

桃 *PpCuAO* 家族基因鉴定及在果实发育和成熟中的表达分析

王伟, 刘世豪, 郑先波, 谭彬, 程钧, 冯建灿*

(河南农业大学园艺学院·河南省果树瓜类生物学重点实验室, 郑州 450002)

摘要:【目的】明确铜胺氧化酶(CuAO)基因与桃果实发育和成熟过程中多胺积累的关系,探究CuAO介导的多胺分解在桃果实成熟中的作用。【方法】采用乙腈浸提法提取黄水蜜桃果实发育过程中的多胺,采用高效液相质谱联用方法测定多胺含量。挖掘并分析桃基因组 *CuAO* 基因家族成员在不同组织及桃果实不同发育时期的表达水平,并利用转基因技术验证关键成员在多胺分解代谢中的作用。【结果】多胺含量分析发现,伴随着桃果实发育和成熟过程,多胺含量逐渐降低。在桃基因组中鉴定了4个CuAO候选基因(*PpCuAO1~4*),各基因呈现明显的组织表达特异性,其中 *PpCuAO4* 在果实发育后期受到明显诱导。利用外源多胺处理及转基因技术分析,表明 *PpCuAO4* 可能参与亚精胺(spermidine, Spd)的氧化分解代谢。【结论】*PpCuAO4* 介导的多胺分解是导致桃果实成熟过程中多胺积累减少的重要原因。

关键词:桃;多胺分解;铜胺氧化酶;基因表达;果实成熟

中图分类号:S662.1

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2021)09-1413-10

Genomic identification and expression pattern of copper-amine oxidase genes during peach fruit development and ripening

WANG Wei, LIU Shihao, ZHENG Xianbo, TAN Bin, CHENG Jun, FENG Jiancan*

(College of Horticulture, Henan Agricultural University/Henan Key Laboratory of Fruit and Cucurbit Biology, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract: 【Objective】Peach (*Prunus persica* L.) is one of the important fruits worldwide. However, peach fruits are highly perishable and deteriorate after ripening. Many studies have shown that polyamines (PAs) serve as endogenous anti-senescence agents. PAs are usually found at high levels during early stages of fruit development but at relatively low levels in mature fruits. Recent studies report that PA catabolism is associated with decreased PA content during fruit ripening. In addition, there is an increased interest in the function of PA catabolism during fruit ripening, but little is known about the role of PA catabolism during the ripening of peach Putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm) are the most common PAs in plants. PA catabolism is mediated by two kinds of amine oxidases, copper-amine oxidase (CuAO) and polyamine oxidase (PAO). It has been reported that CuAOs play important functions in plant growth, fruit development and ripening, as well as abiotic and biotic stress response. However, the potential role of CuAOs in peach fruit development and ripening are still unknown. This study aimed to identify the CuAO genes in peach genome and investigate the potential function of CuAO genes in PA catabolism as well as peach fruit development and ripening. 【Methods】The free PA during Huangshuimi peach fruit development and ripening was extracted by acetonitrile and its concentration was detected with HPLC-MS method. Genes encoding potential copper-containing amine oxidas-

收稿日期:2021-05-18

接受日期:2021-08-01

基金项目:国家重点研发计划(2018YFD1000300);河南省科技创新团队计划(19IRTSTHN009);河南省科技攻关项目(202102110048, 212102110402);河南农业大学科技创新基金(KJCX2018A15)

作者简介:王伟,男,讲师,博士,研究方向为桃采后生理及分子生物学。Tel:18236765046, E-mail: wangwei86@henau.edu.cn

*通信作者 Author for correspondence. Tel:0371-56990107, E-mail: jcfeng@henau.edu.cn

es (CuAOs), which are involved in PA catabolism, were identified across the peach genome. The expression patterns of *PpCuAOs* were analyzed in different tissues and different development stages of peach fruit, as well as with the treatments of exogenous PAs. The relevance of PA concentration and the expression of *PpCuAOs* was analyzed. Transient transformation system was used to investigate the function of *PpCuAO4* in PA catabolism. The expression level of *PpCuAO4*, *NtCuAO1* and *NtMPO1* were analyzed in control and tobacco transgenic lines. DAB staining and detection of PA contents were carried out for transgenic lines. **【Results】**The contents of free PAs including Put, Spd and Spm markedly decreased as the peach fruit ripened. Four putative CuAO genes (*PpCuAO1-PpCuAO4*) were identified in peach using the recently released genome database. The *PpCuAO* genes exhibited tissue-specific expression patterns. Specifically, *PpCuAO1* and *PpCuAO2* exhibited the highest expression level in old leaves and the lowest expression level in flowers. Conversely, *PpCuAO3* and *PpCuAO4* presented the highest transcription level in flowers and the lowest expression level in fruits. The *PpCuAO* genes also exhibited different expression patterns during peach fruit development and ripening. The expression level of *PpCuAO1* decreased during fruit development and ripening, except a slight increase at S2/S3 stage. Interestingly, the expression level of *PpCuAO2* significantly increased from S1 to S3 stage and exhibited the highest expression level at S2/S3 stage, which was nearly 20 folds of S1 level. Subsequently, the expression level of *PpCuAO2* sharply decreased at S3/S4 stage and kept a low level up to S4 stage. The mRNA level of *PpCuAO3* gradually increased during fruit development and ripening and exhibited two peaks at the stage of S3/S4 (5 folds of S1 level) and S4 (10 folds of S1 level), respectively. The transcript level of *PpCuAO4* gradually increased during fruit development and ripening except a slight decrease at S2 stage. The transcription of *PpCuAOs* with exogenous PAs treatment was also investigated. The result showed *PpCuAO3* was remarkably induced by Put treatment. The expression of *PpCuAO4* was dramatically induced by Spd treatment while obviously inhibited by Put and Spm treatments. To further investigate the function of the *PpCuAOs* in PA catabolism, *PpCuAO4* was selected and transiently expressed in tobacco. The expression level of *PpCuAO4* significantly increased in transgenic lines while the transcript level of *NtCuAO1* and *NtMPO1* exhibited no difference between control and transgenic lines. The levels of free PAs markedly decreased in *PpCuAO4* transgenic lines compared to the empty vector (EV) control line. In addition, the DAB staining of tobacco leaves showed *PpCuAO4* transgenic lines produced more H₂O₂ than control tobacco plants. These data indicated *PpCuAO4* was probably involved in the terminal catabolism of Spd but not Spm. **【Conclusion】**In our study, the contents of free PAs markedly decreased as the peach fruit ripened. Four putative *CuAO* genes were identified in peach genome. The *PpCuAO1-4* genes exhibited obviously tissue-specific expression patterns. The expression level of *PpCuAO4* increased during fruit development and ripening and was significantly induced by Spd treatment but inhibited by Put and Spm treatments. In addition, the levels of free PAs markedly decreased in *PpCuAO4* transgenic lines. These results suggested *PpCuAO4* was probably involved in Spd terminal catabolism. Furthermore, *PpCuAO4*-mediated PA catabolism was associated with decreased PA content during peach fruit development and ripening. Our study provides valuable knowledge for better understanding the roles of PA catabolism in peach development and ripening. However, the specific roles of *PpCuAOs*, especially *PpCuAO4*, in peach fruit ripening needs to be further investigated.

