

芹菜 *AgLIMS* 基因的克隆和生物信息学 分析及其表达特性

贾丽丽^{a,b,c}, 尹莲^{a,b,c}, 刘洁霞^{a,b,c}, 王昊^{a,b,c}, 沈迪^{a,b,c}, 冯凯^{a,b,c}, 熊爱生^{a,b,c,①}

(南京农业大学: a. 园艺学院, b. 作物遗传与种质创新国家重点实验室,
c. 农业农村部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 以芹菜 (*Apium graveolens* Linn.) 品种‘六合黄心芹’ (‘Liuhe Huangxinqin’) 和‘津南实芹’ (‘Jinnan Shiqin’) 为研究对象, 分别克隆获得芹菜柠檬烯合酶基因, 命名为 *AgLIMS*, 其开放阅读框长 1 800 bp, 编码 599 个氨基酸。结果显示: 2 个芹菜品种的 *AgLIMS* 基因核苷酸序列存在 2 个位点的差异, 其编码的氨基酸序列也存在 2 个位点的差异; *AgLIMS* 基因编码的氨基酸序列在第 50 至第 586 位存在植物萜类合酶 (Terpene cyclase plant C1) 保守区域, 具有典型的类异戊二烯合成酶 (Isoprenoid Biosyn C1) 超家族结构域。2 个芹菜品种的 *AgLIMS* 蛋白的理论相对分子质量分别为 69 120 和 69 190, 理论等电点均为 pI 5.52。 *AgLIMS* 蛋白的氨基酸序列中, 亲水性氨基酸比例高于疏水性氨基酸; 其二级结构主要由 α 螺旋和无规则卷曲构成, 但 α 螺旋、延伸链和 β 转角的比例在 2 个芹菜品种间略有差异; 其三级结构均含有 1 个 β 折叠, 但 α 螺旋数量在 2 个芹菜品种间略有差异。 *AgLIMS* 基因与多种植物 *LIMS* 基因编码的氨基酸序列一致性为 61.33%; 在系统树上, 2 个芹菜品种与同科种类的进化关系较近, 而与其他科木本种类的进化关系较远。 qRT-PCR 结果显示: *AgLIMS* 基因在 2 个芹菜品种的叶片、叶柄和根中均能表达, 其相对表达量在叶片中最高、在根中最低, 且在不同组织间差异显著; 该基因在‘六合黄心芹’不同组织中的相对表达量总体上显著高于‘津南实芹’。在高温 (38 $^{\circ}\text{C}$)、低温 (4 $^{\circ}\text{C}$)、干旱 (质量体积分数 20% PEG6000) 和高盐 (0.2 mol \cdot L⁻¹ NaCl) 条件下, 2 个芹菜品种 *AgLIMS* 基因的相对表达量呈现不同的变化趋势; 总体上看, ‘津南实芹’ *AgLIMS* 基因的相对表达量均不同程度升高, 而品种‘六合黄心芹’ *AgLIMS* 基因的相对表达量则在高温和干旱条件下显著升高。综合分析结果表明: 2 个芹菜品种的 *AgLIMS* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列差异很小; *AgLIMS* 蛋白为中性、亲水性蛋白, 其进化具有一定的保守性; *AgLIMS* 基因在芹菜中的表达具有组织特异性, 且在受到非生物胁迫时其表达特性发生变化, 但这种变化效应存在品种间差异。

关键词: 芹菜; 柠檬烯合酶基因 (*LIMS* 基因); 蛋白质理化特性; 非生物胁迫; 基因表达特性

中图分类号: Q943.2; S636.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)06-0023-09
DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.06.03

Cloning and bioinformatic analysis on *AgLIMS* gene from *Apium graveolens* and its expression characteristics JIA Lili^{a,b,c}, YIN Lian^{a,b,c}, LIU Jiexia^{a,b,c}, WANG Hao^{a,b,c}, SHEN Di^{a,b,c}, FENG Kai^{a,b,c}, XIONG Aisheng^{a,b,c,①} (Nanjing Agricultural University: a. College of Horticulture, b. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, c. Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(6): 23-31

Abstract: Taking cultivar ‘Liuhe Huangxinqin’ and ‘Jinnan Shiqin’ of *Apium graveolens* Linn. as research objects, limonene synthase gene was cloned and named as *AgLIMS*, and the length of its open reading frame is 1 800 bp, encoding 599 amino acids. The results show that there are two sites of

收稿日期: 2020-05-11

基金项目: 江苏省农业自主创新资金项目 [CX(18)2007]; 江苏高校优势学科建设项目 (PAPD)

作者简介: 贾丽丽 (1995—), 女, 甘肃庆阳人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种和分子生物学研究。

①通信作者 E-mail: xiongaisheng@njau.edu.cn

difference in the nucleotide sequences of *AgLIMS* gene from two *A. graveolens* cultivars, and there are also two sites of difference in their encoding amino acid sequences; there is a conserved region of plant terpene synthase (Terpene cyclase plant C1) from 50th to 586th in amino acid sequence encoded by *AgLIMS* gene, which possesses typical isoprenoid synthase (Isoprenoid Biosyn C1) superfamily domain. The theoretical relative molecular masses of *AgLIMS* protein of two *A. graveolens* cultivars are 69 120 and 69 190, respectively, and their theoretical isoelectric points are both pI 5.52. Among the amino acid sequence of *AgLIMS* protein, the percentage of hydrophilic amino acid is higher than that of hydrophobic amino acid; their secondary structures are mainly composed of α -helix and random coil, but the percentages of α -helix, extended strand and β -turn are slightly different between two *A. graveolens* cultivars; their tertiary structures all contain one β -sheet, but the number of α -helix is slightly different between two *A. graveolens* cultivars. The identity of amino acid sequences encoded by *AgLIMS* gene and *LIMS* gene from multiple plants is 61.33%; in the phylogenetic tree, the evolutionary relationships of two *A. graveolens* cultivars are relatively close with species in the same family, but are relatively far with woody species in other families. The qRT-PCR result shows that *AgLIMS* gene can express in leaf, petiole and root of two *A. graveolens* cultivars, its relative expression is the highest in leaf and the lowest in root, and the difference in different tissues is significant; the relative expression of this gene from different tissues of 'Liuhe Huangxinquin' is significantly higher than that from 'Jinnan Shiqin' in general. Under high temperature (38 °C), low temperature (4 °C), drought (mass volume fraction of 20% PEG6000) and high salt (0.2 mol · L⁻¹ NaCl) conditions, the relative expression of *AgLIMS* gene from two *A. graveolens* cultivars shows different change tendencies; in general, the relative expression of *AgLIMS* gene from 'Jinnan Shiqin' all increases at different degrees; while that of 'Liuhe Huangxinquin' significantly increases under high temperature and drought conditions. The comprehensive analysis result shows that the differences in nucleotide sequences of *AgLIMS* gene and its encoding amino acid sequences of two *A. graveolens* cultivars are very small; *AgLIMS* protein is neutral and hydrophilic protein, and its evolution is conserved with some degree; the expression of *AgLIMS* gene from *A. graveolens* is tissue-specific, and its expression characteristics vary under abiotic stress, but the variation effect is different among cultivars.

