

芹菜品种‘六合黄心芹’*AgCCoAOMT* 基因的克隆及表达特性分析

苑笑阳, 吴雪君, 聂力, 许珂, 熊爱生^①

(南京农业大学园艺学院 作物遗传与种质创新国家重点实验室 农业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: 根据伞形科 (*Apiaceae*) 植物芹菜 (*Apium graveolens* Linn.) 的转录组数据库, 从芹菜品种‘六合黄心芹’ (‘Liuhe Huangxinqin’) 叶片总 RNA 中克隆获得咖啡碱-辅酶 A-O-甲基转移酶基因, 命名为 *AgCCoAOMT* 基因。序列分析结果表明: *AgCCoAOMT* 基因包含 1 个长度 726 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 241 个氨基酸; 该基因编码的蛋白质为 *AgCCoAOMT*, 其理论相对分子质量为 27 010, 理论等电点 pI 5.35; 在 *AgCCoAOMT* 蛋白中, 酸性氨基酸所占比例高于碱性氨基酸, 脂肪族氨基酸所占比例约为芳香族氨基酸的 3 倍; 该蛋白属于疏水性蛋白, 并含有 1 个保守的 AdoMet_MTases 结构域, 说明 *AgCCoAOMT* 蛋白属于 AdoMet_MTases 超级家族; *AgCCoAOMT* 蛋白的三级结构包含多个 α -螺旋和 β -折叠, 与紫花苜蓿 (*Medicago sativa* Linn.) CCoAOMT 蛋白三级结构的一致性为 84.58%。多重比对和系统树分析结果表明: *AgCCoAOMT* 蛋白有较高的保守性; 该蛋白与同科植物大阿米芹 (*Ammi majus* Linn.) 和欧芹 [*Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A. W. Hill] CCoAOMT 蛋白的进化关系最近, 与睡莲科 (*Nymphaeaceae*) 植物莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) CCoAOMT 蛋白的进化关系较近。qRT-PCR 检测结果表明: *AgCCoAOMT* 基因能够在‘六合黄心芹’的根、茎、叶柄和叶片中表达, 且在叶片中的相对表达量极显著 ($P < 0.01$) 高于其他组织, 说明该基因的表达具有明显的组织特异性; 不同生长发育阶段该基因在叶片中的相对表达量有明显差异, 其在商品期 (播种后第 65 天) 的相对表达量极显著高于幼苗期 (播种后第 25 天) 和生长旺盛期 (播种后第 45 天)。研究结果显示: *AgCCoAOMT* 基因与‘六合黄心芹’叶的老化和木质素含量升高有关, 且在进化过程中具有较高的保守性。

关键词: 芹菜; *AgCCoAOMT* 基因; 序列分析; 多重比对; 表达特性

中图分类号: Q785; Q943.2; S636.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2016)03-0019-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2016.03.03

Analyses on cloning and expression characteristics of *AgCCoAOMT* gene from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinqin’ YUAN Xiaoyang, WU Xuejun, NIE Li, XU Ke, XIONG Aisheng^① (State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2016, 25(3): 19-27

Abstract: According to transcriptome database of *Apium graveolens* Linn. in *Apiaceae*, caffeoyl-CoA-O-methyltransferase gene was cloned from total RNA in leaf of *A. graveolens* ‘Liuhe Huangxinqin’, which was named as *AgCCoAOMT* gene. Sequence analysis result shows that *AgCCoAOMT* gene contains an open reading frame (ORF) with length of 726 bp, 241 amino acids are encoded. The protein encoded by this gene is *AgCCoAOMT*, its theoretical relative molecular mass is 27 010, and theoretical isoelectric point is pI 5.35. In *AgCCoAOMT* protein, percentage of acidic amino acids is higher than that of basic amino acids, and percentage of aliphatic amino acids is about three times of that of aromatic amino acids. This protein belongs to hydrophobic protein and contains a conserved AdoMet_MTases domain, meaning that *AgCCoAOMT* protein belongs to AdoMet_MTases superfamily. Tertiary structure of *AgCCoAOMT*

收稿日期: 2016-04-21

基金项目: 国家大学生创新创业训练计划(201510307028); 国家自然科学基金资助项目(31200520)

作者简介: 苑笑阳(1994—), 女, 山东菏泽人, 本科, 主要从事蔬菜分子生物学方面的研究工作。

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

protein includes many α -helix and β -turn, its consistency with that of CCoAOMT protein from *Medicago sativa* Linn. is 84.58%. Analysis results of multiple alignment and phylogenetic tree show that AgCCoAOMT protein has high conservation. And it has the nearest phylogeny with CCoAOMT protein from the same family species *Ammi majus* Linn. and *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A. W. Hill, also, has nearer phylogeny with CCoAOMT protein from *Nelumbo nucifera* Gaertn. in Nymphaeaceae. qRT-PCR determination result shows that *AgCCoAOMT* gene can express in root, stem, petiole and leaf blade of 'Liuhe Huangxinqin', and its relative expression in leaf blade is extremely significantly higher than that of other tissues ($P < 0.01$), meaning that expression of this gene has obvious tissue specificity. There is obvious difference in relative expression of this gene in leaf blade at different growth and development stages, its relative expression at commodity stage (the sixty-fifth day after sowing) is extremely significantly higher than that at seedling stage (the twenty-fifth day after sowing) and vigorous growth stage (the forty-fifth day after sowing). It is suggested that *AgCCoAOMT* gene is related to leaf senescence and lignin content increasing of 'Liuhe Huangxinqin', and has high conservation during evolutionary process.

