



龙眼 *DlPPO1* 基因的克隆及其表达调控分析

田奇琳,林玉玲,郑庆游,苏荣峰,赖钟雄*

(福建农林大学 园艺植物生物工程研究所,福州 350002)

摘要:该研究根据同源克隆技术,利用 RT-PCR 和 RACE 技术,以‘四季蜜’龙眼叶片 cDNA 为模板,获得龙眼多酚氧化酶基因(*polyphenol oxidase, PPO*)的 3 个转录本 *DlPPO1-a*、*DlPPO1-b* 和 *DlPPO1-c* 的 cDNA 全长序列(KM387405、KM516087 和 KM516088)和 1 条 DNA 序列 *DlPPO1*(KU837229)。*DlPPO1-a*、*DlPPO1-b* 和 *DlPPO1-c* 的全长分别为 1 969、1 960 和 1 920 bp,包含相同的完整开放阅读框 1 800 bp 并编码 599 个氨基酸;该基因与荔枝、橄榄和枣等物种的 *PPO* 基因同源性较高。生物信息学分析表明,*DlPPO1* 保守结构域具有多酚氧化酶的典型结构域特征。利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *DlPPO1* 表达结果表明,在龙眼体胚发生过程中,*DlPPO1* 从心形胚时期开始上调表达至子叶胚时期达到最高,推测其在龙眼体胚发生中后期可能发挥重要作用;*DlPPO1* 在龙眼叶片中表达量最高,其次是花芽,而在其他组织部位表达量较低。激素和非生物胁迫处理下的表达分析表明,水杨酸(SA)、低浓度茉莉酸甲酯(MeJA)、NaCl、甘露醇及 PEG 可诱导 *DlPPO1* 基因上调表达,这些表达模式暗示其可能参与多种非生物胁迫应答过程。

关键词:龙眼;体细胞胚胎发生;多酚氧化酶;非生物胁迫;实时荧光定量 PCR

中图分类号:Q785; Q786 **文献标志码:**A

Cloning and Expression Analyses of *DlPPO1* from *Dimocarpus longan* Lour.

TIAN Qilin, LIN Yuling, ZHENG Qingyou, SU Rongfeng, LAI Zhongxiong*

(Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract:Based on homology cloning techniques, we isolated the *polyphenol oxidase* gene (3 transcripts: *DlPPO1-a*, *DlPPO1-b*, and *DlPPO1-c*; Genbank: KM387405, KM516087, and KM516088) from leaves of longan ('Sijimi' cultivar) by RT-PCR and RACE. The full-length cDNA sequence of *DlPPO1-a*, *DlPPO1-b*, and *DlPPO1-c* were 1 969 bp, 1 960 bp and 1 920 bp, respectively, containing a 1 800 bp open reading frame (ORF) which encoded 599 amino acids; *DlPPO1* shared high homology with *PPO* gene of *Litchi chinensis*, *Canarium album*, and *Populus euphratica*, etc. Bioinformatic analysis revealed that the deduced *DlPPO1* protein with conserved domains shared the typical characteristics of the *PPO* family. QPCR analysis indicated that during somatic embryogenesis (SE) in longan, the expression level of *DlPPO1* rose from the stage of heart embryo and then reached the highest at the stage of the cotyledon embryo, which suggested that *DlPPO1* might play important roles during the middle and late stages of longan SE. It was detected that *DlPPO1* abundantly accumulated in longan leaves, followed by flower buds; there was lower expression in other longan tissues. After exposure to phytohormones and abiotic stress, the expression of *DlPPO1* was induced by salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), NaCl, mannitol, and PEG treatments. Consequently, it suggested that *DlPPO1* might participate in abiotic stress responsiveness.

收稿日期:2016-03-05;修改稿收到日期:2016-04-26

基金项目:国家自然科学基金(31272149,31572088);福建省重大科技专项(2015NZ0002-1)

作者简介:田奇琳(1990—),女,博士,主要从事果树生物技术研究。

* 通信作者:赖钟雄,博士,研究员,博士生导师,主要从事园艺植物生物技术与遗传资源研究。E-mail:Laizx01@163.com

Key words: longan; somatic embryogenesis; polyphenol oxidase; abiotic stress, real-time quantitative PCR

