

丁泽红,付莉莉,吴春来,等. 木薯 *MeTPSI* 基因克隆、表达及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):28-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.006

木薯 *MeTPSI* 基因克隆、表达及生物信息学分析

丁泽红,付莉莉,吴春来,胡 伟

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所,海南海口 571101)

摘要:海藻糖-6-磷酸合成酶(trehalose-6-phosphate synthase,简称 TPS)是海藻糖生物合成途径中的关键酶,提高 TPS 基因的表达量可以增强植物在干旱、低温等非生物胁迫条件下的抗逆性。木薯是重要的热带经济作物和粮食作物,在严重干旱、低温或密植(遮阴)条件下,木薯块根产量会显著减少。为了研究 TPS 基因在木薯抗逆中的功能,通过同源基因克隆的方法,从木薯叶片中克隆了 1 个 TPS 基因 *MeTPSI*,该基因含有 1 个 2 781 bp 的开放阅读框,编码 926 个氨基酸,含有 TPS 家族保守结构域。系统进化树分析表明,*MeTPSI* 与杨树、杞柳中同源基因的亲缘关系较近,序列相似性分别达到 88.1%、89.4%。启动子元件分析表明,*MeTPSI* 含有干旱诱导元件(MBS)、热胁迫响应元件(HSE)、防御和胁迫响应元件(TC-rich repeats)以及光响应元件(ACE、Box 1、Box 4)等。实时荧光定量 PCR 分析表明,*MeTPSI* 在叶片中的表达量最高,在须根和储藏根中表达量最低,并且 *MeTPSI* 基因的表达能被干旱、低温和遮阴处理显著诱导,但对 ABA 处理无明显响应。这些结果表明,*MeTPSI* 在转录水平参与木薯干旱、低温和遮阴胁迫的响应,可将其作为候选基因进一步研究其在木薯抗逆中的功能。

关键词:海藻糖合成酶;*MeTPSI*;干旱;低温;遮阴;ABA;表达分析

中图分类号:S533.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)09-0028-06

海藻糖是由 2 个葡萄糖分子通过 $\alpha-1,1$ 糖苷键结合而成的非还原性双糖^[1]。海藻糖具有生物抗逆性,其含量在干旱、低温、氧化和热胁迫等条件下被大量积累^[2],可以在非生物胁迫下保护核酸、蛋白质、细胞膜等生物大分子物质,从而增强植物的抗逆性^[3-4]。海藻糖-6-磷酸合成酶(trehalose-6-phosphate synthase,简称 TPS)是海藻糖生物合成途径中的一个关键酶,即尿苷二磷酸葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖在 TPS 催

化作用下生成 6-磷酸海藻糖,之后在海藻糖-6-磷酸酯酶的水解作用下生成海藻糖^[5]。在大多数植物中,海藻糖的含量非常低(鲜质量含量 < 10 $\mu\text{mol/g}$),但是通过调节 TPS 基因的表达可以提高海藻糖的含量并且不影响植株生长^[6]。将拟南芥 *AtTPSI* 基因转入烟草后,转基因植株体内海藻糖含量显著增加,其耐受盐胁迫的能力显著增强^[4]。在干旱、低温和高盐条件下,水稻 *OsTPSI* 转基因植株抗性明显增强,与对照相比,转基因植株体内海藻糖含量约增加了 2 倍^[3,7]。TPS 基因的表达受到干旱、低温、遮阴等非生物胁迫的调控。在低温胁迫条件下,茶树 *CsTPS*、辣椒 *CaTPS*、小麦 *TaTPS* 的表达量显著增加^[8-10];在干旱胁迫条件下,棉花 *GhTPS* 和海带 *SjTPS* 的表达量显著增加^[11-13];在遮阴胁迫条件下,玉米 TPS 基因的表达量也发生了显著变化^[14]。此外,TPS 基因的表达量在植物的不同组织中也不尽相同,呈现出差异表达的特点^[8-9]。这些研究充分表明,TPS 是一个重要的抵御干旱、低

收稿日期:2017-08-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31600198);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(编号:1630052016012)。

作者简介:丁泽红(1982—),男,湖南岳阳人,博士,副研究员,主要从事植物分子生物学研究。Tel: (0898) 66989380; E-mail: dingzehong@itbb.org.cn。

通信作者:胡 伟,博士,副研究员,主要从事植物分子生物学研究。Tel: (0898) 66890587; E-mail: huwei2010916@126.com。

[18]孙 勇,王 丹,全 征,等. 香蕉幼苗叶片响应低温胁迫的比较蛋白质组学研究[J]. 中国农学通报,2015,31(34):216-228.

[19]韩平安,禄晓萍,米福贵,等. 基于蛋白质组学的高丹草苗期杂种优势分析[J]. 作物学报,2016,42(5):696-705.

[20]杨 超,胡红涛,吴 平,等. 高等植物铁氧还蛋白-NADP⁺氧化还原酶研究进展[J]. 植物生理学报,2014,50(9):1353-1366.

[21]安飞飞,凡 杰,李庚虎,等. 华南 8 号木薯及其四倍体诱导株系叶片蛋白质组及叶绿素荧光差异分析[J]. 中国农业科学,2013,46(19):3978-3987.

[22]梁潘霞,李杨瑞. 甘蔗细胞色素 b6-f 复合体铁硫亚基(*SoCYT*)基因的克隆和表达分析[J]. 西南农业学报,2016,29(5):1032-1037.

