

鸭梨 *PbADC* 基因的鉴定及在果心褐变中的表达

李庆秀¹, 邓冰², 寇晓敏¹, 李萍³, 吴海清^{1,4}, 梁丽雅⁵, 闫师杰^{1,4*}

¹天津农学院 食品科学与生物工程学院 天津 300384

²山西农业大学食品科学与工程学院 山西晋中 030801

³天津农学院 基础科学学院 天津 300384

⁴天津市农副产品深加工技术工程中心 天津 300384

⁵天津农学院 农学与资源环境学院 天津 300384)

摘要 为探究精氨酸脱羧酶(ADC)在鸭梨果心褐变中的调控作用,以鸭梨为材料,对 ADC 进行鉴定、蛋白生物信息学分析及基因表达模式分析。结果表明:成功鉴定 1 个 *PbADC* 基因,该基因开放阅读框(ORF)为 2 193 bp,编码蛋白 730 个氨基酸残基。系统发育分析表明 *PbADC* 蛋白与杜梨、苹果、秋子梨×西洋梨和湖北海棠 ADC 亲缘关系较近,同源比对结果显示 *PbADC* 蛋白包含完整的 Orn_Arg_deC_N 结构域、精氨酸脱羧酶家族 2-磷酸吡哆醛结合位点和 2 个重要的酶活位点。生物信息学分析显示 *PbADC* 为亲水性不稳定蛋白,蛋白分子质量 78.403 ku,理论等电点 5.23。二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主,不含信号肽和跨膜结构。急速降温处理组的鸭梨果心褐变指数大于缓慢降温处理组。荧光定量 PCR 及酶活分析结果表明,在鸭梨褐变发生过程中,*PbADC* 基因的表达量出现先升后降的趋势,其表达量与 ADC 酶活力的变化相吻合。本研究明确了 *PbADC* 蛋白的生物信息学特性及 *PbADC* 基因在贮藏期间的差异表达,为今后深入开展鸭梨采后果心褐变发生机制研究提供了理论基础。

关键词 鸭梨; 褐变; 精氨酸脱羧酶基因; 基因鉴定; 表达分析

文章编号 1009-7848(2023)11-0046-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.005

鸭梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd cv. Yali)属于蔷薇科白梨品系的一种,是我国最早的出口商品之一^[1-2]。鸭梨作为我国出口梨的主打品种,以其鲜嫩多汁、酸甜可口、香气浓郁、耐贮藏等优点而备受消费者青睐,然而其在贮藏期间极易发生逆境伤害,导致果实内部褐变,严重降低了果实的贮藏质量和食用口感,从而造成严重的经济损失^[3-4],因此解决鸭梨褐变问题十分必要。

有研究显示,内源多胺在植物细胞中的累积水平越高,对植物的胁迫抗逆性就越强,而多胺合成酶基因表达水平的上调是其累积的先决条件^[5-6]。多胺(Polyamines, PAs)是一类含有 2 个或更多氨基组成的带正电荷的小分子化合物,在生物体内普遍分布^[7-10]。高等植物体内的主要多胺有腐胺、亚精胺和精胺,它们对植物的生长发育及逆

境响应起着非常重要的调控作用^[11-14]。当果蔬受到逆境伤害时,其游离态腐胺会转变成亚精胺和精胺,从而得到较高含量的游离态亚精胺和精胺来抵御逆境胁迫及自身衰老过程中的一系列伤害^[15]。王颀等^[16]研究表明外源多胺处理可以显著降低鸭梨果心组织 CO₂ 含量,抑制其褐变的发生。多胺的生物合成主要有两条途径,一条是通过鸟氨酸脱羧酶(ODC)将鸟氨酸转化为腐胺;另一条精氨酸脱羧酶(Arginine decarboxylase, ADC)催化精氨酸经脱羧和酶促反应后,再形成腐胺(Putrescine, Put)。ADC 是植物在逆境胁迫条件下合成多胺的关键限速酶,能够将精氨酸转化为 Put,该途径为高等植物所独有,其结构与功能备受关注^[17-20]。精氨酸脱羧酶(ADC)是依赖磷酸吡哆醛(PLP)的一类酶,广泛存在于微生物和动植物中,且 ADC 一般存在于植物的细胞质中,对外界各种胁迫反应都十分敏感。目前研究发现 ADC 在植物抗逆、根系发育及细胞伸长等方面具有重要的功能,而其在果蔬,特别是鸭梨等果蔬采后褐变中的功能尚未见报道。

收稿日期: 2022-11-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072278);天津市自然科学基金重点项目(20JCZDJC00420)

第一作者: 李庆秀,女,硕士生

通信作者: 闫师杰 E-mail: yanshijie@126.com

本研究以鸭梨果心为材料,从鸭梨转录组数据中筛选并鉴定 *PbADC* 基因,通过生物软件来预测其基本生物学特性,并利用 qRT-PCR 技术对其在鸭梨采后贮藏期间的表达模式进行分析。通过以上研究为探索 *PbADC* 基因在鸭梨采后果心褐变中的调控机制提供依据,为进一步解析鸭梨果心褐变机理奠定分子和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

鸭梨于 2020 年采自河北省辛集市,采摘时间为 8 月 26 日(盛花期后 145 d),即早采鸭梨:挑选大小均一、无机械伤和病虫害的果实,采摘后当天运回冷库,预冷 24 h 后进行急速降温【直接放入 $(0\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 】和缓慢降温处理【先放入 12°C 的冷库中,每 5 d 降 2°C ,30 d 降到 $(0\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 】,每个处理各 10 箱。分别在贮藏 0,30,60,90,120,150,180 d 和 210 d 进行果心组织取样,用液氮将所有样品速冻后置于 -80°C 超低温冰箱中保存。

