

马铃薯多酚氧化酶基因家族生物信息学及表达分析

王丽^{1,2,3}, 王万兴^{4,5}, 索海翠^{2,3}, 胡新喜¹, 秦玉芝¹, 李小波^{2,3*}, 熊兴耀^{1,4,5*}

(1.湖南农业大学园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2.广东省农业科学院作物研究所, 广东 广州 510640; 3.广东省农作物遗传改良重点实验室, 广东 广州 510640; 4.中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 5.农业部薯类作物生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081)

摘要:通过搜索马铃薯全基因组, 获得马铃薯多酚氧化酶(PPO)基因家族序列, 并对其进行生物信息学及表达分析。结果显示: 共获得 12 个马铃薯 PPO 基因, 即 *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO3*、...、*StuPPO12*; 除 *StuPPO9* 位于 2 号染色体外, 其余 11 个基因串联于 8 号染色体的 276 kb 范围内; 对具有 3 个典型结构域(Tyrosinase、PPO1_DWL、PPO1_KFDV)的基因蛋白序列进行进一步分析, 结果显示 *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO3*、*StuPPO4*、*StuPPO6* 蛋白序列相似性大于 80%, 且大部分 *StuPPO* 蛋白位于叶绿体; 启动子顺式作用元件分析显示, *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO3*、*StuPPO6*、*StuPPO8*、*StuPPO9* 具有 MeJA 响应元件, *StuPPO1*、*StuPPO3*、*StuPPO4*、*StuPPO6*、*StuPPO7*、*StuPPO8*、*StuPPO9* 具有 ABA 响应元件, *StuPPO2*、*StuPPO4*、*StuPPO8*、*StuPPO9* 具有 IAA 响应元件; 少数 PPO 基因具有对 SA、GA 及低温等胁迫响应相关元件; 基因表达分析结果表明, 不同的 PPO 基因其表达模式有较大的差异, *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO3* 在马铃薯块茎、根、匍匐茎、茎、叶柄、顶部幼叶、中部叶片、底部老叶组织中均有表达, *StuPPO4* 仅在块茎、根、匍匐茎、茎中表达, 而 *StuPPO6*、*StuPPO7*、*StuPPO8*、*StuPPO9* 在 8 个部位都没有检测到表达。此外, 同一基因在不同组织中的表达也有着较大的差异。

关键词: 马铃薯; PPO 基因家族; 生物信息学; 基因表达

中图分类号: S532; Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2019)06-0601-10

Bioinformatics and expression analysis of polyphenol oxidase gene family in potato

WANG Li^{1,2,3}, WANG Wanxing^{4,5}, SUO Haicui^{2,3}, HU Xinxi¹, QIN Yuzhi¹, LI Xiaobo^{2,3*}, XIONG Xingyao^{1,4,5*}

(1.College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 3.Provincial Key Laboratory of Crops Genetic Improvement, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 4.Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081, China; 5.Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Tuber Crops of the Ministry of Agriculture, Beijing, 100081, China)

Abstract: The sequences of the polyphenol oxidase(PPO) gene family were searched from potato genome and were subject to bioinformatics and expression analysis. The results showed that a total of 12 PPO genes, *StuPPO1*, *StuPPO2*, *StuPPO3*, ..., *StuPPO12* with exception of *StuPPO9* localized on chromosome 2, were sorted out and all of them located in the 276 kb range of chromosome 8. Further analysis of the PPO protein sequences with 3 typical structural domains (Tyrosinase, PPO1_DWL, PPO1_KFDV) showed that the similarity of *StuPPO1*, *StuPPO2*, *StuPPO3*, *StuPPO4* and *StuPPO6* protein sequences was more than 80%, and most of the *StuPPO* proteins are in chloroplasts. The analysis of

收稿日期: 2019-07-22

修回日期: 2019-09-09

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201503001); 广东省省级科技计划项目(2017A020208033, 2017B020201005, 2017B020232002); 广东省自然科学基金项目(2018A030313336); 2017 年省级农业发展和农村工作专项(粤财农[2017]88 号); 中国农业科学院科技创新项目(CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 作物种质创新与资源利用重点实验室(省部共建国家重点实验室培育基地)科学基金开放项目(18KFXM03)

作者简介: 王丽(1985—), 女, 山西大同人, 博士研究生, 主要从事马铃薯分子育种研究, wangli@gdaas.cn; *通信作者, 李小波, 硕士, 副研究员, 主要从事马铃薯栽培育种研究, lixiaobo1981@163.com; *通信作者, 熊兴耀, 博士, 教授, 主要从事马铃薯栽培育种研究, xiongxingyao@caas.cn

cis-acting elements of the promoters showed that *StuPPO1*, *StuPPO2*, *StuPPO3*, *StuPPO6*, *StuPPO8* and *StuPPO9* have elements responsive to MeJA; *StuPPO1*, *StuPPO3*, *StuPPO4*, *StuPPO6*, *StuPPO7*, *StuPPO8*, *StuPPO9* have element responsive to ABA; *StuPPO2*, *StuPPO4*, *StuPPO8*, *StuPPO9* have elements responsive to IAA; A few PPO genes have elements responsive to SA, GA and low temperature. The results of gene expression analysis showed that the expression patterns of different PPO genes of potato were significantly different. *StuPPO1*, *StuPPO2* and *StuPPO3* were expressed in the tissues of potato tuber, root, stolon, stem, petiole, young leaves, middle leaves and old leaves; *StuPPO4* is only expressed in the tissues of tuber, root, stolon and stem; *StuPPO6*, *StuPPO7*, *StuPPO8* and *StuPPO9* were not expressed in any tissues tested. In addition, the expression of the same gene varied greatly in different tissues of potato.