[23]卢 倩,弭晓菊,崔继哲. 植物甘油醛-3-磷酸脱氢酶作用机

制的研究进展[J]. 生物技术通报,2013(8):1-6.

[24]夏民旋,王 维,袁 瑞,等. 超氧化物歧化酶与植物抗逆性[J]. 分子植物育种,2015,13(11):2633-2646.

[25]徐 平,凌建群,李德葆. 一种新的与渗透蛋白基因启动子结合的蛋白基因的分离[J]. 中国科学(C 辑),1999,29(1):68-74.

[26]李国龙,吴海霞,孙亚卿,等. 甜菜叶片应答干旱胁迫的差异蛋白质组学分析[J]. 作物杂志,2015(5):63-68.

[27]付晨熙,肖自华,高 飞,等. 干旱胁迫下蒙古沙冬青叶片蛋白质组学研究[J]. 生物技术通报,2017,33(6):69-80.

[28]肖 振,赵 琪,张川芳,等. 蛋白质组学研究揭示的甘蓝型油菜非生物胁迫应答机制[J]. 植物科学学报,2016,34(6):949-961.

[29]孙利军,李大勇,张慧娟,等. NAC 转录因子在植物抗病和抗非生物胁迫反应中的作用[J]. 遗传,2012,34(8):993-1002.

温等非生物胁迫的候选基因,提高其表达水平可以增强植物的抗逆性。

木薯是大戟科块根植物,是热带、亚热带地区重要的经济作物和粮食作物。木薯具有较好的抗旱特性,然而在长时间或较为严重的干旱条件下,其块根产量会显著下降^[15-16]。除了干旱,木薯产量还常常受到低温、遮阴等环境因素的影响。作为典型的热带作物,木薯对低温胁迫非常敏感,极端的低温天气可造成木薯产量大幅减少甚至绝收^[17]。此外,由于长期受耕作方式的影响,在某些经济落后的地区(如拉丁美洲),农民常常将木薯和橡胶树、玉米等作物间作在一起,以达到土地使用效率的最大化。在这种情况下,木薯经常会受到不同程度的遮阴,其产量也会显著减少^[18-19]。因此,提高木薯对于干旱、低温、遮阴等非生物胁迫的耐受性,使其在恶劣环境下维持原有块根产量,或是减少产量的损失具有重要意义。

至今,尚没有关于木薯 *TPS* 基因克隆及其参与非生物胁迫调控的报道。本研究采用同源基因克隆的方法从木薯叶片中克隆了 1 个海藻糖合成酶基因(命名为 *MeTPSI*),之后从进化树、保守结构域和启动子元件等方面对其进行初步的生物信息学分析,同时研究其不同组织之间,以及在干旱、低温、遮阴和脱落酸(ABA)胁迫处理下的表达模式,为进一步研究 *MeTPSI* 的功能奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用木薯材料为木薯栽培品种 Ku50,它具有高产、高淀粉含量的特性,由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供。RNA 提取试剂盒(货号:DP437),购自天根生化科技(北京)有限公司;cDNA 反转录试剂盒(货号:K1622),购自 Fermentas 公司。

1.2 木薯种植与处理

木薯种植按照 Ding 等的方法^[19-20]进行:在木薯种植季节(2013 年 5 月),将木薯种茎切成长度约 15 cm 的茎段,挑选粗细均匀一致且具有 3~4 个芽眼的茎段扦插于塑料盆(高 18.8 cm,上直径 18.5 cm,下直径 14.8 cm)中,每盆 1 个茎段。基质采用营养土与蛭石以体积比 1:1 进行混合。木薯种植约 10 d 后进行间苗,保留 1 株/盆。试验地点为中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

PEG 处理:种植 60 d 后,选取长势一致的植株,用 20% PEG 6000 溶液进行模拟干旱处理,同时以不施 PEG(浇灌自来水)的植株为对照。在处理 0、3、24 h 后,分别收集未展开叶、第 1 张完全展开叶、老叶和根样品,液氮速冻,−80 ℃ 保存备用。

低温处理:种植 60 d 后,选取长势一致的植株放置于光照培养箱内,进行 4 ℃ 低温胁迫处理。在处理 0、6、24 h 后,分别收集未展开叶、第 1 张完全展开叶和根的样品,液氮速冻,−80 ℃ 保存备用。

ABA 处理:种植 60 d 后,选取长势一致的植株,采用 100 μmol/L ABA 溶液进行浇灌处理,在处理 0、3、5、7 d 后收集第 1 张完全展开叶的样品,液氮速冻,−80 ℃ 保存备用。

遮阴处理:将遮阴处理的木薯种植于橡胶树下,将对照处理的木薯种植于室外。种植 60 d 后,选择生长状况较一致的

植株,收集未展开叶、第 1 张完全展开叶和老叶的样品,液氮速冻,−80 ℃ 保存备用。

为了比较不同组织中 *MeTPSI* 基因的表达情况,笔者还收集了木薯 Ku50 叶片、叶柄、茎、须根和储藏根的样本,用于实时荧光定量 PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction,简称 qRT-PCR) 分析。

