毛果杨nsLTP基因家族全基因组水平鉴定及其表达特性分析

程赫'田双慧'张洋'刘聪'夏德安'魏志刚2*

(1. 林木遗传育种国家重点实验室,东北林业大学,哈尔滨 150040; 2. 国家林业和草原局盐碱地研究中心,中国林业科学研究院,北京 100091)

摘要植物非特异性脂质转移蛋白(non-specific lipid transfer proteins,nsLTP)是一类多基因家族编码碱性蛋白,负责脂肪酸体外结和与膜之间的磷脂转移,在植物生长发育和逆境胁迫响应中扮演着重要角色。目前为止,尚无模式植物毛果杨(Populus trichocarpa)nsLTP家族的研究报导。本研究从全基因组水平对PtrnsLTP家族成员的基因数量、亲缘关系、基因结构、编码蛋白保守基序等特性进行了分析,结果表明:PtrnsLTP家族共由 39个基因组成,进化成5个亚家族,其中A亚族含有6个基因、B亚族含有2个、C亚族含有13个、D亚族含有3个、E亚族含有15个。PtrnsLTP家族包含7对旁系同源基因,其中1对大于1,6对Ka/Ks均远小于1,且这6对基因均处于同一个大的进化分支上,进化压力的不同导致基因间的功能出现了分化,编码蛋白均含有Motif1和Motif2保守基序。利用qRT-PCR技术并结合杨树转录组数据对PtrnsLTP的组织表达与盐胁迫响应特性研究发现:各家族成员在毛果杨根、茎和叶中均有表达且经qRT-PCR技术验证后与网站预测结果基本吻合,有11、15和13个成员分别在根、茎和叶中均有表达且经qRT-PCR技术验证后与网站预测结果基本吻合,有11、15和13个成员分别在根、茎和叶中有较高的表达,表明该基因家族参与了杨树不同组织的生长发育;NaCl胁迫下,该家族39个基因中分别有26个成员在根部、14个成员在叶部表达量随着胁迫时间的增加而升高,而32个基因在茎部表现为先升高后降低的趋势。本研究结果对于PtrnsLTP家族基因生物学功能的鉴定与盐胁迫响应基因资源的工作有着积极的推动作用。 关键词 毛果杨;nsLTP;生物信息学分析;盐胁迫

中图分类号:S792.11 文献标志码:A doi:10.7525/j.issn.1673-5102.2022.03.011

Genome-wide Identification and Expression Analysis of nsLTP Gene Family in *Populus trichocarpa*

CHENG He¹ TIAN Shuanghui¹ ZHANG Yang¹ LIU Cong¹ XIA De'an¹ WEI Zhigang^{2*}

(1. State Key Laboratory of Forest Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040; 2. Saline Soil Research Center, National Forestry and Grassland Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract Non-specific lipid transfer proteins (nsLTP), a polygene family of basic lipid transfer proteins, are responsible for the transfer of phospholipids between fatty acids and membrane *in vitro*, and play an important role in plant growth and development and the response to stress. There have been no reports on the *nsLTP* family of *Populus trichocarpa*. In this study, the number of genes, genetic relationship, gene structure and conserved motif of coding proteins of *PtrnSLTP* family members were analyzed at the genome-wide level. The results showed that the *PtrnsLTP* family was composed of 39 genes and evolved into five subfamilies, among which six genes in subfamily A, two genes in subfamily B, 13 genes in subfamily C, three genes in subfamily D, and 15 genes in subfamily E. *PtrnsLTP* family contained seven pairs of paragenetic homologous genes, among which one pair was greater than one, and the six pairs of Ka/Ks were all far less than one. Moreover, these six pairs of genes were all on the same large evolutionary branch, and different evolutionary pressures led to functional

收稿日期:2021-03-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31770640);国家重点研发计划子课题项目(2017YFC0504102-04)

第一作者简介:程赫(1996—),女,硕士研究生,主要从事林木抗性育种方面的研究。

^{*} 通信作者:E-mail:zhigangwei1973@163.com

Foundation item: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770640); Subproject of the National Key Research and Development Program(2017YFC0504102-04)

First author introduction: CHENG He(1996-), female, master, main research direction: tree resistance breeding.

^{*} Corresponding author: E-mail: zhigangwei1973@163.com Received date: 2021-03-28

differentiation among genes. Both encoded proteins contained conserved motifs in Motif 1 and Motif 2. Using qRT-PCR technology combined with *P. trichocarpa* data to study the tissue expression of *PtrnsLTP* and the response characteristics of salt stress, it was found that all family members expressed in the roots, stems and leaves of *P. trichocarpa*. The results were basically consistent with the prediction results by the bioinformatics analysis of the website. There were 11, 15 and 13 members respectively having higher expression in roots, stems and leaves, indicated that this gene family was involved in the growth and development of different tissues of *P. trichocarpa*. Under NaCl stress, among the 39 genes in the family, 26 genes expressed in the root and 14 genes expressed in the leaves increased with the increase of stress time, while 32 genes expressed in the stem first increased and then decreased. The results have a positive role in promoting the identification of the biological function of *PtrnsLTP* family genes and the work of salt stress response gene resources. **Key words** *Populus trichocarpa*; nsLTP; bioinformatics analysis; salt stress