Key words: Peach; Polyamine catabolism; Copper-containing amine oxidase; Gene expression; Fruit ripening

桃(*Prunus persica* L.)味美多汁,营养丰富,是深受人们喜爱的大众水果。2019年我国桃生产面积和产量均位居世界第一位。然而,桃果实成熟后极易软化腐烂,不耐贮藏,严重制约桃产业的发展。大部分桃都属于典型的呼吸跃变型果实,其成熟衰老受到乙烯的紧密调控。乙烯是果实成熟的关键调控因子,能够激活各种参与果实成熟、软化、色泽形成和糖分积累等代谢相关酶的活性,加速果实成熟衰老进程^[1]。生长素(auxin, IAA)能够刺激乙烯合成,IAA合成受阻导致乙烯不能正常释放,桃果实不变软^[2-3]。此外,脱落酸(abscisic acid, ABA)和NO等也参与果实成熟衰老调控^[4-5]。多胺(polyamine)是一类植物生长调节剂,能够广泛参与植物生长发育、成熟衰老及逆境胁迫应答等多种生理过程。有研究报道,多胺作为一种乙烯作用拮抗剂能抑制内源乙烯合成,延缓桃果实成熟衰老^[6]。此外,有研究发现,多胺能够与IAA和ABA等激素相互作用共同调控果实成熟^[7]。多胺积累与果实成熟衰老密切相关,外源添加多胺或通过基因工程增加内源多胺积累量均可有效延缓果实成熟衰老^[8-9]。在果实发育早期多胺含量较高,而随着果实成熟衰老多胺含量逐渐降低这一现象已在众多植物中报道,但目前这一生理现象的分子机制尚不明晰。

植物体内最常见的3种多胺分别是腐胺(putrescine, Put)、亚精胺(spermidine, Spd)和精胺(spermine, Spm)。Put、Spd和Spm的合成分别由精氨酸脱羧酶(ADC)、Spd合成酶(SPDS)和Spm合成酶(SPMS)催化反应而来,Spd和Spm的合成同时还需要硫腺苷甲硫氨酸脱羧酶(SAMDC)的参与^[10-12]。植物体内多胺氧化分解主要由两类酶催化完成。第一类酶为二胺氧化酶(DAO),由于含有二价Cu²⁺,也称为铜胺氧化酶(CuAO)。CuAO主要催化Put的氧化反应,同时生成氨(NH₄⁺)和过氧化氢(H₂O₂)等产物。第二类酶为多胺氧化酶(PAO),主要参与催化Spd、Spm及其乙酰化衍生物的分解代谢,同时产生二氨基丙烷(Dap, 1,3-diaminopropane)和H₂O₂等产物。有研究报道,多胺分解是导致葡萄成熟过程中多胺积累降低的主要原因,而采用PAO抑制剂处理能够显著延缓葡萄果实成熟^[13-14]。在番茄成熟过程中同样发现多胺含量降低与多胺氧化酶(Polyamine oxidase, PAO)基因表达升高密切相关^[15]。CuAO和PAO氧化多胺产生的H₂O₂可能作为一种信号分子

加速果实成熟衰老^[16]。最近发现草莓FaPAO5通过介导Spd和Spm分解,抑制果实成熟^[17]。

笔者实验室前期研究发现,多胺分解是导致桃果实成熟过程中多胺积累降低的主要原因,并且PAO介导的多胺分解能够在桃果实成熟中发挥重要作用^[18]。然而CuAO介导的多胺分解在桃果实成熟中的作用依然不清楚。本研究中笔者在桃基因组中共鉴定到4个CuAO候选基因(*PpCuAO1~4*),分析了CuAO基因在桃果实发育过程中的表达水平,同时利用转基因技术验证了*PpCuAO4*在多胺分解中的作用,将为进一步研究多胺分解在桃果实成熟中的功能提供重要理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为河南农业大学科教园区6年生黄水蜜桃,采用独立主干树形,株行距1.5 m×3.5 m,常规田间管理。

1.2 桃果实发育和成熟过程中多胺含量的测定

选择不同发育时期(S1为第一次迅速生长期, S2为果核硬化期, S3为第二次迅速生长期, S4为成熟后期)黄水蜜桃果实,同一时期果实要求大小一致、成熟度一致、无病虫害和机械损伤。取中果皮部分于液氮速冻保存,用于测定自由态Put、Spd和Spm含量。多胺提取方法为乙腈浸提法:取桃果肉于液氮中研磨至粉末,称取粉末约0.5 g,加入2 mL 20%乙腈,冰水浴中超声提取30 min; 4℃, 10 000 g离心3 min,取上清液,沉淀以2 mL 20%乙腈再提取1次;以乙腈定容至5 mL; 4℃, 10 000 g离心3 min,取上清液1 mL,过0.22 μm有机相滤膜,采用poroshell 120 SB-C18反相色谱柱上机检测。利用液相质谱(HPLC-MS)检测,流动相为A:B=(乙腈):(水/0.1%甲酸),流速为0.3 mL·min⁻¹。多胺含量测定采用高效液相质谱联用法,由南京钟鼎生物技术有限公司完成。