Keywords: potato; PPO gene family; bioinformatic; gene expression

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)是自然界中分布广泛的一种金属蛋白酶,也是果蔬发生酶促褐变的关键酶。PPO 引起的酶促褐变可造成果蔬等农产品外观及营养品质下降,给果蔬生产加工造成损失;因此,受到广泛关注。PPO 除了引起酶促褐变的发生外,也常被认为是一种植物防御蛋白,当植物受到外界生物或非生物胁迫时,其基因表达上调^[1-4],特别在损伤胁迫和有氧气存在的条件下,PPO 可以通过催化酚类化合物的氧化来促进伤口愈合,从而阻止病原菌通过伤口对有机体的侵染,防止植物组织发生腐烂变质^[4]。

研究表明,PPO 主要位于各种质体(如叶绿体、造粉体、白色体等)中,而酚类化合物主要位于液泡^[5]。植物组织受损会导致细胞发生破裂,使得 PPO 与酚类化合物接触,从而发生氧化还原反应,产生有色物质并沉积在损伤组织表面,即发生酶促褐变。在植物有机体中,PPO 基因由核基因编码,且大多以多基因家族的形式存在^[6],例如,草莓中有 4 个 PPO 基因,番茄中有 7 个,杨树中多达 15 个^[6-9]。PPO 蛋白结构序列具有一定的保守性,典型的 PPO 基因具有 1 个 Tyrosinase 结构域,包含 2 个铜离子活性中心(CuA 和 CuB),每个铜离子活性中心由 1 个铜离子和 3 个组氨酸残基(His)组成^[10]。通常 PPO 蛋白的 N-末端包含 1 个转运肽,负责将 PPO 转运至叶绿体类囊体膜;而 C-末端的保守结构域(PPO1_DWL、PPO1_KFDV)在其转运至质体过程中被水解,从而激活其活性^[11]。PPO 基因序列具有一定的保守型,在近源植物中相似性更高^[12]。PPO 基因具有其特定的表达模式和组织特异性,如在马铃薯已经克隆的 5 个 PPO 基因中,*POT32*、*POT33*、*POT72* 主要在块茎中表达,而 *POTP1* 和 *POTP2* 主要在叶片和花中表达^[13-14],其表达模式的不同预示着基因功能可能存在差异。

马铃薯是世界第四大粮食作物,具有产量高、营养全面等特点^[15]。中国是马铃薯第一生产大国,种植面积和产量均居世界首位^[16]。2015 年,中国开始实施马铃薯“主食化”战略,马铃薯加工成为马铃薯主粮化战略实施的重要途径。然而,由于马铃薯极易发生酶促褐变,这在一定程度上阻碍了马铃薯加工业的发展。本研究中,对马铃薯 PPO 基因家族进行生物信息学和表达模式分析,旨在明确马铃薯 PPO 基因家族构成和表达特点,为下一步基因克隆和功能分析提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为四倍体马铃薯栽培品种‘中薯 3 号’。于 2017 年 1 月种植于营养土,生长 3 个月后,用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 MeJA 喷施叶片。12 h 后,分别取块茎、根、匍匐茎、茎、叶柄、上部幼叶、中部叶片、下部老叶共 8 个部位的组织,迅速放入液氮中, -80°C 保存,备用。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯、茄子、番茄、苹果 PPO 蛋白序列获得

在马铃薯基因组数据库 Spud DB potato Genomic Resource(<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)中搜索 PPO 基因并下载 DNA 和蛋白序列,用 DNA 序列在 NCBI 进行搜索,序列相似性大于 97%被认为是同一基因;从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得茄子的 PPO 蛋白序列^[17],从 Phytozome 数据库(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>)获得番茄、苹果的 PPO 基因蛋白序列。

1. 2. 2 马铃薯 PPO 基因生物信息学分析

在数据库 Phytozome(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中查找基因位置及内含子个数；使用 MultAlin(<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)进行序列比对；运用 Simple Modular Architecture Research Tool(SMART, <http://smart.emblheidelberg.de/>)对得到的序列进行基因结构分析；运用 LALIGN(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/lalign/>)进行蛋白序列相似性分析；运用 Target P 1.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)进行亚细胞位置预测；通过 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测与分析马铃薯 PPO 基因家族的蛋白质理化性质，得到蛋白质的分子式、相对分子量、等电点、不稳定性系数、平均亲水性等数据；从 Phytozome 数据库获得基因启动子序列(转录起始位点上游 2 kb)，运用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析启动子顺式作用元件。

1. 2. 3 进化树分析

利用 ClustalW 对 StuPPO 氨基酸序列进行多重序列比对，并在 MEGA 7 软件中使用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建进化树^[18]，校验参数

Bootstrap 为重复 1 000 次。

1. 2. 4 总 RNA 的提取及第一条 cDNA 的合成

用液氮充分研磨样品。使用天根生化科技(北京)有限公司的 RNAprep Pure 多糖多酚 RNA 提取试剂盒提取样品的总 RNA。提取的总 RNA 在 NanoDrop UV 可见光分光光度计(Thermo Fisher Scientific)测定其浓度和质量，保留 RNA 的吸光值 A_{260}/A_{280} 介于 1.9 ~ 2.1 之间的样本。使用 1%琼脂糖凝胶电泳评估总 RNA 的完整性。取 1 μ g 总 RNA，用天根反转录试剂盒反转成 cDNA，-20 $^{\circ}$ C 保存，备用。

