

苹果 14-3-3 基因家族的鉴定与 *MdGRF13* 的功能分析

任家玄, 李艳梅, 马维峰, 吴宙, 毛娟*

(甘肃农业大学园艺学院, 兰州 730070)

摘要:【目的】通过鉴定和分析苹果 14-3-3 基因家族, 并在苹果愈伤组织中过表达 *MdGRF13*, 研究逆境胁迫下其对苹果愈伤组织生长的影响, 为探究该家族基因功能提供理论参考。【方法】利用生物信息学方法对苹果 14-3-3 基因家族进行鉴定和表达分析, 构建 *MdGRF13* 过表达载体并转化苹果愈伤组织。【结果】共鉴定出 36 个苹果 14-3-3 基因家族成员。系统进化分析将该家族成员分为 ϵ 类和非 ϵ 类, 每个亚族基因结构相似, 且高度保守。共线性分析发现片段重复是该基因家族扩张的主要原因。基因组织特异性表达分析显示, 苹果 14-3-3 家族基因在茎中多数上调表达。亚细胞定位表明 *MdGRF13* 蛋白定位在细胞核、细胞质和细胞膜上。qRT-PCR 分析发现, 在 PEG 和 NaCl 处理下分别有 14 和 13 个基因在不同时间点上上调表达。过表达型(OE)愈伤组织在 PEG 和 NaCl 处理下长势优于野生型(WT)。【结论】鉴定出 36 个苹果 14-3-3 基因家族成员, 且各亚族成员结构高度保守。过表达 *MdGRF13* 增强了苹果愈伤组织的抗旱性和耐盐性。

关键词: 苹果; 14-3-3 基因家族; 表达分析; 亚细胞定位; 愈伤组织

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2023)03-0405-17

Identification of 14-3-3 gene family and functional analysis of *MdGRF13* gene in apple

REN Jiakuan, LI Yanmei, MA Weifeng, WU Zhou, MAO Juan*

(College of Horticulture, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: 【Objective】 In this study, the physicochemical properties, structure and evolutionary relationships of 14-3-3 proteins in the apple genome, as well as their expression in different tissues and under stress conditions were analyzed. Meanwhile, overexpression of *MdGRF13* in apple callus under stress was investigated. The purpose of this study was to provide theoretical references for exploring the functions of 14-3-3 family of genes in apple. 【Methods】 The 14-3-3 genes of apple were blasted via *Arabidopsis* and rice protein sequences, and then the conserved domains were searched by SMART and Pfam online websites to remove the apple sequences without conserved domains. ExPASy and SOPMA tools were used to predict the protein's physical and chemical properties and secondary structure, respectively. MEGA7.0 software was used to construct the phylogenetic tree. The gene structures and protein conserved motifs were analyzed by online tools GSDS and MEME, respectively. Ttools software was used to analyze the synteny among apple, *Arabidopsis* and rice, and the protein interaction network was analyzed through STRING protein interaction database. The qRT-PCR was used to analyze the differential expression in roots, stems and leaves of the Gala seedlings. The expression of 14-3-3 genes treated with 15% PEG, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA and 200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl at different time points were measured in Gala plantlet leaves. The *MdGRF13* was cloned and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 cells. The recombinant plasmid pCAMBIA1300-*MdGRF13*-GFP and the control pCAMBIA1300-GFP were genetically introduced into *Nicotiana benthamiana* leaves. After the tobaccos were

收稿日期: 2022-07-07

接受日期: 2022-10-09

基金项目: 甘肃省教育厅双一流重大科研项目(GSSYLXM-02); 甘肃省高等学校产业支撑引导项目(2019C11)

作者简介: 任家玄, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为果树生物技术与种质创新。Tel: 18894012827, E-mail: 1975528906@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13659425539, E-mail: maojuan@gsau.edu.cn

cultured in dark for 2 days, the GFP fluorescence was observed under a laser confocal microscope. Finally, the apple callus was genetically transformed by GV3101, and the transgenic callus were identified by PCR. The fresh weight, MDA content, and the enzyme activities of CAT, POD and SOD of wild-type and overexpression callus were measured after 15 days of PEG and NaCl treatment. 【Results】 According to the sequence analysis of the apple 14-3-3 genes, the amino acid lengths were 98-1006 aa, the molecular weights were 11 221.52-113 854.16 Da, and the theoretical isoelectric points ranged from 4.68 to 10.55. The secondary structure of the 14-3-3 proteins was dominated by alpha helix, followed by random coil, beta turn and extended strand. Phylogenetic analysis revealed that 14-3-3 gene family members in apple were divided into ϵ -group and non- ϵ -group, as well as conserved motifs showed that each subfamily gene contained motif 3, which was highly conserved. Meanwhile, the analysis of gene structures found that the distribution positions and lengths of exons in different subfamilies had obvious differences. *MdGRF11*, *MdGRF14*, *MdGRF23* and *MdGRF27* had only one intron, *MdGRF16* and *MdGRF26* had two introns, and *MdGRF7* and *MdGRF24* had 14 introns. *MdGRF24* and *MdGRF33* were significantly longer than other 14-3-3 genes. In addition, *MdGRF2*, *MdGRF8*, *MdGRF13* and *MdGRF28* belonged to the intron deletion class, and all sequences only contained different exons. The synteny analysis revealed that 10 syntenic gene pairs were contained in this gene family, and there were 6 gene pairs tandem duplication. The 14-3-3 proteins had obviously interacted with FT2, MdFT1 and XP_008366662.1, which were involved in growth, development and flowering regulation processes. The prediction of subcellular localization indicated that MdGRF13 proteins were localized in the nucleus, cytoplasm and cell membrane. The 14-3-3 genes were expressed in different tissues, and they were obviously up-regulated in stems. With ABA treatment, the expression levels of most genes were down-regulated. With PEG treatment, 14 genes were up-regulated. With NaCl treatment, the expression levels of *MdGRF4*, *MdGRF5*, *MdGRF13*, *MdGRF14* and *MdGRF16* were significantly up-regulated compared with the control. The phenotypes of the wild-type and overexpression lines treated with different concentrations of PEG showed that the growth of wild-type (WT) callus was weaker than that of overexpression (OE), while the growth of callus by 2% PEG treatment was better than that by 4% PEG. With NaCl treatment, the growth of transgenic (OE) callus was better than that of wild type (WT), and the growth treated with 0.06 mol · L⁻¹ NaCl was better than that with 0.08 mol · L⁻¹ NaCl treatment. With 0.08 mol · L⁻¹ NaCl treatment, the fresh weight, MDA content, the activities of CAT, POD and SOD of WT callus were not significantly different from those of OE. While with other NaCl and PEG treatments, the fresh weight, the activities of CAT, POD and SOD of WT callus were lower than those of OE, the MDA content of OE was lower than that of WT. 【Conclusion】 In this study, 36 members of apple 14-3-3 family were identified by bioinformatics. Phylogenetic analysis showed that they had high homology with *Arabidopsis thaliana*, and the members of each subfamily were conserved. Subcellular localization assay showed that MdGRF13 protein was localized in the nucleus, cytoplasm and cell membrane. Overexpression of *MdGRF13* enhanced the drought resistance and salt tolerance of apple callus. It provided a theoretical basis for the study on apple 14-3-3 family in response to stress.

Key words: Apple; 14-3-3 gene family; Expression analysis; Subcellular localization; Callus

植物在生长发育过程中会受到高盐、干旱、低温和重金属离子毒害等环境变化引起的非生物胁迫,造成植物生长缓慢或死亡^[1-2]。为了适应这些非生物胁迫,植物自身进化出多种保护系统来抵御逆境胁迫

所造成的损伤^[3]。14-3-3作为应激诱导蛋白通过参与真核生物转录调控和信号转导来增强植物对逆境的耐受性,它通过激素信号途径和离子通道来调控多种靶标的活性,在非生物胁迫中起关键作

用^[4-6]。14-3-3蛋白也具有调节植物生长和发育的功能,其与钙调蛋白激酶CDPK(calcium-dependent protein kinase)共同作用调控植物新陈代谢、激素合成和开花等多种生物学途径^[7-8]。

目前14-3-3蛋白已在甜瓜(*Cucumis melo*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、大豆(*Glycine max*)、苜蓿(*Medicago truncatula*)、杨树(*Populus trichocarpa*)、水稻(*Oryza sativa*)、花生(*Arachis hypogaea*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)和芒果(*Mangifera indica*)中完成了鉴定^[9-17]。研究发现,根据系统进化和内含子数量,14-3-3基因家族划分为 ϵ 类和非 ϵ 类,非 ϵ 类含有4个外显子和3个内含子,而 ϵ 类一般包含6~7个外显子和4~6个内含子^[8,16-17]。14-3-3基因在小麦、葡萄和香蕉生殖器官中高表达来调节植物淀粉合成、果实发育和浆果成熟等过程^[18-20]。研究发现,4个Md14-3-3蛋白与花整合因子MdTFL1和MdFT相互作用参与植物开花调控^[21],而过表达毛竹PvGF14b、PvGF14c和PvGF14e能够延缓拟南芥的开花时间^[22]。在番茄根系中,14-3-3蛋白通过调控脱落酸(abscisic acid, ABA)信号通路来维持植物细胞渗透平衡和气孔开度,进而响应干旱或盐碱逆境胁迫^[9]。前人研究发现,小麦TaGF14b在烟草中过表达增强了植物对非生物胁迫的耐受性^[23]。此外,Xia等^[15]通过qPCR发现芒果植株在干旱处理12 h后Mi14-3-3-A1的表达呈现下降趋势。水稻OsCPK21与OsGF14e磷酸化作用来调控ABA信号转导和耐盐性,而拟南芥14-3-3蛋白质充当盐过度敏感(SOS)信号通路分子开关,响应盐胁迫^[24-25]。棉花叶片中的5个基因(*GhGRF3*、*GhGRF4*、*GhGRF5*、*GhGRF7*和*GhGRF16*)^[26]在盐胁迫下下调表达。同时,过表达MdGRF11可提高转基因苹果愈伤组织和拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性^[27]。以上研究表明14-3-3家族蛋白在植物生长、发育和胁迫反应中具有重要作用。

苹果(*Malus × domestica* Borkh.)是中国广泛种植的经济水果之一,而干旱和盐碱等非生物胁迫仍是限制我国苹果产业发展的重要因素。笔者在本研究中利用拟南芥和水稻蛋白序列在苹果基因组中进行同源比对,鉴定出36个苹果14-3-3基因家族成员,对其理化性质、系统进化关系及保守基序进行分析,并探究该家族基因在植物组织和逆境胁迫下的表达情况,以及分析过表达MdGRF13愈伤组织在

PEG和NaCl胁迫下的影响,为该家族基因响应逆境功能研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与处理

试验于2021年在甘肃农业大学园艺学院果树生理与生物技术实验室进行。选择继代培养30 d生长良好且一致的苹果品种嘎拉实生苗外植体扩繁的试管苗,转接到含有15% PEG、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA和200 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl^[28]的MS液体培养基(降低浓度误差)进行处理,以等体积MS培养基处理为对照,对照与各处理同步时长均为2、12和24 h, pH值为5.8~6.0,采用纸桥法进行固定。每组处理设置3个生物学重复,每个重复5株试管苗。使用qRT-PCR对10年生嘎拉实生苗(甘肃农业大学日光温室)进行组织特异性数据分析。另外,使用本实验保存的苹果王林愈伤组织进行MdGRF13的过表达分析。