Key words: *Apium graveolens* Linn.; *AgCCoAOMT* gene; sequence analysis; multiple alignment; expression characteristics

膳食纤维包括纤维素、木质素、低聚糖和果胶等^[1],摄入适量的膳食纤维有益于人类的身体健康^[2-3]。木质素可参与构成植物细胞壁,其积累能够增强细胞壁的硬度,使蔬菜组织木质化,进而影响蔬菜的口感和品质^[4]。目前,有关木质素的研究及应用多涉及木材和造纸^[5-6]、能源^[7]和饲料^[8-9]等方面,而对蔬菜中木质素的相关研究报道尚不多见。

咖啡碱-辅酶 A-O-甲基转移酶 (caffeoyl-CoA-O-methyltransferase, CCoAOMT) 为木质素合成过程中起关键作用的一类甲基转移酶 (methyltransferases, MTs)^[10-11],参与植物的木质化进程^[12]。在木质素生物合成过程中,CCoAOMT 可催化咖啡酰 CoA 甲基化生成阿魏酰 CoA^[13],并促进复杂的甲基化次生代谢反应,参与不同的生物反应过程^[14-16]。目前,已经从多种植物中分离获得 CCoAOMT 基因^[17-20];而且反义抑制 CCoAOMT 基因后,细胞中的木质素含量明显降低,且 S 型和 G 型木质素含量同时降低,其中 G 型木质素含量降幅较大,导致 S/G 比值增加^[21-23];此外,植物中的 CCoAOMT 还能够响应逆境胁迫^[20,24]。

芹菜 (*Apium graveolens* Linn.) 为伞形科 (Apiaceae) 草本植物,是中国和全世界重要的叶菜类蔬菜作物之一,富含胡萝卜素、维生素和纤维素,兼具食用和药用价值^[25]。与其他园艺作物相比,有关芹菜分子生物学方面的研究报道较少^[26-28]。Pakusch 等^[29]和 Schmitt 等^[30]均发现伞形科蔬菜作物的细胞培养液中存在 CCoAOMT,但对芹菜中 CCoAOMT 基因及其与木质素合成的关系尚不清楚,在芹菜对逆境胁迫的响应过程中该基因的作用也未知。

产自江苏省南京市六合区的优良芹菜品种‘六合黄心芹’(‘Liuhe Huangxinqin’)具有喜湿、耐肥、耐热和耐寒等特点^[31]。作者以该品种为实验材料,克隆获得其 CCoAOMT 基因,对该基因及其编码的氨基酸序列进行分析和比较;并采用 qRT-PCR 技术检测该基因在不同组织中和不同生长发育阶段叶片中的表达特性,以期为深入研究 CCoAOMT 基因在芹菜木质素代谢中的作用奠定研究基础,也为芹菜品质的改良提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

于 2015 年 5 月,将经过催芽的‘六合黄心芹’种子播种到穴盘中,置于人工气候室内进行培养,培养条件为:光照时间 16 h · d⁻¹、昼温 25 °C、夜温 18 °C、光照强度 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。在播种后第 25 天采集嫩叶,经液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存,用于总 RNA 的提取。在播种后第 25 天(幼苗期)、第 45 天(生长旺盛期)和第 65 天(商品期),分别采集植株叶片,采用前述方法速冻和保存,用于不同发育阶段的基因表达分析;在播种后第 65 天分别采集植株的根、茎、叶柄和叶片,采用前述方法速冻和保存,用于不同组织的基因表达分析。

实验用大肠杆菌菌株 DH5 α 由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课题组保存;质粒载体 pMD19-T、TaKaRa *Ex Taq* Mix、SYBR Premix *Ex Taq*、PrimeScript RT reagent Kit 试剂

盒和 DL 2000 Marker 等均购自宝生物工程(大连)有限公司;Axy Prep DNA 凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司;RNA Simple Total RNA Kit 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 取 3 份嫩叶样品,每份 1 g,根据 RNA Simple Total RNA Kit 试剂盒说明书分别提取总 RNA;采用 Nanodrop 2000 微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)检测总 RNA 浓度,并按照 Prime Script RT reagent Kit 试剂盒说明书将总 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.2 目的基因克隆 基于芹菜转录组数据库中的数据检索得到编码 CCoAOMT 的基因序列^[32],根据该基因序列设计 1 对特异引物,正向引物序列为 5'-ATGGCTTCTAATGCTGAATCC-3',反向引物序列为 5'-TCAGCTGATACGACGGCACAG-3'。以前述 cDNA 为模板进行目的基因(即‘六合黄心芹’*CCoAOMT* 基因)片段的 PCR 扩增。扩增体系总体积 10.0 μL ,包括 0.30 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ cDNA 模板 0.5 μL 、 $2 \times \text{TaKaRa Ex Taq Mix}$ (产品编号 RR001A) 5.0 μL 、双蒸水 3.5 μL 、0.10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正向引物和反向引物各 0.5 μL 。扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 105 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物用质量浓度 12 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶进行电泳分离,切取含目的片段的胶块,采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段;将回收产物连接到 pMD19-T 质粒载体上,并转化至大肠杆菌 DH5 α 中。转化菌液经鉴定后,交由南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