1. 2. 5 基因表达检测及定量 PCR 分析

以 cDNA 为模板，用普通 PCR Mix(天根生化科技有限公司，北京)分别对各个基因扩增，检测其在不同部位是否表达。扩增条件为：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，58 $^{\circ}$ C 退火 30 s，75 $^{\circ}$ C 延伸 12 s，40 个循环。扩增产物用 2%的琼脂糖凝胶检测扩增情况。定量 PCR 采用擎科 2 $\times$ T5 Fast qPCR Mix(SYBRGreenI)试剂盒进行。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因的相对表达量^[19]。每个样品 3 次重复。引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 The primers used in this study

基因名称	引物名称	引物序列 (5'-3')	扩增片段长度/bp	GC 含量/%	Tm 值
StuPPO1	T054_qPCR-F	TCCGTCCCAATTCTTCGGTG	93	55.00	60.00
	T054_qPCR-R	TGAACCGGGGTATGAGGGAT		55.00	60.00
StuPPO2	PPO41	ATATCGCGACTGTTGATTTC	133	42.86	56.51
	PPO42	GTCGCACCTTCAATGGAGATA		47.62	57.82
StuPPO3	T681_qPCR-F	GGGGTACGATTACGCACCAA	121	55.00	60.10
	T681_qPCR-R	CGCAAGTGGGAATACCTCGT		55.00	60.10
StuPPO4	T685_qPCR-F	CCAATGGAAATATTACCTTTCT	119	31.80	51.82
	T685_qPCR-R	CATACTGCAACTGCTACTCTCC		50.00	58.55
StuPPO6	T055-F	CTCCTGGTGGTCCAGCAGTT	124	60.00	59.60
	T055-R	AGATGAGCAGGGGAACGGA		57.90	60.00
StuPPO7	T703-F	TGTTTGGATACGAAGATGGGG	129	47.60	59.90
	T703-R	GAATACCTTGTTTGCTGGCTCA		45.50	59.70
StuPPO8	T679-F	CGGTGTAACCAACGAGCCA	122	57.90	59.90
	T679-R	GGAGTGGTGGACAACATGAAAA		45.50	59.70
StuPPO9	T781-F	ACTTTCCTCGGGGACCCCT	91	57.90	59.80
	T781-R	TCCAAACATGAACCGCACC		52.60	59.60
EF1 α	EF1 α -F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA	101	42.90	60.00
	EF1 α -R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA		52.40	64.00

2 结果与分析

2.1 马铃薯 PPO 基因家族鉴定及基本信息预测

通过对马铃薯全基因组搜索,共获得 12 个 PPO 基因。结合前人的研究^[20],笔者将 12 个 PPO 基因命名为 *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO3*、...、*StuPPO12*。从结果(表 2)来看,12 个 PPO 基因序列长度为 414 ~

2 531 bp,蛋白序列长度为 164 ~ 598 个氨基酸。除 *StuPPO7*、*StuPPO8*、*StuPPO9* 各具有 1 个内含子外,其余无内含子。另外,除 *StuPPO9* 位于第 2 号染色体外,其余均位于第 8 号染色体,且串联在 276 kb 范围内(图 1),表明马铃薯 PPO 基因家族是由于基因复制形成。

表 2 马铃薯 PPO 基因基本信息

Table 2 The information of PPO genes of potato					
基因 ID	基因名称	DNA 序列长度/bp	蛋白序列长度/aa	内含子数量	基因组位置
PGSC0003DMG400029575	<i>StuPPO1</i>	1 770	589	0	ch08:45630877..45632646
PGSC0003DMG400018916	<i>StuPPO2</i>	1 797	598	0	ch08:45873422..45875218
PGSC0003DMG400018914	<i>StuPPO3</i>	1 671	556	0	ch08:45888516..45890186
PGSC0003DMG400018917	<i>StuPPO4</i>	1 791	596	0	ch08:45869004..45870794
PGSC0003DMG400018919	<i>StuPPO5</i>	414	137	0	ch08:45793702..45794115
PGSC0003DMG400029576	<i>StuPPO6</i>	1 791	596	0	ch08:45676042..45677832
PGSC0003DMG400018924	<i>StuPPO7</i>	1 767	534	1	ch08:45778567..45780333
PGSC0003DMG400018913	<i>StuPPO8</i>	2 531	591	1	ch08:45904860..45907390
PGSC0003DMG400022430	<i>StuPPO9</i>	1 855	539	1	ch02:34338587..34340441
PGSC0003DMG400018923	<i>StuPPO10</i>	495	164	0	ch08:45806485..45806979
PGSC0003DMG400018918	<i>StuPPO11</i>	495	164	0	ch08:45807634..45808128
PGSC0003DMG400018925	<i>StuPPO12</i>	969	322	0	ch08:45841423..45842391