多酚氧化酶又叫做儿茶酚酶、酪氨酸酶、绿原酸酶和漆酶等,大体上分成两类:儿茶酚氧化酶和漆酶,习惯上把儿茶酚氧化酶称为多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO),它与漆酶(p-diphenol oxidase 或 Laccase)有明显的区别^[1]。PPO 是一类由核编码且结合铜离子的结构蛋白,催化单元酚、双元酚等多元酚氧化成醌类,普遍存在于动植物、真菌和细菌中。PPO 对植物的生长发育具有重要的意义,如促进乙烯代谢过程^[2];而且 PPO 在植物组织和器官中的分布具有时空特异性,如在番茄中, *PPO B* 基因在大多数组织的维管和里层中表达量高,且在幼嫩组织中表达量高且随着植株的发育表达量降低,而在小麦中, *PPO* 基因在胚芽鞘和胚根中表达强烈^[1-2]。PPO 可催化木质素和醌类化合物的生成,构成保护性屏障而使细胞免受或减轻病菌病虫的侵害,在植物逆境防御中起着重要作用^[3-4];逆境胁迫或病原体侵染等外界因素诱导植物产生 PPO 活性,其中也涉及到茉莉酸等激素信号途径在植物防御反应中的作用^[5]。在植物体内,miRNA 通过调节相应的靶基因来控制植物参与环境胁迫的响应, *PPO* 则是受到 miR1444a 调控的靶基因,参与杨树对环境胁迫的应答响应^[6]。

近年来 PPO 的研究已经成为热点,许多热带南亚热带木本果树(如龙眼、荔枝、橄榄等),在果实贮藏保鲜及组织培养过程中容易发生褐变,而多酚氧化酶的酶促反应是影响褐变的主要原因^[7-8]。龙眼果皮褐变和果肉自溶等问题是导致龙眼采后难以长期贮存的重要原因,关于龙眼果皮和果肉等组织的多酚氧化酶活性研究已有报道,如经 50 ℃热水处理 10 min 可有效降低果皮 PPO 活性,保持较高的果皮总酚含量,可有效降低采后龙眼果实酚类物质代谢,从而延缓采后龙眼果实果皮褐变的发生;PPO 酶等同工酶也与龙眼果实自溶的发生和发展密切相关^[9-10]。许多植物 PPO 的研究主要集中在酶学特性上^[11-12],其生理机制尚不明确,近年来许多植物尤其是果树 PPO 基因已经得到克隆^[13-16],但植物 PPO 在生长发育过程和逆境胁迫表达调控机制方面的研究还很少。荣霞分离获得橄榄 *PPO* 基因并发现该基因在橄榄试管苗生长发育过程中发挥重要作用,可能与幼嫩组织的启动分化有关^[15];王家保等分离获得荔枝 *PPO* 基因,且检测到该基因在果实采后贮藏早期果皮中上调表达,可能提高 PPO 活

性从而加剧荔枝果实采后过程中的果皮褐变^[16]。植物胚胎发育过程的遗传调控可以作为探索植物发育过程中形态发生规律及控制机理的基础手段,且龙眼中 *PPO* 基因的克隆及表达调控机制未见报道,因此本研究利用龙眼体胚发生系统^[17],分离、鉴定一个完整的 *PPO* 基因,并对其在龙眼体胚发育过程、不同组织器官、以及逆境胁迫处理下过程中的差异表达进行分析,以期为探索多酚氧化酶与龙眼生长发育及逆境胁迫响应之间的关系提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

以‘四季蜜’品种龙眼的叶片作为基因克隆的材料,以‘红核子’品种^[17]龙眼胚性愈伤组织、球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶胚以及‘四季蜜’品种^[18]龙眼的根、叶、花和果实等为用于检测基因在龙眼组织不同部位的差异表达材料。对培养 18 d 的龙眼胚性愈伤组织进行茉莉酸甲酯(MeJA)和水杨酸(SA)两种激素处理:200 mL 锥形瓶中加入 40 mL MS(蔗糖 20 g/mL)液体培养基,液体培养基内依次添加一种激素至终浓度依次为:0、25、50、75 和 100 μ mol/L,3 次重复,选取松散、浅黄且颗粒较细的龙眼愈伤大约 0.5 g 轻轻放入培养基中,将锥形瓶置于摇床 110 r/min,25 ℃,黑暗培养 24 h。胁迫因素处理:200 mL 锥形瓶中加入 40 mL MS(蔗糖 20 g/mL)液体培养基,液体培养基内各添加 NaCl (150 mmol/L)、甘露醇 (150 mmol/L)、PEG-4000 (10%) 和 ABA (10 μ mol/L),3 次重复后选取松散、浅黄且颗粒较细的龙眼愈伤大约 0.5 g 轻轻放入培养基中,将锥形瓶置于摇床 110 r/min,25 ℃,黑暗培养 1、2、4、8、12、16 和 24 h 后,分别收集以上处理材料用于 RNA 提取和定量表达分析。

1.2 方法

1.2.1 DNA 和总 RNA 提取及 cDNA 合成 采用改良 CTAB 法^[19]提取 DNA,采用 TriPure(Roche)试剂盒提取总 RNA,并采用 GeneRacer Kit (Invitrogen) 进行 RT-PCR 反转录。qPCR 的 cDNA 合成采用 PrimeScript[®] RT reagent Kit(TaKaRa),具体方法参照说明书。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增 根据 GenBank 报道的 PPO 氨基酸保守序列和核酸序列分别设计同源克隆引物 *DlPPO1-F1* 和简并引物 *DlPPO1-R1* 进

