

张焱,仇志浪,申洛男,等.甜樱桃扩展蛋白 *PavEXPA2* 基因克隆与表达分析[J].华中农业大学学报,2023,42(1):27-33.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2023.01.004

甜樱桃扩展蛋白 *PavEXPA2* 基因克隆与表达分析

张焱,仇志浪,申洛男,文晓鹏

贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院/
山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室,贵阳 550025

摘要 为揭示甜樱桃中扩展蛋白基因的结构与功能,克隆了甜樱桃 *PavEXPA2* 基因,并分析了该基因在不同组织(茎、花芽、盛开花朵、幼叶、老叶、幼叶叶柄、老叶叶柄、2个脱落高峰期正常果柄与即将脱落果柄、2个脱落高峰期正常果实与脱落果实)及逆境胁迫(使用20% PEG6000和20 mmol/L NaCl溶液分别模拟干旱和盐胁迫,分别处理0、2、4、6、8 h)下的表达情况。结果显示:*PavEXPA2* 基因cDNA全长序列为1 035 bp,开放阅读框(ORF)为852 bp,编码283 aa,蛋白等电点为8.90,分子质量约为30.81 ku,含有2个跨膜螺旋结构和1个信号肽,亚细胞定位预测 *PavEXPA2* 定位于细胞壁;组织表达分析显示,*PavEXPA2* 基因在甜樱桃易脱落组织中表达量较高,如盛开花瓣,即将脱落的果柄、果实、叶柄等,其中在即将脱落叶柄中表达量最高;相对于未处理样品,干旱处理样本 *PavEXPA2* 表达量上升,在处理6 h时表达量达到最高,随后降低;盐胁迫条件下,*PavEXPA2* 表达量呈先下降后上升再下降的趋势,其中在处理6 h时表达量达到最高。结果表明,甜樱桃可能通过 *PavEXPA2* 基因上调促进脱落而抵御逆境胁迫。

关键词 甜樱桃; *PavEXPA2*; 基因克隆; 生物信息学; 逆境胁迫; 器官脱落

中图分类号 S662.5 **文献标志码** A **文章编号** 1000-2421(2023)01-0027-07

甜樱桃 (*Prunus avium* L.) 属蔷薇科 (Rosaceae) 李属 (*Prunus*) 樱亚属植物,原产欧洲及亚洲西部,果实色泽红润,且营养价值高,深受消费者的喜爱,具有较高的经济价值^[1]。

扩展蛋白 (expansins, EXPA) 又称为细胞壁松弛蛋白,广泛存在于植物细胞组织中,是调节细胞壁伸展和松弛的细胞壁蛋白酶^[2]。它首先从黄瓜细胞壁中分离^[3],后来在很多植物中陆续发现了扩展蛋白。此外,扩展蛋白能够通过其他细胞壁酶相互作用,促进细胞壁降解^[4]。近年来,研究发现扩展蛋白基因参与了植物的抗逆过程。Sabirzhanova等^[5]发现,在干旱条件下玉米叶片中扩展蛋白基因转录水平提高,推测扩展蛋白能够特异调节细胞壁松弛。毛竹叶片中扩展蛋白基因 *PeEXPA2* 表达水平也明显升高^[6]。Cho^[7]利用特异启动子使拟南芥 *AtEXP10* 基因超表达促进叶柄脱落;而抑制表达则会减少叶片脱落,并证明了叶柄脱离的原因是由于分离区扩展蛋白受到诱导发生细胞膨胀、使其产生机

械压力而导致的。在花器官脱落过程中, *RbEXPA1* 的表达量上升,在延缓花瓣脱落的过程中, *RbEXPA1* 的转录水平则降低^[8]。

甜樱桃在花发育、坐果及发育期间易出现幼果异常脱落现象,但有关甜樱桃扩展蛋白基因的克隆和功能分析未见报道。基于 *EXPA* 基因在植物器官脱落中的功能,本研究以甜樱桃脱落小果果柄为材料,克隆甜樱桃扩展蛋白基因 *PavEXPA2*,并通过在线软件对其进行生物信息学分析;利用 qRT-PCR 技术分析该扩展蛋白基因在不同组织以及不同胁迫处理中的表达情况,以期阐明其在甜樱桃生长发育中的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及取样

以甜樱桃品种“桑提娜”为材料,分别采集茎、花芽、盛开花朵、幼叶、老叶、幼叶叶柄、老叶叶柄、2个脱落高峰期正常果柄与即将脱落果柄、2个脱落高峰

收稿日期:2022-02-22

基金项目:国家自然科学基金项目(32272649);贵州省教育厅重点项目(黔科合KY字[2021]038)

