

钱玉磊, 闫晋强, 刘文睿, 等. 葫芦科作物抗氧化基因的全基因组鉴定及分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(8): 51–61.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.08.007

# 葫芦科作物抗氧化基因的全基因组鉴定及分析

钱玉磊<sup>1,2</sup>, 闫晋强<sup>1</sup>, 刘文睿<sup>1</sup>, 吴智明<sup>2</sup>, 谢大森<sup>1</sup>, 江彪<sup>1</sup>

(1. 广东省农业科学院蔬菜研究所/广东省蔬菜新技术研究重点实验室, 广东广州 510640;

2. 仲恺农业工程学院园艺园林学院, 广东广州 510225)

**摘要:** 抗氧化(oxidation resistance, OXR)基因是含有 TLDC 结构域的一类基因,能有效清除活性氧,在抗氧化过程中发挥着重要作用。基于葫芦科基因组数据库,从 6 个葫芦科作物中共鉴定出 37 个 OXR 成员,其中冬瓜、西瓜、甜瓜、葫芦和黄瓜均有 6 个成员,南瓜有 7 个成员。通过系统发育以及保守结构域分析,将这些 OXR 成员分为 5 个亚族: OXR1、OXR2、OXR3、OXR4 和 OXR5。OXR 基因在染色体上呈不均匀分布,同一亚族 OXR 成员所编码的氨基酸数、分子量、外显子数、内含子数以及保守基序的排列模式都极为相似,表明 OXR 基因具有高度保守性。顺式作用元件分析结果显示, OXR 基因的启动子区域含有多种顺式作用元件以及 MYB 转录因子的结合位点。基因复制分析发现,葫芦科 OXR2 成员通过片段复制或全基因组复制发生了一定扩张,这些复制基因对均受到纯化选择。共线性分析结果显示,在亲缘关系较近的葫芦科作物之间, OXR 基因所在的共线性区块较大。不同组织的表达谱分析结果显示,葫芦科 OXR4 成员有相似的表达模式,在叶片中表达量均较高; OXR2 亚族内复制基因出现了非对称表达的现象。

**关键词:** 葫芦科; OXR 基因; 保守结构域; 顺式作用元件; 生物信息学; 表达谱; 亲缘关系

**中图分类号:** S188; S642.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2023)08-0051-10

植物受到胁迫刺激时,细胞内的电子传递和氧化还原的动态平衡被破坏,导致细胞内的氧由氧化态转变为还原态,从而产生过量的活性氧,造成蛋白质、膜脂、DNA 以及其他细胞组分严重损伤<sup>[1]</sup>。然而,活性氧也有对植物有利的一面,其可作为一种信号分子,协调细胞内许多重要的信号传导,如蛋白质的修饰、基因表达和激素调节、协调适应或传递防御反应等<sup>[2-4]</sup>。植物体内具有复杂的活性氧清除系统,主要包括保护酶系和抗氧化物质,使体内活性氧产生与降解处于动态平衡,不对自身造成损伤<sup>[5]</sup>。

抗氧化(oxidation resistance,简称 OXR)基因所编码的蛋白质含有保守结构域 TLDC [TBC (Tre2/Bub2/Cdc16), LysM (lysine motif), domain catalytic],可以影响氧自由基清除基因的表达,从而

降低细胞中活性氧水平<sup>[6]</sup>。近年来,在拟南芥基因组中已鉴定出 6 个具有 TLDC 保守结构域的 OXR 基因家族成员,其中 AtOXR2 是一种线粒体蛋白,过表达 AtOXR2 可以提高拟南芥的光合作用效率,增强对氧化胁迫的耐受能力<sup>[7]</sup>。在蔬菜作物中,张梦云等基于十字花科基因组数据库,对 7 种十字花科植物基因组中的抗氧化基因进行了鉴定和生物信息学分析<sup>[8]</sup>。