Key words: *Apium graveolens* Linn.; limonene synthase gene (*LIMS* gene); physicochemical property of protein; abiotic stress; gene expression characteristics

芹菜(*Apium graveolens* Linn.),也即旱芹,隶属于伞形科(Apiaceae)芹属(*Apium* Linn.)^[1],是重要的叶菜类蔬菜作物之一。芹菜属于冷凉性蔬菜,最适种植温度为15 °C~20 °C^[2],温度是影响芹菜产量和品质的重要因子之一,高温和低温均会引发如烧心、空心 and 叶柄开裂等常见病害,进而影响芹菜的产量和品质。干旱和高盐等非生物胁迫也会对芹菜的产量和品质有较大的影响。

萜类化合物种类繁多、结构多样,是植物次生代谢产物中种类最多的一类^[3],在植物生长发育调控和响应外界环境胁迫时有重要作用^[4-6]。在生物和非生物胁迫下,萜类化合物均可被诱导以启动防御反应。例如:在高温条件下,冬青栎(*Quercus ilex* Linn.)利用单萜清除细胞内的自由基和活性氧等,同时产生大量的挥发性单萜降低树体温度以减少高温伤害^[7];在氧化胁迫下,单萜还可通过降低臭氧含量缓解氧化伤害^[8]。萜类化合物是伞形科植物挥发油的主要组成成分之一,其在植物防御非生物胁迫过程中

的作用为伞形科植物抗逆性研究提供了新的方向和思路。

柠檬烯是萜类化合物中结构最简单的环状功能单萜,是许多环状萜类化合物形成的前体物质。已有研究表明:柠檬烯合酶可作为研究环状单萜合酶的模式酶^[9]。自1993年Colby等^[10]从留兰香(*Mentha spicata* Linn.)中克隆获得第1个柠檬烯合酶基因(*LIMS*基因)以来,研究者陆续从水稻(*Oryza sativa* Linn.)、薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)和雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)等植物中克隆获得柠檬烯合酶基因,并对其功能进行了初步研究^[11-13]。而芹菜中柠檬烯合酶基因的功能和表达特性,以及在非生物胁迫条件下该基因在芹菜抗逆性诱导和调控中的作用,人们尚未有清晰的了解。

鉴于此,作者以芹菜品种'六合黄心芹'('Liuhe Huangxinquin')和'津南实芹'('Jinnan Shiqin')为研究对象,克隆获得其*LIMS*基因,并采用生物信息学分析方法对该基因及其编码的蛋白质的结构和功能

进行分析;采用 qRT-PCR 技术检测该基因的相对表达量在不同组织及不同胁迫条件下的变化,为进一步研究芹菜对逆境胁迫的抗性机制提供基础研究数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试芹菜品种‘六合黄心芹’和‘津南实芹’的种子均保存于南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室伞形科蔬菜作物实验室。

于2019年2月将种子播种并置于人工气候生长室内,参照文献[14]设置培养条件,待幼苗长至2月龄时,分别取近植株顶部的3或4枚叶片(茎叶)以及叶柄(中上部)和根各0.5 g,立即用液氮速冻并保存于-80℃冰箱中,用于总RNA提取、cDNA合成及基因表达分析,取样设置3个生物学重复。参照文献[14]的实验设计,并采用相同的培养条件,对2月龄苗分别进行低温(4℃)、高温(38℃)、干旱(质量体积分数20%PEG6000)和高盐(0.2 mol·L⁻¹ NaCl)处理,处理24 h;每处理5盆,每盆6株,共30株;分别在处理0(CK)、1、2、4、8和24 h时,取近植株顶部的3或4枚叶片,立即用液氮速冻并保存于-80℃冰箱中,用于qRT-PCR分析,采样时每处理设置3个生物学重复。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取和cDNA合成 分别取2个芹菜品种的叶片,用RNAsimple Total RNA Kit总RNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取总RNA,并用PrimeScript™ RT reagent Kit反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]将总RNA反转录成cDNA。具体操作过程见试剂盒说明书。

1.2.2 基因克隆 基于芹菜转录组和基因组数据库^[15-16],检索获得*AgLIMS*基因;根据该基因序列分别设计正向引物(5'-ATGGCTCTTGCATCCTCTTCTCAGA-3')和反向引物(5'-TTATCTATCATTCCTCAATAAGAGTT-3')。PCR扩增体系总体积20.0 μL,包括PrimeSTAR Max Premix[宝生物工程(大连)有限公司]10.0 μL、双蒸水7.0 μL、5 mmol·L⁻¹ cDNA模板1.0 μL及10 μmol·L⁻¹的正向和反向引物各1.0 μL。扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s、54℃退火30 s、72℃延伸30 s,共35个循环;72℃延伸10 min。扩增产物交由南京金斯瑞生物科技有限

公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析 采用BioXM 2.6软件对克隆获得的*AgLIMS*基因进行序列分析;采用NCBI数据库中的BLASTp工具对*AgLIMS*基因编码的氨基酸序列的保守域进行预测,并获得其他植物*LIMS*基因编码的氨基酸序列;采用DNAMAN 6.0软件对*AgLIMS*基因与其他植物*LIMS*基因编码的氨基酸序列进行多重比对,并进行亲水性和疏水性分析;采用MEGA 5.2软件绘制*AgLIMS*基因与其他植物*LIMS*基因编码的氨基酸序列的系统进化树;使用ExPASy数据库和序列处理在线工具包(SMS)(<http://www.bio-soft.net/sms/>)分析*AgLIMS*蛋白的理论相对分子量、氨基酸组成和理论等电点等;通过SOPMA网站(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)对*AgLIMS*蛋白的二级结构进行在线预测;通过CPHmodels 3.2网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>)在线建立*AgLIMS*蛋白的三级结构模型。