非特异性脂质转运蛋白(non-specific lipid transfer proteins, nsLTP)广泛存在于高等植物中, 是一类在体外膜之间介导磷脂转移的碱性蛋白^[1], 具有8个保守的半胱氨酸基序(C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C,8 CM)(其中的二硫键能形成稳 定的疏水结构)[2],是其参与结合和转运各种脂质 (如脂肪酰辅酶A、磷脂和脂肪酸等)的调控活性 中心[3]。nsLTP蛋白于1975年首次在马铃薯(Solanum tuberosum)发芽块茎中被发现^[4],随后,在油菜 (Brassica campestris)^[5]、黄瓜(Cucumis sativus)^[6]和 火炬松(Pinus taeda)^[7]等多种植物中相继克隆出 nsLTP。根据其编码蛋白分子量、序列相似和脂质 转移效率的差异性^[8],植物nsLTP可分为nsLTP1 (8~10 kDa)和nsLTP2(约7 kDa)2种类型^[9-10],其中 nsLTP1型的疏水腔呈隧道状,而nsLTP2型则呈三 角形的空心状[11]。

研究发现,植物nsLTP参与细胞壁松弛和延 伸、花药和花粉的发育与萌发等生长发育的多个 生物学过程^[12],如被nsLTP家族OsC6沉默的水稻 (Oryza sativa)花粉外壁发育缺陷、花粉育性降 低^[13],玉米(Zea mays)nsLTP蛋白能与一种钙调素 结合蛋白相互作用,从而调节自身的生理活性[14]。 同时,植物nsLTP在生物与非生物胁迫响应中也能 发挥重要作用^[15-16],如过表达小盐芥(Thellungiella halophila)ThPIP1的转基因株系在盐胁迫下生物 量和叶绿素值显著高于野生型植株四。拟南芥 (Arabidopsis thaliana) 脂质转运蛋白 AZI1 不仅能 与蛋白激酶MPK3相互作用形成复合物,也能够被 MPK3上调表达,从而介导其盐胁迫响应^[18]。此 外,植物nsLTP对脱落酸、水杨酸、赤霉毒和乙烯等 激素胁迫也具有响应性^[19-20],如马铃薯中StLTPa1 在水杨酸、茉莉酸和脱落酸的诱导下表达量有明 显的上调趋势[21]。

先前研究已经在拟南芥、水稻和小麦(Triticum aestivum)^[22]等模式植物中分别鉴定出了49、 52、106个nsLTP基因并对其进行了全基因组分 析。由于8个保守的半胱氨酸的结构不同,OsLTP 被分为9大类、AtnsLTP被分为10类,且处于相同 类别的基因在多条染色体上形成了基因簇,说明 该基因家族的扩增主要是由串联复制事件演化而 来;TaLTP结构分析表明该家族内含子一外显子 结构多样性较低,多数基因无内含子;在盐和干旱 胁迫条件下 TaLTP 家族基因被上调表达,说明该 家族基因在响应逆境胁迫方面可能具有重要的功 能。毛果杨(Populus trichocarpa)作为首个全基因 组测序的木本植物,是研究木材形成、季节性生 长、性别分化以及木本植物逆境胁迫响应的模式 植物。然而,目前为止,尚未见PtrnsLTP家族基因 的研究报导。本项研究从全基因组水平对PtrnsLTP家族成员的基因数量、亲缘关系、基因结构、染 色体定位、编码蛋白保守基序分布与数量等特征进 行研究。同时,利用qRT-PCR技术并结合转录组 数据,对其组织与逆境胁迫响应特性进行初步研 究。本项研究将为PtrnsLTP在杨树生长发育与逆 境胁迫下的生物学功能分析与鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 PtrnsLTP家族成员的确定以及系统进化 分析

为了鉴定毛果杨nsLTP基因家族的成员,首先 利用已知的拟南芥nsLTP家族各基因编码氨基酸 序列在毛果杨基因组数据库(https://phytozome.jgi. doe.gov/pz/portal.html)进行搜索,将获得的序列结 果汇总整理,剔除重复序列后作为候选基因。为 了验证初始结果的可靠性,将候选基因的氨基酸 序列上传至 HMMER 网站(https://www.ebi.ac.uk/ Tools/hmmer/) 以及 NCBI 保守结构域数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)鉴定其是否具有家 族保守结构域。通过上述步骤,初步确定 Ptrn-sLTP 家族包含 39 个基因。

下载*AtnsLTP*和*PtrnsLTP*编码的氨基酸序列, 通过 MEGA6.0软件中的邻接法(Neighbor-joining, NJ),校验参数 Bootstrap 重复 10 000次^[23],构建进 化树,随后在 iTOL(https://itol.embl.de/)网站上对 生成的进化树进行可视化处理^[24]。

利用ExPASy(https://web.expasy.org/protparam/) 在线预测 PtrnsLTP 蛋白理化性质,包括氨基酸数 目、分子量和等电点等;从 Phytozome 数据库中获 取该基因家族的染色体位置、基因序列、氨基酸序 列、开放阅读框长度以及氨基酸长度等信息,并根 据基因所在的染色体号以及位置对其命名;通过 Plant-mPLoc (http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/ plant-multi/)网站,在线预测家族成员的亚细胞定 位信息。

