

菠萝黑心病发生过程中 *AcAPXs* 的表达分析及克隆

张媛媛^{1,2,3}, 鹿志伟², 李茂富¹, 姚全胜², 侯晓婉^{2,3*}

1. 海南大学园艺学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所/海南省热带园艺产品采后生理与保鲜重点实验室, 广东湛江 524091; 3. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要: 菠萝黑心病 (internal browning, IB) 严重制约菠萝产业发展, 该病害的发生主要是过量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 引起膜损伤, 打破质体多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 与液泡内酚类底物原有的区室化划分, 使其接触氧化后聚合成醌类物质。抗氧化清除系统能够清除过量 ROS, 维持机体内 ROS 的动态平衡。本课题组前期用抗氧化剂抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA) 处理采后‘巴厘’菠萝, 能有效延缓黑心病的恶化, 然而其作用机理尚不明确。抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX, EC1.1.11.1) 是 I 类血红素过氧化物酶, 以抗坏血酸作为特定的电子供体, 催化过氧化氢转化为水, 参与植物的多种发育生理过程和胁迫反应。本研究筛选出 6 个 *AcAPX* 基因, 对其黑心病发生过程以及 AsA 处理后的转录水平进行分析, 发现 *AcAPX1* 基因在贮藏后期极显著响应 AsA 处理, 9 d 和 12 d 时显著上调表达; 相关性分析发现, AsA 处理后的菠萝黑心病指数与 *AcAPX1* 基因表达水平呈显著正相关。结果表明: *AcAPX1* 显著响应 AsA 处理, 可能在 AsA 延缓菠萝黑心病中发挥重要作用。为了进一步探究其作用机制, 从菠萝果肉中克隆到 *AcAPX1* 基因, 通过生物信息学分析方法对其理化性质、蛋白结构域等进行分析。结果表明: 其开放阅读框长度为 753 bp, 编码 250 个氨基酸, 蛋白分子量预测为 27.410 87 kDa, 理论等电点为 5.52, 无跨膜螺旋区, 属于稳定亲水性蛋白; 氨基酸序列比对分析表明, 菠萝 *AcAPX1* 与番木瓜、香蕉、椰子、油棕的序列相似性达 85% 以上, 对 *AcAPX1* 基因进行功能结构域分析表明其具有血红素结合位点、K⁺结合位点及底物结合位点 (超家族: cl00196), 属于植物过氧化物酶超家族的成员。*AcAPX1* 基因的克隆对于研究其在菠萝中抗氧化能力中的分子机制及黑心病的防治具有重要意义。研究结果为进一步探究菠萝 *AcAPX1* 基因参与 AsA 清除 ROS, 延缓黑心病恶化的分子机制奠定基础。

关键词: 菠萝; 黑心病, 抗坏血酸过氧化物酶; qPCR; 克隆

中图分类号: S436.68 文献标识码: A

Expression Analysis and Cloning of *AcAPXs* During the Development of Internal Browning in Pineapple

ZHANG Yuanyuan^{1,2,3}, LU Zhiwei², LI Maofu¹, YAO Quansheng², HOU Xiaowan^{2,3*}

1. College of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. South Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Hainan Province for Postharvest Physiology and Technology of Tropical Horticultural Products, Zhanjiang, Guangdong 524091, China; 3. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Internal browning (IB) seriously restricts the development of pineapple industry. Its occurrence is mainly from excessive reactive oxygen species (ROS) causing membrane damage, which breaks the original compartmentalization between plastid polyphenol oxidase (PPO) and phenolic substrates in vacuoles. It polymerizes into quinones after contact with oxidation. The antioxidant clearance system is able to remove excess ROS and maintain the dynamic balance of ROS in the body. In early time, our laboratory used ascorbic acid (AsA) which can effectively delay the deterioration of IB of ‘Pairs’ pineapple. But the reaction mechanism of AsA is not clear. Ascorbate peroxidases (APX,

收稿日期 2022-07-12; 修回日期 2022-09-16

基金项目 海南省自然科学基金面上项目 (No. 320MS089)。

作者简介 张媛媛 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 菠萝黑心病发病机理。*通信作者 (Corresponding author): 侯晓婉 (HOU Xiaowan), E-mail: xiaowan-515@catas.cn。

EC1.1.1.1) are heme-binding enzymes that reduce hydrogen peroxide (H_2O_2) to water using AsA as an electron donor. It is involved in various developmental physiological processes and stress responses in plants. In this study, we selected six APX genes with AsA as the substrate in pineapple to analyze the occurrence process and the ascorbate transcript level changes after the AsA treatment. *AcAPX1* was significantly upregulated at 9 d and 12 d after AsA treatment and was significantly different from the control group. It showed that AsA significantly enhanced the *AcAPX1* expression. Correlation analysis showed that the incidence index of black heart disease was significantly positively correlated with the *AcAPX1* expression level. It is speculated that this gene may play an important role in AsA delaying IB with pineapple. To further explore the mechanism of action, *AcAPX1* was cloned from the pineapple pulp. The physicochemical properties and protein domain were analyzed by bioinformatics analysis. The results showed that the open reading frame length was 753 bp, encoding 250 amino acids. The predicted molecular weight of the protein was 27.410 87 kDa, and the theoretical isoelectric point was 5.52. There was no transmembrane helix region, which was a stable hydrophilic protein. Amino acid sequence alignment analysis showed that *AcAPX1* of pineapple shared more than 85% homology with papaya, banana, coconut and oil palm. The functional domain analysis of *AcAPX1* showed that it had heme binding sites, K^+ binding sites and substrate binding sites (superfamily: cl00196), belonging to the members of the plant peroxidase superfamily. Cloning of *AcAPX1* is of great significance for studying the molecular mechanism of its antioxidant capacity in pineapple and the control of internal browning. This study would lay a foundation for further exploring the molecular mechanism of pineapple *AcAPX1* involved in AsA clearing ROS and delaying the deterioration of internal browning.