1.2 苹果14-3-3家族基因的鉴定

用拟南芥(<https://www.arabidopsis.org/>)和水稻(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.sh-tml>)14-3-3家族的蛋白序列在苹果数据库GDR(<https://www.rosaceae.org/>)中利用Blast工具进行比对,然后用SMART(<http://smart.emblheidelberg.de/>)和Pfam(<http://pfam.sanger.ac.uk/search>)在线网站进行保守结构域的检索,去除不含保守结构域的苹果序列,根据苹果14-3-3家族基因在染色上的位置进行命名。

1.3 苹果14-3-3家族蛋白理化性质及二级结构分析

对苹果14-3-3家族蛋白的理论等电点(pI)、分子质量和不稳定性指数等基本信息使用ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam/>)工具进行分析。根据二级结构在线工具SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对苹果14-3-3家族蛋白进行 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲比例的预测。

1.4 苹果14-3-3家族蛋白系统进化分析

下载大豆、番茄和二穗短柄草(NCBI)14-3-3家族蛋白序列,与拟南芥、水稻以及苹果蛋白序列用MEGA 7.0软件比对并构建系统进化树,校验参数默认值为1000。

1.5 苹果 14-3-3 家族蛋白结构和保守基序分析

采用 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 对苹果 14-3-3 家族基因成员进行基因结构分析; 利用在线网站 MEME (<http://meme-suite.org/>) 对其蛋白保守基序预测。

1.6 苹果 14-3-3 家族基因共线性和蛋白互作网络分析

利用软件 TBtools 1.6 对苹果 14-3-3 家族基因进行共线性分析, 绘制关系图。通过 Phytozome v12.1: Home (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 下载拟南芥和水稻的 CDS 序列及基因注释文件, 在 GDR (<https://www.rosaceae.org/>) 中下载苹果的基因组数据, 使用 TBtools 1.6 软件绘制苹果、水稻和拟南芥之间的关联性图。对 36 个苹果 14-3-3 家族蛋白通过 String 蛋白互作数据库 (<http://string-db.org/>) 进行蛋白互作网络分析和参数默认。

1.7 实时荧光定量 qRT-PCR 分析

36 个苹果 14-3-3 家族基因 qRT-PCR 引物 (表 1), 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司在线设计, 提取 RNA, 用反转录试剂盒 (Prime Script RT reagent Kit, Perfect Real Time, TaKaRa) 合成 cDNA; 用实时荧光定量 PCR 仪 (LightCycler[®] 96 Real-Time PCR System, Roche, 瑞士) 和试剂盒 (SYBR Green I, TaKaRa) 进行该家族基因在不同组织、PEG、ABA 及 NaCl 处理下表达量的分析。反应体系为 20 μ L, 分别加入 6 μ L ddH₂O、2 μ L cDNA、上下游引物各 1 μ L 和 10 μ L SYBR。用 SPSS 22.0 和 Excel 2010 进行数据处理及作图。

1.8 MdGRF13 基因的克隆及亚细胞定位分析

RNA 来自嘎拉苹果试管苗叶片。苹果 MdGRF13 基因克隆引物为 F: 5' - GAGCTCGG-TACCCGGGATCCATGGCGGCAACCACCC-3', R: 5' - GGTGTCTGACTCTAGAGGATCCGGTCTC-GATCTTGGATTGGTAGTC-3'。按照反应程序 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 42 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 进行 PCR 扩增, 使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测并回收目标条带。连接 pCAMBIA1300 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α (天根生物科技有限公司), 进行菌液 PCR 鉴定后, 送生工生物工程 (西安) 股份有限公司测序。

将 pCAMBIA1300-MdGRF13-GFP 表达载体质

粒和 pCAMBIA1300-GFP 空载体质粒, 分别转入农杆菌 GV3101 (北京博迈德基因技术有限公司)。参照刘勇等^[29]农杆菌介导烟草叶片的侵染方法, 将重悬菌液注射到本氏烟草叶片背面, 培养箱培养 2 d 后, 采用激光共聚焦显微镜观察。

1.9 MdGRF13 愈伤组织转化、表型观察及生理指标测定

愈伤组织侵染参照张婷婷等^[30]的方法。选取生长状态良好的苹果王林愈伤组织进行农杆菌侵染, 并在诱导培养基 (含有潮霉素 50 mg \cdot L⁻¹ 和头孢霉素 300 mg \cdot L⁻¹) 上筛选。使用超光速 mix (MF848) 试剂盒 (北京聚合美生物科技有限公司) 鉴定转基因愈伤组织, 鉴定所用抗性基因 Hyg 引物为, F: 5' - ATGAAAAGCCTGAACTCACCG-3', R: 5' - CTATTCTTTGCCCTCGGACGA-3'; 继代培养。

取野生型和 MdGRF13 过表达系 OE-4、OE-2 及 OE-3 愈伤组织 0.05 g, 放在分别含有 2% PEG、4% PEG、0.06 mol \cdot L⁻¹ NaCl 和 0.08 mol \cdot L⁻¹ NaCl 的 MS 固体培养基^[27,31]上处理 15 d, 拍照并进行鲜质量统计。苹果愈伤组织中丙二醛 (MDA) 含量及 SOD、POD 和 CAT 活性分别采用硫代巴比妥酸法^[32]、氮蓝四唑 (NBT) 法、愈创木酚法和紫外吸收法^[33]测定。

2 结果与分析

2.1 苹果 14-3-3 家族基因成员的鉴定

从苹果基因组中共鉴定得到 36 个 14-3-3 家族基因 (表 2)。苹果 14-3-3 家族基因相对分子质量为 11 221.52~113 854.16 Da; 氨基酸长度介于 98~1006 aa 之间; 等电点 (pI) 为 4.68~10.55; 不稳定系数 MdGRF17 最小, 为 36.92, MdGRF8 最大, 为 98.48; 大多数苹果 14-3-3 家族蛋白的 pI 值小于 7, 其可能是酸性蛋白。对苹果 14-3-3 家族 36 个基因编码蛋白进行亚细胞定位预测, 发现其主要在细胞质中进行相关表达, 其次是细胞核, 其中 MdGRF2、MdGRF7、MdGRF8、MdGRF12、MdGRF16、MdGRF28 和 MdGRF31 完全定位在细胞核中, 预测这 7 个蛋白仅在细胞核中发挥相关作用。MdGRF4 和 MdGRF11 在叶绿体中有一定的表达, 预测这 2 个蛋白可能与植物光合作用相关。

2.2 苹果 14-3-3 家族蛋白二级结构分析

对苹果 36 个 14-3-3 家族蛋白进行二级结构预测结果表明 (图 1)。其蛋白二级结构以 α 螺旋和

表 1 苹果 14-3-3 家族基因 qRT-PCR 引物
Table 1 qRT-PCR primers of 14-3-3 gene family in apple

基因名称 Gene name	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
<i>MdGRF1</i>	5'-GGAGGAGGCAAAGGGAAGTGAAC-3'	5'-TGTGGACGCTGATGGGAGGAG-3'
<i>MdGRF2</i>	5'-CACAACTGTTGACGGTGGAGAG-3'	5'-GAGATTATGCCAGAGTGCGTAGC-3'
<i>MdGRF3</i>	5'-CAGGCAGAGCGATACGATGAGATG-3'	5'-CGACGAGCACCAACAACATTCTTG-3'
<i>MdGRF4</i>	5'-CCAAGCCCCAGCAGTAATCGTATC-3'	5'-GGAGAGAGGAGGAAGAGGTGAGTG-3'
<i>MdGRF5</i>	5'-TGTCCGTTGGGGTCTCACTACTG-3'	5'-CATCGTATCGCTCTGCCTGCTC-3'
<i>MdGRF6</i>	5'-CCGAGCAAGCCGAGCGTTAC-3'	5'-TGTACCCAACCGAAAAGCAGATTCC-3'
<i>MdGRF7</i>	5'-CCGAGCAAGCCGAGCGTTAC-3'	5'-TGTACCCAACCGAAAAGCAGATTCC-3'
<i>MdGRF8</i>	5'-TTGACTCCAGGCTCATCCATCC-3'	5'-TCGGCAAGATAACGGTGGTAATCG-3'
<i>MdGRF9</i>	5'-CGACGGCATTCTCAAGCTCCTC-3'	5'-TCGGCAAGATAACGGTGGTAATCG-3'
<i>MdGRF10</i>	5'-CGACGGCATTCTCAAGCTCCTC-3'	5'-TCGGCAAGATAACGGTGGTAATCG-3'
<i>MdGRF11</i>	5'-CCAACTCAGCAACTCGGACCTTC-3'	5'-CAGCGGATGAGGGTGTGAAAGTC-3'
<i>MdGRF12</i>	5'-GCATTGTCCAGCAGCATGTAAACC-3'	5'-CGACGGCTTTGTTGAAAGAGAGGAG-3'
<i>MdGRF13</i>	5'-GCGTTACGAGGAGATGGTGTGATTC-3'	5'-TTCTTGTAGGCGACGGAGAGGAG-3'
<i>MdGRF14</i>	5'-TGCCCGCTGGATTCTTCTCAAAG-3'	5'-ACTACCTCGTCGTCAACCTCGTC-3'
<i>MdGRF15</i>	5'-GCTCGTCTTCAAACCCATTCC-3'	5'-TGAAGTGGACCATCTCCTCGTAGC-3'
<i>MdGRF16</i>	5'-GCGTCGGCCAGTAAGTACAAGG-3'	5'-AGTGAAGAGCAGCAGGTAGGC-3'
<i>MdGRF17</i>	5'-TTGAGCAGAAGGAGGAGAGCAGAG-3'	5'-CGGCAGATGAGGCAGATGGAATG-3'
<i>MdGRF18</i>	5'-GCGTCATGGCGATACTGTCTTC-3'	5'-GCAAGCTCGTCTTCAACCTCTG-3'
<i>MdGRF19</i>	5'-CCGAGCAAGCCGAGCGTTAC-3'	5'-GTACCCGACCGAAAAGCAGATTCC-3'
<i>MdGRF20</i>	5'-CGCTCGTCAAGCAGTACAGATCC-3'	5'-GGTGGTCGCCGAAGGAACAAG-3'
<i>MdGRF21</i>	5'-CCTGACCTGTGGACCTCTGAC-3'	5'-TTTGGTTCTTCGGTGGGCTTGG-3'
<i>MdGRF22</i>	5'-GAGGAGCCCACCGTCGAAGAG-3'	5'-GGAGGAGACGATACGCCAGGAG-3'
<i>MdGRF23</i>	5'-GATGAAGGGCACTACCACGTTAC-3'	5'-CTATGTCCTGGCAGCCTTGTAAAG-3'
<i>MdGRF24</i>	5'-ACAACCTCACTCTCTGGACCTCTG-3'	5'-ATTCGGCGGCAGTTGGTTCTTC-3'
<i>MdGRF25</i>	5'-ACAACCTCACTCTCTGGACCTCTG-3'	5'-CAGATTCGGCGGCAGGCTTG-3'
<i>MdGRF26</i>	5'-GGCGTTTCGTCAGATCCAAGGTC-3'	5'-CGGTGGTAGTTGCCCTTCATCTTC-3'
<i>MdGRF27</i>	5'-GGAGTTCAAGTTCGCCGATGAGAG-3'	5'-ATGAGTTGGTGACAGATCCGCAAG-3'
<i>MdGRF28</i>	5'-CACAACTGTTGACGGTGGAGAG-3'	5'-GAGATTATGCCAGAGTGCGTAGC-3'
<i>MdGRF29</i>	5'-GCACCTTGTTCCTTCGGCTACC-3'	5'-TCGGCGGCGGTCTTCTCTC-3'-3'
<i>MdGRF30</i>	5'-TTGAGCAGAAGGAGGAGAGCAGAG-3'	5'-GCGGAAGAGGCAGACGGAATG-3'
<i>MdGRF31</i>	5'-TTGAGCAGAAGGAGGAGAGCAGAG-3'	5'-GCGGAAGAGGCAGACGGAATG-3'
<i>MdGRF32</i>	5'-CAGGCAGAGCGATACGATGAGATG-3'	5'-CGACGAGCACCAACAACATTCTTG-3'
<i>MdGRF33</i>	5'-CAGGCAGAGCGATACGATGAGATG-3'	5'-CGACGAGCACCAACAACATTCTTG-3'
<i>MdGRF34</i>	5'-GGAGGAGGCAAAGGGAAGTGAAC-3'	5'-TGTGGACGCTGATGGGAGGAG-3'
<i>MdGRF35</i>	5'-AGCCGAGCGATACGAGGAGATG-3'	5'-TTCTTGTAGGCGACGGAGAGGAG-3'
<i>MdGRF36</i>	5'-ACAACCTCACTCTCTGGACCTCTG-3'	5'-ATTCGGCGGCAGTTGGTTCTTC-3'
<i>MdGAPDH</i>	5'-GAGCTCGCAGGTATCCTTCT-3'	5'-TACCAAGCAATGACCTTGACC-3'

