

白木香信号肽酶*AsSPP1*基因的克隆及表达分析

冯莹莹¹, 刘晓¹, 王金铃¹, 闫雅如¹, 齐博文¹, 吴云¹, 丁宁¹, 高博闻^{2,*}, 王晓晖^{1,*}

¹北京中医药大学中药学院中药现代研究中心, 北京100029

²包头医学院药学院, 内蒙古包头014060

摘要: 信号肽酶在生物的生命过程中起到重要作用。本研究根据白木香转录组高通量测序结果设计引物, 结合RACE及RT-PCR技术从白木香中克隆得到信号肽酶*AsSPP1*基因全长, 并对其进行生物信息学分析; 利用实时荧光定量PCR检测*AsSPP1*基因在不同组织以及在NaCl、重金属、低温、干旱胁迫和ABA、GA₃、MeJA、SA处理下的表达差异。本研究中克隆获得的*AsSPP1*基因全长1 063 bp, 编码353个氨基酸。*AsSPP1*基因在茎中的表达量最高, 其次是叶和茎尖, 在根中的表达量最低。盐、重金属和低温胁迫能够诱导*AsSPP1*基因的表达, 而干旱胁迫则降低*AsSPP1*基因的表达。ABA、SA和MeJA能够诱导*AsSPP1*基因的表达, 而GA₃对*AsSPP1*基因表达影响不大。这些研究结果表明*AsSPP1*基因可能在白木香防御反应中起重要作用。

关键词: 白木香; *AsSPP1*基因; 表达分析; 非生物胁迫; 植物生长调节物质

信号肽(signal peptide)是新合成多肽链中的一段额外氨基酸序列, 多位于N末端, 用于指导蛋白质定位。初生蛋白正确定位后, 信号肽被信号肽酶水解, 初生蛋白释放, 经过折叠等立体构象的变化, 转变为成熟的蛋白质(von Heijne 1998)。而一些残留的信号肽被信号肽酶(signal peptide peptidase, SPP)再次加工处理, 由此产生的肽片段可以作为生物活性肽从内质网膜中释放出来(Klappa等1996)。SPP是一种位于内质网中有着多个跨膜区域的天门冬酰胺蛋白酶, 具有两个保守的催化性天门冬酰胺组成的活性中心, 它们是分别位于第六和第七个跨膜区域的氨基酸序列YD和GXGD(Bardy和Jarrell 2010)。SPP参与调控膜内蛋白的水解, 因此与生物体的免疫反应、细胞信号、组织分化和胚胎形成等基本生命过程相关(McLauchlan等2002)。SPP家族广泛存在于所有的多细胞真核生物中。研究表明人类SPP的功能与免疫监测、细胞信号转导等过程相关。如SPP与人体细胞表面组织相容性抗原(HLA)-E表位的形成相关, 并调节自然杀伤细胞(natural killer cells)的活性。而对于果蝇、线虫、小鼠和斑马鱼的SPP研究表明, SPP家族对于这些生物的生存是必不可少的(Weihofen等2002; Urny等2003; Krawitz等2005; Casso等2005)。目前, 植物SPP的功能研究较少。Hoshi等(2013)报道了拟南芥的SPP可以裂解膜中的靶蛋白, 并释放在信号转导途径中起作用的生物活

性肽, 并且认为拟南芥SPP与雄性配子体的发育以及花粉的成熟相关。Tamura等(2009)报道了水稻SPP在茎尖早期未分化细胞中有很强的表达, 表明SPP与茎尖细胞的分化以及发育密切相关。但是关于SPP在植物防御反应及激素信号传递过程中的作用目前还没有报道。

白木香为瑞香科沉香属植物, 是我国生产名贵药材沉香的唯一正品植物来源。白木香在健康状态下不能够结香, 只有在受到伤害胁迫的情况下才能形成沉香(冯莹莹等2017), 因此, 研究白木香防御反应的分子机制对于揭示沉香的结香机理及发展高效结香技术具有重要意义。盐胁迫、低温、重金属和干旱是影响植物生长发育的最常见的非生物胁迫(Bohnert等1995; Battaglia等2008; 董先娟等2016; 冯莹莹等2017)。脱落酸(abscisic acid, ABA)、赤霉素(gibberellin, GA₃)、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、水杨酸(salicylic acid, SA) 4种激素在信号传递和植物防御反应中起到重要作用。为探讨信号肽酶基因与白木香防御反