张焱,E-mail:1694291562@qq.com

通信作者:文晓鹏,E-mail:xpwensc@hotmail.com

期正常果实与脱落果实。以叶片为材料,使用20% PEG6000和20 mmol/L NaCl溶液分别模拟干旱和盐胁迫,采集处理0、2、4、6、8 h的材料,采集后迅速用液氮速冻,后于-80 °C中保存备用。以上材料均设置3个生物学重复。

1.2 甜樱桃 *PavEXPA2* 基因的克隆

用植物多糖多酚RNA提取试剂盒(赛诺生物科技有限公司,中国张家口)提取甜樱桃果柄总RNA,用MutiscanGO(Thermo,美国)和琼脂糖凝胶电泳对RNA质量进行检测,并用PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒(TaKaRa,日本)对甜樱桃果柄总RNA进行cDNA第1链合成,使用内参基因检测cDNA的完整性并于-20 °C保存备用。

在甜樱桃基因组数据库中搜索该基因的CDS序列,利用Primer Premier 5软件设计特异引物PavEXPA2-F: CACATGCTGACCTGTCCTCC、PavEXPA2-R: CC GCCTAACCTCCTAAC TCTAAT,提交至上海生工生物工程有限公司合成。

以cDNA为模板,利用上述合成引物进行PCR扩增。PCR反应体系为: ddH₂O 3 μL,高保真mix (TaKaRa,日本) 5 μL, cDNA 1 μL,上游和下游引物各0.5 μL,共10 μL。PCR反应程序为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 60 °C退火15 s, 72 °C延伸10 s, 35次循环;最后72 °C延伸7 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增PCR产物纯度,用琼脂糖凝胶回收试剂盒对目的条带进行回收,将回收产物连接到pEASY-Blunt Cloning Kit(全式金,北京)并转化DH5α大肠杆菌,37 °C活化1 h后吸取100~200 μL活化产物涂布于Kan抗性的LB平板上,于37 °C过夜培养,待长出菌落后挑取单菌落进行菌落PCR验证,对检验出的阳性克隆进行培养,将阳性菌液送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.3 *PavEXPA2* 基因的生物信息学分析

用NCBI在线分析工具ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)寻找DNA的开放阅读框,通过DNAMAN软件进行蛋白质翻译、NCBI Blastp进行蛋白质同源性比对,利用MEGA5.1构建进化树。利用在线软件TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对*PavEXPA2*蛋白的跨膜结构域进行预测,用ProtParam (<https://web.expasy.org/prot-param/>)分析*PavEXPA2*蛋白的分子质量和等电点

等基本理化性质,用在线分析工具SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>)分析*PavEXPA2*基因所编码的氨基酸序列的信号肽,利用Cell PLoc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)进行亚细胞定位预测。

1.4 qRT-PCR分析

根据克隆获得的*PavEXPA2*基因序列,用primer 5设计特异性引物,引物序列PavEXPA2-Y-F: CTTCTTTCTCATCTCCTCTGCC, PavEXPA2-Y-R: CCAAGGAACCATACC CACAA,在上海生工生物工程有限公司合成。以甜樱桃不同组织的cDNA为模板,以PavRSP3和PavEF1-α2为内参基因^[9],引物序列为: PavEF1-α2-F: ATCCAGAGTAGCA GAACCAATCAC, PavEF1-α2-R: GTTAGGCATCCAGTCCCAGAAT,在CFX 96TM Real-Time System (Bio-rad,美国)实时荧光定量PCR仪上进行。反应采用三步法,程序为: 94 °C预扩增10 min; 94 °C变性15 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 40个循环。采用2^{-ΔΔCt}法计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 甜樱桃 *PavEXPA2* 克隆与生物信息学分析

以甜樱桃果柄cDNA为模板,通过PCR扩增获得与预期目的基因片段大小一致的条带,将目的条带回收并测序,结果显示序列长度为1 035 bp,开放阅读框(ORF)为852 bp,编码283个氨基酸(图1)。

采用ProtParam分析可知,*PavEXPA2*蛋白质分子式为C₁₃₆₆H₂₁₂₅N_{3750.408}S₁₅,等电点为8.90,分子质量约为30.81 ku。*PavEXPA2*蛋白总的负电荷残基数(Asp+Glu)为21个,正电荷残基数(Arg+Lys)为29个,由此推测该蛋白带正电荷。该蛋白含量最丰富的氨基酸分别为丙氨酸Ala(9.9%)、甘氨酸Gly(8.8%)、丝氨酸Ser(8.8%)、亮氨酸Leu(8.8%)和赖氨酸Lys(6.4%)。蛋白的不稳定系数为41.88,这表明该蛋白属于不稳定蛋白质。氨基酸残基疏水性总和(GRAVY)是-0.139,所以该蛋白亲水性较强。

