

桃果胶甲酯酶抑制因子PMEI基因家族的鉴定及表达分析

冀美玲, 李玲, 陈敏, 王亚奇, 刘利, 郇蕾, 高东升, 朱翠英*, 付喜玲*

山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东省果蔬协同创新中心, 山东泰安271018

摘要: 果胶甲酯酶抑制因子(PMEI)能够抑制果胶甲酯酶(PME)的脱酯化作用, 从而调控果胶甲酯酶的活性。本文在桃(*Prunus persica*)中鉴定出30个PpPMEI基因家族成员并进行了生物信息学分析, 构建进化树发现, 其与拟南芥PMEI基因家族进化关系较远。对PpPMEI进行蛋白质性质分析发现, 大多数PpPMEI蛋白存在信号肽, 等电点在4.44~10.02之间, 亚细胞定位表明多定位于分泌通路。部分PpPMEI表达模式分析表明, 其在花、果实、叶中有表达差异, *Prupe.1G118800*和*Prupe.5G112600*在果实发育过程中表达量下降。赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)和水杨酸(SA)三种激素处理后, *Prupe.5G048900*和*Prupe.5G112600*被GA和ABA诱导表达, *Prupe.7G193700*的表达被GA抑制。本文为研究PpPMEI在调控桃的花与果实发育以及激素响应等方面提供参考。

关键词: 桃; PpPMEI; 生物信息学分析; 表达分析

细胞壁是构成植物细胞的基本结构, 在植物细胞的生长发育、抗逆反应、细胞内及细胞间的信息传递中起着非常重要的作用(Carpita和Gibeaut 1993; 刘清泉等2014)。果胶是构成细胞壁的重要成分, 高度甲酯化的果胶被分泌进入细胞壁, 随后由细胞壁上的果胶甲酯酶(pectin methylesterase, PME)等将其修饰, 这时PME将果胶去甲酯化形成果胶酸和甲醇(Pérez等2000; Wolf等2009)。果胶还参与细胞间的信号传导, 所以近年来研究PME和果胶甲酯酶抑制因子(pectin methylesterase inhibitor, PMEI)逐渐成为细胞表面以及细胞壁研究的热点之一。

PME在植物中广泛存在, 属于第8类碳水化合物酯酶(CAZY: <http://www.cazy.org/CE8.html>; Coutinho等2003), 参与植物的营养生长与生殖生长等生理过程。一些研究表明PME在维持细胞结构(Prasanna等2007)、植物抗病(张倩等2015)、下胚轴伸长(Derbyshire等2007)、果实成熟(Roberts等2000)、种子萌发(Ren和Kermode 2000)、花器官的发育(张莉等2012)等方面有重要作用。在细胞壁中, 具有活性的PME可能具有两种调控方式: (1)被PME脱甲酯化的果胶酸与Ca²⁺相互作用, 从而改变质体外的pH以及细胞壁的理化性能, 影响植物的生长发育(Ridley等2001); (2)脱甲酯化的果胶酸不与Ca²⁺相互作用, 而可能成为果胶降解酶的目标, 如多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG), 从而影响细胞壁的质地和硬度(Micheli 2001)。研究发现PME的活性受到PMEI的调控, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中AtPMEI4与AtPMEI7结合调控其活性, 并在一定程度上改变了果胶的结构(Sénéchal等

2015)。猕猴桃(*Actinidia chinensis*) AcPMEI与拟南芥AtPMEI体外结合为蛋白复合物, 一定范围内pH和NaCl的变化对这个复合物的影响较小, 说明该复合物比较稳定, 同时发现猕猴桃AcPMEI蛋白可以促进拟南芥的根伸长以及花粉粒的萌发(Paynel等2014)。PME最早出现在轮藻植物细胞壁的果胶中, 由于全基因组复制和串联复制在陆地植物中产生了PME结构域与信号肽区域间的一段区域(pro-PME)和PMEI两个结构域。自然选择使PMEI家族在维管植物中进化较快, 通过基因结构和序列分析发现PMEI可能来自全基因组复制后新功能化的proPME (Wang等2013)。PMEI在不同植物的不同组织器官中表达模式不同。番茄(*Solanum lycopersicum*)中发现了一种果胶甲酯酶抑制基因Soly-PMEI, 主要在花、花粉粒和成熟果实中表达, 并且调控番茄果实中酯化果胶的时空分布(Reca等2012)。甘蓝(*Brassica oleracea*) BoPMEI1在成熟的花粉粒和花粉管中特异表达并且影响花粉粒的生长(Zhang等2010)。An等(2008)发现辣椒(*Capsicum annuum*) CaPMEI1在茎中的表达量较高, 在叶维管束的木质部中也有少量表达, 而在成熟果实中不表达。亚麻(*Linum usitatissimum*)纤维中检测到PMEI基因数量多于PME基因数量, 并且在纤维发育早期PMEI基因数量较少, 说明PMEI在纤维发育早期活性较

收稿 2017-05-02 修定 2017-09-25

资助 国家自然科学基金(31672137和31372050)和山东省现代农业产业技术体系项目(SDAIT-06-01)

* 共同通讯作者(E-mail: chunying196217@163.com; xilingfu@sdau.edu.cn)。

低,同时可能说明在纤维细胞壁形成过程中,同聚半乳糖醛酸的脱甲酯化是必不可少的(Pinzón-Latorre和Deyholos 2013)。目前在模式植物拟南芥中对PMEI基因家族的结构、进化、相互作用机理以及抵御逆境等方面有了一定研究,然而,在木本植物中这个家族基因的系统报道相对较少,对桃PMEI的研究主要集中在食品加工和果实成熟上,对PMEI在其他方面的作用还未见报道。