行 *DlPPO1* 部分 cDNA 序列的扩增, 并根据扩增得到的部分 cDNA 序列设计 RACE 引物, 用于扩增 *DlPPO1* 基因 cDNA 3' 末端和 5' 末端序列; 根据获得的 3' 末端和 5' 末端序列设计引物, 进行 *DlPPO1* 基因开放阅读框的扩增。研究中所用的引物名称及序列见表 1, 引物委托北京六合华大基因科技股份有限公司合成。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 57~59 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30~35 个循环; 72 °C 延伸 6 min。

1.2.3 目的片段的回收 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 目的条带采用 BIOMI-GA 公司 DNA 快速纯化回收试剂盒进行回收, 采用 pMD18-T Vector (Takara Biotechnology) 或者 pEASY-T5 Zero Cloning Kit (TransGen Biotech) 进行目的片段的克隆。阳性克隆子的测序委托上海博尚生物技术有限公司完成。

1.2.4 生物信息学分析 采用 NCBI 的 Blast 和 DNAMAN 6.0 对获得的基因全长序列进行分析。*DlPPO1* 蛋白的生物信息学分析, 采用以下分析工具进行: 蛋白质基本理化性质的分析 (ExPASy ProtParam, <http://web.expasy.org/protparam/>), 信号肽预测 (SignalP 4.1 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 亚细胞定位预测 (PSORT, <http://psort.hgc.jp/>), 蛋白质跨膜结构的预测 (EMBnet TMpred, http://www.ch.emblnet.org/software/TMPRED_form.html), 磷酸位点预测 (NetPhos 2.0 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), 蛋白质保守结构域预测 (NCBI-ProteinTools, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), 蛋白质二级结构预测 (PSIPRED Protein Structure Prediction Server, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), 蛋白质三级结构预测 (SWISS-MODEL, <http://swissmodel.expasy.org/>), 分子系统进化树的构建 (Mega 5)。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 分析 实时荧光定量 PCR (qPCR) 反应参照 Lin 和 Lai^[20] 的步骤进行, 仪器为 LightCycler 480 (Roche Applied Science, Switzerland)。反应体系: 2 × SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa) 10 μL, cDNA 1 μL, 引物 (*DlPPO1*-QF、*DlPPO1*-QR) 各 0.8 μL, 总共体积 20 μL。qPCR 反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 10 s, 40 个循环; 通过熔解曲线分析确定扩增反应的特异性。以 *eIF4A*、*EF-1A* 和 *Fe-SOD* 为内参基因^[20]。

表 1 *DlPPO1* 基因克隆和 qPCR 引物列表

Table 1 Primer sequences for the gene isolation and qPCR of *DlPPO1*

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>DlPPO1</i> -F1	GCTGTTGAGCTCATGAAAGC
<i>DlPPO1</i> -R1	CACAAARCTYCCKGCAAAMTC
<i>DlPPO1</i> -5RACE1	GCATAGCAAAGGTTGGGTAC
<i>DlPPO1</i> -5RACE2	ATCACAAATAGGCACAATGGACG
<i>DlPPO1</i> -3RACE1	TAGCTCTTGAGCCGAGATAAAC
<i>DlPPO1</i> -3RACE2	CGAGTTTGCAGGGAGTTTG
<i>DlPPO1</i> -CF1	CCTTATTATAATCACAACCACAC
<i>DlPPO1</i> -CR1	GCACGAAACCAGAGACATTATC
<i>DlPPO1</i> -QF	TGTGGACGGTTGGAAAGAC
<i>DlPPO1</i> -QR	CAAGATTGGCGTCTCATCA

2 结果与分析

2.1 龙眼 *DlPPO1* 基因 cDNA 全长序列的获得

以龙眼叶片 cDNA 为模板, 以 *DlPPO1*-F1 和 *DlPPO1*-R1 为引物扩增获得 1 137 bp 的序列, 经 NCBI 的 Blast 比对推测该序列为龙眼 PPO 基因保守区部分序列, 再根据获得的序列设计 RACE 引物, 获得 PPO 基因的 5' 末端序列和 3' 末端序列, 并在其 5' 末端和 3' 末端序列设计特异性引物 *DlPPO1*-CF1 和 *DlPPO1*-CR1 进行 ORF 验证, 起始密码子和终止密码子分别为 ATG 和 TGA, 开放阅读框 (ORF) 长为 1800 bp, 编码 599 个氨基酸; *DlPPO1*-a、*DlPPO1*-b 和 *DlPPO1*-c 的 5' 端非编码区 (5'-UTR) 相同, 长度为 32 bp, 3' 非编码区 (3'-UTR) 长度不同, 分别为 137、128 和 88 bp, 且 polyA 长度分别为 20、28 和 23 bp。将该序列推导的编码区氨基酸序列在 NCBI 进行比对, 发现 *DlPPO1* 与其他植物如荔枝、橄榄、胡杨等的 PPO 基因高度同源, 其中与荔枝的一致性最高, 达 94%。经结构域分析推测该基因为龙眼 PPO 基因, 该基因 3 个转录本序列在 GenBank 中登录, 分别命名为 *DlPPO1*-a、*DlPPO1*-b 和 *DlPPO1*-c, 登录号分别为 KM387405、KM516087 和 KM516088。以‘四季蜜’龙眼叶片 DNA 为模板, 以 *DlPPO1*-CF1 和 *DlPPO1*-CR1 为引物扩增获得 1 条长度为 2 163 bp DNA 序列, 命名为 *DlPPO1* (GenBank 登录号 KU837229); *DlPPO1* 基因仅含有 1 个内含子, 长度为 214 bp。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 龙眼 *DlPPO1* 蛋白基本性质分析 采用 ExPASy 中的蛋白质基本参数分析工具 ProtParam