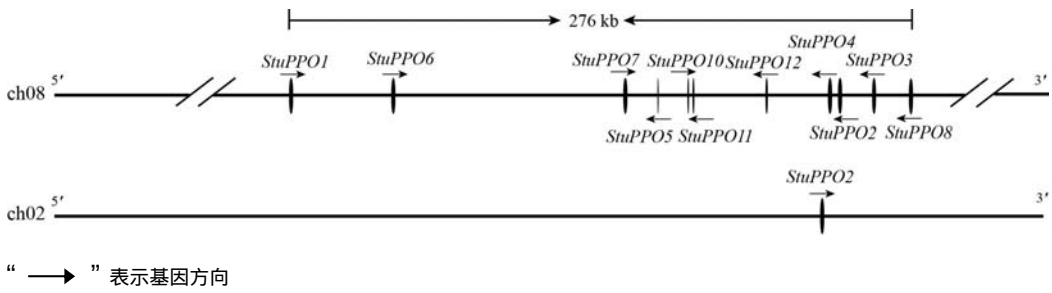


图 1 马铃薯 PPO 基因在染色体上的相对位置

Fig. 1 Relative location of PPO genes of potato on chromosome of potato

2.2 马铃薯 PPO 基因家族蛋白序列分析

在 12 个马铃薯 PPO 蛋白序列中,有 8 个蛋白序列具有 3 个典型结构域(Tyrosinase、PPO1_DWL、PPO1_KFDV), *StuPPO5*、*StuPPO12* 分别具有 1 个和 2 个典型结构域, *StuPPO10* 和 *StuPPO11* 不具有典型结构域(表 3),推测这些基因在复制过程中可能发生片段丢失,预示着其功能可能丧失。马铃薯 PPO 蛋白的 Tyrosinase 结构域长度为 95 ~ 215 个氨基酸。蛋白序列比对显示 *StuPPO5* 在 CuB 活性中心处缺失, *StuPPO7*、*StuPPO12* 在 CuA 活性中心处缺失(图 2)。活性中心的缺失暗示着其功能可能丧失。PPO1_DWL 结构域长度 51 ~ 52 个氨基酸; PPO1_KFDV 结构域长度为 131 ~ 136 个氨基酸(表 3)。此

表 3 马铃薯 PPO 蛋白序列保守结构域位置与序列长度

Table 3 The location and sequence length of amino acid of conserved domain of PPOs of potato

蛋白名称	Tyrosinase 结构域 (长度/aa)	PPO1_DWL 结构域 (长度/aa)	PPO1_KFDV 结构域 (长度/aa)
<i>StuPPO1</i>	171-378(208)	384-435(52)	455-586(132)
<i>StuPPO2</i>	172-385(214)	391-442(52)	463-595(133)
<i>StuPPO3</i>	131-344(214)	350-401(52)	421-553(133)
<i>StuPPO4</i>	172-385(214)	391-442(52)	463-593(131)
<i>StuPPO5</i>	36-130(95)	-	-
<i>StuPPO6</i>	170-384(215)	390-441(52)	461-593(133)
<i>StuPPO7</i>	148-324(177)	330-380(51)	400-531(132)
<i>StuPPO8</i>	165-374(210)	380-431(52)	451-586(136)
<i>StuPPO9</i>	105-313(209)	319-370(52)	405-537(133)
<i>StuPPO10</i>	-	-	-
<i>StuPPO11</i>	-	-	-
<i>StuPPO12</i>	57-231(175)	237-288(52)	-