采用SignalP 4.1 Server在线预测得知*PavEXPA2*蛋白存在1个信号肽,且信号肽裂解位点位于41~42(图2)。用在线软件TMHMM Server v.2.0预测跨膜结构域,结果显示,*PavEXPA2*为跨膜蛋白,含有2个跨膜螺旋结构(图3)。利用Cell PLoc 2.0

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
1  ATGGCTTTCCTTCTCTTACTATAAATTTCTGAACTAAATCTGATCAGCAAAATCAAACCTCCAAAATGGCTTTGTTCTTTGCTTCTCTTCTTCTCATCTCTGCTCT
1  M A F P S F Y Y K L S A T N S D Q Q N Q N S K M A L F L C F L F F F L I S S A S
130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
121 GCTTGTGACCGCTGTACGACCAATCCAAGGCAGCTATTTCTCCACAGCCTCTGCACCTTTCATCTGGGGCTTGTGGGTATGGTTCCTTGGCCTTGGGACTTGGTGGAGGCACCTTGA
41  A C D R C T H Q S K A A Y F S T A S A L S S G A C G Y G S L A L G L G G G H L A
250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
241 GCTGGTGTGCCTTCCCTCTACAAGATGGAGCTGGCTGTGGTGCATGCTTCCAGATAAGATGCAAGAACACGACTCTTGCACAAAACAAGGACAGAAATTACTTTGACTGATCTCAAT
81  A G V P S L Y K D G A G C G A C F Q I R C K N T T L C T K Q G T R I T L T D L N
370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
361 AAAAGTAATCAGACAGATTTTCTTCAGCAGCAGAGCTTTCATGGCCATGGCTCAAAGGGTTGGGCCAAGACATTTGAGACGGCCATTGTCGATGTGGAATATAAGAGGTACCA
121 K S N Q T D F V L S S R A F M A M A Q K G L G Q D I L R R G I V D V E Y K R V P
490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
481 TGTGAATACAAAACCAAATCTAGCCTTGCCTGTGGAAGAATCGAGCCAAAAGCCACATTACTTAGCAATCAAATTCGTATCAAGTGGTCAGACAGAAATAGTAGCCATTGATGT
161 C E Y K N Q N L A L R V E E S S Q K P H Y L A I K I L Y Q G G Q T E I V A I D V
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
601 GCTCAGTCCGGTTCTCAAATTTGAGTTTCCCTGACTCGAAACAATGGGGCAATCTGGGACACGAGTAGGGTTCCGGCAGGGGACCTACAGTTCGGGTTCTTGGTGACGGCCGGGTACGAT
201 A Q V G S S L N W S F L T R N N G A I W D T S R V P A G D L O F R F L V T A G Y D
730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
721 GGGAAACCGTTTGGCCAAAGAATGTGCTCCCTGCTAACTGGAAACCTGGGGTGATATGACACAAAAGTTCAAATCAGTGACATTCGAAAAGATGGTGTCTCTCTGTGATGATGGG
241 G K T V W A K N V L P A N W K P G V I Y D T K V Q I S D I A K D G C S P C D D G
850
841 AACTGGAAATGA
281 N W K *

```

图1 *PavEXPA2*基因ORF序列及编码的氨基酸序列

Fig.1 ORF sequence and encoded amino acid sequence of *PavEXPA2* gene

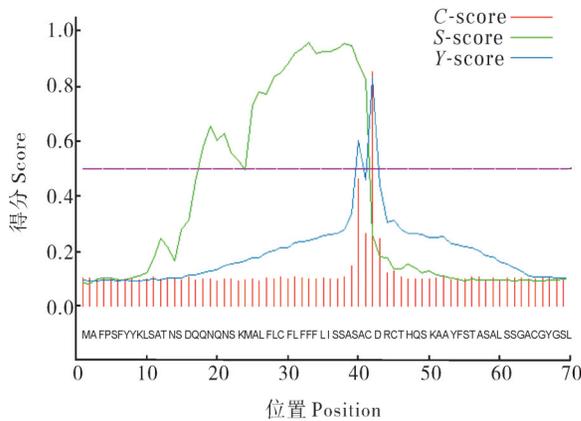


图2 *PavEXPA2*蛋白的信号肽预测

Fig. 2 Signal peptide prediction of *PavEXPA2* protein
在线软件对甜樱桃 *PavEXPA2* 蛋白进行亚细胞定位预测分析,发现该蛋白主要位于细胞壁中。

2.2 *PavEXPA2*基因的同源性分析

将 *PavEXPA2* 基因序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 同源检索,发现它与很多植物都具有较高的同源性,其中与扁桃 (*Prunus dulcis*)、桃 (*Prunus persi-*

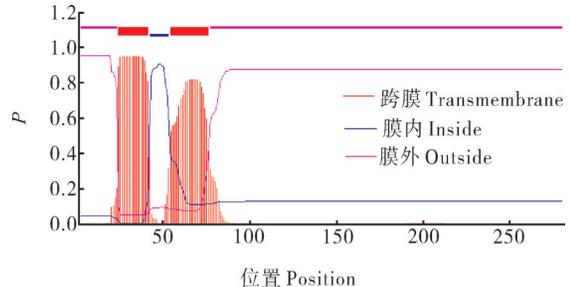


图3 *PavEXPA2* 蛋白的跨膜域预测

Fig. 3 Prediction of the transmembrane domain of *PavEXPA2* protein

ca)、梅 (*Prunus mume*) 扩展蛋白基因同源性最高,分别为 97.49%、97.47% 和 96.91%,并且发现 *PavEXPA2* 有较高保守性,含有 DPBB_1 保守结构域。

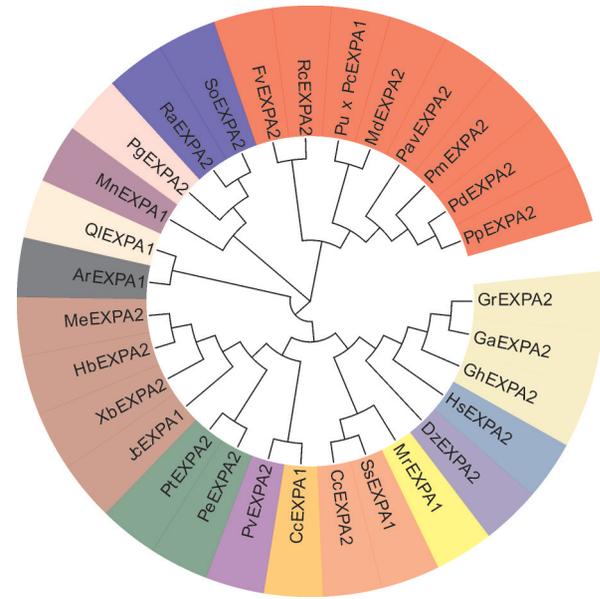