无规则卷曲为主,分别占 23.08% (*MdGRF8*)~78.57% (*MdGRF13*)、15.47% (*MdGRF18*)~64.10% (*MdGRF8*)。而 β 转角占 0% (*MdGRF13*)~7.93% (*MdGRF16*),延伸链占 2.04% (*MdGRF13*)~22.65% (*MdGRF33*),二者所占比例较小。

2.3 苹果 14-3-3 家族基因进化分析

将苹果、拟南芥、水稻、大豆、二穗短柄草以及番

茄的 14-3-3 家族蛋白序列构建系统进化树(图 2)。结果表明,该基因家族可分为 ϵ 类和非 ϵ 类,又分为 5 个亚族。其中, I 亚族有 6 个苹果 14-3-3 家族基因, II 亚族有 10 个苹果 14-3-3 家族基因, III 亚族有 3 个苹果 14-3-3 家族基因, IV 亚族有 10 个苹果 14-3-3 家族基因, V 亚族有 7 个苹果 14-3-3 家族基因。苹果跟拟南芥 14-3-3 家族基因有较高的同源性,进化关

表 2 苹果 14-3-3 家族基因理化性质分析

Table 2 Physical and chemical properties of 14-3-3 family genes in apple

基因名称 Gene name	登录号 Accession No.	长度 Length/aa	等电点 pI	分子质量 Molecular weight/Da	不稳定系数 Instability index	亚细胞定位 Subcellular location	登录号 Accession No. (GDDH13 V1.1)
<i>MdGRF1</i>	MDP0000216180	348	5.36	39 760.68	50.51	细胞质 Cytoplasm	MD15G1370500
<i>MdGRF2</i>	MDP0000624357	100	6.28	11 508.05	41.69	细胞核 Nucleus	MD15G1315300
<i>MdGRF3</i>	MDP0000461883	265	4.78	29 894.45	43.82	细胞质 Cytoplasm	MD00G1176300
<i>MdGRF4</i>	MDP0000281236	383	6.14	42 382.58	46.99	叶绿体 Chloroplast	MD01G1037700
<i>MdGRF5</i>	MDP0000192110	375	8.88	44 146.34	58.87	质膜 PlasmaMembrane	MD00G1176300
<i>MdGRF6</i>	MDP0000327058	295	4.98	33 747.02	48.83	细胞质 Cytoplasm	MD05G1301400
<i>MdGRF7</i>	MDP0000220423	693	6.80	77 731.88	48.57	细胞核 Nucleus	MD05G1301400
<i>MdGRF8</i>	MDP0000226796	156	10.55	17 215.73	98.43	细胞核 Nucleus	MD10G1023000
<i>MdGRF9</i>	MDP0000846709	263	4.77	29 599.27	52.78	细胞质 Cytoplasm	MD15G1373400
<i>MdGRF10</i>	MDP0000137688	263	4.77	29 599.27	52.78	细胞质 Cytoplasm	MD15G1373400
<i>MdGRF11</i>	MDP0000250954	286	9.24	31 356.90	49.63	线粒体 Mitochondrion 叶绿体 Chloroplast	MD06G1027400
<i>MdGRF12</i>	MDP0000185486	465	9.35	51 163.61	43.71	细胞核 Nucleus	MD07G1247400
<i>MdGRF13</i>	MDP0000795703	98	4.81	11 221.52	63.07	细胞质 Cytoplasm 细胞核 Nucleus	MD07G1164300
<i>MdGRF14</i>	MDP0000468464	147	8.81	16 673.50	56.25	线粒体 Mitochondrion 细胞外 Extracellular	MD15G1315300
<i>MdGRF15</i>	MDP0000325949	326	6.51	37 143.92	43.05	细胞质 Cytoplasm 细胞核 Nucleus	MD08G1193600
<i>MdGRF16</i>	MDP0000135165	227	9.27	24 768.16	64.26	细胞核 Nucleus	MD13G1159400
<i>MdGRF17</i>	MDP0000387626	682	5.29	75 232.16	36.92	细胞质 Cytoplasm	MD07G1096000
<i>MdGRF18</i>	MDP0000270640	265	5.31	30 393.38	51.66	细胞质 Cytoplasm	MD08G1184000
<i>MdGRF19</i>	MDP0000263569	236	5.53	27 138.88	42.29	细胞质 Cytoplasm	MD10G1280300
<i>MdGRF20</i>	MDP0000286065	253	4.95	28 455.30	47.03	细胞质 Cytoplasm	MD01G1037700
<i>MdGRF21</i>	MDP0000772373	264	4.76	29 641.25	49.39	细胞质 Cytoplasm	MD08G1187400
<i>MdGRF22</i>	MDP0000253447	261	4.81	29 394.00	45.77	细胞质 Cytoplasm	MD10G1084500
<i>MdGRF23</i>	MDP0000483514	198	6.85	22 660.12	41.21	细胞质 Cytoplasm	MD12G1114600
<i>MdGRF24</i>	MDP0000297492	1 006	6.68	113 854.16	42.95	质膜 PlasmaMembrane	MD13G1063600
<i>MdGRF25</i>	MDP0000360018	264	4.90	29 924.05	50.58	细胞质 Cytoplasm	MD13G1063600
<i>MdGRF26</i>	MDP0000272583	277	9.52	30 528.45	45.05	细胞外 Extracellular 质膜 PlasmaMembrane	MD13G1159400
<i>MdGRF27</i>	MDP0000238985	198	5.17	22 796.11	44.15	细胞质 Cytoplasm	MD12G1114600
<i>MdGRF28</i>	MDP0000253442	100	6.28	11 508.05	41.69	细胞核 Nucleus	MD15G1315300
<i>MdGRF29</i>	MDP0000166687	414	5.75	46 205.53	43.85	细胞质 Cytoplasm	MD15G1315300
<i>MdGRF30</i>	MDP0000147337	261	4.75	29 505.13	52.69	细胞质 Cytoplasm	MD17G1074900
<i>MdGRF31</i>	MDP0000146698	434	6.22	48 509.03	57.40	细胞核 Nucleus	MD17G1105100
<i>MdGRF32</i>	MDP0000325633	262	4.68	29 606.73	41.05	细胞质 Cytoplasm	MD17G1231000
<i>MdGRF33</i>	MDP0000210036	927	5.86	104 149.56	38.68	细胞质 Cytoplasm	MD17G1231000
<i>MdGRF34</i>	MDP0000018128	240	5.04	27 454.88	49.10	细胞质 Cytoplasm	MD08G1184000
<i>MdGRF35</i>	MDP0000278065	261	4.79	29 353.94	46.26	细胞质 Cytoplasm	MD00G1018600
<i>MdGRF36</i>	MDP0000360017	264	4.90	29 988.74	49.90	细胞质 Cytoplasm	MD13G1063600

系较近。

2.4 苹果 14-3-3 家族基因结构和 motif 分析

对 36 个苹果 14-3-3 基因家族构建进化树以及基因结构分析(图 3-A~B),该基因家族可分为 ϵ 类和非 ϵ 类。*MdGRF11*、*MdGRF14*、*MdGRF23* 和

MdGRF27 仅有一个内含子,*MdGRF16* 和 *MdGRF26* 有 2 个内含子,*MdGRF7* 和 *MdGRF24* 有 14 个内含子。*MdGRF24* 和 *MdGRF33* 明显长于其他基因,序列长度超过 8 kb。*MdGRF2*、*MdGRF8*、*MdGRF13* 和 *MdGRF28* 属于内含子缺失类,整条序列均为外显

