

# 棕果实 CCoAOMT 与 LAR 基因的 筛选与表达分析

陈桂信<sup>1,2</sup>, 王玉珍<sup>1,2</sup>, 赵利<sup>1,2</sup>, 姜翠翠<sup>3</sup>, 吕恃衡<sup>1</sup>, 潘东明<sup>1,2</sup>

(1. 福建农林大学 园艺学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 园艺产品贮运保鲜研究所, 福建 福州 350002;  
3. 福建省农业科学院 果树研究所, 福建 福州 350013)

**摘 要:**以棕果实为研究材料,探讨了棕 *PsCCoAOMT* 和 *PsLAR* 基因在棕果实不同发育时期的表达动态,采用两步法逆转录与抑制 PCR 技术相结合的方法构建含棕果实不同发育时期的均一化全长 cDNA 文库,通过稀释池 PCR 法筛选出酚类物质代谢途径中的关键酶基因 *PsCCoAOMT* 和 *PsLAR*。结果表明:*PsCCoAOMT* 和 *PsLAR* 全长 cDNA 序列分别为 1 195 bp 和 1 625 bp,对应的 ORF 分别为 744 bp 和 1 050 bp,分别编码 247 和 349 个氨基酸。*PsCCoAOMT* 相对分子量为 27 893.8,等电点为 5.42,属于亲水性稳定蛋白;*PsLAR* 相对分子量为 38 483.1,等电点为 5.40,具有亲水性,属于不稳定蛋白。同源性分析表明,*PsCCoAOMT* 氨基酸序列与白梨相似性达 96%,*PsLAR* 氨基酸序列与蔷薇科植物高度同源。荧光定量结果表明,*PsCCoAOMT* 在棕整个生长发育过程表达量差异都不明显,整体呈下降趋势,花后 50 d 表达量最低;*PsLAR* 在棕整个生长发育过程表达量呈明显的下降趋势,前期高后期低,花后 125 d 表达量最低。

**关键词:**棕; *PsCCoAOMT*; *PsLAR*; 稀释池 PCR; 实时荧光定量 PCR

**中图分类号:**S 665.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)09-0087-08

棕(*Prunus salicina* Lindli. var *cordata* J. Y. Zhang et al.)是原产福建的一类重要核果类果树,果大核小、肉厚汁多,可食率高,在我国南方大面积推广种植,市场前景好,但生产上存在果实外观完好,内部果肉已经发生褐变的问题,严重影响棕果实的商品价值和市场声誉,制约棕产业的发展。

邱栋梁等<sup>[1]</sup>针对棕果实采前褐变问题,测定果实发育过程中的相关酶活性变化,结果表明,多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)将果实中的酚类物质氧化,生成的醌类物质经过聚合作用形成褐色大分子化合物,从而导致果肉褐变的发生<sup>[2-3]</sup>。酚类物质是植物中最重要且分布最广泛的次生代谢物质之一,广泛分布于水果、

蔬菜、花卉等各种高等植物器官中,对植物的品质、色泽、风味等有一定的影响,同时可以使植物免受生物和非生物胁迫<sup>[4]</sup>。植物酚类物质主要由莽草酸途径和苯丙烷代谢途径产生,其中苯丙烷代谢途径包含合成酚类物质的大量关键酶,可以产生多种具有重要生理功能的多酚类次生物质<sup>[5]</sup>。无色花色素还原酶(leucoanthocyanin reductase, LAR)是单宁合成途径中的限速酶<sup>[6]</sup>,能将 DFR 催化的无色花青素(黄烷 3,4-二醇)转化为儿茶素(2,3-反式黄烷三醇)<sup>[7]</sup>。咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶(Caffeoyl CoA-O-methyl-transferase, CCoAOMT)是木质素合成支路的一个关键酶,能将咖啡酰辅酶 A 甲基化成阿魏酰辅酶 A<sup>[8-9]</sup>。目前,CCoAOMT 基因和 LAR 基因已在多种植物中克隆得到<sup>[10-15]</sup>。

该研究从已构建好的含棕果实不同发育时期的均一化全长 cDNA 文库中筛选到 CCoAOMT 和 LAR 全长基因,并对这 2 个基因序列进行生物信息学分析;采用荧光定量 PCR 技术,探明这 2 个基因在棕不同发育时期的表达动态,以期为进一步研究 CCoAOMT 和 LAR 基因功能以及在棕果实褐变中的作用奠定基础,对棕褐变的研究具有重要的理论意义和实践价值。

**第一作者简介:**陈桂信(1967-),男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为园艺植物遗传育种与生物技术。E-mail: guixinchen@126.com.

**责任作者:**潘东明(1956-),男,本科,教授,博士生导师,研究方向为果树采后生理与分子生物学。E-mail: pdm666@126.com.

**基金项目:**福建农林大学“园艺植物种质与高优生产技术创新”创新团队基金资助项目(CXTD12013)。

**收稿日期:**2015-01-28

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料采自福建省古田县城关曾志芳家的油棕果园,4月15日开始取果,每隔25 d取1次,直到7月25日果实完全成熟,分别是盛花后25、50、75、100、125 d,按果实大小分为花后25 d(0.5~10.0 g)、花后50 d(20.0~40.0 g)、花后75 d(40.0~60.0 g)、花后100 d(60.0~90.0 g)和花后125 d(90.0~110.0 g)5个不同发育时期。棕果实去皮去核后,将果肉切成小块,称取1 g样品,用锡箔纸包裹,放入液氮速冻后,转入-80℃冰箱保存备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 棕果实全长均一化 cDNA 文库的构建 将不同发育时期的果肉,采用陈桂信<sup>[16]</sup>的改良 CTAB 法提取,所