收稿 2018-11-02 修定 2019-04-03

资助 北京中医药大学科学研究项目(2019-JYB-JS-014)、国家自然科学基金青年科学基金项目(81503182)、内蒙古自然科学基金博士基金项目(2017BS0803)和包头医学院科学研究项目(BYJJ-YF201608)。

* 共同通讯作者: 高博闻(gaobw001@163.com)、王晓晖(wangxhui2014@163.com)。

应相关的功能,本研究采用RACE扩增技术,从白木香愈伤组织中克隆得到*AsSPP1*基因的序列全长;并利用qRT-PCR的方法考察*AsSPP1*基因的组织表达特异性,以及非生物胁迫和植物生长调节物质处理下*AsSPP1*基因的表达差异,为阐明白木香防御反应及沉香形成的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

白木香[*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg.]产于广东省中山市,经史社坡研究员鉴定后栽培于北京中医药大学中药现代研究中心。利用栽培的白木香叶诱导愈伤组织用于提取总RNA及cDNA的合成。将愈伤组织进行NaCl、低温(4℃)、重金属(CdCl₂)、干旱(甘露醇)4种胁迫和植物生长调节物质ABA、SA、GA₃、MeJA处理,分别于处理后的0、12、24、36和48 h取样,提取总RNA,检测*AsSPP1*基因在各种处理下的表达差异。

1.2 白木香总RNA的提取和cDNA的合成

按照我们之前报道的方法提取白木香总RNA,合成cDNA(董先娟等2016;冯莹莹等2017)。

1.3 *AsSPP1*基因序列全长克隆

1.3.1 白木香*AsSPP1*基因核心片段的克隆

利用转录组高通量测序从白木香中挖掘到1个由表达序列标签拼接而成的序列,经注释分析发现为*AsSPP1* 5'端片段。以1.2节中获得的白木香cDNA为模板,利用表1中特异引物对*AsSPP1*基因进行扩增,扩增体系为: cDNA 1 μL、10×LA-Taq

buffer 5 μL、dNTP Mix (2.5 mmol·L⁻¹) 4 μL、LA-Taq (2.5 U·μL⁻¹) 0.5 μL、10 μmol·L⁻¹引物各1 μL,终体积为50 μL。反应条件为: 94℃预变性5 min; 然后进行35个循环, 94℃ 40s, 59℃ 30 s, 72℃ 2 min 30 s, 程序循环结束后72℃延伸反应10 min。

1.3.2 白木香*AsSPP1*基因的RACE扩增

根据获得的核心片段设计特异引物进行RACE扩增,引物序列见表1。*AsSPP1*基因3'端的扩增按照Clontech RACE试剂盒说明进行。将RACE获得序列与核心序列拼接得到*AsSPP1*基因的序列全长。根据拼接的序列设计特异引物(表1),以PCR验证序列的正确性。

1.4 白木香*AsSPP1*蛋白的生物信息学分析

通过在线软件ProtParam预测蛋白结构参数;利用软件TMHMM 2.0进行蛋白质跨膜结构分析;利用DNAMAN将*AsSPP1*与其它物种的SPP氨基酸序列进行同源性比对;通过MEGA 6软件进行系统进化树分析。

1.5 白木香*AsSPP1*在不同组织、胁迫及植物生长调节物质下的表达分析

挑选白木香幼嫩叶片,切成直径1 cm左右小段。2.5%的次氯酸钠溶液表面消毒10 min,再用70%乙醇消毒30 s后,用无菌蒸馏水洗涤4次。处理过的叶片至于含2 μg·mL⁻¹ NAA和1 μg·mL⁻¹ 6-BA的MS培养基中,诱导愈伤组织。避光室温下孵化1个月后,继代于含2 μg·mL⁻¹ NAA、1 μg·mL⁻¹ 6-BA、1 μg·mL⁻¹ 2,4-D和1 μg·mL⁻¹ KT的新鲜MS培养基中。