1.2 同源基因的Ka和Ks分析

通过 Blastp 比对 PtmsLTP 氨基酸序列,利用 TBtools 软件分析同源基因对之间的 Ka(异意替 换)和Ks(同意替换)以及二者的比率。这个比率 可以判断是否有选择压力作用于这个蛋白质编码 的基因。若Ka/Ks=1则同义突变和非同义突变将 以同样的速率被固定,即中性选择,突变不会影响 蛋白质的结构和功能;若Ka/Ks>1,氨基酸发生了 改变,此时的非同义突变会提高植物的生存力,即 正选择;只有当Ka/Ks<1时,非同义突变是有害 的,即负选择,使得突变具有纯化作用^[25]。

1.3 PtrnsLTP的结构及保守基序分析

通过GSDS网站(http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php)将PtrnsLTP的内含子和外显子信息进行 可视化,并结合MEGA6.0软件对其进化树文本进 行基因进化树比对分析。

利用 MEME(http://meme-suite.org/tools/meme) 网站对 PtrnsLTP 氨基酸序列进行保守基序分析, TBtools 软件对该分析结果进行可视化处理。

1.4 PtrnsLTP组织表达盐胁迫响应特性分析

组织表达特异性分析:通过Phytozome数据 库,下载各PtrnsLTP在各组织中的表达量数据,并 与qRT-PCR分析结果相互验证。野生型毛果杨来 自中国科学院上海生物科学研究所,用组织培养 的方法扩繁后。将1月大小的组培苗移栽到土壤 中,在25℃、长日照(光照16h黑暗8h)环境下温室中培养3周。分别采集根、茎和叶组织,利用植物总RNA提取试剂盒(MiniBEST,TaKaRa)提取总RNA,然后采用PrimeScript[™] RT reagent Kit(Perfect Real Time,TaKaRa)试剂盒反转录RNA获得cDNA用于qRT-PCR。每组处理重复3次,采用2^{-AACT}法计算相对表达量并利用TBtools可视化。

盐胁迫下的响应特性:将幼苗随机分成7组, 每组包含5棵毛果杨幼苗。用100 mmol•L⁻¹ NaCl 处理3、6、12、24、48、72 h同时用水处理作为对照 组。分别采集上述处理组内各植株材料的根、茎 和叶组织,提取总 RNA 后反转录获得 cDNA 进行 qRT-PCR 分析。每组处理重复3次,采用2^{-AACT}法 计算相对表达量并利用 TBtools 可视化。

根据荧光定量引物设计原则,设计*PtrnsLTP*家 族基因定量引物,以*PtrActin*为内参基因(见表1)。 在赛默飞ABI 7500实时荧光定量 PCR 仪上进行试 验,体系如下: 2×TransStart TOP/Tip Green qPCR Supermix 10 μ L、上下游混合引物(10 μ mol·L⁻¹) 0.4 μ L、cDNA1.5 μ L, PassiveReference Dye(50×) 0.4 μ L, μ I ddH₂O 至 20 μ L。反应程序: 94 °C 30 s; 94 °C 5 s, 60 °C 15 s, 72 °C 35 s,循环40次; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 30 s。

2 结果分析

2.1 PtrnsLTP系统进化

以AtnsLTP家族基因序列为参考,在毛果杨基 因组中鉴定出39个nsLTP,其编码蛋白均含有植物 nsLTP 典型的 C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C 保守结构域。为了进一步分析 PtrnsLTP家族成员 间进化关系,构建了毛果杨和拟南芥nsLTP编码的 蛋白序列进化树。结果(见图1)表明:毛果杨与拟 南芥nsLTP可分为5个亚家族,不同的亚家族间用 不同的背景颜色表示,同时外部的黑色和白色圆 圈分别代表毛果杨及拟南芥nsLTP家族基因。可 以看出 PtrnsLTP A 亚族有6个、B 亚族有2个、C 亚 族有13个、D 亚族有3个、E 亚族有15个成员,与 其他物种的进化方式^[26]相似。

2.2 PtrnsLTP基本特征

PtrnsLTP 家族各基因编码蛋白分子质量为 8.58~16.95 kDa、pl值为4.27~9.91,符合植物nsLTP 家族基因编码蛋白的等电点基本特征(见表2)。亚细 胞定位预测表明,PtrnsLTP编码蛋白如PtrnsLTP1.1