1.3 桃 *PpCuAO* 基因家族成员发掘及信息学分析

为了挖掘桃基因组中CuAO家族成员信息,采用目前已经报道的拟南芥CuAO(AtAO1, AtCuAO1~3)和苹果CuAO(MdAO1~5)氨基酸序列在桃基因组数据库中进行搜索比对。采用DNAMAN软件(Version6.0)^[19]进行氨基酸序列比对,采用GS-DS软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析基因结

构^[20],采用MEGA(Version4.1)软件分析不同物种CuAO亲缘关系^[21]。利用MapDraw软件进行染色体定位作图^[22]。

1.4 桃果实*PpCuAO*基因表达分析

桃果实总RNA提取方法参见生工生物工程(上海)股份有限公司柱式植物总RNA提取试剂盒(Spin Column Plant total RNA Purification Kit)说明书。使用Nanodrop 2000分光光度计对提取总RNA浓度及纯度进行检测,通过琼脂糖凝胶电泳确定

RNA完整性。用TaKaRa公司的RNA反转录试剂盒(TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit)合成cDNA,将反应产物于-80℃保存备用。

桃*PpCuAO1~4*和烟草*NtCuAO1*及*NtMPO1*定量引物采用Primer Premier 5软件设计^[23]。分别使用桃*PpEF2*和烟草*Ntactin*作为内参基因,具体引物序列见表1。荧光定量试验采用ABI(Applied Biosystems)7500 Fast系统,运行程序为95℃ 30 s,然后进行40个循环:95℃ 3 s,60℃ 30 s。基因表达量采用

表 1 定量分析所用引物序列
Table 1 Primers used for qPCR

基因名称 Gene name	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')	产物大小 Product size/bp
<i>PpCuAO1</i>	TTGGAGATGAAGGCCACGTC	GGCGTTAACGGGGTTTGTTTC	198
<i>PpCuAO2</i>	CCGCTTAATGATTGCCACG	ACGCGATATCACCCGCATAG	124
<i>PpCuAO3</i>	GATCTTGACGTGGATGGCGA	AGCTCCGATGGCTTCAAACA	167
<i>PpCuAO4</i>	AGCTCGTATGGACATGGCAG	ACAATCCAATGGCGAGCAGA	195
<i>NtMPO1</i>	GAGGTCAAGATGGGATGCG	CCTCCTTTGGTTCTCGGCAT	128
<i>NtCuAO1</i>	TAACTGCTCTCCGGCTGTTG	TGGCAGTGGACTTTGCTACA	101
<i>PpEF2</i>	AGCAGGCTCTTGGTGGTATCT	GATTCAATGACGGGGAGGTAG	178
<i>Ntactin</i>	CCGATGCCCTGAAGTCCTTT	ACATAGTCGAACCGCCACTG	152

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[24]。

1.5 烟草瞬时转化及检测

依据 pRI 101-AN 载体的多克隆位点和*PpCuAO4*目的基因编码区的全长序列,设计带有同源臂引物(F:GCGCATATGATGGCCGCAACTCAG-GAA,R:GCGGGTACTTAGAGCTTAGCCAGTAG)并扩增其全长。利用同源重组法构建 pRI 101-*PpCuAO4*超表达载体,将重组质粒转化入农杆菌GV3101菌株。利用农杆菌介导的遗传转化方法将重组质粒瞬时转化到本氏烟草叶片,在25℃、16 h/8 h(光照/黑暗)、65%~70%相对湿度的条件下培养3 d。取转基因烟草叶片进行阳性检测,并测定自由态多胺含量,多胺含量检测方法同1.2。同时对转基因烟草叶片进行3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色,检测多胺分解产物H₂O₂含量。具体方法:将整个叶片剪下并充分浸泡在DAB溶液中,常温弱光下处理8 h,随后将叶片放入95%(v)乙醇中煮沸脱色,进行观察并拍照。

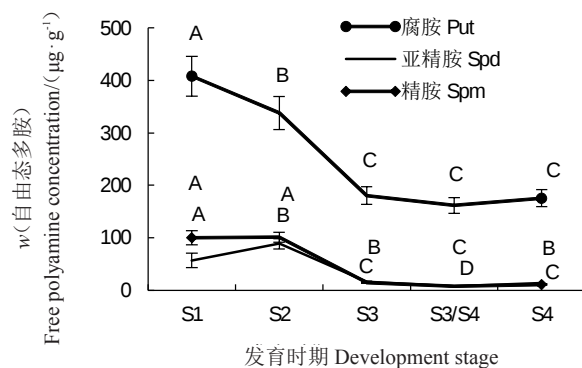
1.6 数据统计与分析

采用Excel 2016和SPSS 17.0进行数据处理及差异显著性分析,差异显著性分析检验方法为*t*检验($p < 0.01$)。使用SigmaPlot 12.5软件作图。

2 结果与分析

2.1 黄水蜜桃果实的多胺含量

检测桃果实发育和成熟期间果实多胺含量,结果显示(图1),整体上3种自由态多胺含量均在果实发育前期最高,随果实发育成熟逐渐降低,并且均显著低于S1时期多胺水平。其中,Put和Spd含量均在桃果实发育S1时期含量最高,而Spm含量从S1



不同大写字母表示在 $p < 0.01$ 差异显著。

Different capital letters indicate significant difference at $p < 0.01$.