表1 本研究使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物作用	引物名称	引物序列(5'→3')
核心序列扩增	AsSPP1-1	ATGAAAAACGCTGAAAGAATCG
	AsSPP1-2	CAATCCAATAACTGCTGTACGA
	AsSPP1-3	GGTGCCATTCTCCTGGCTGGGC
	AsSPP1-4	GATGTATCCAGAGGAAAAACAG
	AsSPP1-5	ATGAAAAACGCTGAAAGAATCGCC
qRT-PCR	AsSPP1-6	GGTATCTGCCAAACCATTG
	AsSPP1-7	GAATAGAGAAAGCAAGACCCAG
	GAPDH-1	CTGGTATGGCATTCCGTGTA
	GAPDH-2	AACCACATCCTCTTCGGTGTA

在高盐、重金属、干旱以及低温4种非生物胁迫实验中, 将白木香愈伤组织在室温下培养于新鲜的培养基上20 d后, 选取长势相同的愈伤组织转移到含有NaCl (150 mmol·L⁻¹)、CdCl₂ (500 μmol·L⁻¹)、甘露醇(750 mmol·L⁻¹)的培养基上, 以及将愈伤组织培养在4℃中培养。

4种植物生长调节物质处理实验中, 将愈伤组织转移到含有ABA (150 μmol·L⁻¹)、GA₃ (150 μmol·L⁻¹)、MeJA (150 μmol·L⁻¹)和SA (150 μmol·L⁻¹)的培养基中进行培养。

不同处理后采集愈伤组织用蒸馏水洗5次, 在处理0、12、24、36和48 h提取RNA作为样品; 以未处理的愈伤组织作为对照。同时提取白木香不同组织的RNA作为样品。按照之前报道的方法(冯莹莹等2017)进行实时荧光定量PCR实验。

2 实验结果

2.1 白木香*AsSPP1*基因全长cDNA的克隆

获得的白木香*AsSPP1*基因5'端片段及3' RACE扩增片段大小见图1-A和B。扩增的序列全长为1 063 bp (图1-C), 编码353个氨基酸, 测序结果与拼接结果一致, 将该基因命名为*AsSPP1*。

2.2 *AsSPP1*的生物学信息分析

通过ProtParam软件预测*AsSPP1*编码的蛋白质分子式为C₁₈₀₅H₂₈₁₈N₄₄₆O₄₅₇S₂₀, 相对分子质量为38 720.14, 理论等电点为9.31, 不稳定系数II为37.01, 属于稳定蛋白, 总平均亲水性GRAVY为

0.575, 为疏水性蛋白; 利用TMHMM 2.0预测白木香*AsSPP1*有7个跨膜区域(表2), 分别起始第7、59、85、137、187、229和285的位置。通过预测发现, *AsSPP1*蛋白的N端在细胞质膜的内侧, C端在细胞质膜的外侧, 中间有7个跨膜域的结构(图2)。白木香*AsSPP1*氨基酸序列与GenBank中其它物种SPP氨基酸序列比对, 结果表明*AsSPP1*氨基酸序列与其它植物SPP一样具有典型的2个保守催化性天门冬酰胺组成的活性中心YD和GLGD, 如图3黑框中所示。根据*AsSPP1*蛋白跨膜区域分析结果, 二者

表2 *AsSPP1*蛋白跨膜域结构的预测

Table 2 Prediction of *AsSPP1* protein transmembrane domain structure

位置	起始氨基酸	终止氨基酸
膜内	1	6
跨膜	7	24
膜外	25	58
跨膜	59	78
膜内	79	84
跨膜	85	107
膜外	108	136
跨膜	137	156
膜内	157	186
跨膜	187	209
膜外	210	228
跨膜	229	251
膜内	252	284
跨膜	285	307
膜外	308	343