1.2 试验设备与仪器

TAdvanced 96 温度梯度 PCR 仪,德国耶拿分

析仪器公司;Quantagene q225 荧光定量 PCR 仪,北京酷博科技有限公司;GenSens 2100 凝胶成像仪,上海勤翔科学仪器有限公司;PowerPac Basic 1645050 电泳仪,美国伯乐公司;Eppendorf 5418 小型台式高速离心机,德国艾本德股份公司;NanoDrop one 超微量分光光度计,美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 试验方法

1.3.1 基因鉴定 参考韩云云等^[21]的方法,并略作修改。利用在线软件 SMART 和 Pfam 对从转录组数据中筛选的基因进行注释,使用 NCBI 中的 Blast P 分析 ADC 蛋白的保守结构域,基因结构用 IBS 1.0 软件进行可视化。

1.3.2 系统发育树构建及多序列比对 *PbADC* 蛋白和其部分同源序列使用 NCBI 数据库中的 BLAST 检索并下载,系统发育树使用 MEGA 6.0 软件进行构建,*PbADC* 蛋白与其亲缘关系较近的 ADC 蛋白使用 DNAMAN 软件进行多序列比对。

1.3.3 蛋白生物信息学分析 参考韩云云等^[21]的方法对 *PbADC* 蛋白进行生物信息学分析。

表 1 蛋白生物信息学分析软件

Table 1 The software of protein bioinformatics analysis

生物软件/在线网站	功能
ProtParam(https://web.expasy.org/protparam/)	理化性质分析
SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)、 SWISS-MODEL(https://swissmodel.expasy.org/)	蛋白二、三级结构预测
ExPASy-ProtScale(https://web.expasy.org/protscale/)	亲水性分析
Cell-Ploc(http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-Ploc-2/)	细胞定位预测
SignalP 4.1 Server(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1)	信号肽分析
TMHMM Server(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0)	跨膜结构分析

1.3.4 果心褐变指数的测定 参考闫师杰等^[22]的方法,并略作修改;分别在贮藏 0,30,60,90,120,150,180 d 和 210 d 随机从急降和缓降处理的 10 箱鸭梨中各选取 30 个鸭梨,每组 10 个,把鸭梨切开后统计其果心子房室的褐变情况。褐变指数计算方法见式(1)。

$$\text{鸭梨褐变指数} = \frac{\sum(\text{褐变级别} \times \text{该级别果数})}{\text{最高褐变级别} \times \text{检查果数}} \quad (1)$$

1.3.5 总 RNA 提取和相对表达量测定 参考张

引引^[2]和樊晓岚等^[23]的方法,略作改动。

1.3.5.1 总 RNA 提取和反转录 根据植物多糖多酚试剂盒说明书进行鸭梨果心组织样品总 RNA 的提取;制备 1%的琼脂糖凝胶,并用水平电泳检测 RNA 提取的质量;采用 Nanodrop 超微量分光光度计测定 RNA 在不同波长下 (260 nm 和 280 nm 处)的 OD 值,来确定 RNA 的浓度及纯度。使用宝生物的反转录试剂盒(RR047A)将 $1\ \mu\text{L}$ 的总 RNA 为模板进行反转录,合成 cDNA(具体操作

参照说明书),反应结束后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.3.5.2 相对表达量测定 将获得的 cDNA 参照确定的基因序列用 NCBI blast primer 设计用于荧光定量 PCR 反应的引物(表 2)。参照试剂盒说明书把荧光定量 PCR 反应体系充分混匀后,置于荧光定量 PCR 仪中进行反应,反应结束后根据得到的溶解曲线和扩增曲线确定数据的可靠性,并进行计算。将 *PbActin*(登录号 GU830958.1)作为内参基因,用降温前(贮藏 0 d)样品中的相关基因表达量作为标准,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算出不同样品的基因相对表达量^[21]。

1.3.6 精氨酸脱羧酶(ADC)活性的测定 采用植物精氨酸脱羧酶试剂盒进行精氨酸脱羧酶(ADC)活性的测定。

1.3.7 数据统计及分析 利用 Excel 2016 和 IBM SPSS 统计软件进行数据处理和方差分析,使用 Origin 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 *PbADC* 基因鉴定

从鸭梨转录组数据中得到 1 条与 *ADC* 基因具有同源性的编码序列,通过 SMART 在线工具对该序列所编码的蛋白进行结构域分析,结果表明 *PbADC* 蛋白第 127~399 位氨基酸残基为

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study	
基因名称	序列(5→3)
<i>PbActin</i>	F:GCTGCTGGCATTTCATGAGAC
	R:TTGACCCACCACTAAGCACC
<i>PbADC</i>	F:TGGACTCACCACCACTCAGA
	R:GATACGCCATCAGCGAGCAG

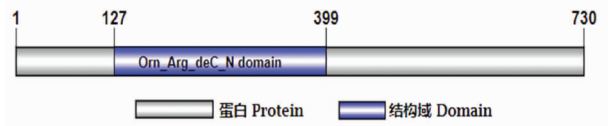


图 1 *PbADC* 基因结构域预测

Fig.1 Domain prediction of *PbADC* gene

Orn_Arg_deC_N 结构域(图 1),再结合 CDD 注释结果确定该序列为 *PbADC* 基因的编码序列。而后对 *PbADC* 基因的 DNA 序列进行分析,结果显示该基因 DNA 序列长度为 3 020 bp,其最长开放阅读框为 2 193 bp,编码 730 个氨基酸。