表 1

引物序列

Table 1

Primer sequences

简并引物 Degenerate primer		荧光定量引物 qRT-PCR primer	
CCoAOMTF	5'-GAGACHAGTGTGTAYCCDAVRGAGAGCCTG-3'	Nai-tubulinF	5'-TCGGATGATGATGACCTTCTCTGTG-3'
CCoAOMTR	5'-AGTCYCTRTARTACCTVACRTAC-3'	Nai-tubulinR	5'-CATACACTCGTCTGCGTTCTCCA-3'
LARF	5'-TCNATTGCTCTCTGGCCYTACT-3'	YG-LARF	5'-AGCTGTTGGCACAATTAAGAGGT-3'
LARR	5'-CATYGAARCAAYTCATCCAARGT-3'	YG-LARR	5'-CTCAGAAGGATGCTTGTGTGTCG-3'
M13F	5'-GTAAAACGACGCCAGT-3'	YG-CCoAOMTF	5'-TACCCAAGAGAGCCTGAATCC-3'
M13R	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	YG-CCoAOMTR	5'-AGCCAGTGAAGACCCCAATC-3'

1.2.3 荧光定量 PCR 表达分析 以棕不同发育时期果实为材料,分别提取不同时期的棕果肉 RNA,3个生物重复,用 TaKaRa 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,稀释10倍作为荧光定量 PCR 的模板。以棕 *tubulin* 基因作为内参基因,参照 2×SYBR Prime Script™ RT-PCR Kit (TaKaRa) 荧光定量试剂盒进行荧光定量试验。反应体系:模板 cDNA 1 μL,2×SYBR Premix Ex Taq 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,补水至 20 μL。PCR 程序为 95℃ 预变性 30 s,95℃ 变性 5 s,60℃ 复性 34 s,共 40 个循环。相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算,应用 SPSS 软件进行数据差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PsCCoAOMT* 基因的分离与序列分析

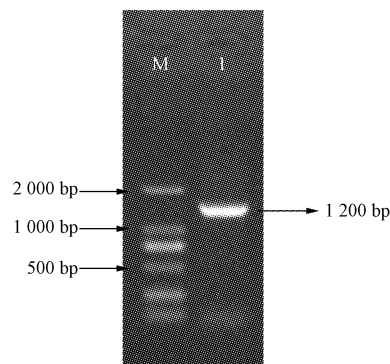
采用稀释池 PCR 法简并引物 CCoAOMTF 和 CCoAOMTR 从含棕果实不同发育时期的均一化文库中分离阳性克隆,对该阳性克隆用全长通用引物 M13R 和 M13F 鉴定,片段大小在 1 200 bp 左右(图 1),命名为 *PsCCoAOMT*。

*PsCCoAOMT* 去载体后全长 cDNA 为 1 195 bp,其中 5'UTR 为 284 bp,3'UTR 为 167 bp,ORF 为 744 bp,含有一个起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA,编码 247 个氨基酸序,具有明显的 poly A 尾巴,属于甲硫氨酸甲基转移酶超家族(图 2)。ProParam 在线分析预

提 RNA 样品溶于适量 RNase-free H<sub>2</sub>O,取一定量总 RNA 测定含量,取 1 μL 电泳检测其完整性,采用郑鸿昌<sup>[17]</sup>构建文库的方法构建含有棕不同发育时期的均一化文库。

### 1.2.2 棕果实 *PsCCoAOMT* 和 *PsLAR* 基因的筛选

根据 NCBI-BLAST 软件与 DNAMAN 软件对蔷薇科植物 CCoAOMT 和 LAR 基因的同源性进行比较,设计保守区引物(表 1),采用稀释池 PCR 法对文库逐步稀释,筛选阳性单克隆。将分离到的阳性菌液用全长通用引物 M13F 和 M13R 进行 PCR 验证,检测插入片段长度,并送交上海博尚生物技术有限公司进行测序。将所得序列通过在线 NCBI 的 Blast 功能进行氨基酸序列同源性比较,通过在线软件 Protparam、SOPMA 等对该序列进行生物信息学分析。



注:M;Marker DL 2 000;1:*PsCCoAOMT* 全长引物扩增。

Note:M;Marker DL 2 000;1:Amplification product of full length of *PsCCoAOMT*.

图 1 棕 *PsCCoAOMT* cDNA 阳性克隆 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Amplification product of positive clone containing *PsCCoAOMT* cDNA