1.2.4 qRT-PCR分析 根据*AgLIMS*基因测序结果,采用Primer Premier 6.0软件设计荧光定量引物,正向引物序列为5'-TTGGTGGAGGCTCGGTGGTT-3',反向引物序列为5'-TGCTTCATCACTGCTGCCCATTT-3';以芹菜*actin*基因作为内参基因^[17],使用qRT-PCR检测系统分析*AgLIMS*基因的表达水平。反应体系总体积20.0 μL,包括10 μmol·L⁻¹的正向和反向引物各0.4 μL、Hieff qPCR SYBR Green Master Mix(上海翊圣生物科技有限公司)10.0 μL、双蒸水7.2 μL和5 mmol·L⁻¹ cDNA模板2.0 μL。扩增程序为:95℃预变性5 min;95℃变性10 s、55℃~60℃退火20 s、72℃延伸20 s,共40个循环。采用2^{-ΔΔC_t}法^[18]计算*AgLIMS*基因的相对表达量。

1.3 数据处理分析

用EXCEL 2010和SPSS 24.0软件对*AgLIMS*基因的相对表达量数据进行整理分析,采用单因素方差分析法和Duncan's多重比较法进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 *AgLIMS*基因的克隆和测序结果

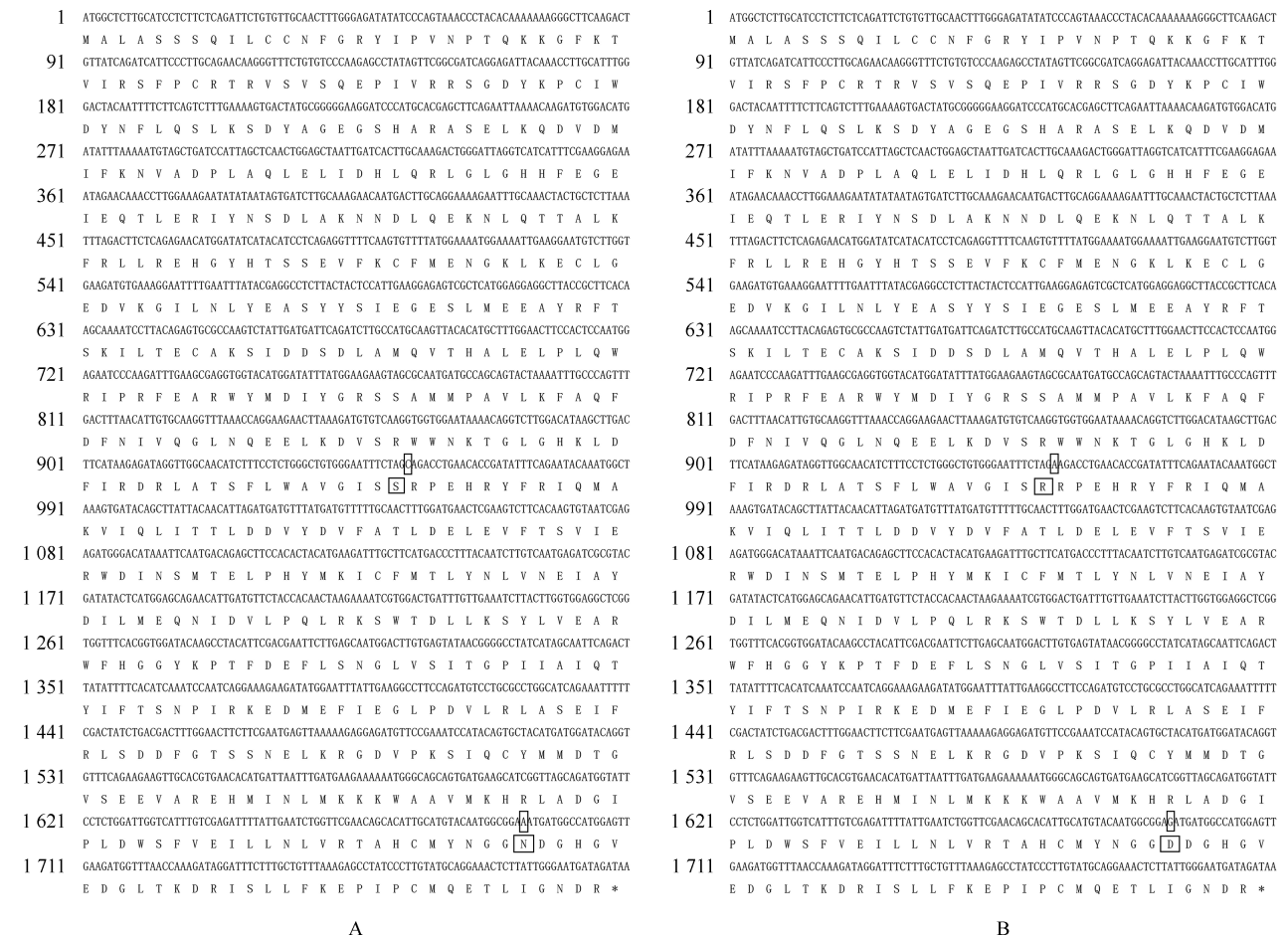
克隆和测序结果显示:*AgLIMS*基因的开放阅读框长1 800 bp,编码599个氨基酸。芹菜品种‘六合

黄心芹’和‘津南实芹’*AgLIMS* 基因核苷酸序列有 2 个碱基位点的差异,分别为第 954 位的 C 和 A 以及第 1 693 位的 A 和 G (图 1),核苷酸序列的差异导致其编码的氨基酸位点发生改变,分别为第 318 位的丝氨酸(Ser)和精氨酸(Arg)以及第 565 位天冬酰胺(Asn)和天冬氨酸(Asp)。保守域预测结果(图 2)显示:*AgLIMS* 基因编码的氨基酸序列在第 50 至第 586

位存在植物萜类合酶(Terpene cyclase plant C1)保守区域,具有典型的类异戊二烯合成酶(Isoprenoid Biosyn C1)超家族结构域。

2.2 *AgLIMS* 基因编码的氨基酸序列的生物信息学分析

2.2.1 同源性比对和系统进化分析 芹菜品种‘六合黄心芹’和‘津南实芹’*AgLIMS* 基因与其他 13 种



方框内序列为有差异的核苷酸位点及对应的氨基酸位点 The sequences in the boxes are different nucleotide sites and corresponding amino acid sites. * : 终止密码子 Stop codon.