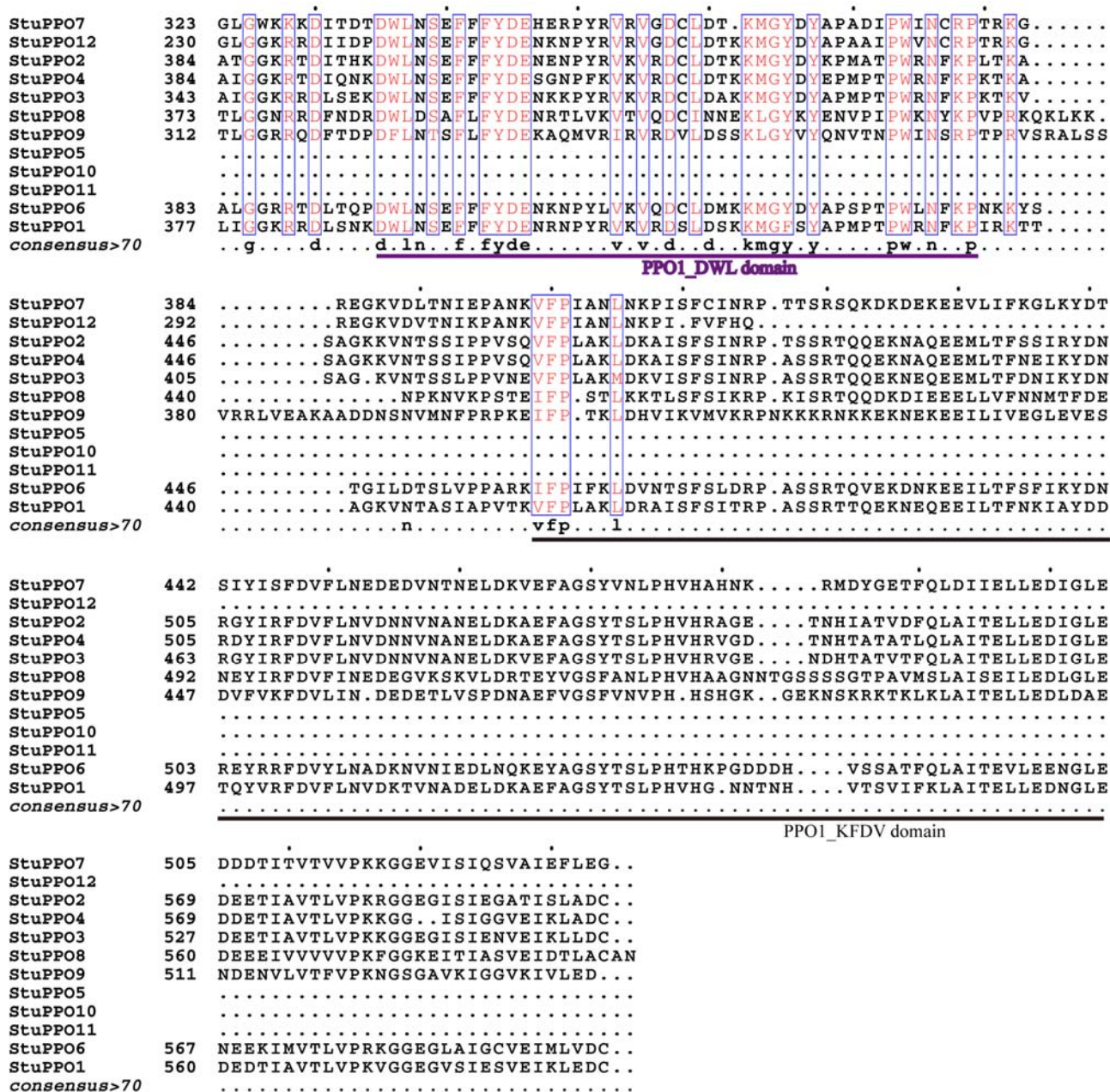
consensus>70

consensus>70

consensus>70

consensus>70

consensus>70



“*”示保守的组氨酸(His)残基；黄色方框为跨膜结构域。

图2 马铃薯 PPO 蛋白序列比对

Fig.2 Sequences alignment of the PPO proteins of potato

外, PPO 基因 N 端一般具有 1 个类囊体转移结构域(thylakoid transfer domain), 负责将成熟的 PPO 转移到叶绿体类囊体膜^[6]。在马铃薯 PPO 蛋白序列中, 除 StuPPO12 外, 其余蛋白均具有 1 个保守的类囊体转移结构域。StuPPO9 的 N 端还包含 1 个跨膜结构域(transmembrane domain)。

2.3 马铃薯 PPO 蛋白序列相似性及进化分析

基于以上分析, 推测具有结构域缺失的

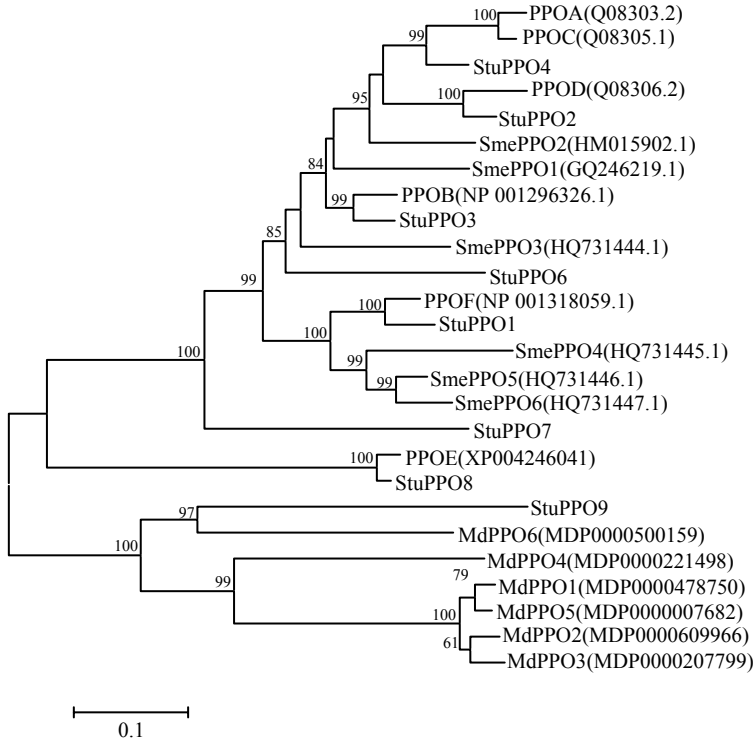
StuPPO5、StuPPO10、StuPPO11、StuPPO12 可能不具有活性功能; 因此, 在下一步的分析中只对其余 8 个 PPO 基因进行分析。对 8 个 StuPPO 蛋白序列相似性进行比对, 结果(表 4)显示, 马铃薯 PPO 蛋白序列相似性介于 66.3%~93.7%, 其中 StuPPO1、StuPPO2、StuPPO3、StuPPO4、StuPPO6 之间相似性高于 80%, StuPPO2、StuPPO3、StuPPO4 之间及 StuPPO3 与 StuPPO6 的序列相似性均高于 90%。

表 4 马铃薯 PPO 蛋白的序列相似性

蛋白名称	相似性/%							
	StuPPO1	StuPPO2	StuPPO3	StuPPO4	StuPPO6	StuPPO7	StuPPO8	StuPPO9
StuPPO1	—	86.9	88.4	86.6	84.2	70.5	77.8	70.4
StuPPO2		—	93.4	92.0	84.3	71.1	76.8	70.1
StuPPO3			—	93.7	90.1	73.9	76.8	69.7
StuPPO4				—	85.3	71.6	77.7	69.4
StuPPO6					—	69.8	73.0	68.3
StuPPO7						—	66.3	72.3
StuPPO8							—	74.5
StuPPO9								—

将马铃薯 PPO 蛋白序列与茄子、番茄、苹果的 PPO 蛋白序列进行进化树分析。结果所有 PPO 蛋白序列聚为 3 类(图 3)：MdPPO1、MdPPO2、MdPPO3、...、MdPPO6 与 StuPPO9 聚为一类，表明苹果 PPO 与 StuPPO9 进化关系较近，而与马铃薯其他 PPO 以及茄子、番茄 PPO 进化关系较远；

StuPPO8 和 PPOE 聚为一类 表明 StuPPO8 和 PPOE 进化关系较近；其余的 PPO 聚为一类，主要包括马铃薯、茄子、番茄的 PPO。以上结果表明，同科植物的 PPO 基因进化关系较近，而不同科之间的进化关系较远。