Keywords: *Ananas comosus*; internal browning; ascorbic acid peroxidase; qPCR; clone

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.03.017

菠萝 [*Ananas comosus* (Linn.) Merr.] 是凤梨科凤梨属多年生单子叶常绿草本果树, 是世界三大热带水果之一, 也是我国热区的主要经济作物, 主要集中在台湾、广东、广西、福建、海南等省(区)。广东省是我国菠萝生产第一大省, 其主栽品种为‘巴厘’菠萝, 种植面积达 35 639 hm^2 , 产量达 111.0 万 $t^{[1-3]}$ 。然而‘巴厘’菠萝在采后贮藏和运输期间极易发生黑心病 (internal browning, IB), 使果髓乃至果肉均变为黑褐色, 导致果实品质显著降低, 耐储能力大幅度缩减, 给种植户以及收果商带来严重的损失^[3]。

黑心病是由低温 (昼/夜 $<25\text{ }^\circ\text{C}/20\text{ }^\circ\text{C}$) 引起的生理失调症, 该病害发生的实质是酶促氧化褐变^[1, 4]。前人通过对不同园艺物种冷害生理反应的研究发现, 长期低温导致的液泡膜损伤、线粒体肿胀和内部组织褐变^[3, 5-6], 均会使活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量增加。而 ROS 的过量积累诱导氧化损伤, 对机体产生包括生物膜脂过氧化、DNA 损伤、蛋白质变性等毒害效应^[7]; 对机体造成冷害的二次反应, 使细胞膜结构由相变成为刚变^[5]。菠萝由于田间或采后的长时间低温冷害, 使细胞膜出现不可逆的渗透性损伤, 打破膜质区域化划分, 导致质体内的多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 与液泡内的酚类底物均释放到细胞质中, 接触氧形成化醌类物质, 引起果肉褐变^[3, 8]。

为了维持自身 ROS 的动态平衡, 植物进化出一系列酶促和非酶促抗氧化防御系统^[9]。非酶促抗氧化系统包括抗坏血酸 (ascorbic acid, AsA)、还原型谷胱甘肽 (lglutathione, GSH) 等抗氧化物质, 而酶促抗氧化清除系统则包括抗坏血酸过氧化物酶 (ascorbate peroxidase, APX)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX) 等抗氧化蛋白酶^[10-11], 其分别属于水循环系统、AsA-GSH 循环系统和 GPX 循环系统, 其中 AsA-GSH 循环系统在抗氧化防御中发挥着主要作用^[12]。本课题组前期用抗氧化剂 AsA 处理采后‘巴厘’菠萝, 发现 AsA 能显著减少机体内 H_2O_2 含量、膜受损伤程度和 PPO 活性, 增强抗氧化防御系统关键抗氧化酶活性, 增加菠萝的抗氧化能力, 使 ROS 毒害效应减弱, 显著降低菠萝黑心病病情指数, 延缓黑心病的发生^[13-14], 但 AsA 在其中的发生机制尚不明确。APX 作为 AsA-GSH 循环系统的关键调节酶, 以 AsA 为电子供体, 将 H_2O_2 转换为 H_2O , 清除机体过量 ROS, 达到维持 ROS 稳态的目的^[15]。前人研究发现 APX 通过清除植物体内的 H_2O_2 参与植物的多种发育生理过程和胁迫反应, 如, ZHANG 等^[16]研究表明, 过表达 *OsAPX2* 可以清除活性氧, 提高水稻幼苗对于干旱、盐和低温胁迫的耐受性; ZHANG 等^[17]发现异源表达金孢隐霉菌 *CfAPX* 降低了转基因拟南芥 H_2O_2 含量, 具有较强的胁迫耐受性; CAVERZAN 等^[18]

研究表明 *chlAPXs* 参与水稻光氧化胁迫下的光合作用和保护的调控作用。

本研究从菠萝基因组数据库中 (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Acomosus_v3)^[19] 筛选到 6 个 *APX* 基因, 对黑心病发生过程以及抗坏血酸处理后的转录水平变化进行分析, 发现抗坏血酸处理显著增强 *AcAPX1* 基因的表达, 相关性分析发现, AsA 处理后菠萝黑心病指数与 *AcAPX1* 基因表达水平呈显著正相关, 因此, 猜想 *AcAPX1* 基因在 AsA 延缓黑心病恶化中发挥重要作用。为探究其作用机制, 进一步克隆 *AcAPX1* 基因, 并对该基因进行氨基酸理化性质、同源氨基酸比对、进化树构建、功能结构域分析以及亚细胞定位等一系列生物信息学分析, 为探究菠萝 *AcAPX1* 基因参与 AsA 清除 ROS, 延缓黑心病恶化的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选取菠萝栽培品种‘巴厘’(*Ananas comosus* L. cv. Comte de Paris) 为试验材料, 样本采收于中国热带农业科学院南亚热带作物研究所菠萝种植基地 (21°10'2"N, 110°16'34"E)。抗坏血酸 (AsA), 纯度 99%, 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 采后处理方法和 RNA 提取 挑选无病虫害、无机械损伤, 果实大小一致的六成熟果 60 个, 用 0.5 mg/L 咪鲜胺浸泡果实底部 1 min, 置阴凉通风处晾干备用。各取 30 个果, 分别用清水和 0.2% AsA 水溶液浸泡果实底部 15 min, 待风干后, 置于(25±2) °C 贮藏箱中, 分别于贮藏 0、3、6、9、12 d 时取 F/C 处果肉, 取样方式、具体位置以及黑心病指数参考侯晓婉等^[13-14]的方法, 液氮冷冻后, 研磨, 用 Quick RNA isolation Kit (北京华越洋生物技术有限公司) 快速通用植物 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 并选用 TransStart[®] Top Green qPCR SuperMix 试剂盒反转录合成 cDNA, 置于 -20 °C 冰箱备用。

1.2.2 菠萝 *APX* 基因转录水平分析 从菠萝基因组数据库 (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Acomosus_v3)^[19] 获得菠萝 *APX* 基因序列, 利用 NCBI Primer designing tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) 进行定量引物设计

