

张春华, 沈志军, 马瑞娟, 等. 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族基因鉴定和表达分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38( 4 ): 1049-1061.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.04.023

## 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族基因鉴定和表达分析

张春华, 沈志军, 马瑞娟, 张圆圆, 郭绍雷, 蔡志翔, 俞明亮

(江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** II 型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶( Type II *NADH* dehydrogenase ) 在所有已全基因组测序的植物中均存在, 具有多种功能, 尤其在大多数植物呼吸链中起重要作用。本研究对桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族基因进行了鉴定, 确定了桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因家族成员数目、亚家族分类, 并分别进行了克隆, 同时分析了它的进化关系、在基因组骨架上分布、启动子区域、基因结构、不同组织表达水平及其编码的蛋白质结构。结果显示, 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因家族共有 6 个成员, 分布在 3~6 号染色体上, 被分为 3 个亚家族: *NDA*、*NDB*、*NDC*。桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族成员, 脂肪族氨基酸指数范围是 80.63~95.75, 等电点预测结果表明 Prupe.3G231400.1 和 Prupe.5G076700.1 是酸性蛋白质, 其余 4 个是碱性蛋白质; *NDA* 和 *NDC* 亚家族成员二级结构均以无规则卷曲为主要构成元件, *NDB* 亚家族成员二级结构均以  $\alpha$ -螺旋为主要构成元件。II 型 *NADH* 脱氢酶家族基因在桃不同组织中的表达水平差异较大, 5 个基因在老叶中表达量相对较高, 在成熟果肉中表达量低。这些结果为下一步进行 II 型 *NADH* 脱氢酶基因功能验证奠定了重要基础。

**关键词:** 桃; II 型 *NADH* 脱氢酶; 基因家族; 基因表达

**中图分类号:** S662.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440( 2022 ) 04-1049-13

## Identification and expression analysis of the type II *NADH* dehydrogenase family genes in peach

ZHANG Chun-hua, SHEN Zhi-jun, MA Rui-juan, ZHANG Yuan-yuan, GUO Shao-lei, CAI Zhi-xiang, YU Ming-liang

(Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences / Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Type II nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase ( type II *NADH* dehydrogenase ) exists in all plants that have been sequenced by the whole genome and has a variety of functions, especially plays an important role in the respiratory chains of most plants. Type II *NADH* dehydrogenase family genes were identified in this study, and the number of member and subfamily classification were determined. At the same time, the phylogenetic relationship, the distribution on the scaffold, promoter region, gene structure, expression levels in different tissues and encoded protein structure were analyzed. The results showed that type II *NADH* dehydrogenase gene family in peach contained six members, which

收稿日期: 2021-09-11

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项( CARS-30 ); 江苏省基础研究计划( 自然科学基金 ) 面上项目( BK20201237 )

作者简介: 张春华( 1979- ), 女, 吉林永吉人, 博士, 研究员, 主要从事桃育种和果实品质分子机理研究。( E-mail ) chun-hua3217626@aliyun.com

通讯作者: 俞明亮, ( E-mail ) mly1008@aliyun.com

were located on the chromosome 3-6 and clustered into three subfamilies: *NDA*, *NDB* and *NDC*. All members of peach type II *NADH* dehydrogenase family were stable amphoteric proteins, and the aliphatic amino acid index ranged from 80.63 to 95.75. The isoelectric point prediction results showed that Prupe.3G231400.1 and Prupe.5G076700.1 were acidic proteins, and the other four were

basic proteins. The secondary structure of NDA and NDC subfamily members was mainly composed of random coil, while  $\alpha$ -helix was the main component for the secondary structure of NDB subfamily members. The expression levels of type II *NADH* dehydrogenase family genes in different tissues of peach were quite different. Among them, the expression levels of five genes were relatively high in old leaves and low in mature flesh. These results lay an important foundation for the functional verification of type II *NADH* dehydrogenase gene in the future.

**Key words:** peach; type II *NADH* dehydrogenase; gene family; gene expression

II 型 *NADH* 脱氢酶 (Type II *NADH* dehydrogenase, EC 1.6.99.3) 广泛存在于真细菌、古细菌、酵母、真菌和植物线粒体中<sup>[1-3]</sup>, 基因组测序的 100% 植物种类中均有 II 型 *NADH* 脱氢酶<sup>[4]</sup>。II 型 *NADH* 脱氢酶家族蛋白质的典型特点是存在一个保守的 C 端结构域, 该结构域在介导蛋白质的二聚化、膜锚定以及底物的识别中发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。II 型 *NADH* 脱氢酶不传递质子, 位于线粒体内膜表面 (内侧或者外侧), 也有位于质体和叶绿体的报道。II 型 *NADH* 脱氢酶相对分子质量低, 一般由单个多肽链组成, 驱动电子从 *NADH* 转移到泛醌<sup>[6]</sup>。与多聚体复合物 I 相反, II 型 *NADH* 脱氢酶对鱼藤酮不敏感, 通常含有 1 个 FAD 非共价结合分子作为氧化还原修复基因<sup>[2,7]</sup>。

植物能通过 II 型 *NADH* 脱氢酶氧化外源 *NADH* 和 *NADPH*<sup>[8-9]</sup>。II 型 *NADH* 脱氢酶介导的 *NADH* 氧化可以驱动更快的新陈代谢的产能过程, 以及加快碳元素流入生物合成路径, 因而可以更高效地合成 ATP<sup>[5]</sup>。每种植物至少含有 4 种对鱼藤酮不敏感的 II 型 *NADH* 脱氢酶<sup>[9]</sup>。多种植物基因组测序的完成为研究 II 型 *NADH* 脱氢酶家族基因提供了便利。根据报道, 来自部分植物的 II 型 *NADH* 脱氢酶基因已经被鉴定, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, *At*) 7 个<sup>[9]</sup>、水稻 (*Oryza sativa*, *Os*) 6 个、黄豆 (*Soybean*) 2 个<sup>[10]</sup>、土豆 (*Solanum tuberosum*, *St*) 2 个<sup>[11]</sup>、玉米 (*Zea mays*, *Zm*) 2 个<sup>[9,12]</sup>、甜菜 (*Beta vulgaris*, *Bv*) 2 个<sup>[12-14]</sup> 等。另外, 来自莱氏衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Cr*) 7 个 II 型 *NADH* 脱氢酶已被初步鉴定。

不断增加的证据显示 II 型 *NADH* 脱氢酶家族基因在氧化、光呼吸、生物和非生物逆境及其他代谢途径中起重要作用<sup>[10,15]</sup>。土豆叶片的 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质 NDA1 依赖光, 且对低温敏感, 5℃ 冷害处理 6 d 后, 蛋白质表达量下降为原来的 10%; 在早上蛋白质表达量出现峰值, 并可能与昼夜节律和光合作用有关<sup>[16-17]</sup>; 输入的蛋白质

II 型 *NADH* 脱氢酶在洋地黄素渗透时与膜相关。拟南芥叶片的 II 型 *NADH* 脱氢酶基因 *AtNDA1* 受光控制, *AtNDA2* 不依赖光, *AtNDA2* 在检测的拟南芥所有组织中均有表达, *AtNDA1* 特异性地在拟南芥地上所有组织中表达, 在根中几乎无表达; *AtNDB1* 和 *AtNDB2* 在拟南芥所有组织中均有表达, *AtNDB3* 和 *AtNDB4* 在拟南芥叶片中不表达, *AtNDB4* 在茎中也不表达; *AtNDC1* 在拟南芥所有检测组织中均有高表达, 表明可能与异养代谢、呼吸等活动相关。在莱氏衣藻中, *NDA1* 在复合物 I 缺乏的情况下, 起到氧化基质的作用<sup>[18]</sup>。II 型 *NADH* 脱氢酶是一类冗余蛋白质, 但是拥有良好的可塑性, 可以根据环境的不同起到不同的作用, 赋予了生物体更好的适应环境的能力<sup>[5]</sup>。