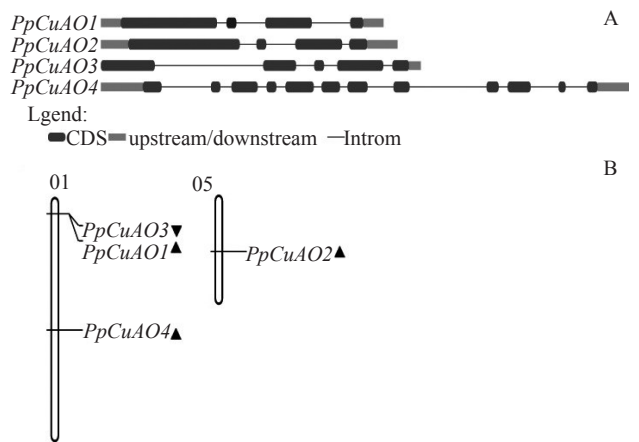
图 1 黄水蜜桃果实发育过程多胺含量

Fig. 1 Detection of free polyamines content in the peach cultivar of Huangshuimi during fruit development and ripening

PpCuAO1 和 PpCuAO3 氨基酸序列相似度最高,但仅仅达到 56%,其次为 PpCuAO1 和 PpCuAO2 氨基酸序列相似度为 47%,其余氨基酸序列相似度为 27%~46%。虽然不同 PpCuAO 之间氨基酸序列差异较大,但依然存在一些比较保守的序列,比如已被证明植物 CuAO 相对保守的 33 个氨基酸残基在各 PpCuAO 成员中均被发现(图 2 标星号)。与 AtCuAO1 一样, PpCuAO1、PpCuAO2 和 PpCuAO3 氨基酸序列均包含有 N 端信号肽序列(图 2 黑色边框),说明其可能定位在细胞外间隙。PpCuAO4 与 AtCuAO3 氨基酸序列相似度最高,达到 87%。并且 PpCuAO4 与拟南芥 AtCuAO3 氨基酸序列相同,都具有过氧化物酶体信号肽序列(PTS1),暗示其可能定位在过氧化物酶体,同时与 AtCuAO3 具有相似的功能。

对桃 PpCuAO 和其他已报道植物 CuAO 的亲缘关系进行分析,结果显示,植物 CuAO 可以分为两个亚族(图 3)。与氨基酸序列比对结果相似, PpCuAO1、PpCuAO2 和 PpCuAO3 均属于第一亚族,并且 PpCuAO2 和 PpCuAO3 分别与苹果 MdAO2 和 MdAO3 亲缘关系最近,而 PpCuAO1 与蓖麻 RcCuAO 亲缘关系最近。PpCuAO4 则属于第二亚族并且与苹果 MdAO1 亲缘关系最为接近。PpCuAO 基因结构分析结果显示, PpCuAO1 和 PpCuAO2 基因

结构相同,均含有 4 个外显子和 3 个内含子(图 4-A)。PpCuAO3 则含有 5 个外显子和 4 个内含子。而 PpCuAO4 基因结构最为复杂,含有 12 个外显子和 11 个内含子。染色体定位分析 4 个 PpCuAO 成员分别位于第 1、5 号染色体上,并且 PpCuAO1、PpCuAO3、PpCuAO4 均位于第 1 号染色体上(图 4-B)。



A. 桃 CuAO 基因结构;B. 桃 CuAO 基因染色体定位。三角形表示基因转录方向,数字表示染色体编号。

A. Gene structures of the peachCuAO genes; B. Distribution of the CuAO genes on peach chromosomes. The triangles indicate the transcription direction. The chromosome numbers are indicated at the top of each bar.

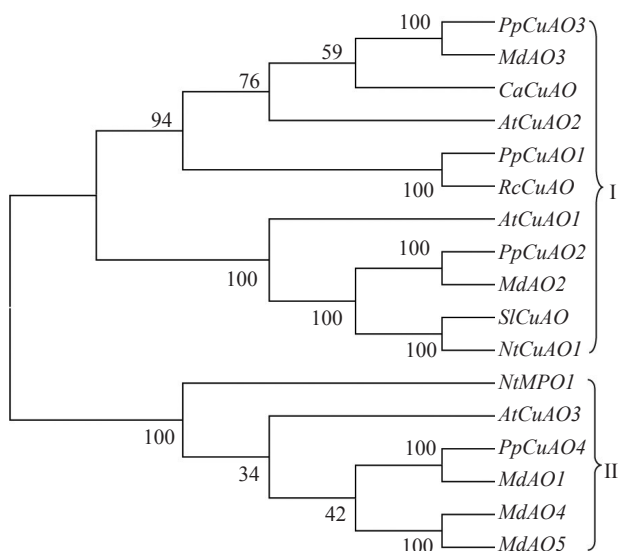
图 4 桃 CuAO 基因结构和染色体定位

Fig. 4 Gene structure and chromosome location analysis of four PpCuAO genes

2.3 PpCuAO 在不同组织及果实不同发育时期的表达分析

为了研究 PpCuAO 基因在不同组织器官的表达情况,分别检测了 PpCuAO 基因在花、叶片和果实中的表达水平。结果显示,各 PpCuAO 基因在不同组织器官中均有表达,但表达水平呈现明显的组织特异性(图 5)。具体来说, PpCuAO1 和 PpCuAO2 呈现相似的表达模式,二者均在成熟叶片中表达量最高,其次为幼叶和果实,而在花中表达水平最低,并且二者在花器官不同组织同样表现出明显的组织特异性(图 5-A~B)。与此结果相反的是, PpCuAO3 和 PpCuAO4 均在花器官中具有最高表达水平,并且在雌蕊中表达水平远高于花瓣、萼片和雄蕊(图 5-C~D)。同时, PpCuAO3 和 PpCuAO4 均在果实中表达水平最低。但 PpCuAO3 在幼叶和成熟叶中表达水平相当,而 PpCuAO4 在成熟叶中表达水平远低于幼叶。

为了研究 PpCuAO 在桃果实发育中的功能,进



Pp. 桃;Md. 苹果;At. 拟南芥;Nt. 烟草;Ca. 鹰嘴豆;Rc. 蓖麻。

Pp. Peach; Md. Apple; At. Arabidopsis; Nt. Tobacco; Ca. Chickpea; Rc. Ricinus.

