

丝瓜 POD 基因家族鉴定及盐胁迫下表达分析

骆彩霞^{2*}, 张 涵^{1,2*}, 刘樟扬², 赵钢军², 喻 敏¹, 刘敏敏^{1**}, 吴海滨^{2,3**}

1. 佛山科学技术学院, 广东佛山 528225; 2. 广东省蔬菜新技术研究重点实验室/广东省农业科学院蔬菜研究所, 广东广州 510640; 3. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室, 广东广州 510000

摘 要: 过氧化物酶 (peroxidase, POD) 是植物体内普遍存在且活性较高的一种酶, 在植物生长发育和胁迫响应中发挥重要作用。从丝瓜基因组层面分析 POD 家族基因及其对盐胁迫响应的研究鲜有报道。本研究利用生物信息学方法在丝瓜基因组中鉴定出 94 个 POD 家族成员, 具有相似的基因结构, 大多数含有 3 个或者 4 个外显子; 编码氨基酸数量在 89~688 之间, 平均为 309 个; 理论等电点 (pI) 介于 4.58~10.34 之间; 其中 57 个成员为碱性氨基酸, 82 个成员为亲水性蛋白; POD 家族成员不均匀地分布在丝瓜 13 条染色体上, 其中 7 号染色体最多 (20 个), 12 号最少 (1 个)。系统发育分析将丝瓜 POD 家族划分为 8 个亚家族。与拟南芥的 POD 家族基因共线性分析表明, 2 个物种之间有 12 对共线性基因, 丝瓜中 POD 家族基因发生了扩张。蛋白保守结构域分析表明, 丝瓜 POD 家族成员都含有 plant peroxidases 保守结构域和相似的保守基序。启动子区域的顺式作用元件分析发现, 启动子中含有大量的脱落酸、赤霉素、生长素、乙烯、水杨酸、茉莉酸甲酯等植物激素响应元件和低温、低氧、光、干旱、防御和胁迫响应等胁迫响应顺式元件。丝瓜幼苗受到 200、500 mmol/L NaCl 胁迫处理时, POD 活性增强, 56 个 POD 家族成员基因表达量显著上升。通过表达趋势分析, 获得 2 个显著富集趋势, 包含的 35 个基因在不同浓度盐胁迫处理下显著上调表达, 表明这些基因可能参与丝瓜对盐胁迫响应。本研究从基因组层面鉴定丝瓜 POD 家族成员, 并进行其理化性质分析及盐胁迫下表达分析, 为更深入研究丝瓜 POD 基因家族的生物学功能奠定基础。

关键词: 丝瓜; 过氧化物酶; 盐胁迫; 表达模式

中图分类号: S432.1 文献标识码: A

Genome-wide Identification of the POD Gene Family and Expression Analysis Under Salt Stress in *Luffa (Luffa acutangula)*

LUO Caixia^{2*}, ZHANG Han^{1,2*}, LIU Zhangyang², ZHAO Gangjun², YU Min¹, LIU Minmin^{1**}, WU Haibin^{2,3**}

1. Foshan University, Foshan, Guangdong 528225, China; 2. Guangdong Key Laboratory for New Technology Research of Vegetables / Vegetable Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 3. Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou, Guangdong 510000, China

Abstract: Peroxidase (POD) is a ubiquitous and highly active enzyme in plants, which plays an important role in plant growth and development and stress response. There are few reports on the analysis of POD family genes and the response to salt stress. In this study, 94 POD family members were identified in luffa genome by bioinformatics methods. They had similar gene structure, most of them contained 3–4 exons. The number of coding amino acids were ranged from 89 to 688, with an average of 309. The pI of the protein was between 4.58 and 10.34. 57 of them were basic amino acids. 82 members were hydrophilic proteins. POD family members were unevenly distributed on 13 chromosomes of luffa, of which chromosome 7 was the most (20) and chromosome 12 was the least (1). Phylogenetic analysis divided the POD family members into 8 subfam-

收稿日期 2022-10-10; 修回日期 2022-11-29

基金项目 岭南现代农业科学与技术广东省实验室项目 (No.NZ2021008); 国家自然科学基金项目 (No.31902011); 广州市科技计划项目 (No.202201011453)。

作者简介 骆彩霞 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 丝瓜分子生物学; *同等贡献作者: 张 涵 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 丝瓜分子生物学。**通信作者 (Corresponding author): 吴海滨 (WU Haibin), E-mail: wuhbhope@yeah.net; 刘敏敏 (LIU Minmin), E-mail: mminliu@outlook.com。

lies. The analysis of the collinearity of POD family genes with Arabidopsis showed that there were 12 pairs of collinearity genes between the two species, and the POD family genes in luffa had expanded. Protein conserved domain analysis showed that POD family members all contained plant peroxidases conserved domains and had similar conserved bases. The gene promoter contained a large number of plant hormone response elements such as abscisic acid, gibberellin, auxin, ethylene, salicylic acid, methyl jasmonate, and stress response *cis* elements such as low temperature, hypoxia, light, drought defense and stress response, indicating that it may be induced by abiotic stress. The analysis of *cis* acting elements in the promoter showed that the promoter contained a large number of phytohormone (abscisic acid, gibberellin, auxin, ethylene, salicylic acid, methyl jasmonate) response elements and stress (low temperature, low oxygen, light, drought, defense and stress response) response *cis* elements. When luffa seedlings were stressed by 200 and 500 mmol/L NaCl, the POD activity increased, and the gene expression of 56 POD family members increased significantly. Through expression trend analysis, two significant enrichment trends were obtained, including 35 genes that were significantly up-regulated under salt stress, indicating that the genes may participate in the response to salt stress. This study is the first time to identify the members of the POD family of luffa at the genomic level, and analyzed the physical properties and expression under salt stress. The results of this study would lay a theoretical foundation for exploring the biological functions of POD family members in luffa.

Keywords: *Luffa*; peroxidase; salt stress; expression pattern

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.10.003

丝瓜为葫芦科 (Cucurbitaceae) 丝瓜属 (*Luffa* spp.) 一年生攀援性草本植物, 共有 9 个种, 栽培种为有棱丝瓜 (*L. acutangula* Roxb.) 和普通丝瓜 (*Luffa. cylindrica* Roem.)^[1]。丝瓜果实富含赖氨酸、苯丙氨酸等人体必需氨基酸、维生素 B1/B2/C 等抗氧化物质, 是一种重要的药食兼用的多功能蔬菜^[2-3]。

植物受到如高温、干旱、盐渍、寒冷等非生物胁迫或者病、虫、机械损伤等生物胁迫时, 细胞代谢平衡被破坏, 导致植物体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 累积造成氧化胁迫 (oxidative stress), 使膜损伤、蛋白质变性、脂质过氧化、DNA 损伤等, 严重损害生物系统的稳定性^[4-5]。植物细胞通过酶促活性氧清除系统和非酶活性氧清除系统清除或者降低 ROS 含量^[5-6]。过氧化物酶 (peroxidase, POD) 可以还原植物细胞体内的 ROS, 生成 H₂O 和 O₂, 是植物酶促活性氧清除系统重要的组成部分^[7-9]。