桃 (*Prunus persica*) 是蔷薇科 (Rosaceae) 李属 (*Prunus*) 植物, 果实柔软多汁、营养丰富, 深受消费者喜爱, 是世界广泛栽培的果树。中国是世界桃生产大国, 据联合国粮农组织统计数据库 (FAOSTAT) 最新统计, 2019 年中国桃种植面积 (84 0919 hm<sup>2</sup>) 和总产量 (15 841 928 t), 均稳居世界第一, 分别占世界桃种植总面积 (1 527 052 hm<sup>2</sup>) 的 55.07% 和总产量 (25 737 841 t) 的 61.55%; 中国桃种植面积排在李、黑刺李、苹果、梨和柿子之后, 超过葡萄; 总产量仅次于苹果、梨, 也已超过葡萄 (<http://www.fao.org/about/en>)。桃是二倍体 ( $2n = 2x = 16$ ), 具有相对小的基因组 (约 265 Mb), 特别是桃 Lovell、Chinese Cling 全基因组测序获得 26 335~27 852 个注释基因<sup>[19-20]</sup>, 为研究桃每个家族基因的特点和功能提供了坚实的基础。

目前, 尚未有桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族成员的系统鉴定和分析报道。鉴于此, 本研究鉴定了桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族成员, 并分析了进化特征、基因结构、蛋白质结构、组织表达等特性。研究结果将为进一步验证桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族基因在桃生长发育中的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族成员的鉴定

根据拟南芥 7 个Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶基因及其编码的蛋白质氨基酸序列,利用 BLAST 工具检索蔷薇科基因组数据库 (<http://www.rosaceae.org/node/355>) 桃参考基因组蛋白质氨基酸序列,将这些候选序列逐一提交到 NCBI 的在线工具 CD Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行保守结构域 (*NADH* dehydrogenase-like) 搜索,预测这些蛋白质有无Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶结构域。存在 *NADH* dehydrogenase-like 保守区域的蛋白质就被认为是Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质。

### 1.2 桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族基因克隆

使用植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司产品)分别提取桃野鸡红叶芽、老叶、幼叶、一年生枝条的枝表皮、根、幼果肉、熟果肉、熟果皮组织的总 RNA,使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳和微量

紫外可见分光光度计检测总 RNA 的纯度和浓度,分别以 1  $\mu$ g 各组织的总 RNA 为模板,使用 Prime-Script™Ⅱ 1st Strand 反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司产品]合成 cDNA 第一条链,并稀释 10 倍。

根据桃每个Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶基因的参考基因组 CDS 序列设计引物(表 1),以桃叶片 cDNA 为模板,PCR 扩增每个桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶基因的开放阅读框(Open reading frame, ORF)全长序列。PCR 反应体系 50.0  $\mu$ l: 21.0  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 25.0  $\mu$ l DNA 聚合酶混合物,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1.0  $\mu$ l, cDNA 2.0  $\mu$ l。PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳和胶回收后,回收片段与 pEASY-T3 载体(北京金全生物技术有限公司产品)连接并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,选取菌液 PCR 鉴定为阳性的克隆,由通用生物系统有限公司测序。

表 1 桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶基因克隆所用引物

Table 1 Primers used for cloning of type Ⅱ *NADH* dehydrogenase genes in peach

基因名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	预期产物大小 (bp)
<i>Prupe.6G055600.1</i>	CACCATGGCTTGGTTCAGAAGCCTC	GATTCTGTTATATCACGCCCGAAC	1 506
<i>Prupe.4G039000.1</i>	CACCATGGCATTAGAAAGGATTGCT	ACCTATTCTTGAGTTGTCTCTGCCA	1 653
<i>Prupe.3G231400.1</i>	CACCATGACGATCTCGTCCTTCTTC	AATGCGGCTTGAATCTCTCCCGAAA	1 746
<i>Prupe.4G037100.1</i>	CACCATGAGAGGTTTCGCTTTCTTC	AATGCGACTTGAATCCCTCCCCCAG	1 764
<i>Prupe.3G231300.1</i>	CACCATGGCCAAAACATCGAATTTT	AAGGCGACTTGAGTCTCTTCCGAAT	1 866
<i>Prupe.5G076700.1</i>	CACCATGATGTCATCAGTTGCATTA	TGAGTCTGAGAGAACCTTGCTCAGG	1 620

### 1.3 桃与其他物种Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质系统进化树的构建

利用软件 MEGA 4.1 内置的 Clustal W 程序对 6 个桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶与拟南芥 7 个、水稻 8 个、玉米 1 个、土豆 2 个、莱氏衣藻 6 个Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质氨基酸序列进行比对分析。7 个拟南芥Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质氨基酸序列 AT1G07180.1、AT2G29990、AT4G28220、AT4G05020、AT4G21490、AT2G20800、AT5G08740 下载自 <http://www.arabidopsis.org/>; 8 个水稻Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质氨基酸序列 Os07t0564500-01、Os01t0830100-02、Os01t0830100-01、Os05t0331200-01、Os06t0684000-02、Os06t0684000-01、Os08t0141400-01、Os06t0214900-01 下载自 <https://>

[rapdb.dna.affrc.go.jp](http://rapdb.dna.affrc.go.jp); 1 个玉米Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质氨基酸序列 Zm00001eb151430 下载自 <https://plants.ensembl.org/index.html>; 2 个土豆Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质氨基酸序列 PGSC0003DMG400021670、PGSC0003DMG400004168 下载自 <https://phytozome-next.jgi.doe.gov>; 6 个莱氏衣藻Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质氨基酸序列 XP\_001698901.1、XP\_001702271.1、XP\_001703055.1、XP\_001703643.1、XP\_001691969.1、XP\_001703056.1 下载自 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>。

根据多序列联配的结果,使用 MEGA 4.1 软件以相邻连接法构建系统进化树,并对构建的系统进化树进行自举评估,随机抽样重复次数设为 1 000,其他参数使用系统默认值。并根据拟南芥和水稻Ⅱ

型 *NADH* 脱氢酶家族的亚家族分类情况进行了桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族的亚家族分类。

#### 1.4 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因结构、启动子及保守结构域分析

每个基因序列及所在染色体位置下载自蔷薇科基因组数据库 (<http://www.rosaceae.org/node/355>)。运用在线网站 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析 II 型 *NADH* 脱氢酶基因结构, 包括外显子、内含子、3'UTR 和 5'UTR。在 GDR 数据库下载每个基因起始密码子前的 1~2 000 bp, 将序列输入 Promoter 2.0 服务器在线预测 II 型 *NADH* 脱氢酶基因启动子。

使用在线工具 Multiple EM for Motif Elicitation (MEME, version 4.8.1, <http://meme-suite.org/tools/meme>) 分析每个成员编码蛋白质的保守结构域, 并下载 LOGO 图。参数设置为: 保守区域 (Motif) 数量最多 5 个, 保守区域宽度 6~100。

#### 1.5 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质的一级、二级结构预测

利用 ExPaSy 的 Protparam 软件 (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 预测 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质一级结构及特性, 包括氨基酸数目、相对分子质

量大小、分子式、总原子数量、稳定性指数、理论等电点、蛋白质亲疏水性等。利用在线工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测每个蛋白质的跨膜结构域。信号肽预测网站采用 <https://novopro.cn/tools/signalp.html> 和 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>。

利用在线工具 SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 预测桃 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质二级结构中  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲等在整体结构中所占的比例, 窗口宽度设置为 17, 相似性阈值设置为 8。

#### 1.6 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因的表达分析

以各组织 cDNA 为模板, 采用 Primer Premier 5.0 软件 (Premier Biosoft), 为每个基因设计实时荧光定量 PCR 引物 (表 2), 使扩增产物出现在 6 个基因间的非保守序列, 采用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司产品] 进行荧光定量 PCR 反应, 反应体系和反应程序等参考 Zhang 等<sup>[21]</sup> 的方法。使用 SPSS20.0 对数据进行差异显著性分析, 所有数据以邓肯氏新复极差法进行检验。

表 2 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因荧光定量 PCR 所用引物

Table 2 Primers used for qRT-PCR of type II *NADH* dehydrogenase genes in peach

基因编号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	预期产物大小 (bp)
<i>Prupe.6G055600.1</i>	GTTCAGAAGCCTCATCCAAGTC	CGAGAGCAGAGTGTAAGAAAAT	88
<i>Prupe.4G039000.1</i>	GAAATGTTGTGTGAGGGAGC	GGAAATTGATAAGTTGGGGT	164
<i>Prupe.3G231400.1</i>	ATCTCGTCCTTCTTCACCA	TCCCAAGCACCACCACTCT	193
<i>Prupe.4G037100.1</i>	TATCCTTCGGTTCCCAAAGTGCTCG	CTCAGGGTTTGCCTCAGCGTAAGCC	81
<i>Prupe.3G231300.1</i>	TCGAATTTTACTTACCGCA	CATAGAAAGACTGTCCCA	127
<i>Prupe.5G076700.1</i>	TCAATTCTAGGGCAAAGCAC	CACTGGAAGCAACAGCAAAC	126
<i>RPII</i>	TGAAGCATACACCTATGATGATGAAG	CTTTGACAGCACCAGTAGATTCC	128