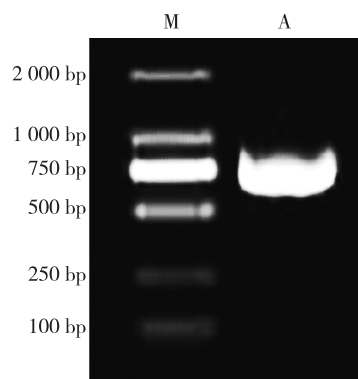
1.2.3 序列分析 采用 BioXM 2.6 软件对克隆获得的目的基因片段进行核苷酸和氨基酸序列分析;在 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)上,采用 BLASTp 程序对目的基因编码的氨基酸序列进行保守域预测及同源性分析;用 DNAMAN 6.0 软件分析目的基因编码的氨基酸序列的亲水性和疏水性;采用序列处理在线工具包(SMS)(<http://www.bio-soft.net/sms>)和 BioXM 2.6 软件对目的基因及与其同源性较高的其他植物的 *CCoAOMT* 基因编码的氨基酸序列的氨基酸组成和理化性质(相关数据来自 NCBI 数据库)进行分析和多重比对,并采用 MEGA 5.2 软件绘制系统树;运用 SWISS-MODEL 软件对目的基因编码的氨基酸序列的三级结构进行预测分析。

1.2.4 基因表达特性分析 采用 qRT-PCR 技术、用 SYBR Premix *Ex Taq* 试剂盒以及 iQTM 5 Software 和 iQTM 5 Real-time PCR System 分析植株不同组织和不同生长发育阶段叶片中目的基因的表达特性。根据克隆获得的目的基因序列设计引物,正向引物序列为 5'-GGCTTCTAATGCTGAATCCAAAC-3',反向引物序列为 5'-CTAAGCTCTTTCATTGCCTCTGG-3';以芹菜的 *actin* 基因为内参基因^[33],正向引物序列为 5'-CGGTATTGTGTTGGACTCTGGTGAT-3',反向引物序列为 5'-CAGCAAGGTCAAGACGGAGTATGG-3'。扩增体系总体积 20.0 μL ,包括 SYBR Premix *Ex Taq* (产品编号 RR430S) 10.0 μL 、0.15 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ cDNA 模板 2.0 μL 、双蒸水 7.2 μL 、0.50 μmol^{-1} 正向引物和反向引物各 0.4 μL 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s、54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,共 40 个循环;65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 s。绘制熔解曲线,并根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算基因的相对表达量,其中, $\Delta C_T = C_{T\text{目标基因}} - C_{T\text{actin}}$ ^[34]。

2 结果和分析

2.1 目的基因的克隆及序列分析结果

以芹菜品种‘六合黄心芹’嫩叶的 cDNA 为模板,扩增到 1 条长度约 750 bp 的特异片段(图 1),命名为 *AgCCoAOMT* 基因,其编码的蛋白质为 *AgCCoAOMT*; *AgCCoAOMT* 基因包含 1 个长度为 726 bp 的开放阅读框(ORF)(图 2),编码 241 个氨基酸;*AgCCoAOMT* 蛋白在第 80 位至第 160 位氨基酸间含有 1 个保守的 AdoMet_{MTases} 结构域(图 3),说明该蛋白属于



M: DL 2000 marker; A: *AgCCoAOMT* gene.

图 1 芹菜品种‘六合黄心芹’*AgCCoAOMT* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification result of *AgCCoAOMT* gene from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’

AdoMet_MTases 超级家族。亲水性和疏水性分析结果(图4)显示:在 AgCCoAOMT 蛋白中,疏水性氨基酸多于亲水性氨基酸,据此推测该蛋白属于疏水性蛋白;其中,位于第 159 位的丙氨酸的亲水性最强,位于第 66 位的赖氨酸、第 115 位的丙氨酸和第 227 位的酪氨

酸的疏水性均很强。

2.2 AgCCoAOMT 蛋白与不同植物 CCoAOMT 蛋白的比较

2.2.1 氨基酸序列同源性分析

将芹菜品种‘六合黄心芹’及 NCBI 数据库中茶树[*Camellia sinensis*

```

1 ATGGCTTCTAATGCTGAATCCAACATTTCAGAAGTTGGGCACAAAGAGTCTTTGCAGAGTGTGCTCTTTATCAGTATATACTTGAACA
  M A S N A E S K H S E V G H K S L L Q S D A L Y Q Y I L E T
91 AGTGTGTACCCAAGAGAGCCAGAGCAATGAAAGAGCTTAGAGATGTCACTGCCAAGCATCCATGGAATCTGATGACAACATCAGCTGAT
  S V Y P R E P E A M K E L R D V T A K H P W N L M T T S A D
181 GAAGGGCAGTTCTTGAGCATGCTTTGAAGCTCATCAATGCCAAGAACCATGGAGATTGGTGTTTACACTGGTTATTCTCTCCTTGCC
  E G Q F L S M L L K L I N A K N T M E I G V Y T G Y S L L A
271 ACGGCCCTGGCTCTCCAGATGATGGGAAGATTTGGCATTGGACATCAACAGAGAAAACTATGAAATTGGATTACCAATTATTGAAAAA
  T A L A L P D D G K I L A L D I N R E N Y E I G L P I I E K
361 GCTGGAGTTGGTCACAAAATTGACTTCAGAGAGGGCCCTGCTTTGCCTGTTCTTGATCATATGCTCGAAGATGGGAAGTTTCATGGGACA
  A G V G H K I D F R E G P A L P V L D H M L E D G K F H G T
451 TTGGATTTTGTATTTCGTTGATGCTGACAAAGATAACTATATCAACTACCACAAGAGATTAATTGATTTAGTGAAAAATCGGAGGACTTATC
  L D F V F V D A D K D N Y I N Y H K R L I D L V K I G G L I
541 GGCTACGACAACACCCCTTTGGAATGGTCTGTGGCAGCCAGCTGATGCTCCCATGAGGAAGTATGTAAGGTACTACAGAGACTTTGTG
  G Y D N T L W N G P V A Q P A D A P M R K Y V R Y Y R D F V
631 ATCGAGCTTAACAAGCCCTGGCTGCTGATCCAGATTGAGATCTGCATGCTTCTGTTGGTGTGGAGTTACCCTGTGCCGTCGTATC
  I E L N K A L A A D P R I E I C M L P V G D G V T L C R R I
721 AGCTGA
  S *

```

*: 终止密码子 Stop codon.