图 3 植物 CuAO 亲缘关系分析

Fig. 3 Phylogenetic tree showing sequence relationships among CuAOs from different species

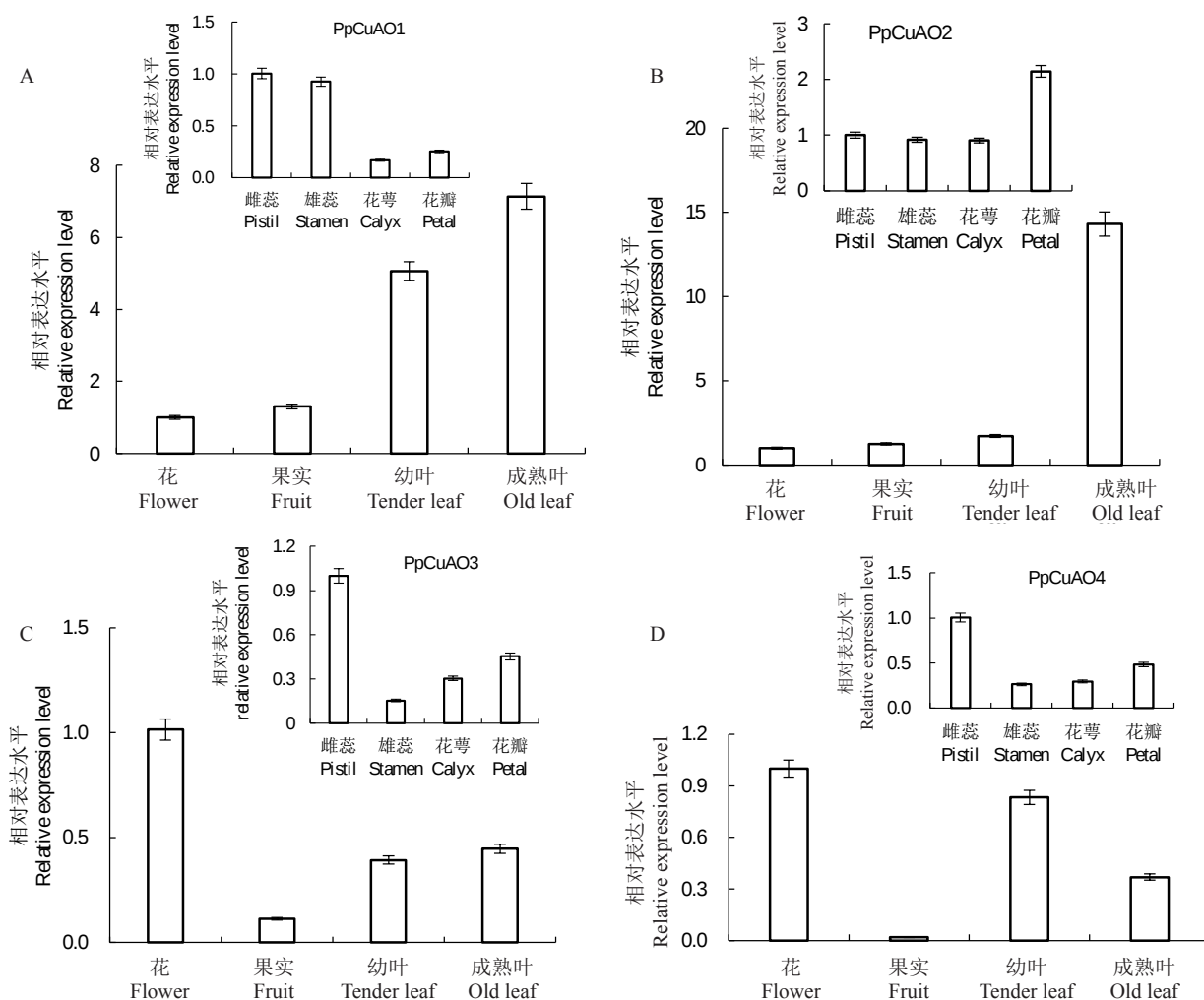
图5 *PpCuAO* 在不同组织器官的表达水平

Fig. 5 Expression patterns of peach CuAO genes in various organs

一步分析了 *PpCuAO1~4* 在黄水蜜桃果实不同发育阶段的表达模式(图6)。 *PpCuAO1* 在桃果实发育期间呈现明显下调表达趋势,但是在 S2/S3 时期表达量有 1 个小的上升高峰(约为 S2 时期的 2 倍水平),随后又逐渐降低(图 6-A)。而 *PpCuAO2* 在 S1 到 S3 时期呈现显著上调表达模式,其中在 S2/S3 时期表达水平最高,为 S1 时期的 20 倍左右,随后在 S3 到 S4 时期表达水平迅速降低到 S1 时期的 1/2 到 1/3(图 6-B)。 *PpCuAO3* 表达模式整体上呈现上升趋势,并且呈现两个高峰,第一个峰值在 S2/S3 时期,表达水平约为 S1 时期表达水平的 5 倍左右,随后在 S3/S4 时期回落到 S1 时期表达水平,而在 S4 时期迅速升高到第二个峰值,约为 S1 时期表达水平的 10 倍以上(图 6-C)。 *PpCuAO4* 表达模式整体上也呈现上升趋势,但在 S2 时期略有降低(约为 S1 时期水平的 1/3),其余时期表达水平均逐渐升高,并且

在 S4 时期达到峰值,为 S1 时期表达水平的 10 倍以上(图 6-D)。

2.4 *PpCuAO* 在外源多胺处理下的表达模式

为了研究 *PpCuAO1~4* 在多胺代谢中的功能,进一步分析了其不同多胺处理下的表达模式。分析结果显示,在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Put 处理下 *PpCuAO1* 和 *PpCuAO2* 基因表达水平无显著变化,仅在个别时期有升高或降低。而 *PpCuAO3* 基因表达则受到 Put 明显诱导,表达水平显著升高并且在处理 48 h 达到最高水平,超过 0 h 表达水平的 20 倍(图 7)。与 *PpCuAO3* 基因表达模式相反,Put 处理后 *PpCuAO4* 表达水平呈现明显下调趋势,在处理 48 h 达到最低水平,仅为 0 h 表达水平的 1/5。在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Spd 处理下, *PpCuAO1* 和 *PpCuAO2* 基因表达水平均呈现显著下调趋势,而 *PpCuAO2* 表达水平在 0 h 到 24 h 无明显变化,仅在 48 h 突然显著升高,约为 0 h 表达