本研究对桃PpPMEI基因家族进行了鉴定,对其亲缘关系和蛋白特性进行了分析,对PpPMEI基因家族的部分PpPMEI基因进行了组织表达模式分析,亦研究了其对脱落酸(abscisic acid, ABA)、赤霉素(gibberellin, GA)、水杨酸(salicylic acid, SA)的响应情况,为进一步研究桃PpPMEI基因的功能提供参考。

材料与方法

1 PpPMEI基因家族的鉴定

拟南芥PME和PMEI基因家族蛋白序列保守结构域的隐马氏模型(hidden Markov model)从Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org/>)获得,包括PF01095结构域(PME domain)和PF04043结构域(PMEI domain)。利用Phytozome网站(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中的*Prunus persica* v2.1找寻含有PF04043 (PMEI domain)保守结构域的基因,共找到65个基因,然后去除含有PF01095结构域的基因,得到30个只含PF04043结构域(PMEI domain)的基因,这30个基因被鉴定为桃果胶甲酯酶抑制因子家族基因。

2 PpPMEI基因家族的生物信息学分析

利用MEGA 5.0软件,将得到的30个PpPMEI与拟南芥中的PMEI家族采用邻接法(neighbor-joining)构建进化树。将PpPMEI蛋白序列依次提交到理化性质在线分析软件ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)上计算蛋白序列性质。各项指标包括:蛋白序列氨基酸数目、蛋白分子量、蛋白理论等电点;然后通过蛋白质亚细胞定位预测软件TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)对PpPMEI基因家族蛋白序列进行亚细胞定位分析(采用默认参数设置);最后利用信号肽预测软件SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对其进行信号肽预测(采用默认参数设置)。

3 试验材料与处理

试验于2016~2017年在山东农业大学作物生物学国家重点实验室及园艺实验站进行。试验材料为‘中油四号’油桃[*Prunus persica* (L.) Batsch var. *nectarina* Maxim cv. ‘Zhongyousihao’],用于组织特异性表达分析的植物组织按不同时间段在日光温室取下后液氮速冻保存备用。

11月中旬,随机采集大田一年生枝,首先插入清水中预培养一天(温度24.5°C,光照强度40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,昼/夜12 h/12 h,相对空气湿度80%),进行3组处理:(1) GA处理,即125 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA+0.5% Triton 100;(2) ABA处理,即100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA+0.5% Triton 100;(3) SA处理,即1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA+0.5% Triton 100。按时间段取样,用液氮速冻备用。

4 总RNA的提取及实时荧光定量表达

将样品分别在液氮中充分研磨,采用RNAprep Pure Plant Kit (DP441, TIANGEN)提取总RNA,PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, TaKaRa)反转录试剂盒反转录cDNA,利用Primer 3.0设计荧光定量引物,如表1所示。

利用获得的cDNA作为模板,按照SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus)试剂盒(宝生物)说明书上的操作进行荧光定量PCR反应。反应体系为:12.5 μL SYBR® *Premix Ex Taq* (2 \times) (TliRNaseH Plus)、1 μL 上游引物(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL 下游引物(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1.0 μL cDNA,加去离子水至25 μL 。每次试验设置3次技术重复。荧光定量PCR反应条件:95°C预变性30 s;95°C变性5 s,58°C退火30 s,40次循环;反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线。最后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量数据分析。利用GraphPad Prism 6整理数据作图。

实验结果

1 PpPMEI基因家族的鉴定及亲缘关系分析

本研究在桃中找到30个只含有PF04043 (PMEI domain)保守结构域的基因,并在SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)上检索其结构域,验证这些蛋白质有无PF01095结构域 (PME domain)和PF04043结构域,结果显示这30个基因全部为PMEI家族基因。对PpPMEI家族与拟南芥PMEI家族构建进化树进行分析,结果如图1所示,可以看出PpPMEI基因与拟南芥PMEI基因同源程度并不高,

表1 实验所用引物信息

Table 1 Information of primer sequences in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
<i>Prupe.7G193700-sybF1</i>	AACTCTCAACTCCGACCAG	定量
<i>Prupe.7G193700-sybR1</i>	GGCGTTGCTCATCTGAAACA	定量
<i>Prupe.7G193700-sybF2</i>	CCTCCACTCCCTACCCTACT	定量
<i>Prupe.7G193700-sybR2</i>	CTGGTCGGAGTTGGAGAGTT	定量
<i>Prupe.1G118800-sybrF</i>	GAGCTTGCTTCGGGATTCAG	定量
<i>Prupe.1G118800-sybrR</i>	AGTCAACCGTCTTCTCCCAG	定量
<i>Prupe.5G048900-sybrF</i>	GACGCCATTCTACCCTACA	定量
<i>Prupe.5G048900-sybrR</i>	AGCAAGAGAAATGGCGTTCA	定量
<i>Prupe.5G112600-sybrF</i>	CCGGTGCTCTGAATAAAGCC	定量
<i>Prupe.5G112600-sybrR</i>	TCATTCATGCCTTGCTCTGC	定量
β -actin-sybrF	CTTATTCTTCATCGGCTCTTCG	定量
β -actin-sybrR	CTTCACCATTCCAGTCCCATGTC	定量