图2 芹菜品种‘六合黄心芹’AgCCoAOMT 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of AgCCoAOMT gene from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’ and its amino acid sequence encoded

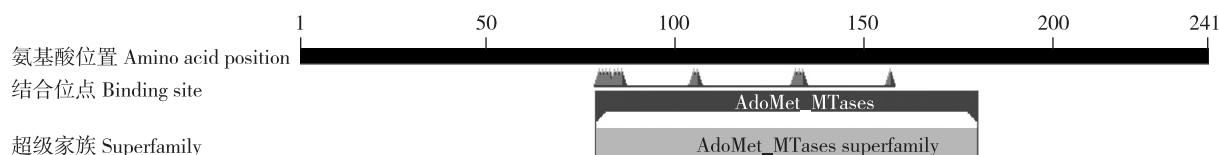


图3 芹菜品种‘六合黄心芹’AgCCoAOMT 蛋白的保守域预测结果

Fig. 3 Prediction result of conserved domain of AgCCoAOMT protein from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’

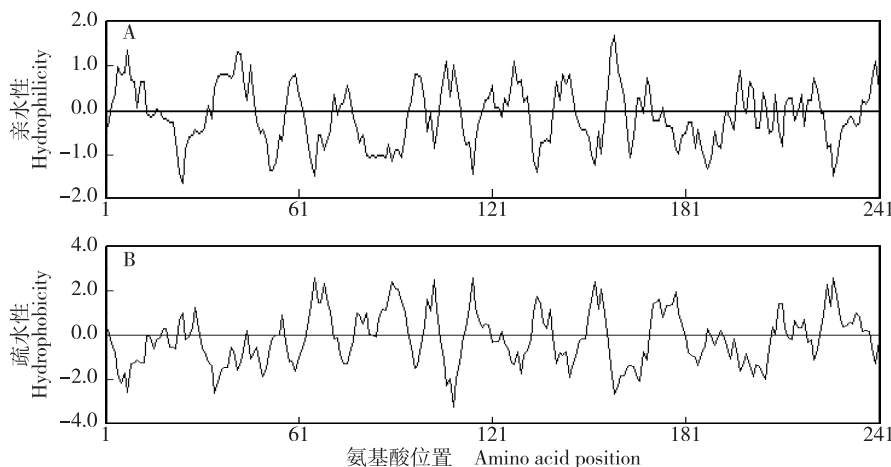
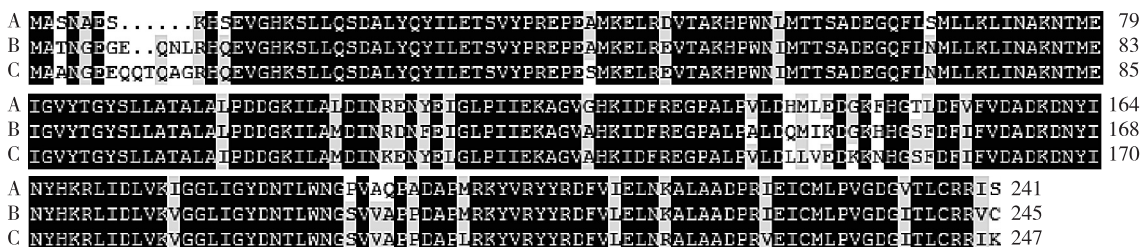


图4 芹菜品种‘六合黄心芹’AgCCoAOMT 蛋白氨基酸序列的亲水性(A)和疏水性(B)分析结果
Fig. 4 Analysis result of hydrophilicity (A) and hydrophobicity (B) of amino acid sequence of AgCCoAOMT protein from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’

(Linn.) Kuntze] 和枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] CCoAOMT 蛋白的氨基酸序列(登录号分别为 AFY97679.1 和 AFZ76980.1) 进行比对, 结果见图 5。结果表明: 虽然‘六合黄心芹’、茶树和枇杷 CCoAOMT 蛋白的氨基酸序列长度存在一定差异(分别为 241、245 和 247 个氨基酸), 但相似度却很高(91.09%),

说明 CCoAOMT 蛋白具有高度保守性。

2.2.2 蛋白质理化性质及氨基酸组成分析 采用 BLASTp 程序从 NCBI 数据库中选取与 *AgCCoAOMT* 蛋白氨基酸序列相似度高于 80% 的 19 个种类, 对芹菜品种‘六合黄心芹’与它们 CCoAOMT 蛋白的理化性质和氨基酸组成进行分析, 结果见表 1。



A: ‘六合黄心芹’ ‘Liuhe Huangxinjin’; B: 茶树 *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze; C: 枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.

图 5 芹菜品种‘六合黄心芹’、茶树和枇杷的 CCoAOMT 蛋白氨基酸序列的多重比对结果
 Fig. 5 Result of multiple alignment of amino acid sequences of CCoAOMT protein from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’, *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze and *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.

