

新几内亚凤仙 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因的 克隆及表达分析

李凡, 张晓丽, 赵潞秋, 石万磊, 谭弋, 黄美娟, 黄海泉

(西南林业大学园林园艺学院/国家林业和草原局西南风景园林工程技术研究中心/云南省功能性花卉资源及
产业化技术工程研究中心/西南林业大学园林园艺花卉研发中心, 昆明 650224)

摘要: 通过对新几内亚凤仙 (*Impatiens hawkeri*) 指甲花醌合成相关基因 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 的克隆及表达分析, 以期为解析其合成途径提供一定的理论依据。基于新几内亚凤仙指甲花醌含量测定和转录组测序数据分析, 克隆到 1 个 *CCoAOMT* 和 2 个 *SAMS* 基因, 将其命名为 *IhCCoAOMT*、*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2*。3 种处理 (光培养、暗培养和前体物 DHNA (1, 4-dihydroxy-2-naphthoate) 诱导) 均能促进指甲花醌积累, 且暗培养处理最佳。*IhCCoAOMT* 的 cDNA 全长为 729 bp, 编码 242 aa, 其蛋白具有 AdoMet_MTases 超家族结构域; *IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 的 cDNA 全长分别为 1179 bp 和 1173 bp, 分别编码 393 aa 和 391 aa, 其蛋白均具有 S-AdoMet_synt 超家族结构域。系统进化分析表明, *IhCCoAOMT* 与喜马拉雅凤仙亲缘关系最近; *IhSAMS1* 与 *IhSAMS2* 可能为旁系同源。qRT-PCR 分析表明, 3 个基因在新几内亚凤仙的 3 个处理及 4 个时期中均有表达, 其中 *IhCCoAOMT* 在暗培养及前体物 DHNA 诱导中表达量整体上调, 且暗培养第 60 天时表达量最高; *IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 在暗培养及 DHNA 诱导中表达量整体下调, 但 *IhSAMS1* 在 DHNA 诱导中表达量较高, *IhSAMS2* 在暗培养中表达量较高。综上所述, 推测 *IhCCoAOMT* 在指甲花醌处理后后期起主要作用, *IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 在其早期起主要作用, 且 *IhSAMS2* 作用更为显著。

关键词: 新几内亚凤仙; 指甲花醌; *CCoAOMT*; *SAMS*; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of *CCoAOMT* and *SAMS* Genes in *Impatiens Hawkeri*

LI Fan, ZHANG Xiaoli, ZHAO Luqiu, SHI Wanlei, TAN Yi, HUANG Meijuan, HUANG Haiquan

(College of Landscape Architecture and Horticulture Sciences, Southwest Forestry University/Southwest Research Center for Engineering Technology of Landscape Architecture (State Forestry and Grassland Administration)/Yunnan Engineering Research Center for Functional Flower Resources and Industrialization/ Research and Development Center of Landscape Plants and Horticulture Flowers, Southwest Forestry University, Kunming 650224)

Abstract: Through cloning and analyzing the expression of the *CCoAOMT* and *SAMS* genes in *Impatiens hawkeri*, we provided a theoretical basis for understanding the biosynthesis of 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone (MNQ). Based on the quantification of MNQ content and the transcriptome profile datasets in *I. hawkeri*, one *CCoAOMT* and two *SAMS* genes of *I. hawkeri* were identified and cloned, named *IhCCoAOMT*, *IhSAMS1* and *IhSAMS2*. Three treatments including light, dark and DHNA (1, 4-dihydroxy-2-naphthoate) could promote the MNQ accumulation, with best performance under dark culture. The full-length coding sequence of *IhCCoAOMT*

收稿日期: 2023-08-18 修回日期: 2023-09-25 网络出版日期: 2023-10-11

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230818001>

第一作者研究方向为园林植物遗传育种, E-mail: 2098175323@qq.com

通信作者: 黄美娟, 研究方向为园林植物遗传育种, E-mail: xmhq2001@163.com

黄海泉, 研究方向为园林植物遗传育种, E-mail: haiquan@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (32060364, 32060366); 云南省重大科技专项 (202102AE090052); 园林植物遗传改良与高效繁育博士生导师团队项目 (503210103)

Foundation projects: The National Natural Science Foundation of China (32060364, 32060366); The Major Science and Technology Project of Yunnan Province (202102AE090052); The Doctoral Supervisor Team Project of Garden Plant Genetic Improvement and Efficient Breeding (503210103)

is 729 bp and encodes 242 aa containing the AdoMet_MTases superfamily domain. The CDS of *IhSAMS1* and *IhSAMS2* are 1179 bp and 1173 bp, which encode 393 aa and 391 aa, respectively. Their deduced proteins were predicted with the S-AdoMet_synt superfamily domain. Phylogenetic analysis showed that *IhCCoAOMT* was closely related to *I. glandulifera*. *IhSAMS1* and *IhSAMS2* of *I. hawkeri* may be paralogous genes. These genes were detected with transcripts at four culture periods under three treatments. The expression level of *IhCCoAOMT* increased in dark culture and DHNA treatment, and the highest expression was found on 60 days post dark culture. The expression levels of *IhSAMS1* and *IhSAMS2* were decreased in dark culture and DHNA treatment. The expression level of *IhSAMS1* was higher than that in DHNA treatment, and a higher expression of *IhSAMS2* was observed under dark culture treatment. Collectively, *IhCCoAOMT* was speculated with a key role at the late stage of MNQ treatment, while *IhSAMS1* and *IhSAMS2*, especially for *IhSAMS2*, possibly played roles at the early stage.

Key words: *Impatiens hawkeri*; 2-methoxy-1,4-Naphthoquinone; *CCoAOMT*; *SAMS*; expression analysis

凤仙花属 (*Impatiens* L.) 植物是一种富含天然药用成分的观赏及药用植物, 在亚洲国家被广泛用作传统医药治疗各种人类疾病^[1-3], 其次生代谢产物指甲花醌 (MNQ, 2-methoxy-1,4-naphthoquinone) 具有抗菌、抗皮炎和抗肿瘤等作用。指甲花醌及其前体物指甲花醌均为 1,4-萘醌类物质, 都通过聚酮化合物、莽草酸和类异戊二烯途径合成^[4-6], 且结构上与萘相关, 其特征在于酮基取代了 C1 和 C4 位 (1,4-萘醌)^[7]。研究表明 1,4-萘环来源于莽草酸途径和邻琥珀酰苯甲酸途径, 且指甲花醌生物合成过程也被称为 1,4-二羟基-2-萘酸 (DNHA, 1,4-dihydroxy-2-naphthoate) 途径^[5]。DHNA 是植物体中多种 1,4-萘醌类物质 (指甲花醌、叶绿醌、胡桃醌等) 的生物合成关键前体, Widhalm 等^[6] 研究发现茶花凤仙花 (*I. balsamina*) 中指甲花醌和叶绿醌均来自于 DHNA, 且指甲花醌又是指甲花醌的直接前体。迄今 DHNA 下游参与 1,4-萘醌类物质合成的酶和用于指甲花醌生物合成的酶均尚未确定。然而, 有研究报道称指甲花醌是由一种未知的酶通过将 DHNA 氧化脱羧形成的, 且还有学者提出指甲花醌是由一种具有 S-腺苷甲硫氨酸依赖性的 O-甲基转移酶活性的酶通过将指甲花醌的羟基甲基化形成的^[6, 8-9]。本研究基于课题组前期工作成功筛选出与指甲花醌合成相关的 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因, 为进一步验证其对新几内亚凤仙指甲花醌生物合成影响奠定基础。

咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶 (*CCoAOMT*, Caffeoylcoenzyme A-O-methyltransferase) 是一类 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM, S-adenosine methionine) 甲基转移酶, 其作为一种依赖 SAM 的氧甲基转移酶能够将 SAM 的甲基转移到苯环上, 从而对苯丙烷、类黄酮、生物碱、花青素和香豆素等多种化合物起到催化作用^[10]。研究表明 *CCoAOMT* 是木质素生物合

成过程中的一种关键性甲基转移酶类, 其主要在苯丙烷途径中参与木质素的生物合成过程^[11]; 王礼洪等^[12] 同样指出 *CCoAOMT* 是茶叶多酚中表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG, epigallocatechin gallate) 甲基化生物合成的一种重要酶, 且 Zhang 等^[13] 已证实 *CCoAOMT* 能催化 EGCG 形成多种甲基化类似物; Liao 等^[14] 研究还发现 *CCoAOMT* 是一种高效的多功能 O-甲基转移酶, 其能够参与柑橘中聚甲氧基黄酮 (PMFs, polymethoxylated flavones) 的生物合成。S-腺苷甲硫氨酸合酶 (*SAMS*, S-adenosylmethionine synthase) 是催化甲硫氨酸和 ATP 合成 SAM 的唯一酶, SAM 作为生物体内重要的甲基供体, 在 *CCoAOMT* 转移甲基过程中提供甲基, 从而参与生物体中咖啡碱、多胺、乙烯等多种次生代谢产物的生物合成。研究表明, 拟南芥中鉴定到 4 个 *SAMS* 基因, 其分别为 *AtMAT1*、*AtMAT2*、*AtMAT3* 和 *AtMAT4*^[15], 同时 Meng 等^[16] 研究发现 *AtMAT3* 可以在体外与 *AtMAT1*、*AtMAT2*、*AtMAT4* 及其自身相互作用, 且 Yang 等^[17] 研究发现其还可以直接与 S-腺苷-L-同型半胱氨酸水解酶 (*SAHH*, S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase) 相互作用, 并与 *CCoAOMT7* 形成甲基供体复合物作用于阿魏酸盐甲基化。由此表明, *CCoAOMT* 和 *SAMS* 之间不仅存在相互作用, 且均对植物的生长发育、物质代谢以及响应逆境胁迫过程发挥着重要作用。

新几内亚凤仙 (*Impatiens hawkeri*) 隶属凤仙花科 (Balsaminaceae) 凤仙花属 (*Impatiens* L.) 多年生草本植物, 其花色丰富, 花期较长, 具有较高的观赏价值, 广泛应用于盆栽、地栽、花坛及花镜等; 其提取物还具有药用、食用和化工等作用。目前新几内亚凤仙的研究有叶斑病、霜霉病、离体快繁及其叶绿体基因组测序等方面^[18-20]。但迄今为止, 国内外

尚未见有关凤仙花指甲花醚生物合成相关基因的报道。本研究通过课题组前期工作成功筛选到指甲花醚合成相关基因 *CCoAOMT* 和 *SAMS*, 在此基础上采用 qRT-PCR 探究其在新几内亚凤仙指甲花醚生物合成过程中不同处理及不同时期的时空表达模式, 进而探讨 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因在新几内亚凤仙指甲花醚生物合成过程中的功能与作用, 以期解析凤仙花属植物指甲花醚生物合成途径提供一定的基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以课题组前期离体快繁培育的新几内亚凤仙 (*Impatiens hawkeri*) 丛生芽为材料, 分别随机混合采集光培养(光下 16 h, 暗下 8 h 间隔培养)、暗培养和 DHNA 诱导光下培养第 15 天、30 天、45 天及 60 天的植物材料, 每组试验 50 瓶, 重复 3 次。部分处理时期的生长状态如图 1, 本试验以 50 mg/L DHNA 诱导光下培养为材料, 且由图可知 150 mg/L DHNA 为半致死浓度, 300 mg/L DHNA 为致死浓度。其中暗培养及 DHNA 诱导培养为处理组, 光培养为对照组。



A: 光下培养 30 d; B: 暗培养 30 d; C、D、E: 50、150、300 mg/L DHNA 诱导下培养 30 d

A: Cultured under light for 30 d; B: Cultured in dark for 30 d; C, D, E: 50, 150, 300 mg/L DHNA induction culture for 30 d

图 1 新几内亚凤仙丛生芽 3 种处理下的生长状态

Fig.1 Growth status of cluster bud of *I. hawkeri* under three treatments

1.2 试验方法

1.2.1 不同处理下新几内亚凤仙丛生芽指甲花醚含量测定 精准称量 1.0 g 光培养、暗培养和 DHNA 诱导培养第 30 天、60 天的干样磨成细粉, 甲醇浸提后旋蒸富集成样品用于高效液相色谱 (HPLC, high performance liquid chromatography) 测定, 每组试验重复 3 次。色谱柱为 Hypersil-GOLD-C18 柱, 流动相为 5% 水(A)-95 % 甲醇(B), 检测时间段为 0 ~ 10 min, 流速为 0.3 mL/min, 柱温 27.5 °C, 进样量为 10 μL, 检测波长为 280 nm。指甲花醚标准品浓度梯度为 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mg/mL。运用 Excel 统计数据, 利用 SPSS26.0 软件进行数据显著性分析。

1.2.2 新几内亚凤仙总 RNA 的提取与 *CCoAOMT*

和 *SAMS* 基因的克隆 新几内亚凤仙总 RNA 的提取采用 OMEGA 试剂盒, 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, 并用核酸蛋白检测仪检测其浓度和质量, cDNA 的合成按照全式金逆转录试剂盒操作步骤进行合成。根据测序公司提供的新几内亚凤仙转录组数据设计引物(表 1), 进行 PCR 扩增, 其反应体系均为 20 μL (模板 1 μL, 上下游引物各 1 μL, 10× PCR Buffer (Mg²⁺) 2.4 μL, dNTP Mixture 1.6 μL, Easy Taq 0.2 μL, dd H₂O 12.8 μL), *IhCCoAOMT* 基因反应条件: 预变性 94 °C 5 min; 变性 94 °C 30 s, 退火 68 °C 30 s, 延伸 72 °C 1 min, 共 35 个循环。2 个 *SAMS* 基因的退火温度均为 57 °C, 延伸时间均为 1 min 30 s, 其他条件同上。PCR 产物回收纯化后, 连接到 pMD19-T 载体上, 构建重组质粒转化到 DH5α 感受态细胞, 筛选阳性克隆并进行测序。

