

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工程研究中心/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: 本研究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, 以期解析该合成途径解析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 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 (1,4-dihydroxy-2-naphthoate, DHNA) 诱导中表达量均逐渐上调, 且暗培养第 60 d 时表达量最高; *IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 在暗培养及 DHNA 诱导中表达量均逐渐下调, 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* 基因; *SAMS* 基因; 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: This studies conducted the gene cloning and transcriptional profile analysis of two genes *CCoAOMT* and *SAMS* involved into the 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) synthesis, in order to provide theoretical basis for the MNQ synthesis in *Impatiens hawkeri*. 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 could promote the MNQ accumulation, with best performance under dark culture. The full-length coding sequence of *IhCCoAOMT* is 729 bp and encodes 242 aa containing the AdoMet_MTases superfamily domain. The CDS of

收稿日期: 2023-08-18 修回日期: 2023-09-25

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, 主要从事园林植物研究, E-mail: xmhq2001@163.com

黄海泉, 主要从事园林植物研究, E-mail: haiquanl@163.com

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

Foundation projects: The National Natural Science Foundation of China (32060364,32060366), the Major Science and Technology Project of Yunnan Province (202102AE090052) and the doctoral supervisor team of Garden Plant Genetic Improvement and Efficient Breeding in Yunnan Province

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 gradually increase on expression of *IhCCoAOMT* was found in either dark culture or 1,4-dihydroxy-2-naphthoate (DHNA) treatment, and the highest expression was found on 60 days post dark culture. The expression of *IhSAMS1* and *IhSAMS2* were gradually 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* gene; *SAMS* genes; expression analysis

凤仙花属(*Impatiens* L.)植物是一种富含天然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(2-methoxy-1,4-naphthoquinone, MNQ)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,并都通过聚酮化合物、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(OSB),且指甲花醌生物合成过程也被称为1,4-二羟基-2-萘酸(DHNA)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直接来自于DHNA,且指甲花醌又是指甲花醌的直接前体。迄今国内外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]。因此,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(caffeoylcoenzyme A-O-methyltransferase, CCoAOMT)是一类S-腺苷甲硫氨酸(SAM)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)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基化黄酮(PMFs)的生物合成。S-腺苷甲硫氨酸合酶(S-adenosylmethionine synthase, SAMS)是催化甲硫氨酸(Met)和ATP合成SAM的唯一酶,SAM作为生

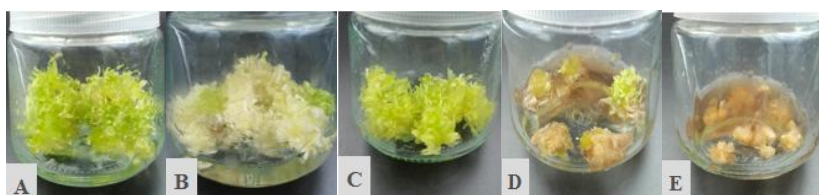
物体内重要的甲基供体，在 CCoAOMT 转移甲基过程中提供甲基，从而参与生物体中咖啡碱、多胺、乙烯等多种次生代谢产物的生物合成。研究表明，拟南芥中鉴定到 4 个 SAMS 基因，其分别为 *AtMAT1*、*AtMAT2*、*AtMAT3* 和 *AtMAT4*^[15]，同时 Meng 等^[16]研究发现 *AtMAT3* 可以在体外与 *AtMAT1*、*AtMAT2*、*AtMAT4* 及其自身相互作用，且 Yang 等^[17]研究发现其还可以直接与 S-腺苷高半胱氨酸水解酶 1(*AtSAHH1*)相互作用，并与 CCoAOMT7 形成甲基供体复合物作用于阿魏酸盐甲基化。由此表明，CCoAOMT 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等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*)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；还具有药用和天然色素等价值。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 实验材料

本研究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 诱导光下培养下第 15 d、30 d、45 d 及 60 d 的植物材料，供后期实验使用。(部分处理时期的生长状态如图 1，本实验以 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。)



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 for 30 days under light; B, cultured in dark for 30 days; C/D/E, 50/150/300 mg/L DHNA induction culture for 30 days