在多个物种中已经鉴定出 POD 家族成员, 包括拟南芥^[10]、水稻^[11]、大豆^[12]、茶树^[13-14]、苹果^[15]等。研究发现, 拟南芥过氧化物酶 RCI3 受冷胁迫诱导, 正调节拟南芥耐渗透胁迫和盐胁迫^[16]。大豆中 23 个 POD 家族基因在耐旱系和干旱敏感系间显著差异表达, 其中 *GsPOD40* 通过增强干旱胁迫下大豆的光合作用和抗氧化酶活性, 从而减轻 ROS 诱导的氧化损伤, 增强大豆的耐旱性^[12]。苹果中, 大部分 POD 基因受 ABA、PEG、NaCl 胁迫诱导表达, 其中超表达 *MdPOD15*, 可缓解非生物胁迫对苹果愈伤组织的损伤^[15]。朱海生等^[17]

利用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 方法扩增了 1 个丝瓜 POD 基因, 并表示其可能与丝瓜果肉褐化有关。

然而, 到目前为止, 从基因组层面鉴定丝瓜 POD 家族基因, 及其对盐胁迫响应研究鲜有报道。本研究利用生物信息学方法鉴定丝瓜 POD 家族成员, 并对其基因结构、理化性质、系统进化、顺式作用元件及其在盐胁迫下表达模式分析, 为探究 POD 基因家族调控丝瓜盐胁迫时的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试丝瓜品种为广东省农业科学院蔬菜研究所培育的高代自交系 S1174。

1.2 方法

1.2.1 丝瓜 POD 家族成员鉴定 从 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 POD 家族的保守结构域 PF00141, 利用 TBtools^[18]检索本课题组装的有棱丝瓜基因组(未发表)的蛋白序列, 得到丝瓜 POD 家族成员的候选序列。为保证候选序列的准确性, 在 NCBI-CDD 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 手动检索, 去除不含有 POD 家族保守域的序列。利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 网站预测 POD 家族成员的分子量、等电点和亲水性等理化性质。

1.2.2 POD 家族成员染色体定位、系统进化、基序、基因结构、启动子顺式作用元件分析 使用在线软件 MG2C (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)

进行染色体定位可视化分析。利用 MEGA 7.0 软件的邻接法构建丝瓜和拟南芥 POD 蛋白的系统进化树 (Bootstrap=1000)。利用 TBtools 软件^[18]进行染色体共线性分析。利用在线软件 MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)进行氨基酸序列基序分析。使用在线软件 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析丝瓜 POD 家族成员的基因结构。使用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行基因启动子的顺式元件分析。

1.2.3 NaCl 处理 挑选饱满种子, 催芽后, 将露白种子播种于光照培养箱, 培养 2 周后, 分别进行 200、500 mmol/L NaCl 胁迫处理, 对照加等量清水, 每个处理 8 株, 3 个生物学重复。胁迫处理 7 d 后, 取叶片, 快速用 ddH₂O 清洗 2 遍, 液氮速冻, 存入超低温冰箱备用。

1.2.4 POD 活性测定 利用 POD 活性测定试剂盒 (索莱宝, 北京) 测定丝瓜叶片 POD 活性。主要步骤如下: 称取液氮研磨的粉末样品 0.1 g, 加入 1 mL 提取液, 冰浴匀浆, 离心取上清。于 EP 管中按次序分别加入试剂一 120 μ L、试剂二 30 μ L、试剂三 30 μ L、蒸馏水 60 μ L、样本 5 μ L, 立即混匀并计时, 取 200 μ L 于酶标板中, 记录 470 nm 下 30 s 时的吸光值 A_1 和 1 min 30 s 时的吸光值 A_2 , 计算 $\Delta A = A_2 - A_1$ 。计算 POD 活性: POD (U/g) = $9800 \times \Delta A / W$, W: 样品质量。

1.2.5 RNA 提取及表达分析 使用 Primer Premier 5 在基因非保守区域设计特异性引物。使用 RNA 提取试剂盒 (全式金, 北京) 提取样品的总 RNA, 使用 TransScript[®] II Green Two-Step qRT-PCR SuperMix (全式金, 北京) 反转录成 cDNA, 并进行 qPCR 扩增。反应体系 20 μ L: 2 μ L cDNA, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, 10 μ L 2 \times prefectStart Green qPCR SuperMix, 7.2 μ L ddH₂O。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 循环 40 次; 3 次技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的表达量。对差异表达基因在 OmicShare 平台 (<https://www.omicshare.com/tools/>) 进行表达趋势分析, 设定模块数量为 20, P 为 0.01, 获得显著性和非显著性基因表达模式。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 2019 和 SPSS 22.0 软件对数据进行整理、统计分析。

2 结果与分析

2.1 丝瓜 POD 基因家族成员鉴定及其蛋白的理化性质分析

通过 TBtools 比对筛选, 结合 CDD 工具检测保守结构域, 最终从丝瓜中鉴定出 94 个 POD 家族基因。最长的 POD 蛋白 (Lac05g017090) 含有 688 个氨基酸残基, 最短的 (Lac05g003440) 含有 89 个氨基酸残基, 平均为 309 个; 分子质量最大为 75 617.64 (Lac05g017090), 最小为 10 276.5 (Lac05g003440); 理论等电点 (pI) 介于 4.58 (Lac02g012390) ~ 10.34 (Lac00g002910) 之间。其中 pI > 7 的 POD 蛋白有 57 个, 达 60.64%, 表明丝瓜 POD 蛋白家族大部分富含碱性氨基酸; 其中 82 个蛋白具有亲水性, 12 个蛋白不具有亲水性 (表 1)。94 个 POD 家族成员不均匀地分布在丝瓜 13 条染色体, 其中, 7 号染色体分布的最多, 为 20 个; 12 号最少, 为 1 个 (图 1)。

2.2 POD 家族成员进化分析

利用 MEGA 7 软件对 94 个丝瓜 POD 家族成员和 73 个拟南芥 POD 家族成员的氨基酸序列构建系统进化树 (图 2)。2 个物种的 POD 家族成员分成了 3 个类群 Group I、Group II、Group III, 其中 Group I 只有 1 个 POD 蛋白家族成员 (Lac10g028260), Group III 成员最多, 包含 6 个亚组, 共 161 个成员。Group III-A 全部为拟南芥家族成员, Group III-F 的成员最多 (45 个), 包括 30 个丝瓜、15 个拟南芥 POD 家族成员。

丝瓜和拟南芥的 POD 家族基因之间的共线性分析结果显示 (图 3), 2 个物种之间有 12 对共线性基因, 丝瓜中有 33 个 POD 家族基因与拟南芥的 37 个 POD 家族基因存在共线性关系。其中, *AT1G24110* 基因在丝瓜中有 4 个共线性基因 *Lac03g015670*、*Lac06g003720*、*Lac09g002650*、*Lac09g018070*。而 *AT1G05240*、*AT1G30870*、*AT2G18140*、*AT2G37130*、*AT3G21770*、*AT3G50990*、*AT4G35000*、*AT4G36430*、*AT5G58390*、*AT5G66390* 在丝瓜中分别有 2 个共线性基因。*Lac04g020260* 和 *Lac11g009150* 基因在拟南芥中分别有 4 个共线性基因 *AT2G18140*、*AT3G50990*、*AT4G36430*、*AT5G66390* 和 *AT2G18140*、*AT3G50990*、*AT4G36430*、*AT5G66390*。以上结果表明丝瓜中 POD 家族基因发生了扩张。