葫芦科是世界上最重要的植物科之一,包含许多常见的蔬菜和瓜果,具有重要的经济价值。随着基因组测序技术的发展,黄瓜(*Cucumis sativus*)<sup>[9]</sup>、甜瓜(*C. melo*)<sup>[10]</sup>、西瓜(*Citrullus lanatus*)<sup>[11]</sup>、葫芦(*Lagenaria siceraria*)<sup>[12]</sup>、南瓜(*Cucurbita moschata*)<sup>[13]</sup>、冬瓜(*Benincasa hispida*)<sup>[14]</sup>等葫芦科作物先后完成了全基因组测序,为系统研究葫芦科作物的抗氧化基因家族奠定基础。本研究通过系统鉴定 6 个葫芦科作物抗氧化基因家族,并开展生物信息学分析和不同组织的表达谱分析,为深入阐明葫芦科作物 OXR 家族的基因功能奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 葫芦科 OXR 成员的鉴定

从葫芦科基因组数据库(<http://>

收稿日期:2022-06-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:31972403,32102406);广东省农业科学院中青年学科带头人项目(编号:R2020PY-JG003);广东省农业科学院优秀博士项目(编号:R2021YJ-YB2004)。

作者简介:钱玉磊(1997—),男,河南郑州人,硕士研究生,研究方向为蔬菜分子生物学。E-mail:qylei2022@163.com。

通信作者:江彪,博士,研究员,研究方向为蔬菜遗传育种与分子生物学。E-mail:jiangbiao@gdaas.cn。

cucurbitgenomics.org/) 下载黄瓜、甜瓜、西瓜、葫芦、南瓜和冬瓜的基因组信息文件, Pfam 网站 (<https://pfam.xfam.org/>) 下载 TLDc 保守结构域的隐马尔可夫模型 (PF07534), 使用 hmmsearch 指令, 搜索阈值  $<0.000\ 01$ , 在葫芦科 6 种作物的蛋白序列文件中进行搜索。以已报道的 6 个 *AtOXR* 基因家族成员的蛋白质序列作为查询序列<sup>[7]</sup>, 与葫芦科作物的所有蛋白质序列进行 BLASTP (检索阈值  $<0.000\ 01$ )。将上述 2 种方法所鉴定到的候选葫芦科 OXR 成员的蛋白序列提交至 NCBI、Pfam 和 SMART 数据库, 查询结构域特征, 最后下载结果文件, 并人为鉴定 TLDc 结构域是否存在, 最终确定葫芦科 OXR 成员。

## 1.2 系统发育分析、保守结构域分析和物理化学性质分析

利用 MEGA11 中的 ClustalW (默认设置) 比对鉴定出的 37 个葫芦科 OXR 成员和 6 个 *AtOXR* 成员的蛋白质序列, 构建 Neighbor - Joining 树, 使用 1 000 个重复进行 bootstrap 分析。根据拟南芥的分类方法将葫芦科 OXR 成员分类<sup>[7]</sup>, 利用 Evolveview v3 将分类结果及每个 OXR 成员的蛋白序列和 TLDc 结构域所在位置可视化<sup>[15]</sup>, 利用在线工具 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 OXR 成员的分子量 (MW) 和等电点 (PI)。

## 1.3 葫芦科 OXR 成员的染色体定位

根据相应的基因组注释文件, 提取 37 个 OXR 成员的基因位置信息, 然后使用 MG2C ([http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.1/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/)) 将其定位到相应的染色体上。

## 1.4 保守基序和基因结构分析

从基因组注释文件中获得 OXR 基因的外显子和内含子位置信息, 将葫芦科 OXR 成员和拟南芥 OXR 成员的蛋白质序列提交 MEME 在线网站 (<https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html>), 最大基序 (motif) 检索数设置为 15, 利用 CFVisual (<https://github.com/ChenHuilong1223/CFVisual>) 将结果可视化。

## 1.5 启动子分析

提取每个 OXR 成员起始密码子前 2 500 bp 序列, 提交 PlantCare 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), 获得顺式作用元件信息, 然后以 R 4.1.3 的 tidyverse 和 ggplot2 函数绘制启动子热图。

## 1.6 复制基因分析及选择压力分析

使用 MCSanX<sup>[16]</sup> 中的 detect\_collinearity\_within

\_gene\_families.pl 分析 6 个葫芦科物种内的 OXR 复制基因对以及非 OXR 复制基因对, 然后提取所有复制基因对在基因组中的位置信息, 并利用 Circos 软件<sup>[17]</sup> 将复制基因对可视化。