图 1 新几内亚凤仙丛生芽三种处理下的生长状态

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

1.2 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 d、60 d 的干样磨成细粉，甲醇浸提后旋蒸富集成样品用于 HPLC 测定。色谱柱为 Hypersil-GOLD-C18 柱，流动相为水(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 μ L，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 统计分析数据，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几内亚凤仙转录组数据设计引物(表 1)，进行 PCR 扩增。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 DH5 α 感受态细胞，筛选阳性克隆并进行测序。

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 Primer sequence(5'→3')	用途 Purpose
<i>IhCCoAOMT</i> -F	5'-ATGGCGGCAACGGCGACAACATG-3'	
<i>IhCCoAOMT</i> -R	5'-TCAGGCGACACGGCGCAGAG-3'	
<i>IhSAMS1</i> -F	5'-ATGGAGACCTTCTGTGTTACATCTGAATC-3'	全长克隆
<i>IhSAMS1</i> -R	5'-TTAAGCTTGAGGCTTCTCCATTG-3'	Full length clone
<i>IhSAMS2</i> -F	5'- ATGGACACATTCCATTACCTCAGAATC-3'	
<i>IhSAMS2</i> -R	5'- TCAAGCTTTCGGCTTCAGCG-3'	
<i>Actin</i> -F	5'-GTTCTGTCCATTCCCATCTGTC-3'	
<i>Actin</i> -R	5'-CCCTGAGGAATCCAGTGAGC-3'	
<i>qIhCCoAOMT</i> -F	5'-AAGAGCCTTCTCCAAAGCGA-3'	
<i>qIhCCoAOMT</i> -R	5'-CAGAAACTGACCCTCGTCCG-3'	qRT-PCR
<i>qIhSAMS1</i> -F	5'-TCTACCCAGCAGACGAAAC-3'	
<i>qIhSAMS1</i> -R	5'-AAACACCTCCTAGCAAGCCC-3'	
<i>qIhSAMS2</i> -F	5'- GAACGAAGGCCATCCAGACA-3'	
<i>qIhSAMS2</i> -R	5'- CTTGGTACCAGCTCCGATT-3'	

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；利用在线软(<http://www.detaibio.com/tools/hydropathy-analysis.html>)对蛋白质亲水性及疏水性预测；利用在线软件(<http://www.detaibio.com/tools/signal-peptide.html>)对蛋白质信号肽预测；利用在线软(<http://www.detaibio.com/tools/chou-fasman-forecast.html>)和 SWISS-MODEL 软件(<https://swissmodel.expasy.Org/interactive>)对蛋白质二级和三级结构预测；利用在线软件(<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及运用 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 d、30 d、45 d、60 d 的 RNA，逆转录成 cDNA 备用。

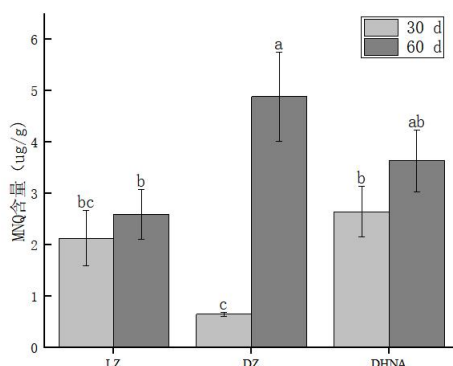
(2) 引物设计 根据 cDNA 序列利用 NCBI 中结合 Primer-BLAST 在线工具引物设计原则来设计 qRT-PCR 引物(表 1)，内参基因为 *Actin*。

(3) 荧光定量 PCR 根据 qRT-PCR 结果记录 Ct 值，每组试验重复 3 次，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法分析基因的相对表达量。运用 Excel 统计分析数据，利用 SPSS26.0 软件进行数据显著性分析，Origin 软件制图。