(表 1), 通过全式金 TransStart[®] Tip Green qPCR SuperMix 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应, 其中, 反应体系为 20 μL, cDNA 模板 1 μL, 引物 F (10 μmol/L) 和 R (10 μmol/L) 均为 0.4 μL, 2×TransStart[®] Top Green qPCR SuperMix 10 μL, Prssive Reference Dye (50×) 0.4 μL, 无菌去离子水 7.8 μL。在 Roche LightCycler[®] 96 荧光定量仪中进行扩增反应, 反应程序如下: 预变性 95 °C 30 s, 循环反应: 变性 94 °C 5 s, 58 °C 30 s, 40 个循环, 溶解曲线: 95 °C 15 s; 60 °C 1 min; 95 °C 15 s。每个样品设置 3 个重复, 相对表达量采用 2^{-ΔΔC_T} 法进行分析。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Application
qAcAPX1-F	TTGTTGCCGTGGAAGTTA	表达分析
qAcAPX1-R	CGAAGAAAAGAGGATTGG	
qAcAPX2-F	GGAGCCTGGACAACAAAC	
qAcAPX2-R	CAACAAAAGGACGGAAAA	
qAcAPX3-F	GTGCTTGACAAAGGACC	
qAcAPX4-F	CTCTCAGAACTGGGCTTTAC	
qAcAPX4-R	CCTGAACTTCTGGATGTAAT	
qAcAPX5-F	GTGGTGGACGCTGGGTAC	
qAcAPX5-R	TTCTTGCTGGCGATTAGG	
qAcAPX6-F	AGTTCCCCGTCTCTCCT	
qAcAPX6-R	ACCTTCCCAGCGTGTGTC	
Acβ-actin-F	CTGGCCTACGTGGCACTTGACTT	内参基因
Acβ-actin-R	CACTTCTGGGCAGCGGAACCTTT	
AcAPX1-F	CAGTGGTCTCACAACATGGGGAA GTCCGAC	基因克隆
AcAPX1-R	CAGTGGTCTCATAATCAAGCAT CAGCAAACCTT	

1.2.3 *AcAPX1* 基因的克隆 从菠萝基因组数据库获得菠萝 *AcAPX1* 蛋白序列及基因序列, 运用 Primer 5.0 软件设计 *AcAPX1* 基因编码 (coding sequence, CDS) 全长序列克隆引物 (表 1)。使用 TransStart[®] FastPfu DNA Polymerase 试剂盒对 *AcAPX1* 基因 CDS 全长序列进行扩增, PCR 扩增体系及反应条件如下: 总体系 50 μL, 模板 1 μL, 引物 F (10 μmol/L) 和 R (10 μmol/L) 均为 1 μL, 5×TransStart[®] FastPfu Buffer 10 μL, NTP (2.5 mmol/L) 4 μL, TransStart[®] FastPfu DNA Polymerase 1 μL, ddH₂O 32 μL, 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。琼脂糖

凝胶电泳检测扩增结果, 切胶回收纯化, 连接至 T1 载体, 转化 DH5 α 感受态细胞, 在 37 °C 的恒温培养箱过夜培养, 并进行蓝白斑筛选, 挑选白色的阳性克隆菌斑后通过 PCR 筛选分析, 并送菌液进行测序。

1.2.4 AcAPX1 基因生物信息学分析 利用 NCBI 的 ORF (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线软件对 *AcAPX1* 基因开放阅读框进行分析; 运用 NCBI 在线搜索 *AcAPX1* 在不同物种中的同源蛋白序列; 通过 Conserved domains 在线软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对 *AcAPX1* 蛋白进行保守结构域预测; 通过 ExPASy-ProtParam 在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 *AcAPX1* 蛋白的理化性质进行分析; 利用 GSDS 2.0 在线软件 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 分析 *AcAPX1* 基因结构; 使用 DNAMAN v.8.0 软件对不同物种间的氨基酸序列进行比对; 利用 MEGA6 软件进行系统进化树构建; 利用在线软件 InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 预测 *AcAPX1* 蛋白的结构特征; 利用 SOPMA 在线软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html) 预测蛋白质二级结构; 用 SWISS-MODEL 在线软件 (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 预测 *AcAPX1* 蛋白三级结构; 通过在线软件 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行蛋白的信号肽预测; 使用在线分析软件 TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测序列的跨膜螺旋结构域; 运用 Cell-PLoc 2.0 在线预测软件 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对 *AcAPX1* 蛋白进行亚细胞定位分析^[20]。

1.3 数据处理

采用 Graphpad prism 9.0 软件对数据进行方差分析和相关性分析, 采用 Excel 软件制表^[21]。

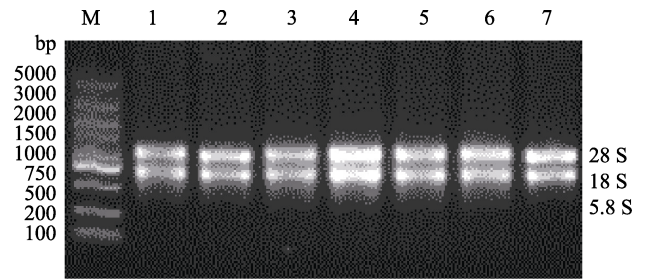
2 结果与分析

2.1 菠萝 RNA 的提取和反转录 cDNA

提取菠萝果肉 (F/S) 总 RNA, 经电泳鉴定 RNA 条带完整 (图 1), 用核酸测定仪测得其 $OD_{260/280}$ 在 1.6~1.8 之间, 可用于反转录实验。

2.2 菠萝 APX 基因转录水平变化及其与黑心病指数的相关性

前期研究发现 AsA 延缓了黑心病的恶化, 通



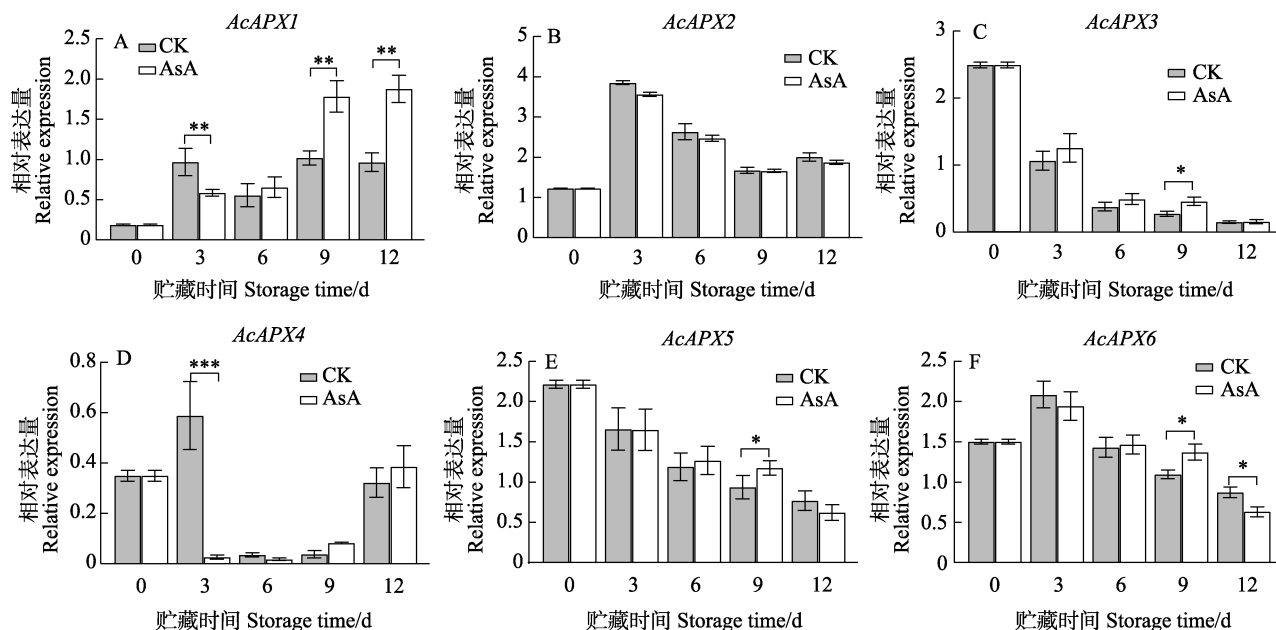
M: DL5000 DNA marker; 1~7: 菠萝果肉总 RNA 条带。
M: DL5000 DNA marker; 1-7: Total RNA of pineapple flesh.