图 1 芹菜品种‘六合黄心芹’(A)和‘津南实芹’(B)的*AgLIMS* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列
Fig. 1 Nucleotide sequences of *AgLIMS* gene from cultivar ‘Liuhe Huangxinquin’ (A) and ‘Jinnan Shiqin’ (B) of *Apium graveolens* Linn. and their encoding amino acid sequences

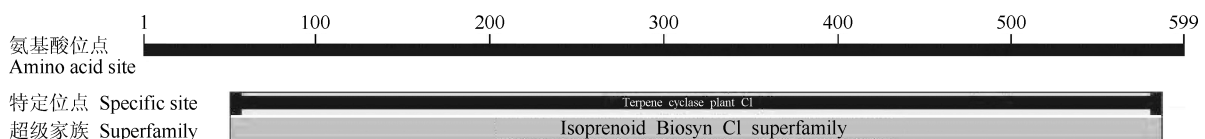
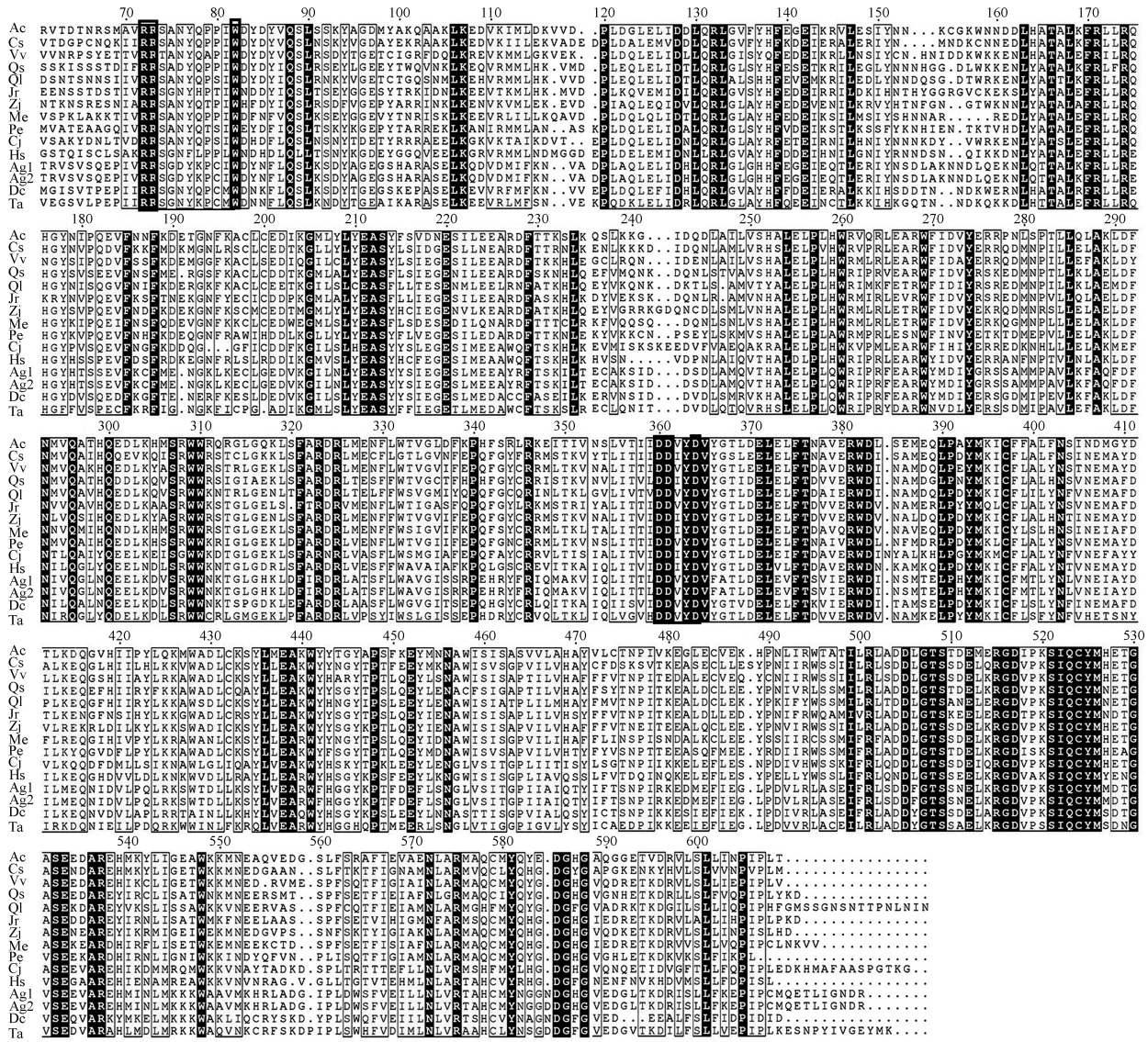


图 2 芹菜 *AgLIMS* 基因编码的氨基酸序列的保守域预测结果
Fig. 2 Prediction result of conserved domain of amino acid sequence encoded by *AgLIMS* gene from *Apium graveolens* Linn.

植物 *LIMS* 基因编码的氨基酸序列的多重比对及系统进化分析结果分别见图 3 和图 4。多重比对结果(图 3)显示: *AgLIMS* 基因与其他植物 *LIMS* 基因编码的氨基酸序列一致性为 61.33%, 且均含有蒎类合酶氨基酸序列的 2 个高度保守域 RRX₈W 和 DDXD。