定量引物名称	F端引物序列(5'—3')	R端引物序列(5'—3')
PtrnsLIP1.1		
PtrnsLIP1.2		
PtrnsLTP1.3	AGIGIAGIAGCGGCAGCAAIG	GGCCTCAGGTCCTTGATTACAT
PtrnsLTP1.4	CAAGTGTAGTAGCGGCAGCAAT	CAGCAGGTGGTTTCCCAGTA
PtrnsLTP1.5	GCACATCCTTGTGGTAGCACTT	AAGAGTACACAAGCAAGGCTGG
PtrnsLTP1.6	AGCACTGTTGATGAAAAGGCA	GTTGACGCTTGTAGAGACGGG
PtrnsLTP2.1	GAGTCTAGTGCTTGCCCTCATG	CACCTTTGGTCCCTTTTTGG
PtrnsLTP2.2	AGATGGCGAAGAGGCAGC	GCCCCAGAAACAGCCTTG
PtrnsLTP4.1	TGCTTATAGCGATGGTTGTTAGTG	AGGATTTCAAACAGTTGCAGACC
PtrnsLTP4.2	GCTTGTAGCGATGGTTGTTAGTG	CTTACCAGCCAAGGATTTCAAAC
PtrnsLTP4.3	TGCCTACCAGCAATCTCGTC	CAAAGACAAGGCTTCTGCTCC
PtrnsLTP6.1	TGCCTCACCTACCTGAAGAAAG	ACTTTGGAGGCGGTTTGTTT
PtrnsLTP7.1	CTCGCATTGTTGGGTTTCTG	GGTCCACGTCGAACTTAGCC
PtrnsLTP7.2	CCCCATCTTCAGAGGCACC	CAGTATGAACCTGCGAGAAAATC
PtrnsLTP8.1	GGCGACTCCAATGAAGTACATT	AGCACTGGCTCGAAACTGAAG
PtrnsLTP9.1	CAAGTGTAGTGGTGGCAGCAAT	GTTCACACAAGGCCTCAGGTC
PtrnsLTP9.2	CAAATCCAGATGCTCCCGAT	ACAGCCTTCTCCATGCTAATCA
PtrnsLTP9.3	ACGCACAAAGAATTTTGTCGTT	CCTGTCTGCACTGATGGCTTAC
PtrnsLTP10.1	CTTGGGTTGTGACTGTGTTGGT	AGGCAGTAACTTTGGAGCAGC
PtrnsLTP10.2	TCAATCAAGTTGACGGGGC	AACAGCGCATAGGCAGGC
PtrnsLTP11.1	AATAGTGGTGGCTGTGATTGCT	GTAGTAGTCAAGAATGGGAGGCAG
PtrnsLTP11.2	GTATTCTGTTTTTTGGGCAGTGA	TCCCTTTTGTCTTTCCTGTTGA
PtrnsLTP11.3	CTGTTTTCTGGGCAGTGATTTT	GAGACACTACCCAGCAAGAACG
PtrnsLTP12.1	CAATCACATCTTCTACTCCACCAA	GCTTCTGTTCCTTGATCTTGCT
PtrnsLTP12.2	TCACTCAAGTCTCTTAGCTCCCC	GTACTAGGGTTGGTGTTCGGTG
PtrnsLTP12.3	CTCCTGTTGCTGTTGCTCTCAT	CCACAGAAGCCAGGCAGAGTA
PtrnsLTP14 1	ACTTGTCTGCTTGCGTTTCCTA	GATGCAGCCTCATCCTTCATATC
PtrnsITP14 2	AGCAGCAATGAGCACTCATCTAT	ACAGCAAGTCTTTGACGGATCT
PtrnsLTP14 3	TCCTTTGTGTGGCTCTATTGCT	GCGGTAGGGTTAGGAGGAGTTA
PtrnsLTP15 1	ATTGGTGCTTCTTCTGGCTCA	GCAGGGCTTCTGTTCCTTGAT
DtrasITD15.2		
Ptwart TP16 1	TTCATCGCTCTTCTGGGATTG	
Dterre LTD 16.2		
PlfmsL1P10.2		
PIMISLIP10.5		
PtrnsLIP16.4		
PtrnsLTP16.5		
PtrnsLTP16.6	GAGAGCCCTTCATTTAGTTTGC	TGAAATCGCTGCTTTAGTGGT
PtrnsLTP17.1	TTCGGAGAGTAAATGCGAGC	CAGTCCACGCTTCGCTAATC
PtrnsLTP17.2	TAACCCAGGGCAGTTGAGC	AAGTGGTGGAGGGTGGTGTAG
PtrActin	AGGCAGGTTTCGCAGGAGATGA	TCCATCACCAGAATCCAGCACA