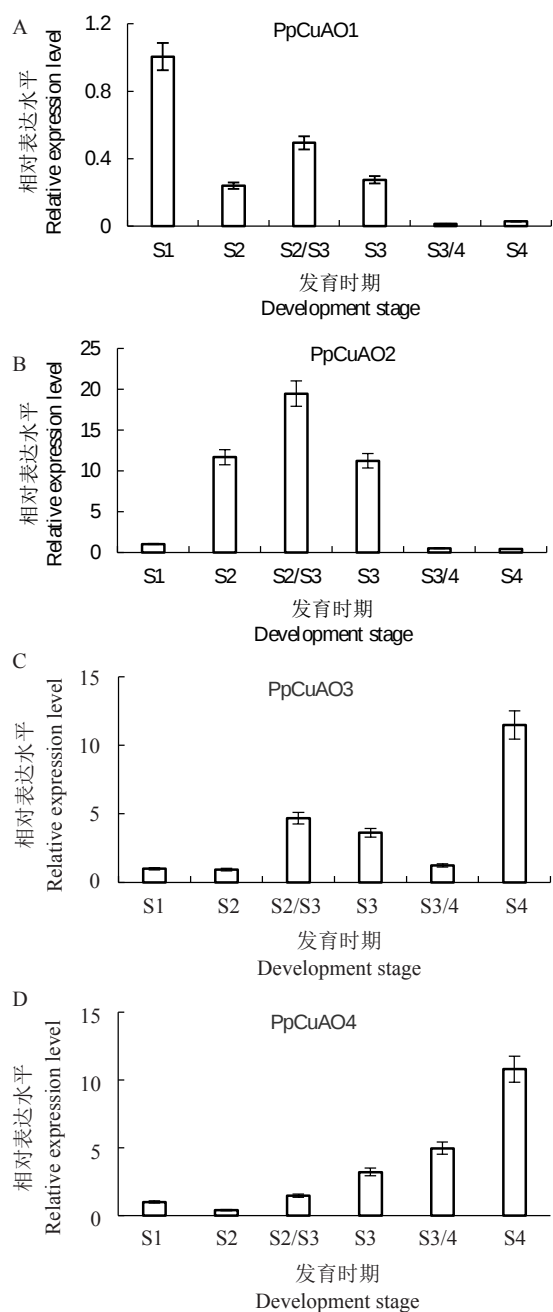


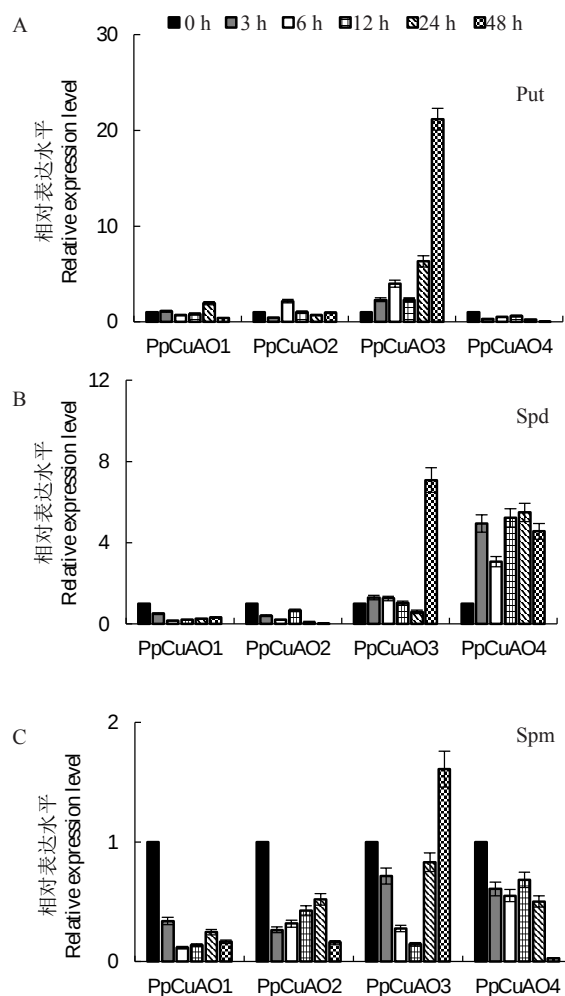
图6 *PpCuAO* 在果实不同发育时期的表达水平

Fig. 6 Expression patterns of peach *CuAO* genes during peach fruit development and ripening

水平的7倍。与此相反, Spd处理下 *PpCuAO4* 基因表达水平显著上调, 且始终保持较高水平。Spm处理下, *PpCuAO1~4* 表达水平均呈现明显下调趋势, 仅有 *PpCuAO3* 基因表达水平在48 h处略有上升(图7)。*PpCuAO1~4* 在不同多胺处理下表现出不同的表达模式, 暗示可能在多胺分解代谢中发挥不同的作用。

2.5 *PpCuAO4* 在多胺分解中的功能验证

为了进一步研究 *PpCuAO* 在多胺分解代谢中的功能, 将果实成熟过程中受到明显诱导的



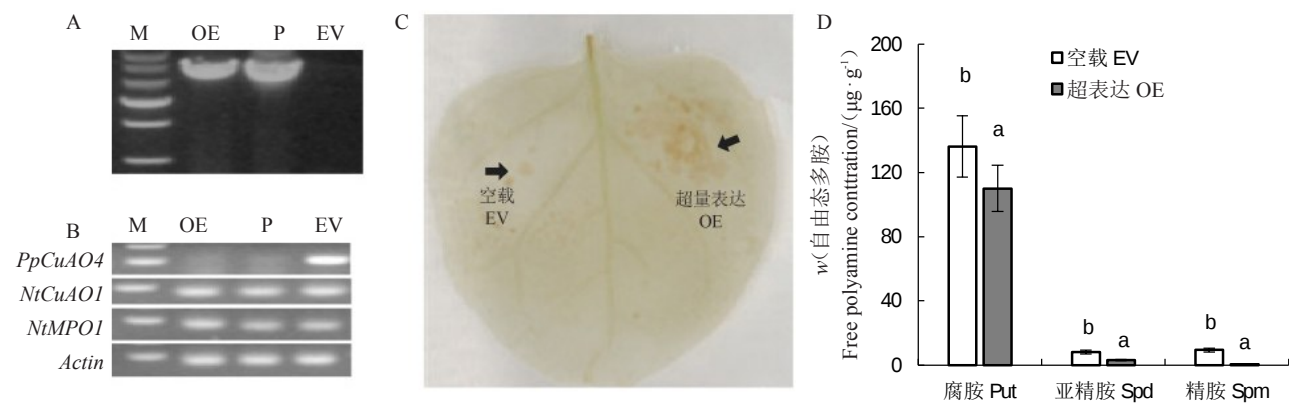
A~C. *PpCuAO1~4* 分别在 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Put, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Spd 和 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Spm 处理下的表达分析。

A-C: The expression level of *PpCuAO1 to 4* under the treatment of $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Put, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Spd and $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Spm, respectively.