利用 DNAMAN 软件将 *PavEXPA2* 基因的开放阅读框翻译成氨基酸序列,并将其序列与 30 个和 *PavEXPA2* 蛋白同源性较高的氨基酸序列进行对比,发现该基因编码氨基酸序列与桃、扁桃和梅扩展蛋白氨基酸序列的同源性较高,分别为 95.58%、95.56% 和 94.76%。

利用 MEGA5.1 软件对甜樱桃扩展蛋白 *PavEXPA2* 与 BLAST 检索得到其他物种(柑橘、杨梅、胡杨、杨树)扩展蛋白氨基酸序列全长,构建系统进化树,结果发现甜樱桃 *PavEXPA2* 与 *PmEXPA2*(梅)、*PdEXPA2*(扁桃)和 *PpEXPA2*(桃)序列相似程度最高,亲缘关系最近(图4)。

2.3 *PavEXPA2*的组织特异性表达

PavEXPA2 在甜樱桃“桑提娜”即将脱落组织,如茎、花芽、花朵、叶、叶柄、果柄和果实的表达结果显示,在成熟叶叶柄中表达量最高,随后依次是盛开

花朵、第2落果高峰即将脱落果柄、成熟叶、第1落果高峰即将脱落果柄、第2落果高峰即将脱落果实,在第1落果高峰正常果实中表达量最低。而在第1落果高峰正常果柄、第2落果高峰正常果柄、花芽、第1落果高峰即将脱落果实、第2落果高峰正常果实、幼叶叶柄、幼叶以及茎中基本检测不到表达(图5)。因此, *PavEXPA2* 基因主要是在成熟叶及其叶柄、脱落果柄和盛开花朵中表达,且在这些组织的表达与其成熟和脱落进程大致同步,由此推测该基因可能参与甜樱桃组织脱落的调控,尤其与叶柄脱落相关。



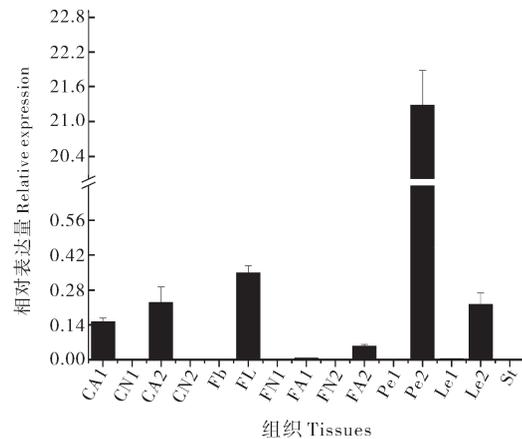
来源物种 Species of EXPA: GrEXPA2: 棉花 *Gossypium*; GaEXPA2: 木本棉 *Bombax*; GhEXPA2: 陆地棉 *Gossypium hirsutum*; HsEXPA2: 木槿; *Hibiscus syriacus*; DzEXPA2: 榴莲 *Durio zibethinus*; MrEXPA1: 杨梅 *Myrica rubra*; SsEXPA1: 密花豆 *Spatholobus suberectus*; CcEXPA2: 木豆 *Cajanus cajan*; CcEXPA1: 柑橘 *Citrus*; PvEXPA2: 阿月浑子 *Pistacia vera*; PeEXPA2: 胡杨 *Populus euphratica*; PtEXPA2: 杨树 *Populus*; JcEXPA1: 麻风树 *Jatropha curcas*; XbEXPA2、HbEXPA2: 橡胶 *Hevea brasiliensis*; MeEXPA2: 木薯 *Manihot esculenta*; ArEXPA1: 猕猴桃 *Actinidia chinensis*; QiEXPA1: 白栎 *Quercus fabri*; MnEXPA1: 桑 *Morus*; PgEXPA2: 石榴 *Punica granatum*; RaEXPA2: 玫瑰木 *Rhodammia*; SoEXPA2: 蒲桃 *Syzygium jambos*; FvEXPA2: 草莓 *Fragaria* × *ananassa*; RcEXPA2: 月季 *Rosa chinensis*; Pu×PcEXPA1: 梨 *Pyrus* spp.; MdEXPA2: 苹果 *Malus*; PavEXPA2: 樱桃 *Prunus avium*; PmEXPA2: 梅 *Prunus*; PdEXPA2: 扁桃 *Amygdalus communis*; PpEXPA2: 桃 *Amygdalus persica*.

图4 甜樱桃 *PavEXPA2* 系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of sweet cherry *PavEXPA2* and the α -expansins of other plant species

2.4 *PavEXPA2*对非生物逆境的应答

在20% PEG6000和20 mmol/L NaCl处理后 *PavEXPA2* 基因的相对表达量结果(图6)显示,在干旱处理(20% PEG6000处理)条件下, *PavEXPA2* 基因表达量逐渐上升,在处理6 h时的表达量达到峰值,同时盐胁迫(20 mmol/L NaCl处理)下其表达量也在6 h达到峰值。而在两者表达量均达到峰值时,干旱胁迫下该基因的表达量显著高于盐胁迫,推测甜樱桃在抵御干旱及盐胁迫过程中,通过 *PavEXPA2* 基因上调表达而响应逆境胁迫。表明 *PavEXPA2* 在甜樱桃抵御非生物胁迫时可能起着关键作用,尤其是对于干旱胁迫的响应较为明显。



CA1: 第1落果高峰即将脱落果柄; CN1: 第1落果高峰正常果柄; CA2: 第2落果高峰即将脱落果柄; CN2: 第2落果高峰正常果柄; Fb: 花芽; FL: 盛开花朵; FN1: 第1落果高峰即将脱落果实; FA1: 第1落果高峰正常果实; FN2: 第2落果高峰正常果实; FA2: 第2落果高峰即将脱落果实; Pe1: 幼叶叶柄; Pe2: 成熟叶叶柄; Le1: 幼叶; Le2: 成熟叶; St: 茎。 CA1: Abscising carpoidium in the first peak of fruitlet abscission; CN1: Retention carpoidium in the peak of fruitlet abscission; CA2: Abscising carpoidium in the second peak of fruitlet abscission; CN2: Retention carpoidium in the second peak of fruitlet abscission; Fb: Flower bud; FL: Flower; FN1: Retention fruitlet in the first peak; FA1: Abscising fruitlet in the first peak; FN2: Retention fruitlet in the second peak; FA2: Retention fruitlet in the second peak; Pe1: Young leaf petiole; Pe2: Old leaf petiole; Le1: Young leaf; Le2: Old leaf; St: Stem.