StuPPO1、StuPPO2、StuPPO3、...、StuPPO12 为马铃薯 PPO 蛋白；SmePPO1、SmePPO2、SmePPO3、...、SmePPO6 为茄子 PPO 蛋白；PPOA、PPOB、PPOC、PPOD、PPOE、PPOF 为番茄 PPO 蛋白；MdPPO1、MdPPO2、MdPPO3、MdPPO4、MdPPO5、MdPPO6 为苹果 PPO 蛋白。

图 3 马铃薯、番茄、茄子、苹果 PPO 基因进化分析

Fig.3 The genetic evolution of potato, tomato, eggplant, appple PPO genes

2.4 StuPPO 蛋白亚细胞位置预测

亚细胞位置预测结果(表 5)显示，除 StuPPO3、StuPPO9 外，其余 6 个 StuPPO 均具有 1 个叶绿体

转运肽，暗示着大部分的 StuPPO 均位于叶绿体，而 StuPPO3、StuPPO9 可能位于除叶绿体之外的其他位置，StuPPO9 还可能位于液泡或者线粒体。

表 5 马铃薯 PPO 蛋白亚细胞位置预测

Table 5 The prediction of subcellular of potato PPOs							
蛋白名称	叶绿体转运肽	线粒体转运肽	信号肽	其他	位置	可信度	叶绿体转运肽长度/aa
StuPPO1	0.939	0.076	0.008	0.102	C	1	48
StuPPO2	0.875	0.086	0.015	0.132	C	2	45
StuPPO3	0.150	0.130	0.076	0.872	—	2	5
StuPPO4	0.916	0.071	0.012	0.106	C	1	45
StuPPO6	0.961	0.074	0.015	0.089	C	1	45
StuPPO7	0.979	0.026	0.017	0.063	C	1	44
StuPPO8	0.757	0.038	0.076	0.306	C	3	33
StuPPO9	0.017	0.245	0.294	0.156	S	5	47

2.5 StuPPO 蛋白理化性质分析

理化性质预测结果(表 6)显示, 马铃薯 PPO 蛋白家族的相对分子量在 60 365.04 ~ 67 643.66 ,其中 StuPPO7 的相对分子量最小 ,为 60 365.04 ;StuPPO6 的相对分子量最大, 为 67 643.66。理论等电点为 5.82 ~ 7.57 , 其中 StuPPO7 等电点最低(5.82) , StuPPO4 的等电点最大(7.57)。StuPPO2、StuPPO4 不稳定系数均小于 40 ,而其他蛋白的不稳定系数均大于 40 ,表明在马铃薯 PPO 蛋白中, 除 StuPPO2、StuPPO4 外, 其余均为不稳定蛋白。此外, 马铃薯

PPO 蛋白平均亲水性系数均为负值, 表明该家族均为疏水性蛋白质。

2.6 马铃薯 PPO 基因家族基因启动子顺式作用元件分析

对马铃薯 PPO 基因家族启动子顺式作用元件进行分析, 结果(表 7) 表明: *StuPPO2*、*StuPPO4*、*StuPPO8*、*StuPPO9* 均具有 1 个或 2 个 IAA 响应元件 推测这些基因可能与 IAA 响应有关 除 *StuPPO4* 和 *StuPPO7* 外, 其余 PPO 基因均含有 MeJA 响应元件, 可能与 MeJA 响应有关; 除 *StuPPO2* 外, 其余 PPO 基因均含有 ABA 响应元件, 可能对 ABA 响应有关; *StuPPO4* 具有 1 个 SA 响应元件, 可能与 SA 响应有关; *StuPPO1* 和 *StuPPO8* 分别具有 1 个 GA 响应元件; *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO9* 分别具有 1 个低温响应元件 LTR; *StuPPO1*、*StuPPO4*、*StuPPO6* 分别具有 1 个防御和应激反应元件 TC-rich repeats。以上结果表明, 多数马铃薯 PPO 基因可能对 IAA、MeJA 和 ABA 响应, 部分对低温及外界胁迫响应。

表 6 马铃薯 PPO 蛋白的理化性质预测

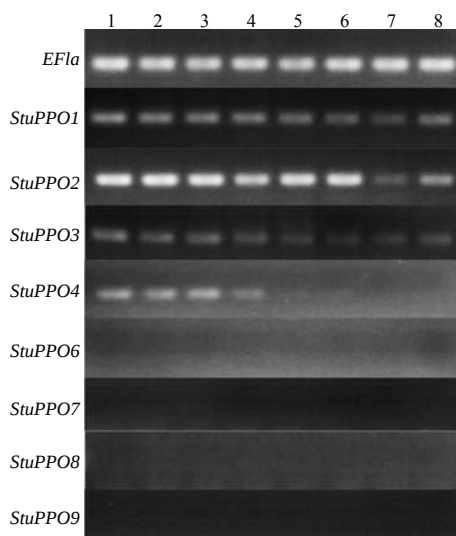
Table 6 The physicochemical properties of PPOs of potato				
蛋白名称	理论等电点	分子量	亲水性	不稳定系数
StuPPO1	6.63	66 446.13	-0.480	40.87
StuPPO2	6.61	67 143.67	-0.479	36.02
StuPPO3	5.90	62 971.46	-0.445	41.19
StuPPO4	7.57	66 612.49	-0.442	39.24
StuPPO6	6.00	67 643.66	-0.457	50.79
StuPPO7	5.82	60 365.04	-0.492	44.23
StuPPO8	6.44	66 817.73	-0.430	45.17
StuPPO9	6.41	60 410.37	-0.452	40.30