## 2 结果与分析

### 2.1 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族成员鉴定

根据拟南芥 II 型 *NADH* 脱氢酶基因编码的蛋白质检索出 6 个桃候选 II 型 *NADH* 脱氢酶 (表 3), 用 Conserved Domain Search 软件对其保守结构域进行预测, 结果显示, 桃有 6 种 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白

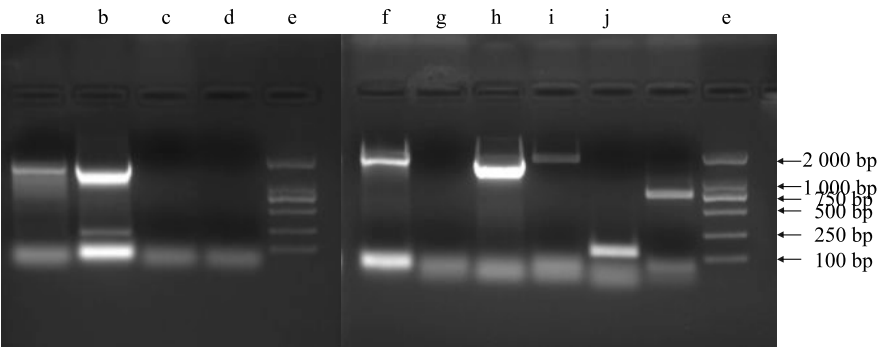
质。其中, *Prupe.6G055600.1*、*Prupe.4G039000.1*、*Prupe.3G231400.1* 只含有 1 个 *NADH* dehydrogenase-like 结构域; *Prupe.3G231300.1* 和 *Prupe.4G037100.1* 除了含有 *NADH* dehydrogenase-like 结构域外, 还含有 EF-hand 保守结构域, *Prupe.3G231300.1* 氨基酸序列的 426~499 aa 含有 2 个 EF-hand 结构域, *Prupe.4G037100.1* 只含有 1 个 EF-hand 结构域, 位

于390~464 aa; Prupe.5G076700.1 氨基酸序列含有 1 个小的 NADH 结合结构域,这个小的 NADH 结合位点被包含在一个更大的、被称作氧化还原辅基的 FAD 结合结构域里。

2.2 桃Ⅱ型 NADH 脱氢酶家族基因克隆

从野鸡红叶片中分离出 5 个基因,根据测序结果和参考基因组序列比对,发现 5 个Ⅱ型 NADH 脱氢酶基因与桃参考基因组 Lovell 品种中 5 个相应基

因的 ORF 分别完全一致, Prupe.6G055600.1、Prupe.4G039000.1、Prupe.3G231400.1、Prupe.4G037100.1、Prupe.5G076700.1 ORF 全长分别是1 506 bp、1 653 bp、1 746 bp、1 764 bp、1 620 bp,分别编码 501 个、550 个、581 个、587 个、539 个氨基酸;这些基因分别位于3~6 号染色体上(表 3)。在多个组织的 cDNA 文库中,多次设置不同温度梯度和模板浓度, Prupe.3G231300.1 都没有被扩增出来(图 1)。



a; Prupe.6G055600.1; b; Prupe.3G231400.1; c; Prupe.3G231300.1; d; Prupe.3G231400.1; e; Marker; f; Prupe.4G037100.1; g; Prupe.3G231300.1; h; Prupe.5G076700.1; i; Prupe.4G039000.1; j; RPII。

图 1 桃 6 个Ⅱ型 NADH 脱氢酶家族基因克隆  
Fig.1 Cloning of type II NADH dehydrogenase family genes in peach

表 3 桃Ⅱ型 NADH 脱氢酶家族基因信息

基因编号	所在染色体	基因在染色体上的位置	ORF 长度	基因名称	亚家族
Prupe.6G055600.1	6	3 917 924~3 921 952	1 506	PpNDA1	NDA
Prupe.4G039000.1	4	1 827 925~1 832 210	1 653	PpNDA2	NDA
Prupe.3G231400.1	3	22 853 111~22 857 078	1 746	PpNDB1	NDB
Prupe.4G037100.1	4	754 540~1 759 605	1 764	PpNDB3	NDB
Prupe.3G231300.1	3	22 849 557~22 852 998	1 866	PpNDB4	NDB
Prupe.5G076700.1	5	9 088 505~9 091 035	1 620	PpNDC1	NDC

2.3 桃与其他物种Ⅱ型 NADH 脱氢酶蛋白质系统进化树的构建

为评估桃和其他物种Ⅱ型 NADH 脱氢酶蛋白质的进化关系,对桃和其他 5 个物种Ⅱ型 NADH 脱氢酶家族蛋白质氨基酸序列进行系统进化树构建(图 2)。根据不同物种间Ⅱ型 NADH 脱氢酶家族蛋白质氨基酸序列的相似性和进化关系的远近,特别是根据拟南芥Ⅱ型 NADH 脱氢酶亚家族蛋白质分类,将桃Ⅱ型 NADH 脱氢酶蛋白质分成 3 个亚家族: NDA、NDB、NDC,分别包含 2 个、3 个、1 个成员。

NDA 亚家族中的 Prupe. 6G055600. 1 与

At1g07180( AtNDA1 ) 和 At2g29990 ( AtNDA2 ) 亲缘关系均较近,同时 Prupe.6G055600.1 与土豆 StPG-SC0003DMG400004168 ( StNDA1, NCBI 序列号: CAB52796.1 ) 进化关系也很近,因此,将 Prupe.6G055600.1 命名为 PpNDA1。Prupe.4G039000.1 命名为 PpNDA2。

桃 Prupe.3G231400.1 与拟南芥 At4g28220 ( AtNDB1 ) 和土豆 StPGSC0003DMG400021670 ( StNDB1 ) 紧密聚在一起,亲缘关系最近,因此,将 Prupe.3G231400.1 命名为 PpNDB1。桃 Prupe.3G231300.1 与拟南芥 At2g20800 ( AtNDB4 ) 聚在一起,将 Prupe.

3G231300.1 命名为 *PpNDB4*; *Prupe.4G037100.1* 与拟南芥 *At4g21490* (*AtNDB3*) 亲缘关系更近, 将 *Prupe.4G037100.1* 命名为 *PpNDB3* (表 3)。

桃 NDC 亚家族中仅含有 *Prupe.5G076700.1* 一个成员, 其与拟南芥 *At5g08740* (*AtNDC1*) 亲缘关系

最近, 在同一分支内, 因此, *Prupe.5G076700.1* 被命名为 *PpNDC1* (表 3)。

桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族成员比拟南芥 II 型 *NADH* 脱氢酶家族成员少了 1 个, 桃没有与拟南芥 *AtNDB2* 相对应的同源基因。