图5 甜樱桃 *PavEXPA2* 基因组织差异性表达分析

Fig.5 Differential expression of *PavEXPA2* gene in sweet cherry

3 讨论

本研究从甜樱桃克隆了1个扩展蛋白基因家族成员 *PavEXPA2*, 其编码蛋白与桃、扁桃、梅等扩展蛋白氨基酸序列有较高的同源性, *PavEXPA2* 参与甜樱桃器官脱落的调控, 尤其是叶柄脱落; 在干旱及

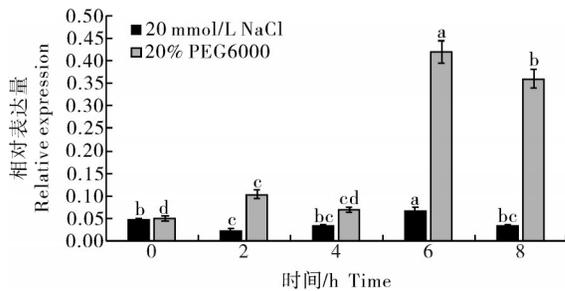


图6 盐处理和干旱胁迫下甜樱桃 *PavEXPA2* 基因的表达

Fig.6 Expression of *PavEXPA2* gene in sweet cherry under salt and drought treatments

盐胁迫下, *PavEXPA2* 基因均上调表达。因此, 甜樱桃可能通过该基因上调促进脱落而抵御逆境胁迫。

扩展蛋白是1个庞大的多基因家族, 目前植物扩展蛋白一般分为4类, 分别为 α -expansin (EXPA)、 β -expansin (EXPB)、类 α -expansin (EXLA) 和类 β -expansin (EXLB)^[10-11]。扩展蛋白基因在植物基因组中广泛存在, 但在基因家族序列的组成、数量、功能等方面, 不同物种间有很大差异^[12]。研究较多的是 α -expansin 和 β -expansin, 越来越多研究表明, 在植物整个生长发育进程中扩展蛋白(尤其是 α -扩展蛋白)几乎都有参与。在种子萌发、根毛起始和延长、茎和叶生长发育、叶柄脱落、花粉管延长以及果实成熟等过程中都有扩展蛋白参与^[4]。另外, Downes^[12]在大豆中同样发现了1个 β 型扩展蛋白基因 *CIM1*, 该基因通过软化柱头与花柱细胞的细胞壁、协助花粉管伸长生长, 从而协助花粉管通过花柱进入子房, 显示出扩展蛋白功能的多样性。

3.1 *PavEXPA2* 基因与植物器官脱落

在其他物种中, 例如在草莓^[13-14]、枇杷^[15]及葡萄^[16]等植物中, 扩展蛋白与果实的成熟软化相关。Cho^[7]在拟南芥叶以及叶柄基部分析表明, 扩展蛋白参与了拟南芥叶柄的脱落过程。此外, Tucker等^[17]的研究也发现在大豆脱落叶柄离区中扩展蛋白有显著上调。西洋接骨木 (*Sambucus nigra* L.) 的花脱落过程中能观察到离区中扩张蛋白的多克隆抗体标记逐渐增加, 并且在脱落之前的黄化阶段检测到高水平的扩展蛋白, 且离区中编码扩展蛋白基因 *SmiExp2* 和 *SmiExp4* 上调表达^[18]。因此, 扩展蛋白在植物器官脱落过程中发挥了重要作用。

本研究克隆得到1个甜樱桃中的扩展蛋白 *PavEXPA2*, 通过 qRT-PCR 发现 *PavEXPA2* 在成熟的器官及易脱落的组织中高表达, 生物信息学分析结

果表明, 此基因可能在细胞壁中发挥作用。许多研究表明, 扩展蛋白可重塑细胞壁, 破坏纤维素和半纤维素之间的氢键^[19-20]。细胞壁是植物细胞连接的部分, 在植物器官脱落的过程中, 同样涉及细胞壁的变化^[21]。本研究中甜樱桃 *PavEXPA2* 在一些易脱落或者趋向脱落的器官中均有较高的表达量, 说明该基因可能与甜樱桃组织的脱落相关。扩展蛋白在细胞中的功能机制已经较为明晰, 但是该基因如何参与甜樱桃器官脱落尚需进一步深入研究。

3.2 *PavEXPA2* 基因与非生物胁迫

扩展蛋白在响应非生物胁迫中有重要作用, 在烟草中过表达 *TaEXPA2* 基因能提高植株对盐^[22]、干旱^[23] 和镉^[24] 的抗性。同样的, 在烟草中过表达 *TaEXPB23* 基因, 提高了烟草的抗氧化和盐胁迫^[25] 的能力。在干旱条件下, 小麦胚芽鞘扩展蛋白基因的表达上调^[26-27] 说明干旱条件下, 扩展蛋白基因的功能发生了变化。Dai等^[28]在拟南芥中过表达月季扩展蛋白基因 *RhEXPA4*, 增强了植株的抗旱性。在高盐条件下, 玉米叶片细胞的扩展蛋白基因 *ZmEXPA1* 的表达上调^[29], 上述研究都表明扩展蛋白与植物的抗逆性相关。本研究中 *PavEXPA2* 表达量在干旱和盐胁迫下均上调, 与以上研究结果一致, 说明该基因在甜樱桃抗逆过程中同样有着关键作用。

由于贵州的寡日照及喀斯特高原的特殊地理条件, 樱桃的生长及果实的发育有着一定的限制。甜樱桃在幼果阶段的异常脱落已经是制约贵州甜樱桃发展的一个严峻问题, 而关于甜樱桃生理落果的分子信号机制仍旧比较模糊。在逆境胁迫时, 扩展蛋白主要通过调节植物细胞壁的组分以增加细胞壁的柔韧性从而缓解胁迫对细胞造成的压力^[30]。细胞的变化在逆境胁迫和脱落中存在相似之处, 对扩展蛋白基因的功能研究有助于在细胞层面解析甜樱桃幼果异常脱落的机制。

参考文献 References

- [1] 夏惠, 林玲, 高帆, 等. 甜樱桃 '佐藤锦' 果实生长发育过程 AsA 含量及其相关酶活性的变化[J]. 西北植物学报, 2016, 36(10): 2008-2014. XIA H, LIN L, GAO F, et al. Changes of AsA content and related enzyme activities in sweet cherry 'Satonishiki' fruit during development [J]. Northwestern journal of botany, 2016, 36(10): 2008-2014 (in Chinese with English abstract).
- [2] 赵美荣, 李永春, 黄文婕. 扩展蛋白在果实成熟过程中的作用研究进展[J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2016, 32(11): 11-13. ZHAO M R, LI Y C, HUANG W J. Research progress on the

- role of expansins in fruit ripening[J].Journal of Chifeng University (natural science edition), 2016, 32(11): 11-13(in Chinese).