2 结果

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 d 和第 60 d 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 $y = 7 \times 10^7 x + 16521$ ($r = 0.9993$)；培养第 30 d 的指甲花醚含量分别为 2.13 ug/g、0.65 ug/g、2.65 ug/g，培养第 60 d 的指甲花醚含量分别为 2.60 ug/g、4.89 ug/g、3.64 ug/g；从中发现指甲花醚含量随培养时间的延长逐渐积累；暗培养和 DHNA 诱导培养均能促进指甲花醚的生物合成，且暗培养作用更为显著；其中暗培养第 60 d 的指甲花醚含量最高，但暗培养第 30 d 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从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。



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 ($P < 0.05$)

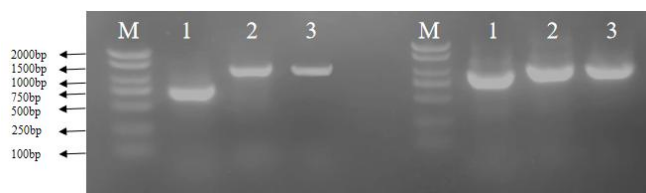
LZ, light culture; DZ, dark culture; DHNA, DHNA induced culture; Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 2 不同样品中指甲花醚含量

Fig.2 Content of MNQ in different samples

2.2 新几内亚凤仙 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因的克隆

经 PCR 扩增，获得 *IhCCoAOMT*、*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 基因的全长 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，其 NCBI 登录号分别为 OR067819、OR067820 和 OR067821。将其 cDNA 序列与基因组 gDNA 全长比较发现，*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)。



M: DL2000 Marker; 1: *IhCCoAOMT*; 2: *IhSAMS1*; 3: *IhSAMS2*

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*

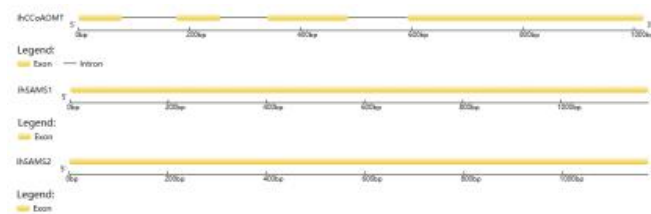


图4 新几内亚凤仙 *IhCCoAOMT*、*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 基因的组成结构

Fig.4 Genomic structures of *IhCCoAOMT*, *IhSAMS1*, and *IhSAMS2* genes of *I. hawkeri*

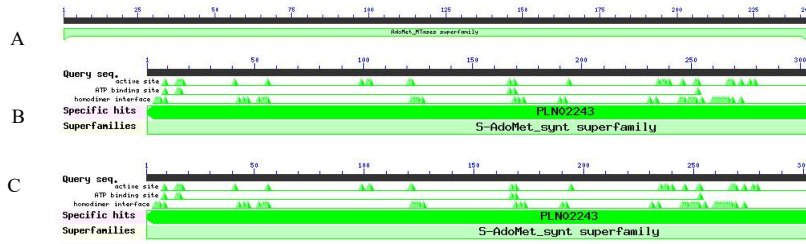
2.3 新几内亚凤仙 *CCoAOMT* 和 *SAMS* 基因的序列结构分析

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 个基因均为稳定性亲水蛋白; 在线软件预测分析表明其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, *IhCCoAOMT* 主要由 α -螺旋(Hh)、无规则卷曲(Cc)、延伸连(Ee)和 β 转角(Tt)组成, 分别占比 40.08 %、31.82 %、19.42 %和 8.68 %; *IhSAMS1* 主要由无规则卷曲(Cc)、 α -螺旋(Hh)、延伸连(Ee)和 β 转角(Tt)组成, 分别占比 40.31 %、36.22 %、14.54 %和 8.93 %; *IhSAMS2* 主要由无规则卷曲(Cc)、 α -螺旋(Hh)、延伸连(Ee)和 β 转角(Tt)组成, 分别占比 41.03 %、35.64 %、15.13 %和 8.21 %; 预测结果表明其蛋白的二级结构均为 mixed 型。SWISS-MODEL 三级结构预测分析表明, *IhCCoAOMT* 的空间结构与苜蓿(*Medicago sativa* L.)相似度为 89.21 %; *IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 的空间结构与拟南芥(*AtMAT1*)的相似度分别为 93.37 %和 87.40 %。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 5)。运用在线软件预测软件选择选择同源性较高的 *CCoAOMT*、*SAM1*、*SAM2*、*MAT3* 和 *MOT3* 等制作拟南芥中存在的互作网络, 结果表明新几内亚凤仙 *CCoAOMT* 与 *SAM1*、*SAM2* 可能存在互作作用, 共同参与指甲花醚的生物合成(图 6)。