图 1 菠萝果肉总 RNA 电泳结果

Fig. 1 Total RNA electrophoresis result of pineapple flesh

过 RT-qPCR 对采后贮藏 0、3、6、9、12 d 的 *APX* 基因转录水平进行分析, 结果显示, 6 个 *AcAPX* 基因均不同程度响应 AsA 处理 (图 2), 表明 *APX* 以 AsA 为电子供体, 参与菠萝的抗氧化过程, 在延缓黑心病的恶化中发挥一定作用。在各个贮藏阶段, *AcAPX3*、*AcAPX5* 基因在 CK 和 AsA 处理组中的表达整体变化趋势一致, 均持续下降, 并且均在 9 d 时, CK 与处理组有显著差异; *AcAPX2*、*AcAPX4* 和 *AcAPX6* 在贮藏初期显著上调, 3 d 后其表达呈下降趋势; 此外, 处理组与 CK 间 *AcAPX2* 和 *AcAPX6* 无显著差异; 而 AsA 处理后 *AcAPX4* 在 3 d 时极显著下降, 下降时间点从 CK 组的 6 d 提前到 3 d, 表明 AsA 处理提前了 *AcAPX4* 对黑心病的响应时间。 *AcAPX1* 在 AsA 处理组和 CK 中的表达趋势呈显著差异, AsA 处理后 *AcAPX1* 基因呈持续上升的表达趋势; 而 CK 中在贮藏初期上调后, 随着贮藏时间的延长, 其表达量无显著差异。

为了进一步筛选显著响应 AsA 延缓黑心病发生的关键基因, 进行黑心病指数与 *AcAPXs* 基因表达量的相关性分析 (表 2), 结果表明, CK 中, *AcAPX5* 基因对菠萝黑心病指数的影响最大, 相关系数为 -0.9348, 呈显著负相关 ($P < 0.05$), 而与其他基因无显著相关。AsA 处理组中, *AcAPX1*、*AcAPX5* 和 *AcAPX6* 基因对菠萝黑心病指数的影响较大, 其相关系数分别为 0.9362、-0.9142 和 -0.8998, 其中, 与 *AcAPX5* 和 *AcAPX6* 基因呈显著负相关 ($P < 0.05$), 与 *AcAPX1* 基因呈显著正相关 ($P < 0.05$), 与 *AcAPX1* 基因的相关系数更接近 1, 说明与黑心病指数的相关性更大; 并且贮藏后期 *AcAPX1* 基因的表达极显著高于 CK。综上所述, *AcAPX1* 基因显著响应 AsA 处理, 可能在 AsA 延缓黑心病的发生中发挥重要作用。



*表示差异显著 ($P < 0.05$), **和***表示差异极显著 ($P < 0.01, P < 0.001$)。

* indicates significant difference ($P < 0.05$), ** and *** indicate extremely significant difference ($P < 0.01, P < 0.001$).

图 2 AsA 处理下菠萝 AcAPX1 基因不同贮藏时间的表达量

Fig. 2 Expression of pineapple AcAPX1 in different storage time under AsA treatment

表 2 菠萝黑心病指数与 6 个 APX 基因表达水平的相关性

Tab. 2 Correlation between internal browning index of pineapple and the expression level of six APX genes

指标 Index	AcAPX1	AcAPX2	AcAPX3	AcAPX4	AcAPX5	AcAPX6
CK 组 IB 指数	0.6741	-0.2353	-0.8169	-0.4269	-0.9348*	-0.8339
AsA 组 IB 指数	0.9362*	-0.3225	-0.7858	0.3622	-0.9142*	-0.8998*

注：*表示显著相关 ($P < 0.05$)。

Note: * indicates significant correlation ($P < 0.05$).

2.3 菠萝 AcAPX1 基因的克隆及编码蛋白质的理化性质

以未处理的‘巴厘’菠萝果肉的 cDNA 为模板, 使用 AcAPX1-F、AcAPX1-R 特异性引物, 运用 RT-PCR 扩增 AcAPX1 基因的 CDS 全长 (图 3)。通过 BLAST 比对发现, 扩增片段包含完整的 CDS 序列, 全长为 753 bp, 编码 250 个氨基酸残基 (图 4)。AcAPX1 编码的蛋白分子量大小为 27.410 87 kDa, 分子式为 $C_{1220}H_{1880}N_{338}O_{367}S_8$, 理论等电点为 5.52, 该蛋白有 36 个带负电荷的氨基酸残基 (Asp+Glu), 28 个带正电荷的氨基酸残基 (Arg+Lys), 蛋白质半衰期为 30 h。菠萝 AcAPX1 基因编码的蛋白质不稳定系数为 39.87 (< 40), 表明该蛋白为稳定蛋白; 平均亲水性常数为 -0.436, 说明该蛋白为亲水性蛋白, 脂溶指数为 72.68, 其氨基酸组成如表 3 所示。运用 GSDS 2.0 分析 AcAPX1 基因结构表明, 该基因含有 5'UTR 和 3'UTR, 9 个外显子和 8 个内含子 (图 5)。