利用 Muscle 软件分别比对复制基因对的氨基酸序列, 然后用 ParaAT<sup>[18]</sup> 将氨基酸序列比对引导对应的编码序列比对, 进一步使用 KaKs\_Kaculator 2.0<sup>[19]</sup> 计算复制基因对的  $K_a$  (非同义替换率)/ $K_s$  (同义替换率), 通过  $K_a/K_s$  的值来判断基因在进化过程中受到的选择压力。

## 1.7 共线性分析

利用葫芦科作物的基因组文件及基因组注释文件, 使用 JCVI<sup>[20]</sup> 进行 6 个葫芦科物种间的 OXR 基因共线性分析。

## 1.8 葫芦科 OXR 成员在不同器官组织的表达谱分析

从葫芦科基因组数据库下载冬瓜、南瓜 (PRJNA385310)、甜瓜 (PRJNA383830)、黄瓜 (PRJNA80169) 和葫芦 (PRJNA387615) 的不同组织 (根、茎、叶、花) 的表达谱数据, 分别以 *OXR1* 在根中的 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) 值为基准, 计算 OXR 成员在根、茎、叶、花的相对表达量, 使用 TBtools 中的 HeatMap<sup>[21]</sup> 绘制热图, 将结果可视化。

# 2 结果与分析

## 2.1 葫芦科 OXR 基因家族成员的鉴定

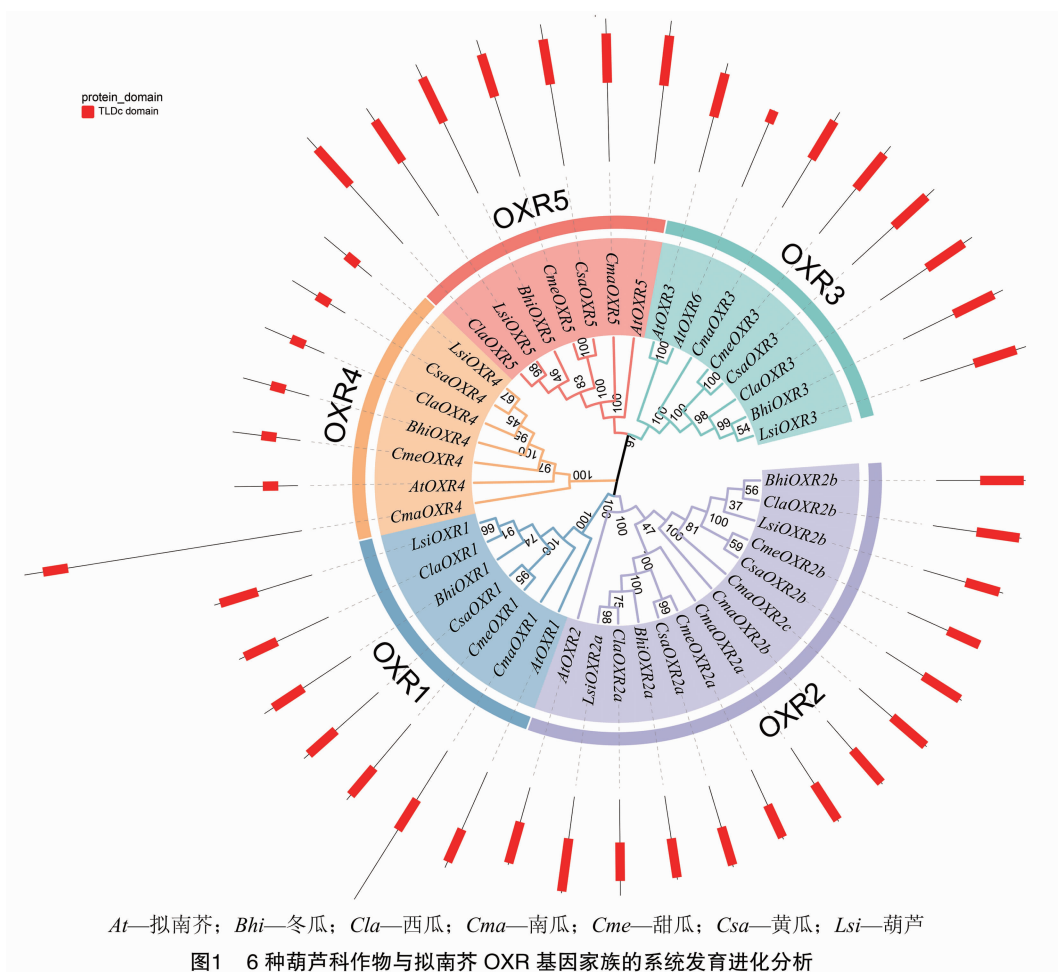
根据 TLDc 的隐马尔可夫模型 (PF07534), 使用 hmmsearch 指令在葫芦科 6 种作物全基因组中共搜索到 37 个候选 OXR 成员基因。同时, 利用同源 BLAST 方法鉴定到 38 个候选 OXR 成员基因。随后, 将 2 种方法鉴定到的候选成员的蛋白质序列提交数据库进行确认, 结果表明, hmmsearch 指令鉴定到的成员都含有 TLDc 保守结构域, 同源 BLAST 检测出的 38 个成员包含 hmmsearch 指令鉴定到的 37 个成员, 另外 1 个候选 OXR 成员不含有 TLDc 保守结构域, 因此将其去除。最终, 在葫芦科 6 种作物中共鉴定出 37 个 OXR 成员, 其中冬瓜、黄瓜、西瓜、甜瓜和葫芦均有 6 个成员, 南瓜有 7 个成员。