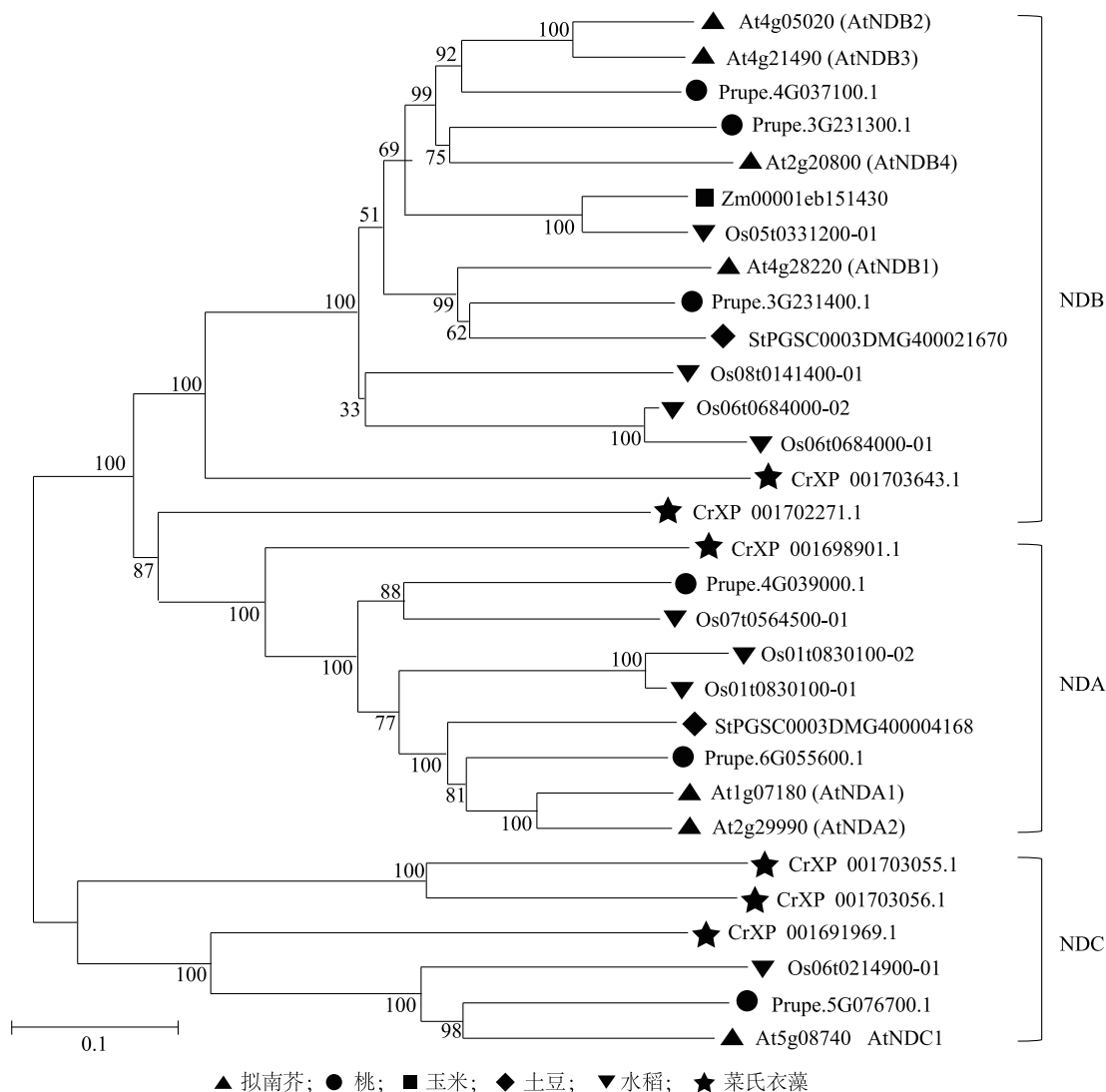


图 2 桃与其他物种 II 型 *NADH* 脱氢酶家族成员系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of type II *NADH* dehydrogenase family members in peach and other species

## 2.4 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因结构、启动子及保守结构域分析

桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因结构 (图 3) 显示, *NDA* 亚家族的 2 个基因均含有 8 个外显子和 7 个内含子, 而且 2 个基因之间外显子长度和外显子排列顺序几乎完全相同, 但是内含子长度、3'UTR 长度和 5'UTR 长度有很大不同。 *NDB* 亚家族的 *Prupe.3G231400.1* (*PpNDB1*) 和 *Prupe.4G037100.1* (*PpNDB3*) 基因均分别含有 10 个外显

子和 9 个内含子, *Prupe.3G231300.1* (*PpNDB4*) 含有 11 个外显子 10 个内含子, 且无上下游 3'UTR 和 5'UTR 结构。基因间相比, 同一编号的外显子长度几乎相等。 *Prupe.5G076700.1* (*PpNDC1*) 的基因结构与其他亚家族基因不同, 没有内含子, 由 3'UTR、5'UTR 和 1 个长外显子构成。

桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族 6 个基因的启动子分别位于基因起始密码子前 2 000 bp 范围的 496~546

bp、1 330~1 380 bp、1 771~1 821 bp、1 153~1 203 bp、1 612~1 662 bp、1 678~1 728 bp 处(表 4)。

保守区域分析结果(图 4 和图 5)显示,每个 PpNDA 和 PpNDB 亚家族成员均含有 4 个相同的保守结构域: motif 1、motif 2、motif 3、motif 5,这 4 个保

守结构域在每个成员的氨基酸序列中出现的先后顺序也相同。PpNDB 亚家族的 3 个成员除了含有上述 4 个保守结构域外,还含有 1 个 PpNDB 亚家族成员特有的保守结构域 motif 4。PpNDC 亚家族成员只含有保守结构域 motif 2 和 motif 3。

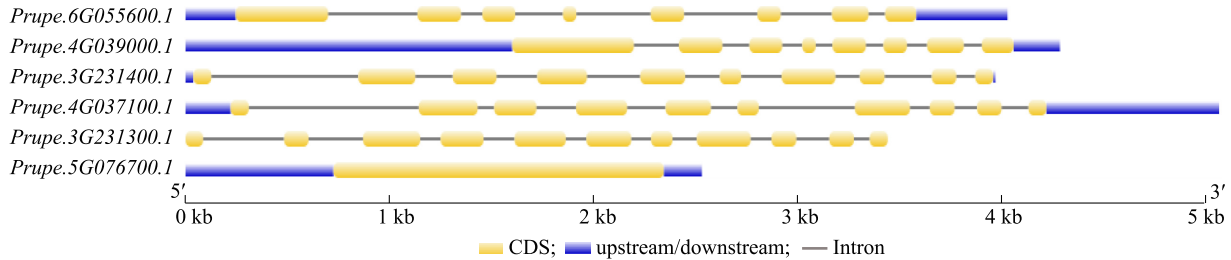


图 3 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族基因结构

Fig.3 Gene structure of type II *NADH* dehydrogenase family in peach

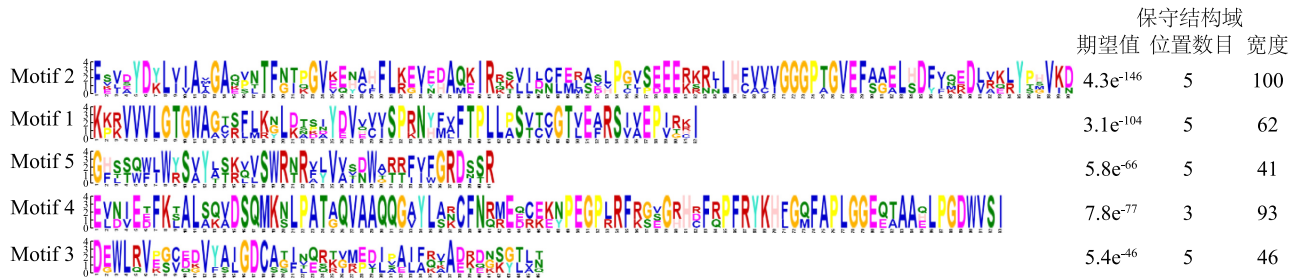
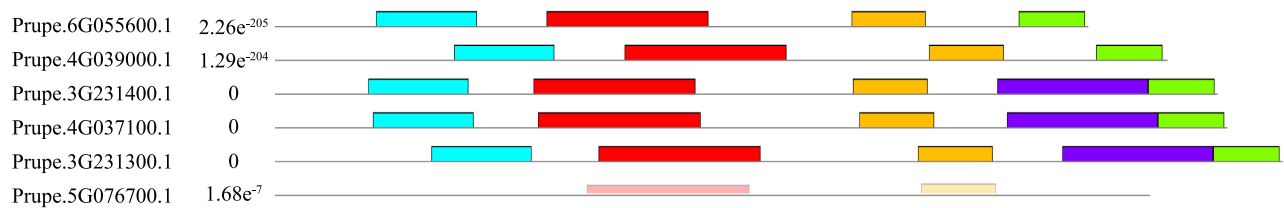


图 4 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族蛋白保守结构域标志

Fig.4 Conserved domain markers of type II *NADH* dehydrogenase family proteins in peach



蓝色: motif 1; 红色: motif 2; 桔黄: motif 3; 紫色: motif 4; 绿色: motif 5

图 5 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族蛋白质保守结构域

Fig.5 Conserved domain of type II *NADH* dehydrogenase family proteins in peach

## 2.5 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质一级、二级结构预测

桃 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质一级结构预测结果(表 5)表明,桃 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质氨基酸数目介于 501~621 aa, 相对分子质量介于 55 340~70 070; 而且发现 NDC 亚家族和 PpNDA 亚家族成员的氨基酸数目和相对分子质量小于 PpNDB 亚家族成员。

Prupe.3G231400.1 (PpNDB1) 和 Prupe.5G076700.1 (PpNDC1) 理论等电点值均小于 7, 说明是酸性蛋白质;

其余 4 个蛋白质的理论等电点均大于 7, 是碱性蛋白质。6 个蛋白质的不稳定指数介于 31.58~39.18, 均属于稳定蛋白质。6 个桃 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质亲水性指数平均值介于 -0.135~-0.308, 均是亲水性蛋白质(表 5)。

亚细胞定位预测结果(表 5)显示, 6 个桃 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质大概率位于线粒体或叶绿体; 跨膜结构域预测结果表明, 6 个蛋白质均无跨膜结构域; 6 个蛋白质 Prupe.6G055600.1、Prupe.4G039000.1、Prupe.3G231400.1、Prupe.4G037100.1、Prupe.3G231300.1、Prupe.