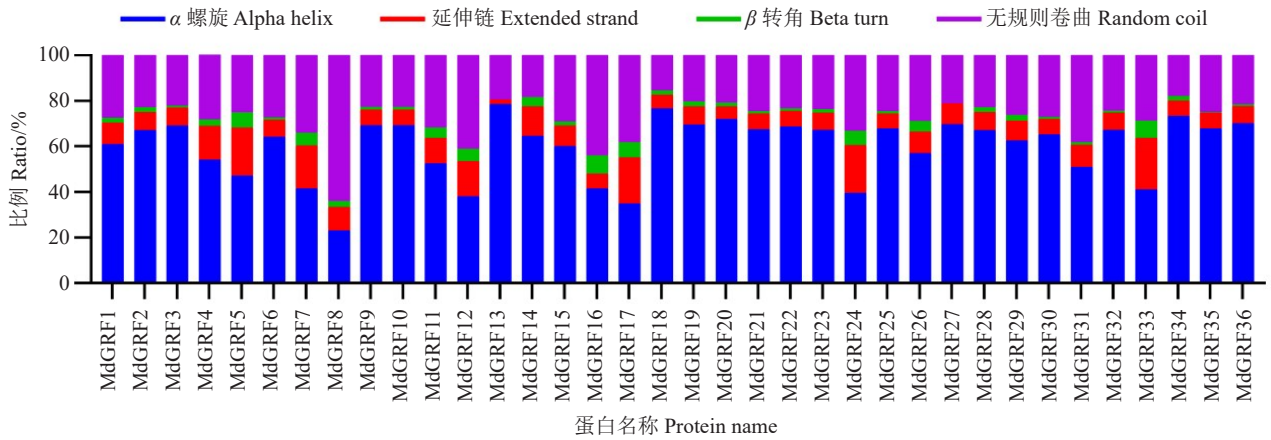


图1 苹果14-3-3蛋白二级结构分析

Fig. 1 The secondary structure analysis of 14-3-3 protein sequence in apple

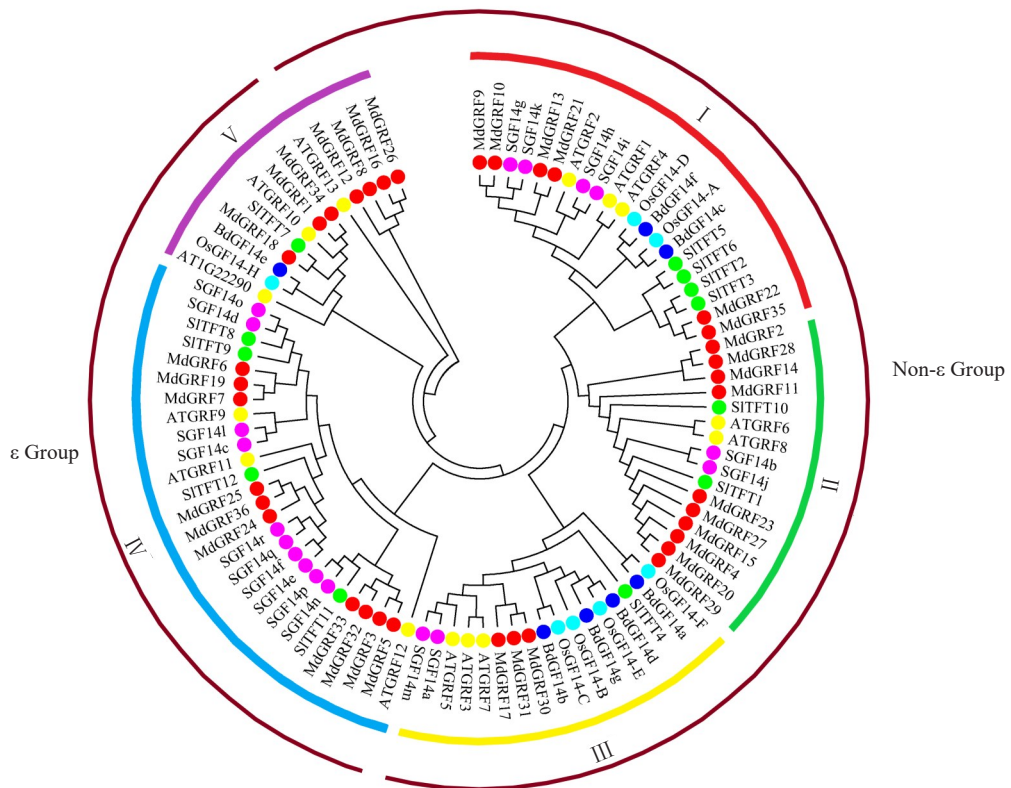


图2 拟南芥(At)、水稻(Os)、大豆(S)、二穗短柄草(Bd)、番茄(Sl)与苹果(Md)14-3-3蛋白系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of 14-3-3 proteins in Arabidopsis thaliana (At), Oryza sativa (Os), Soybean (S), Brachypodium distachyon (Bd), Solanum lycopersicum (Sl) and Malus domestica (Md)

子,不同亚族序列外显子分布位置和长度差异较大,推测不同亚族有较大功能差异。对苹果14-3-3家族成员的motif分析显示(图3-C),共鉴定出10个motif,且都含有motif 3。MdGRF8、MdGRF12和MdGRF14蛋白只有一个保守基序,分别为motif 3、motif 2和motif 1。同一亚族成员结构相似,具有较高的保守性,其在苹果生长中可能发挥相似的功能;

不同亚族间的motif存在差异,表明其可能具有不同的生物学功能。

2.5 苹果14-3-3家族基因的共线性和蛋白互作网络分析

对36个苹果14-3-3家族蛋白互作网络分析表明(图4-A)。15个成员(MdGRF3、MdGRF4、MdGRF6、MdGRF10、MdGRF11、MdGRF13、

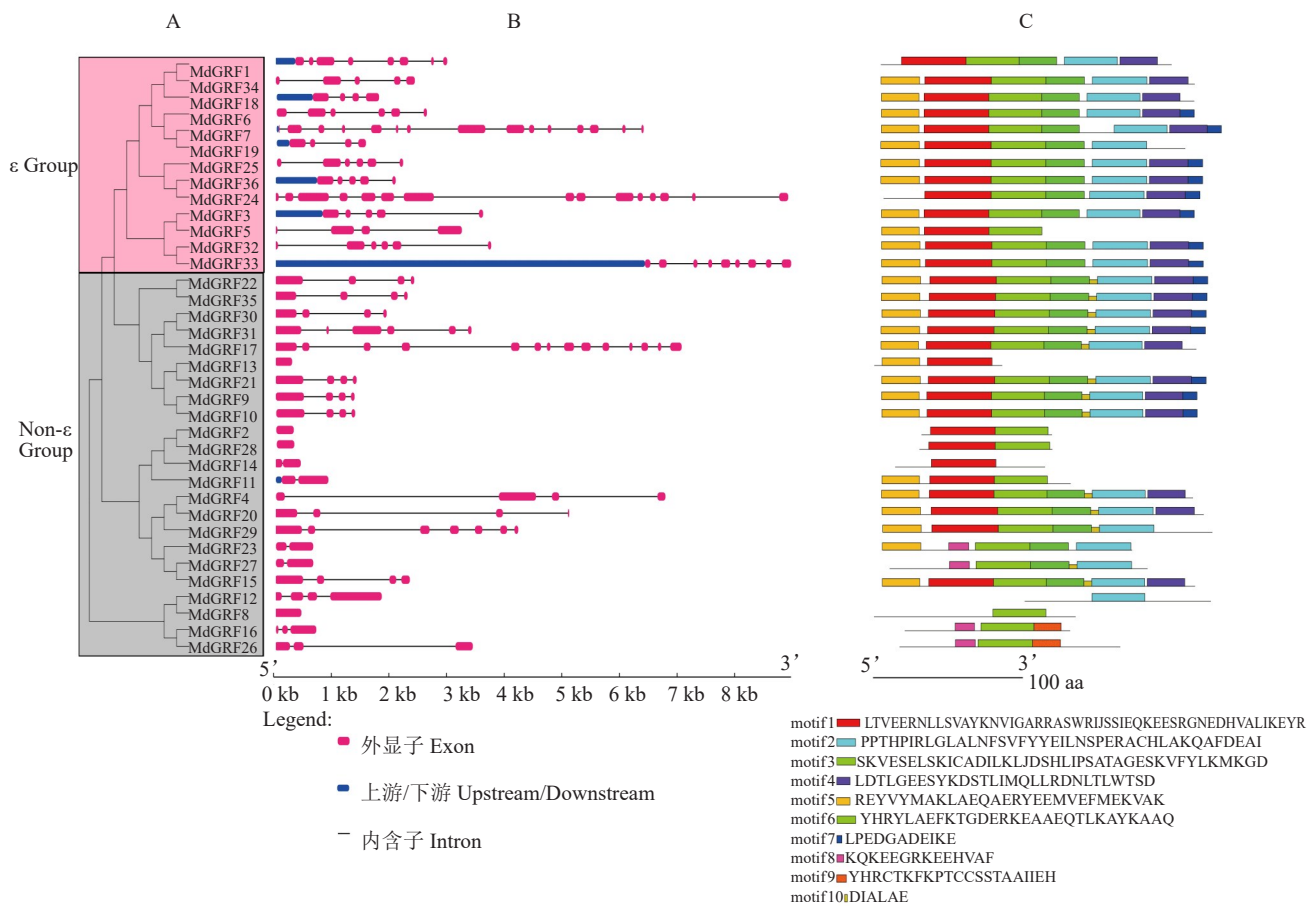


图 3 苹果 14-3-3 家族基因蛋白系统发育树(A)、基因结构(B)和蛋白保守基序(C)分析

Fig. 3 Analysis of phylogenetic tree (A), gene structure (B) and protein conserved motifs (C) of the 14-3-3 family genes in apple

MdGRF15、MdGRF18、MdGRF22、MdGRF25、MdGRF26、MdGRF31、MdGRF32、MdGRF34和MdGRF36)在网络中与FT2、MdFT1和XP-008366662.1蛋白互作,推测苹果14-3-3家族蛋白与植物营养生长、生殖生长和开花调控相关。

染色体定位显示,33个苹果14-3-3家族基因分布在11条苹果染色体上,3个苹果14-3-3家族基因分布在chrUr染色体上,而染色体Chr 05上分布最多,有5个苹果14-3-3家族基因(图4-B)。对苹果的36个14-3-3家族基因进行共线性分析,结果如图4-B所示:10对基因存在共线性,分别为MdGRF1/MdGRF34、MdGRF2/MdGRF32、MdGRF4/MdGRF20、MdGRF4/MdGRF29、MdGRF7/MdGRF18、MdGRF9/MdGRF21、MdGRF17/MdGRF30、MdGRF20/MdGRF29、MdGRF22/MdGRF35和MdGRF24/MdGRF36,原因可能与大片段复制有关。存在MdGRF2/MdGRF3、MdGRF6/MdGRF7、MdGRF9/MdGRF10、MdGRF24/MdGRF25、MdGRF30/MdGRF31和MdG

RF32/MdGRF33 6对串联重复基因,片段重复在苹果14-3-3基因家族扩展中占主要作用,该家族基因具有较高的同源性。

为了探讨不同物种14-3-3家族基因的进化关系,分析了苹果、单子叶植物水稻以及模式植物拟南芥之间的同源基因,结果表明(图5),苹果与拟南芥之间的关联性较强,存在20对共线性基因对,苹果与水稻之间的关联性相对较弱,存在3对基因对。表明苹果与拟南芥的14-3-3家族基因亲缘关系较近。

2.6 苹果14-3-3家族基因的组织特异性表达分析

对苹果14-3-3家族基因在根、茎和叶中的表达差异分析显示(图6),36个基因在根、茎和叶中都有表达。4个基因(MdGRF2、MdGRF17、MdGRF25和MdGRF28)在根中有较高表达,16和12个基因分别在茎和叶中表达量较高。综上所述,苹果14-3-3家族基因在不同组织中存在表达差异,且在茎中表达量高于叶和根。