表 1 丝瓜 POD 基因家族成员信息
Tab. 1 The POD gene family identified from luffa genome

基因号 Sequence ID	氨基酸长度 Number of amino acid	分子量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	亲水性总平均值 Grand average of hydropathicity
Lac00g000500	220	23 771.50	4.97	-0.318
Lac00g000880	145	16 013.09	7.80	-0.430
Lac00g001050	162	17 630.79	5.92	-0.394
Lac00g002910	118	12 834.73	10.34	-0.150
Lac00g003060	143	16 327.76	8.90	-0.292
Lac00g004840	143	16 327.76	8.90	-0.292
Lac00g004890	143	16 327.76	8.90	-0.292
Lac00g005620	143	16 345.78	9.08	-0.294
Lac01g000360	377	42 122.80	5.76	-0.188
Lac01g002250	330	35 904.79	6.00	-0.065
Lac01g002260	329	35 116.90	8.12	0.006
Lac01g002440	326	35 144.13	5.37	0.083
Lac01g005270	671	73 094.52	8.87	0.047
Lac01g006570	313	34 015.44	8.09	-0.171
Lac01g016900	327	35 939.12	9.16	-0.103
Lac02g008130	333	36 184.30	5.40	-0.021
Lac02g012390	333	35 348.70	4.58	-0.003
Lac02g014670	112	12 625.77	9.34	-0.125
Lac02g017280	333	37 446.70	5.55	-0.144
Lac03g014620	324	35 791.04	7.04	-0.142
Lac03g014630	327	35 909.04	5.79	-0.131
Lac03g015670	330	36 109.32	8.03	-0.113
Lac04g000640	316	34 862.79	8.10	-0.050
Lac04g012570	330	37 247.58	5.95	-0.222
Lac04g016390	327	36 553.71	6.44	-0.122
Lac04g017340	328	35 883.96	9.32	-0.074
Lac04g020260	332	36 443.27	9.11	-0.268
Lac04g020890	295	32 794.58	8.94	-0.357
Lac04g021070	318	34 572.52	9.04	-0.093
Lac05g003440	89	10 276.50	6.28	-0.767
Lac05g007400	285	31 404.69	6.47	-0.378
Lac05g010890	318	35 598.62	8.98	-0.484
Lac05g017060	331	35 784.95	8.38	-0.096
Lac05g017070	334	36 613.11	6.94	-0.120
Lac05g017080	330	35 858.02	9.33	-0.143
Lac05g017090	688	75 617.64	9.05	-0.233
Lac05g017100	335	36 509.65	8.91	-0.163
Lac05g017110	337	36 806.71	7.59	-0.193
Lac05g017120	336	36 204.02	7.61	-0.144
Lac06g003720	328	36 517.87	6.39	-0.030
Lac06g005420	347	38 763.30	5.91	-0.178
Lac06g005940	332	37 731.23	8.33	-0.365
Lac06g007790	352	38 237.94	9.20	-0.180
Lac06g013780	324	35 473.82	7.52	0.013
Lac06g021630	340	38 343.74	7.15	-0.322
Lac07g005610	332	36 009.35	9.04	-0.041
Lac07g008630	346	38 215.38	4.96	-0.111
Lac07g012460	327	35 746.85	8.09	-0.109
Lac07g014520	324	36 460.00	9.33	-0.176

续表 1 丝瓜 POD 基因家族成员信息
Tab. 1 The POD gene family identified from luffa genome (continued)

基因号 Sequence ID	氨基酸长度 Number of amino acid	分子量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	亲水性总平均值 Grand average of hydropathicity
Lac07g014880	322	34 743.92	9.38	-0.032
Lac07g014890	313	34 115.75	8.37	-0.218
Lac07g014900	323	35 599.69	9.42	-0.250
Lac07g014910	326	35 332.84	4.76	-0.160
Lac07g014930	321	35 028.13	9.24	-0.131
Lac07g016730	249	27 023.65	5.67	-0.289
Lac07g019770	327	35 645.81	6.43	-0.016
Lac07g019780	332	35 933.37	4.70	-0.084
Lac07g019790	334	36 389.17	8.57	-0.225
Lac07g019800	314	33 717.33	5.32	0.079
Lac07g019810	328	35 537.94	8.95	-0.027
Lac07g019820	329	35 436.72	8.60	0.019
Lac07g019830	388	43 306.15	6.04	-0.261
Lac07g019850	334	36 025.60	6.24	-0.162
Lac07g019860	319	34 315.63	4.86	0.005
Lac07g019870	321	34 311.44	4.92	-0.056
Lac08g012270	129	14 679.92	9.69	-0.353
Lac08g017630	335	36 749.88	7.62	-0.273
Lac08g018510	314	34 155.98	8.87	-0.067
Lac09g002650	326	36 063.14	8.30	-0.150
Lac09g011270	457	49 740.24	8.76	-0.388
Lac09g018070	321	35 060.80	8.07	-0.051
Lac09g020200	183	20 191.54	7.76	-0.428
Lac09g020210	137	15 202.90	8.97	0.368
Lac09g020220	318	33 627.59	8.82	-0.142
Lac09g021550	325	34 725.87	6.42	0.141
Lac09g021560	323	34 474.04	6.43	-0.018
Lac09g021570	338	36 548.29	4.86	-0.007
Lac09g021580	325	35 534.74	8.09	0.022
Lac10g000220	270	28 993.29	5.59	-0.281
Lac10g002630	622	70 549.43	5.54	-0.346
Lac10g006770	133	15 087.02	9.23	-0.516
Lac10g026110	325	34 688.24	5.21	0.066
Lac10g027660	329	36 654.82	8.90	-0.115
Lac10g028260	347	37 903.93	6.78	-0.273
Lac11g002020	320	35 144.15	8.79	-0.117
Lac11g009150	338	36 949.74	9.09	-0.346
Lac11g010050	323	36 114.22	6.90	-0.132
Lac12g006320	119	13 516.54	4.65	-0.140
Lac13g003130	316	34 175.87	8.57	-0.121
Lac13g003140	316	34 175.87	8.57	-0.121
Lac13g003320	316	34 175.87	8.57	-0.121
Lac13g003330	316	34 175.87	8.57	-0.121
Lac13g013220	342	37 569.96	5.34	0.005
Lac13g015810	346	37 716.06	5.72	-0.013