2.2 *PbADC* 氨基酸序列比对和系统发育树构建

为分析 *PbADC* 与其它植物 ADC 蛋白的进化关系,通过 MEGA 6.0 软件,用 ML 法进行构建鸭梨(*Pyrus bretschneideri*)、杜梨(*Pyrus betulifolia*)、苹果(*Malus domestica*)、秋子梨×西洋梨(*Pyrus ussuriensis* × *Pyrus communis*)、湖北海棠(*Malus*

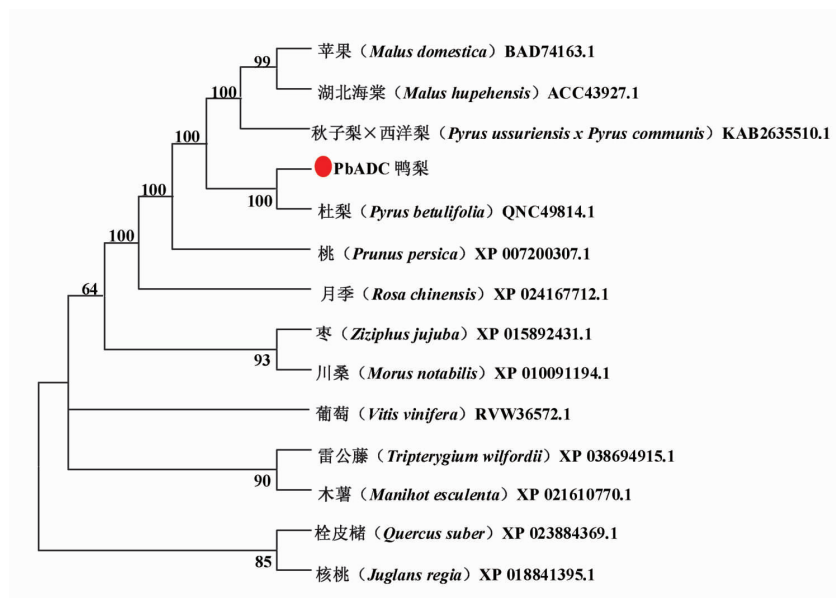
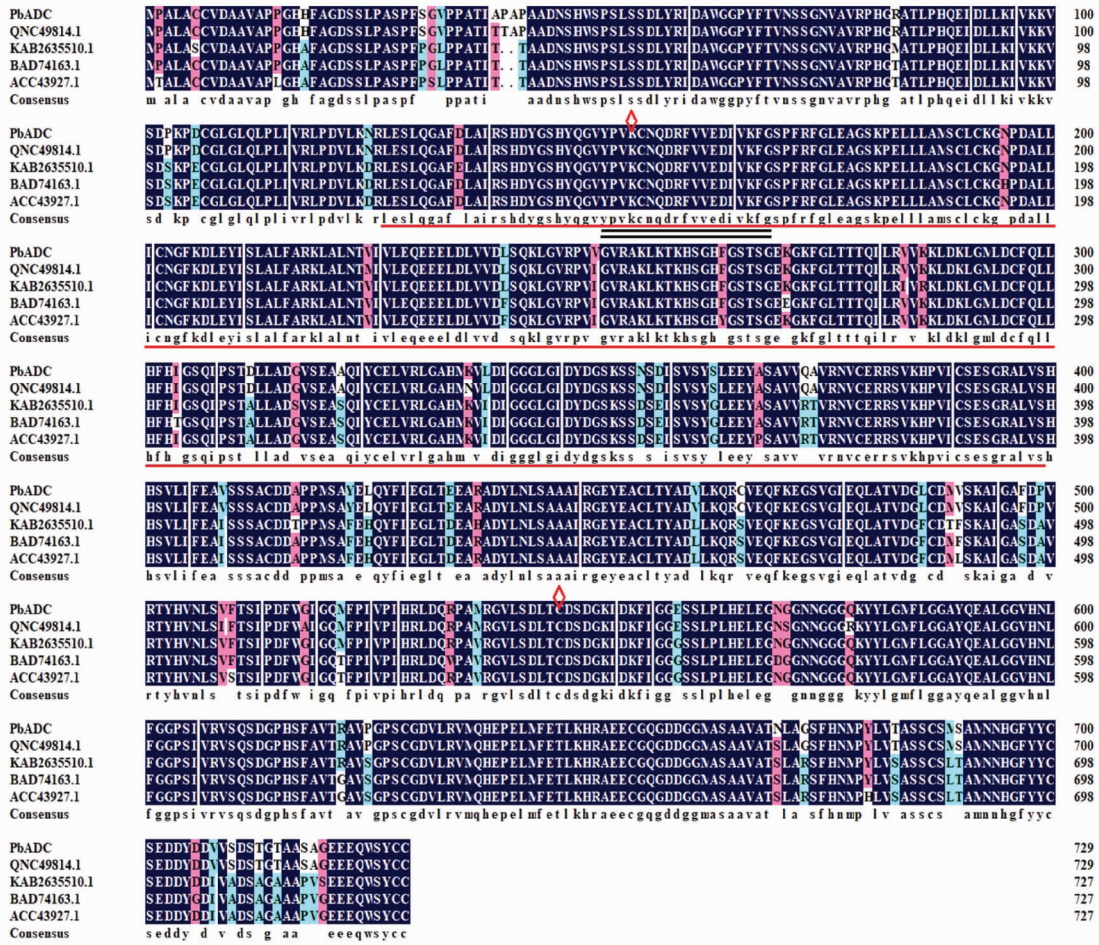