1.3 引物合成及 qRT-PCR

采用 Primer 6.0 软件设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,包括 *actin* 基因引物(L1: 5'-TGATGAGTCTGCTCCATCCA-3'; R1: 5'-CCTCCTACGACCCAATCTCA-3')^[21]、*MeTPSI* 基因 qRT-PCR 引物(L2: 5'-TAGACACTCTGGGCGAAGA-3'; R2: 5'-CTGCCAGCCACATGTCAAAC-3')和 *MeTPSI* 基因全长扩增引物(L3: 5'-ATGCCTGGAAACCAGTACAACA-3'; R3: 5'-TCAAGGAGATGCATTGGCT-3')。采用 RNA 提取试剂盒抽提木薯总 RNA,之后用 cDNA 反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA,−20 ℃ 储存备用。用 SYBR Green I 试剂盒(TaKaRa 公司),按照操作说明在 Mx 3005P 荧光定量 PCR 仪(Stratagene,美国)上进行 qRT-PCR 分析。每个样品设 3 次生物学重复,表达量按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算^[22]。

1.4 生物信息学分析

用 ExPASy ProtParam 软件分析蛋白质的分子量和等电点;用 Plant-mPLoc 软件预测亚细胞定位情况;用 NCBI-CDD 数据库分析保守结构域;用 BLASTp 搜索 Phytozome 数据库,获取其他物种与 *MeTPSI* 同源的蛋白质序列;用 ClustalX 进行序列比对;用 MEGA5.2 软件构建进化树;用 PlantCARE 进行启动子元件分析。

2 结果与分析

2.1 *MeTPSI* 基因克隆

用拟南芥 *AtTPSI* 基因(登录号:Atlg78580)的蛋白质序列进行 BLASTp 搜索 Phytozome 数据库,获得其在木薯中的同源序列(cassava4.1_001223m),之后设计引物进行 PCR 扩增(图 1)。测序后获得 1 个全长为 2 781 bp 的序列,编码 926 个氨基酸(图 2),根据该序列与拟南芥 *TPS* 基因的同源性,将其命名为 *MeTPSI*。经序列比对,发现 *MeTPSI* 与参考序列之间共存在 3 个碱基差异,其中 1 个为非同义突变(图 2)。将 *MeTPSI* 与基因组序列比对得知,该基因含有 17 个外显子和 16 个内含子。ProtParam 理化性质预测 *MeTPSI* 蛋白质的分子式为 $C_{4639}H_{7296}N_{1314}O_{1382}S_{32}$,分子量为 104 614.86 u,理论等电点(pI)为 6.34,不稳定系数为 49.05,属于不稳定蛋白。亚细胞定位预测结果显示,该蛋白质定位于叶绿体。蛋白质保守结构域分析表明,*MeTPSI* 编码的蛋白含有 TPS 家族保守结构域(Glyco_transf_20,图 3),进一步表明克隆得到的基因为木薯 *MeTPSI* 基因。

2.2 *MeTPSI* 基因进化树分析

采用 BLASTp 同源比对的方法,笔者获取了其他物种中与 *MeTPSI* 同源性较高的蛋白质序列。系统进化树分析表明,这些基因大体上可以被分为 3 组:第 I 组以 C4 物种为代表,包括谷子、狗尾草、玉米、高粱、黍羊、柳枝稷和二穗短柄草;第 II 组以杨柳目的物种为代表,包括木薯、杨树和杞柳,因

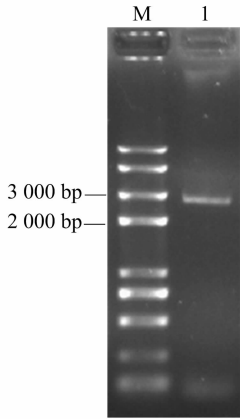


图1 *MeTPS1* 基因全长 cDNA 电泳结果

此 *MeTPS1* 与其在杨树 (Potri. 011G103900. 2)、杞柳

(SapurV1A. 0026s0140. 6) 中同源基因的亲缘关系较近, 序列相似性分别为 88. 1%、89. 4%; 第Ⅲ组以十字花科的物种为代表, 包括白菜型油菜、拟南芥、荠菜花、琴叶拟南芥和鼠耳芥 (图 4)。