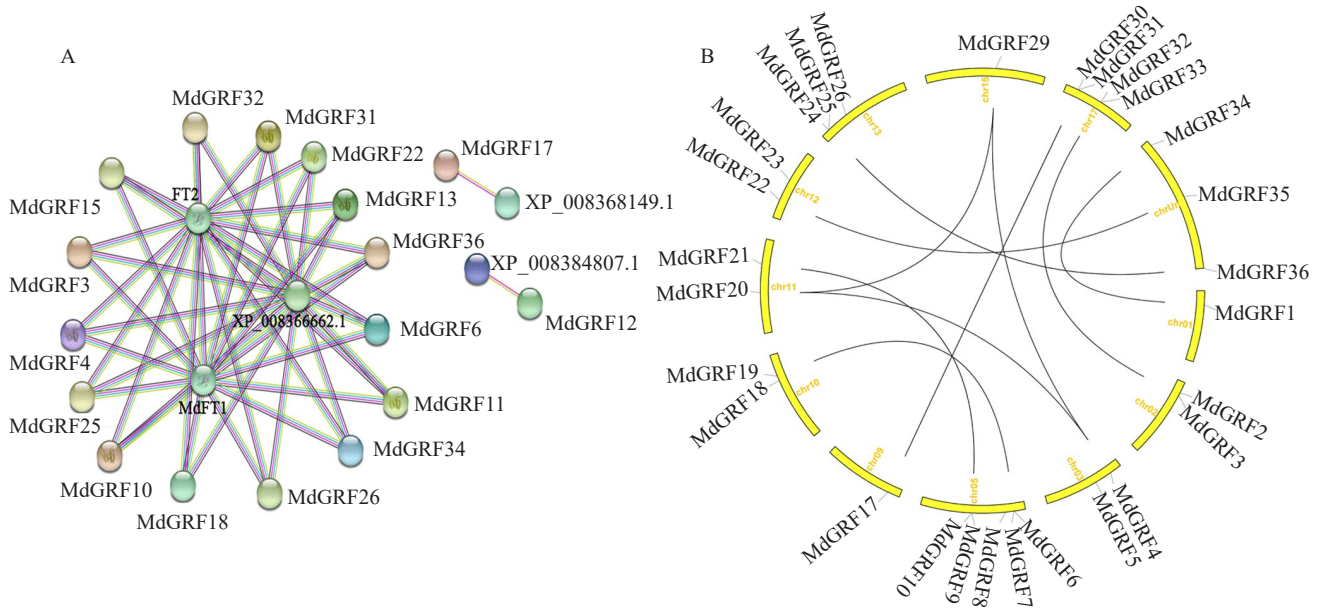


图 4 苹果 14-3-3 家族成员之间蛋白功能联系网络(A)和共线性(B)

Fig. 4 Protein functional network (A) and synteny (B) between members of the apple 14-3-3 family

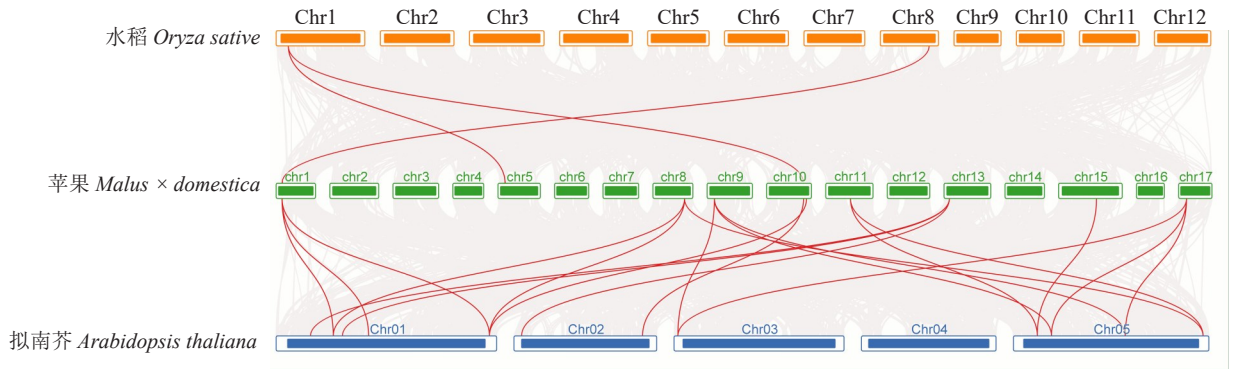


图 5 拟南芥(*At*)、水稻(*Os*)与苹果(*Md*)的 14-3-3 基因共线性分析

Fig. 5 Synteny analysis of 14-3-3 genes in *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Oryza sativa* (*Os*) and *Malus domestica* (*Md*)

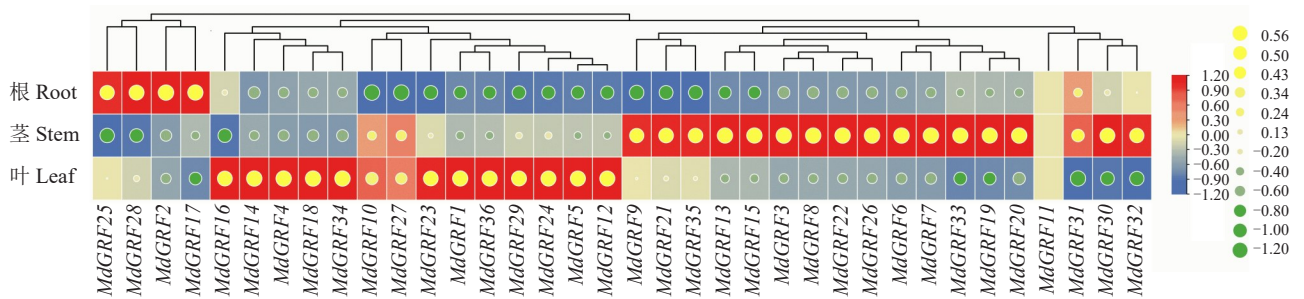


图 6 苹果 14-3-3 家族基因不同组织中表达量

Fig. 6 Heat map of expression levels in different tissues of 14-3-3 family genes from apple

2.7 苹果 14-3-3 家族基因对非生物胁迫的表达分析

通过 qRT-PCR 分析了 36 个苹果 14-3-3 家族基因在 PEG、ABA 和 NaCl 处理下的相对表达量(图 7)。结果表明, ABA 处理 2 h 后, *MdGRF18* 和 *MdGRF26* 较对照显著上调表达, *MdGRF4* 和

MdGRF16 也有上调表达, *MdGRF24* 在 ABA 处理 24 h 后上调表达, 其余基因均下调表达。 *MdGRF5*、*MdGRF14*、*MdGRF24* 和 *MdGRF26* 在 PEG 处理 2 h 下与对照相比呈显著上调表达, *MdGRF2*、*MdGRF13* 和 *MdGRF26* 在 12 h 有较高表达, 且 *MdGRF13* 在 24 h 表达量最高, 为对照的 1.8 倍, 而其余基因表达

□脱落酸 ABA ■聚乙二醇 PEG ■氯化钠 NaCl

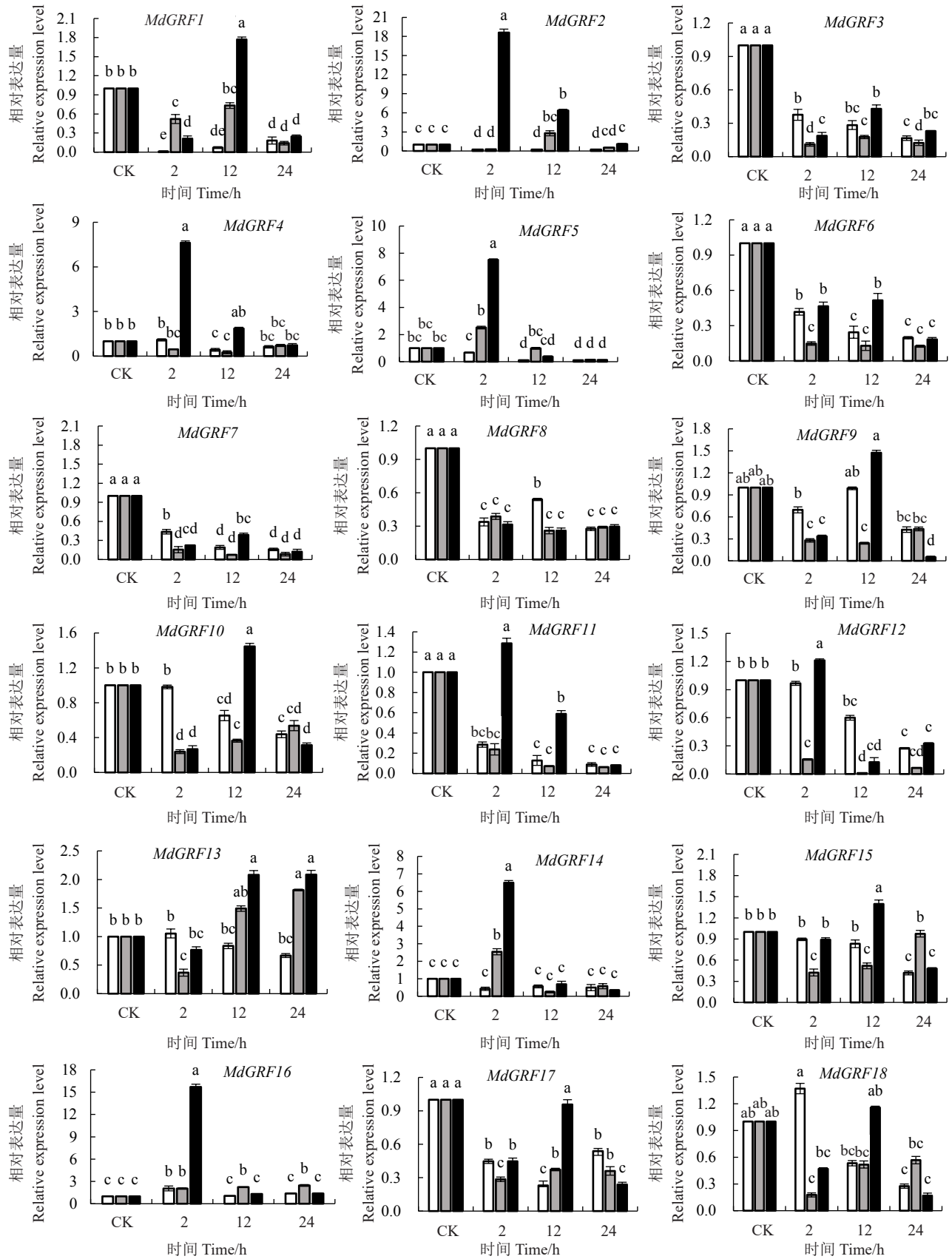


图 7 不同处理下苹果 14-3-3 家族基因表达分析

Fig. 7 Expression analysis of 14-3-3 family genes under different treatments in apple