在系统进化树(图 4)上, 2 个芹菜品种首先聚在

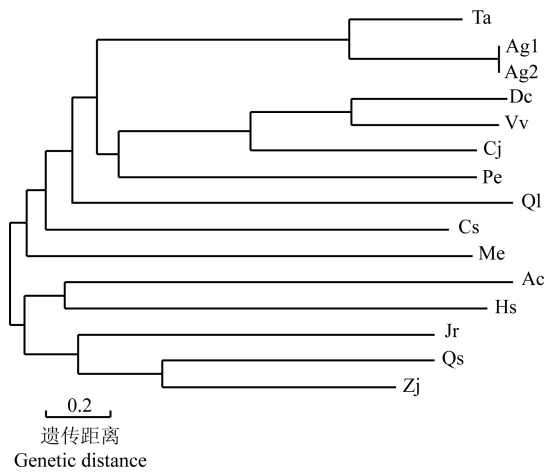
一起, 并与同科种类细叶糙果芹 [*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague] 聚在同一小分支中, 与同科植物胡萝卜 (*Daucus carota* var. *sativa* Hoffm.) 聚在同一大分支中, 说明同科植物的进化关系较近; 而与其他科木本种类, 如枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.)、欧洲栓皮栎 (*Quercus suber* Linn.)、胡桃 (*Juglans regia* Linn.) 和木



方框内序列为保守域 The sequences in the box are conserved domains; 黑色表示同一位点的氨基酸完全一致, 白色表示同一位点的氨基酸不完全一致 Black indicates the amino acids at the same site are completely identical, and white indicates the amino acids at the same site are not completely identical.

Ac: 中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch.; Cs: 茶树 *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze; Vv: 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; Qs: 欧洲栓皮栎 *Quercus suber* Linn.; Ql: 加州白栎 *Quercus lobata* Née; Jr: 胡桃 *Juglans regia* Linn.; Zj: 枣 *Ziziphus jujuba* Mill.; Me: 木薯 *Manihot esculenta* Crantz; Pe: 胡杨 *Populus euphratica* Oliv.; Cj: 金柑 *Citrus japonica* Thunb.; Hs: 木槿 *Hibiscus syriacus* Linn.; Ag1: ‘六合黄心芹’ ‘Liuhe Huangxinqin’; Ag2: ‘津南实芹’ ‘Jinnan Shiqin’; Dc: 胡萝卜 *Daucus carota* var. *sativa* Hoffm.; Ta: 细叶糙果芹 *Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague.

图 3 芹菜 *AgLIMS* 基因与其他植物 *LIMS* 基因编码的氨基酸序列的多重比对结果
Fig. 3 Multiple alignment result of amino acid sequences encoded by *AgLIMS* gene from *Apium graveolens* Linn. and *LIMS* gene from other species



Ac: 中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch.; Cs: 茶树 *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze; Vv: 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; Qs: 欧洲栓皮栎 *Quercus suber* Linn.; Ql: 加州白栎 *Quercus lobata* Née; Jr: 胡桃 *Juglans regia* Linn.; Zj: 枣 *Ziziphus jujuba* Mill.; Me: 木薯 *Manihot esculenta* Crantz; Pe: 胡杨 *Populus euphratica* Oliv.; Cj: 金柑 *Citrus japonica* Thunb.; Hs: 木槿 *Hibiscus syriacus* Linn.; Ag1: ‘六合黄心芹’ ‘Liuhe Huangxinqin’; Ag2: ‘津南实芹’ ‘Jinnan Shiqin’; Dc: 胡萝卜 *Daucus carota* var. *sativa* Hoffm.; Ta: 细叶糙果芹 *Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague.

图 4 芹菜 *AgLIMS* 基因与其他植物 *LIMS* 基因编码的氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of amino acid sequences encoded by *AgLIMS* gene from *Apium graveolens* Linn. and *LIMS* gene from other species

表 1 2 个芹菜品种 *AgLIMS* 蛋白的氨基酸组成和理化性质

Table 1 Amino acid composition and physicochemical property of *AgLIMS* protein from two cultivars of *Apium graveolens* Linn.

| 品种 Cultivar | 氨基酸数 Number of amino acid | 理论相对分子质量 Theoretical relative molecular mass | 理论等电点 Theoretical isoelectric point (pI) | 各类氨基酸的比例/% Percentage of each type of amino acid | | | | 总平均疏水性 Grand average of hydrophobicity |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------|------------------|-----------------|-------------------------------------------|
| | | | | 酸性 Acidic | 碱性 Basic | 脂肪族 Aliphatic | 芳香族 Aromatic | |
| 六合黄心芹 Liuhe Huangxinqin | 599 | 69 120 | 5.52 | 14 | 14 | 23 | 10 | -0.263 |
| 津南实芹 Jinnan Shiqin | 599 | 69 190 | 5.52 | 14 | 14 | 23 | 10 | -0.269 |

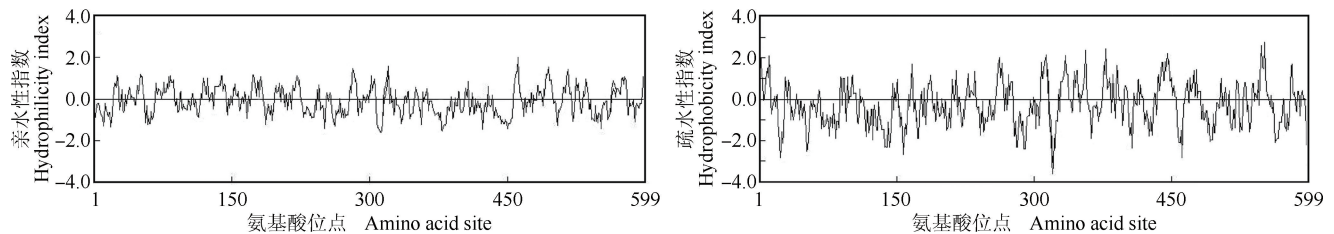


图 5 芹菜 *AgLIMS* 蛋白的亲水性 (A) 和疏水性 (B)

Fig. 5 Hydrophilicity (A) and hydrophobicity (B) of *AgLIMS* protein from *Apium graveolens* Linn.