测其相对分子量为 27 893.8,等电点为 5.42,分子式为 C<sub>1245</sub> H<sub>1966</sub> N<sub>338</sub> O<sub>371</sub> S<sub>9</sub>,脂溶指数为 96.36,不稳定指数为 35.64,属于稳定蛋白,总平均疏水指数(GRAVY)为-0.324,亲水性蛋白。SOPMA 预测其蛋白质二级结构,α螺旋占总氨基酸的 41.30%,延伸链占 19.03%,β转角占 8.91%,无规则卷曲占 30.77%。SignalP 4.1 Server-prediction results 预测结果显示不含信号肽,无分泌蛋白。经 ProtComp Version 9.0 预测,*PsCCoAOMT*

```

1      CATTACGGCCTAGTACGGGGGACACCTCCAAGGCACAAGTCTGATTTCGTTTGAGGTTCC
61     AAAACTCACACAGCCCTCTCAGGACAGTTTCACCAACCCCGGACCGGATTGGTGGTCGG
121    TTCAACCAACCATCCGGTTCGAACCGGATACTTCATTCCATATATACCTTGTCTTTCTCT
181    CTTTCTAAATTCAGGTTTCATCTGCCTGTATCCATTTAATCATTTTAAGCCAAGAAAACTG
241    CATAAATCCAGGGCCATCAAAGCAACAGAAAAACAAAGCTAGCAATGGCAACCAATGGAG
1      M      A      T      N      G
301    AAAACCAGCAAAACCAGGCAGGGAGGCACCAAGAGGTTGGCCACAAGAGCCTCCTTCAAA
6      E      N      Q      Q      N      Q      A      G      R      H      Q      E      V      G      H      K      S      L      L      Q
361    GTGATGCACTTTACCAGTATATATTGGAGACAAGTGTGTACCCAAGAGAGCCTGAATCCA
26     S      D      A      L      Y      Q      Y      I      L      E      T      S      V      Y      P      R      E      P      E      S
421    TGAAGGAGCTCAGAGAAGTGACTGCAAAGCACCCATGGAACATCATGACCACATCAGCTG
46     M      K      E      L      R      E      V      T      A      K      H      P      W      N      I      M      T      T      S      A
481    ATGAAGGCCAGTTCTTGAACATGCTTCTCAAGCTCATCAATGCCAAGAACACCATGGAGA
66     D      E      G      Q      F      L      N      M      L      L      K      L      I      N      A      K      N      T      M      E
541    TTGGGGTCTTCACTGGGTACTCCCTCCTTGCCACAGCCCTTGCCATTCTGTATGATGGAA
86     I      G      V      F      T      G      Y      S      L      L      A      T      A      L      A      I      P      D      D      G
601    AGATCTTGGCCATGGACATAAACAGGGAAACTATGATTTGGGTCGTCCAATTATAGAAA
106    K      I      L      A      M      D      I      N      R      E      N      Y      D      L      G      R      P      I      I      E
661    AAGCCGGCGTTGCCACAAGATTGACTTCAGAGAAGGCCCTGCACTCCCAGTTCTCGACC
126    K      A      G      V      A      H      K      I      D      F      R      E      G      P      A      L      P      V      L      D
721    AACTGGTCGAAGATGAGAAGAATCATGGATCATATGATTTTCATCTTCGTGGACGCAGACA
146    Q      L      V      E      D      E      K      N      H      G      S      Y      D      F      I      F      V      D      A      D
781    AGGACAACACTACATCAACTACCACAAGAGGCTAATTGATCTGGTGAAGGTTGGGGGTTTGA
166    K      D      N      Y      I      N      Y      H      K      R      L      I      D      L      V      K      V      G      G      L
841    TCGGCTACGACAACACCCTATGGAATGGCTCCGTGGTCGCGCCCCCTGATGCCCGCTCC
186    I      G      Y      D      N      T      L      W      N      G      S      V      V      A      P      P      D      A      P      L
901    GCAAGTACGTTAGGTACTACAGGGACTTCGTGCTGGAGCTCAACAAGGCTCTCGCTGCTG
206    R      K      Y      V      R      Y      Y      R      D      F      V      L      E      L      N      K      A      L      A      A
961    ACCCCAGAATTGAGATCTGTATGCTTCCAGTTGGCGATGGCATCACTCTCTGCCGTCGGA
226    D      P      R      I      E      I      C      M      L      P      V      G      D      G      I      T      L      C      R      R
1021   TCAAAATGAGCCCAACCCAATTGACCTTATCACATTTCTTGTATGAAGCAAAGCAAAATGGG
246    I      K
1081   TGTTTCTTTTCTTTGTCTTTATTCTCTGTGTTTGTATTTGGATTAAAGGCAAAATCC
1141   CATATTAATAATGTGCTGATTAATAATTGATGCCATAATTATAATAAACCAAAAAA

```

注:黑框标注的是起始密码子和终止密码子;下划线所标注的是 poly A。下同。

Note: The black box indicated start codon and termination codon; the underline was marked by poly A. The same below.

图2 棕果实 *PsCCoAOMT* 全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Full length cDNA sequence of *PsCCoAOMT* and its deduced amino acid sequence of Nai's fruit

蛋白分布在细胞质、溶酶体、线粒体基质和内质网中。经 TMHMM 2.0 和 TMpred 检测, *PsCCoAOMT* 蛋白无跨膜结构。

为比较棕果实 *CCoAOMT* 基因序列所推导的氨基酸序列与其它物种间序列同源性的关系, 该研究从 NCBI 数据库中下载了白桦 (*Betula platyphylla*,

AAW55668)、龙眼 (*Dimocarpus longan*, AEK52482.1)、枇杷 (*Eriobotrya japonica*, AFZ76980.1)、毛白杨 (*Populus tomentosa*, ACE95173.1) 以及白梨 (*Pyrus × bretschneideri*, AFU54611) 的 *CCoAOMT* 基因的氨基酸序列(图3)。BLAST 比对结果, 棕 *PsCCoAOMT* 的氨基酸序列与白梨相似性达 96%, 物种间的 *CCoAOMT* 基因同源