## 2.2 系统发育、保守结构域和物理化学性质分析

以葫芦科 37 个 OXR 成员和拟南芥 6 个 OXR 成员的蛋白质序列构建系统发育树, 可将葫芦科 OXR 基因家族分为 5 个 OXR 亚家族, 分别为 OXR1

亚族、OXR2 亚族、OXR3 亚族(*AtOXR6* 归入 OXR3 亚族)、OXR4 亚族、OXR5 亚族。葫芦科 6 个作物在 OXR1 亚族、OXR3 亚族、OXR4 亚族和 OXR5 亚族均仅有 1 个成员。在 OXR2 亚族中,拟南芥仅有 1 个成员,而冬瓜、黄瓜、西瓜、甜瓜和葫芦有 2 个成员,南瓜有 3 个成员。因此,相较于拟南芥,葫芦科 OXR2 成员在进化史中有一定的扩张。

根据葫芦科 OXR 成员所在亚家族,按照“物种拉丁名缩写+亚家族+小写字母”的形式命名。同一亚族 OXR 成员的 TLDc 结构域的长度和位置相似,不同亚族的 OXR 成员的 TLDc 结构域的位置和长度有差别(图 1),如 OXR4 亚族的 TLDc 结构域的长度短于其他 OXR 族,且位于蛋白质的中部,并不靠近 C 端。



理化性质分析结果(表 1)表明,葫芦科作物 OXR 家族成员的氨基酸数量在 232 ~ 1 059 之间,等电点在 4.65 ~ 7.07 之间。分子量最小的是 *LsiOXR4*, 仅有 25.64 ku, 其开放阅读框长度为 699 bp, 编码 232 个氨基酸; 而分子量最大的 *CmaOXR4*, 有 118.62 ku, 其开放阅读框长度达到 3 180 bp, 编码 1 059 个氨基酸。通过对比葫芦科和拟南芥的 OXR 基因家族成员的氨基酸数发现,同一亚家族内,除南瓜 *CmaOXR1* 和 *CmaOXR4* 外,其他葫芦科 OXR 成员和拟南芥 OXR 成员的氨基酸数量相似。

### 2.3 染色体定位

将 37 个葫芦科 OXR 基因家族成员定位到相应的染色体上,结果显示 OXR 基因在染色体上呈不均匀分布。南瓜 OXR 基因分布于 6 条染色体上,葫芦 OXR 基因分布于 5 条染色体上,冬瓜和甜瓜分布于 4 条染色体上,黄瓜和西瓜 OXR 基因位于 3 条染色体上。不同染色体上分布的 OXR 基因数量不同,最多有 4 个(黄瓜 3 号染色体)(图 2)。