1.2.3 生物信息学分析 利用 ExPasy-ProtParam 软件 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 对蛋白质的基本理化性质分析; 利用德泰生物在线网址 (<http://www.detaibio.com/tools/hydropathy-analysis.html>, <http://www.detaibio.com/tools/signal-peptide.html>, <http://www.detaibio.com/tools/chou-fasman-forecast.html>) 分别对蛋白质亲疏水性、信号肽和二级结构预测; 利用 SWISS-MODEL 软件 (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 对蛋白质三级结构预测; 利用 STRING 在线数据库 (<https://string-db.org/>) 预测基因编码蛋白间的互作关系; 利用 NCBI 中 BLAST 在线工具检索其同源蛋白序列并运用 DNAMAN 对其进行序列相似性比对; 运用 MEGA10.0 构建系统发育树。

1.2.4 新几内亚凤仙 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因的时空表达特性分析 (1) RNA 提取及逆转录: 分别提取新几内亚凤仙光培养、暗培养和 DHNA 诱导培养第 15 天、30 天、45 天、60 天的 RNA, 逆转录成 cDNA 备用。

(2) 引物设计: 根据 cDNA 序列利用 NCBI 中结合 Primer-BLAST 在线工具引物设计原则来设计 qRT-PCR 引物(表 1), 内参基因为 *Actin*。

(3) 荧光定量 PCR: 反应体系为 20 μL (qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL, 上下游引物各 0.4 μL, dd H₂O 8.2 μL, 模板 1 μL), 反应条件: 预变性 95 °C 5 min; 变性 95 °C 10 s, 退火 60 °C 20 s, 延伸 72 °C 30 s, 40 个循环。根据 qRT-PCR 结果记录 Ct 值, 每组试验重复 3 次, 采用 2^{-ΔΔCt} 计算方法分析基因的相对表达量。运用 Excel 统计数据, 利用 SPSS 26.0 软件进行数据显著性分析, Origin 软件制图。

表 1 所用引物信息

Table 1 Information of primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Purpose
<i>IhCCoAOMT</i> -F	ATGGCGGCCAACGGCGACAACATG	全长克隆
<i>IhCCoAOMT</i> -R	TCAGGCGACACGGCGCAGAG	
<i>IhSAMS1</i> -F	ATGGAGACCTTCTGTTTACATCTGAATC	qRT-PCR
<i>IhSAMS1</i> -R	TTAAGCTTGAGGCTTCTCCATTG	
<i>IhSAMS2</i> -F	ATGGACACATTCCTATTCACCTCAGAATC	
<i>IhSAMS2</i> -R	TCAAGCTTTCGGCTTCAGCG	
<i>Actin</i> -F	GTTCTGTCCATTCCTCATCTGTC	
<i>Actin</i> -R	CCCTGAGGAATCCAGTGAGC	
<i>qIhCCoAOMT</i> -F	AAGAGCCTTCTCCAAAGCGA	
<i>qIhCCoAOMT</i> -R	CAGAAACTGACCCCTCGTCCG	
<i>qIhSAMS1</i> -F	TCTACCCAGCAGCAGCAAAC	
<i>qIhSAMS1</i> -R	AAACACCTCCTAGCAAGCCC	
<i>qIhSAMS2</i> -F	GAACGAAGGCCATCCAGACA	
<i>qIhSAMS2</i> -R	CTTGGTCCACCAGCTCCGATT	

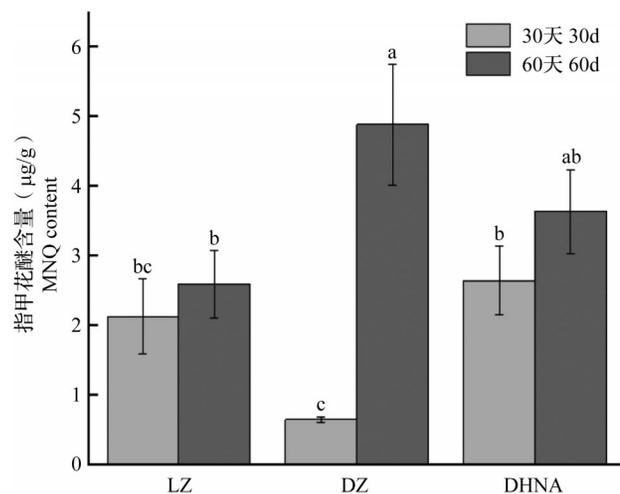
2 结果与分析

2.1 标准品与样品的 HPLC 测定

为了探究指甲花醚含量与基因表达之间的关系,利用 HPLC 技术分别对光培养、暗培养和 DHNA 诱导培养第 30 天和第 60 天的植物材料进行指甲花醚含量测定(图 2)。结果表明,指甲花醚标准曲线的回归方程为 $y = 7 \times 10^7 x + 16521$ ($r = 0.9993$);光培养、暗培养和 DHNA 诱导培养第 30 天的指甲花醚含量分别为 2.13 $\mu\text{g/g}$ 、0.65 $\mu\text{g/g}$ 、2.65 $\mu\text{g/g}$,培养第 60 天的指甲花醚含量分别为 2.60 $\mu\text{g/g}$ 、4.89 $\mu\text{g/g}$ 、3.64 $\mu\text{g/g}$;从中发现 3 种处理下指甲花醚含量随培养时间的延长均逐渐积累,暗培养能有效促进指甲花醚的生物合成,其中暗培养第 60 天的指甲花醚含量最高,但暗培养第 30 天的指甲花醚含量最低,二者差异倍数为 7.28 倍,推测暗培养初期新几内亚凤仙丛生芽为了适应环境变化延迟了指甲花醚生物合成相关基因的表达。

2.2 新几内亚凤仙 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因的克隆

将目的基因命名为 *IhCCoAOMT*、*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2*,经 PCR 扩增获得其全长 cDNA 序列,分别为 729 bp、1179 bp 和 1173 bp(图 3),分别编码 242 aa、393 aa 和 391 aa,NCBI 登录号分别为 OR067819、OR067820 和 OR067821。比较全长 cDNA 与基因组 gDNA 序列,发现 *IhCCoAOMT* 由 4 个外显子和 3 个内含子组成,内含子长度分别为 98 bp、84 bp 和 107 bp;*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 均没有内含子(图 4)。



LZ:光培养;DZ:暗培养;DHNA:DHNA 诱导培养;其中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);下同

LZ:Light culture; DZ:Dark culture; DHNA: DHNA induced culture; Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$); The same as below

图 2 不同样品中指甲花醚含量

Fig.2 Content of MNQ in different samples

2.3 新几内亚凤仙 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因的序列结构分析

运用 ExPasy-ProtParam 对新几内亚凤仙 *IhCCoAOMT*、*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 基因编码蛋白质的基本理化性质分析结果显示(表 2),3 个蛋白均为稳定性亲水蛋白,均不存在信号肽和跨膜结构,表明其可能在细胞质内起作用。蛋白质二级结构预测表明,3 个蛋白的二级结构均为混合型,在 *IhCCoAOMT* 结构域中 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链