图 2 *PbADC* 蛋白与部分物种 ADC 蛋白的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *PbADC* protein and ADC protein of some species

hupehensis)、桃(*Prunus persica*)、月季(*Rosa chinensis*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、雷公藤(*Tripterygium wilfordii*)、枣(*Ziziphus jujuba*)、川桑(*Morus notabilis*)、栓皮栎(*Quercus suber*)、核桃(*Juglans regia*)、木薯(*Manihot esculenta*)ADC 蛋白系统发育树。结果(图 2)表明,PbADC 蛋白与杜梨、秋子梨×西洋梨、苹果和海棠 ADC 亲缘关系较近。同时使用 DNAMAN 软件对 PbADC、杜梨、秋子梨×西洋

梨、苹果和湖北海棠 ADC 蛋白的氨基酸序列进行多重序列比对分析,结果(图 3)显示其整体一致性为 96.66%,且均含一个完整的 Orn_Arg_deC_N 结构域,并具有 2 个关键的酶活位点:氨基末端的赖氨酸(K)和羧基末端的半胱氨酸(C),并在第 151~169 位残基发现精氨酸脱羧酶家族 2-磷酸吡哆醛结合位点。



注:单下划线部分为精氨酸脱羧酶结构域;双下划线部分为精氨酸脱羧酶家族 2-磷酸吡哆醛结合位点;◇表示氨基末端的赖氨酸(K)和羧基末端的半胱氨酸(C)这两个关键的酶活位点。

图 3 PbADC 与其它同源蛋白的序列比对

Fig.3 Sequence alignment of PbADC with other homologous proteins

2.3 PbADC 蛋白生物信息学分析

2.3.1 PbADC 理化性质分析 采用在线软件 ProtParam 预测了 PbADC 的理化性质。PbADC 氨基酸残基为 730,其中甘氨酸(Gly,9.60%)、亮氨酸(Leu,10.10%)、丝氨酸(Ser,9.30%)、缬氨酸

(Val,8.10%)和丙氨酸(Ala,8.60%)是该蛋白中最主要的几种氨基酸;分子式为 C₃₄₆₃H₅₄₀₆N₉₄₀O₁₀₆₃S₃₇,分子质量为 78.403 ku;含正电(Arg+Lys)的氨基酸数 58 个,含负电(Asp+Glu)的氨基酸数 87 个;理论等电点为 5.23,不稳定系数为 42.64(大于 40),

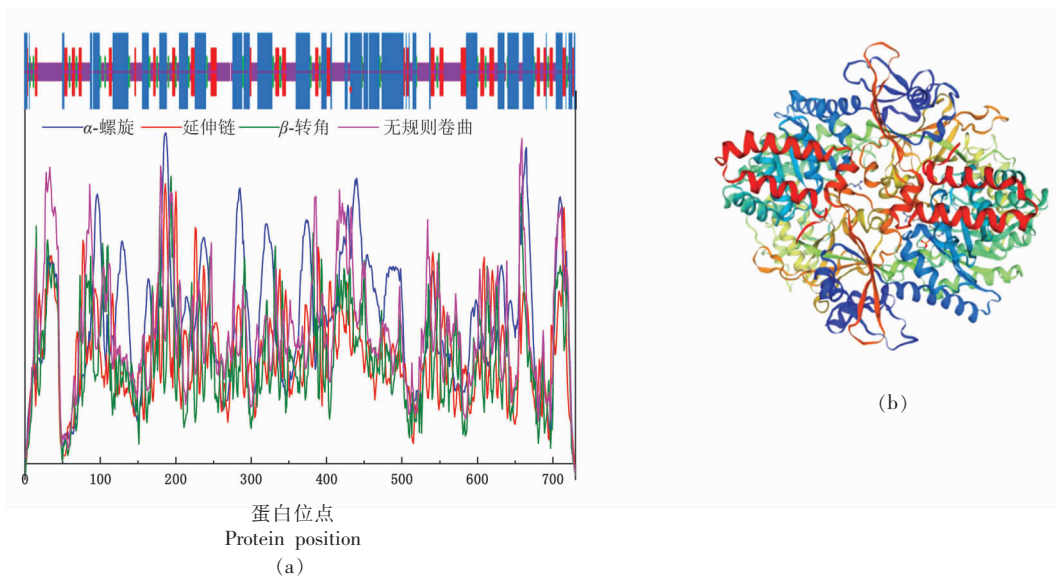


图4 PbADC蛋白的二、三级结构预测

Fig.4 The prediction of secondary structure and tertiary structure of PbADC protein

属于酸性不稳定蛋白。

2.3.2 PbADC蛋白二、三级结构分析 使用SOPMA和SWISS-MODEL在线工具分析并预测了PbADC的二、三级结构,结果显示PbADC蛋白主要由 α -螺旋和无规则卷曲构成,其中 α -螺旋占42.05%、无规则卷曲占35.48%、延伸链和 β -转角分别占15.48%和6.99%(图4a和4b)。

2.3.3 PbADC蛋白亲水性分析 使用ExPASy-ProtScale在线工具分析了PbADC的亲水性,结果表明PbADC蛋白表面存在722个亲水基团,以第188位氨基酸残基(Met)的疏水能力最强,为2.567;在第143位(Tyr)疏水能力最弱,为-2.111(图5)。从总体上看,PbADC蛋白表面的总亲水位点数量(375个)大于总疏水位点(347个),且总平均亲水系数为-0.044,说明该蛋白为亲水蛋白。

2.3.4 PbADC蛋白细胞定位与信号肽分析 利用SignalP 4.1 Server对PbADC蛋白的信号肽进行了预测,发现前60位氨基酸中最高信号肽、初始剪切位点和综合剪切位点的分值均低于0.5(图6a),且信号肽预测的结果显示为no,表明不存在信号肽。蛋白质的跨膜区域主要是指膜内在蛋白和细胞膜的膜脂相结合的部位,为了寻找跨膜结构域,用TMHMM Server在线工具对PbADC蛋白进行了预测,结果表明该蛋白的跨膜螺旋数