表 1 芹菜品种‘六合黄心芹’及其他植物 CCoAOMT 蛋白的氨基酸组成和理化性质比较

Table 1 Comparison on compositions of amino acids and physical and chemical property of CCoAOMT protein from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’ and other species

种类 ¹⁾ Species ¹⁾	登录号 Accession No.	氨基酸数量 Number of amino acids	理论相对分子质量 Theoretical relative molecular mass	理论等电点 Theoretical isoelectric point	比例/% ²⁾ Percentage ²⁾			
					BA	AC	AR	AL
1		241	27 010	5.35	33	49	20	60
2	AAT40111.1	241	27 050	5.16	32	51	21	58
3	P28034.1	241	27 100	5.35	33	50	21	58
4	XP_006487045.1	247	27 900	5.37	33	58	20	62
5	AAT37172.1	247	27 740	5.18	33	54	21	60
6	AFY97679.1	245	27 560	5.61	34	53	20	59
7	NP-001268047.1	242	27 240	5.14	31	53	21	60
8	AFZ78548.1	247	27 880	5.18	32	56	21	59
9	AFG17073.1	247	27 790	5.36	32	56	21	60
10	ACJ38669.1	247	27 840	5.36	34	56	21	60
11	AFU54611.1	247	27 850	5.66	35	54	20	62
12	XP_008385739.1	247	27 780	5.38	34	55	20	62
13	AFZ76980.1	247	27 810	5.38	34	55	20	62
14	NP_001234801.1	242	27 180	5.35	31	51	21	61
15	BAG71891.1	247	27 650	5.64	33	51	21	64
16	BAM05558.1	246	27 610	5.00	31	55	20	61
17	AFZ15799.1	247	27 940	5.17	33	55	21	60
18	XP_010263488.1	248	28 090	5.38	33	58	21	61
19	NP_001305508.1	242	27 270	5.16	32	53	21	59
20	ALR73822.1	247	27 860	5.36	34	56	20	62

¹⁾ 1: ‘六合黄心芹’ ‘Liuhe Huangxinjin’; 2: 大阿米芹 *Ammi majus* Linn.; 3: 欧芹 *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A. W. Hill; 4: 甜橙 *Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck; 5: 构树 *Broussonetia papyrifera* (Linn.) L’ Hér ex Vent; 6: 茶树 *Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze; 7: 葡萄 *Vitis vinifera* Linn.; 8: 毛白杨 *Populus tomentosa* Carr.; 9: 芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.; 10: 亮叶桦 *Betula luminifera* H. Winkl.; 11: 白梨 *Pyrus bretschneideri* Rehd.; 12: 苹果 *Malus domestica* Borkh.; 13: 枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.; 14: 番茄 *Solanum lycopersicum* Linn.; 15: 红花 *Carthamus tinctorius* Linn.; 16: 桉树 *Eucalyptus pilularis* Smith; 17: 忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.; 18: 莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn.; 19: 马铃薯 *Solanum tuberosum* Linn.; 20: 白桦 *Betula platyphylla* Suk.

²⁾ BA: 碱性氨基酸 Basic amino acids; AC: 酸性氨基酸 Acidic amino acids; AR: 芳香族氨基酸 Aromatic amino acids; AL: 脂肪族氨基酸 Aliphatic amino acids.

结果显示:不同植物 CCoAOMT 蛋白的氨基酸数量为 241 ~ 248,其中,同为伞形科的‘六合黄心芹’、大阿米芹 (*Ammi majus* Linn.) 和欧芹 [*Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman ex A. W. Hill] CCoAOMT 蛋白的氨基酸数量最少,均为 241;睡莲科 (Nymphaeaceae) 植物莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) CCoAOMT 蛋白的氨基酸数量最多,为 248;另有 11 种植物 CCoAOMT 蛋白的氨基酸数量为 247。从氨基酸组成看,除‘六合黄心芹’ AgCCoAOMT 蛋白外,其他 19 种植物的 CCoAOMT 蛋白中酸性氨基酸所占比例均在 50% 以上,明显高于碱性氨基酸的比例;而脂肪族氨基酸所占比例均在 58% 以上,约为芳香族氨基酸的 3 倍。

从蛋白质理化性质看,表 1 涉及的这些种类的 CCoAOMT 蛋白的理论相对分子质量差异较小,以‘六

合黄心芹’ CCoAOMT 蛋白的理论相对分子质量最低 (27 010)、莲 CCoAOMT 蛋白的理论相对分子质量最高 (28 090)。这 20 种植物 CCoAOMT 蛋白的理论等电点为 pI 5.00 ~ pI 5.66,变幅不大。

2.2.3 系统进化分析 采用 MEGA 5.2 软件绘制上述 20 种植物 CCoAOMT 蛋白的系统树,结果见图 6。

结果显示:这 20 种植物被分成 2 支,其中,隶属于伞形科、睡莲科、山茶科 (Theaceae)、葡萄科 (Vitaceae) 和茄科 (Solanaceae) 的 8 种植物聚为一支,另外 9 科 12 种植物聚为另一支。‘六合黄心芹’与同科植物大阿米芹和欧芹的进化关系最近,并且与睡莲科植物莲的进化关系较近;此外,其他同科不同植物的进化关系均较近,说明同科植物 CCoAOMT 蛋白的进化关系较近。