<i>Betula platyphylla</i>	MAANGEDNQNVSRHQEVGHKSLLQSDLYQYILETSVYPKEPEPMKELREVTAKHPWNIMT	62
<i>Populus tomentosa</i>	MAANGEDNQNVSRHQEVGHKSLLQSDLYQYILETSVYPKEPEPMKELREVTAKHPWNIMT	62
<i>Dimocarpus longan</i>	MAANGEDNQNVSRHQEVGHKSLLQSDLYQYILETSVYPTEPEPMKELREVTAKHPWNIMT	62
<i>Eriobotrya japonica</i>	MAANGEDNQNVSRHQEVGHKSLLQSDLYQYILETSVYPKEPEPMKELREVTAKHPWNIMT	62
<i>Pyrus × bretschneideri</i>	MAANGEDNQNVSRHQEVGHKSLLQSDLYQYILETSVYPKEPEPMKELREVTAKHPWNIMT	62
<i>PsCCoAOMT</i>	MAANGEDNQNVSRHQEVGHKSLLQSDLYQYILETSVYPKEPEPMKELREVTAKHPWNIMT	62
<i>Betula platyphylla</i>	TSADGGQFLMLLKLINAKNTMEIGVTGYSLLATALAPDDGKILAMDINRENYLGLPVI	124
<i>Populus tomentosa</i>	TSADGGQFLMLLKLINAKNTMEIGVTGYSLLATALAPDDGKILAMDINRENYLGLPVI	124
<i>Dimocarpus longan</i>	TSADGGQFLMLLKLINAKNTMEIGVTGYSLLATALAPDDGKILAMDINRENYLGLPVI	124
<i>Eriobotrya japonica</i>	TSADGGQFLMLLKLINAKNTMEIGVTGYSLLATALAPDDGKILAMDINKENYLGLPVI	124
<i>Pyrus × bretschneideri</i>	TSADGGQFLMLLKLINAKNTMEIGVTGYSLLATALAPDDGKILAMDINKENYLGLPVI	124
<i>PsCCoAOMT</i>	TSADGGQFLMLLKLINAKNTMEIGVTGYSLLATALAPDDGKILAMDINRENYLGLPVI	124
<i>Betula platyphylla</i>	KAGVAKIDFEGPAFLDQILDEK HGSYDIFVDADKDNYNHKLRLDLVKVGGVI	186
<i>Populus tomentosa</i>	KAGVAKIDFEGPAFLDQILDEK HGSYDIFVDADKDNYNHKLRLDLVKVGGVI	186
<i>Dimocarpus longan</i>	KAGVAKIDFEGPAFLDQILDEK HGSYDIFVDADKDNYNHKLRLDLVKVGGVI	186
<i>Eriobotrya japonica</i>	KAGVAKIDFEGPAFLDQILDEK HGSYDIFVDADKDNYNHKLRLDLVKVGGVI	186
<i>Pyrus × bretschneideri</i>	KAGVAKIDFEGPAFLDQILDEK HGSYDIFVDADKDNYNHKLRLDLVKVGGVI	186
<i>PsCCoAOMT</i>	KAGVAKIDFEGPAFLDQILDEK HGSYDIFVDADKDNYNHKLRLDLVKVGGVI	186
<i>Betula platyphylla</i>	GVDNTLWNGSVVAPADAPRKYYVRYRDFVLELNALADPREICMLPVGDGTLCRRI	246
<i>Populus tomentosa</i>	GVDNTLWNGSVVAPADAPRKYYVRYRDFVLELNALADPREICMLPVGDGTLCRRI	246
<i>Dimocarpus longan</i>	GVDNTLWNGSVVAPADAPRKYYVRYRDFVLELNALADPREICMLPVGDGTLCRRI	246
<i>Eriobotrya japonica</i>	GVDNTLWNGSVVAPADAPRKYYVRYRDFVLELNALADPREICMLPVGDGTLCRRI	246
<i>Pyrus × bretschneideri</i>	GVDNTLWNGSVVAPADAPRKYYVRYRDFVLELNALADPREICMLPVGDGTLCRRI	246
<i>PsCCoAOMT</i>	GVDNTLWNGSVVAPADAPRKYYVRYRDFVLELNALADPREICMLPVGDGTLCRRI	246

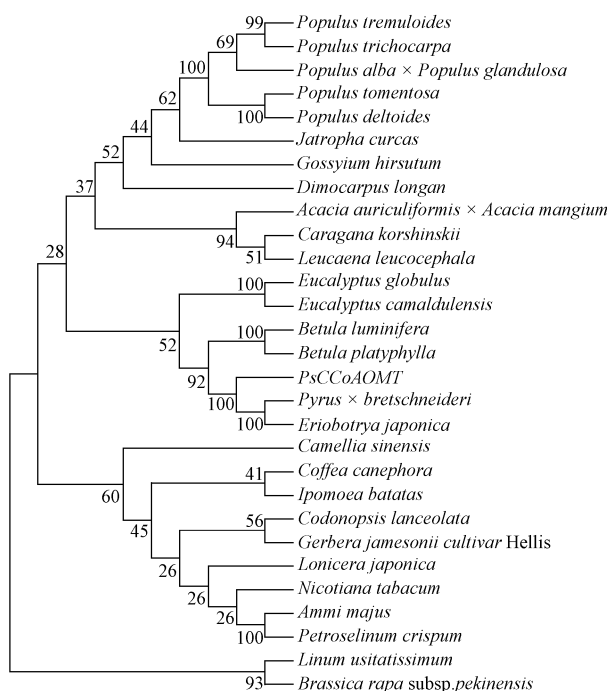
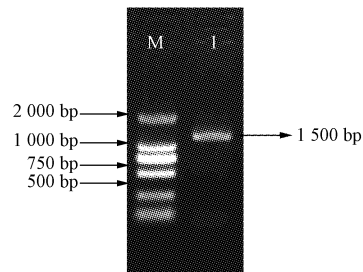
图3 棕果实 *PsCCoAOMT* 与其它植物 CCoAOMT 氨基酸序列同源性比对分析Fig. 3 Homology alignment of deduced amino acid sequences of *PsCCoAOMT* and that of other rosaceae fruit trees图4 棕 *PsCCoAOMT* 与其它高等植物 CCoAOMT 蛋白氨基酸序列的系统树

Fig. 4 Phylogenetic relationships of amino acid sequence of CCoAOMT protein between Nai and other higher plants

性较高。系统进化分析结果表明,其与蔷薇科属于同簇,与蔷薇科的李属亲缘性最近(图4)。

## 2.2 *PsLAR* 基因的筛选与序列分析

采用稀释池 PCR 法用简并引物 LARF 和 LARR 从含棕果实不同发育时期的均一化文库中分离阳性克隆,对该阳性克隆用全长通用引物 M13R 和 M13F 鉴定,片段大小在 1 500 bp 左右(图5),命名为 *PsLAR*。



注:M;Marker DL 2 000;1:*PsLAR* 全长 cDNA 扩增。

Note:M;Marker DL 2 000;1:Amplification product of full length of *PsLAR* cDNA.

图5 棕果 *PsLAR* 阳性克隆 PCR 扩增电泳图Fig. 5 PCR amplification product of positive clone containing *PsLAR* cDNA



棕果实 *PsLAR* 全长 1 625 bp, ORF 为 1 050 bp, 其中 5'UTR 为 150 bp, 3'UTR 为 425 bp, 编码 349 个氨基酸, 含有起始密码子(ATG)、终止密码子(TGA)和 poly A 尾巴, 属于 NADB\_Rossmann 超家族(图 6)。通过 ProParam 在线分析预测其相对分子量为 38 483.1, 等电点为 5.40, 分子式为  $C_{1727}H_{2741}N_{457}O_{514}S_{11}$ , 脂溶指数为 95.24, 不稳定系数为 27.64, 属于稳定蛋白, 总平均疏水