2.3 丝瓜 POD 家族基因结构、蛋白保守结构域和保守基序分析

利用 GSDS 在线软件对 POD 家族成员的基因

结构进行分析。结果表明, POD 基因家族具有相似的基因结构, 外显子数量介于 1~14 个之间, 大多数含有 3 个或者 4 个外显子。

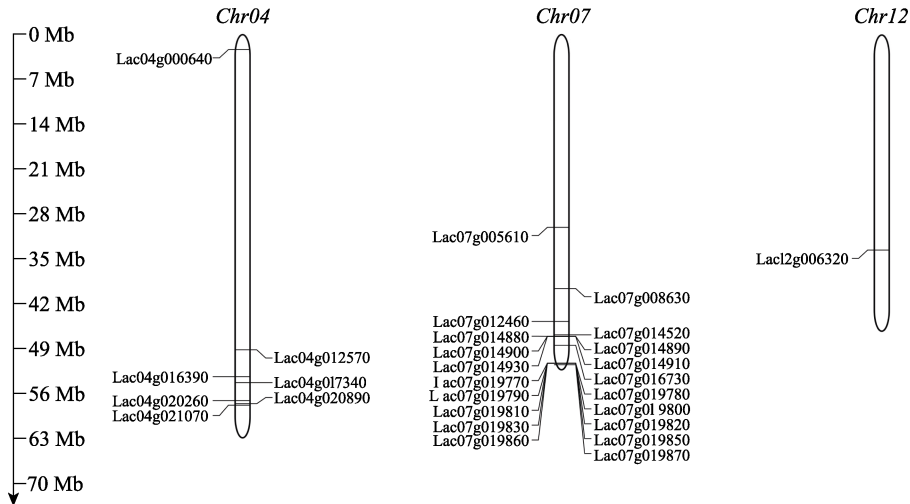


图 1 丝瓜 4、7、12 号染色体上的 POD 家族成员
 Fig. 1 POD family members on chromosome 4, 7 and 12

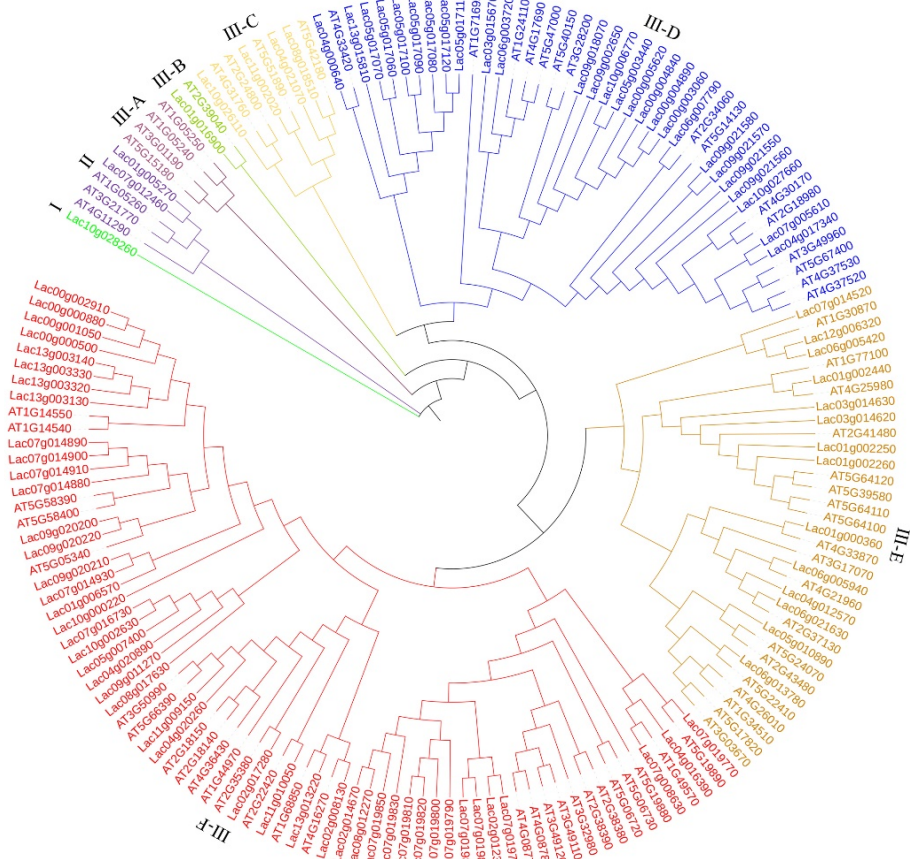


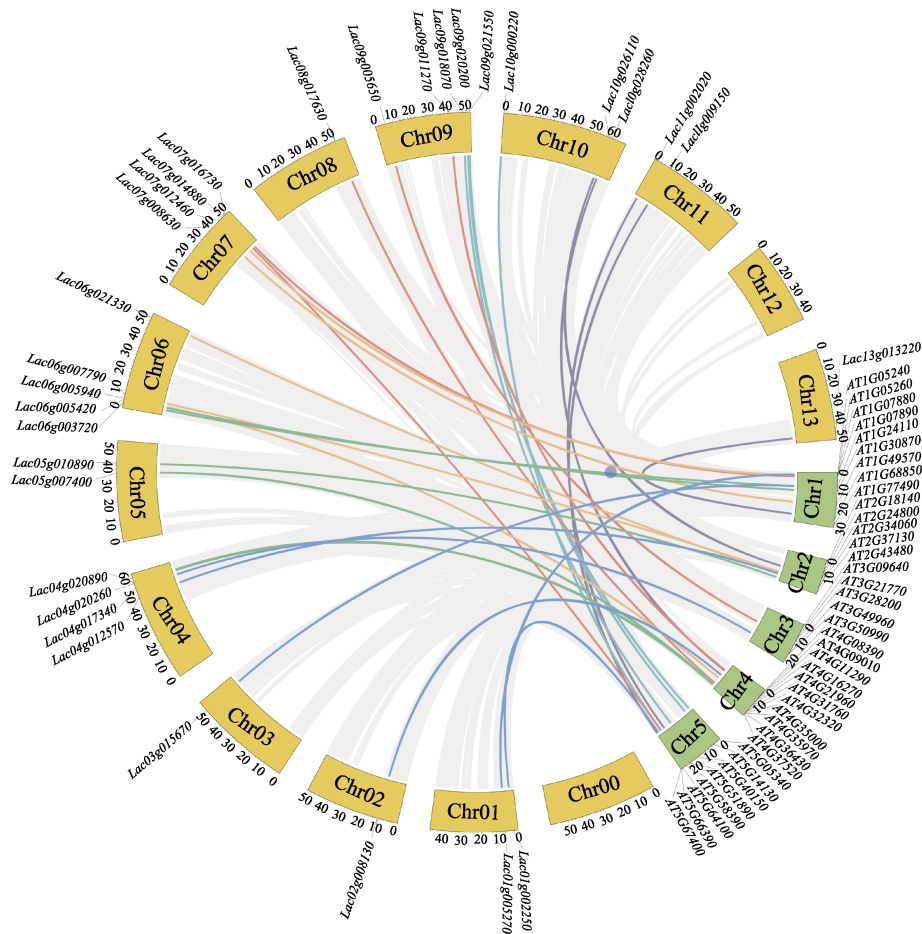
图 2 丝瓜和拟南芥 POD 家族成员进化分析
 Fig. 2 Evolution analysis of POD family members in *Luffa* and *Arabidopsis*

蛋白保守结构域分析表明，丝瓜 POD 家族成员都含有 plant peroxidases 保守结构域，其中 Lac01g005270 和 Lac05g017090 含有 2 个 plant peroxidases 保守结构域(图 4)。保守基序分析表明，不同的丝瓜 POD 家族成员含有的基序数量不同，

其中 Lac09g020210 只含有 1 个基序,Lac01g005270 和 Lac05g017090 含有 20 个基序(图 5)。

2.4 丝瓜 POD 家族成员的顺式作用元件分析

对丝瓜 POD 家族成员启动子序列顺式作用元件分析发现，POD 基因普遍存在与植物激素响



彩色线表示 POD 家族共线性基因，灰色线表示所有共线性基因，黄色框和绿色框分别表示丝瓜和拟南芥染色体。
The color lines represent POD collinearity between species, and the gray lines are collinearity of all gene members between species, Yellow and green boxes represent *Luffa* chromosomes and *Arabidopsis* chromosomes respectively.