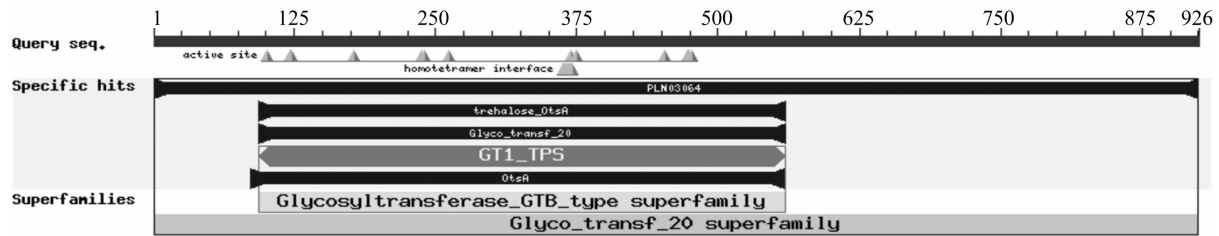
2.3 *MeTPS1* 基因启动子元件分析

启动子是控制基因转录起始时间和表达程度的重要组成部分。本研究选取 *MeTPS1* 起始密码子上游 1 500 bp 的序列进行启动子元件分析, 发现了一些与胁迫相关的元件, 如干旱诱导元件 MBS、热胁迫响应元件 HSE、以及防御和胁迫响应元件 TC - rich repeats (表 1)。除此之外, 笔者还发现一些与激素相关的元件, 如赤霉素响应元件 GARE - motif、水杨酸响应元件 TCA - element、生长素响应元件 TGA - element, 以及与光响应相关的元件, 如 ACE、Box 4 和 Box I 等 (表 1)。这些结果表明, *MeTPS1* 可能参与木薯干旱、高温/低温、激素和光

```
1 M P G N Q Y N S N S T P Y P S R T Q R L L R E R E L K K S S R S S H S
1 ATGCCTGGAAACCAGTACAACAGTAACCTAACCCCTTACCCAAGTCGTACACAACGGCTCTTGAGAGAAGAGAGCTGAAGAAAAGCAGCAGGTCTTCCCATTC
36 N E A T D N H R G I E P C E H D L R L R E G D D S N N C Y I E Q Y L E
106 AATGAGGCTACTGATAATCATAGGGGATTGAACCATGTGAACATGATTTCGCGTTGAGAGAAGGTGACGACTCAACAATTGCATATATTGACGAATACCTTGAA
(GAC)
71 G A I A A T K T L A E G C E Y Q D A R P L R Q R L L V V A N R L P V S
211 GGGGCTATTGCAGTACGAAGACACTTGCTGAGGGATGTGAATATCAGGATGCCAGGCCTTTAAGGCAACGGCTGCTGGTGGTGGCTAACAGGTTCGCTGCTCT
CTG
106 A V R R G E D S W S L E I S A G G G L V T A L L G V K E F E A R W I G W
316 GCAGTTAGAAGGGGTGAAGATTCATGGTCATTGGAGATAAGTGCTGGTGGCTAGTTACTGCCCTTTTAGGTGTGAAGGAATTTGAGGCAAGATGGATTGGTTGG
GGA
141 A G V N V P D E I G Q K A L T R A L A E K R C I P V F L D E E I V H Q
421 GCTGGTGAATGTGCCTGATGAGATTGGTCAGAAGGCACTTACTAGAGCTTTGGCGGAAAAGAGATGCATACCAGTATTCCTTGATGAAGAGATTGTTTCATCAA
176 Y Y N G Y C N N I L W P L F H Y L G L P Q E D R L A T T R S F Q S Q F
526 TATTATAATTGGCTACTGCAACAATATATTATGGCCTCTTTTCATTATCTTGGACTCCACAAGAAGATCGCCTTGCACACAAGAAGTTTTCAGTCACAATTT
211 A A Y K K A N Q M F A D V V N K H Y E E G D V T V W C H D Y H L M F L P
631 GCTGCATATAAGAAGGCTAATCAAATGTTTGCTGATGTGGTGAATAAACATGAAGAGGGTGAATGTTGTGTGGTGCCTGATTATCATCTAATGTTCTCTTCCA
246 K C L K E Y N S N M K V G W F L H T P F P S S E I H R T L P S R S E L
736 AAATGCTTAAAGAATAACAACAGTAATATGAAAGTTGGTTGGTTTCTCCACACCCCTTTCCTTCTCTGAAATCCACAGGACTCTCCATCTCGATCAGAGCTA
281 L R S V L A A D L V G F H T Y D Y A R H F V S A C T C T C T G G A A T C C A G G A C T C T C C A T C T C G A T C A G A C T A
841 CTGCGTTCAGTTCTTGCTGCTGATTAGTTGGATTTCATACCTATGACTATGCAAGGCATTTTGTAGTGCTTGTACTCGTATCTTGGACTGGAGGGCACCT
316 E G V E D Q G R L T R V A A F P I G I D S D R F I R A L E V P Q V Q D
946 GAAGGATTGAGGACCGGGAGGCTGACTCGAGTTGCTGCTTTCCCTATTGGGATAGACTCTGATCGTTTCATAAGAGCACTGGAGGTCCCTCAAGTCCAGGAT
351 H I K E L K E R F S G R K V M L G V D R L D M I K G I P Q K I L A F E
1 051 CATATCAAGAATTGAAGAAAGATTTTCTGGCCGAAAGGTAATGTTAGGTGTGTGATCGCCTTGATATGAAGGAATTCACAGAAGATATGCAATTTGAA
386 K F L E E N S H W R D K V V L L Q I A V P T R T D V P E Y Q K L T S Q
1 156 AAGTTTCTGAAGAAAACCTCTCATTGGCGTGATAAAGTTGTCTGTACAGATTGCAGTGCCAAACCGTACTGATGTACCTGAGTATCAAAAACCTCAAGCCAA
421 V H E I V G R I N G R F G T L T A V P I H H L D R S L D F H A L C A L
1 261 GTTCATGAAATTTGTGGCGCATTAATGGTAGATTGGAACCTTGACTGCTGTTTCCAATACATCAITTTGGATCGCTCTCGGACTTCCATGCCTTATGTGGCTTG
456 Y A V T D V A L V T S L R D G M N L V S Y E F V A C Q D S K K G V L I
1 366 TATGCTGTACTGATGTGCACTTGTAACCTTCTTGAGGGATGGAATGAATTTGTAGTTATGAATTTGTAGCATGCCAAGATCAAGAAAGGTGTACTCAIT
491 L S E F A G A A Q S L G A G A I L V N P W N I T E V A D S I R A G A L T
1 471 CTTAGTGAGTTTGTGAGGACGACAACTCTCTGGGTGCTGGTGCAATCCTTGTAATCCTTGAATATCACTGAAGTTGTGATCAATACGCCAAGCTTTGACT
526 M S C E E R E K R H R H N F A H V K T H T A Q E W A E T F V S E L N D
1 576 ATGTGATGTGAGGAGAGAGAGACGACATCGGCATAATTTTGCACATGTGAAACCCACACTGCAAGAATGGGCTGAAACATTTTGAGTGAAGTAAATGAT
561 T V I E A Q L R T R Q V P P I L P E E D A I E R Y L Q S N N R L L I L
1 681 ACTGTTATTGAGGCTCAGTAAGGACTAGGCAAGTTCCACCTTATCTTCCAGAAGAAGATGCAATGAACGCTATTGTCAGTCTAATAACCGGTGTGCTCATACTG
596 G F N A T L T E P V D T P G R R G D Q I K E M E L K L H P E L K E T L
1 786 GGATTCAATGCAACGTTGACTGAACAGTAGACACTCTGGCGAAGAGGTGATCAAAATTAAGAAATGGAACCTAAGTTGCATCCTGAGCTGAAAGAAACATTG
631 V A L C S D P K T T I V V L S G S E R N V L D E N F G E F D M W L A A
1 891 GTAGCACTATGTAGTGATCCAAAGCAACCATTTGTTGTTTAAAGTGGGAGTGAGAGAATGTCTTAGATGAGAATTTTGGGAGTTTGACATGTGCTGCGAGAC
666 E H G M F L R L T K A E W M T T M P D H L N M E W V D S V K H V F E Y
1 996 GAACATGGAATGTTTTACGCTTTACCAAGGCAAGTGGATGACACAACATGCCAGATCACTGAACATGGAATGGGTGACAGTGTGAAGCATGTCTTTGAGTAC
701 F T E R T P R S H F E L R E T S L V W N Y K Y A R T K Q T D G L K S P G E K R P P P K
2 101 TTCACAGAACGGACACCAGATCACACTTGAACCTCGTGAACATCACTTGATGGAATTACAAGTATGCAGATGTTGAATTTGGAAGACTTCAAGCTAGGGAT
736 M L Q H L W T G P I S N A S V D V I Q G S R S V E V R P V G V T K G A
2 206 ATGTTGCACTCTCTGGACAGGCCAAATTTCTAATGCATCTGTTGATGTCATCCAGGGTAGCAGATCAGTTGAGGTTAGACCAGTTGGTGTACAAAGGGTGCT
771 A I D R I A L G E I V H S K S M T T P I D F V L C V G H F L G K D E D V
2 311 GCTATTGTCAATAGGAGAGATCGTTCACAGTAAATCCATGACAAACCAATGATTGTTGCTGTGTGGGCAATTTTCTGGGAAAGGATGAAGATGTG
806 Y T F E F L R S D G V G I A R T K Q T D G L K S P G E K R P P P K
2 416 TACACCTTCTTTGAGCGGTGCTACCTTCTGATGGCGTAGGTATTGCAAGAACCAAGCAAACTGACGGCTTGAAGTCGCCAGGGGAAAAGCGTCTCTCCGAAG
841 L P A K S G S K S S Q G K S R P S P N L D K K M T N N S C A S G R R Q
2 521 CTTCCAGCTAAAGTGGGTCCAAATGCTCTCAAGTAAAGTACGACCTTACCAAACTCTTGACAAGAAATACCAACAATAGCTGTGCGAGTGGCGAGGAC
876 S P E K I S W N V L D L K G D N Y F S C A V G R T R T N A R Y L Q S
2 626 TCACCAGAGAAGATTTCATGGAATGTTCTTGATCTCAAGGAGATAATTACTCTTGTGTGCTGCGACGAATCGAACAATGCTCGCTATCTACTCAATCT
911 S D V V S F L K A L A N A S P *
2 731 TCAGATGATGTGCTCTCTTCTGAAGAACTAGCCAATGCATCTCCTTGA
```