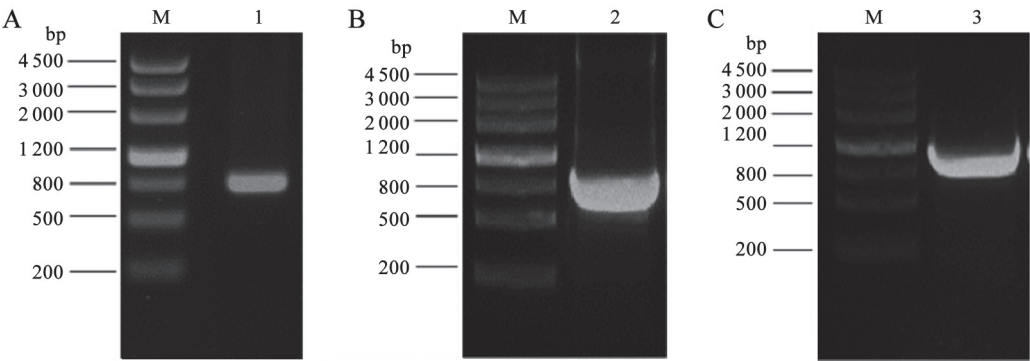


图1 白木香愈伤组织的*AsSPP1*基因全长扩增

Fig.1 Cloning of *AsSPP1* gene from *A. sinensis* calli

A: *AsSPP1*基因5'端序列; B: *AsSPP1*基因3' RACE扩增片段; C: *AsSPP1*基因全长扩增片段。M: Marker。

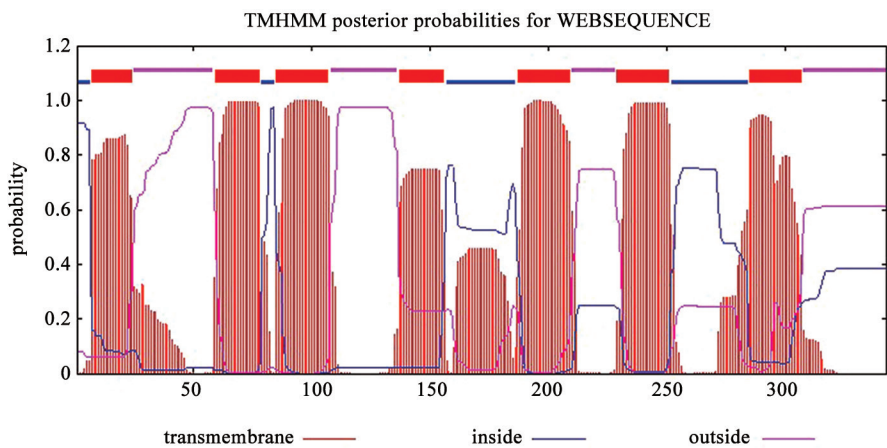


图2 AsSPP1蛋白跨膜域结构的氨基酸排布示意图
Fig.2 AsSPP1 protein transmembrane domain structure

分别位于第六和第七个跨膜区域,与Hoshi等(2013)报道的拟南芥SPP一致。AsSPP1氨基酸序列与可可(*Theobroma cacao*)、西瓜(*Cucumis melo*)的同源性分别为71.43%、70.93%;而与大肠杆菌(*Escherichia coli*)和恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)的同源性分别为10.41%和24.27%。系统进化树分