### 2.4 基因结构和保守基序分析

为了研究葫芦科作物 OXR 基因家族成员的进化关系,对 37 个葫芦科 OXR 成员和 6 个拟南芥

表 1 6 种葫芦科作物 OXR 基因家族成员的物理化学性质

基因名称	转录 ID	开放阅读框 (bp)	氨基酸数量 (个)	等电点	分子量 (ku)
<i>AtOXR1</i>	AT4G39870	1 185	394	4.65	43.88
<i>AtOXR2</i>	AT2G05590	792	303	5.91	33.29
<i>AtOXR3</i>	AT5G06260	1 275	424	5.25	40.35
<i>AtOXR4</i>	AT1G32520	720	293	6.81	26.29
<i>AtOXR5</i>	AT5G39590	1 629	542	5.27	59.92
<i>AtOXR6</i>	AT4G34070	942	313	5.93	34.88
<i>BhiOXR1</i>	Bhi11G000824	1 173	390	6.28	43.30
<i>BhiOXR2a</i>	Bhi01G000487	960	319	5.32	35.53
<i>BhiOXR2b</i>	Bhi12G001382	1 014	337	5.8	36.92
<i>BhiOXR3</i>	Bhi11G002029	1 260	419	5.18	46.95
<i>BhiOXR4</i>	Bhi11G000120	777	258	8.56	28.63
<i>BhiOXR5</i>	Bhi09G001809	1 620	539	5.22	59.80
<i>ClaOXR1</i>	Cla97C10G192120.1	1 122	373	5.85	41.19
<i>ClaOXR2a</i>	Cla97C05G084670.1	1 089	362	5.37	40.30
<i>ClaOXR2b</i>	Cla97C06G117030.1	1 014	337	6.08	37.02
<i>ClaOXR3</i>	Cla97C10G201580.1	1 260	419	5.32	46.86
<i>ClaOXR4</i>	Cla97C10G186410.1	735	244	6.73	27.02
<i>ClaOXR5</i>	Cla97C05G099850.1	1 620	539	5.48	59.78
<i>CmaOXR1</i>	CmaCh16G007180.1	1 986	661	5.04	73.55
<i>CmaOXR2a</i>	CmaCh14G018420.1	993	330	4.84	36.63
<i>CmaOXR2b</i>	CmaCh08G010600.1	954	317	6.32	34.99
<i>CmaOXR2c</i>	CmaCh17G001410.1	1 011	336	5.81	36.99
<i>CmaOXR3</i>	CmaCh06G005000.1	1 260	419	5.45	46.50
<i>CmaOXR4</i>	CmaCh06G008480.1	3 180	1059	7.69	118.62
<i>CmaOXR5</i>	CmaCh01G019570.1	1 620	539	5.10	59.53
<i>CmeOXR1</i>	MEL03C018977.2.1	1 125	374	5.76	41.27
<i>CmeOXR2a</i>	MEL03C006380.2.1	867	288	5.22	31.47
<i>CmeOXR2b</i>	MEL03C023042.2.1	894	297	7.9	32.45
<i>CmeOXR3</i>	MEL03C009510.2.1	1 278	425	5.49	47.42
<i>CmeOXR4</i>	MEL03C013862.2.1	774	257	8.07	28.36
<i>CmeOXR5</i>	MEL03C003770.2.1	1 620	539	5.4	59.76
<i>CsaOXR1</i>	CsaV3_4G008920.1	1 125	374	5.73	41.11
<i>CsaOXR2a</i>	CsaV3_3G011730.1	957	318	5.14	35.29
<i>CsaOXR2b</i>	CsaV3_2G012440.1	1 014	337	7.07	37.00
<i>CsaOXR3</i>	CsaV3_3G037660.1	1 260	419	5.17	46.59
<i>CsaOXR4</i>	CsaV3_3G001880.1	702	233	7.48	25.79
<i>CsaOXR5</i>	CsaV3_3G045670.1	1 620	539	5.24	59.62
<i>LsiOXR1</i>	Lsi03G009200.1	1 161	386	5.79	42.79
<i>LsiOXR2a</i>	Lsi05G017670.1	1 104	367	6.02	40.70
<i>LsiOXR2b</i>	Lsi09G011960.1	942	313	6.08	34.20
<i>LsiOXR3</i>	Lsi03G018540.1	1 260	419	5.13	46.83
<i>LsiOXR4</i>	Lsi07G012160.1	699	232	5.45	25.64
<i>LsiOXR5</i>	Lsi04G017240.1	1 467	488	5.62	54.30