表 7 马铃薯 PPO 基因启动子顺式作用元件

Table 7 The function of cis-acting element of PPO genes promotor of potato									
基因	IAA 响应		MeJA 响应		ABA 响应	SA 响应	GA 响应	低温响应	防御和 应激反应
	AuxRR- core	TGA- element	CGTCA- motif	TGACG- motif	ABRE	TCA- element	TATC-box	LTR	TC-rich repeats
<i>StuPPO1</i>			√	√	√		√	√	√
<i>StuPPO2</i>	√	√	√	√				√	
<i>StuPPO3</i>			√	√	√				
<i>StuPPO4</i>		√			√	√			√
<i>StuPPO6</i>			√	√	√				√
<i>StuPPO7</i>					√				
<i>StuPPO8</i>	√		√	√	√		√		
<i>StuPPO9</i>		√	√	√	√			√	

2.7 马铃薯 PPO 基因在马铃薯不同部位的表达

检测 8 个 PPO 基因在马铃薯块茎、根、匍匐茎、茎、叶柄、顶部幼叶、中部叶片、底部老叶中的表达。结果(图 4)显示, *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO3* 在所检测的 8 个部位均有表达; *StuPPO4* 在马铃薯块茎、根、匍匐茎、茎中检测到表达; *StuPPO6*、*StuPPO7*、*StuPPO8*、*StuPPO9* 在 8 个部位都未检测到表达。

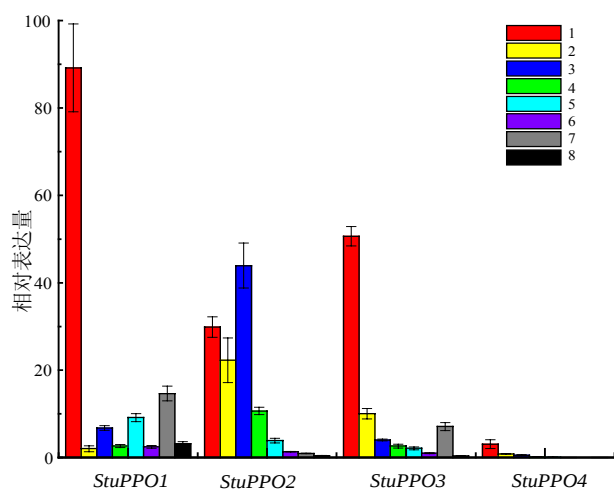


1~8 分别表示马铃薯块茎、根、匍匐茎、茎、叶柄、顶部幼叶、中部叶片、底部老叶。

图 4 马铃薯 PPO 基因在马铃薯不同部位的表达

Fig.4 The expression of PPO genes in different tissues of potato

此外, 检测了 *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO3*、*StuPPO4* 在 8 个部位的相对表达量, 结果(图 5)显示:



1~8 分别表示马铃薯块茎、根、匍匐茎、茎、叶柄、顶部幼叶、中部叶片、底部老叶。

图 5 4 个 *StuPPO* 基因在马铃薯不同部位的相对表达量

Fig.5 The relative expression of 4 *StuPPO* genes in tissues of potato

StuPPO1 在块茎中的表达量最高; *StuPPO2* 在块茎、根、匍匐茎中的表达量较高, 其中在匍匐茎中的表达量最高; *StuPPO3* 在块茎中的表达量最高, 在根和中部叶片的表达量次之; *StuPPO4* 在各部位的表达量均较低, 在块茎中的表达量最高。

3 结论与讨论

本研究从马铃薯基因组中搜索获得 12 个 PPO 基因。除了 *StuPPO9* 位于 2 号染色体外, 其余 11 个 PPO 基因均串联在 8 号染色体 276 kb 的范围内, 表明马铃薯 PPO 基因家族是由于基因复制形成的。同大部分双子叶 PPO 基因的特点类似, 在马铃薯 12 个 PPO 基因中, 除了 *StuPPO7*、*StuPPO8* 和 *StuPPO9* 各具有 1 个内含子外, 其余均不含有内含子。典型的 PPO 基因具有 Tyrosinase、PPO1_DWL、PPO1_KFDV 结构域, 部分结构域的丢失可能导致基因功能的丧失^[6]。蛋白序列比对显示, *StuPPO5*、*StuPPO10*、*StuPPO11*、*StuPPO12* 部分结构域丢失, *StuPPO7* 在 Tyrosinase 结构域的 CuA 处缺失, 推测 *StuPPO5*、*StuPPO10*、*StuPPO11*、*StuPPO12* 对应的基因功能丧失, 而 *StuPPO7* 其活性功能可能降低或丧失。进一步对除 *StuPPO5*、*StuPPO10*、*StuPPO11*、*StuPPO12* 外的其他 8 个基因进行蛋白序列相似性分析显示, 距离最为接近的 *StuPPO2*、*StuPPO3*、*StuPPO4* 蛋白序列之间相似性均高于 90%, *StuPPO3* 与 *StuPPO6* 相似性也大于 90%。尽管这几个基因的蛋白序列相似性较高, 但其在马铃薯各个部位的表达却有着较大的差异, 意味着其生物功能的差异。将马铃薯 PPO 蛋白序列与茄子、番茄、苹果的 PPO 蛋白序列进行进化分析, 结果显示, 除 *StuPPO9* 与苹果 PPO 聚为一类之外, 其他茄科 PPO 聚为一类, 表明 *StuPPO9* 与茄科其他 PPO 基因进化关系较远, 而与苹果 PPO 在进化关系上较近。亚细胞位置预测表明, 马铃薯大部分 PPO 位于叶绿体, 而 *StuPPO9* 可能位于液泡或者线粒体, *StuPPO3* 可能位于除叶绿体、线粒体、液泡外的其他位置。有报道显示, 杨树中的 PtrPPO13、金鱼草中的金鱼草素合成酶 (AmAS1) 以及石炭酸灌木中的 (+)-larreatricin 羟化酶均位于液泡, 具有生物合成功能^[9, 21-22]; 因此, 推测 *StuPPO9* 可能有着类似的生物合成功能。