5G076700.1 有信号肽的概率分别是 0.748%、0.125%、31.022%、4.592%、0.046%、0.114%。

利用 SOPMA 程序对 6 个桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族蛋白质的二级结构进行预测,结果(表 6、图 6)显示,PpNDB 亚族成员蛋白质的二级结构全部以  $\alpha$ -

螺旋为主要构成元件,其次是无规则卷曲, $\beta$ -转角所占比例最低。而 PpNDA 和 PpNDC 亚族成员蛋白质的二级结构中占比最高的是无规则卷曲,其次是  $\alpha$ -螺旋, $\beta$ -转角所占比例最低。

表 4 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因启动子分析

Table 4 Promotor analysis of type II *NADH* dehydrogenase genes in peach

基因名称	基因编号	该基因起始密码子 前约 2 000 bp 在 染色体上的位置	启动子 开始 位置	启动子 结束 位置	启动子序列 (5'→3')
PpNDA1	Prupe.6G055600.1	3 916 171~3 918 170	496	546	ATATATATATATATATATATCTCTCAAACTCATTCGATAAGATGAGCAAC
PpNDA2	Prupe.4G039000.1	1 827 527~1 829 526	1 330	1 380	GATGTTTGCATATAAAATAGAGTTGTTCTGTTTACGAGTAGCTTTGTGTGC
PpNDB1	Prupe.3G231400.1	22 850 901~22 852 900	1 771	1 821	AATTGTCACGTAAAAAAGGGCACTCTATCTTTTGGGTCCGAGGTTGACT
PpNDB3	Prupe.4G037100.1	1 752 762~1 754 761	1 153	1 203	AGAAAATAAATAAAAAAGCGTCACAGAATCTAACATATTACGAGGTGTAA
PpNDB4	Prupe.3G231300.1	22 847 380~22 851 172	1 612	1 662	CCCTTGTAAAGTAAAAATCGCCTTATTTTCATTATATGACTAATTTGTATA
PpNDC1	Prupe.5G076700.1	9 087 231~9 089 230	1 678	1 728	TTTGGAGGTCTATATACTGCGTTAAGACTAGAATCTTTGGAATGGCCTGA

加粗的字母代表转录起始位置。

表 5 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族蛋白质一级结构分析

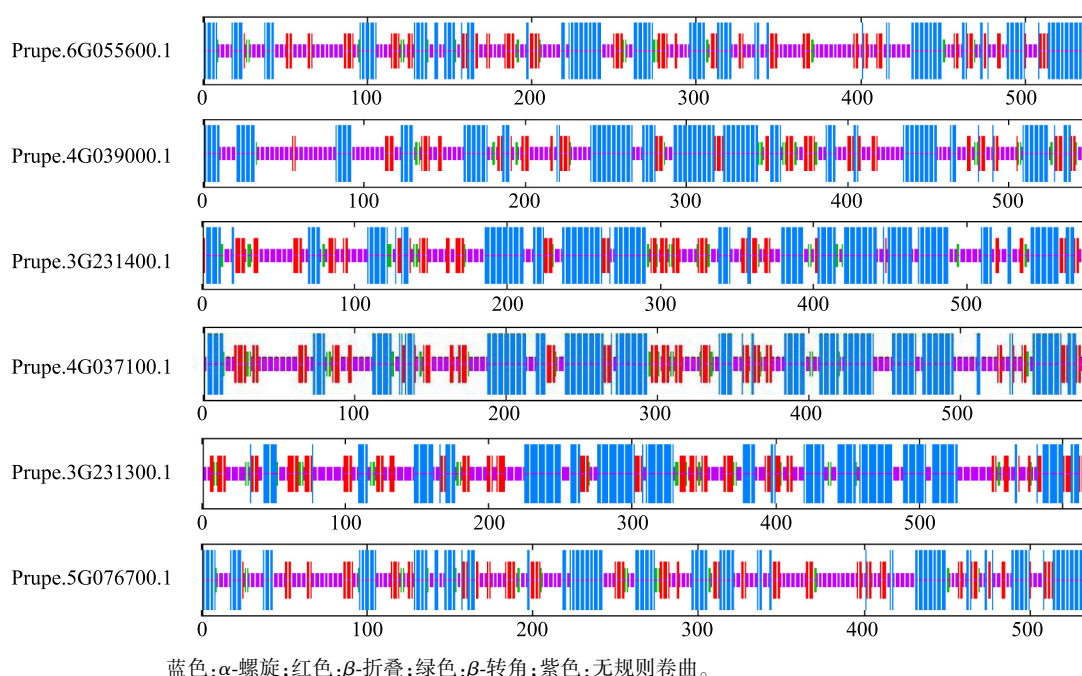
Table 5 Primary structural analysis of type II *NADH* dehydrogenase family proteins in peach

蛋白质 名称	蛋白质编号	氨基酸 数目	相对分 子质量	分子式	总原子 数	理论 等电点	不稳定 指数	脂肪族 氨基酸 指数	亲水性 指数平 均值	亚细胞定位预测 (可信度)	有信号 肽的概 率(%)
PpNDA1	Prupe.6G055600.1	501	55 340	C <sub>2 504</sub> H <sub>3 938</sub> N <sub>682</sub> O <sub>710</sub> S <sub>12</sub>	7 846	9.22	34.30	91.02	-0.136	线粒体(1.473) 叶绿体(1.297)	0.748
PpNDA2	Prupe.4G039000.1	550	61 180	C <sub>2 748</sub> H <sub>4 328</sub> N <sub>760</sub> O <sub>787</sub> S <sub>18</sub>	8 641	9.08	31.76	87.53	-0.178	叶绿体(1.797) 线粒体(1.143)	0.125
PpNDB1	Prupe.3G231400.1	581	65 000	C <sub>2 895</sub> H <sub>4 555</sub> N <sub>799</sub> O <sub>863</sub> S <sub>20</sub>	9 132	6.63	34.93	84.99	-0.248	叶绿体(1.829) 线粒体(0.466)	31.022
PpNDB3	Prupe.4G037100.1	587	65 860	C <sub>2 947</sub> H <sub>4 642</sub> N <sub>814</sub> O <sub>857</sub> S <sub>21</sub>	9 281	8.84	31.58	83.97	-0.263	叶绿体(1.618) 线粒体(0.544)	4.592
PpNDB4	Prupe.3G231300.1	621	70 070	C <sub>3 130</sub> H <sub>4 903</sub> N <sub>859</sub> O <sub>915</sub> S <sub>27</sub>	9 834	8.50	37.29	80.63	-0.308	叶绿体(0.917) 线粒体(0.871)	0.046
PpNDC1	Prupe.5G076700.1	539	59 060	C <sub>2 632</sub> H <sub>4 203</sub> N <sub>735</sub> O <sub>785</sub> S <sub>11</sub>	8 366	6.70	39.18	95.75	-0.135	叶绿体(2.339) 线粒体(1.021)	0.114

表 6 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族蛋白质二级结构分析

Table 6 Secondary structure analysis of type II *NADH* dehydrogenase family proteins in peach

亚家族名称	蛋白质名称	蛋白质编号	$\alpha$ -螺旋 占比(%)	$\beta$ -折叠 占比(%)	$\beta$ -转角 占比(%)	无规则卷曲 占比(%)
PpNDA	PpNDA1	Prupe.6G055600.1	37.72	17.96	4.19	40.12
	PpNDA2	Prupe.4G039000.1	38.36	16.18	4.73	40.73
PpNDB	PpNDB1	Prupe.3G231400.1	43.37	18.24	5.68	32.70
	PpNDB3	Prupe.4G037100.1	42.08	17.38	4.60	35.95
	PpNDB4	Prupe.3G231300.1	38.65	20.29	4.83	36.23
PpNDC	PpNDC1	Prupe.5G076700.1	33.40	18.55	4.45	43.60