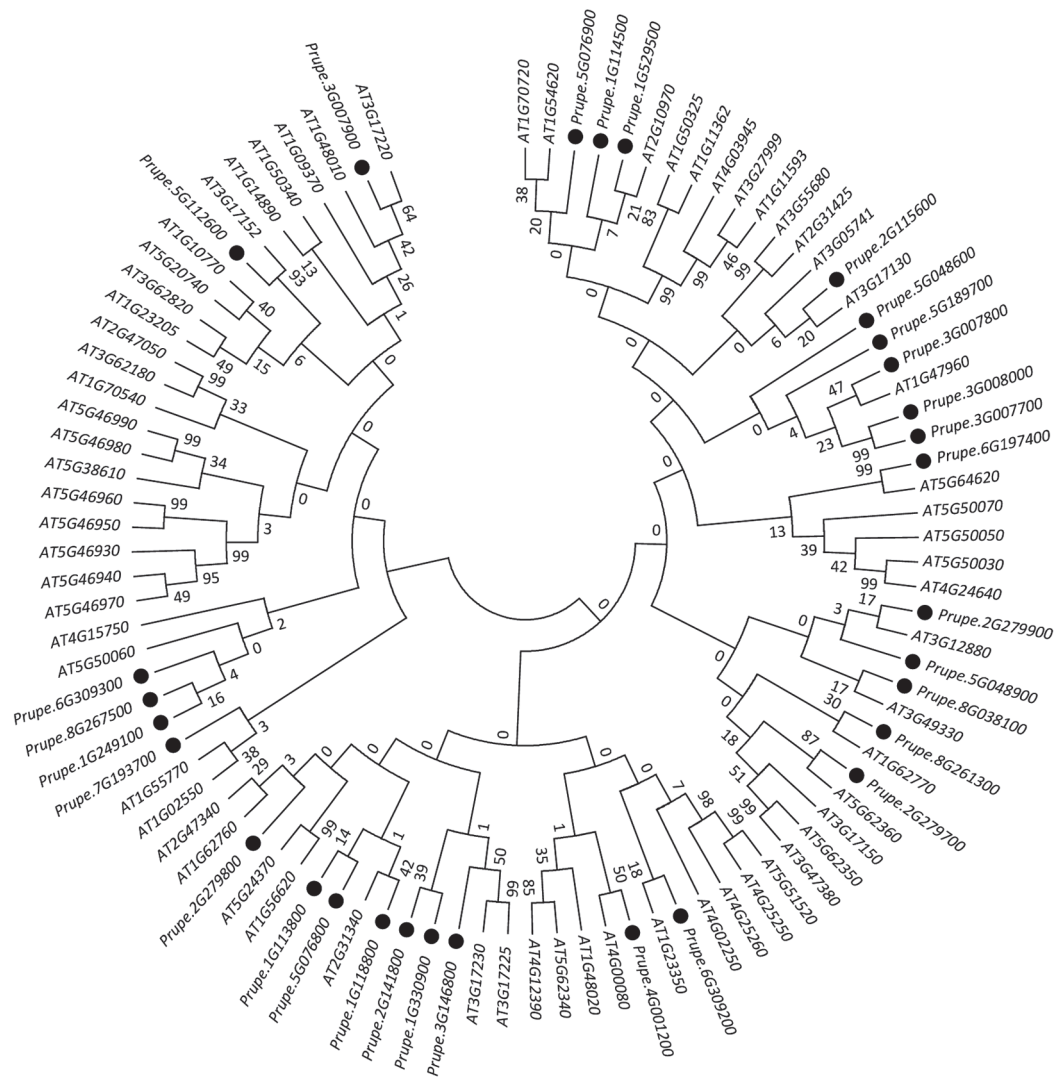


图1 桃与拟南芥PME1的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of PME1 genes in peach and *A. thaliana*

因此并不能根据二者氨基酸序列相似性和进化关系的远近将PpPMEI基因家族分为若干亚族;但是仍然可以看出,在桃和拟南芥的PMEI基因中,存在着2个基因同源对: *Prupe.5G112600*和*AT3G17152*、*Prupe.6G197400*和*AT3G12880*,可靠性分别为93和99,表明他们在桃和拟南芥2个物种中氨基酸序列相似,在各自的物种中可能具有相似的功能。

2 PpPMEI基因家族成员的蛋白特性分析

对PpPMEI进行蛋白特性分析,结果如表2所示,可以看出,PpPMEI的氨基酸序列长度多在200个氨基酸左右,但*Prupe.1G529500*、*Prupe.3G008000*和*Prupe.8G267500*三个基因的氨基酸序列长度分别为564、98、451 aa,远远高于或低于200 aa。等电点分析结果显示,PpPMEI的等电点分布较为

广泛,在4.44~10.02这个范围内均有分布,其中有17个PpPMEI的等电点在酸性范围内,13个PpPMEI的等电点在碱性范围内,30个PpPMEI的平均等电点为7.005。从信号肽分析结果发现,26个PpPMEI具有信号肽,并且切割位点多数集中在20~30 aa之间,只有*Prupe.1G330900*、*Prupe.2G279700*、*Prupe.2G279800*和*Prupe.6G309200*的切割位点在30~40 aa之间。通过TargetP软件进行亚细胞定位预测,有26个PpPMEI定位于分泌通路,即分泌到细胞质,但是大多数可信度并不高,只有*Prupe.1G113800*、*Prupe.2G279700*和*Prupe.5G076800*的可信度达到了5,但其中有18个PpPMEI的可信度仅为1; *Prupe.7G193700*定位于线粒体; *Prupe.2G279800*、*Prupe.5G189700*、*Prupe.8G267500*定位于其他位置。可