对 *StuPPO* 基因的启动子顺式作用元件进行分析显示, *StuPPO* 基因具有 MeJA、ABA 作用元件, 推测其与 MeJA、ABA 响应有关; 部分具有 IAA、SA、GA 作用元件, 推测其与 IAA、SA、GA 响应

有关。此外, *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO9* 具有低温响应元件 LTR; *StuPPO1*、*StuPPO4*、*StuPPO6* 具有防御和应激反应元件 TC-rich repeats。推测 *StuPPO* 基因能够响应部分植物激素、低温胁迫以及其他胁迫, 从而发挥其功能。尽管 *StuPPO2*、*StuPPO3*、*StuPPO4* 蛋白序列相似性大于 90%, 但是它们的基因启动子的顺式作用元件有着明显的差异。对 *StuPPO* 基因的表达分析结果显示, *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO3* 在所检测的马铃薯 8 个部位组织中均有表达, *StuPPO4* 在部分组织中有表达, 其余 4 个基因在 8 个部位的组织中没有检测到表达。进一步分析显示, *StuPPO1*、*StuPPO2*、*StuPPO3*、*StuPPO4* 在马铃薯块茎中均有较高的表达量, 其中 *StuPPO1* 在块茎中的表达量最高。可见, 马铃薯不同的 *StuPPO* 基因之间的表达模式具有较大的差异, 意味着其功能有所差异, 其具体的生物功能需作进一步深入研究。

参考文献:

- [1] BHONWONG A, STOUT M J, ATTAJARUSIT J, et al. Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) and beet armyworm (*Spodoptera exigua*)[J]. Journal of Chemical Ecology, 2009, 35(1): 28–38.
- [2] HAN Y, WANG Y, BI J L, et al. Constitutive and induced activities of defense-related enzymes in aphid-resistant and aphid-susceptible cultivars of wheat[J]. Journal of Chemical Ecology, 2009, 35(2): 176–182.
- [3] CONSTABEL C P, BERGEY D R, RYAN C A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United of America, 1995, 92(2): 407–411.
- [4] JIA H, ZHAO P, WANG B, et al. Overexpression of polyphenol oxidase gene in strawberry fruit delays the fungus infection process[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(3): 592–606.
- [5] VAUGHN K C, DUKE S O. Function of polyphenol oxidase in higher plants[J]. Plant Physiology, 1984, 60(1): 106–112.
- [6] TRAN L T, TAYLOR J S, CONSTABEL C P. The polyphenol oxidase gene family in land plants: lineage-specific duplication and expansion[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 395.
- [7] NEWMAN S M, EANNETTA N T, YU H, et al. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 21(6): 1035–1051.
- [8] NEWMAN S M, TANTASAWAT P, STEFFENS J C. Tomato polyphenol oxidase B is spatially and temporally regulated during development and in response to ethylene[J]. Molecules, 2011, 16(1): 493–517.
- [9] TRAN L T, CONSTABEL C P. The polyphenol oxidase gene family in poplar: phylogeny, differential expression and identification of a novel, vacuolar isoform[J]. Planta, 2011, 234(4): 799–813.
- [10] MISHRA B B, GAUTAM S. Polyphenol oxidases: biochemical and molecular characterization, distribution, role and its control[J]. Enzyme Engineering, 2016, 5(1): 141–149.
- [11] ROBINSON S P, DRY I B. Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-Kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage[J]. Plant Physiology, 1992, 99(1): 317–323.
- [12] THYGESEN P W, DRY I B, ROBINSON S P. Polyphenol oxidase in potato (A multigene family that exhibits differential expression patterns)[J]. Plant Physiology, 1995, 109(2): 525–531.
- [13] THIPYAPONG P, HUNT M D, STEFFENS J C. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase[J]. Phytochemistry, 1995, 40(3): 673–676.
- [14] HUNT M D, EANNETTA N T, YU H, et al. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 21(1): 59–68.
- [15] 徐建飞, 金黎平. 马铃薯遗传育种研究: 现状与展望[J]. 中国农业科学, 2017, 50(6): 990–1015.
- [16] 陈哲明, 罗宇, 刘明月, 等. 栽培模式对马铃薯植株镉积累和产量及品质的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2016, 42(3): 238–241.
- [17] SHETTY S M, CHANDRASHEKAR A, VENKATESH Y P. Eggplant polyphenol oxidase multigene family: cloning, phylogeny, expression analyses and immunolocalization in response to wounding[J]. Phytochemistry, 2011, 72(18): 2275–2287.
- [18] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [19] 张帆, 马艳青, 李雪峰, 等. 辣椒 Aux/IAA 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2018, 44(6): 597–606.
- [20] CHI M, BHAGWAT B, LANE W D, et al. Reduced polyphenol oxidase gene expression and enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) with artificial microRNAs[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 1–18.
- [21] ONO E, HATAYAMA M, ISONO Y, et al. Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles[J]. The Plant Journal, 2006, 45(2): 133–143.
- [22] CHO M H, MOINUDDIN S G, HELMS G L, et al. (+)-Larreticrin hydroxylase, an enantio-specific polyphenol oxidase from the creosote bush (*Larrea tridentata*)[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United of America, 2003, 100(19): 10641–10646.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳 正