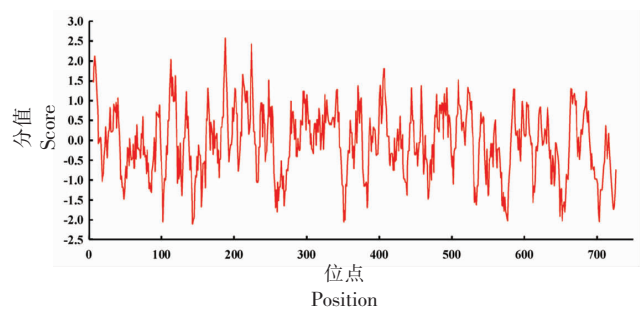


图5 PbADC蛋白的亲水性分析

Fig.5 Hydrophilic analysis of PbADC protein

量为0,没有跨膜结构(图6b)。综上所述,推测PbADC为一种非分泌蛋白,不会进入其它细胞器发挥作用。利用PSORT和Cell-Ploc在线软件对PbADC在细胞中的定位情况进行了预测,结果发现PbADC蛋白主要存在于细胞质中。

2.4 PbADC基因在鸭梨采后褐变过程中的表达模式分析

果心褐变指数是显示褐变严重程度的一个重要指标,它既可看出整体果实的褐变情况,也可看出单个果心的褐变程度。不同处理组鸭梨果心的褐变指数随贮藏时间的增加而增加(图7a)。在贮藏120 d时,急降和缓降处理组的鸭梨均出现了不同程度的果心褐变,褐变指数分别为0.217和

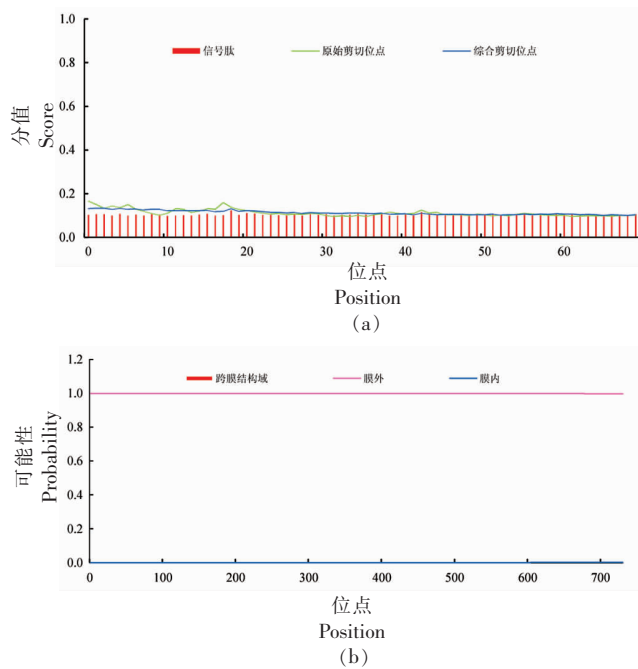
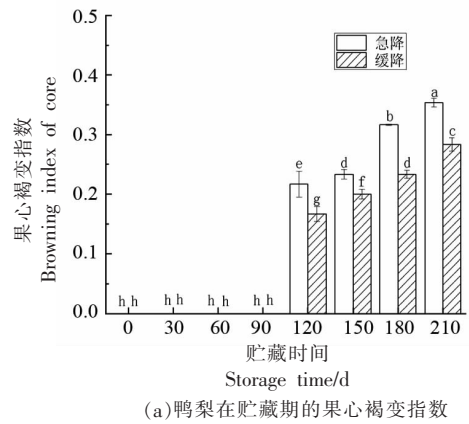


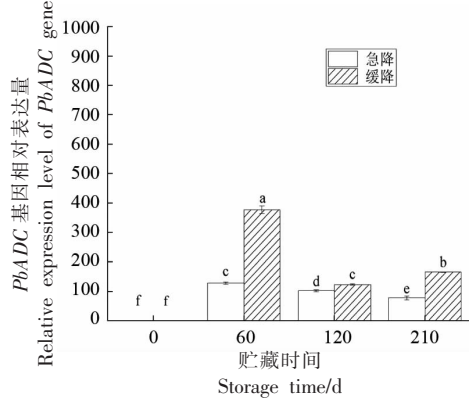
图 6 *PbADC* 蛋白的细胞定位与信号肽分析
Fig.6 Cell localization and signal peptide analysis of *PbADC* protein

0.167。急速降温 and 缓慢降温两个处理组相比,急速降温处理组的果心褐变指数均高于缓慢降温处理组 ($P < 0.05$),说明急速降温处理加速了鸭梨的果心褐变。