和 β 转角的比例分别为40.08%、31.82%、19.42%和8.68%，在IhSAMS1结构域中它们的比例分别为36.22%、40.31%、14.54%和8.93%，在IhSAMS2结构域中它们的比例分别为35.64%、41.03%、15.13%和8.21%。SWISS-MODEL三级结构预测分析表明，IhCCoAOMT的空间结构与MsCCoAOMT相似度为89.21%；IhSAMS1和IhSAMS2的空间结构与AtSAMS的相似度分别为93.37%和87.40%（图5）。运用NCBI CDD对结构域进行分

析，结果显示IhCCoAOMT基因具有AdoMet_MTases超家族结构域；IhSAMS1和IhSAMS2基因均具有S-AdoMet_synt超家族结构域（图6）。通过同源比对，从STRING数据库中选择了与IhCCoAOMT、IhSAMS1和IhSAMS2相似性较高的序列，制作了拟南芥中CCoAOMT1的互作网络，结果表明新几内亚凤仙IhCCoAOMT与IhSAMS1、IhSAMS2可能存在互作用，共同参与指甲花醚的生物合成（图7）。

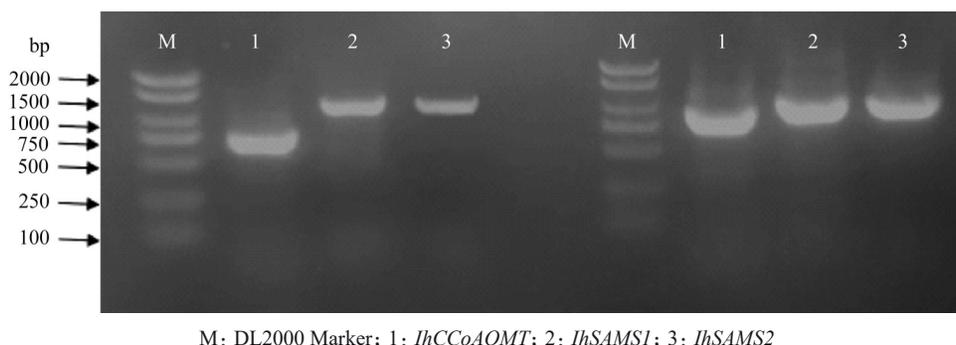


图3 新几内亚凤仙IhCCoAOMT、IhSAMS1和IhSAMS2基因的cDNA(左)和gDNA(右)PCR扩增

Fig.3 PCR amplification of cDNA (left) and gDNA (right) of IhCCoAOMT, IhSAMS1, and IhSAMS2 genes of *I. hawkeri*

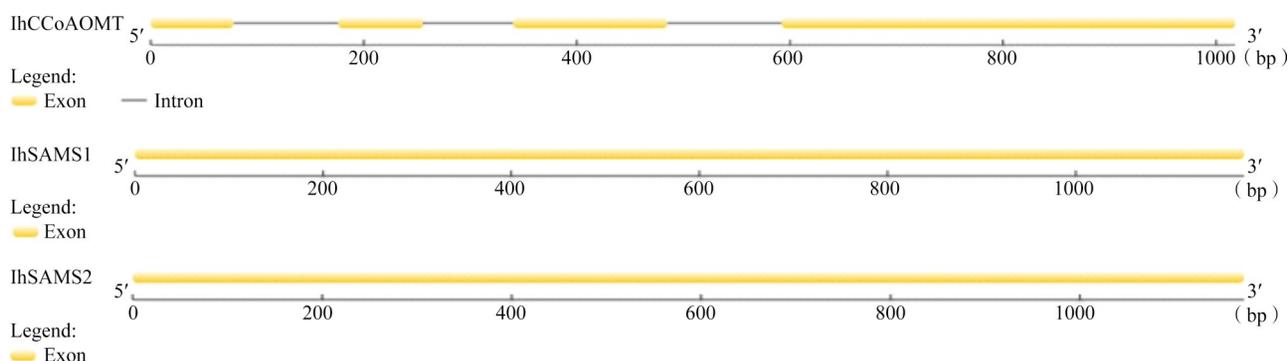
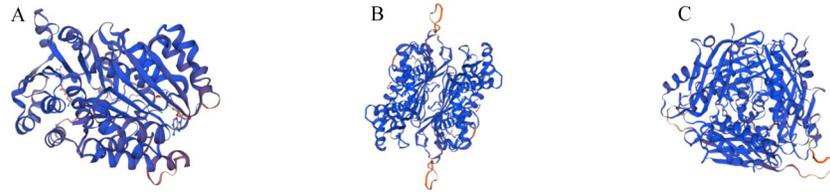


图4 新几内亚凤仙IhCCoAOMT、IhSAMS1和IhSAMS2基因的组成结构
Fig.4 Genomic structures of IhCCoAOMT, IhSAMS1, and IhSAMS2 genes of *I. hawkeri*

表2 新几内亚凤仙IhCCoAOMT、IhSAMS1和IhSAMS2基因氨基酸的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of amino acids of IhCCoAOMT, IhSAMS1 and IhSAMS2 genes of *I. hawkeri*

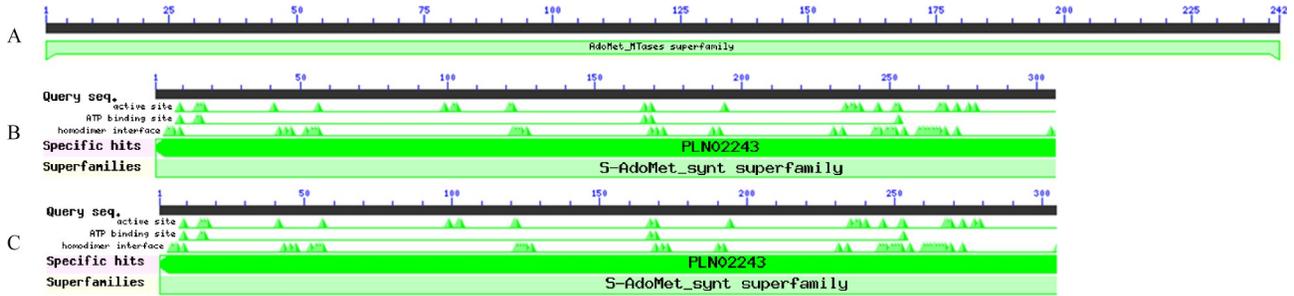
基因 Gene	分子式 Molecular formula	相对分子质量 Protein molecular weight	等电点 Isoelectric point	总原子数 Total atomic number	不稳定系数(%) Instability index	GRAVY值 GRAVY value
IhCCoAOMT	C ₁₂₁₉ H ₁₉₂₇ N ₃₂₁ O ₃₅₉ S ₁₁	27176.31	5.20	3837	32.07	-0.168
IhSAMS1	C ₁₉₀₂ H ₃₀₀₄ N ₅₂₀ O ₅₈₁ S ₁₅	42932.81	5.68	6022	25.24	-0.288
IhSAMS2	C ₁₈₈₂ H ₂₉₉₁ N ₅₁₇ O ₅₇₄ S ₁₅	42525.47	6.19	5979	28.96	-0.304