表1 PtrnsLTP 定量引物序列 Table 1 PtrnsLTP quantitative primer sequence

表 2 PtrnsLTP 家族概况 Table 2 Overview of the PtrnsLTP gene family

基因名称 Gene name	登录号 Gene ID	基因的位置 Genomic location	蛋白长度 Protein length /aa	分子量 Molecular weight /kDa	等电点 pI	亚细胞定位 Subcellular localization
PtrnsLTP1.1	Potri.001G023200.1	1768060-1768956	113	12.009 12	6.78	СМ
PtrnsLTP1.2	Potri.001G023300.1	1770676-1771673	134	14.607 19	7.56	СМ
PtrnsLTP1.3	Potri.001G232700.1	24461327-24462000	118	11.975 05	8.14	CW
PtrnsLTP1.4	Potri.001G232900.1	24483523-24484495	118	12.014 09	8.46	CW
PtrnsLTP1.5	Potri.001G271000.1	27859786-27860575	88	9.291 93	6.71	СМ
PtrnsLTP1.6	Potri.001G460900.1	49454026-49454302	84	8.582 16	8.74	CW
PtrnsLTP2.1	Potri.002G012300.1	714913-715376	124	14.124 77	8.8	CW
PtrnsLTP2.2	Potri.002G251000.1	24097409-24098806	102	10.740 64	4.85	СМ
PtrnsLTP4.1	Potri.004G086500.1	7250939-7252044	118	11.809 93	9.22	CW
PtrnsLTP4.2	Potri.004G086600.1	7257055-7257885	118	11.668 74	9.06	CW
PtrnsLTP4.3	Potri.004G096000.1	8252603-8253488	93	9.645 56	9.14	СМ
PtrnsLTP6.1	Potri.006G108100.1	8428753-8429723	116	11.881 21	9.32	CW
PtrnsLTP7.1	Potri.007G138400.1	14998848-14999195	115	13.108 28	5.45	CW
PtrnsLTP7.2	Potri.007G138500.1	15002557-15003632	153	16.955 85	6.39	CW
PtrnsLTP8.1	Potri.008G061800.1	3715997-3716768	119	12.545 76	8.6	СМ
PtrnsLTP9.1	Potri.009G025200.1	3644075-3645235	118	11.870 75	8.13	CW
PtrnsLTP9.2	Potri.009G048800.1	5396543-5396830	95	10.243 31	9.07	CW,CM
PtrnsLTP9.3	Potri.009G112500.1	9594032-9594787	109	11.662 80	8.83	СМ
PtrnsLTP10.1	Potri.010G100600.1	12200539-12202205	120	12.268 74	9.91	СМ
PtrnsLTP10.2	Potri.010G196300.1	18966272-18967159	119	12.541 65	8.07	СМ
PtrnsLTP11.1	Potri.011G021900.1	1852821-1853530	118	12.831 99	8.13	CW,CM
PtrnsLTP11.2	Potri.011G022100.1	1860483-1860995	119	12.987 31	8.64	CW
PtrnsLTP11.3	Potri.011G022200.1	1869485-1870289	119	13.027 37	8.43	CW
PtrnsLTP12.1	Potri.012G054300.1	5504366-5505126	93	10.033 02	9.24	CW
PtrnsLTP12.2	Potri.012G137400.1	15263548-15264499	94	96.432 60	6.66	СМ
PtrnsLTP12.3	Potri.012G139700.1	15398444-15399190	118	12.415 55	4.27	CW
PtrnsLTP14.1	Potri.014G046500.1	3643120-3644008	117	12.105 16	6.53	CW
PtrnsLTP14.2	Potri.014G098000.1	7655899-7656796	127	13.578 99	9.06	CW
PtrnsLTP14.3	Potri.014G149900.1	11496745-11497691	103	10.687 80	8.62	СМ
PtrnsLTP15.1	Potri.015G044500.1	4411154-4411923	93	10.083 00	9.36	CW,CM
PtrnsLTP15.2	Potri.015G139100.1	14741017-14741301	94	9.760 28	5.97	СМ
PtrnsLTP16.1	Potri.016G104300.1	10353074-10353978	116	11.902 98	8.11	СМ
PtrnsLTP16.2	Potri.016G135400.1	13871619-13872561	116	11.879 93	8.89	CW
PtrnsLTP16.3	Potri.016G135500.1	13890545-13891464	129	14.051 54	9.36	CW
PtrnsLTP16.4	Potri.016G135700.1	13908471-13909450	117	12.825 26	9.23	CW
PtrnsLTP16.5	Potri.016G135800.1	13915635-13916479	120	12.498 66	9.26	CW
PtrnsLTP16.6	Potri.016G136000.1	13922459-13923572	120	12.662 74	9.01	CW
PtrnsLTP17.1	Potri.017G013200.1	1105887-1106566	116	13.385 69	8.03	CW
PtrnsLTP17.2	Potri.017G118700.1	13300324-13300829	94	9.926 79	8.68	СМ

注:CW.细胞壁;CM.细胞膜

Note:CW.Cell wall;CM.Cell membrane





Fig.2 Chromosome location and sequence identity analysis of *PtrnsLTP*

等14个蛋白定位在细胞膜上,PtrnsLTP1.3等22个 蛋白定位在细胞壁上,其中PtrnsLTP9.2、PtrnsLTP11.1 和PtrnsLTP15.1在细胞膜和细胞壁上均有定位。

2.3 PtrnsLTP的染色体定位及序列一致性

为了阐明 PtrnsLTP 家族基因在染色体上的分布,利用 TBtools 构建了家族基因染色体定位以及同源关系图。结果(见图2)表明,PtrnsLTP 主要分布在毛果杨1号和16号染色体上,各有6个且16号染色体上的6个基因形成了基因簇。4、9、11、12

和14号染色体上各有3个,2、7、10、15和17号染色体上各有2个,其余染色体上均只含有1个基因。

Blastp 结果显示, *PtrnsLTP1.3*和 *PtrnsLTP1.4* 与*PtrnsLTP9.1*同源片段长度大于300 bp且序列一 致性高于80%, 同样的还有*PtrnsLTP4.1*和 *PtrnsLTP4.2、PtrnsLTP11.2*和 *PtrnsLTP11.3、PtrnsLTP16.3*和 *PtrnsLTP16.4、PtrnsLTP16.5*和 *PtrnsLTP16.6*(见图3,表3),说明这7对基因为基因复 制事件进化而形成的旁系同源基因^[27]。



图3 PtrnsLTP家族基因外显子—内含子结构



_ . . __ . .

	表3	同源基因的Ka/Ks比值及序列一致性
Table 3	Ka/Ks	ratio and sequence identity of homologous genes

. . . . ____

同源基因Paralogues		$K_{0}(\mathbf{IC})$	$\mathbf{K}_{\mathbf{C}}(\mathbf{IC})$	V o /V o	同源片段长度	同源性
Gene1	Gene2	Ka(JC)	KS(JC)	Kd/KS	fragment length /bp	Homology /%
PtrnsLTP4.1	PtrnsLTP4.2	0.050 751	0.058 338	0.869 942	339	95
PtrnsLTP8.1	PtrnsLTP10.2	0.060 735	0.274 117	0.221 566	325	90
PtrnsLTP9.1	PtrnsLTP1.3	0.117 490	0.210 058	0.559 323	312	87
	PtrnsLTP1.4	0.108 696	0.241 534	0.450 025	312	87
PtrnsLTP11.2	PtrnsLTP11.3	0.025 754	0.064 835	0.397 217	348	97
PtrnsLTP16.3	PtrnsLTP16.4	0.112 034	0.068 727	1.630 148	317	91
PtrnsLTP16.5	PtrnsLTP16.6	0.028 199	0.064 493	0.437 239	346	98