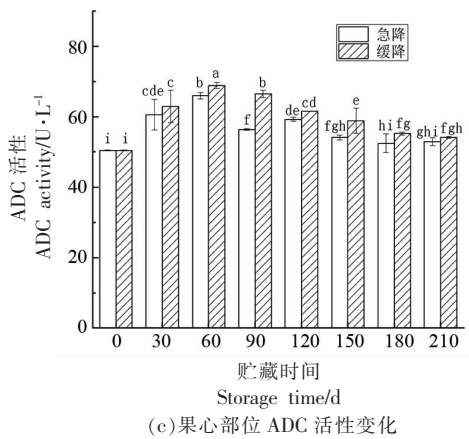
精氨酸脱羧酶(ADC)作为多胺合成通路中的一个重要酶,对外界环境的胁迫响应最为敏感^[24]。结果(7b)表明,在贮藏的前 60 d,鸭梨 *ADC* 基因上调表达,其中 *ADC* 基因在缓降处理中的表达比急降处理高 ($P < 0.05$),并且缓降鸭梨的表达量最高为 376.7。*ADC* 基因在鸭梨果心中的表达量虽随贮藏时间延长而降低,但仍是缓降鸭梨的表达量高,说明缓慢降温能促进鸭梨 *ADC* 基因的表达,有助于其抵抗低温胁迫导致的果心褐变。精氨酸脱羧酶在不同处理下均呈先升后降的变化趋势,这与 *ADC* 基因的表达情况基本一致(图 7c)。在整个贮藏期间,缓慢降温处理下的 *ADC* 酶活性均高于急速降温处理 ($P < 0.05$),且在贮藏 60 d 时, *ADC* 酶活性最高,为 68.89 U/L。结合鸭梨果心褐变情况分析,整个贮藏期缓慢降温处理组鸭梨果心褐变指数低,褐变情况少,可能是因为鸭梨果实中的 *ADC* 酶活力较高,能够合成大量的多胺,从



(a) 鸭梨在贮藏期的果心褐变指数



(b) 果心部位 *PbADC* 基因相对表达量变化



(c) 果心部位 *ADC* 活性变化

图 7 *PbADC* 基因在鸭梨采后褐变过程中的表达模式分析

Fig.7 Expression pattern analysis of *PbADC* gene during postharvest browning of Yali pear

而提高了鸭梨的抗冷性,降低了果心褐变的风险。

3 讨论与结论

作为一种新型植物生长的调节剂或“第二信使”,多胺具有稳定细胞膜、参与植物成熟衰老过

程以及响应逆境等多种功能^[25]。ADC属于磷酸吡哆醛依赖性酶(Pyridoxal 5'-phosphate de-carboxylase, PLPDE)基因超家族Ⅲ型的重要成员,其含有1个PLPDE典型的Orn_Arg_deC_N结构域,是生物体内多胺生物合成的一个重要限速酶^[17,26]。本研究发现鸭梨*PbADC*基因序列最长ORF为2 193 bp,编码730个氨基酸。鸭梨与柑橘和草莓等其它果树具有相似的ADC基因序列,柑橘*PtADC*基因的ORF含2 256 bp,编码751个氨基酸^[27];森林草莓*FvADC*基因的ORF含2 154 bp,编码717个氨基酸^[28]。PbADC蛋白是定位于细胞质的非分泌亲水性不稳定蛋白,二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主,该结果与其它ADC蛋白的细胞定位情况一致^[27-29]。除此之外,本研究通过同源序列比对发现PbADC包含完整的Orn_Arg_deC_N结构域,含有家族保守的2-磷酸吡哆醛结合位点和两个重要的酶活位点,这些与已有的一些物种的ADC同源蛋白相吻合,是鉴定磷酸吡哆醛依赖性酶基因超家族Ⅲ型PLPDE家族成员的关键结构域。

有研究表明,ADC基因在植物抗逆中的作用较大。孙培培^[30]研究表明,枳的*PtADC*基因能够提高柑橘的低温耐受力,降低H₂O₂和超氧阴离子的积累。刘荣等^[31]通过RACE技术,从芒果中分离得到*MiADC*基因,并发现其在转录水平上能够受到低温的调控,是一类对低温具有应答作用的基因。孙虹丽^[32]在梨褐皮与多胺代谢的研究中发现花后ADC基因的表达量先增加后降低,这一现象与多胺的变化趋势相吻合,是造成果皮褐色的主要因素。在贮藏初期,ADC基因的表达量增加,其通过上调表达来提高对低温的抗性,从而降低了缓降鸭梨果心褐变的发生。

本研究在鸭梨转录组数据中筛选并鉴定到了1条由*PbADC*基因编码的序列,通过对该序列编码的蛋白进行生物信息学分析,明确了其生物学特性,并利用qRT-PCR方法分析了*PbADC*基因在鸭梨采后果心褐变中的表达模式。综上所述为进一步揭示鸭梨采后果心褐变发生机制奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 李秀萍. 中国鸭梨之乡——泊头市 [J]. 河北林业, 1995(6): 25.
LI X P. The hometown of Yali pear in China - Botou city[J]. Hebei Forestry, 1995(6): 25.
- [2] 张引引. 降温速度对鸭梨果心褐变影响及相关基因挖掘的研究[D]. 天津: 天津农学院, 2020.
ZHANG Y Y. Effect of cooling speeds on browning of Yali pear core and mining of related genes[D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2020.
- [3] 韩艳文, 廉双秋, 韩云云, 等. 鸭梨*POD*基因的原核表达及成熟度和降温方法对其表达量的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(9): 40-45.
HAN Y W, LIAN S Q, HAN Y Y, et al. Prokaryotic expression of *POD* gene from 'Yali' pears and effects of maturity and cooling rate on the expression of *POD* gene during storage[J]. Food Science, 2017, 38(9): 40-45.
- [4] 王梓宇, 张引引, 李月圆, 等. 漆酶*LAC*表达与鸭梨果心褐变的关系[J]. 中国农业科学, 2020, 53(24): 5073-5080.
WANG Z Y, ZHANG Y Y, LI Y Y, et al. Relationship between *LAC* gene expression and core browning of Yali Pear[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(24): 5073-5080.
- [5] 李彤彤, 宋姗姗, 王琦, 等. 小麦与叶锈菌互作过程中精氨酸脱羧酶基因*TaADC*的功能研究[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(8): 1343-1351.
LI T T, SONG S S, WANG Q, et al. Study on the function of arginine decarboxylase gene *TaADC* in the interaction between wheat (*Triticum aestivum*) and *Puccinia triticina* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(8): 1343-1351.
- [6] 吴昊. 柑橘转录因子CsCBF1和PtrNAC72在调控精氨酸脱羧酶基因表达及抗逆中的功能鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
WU H. Functional characterization of *Citrus sinensis* CBF1 and *Poncirus trifoliata* NAC72 in regulation of arginine decarboxylase gene expression and stress tolerance[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [7] 靳丛, 郭巧会, 陈国栋, 等. 杜梨精氨酸脱羧酶基因*PbADC*的克隆与表达分析[J]. 核农学报, 2021, 35(2): 306-313.