对 *DlPPO1* 基本参数进行计算表明, *DlPPO1* 编码的蛋白为碱性蛋白, 具有亲水性, 且带正电氨基酸数量(Arg+Lys)均大于带负电的氨基酸数量(Asp+Glu); *DlPPO1* 是不稳定蛋白。采用 SignalP 4.1 Server 预测表明 *DlPPO1* 不含信号肽, 不是分泌蛋白。采用 PSORT 分析显示 *DlPPO1* 蛋白定位为叶绿体基质的可能性最大, 分值为 0.892。在亚细胞定位分析的基础上, 利用 ExPASy 中的 TMpred 工具进行跨膜结构的预测显示, *DlPPO1* 具有跨膜结构域, 可能与膜定位和跨膜转运有关。磷酸化位点预测显示, *DlPPO1* 蛋白共含 35 个磷酸化位点, 其中丝氨酸的磷酸化位点 21 个, 苏氨酸和酪氨酸的磷酸化位点分别为 8 个和 6 个, *DlPPO1* 蛋白中丝氨酸的比例明显大于苏氨酸和酪氨酸。对 *DlPPO1* 蛋白的二级结构进行预测, 其中无规则卷曲所占比例最大, 而 α 融合和 β 折叠所占比例相当; 在了解蛋白二级结构的基础上, 进一步对其三级结构进行预测, 预测的结果与二级结构预测的结论相符。使用 NC-BI-CD-Search 工具进行蛋白保守区域分析, 结果显示 *DlPPO1* 氨基酸序列中 173-382 区域与酪氨酸酶超家族的核心序列高度同源, 具有 PPO 蛋白的典型特征, 含 PPO1_DLW 和 PPO1_KFDV 两个结构域(图 1)。

2.2.2 龙眼 *DlPPO1* 基因相关 MicroRNA 预测与分析 miRNAs 作为一种调节分子, 参与控制植物的生长发育和逆境胁迫应答。已有研究表明 miRNAs 在植物花、种子、叶、根和维管等形态建成和发育中均发挥重要作用; 且 miRNAs 除了可以响应激素信号调控并参与控制其他 miRNAs 的生物合成, 还可以通过应答干旱胁迫、病毒侵染等逆境胁迫调控基因表达。因此, 研究 miRNAs 对靶基因的调控作用, 对于研究靶基因如何参与植物生长发育调控及环境胁迫响应有重要意义。利用在线软件 psRNA Target 等^[21] 对调控 *DlPPO1* 的 miRNAs 进行预测, 结果在杨树 miRNA 数据库中比对发现 *DlPPO1* 存在杨树 miR1444(ptc-miR1444)的翻译抑制位点, 说明在龙眼 *DlPPO1* 可能也存在与 ptc-miR1444

类似抑制位点, 受到龙眼中类似 miRNA 成员的调控。

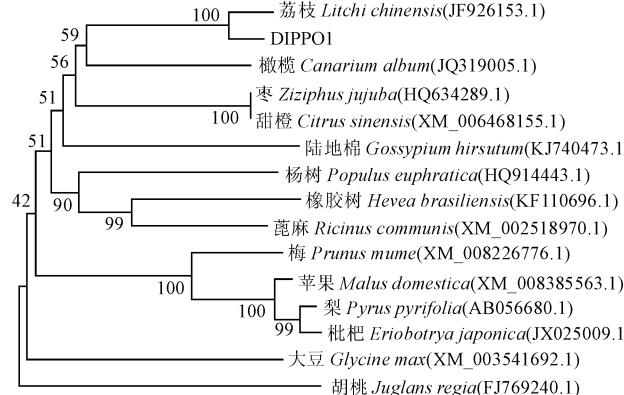
2.2.3 系统进化树分析 系统进化分析表明, 龙眼 *DlPPO1* 与同科的荔枝(JF926153.1)PPO 距离较近, 与木犀科植物橄榄(JQ319005.1)、鼠李科植物枣(HQ634289.1)和芸香科植物甜橙(XM_006468155.1)等的 PPO 的遗传距离也较近(图 2)。