指数(GRAVY)为-0.071, 亲水性蛋白。SOPMA 预测其蛋白质二级结构,  $\alpha$  螺旋占总氨基酸的 38.11%, 延伸链占 18.91%,  $\beta$  转角占 7.16%, 无规则卷曲占 35.82%。SignalP 4.1 Server-prediction results 预测结果显示不含信号肽, 无分泌蛋白。经 ProtComp Version 9.0 预测, *PsLAR* 蛋白分布在线粒体中。经 TMHMM 2.0 和 TMpred 检测, *PsLAR* 蛋白无跨膜结构。

```

1 TAGTTACGGGGGACCCAAATCGTGCCAGGCTTTAATAAGCCAAATATCAATCAAAGGCC
61 CTCCATTTCAAGTTACTTGGGAAAAAGACTTAAATTTGAAAACAAATAACAAAAGGGTC
121 AAGGGCTATAGGAGCAGCCAGCCGCCAGTCATGACCGTGTCACTTGTGTTTCTGCAGCC
1 M T V S T C V S A A
181 AAGAATGGCAGAATCTTCATTGTTGGTGCTGCTGGTTTCATCGGGAGGTTTGTGGCTGAA
11 K N G R I F I V G A A G F I G R F V A E
241 GCTAGCCTTGATGCTGGCCAAACCCACCTATGTTCTGGTCCGGCCAGGCCCTCTTGACCCA
31 A S L D A G Q P T Y V L V R P G P L D P
301 TCTAAGGCTGACATCATCAAAGGCCTCAAAGACAGAGCGCTATAATCATACATGGGGAG
51 S K A D I I K G L K D R G A I I I H G E
361 ATTTCTGATAAGGCACTGATGGAGAACTGCTAAGAGAGCATGAGATTGAGGTGTAATA
71 I S D K A L M E K L L R E H E I E V V I
421 TCAGCCGTGGGTGGTGAACAATATTGGACCAGATCACCTGGTTGAGGCCATTCAAGCT
91 S A V G G A T I L D Q I T L V E A I Q A
481 GTTGGCACAATTAAGAGGTTTTGCGGTCCGAGTTTGGGCACGATGTGGACAGGGCTGAT
111 V G T I K R F L P S E F G H D V D R A D
541 CCGGTGGAACCGAGGCTCACCATGTACTTGGAGAAGCGCCAGGTGAGCGGTTTTGTGAG
131 P V E P G L T M Y L E K R Q V R R F V E
601 AAATCTGGGGTGCCCTACACCTACATTGCTGCAATTCATTGCTTCTTGGCCCTACTTC
151 K S G V P Y T Y I C C N S I A S W P Y F
661 GACAACAAGCATCCTTCTGAGGTTCTTCCACCGTTGGATCAGTTCCAAATCTACGGTGAT
171 D N K H P S E V L P P L D Q F Q I Y G D
721 GGCAGCGTTAAAGCCTACTTTATAGACGGCACTGATATTGGAAGTTTCAATGAAAACG
191 G S V K A Y F I D G T D I G K F T M K T
781 GTGGACGACATCCGAACCATCAACAAAAATGTTCAATTTTCGACCCCTGCCAATATATCC
211 V D D I R T I N K N V H F R P P A N I S
841 GACATGAATGGTCTGGCATCTCTGTGGGAGAAGAAAATTGGCCGACCCCTCCAGAGTT
231 D M N G L A S L W E K K I G R T L P R V
901 ACCATCACTGAAGATGACCTACTAAACATTGCTGCAGAGAACCGCATACCGGAAAGTATA
251 T I T E D D L L N I A A E N R I P E S I
961 GTGGCCTCATTCACTCACGATATCTTTATCAAAGTTGCCAGGTCAATTTCCCCGTGGAG
271 V A S F T H D I F I K G C Q V N F P V E
1 021 GGCCTCACGATGTGGAGATTGGGACCCTCTACCCAGGAGAATCTTCCGGACCTTGGAT
291 G P H D V E I G T L Y P G E S F R T L D
1 081 GAGTGCTTTAATGACTTTCTTCTCAAACCTGGAAGAAAAGCTAGAGCTAGAGAAAAACAAA
311 E C F N D F L L K L E E K L E L E K N K
1 141 GTTCCACCAAACTACTGCAGTTGTTGAACCCAGGGCTGTCACTGCCACTTGTGCTTGA
331 V S T K T T A V V E P R A V T A T C A
1 201 TCTACCCATCAGACTCTCTGACAACCAAGACATATTCATCTGCTATTATTTTTTTACCG
1 261 TTGGTCTTATTTCTTCTCCCCCTCCCTCACCCACAAAAAATTGTCCAACAATTTGGGAG
1 321 TGAATATGTTAAATTAGCATTGAGGTTACCATGTTAATTTGATTGTTTGGTTTCTAGACA
1 381 AGGAACTGGATTTCTGCTGCAAAATTAAGTATCCAGTTTGTATGATTATTTGATAAT
1 441 TCAATGTAGTAGTATGTAGAGAGTGATATATCCCTCATGTATGATCTTCAAGTTCAACC
1 501 ATGCTTTTCACTGCAAGTTACCAATCTTTGTCTGTACTATCATCTTTATTTTACTCCAAT
1 561 AATAAGAAGGAAGGAAGAAATTGCCTATGGCATTTTTCAATTTGTACTAAAAA
1 621 AAAAA

```

图 6 棕果实 *PsLAR* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 6 Nucleotide sequence of *PsLAR* and its deduced amino acid sequence in Nai's fruit

将棕果实的 *PsLAR* 氨基酸序列通过 NCBI 中的 Blast 比对分析, *PsLAR* 与甜樱桃相似性很高, 达 92%。其与蔷薇科果树苹果(登录号 AAZ79364.1)、草莓(登录