图7 *PpCuAO* 在不同多胺处理下的表达模式分析

Fig. 7 The expression pattern of *PpCuAO* under PA treatment

PpCuAO4 基因克隆并在烟草中超量表达。转基因阳性植株检测结果如图8-A所示。对转基因烟草目的基因 *PpCuAO4* 表达量进行检测, 表明该基因成功在烟草中超量表达(图8-B)。同时还检测了烟草铜胺氧化酶基因 *NtCuAO1* 和 *NtMPO1* 的表达量, 结果显示, 在转基因植株以及对对照植株中2个基因表达量均无明显差别(图8-B)。采用DAB染色检测多胺分解产物 H_2O_2 含量, 结果显示, 与空载对照相比, 超表达 *PpCuAO4* 烟草DAB染色明显较深, 说明转基因烟草多胺分解产生的 H_2O_2 含量较高(图8-C)。同时检测了转基因烟草多胺含量, 结果显示 Put、Spd 和 Spm 三种多胺含量均显著降低,



A. 转基因烟草阳性检测; B. 转基因烟草 *PpCuAO4*、*NtCuAO1* 和 *NtMPO1* 表达分析; C. 转基因烟草 DAB 染色; D. 转基因烟草多胺含量检测。M. DNA mark; OE. 超量表达; P. 阳性质粒; EV. 空载; WT. 野生型。不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 差异显著 (t 检验)。

A. Genomic PCR detection of transgenic tobacco leaves; B. Expression analysis of *PpCuAO4*, *NtCuAO1* and *NtMPO1* in transient transgenic tobacco leaves with RT-PCR; C. DAB staining of transgenic tobacco leaves; D. Detection of free PA concentration of transgenic tobacco leaves. M. DNA mark; OE. Over-expression line, P. Positive plasmid, EV. Empty vector, WT. Wild type. Different small letters indicate significant difference at $p < 0.05$ (Student's t -test).

图8 *PpCuAO4* 转基因烟草多胺含量检测

Fig. 8 Polyamine concentration in tobacco leaves transiently expressing *PpCuAO4*

尤其是 Spd 和 Spm 含量分别仅为对照水平的 1/3 和 1/10 (图 8-D)。上述结果说明, *PpCuAO4* 参与多胺氧化分解代谢, 超表达 *PpCuAO4* 基因促进转基因烟草内源多胺分解, 而烟草植株内源铜胺氧化酶基因表达无明显变化。

3 讨论

大量研究表明, 果实发育初期多胺含量较高, 随着果实成熟多胺含量逐渐降低, 这种现象在跃变型果实和非跃变型果实中均有报道^[13]。本实验室前期研究表明, 桃果实成熟过程中多胺分解是导致多胺含量降低的主要原因, 并且 PAO 介导的多胺分解在桃果实成熟中发挥重要作用^[18]。本研究通过分析黄水蜜桃果实发育过程中自由态多胺含量的变化, 发现随着果实成熟 Put、Spd 和 Spm 含量均显著降低, 其中 Put 含量在 S1~S3 时期降低尤为显著。同时, 笔者也注意到在 S3/S4 到 S4 时期 3 种多胺含量均无明显变化, 似乎与铜胺氧化酶基因表达随果实成熟不断升高自相矛盾。实际上前期研究已经表明在桃果实成熟过程中多胺合成关键基因 *PpADC* 和 *PpSAM-DC* 表达均显著升高, 因此推测在 S3/S4 到 S4 时期 3 种多胺含量无明显变化可能是由于多胺合成和分解的动态平衡^[18]。然而, CuAO 是否与多胺积累降低有关以及 CuAO 介导的多胺分解在桃果实成熟中的功能尚不明确。本研究中笔者在桃基因组中鉴定到

4 个 CuAO 候选基因 (*PpCuAO1*~4)。通过分析不同组织及器官、果实不同发育时期表达水平, 发现 *PpCuAO1*~4 基因表达呈现明显的组织特异性, 并且 *PpCuAO2*~4 基因在果实发育后期均受到不同程度诱导, 尤其是 *PpCuAO3* 和 *PpCuAO4* 基因在果实发育期间表达水平上升尤为明显, 暗示该基因可能参与桃果实成熟过程。前人研究报道, 不同 CuAO 成员在多胺分解中发挥不同作用, 且拟南芥中 CuAO 能同时参与 Put 和 Spd 的分解代谢^[25]。同时, 为了进一步研究 *PpCuAO* 基因在多胺分解中的功能, 分析了外源多胺处理下各基因表达水平, 结果表明, *PpCuAO3* 表达受到 Put 明显诱导而 *PpCuAO4* 表达受到 Spd 明显诱导, 说明 *PpCuAO3* 可能参与 Put 分解代谢, 而 *PpCuAO4* 可能参与 Spd 分解代谢, 同时也暗示各成员在多胺分解代谢中发挥不同作用, 与前人研究一致。进一步在烟草中超表达 *PpCuAO4* 基因, 发现转基因烟草多胺含量显著降低, 尤其是 Spd 和 Spm 均显著低于对照水平, 说明该基因可能参与 Put、Spd 和 Spm 的分解代谢。进一步结合 *PpCuAO4* 基因表达受到外源 Spd 诱导但被 Put 和 Spm 处理抑制的情况进行分析, 说明该基因可能参与 Spd 分解代谢。同时, *PpCuAO4* 在桃果实发育过程中基因表达逐渐升高与多胺含量逐渐降低正好相对应, 说明该基因介导的多胺分解与多胺含量降低具有直接相关性^[26]。

4 结 论

在桃基因组中共鉴定了4个 *CuAO* 候选基因 (*PpCuAO1~4*), 其中 *PpCuAO4* 表达量随果实发育和成熟逐渐升高。进一步研究表明, *PpCuAO4* 基因可能参与 Spd 的分解代谢, 说明 *PpCuAO4* 介导的多胺分解是桃果实发育和成熟过程中多胺含量降低的重要原因。