表2 桃PpPMEI基因家族理化性质分析

Table 2 Physico-chemical analysis of PpPMEI gene family in peach

基因名称	信号肽	切割位点/aa	氨基酸数目/aa	分子质量/Da	等电点	亚细胞定位	亚细胞定位可信度得分
<i>Prupe.1G113800</i>	无	无	206	22 113.48	5.40	分泌通路	5
<i>Prupe.1G114500</i>	有	25~26	176	18 633.39	5.78	分泌通路	1
<i>Prupe.1G118800</i>	有	26~27	289	30 879.18	8.12	分泌通路	3
<i>Prupe.1G249100</i>	无	无	175	19 312.44	9.03	分泌通路	3
<i>Prupe.1G330900</i>	有	33~34	215	23 261.30	6.28	分泌通路	1
<i>Prupe.1G529500</i>	有	27~28	564	61 476.24	7.14	分泌通路	1
<i>Prupe.2G141800</i>	有	27~28	213	24 081.01	9.62	分泌通路	2
<i>Prupe.2G115600</i>	有	28~29	191	21 718.38	9.47	分泌通路	1
<i>Prupe.2G279700</i>	有	30~31	203	21 453.30	6.41	分泌通路	5
<i>Prupe.2G279800</i>	有	37~38	208	22 255.47	8.73	其他位置	1
<i>Prupe.2G279900</i>	有	22~23	194	21 072.15	9.37	分泌通路	3
<i>Prupe.3G007700</i>	有	21~22	174	19 286.79	5.90	分泌通路	3
<i>Prupe.3G007800</i>	有	25~26	171	19 141.99	5.23	分泌通路	1
<i>Prupe.3G007900</i>	有	27~28	175	19 403.19	4.75	分泌通路	1
<i>Prupe.3G008000</i>	有	21~22	98	11 057.63	8.93	分泌通路	3
<i>Prupe.3G146800</i>	有	29~30	181	19 259.24	4.93	分泌通路	1
<i>Prupe.4G001200</i>	有	22~23	179	19 695.62	6.92	分泌通路	1
<i>Prupe.5G048600</i>	有	28~29	199	21 981.36	4.78	分泌通路	1
<i>Prupe.5G048900</i>	有	24~25	183	20 104.06	6.72	分泌通路	1
<i>Prupe.5G076800</i>	有	27~28	200	22 170.52	6.12	分泌通路	5
<i>Prupe.5G076900</i>	有	23~24	208	22 608.89	10.02	分泌通路	1
<i>Prupe.5G112600</i>	有	23~24	173	18 214.63	4.44	分泌通路	1
<i>Prupe.5G189700</i>	无	无	235	25 380.96	5.24	其他位置	1
<i>Prupe.6G197400</i>	有	21~22	181	19 722.46	7.64	分泌通路	4
<i>Prupe.6G309200</i>	有	31~32	195	21 659.99	5.94	分泌通路	1
<i>Prupe.6G309300</i>	有	17~18	174	19 800.45	5.01	分泌通路	1
<i>Prupe.7G193700</i>	有	23~24	202	22 361.37	8.72	线粒体	3
<i>Prupe.8G038100</i>	有	27~28	180	19 277.07	4.73	分泌通路	1
<i>Prupe.8G261300</i>	有	28~29	200	21 498.63	9.32	分泌通路	1
<i>Prupe.8G267500</i>	无	无	451	49 975.54	9.47	其他位置	4

见, PpPMEI蛋白多为分泌蛋白。

3 PpPMEI基因的组织表达模式分析

对‘中油四号’油桃叶芽、花芽、幼叶等9个组织部位取样, 选取4个PpPMEI分析它们在‘中油四号’油桃不同组织部位的表达情况。图2结果表明, *Prupe.7G193700*主要在桃树的幼叶和幼果中表达, 在花组织中的表达水平非常低, 尤其是花瓣中表达量最低。*Prupe.1G118800*在雄蕊和成熟花中表达量高, 说明该基因主要在花器官中表达; *Prupe.1G118800*在花芽中表达量是叶芽的3.18倍, 在成熟花中的表达量是叶芽的22.81倍, 在雄蕊中的表达水平高于叶芽196.29倍, 可以推测出*Prupe.1G118800*可能随着花器官的发育而表达水平升高, 尤其是在雄蕊的发育过程中发挥重要作用。而*Prupe.5G048900*只在叶芽和雄蕊中表达量较低, 在幼果和花器官中的表达水平均非常高, 尤其是在雌蕊中的表达量是叶芽的1700多倍, 推测该基因在雌蕊的发育过程中发挥重要作用。*Prupe.5G112600*在花芽和幼叶

中的表达水平较高, 分别是叶芽的22倍和64倍, 在成熟花中的表达量相对于叶芽基本无变化, 由于该基因随着花芽的发育表达量下降, 并且该基因随着叶芽的发育表达量上升, 所以推测该基因参与叶的发育过程。这4个PpPMEI在不同的组织中具有不同的表达模式, 其功能可能也有较大差异。

4 PpPMEI基因在幼果发育过程中的表达分析

为进一步研究PpPMEI在果实发育中的作用, 通过实时荧光定量PCR检测了PpPMEI在幼果发育过程中的表达水平。如图3所示, *Prupe.7G193700*的表达量在幼果发育过程中先升后降, 而*Prupe.5G112600*和*Prupe.1G118800*的表达水平在幼果的发育中有逐渐降低的趋势; *Prupe.5G048900*的表达量在幼果的发育过程中并没有显著变化。通过表达模式的变化可以看出这4个PpPMEI在幼果的发育中存在着不同的功能。