A: IhCCoAOMT; B: IhSAMS1; C: IhSAMS2

图5 新几内亚凤仙 *IhCCoAOMT*、*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 的三级结构预测

Fig.5 Tertiary structure prediction of *IhCCoAOMT*, *IhSAMS1*, and *IhSAMS2* proteins of *I. hawkeri*



A: *IhCCoAOMT*; B: *IhSAMS1*; C: *IhSAMS2*

图6 新几内亚凤仙 *IhCCoAOMT*、*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 基因的保守结构域

Fig.6 Conserved domains of *IhCCoAOMT*, *IhSAMS1*, and *IhSAMS2* genes of *I. hawkeri*

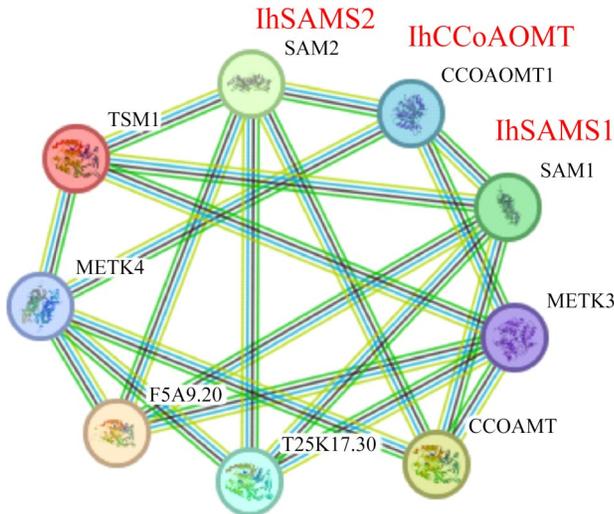


图7 新几内亚凤仙 *IhCCoAOMT* 蛋白相互作用预测模型

Fig.7 Prediction model of *IhCCoAOMT* protein interaction in *I. hawkeri*

2.4 新几内亚凤仙 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因的系统进化分析

运用DNAMAN对来自不同物种的 *IhCCoAOMT*、*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 基因的蛋白序列进行同源性分析,发现新几内亚凤仙 *IhCCoAOMT* 基因与喜马拉雅凤仙花 (XP_047339085)、陆地棉 (XP_040940528)、哥伦比亚锦葵 (XP_021277446) 等物种的序列相似性较高,达到了 76.56 % 以上; *IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 基因与喜马拉雅凤仙花 (XP_047325460)、甜瓜 (XP_008461384)、雷蒙德氏棉 (XP_012475021) 等的序列

相似性较高,达到了 94.54 % 以上。通过 MEGA10.0 构建系统进化树, *IhCCoAOMT* 与喜马拉雅凤仙花聚在一起,表明其亲缘关系最近; *IhSAMS1* 也与喜马拉雅凤仙花聚在一起,但 *IhSAMS2* 单独聚在一个分支,由此推测 2 个 *SAMS* 基因可能为旁系同源关系(图 8)。

2.5 新几内亚凤仙 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因的表达特性研究

研究表明 *IhCCoAOMT*、*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 基因在新几内亚凤仙的 3 个处理(光培养、暗培养和 DHNA 诱导培养)及 4 个培养时期(培养 15 d、30 d、45 d、60 d)中均有表达(图 9)。 *IhCCoAOMT* 在光培养下第 15 天时表达量较低,其他时期表达量均较高且几乎保持稳定;在暗培养和 DHNA 诱导中 *IhCCoAOMT* 表达量整体上调,且均在第 60 天时表达量最高,其分别与 DHNA 诱导第 30 天的相对表达量差异倍数分别为 33.75 倍和 11.0 倍;由此表明,该基因对暗培养响应更为显著。 *IhSAMS1* 在光培养中表达量几乎不变,但 *IhSAMS2* 表现为先上升后下降的趋势,但其表达量总体较高;在暗培养及 DHNA 诱导中 2 个基因表达量整体均下调,其中 *IhSAMS1* 在 DHNA 诱导中表达量较高,且在第 15 天时表达量最高,其与光培养第 45 天的相对表达量差异倍数为 30.07 倍;而 *IhSAMS2* 在暗培养中表达量较高,且在第 15 天时表达量最高,与 DHNA 诱导第 45 天的相对

表达量差异倍数为32.6倍。综上所述,3个基因可能均对新几内亚凤仙指甲花醚生物合成具有重要影响,推测 *IhCCoAOMT* 在以依赖 SAM 甲基转移的过程中对指甲花醚处理后期起主要作用;而 *IhSAMS1* 和