- [3] MCQUEEN-MASON S. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants [J]. The plant cell online, 1992, 4(11): 1425-1433.
- [4] 徐筱,徐倩,张曙,等.植物扩展蛋白基因的研究进展[J].北京林业大学学报, 2010, 32(5): 154-162.XU X, XU Q, ZHANG L, et al. Advancements in expansin genes of plants[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2010, 32(5): 154-162 (in Chinese with English abstract).
- [5] SABIRZHANOVA I B, SABIRZHANOV B E, CHEMERIS A V, et al. Fast changes in expression of expansin gene and leaf extensibility in osmotically stressed maize plants[J]. Plant physiology & biochemistry, 2005, 43(4): 419-422.
- [6] 马霜.毛竹扩展蛋白家族全基因组分析及PeEXPA8功能研究[D].绵阳:西南科技大学, 2021.MA S. Genome-wide analysis of the expansin gene family in *Phyllostachys edulis* and functional analysis of PeEXPA8 [D]. Mianyang: Southwest University of Science and Technology, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [7] CHO H. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* [J]. PNAS, 2000, 97(17): 9783-9788.
- [8] SANE A P, TRIPATHI S K, NATH P. Petal abscission in rose (*Rosa bourboniana* var Gruss an Teplitz) is associated with the enhanced expression of an alpha expansin gene, RbEXPA1 [J]. Plant science, 2007, 172(3): 481-487.
- [9] 仇志浪,何美乾,文壮,等.甜樱桃花芽不同发育时期内参基因的筛选与验证[J].种子, 2020, 39(2): 37-43. QIU Z L, HE M Q, WEN Z, et al. Selection and validation of reference genes in sweet cherry flower bud at different development stages [J]. Seed, 2020, 39(2): 37-43 (in Chinese with English abstract).
- [10] KENDE H, BRADFORD K, BRUMMELL D, et al. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins [J]. Plant molecular biology, 2004, 55(3): 311-314.
- [11] 李昊阳,施杨,丁亚娜,等.杨树扩展蛋白基因家族的生物信息学分析[J].北京农业大学学报, 2014, 36(2): 59-67. LI H Y, SHI Y, DING Y N. Bioinformatics analysis of expansin gene family in poplar genome [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2014, 36(2): 59-67 (in Chinese with English abstract).
- [12] DOWNES B P. Expression and processing of a hormonally regulated beta-expansin from soybean [J]. Plant physiology, 2001, 126(1): 244-252.
- [13] CIVELLO P M. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit [J]. Plant physiology, 1999, 121(4): 1273-1280.
- [14] HARRISON E P, MCQUEEN-MASON SIMON J, KENNETH M. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit [J]. Journal of experimental botany, 2001(360): 1437-1446.
- [15] MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ D, GOUBLE B, GOMEZ R M, et al. Two expansin cDNAs from *Prunus armeniaca* expressed during fruit ripening are differently regulated by ethylene [J]. Plant physiology & biochemistry, 2002, 40(5): 445-452.