参考文献 References:

- ALEXANDER L, GRIERSON D. Ethylene biosynthesis and action in tomato: A model for climacteric fruit ripening[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(377):2039-2055.
- TATSUKI M, NAKAJIMA N, FUJII H, SHIMADA T, NAKANO M, HAYASHI K I, HAYAMA H, YOSHIOKA H, NAKAMURA Y. Increased levels of IAA are required for system 2 ethylene synthesis causing fruit softening in peach (*Prunus persica* L. Batsch.) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(4):1049-1059.
- PAN L, ZENG W F, NIU L, LU Z H, LIU H, CUI G C, ZHU Y Q, CHU J F, LI W P, FANG W C, CAI Z G, LI G H, WANG Z Q. *PpYUC11*, a strong candidate gene for the stony hard phenotype in peach (*Prunus persica* L. Batsch.), participates in IAA biosynthesis during fruit ripening[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(22):7031-7044.
- YANG Q Z, WANG F, RAO J P. Effect of putrescine treatment on chilling injury, fatty acid composition and antioxidant system in kiwifruit[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9):e0162159.
- YUE P T, LU Q, LIU Z, LÜ T X, LI X Y, BU H D, LIU W T, XU Y X, YUAN H, WANG A D. Auxin-activated MdARF5 induces the expression of ethylene biosynthetic genes to initiate apple fruit ripening[J]. *The New Phytologist*, 2020, 226(6):1781-1795.
- 汪开拓, 雷长毅, 韦盼盼, 刘群, 黎春红, 蒋永波. 亚精胺处理对桃果实贮藏品质及内源乙烯和多胺代谢的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(10):92-99.
WANG Kaituo, LEI Changyi, WEI Panpan, LIU Qun, LI Chunhong, JIANG Yongbo. Effects of spermidine treatment on storage quality and endogenous ethylene and polyamine metabolism of peach fruits[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(10):92-99.
- GUO J, WANG S, YU X, DONG R, LI Y, MEI X, SHEN Y. Polyamines regulate strawberry fruit ripening by ABA, IAA, and ethylene[J]. *Plant Physiology*, 2018, 177(1):339-351.
- NAMBEESAN S, DATSENKA T, FERRUZZI M G, MALLADI A, MATTOO A K, HANDA A K. Overexpression of yeast spermidine synthase impacts ripening, senescence and decay symptoms in tomato[J]. *Plant Journal*, 2010, 63(5):836-847.
- MIRDEHGHAN S H, RAHIMI S. Pre-harvest application of polyamines enhances antioxidants and table grape (*Vitis vinifera* L.) quality during postharvest period[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196(1):1040-1047.
- ALCZAR R, ALTABELLA T, MARCO F, BORTOLOTTI C, REYMOND M, KONCZ C, CARRASCO P, TIBURCIO A F. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance[J]. *Planta*, 2010, 231(6):1237-1249.
- DIASLL C, RIBEIRO D M, CATARINA C S, BARROS R S, FLOH E I S, OTONI W C. Ethylene and polyamine interactions in morphogenesis of *Passiflora cincinnata*: effects of ethylene biosynthesis and action modulators, as well as ethylene scavengers[J]. *Plant Growth Regulation*, 2010, 62(1):9-19.
- GUPTA K, DEY A, GUPTA B. Plant polyamines in abiotic stress responses[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(7):2015-2036.
- AGUDELO-ROMERO P, BORTOLLOTTI C, PAIS M S, TIBURCIO A F, FORTES A M. Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 67(3):105-119.
- AGUDELO-ROMERO P, ALI K, CHOI Y H, SOUSA L, VERPOORTE R, TIBURCIO A F, FORTES A M. Perturbation of polyamine catabolism affects grape ripening of *Vitis vinifera* cv. Trincadeira[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 74:141-155.
- TSANIKLIDIS G, KOTSIRAS A, TSAFOUROS A, ROUSSOS P A, AIVALAKIS G, KATINAKIS P, DELIS C. Spatial and temporal distribution of genes involved in polyamine metabolism during tomato fruit development[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 100:27-36.
- FORTES A M, AGUDELO-ROMERO P. Polyamine metabolism in climacteric and non-climacteric fruit ripening polyamines [M]. New York: Humana Press, 2018:433-447.
- MO A, XU T, BAI Q, SHEN Y Y, GAO F, GUO J X. FaPAO5 regulates Spm/Spd levels as a signaling during strawberry fruit ripening[J]. *Plant Direct*, 2020, 4(5):1-14.
- WANG W, ZHENG X B, LIU S H, TAN B, CHENG J, YE X, LI J D, FENG J C. Polyamine oxidase (PAO)-mediated polyamine catabolism plays potential roles in peach (*Prunus persica* L.) fruit development and ripening[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2021, 17(1):10.
- YAO F, XU X Y, DU X, CAO K, PAN Q. Detection and characterization of a theta-replicating plasmid pLP60 from *Lactobacillus plantarum* PC518 by inverse PCR[J]. *Heliyon*, 2019, 5(8):e02164.
- HU B, JIN J, GUO A Y, ZHANG H, LUO J, GAO G. GSIDS 2.0: An upgraded gene feature visualization server[J]. *Bioinformatics*, 2014, 31(8):1296-1297.
- YANG Q, FENG W, RAO J. Effect of putrescine treatment on chilling injury, fatty acid composition and antioxidant system in kiwifruit[J]. *Plos One*, 2016, 11(9):e0162159.
- 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw, 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏 [J]. *遗传*, 2003, 25(3):317-321.
LIU Renhu, MENG Jinling. MapDraw: A microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data[J]. *Hereditas*, 2003, 25(3):317-321.
- JIAN Y, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, CUTCUTACHE I, ROZEN S, MADDEN T L. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction [J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13(1):134.
- LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- PLANAS-PORTELL J, GALLART M, TIBURCIO A F, ALTABELLA T. Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13(1):109.
- WANG W, PASCHALIDIS K, FENG J C, SONG J, LIU J H. Polyamine catabolism in plants: a universal process with diverse functions[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:561.