IhSAMS2 在以 SAM 为底物提供甲基的过程中对指甲花醚处理早期起主要作用,且 *IhSAMS2* 对新几内亚凤仙指甲花醚的合成影响更为显著。

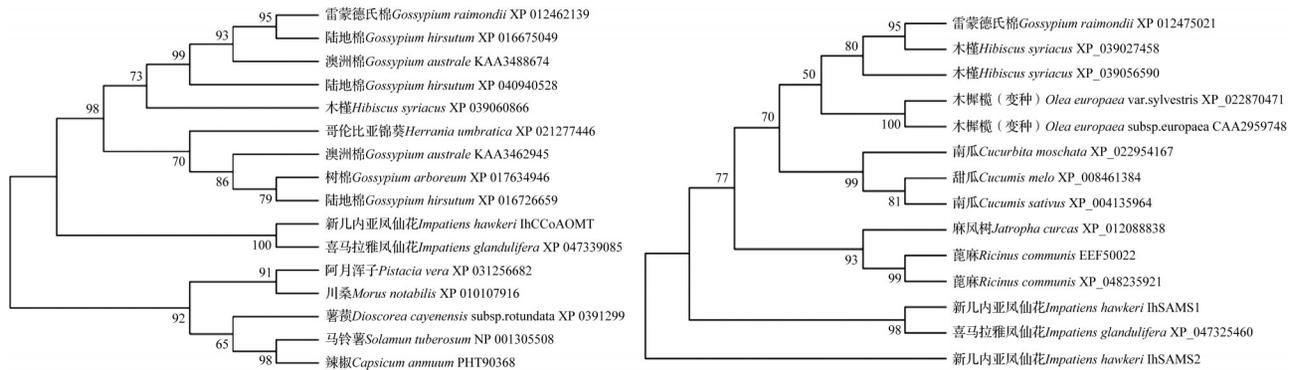
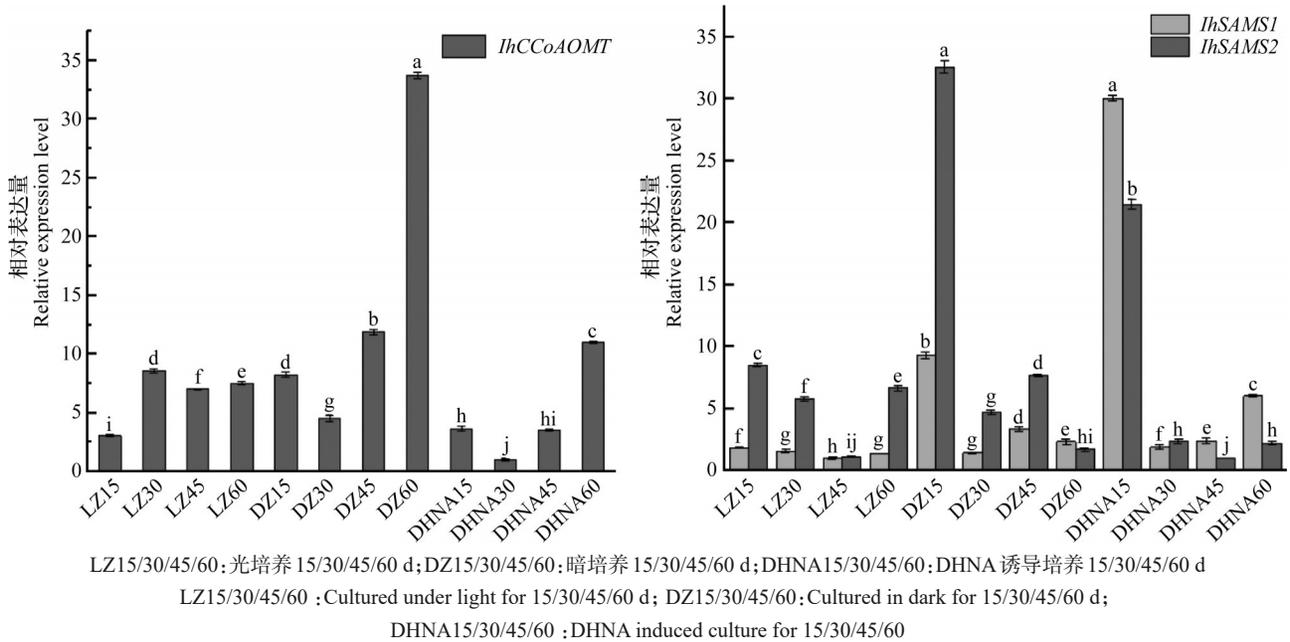


图8 基于新几内亚凤仙 *CCoAOMT*(左)和 *SAMS*(右)基因氨基酸序列构建的系统发育树

Fig.8 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of *CCoAOMT* (left) and *SAMS* (right) genes from *I. hawkeri*



LZ15/30/45/60: 光培养 15/30/45/60 d; DZ15/30/45/60: 暗培养 15/30/45/60 d; DHNA15/30/45/60: DHNA 诱导培养 15/30/45/60 d
 LZ15/30/45/60 : Cultured under light for 15/30/45/60 d; DZ15/30/45/60: Cultured in dark for 15/30/45/60 d;
 DHNA15/30/45/60 : DHNA induced culture for 15/30/45/60

图9 *CCoAOMT*(左)和 *SAMS*(右)基因在新几内亚凤仙 3 个处理及其 4 个时期的时空表达模式分析

Fig.9 The spatiotemporal expression pattern analysis of *CCoAOMT* (left) and *SAMS* (right) genes in three treatments and four periods of *I. hawkeri*

3 讨论

本研究成功测定了 3 种处理下 2 个培养时期的指甲花醚含量,结果表明暗培养能显著促进新几内亚凤仙指甲花醚含量积累,这与其他弱光处理均能促进次生代谢产物积累的研究结果相似^[21-22]。目前,DHNA 已被明确为指甲花醌的直接前体^[6],但尚未见其作为前体物的相关报道;由测定结果表明 DHNA 诱导对新几内亚凤仙指甲花醚含量积累具有促进作用,但其效果比暗培养较差,这可能是

DHNA 作为前体物对新几内亚凤仙的代谢过程产生了负反馈调节,也可能是在培养过程中 DHNA 被消耗完致使诱导作用并不显著,亦或是 DHNA 作为很多 1,4-萘醌类物质的合成前体也促进了其他物质的生物合成。此外,本研究样品中指甲花醌含量极低以致不能被定量,这可能是新几内亚凤仙花原本含量较低,或是指甲花醌被快速转化为指甲花醚等因素所导致,其具体机理有待进一步研究。

CCoAOMT 是一种依赖 SAM 高效的多功能甲基转移酶,不仅对烟草、苧麻等木质素生物合成起

到关键调控作用^[23-24],其还能够催化EGCG和PMFs等多种化合物的甲基化发生^[13-14];甲硫氨酸以底物的形式提供甲基并与SAMS作用合成SAM,且有研究表明SAMS与CCoAOMT存在互作^[17],其共同对植物的生长发育、物质代谢以及响应逆境胁迫等发挥着重要作用。本研究从新几内亚凤仙中成功分离克隆了指甲花醚生物合成相关基因*IhCCoAOMT*、*IhSAMS1*和*IhSAMS2*,其cDNA全长分别为729 bp、1179 bp和1173 bp,分别编码242 aa、393 aa和391 aa,均属于稳定蛋白。基因组结构分析表明,*IhCCoAOMT*基因由4个外显子和3个内含子组成,这与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)由4个外显子和3个内含子组成结果一致^[25],与砀山酥梨(*Pyrus bretschneideri*)由5个外显子和4个内含子组成的结果存在差异^[26];倪志勇等^[27-28]从棉花(*Gossypium hirsutum*)中分离到2个CCoAOMT基因,其分别具有3个和4个内含子,这表明不同或同种植物间该基因均存在着差异性;但该基因内含子左右边界为GT-AG结构,表明不同植物CCoAOMT基因结构中内含子剪切位点均保持一致,说明CCoAOMT基因在不同植物中具有一定的保守性。*IhSAMS1*和*IhSAMS2*基因组结果分析表明其有较为相似的保守基序和基因结构,均没有内含子,这与茶树(*Camellia sinensis*)和黄瓜(*Cucumis sativus*)等SAMS基因结构较为相似^[29-30]。蛋白二级结构预测分析表明*IhCCoAOMT*含有丰富的 α -螺旋和无规则卷曲,这与陈凌娜等^[31]对巨龙竹(*Dendrocalamus sinicus*)中DsCCoAOMT蛋白的研究结果一致;且该基因密码子偏好性分析表明,其选择偏好性较强且偏好以G/C结尾,这与陈凌娜等^[31]研究结果也一致。*IhSAMS1*和*IhSAMS2*蛋白二级结构预测表明,其与张玉荣等^[32]对大乌草(*Balsas teosinte*)的研究结果一致,均表现为该类基因的二级结构主要由无规则卷曲组成。蛋白互作预测表明,新几内亚凤仙SAMS和其他同源性较高的METK3、METK4等均可能与CCoAOMT之间存在互作,这与Yang等^[17]研究结果一致。同源性分析表明,CCoAOMT和SAMS基因的氨基酸序列与喜马拉雅凤仙(XP_047339085、XP_047325460)的同源性较高,分别为76.56%和94.54%;进化分析表明,*IhCCoAOMT*与喜马拉雅凤仙聚在一起,表明同属植物间其物种亲缘关系最近;*IhSAMS1*与喜马拉雅凤仙也聚在一起,但*IhSAMS2*单独为一分支,由此推测2个SAMS基因可能为旁系同源关系。