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	分子式	相对分子量	等电点	总原子数	不稳定系数	GRAVY 值
Gene	Molecular formula	Protein molecular weight	Isoelectric point	Total atomic number	Instability index	GRAVY value
<i>IhCCoAOMT</i>	C1219H1927N321O359S11	27176.31	5.20	3837	32.07	-0.168
<i>IhSAMS1</i>	C1902H3004N520O581S15	42932.81	5.68	6022	25.24	-0.288
<i>IhSAMS2</i>	C1882H2991N517O574S15	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* 基因的保守结构域

Fig.5 Conserved domains of *IhCCoAOMT*, *IhSAMS1*, and *IhSAMS2* genes of *I. hawkeri*

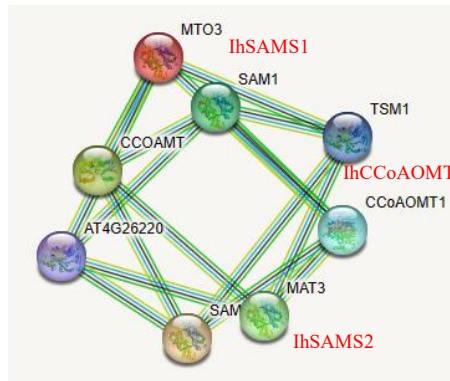


图 6 新几内亚凤仙 *IhCCoAOMT* 蛋白交互预测

Fig.6 Prediction 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 76.75%；*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%。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 7)。

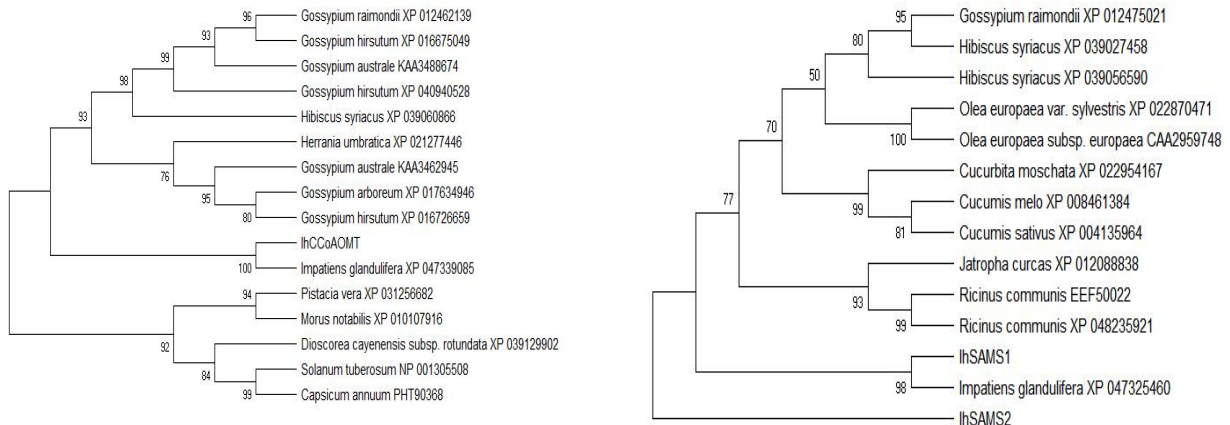
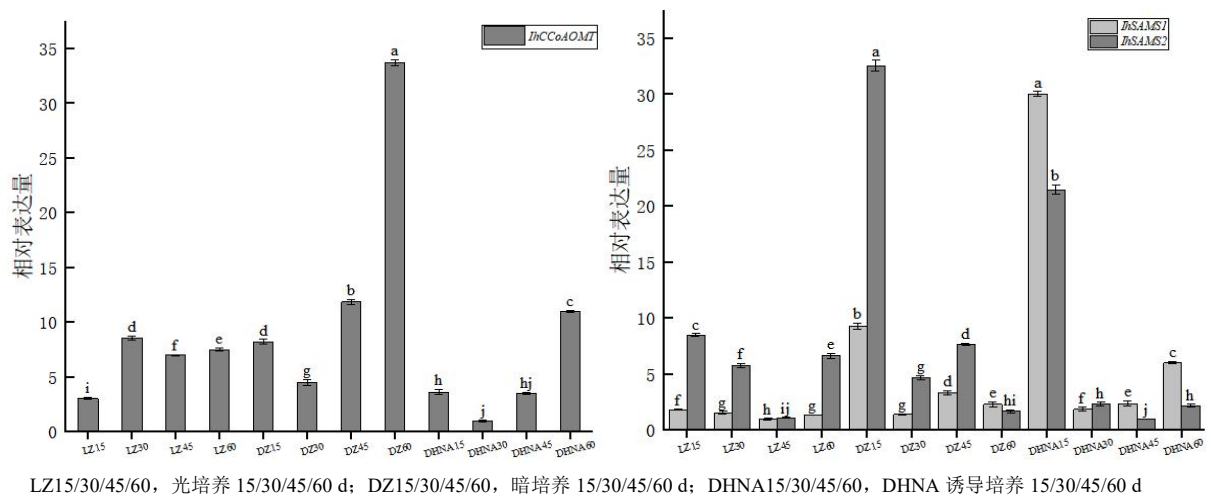