- JIN C, GUO Q H, CHEN G D, et al. Cloning and expression analysis of *PbADC* in *Pyrus betulifolia*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(2): 306–313.
- [8] CHEN D D, SHAO Q S, YIN L H, et al. Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1945.
- [9] 王保全, 张晓娜, 刘继红, 等. 桃树 *PpADC* 基因克隆及逆境胁迫表达分析[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2020, 45(7): 34–41.
- WANG B Q, ZHANG X N, LIU J H, et al. Cloning and abiotic stress-induced expression of the arginine decarboxylase gene from *Prunus persica*[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition), 2020, 45(7): 34–41.
- [10] 沈永娟, 张辉, 王倩, 等. 植物中多胺的合成代谢及其分子生物学水平研究进展[J]. 保鲜与加工, 2018, 18(6): 157–161.
- SHEN Y J, ZHANG H, WANG Q, et al. Research progress on synthesis metabolism and molecular biology of polyamines in plants[J]. Storage and Process, 2018, 18(6): 157–161.
- [11] 郭彩明, 陈宗明, 陈春丽. 精氨酸脱羧酶基因 *AtADC2* 通过调节超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性增强拟南芥耐盐性[J]. 植物生理学报, 2015, 51(7): 1067–1074.
- GUO C M, CHEN Z M, CHEN C L. *AtADC2* enhances salt tolerance through regulating activities of superoxide dismutase and catalase in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Physiology Journal, 2015, 51(7): 1067–1074.
- [12] 李亚栋, 默辉娟, 王省芬, 等. 棉花精氨酸脱羧酶基因 *GhADC1* 克隆与表达分析[J]. 棉花学报, 2013, 25(4): 291–299.
- LI Y D, MO H J, WANG X F, et al. Cloning and expression analysis of an arginine decarboxylase gene from *Gossypium hirsutum*[J]. Cotton Science, 2013, 25(4): 291–299.
- [13] SAVITHRI N, SYNAN A Q, KRISTIN L, et al. Polyamines attenuate ethylene-mediated defense responses to abrogate resistance to *Botrytis cinerea* in tomato[J]. Plant Physiology, 2011, 158(2): 1034–1045.
- [14] 陈俊琴. 辣椒果实中辣椒素生物合成相关物质及外源多胺调控的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2015.
- CHEN J Q. Studies on capsaicin biosynthetic related substances and polyamines regulatory mechanisms for capsaicin in pepper[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2015.
- [15] 钱霄晨, 蔺凯丽, 黄琦, 等. 肉桂醛熏蒸处理对香菇采后抗氧化能力及多胺的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 263–269.
- QIAN X C, LIN K L, HUANG Q, et al. Effect of cinnamaldehyde fumigation on antioxidant capacity and polyamines in shiitake mushroom [J]. Food Science, 2019, 40(17): 263–269.
- [16] 王颀, 李里特, 丹阳, 等. 多胺处理对鸭梨采后生理的影响[J]. 食品科学, 2003, 24(7): 141–145.
- WANG J, LI L T, DAN Y, et al. Effects of polyamine treatment on postharvest physiology of Yali pear[J]. Food Science, 2003, 24(7): 141–145.
- [17] 王中平, 秦白富, 强玮, 等. 颠茄精氨酸脱羧酶基因的克隆与表达分析[J]. 中草药, 2016, 47(15): 2734–2740.
- WANG Z P, QIN B F, QIANG W, et al. Cloning and expression analysis on arginine decarboxylase genes in *Atropa belladonna* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(15): 2734–2740.
- [18] KOU S, CHEN L, TU W, et al. The arginine decarboxylase gene *ADC1*, associated to the putrescine pathway, plays an important role in potato cold-acclimated freezing tolerance as revealed by transcriptome and metabolome analyses[J]. The Plant Journal, 2018, 96(6): 1283–1298.
- [19] ALCAZAR R, ALTABELLA T, MARCO F, et al. Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance[J]. Planta, 2010, 231(6): 1237–1249.
- [20] ROSSI F R, MARINA M, PIECKENSTAIN F L. Role of arginine decarboxylase (ADC) in *Arabidopsis thaliana* defence against the pathogenic bacterium *Pseudomonas viridiflava*[J]. Plant Biology, 2015, 17(4): 831–839.
- [21] 韩云云, 袁学文, 栗艺芳, 等. 香菇 *GPX* 基因克隆及其在采后贮藏中的表达分析[J]. 保鲜与加工, 2022, 22(4): 1–8.
- HAN Y Y, YUAN X W, LI Y F, et al. Cloning and expression analysis of *Lentinus edodes GPX* gene during postharvest storage[J]. Storage and Process, 2022, 22(4): 1–8.
- [22] 闫师杰, 陈计峦, 梁丽雅, 等. 降温方法对不同采