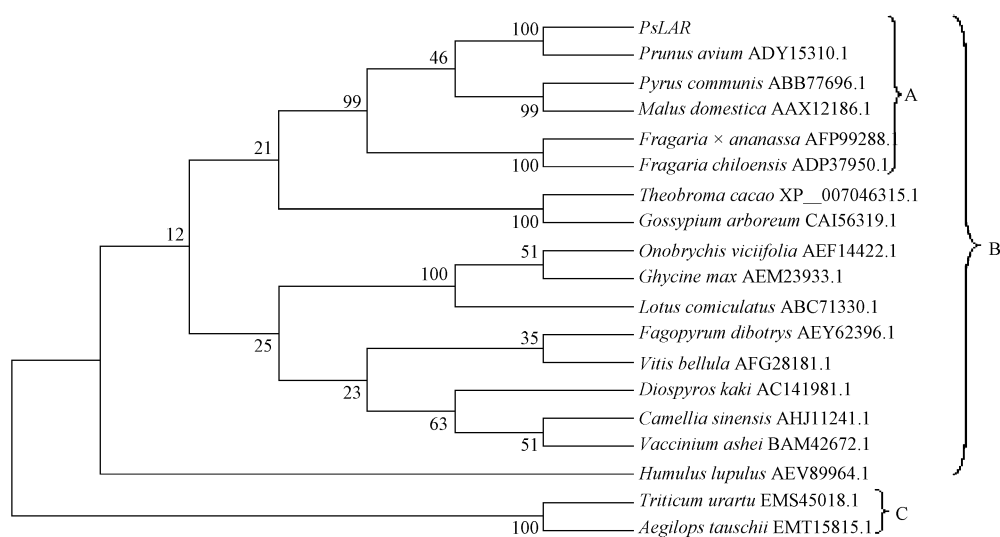
号 AFP99288.1)、甜樱桃(登录号 ADY15310.1)、西洋梨(登录号 ABB77696.1)的 *LAR* 基因具有很高同源性, 是一个高度保守的基因(图 7)。

<i>Fragaria × ananassa</i>	MTVSPSIAAASGFLVIGAGFIGFVAEASLDGLPTYVLRPGPSRPSKSDTKSL	60
<i>Malus domestica</i>	MTVSSSL.SVAK.GFV.IAGAGFIGFVAEASLAGPTYVLRPGPHPSK.DTVKSF	59
<i>Prunus avium</i>	MTVSTCV.SAAK.GFV.IAGAGFIGFVAEASLDGLPTYVLRPGPDPSK.DTKAL	59
<i>Pyrus communis</i>	MTVSSSL.SVAK.GFV.IAGAGFIGFVAEASLAGPTYVLRPGPHPSK.DTVKSF	59
<i>PsLAR</i>	MTVSTCV.SAAK.GFV.IAGAGFIGFVAEASLDGLPTYVLRPGPDPSK.DTKGL	59
<i>Fragaria × ananassa</i>	KDRGAILHQVSDKPLMEMLREHEIEIVISAVGGATILDQITLVEAITSVGTVKRFLP	120
<i>Malus domestica</i>	KDRGAILHQLSDKTLMEMLREHEIEIVISAVGGATILDQITLVDAIAVGTVKRFLP	119
<i>Prunus avium</i>	KDRGAILHQVSDKALMEMLREHEIEIVISAVGGATILDQITLVEAIAVGTDKRFLP	119
<i>Pyrus communis</i>	KDRGAILHQLSDKTLMEMLREHEIEIVISAVGGATILDQITLVDAIAVGTVKRFLP	119
<i>PsLAR</i>	KDRGAILHQVSDKALMEMLREHEIEIVISAVGGATILDQITLVEAIAVGTDKRFLP	119
<i>Fragaria × ananassa</i>	SEFGHDVCRADPVEPGLTMYLEKRVRRRE.SGVPYIYICCNISIASWPYDNKHPSEV	180
<i>Malus domestica</i>	SEFGHDVCRADPVEPGLTMYLEKRVRRSE.TSGVPYIYICCNISIASWPYDNTHPSEV	179
<i>Prunus avium</i>	SEFGHDVCRADPVEPGLTMYLEKRVRRRE.SGVPYIYICCNISIASWPYDNKHPSEV	179
<i>Pyrus communis</i>	SEFGHDVCRADPVEPGLTMYLEKRVRRSE.SGVPYIYICCNISIASWPYDNTHPSEV	179
<i>PsLAR</i>	SEFGHDVCRADPVEPGLTMYLEKRVRRRE.SGVPYIYICCNISIASWPYDNKHPSEV	179
<i>Fragaria × ananassa</i>	PPLDQFQIYGDGVKAYFDG.DIGKFT.KTV.DR.NKNVHFRPS.ND.NGLASLW	240
<i>Malus domestica</i>	PPLDRFQIYGDGVKAYFDG.DIGKFT.KTV.DR.NKNVHFRPS.ND.NGLASLW	239
<i>Prunus avium</i>	PPLDQFQIYGDGVKAYFDG.DIGKFT.KTV.DR.NKNVHFRPS.ND.NGLASLW	239
<i>Pyrus communis</i>	PPLDRFQIYGDGVKAYFDG.DIGKFT.KTV.DR.NKNVHFRPS.ND.NGLASLW	239
<i>PsLAR</i>	PPLDQFQIYGDGVKAYFDG.DIGKFT.KTV.DR.NKNVHFRPS.ND.NGLASLW	239
<i>Fragaria × ananassa</i>	PPLDRTLPRVTITENDLITMAA.NRIPESIVASFTHDIFIKGCQTNFPEGPNVDVIGT	300
<i>Malus domestica</i>	PPLDRTLPRVTITENDLITMAA.NRIPESIVASFTHDIFIKGCQVNFVEGPHDVVIGT	299
<i>Prunus avium</i>	PPLDYRTLPRVTITENDLITIAA.NRIPESIVASFTHDIFIKGCQINFVEGPHDVVIGT	299
<i>Pyrus communis</i>	PPLDRTLPRVTITENDLITMAA.NRIPESIVASFTHDIFIKGCQVNFVEGPNVDVIGT	299
<i>PsLAR</i>	PPLDRTLPRVTITENDLITIAA.NRIPESIVASFTHDIFIKGCQVNFVEGPHDVVIGT	299
<i>Fragaria × ananassa</i>	LYPDSFRTLDECFFFLKGGK.LETDKLAANKNTAAV.GVEPM.TATC	349
<i>Malus domestica</i>	LYPDSFRTLDECFFFLKDKK.LELQEEEDQVSTENTVES.TATC	353
<i>Prunus avium</i>	LYPDSFRTLDECFFFLKEDK.LEENKVSNTNA.VET.TATC	348
<i>Pyrus communis</i>	LYPDSFRTLDECFFFLKDKK.LELQEEEDQVSTESTVES.TATC	351
<i>PsLAR</i>	LYPDSFRTLDECFFFLKEEK.LEENKVSTTTA.VEP.TATC	348