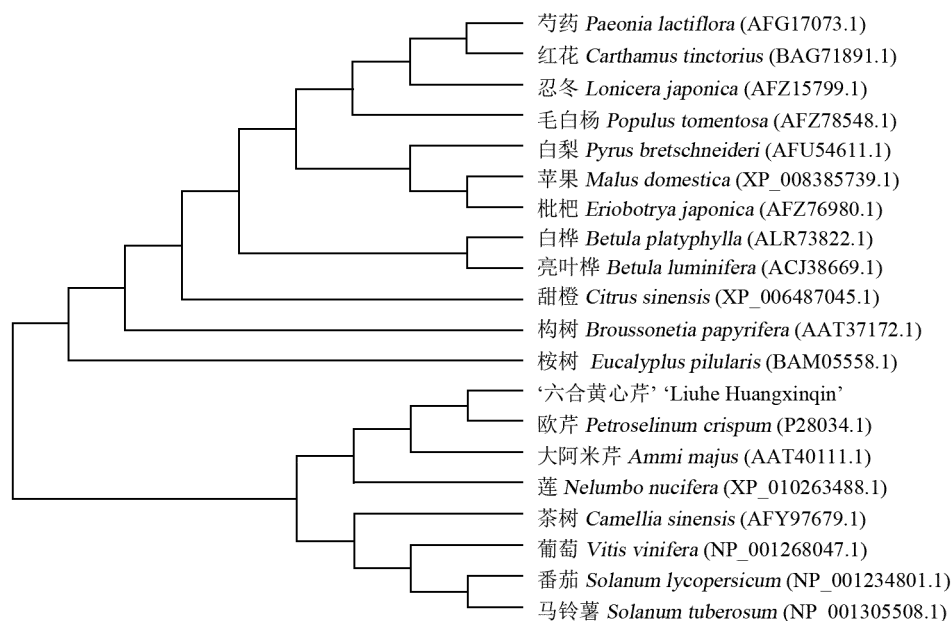


图 6 芹菜品种‘六合黄心芹’及其他植物 CCoAOMT 蛋白的系统树
Fig. 6 Phylogenetic tree of CCoAOMT protein from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’ and other species

2.3 AgCCoAOMT 蛋白三级结构的预测分析

由于芹菜品种‘六合黄心芹’ AgCCoAOMT 蛋白与紫花苜蓿 (*Medicago sativa* Linn.) CCoAOMT 蛋白的氨基酸序列相似度很高,因此,以紫花苜蓿 CCoAOMT (PDB ID: 1sui.1) 为模型^[35],采用 SWISS-MODEL 软件对该蛋白的三级结构进行预测,结果见图 7。‘六合黄心芹’ AgCCoAOMT 蛋白与紫花苜蓿 CCoAOMT 蛋白三级结构的一致性达 84.58%,并且存在多个 α -螺旋和 β -折叠。

2.4 AgCCoAOMT 基因的表达特性分析

采用 qRT-PCR 技术对芹菜品种‘六合黄心芹’不同组织中以及不同生长发育阶段叶片中 AgCCoAOMT 基因的相对表达量进行检测,结果见图 8。

2.4.1 在不同组织中的表达特性分析 由图 8-A 可见:播种后第 65 天,AgCCoAOMT 基因在‘六合黄心芹’根、茎、叶柄和叶片中均能够表达,但相对表达量存在明显差异;AgCCoAOMT 基因的相对表达量在叶片中最高、根中次之、茎中较少、叶柄中最少。叶片中

AgCCoAOMT 基因的相对表达量分别为叶柄、茎和根的 15.17、10.89 和 3.70 倍,且差异极显著 ($P < 0.01$); 而根、茎和叶柄中该基因的相对表达量则无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.4.2 在不同生长发育阶段的表达特性分析 由图 8-B 可见:在幼苗期(播种后第 25 天)、生长旺盛期(播种后第 45 天)和商品期(播种后第 65 天),‘六合黄心芹’叶片中 *AgCCoAOMT* 基因的相对表达量存在明显差异,表现为商品期最高、幼苗期次之、生长旺盛期最低。商品期 *AgCCoAOMT* 基因的相对表达量分别为幼苗期和生长旺盛期的 5.18 和 6.36 倍,且差异极显著;而幼苗期和生长旺盛期该基因的相对表达量则无显著差异。

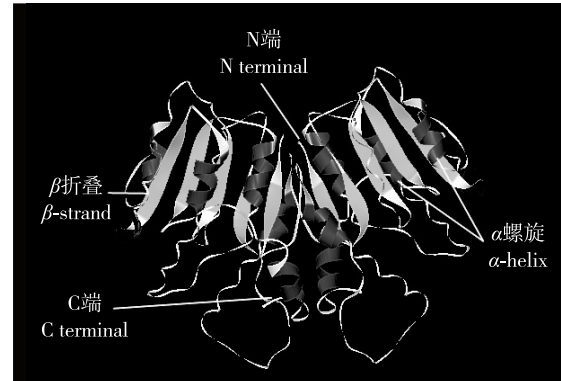
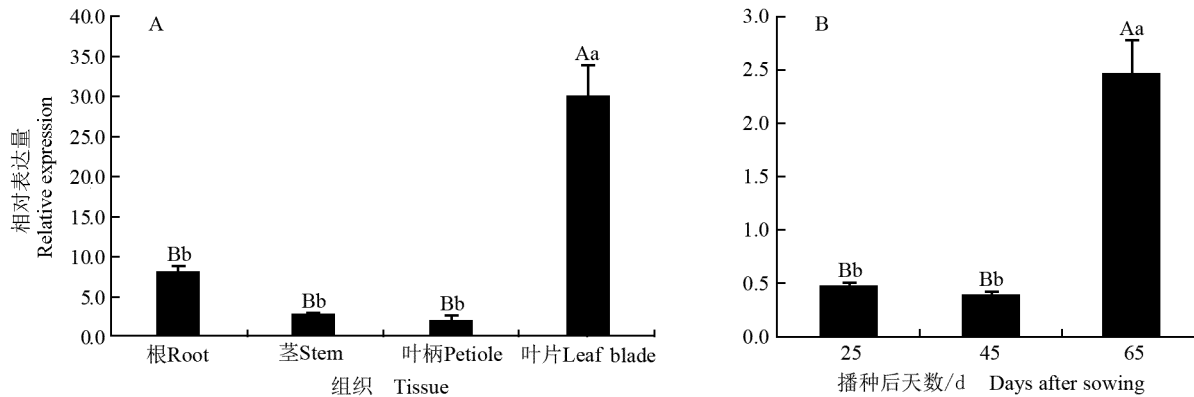


图7 芹菜品种‘六合黄心芹’*AgCCoAOMT*蛋白的三级结构
Fig. 7 Tertiary structure of *AgCCoAOMT* protein from *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’



不同大和小写字母分别表示差异极显著 ($P < 0.01$) 或显著 ($P < 0.05$) Different capitals and small letters indicate the extremely significant ($P < 0.01$) or significant ($P < 0.05$) differences, respectively.