- 收成熟度鸭梨某些生理指标的影响[J]. 中国食品学报, 2008, 8(4): 96-101.
- YAN S J, CHEN J L, LIANG L Y, et al. Effects of different cooling methods on some physiological indexes of different maturity Yali pear after harvest [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(4): 96-101.
- [23] 樊晓岚, 尤玲玲, 韩云云, 等. 降温方式对中采鸭梨果心 *ACO* 基因表达和褐变的影响[J]. 食品科技, 2018, 43(12): 50-55.
- FAN X L, YOU L L, HAN Y Y, et al. Effect of cooling methods on *ACO* gene expression and core browning of Yali pear[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(12): 50-55.
- [24] 樊晓岚, 李月圆, 张引引, 等. 降温方式对鸭梨采后 *FAD* 及 *LOX* 基因表达及其褐变的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(5): 222-227.
- FAN X L, LI Y Y, ZHANG Y Y, et al. Effect of cooling method on *FAD* and *LOX* gene expression and core browning in postharvest Yali pears[J]. Food Science, 2019, 40(5): 222-227.
- [25] 宋永骏, 刁倩楠, 齐红岩. 多胺代谢与植物抗逆性研究进展[J]. 中国蔬菜, 2012(18): 36-42.
- SONG Y J, DIAO Q N, QI H Y. Research progress on relationship between polyamine metabolism and plant stress resistance[J]. China Vegetables, 2012(18): 36-42.
- [26] 洪林. 甘蓝型油菜精氨酸脱羧酶基因的克隆及原核表达[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
- HONG L. Molecular cloning and prokaryotic expression of *ADC* gene from *Brassica napus* L. [D]. Chongqing: Southwest University, 2011.
- [27] WANG J, SUN P P, CHEN C L, et al. An arginine decarboxylase gene *PtADC* from *Poncirus trifoliata* confers abiotic stress tolerance and promotes primary root growth in *Arabidopsis*[J]. J Exp Bot, 2011, 62(8): 2899-2914.
- [28] 王静, 赵密珍, 王壮伟, 等. 森林草莓精氨酸脱羧酶基因的电子克隆与序列分析[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(3): 628-633.
- WANG J, ZHAO M Z, WANG Z W, et al. *In silico* cloning and sequencing of an arginine decarboxylase gene from *Fragaria vesca*[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2011, 27(3): 628-633.
- [29] 侯岚菲, 杨洪, 邓治, 等. 橡胶树 *ADC1* 的克隆、表达及生物信息学分析[J]. 生物技术通报, 2018, 34(11): 111-119.
- HOU L F, YANG H, DENG Z, et al. Cloning, expression and bioinformatics analyses of an *ADC1* gene in *Hevea brasiliensis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(11): 111-119.
- [30] 孙培培. 枳精氨酸脱羧酶基因 *PtADC* 抗逆功能解析及其调控因子分离与鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- SUN P P. Functional characterization of arginine decarboxylase gene *PtADC* from *Poncirus trifoliata* and identification of the regulators[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.
- [31] 刘荣, 黄海, 韩树全, 等. 芒果精氨酸脱羧酶基因 *MiADC* 的克隆及表达分析 (英文)[J]. Agricultural Science & Technology, 2018, 19(2): 9-16.
- LIU R, HUANG H, HAN S Q, et al. Cloning and expression analysis of arginine decarboxylase gene *MiADC* from Mango[J]. Agricultural Science & Technology, 2018, 19(2): 9-16.
- [32] 孙虹丽. 梨褐皮芽变果皮多胺代谢与相关基因克隆表达及 pBI121-SPMS 转化载体构建[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- SUN H L. Cloning and expression of gene related to polyamine metabolism in exocarp of Russet Skin Mutant pear and construction of the transgenic vector pBI121-SPMS[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2015.

Identification and Expression Analysis of *PbADC* Gene in Core Browning of Yali Pear

Li Qingxiu¹, Deng Bing², Kou Xiaomin¹, Li Ping³, Wu Haiqing^{1,4}, Liang Liya⁵, Yan Shijie^{1,4*}

¹College of Food Science and Biological Engineering, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384

²College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi

³College of Basic Science, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384

⁴Tianjin Engineering and Technology Research Center of Agricultural Products Processing, Tianjin 300384

⁵College of Agronomy and Resource Environment, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384

Abstract The purpose of this study was to explore the regulatory role of arginine decarboxylase (ADC) in core browning of Yali pear. Using Yali pear as material, the arginine decarboxylase of *Pyrus bretschneideri* (*PbADC*) was identified, and the bioinformation of *PbADC* and the gene expression pattern of *PbADC* were analyzed. The results showed that the *PbADC* gene was successfully identified and contained a complete open reading frame of 2 193 bp that encoding 730 amino acids. The phylogenetic analysis showed that *PbADC* was very closely to ADC of *Pyrus betulifolia*, *Malus domestica*, *Pyrus ussuriensis* × *Pyrus communis* and *Malus hupehensis*, and the multi alignment analysis showed that *PbADC* containing the complete Orn_Arg_deC_N domain, the binding site of pyridoxal 2-phosphate of ADC family and two important enzyme activity sites. Bioinformatics analysis showed that PbADC was a hydrophilic unstable protein with theoretical isoelectric point of 5.23 and molecular weight of 78.403 ku, which was hydrophilic and non-transmembrane without signal peptide, and α -helix and random coil were the main secondary structure of PbADC. The core browning index of rapid cooling treatment group was higher than that of slow cooling treatment group. Quantitative PCR and enzyme activity results showed that the expression of PbADC increased at the early storage period and then decreased during the browning of Yali pear, and the change of ADC enzyme activity was consistent with the gene expression level. This study clarified the bioinformatics characteristics of *PbADC* protein and the differential expression of *PbADC* gene during storage, which provided a theoretical basis for further research on the mechanism of postharvest browning of Yali pear.

Keywords Yali pear; browning; arginine decarboxylase gene; gene identification; expression analysis