5 PpPMEI基因对激素处理的响应

从图4中我们可以看出, GA处理花芽之后,

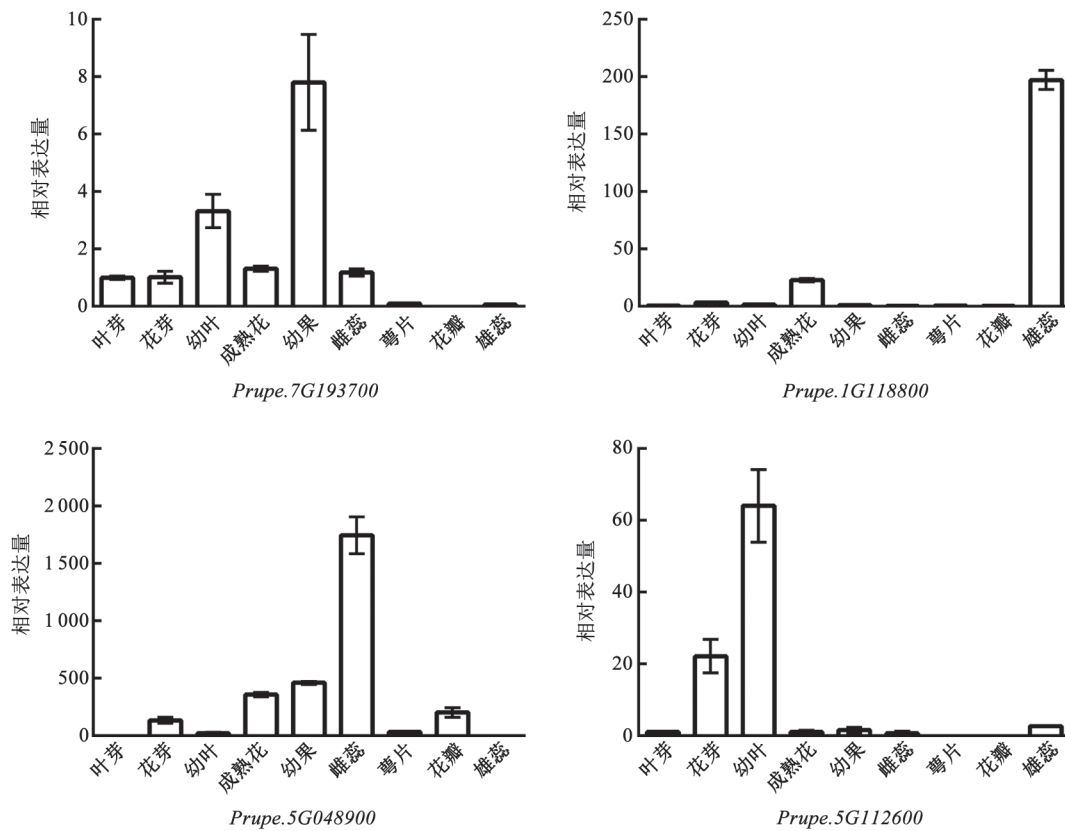
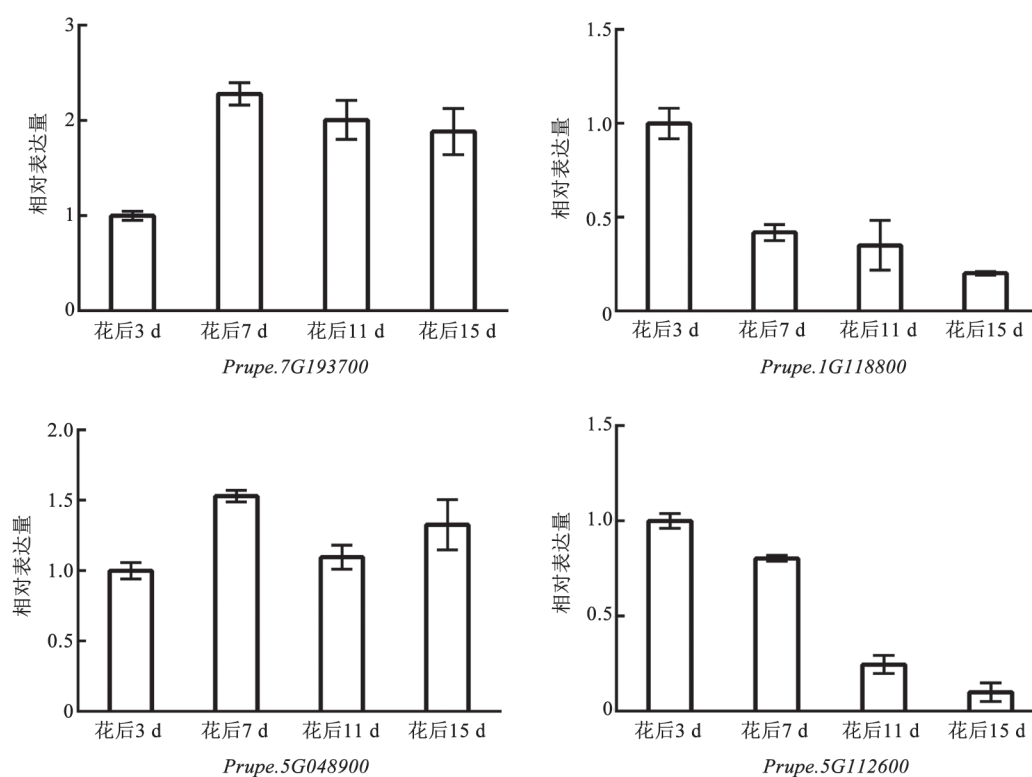