图8 芹菜品种‘六合黄心芹’不同组织(A)和不同生长发育阶段叶片(B)中 *AgCCoAOMT* 基因相对表达量的比较
Fig. 8 Comparison on relative expression of *AgCCoAOMT* gene in different tissues (A) and in leaf blade at different growth and development stages (B) of *Apium graveolens* ‘Liuhe Huangxinjin’

3 讨 论

氨基酸序列同源性分析结果显示:芹菜品种‘六合黄心芹’*AgCCoAOMT* 蛋白与茶树和枇杷 *CCoAOMT* 蛋白的氨基酸序列相似度为 91.09%,说明 *CCoAOMT* 蛋白的氨基酸序列具有高度保守性。而在基于 *AgCCoAOMT* 蛋白的氨基酸序列构建的系统树中,‘六合黄心芹’与同科植物欧芹和大阿米芹聚在一起,也表明在植物进化过程中 *CCoAOMT* 蛋白的氨基酸序列具有一定的保守性。

qRT-PCR 检测结果表明:在芹菜品种‘六合黄心芹’的根、茎、叶柄和叶片中,*AgCCoAOMT* 基因均能够

表达但其相对表达量有明显差异,说明该基因的表达存在明显的组织特异性,推测这可能与芹菜不同部位木质素的积累和分布差异有关。在不同生长发育阶段,‘六合黄心芹’*AgCCoAOMT* 基因的相对表达量也存在明显差异,其中,幼苗期和生长旺盛期该基因的相对表达量较低,而商品期该基因的相对表达量则显著提高,推测这可能与商品期植株叶的老化和木质素含量升高有关。

植物的木质素代谢是一个复杂的生理过程,受到多种酶的综合调控^[36-37]。本研究仅对芹菜品种‘六合黄心芹’的 *AgCCoAOMT* 基因进行了相关的初步研究,但 *AgCCoAOMT* 基因对芹菜尤其是‘六合黄心芹’体内木质素代谢的作用机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] DHINGRA D, MICHAEL M, RAJPUT H, et al. Dietary fibre in foods: a review[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2012, 49: 255–266.
- [2] SLAVIN J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits [J]. *Nutrients*, 2013, 5: 1417–1435.
- [3] RODRÍGUEZ R, JIMÉNEZ A, FERNÁNDEZ-BOLAÑOS J, et al. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2006, 17: 3–15.
- [4] THIMM J, BURRITT D, SIMS I M, et al. Celery (*Apium graveolens*) parenchyma cell walls: cell walls with minimal xyloglucan[J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 116: 164–171.
- [5] CHEN C Y, BAUCHER M, CHRISTENSEN J H, et al. Biotechnology in trees: towards improved paper pulping by lignin engineering [J]. *Euphytica*, 2001, 118: 185–195.
- [6] RONG H Y, GAO B Y, ZHAO Y X, et al. Advanced lignin-acrylamide water treatment agent by pulp and paper industrial sludge: synthesis, properties and application [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25: 2367–2377.
- [7] 周强, 於丙军. 潜在木质纤维素能源植物香根草的初步研究[J]. *植物资源与环境学报*, 2012, 21(1): 98–103.
- [8] KNUDSEN K E B. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 1997, 67: 319–338.
- [9] PETERSSON A, DOMIG K J, SCHEDLE K, et al. Comparison of three methods to enumerate gut microbiota of weanling piglets fed insoluble dietary fibre differing in lignin content [J]. *Journal of Agricultural Science*, 2010, 148: 225–232.
- [10] ZHONG R Q, MORRISON III W H, HIMMELSBACH D S, et al. Essential role of caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124: 563–577.
- [11] YE Z H, KNEUSEL R E, MATERN U, et al. An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia* [J]. *The Plant Cell*, 1994, 6: 1427–1439.
- [12] LI X Y, CHEN W J, ZHAO Y, et al. Downregulation of caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase (*CCoAOMT*) by RNA interference leads to reduced lignin production in maize straw [J]. *Genetics and Molecular Biology*, 2013, 36: 540–546.
- [13] GRIENENBERGER E, BESSEAU S, GEOFFROY P, et al. A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines[J]. *The Plant Journal*, 2009, 58: 246–259.
- [14] ZHANG G Y, ZHANG Y J, XU J T, et al. The *CCoAOMT3* gene from jute (*Corchorus capsularis* L.) is involved in lignin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene*, 2014, 546: 398–402.
- [15] ZHAO H Y, SHENG Q X, LÜ S Y, et al. Characterization of three rice *CCoAOMT* genes [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49: 1602–1606.
- [16] LIU X G, LUO Y, WU H K, et al. Systematic analysis of *O*-methyltransferase gene family and identification of potential members involved in the formation of *O*-methylated flavonoids in *Citrus* [J]. *Gene*, 2016, 575: 458–472.
- [17] DO C T, POLLET B, THÉVENIN J, et al. Both caffeoyl Coenzyme A 3-*O*-methyltransferase 1 and caffeic acid *O*-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2007, 226: 1117–1129.
- [18] BHUIYAN N H, SELVARAJ G, WEI Y D, et al. Gene expression profiling and silencing reveal that monolignol biosynthesis plays a critical role in penetration defence in wheat against powdery mildew invasion [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60: 509–521.
- [19] WEI J H, ZHAO H Y, ZHANG J Y, et al. Cloning of cDNA encoding CCoAOMT from *Populus tomentosa* and down-regulation of lignin content in transgenic plant expressing antisense gene [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43: 1179–1183.
- [20] LIU Y X, ZOU D M, WU B S, et al. Cloning and expression analysis of a *CCoAOMT* homolog in loquat fruit in response to low-temperature storage [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, 105: 45–50.
- [21] ZHONG R Q, MORRISON III W H, NEGREL J, et al. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis [J]. *The Plant Cell*, 1998, 10: 2033–2045.
- [22] MEYERMANS H, MORREEL K, LAPIERRE C, et al. Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 36899–36909.
- [23] ZHAO H Y, WEI J H, ZHANG J Y, et al. Lignin biosynthesis by suppression of two *O*-methyl-transferases [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47: 1092–1095.
- [24] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼咖啡酰辅酶A-*O*-甲基转移酶(*DLCCoAOMT*)基因的克隆和表达分析[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(1): 118–126.
- [25] 李梦瑶, 王枫, 侯喜林, 等. 芹菜过敏原蛋白 *Api g1* 基因的克隆与表达分析[J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36(2): 13–19.
- [26] 李梦瑶, 王枫, 侯喜林, 等. 2个芹菜品种泛变应原 *Api g4* 基因的克隆与分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2013, 22(1): 1–7.
- [27] 田畅, 蒋倩, 王枫, 等. 3个芹菜品种 *Agnp-G3PDH* 基因的克隆及其序列和表达特性分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2014, 23(2): 1–10.
- [28] JIA X L, WANG G L, WANG F, et al. Anatomic structure and expression profiles of related genes: novel insights into leaf development in celery [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34: 519–531.
- [29] PAKUSCH A E, KNEUSEL R E, MATERN U. S-adenosyl-L-