MeTPS1 与参考序列之间存在 3 个碱基差异已被标出, 其中非同义突变用括号标志; “*” 表示终止密码子

图2 *MeTPS1* 基因全长 cDNA 序列



横轴数据表示氨基酸位置；Query seq 表示查询序列；Superfamilies 表示超家族；active site 表示活性位点；homotetramer interface 表示同源四聚体接口

图3 *MeTPS1* 蛋白质结构域分析

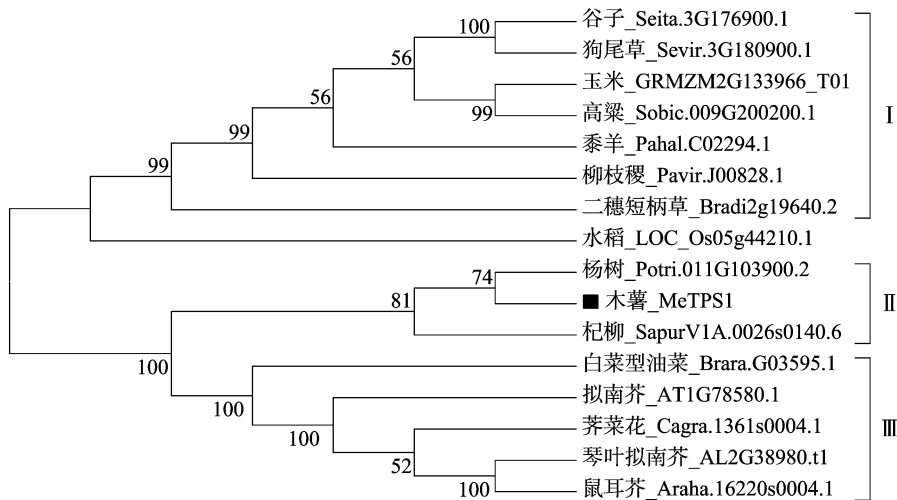
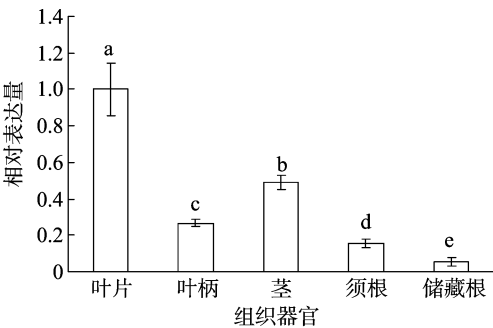