研究表明CCoAOMT基因在植物体所有组织部位中均能表达,但其在不同组织部位及其不同生长发育时期的表达特性具有明显差异。王丹阳等^[26]研究表明砀山酥梨在盛花后期第21天到第40天的发育过程中*PbCCoAOMT*基因随发育时间的延长其基因表达量逐渐上调;且陈凌娜等^[31]研究发现随着竹笋的发育*DsCCoAOMT*基因的表达量也逐渐上调,这都与本研究中发现*IhCCoAOMT*基因在暗培养及DHNA诱导培养的第15天到第60天中其表达量整体上调结果相似,表明该基因在参与不同植物的生长发育过程中均发挥着重要作用。此外,张夏燕^[33]研究发现CCoAOMT基因也可以通过促进木质素大量合成来提高植株对于干旱胁迫的抗性;Shaipulah等^[34]还发现CCoAOMT下调表达能够激活牵牛花中花青素的生物合成。本研究中新几内亚凤仙暗培养及DHNA诱导处理对SAMS基因表达影响与张悦等^[35]对刚毛柃柳采用盐胁迫及模拟干旱处理结果相似,即该基因在处理一定时间内其表达量呈下调趋势。研究表明SAMS基因在植物体中具有明显的组织特异性表达,张寒冰^[36]对大麦研究表明*HvSAMS2*在根中表达量最高,叶片的表达量次之,茎中的表达量最低;倪飞等^[37]研究表明*BISAMS1*在光皮桦叶中的整体表达量较高,*BISAMS2*和*BISAMS3*在茎中的表达量随着木质化程度的增加而升高,且在木质部中优势表达。此外,Choi等^[38]研究还发现SAMS基因在抗寒性和抗氧化等逆境条件中也发挥着重要作用。

本研究成功测定了不同处理及不同培养时期的指甲花醚含量,克隆了新几内亚凤仙指甲花醚生物合成相关基因*IhCCoAOMT*、*IhSAMS1*和*IhSAMS2*,并对其进行生物信息学分析和不同处理及不同培养时期的时空表达特性研究,推测这两类基因对参与新几内亚凤仙指甲花醚生物合成过程均发挥了重要作用,为进一步验证其基因功能和基因之间的相互作用以及为解析指甲花醚生物合成途径提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Oku H, Ishiguro K. Antipruritic and antidermatitic effect of extract and compounds of *Impatiens balsamina* L. in atopic dermatitis model NC mice. *Phytotherapy Research*, 2001, 15 (6): 506-510
- [2] Wang Y C, Lin Y H. Anti-gastric adenocarcinoma activity of 2-Methoxy-1, 4-naphthoquinone, an anti-Helicobacter pylori compound from *Impatiens balsamina* L. *Fitoterapia*, 2012, 83