同源基因 Ka/Ks 分析发现, PtrnsLTP 家族共有 7 对同源基因,其中6 对基因(PtrnsLTP4.1 和 PtrnsLTP4.2、PtrnsLTP8.1 和 PtrnsLTP10.2、PtrnsLTP9.1 和 PtrnsLTP1.3、PtrnsLTP9.1 和 PtrnsLTP1.4、PtrnsLTP11.2 和 PtrnsLTP11.3、PtrnsLTP16.5 和 PtrnsLTP16.6)的 Ka/Ks 比值小于1,1对(PtrnsLTP16.3 和 PtrnsLTP16.4)大于1(见表3),上述结果表明, PtrnsLTP7家族各成员在进化过程中大多数基因经 过了纯化选择,少部分基因受到了正向选择。值 得注意的是这6对基因处于同一个大的进化分支 上,推测进化压力的不同可能会导致基因功能的 分化。

2.4 PtrnsLTP外显子和内含子分布以及编码蛋白结构域

为了更好地阐明 PtrnsLTP 家族中各基因外显 子与内含子分布规律,利用 GSDS 网站对上述内容 进行了可视化处理。结果表明(见图3),不同基因 的内含子与外显子在基因中的分布方式相似,所 有基因均无内含子,表明PtrnsLTP家族基因的结 构在进化中极为保守。

PtrnsLTP家族编码蛋白保守域分析发现,9个保守基序中Motif1和Motif2为家族共有基序(见图4)。虽然不同基因编码蛋白所含基序数量与种类存在一定的差异,但相同分枝的基因编码蛋白具有相似的基序组合,而不同亚家族、类型之间的基序存在明显的差别。上述结果表明,PtrnsLTP不同亚家族的生物学功能在进化过程中可能产生了分化。

2.5 PtrnsLTP组织表达特异性

为了解 PtrnsLTP 家族各成员在毛果杨生长发育中的生物学功能,我们对 Phytozome 中 PtrnsLTP 家族各基因在不同组织部位的表达量数据并进行了初步分析,结果(见图5A)表明,PtrnsLTP 家族成员在毛果杨各组织表达量不同,其中除 Ptrn-



sLTP9.2、PtrnsLTP7.1、PtrnsLTP17.2、PtrnsLTP1.1、 PtrnsLTP14.2、PtrnsLTP11.3 以及 PtrnsLTP15.2 在 网站无表达量数据以外,其余基因均在毛果杨不 同部位有所表达。该家族大部分基因在茎部表达 量较高,其次为叶部,相同进化分枝基因的表达模 式相似。同时,我们利用 qRT-PCR 技术对 PtrnsLTP家族成员在毛果杨不同组织部的表达情况做进一步验证,结果(见图5B)表明,各家族成员在毛果杨根、茎和叶中的表达变化趋势与phytozome中各基因表达值基本吻合。上述结果初步表明, PtrnsLTP家族成员在毛果杨根、茎和叶发育过程中的生物学功能产生了分化。



A.Phytozome网站数据;B.qRT-PCR结果



A.Phytozome website data; B.qRT-PCR results



图 6 PtrnsLTP 在盐胁迫不同时间下的表达特性 Fig.6 Expression characteristics of PtrnsLTP under salt stress at different times

2.6 PtrnsLTP 对盐胁迫的响应特性

为鉴定 PtrnsLTP 家族成员的盐胁迫响应特性,利用 qRT-PCR 技术分析了不同时间盐胁迫下 家族成员在毛果杨根、茎、叶部的表达量。结果 (见图6)表明,39个 PtrnsLTP 成员均对盐胁迫有不 同程度的响应;根部组织中,随着盐胁迫时间的增 加,除 PtrnsLTP1.5、PtrnsLTP9.2、PtrnsLTP17.2 和 PtrnsLTP16.2表达量降低以外,其余基因表达量均 有明显的上升趋势;茎部几乎所有基因表达量随 着胁迫时间的增加呈现明显的先升高后降低的 "倒U"曲线趋势,即随着胁迫时间的增加表达量 先升高,达到峰值后逐渐降低;同样,叶部相同进 化分支的基因如 PtrnsLTP17.2、PtrnsLTP14.1 和 PtrnsLTP6.1 表达量也在12 h时达到了峰值,而其 他大部分基因表达量随胁迫时间增加呈现明显上 升的趋势。

3 讨论

脂质(磷脂)在维持植物细胞功能、生长发育 以及各种胁迫的应答中起着重要作用^[28],而nsLTP 蛋白是植物体内脂质(磷脂和脂肪酸)跨膜转运的 主要载体^[29]。研究表明,植物nsLTP对干旱^[30]、盐 碱^[31]和低温^[32]等非生物胁迫具有较强的响应能力。 目前为止,植物nsLTP家族基本特性的研究主要集 中在水稻和拟南芥^[10]等草本模式植物中,木本模式 植物毛果杨nsLTP家族的研究目前尚无报导。