图7 *PsLAR* 与蔷薇科其它果树 LAR 同源蛋白序列的多重比较

Fig. 7 Alignment of deduced amino acid sequences of *PsLAR* and that of other rosaceae fruit trees

从 GenBank 中挑选 19 种植物的 LAR 基因全长 cDNA 所编码的氨基酸序列,应用 Clustalx 1.83 和 MEGA 5.0 软件,用邻位相连法(neighbor-joining)构建系统发生树(图8)。进化树中,*PsLAR* 蛋白属于双子叶植物类,



注:A:蔷薇科;B:双子叶植物;C:单子叶植物。

Note: A: Rosaceae; B: Dicotyledon; C: Monocotyledon.

图8 棕 *PsLAR* 与其它高等植物 LAR 蛋白氨基酸序列的系统树

Fig. 8 Phylogenetic relationships of amino acid sequence of LAR protein between Nai and other higher plants

与蔷薇科植物亲缘关系最近,其中与甜樱桃 *LAR* 蛋白属于同簇。

### 2.3 *PsCCoAOMT* 和 *PsLAR* 基因在棕果实不同生长发育时期表达分析

以油棕果实 *tubulin* 基因作内参,通过实时荧光定量 PCR 技术对棕果实 5 个时期的 *PsCCoAOMT* 和

*PsLAR* 基因的表达进行分析,图 9 表明,*PsLAR* 基因在花后 25 d 相对表达量最高,随后呈现明显的下调趋势,在花后 125 d 几乎不表达;*PsCCoAOMT* 基因在棕整个生长发育过程中表达量差异不明显,在花后 25 d 表达最高,花后 50 d 表达最低。

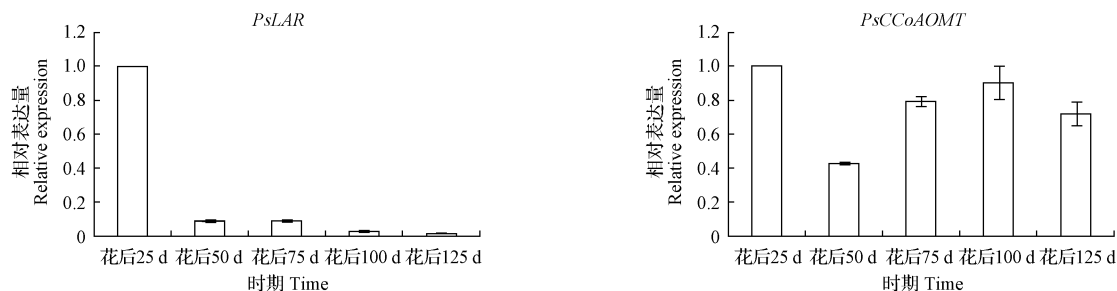


图 9 棕果实不同生长发育时期 *PsCCoAOMT* 和 *PsLAR* 基因表达分析

Fig. 9 Express analysis of *PsCCoAOMT* and *PsLAR* during different development stages from Nai fruit

### 3 讨论

多酚氧化酶与酚类物质结合打破了棕果实酚酶-酶的区域化分布,是造成棕果实褐变的主要原因。酚类物质是褐变的物质基础,大量前人研究表明,不同作物中的主要酚类物质不同<sup>[18-20]</sup>。姜翠翠<sup>[21]</sup>克隆了一些与棕果实褐变相关的基因,证明了棕果实的褐变是由多个基因共同调控的一个复杂过程,这些基因都参与了酚类物质的代谢过程。该研究通过基因库搜索和同源性比较,从含棕果实不同发育时期的均一化全长 cDNA 文库中分别分离出编码 *LAR* 和 *CCoAOMT* 这 2 条酚类代谢网络中的关键结构基因,分别命名为 *PsLAR* 和 *PsCCoAOMT*。

*CCoAOMT* 是木质素合成支路的一个关键酶,对 G 木质素合成特异调控<sup>[22]</sup>。抑制 *CCoAOMT* 表达,会使植物中木质素含量普遍降低,并伴随组分的改变<sup>[23]</sup>。研究表明, *PsCCoAOMT* 在棕整个发育过程中表达差异不明显,小果中表达量最低。*LAR* 处于下游单宁合成支路的关键酶,*LAR* 基因家族的不同成员在类黄酮合成代谢途径中可能扮演着不同的角色,并且具有时间和空间特异性,在不同发育时期起着不同的调控作用<sup>[24]</sup>。该研究中 *LAR* 的表达模式与 Wang 等<sup>[25]</sup>从日本柿子中分离的 *DkLAR* 基因的研究结果相符,表达量都是随着果实的不断成熟而逐渐降低。

该研究通过构建含棕果实不同发育时期的均一化 cDNA 文库,根据蔷薇科植物 *LAR* 和 *CCoAOMT* 基因的同源性比较,设计简并引物,筛选出的 *PsCCoAOMT* 和 *PsLAR* 的 cDNA 全长分别为 1 195 bp 和 1 625 bp,分别编码 247 和 349 个氨基酸。系统进化树分析结果表

明,*PsCCoAOMT* 和 *PsLAR* 都与蔷薇科植物属于同簇。该研究通过对棕 *LAR* 和 *CCoAOMT* 基因的生物信息学分析以及在不同发育时期表达动态的研究,从代谢网络的角度,深化棕果肉褐变机制的探讨,为棕果肉褐变的控制、抗褐变育种材料的筛选与抗褐变品种的选育提供理论依据和可行的技术支撑,具有重要的理论和实践价值。