图 7 基于新几内亚凤仙 *CCoAOMT*(左)和 *SAMS*(右) 基因氨基酸序列构建的系统发育树

Fig.7 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of *CCoAOMT* (left) and *SAMS* (right) genes from *I. hawkeri*

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 8)。 *IhCCoAOMT* 在光培养第 15 d 时表达量较低，其他同处理的不同时期表达量均较高且几乎保持稳定；在暗培养和 DHNA 诱导中其表达量均逐渐上升，且均在第 60 d 时表达量最高，并与 DHNA 诱导第 30 d 的相对表达量差异倍数分别为 33.75 和 11.0 倍；由此表明，该基因对暗培养响应更为显著。 *IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 在光培养中其表达量均几乎不变，但 *IhSAMS2* 的总体表达量较高；在暗培养及 DHNA 诱导中二者表达量均逐渐下调，其中 *IhSAMS1* 在 DHNA 诱导中表达量较高，且在第 15 d 时表达量最高，并与光培养第 45 d 的相对表达量差异倍数为 30.07 倍； *IhSAMS2* 在暗培养中表达量较高，且在第 15 d 时表达量最高，并与 DHNA 诱导第 45 d 的相对表达量差异倍数为 32.6 倍。综上所述，3 个基因表达量与指甲花醚含量结果相符，其可能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。