3.1 PtrnsLTP家族基因基本特性

本项研究在毛果杨基因组中鉴定出 39个 PtrnsLTP,按照进化关系将其分为5个亚组族(见 图1),其编码蛋白分别定位在细胞壁、细胞膜或在 二者之间均有定位(见表2)。PtrnsLTP家族成员 分布于毛果杨14条染色体上,且各染色体上基因 分布数量存在差异,其中1号和16号染色体上分 布最多,分别有6个PtrnsLTP(见图2),而6和8号 染色体上均只含有1个基因,表明导致PtrnsLTP家 族成员扩张的历史事件存在差异。PtrnsLTP家族 中有7对基因为旁系同源基因(见图2和表3),其 中1对旁系同源基因的Ka/Ks比值大于1,证明其 受到了正向选择,6对远小于1,且这6对基因处于 同一个大的进化分支。该家族基因在进化过程当 中既经历了纯化选择也经历了正向选择,有害的 非同义替换在进化过程中消失,极少数的无害或 有益替换得以保留,上述结果表明,毛果杨PtrnsLTP家族基因在进化过程受到的选择作用不同, 因此其家族基因编码蛋白的细胞定位与理化性状 产生了分化[33]。同时,这一现象也预示了该基因 家族的生物学功能产生了分化。PtrnsLTP家族基 因均无内含子(见图3),一般认为无内含子基因能 够连续编码成蛋白质,且内含子与真核生物基因 组的复杂程度有很大的关系,越复杂的生物体其 体内的内含子数越多[34]。此外近期研究表明,无 内含子基因能够更加快速的应答胁迫信号[35],预 示着该家族基因在非生物胁迫下可能具有重要功 能。与其他植物一样, PtrnsLTP家族编码蛋白含 有多个基序,表明该基因家族生物学功能的多样 性,但所有基因均含有保守基序 Motif 1 和 Motif 2 (见图4),表明这两个基序是该家族的特征基序, 且是毛果杨生命活动所必需的。上述结果进一步 预示了PtrnsLTP家族结构相对较为保守,但不同 进化分枝基因可能在生物学功能上出现了分化。

3.2 PtrnsLTP家族基因参与盐胁迫响应过程

结合毛果杨生物学网站表达谱数据(见图 5A)与本研究中 qRT-PCR 结果(见图 5B)发现, PtrnsLTP 家族成员在毛果杨根、茎和叶部均有表 达,但表达量在3种组织中存在差异,其中11个基 因在根部表达水平较高,15个在茎部表达水平较 高,13个在叶部表达水平较高,预示了各成员分别 在毛果杨不同组织发育过程中扮演着不同的作 用^[36]。前期研究表明,nsLTP多涉及环境胁迫响 应^[30-31],而盐胁迫又是最常见的环境胁迫之一。盐 胁迫过程主要分为两部分即渗透胁迫和离子胁 迫,渗透胁迫是植物在盐渍土壤中经历的第1次胁 迫,当盐浓度达到临界值时就会产生离子毒害[37]。 我们利用qRT-PCR分析毛果杨在盐胁迫不同时间 下的表达情况(见图6),结果进一步表明,PtmsLTP 家族基因对盐胁迫具有不同程度的响应能 力,与拟南芥中该家族在盐胁迫中表现类似[38]。 值得注意的是茎部几乎所有的基因在盐胁迫12h 时表达水平显著上升,而茎部又是输送水、无机盐 以及有机物等维持植物体正常生长必不可少成分 的关键部位。据此,我们推测该家族基因可能在 植物盐胁迫中主要参与渗透胁迫过程。

本研究通过对PtrnsLTP家族基因生物学功能 的鉴定和盐胁迫表达特征分析为今后更深入了解 该基因家族奠定了基础,同时也对基因资源的挖 掘具有积极的意义。

参考文献

- [1] DENG W J, LI R Q, XU Y W, et al. A lipid transfer protein variant with a mutant eight-cysteine motif causes photoperiod- and-thermo-sensitive dwarfism in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 71(4): 1294-1305.
- [2] JOSÉ -ESTANYOL M, GOMIS-RÜTH F X, PUIG-DOMÈNECH R.The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins[J].Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(5): 355-365.
- [3] LERCHE M H, KRAGELUND B B, BECH L M, et al.Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: the structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligands [J]. Structure, 1997, 5(2):291-306.
- [4] KADER J C.Proteins and the intracellular exchange of lipids: I.stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Lipids and Lipid Metabolism, 1975, 380 (1): 31-44.
- [5] 王洪.油菜非特异性脂转运蛋白基因家族的全基因组 水平鉴定和表达分析[D].杨凌:西北农林科技大学, 2015.

WANG H. Genome-wide identification and expression analysis of brnsltps gene family in brassica rapa[D].Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2015.

- [6] 孟令波,刘关君,李淑敏,等.黄瓜非特异性脂质转移蛋 白基因的序列分析及细菌性角斑病菌浸染下的表达 [J].东北农业大学学报,2013,44(1):55-60. MENG L B, LIU G J, LI S M, et al. Sequence analyses of non-specific transfer protein from cucumber and expression after challenging by *Pseudomonas syringae* pv. *Lachry-mans*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2013,44(1):55-60.
- [7] KINLAW C S, GERTTULA S M, CARTER M C. Lipid transfer protein genes of loblolly pine are members of a complex gene family [J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26(4):1213-1216.
- [8] BLUNDELL T L, SIBANDA B L, STERNBERG M J E, et al. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules [J].Nature, 1987, 326(6111): 347-352.
- [9] DOULIEZ J P, MICHON T, ELMORJANI K, et al. Mini Review: structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels[J].Journal of Cereal Science, 2000, 32(1): 1-20.