- methionine: *trans*-caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase from elicitor-treated parsley cell suspension cultures[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1989, 271: 488–494.
- [30] SCHMITT D, PAKUSCH A E, MATERN U. Molecular cloning, induction and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266: 17416–17423.
- [31] 王海峰, 张德琴, 刘长勇, 等. 六合黄心芹周年生产技术[J]. 长江蔬菜, 1999(1): 16–18.
- [32] 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: 1–9.
- [33] LI M Y, WANG F, JIANG Q, et al. Validation and comparison of reference genes for qPCR normalization of celery (*Apium graveolens*) at different development stages[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1–12.
- [34] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29: 2002–2007.
- [35] FERRER J L, ZUBIETA C, DIXON R A, et al. Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase[J]. Plant Physiology, 2005, 137: 1009–1017.
- [36] JIA X L, WANG G L, XIONG F, et al. *De novo* assembly, transcriptome characterization, lignin accumulation, and anatomic characteristics: novel insights into lignin biosynthesis during celery leaf development[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 8259.
- [37] JIA X L, LI M Y, JIANG Q, et al. High-throughput sequencing of small RNAs and anatomical characteristics associated with leaf development in celery[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 11093.

(责任编辑: 佟金凤)

(上接第18页 Continued from page 18)

- [6] BARBOUR W M, HATTERMANN D R, STACEY G. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57: 2635–2639.
- [7] LOZOVAYA V V, LYGIN A V, ZERNOVA O V, et al. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase[J]. Planta, 2007, 225: 665–679.
- [8] 江昌俊, 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(4): 425–430.
- [9] AIDA M, ISHIDA T, FUKAKI H, et al. Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cupshaped cotyledon mutant[J]. The Plant Cell, 1997, 9: 841–857.
- [10] OOKA H, SATOH K, DOI K, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*[J]. DNA Research, 2003, 10: 239–247.
- [11] OLSEN A N, ERNST H A, LEGGIO L L, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10: 79–87.
- [12] 刘晓庆, 陈华涛, 张红梅, 等. 大豆 *GmNACO11* 基因的分离及对异黄酮合酶基因 *GmIFS2* 的调控分析[J]. 华北农学报, 2015, 30(5): 25–29.
- [13] SAVKA M A, RAVILLION B, NOEL G R, et al. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode[J]. Phytopathology, 1990, 80: 503–508.
- [14] 易金鑫, 徐照龙, 王峻峰, 等. *GmCHS8* 和 *GmIFS2* 基因共同决定大豆中异黄酮的积累[J]. 作物学报, 2011, 37(4): 571–578.
- [15] WANG Y, GUO D, LI H L, et al. Characterization of HbWRKY1, a WRKY transcription factor from *Hevea brasiliensis* that negatively regulates *HbSRPP*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 71: 283–289.
- [16] 孙君明, 丁安林. 大豆种子发育过程中异黄酮的积累[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(1): 10–13.
- [17] SOUER E, HOUWELINGEN A V, KLOOS D, et al. The *no apical meristem* gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries[J]. Cell, 1996, 85: 159–170.
- [18] DUVAL M, HSIEH T F, KIM S Y, et al. Molecular characterization of *AtNAM*; a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 50: 237–248.
- [19] TRAN L S, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, et al. Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive *cis*-element in the *early responsive to dehydration stress 1* promoter[J]. The Plant Cell, 2004, 16: 2481–2498.
- [20] YI J, DERYNCK M R, LI X, et al. A single-repeat MYB transcription factor, *GmMYB176*, regulates *CHS8* gene expression and affects isoflavonoid biosynthesis in soybean[J]. The Plant Journal, 2010, 62: 1019–1034.
- [21] LIU X, YUAN L, XU L, et al. Over-expression of *GmMYB39* leads to an inhibition of the isoflavonoid biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.)[J]. Plant Biotechnology Reports, 2013, 7: 445–455.

(责任编辑: 张明霞)