2.3 龙眼体胚发生过程中 *DlPPO1* 基因表达模式

植物基因在胚胎发育过程的转录水平变化可为探索其在植物发育过程中的调控机制提供线索。*DlPPO1* 基因在龙眼体胚发生不同时期(胚性愈伤组织、不完全紧实结构、球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶胚)的相对转录水平进行分析, 结果表明, 从胚性愈伤组织时期到心形胚时期的 *DlPPO1* 基因的转录水平一直相对较低, 而从心形胚开始逐渐上调, 鱼雷形胚时期的转录水平约为愈伤组织时期的 4 倍, 子叶胚时期达到最高, 约为愈伤组织时期的 6 倍(图 3)。说明在龙眼体胚发生过程中, *DlPPO1* 基因主要在后期即子叶胚时期表达。

2.4 *DlPPO1* 基因的组织特异性表达分析

为进一步探索 *DlPPO1* 基因的组织差异性表



分支上的数字代表 1 000 次 Bootstrap 重复验证中该节点的可信度百分比值

图 2 *DlPPO1* 系统进化树

Numbers at the nodes represent the bootstrap values based on 1 000 replications

Fig. 2 Phylogenetic tree for *DlPPO1*

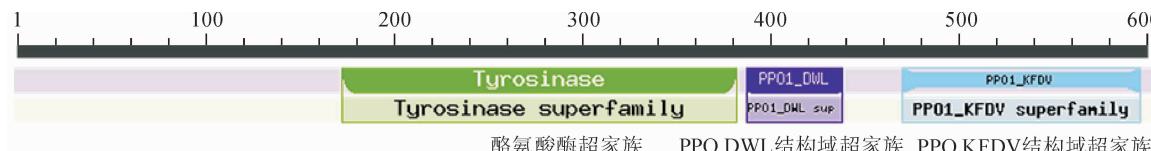


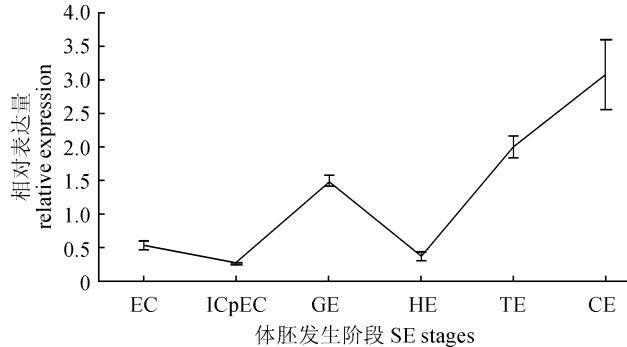
图 1 *DlPPO1* 蛋白保守结构域预测

Fig. 1 Functional domains prediction for *DlPPO1*

达特点,对其在龙眼不同组织部位(根、叶、花芽、成花、幼果、成熟果、果皮、果肉和种子)的相对表达量进行分析,结果表明,*DlPPO1* 基因在叶片中表达量最高,在成花中也有少量存在,在龙眼其他组织部位表达量较低(图 4)。说明在龙眼生长发育过程中,*DlPPO1* 基因主要在叶片和花中表达。

2.5 *DlPPO1* 基因的激素应答及胁迫响应

植物 PPO 如何应对外界环境的变化及其反应机制的研究具有重要意义。低浓度 MeJA 诱导 *DlPPO1* 的表达,而高浓度 MeJA 抑制 *DlPPO1* 的表达,说明 *DlPPO1* 基因具有较复杂的茉莉酸响应机制;随着 SA 处理浓度的提高,*DlPPO1* 基因表达

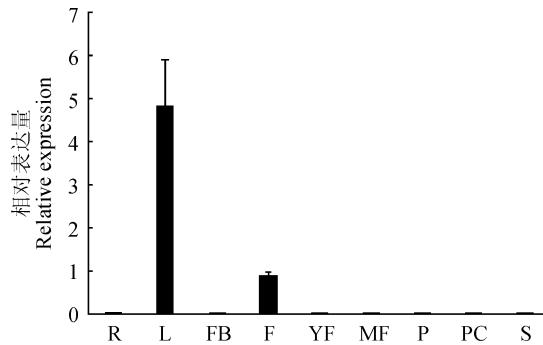


EC. 松散型胚性愈伤组织; ICpEC. 不完全胚性紧实结构;
GE. 球形胚; HE. 心形胚; TE. 鱼雷形胚; CE. 子叶胚

图 3 龙眼体胚发生过程中 *DlPPO1* 的相对表达量

EC. embryogenic callus; ICpEC. incomplete compact pro-embryogenic cultures; GE. globular embryos; HE. heart-shaped embryos;
TE. torpedo-shaped embryos; CE. cotyledon embryos.