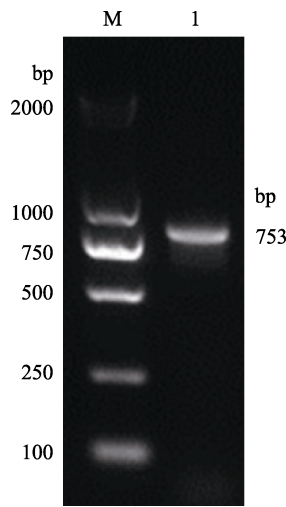
2.4 菠萝 AcAPX1 蛋白功能结构域分析及同源氨基酸序列比对

利用 NCBI Conserved Domain Search 寻找 AcAPX1 蛋白的保守区, 发现其含有 APX 蛋白家族的保守序列, 表明该蛋白属于植物过氧化物酶 (POD) 超家族, 并且具有血红素结合位点、 K^+ 结合位点及底物结合位点 (图 6)。通过 NCBI 的 Blast 工具对 AcAPX1 氨基酸序列进行比对, 结果表明, 菠萝 AcAPX1 与番木瓜、香蕉、椰子、油棕等热带植物的序列相似性达 85% 以上 (图 7)。结合保守结构域分析可得, AcAPX1 基因编码的蛋白除了含有植物 POD 结构域, 还含有 XANX、LPDAX 等保守片段 (图 7 红色方框区域), 这些片段是 APX 与底物 AsA 结合的关键。

2.5 系统发育树构建

采用 Construct/Test Neighbor-Joining Tree, Bootstrap 值为 1000, 利用 MEGA6 和 Clustalx 软件构建无根系统发育树, 进化树整体分为三大类

(图 8),结果表明,菠萝 *AcAPX1* 与油棕 *EgAPX*、椰子 *CnAPX* 和海枣 *PdAPX* 分为一组,表明菠萝与热带植物的亲缘关系较近。



M: DL2000 DNA marker; 1: *AcAPX1* 基因的 CDS 全长。
M: DL2000 DNA marker; 1: Full length CDS of *AcAPX1* gene.

图 3 *AcAPX1* 基因的 CDS 全长克隆电泳结果

Fig. 3 Full-length clone electrophoresis result of *AcAPX1*

```

1 ATGGGGAAGTGTATCCGACGGTGGAGCGAGGAGTACCGCGCGGG
  M G K S Y P T V S E E Y R A A
48 GTGGCGAAGTCCCGCGCAAGCTCCGGGGCTCATCGGGAGAAG
  V A K C R R K L R G L I A E K
91 AACTGCGGCGCGTTGATGCTCCGCGTGGCGTGGCACTCGCGGG
  N C A P L M L R L A W H S A G
136 ACGTACGATGCTCAGACGGGGACGGGGCGCGCTCGGGACGATG
  T Y D A Q T G T G G P F G T M
181 AGGCATGAGGTGGAGCGAGGACACGGCGCAATAATGGCTCGAA
  R H E V E Q G H G A N N G L E
226 ATAGCGGTCCGCATCTCGAGCCATCAAGGCCAGTTCCGAAAC
  I A V R I L E P I K A Q F P N
271 ATCTCGTATGGGGACTTCTATCAGCTTCCGGAGTGTGCTGTA
  I S Y G D F Y Q L A G V V A V
316 GAGATCACCGCGCGGGCGGAGGTTCTTCCATCCCGCGGACAG
  E I T G G P E V P F H P G R Q
361 GACAAAGCTGAGCTCCGAAAGAGTGGCTCCGATGCCACC
  D K P E P P E E G R L P D A T
406 AAAGTTCTGATCACCTCCCGATGTTTTGGTAAACAAATGGGA
  K G S D H L R D V F G K Q M G
451 TTGAGTGACAGGATATTTGCTCTATCTGGCGGGCATACTG
  L S D R D I V A L S G G H T L
496 GGAAGATGTCACAAGGAACGTTCTGGTTTTGAGGGAGCTGGACA
  G R C H K E R S G F E G A W T
541 ACAAAACCCCTTATTTTGATACTGACTTCAAGGAGCTTCTT
  T N P L I F D N S Y F K E L L
586 AGTGGAGAAAACAAGATCTGCTCAACTCCGCTGACAAGGCC
  S G E N K D L L Q L P S D K A
631 CTTCTCGCAGATCCTGTTTCCGTCCTTTGTTGAAATAAGCT
  L L A D P V F R P F V E K Y A
676 GCTGATGAGGATGCTTTTTCCGCCACTAAGCTCAGCTCAGT
  A D E D A F F A D Y A E A H M
721 AAGCTTCTGAGCTAGGGTTTCTGATGCTTGA
  K L S E L G F A D A *
    
```

图 4 *AcAPX1* 基因的全长序列及其编码的氨基酸

Fig. 4 Full-length sequence of cDNA and its coded amino acid for *AcAPX1*

表 3 *AcAPX1* 蛋白质的氨基酸组成

Tab. 3 Amino acid composition of *AcAPX1*

氨基酸	数量	占比	氨基酸	数量	占比	氨基酸	数量	占比
Amino acid	Amount	Percentage/%	Amino acid	Amount	Percentage/%	Amino acid	Amount	Percentage/%
Ala (A)	26	10.40	His (H)	8	3.20	Ser (S)	12	4.80
Arg (R)	14	5.60	Ile (I)	8	3.20	Thr (T)	10	4.00
Asn (N)	7	2.80	Leu (L)	23	9.20	Trp (W)	2	0.80
Asp (D)	16	6.40	Lys (K)	14	5.60	Tyr (Y)	8	3.20
Cys (C)	3	1.20	Met (M)	5	2.00	Val (V)	12	4.80
Gln (Q)	7	2.80	Phe (F)	13	5.20	Pyl (O)	0	0.00
Glu (E)	20	8.00	Pro (P)	16	6.40	Sec (U)	0	0.00
Gly (G)	26	10.40						



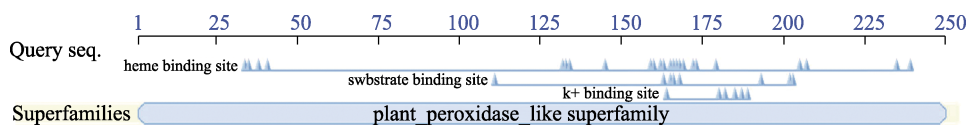
Legend:
■ CDS ■ upstream/downstream — Intron

蓝色格子为启动子区域,黄色格子为外显子,黄色格子之间的区域为内含子。

Blue lattice was the promoter region, yellow lattice was the exon, and the region between yellow lattices was the intron.

图 5 *AcAPX1* 基因结构图

Fig. 5 Structure of *AcAPX1*



数字表示氨基酸位置。

The number represents the position of amino acids.