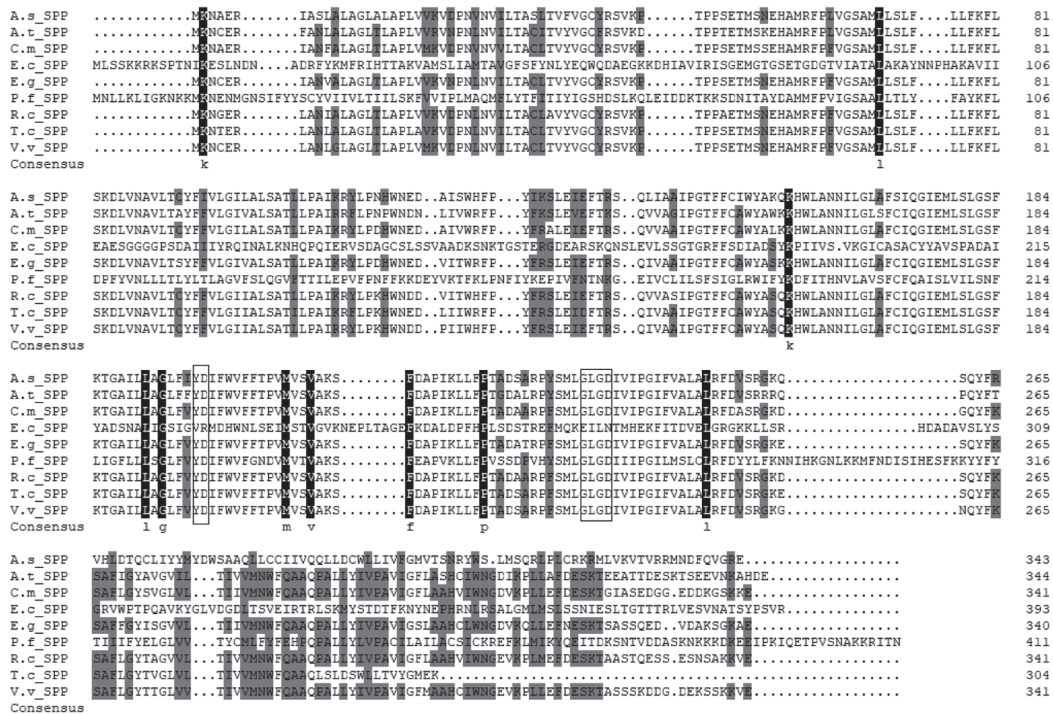


图3 白木香AsSPP1与其它SPP氨基酸序列同源性比对

Fig.3 Alignment of SPP deduced amino acid sequences of *A. sinensis* with SPP proteins from other plants

A.s SPP: 白木香SPP; A.t SPP: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) SPP; C.m SPP: 西瓜(*Cucumis melo*) SPP; E.c SPP: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) PCN079 SPP; E.g SPP: 巨桉(*Eucahyptus grandis*) SPP; P.f SPP: 恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*) SPP; R.c SPP: 蓖麻(*Ricinus communis*) SPP; T.c SPP: 可可(*Theobroma cacao*) SPP; V.v SPP: 葡萄(*Vitis vinifera*) SPP。

析结果表明, 植物SPP亲缘关系更近。*AsSPP1*蛋白氨基酸序列与可可SPP相似性较高(图4)。

2.3 *AsSPP1*的组织表达特异性分析

利用实时荧光定量PCR检测*AsSPP1*基因的表达特异性, 结果表明, *AsSPP1*基因在白木香茎、叶和茎尖表达量都很高, 在茎中的表达量最高, 其次是叶和茎尖; 在根中的表达量则明显低于前三者

(图5)。提示*AsSPP1*基因主要在茎中发挥重要的生物学功能。

2.4 在非生物胁迫处理下*AsSPP1*基因的表达分析

实时荧光定量PCR检测*AsSPP1*基因在非生物胁迫处理下的表达差异, 结果(图6)显示*AsSPP1*的表达水平在盐(NaCl)胁迫下24 h内显著升高, 随后缓慢减低; 重金属(CdCl_2)胁迫下, *AsSPP1*的表达水