图4 木薯*MeTPS1* 基因与其他物种*TPS* 基因的系统进化树

表 1 *MeTPS1* 基因启动子元件分析

序号	元件名称	数量 (个)	功能预测
1	MBS	2	干旱诱导
2	HSE	1	热胁迫响应
3	TC - rich repeats	2	防御和胁迫响应
4	GARE - motif	3	赤霉素响应
5	TCA - element	3	水杨酸响应
6	TGA - element	1	生长素响应
7	ACE	1	光响应
8	Box 4	1	光响应
9	Box I	1	光响应



数据用“均值±标准差”表示，标有不同小写字母的进行Duncan's多重比较，差异显著 ($P < 0.05$)

图5 *MeTPS1* 基因在木薯不同组织中的表达分析

照(如遮阴)相关的基因调控。

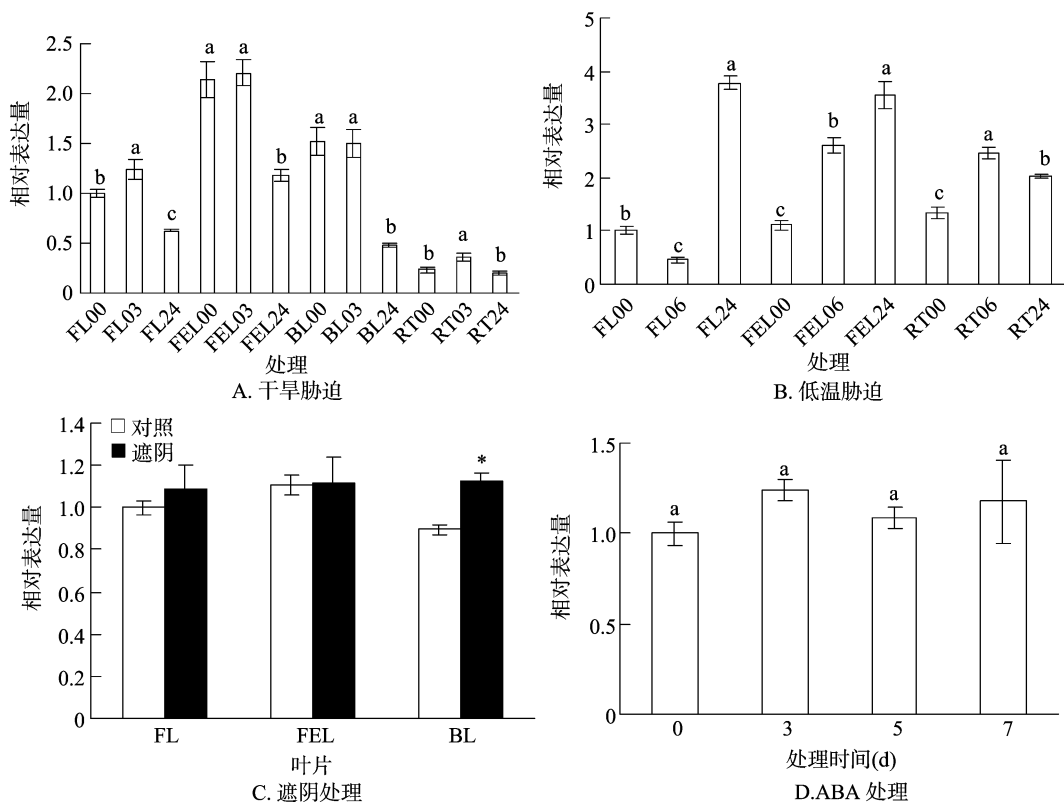
2.4 *MeTPS1* 基因在木薯不同组织中的表达分析

前人研究表明,*TPS* 基因在植物不同组织器官中的表达量差异很大。本研究考察了 *MeTPS1* 基因在木薯 Ku50 不同组织中的表达情况。结果表明, *MeTPS1* 在叶片中的表达量最高,其次是茎、叶柄、须根和储藏根中的表达量,分别是叶片中的 49%、27%、16%、5% (图 5)。这些结果表明, *MeTPS1* 基因主要在木薯的叶片中起作用,而在根(特别是储藏根)中的作用可能比较有限。

2.5 *MeTPS1* 基因在不同胁迫条件下的表达分析

本研究分别考察了 *MeTPS1* 基因在干旱、低温、遮阴和 ABA 处理条件下不同组织中的表达情况。在 PEG 6000 胁迫条件(模拟干旱)下, *MeTPS1* 的表达量在未展开叶中呈现先上升后下降的变化趋势,在胁迫处理 3、24 h 后与处理 0 d 相