### 参考文献

- [1] 邱栋梁,刘星辉. 棕果肉的褐变机理[J]. 福建农业大学学报,1998,27(1):37-41.
- [2] 孙芝杨,钱建亚. 果蔬酶促褐变机理及酶促褐变抑制研究进展[J]. 中国食物与营养,2007(3):22-24.
- [3] 孙蕾,王大明,乔勇进,等. 果实褐变机理及研究进展[J]. 经济林研究,2002,20(2):92-94.
- [4] Harboren J B, Wilkinson C A. Advances in flavonoid research since 1992[J]. Phytochem,2000,55(6):481-504.
- [5] Brenda W S. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology[J]. Plant Physiology, 2001, 126:485-493.
- [6] Tanner G J, Francki K T, Abrahams S, et al. Proanthocyanidin biosynthesis in plants: purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA[J]. Journal of Biology Chemistry, 2003, 278: 31647-31656.
- [7] Wang Y, Zhang Q L, Luo Z R. Isolation and expression of gene encoding leucoanthocyanidin reductase from *Diospyros kaki* during fruit development[J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(4):707-710.
- [8] Ferrer J L, Austin M B. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids[J]. Plant Physiol Biochem, 2008, 46(3):356-370.
- [9] 李雪平,高志民,彭镇华,等. 绿竹咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因的克隆与分析[J]. 分子植物育种,2008,6(3):587-592.
- [10] Pfeiffer J, Kuhnel C, Brandt J, et al. Biosynthesis of flavan-3-ols by

leucoanthocyanidin 4-reductases and anthocyanidin reductases in leaves of grape (*Vitis vinifera* L.), apple (*Malus domestica* Borkh.) and other crops [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2006, 44: 323-334.

[11] 马春雷, 乔小燕, 陈亮. 茶树无色花色素还原酶基因克隆及表达分析[J]. *茶叶科学*, 2010, 30(1): 27-36.

[12] Wang L J, Jiang Y Z, Li Y, et al. Isolation and characterization of cDNAs encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase from populus trichocarpa[J]. *Plos One*, 2013, 8: 1-10.

[13] Do C T, Pollet B, Thevenin 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(5): 1117-1129.

[14] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶 (*DL-CCoAOMT*) 基因的克隆和表达分析[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(1): 118-126.

[15] Zhao H Y, Sheng Q X, Lu S Y, et al. Characterization of three rice *CCoAOMT* genes [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(15): 1602-1606.

[16] 陈桂信. 棕多酚氧化酶基因及 5' 端调控序列的克隆 [D]. 福州: 福建农林大学, 2005.

[17] 郑鸿昌. 夜来香均一化全长 cDNA 文库的构建与花香相关基因的遗传转化 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.

传转化 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.

[18] 慈志娟, 陈学森, 张立杰, 等. 杏果实酶促褐变机理的研究初报 [J]. *山东农业科学*, 2006(6): 17-25.

[19] 印芳, 葛红, 彭克勤, 等. 酚类物质与蝴蝶兰褐变关系初探 [J]. *园艺学报*, 2006, 33(5): 1137-1140.

[20] 宋焯, 翟衡, 刘金豹, 等. 苹果加工品种果实中的酚类物质与褐变研究 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(11): 2563-2568.

[21] 姜翠翠. (棕) 均一化全长 cDNA 文库的构建及果实褐变相关基因的分离与表达分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.

[22] 李漪滨, 刘蕾, 何聪芬, 等. 木质素生物合成关键酶基因的研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2007, 5(6): 45-51.

[23] Li L, Popko J L, Umezawa T, et al. 5-Hydroxyconiferyl aldehyde modulates enzymatic methylation for syringyl monolignol formation, a new view of monolignol biosynthesis in angiosperms [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 6537-6545.

[24] 马婧, 王斌, 代银, 等. 金荞麦无色花色素还原酶基因 *FdLAR* 的克隆和表达分析 [J]. *药学报*, 2012, 47(7): 953-961.

[25] Wang Y, Zhang Q L, Luo Z R. Isolation and expression of gene encoding leucoanthocyanidin reductase from *Diospyros kaki* during fruit development [J]. *Biol Plant*, 2010, 54: 707-710.

## Screening and Expression of *CCoAOMT* and *LAR* Genes from Nai's Fruit

CHEN Gui-xin<sup>1,2</sup>, WANG Yu-zhen<sup>1,2</sup>, ZHAO Li<sup>1,2</sup>, JIANG Cui-cui<sup>3</sup>, LYU Shi-heng<sup>1</sup>, PAN Dong-ming<sup>1,2</sup>

(1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Institute of Storage Science and Technology of Horticultural Products, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 3. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013)

**Abstract:** Dynamic changes of expression of *PsCCoAOMT* and *PsLAR* genes at different development stages in Nai's fruits were explored, a normalized full-length cDNA library was constructed with Nai's fruits at different developmental stages as research materials by combination of two-step reverse transcription and suppressive PCR. Full-length cDNAs of *PsCCoAOMT* and *PsLAR* encoding key enzymes in metabolic pathway of phenolics in Nai's fruit were screened by dilute-pool PCR method. The results showed that the full length cDNAs of *PsCCoAOMT* and *PsLAR* genes were 1 195 bp with 744 bp of ORF encoding 247 amino acids and 1 625 bp with 1 050 bp of ORF encoding 349 amino acids, respectively. The protein encoded by *PsCCoAOMT* was a stable hydrophilic protein whose relative molecular weight of molecular weight was 27 893.8 and pI was 5.42; the protein encoded by *PsLAR* was an unstable hydrophilic protein whose relative molecular weight of molecular weight was 38 483.1 and pI was 5.40. Homologous analysis showed that the homology of *PsCCoAOMT* compared with that of *Pyrus x bretschneideri* was the highest by 96%, the *PsLARs* were highly homologous in Rosaceous plants. The results of Real-time PCR showed that the change of *PsCCoAOMT* was not obvious and tended to reduce overall in the whole process of development of fruit and reached to minimum after 50 days of anthesis; that of *PsLAR* gradually reduced in the whole process of development of fruit, that of the gene reduced to zero after 125 days of anthesis.

**Keywords:** Nai (*Prunus salicina*); *PsCCoAOMT*; *PsLAR*; dilute-pool PCR; real-time PCR