Fig. 3 Relative expression of *DlPPO1* at different stages of longan SE



R. 根; L. 叶; FB. 花芽; F. 成花; YF. 幼果; MF. 成熟果;
P. 果肉; PC. 果皮; S. 种子

图 4 龙眼不同组织部位 *DlPPO1* 的相对表达量

R. Roots; L. Leaves; FB. Floral buds; F. Flowers;
YF. Young fruits; MF. Mature fruits; P. Pulp;
PC. Pericarp; S. Seeds.

Fig. 4 Relative expression of *DlPPO1* in different tissues of longan

量整体呈现逐渐上升的趋势,说明 SA 对 *DlPPO1* 具有正调控作用(图 5)。不同非生物胁迫的时序表达分析表明,NaCl 模拟的盐胁迫和甘露醇模拟的渗透胁迫处理下,随着处理时间的延长 *DlPPO1* 基因总体表达量上升,而 PEG 模拟干旱胁迫也诱导 *DlPPO1* 表达,说明 *DlPPO1* 参与对盐胁迫、渗透胁迫和干旱胁迫等多种非生物胁迫过程,其中对盐胁迫的响应最为显著。此外,ABA 处理下 *DlPPO1* 基因的表达水平相对平稳,说明 *DlPPO1* 并不直接依赖于 ABA 激素信号途径(图 6)。

3 讨 论

3.1 龙眼 *DlPPO1* 的潜在功能

生物膜将细胞分隔成带有不同种类蛋白质的细胞器,并发挥各自不同的功能,蛋白质的亚细胞定位分析可以为研究其功能提供线索。由于 PPO 属于核基因编码的质体酶,基因在细胞质中表达后需经转运至质体靶位点而发挥作用^[22],而本研究预测的 *DlPPO1* 具有较丰富跨膜结构的特点,正符合该基

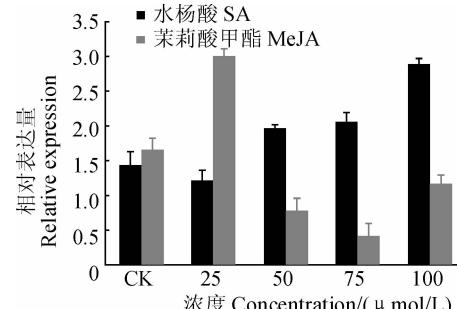


图 5 外源激素处理下 *DlPPO1* mRNA 的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *DlPPO1* in response to exogenous phytohormones

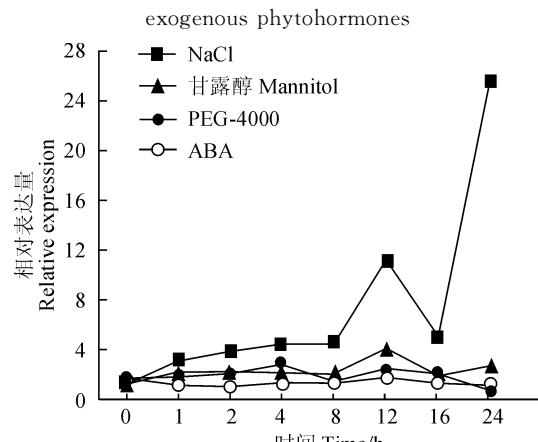


图 6 非生物胁迫因素处理下 *DlPPO1* 的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of *DlPPO1* in response to abiotic stress

因的作用特征。质体醌是一种醌分子,与光合作用中的光反应的电子传递链有关。经本研究中预测 *DlPPO1* 可能定位于叶绿体基质中的类囊体上,推测 *DlPPO1* 有可能参与叶绿体中质体醌的形成,可能间接影响龙眼光合作用的电子传递链反应。

本研究中 *DlPPO1* 蛋白的结构特征符合前人关于 PPO 的报道。*DlPPO1* 具有 PPO 蛋白的典型特征,含 PPO1_DWL 和 PPO1_KFDV 两个结构域,同时还含有两个保守的铜离子束缚区 CuA 和 CuB 双结合位点^[23]。另外 *DlPPO1* 在龙眼中可能存在与 ptcmiR1444s 类似的翻译抑制位点。

3.2 *DlPPO1* 的组织表达特性

植物 PPO 在不同组织中的表达具有特异性,如苹果 PPO 在幼茎、幼叶、花瓣、枝皮等组织中均有表达,在幼叶中表达量最高而在花瓣中的表达量最低^[24];橄榄中幼嫩组织器官的 PPO 转录水平高于成熟组织^[15];荔枝 PPO 在花和叶中表达量最高,在果肉中表达量最低^[16]。尽管果树中有关于 PPO 在植物若干组织部位的差异性表达研究,但在种子形成之前的胚胎发育阶段的表达调控研究尚未有报道,且龙眼 PPO 基因的表达调控研究仍为空白。龙眼胚性愈伤组织的转录组数据^[25]中并没有发现 PPO 基因的记录,由此可初步推测, *DlPPO1* 可能在龙眼胚胎发育早期表达量较低或者以其他前体等形式存在。通过对 *DlPPO1* 基因的在龙眼体胚发生过程的差异表达进行分析发现, *DlPPO1* 从体胚发育中期开始积累,到子叶胚时期的相对表达量相对早期显著上调,说明 *DlPPO1* 在龙眼体胚发育后期开始发挥关键作用,可能为参与幼胚发育及后期萌发等过程中的酚类氧化和木质素形成过程储备营养物质和能量。*DlPPO1* 在龙眼体胚发生过程中的表达调控机制仍需要今后进行进一步深入研究。组