图 3 丝瓜和拟南芥 POD 家族成员共线性分析

Fig. 3 Collinearity analysis of orthologous POD gene pairs between *Luffa* and *Arabidopsis*

应和胁迫响应相关的顺式元件（图 6）。植物激素响应元件包括脱落酸响应元件（ABRE，236 个），生长素响应元件（AuxRE，66 个），赤霉素响应元件（GARE，82 个），乙烯响应元件（ERE，154 个），水杨酸响应元件（SARE，45 个），茉莉酸甲酯响应元件（MeJRE，264 个）。胁迫响应元件包括低温响应元件（LTR，53 个），低氧胁迫响应元件（ARE，264 个），光响应元件（LRE，1054 个），干旱响应元件（104 个）包括参与干旱诱导的 MYB 结合位点（MBS）和脱水反应元件（DRE），防御和胁迫响应元件（DSRE，56 个）。

2.5 盐胁迫处理后丝瓜叶片 POD 活性升高

为了研究 POD 在丝瓜幼苗受盐胁迫时的作用，本研究测定了盐胁迫后丝瓜叶片中 POD 活性的变化。结果表明，在受到盐胁迫后，丝瓜叶片中 POD 活性升高，随着盐处理浓度的增加，POD 活性增加，达到极显著水平（图 7）。

2.6 丝瓜 POD 家族成员盐胁迫表达分析

采用 qRT-PCR 技术对丝瓜 POD 家族成员在不同浓度盐胁迫下的表达进行分析。结果表明，在 200、500 mmol/L NaCl 溶液处理下，56 个基因受 NaCl 胁迫诱导表达，包括 6 个基因（*Lac07g019770*、*Lac08g017630*、*Lac08g017630*、*Lac09g021570*、*Lac10g006770*、*Lac11g002020*）在 200、500 mmol/L 胁迫处理下极度上调表达（>100 倍），另外有 14 个基因在丝瓜叶片中不表达（图 8）。对 80 个检测到的基因进行表达趋势分析，获得 8 种基因表达趋势模式，有 2 种显著的基因表达趋势模式（ $P < 0.01$ ）（图 9）。其中 profile7 模式中，17 个基因在 200、500 mmol/L 胁迫处理下表达量依次升高，profile6 模式中，18 个基因受盐胁迫后表达量升高，且在 200、500 mmol/L 胁迫处理下表达量相似（图 9）。另外，11 个基因只在 500 mmol/L 胁迫处理时表达量上升（profile4），10 个基因只在

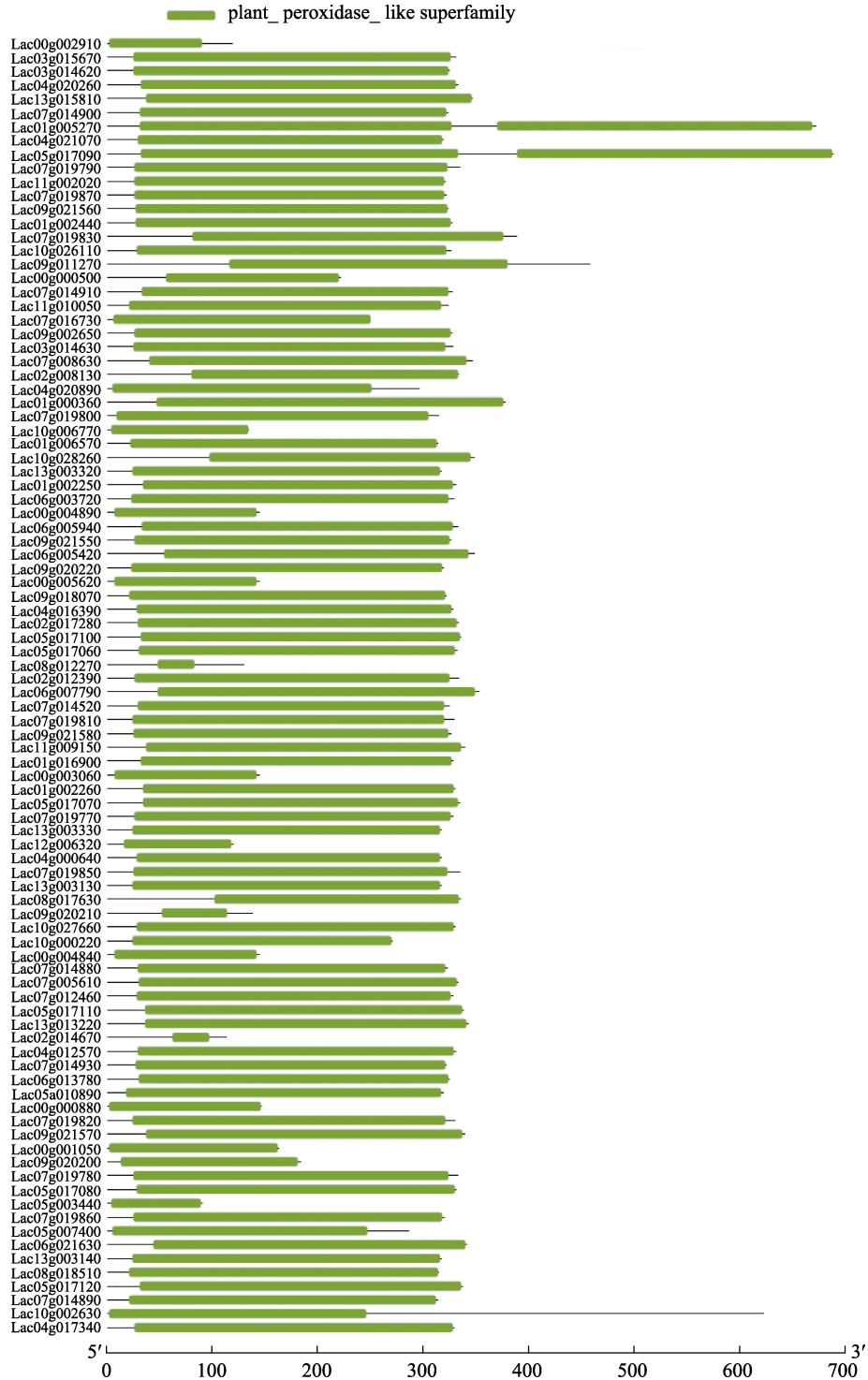


图 4 丝瓜 POD 家族成员保守结构域分析

Fig. 4 Analysis of conserved domains of POD family members in *Luffa*

200 mmol/L 胁迫处理下表达量上升 (profile5), 8 个基因在 200 mmol/L 胁迫处理下无变化, 而在 500 mmol/L 胁迫处理下表达量下降 (profile3)。