级结构进行预测,结果显示:在‘六合黄心芹’和‘津南实芹’的 *AgLIMS* 蛋白二级结构中, α 螺旋分别占 65.94% 和 65.78%,延伸链分别占 2.84% 和 3.17%、

槿 (*Hibiscus syriacus* Linn.) 等的进化关系较远。

2.2.2 氨基酸组成和理化性质分析 芹菜品种‘六合黄心芹’和‘津南实芹’ *AgLIMS* 蛋白的氨基酸组成和理化性质见表 1,该蛋白的亲水性和疏水性见图 5。

由表 1 可见:2 个芹菜品种的 *AgLIMS* 蛋白均由 599 个氨基酸组成,理论相对分子质量分别为 69 120 和 69 190,理论等电点均为 pI 5.52;二者的总平均疏水性略有差异,分别为 -0.263 和 -0.269;2 个芹菜品种的 *AgLIMS* 蛋白的酸性、碱性、脂肪族和芳香族氨基酸所占比例均相同,表明这 2 个芹菜品种的 *AgLIMS* 蛋白的相似度极高。此外,组成 *AgLIMS* 蛋白的氨基酸中,酸性氨基酸与碱性氨基酸的比例相同,均为 14%,表明 *AgLIMS* 蛋白为中性蛋白。

由图 5 可见:在 *AgLIMS* 蛋白的亲水性区域,第 461 位的谷氨酸 (Glu) 的亲水性最强;在该蛋白的疏水性区域,第 551 位的亮氨酸 (Leu) 的疏水性最强。组成 *AgLIMS* 蛋白的氨基酸中,亲水性氨基酸所占比例为 58.3%,疏水性氨基酸所占比例为 41.7%,据此推测 *AgLIMS* 为亲水性蛋白。

2.2.3 蛋白质二级和三级结构预测结果 对 2 个芹菜品种‘六合黄心芹’和‘津南实芹’ *AgLIMS* 蛋白二

β 转角分别占 3.17% 和 3.01%,无规则卷曲分别占 28.05% 和 28.05%,2 个芹菜品种间差异不明显;总体来说,*AgLIMS* 蛋白二级结构主要由 α 螺旋和无规则

卷曲构成。

三级结构模型(图 6)显示:‘六合黄心芹’和‘津南实芹’的 *AgLIMS* 蛋白三级结构均含有 1 个 β 折

叠,但 2 个芹菜品种 *AgLIMS* 蛋白三级结构中 α 螺旋数量有差异,‘六合黄心芹’含 25 个 α 螺旋,‘津南实芹’含 23 个 α 螺旋。

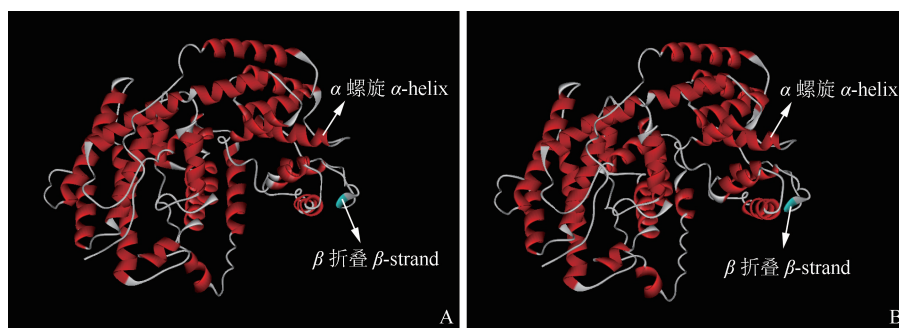


图 6 芹菜品种‘六合黄心芹’(A)和‘津南实芹’(B)的 *AgLIMS* 蛋白三级结构

Fig. 6 Tertiary structure of *AgLIMS* protein from cultivar ‘Liuhe Huangxinqin’ (A) and ‘Jinnan Shiqin’ (B) of *Apium graveolens* Linn.

2.3 *AgLIMS* 基因表达特性的差异和变化

2.3.1 在不同组织中相对表达量的差异 在芹菜品种‘六合黄心芹’和‘津南实芹’不同组织中 *AgLIMS* 基因的相对表达量差异见表 2。结果显示:*AgLIMS* 基因在 2 个芹菜品种叶片、叶柄和根中均有表达,但相对表达量存在显著 ($P < 0.05$) 差异,均表现为在叶片中最高、在叶柄中次之、在根中最低。在‘六合黄心芹’叶片和根中 *AgLIMS* 基因的相对表达量显著高于‘津南实芹’,但在其叶柄中 *AgLIMS* 基因的相对表达量与后者无显著差异。

2.3.2 非生物胁迫条件下相对表达量的变化 在非生物胁迫条件下芹菜品种‘六合黄心芹’和‘津南实芹’*AgLIMS* 基因相对表达量的变化见表 3。

在高温(38 °C)条件下处理 1~24 h,‘六合黄心芹’和‘津南实芹’*AgLIMS* 基因的相对表达量总体随

处理时间的延长呈波动升高的趋势,在处理 24 h 达到最大值,分别为处理 0 h 的 10.5 和 8.1 倍,且差异显著。

在低温(4 °C)条件下处理 1~24 h,‘六合黄心芹’*AgLIMS* 基因的相对表达量呈小幅波动变化,但总体无显著差异。‘津南实芹’*AgLIMS* 基因的相对表达量则随处理时间的延长呈先升高后降低的变化趋势,总体差异显著;在处理 4 h 达到最大值(为处理 0 h 的 2.5 倍),在处理 24 h 降至最低(较处理 0 h 降低 51.5%)。

在干旱(质量体积分数 20% PEG6000)条件下处理 1~24 h,‘六合黄心芹’*AgLIMS* 基因的相对表达量在处理 0~4 h 内无显著变化,但之后急剧上升,且在处理 24 h 达到最大值,为处理 0 h 的 16.8 倍。‘津南实芹’*AgLIMS* 基因的相对表达量则随处理时间的延长呈波动升高的变化趋势,且与处理 0 h 差异显著;其中,在处理 1~8 h 小幅波动,但在处理 24 h 急剧升高并达到最大值,为处理 0 h 的 30.7 倍。

在高盐(0.2 mol · L⁻¹ NaCl)条件下处理 1~24 h,‘六合黄心芹’*AgLIMS* 基因的相对表达量随处理时间的延长呈先升高后波动降低的变化趋势,其中,在处理 1 和 2 h 显著升高,分别为处理 0 h 的 6.9 和 2.8 倍;而在处理 4~24 h 降低,且与处理 0 h 无显著差异。‘津南实芹’*AgLIMS* 基因的相对表达量则随处理时间的延长呈波动升高的变化趋势,且与处理 0 h 差异显著,在处理 24 h 达到最大值,为处理 0 h 的 14.3 倍。

表 2 2 个芹菜品种不同组织中 *AgLIMS* 基因相对表达量的比较 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 2 Comparison on relative expression of *AgLIMS* gene from different tissues of two cultivars of *Apium graveolens* Linn. ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

| 品种 Cultivar | 在不同组织中的相对表达量 Relative expression in different tissues | | |
|-------------------------|----------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| | 叶片 Leaf | 叶柄 Petiole | 根 Root |
| 六合黄心芹 Liuhe Huangxinqin | 3.56±0.02Aa | 1.01±0.13Ab | 0.05±0.01Ac |
| 津南实芹 Jinnan Shiqin | 2.52±0.35Ba | 1.00±0.03Ab | 0.02±0.01Bc |

¹⁾ 同行中不同的小写字母表示同一品种不同组织间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same row indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same cultivar among different tissues; 同列中不同的大写字母表示同一组织不同品种间差异显著 ($P < 0.05$) Different uppercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) difference in the same tissue among different cultivars.