图6 桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族蛋白质二级结构Fig.6 Secondary structure of type II *NADH* dehydrogenase family proteins in peach

## 2.6 桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶基因表达水平分析

以 *RPII* 为看家基因,以叶芽表达量为1,其他7个组织相对于叶芽组织表达量的相对水平进行计算,桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族基因在8个组织中的相对表达水平分析结果(图7)表明,*Prupe.6G055600.1* (*PpNDA1*) 在熟果肉中表达量显著高于老叶、枝表皮和其他组织;*Prupe.4G039000.1* (*PpNDA2*) 在根中表达量最高,其次是老叶,再次是叶芽,在果肉中表达量最低;*Prupe.3G231400.1* (*PpNDB1*) 在老叶和幼果肉中表达量最高,其次是根,再次是叶芽和幼叶,在熟果肉中几乎无表达;*Prupe.4G037100.1* (*PpNDB3*) 在老叶和根中表达量显著高于其他组织,在熟果肉中几乎不表达,在枝表皮、幼果肉、熟果皮表达量相近。*Prupe.3G231300.1* (*PpNDB4*) 在枝表皮和熟果肉中检测不到表达,在幼叶和根中表达量显著高于其他组织,在熟果皮、幼果肉、叶芽中表达量相近,没有显著差异;*Prupe.5G076700.1* (*PpNDC1*) 在老叶中表达量最高,其次是叶芽、幼果肉、枝表皮,再次是幼叶和根,在熟果肉中几乎检测不到表达。

## 3 讨论

### 3.1 桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族成员鉴定

本研究鉴定出桃有6个桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶成员,比拟南芥少了一个 *AtNDB2* 成员,这表明拟南芥

与桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族成员数目方面稍有差异,也有很高的保守性;这种物种间的保守性和差异性在其他植物中也被发现,水稻有8个Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶成员。这在一定程度上验证了以往报道:每种植物线粒体一定程度上至少含有4个不同的Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶<sup>[9]</sup>。综合这些研究结果,也说明植物Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族成员数目较少,是较小的家族。

桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族被分成3个亚家族,其他植物Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族也是被分为3个亚家族<sup>[22]</sup>,这体现了同一家族基因在不同物种间的保守性。特别是 *PpNDC* 亚家族,有且只有1个成员 *PpNDC1*,在拟南芥、水稻、白腐菌及本研究中都得到了证实<sup>[22]</sup>。

### 3.2 桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族基因克隆

从野鸡红的8种组织 cDNA 池中均无法扩增出 *PpNDB4* (*Prupe.3G231300.1*) 条带,经过在 NCBI 中查找该基因的基因组序列,发现与 GDR 中下载的基因组序列不同,有待进一步研究;但是根据参考基因组 Lovell 品种中 *Prupe.3G231300.1* 的 CDS 序列设计的 qRT-PCR 引物能扩增出 127 bp 目的片段,其表达水平在一些组织中也能被检测到。这与以往拟南芥中发现的类似:*AtNDB3* 无法克隆,并被认为是一

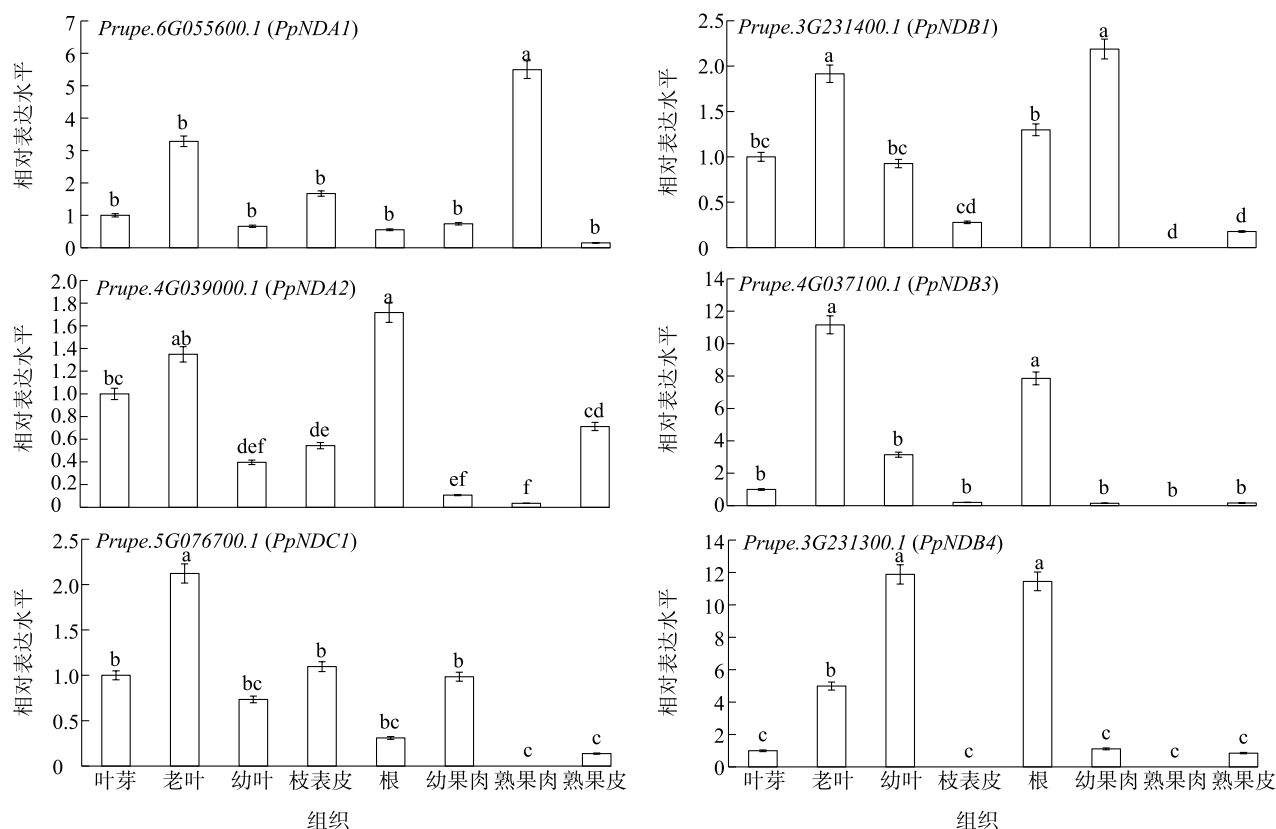


图 7 桃 II 型 NADH 脱氢酶家族基因相对表达水平

Fig.7 Relative expression level of type type II NADH dehydrogenase family genes in peach

个假基因<sup>[23]</sup>。在萌发过程中的转录组分析结果表明, *AtNDB3* 在萌发早期表达<sup>[24]</sup>。假基因是基因家族在进化过程中形成的, 往往存在于真核生物的多基因家族中。例如, 大多数光合作用的基因已经丢失或消失, 只保留为假基因<sup>[25]</sup>。由于假基因在选择压力降低的条件下进化, 可以推测出它们的种间变异性增加, 因此, 这些假基因可能是分类学研究中有用的分子工具<sup>[25]</sup>。这是首次报道在桃中发现假基因, *Prupe.3G231300.1* 的利用有待进一步深入探索。

### 3.3 桃 II 型 NADH 脱氢酶家族基因结构及蛋白质特性

基因结构方面, 桃 *PpNDA* 亚家族 2 个基因的外显子数量相同, 各 8 个, 这与拟南芥 *AtNDA* 亚家族 2 个基因的外显子数量相等<sup>[9]</sup>。说明 2 个物种间 *NDA* 亚家族基因在外显子数量上是保守的。比较桃 *NDA* 亚家族的 2 个基因, 发现外显子长度和外显子排列顺序、内含子排列顺序几乎完全相同, 但内含子长度、上下游长度有很大不同。比较拟南芥 *NDA* 亚家族的 2 个基因, 所有内含子的位置、大多数内含