3 讨论

POD 是一种对环境条件十分敏感的氧化酶类,

其主要作用是清除氧代谢中产生的活性氧, 是植物在逆境条件下酶促防御系统的关键酶之一^[8-9]。植物在受到逆境胁迫时, 导致 ROS 累积, 随后过氧化物酶活性升高, 增强植物清除活性氧的能力, 降低 ROS 对细胞功能的伤害^[5, 19]。油棕幼苗经过缓慢低温胁迫可以提高 POD 活性, 进而提高油棕

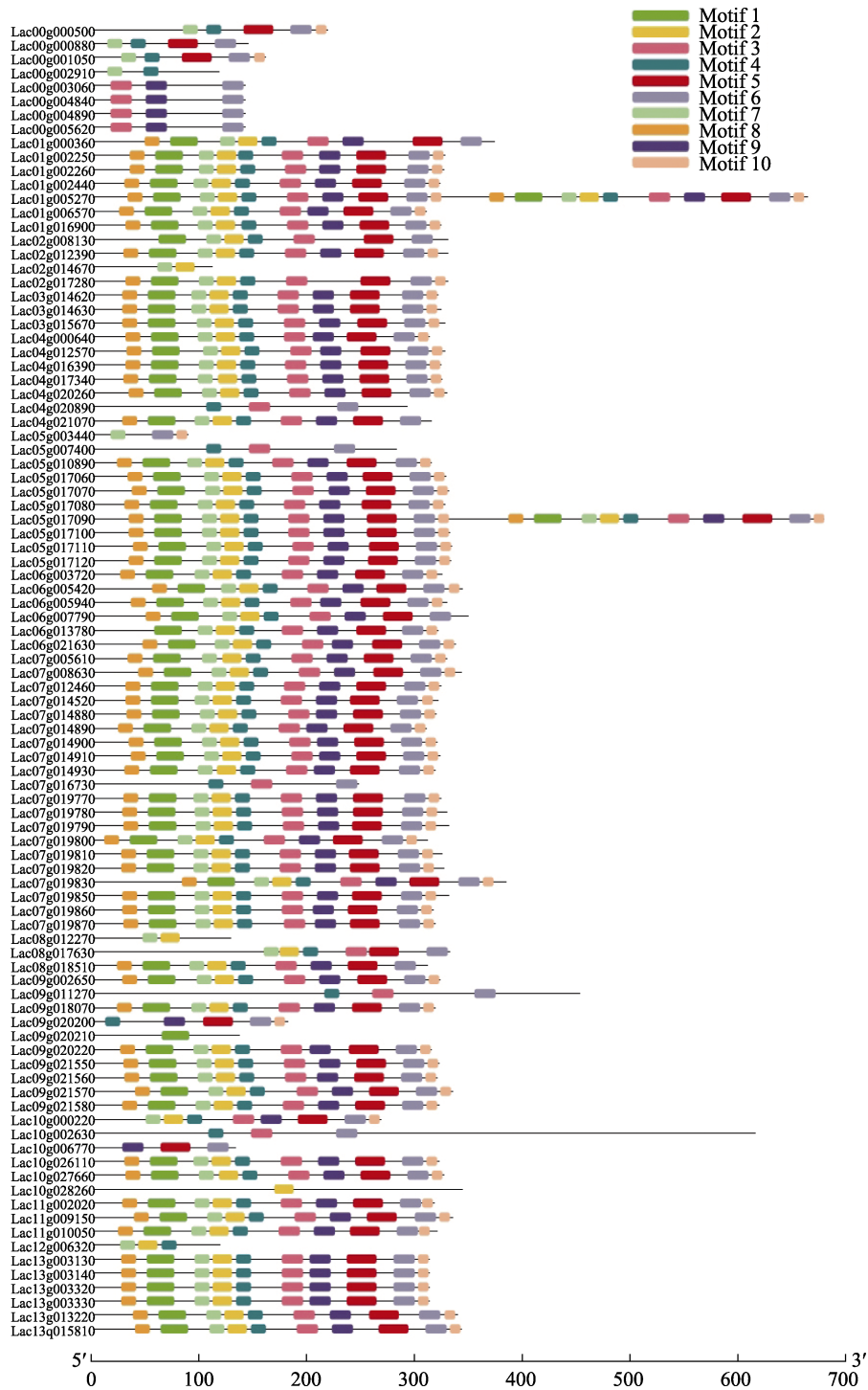


图 5 丝瓜 POD 家族成员保守基序分析
 Fig. 5 Analysis of motifs of POD family members in *Luffa*

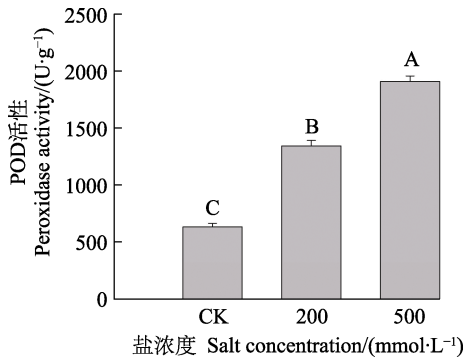
幼苗抗寒性^[20]。在抗病木薯种质受到细菌性萎蔫病侵染后, POD 活性显著高于感病品种, POD 与多酚氧化酶和苯丙氨酸解氨酶活性可作为木薯抗病性鉴定的辅助指标^[21]。本研究中, 丝瓜受到盐胁迫后, POD 活性增强, 并且随 NaCl 浓度升高而活性增强, 其可能参与丝瓜盐胁迫下活性氧的

清除, 降低活性氧对细胞的伤害, 增强丝瓜对盐胁迫的抵抗能力。本研究进一步从丝瓜基因组层面, 鉴定到 94 个 POD 家族成员, 全面分析了 POD 家族成员的理化性质、系统发育、染色体定位、基因共线性、基因结构、顺式元件, 以及对 NaCl 胁迫的响应, 为进一步研究 POD 家族成员生物功



图 6 丝瓜 POD 家族成员启动子顺式元件分析

Fig. 6 Analysis of *cis*-elements in promoters of POD family members in *Luffa*



不同大写字母表示处理间差异极显著 ($P < 0.01$)。 Different capital letters indicate extremely significant difference among treatments ($P < 0.01$)。 图 7 盐胁迫后丝瓜叶片 POD 活性 Fig. 7 POD activity of *Luffa* leaves after salt stress