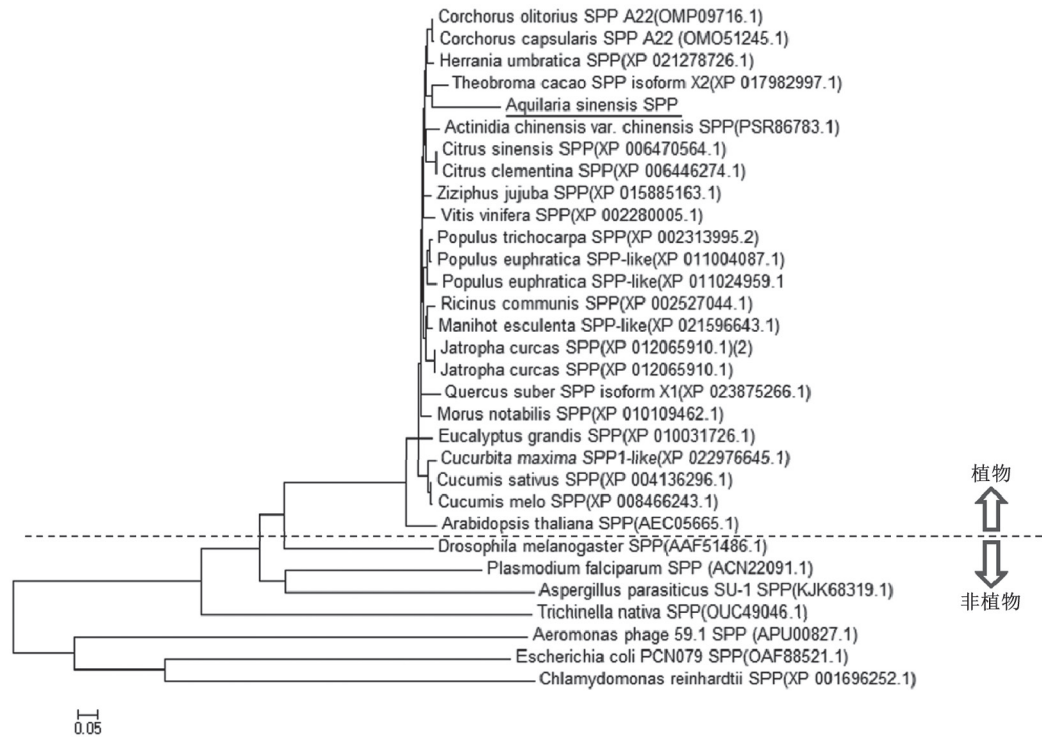


图4 SPP蛋白氨基酸序列的聚类分析
Fig.4 Phylogenetic analysis of SPP proteins

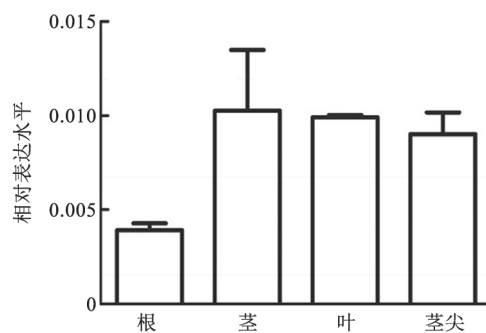


图5 *AsSPP1*在不同组织中的表达分析
Fig.5 Expression level of *AsSPP1* in different tissues

平在12 h内逐渐升高, 随后降低, 36 h再次升高, 呈现双峰现象; 低温处理使*AsSPP1*的表达水平在12 h达到最高, 随后缓慢下降; 甘露醇处理下*AsSPP1*的表达水平在36 h内持续下降, 随后在48 h上升。

2.5 在植物生长调节物质处理下*AsSPP1*基因的表达分析

四种植物生长调节物质ABA、SA、 GA_3 和MeJA对愈伤组织处理不同时间后, *AsSPP1*基因的表达分析结果(图7)显示, *AsSPP1*基因在受到外源ABA和MeJA处理后表达水平显著上升, ABA处理

下36 h表达量最高, MeJA处理下24 h表达量最高; 在外源GA₃处理下, *AsSPP1*的表达水平变化不大; 在外源SA处理下, 出现双峰现象, 诱导后12 h基因表达量显著上升, 24 h表达量下降, 36 h表达量显著上升达到最高, 之后随时间增加而表达量显著下降。

3 讨论

SPP属于膜内天门冬酰胺裂解蛋白酶, 该类蛋白酶的催化活性中心都具有保守的GXGD序列。GXGD已被证实是蛋白水解基本序列的一部分, 调控模内蛋白的水解(Tomita和Iwatsubo 2013)。目前关于植物中的SPP基因研究比较少, 仅在拟南芥、

水稻等植物中分离得到SPP基因。本研究利用RACE及RT-PCR技术首次在白木香愈伤组织中扩增得到*AsSPP1*基因全长, 并对基因进行生物学信息分析。跨膜结构分析表明AsSPP1蛋白的N端在细胞质膜的内侧, C端在细胞质膜的外侧, 中间有7个跨膜域的结构; 多重序列分析发现AsSPP1氨基酸序列具有典型的两个保守的天门冬酰胺活性中心YD和GLGD, 并且分别位于第六和第七个跨膜区域, 这与文献报道的其它植物SPP一致(Hoshi等2013)。聚类分析结果表明AsSPP1氨基酸序列与可可的SPP同源性最高为71.43%, 而与大肠杆菌的SPP同源性最低为10.41%, 在进化过程中有一定程度的保守性。

对单子叶植物水稻和双子叶植物拟南芥2种模式植物SPP的研究结果表明, SPP基因在茎尖部位的未分化细胞中具有很大的表达量, 提示这两种植物中的SPP在茎尖细胞的分化发育中具有重要作用(Tamura等2009; Han等2009)。白木香*AsSPP1*基因组织特异性表达分析结果显示, 相对于*AsSPP1*基因在茎尖的高表达量, 其在茎和叶中的表达量更高, 在茎中的表达量最高, 在根中的表达量明显少于以上三个部位, 说明*AsSPP1*基因在茎中发挥重要的生物学功能。