子长度都是保守的<sup>[9]</sup>, 这说明桃和拟南芥 2 个物种的 *NDA* 亚家族成员基因结构高度保守, 除了 2 个物种间内含子长度略有不同。桃 *NDB* 亚家族 3 个基因的外显子位置、长度、数目、顺序高度保守, 内含子长度有差异; 比较拟南芥 *NDB* 亚家族 4 个基因, 大多数内含子位置保守, 和 *NDB1* 及 *NDB2* 相比, *NDB4* 丢失了几个内含子, 这些体现了 2 个物种间虽然略有差异, 但是具有高度保守性。这些基因结构上的保守性也为进化分析结果提供了支持。*NDC* 亚家族唯一成员拟南芥 *NDC1* 有 9 个内含子, 而桃 *NDC* 亚家族唯一成员 *NDC1* (*Prupe.5G076700.1*) 没有内含子, 这可能是自然选择的结果, 这种选择是由最小化转录成本所产生的优势驱动的, 因为内含子较短, 可以减少转录和剪接等过程的能量消耗, 从而提高转录效率<sup>[26]</sup>。

*PpNDC1* (*Prupe.5G076700.1*) 与拟南芥 *AtNDC1* (*AT5G08740*) 均是 *NDC* 家族唯一蛋白质, 两者的氨基酸序列均含有 1 个小的 NADH 结合结构域, 这个小的 NADH 结合位点被包含在一个更大的、被称作

氧化还原辅基的 FAD 结合结构域里。说明物种间同源基因结构上具有高度保守性,可能起源于同一个祖先。

EF-hand 是 1 个由  $\alpha$ -螺旋“E”(一个可能结合钙的环)和第二个  $\alpha$ -螺旋“F”组成的基序<sup>[27]</sup>。含有 EF-hand 保守区域的蛋白质主要有 2 类:钙离子传感器,可传递钙离子信号;钙离子信号调节剂,可调节钙离子信号的形状和/或持续时间,或参与钙离子稳态<sup>[28]</sup>。PpNDB 亚家族 3 个成员中有 2 个成员含有 EF-hand 保守结构域,而且 PpNDB4 (Prupe.3G231300.1) 含有 2 个紧紧相邻的 EF-hand 结构域, PpNDB3 (Prupe.4G037100.1) 在 390~464 aa 含有 1 个 EF-hand 结构域且是钙离子结合位点,这与以往报道相同,植物 NDB 蛋白含有 1 个 EF-hand 保守区域,大约 70 个氨基酸残基长度,它能结合钙从而保证活性,在烟草中已得到证实,NDB 活性依赖于钙<sup>[4,29]</sup>。这间接说明含有 EF-hand 结构域的氨基酸序列有共同的祖先,一个家族的成员间是同源基因。PpNDB4 (Prupe.3G231300.1) 蛋白质含有 2 个紧邻的 EF-hand 结构域,这与以往报道的 EF-hand 保守结构域经常成对出现的结论一致<sup>[27]</sup>。含有 EF-hand 保守结构域的蛋白质具有一系列多种功能<sup>[28]</sup>,有待在桃中进一步探索和挖掘。

桃 NDC1 (Prupe.5G076700.1) 有 1 个包含在大的 FAD 结构域里面的 1 个小 NADH 结合结构域,相对分子质量是 59 056。这与以往报道相同:含有 1 个 FAD 结构域的典型的Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶,相对分子质量大小是 50 000~60 000<sup>[2]</sup>。拟南芥中也有 1 个具有 FAD 结构域的典型的Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质 NDC1 (AT5G08740.1),相对分子质量是 57 018,也介于 50 000~60 000。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) NDH 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) NDI1 也分别是包含 FAD 的单个多肽Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质,相对分子质量是 45 000~50 000<sup>[9]</sup>。这些说明 NDC 亚家族中的 NDC1 相对分子质量在植物、细菌、酵母等生物中是不同的,在植物中含有 1 个 FAD 结构域的典型的Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质 NDC1,相对分子质量符合 50 000~60 000 的规律<sup>[2]</sup>,在细菌和酵母等生物中 NDC 相对分子质量范围需要进一步确定和总结。这可能与物种的基因组大小相关,植物基因组比细菌、酵母等基因组大。

### 3.4 桃Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶家族蛋白质亚细胞定位预测

最初的体内 GFP 融合方法确定拟南芥 NDA1、NDA2、NDB1、NDB2、NDC1 蛋白质都位于线粒体中<sup>[9]</sup>。Elhafez 等<sup>[23]</sup>通过对分离线粒体进行体外导入分析后确定 NDB1、NDB2 和 NDB4 定位于线粒体内膜的外部,NDA1、NDA2 和 NDC1 定位在线粒体内膜的内部。而 NDB3 因无法克隆,亚细胞定位未知。然而,随后的研究发现,拟南芥Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质事实上是双重定位的,NDA1、NDA2 和 NDB1 被发现定位在线粒体和过氧化物酶体,NDC1 被确定定位在线粒体和质体<sup>[30]</sup>。这些研究得出的结论不同,是因为最初的研究仅使用目标蛋白质的 C 端 GFP 标签加上 N 端前 50~100 个氨基酸构建载体<sup>[22]</sup>。

为了得到确定结论,Xu 等<sup>[22]</sup>2013 年通过 *AtNDA1*、*AtNDA2* 基因 ORF 全长 C 端融合表达,确定 *AtNDA1* 和 *AtNDA2* 表达的蛋白质定位在线粒体中。如果只把编码 *AtNDA1*、*AtNDA2* 蛋白质最后 10 个氨基酸的基因融合表达,则发现 *AtNDA1*、*AtNDA2* 表达的蛋白质定位在过氧化物酶体。*OsNDA1* 基因 ORF 全长 C 端融合表达,确定 *OsNDA1* 表达的蛋白质定位在线粒体中,如果只把编码 *OsNDA1* 蛋白质的最后 10 个氨基酸的基因融合表达,则发现 *OsNDA1* 表达的蛋白质不定位在任何位置,*OsNDA2* 表达的蛋白质定位在线粒体和过氧化物酶体;*AtNDB1* 表达的蛋白质定位在线粒体和过氧化物酶体,*AtNDB2* 和 *AtNDB4* 表达的蛋白质均只定位在线粒体;*OsNDB1* 和 *OsNDB2* 基因 ORF 全长 C 端融合表达,确定 *OsNDB1* 和 *OsNDB2* 表达的蛋白质定位在线粒体中,如果只把编码 *OsNDB1* 和 *OsNDB2* 蛋白质最后 10 个氨基酸的基因融合表达,则 *OsNDB1* 和 *OsNDB2* 表达的蛋白质定位在过氧化物酶体;*AtNDC1* 和 *OsNDC1* 表达的蛋白质均定位在线粒体和质体。在植物中,线粒体和质体的功能也对各种发育和环境作出反应,但有关信号的细节仍然未知;质体功能可以影响线粒体的生物发生和活性<sup>[31]</sup>。光合作用缺陷细胞可改变线粒体基因在叶中表达和基因组拷贝数,但不影响在根中的表达和基因组拷贝数,这在大麦中较为明显<sup>[32]</sup>。

本研究中 6 个Ⅱ型 *NADH* 脱氢酶蛋白质被预测定位在线粒体或叶绿体的概率较高,这与其他物种

(拟南芥和水稻) C 端融合表达确定的亚细胞定位结果<sup>[22]</sup>既有相同之处,又有差异。PpNDA1 被预测的最高可信度的亚细胞定位在线粒体,这与已验证的拟南芥 AtNDA1<sup>[9]</sup>、莱氏衣藻 CrNDA1<sup>[18]</sup>、土豆 StNDA1<sup>[11]</sup>的亚细胞定位结果相同。莱氏衣藻 CrNDA2 和 CrNDA3 定位于叶绿体, CrNDA1、CrNDA5、CrNDA6、CrNDA7 亚细胞定位结果目前还未知<sup>[33]</sup>; AtNDB2 和 StNDB1 位于线粒体。下一步将对桃 II 型 *NADH* 脱氢酶蛋白质亚细胞定位进行试验确定。