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

图 8 *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.8 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 已被明确为指甲花醚的直接前体^[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,本实验样品中指甲花醌含量极低以致不能被定量,这可能是本实验材料中指甲花醌含量极低,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]; Met 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];但倪志勇等^[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,这与陈凌娜等研究结果也一致。*IhSAMS1* 和 *IhSAMS2* 蛋白二级预测表明,其与张玉荣等^[32]对大刍草(*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 MAT3、MOT3 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 d 到第 40 d 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 d 到第 60 d 中其表达量均逐渐上调结果相似,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,张夏燕等^[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 *SMSA* 基因表达影响与张悦等^[35]对刚毛怪柳采用盐胁迫及模拟干旱处理结果相似,该基因表达量在一定时间段内均呈现逐渐下调趋势。研究表明 *SAMS* 基因在植物体中具有明显的组织特异性表达,张寒冰等^[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 *BI SAMS1* 在光皮桦叶中的整体表达量较高, *BI SAMS2* 和 *BI SAMS3* 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其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. *Phytother Res*, 2001, 15(6): 506-10
- [2] Wang YC, Lin YH. Anti-gastric adenocarcinoma activity of 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone, an anti-*Helicobacter pylori* compound from *Impatiens balsamina* L. *Fitoterapia*, 2012, 83(8): 1336-44
- [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 Anal*, 2010, 21(5): 444-50
- [4] Socaciu C. *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, CRC Press, Boca Raton, 2007
- [5] Nowicka B, Kruk J. Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1797(9): 1587-605
- [6] Widhalm JR, Rhodes D. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Hortic Res*, 2016, 21(3): 16046
- [7] Babula P, Adam V, Havel L, Kizek R. Noteworthy secondary metabolites naphthoquinones-their occurrence, pharmacological properties and analysis. *Curr. Pharm. Anal*, 2009, 5: 47-68
- [8] Liscombe DK, Louie GV, Noel JP. Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases. *Nat Prod Rep*, 2012, 29(10): 1238-50
- [9] Foong LC, Chai JY, Ho ASH, Yeo BPH, Lim YM, Tam SM. Comparative transcriptome analysis to identify candidate genes involved in 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) biosynthesis in *Impatiens balsamina* L. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16123
- [10] Xu RX, Zhao Y, Gao S, Zhang YY, Li DD, Lou HX, Cheng AX. Functional characterization of a plastidal cation-dependent O-methyltransferase from the liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. *Phytochemistry*, 2015, 118: 33-41
- [11] Tong NN, Peng LP, Liu ZA, Li Y, Zhou XY, Wang XR, Shu QY. Comparative transcriptomic analysis of genes involved in stem lignin biosynthesis in woody and herbaceous *Paeonia* species. *Physiol Plant*, 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):

Wang LH, Wei SY, Liu H, Su YS, Wu ZC, Zi CT. Synthesis and Activity of methylated EGCG analogues]. *Food Safety Guide*, 2020(12): 175-176

- [13] Zhang Y, Lv HP, Ma CY, Guo L, Tan JF, Peng QH, Lin Z. Cloning of a caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase from *Camellia sinensis* and analysis of its catalytic activity. *J Zhejiang Univ Sci 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 Physiol*, 2023, 192(3): 2049-2066
- [15] Shen B, Li C, Tarczynski MC. High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* S-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. *Plant J*, 2002, 29(3): 371-80
- [16] Meng J, Wang L, Wang J, Zhao X, Cheng J, Yu W, Jin D, Li Q, Gong Z. METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE4 Mediates DNA and Histone Methylation. *Plant Physiol*, 2018, 177(2): 652-670
- [17] Yang SX, Wu TT, Ding CH, Zhou PC, Chen ZZ, Gou JY. SAHH and SAMS form a methyl donor complex with CCoAOMT7 for methylation of phenolic compounds. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(1): 122-127
- [18] Peng Z, He Y, Parajuli S, You Q, Wang W, Bhattarai K, Palmateer AJ, Deng Z. Integration of early disease-resistance phenotyping, histological characterization, and transcriptome sequencing reveals insights into downy mildew resistance in *Impatiens*. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 108
- [19] Zhang D, Wei J, Zhou M, Li Y, Li XY, Wen YH, Huang MJ, Huang HQ. Efficient plant regeneration system for New Guinea *Impatiens* (*Impatiens hawkeri* W. Bull) CV. 'Violet' and 'Scarlet Bronze Leaf'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2022, 3: 149
- [20] Luo C, Huang W, Yer H, Kamuda T, Li X, Li Y, Rong Y, Yan B, Wen Y, Wang Q, Huang M, Huang H. Complete Chloroplast Genomes and Comparative Analyses of Three Ornamental *Impatiens* Species. *Front Genet*, 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 YT. Effects of different light intensity on photosynthesis and secondary metabolism of *Catharanthus roseus*. Chongqing, Southwest University, 2008.
- [22] Zhang LX, Guo QS, Chang QS, Zhu ZB, Liu L, Chen YH. Chloroplast ultrastructure, photosynthesis and accumulation of secondary metabolites in *glechoma longituba* in response to irradiance. *Photosynthetica*, 2015, 53(1): 144-153
- [23] Song JL, Wang ZY, Wang YH, Du J, Wang CY, Zhang XQ, Chen S, Huang XL, Xie XM, Zhong TX. Overexpression of *Pennisetum purpureum* CCoAOMT Contributes to Lignin Deposition and Drought Tolerance by Promoting the Accumulation of Flavonoids in Transgenic Tobacco. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 884456
- [24] 陈婕, 邓晶, 陈建荣, 徐磊, 张学文. 苎麻 CCoAOMT 基因 cDNA 反义转化模式烟草 'WS38'. *西北植物学报*, 2007(08): 1558-1562
- Chen J, Deng J, Chen J R, Xu L, Zhang XW. Transformation of Model Tobacco Variety WS38 with Antisense CCoAOMT cDNA of *Boehmeria nivea*. *Acta Botanica Sinica*, 2007(08): 1558-1562
- [25] Do CT, Pollet B, Thévenin J, Sibout R, Denoue D, Barrière Y, Lapierre 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): 1117-29
- [26] 王丹阳, 高付永, 孙炜, 芮伟康, Khanizadeh S, 张绍铃, 陶书田, '砀山酥梨' 果实 CCoAOMT 基因的克隆与表达分析. *南京农业大学学报*, 2015, 38(01): 33-40
- Wang DY, Gao F Y, Sun W, Bing WJ, Khanizadeh S, Zhang SL, Tao ST. Cloning and expression analysis of CCoAOMT gene in fruit of 'Dangshansuli'. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38(01): 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, 10: 1946-1953