白木香只有在受到各种胁迫产生防御反应后才能产生沉香, 因此研究白木香响应伤害胁迫的分子机制对于阐明沉香的结香机理具有重要意义。植物防御反应与免疫反应和信号传递密切相关, 而SPP已被证实与生物体的免疫反应、细胞信号传递等生命过程相关(Weihsen等2002; Urny等2003; Krawitz等2005; Casso等2005), 因此SPP很有可能参与植物防御反应。高盐、重金属、低温及干旱胁迫是植物在自然界中最常见的非生物胁迫。本研究结果表明盐、重金属、低温均能够促进白木香*AsSPP1*基因的表达, 并且盐胁迫对白木香*AsSPP1*基因的影响比低温影响大; 而干旱胁迫则能够降低*AsSPP1*基因的表达。这些实验结果表明*AsSPP1*基因在植物的非生物胁迫防御反应起到重要作用。ABA、GA₃、MeJA和SA是植物体内普遍存在的重要的内源信号分子, 同时在植物的抗病、抗低温、抗旱、抗盐等抗逆活动中具有重要

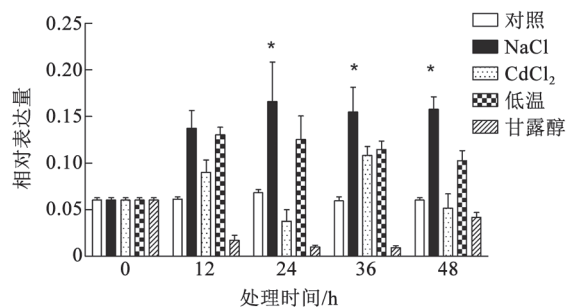


图6 NaCl、CdCl₂、低温和甘露醇处理下
*AsSPP1*基因的表达分析

Fig.6 Expression analysis of *AsSPP1* gene with treatments of NaCl, CdCl₂, low temperature and mannitol

*表示同一时间该处理与对照之间差异显著($P < 0.05$)。

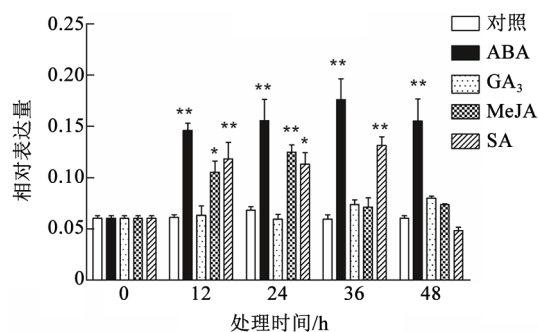


图7 外源ABA、GA₃、MeJA和SA处理下
*AsSPP1*基因的表达分析

Fig.7 Expression analysis of *AsSPP1* with treatments of ABA, GA₃, MeJA and SA

*表示同一时间该处理与对照之间差异显著($P < 0.05$); **表示与对照之间差异极显著($P < 0.01$)。

的生理作用(Dat等1998; Creelman和Mullet 1995; Thorpe等2007)。本研究结果表明ABA、SA和MeJA能够诱导*AsSPPI*基因表达, 而ABA对*AsSPPI*基因表达量影响最大, 这表明*AsSPPI*基因的表达受到多种激素调控, *AsSPPI*在植物信号转导过程中可能起到重要作用。本研究为进一步揭示白木香植物防御反应机制和白木香结香机制奠定基础。

参考文献(References)