图 7 POD activity of *Luffa* leaves after salt stress

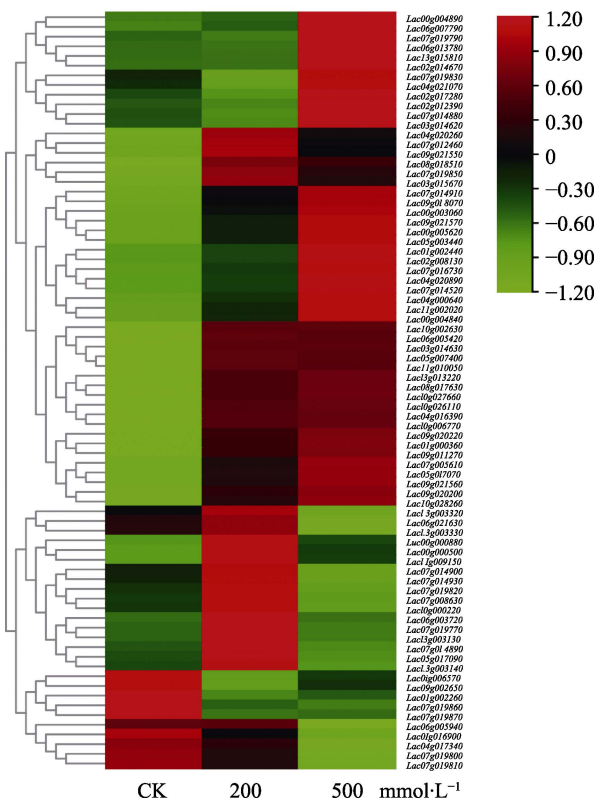
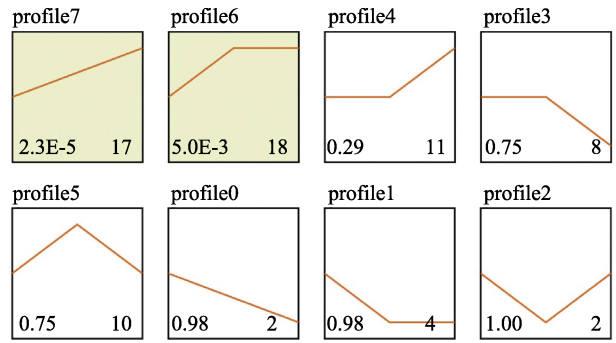


图 8 丝瓜 POD 家族成员盐胁迫表达分析 Fig. 8 Gene expression levels of POD family members after salt stress in *Luffa*

能奠定基础。

理化性质分析表明, 丝瓜 POD 家族成员大部分为亲水性蛋白 (82/94); 一半富含酸性氨基酸, 一半富含碱性氨基酸, 这与茶树^[13]、石榴^[22]、大豆^[12]研究相似。基因结构和保守基序分析发现, 所有的丝瓜 POD 家族成员都含有典型的过氧化物酶结构域, 以及大部分成员含有全部的 10 个基序 (66/94), 推测其可能在维持细胞内 ROS 平衡



左下角数字为 P 值, 右下角数字为基因数量。 The number in the lower left corner is the P value, and the number in the lower right corner is the number of genes. 图 9 丝瓜 POD 家族成员盐胁迫差异表达基因表达趋势分析 Fig. 9 Expression trends of differentially expressed genes of POD family members after salt stress in *Luffa*

起功能, 不同的蛋白基序可能决定了其参与不同的调控途径, 执行不同的生物学功能^[23-24]。

基因复制是基因组进化和功能分化的关键动力之一^[25]。在进化历史过程中, 大多数高等植物都经历了多倍体化, 是植物提高环境适应性的普遍现象^[26]。在棉花^[27]、二穗短柄草^[28]、葡萄^[23]中 POD 家族基因进化过程中, 发生基因串联重复或者片段重复, 是 POD 家族基因演化的主要驱动力之一。本研究中, 在丝瓜 7 号染色体上有连续 16 个 POD 家族基因, 5 号染色体上有连续 7 个 POD 家族基因, 表明 POD 家族基因在丝瓜中存在物种特异性扩张。基因共线性分析表明丝瓜和拟南芥物种之间存在 12 对共线性基因, 其中部分拟南芥 POD 基因在丝瓜中存在多个同源基因, 表明丝瓜 POD 家族存在串联重复基因或者片段重复基因。

许多研究表明, 植物过氧化物酶参与植物生长和发育过程中的各种细胞过程, 以及植物对非生物和生物胁迫的响应。玉米中根中的膜结合过氧化物酶 (pmPOX1、pmPOX2a、pmPOX2b 和 pmPOX3) 受茉莉酸甲酯、水杨酸和病原体诱导表达^[29]。葡萄中, 30 个 POD 基因受 NaCl、drought、和 ABA 诱导表达^[29]。苹果中, 超过 94.1% (48/51) POD 基因受 ABA、PEG、NaCl 胁迫诱导表达^[15], 谷子中 POD 家族成员受干旱和 ABA 诱导表达^[30]。通过对基因启动子顺式作用元件分析表明, 丝瓜 POD 家族成员启动子含有大量的与激素诱导、非生物胁迫相关的顺式作用元件, 表明其可能受非生物胁迫诱导表达。对丝瓜 POD 家族成员盐胁迫后基因表达分析发现, 56 个基因受盐胁迫诱导表

达, 其中 6 个基因极度上调表达 (>100 倍), 可能这些基因参与丝瓜受到盐胁迫后的过氧化物酶的合成, 进而参与细胞 ROS 的清除。

综上所述, 本研究首次从丝瓜基因组鉴定出 94 个丝瓜 POD 家族成员, 并对其进行理化性质、基因结构、基因定位、基因共线性分析以及盐胁迫响应分析。其中 56 个 POD 基因受盐胁迫诱导表达, 其可能参与丝瓜对盐胁迫响应。本研究为更深入研究丝瓜 POD 基因家族的生物学功能奠定基础。