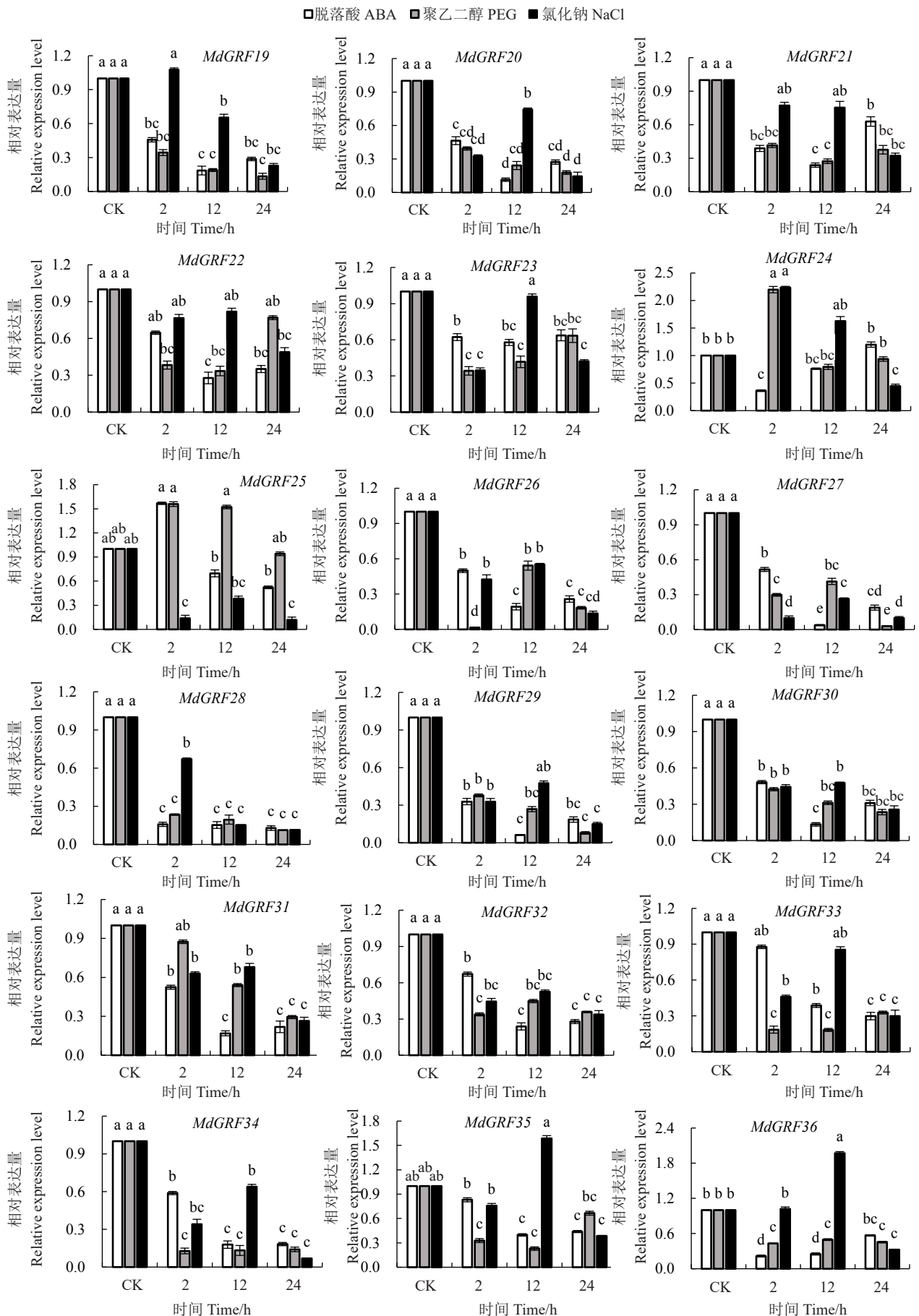


图7 (续) Fig. 7 (Continued)

量较低。NaCl处理下,*MdGRF4*、*MdGRF5*、*MdGRF12*、*MdGRF14*、*MdGRF16*、*MdGRF19*和*MdGRF24*在2 h较对照上调表达,*MdGRF1*、*MdGRF9*、*MdGRF10*、*MdGRF13*、*MdGRF15*和*MdGRF24*在12 h显著上调;*MdGRF2*始终处于上调表达,且在2 h表达量最高,为对照的18.6倍,其可能在盐胁迫中起正调控作用。*MdGRF4*、*MdGRF5*、*MdGRF14*和*MdGRF16*在NaCl处理2 h后表达量分别为对照的7.6、7.5、6.5和15.6倍,而*MdGRF13*在NaCl处理12 h及24 h后显著上调表达,为对照的2.1倍,推测苹果14-3-3家族基因可能响应盐胁迫。

2.8 苹果 *MdGRF13* 基因克隆和亚细胞定位分析

由qRT-PCR分析(图7)表明*MdGRF13*基因在15% PEG以及200 mmol·L⁻¹ NaCl处理12 h和24 h后较对照显著上调表达,说明其在抵御非生物胁迫的过程中发挥重要的作用。因此,选择*MdGRF13*基因克隆并进行功能验证。

以嘎拉苹果cDNA为模板,进行PCR扩增,得到与预期目标一致的条带(图8-A),将扩增产物回收纯化后连接大肠杆菌DH5 α 并通过PCR阳性检测,所得结果与原序列(297 bp)相吻合(图8-B)。最后转入农杆菌,PCR检测条带合适(图8-C)。

以pCAMBIA1300-GFP空载体为阳性对照,将*MdGRF13*重组质粒在烟草叶片中瞬时表达。结果表明(图9),pCAMBIA1300-*MdGRF13*-GFP表达载体的荧光定位在细胞核、细胞质和细胞膜上。

2.9 *MdGRF13* 过表达在苹果愈伤组织的功能鉴定

将过表达载体pCAMBIA1300-*MdGRF13*-GFP转化王林苹果愈伤组织(图10-A)。对所得转基因愈伤组织通过PCR检测,获得了与阳性对照片段大小一致的条带(图10-B),证明*MdGRF13*在苹果愈伤组织中转化成功。选取过表达型OE-4、OE-2和OE-3进行处理。

对野生型与过表达型愈伤组织经不同浓度PEG

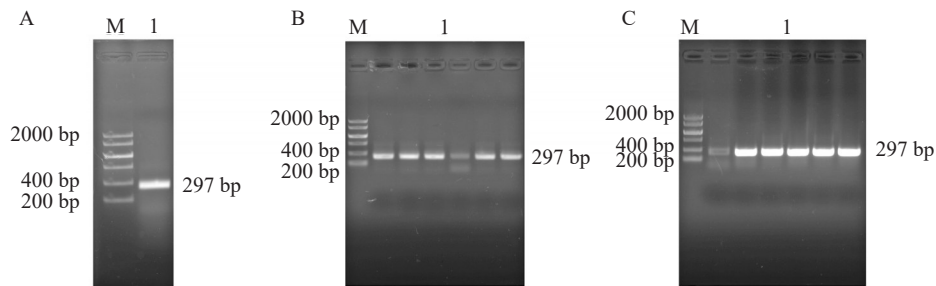


图8 苹果 *MdGRF13* 基因克隆与 PCR 检测
M. Marker, 1. 苹果 *MdGRF13* 基因 PCR 产物。A. 苹果 *MdGRF13* 基因扩增电泳图; B. 苹果 *MdGRF13* 基因大肠杆菌菌液 PCR 检测; C. 苹果 *MdGRF13* 基因农杆菌菌液 PCR 检测。

M. Marker, 1 indicate PCR product of apple *MdGRF13* gene. A. Amplification electrophoresis map of *MdGRF13* gene; B. Electrophoretogram of *MdGRF13* Escherichia coli; C. Electrophoretogram of *MdGRF13* Agrobacterium.

图8 苹果 *MdGRF13* 基因克隆与 PCR 检测

Fig. 8 *MdGRF13* gene cloning and PCR detection

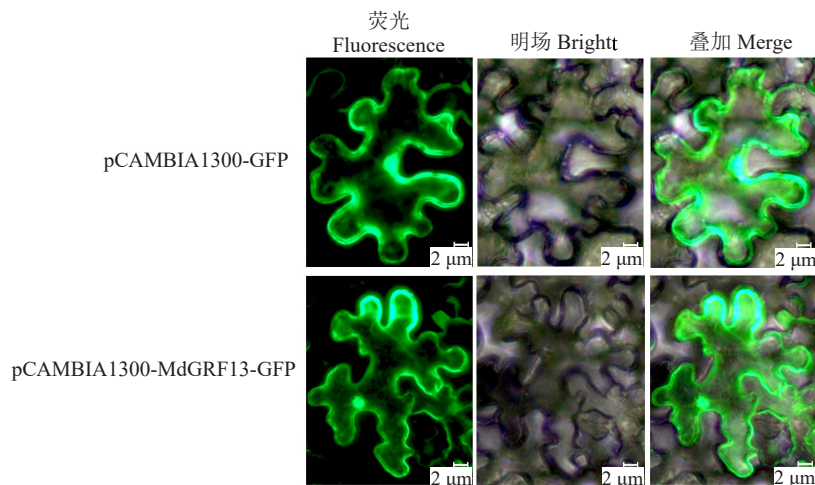
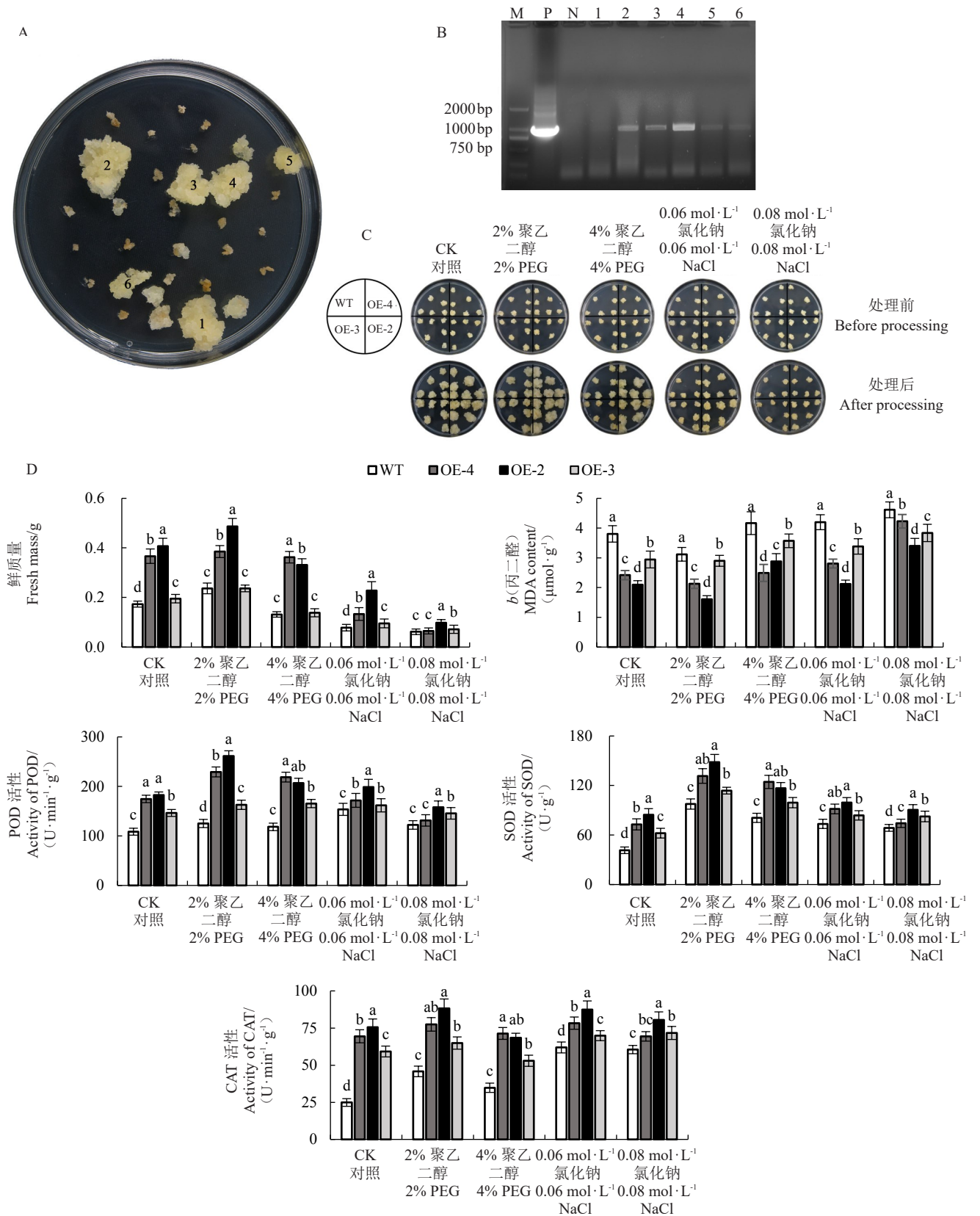