比分别上升了 30%、下降了 40%;在第 1 张完全展开叶和老叶中, *MeTPS1* 的表达量在 3 h 内均没有显著变化,而在 24 h 分别下降了 50% 和 70%;在根中 *MeTPS1* 的表达量在 3 h 上升了 60%,之后在 24 h 又恢复到初始水平(图 6 - A)。在低温胁迫条件下, *MeTPS1* 的表达量在不同组织中也呈现不同的表达模式:在未展开叶中 *MeTPS1* 的表达量先下降后上升;在第 1 张完全展开叶中, *MeTPS1* 的表达量持续上升,在低温处理 6、24 h 后分别上升了 1.3、2.2 倍;在根中, *MeTPS1* 的表达量呈现先上升后下降的变化趋势(图 6 - B)。在遮阴条件下, *MeTPS1* 的表达量在未展开叶、第 1 张完全展开叶中没有显著变化,但在老叶中其表达量被显著诱导了,增加了约 30%(图 6 - C)。然而,在 ABA 处理 3、5、7 d 后, *MeTPS1* 的表达量均没有显著变化(图 6 - D)。



FL—未展开叶; FEL—第 1 张完全展开叶; BL—老叶; RT—根。00、03、06、24 分别代表胁迫处理 0、3、6、24 h。数据用“均值±标准差”表示,不同小写字母表示同一类材料在不同处理时间经 Duncan's 多重比较差异显著($P<0.05$)。图 C 中“*”表示与对照相比差异显著($P<0.05$)

图6 *MeTPS1* 基因在不同胁迫条件下的表达分析

这些结果充分表明, *MeTPS1* 基因的表达受到干旱、低温和遮阴处理显著诱导,在木薯各组织中呈现截然不同的表达模式,但是 *MeTPS1* 基因表达量与 ABA 胁迫处理没有表现出必然联系。

3 讨论与结论

TPS 是海藻糖生物合成途径中的一个关键酶,是植物进行遗传改良以抵御干旱、低温等逆境胁迫的一个重要候选基因。植物中 TPS 基因以基因家族的形式存在,绝大部分 TPS 蛋白都含有 TPS 基因家族保守结构域^[14]。目前,人们已经先后从拟南芥^[23]、水稻^[7]、小麦^[10]、棉花^[12]、茶树^[8]、香蕉^[24-25]、辣椒^[9]等多个物种中克隆了 TPS 基因,并对其功能进行了深入研究,但在木薯中尚没有 TPS 基因克隆的相关报道。本研究采用同源基因克隆的方法,从木薯叶片中克隆了 1 个 TPS 基因,命名为 *MeTPS1*。序列分析表明, *MeTPS1* 编码 926 个氨基酸,含有 TPS 家族保守结构域。进化树分析表明, *MeTPS1* 与杨树和杞柳 TPS 基因的亲缘关系较近,序列相似性分别达到 88.1% 和 89.4%。

许多研究表明, TPS 基因在植物不同组织器官中的表达量差异很大^[8-9,26]。例如,辣椒 *CaTPS* 在叶片中的表达量大约是根和茎中的 5~6 倍^[9];香蕉 *MaTPS* 在叶片、球茎和花中的表达量较大,而在根和果实中的表达量极少^[25];茶树 *CsTPS* 基因在花中的表达量最高,在根中的次之,其次是在茎、芽、叶和种子中的,且表达丰度仅为花的 13%~41%^[8]。本研究发现, *MeTPS1* 在叶片中的表达量最高,其丰度是茎、

叶柄、须根和储藏根的 2~20 倍,呈现出明显的组织表达特异性。这些研究结果表明, TPS 基因可能在植物不同组织中扮演着不同的功能。

TPS 基因的表达量受到干旱、低温、遮阴等非生物胁迫的诱导^[11,14]。在干旱胁迫条件下,棉花 *GhTPS* 和海带 *SjTPS* 的表达量显著增强^[11-12];在低温胁迫条件下,茶树 *CsTPS* 和辣椒 *CaTPS* 的表达量被显著诱导^[8-9]。启动子是基因表达调控的重要元件,通过对 *MeTPS1* 启动子序列分析,发现了干旱相关元件 MBS、热胁迫相关元件 HSE,以及许多与光响应相关的元件(如 ACE、Box I、Box 4 等),从而提示 *MeTPS1* 可能参与木薯干旱、低温和光照(如遮阴)相关的基因调控。脱落酸(abscisic acid,简称 ABA)是调节植物生长发育非常重要的一种激素,是植物响应干旱、低温等非生物胁迫信号的传导者^[27-30]。为此,笔者分别在干旱、低温、遮阴和 ABA 处理条件下,在木薯不同叶片和根中对 *MeTPS1* 基因的表达模式进行详细的研究。试验结果表明, *MeTPS1* 基因表达受干旱、低温和遮阴胁迫显著诱导,但对 ABA 胁迫处理没有明显反应,暗示 *MeTPS1* 参与木薯干旱、低温和遮阴胁迫反应的信号传导路径是不依赖于 ABA 的。这一点与 *MeTPS1* 启动子元件的分析结果是一致的,因为本研究没有发现任何与 ABA 响应相关的元件。这些研究结果为进一步研究 *MeTPS1* 参与木薯非生物胁迫的分子机制奠定了扎实的工作基础,同时也为木薯抗逆遗传改良工作的实施提供了重要的理论依据。

本研究克隆了 1 个木薯海藻糖合成酶基因 *MeTPS1*,该基因编码 926 个氨基酸,含有 TPS 家族保守结构域,它与杨树和

杞柳中同源基因的亲缘关系较近。启动子元件分析表明, *MeTPSI* 含有干旱诱导元件 (MBS)、热胁迫响应元件 (HSE)、防御和胁迫响应元件 (TC-rich repeats) 以及光响应元件 (ACE、Box I、Box 4) 等。表达分析结果显示, *MeTPSI* 在叶片中的表达量最高, 在须根和储藏根中的表达量最低。而且, *MeTPSI* 基因的表达能被干旱、低温和遮阴胁迫处理显著诱导, 但对 ABA 胁迫处理无明显响应。因此可见, *MeTPSI* 可作为一个重要的候选基因应用于木薯抗逆遗传改良中。