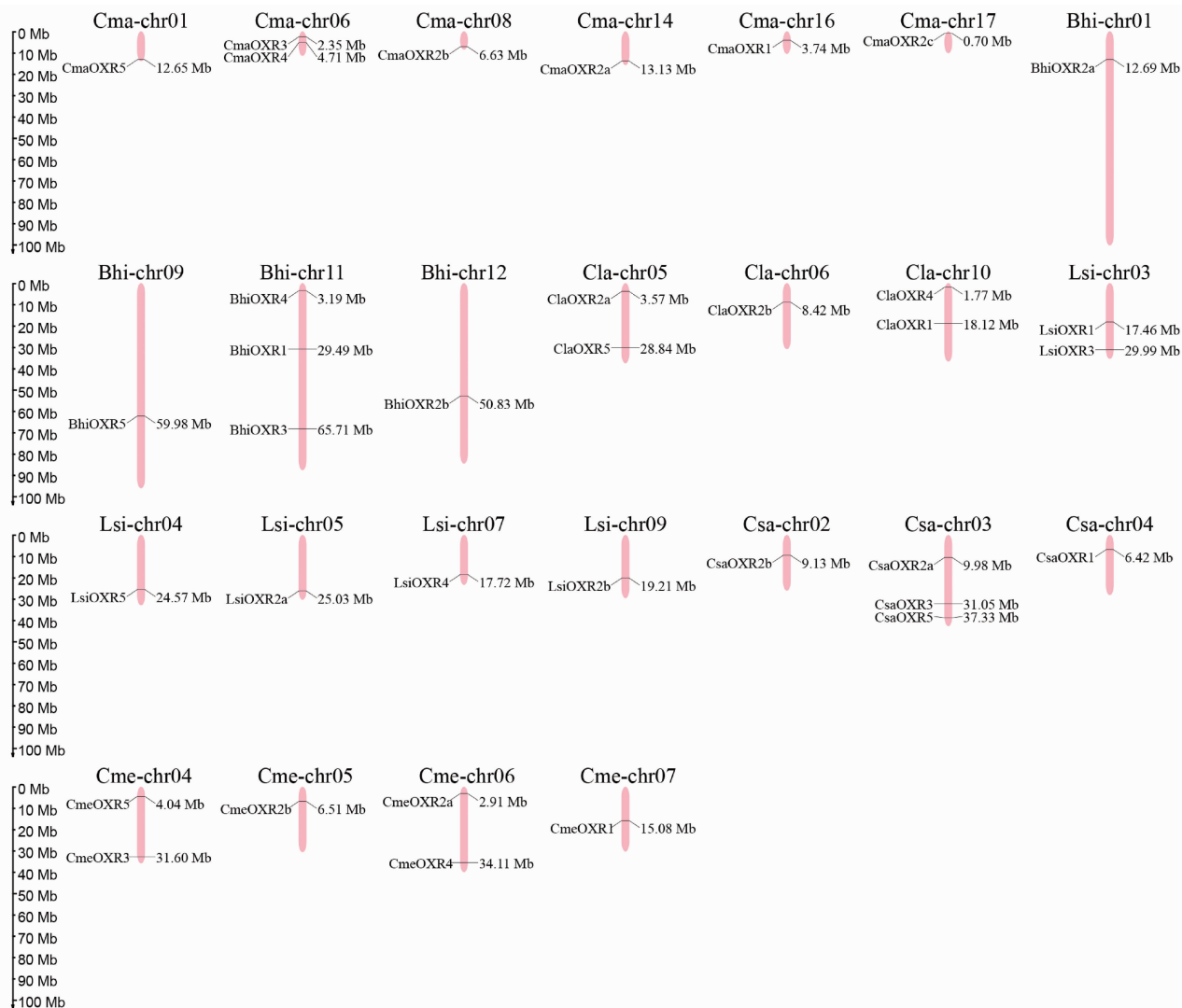


图2 6种葫芦科作物 OXR 基因家族成员染色体分布

OXR 成员的外显子和内含子的数量及排列模式进行了分析。结果表明,位于不同亚家族的所有 OXR 成员的外显子和内含子的数量以及排列模式差异显著,而同一亚族的葫芦科 OXR 成员的内含子-外显子排列模式基本一致(图 3)。