图9 *MdGRF13* 蛋白的亚细胞定位

Fig. 9 Subcellular localization of the *MdGRF13* protein



A. 转基因愈伤组织; B. 愈伤组织阳性检测, M. Marker, P. 阳性对照, N. 野生型阴性对照, 1~6 为转基因愈伤组织 PCR 产物; C. 不同浓度 PEG 及 NaCl 处理下愈伤组织表型; D. 生理指标测定。

A. Transgenic callus; B. The positive detection of callus, M. Marker, P. positive control, N. Wild type negative control, 1~6. Indicate PCR product of transgenic callus; C. Phenotype of callus treated with different concentrations of PEG and NaCl; D. Physiological index determination.

图 10 转基因愈伤组织鉴定和酶活性测定

Fig. 10 Identification of transgenic callus and assay of enzyme activities

处理下表型观察发现(图10-C),过表达型(OE)愈伤组织长势优于野生型(WT),且差异显著,而2% PEG处理下愈伤组织整体长势优于4% PEG。0.06 mol·L⁻¹ NaCl处理下,过表达型(OE)愈伤组织长势优于野生型(WT),而在0.08 mol·L⁻¹ NaCl处理下,过表达型(OE)愈伤组织长势与野生型(WT)无显著差异。

对WT和OE愈伤组织进行鲜质量统计,并对MDA(丙二醛)含量以及CAT、POD和SOD酶活性进行测定。结果表明(图10-D),0.08 mol·L⁻¹ NaCl处理下,OE愈伤组织鲜质量、MDA含量以及CAT、POD和SOD酶活性较WT无显著差异,而其他处理下,OE愈伤组织鲜质量以及CAT、POD和SOD酶活性高于WT,而OE的MDA含量低于WT。表明过表达*MdGRF13*能够增强苹果愈伤组织对干旱和盐胁迫的抗性。

3 讨 论

14-3-3蛋白是一类调控植物激酶与转录因子信号转导的基础性蛋白,参与调节植物多种生理和发育过程^[34-35]。笔者在本研究中通过对苹果基因组数据分析鉴定得到36个苹果14-3-3基因家族成员,与研究鉴定得到的拟南芥^[16]、番茄^[9]、苜蓿^[11]、大豆^[12]和茶树^[36]14-3-3家族成员(分别为15、12、18、11和23个)相比,苹果14-3-3基因家族成员数量大,表明14-3-3基因家族成员在不同物种间有较大差异,而本研究较Ren等^[27]和Zuo等^[21]已发表文章鉴定出更多的苹果14-3-3家族成员,其中7个基因(*MdGRF8*、*12*、*13*、*16*、*23*、*26*和*27*)未被鉴定,且都存在于进化关系的非ε类,*MdGRF12*/*MdGRF13*、*MdGRF16*/*MdGRF26*及*MdGRF23*/*MdGRF27*相邻(图2),进化关系较近。笔者在本文中通过qPCR分析发现*MdGRF19*(MD10G1280300)在茎中表达量最高,而在叶中表达量最低,与Ren等^[27]的研究结果相反,与Zuo等^[21]的研究结果相同。*MdGRF11*(MD10G1280300)^[27]在ABA和PEG处理下表达趋势与本文*MdGRF19*(MD10G1280300)研究结果基本一致。Zuo等^[21]亚细胞定位发现MdGF14j(MD10G1280300)蛋白定位在细胞质和细胞核中,与Ren等^[27]的研究结果相同。推测其原因可能是不同版本的数据库有差异,以苹果不同品种间的数据比对筛选出更多被识别的基因。

理化性质分析表明,苹果14-3-3蛋白pI值小于7,这与李菲等^[11]14-3-3蛋白是酸性氨基酸的研究结果一致。系统进化分析显示苹果14-3-3基因家族分为ε类和非ε类,且非ε类双子叶植物苹果(52.8%)、拟南芥(57.1%)和番茄(58.3%)比例高于单子叶植物二穗短柄草(85.7%)和番茄(85.7%),在ε类的结果相同^[17]。Zuo等^[21]的研究表明,苹果MdGF14a、MdGF14d、MdGF14i和MdGF14j蛋白与关键的花整合因子MdTFL1和MdFT相互作用,参与开花调控,在本研究中,*MdGRF6*在系统发育树与*MdGF14i*和*MdGF14j*相邻,推测其具有相似的作用。研究发现,14-3-3蛋白以N-端和C-端不同的motif为核心结构发挥不同功能^[37],本研究中苹果14-3-3家族蛋白ε和非ε类的N-端与C-端有不同的motif,该家族蛋白可能与靶蛋白相结合发挥重要功能。苹果14-3-3家族基因有10对片段重复和6对串联重复基因,表明片段重复在其基因家族的进化过程中起着重要的作用,并且串联和片段重复事件有利于植物进化过程中基因家族成员的扩展^[38-39]。烟草叶片瞬时表达亚细胞定位实验表明,*MdGRF13*蛋白定位在细胞核、细胞质和细胞膜中,与Ren等^[27]和Zuo等^[21]所得结果相似,说明14-3-3家族蛋白在不同植物中有保守功能,其可能在细胞核中调控部分基因的转录。

组织特异性表达有助于了解植物中的基因功能^[40-41]。通过qRT-PCR发现苹果14-3-3家族基因在根、茎和叶组织中都有表达,而在茎中表达量较高,与木薯14-3-3蛋白在块根不同发育时期有不同组织的表达研究结果相似^[42],说明14-3-3家族基因在苹果中有一定的组织特异性表达。研究发现,水稻*OsGF14b*的突变对干旱和渗透胁迫耐受性的提高可能与ABA信号通路有关^[43]。qPCR结果显示,*MdGRF4*、*MdGRF16*、*MdGRF18*和*MdGRF26*在ABA处理下上调表达,本文结果与以上研究相似,推测该家族基因功能与ABA相关,表明苹果14-3-3蛋白可能与ABA介导的保卫细胞相结合,进而影响其在激活ABA应答基因中的转录^[5]。干旱胁迫会降低植物的光合和碳水化合物的合成,进而减缓植物的生长发育^[44]。14-3-3蛋白作为重要的干旱调控因子在胁迫反应中有不同程度的表达,*MdGRF26*在PEG处理下高表达,同时,6个基因有一定量的上调表达。本研究在苹果愈伤组织过表达*MdGRF13*,在不同浓度PEG处理下,转基因愈伤组织长势优于野

生型,且以2% PEG处理下长势最好,与棉花CGF14-4^[45]和油菜GF14omeg基因^[46]在干旱胁迫下上调表达研究结果相似,表明过表达MdGRF13增强了苹果愈伤组织的抗旱性。实时荧光定量PCR发现,MdGRF2、MdGRF4、MdGRF5、MdGRF13、MdGRF14和MdGRF16在NaCl处理下表达量分别为对照的18.6、7.6、7.5、2.1、6.5和15.6倍,且本研究在0.06 mol·L⁻¹ NaCl处理下,转基因愈伤组织长势优于野生型,与小麦^[23]、番茄^[9]、水稻^[47]及短柄草^[48]TaGF14b在烟草中异位表达时增强盐胁迫耐受性的研究结果相似,表明过表达MdGRF13增强了苹果愈伤组织对盐胁迫的抗性。而在0.08 mol·L⁻¹ NaCl处理下,转基因愈伤组织较野生型表型未发生较大变化,可能是较高浓度NaCl处理抑制了愈伤组织的生长。同时,本文研究结果与Ren等^[27]MdGRF11(MD10G1280300)在愈伤组织中过表达可增强抗旱性和耐盐性研究结果一致。说明苹果14-3-3家族基因在抵御非生物胁迫的过程中发挥了重要的作用。

4 结 论

本研究通过生物信息学分析鉴定出36个苹果14-3-3基因家族成员,系统进化分析发现其与拟南芥同源性较高,且各亚族成员结构保守。亚细胞定位显示,MdGRF13蛋白定位在细胞核、细胞质和细胞膜中。过表达MdGRF13增强了苹果愈伤组织的抗旱性和耐盐性。对进一步研究苹果14-3-3家族成员的功能具有重要意义。

参考文献 References:

- [1] ANDERAS M, LUCA C. The effect of stress on genome regulation and structure[J]. *Annals of Botany*, 2004, 94(4):481-495.
- [2] BOYKO A, KOVALCHUK I. Epigenetic control of plant stress response[J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2008, 49(1):61-72.
- [3] SHESHADRI S A, NISHANTH M J, BINDU S. Stress-mediated cis-element transcription factor interactions interconnecting primary and specialized metabolism in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7:1725-1748.
- [4] YAMAGUCHI-SGINOZAKI K, SHINOZAKI K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters[J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2):88-94.
- [5] ROBERTS M R, SALINAS J, COLLINGE D B. 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(6):1031-1039.
- [6] OLSSON A, SVENNELID F, SOMMARIN M, LARSSON C. A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H⁺-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding[J]. *Plant Physiology*, 1998, 118(2):551-555.
- [7] PAUL A L, DENISON F C, SCHULTZ E R, ZUPANSKA A K, FERL R J. 14-3-3 phosphoprotein interaction networks-dose isoform diversity present functional interaction specification?[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3:190-204.
- [8] ROSENQUIST M, ALSTERFJORD M, LARSSON C, SOMMARIN M. Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(1):142-149.
- [9] XU W F, SHI W M. Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: Analysis by real-time RT-PCR[J]. *Annals of Botany*, 2006, 98(5):965-974.
- [10] 马勇,刘嘉荣,巴德仁贵,哈斯阿古拉. 甜瓜14-3-3基因家族全基因组鉴定与进化分析[J]. *广东农业科学*, 2013, 40(24):104-111.
MA Yong, LIU Jiarong, Bade Rengui, Hasi Agula. Genome-wide identification and phylogenetic analysis of 14-3-3 gene family in melon[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40(24):104-111.
- [11] 李菲,何小红,张习敏,龚记熠,乙引. 苜蓿14-3-3基因家族的鉴定与进化和特征分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(12):5238-5243.
LI Fei, HE Xiaohong, ZHANG Ximin, GONG Jiyi, YI Yin. Identification, evolution and characteristic analysis of 14-3-3 gene family in medicago[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(12):5238-5243.
- [12] 李昕文,沙爱华,黄家权. 大豆14-3-3家族基因对低磷胁迫响应及其与磷转运蛋白PHT6的互作[J]. *中国油料作物学报*, 2017, 39(3):308-314.
LI Xinwen, SHA Aihua, HUANG Jiaquan. Response of 14-3-3 family genes to phosphorus starvation in soybean and their interaction with phosphorus transporter PHT6[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2017, 39(3):308-314.
- [13] 姜焕焕,王通,禹山林,陈明娜,王冕,陈娜,潘丽娟,祁佩时,迟晓元. 花生14-3-3基因家族的生物信息学分析[J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(4):501-507.
JIANG Huanhuan, WANG Tong, YU Shanlin, CHEN Mingna, WANG Mian, CHEN Na, PAN Lijuan, QI Peishi, CHI Xiaoyuan. Bioinformatic analysis of 14-3-3 gene family in peanut[J]. *Chinese Journal of Oil Crops*, 2018, 40(4):501-507.
- [14] 张书芹. 陆地棉14-3-3基因家族的鉴定及逆境胁迫应答[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(11):3468-3476.
ZHANG Shuqin. Identification and stress response of 14-3-3 gene family in upland cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(11):3468-3476.
- [15] XIA L M, HE X H, HUANG X, YU H X, LU T T, XIE X J,