图 6 *AcAPX1* 基因编码蛋白的功能结构域

Fig. 6 Function domain of amino acid sequence coded by *AcAPX1*

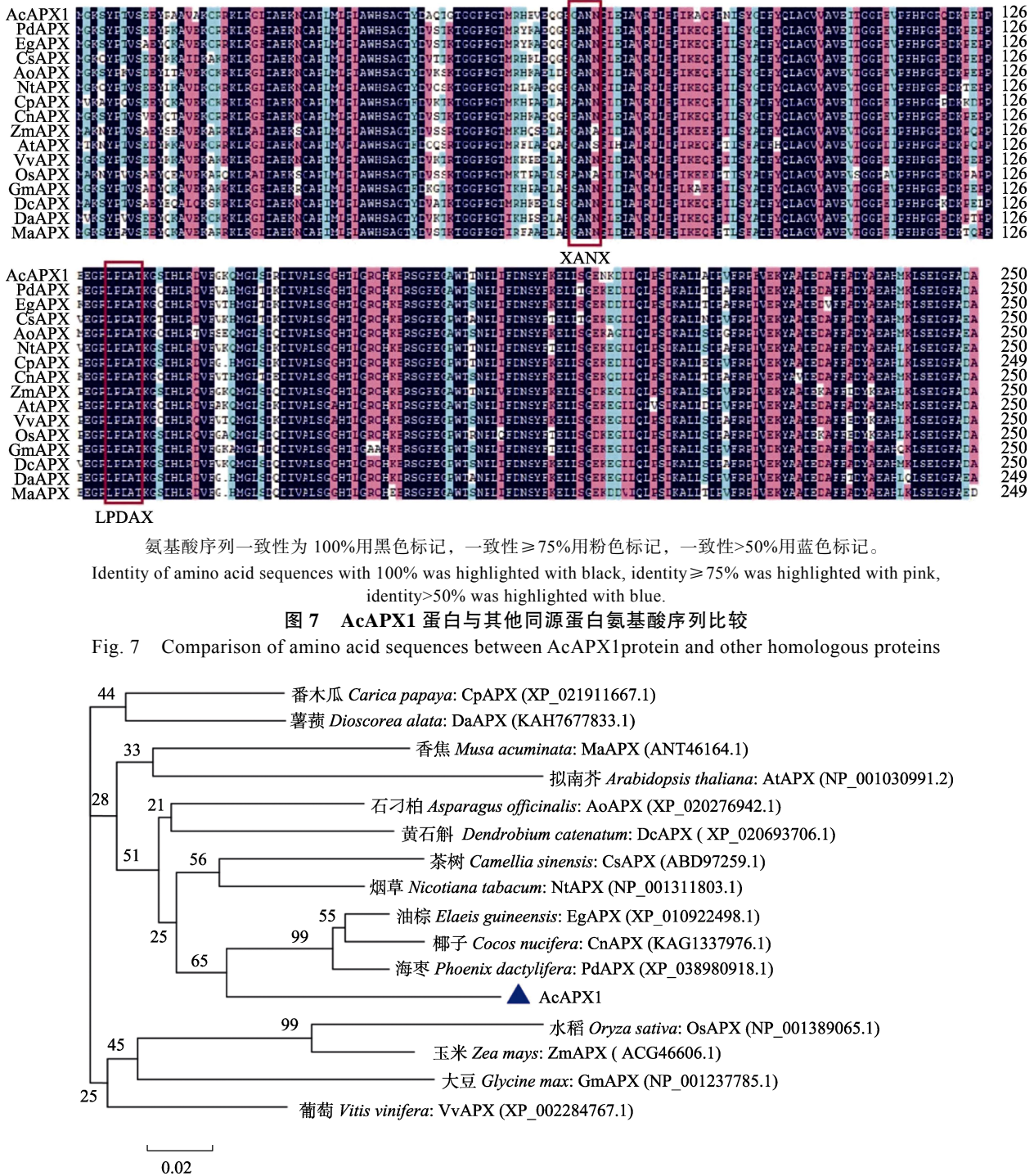


图 7 AcAPX1 蛋白与其他同源蛋白氨基酸序列比较
 Fig. 7 Comparison of amino acid sequences between AcAPX1 protein and other homologous proteins

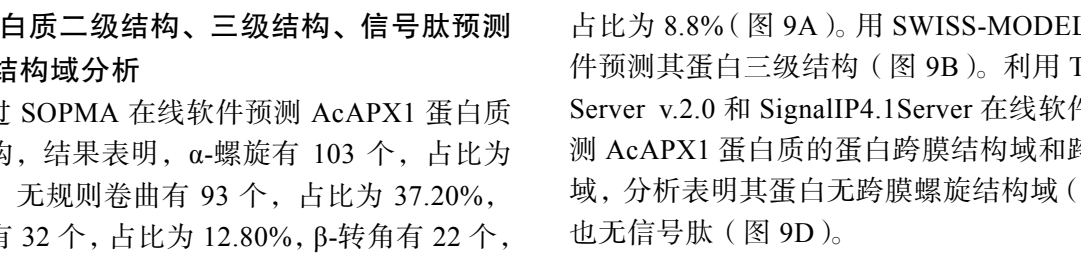
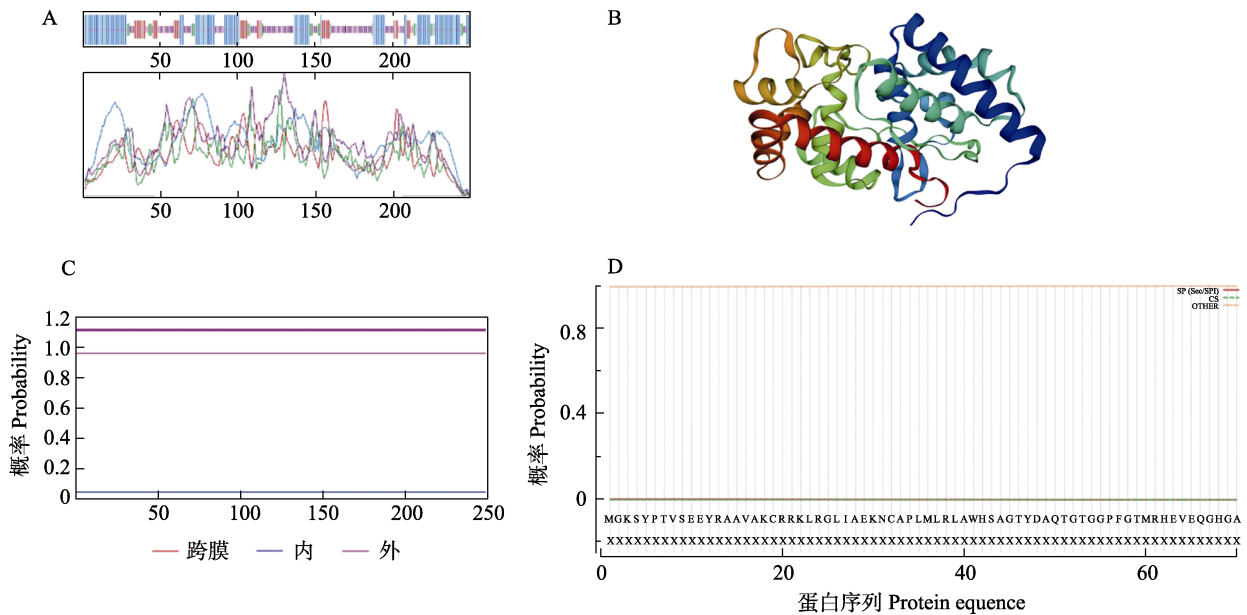