参考文献

- [1] WU H, ZHAO G, GONG H, LI J, LUO C, HE X, LUO S, ZHENG X, LIU X, GUO J, CHEN J, LUO J. A high-quality sponge gourd (*Luffa cylindrica*) genome[J]. Horticulture Research, 2020, 7(1): 128.
- [2] ZHAO G, WANG M, LUO C, LI J, GONG H, ZHENG X, LIU X, LUO J, WU H. Metabolome and transcriptome analyses of cucurbitacin biosynthesis in *Luffa* (*Luffa acutangula*)[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 886870.
- [3] 颜国纲, 郑振佳, 时新刚, 葛长军. 丝瓜的营养价值及其综合利用研究进展[J]. 中国果菜, 2011(7): 35-36.
YAN G G, ZHENG Z J, SHI X G, GE C J. Research progress on nutritional value and comprehensive utilization of luffa[J]. Chinese fruits and vegetables, 2011(7): 35-36. (in Chinese)
- [4] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signaling transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 373-399.
- [5] CAVERZAN A, PASSAIA G, ROSA S B, RIBEIRO C W, LAZZAROTTO F, MARGIS-PINHEIRO M. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection[J]. Genetics and Molecular Biology, 2012, 35(Suppl.4): 1011-1019.
- [6] GILL S S, TUTEJA N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12): 909-930.
- [7] JHA S, SINGH R, JHA G, SINGH P, AGGARWAL D, SHUKLA M, DIKSHIT A. Plant Peroxidases: biomarkers of environmental stresses and signaling in plants[M]// AFTAB T, HAKEEM K R. Antioxidant defense in plants: molecular basis of regulation. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022: 135-156.
- [8] HIRAGA S, SASAKI K, ITO H, OHASHI Y, MATSUI H. A large family of class III plant peroxidases[J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42(5): 462-468.
- [9] BINDSCHEDLER L V, DEWDNEY J, BLEE K A, STONE J M, ASAI T, PLOTNIKOV J, DENOUEUX C, HAYES T, GERRISH C, DAVIES D, AUSUBEL F, BOLWELL G. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance[J]. The Plant Journal, 2006, 47(6): 851-863.
- [10] TOGNOLLI M, PENEL C, GREPPIN H, SIMON P. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. Gene, 2002, 288(1): 129-138.
- [11] PASSARDI F, LONGET D, PENEL C, DUNAND C. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants[J]. Phytochemistry, 2004, 65(13): 1879-1893.
- [12] ALEEM M, RIAZ A, RAZA Q, ALEEM M, ASLAM M, KONG K, ATIF R, KASHIF MBHAT J, ZHAO T. Genome-wide characterization and functional analysis of class III peroxidase gene family in soybean reveal regulatory roles of GsPOD40 in drought tolerance[J]. Genomics, 2022, 114(1): 45-60.
- [13] 史晓霞, 张宝会, 姚新转, 吕立堂. 茶树Ⅲ类过氧化物酶基因家族的鉴定及表达模式分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(11): 6.
SHI X X, ZHANG B H, YAO X Z, LYU L T. Identification and expression pattern analysis of class III peroxidase gene family in *Camellia sinensis* (L.) [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2021, 34(11): 6. (in Chinese)
- [14] 王赞, 曹红利, 岳川, 郭雅玲. 茶树 *CsGPX* 基因全基因组鉴定和表达分析[J]. 热带作物学报, 2019, 40(6): 1130-1137.
WANG Z, CAO H L, YUE C, GUO Y L. Genome-wide Identification and expression analysis of *CsGPX* gene in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(6): 1130-1137. (in Chinese)
- [15] 马维峰, 李艳梅, 马宗桓, 陈佰鸿, 毛娟. 苹果 POD 家族基因的鉴定与 *MdPOD15* 的功能分析[J]. 园艺学报, 2022, 49(6): 19.
MA W F, LI Y M, MA Z H, CHEN B H, MAO J. Identification of apple POD gene family and functional analysis of *MdPOD15* Gene [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(6): 19. (in Chinese)
- [16] LLORENTE F, LÓPEZ-COBOLLO R M, CATALÁ R, MARTÍNEZ-ZAPATER J M, SALINAS J. A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, *RCI3*, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance[J]. The Plant Journal, 2002, 32(1): 13-24.
- [17] 朱海生, 刘建汀, 王彬, 陈敏氨, 张前荣, 叶新如, 林琿, 李永平, 温庆放. 丝瓜过氧化物酶基因的克隆及其在果实褐变中的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(1): 43-52.
ZHU H S, LIU J T, WANG B, CHEN M D, ZHANG Q R,

- YE X R, LIN H, LI Y P, WEN Q F. Cloning of peroxidase gene from *Luffa* (*Luffa cylindrical*) and its expression analysis in fruit browning[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(1): 43-52. (in Chinese)
- [18] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS H R, FRANK MH, HE Y, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [19] 陆艾鲜, 凌瑞, 陈生煜, 翟俊文, 郑泽新, 吴沙沙. 高温胁迫下 8 个绣球品种的生理生化响应[J]. 热带作物学报, 2022, 43(4): 816-828.
- LU A X, LING R, CHEN S Y, ZHAI J W, ZHENG Z X, WU S S. Physiological and biochemical responses of eight *Hydrangea* cultivars to high temperature stress[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(4): 816-828. (in Chinese)
- [20] 刘艳菊, 周丽霞, 曹红星. 低温胁迫下不同浓度 ABA 对 4 个油棕新品种幼苗生理特性的影响[J]. 热带作物学报, 2020, 41(6): 1124-1131.
- LIU Y J, ZHOU L X, CAO H X. Effects of exogenous ABA on physiology of four new oil palm varieties under cold stress[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(6): 1124-1131. (in Chinese)
- [21] 林兆威, 李超萍, 蔡吉苗, 时涛, 黄贵修. 3 份木薯新种质抗细菌性萎蔫病机理初探[J]. 热带作物学报, 2021, 42(1): 205-212.
- LIN Z W, LI C P, CAI J M, SHI T, HUANG G X. Resistant mechanism to bacterial blight of three new cassava germplasms[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(1): 205-212. (in Chinese)
- [22] 冯立娟, 史作亚, 杨雪梅, 唐海霞, 焦其庆, 尹燕雷. 石榴 POD 基因家族鉴定及生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(10): 13.
- FENG L J, SHI Z Y, YANG X M, TANG H X, JIAO Q Q, Y Y L. Identification and bioinformatics analysis of peroxidase gene family in pomegranate[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(10): 13. (in Chinese)
- [23] XIAO H, WANG C, KHAN N, CHEN M, FU W, GUAN L, LENG X. Genome-wide identification of the class III POD gene family and their expression profiling in grapevine (*Vitis vinifera* L.)[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 444.
- [24] BAILEY-SERRES J, MITTLER R. The roles of reactive oxygen species in plant cells[J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 311.
- [25] REN R, WANG H F, GUO C C, ZHANG N, ZENG L P, CHEN Y M, MA H, QI J. Widespread whole genome duplications contribute to genome complexity and species diversity in angiosperms[J]. Molecular Plant, 2018, 11(3): 414-428.
- [26] GILBERT W, DE SOUZA S J, LONG M. Origin of genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(15): 7698-7703.
- [27] DUAN P, WANG G, CHAO M, ZHANG Z, ZHANG B. Genome-wide identification and analysis of class iii peroxidases in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and their responses to PK deficiency[J]. Genes, 2019, 10(6): 473.
- [28] ZHU T, XIN F, WEI S, LIU Y, HAN Y, XIE J, DING Q, MA L. Genome-wide identification, phylogeny and expression profiling of class III peroxidases gene family in *Brachypodium distachyon*[J]. Gene, 2019, 700: 149-162.
- [29] MIKA A, BOENISCH M J, HOPFF D, LÜTHJE S. Membrane-bound guaiacol peroxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 61(3): 831-841.
- [30] 马鑫磊, 许瑞琪, 索晓曼, 李婧实, 顾鹏鹏, 姚锐, 林小虎, 高慧. 谷子 III 型 PRX 基因家族全基因组鉴定及干旱胁迫下表达分析[J]. 作物学报, 2022, 48(10): 2517-2532.
- MA X L, XU R Q, SUO X M, LI J S, GU P P, YAO R, LIN X H, GAO H. Genome-wide identification of the class III PRX gene family in foxtail millet (*Setaria italica* L.) and expression analysis under drought stress[J]. Acta Agronomica Sinica, 2022, 48(10): 2517-2532. (in Chinese)