- ZENG X M, ZHU J W, LUO C. Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 gene family in mango (*Mangifera indica* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(23): 1593-1610.
- [16] DELILLE J M, SEHNKE P C, FERL R J. The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators[J]. Plant Physiology, 2001, 126(1):35-38.
- [17] TIAN F X, WANG T, XIE Y L, ZHANG J, HU J J. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of 14-3-3 gene family in *Populus*[J]. PLoS One, 2015, 10(4): 1-22.
- [18] GUO J, DAI S, LI H S, LIU A F, LIU C, CHENG D G, CAO X Y, CHU X S, ZHAI S N, LIU J J, ZHAO Z D, SONG J M. Identification and expression analysis of wheat *TaGF14* Genes[J]. Frontiers in Genetics, 2018, 9: 12-22.
- [19] CHENG C, WANG Y, CHAI F M, LI S H, XIN H P, LIANG Z C. Genome-wide identification and characterization of the 14-3-3 family in *Vitis vinifera* L. during berry development and cold-and heat-stress response[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1):579-593.
- [20] LI M Y, REN L C, XU B Y, YANG X L, XIA Q Y, HE P P, XIAO S S, GUO A P, HU W, JIN Z Q. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analyses of the 14-3-3 family reveal their involvement in the development, ripening, and abiotic stress response in banana[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1442-1456.
- [21] ZUO X Y, WANG S X, XIANG W, YANG H R, TAHIR M M, ZHENG S G, AN N, HAN M Y, ZHAO C P, ZHANG D. Genome-wide identification of the 14-3-3 gene family and its participation in floral transition by interacting with TFL1/FT in apple[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 1-17.
- [22] XIAO B J, LUO G H, WANG K S, MAO Z Y, LIN B Z. Over-expression of *PvGF14c* from phyllostachys violascens delays flowering time in transgenic *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 105-127.
- [23] ZHANG Y, ZHAO H Y, ZHOU S Y, HE Y, LUO Q, ZHANG F, QIU D, FENG J, WEI Q, CHRN L. Expression of *TaGF14b*, a 14-3-3 adaptor protein gene from wheat, enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco[J]. Planta, 2018, 248(1): 117-137.
- [24] 李芳, 滕建晒, 陈宣钦. 14-3-3 蛋白参与植物应答非生物胁迫的研究进展[J]. 植物科学学报, 2018, 36(3): 459-469.
LI Fang, TENG Jianshai, CHEN Xuanqin. Research progress on the 14-3-3 protein involved in plant responses to abiotic stress[J]. Plant Science Journal, 2018, 36(3): 459-469.
- [25] YANG Z J, WANG C W, XUE Y, LIU X, CHEN S, SONG C P, YANG Y Q, GUO Y. Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1199-1211.
- [26] CAO J F, HUANG J Q, LIU X, HUANG C C, ZHENG Z S, ZHANG X F, SHANG G, WANG L J, ZHANG Y G, WENDEL J F, GROVER C E, CHEN Z W. Genome-wide characterization of the GRF family and their roles in response to salt stress in *Gossypium*[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 1-16.
- [27] REN Y R, YANG Y Y, ZHANG R, YOU C X, ZHAO Q. *MdGRF11*, an apple 14-3-3 protein, acts as a positive regulator of drought and salt tolerance[J]. Plant Science, 2019, 288: 110219-110231.
- [28] 马维峰, 李艳梅, 马宗桓, 陈佰鸿, 毛娟. 苹果 POD 家族基因的鉴定与 *MdPOD15* 的功能分析[J]. 园艺学报, 2022, 49(6): 1181-1199.
MA Weifeng, LI Yanmei, MA Zonghuan, CHEN Baihong, MAO Juan. Identification of apple POD gene family and functional analysis of *MdPOD15* gene[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(6): 1181-1199.
- [29] 刘勇, 王泽琼, 龚林忠, 王富荣, 王会良, 艾小艳, 何华平. 桃乙烯应答因子 *PpERF1a* 的克隆与功能分析[J]. 园艺学报, 2020, 47(6): 1165-1171.
LIU Yong, WANG Zeqiong, GONG Linzhong, WANG Furong, WANG Huiliang, AI Xiaoyan, HE Huaping. Cloning and functional analysis of ERF transcription factor gene *PpERF1a* in peach[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(6): 1165-1171.
- [30] 张婷婷, 康慧, 付璐璐, 由春香, 王小非, 郝玉金. 苹果 MdCYP707A 家族基因表达分析和 *MdCYP707A1* 的功能鉴定[J]. 园艺学报, 2019, 46(8): 1429-1444.
ZHANG Tingting, KANG Hui, FU Lulu, YOU Chunxiang, WANG Xiaofei, HAO Yujin. Expression analysis of apple MdCYP707A family genes and functional characterization of *MdCYP707A1*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(8): 1429-1444.
- [31] 杨蕾蕾. 苹果质膜内在蛋白基因 *MdPIPI1;1* 和 *MdPIPI1;2* 在干旱和盐胁迫中的功能分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
YANG Leilei. Functional analysis of apple plasma membrane intrinsic protein genes *MdPIPI1;1* and *MdPIPI1;2* under drought and salt stress[D]. Yangling: North West Agriculture and Forestry University, 2020.
- [32] 赵世杰, 许长成, 邹琦, 孟庆伟. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(3): 207-210.
ZHAO Shijie, XU Changcheng, ZOU Qi, MENG Qingwei. Improvements of method for measurement of malondialdehyde in plant tissues[J]. Plant Physiology Communications, 1994, 30(3): 207-210.
- [33] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
ZHANG Zhiliang. Guide to plant physiology experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2008.
- [34] CAMPO S, PERIS- PERIS C, MONTESINOS L, PENAS G, MESSEGUER J, SAN S B. Expression of the maize *ZmGF14-6* gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(2): 983-999.
- [35] LEE J H, LU H. 14-3-3 γ inhibition of MDMX-mediated p21 turn-

- over independent of p53[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(7): 5136-5142.
- [36] 安海丽,张宝会,姚新转,吕立堂. 茶树 14-3-3 基因家族的鉴定和表达模式分析[J/OL]. *分子植物育种*, 2021: 1-20. [2022-07-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210909.1626.024.html>.
- AN Haili, ZHANG Baohui, YAO Xinzhuang, LÜ Litang. Identification and expression pattern analysis of 14-3-3 gene family in (*Camellia sinensis* L.)[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2021: 1- 20. [2022- 07- 07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210909.1626.024.html>.
- [37] 周颖,李冰樱,李学宝. 14-3-3 蛋白对植物发育的调控作用[J]. *植物学报*, 2012, 47(1): 55-64.
- ZHOU Ying, LI Bingying, LI Xuebao. Roles of 14-3-3 proteins in regulating plant development[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(1): 55-64.
- [38] CANNON S B, MITRA A, BAUMGARTEN A, YOUNG N D, MAY G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2004, 4(1): 10-30.
- [39] SUN H H, WU S, ZHANG G Y, JIAO C, GUO S G. Karyotype stability and unbiased fractionation in the paleo-allotetraploid *Cucurbita* genomes[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(10): 1293-1306.
- [40] GENG M T, YAO Y, WANG Y L. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in cassava[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(5), 1041-1059.
- [41] MA B Q, LIAO L, FANG T, QIAN P, COLLINS O, HUI Z, MA F W, HAN Y P. A *Mal10* gene encoding P-type ATPase is involved in fruit organic acid accumulation in apple[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(3): 674-686.
- [42] WANG X C, CHANG L L, TONG Z, WANG D Y, QI Y, WANG D, JIN X, YANG Q, WANG L M, SUN Y, HUANG Q X, GUO A P, PENG M. Proteomics profiling reveals carbohydrate metabolic enzymes and 14-3-3 proteins play important roles for starch accumulation during cassava root tuberization[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1-15.
- [43] LIU J P, SUN X J, LIAO W C, ZHANG J H, LIANG J S, XU W F. Involvement of *OsGF14b* adaptation in the drought resistance of rice plants[J]. *Rice*, 2019, 12(1): 1-7.
- [44] 吕慧,吉雪花,张中荣,朱冉冉,王世宁,谢雪果,袁雷. 制干辣椒果实辣椒素对干旱、盐及其双重胁迫的响应[J]. *中国瓜菜*, 2022, 35(2): 78-84.
- LÜ Hui, JI Xuehua, ZHANG Zhongrong, ZHU Ranran, WANG Shining, XIE Xueguo, YUAN Lei. Capsaicin of dry pepper fruit grown under drought, salt and combined stress condition[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2022, 35(2): 78-84.
- [45] SUN G L, XIE F L, ZHANG B H. Transcriptome-wide identification and stress properties of the 14-3-3 gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2011, 11(4): 627-636.
- [46] LUO J L, TANG S H, PENG X J, YAN X H, ZENG X H, LI J, LI X F, WU G. Elucidation of cross-talk and specificity of early response mechanisms to salt and PEG-simulated drought stresses in *Brassica napus* using comparative proteomic analysis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0138974.
- [47] CHEN Y X, ZHOU X J, CHANG S, CHU Z L, WANG H M. Calcium-dependent protein kinase 21 phosphorylates 14-3-3 proteins in response to ABA signaling and salt stress in rice[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 493(4): 1450-1456.
- [48] HE Y, ZHANG Y, CHEN L H, WU C L, LUO Q C, ZHANG F, WEI Q H, LI K X, CHANG J L, YANG G X, HE G Y. A member of the 14-3-3 gene family in *Brachypodium distachyon*, *BdGF14d*, confers salt tolerance in transgenic tobacco plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 340-353.