### 3.5 桃 II 型 *NADH* 脱氢酶家族基因表达水平

基因表达水平分析结果显示,桃 *NDB* 亚家族的 3 个基因均在老叶、幼叶、根中表达量更高,在熟果肉、熟果皮和枝表皮中表达量相对低或检测不到,说明同一亚家族成员之间不仅在基因结构、蛋白质保守区域、蛋白质理化性质方面具有保守性,在行使的功能方面也可能具有保守性,且在成熟果实中行使的功能少或只在特定条件下的成熟果实中才具有功能。除了 *Prupe.3G231300.1* (*PpNDB4*) 外,其余 5 个桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因在老叶中的表达水平均分别显著高于其在幼叶中的表达水平,据此推测 5 个桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因在成熟的、深绿的老叶中行使的功能可能强于其在浅绿的嫩叶中行使的功能。*Prupe.4G039000.1* (*PpNDA2*)、*Prupe.4G037100.1* (*PpNDB3*)、*Prupe.3G231300.1* (*PpNDB4*) 在白色幼根中表达量较高,且显著高于其在叶芽、枝表皮、幼果肉、熟果肉、熟果皮中的表达水平,据此推测这 3 个 II 型 *NADH* 脱氢酶基因可能在根生长、发育等方面具有重要作用。有研究表明,通过线粒体呼吸链中的非磷酸化途径氧化 *NADH* 在陆地植物和湿地植物中都很常见;在湿地植物的根部,这些特性尤为显著,所以它们可以在长期缺氧和缺氧胁迫下生存<sup>[34-35]</sup>。将来可以进一步从 II 型 *NADH* 脱氢酶基因入手,解析其在桃树抗涝等方面的分子作用机理。

6 个桃 II 型 *NADH* 脱氢酶成员的系统性分析为未来基因功能研究提供了重要方向和依据。下一步将通过转基因、亚细胞定位、蛋白质互作等试验验证基因功能,以期明确桃 II 型 *NADH* 脱氢酶基因在调控光呼吸、适应生物和非生物逆境(如冷害、涝害等)及其他代谢途径等过程的具体作用机理。

### 参考文献:

[1] MELO A M, BANDEIRAS T M, TEIXEIRA M. New insights into

type II *NAD(P)H*: quinone oxidoreductases[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(4):603-616.

[2] KERSCHER S, DROSE S, ZICKERMANN V, et al. The three families of respiratory *NADH* dehydrogenases[J]. *Bioenergetics*, 2007, 45:185-222.

[3] SKULACHEV V P, BOGACHEV A V, KASPARINSKY F O. Principles of bioenergetic. [M]. Berlin: Springer Verlag, 2012: 119-138.

[4] MARREIROS B C, SENA F V, SOUSA F M, et al. Type II *NADH*: quinone oxidoreductase family: phylogenetic distribution, structural diversity and evolutionary divergences[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(12):4697-4709.

[5] 李文斐. II 型 *NADH* 脱氢酶 NDH2 的结构与功能研究[D]. 北京:清华大学,2015.

[6] CARDOL P, GONZA'LEZ-HALPHEN D, REYES-PIRIETO A, et al. The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the genome sequencing project[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(2):447-459.

[7] BANDEIRAS T M, SALGUEIRO C, KLETZINC A, et al. *Acidianus ambivalens* type-II *NADH* dehydrogenase: genetic characterization and identification of the flavin moiety as FMN[J]. *FEBS Letters*, 2002, 531(2):273-277.

[8] MELO A M P, ROBERTS T H, MOLLER I M. Evidence for the presence of two rotenone-insensitive *NAD(P)H* dehydrogenases on the inner surface of the inner membrane of potato tuber mitochondria[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1996, 1276(2):133-139.

[9] MICHAŁECKA A M, STAFFAN-SVENSSON A, JOHANSSON F I, et al. *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II *NAD(P)H* dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light[J]. *Plant Physiology*, 2015, 133(2):642-652.

[10] RIBAS-CARBO M, ROBINSON S A, GONZALEZ-MELER R M A, et al. Effects of light on respiration and oxygen isotope fractionation in soybean cotyledons[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2000, 23(9):983-989.

[11] RASMUSSEN A G, SVENSSON A S, KNOOP V, et al. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive *NADH* dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria[J]. *The Plant Journal*, 1999, 20(1):79-87.

[12] LUETHY M H, THELEN J J, KNUDTEN A F, et al. Purification, characterization, and submitochondrial localization of a 58-kilodalton *NAD(P)H* dehydrogenase[J]. *Plant Physiology*, 1995, 107(2):443-450.

[13] LUETHY M H, HAYES M K, ELTHON T E. Partial purification and characterization of three *NAD(P)H* dehydrogenases from *Beta vulgaris* mitochondria[J]. *Plant Physiology*, 1991, 97(4):1317-1322.

[14] IAN MENZ R, DAY D A. Purification and characterization of a 43 kDa rotenone-insensitive *NADH* dehydrogenase from plant mitochondria[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(38):23117-23120.

- [15] JACOBY R P, LI L, HUANG S B, et al. Mitochondrial composition, function and stress response in plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54 (11): 887-906.
- [16] SVENSSON A S, RASMUSSEN A G. Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves[J]. *The Plant Journal*, 2001, 28(1):73-82.
- [17] SVENSSON A S, JOHANSSON F I, MOLLER I M, et al. Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves[J]. *FEBS Letters*, 2002, 517(1/3):79-82.
- [18] LECLER R, VIGEOLAS H, EMOND-ALT B, et al. Characterization of an internal type-II *NADH* dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria[J]. *Current Genetics*, 2012, 58: 205-216.
- [19] VERDE I, ABBOTT A G, SCLABRIN S, et al. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45:487-494.
- [20] CAO K, YANG X W, LI Y, et al. New high-quality peach (*Prunus persica* L. Batsch) genome assembly to analyze the molecular evolutionary mechanism of volatile compounds in peach fruits[J]. *The Plant Journal*, 2021, 108(1):281-295.
- [21] ZHANG C, FENG R C, MA R J, et al. Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix superfamily members in peach[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195974.
- [22] XU L, LAW S R, MURCHA M W, et al. The dual targeting ability of type II *NAD(P)H* dehydrogenases arose early in land plant evolution[J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13:100-114.
- [23] ELHAFEZ D, MURCHAM W, CLIFTON R, et al. Characterization of mitochondrial alternative *NAD(P)H* dehydrogenases in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2006, 47(1):43-54.
- [24] NARSAI R, LAW S R, CARRIE C, et al. In-depth temporal transcriptome profiling reveals a crucial developmental switch with roles for RNA processing and organelle metabolism that are essential for germination in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(3):1342-1362.
- [25] BENHARRAT H, DELAVAUULT P, THEODET C, et al. RbcL plastid pseudogene as a tool for *Orobanch* (Subsection Minores) identification[J]. *Plant Biology*, 2000, 2(1):34-39.
- [26] CASTILLO-DAVIS C I, MEKHEDOV S L, HARTL D L, et al. Selection for short introns in highly expressed genes[J]. *Nature Genetics*, 2002, 31:415-418.
- [27] KAWASAKI H, KRETSINGER R H. Structural and functional diversity of EF-hand proteins: evolutionary perspectives[J]. *Protein Science*, 2017, 26(10):1898-1920.
- [28] DAY I S, REDDY V S, SHAD ALI G, et al. Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis* [J]. *Genome Biology*, 2002, 3(10):1-24.
- [29] MICHAŁECKA A M, AGIUS S C, MOLLER I M, et al. Identification of a mitochondrial external *NADPH* dehydrogenase by over-expression in transgenic *Nicotiana sylvestris*[J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(3):415-425.
- [30] NELSON M R, THULIN E, FAGAN P A, et al. The EF-hand domain: a globally cooperative structural unit[J]. *Protein Science*, 2002, 11(2):198-205.
- [31] CARRIE C, MURCHA M W, KUEHN K, et al. Type II *NAD(P)H* dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Letters*, 2008, 582(20):3073-3079.
- [32] SURPIN M, CHORY J. The coordination of nuclear and organellar genome in eukaryotic cells[J]. *Essays in Biochemistry*, 1997, 32: 113-125.
- [33] HEDTKE B, WAGNER I, BORNER T, et al. Inter-organelle crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels[J]. *The Plant Journal*, 1999, 19(6): 635-643.
- [34] TERASHIMA M, SPECHT M, NAUMANN B, et al. Characterizing the anaerobic response of *Chlamydomonas reinhardtii* by quantitative proteomics[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2010, 9(7):1514-1532.
- [35] NAKAMURA M, NOGUCHI K. Tolerant mechanisms to O<sub>2</sub> deficiency under submergence conditions in plants [J]. *Journal of Plant Research*, 2020, 133:343-371.

(责任编辑:陈海霞)