图2 PpPMEI基因在不同组织中的表达分析

Fig.2 Expression analysis of PpPMEI genes in different tissues

图3 *PpPMEI*基因在幼果发育过程中的表达分析Fig.3 Expression analysis of *PpPMEI* genes in developing fruit

*Prupe.7G193700*的表达水平先升高后逐渐降低, *Prupe.5G048900*和*Prupe.5G112600*可被GA诱导表达, *Prupe.1G118800*的表达量在5 d后达到最低。ABA处理之后, *Prupe.7G193700*和*Prupe.1G118800*的表达水平无明显变化, *Prupe.5G048900*和*Prupe.5G112600*表达量在7 d后达到最高, 分别是处理12 h的6.4和9.1倍。SA处理花芽之后, *Prupe.7G193700*和*Prupe.1G118800*的表达量变化较小, *Prupe.5G048900*和*Prupe.5G112600*的表达水平最终升高。从中我们可看出, *Prupe.5G048900*和*Prupe.5G112600*对GA、ABA和SA的响应模式具有相似性, 可被GA、ABA和SA三种激素诱导表达; *Prupe.1G118800*对三种激素的响应不大; *Prupe.7G193700*被GA抑制表达。

讨 论

*PMEI*家族已在一些物种中被鉴定, 包括拟南芥、烟草(*Nicotiana* sp.)、杨树(*Populus* sp.)、猕猴桃等植物, 本文在桃中鉴定出30个只具有PMEI结构域的PMEI家族成员。马婧(2016)发现毛果杨(*P.*

trichocarpa)中PMEI家族成员与拟南芥的PMEI家族亲缘关系较远; 本研究通过构建进化树分析发现, 桃中PpPMEI家族与拟南芥PMEI家族的同源程度并不高, 可能是因为木本植物在进化过程中保守程度低。大部分PpPMEI含有信号肽, 亚细胞定位预测结果表明PpPMEI多数定位于分泌通路。研究发现PMEI多定位于胞间层, 但是水稻(*Oryza sativa*)*OsPMEI12*定位于细胞膜和细胞核(Nguyen等2016), 甘蓝*BoPMEI1*也定位于细胞膜(Zhang等2010), 说明PMEI在细胞中存在多种分布形式, 也预示PMEI功能的多样性。

拟南芥、水稻、小麦(*Triticum aestivum*)等植物的PMEI均已进行过报道, 发现PMEI参与了植物的根、花、果实等的发育(Röckel等2008; Hocq等2016; Nguyen等2017; Hong等2010)。猕猴桃AcPMEI1调控花粉管和根的发育, 并且可以与拟南芥AtPME在体外形成复合物, 抑制拟南芥AtPME的活性(Payne等2014)。Nguyen等(2016)发现水稻*OsPMEI*的活性在幼叶中最高, *OsPMEI49*在花中表达量较高; 水稻中*OsPMEI28*的过表达植株出现矮

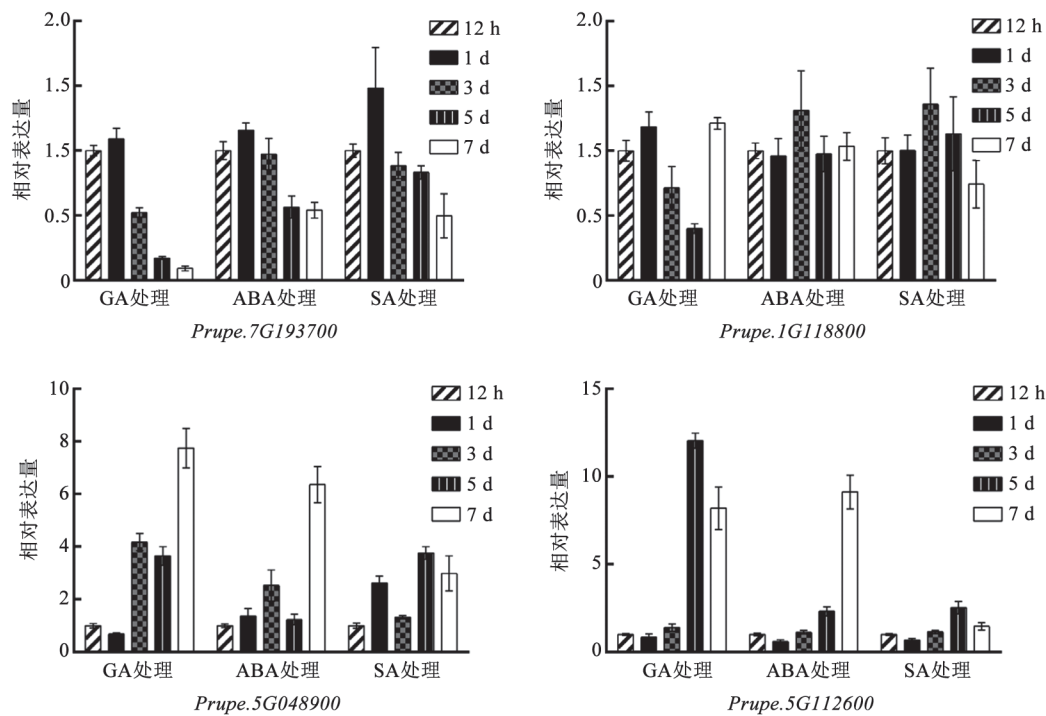


图4 *PpPMEI*基因在GA、ABA、SA处理下的表达变化

Fig.4 Changes in relative expressions of *PpPMEI* genes under GA, ABA and SA treatments