参考文献:

- [1] 张雯, 王宇斐, 郭延平. 高等植物 6-磷酸海藻糖信号调控研究进展[J]. 植物生理学报, 2016, 52(4): 394-400.
- [2] 张建波, 王莎莎, 郝大海, 等. 干旱和低温胁迫影响烟草幼苗海藻糖代谢的差异比较[J]. 生物技术通报, 2015, 31(10): 111-118.
- [3] Garg A K, Kim J K, Owens T G, et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(25): 15898-15903.
- [4] 郭蓓, 胡磊, 何欣, 等. 海藻糖-6-磷酸合成酶转基因烟草提高耐盐性的研究[J]. 植物学通报, 2008, 25(1): 41-49.
- [5] 史健志, 徐燕, 纪德华, 等. 坛紫菜 6-磷酸海藻糖合成酶 (TPS) 家族基因的克隆及表达特征分析[J]. 水产学报, 2015, 39(4): 485-495.
- [6] Jang I C, Oh S J, Seo J S, et al. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth[J]. Plant Physiology, 2003, 131(2): 516-524.
- [7] Li H W, Zang B S, Deng X W, et al. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPSI* enhances abiotic stress tolerance in rice[J]. Planta, 2011, 234(5): 1007-1018.
- [8] 丁菲, 庞磊, 李叶云, 等. 茶树海藻糖-6-磷酸合成酶基因 (*CsTPS*) 的克隆及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(11): 1253-1261.
- [9] 魏兵强, 王兰兰, 张茹, 等. 辣椒 TPS 家族成员的鉴定与 CaTPS1 的表达分析[J]. 园艺学报, 2016, 43(8): 1504-1512.
- [10] 黄鹤, 李卓夫, 王晓楠, 等. 低温下冬小麦与中国春的 TPS 基因表达分析[J]. 核农学报, 2016, 30(7): 1255-1262.
- [11] Deng Y Y, Wang X L, Guo H, et al. A trehalose-6-phosphate synthase gene from *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyceae) [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(1): 529-536.
- [12] Kosmas S A, Argyrokastritis A, Loukas M G, et al. Isolation and characterization of drought-related trehalose 6-phosphate-synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Planta, 2006, 223(2): 329-339.
- [13] Mu M, Lu X K, Wang J J, et al. Genome-wide identification and analysis of the stress-resistance function of the TPS (Trehalose-6-Phosphate Synthase) gene family in cotton[J]. BMC Genetics, 2016, 17(1): 54.
- [14] Henry C, Bledsoe S W, Siekman A, et al. The trehalose pathway in maize: conservation and gene regulation in response to the diurnal cycle and extended darkness[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(20): 5959-5973.
- [15] Okogbenin E, Setter T L, Ferguson M, et al. Phenotypic approaches to drought in cassava: a review[J]. Frontiers in Physiology, 2013, 4: 93.
- [16] Brown A L, Cavagnaro T R, Gleadow R, et al. Interactive effects of temperature and drought on cassava growth and toxicity: implications for food security? [J]. Global Change Biology, 2016, 22(10): 3461-3473.
- [17] 卢赛清, 盘欢, 马崇熙, 等. 2008 年广西木薯低温冻害情况及应对措施[J]. 广西热带农业, 2009(1): 21-22.
- [18] Okoli P S O, Wilson G F. Response of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to shade under field conditions[J]. Field Crops Research, 1986, 14(4): 349-359.
- [19] Ding Z H, Zhang Y, Xiao Y, et al. Transcriptome response of cassava leaves under natural shade[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31673.
- [20] 丁泽红, 付莉莉, 铁韦韦, 等. 木薯 *MeNCED3* 基因克隆, 结构变异及其表达分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(10): 148-153.
- [21] Xu J, Duan X, Yang J, et al. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots [J]. Plant Physiology, 2013, 161(3): 1517-1528.
- [22] Fu L L, Ding Z H, Han B Y, et al. Physiological investigation and transcriptome analysis of polyethylene glycol (PEG)-induced dehydration stress in cassava[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(3): 283.
- [23] Delorge I, Figueroa C M, Feil R, et al. Trehalose-6-phosphate synthase 1 is not the only active TPS in *Arabidopsis thaliana* [J]. Biochemical Journal, 2014, 466(2): 283-290.
- [24] 邢文婷, 李科明, 贾彩红, 等. 香蕉海藻糖合成酶基因 (*MaTPS5*) 生物学及表达特性分析[J]. 生物技术通报, 2017, 33(2): 118-124.
- [25] 许桂莹, 徐碧玉, 邢文婷, 等. 香蕉 *MaTPS4* 基因序列及表达特性分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(3): 532-538.
- [26] Yang H L, Liu Y J, Wang C L, et al. Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42438.
- [27] 江敏, 刘才, 宁慧宇, 等. 脱落酸对涝渍条件下棉花幼苗生长及相关生理指标的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(7): 73-75.
- [28] 蔡凤香, 陈豆豆, 杨飞, 等. 镉锌互作条件下 ABA 对水稻幼苗根系生长和生长素分布的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 114-117.
- [29] Shinozaki K, Yamaguchi S, Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(2): 221-227.
- [30] De Zelicourt A, Colcombet J, Hirt H. The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling [J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(8): 677-685.