图 8 AcAPX1 蛋白及其同源蛋白系统进化树分析
 Fig. 8 Phylogenetic tree analysis of AcAPX1 protein and its homologous protein system

2.6 蛋白质二级结构、三级结构、信号肽预测和跨膜结构域分析

通过 SOPMA 在线软件预测 AcAPX1 蛋白质二级结构, 结果表明, α -螺旋有 103 个, 占比为 41.20%, 无规则卷曲有 93 个, 占比为 37.20%, 延伸链有 32 个, 占比为 12.80%, β -转角有 22 个,

占比为 8.8% (图 9A)。用 SWISS-MODEL 在线软件预测其蛋白三级结构 (图 9B)。利用 TMHMM Server v.2.0 和 SignalIP4.1Server 在线软件分别检测 AcAPX1 蛋白质的蛋白跨膜结构域和跨膜结构域, 分析表明其蛋白无跨膜螺旋结构域 (图 9C), 也无信号肽 (图 9D)。



分图 A: 蓝色为 α -螺旋, 红色为延伸链, 绿色为 β -转角, 紫色为无规则蜷曲; 分图 C: 横坐标为氨基酸位置, 纵坐标为每项指标的对应值。
In Tab. A: Blue is α -helix, red is extended strand, green is β -turn, purple is random coil; In Tab. C: The X-axis is the position of the amino acid, and the Y-axis is the value corresponding to each indicator.

图 9 AcAPX1 蛋白二级结构 (A)、三级结构 (B)、跨膜结构域 (C) 和信号肽 (D) 预测

Fig. 9 Prediction of secondary structure (A), tertiary structure (B), transmembrane (C) and signal peptide (D) for AcAPX1

2.7 亚细胞结构

通过 Cell-PLoc 2.0 在线预测软件 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对 AcAPX1 蛋白进行分析, 发现该蛋白可能存在于细胞质中。结合该蛋白无跨膜结构域, 加大了其定位于细胞质的可能性。

3 讨论

近年来, APX 基因的功能在水稻、拟南芥和玉米等植物中被广泛报道, APX 基因具有响应各种非生物胁迫, 增强植株抗氧化能力的功能。拟南芥、水稻缺乏 APX 基因时, 会造成 H_2O_2 含量升高, 引起 ROS 的过量积累, 对机体造成氧化损伤, 对生物大分子产生毒害效应, 甚至导致细胞死亡^[7], 降低植株抵御胁迫的能力^[22-24]; 过表达 APX 增强了水稻、拟南芥等植物的 APX 酶活性, 具有高效的 ROS 清除性, 提高了植株对于干旱^[15-16]、低温^[16]、重金属^[23]和盐^[25]等胁迫的耐受性。

菠萝黑心病是一种长时间低温冷害导致的生理失调症。长期低温冷害造成机体产生过量的 ROS, 引起膜损伤, 使得质体内的 PPO 与液泡内的酚类底物接触氧化形成醌类物质。通过 RTq-PCR 分析发现, AcAPX1-6 基因均响应黑心病的发生。AsA 处理延缓黑心病的恶化后, 改变

了 AcAPX1-6 基因的表达。特别是 AcAPX1 基因, 在 AsA 处理后, 其表达显著上调, 并且黑心病指数与 AcAPX1 基因表达水平呈显著正相关。AsA 处理后, 可能通过上调 AcAPX1 的表达来延缓黑心病的发生。基于 RTq-PCR 和相关性分析结果, 从‘巴厘’菠萝中成功克隆到 AcAPX1 基因, 分析表明该基因编码的蛋白质与其他物种 APX 蛋白具有相同的保守结构域, 具有 AsA 结合位点、血红素结合位点、 K^+ 结合位点, 属于 POD 超家族, 在清除 ROS 和植物抵抗外界胁迫中发挥重要作用; 系统发育树分析表明, 菠萝 AcAPX1 与油棕、椰子等热带植物的亲缘关系较近; AcAPX1 蛋白为亲水性蛋白, 并且不含跨膜结构和信号肽, 亚细胞定位预测其定位于细胞质中。

本研究结果为探究菠萝 AcAPX1 基因的功能及抗氧化机理奠定了基础。下一步将构建过表达载体, 通过转基因技术进一步研究该基因在抗氧化方面中的具体作用, 解析 AcAPX1 基因在 AsA 延缓菠萝黑心病恶化中发挥的作用机制。

参考文献

- [1] 宋康华, 谷会, 张鲁斌, 洪克前, 贾志伟, 侯晓婉. 菠萝黑心病研究进展[J]. 广东农业科学, 2019, 46(11): 85-91.
SONG K H, GU H, ZHANG L B, HONG K Q, JIA Z W,