化现象并且果胶的甲酯化程度升高。桃*PpPMEI*在各个组织中表达模式不同,虽然*Prupe.1G118800*和*Prupe.5G048900*在花芽和成熟花中表达量高,但是*Prupe.1G118800*主要在雄蕊中表达, *Prupe.5G048900*主要在雌蕊和花瓣中表达,在雄蕊中的表达水平较低。*Prupe.7G193700*在幼叶和幼果中表达量较高;其在幼果的发育过程中表达呈升高趋势,推测其对果实的发育具有一定的作用。*Prupe.5G112600*在幼叶中表达量是叶芽中的64倍,其在叶的发育过程中可能起到积极作用。

一些植物激素对*PMEI*的表达具有调控作用,如SA、乙烯、茉莉酸甲酯和ABA等能够诱导辣椒*CaPMEI*在叶中表达(An等2008)。ABA处理花后102 d的桃果实*PMEI*的表达下调,而处理花后115 d的果实*PMEI*的表达量增加,表明在不同阶段*PMEI*对ABA的响应存在差异(Soto等2013)。Hong等(2010)研究发现小麦*TaPMEI*经过SA处理6 h后可强烈表达,表明该基因表达与SA信号有关,相反ABA抑制*TaPMEI*的表达。本研究利用ABA、GA、SA三种激素处理桃花芽,发现*PpPMEI*对三种激素具有不同的表达模式。*Prupe.7G193700*在

三种激素处理下,表达量在3 d后开始下降,尤其是在GA处理3 d后表达量下降迅速,说明GA抑制该基因表达,推测该基因可能在GA的代谢通路中起到负调控作用;同时发现ABA和SA对*Prupe.1G118800*的表达基本无影响。*Prupe.5G048900*和*Prupe.5G112600*均可被ABA和GA诱导表达,SA处理后二者变化幅度不大,但处理5 d后表达量均增加,二者对激素的响应具有相似性,可能在抗逆等方面存在相似的功能。本文对桃*PpPMEI*基因家族的鉴定、同源性分析及表达分析为进一步研究*PpPMEI*基因在调控桃的花与果实发育以及激素响应等方面提供参考。

参考文献

- An SH, Sohn KH, Choi HW, Hwang IS, Lee SC, Hwang BK (2008). Pepper pectin methylesterase inhibitor protein CaPMEI1 is required for antifungal activity, basal disease resistance and abiotic stress tolerance. *Planta*, 228 (1): 61–78
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J*, 3 (1): 1–30
- Coutinho PM, Stam M, Blanc E, Henrissat B (2003). Why there are so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants?