根据 MEME 网站分析,在葫芦科 OXR 成员和拟南芥 OXR 成员中共检测到 15 个保守基序,每个 OXR 成员大致含有 5~9 个不等的保守基序,同一个亚族内的 OXR 成员所含的保守基序的数量和保守基序的分布模式大致相同,推测同亚族的 OXR 可能发挥相似的功能。不同亚族的 OXR 成员的保守基序的分布模式有所不同,可能是造成其功能差异的主要原因。

## 2.5 启动子分析

提取葫芦科 OXR 基因起始密码子前 2 500 bp 序列,提交至 Plantcare 网站,预测其顺式作用元件

(图 4)。共发现 49 种顺式作用元件,主要分为 4 类:调控生长发育、光反应、激素响应和逆境胁迫相关。其中调控生长发育的元件包括对栅栏叶肉细胞分化、胚乳表达、昼夜节律、分生组织表达等调控元件,而在 *BhiOXR2a* 和 *CmeOXR2a* 中还发现有参与类黄酮生物合成的 MYB 结合位点。光反应元件包含 24 个不同的元件,说明葫芦科 OXR 基因家族可能广泛参与了光调控途径。多个葫芦科 OXR 基因中有许多与脱落酸、赤霉素、水杨酸和生长素等植物激素响应相关的顺式作用元件。另外, OXR3 亚族成员都具有参与脱落酸响应的 ABRE 顺式作用元件,数量 1~4 个不等,推测葫芦科 OXR3 可能参与脱落酸的响应。逆境胁迫相关元件主要包含多种非生物胁迫响应元件(干旱、低温、缺氧和创伤响应元件)以及参与干旱诱导的 MYB 结合位点。