- (8): 1336-1344
- [3] Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Simultaneous determination of three naphthoquinones in the leaves of *Impatiens balsamina* L. by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem Analysis*, 2010, 21 (5): 444-450
- [4] Socaciu C. Food colorants: Chemical and functional properties. Boca Raton: Chemical Rubber Company Press. 2007, 357-373
- [5] Nowicka B, Kruk J. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2010, 1797(9): 1587-1605
- [6] Widhalm J R, Rhodes D. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1, 4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Horticulture Research*, 2016, 21 (3): 16046
- [7] Babula P, Adam V, Havel L L, Kizek R. Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones-their occurrence, pharmacological properties and analysis. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2009, 5: 47-68
- [8] Liscombe D K, Louie G V, Noel J P. Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. *Natural Product Reports*, 2012, 29 (10): 1238-1250
- [9] Foong L C, Chai J Y, Ho A S H, Yeo B P H, Lim Y M, Tam S M. Comparative transcriptome analysis to identify candidate genes involved in 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone (MNQ) biosynthesis in *Impatiens balsamina* L. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 16123
- [10] Xu R X, Zhao Y, Gao S, Zhang Y Y, Li D D, Lou H X, Cheng A X. Functional characterization of a plastidal cation-dependent O-methyltransferase from the liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. *Phytochemistry*, 2015, 118: 33-41
- [11] Tong N N, Peng L P, Liu Z A, Li Y, Zhou X Y, Wang X R, Shu Q Y. Comparative transcriptomic analysis of genes involved in stem lignin biosynthesis in woody and herbaceous *Paonia* species. *Physiologia Plantarum*, 2021, 173 (3): 961-977
- [12] 王礼洪, 魏升昀, 刘欢, 苏银山, 武增才, 字成庭. 甲基化表没食子儿茶素没食子酸酯类似物的合成及活性研究概述. *食品安全导刊*, 2020(12): 175-176
Wang L H, Wei S Y, Liu H, Su Y S, Wu Z C, Zi C T. Synthesis and activity of methylated EGCG analogues. *Food Safety Guide*, 2020(12): 175-176
- [13] Zhang Y, Lv H P, Ma C Y, Guo L, Tan J F, Peng Q H, Lin Z. Cloning of a caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase from *Camellia sinensis* and analysis of its catalytic activity. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2015, 16(2): 103-112
- [14] Liao Z, Liu X, Zheng J, Zhao C, Wang D, Xu Y, Sun C. A multifunctional true caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase enzyme participates in the biosynthesis of polymethoxylated flavones in citrus. *Plant Physiology*, 2023, 192(3): 2049-2066
- [15] Shen B, Li C, Tarczynski M C. High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *Plant Journal*, 2002, 29(3): 371-380
- [16] Meng J J, Wang L S, Wang J Y, Zhao X W, Cheng J K, Yu W X, Jin D, Li Q, Gong Z Z. METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE4 mediates DNA and histone methylation. *Plant Physiology*, 2018, 177(2): 652-670
- [17] Yang S X, Wu T T, Ding C H, Zhou P C, Chen Z Z, Gou J Y. SAHH and SAMS form a methyl donor complex with *CCoAOMT7* for methylation of phenolic compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 520(1): 122-127
- [18] Peng Z, He Y, Parajuli S, You Q, Wang W, Bhattarai K, Palmateer A J, Deng Z. Integration of early disease-resistance phenotyping, histological characterization, and transcriptome sequencing reveals insights into downy mildew resistance in *Impatiens*. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 108
- [19] Zhang D, Wei J, Zhou M, Li Y, Li X Y, Wen Y H, Huang M J, Huang H Q. Efficient plant regeneration system for New Guinea *Impatiens* (*Impatiens hawkeri* W. Bull) CV. 'Violet' and 'Scarlet Bronze Leaf'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2022, 3: 149
- [20] Luo C, Huang W L, Yer H, Kamuda T, Li X Y, Li Y, Rong Y H, Yan B, Wen Y H, Wang Q, Huang M J, Huang H Q. Complete chloroplast genomes and comparative analyses of three ornamental *Impatiens* species. *Frontiers Genetics*, 2022, 13: 816123
- [21] 周忆堂. 不同光强对长春花(*Catharanthus roseus*)光合作用及次生代谢的影响研究. 重庆: 西南大学, 2008
Zhou Y T. Effects of different light intensity on photosynthesis and secondary metabolism of *Catharanthus roseus*. Chongqing: Southwest University, 2008
- [22] Zhang L X, Guo Q S, Chang Q S, Zhu Z B, Liu L, Chen Y H. Chloroplast ultrastructure, photosynthesis and accumulation of secondary metabolites in *Glechoma longituba* in response to irradiance. *Photosynthetica*, 2015, 53(1): 144-153
- [23] Song J L, Wang Z Y, Wang Y H, Du J, Wang C Y, Zhang X Q, Chen S, Huang X L, Xie X M, Zhong T X. Overexpression of pennisetum purpureum *CCoAOMT* contributes to lignin deposition and drought tolerance by promoting the accumulation of flavonoids in transgenic Tobacco. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 884456
- [24] 陈婕, 邓晶, 陈建荣, 徐磊, 张学文. 苧麻 *CCoAOMT* 基因 cDNA 反义转化模式烟草 'WS38'. *西北植物学报*, 2007(8): 1558-1562
Chen J, Deng J, Chen J R, Xu L, Zhang X W. Transformation of model tobacco variety WS38 with antisense *CCoAOMT* cDNA of *Boehmeria nivea*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007(8): 1558-1562
- [25] Do C T, Pollet B, Thévenin J, Sibout R, Denoue D, Barrière Y, Lapiere C, Jouanin L. 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*. *Planta*, 2007, 226 (5): 1117-1129
- [26] 王丹阳, 高付永, 孙炜, 芮伟康, Khanizadeh S, 张绍铃, 陶书田, ‘碭山酥梨’果实 *CCoAOMT* 基因的克隆与表达分析. 南京农业大学学报, 2015, 38(1): 33-40
Wang D Y, Gao F Y, Sun W, Rui W K, Khanizadeh S, Zhang S L, Tao S T. Cloning and expression analysis of *CCoAOMT* gene in fruit of ‘Dangshansuli’. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38(1): 33-40
- [27] 倪志勇, 吕萌, 马文静, 陈艳, 范玲. 棉花咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因的克隆及表达. 西北植物学报, 2009, 29 (10): 1946-1953
Ni Z Y, Lv M, Ma W J, Chen Y, Fan L. Cloning and expression analysis of *CCoAOMT* gene from *Gossypium hirsutum* L. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(10): 1946-1953
- [28] 倪志勇, 吕萌, 范玲. 棉花咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因的克隆及特征分析. 西北植物学报, 2010, 30(6): 1083-1091
Ni Z Y, Lv M, Fan L. Cloning and expression analysis of *CCoAOMT* gene from *Gossypium hirsutum* L. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(6): 1083-1091
- [29] 王艺清, 王涛, 韦朝领, 戴浩民, 曹士先, 孙威江, 曾雯. 茶树 *SMAS* 基因家族的鉴定及互作分析. 生物技术通报, 2023, 39(4): 246-258
Wang Y Q, Wang T, Wei Z L, Dai H M, Cao S X, Sun W J, Zeng W. Identification and interaction analysis of *SMAS* gene family in tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Biotechnology Bulletin*, 2023, 39 (4) : 246-258
- [30] 何美文. 黄瓜 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因鉴定及其在响应盐胁迫中的功能. 南京: 南京农业大学, 2019
He M W. Identification of S-adenosylmethionine synthetase gene and its salt stress response function in cucumber. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019
- [31] 陈凌娜, 郭晓娟, 杨汉奇. 巨龙竹木质素合成关键基因 *CCoAOMT* 的克隆及表达分析. 植物遗传资源学报, 2019, 20(2): 476-484
Chen L N, Guo X J, Yang H Q. Cloning and expression analysis of *CCoAOMT*, a key gene in lignin biosynthesis of *Dendrocalamus sinicus*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(2): 476-484
- [32] 张玉荣, 杨雅舒, 申圣圣, 王陆军, 郭虹霞, 邓妍, 王创云, 杨利艳. 大刍草 *SAMS1* 基因克隆与生物信息学分析. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(12): 5660-5668
Zhang Y R, Yang Y S, Shen S S, Wang L J, Guo H X, Deng Y, Wang C Y, Yang L Y. Cloning and bioinformatics analysis of *SAMS1* gene in *Balsas Teosinte*. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(12): 5660-5668
- [33] 张夏燕. 凤丹对于干旱胁迫的响应及 *CCoAOMT* 基因功能的研究. 扬州: 扬州大学, 2020
Zhang X Y. Study on the response of *Paeonia ostii* to drought stress and the function of *CCoAOMT* gene. Yangzhou: Yangzhou University, 2020
- [34] Shaipulah N F, Muhlemann J K, Woodworth B D, Van Moerkercke A, Verdonk J C, Ramirez A A, Haring M A, Dudareva N, Schuurink R C. *CCoAOMT* down-regulation activates anthocyanin biosynthesis in *Petunia*. *Plant Physiology*, 2016, 170(2): 717-731
- [35] 张悦, 赵鑫, 侯峥, 王艳敏, 王玉成, 王超. 刚毛怪柳 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (*ThSAMS*) 基因的克隆及表达分析. 植物研究, 2019, 39(1): 113-122
Zhang Y, Zhao X, Hou Z, Wang Y M, Wang Y C, Wang C. Cloning and expression analysis of S-adenosine methionine synthase (*ThSAMS*) gene from *Tamarix hispida*. *Plant Research*, 2019, 39(1): 113-122
- [36] 张寒冰. 大麦 S-腺苷甲硫氨酸合成酶 *HvSAMS2* 基因的克隆及耐盐性功能分析. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020
Zhang H B. Cloning and salt tolerance analysis of S-adenosine methionine synthetase *HvSAMS2* gene in *Hordeum vulgare* L. Yangling: Northwest A & F University, 2020
- [37] 倪飞, 励文豪, 蔡苗苗, 林二培, 童再康, 黄华宏. 光皮桦转录组及 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因分析. 农业生物技术学报, 2018, 26(3): 410-420
Ni F, Li W H, Cai M M, Lin E P, Tong Z K, Huang H H. Analysis of transcriptome and the S-adenosylmethionine synthetase (*SAMS*) genes in *Betula luminifera*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(3): 410-420
- [38] Choi H L, Seo J W, Hwang M H, Yu C Y, Seong E S. *MsSAMS*, a cold stress-responsive gene, provides resistance to environmental stress in T2-generation transgenic plants. *Transgenic Research*, 2022, 31(3): 381-389