表3 非生物胁迫条件下2个芹菜品种 *AgLIMS* 基因相对表达量的变化 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾Table 3 Change on relative expression of *AgLIMS* gene from two cultivars of *Apium graveolens* Linn. under conditions of abiotic stress ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

| 处理 Treatment | 不同处理时间‘六合黄心芹’ <i>AgLIMS</i> 基因的相对表达量 Relative expression of <i>AgLIMS</i> gene from ‘Liuhe Huangxinqin’ at different treatment times | | | | | |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| | 0 h | 1 h | 2 h | 4 h | 8 h | 24 h |
| 高温 High temperature (38 °C) | 1.01±0.18d | 2.19±0.15c | 3.19±0.36b | 2.46±0.47c | 2.23±0.31c | 10.61±0.10a |
| 低温 Low temperature (4 °C) | 1.01±0.18ab | 1.12±0.15a | 0.73±0.26b | 0.69±0.16b | 0.88±0.19ab | 1.10±0.15a |
| 干旱 Drought (m/V 20%PEG6000) | 1.01±0.18c | 1.02±0.05c | 1.19±0.14c | 0.33±0.10c | 3.82±1.77b | 16.96±0.02a |
| 高盐 High salt (0.2 mol · L ⁻¹ NaCl) | 1.01±0.18c | 6.96±0.42a | 2.85±0.37b | 0.61±0.14c | 0.70±0.05c | 0.60±0.10c |
| 处理 Treatment | 不同处理时间‘津南实芹’ <i>AgLIMS</i> 基因的相对表达量 Relative expression of <i>AgLIMS</i> gene from ‘Jinnan Shiqin’ at different treatment times | | | | | |
| | 0 h | 1 h | 2 h | 4 h | 8 h | 24 h |
| 高温 High temperature (38 °C) | 1.01±0.14e | 1.71±0.17d | 6.88±0.54b | 5.38±0.08c | 7.70±0.60a | 8.17±0.19a |
| 低温 Low temperature (4 °C) | 1.01±0.14c | 1.17±0.09c | 1.84±0.14b | 2.49±0.22a | 1.91±0.26b | 0.49±0.18d |
| 干旱 Drought (m/V 20%PEG6000) | 1.01±0.14e | 6.22±0.46b | 3.93±0.64cd | 4.53±0.40c | 2.75±0.57d | 31.04±1.50a |
| 高盐 High salt (0.2 mol · L ⁻¹ NaCl) | 1.01±0.14e | 5.40±0.27c | 3.76±0.20d | 4.26±0.45d | 7.86±0.38b | 14.42±0.44a |

¹⁾ m/V: 质量体积分数 Mass volume fraction. 同行中不同的大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different uppercase in the same row indicate the significant ($P < 0.05$) difference.

3 讨论和结论

柠檬烯合酶基因在植物中普遍存在,但不同植物种类的柠檬烯合酶基因序列差异较大,且功能存在差异。本研究从芹菜品种‘六合黄心芹’和‘津南实芹’中均克隆获得芹菜柠檬烯合酶基因 *AgLIMS*,但2个芹菜品种的 *AgLIMS* 基因碱基序列存在2个位点的差异,进而使其编码的氨基酸序列也存在2个位点差异,这种差异可能与栽培地的环境条件差异以及品种间的遗传差异有关,但环境因子对该基因功能的影响尚不清楚,还需进一步深入研究。此外,多重比较和系统进化分析结果显示:同科植物 *LIMS* 基因编码的氨基酸序列遗传一致性较高,且在系统树上首先聚在一起,说明同科植物的 *LIMS* 蛋白亲缘关系更近,且该基因编码的氨基酸序列具有一定的保守性。

柠檬烯合酶在甜橙 [*Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck]、水稻和薄荷等植物中广泛存在^[19-21],且在植物中呈不均衡分布。*Citrus unshiu* Marc. 中柠檬烯合酶基因 *CiMTSE1* 在花中特异性表达^[22]。本文研究也发现 *AgLIMS* 基因在‘六合黄心芹’和‘津南实芹’不同组织中表达存在较大差异,在叶片中的相对表达量显著高于叶柄和根,具有明显的组织特异性。

高温、低温、干旱和高盐等非生物胁迫对芹菜产量和品质均有不同程度的影响^[23]。萜类化合物作为植物体内重要的次生代谢产物,能够直接或间接参与

植物的防御反应^[24]。高温可诱导冬青柝释放大量的单萜^[7];干旱处理下,与玉米 (*Zea mays* Linn.) 抗逆性相关的2个倍半萜合酶基因 *ZmTPS6* 和 *ZmTPS8* 的表达量在玉米品种‘Mo17’中上升,而在品种‘B73’中下调^[25];对拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 中控制合成萜类化合物的直接前体物质法尼基焦磷酸基因进行沉默处理会导致拟南芥非生物胁迫应激反应的调控失常^[26]。这些研究结果均表明植物在受到生物与非生物胁迫时会释放单萜和倍半萜等挥发性物质进行间接防御,同时诱导相关基因的表达。在本研究中,对2个芹菜品种进行高温(38 °C)、低温(4 °C)、干旱(质量体积分数20%PEG6000)和高盐(0.2 mol · L⁻¹NaCl)胁迫处理,2个芹菜品种的 *AgLIMS* 基因均有不同程度的表达,但相对表达量随处理时间延长呈现不同的变化趋势;总体上看,在4种非生物胁迫处理下‘津南实芹’的 *AgLIMS* 基因相对表达量不同程度升高;而‘六合黄心芹’的 *AgLIMS* 基因相对表达量在高温和干旱胁迫下显著升高,但经低温和高盐处理后变化幅度不大。表明芹菜在受到非生物胁迫时其 *AgLIMS* 基因参与对逆境胁迫的生理响应,但该响应效应存在品种间差异^[27]。