织特异性表达分析表明, *DlPPO1* 在龙眼叶片中表达量最高,可能与其亚细胞定位于叶绿体基质有关;其次在花芽表达量较高,可能原因为相对较高的 PPO 活性有利于花芽分化^[26];而 *DlPPO1* 基因的在其他组织部位几乎无表达,可见其表达具有组织特异性,且龙眼中可能还存在其他成员以实现 PPO 在龙眼不同组织部位的氧化还原反应调节。

3.3 *DlPPO1* 可能参与胁迫应答

激素在植物应对各种生物和非生物胁迫应答中发挥重要作用,已知茉莉酸(JA)和水杨酸(SA)可作为植物抗病响应所需的信号分子来激活植物防御机制^[27];JA 和 SA 分别与植物诱导性系统抗性 (ISR) 和系统获得性抗性 (SAR) 有关^[28];植物体内 ABA 是应答生物胁迫和非生物胁迫的重要信号分子,许多逆境条件下其含量升高,从而提高植物自身抗逆性以应对外界环境^[29]。有研究指出,植物激素信号产生的时间和丰度在决定植物病害程度中起着关键作用^[30]。本研究中, *DlPPO1* 的表达受到低浓度 MeJA、SA、盐胁迫、渗透胁迫和干旱胁迫的诱导,其中盐胁迫的诱导作用最为显著,而 ABA 对 *DlPPO1* 并没有显著的诱导作用,可见 *DlPPO1* 可能不直接依赖于 ABA 的逆境胁迫信号转导途径,而可能是通过 JA 或 SA 的逆境胁迫信号转导途径调控植物对胁迫的抗性。另外,杨树 miR1444 可能通过作用于 PPO 基因参与毛果杨对外界环境胁迫的应答^[6, 31];本研究在杨树 miRNA 数据库中预测分析到 *DlPPO1* 也存在杨树 miR1444 翻译抑制位点,可见龙眼中可能也存在 miR1444 类似成员通过调控龙眼 PPO 的活动以应对外界环境变化。总之,究竟 *DlPPO1* 在龙眼体胚中如何调节植物细胞以应对胁迫,如何应答逆境信号转导等一系列问题还需要进一步研究。

参考文献:

- 王 蕾. 小麦 PPO 基因变异及 *Ppo-A1* 基因多态性与面粉白度关联性研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2012.
- 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.
- FUERST E P, ANDERSON J V, KENNEDY A C, et al. Induction of polyphenol oxidase activity in dormant wild oat (*Avena fatua*) seeds and caryopses: a defense response to seed decay fungi[J]. *Weed Science*, 2011, **59**(2): 137-144.
- MAHANIL S, ATTAJARUSIT J, STOUT M J, et al. Over-expression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm[J]. *Plant Science*, 2008, **174**(4): 456-466.
- MAYER A M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review [J]. *Phytochemistry*, 2006, **67** (21): 2 318-2 331.
- 崔秀娜, 袁丽叙, 苏晓娟, 等. miR1444a 参与毛果杨对锌胁迫的响应[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, **42**(10): 850-860.
- CUI X N, YUAN L C, XU X J, et al. miR1444a is involved in the response of *Populus trichocarpa* to zinc stress. [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2012, **42**(10): 850-860.
- 孙 健, 李 丽, 等. 荔枝、龙眼采后酶促褐变反应化学机理