- Trends Plant Sci, 8 (12): 563–565
- Derbyshire P, McCann MC, Roberts K (2007). Restricted cell elongation in *Arabidopsis* hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level. *BMC Plant Biol*, 7: 31
- Hocq L, Sénéchal F, Lefebvre V, Lehner A, Domon JM, Mollet JC, Dehors J, Pageau K, Marcelo P, Guérineau F, et al (2016). Combined experimental and computational approaches reveal distinct pH dependence of pectin methylesterase inhibitors. *Plant Physiology*, 173 (2): 1075–1093
- Hong MJ, Kim DY, Lee TG, Jeon WB, Seo YW (2010). Functional characterization of pectin methylesterase inhibitor (*PMEI*) in wheat. *Genes Genet Syst*, 85: 97–106
- Liu QU, Chen YH, Shen ZG, Zheng LQ (2014). Roles of cell wall in plant heavy metal tolerance. *Plant Physiol J*, 50 (5): 605–611 (in Chinese with English abstract) [刘清泉, 陈亚华, 沈振国, 郑录庆(2014). 细胞壁在植物重金属耐受性中的作用. *植物生理学报*, 50 (5): 605–611]
- Ma J (2016). Pectin methylesterases (PME) and pectin methylesterase inhibitors (PMEI) gene families in poplar and their responses to salt stress. Beijing: Chinese Academy of Forestry Sciences (in Chinese with English abstract) [马婧(2016). 杨树果胶甲酯酶(PME)与果胶甲酯酶抑制剂(PMEI)基因家族及其对盐胁迫的响应. 北京: 中国林业科学研究院]
- Micheli F (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci*, 6 (9): 414–419
- Nguyen HP, Jeong HY, Jeon SH, Kim D, Lee C (2017). Rice pectin methylesterase inhibitor28 (OsPMEI28) encodes a functional PMEI and its overexpression results in a dwarf phenotype through increased pectin methylesterification levels. *J Plant Physiol*, 208: 17–25
- Nguyen HP, Jeong HY, Kim H, Kim YC, Lee C (2016). Molecular and biochemical characterization of rice pectin methylesterase inhibitors (OsPMEIs). *Plant Physiol Bioch*, 101: 105–112
- Paynel F, Leroux C, Surcouf O, Schaumann A, Pelloux J, Driouich A, Mollet JC, Lerouge P, Lehner A, Mareck A (2014). Kiwi fruit PMEI inhibits PME activity, modulates root elongation and induces pollen tube burst in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul*, 74 (3): 285–297
- Pérez S, Mazeau K, du Penhoat H (2000). The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol Bioch*, 38 (1–2): 37–55
- Pinzón-Latorre D, Deyholos MK (2013). Characterization and transcript profiling of the pectin methylesterase (PME) and pectin methylesterase inhibitor (PMEI) gene families in flax (*Linum usitatissimum*). *BMC Genom*, 14: 742
- Prasanna V, Prabha TN, Tharanathan RN (2007). Fruit ripening phenomena—an overview. *Crit Rev Food Sci*, 47 (1): 1–19
- Reca IB, Lionetti V, Camardella L, D’Avino R, Giardina T, Cervone F, Bellincampi D (2012). A functional pectin methylesterase inhibitor protein (SolyPMEI) is expressed during tomato fruit ripening and interacts with PME-1. *Plant Mol Biol*, 79 (4): 429–442
- Ren C, Kermode AR (2000). An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiol*, 124: 231–242
- Ridley BL, O’Neill MA, Mohnen D (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57 (6): 929–967
- Roberts JA, Whitelaw CA, Gonzalez-Carranza ZH, McManus MT (2000). Cell separation processes in plants—models, mechanisms and manipulation. *Ann Bot*, 86 (2): 223–235
- Röckel N, Wolf S, Kost B, Rausch T, Greiner S (2008). Elaborate spatial patterning of cell-wall PME and PMEI at the pollen tube tip involves PMEI endocytosis, and reflects the distribution of esterified and de-esterified pectins. *Plant J*, 53 (1): 133–143
- Sénéchal F, Mareck A, Marcelo P, Lerouge P, Pelloux J (2015). *Arabidopsis* PME17 activity can be controlled by pectin methylesterase inhibitor4. *Plant Signal Behav*, 10 (2): e983351
- Soto A, Ruiz KB, Ravaglia D, Costa G, Torrigiani P (2013). ABA may promote or delay peach fruit ripening through modulation of ripening- and hormone-related gene expression depending on the developmental stage. *Plant Physiol Biochem*, 64 (5): 11
- Wang M, Yuan D, Gao W, Li Y, Tan J, Zhang X (2013). A comparative genome analysis of PME and PMEI families reveals the evolution of pectin metabolism in plant cell walls. *PLoS ONE*, 8 (8): e72082
- Wolf S, Mouille G, Pelloux J (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol Plant*, 2 (5): 851–860
- Zhang GY, Feng J, Wu J, Wang XW (2010). BoPMEI1, a pollen-specific pectin methylesterase inhibitor, has an essential role in pollen tube growth. *Planta*, 231 (6): 1323–1334
- Zhang L, Xue JA, Yu HQ, Li QY, Li RZ (2012). The expression and function study of pectin methylesterase genes which regulate and control the petal falling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol J*, 48 (4): 350–358 (in Chinese with English abstract) [张莉, 薛金爱, 于浩泉, 李巧英, 李润植(2012). 调控拟南芥花瓣脱落的果胶甲酯酶基因表达和功能分析. *植物生理学报*, 48 (4): 350–358]
- Zhang Q, Bao YQ, Tan XY (2015). Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* pectin methylesterase gene *PMEI7* in immunity against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Plant Physiol J*, 51 (7): 1061–1066 (in Chinese with English abstract) [张倩, 鲍依群, 谭小云(2015). 拟南芥果胶甲酯化酶基因PMEI7在抵御丁香假单胞杆菌番茄致病变种DC3000株中的功能. *植物生理学报*, 51 (7): 1061–1066]

Identification and expression analysis of *PMEI* gene family in peach

JI Mei-Ling, LI Ling, CHEN Min, WANG Ya-Qi, LIU Li, HUAN Lei, GAO Dong-Sheng, ZHU Cui-Ying*, FU Xi-Ling*

College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University; State Key Laboratory of Crop Biology; Shandong Collaborative Innovation Center for Fruit & Vegetable Production with High Quality and Efficiency, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: Pectin methylesterase inhibitor (PMEI) can inhibit the de-esterification of the functions of pectin methylesterase (PME), and then regulate the activity of PME. Thirty *PpPMEI* genes in peach (*Prunus persica*) were identified in this study. *PpPMEI* proteins are not closer to *AtPMEIs*. Bioinformatic analysis shows that 26 *PpPMEI* proteins have signal peptides, the theoretical isoelectric points were between 4.44 and 10.02, and most of *PpPMEI* proteins were localized in secretory pathway. Using quantitative real-time PCR, we found that *PpPMEI* were expressed differently in flower, fruit and leaf. Furthermore, the mean expression levels of two *PpPMEI* genes (*Prupe.1G118800* and *Prupe.5G112600*) decreased with the growth of young fruit. *Prupe.5G048900* and *Prupe.5G112600* could be induced by gibberellin (GA) and salicylic acid in peach, however, *Prupe.7G193700* was inhibited by GA. Therefore, *PpPMEI* genes may play an important role in the process of growth and development in peach. These results would be useful for the study in this field.

Key words: peach; *PpPMEI*; bioinformatic analysis; expression analysis

Received 2017-05-02 Accepted 2017-09-25

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31672137 and 31372050), and the Modern Agricultural Industry Technology System of Shandong Province (Grant No. SDAIT-06-01).

*Co-corresponding authors (E-mail: chunying196217@163.com; xilingfu@sdau.edu.cn).