综合分析结果表明:从芹菜不同品种中均能克隆获得 *AgLIMS* 基因,但不同品种间该基因的序列及其编码的氨基酸序列略有差异;该基因与同科植物的 *LIMS* 基因具有较高的一致性。*AgLIMS* 基因在芹菜不同组织中均有表达,但在叶片中相对表达量较高;

经过高温、低温、干旱和高盐胁迫处理后, *AgLIMS* 基因的表达特性发生变化,但 2 个芹菜品种 *AgLIMS* 基因的表达特性存在差异。表明该基因在芹菜抵御非生物胁迫的过程中发挥重要的调控作用,但 *AgLIMS* 基因的表达特性存在组织特异性和品种差异性。

本文通过对芹菜 *AgLIMS* 基因的克隆和生物信息学分析及其表达特性的研究,为明确萜类合酶基因在芹菜逆境响应中的作用提供了依据。但植物对非生物胁迫的响应机制相互关联且非常复杂,仅研究其中某个基因无法全面阐述植物响应逆境胁迫的调控途径和代谢机制,因而,后续将扩大芹菜品种数量,针对多个与植物抗逆性相关的基因开展深入研究。

参考文献:

- [1] WU Z Y, RAVEN P H. Flora of China: Vol. 14 [M]. Beijing: Science Press, 2005: 76.
- [2] 沈火林,朱鑫,冯锡刚,等. 芹菜耐寒性的初步鉴定[J]. 中国农学通报, 2006, 22(2): 316-319.
- [3] YONEKURA-SAKAKIBARA K, SAITO K. Functional genomics for plant natural product biosynthesis [J]. Natural Product Reports, 2009, 26: 1466-1487.
- [4] 岳跃冲,范燕萍. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展[J]. 园艺学报, 2011, 38(2): 379-388.
- [5] 徐应文,吕季娟,吴卫,等. 植物单萜合酶研究进展[J]. 生态学报, 2009, 29(6): 3188-3197.
- [6] 樊梓鸾,赵梓霖,赵翔,等. 红豆越橘总三萜的纯化及体外抗炎活性[J]. 南京林业大学学生(自然科学版), 2019, 43(4): 132-138.
- [7] GROTE R, MAYRHOFER S, FISCHBACH R J, et al. Process-based modelling of isoprenoid emissions from evergreen leaves of *Quercus ilex* (L.) [J]. Atmospheric Environment, 2006, 40(S1): 152-165.
- [8] 史利平. 盐胁迫条件下玉米萜类合成及水通道蛋白基因表达分析与生理生化特征研究[D]. 天津: 天津大学环境科学与工程学院, 2016: 7-9.
- [9] 吕季娟. 薄荷和留兰香柠檬烯合酶基因的克隆和序列分析[D]. 成都: 四川农业大学农学院, 2009: 6-10.
- [10] COLBY S M, ALONSO W R, KATAHIRA E J, et al. 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(31): 23016-23024.
- [11] 杭宇. 水稻柠檬烯合酶的克隆与鉴定[D]. 南京: 南京大学生命科学学院, 2014: 23-35.
- [12] 王海荣. 薄荷柠檬烯合酶基因(*MhLS*)的克隆、分子进化与遗传转化研究[D]. 南京: 南京农业大学农学院, 2013: 17-30.
- [13] 胡添源,苏平,张逸风,等. 雷公藤单萜合酶基因 *TuMS* 的克隆及蛋白表达分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1312-1318.
- [14] 杨青青,刘洁霞,徐志胜,等. 芹菜品种‘津南实芹’*AgICE1* 基因的克隆及其对非生物胁迫的响应[J]. 植物资源与环境学报, 2019, 28(1): 16-24.
- [15] FENG K, HOU X-L, LI M-Y, et al. CeleryDB: a genomic database for celery[J]. Database, 2018: bay070.
- [16] LI M-Y, FENG K, HOU X-L, et al. The genome sequence of celery (*Apium graveolens* L.), an important leaf vegetable crop rich in apigenin in the Apiaceae family [J]. Horticulture Research, 2020, 7: 9.
- [17] LI M-Y, WANG F, JIANG Q, et al. Identification of SSRs and differentially expressed genes in two cultivars of celery (*Apium graveolens* L.) by deep transcriptome sequencing[J]. Horticulture Research, 2014, 1: 10.
- [18] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9): e45.
- [19] MOREHOUSE B R, KUMAR R P, MATOS J O, et al. Functional and structural characterization of a (+)-limonene synthase from *Citrus sinensis* [J]. Biochemistry, 2017, 56(12): 1706-1715.
- [20] 戈林泉. 水稻 β -石竹烯和柠檬烯基因的克隆鉴定、原核表达及其遗传转化[D]. 扬州: 扬州大学园艺与植物保护学院, 2008: 47-60.
- [21] 王海荣,于盱,刘艳,等. 薄荷 *MhLS* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 23-25.
- [22] SHIMADA T, ENDO T, FUJII H, et al. Isolation characterization of a new *d*-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* Marc. [J]. Scientia Horticulturae, 2005, 105(4): 507-512.
- [23] LI M-Y, HOU X-L, WANG F, et al. Advances in the research of celery, an important Apiaceae vegetable crop [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(2): 172-183.
- [24] 郭艳玲,张鹏英,郭默然,等. 次生代谢产物与植物抗病防御反应[J]. 植物生理学报, 2012, 48(5): 429-434.
- [25] 侯婧怡,傅竞也,赵颖,等. 玉米根部萜类合酶基因对于旱与激素处理的表达差异分析[J]. 玉米科学, 2017(5): 63-67.
- [26] MANZANO D, ANDRADE P, CAUDEPON D, et al. Suppressing farnesyl diphosphate synthase alters chloroplast development and triggers sterol-dependent induction of jasmonate-and fe-related responses[J]. Plant Physiology, 2016, 172: 93-117.
- [27] 段奥其,冯凯,刘洁霞,等. 芹菜 *NAC* 转录因子基因 *AgNAC1* 的克隆及其对非生物胁迫的响应[J]. 园艺学报, 2018, 45(6): 1125-1135.

(责任编辑:郭严冬)