- [10] BOUTROT F, CHANTRET N, GAUTIER M F.Genomewide analysis of the rice and arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining[J].BMC Genomics, 2008,9(1):86.
- [11] SAMUEL D, LIU Y J, CHENG C S, et al. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (Oryza sativa) [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002,277(38):35267-35273.
- [12] KADER J C.Lipid-transfer proteins in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1996,47:627-654.
- [13] ZHANG D S, LIANG W Q, YIN C S, et al.OsC6, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice [J]. Plant Physiology, 2010, 154(1):149-162.
- [14] XIE W Q, ZHAO L Q, BAI W Y, et al. The effects of calmodulin on the lipid-binding activity of CaM-binding protein-10 and maize non-specific lipid transfer protein [J].Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2006, 32(6):679-684.
- [15] MOLINA A, SEGURA A, GARCÍA-OLMEDO F. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens[J].FEBS Letters, 1993, 316(2):119-122.
- [16] GARCÍA-OLMEDO F, MOLINA A, SEGURA A, et al. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants[J].Trends in Microbiology, 1995, 3(2):72-74.
- [17] 强晓晶.小盐芥 ThPIP1 基因的水稻遗传转化及耐盐 机理研究[D].北京:中国农业科学院,2015.
 QIANG X J.Thellungiella halophila ThPIPl gene transferring rice and mechanism of salt stress tolerance[D].
 Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
- [18] ANDREA P, SNEHA D, HELENE P.Salt stress in Arabidopsis: lipid transfer protein AZI1 and its control by mitogen-activated protein kinase MPK3 [J]. Molecular Plant, 2014, 7(4): 722-738.
- [19] MCLAUGHLIN J E, BIN-UMERM A, WIDIEZ T, et al. A lipid transfer protein increases the glutathione content and enhances Arabidopsis resistance to a trichothecene mycotoxin[J].PLoS One, 2015, 10(6):e0130204.
- [20] JUNG H W, KIM K D, HWANG B K. Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (CALTPI) and the enhanced resistance of the CALTPI transgenic *Arabidopsis* against pathogen and environmental stresses [J]. Planta, 2005, 221(3):361-373.

 [21] 部刚,任彩虹,金黎平,等.马铃薯非特异性脂质转移 蛋白基因 *StLTPa1* 的克隆和表达[J].作物学报,2008, 34(9):1510-1517.
GAO G, REN C H, JIN L P, *et al.* Cloning, expression

and characterization of a non-specific lipid transfer protein gene from potato[J].Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(9):1510-1517.

- [22] FANG Z W, HE Y Q, LIU Y K, et al. Bioinformatic identification and analyses of the non-specific lipid transfer proteins in wheat[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2020, 19(5):1170-1185.
- [23] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30 (12):2725-2729.
- [24] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): W256-W259.
- [25] ZHANG Z, LI J, ZHAO Z Q, et al.KaKs_Calculator: calculating Ka and Ks through model selection and model averaging [J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2006,4(4):259-263.
- [26] LI J, GAO G Z, XU K, et al.Genome-wide survey and expression analysis of the putative non-specific lipid transfer proteins in Brassica rapa L. [J]. PLos One, 2014, 9 (1):e84556.
- [27] BLANC G, WOLFE K H.Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes [J]. The Plant Cell, 2004, 16 (7): 1667-1678.
- [28] LIU W F, HUANG D W, LIU K, et al. Discovery, identification and comparative analysis of non-specific lipid transfer protein(nsLtp) family in solanaceae[J].Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2010,8(4):229-237.
- [29] TSUBOI S, OSAFUNE T, TSUGEKI R, *et al*.Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: sub-

cellular localization and a possible role in lipid metabolism[J].Journal of Biochemistry,1992,111(4):500-508.

- [30] ARONDEL V, VERGNOLLE C, CANTREL C, et al.Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in Arabidopsis thaliana [J].Plant Science, 2000, 157(1):1-12.
- [31] HINCHA D K, NEUKAMM B, SROR H A M, et al. Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family [J]. Plant Physiology, 2001,125(2):835-846.
- [32] TREVINO M B, O' CONNELL M A. Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression[J].Plant Physiology, 1998, 116(4):1461-1468.
- [33] JI J L, LÜ H H, YANG L M, *et al*.Genome-wide identification and characterization of non-specific lipid transfer proteins in cabbage[J].PeerJ, 2018, 6: e5379.
- [34] SAKHARKAR M K, CHOW V T K, KANGUEANE P. Distributions of exons and introns in the human genome [J].In Silico Biology, 2004, 4(4):387-393.
- [35] JAIN M, KHURANA P, TYAGI A K, et al. Genome-wide analysis of intronless genes in rice and Arabidopsis [J]. Functional & Integrative Genomics, 2008, 8(1):69-78.
- [36] D' AGOSTINO N, BUONANNO M, AYOUB J, et al. Identification of non-specific Lipid Transfer Protein gene family members in Solanum lycopersicum and insights into the features of Sola 1 3 protein [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1):1607.
- [37] LIANG W J, MA X L, WAN P, *et al*.Plant salt-tolerance mechanism: a review [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 495(1):286-291.
- [38] COLCOMBET J, HIRT H. Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes [J]. Biochemical Journal, 2008, 413 (2) : 217-226.