- HOU X W. Advances in research of post-harvest pineapple blackheart disease[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2019, 46(11): 85-91. (in Chinese)
- [2] ZHOU Y C, O'HARE T J, JOBIN-DÉCOR M, UNDERHILL S J, WILLS R B, GRAHAM M W. Transcriptional regulation of a pineapple polyphenol oxidase gene and its relationship to blackheart[J]. Plant Biotechnology Journal, 2003, 1(6): 463-478.
- [3] KOUSHESH S M, MORADI S. Internal browning disorder of eight pear cultivars affected by bioactive constituents and enzyme activity[J]. Food Chemistry, 2016, 205: 257-263.
- [4] FUKUOKA N, MIYATA M, HAMADA T, TAKESHITA E. Occurrence of internal browning in tuberous roots of sweet potato and its related starch biosynthesis[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 135: 233-241.
- [5] LAURA S, SANCHEZ-BALLESTA M T, FELIX R, FLORES F B. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(4): 555-573.
- [6] HASSAN S, OHTANI K, WANG R, YUAN Y, WANG Y, YAMAGUCHI Y. Transcriptional regulation of hemo encoding heme oxygenase in *Clostridium perfringens*[J]. Journal of Microbiology, 2010, 48(1): 96-101.
- [7] SEWELAM N, KAZAN K, SCHENK P M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 187.
- [8] CHOUDHURY F K, RIVERO R M, BLUMWALD E, MITTLER R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination[J]. Plant Journal, 2017, 90(5): 856-867.
- [9] MITTLER R, VANDERAUWERA S, SUZUKI N, MILLER G, TOGNETTI V B, VANDEPOELE K, GOLLERY M, SHULAEV V, VAN B F. ROS signaling: the new wave?[J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(6): 300-309.
- [10] FOYER C H, NOCTOR G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(4): 861-905.
- [11] VAAHTERA L, BROSCHE M, WRZACZEK M, KANGASJARVI J. Specificity in ROS signaling and transcript signatures[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(9): 1422-1441.
- [12] CHOUDHURY S, PANDA P, SAHOO L, PANDA S K. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress[J]. Plant Signal & Behavior, 2013, 8(4): e23681.
- [13] 侯晓婉, 鹿志伟, 谷会, 贾志伟, 张鲁斌. 外源抗坏血酸处理对采后菠萝黑心病发生和果实品质的影响[J]. 热带作物学报, 2018, 39(10): 2014-2020.
- HOU X W, LU Z W, GU H, JIA Z W, ZHANG L B. Effects of exogenous ascorbic acid treatment on the occurrence of blackheart and fruit quality of postharvest pineapple[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(10): 2014-2020. (in Chinese)
- [14] 侯晓婉, 鹿志伟, 张鲁斌, 贾志伟, 谷会, 洪克前. 外源抗坏血酸对采后菠萝黑心病发生及抗氧化性能的影响[J]. 果树学报, 2018, 35(9): 1105-1116.
- HOU X W, LU Z W, ZHANG L B, JIA Z W, GU H, HONG K Q. Effect of exogenous ascorbic acid on blackheart occurrence and anti-oxidation activity in postharvest pineapple[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(9): 1105-1116. (in Chinese)
- [15] SOFO A, SCOPA A, NUZZACI M, VITTI A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(6): 13561-13578.
- [16] ZHANG Z G, ZHANG Q A, WU J X, ZHENG X, ZHENG S, SUN X H, QIU Q S, LU T G. Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2 (OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57472.
- [17] ZHANG Y T, YANG L W, ZHANG M, YANG J J, CUI J B, HU H L, XU J. CfAPX, a cytosolic ascorbate peroxidase gene from *Cryptomeria fortunei*, confers tolerance to abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 172: 167-179.
- [18] CAVERZAN A, BONIFACIO A, CARVALHO F E L, ANDRADE C M B, PASSAIA G, SCHUNEMANN M, MARASCHIN F D S, MARTINS M O, TEIXEIRA F K, RAUBER R, MARGIS R, SILVEIRA J A G, MARGIS-PINHEIRO M. The knockdown of chloroplastic ascorbate peroxidases reveals its regulatory role in the photosynthesis and protection under photo-oxidative stress in rice[J]. Plant Science, 2014, 214: 74-87.
- [19] MING R, VANBUREN R, WAI C M, TANG H, SCHATZ M C, BOWERS J E, LYONS E, WANG M L, CHEN J, BIGGERS E, ZHANG J, HUANG L, ZHANG L, MIAO W, ZHANG J, YE Z, MIAO C, LIN Z, WANG H, ZHOU H, YIM W C, PRIEST H D, ZHENG C, WOODHOUSE M, EDGER P P, GUYOT R, GUO H B, GUO H, ZHENG G, SINGH R, SHARMA A, MIN X, ZHENG Y, LE H, GURTOWSKI J, SEDLAZECK F J, HARKESS A, MCKAIN M R, LIAO Z, FANG J, LIU J, ZHANG X, ZHANG Q, HU W, QIN Y, WANG K, CHEN L Y, SHIRLEY N, LIN Y R, LIU L Y, HERNANDEZ A G, WRIGHT C L, BULONE V, TUSKAN G A, HEATH K,

- ZEE F, MOORE P H, SUNKAR R, LEEBENS-MACK J H, MOCKLER T, BENNETZEN J L, FREELING M, SANKOFF D, PATERSON A H, ZHU X, YANG X, SMITH J A, CUSHMAN J C, PAULL R E, YU Q. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(12): 1435-1442.
- [20] 王漫青, 程湘, 王广, 明玥, 曾静怡, 白小娜, 张绍鹏, 徐燃. 当归香豆酸-3-羟化酶基因 *ASC3H* 的克隆及表达模式与阿魏酸含量相关性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(4): 161-166.
- WANG M Q, CHENG X, WANG G, MING Y, ZENG J Y, BAI X N, ZHANG S P, XU R. Cloning and expression patterns of *ASC3H* gene in *Angelica sinensis* and its correlation with ferulic acid content[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2023, 29(4): 161-166. (in Chinese)
- [21] 鹿志伟, 侯晓婉, 杨子平, 张燕梅, 李俊峰, 周文钊. 剑麻 *AsLEC* 基因克隆及生物信息学分析[J]. *热带作物学报*, 2019, 40(6): 1122-1129.
- LU Z W, HOU X W, YANG Z P, ZHANG Y M, LI J F, ZHOU W Z. Cloning and bioinformatics analysis of *AsLEC* gene in *Agave sisalana*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40(6): 1122-1129. (in Chinese)
- [22] AVLETOVA S, RIZHSKY L, LIANG H, SHENGQIANG Z, OLIVER D J, COUTU J, SHULAEV V, SCHLAUCH K, MITTLER R. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(1): 268-281.
- [23] JIANG L, WANG W Y, CHEN Z P, GAO Q C, XU Q X, CAO H M. A role for *APXI* gene in lead tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Science*, 2017, 256: 94-102.
- [24] WANG X Y, HUANG W L, YANG Z M, LIU J, HUANG B R. Transcriptional regulation of heat shock proteins and ascorbate peroxidase by CtHsfA2b from African bermuda-grass conferring heat tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28021.
- [25] LU Z Q, LIU D L, LIU S K. Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(10): 1909-1917.