- Bardy SL, Jarrell KF (2010). Cleavage of preflagellins by an aspartic acid signal peptidase is essential for flagellation in the archaeon *Methanococcus voltae*. *Mol Microbiol*, 50 (4): 1339–1347
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, et al (2008). The enigmatic lea proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*, 148 (1): 6–24
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 7 (7): 1099–1111
- Casso DJ, Tanda S, Biehs B, et al (2005). Drosophila signal peptide peptidase is an essential protease for larval development. *Genetics*, 170 (1): 139–148
- Creelman RA, Mullet JE (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (10): 4114–4119
- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, et al (1998). Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermo tolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol*, 116 (4): 1351–1357
- Dong XJ, Liu X, Zhang ZX, et al (2016). Cloning and expression analysis of two small heat shock proteins genes from *Aquilaria sinensis*. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 47 (22): 4054–4061 (in Chinese with English abstract) [董先娟, 刘晓, 张钟秀等(2016). 白木香2个小分子热激蛋白基因的克隆及表达分析. *中草药*, 47 (22): 4054–4061]
- Feng YY, Dong XJ, Liu X, et al (2017). Cloning and expression analysis of transcription factor AsMYB1 and AsMYB2 from *Aquilaria sinensis*. *Chin J Chin Mater Med*, 42 (17): 3305–3311 (in Chinese with English abstract) [冯莹莹, 董先娟, 刘晓等(2017). 白木香转录因子AsMYB1和AsMYB2克隆及表达分析. *中国中药杂志*, 42 (17): 3305–3311]
- Han S, Green L, Schnell DJ (2009). The signal peptide peptidase is required for pollen function in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 149 (3): 1289–1301
- Hoshi M, Ohki Y, Ito K, et al (2013). Experimental detection of proteolytic activity in a signal peptide peptidase of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Biochem*, 14 (1): 16
- Klappa P, Dierks T, Zimmermann R (1996). Cyclosporin A inhibits the degradation of signal sequences after processing of presecretory proteins by signal peptidase. *FEBS J*, 239 (2): 509–518
- Krawitz P, Haffner C, Fluhrer R, et al (2005). Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3. *J Biol Chem*, 280 (47): 39515–39523
- McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, et al (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J*, 21 (15): 3980–3988
- Tamura T, Kuroda M, Oikawa T, et al (2009). Signal peptide peptidases are expressed in the shoot apex of rice, localized to the endoplasmic reticulum. *Plant Cell Rep*, 28 (11): 1615–1621
- Thorpe MR, Ferrieri AP, Herth MM, et al (2007). ¹¹C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta*, 226 (2): 541–551
- Tomita T, Iwatsubo T (2013). Structural biology of presenilins and signal peptide peptidases. *J Biol Chem*, 288 (21): 14673–14680
- Urny J, Hermans-Borgmeyer I, Gercken G, et al (2003). Expression of the presenilin-like signal peptide peptidase (spp) in mouse adult brain and during development. *Gene Expr Pattern*, 3 (5): 685–691
- von Heijne G (1998). Life and death of a signal peptide. *Nature*, 396 (6707): 111–113
- Weihofen A, Binns K, Lemberg MK, et al (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science*, 296 (5576): 2215–2218

Cloning and expression analysis of signal peptide peptidase (*AsSPP1*) from *Aquilaria sinensis*

FENG Ying-Ying¹, LIU Xiao¹, WANG Jin-Ling¹, YAN Ya-Ru¹, QI Bo-Wen¹, WU Yun¹, DING Ning¹, GAO Bo-Wen^{2,*}, WANG Xiao-Hui^{1,*}

¹Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

²School of Pharmacy, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia 014060, China

Abstract: Signal peptide peptidase (SPP) plays an important role in biological processes of organisms. In present study, the full length of *AsSPP1* gene was cloned by RACE and reverse transcription PCR from *Aquilaria sinensis* calli based on the high-throughput sequencing results of the transcriptome. The SPP transmembrane domain and phylogenetic analysis were predicted by different software to analyze the bioinformatics of SPP proteins. Transcript level of *AsSPP1* was performed with real-time quantitative RT-PCR in different tissues and in response to abiotic stresses including salt, heavy metal, cold and drought stress, as well as plant growth regulators including abscisic acid (ABA), gibberellins (GA₃), methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) treatments. Our results demonstrated that the *AsSPP1* cDNA sequence had an ORF of 1 063 bp, encoding a protein of 353 amino acids. Tissue expression analysis indicated that *AsSPP1* was primarily expressed in stems, followed by leaves and shoot tips, and then roots. The expression of *AsSPP1* was induced by salt, heavy metal and cold stresses, while decreased under drought stress. Furthermore, the transcript level of *AsSPP1* was increased treated by ABA, MeJA and SA, while GA₃ had little influence on the expression of *AsSPP1*. These results suggested the *AsSPP1* may play an important role in plant defense and hormone signal transduction in *A. sinensis*.

Key words: *Aquilaria sinensis*; *AsSPP1* gene; expression analysis; abiotic stress; plant growth regulators

Received 2018-11-02 Accepted 2019-04-03

This work was supported by Science Foundation for Elite Young Scholars of Beijing University of Chinese Medicine (2019-JYB-JS-014), the National Natural Science Foundation of China (81503182), Inner Mongolia Natural Science Foundation (2017BS0803) and Natural Science Foundation of Baotou Medical College (BYJJ-YF201608).

*Co-corresponding authors: Gao BW (gaobw001@163.com), Wang XH (wangxhui2014@163.com).