- [16] ISHIMARU M, SMITH D L, GROSS K C, et al. Expression of three expansin genes during development and maturation of kyoho grape berries [J]. Journal of plant physiology, 2007, 164: 1675-1682.
- [17] TUCKER M L, BURKE A, MURPHY C A, et al. Gene expression profiles for cell wall-modifying proteins associated with soybean cyst nematode infection, petiole abscission, root tips, flowers, apical buds, and leaves [J]. Journal of experimental botany, 2007, 58(12): 3395-3406.
- [18] TSUCHI M, SATOH T, IWAI H, et al. Distribution of XTH, expansin, and secondary-wall-related CesA in floral and fruit abscission zones during fruit development in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J/OL]. Frontiers in plant science, 2015, 323[2022-02-22]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00323>.
- [19] JOHN B E, BENEDETTO R, ALAN R J, et al. Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra* [J]. Journal of experimental botany, 2005, 56(413): 817-823.
- [20] PATHARKAR O R, WALKER J C. Advances in abscission signaling [J]. J Exp Bot, 2018, 69(4): 733-740.
- [21] REICHARDT S, PIEPHO H P, STINTZI A, et al. Peptide signaling for drought-induced tomato flower drop [J]. Science, 2020, 367(6485): 1482-1485.
- [22] CHEN Y, HAN Y, KONG X, et al. Ectopic expression of wheat expansin gene TaEXPA2 improved the salt tolerance of transgenic tobacco by regulating Na⁺/K⁺ and antioxidant competence [J]. Physiologia plantarum, 2017, 159(2): 161-177.
- [23] CHEN Y, HAN Y, ZHANG M, et al. Overexpression of the wheat expansin gene TaEXPA2 improved seed production and drought tolerance in transgenic tobacco plants [J/OL]. PLoS One, 2016, 11(4): e0153494 [2022-02-22]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153494>.
- [24] REN Y, CHEN Y, AN J, et al. Wheat expansin gene TaEXPA2 is involved in conferring plant tolerance to Cd toxicity [J]. Plant science, 2018, 270: 245-256.
- [25] HAN Y, CHEN Y, YIN S, et al. 2015. Over-expression of TaEXPB23, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants [J]. Journal of plant physiology, 173: 62-71.
- [26] YANG Y H, AI X L, FENG L, et al. Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, TaEXPB23, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation [J]. Plant Physiol Biochem, 2012, 54: 49-58.
- [27] GAO Q, ZHAO M, FENG L, et al. Expansins and coleoptile elongation in wheat [J]. Protoplasma, 2008, 233(s1/2): 73-81.
- [28] DAI F, ZHANG C, JIANG X, et al. RhNAC2 and RhEXPA4

- are involved in the regulation of dehydration tolerance during the expansion of rose petals [J]. *Plant physiology*, 2012, 160 (4): 2064-2082.
- [29] VESELOV D S, SABIRZHANOVA I B, SABIRZHANOV B E, et al. Changes in expansin gene expression, IAA content, and extension growth of leaf cells in maize plants subjected to salinity [J]. *Russian journal of plant physiology*, 2008, 55(1): 101-106.