- 研究进展[J]. 南方农业学报, 2012, 43(10): 1 561-1 568.
- SUN J, LI L, et al. Chemical mechanism advances of enzymatic browning reaction in postharvest lychee and longan fruits[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43(10): 1 561-1 568.
- [8] 张振霞, 洪萍. 橄榄总多酚含量及多酚氧化酶活性与组培褐变的关系[J]. 中国农学通报, 2010, 26(22): 54-57.
- ZHANG ZH X, HONG P. The connection between concentration of total polyphenol, activity of polyphenol oxidase and browning of explants in *Canarium album* (Lour.) Rauesch[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(22): 54-57.
- [9] 赵云峰, 林河通, 林艺芬, 等. 热处理延缓采后龙眼果实皮褐变及其与酚类物质代谢的关系[J]. 现代食品科技, 2014(5): 218-224.
- ZHAO Y F, LIN H T, LIN Y F, et al. Effect of heat treatment on browning delaying and phenolics metabolism in pericarp of harvested longan fruit[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, (5): 218-224.
- [10] 陈子健, 吴振先, 等. 龙眼果肉自溶与部分氧化还原酶同工酶变化的关系[J]. 热带作物学报, 2014, (7): 1 434-1 438.
- CHEN Z J, WU ZH X, et al. Relationship between longan pulp-breakdown and the changes of some oxidoreductase isozymes[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, (7): 1 434-1 438.
- [11] ANDERSON J V, MORRIS C F. Purification and analysis of wheat grain polyphenol oxidase (PPO) protein[J]. *Cereal Chemistry*, 2003, 80(2): 135-143.
- [12] NISHIMURA M, FUKUDA C, MURATA M, et al. Cloning and some properties of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*) polyphenol oxidase, and changes in browning potential during fruit maturation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2003, 83(11): 1 156-1 162.
- [13] 李桂琴, 李会宣, 许冬倩, 等. 鸭梨多酚氧化酶基因 CDS 区的克隆及表达[J]. 果树学报, 2008, 25(4): 577-580.
- LI G, LI H X, XU D Q, et al. Cloning and expression of polyphenol oxidase gene of CDS from Yali Pear [J]. *Journal of fruit science*, 2008, 25(4): 577-580.
- [14] 高宇琼, 林玉玲, 赖钟雄. 金花茶多酚氧化酶基因的克隆及其体胚发生过程中的表达分析[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2014, 43(6): 602-608.
- GAO Y Q, LIN Y L, LAI ZH X. Cloning and expression of PPO gene during somatic embryogenesis in *Camellia nitidissima* Chi. [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* (Natural Science Edition), 2014, 43(6): 602-608.
- [15] 荣霞, 赖钟雄, 林玉玲, 等. 橄榄多酚氧化酶基因(PPO)克隆及其试管苗离体保存过程中的表达分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(4): 738-745.
- RONG X, LAI Z X, LIN Y L, et al. Cloning and expression of polyphenol oxidase (PPO) gene during different process of preservation in *in vitro* Chinese Olive(*Canarium album*) [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, 35(4): 738-745.
- [16] WANG J, LIU B, XIAO Q, et al. Cloning and expression analysis of litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.) polyphenol oxidase gene and relationship with postharvest pericarp browning[J]. *PLoS one*, 2014, 9(4): e93982.
- [17] LAI Z, CHEN C, ZENG L, et al. Somatic embryogenesis in longan [*Dimocarpus longan* Lour.] [M]//. In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer, 2000: 415-431.
- [18] LIN Y, LAI Z, TIAN Q, et al. Endogenous target mimics down-regulate miR160 mediation of ARF10, -16, and -17 cleavage during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6(e219).
- [19] 陈桂信, 吕柳新, 赖钟雄, 等. 桑基因组 DNA 的提取与纯化 [J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(3): 329-333.
- CHEN G X, LV L X, LAI Z X, et al. Extraction and purification of genomic DNA in Nai (*Prunus salicina* Lindl. var. *cordata*) [J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2004, 26(3): 329-333.
- [20] LIN Y, LAI Z. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree[J]. *Plant Science*, 2010, 178(4): 359-365.
- [21] DAI X, ZHAO P X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39 (suppl 2): W155-W159.
- [22] SOMMER A, NE'EMAN E, STEFFENS J C, et al. Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase [J]. *Plant Physiology*, 1994, 105(4): 1 301-1 311.
- [23] LIAO Z, CHEN R, CHEN M, et al. Molecular cloning and characterization of the polyphenol oxidase gene from sweet-potato[J]. *Molecular Biology*, 2006, 40(6): 907-913.
- [24] 马长青, 柏素花, 戴洪义. '嘎拉' 苹果多酚氧化酶基因 *MdP-PO* 的克隆与表达分析[J]. 植物生理学报, 2013, (8): 803-810.
- MA C Q, BAI S H, DAI H Y. Cloning and expression analysis of polyphenol oxidase gene (PPO) identified from 'Gala' apple[J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, (8): 803-810.
- [25] LAI Z, LIN Y. Analysis of the global transcriptome of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) embryogenic callus using Illumina paired-end sequencing[J]. *Bmc. Genomics*, 2013, 14 (2): 178-189.
- [26] 贺纱莎, 赵尊练, 江山, 等. 线辣椒花芽分化过程的形态观察及部分代谢产物和酶活性的变化[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2014, (4): 171-178.
- ZANG S S, ZHAO Z L, JIANG S, et al. Morphology and changes in metabolites during floral bud differentiation of chili pepper[J]. *Journal of Northwest A & F University* (Natural Science Edition), 2014, (4): 171-178.
- [27] RIVAS-SAN VICENTE M, PLASENCIA J. Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(10): 3 321-3 338.
- [28] DOORNBOS R F, GERAATS B P, KURAMAE E E, et al. Effects of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid signaling on the rhizosphere bacterial community of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24 (4): 395-407.
- [29] CUTLER S R, RODRIGUEZ P L, FINKELSTEIN R R, et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2010, 61(1): 651-679.
- [30] MUR L A J, PAUL K, et al. The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(1): 249-262.
- [31] SHANFA L, YING-HSUAN S, CHIANG V L. Stress-responsive microRNAs in *Populus*[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2008, 55(1): 131-151.