- Ni ZY, Lv M, Ma WJ, 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(06): 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(06): 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(04): 246-258
- Wang YQ, Wang T, Wei ZL, Dai HM, Cao SX, SunWJ, Zeng W. Identification and Interaction Analysis of SMAS Gene Family in Tea Plant(*Camellia sinensis*). *Journal of biotechnology bulletin*, 2023, 33 (4) 6: 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 MW. 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(02): 476-484
- Chen LN, Guo XJ, Yang HQ. Cloning and Expression Analysis of CCoAOMT, a Key Gene in Lignin Biosynthesis of *Dendrocalamus sinicus*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(02): 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. 大皂草 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 YR, Yang YS, Shen SS, Wang LJ, Guo HX, Deng Y, Wang CY, Yang LY. Cloning and Bioinformatics Analysis of SAMS1 Gene in *Balsamorhiza hirsuta*. *Genomics & Applied Biology*, 2020, 39(12): 5660-5668
- [33] 张夏燕. 凤丹对干旱胁迫的响应及 CCoAOMT 基因功能的研究. 江苏, 扬州大学, 2020
- Zhang X Y. Study on the response of *Paeonia ostii* to Drought Stress and the Function of CCoAOMT Gene. Jiangsu, Yangzhou University, 2020
- [34] Shaipulah NF, Muhlemann JK, Woodworth BD, Van Moerkercke A, Verdonk JC, Ramirez AA, Haring MA, Dudareva N, Schuurink RC. CCoAOMT Down-Regulation Activates Anthocyanin Biosynthesis in *Petunia*. *Plant Physiol*, 2016, 170(2): 717-31
- [35] 张悦, 赵鑫, 侯峥, 王艳敏, 王玉成, 王超. 刚毛柽柳 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(01): 113-122
- Zhang Y, Zhao X, Hou Z, Wang YM, Wang YC, Wang C. Cloning and expression analysis of S-adenosine methionine synthase (ThSAMS) gene from *Tamarix hispida*. *Plant Research*, 2019, 39(01): 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. 陕西, 西北农林科技大学, 2020
- Zhang HB. Cloning and salt tolerance analysis of S-adenosine methionine synthetase HvSAMS2 gene in *Hordeum vulgare* L. Ranxi, 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[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(03): 410-420.
- Ni F, Li WH, Cai MM, Lin EP, Tang ZR, Huang HH. Analysis of Transcriptome and the S-adenosylmethionine Synthetase (SAMS) Genes in *Betula luminifera*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26(03): 410-420
- [38] Choi HL, Seo JW, Hwang MH, Yu CY, Seong ES. MsSAMS, a cold stress-responsive gene, provides resistance to environmental stress in T2-generation transgenic plants. *Transgenic Res*, 2022, 31(3): 381-389