- [30] 赵美荣, 李永春, 王玮. 扩展蛋白与植物抗逆性关系研究进展 [J]. *植物生理学报*, 2012, 48(7): 637-642. ZHAO M R, LI Y C, WANG W. Research progress on relationship between expansin and plant resistance [J]. *Plant physiology journal*, 2012, 48 (7): 637-642(in Chinese with English abstract).

Cloning and expression of expansin *PavEXPA2* gene in sweet cherries

ZHANG Yan, QIU Zhilang, SHEN Luonan, WEN Xiaopeng

The Key Laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education) / Institute of Agro-Bioengineering / College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract Expansin is a kind of protein widely found in plants. It may relax the cell wall and plays an important role in the growth and development, and the stress response of plants. The *PavEXPA2* gene was cloned and bioinformatically analyzed to uncover the structure and function of expansin gene (*EXPA*) in sweet cherries. The gene expression in different tissues including stems, flower buds, blooming flowers, young leaves, old leaves, petioles of young leaves, petioles of old leaves, normal fruit stalks at the 2 abscission peaks and about to abscission, the normal fruits at 2 abscission peaks and shedding, and under the abiotic stresses including using 20% PEG6000 and 20 mmol/L NaCl solutions to simulate drought and salt stress for 0, 2, 4, 6, and 8 h was profiled. The results showed that the full length of *PavEXPA2* was 1 035 bp with the open reading frame (ORF) of 852 bp, encoding 283 amino acids. The putative protein has an isoelectric point of 8.90 and a molecular mass of 30.81 ku, containing two transmembrane helical structures and a signal peptide. The results of subcellular location showed that the protein of gene was located in the cell wall. The results of tissue expression analysis showed that the expression level of *PavEXPA2* was higher in the easily abscised tissues of sweet cherry including flowers, stalks, fruits and petioles, with the highest level in petioles about to abscission. Compared with the samples untreated, the expression of *PavEXPA2* in the drought-treated samples increased, and the expression reached the highest at 6 h, and then decreased. Under the salt stress, the expression level of *PavEXPA2* decreased first, then increased and then decreased, and the expression level reached the highest at 6 h. Therefore, sweet cherries may resist stress by promoting abscission through the up-regulation of *PavEXPA2* gene. It will lay a theoretical foundation for further understanding the role of *PavEXPA2* in the growth and development of sweet cherries.

Keywords sweet cherry; *pavEXPA2*; gene cloning; bioinformatics; abiotic stress; organ abscission

(责任编辑: 张志钰)