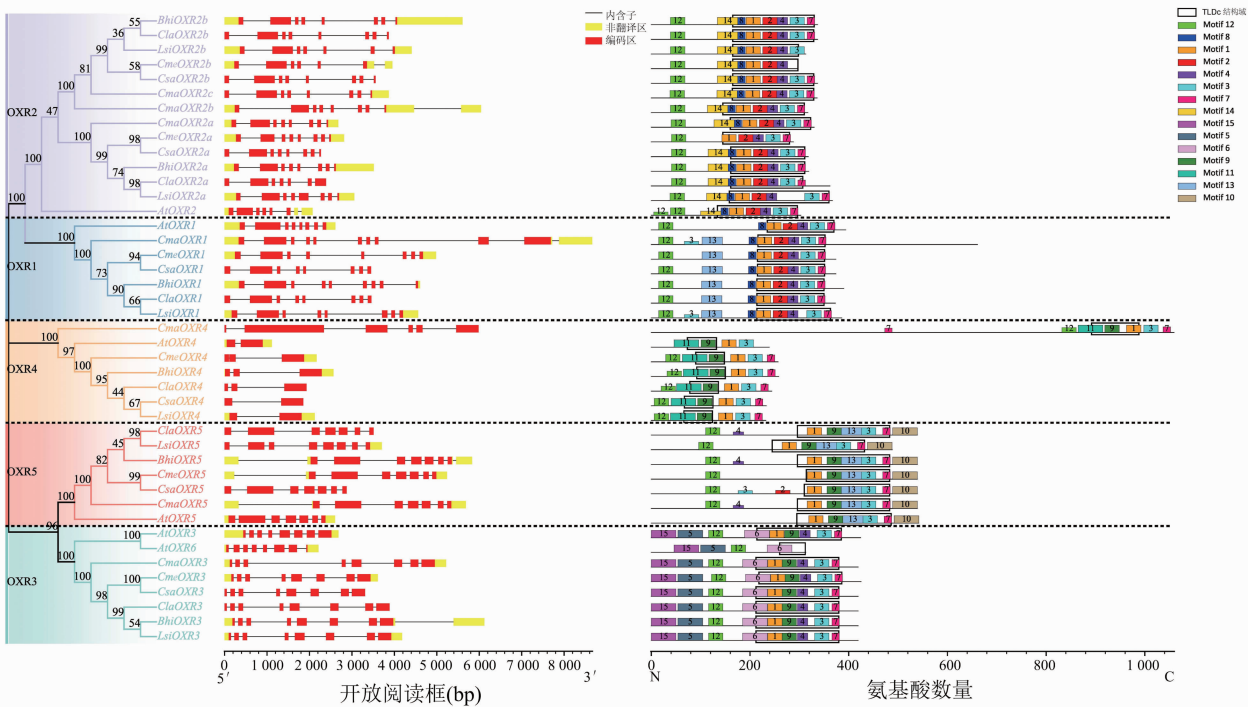


图3 6 种葫芦科作物 OXR 基因家族的蛋白保守基序及基因结构

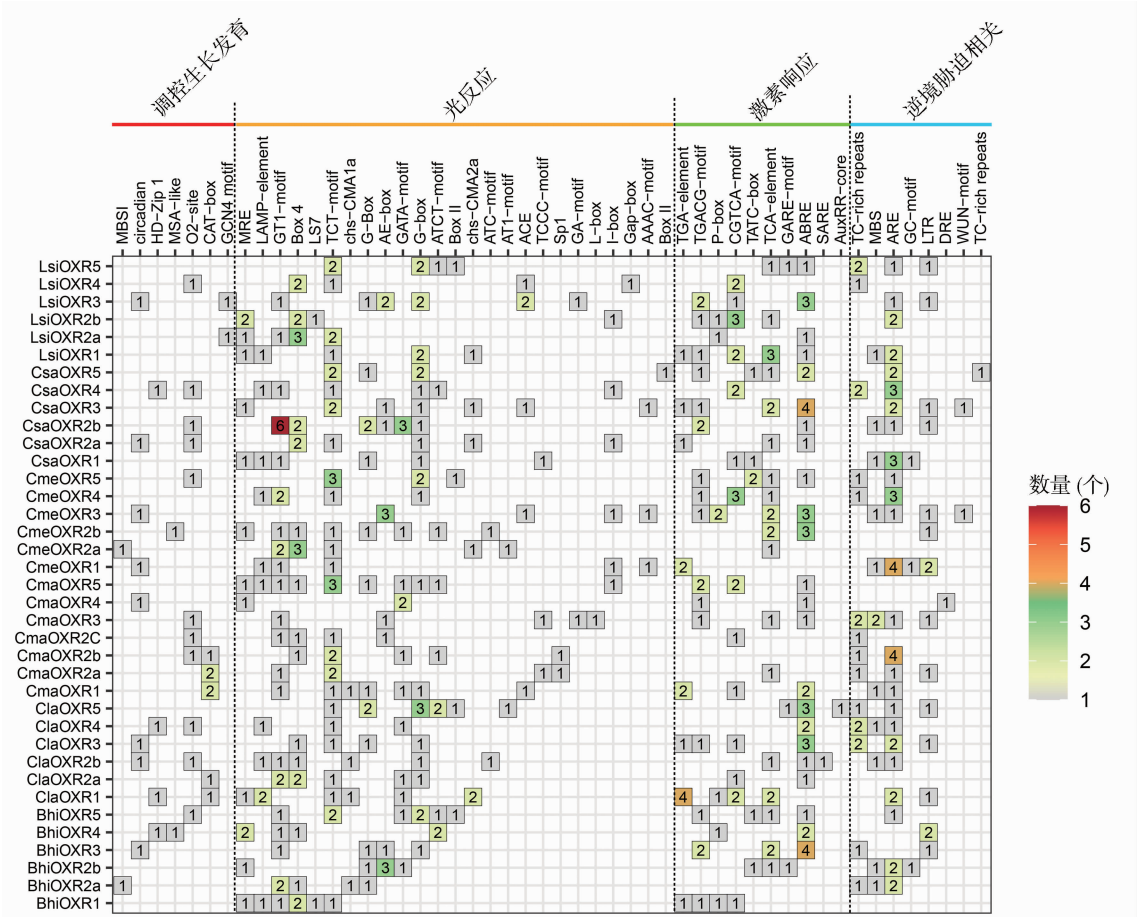
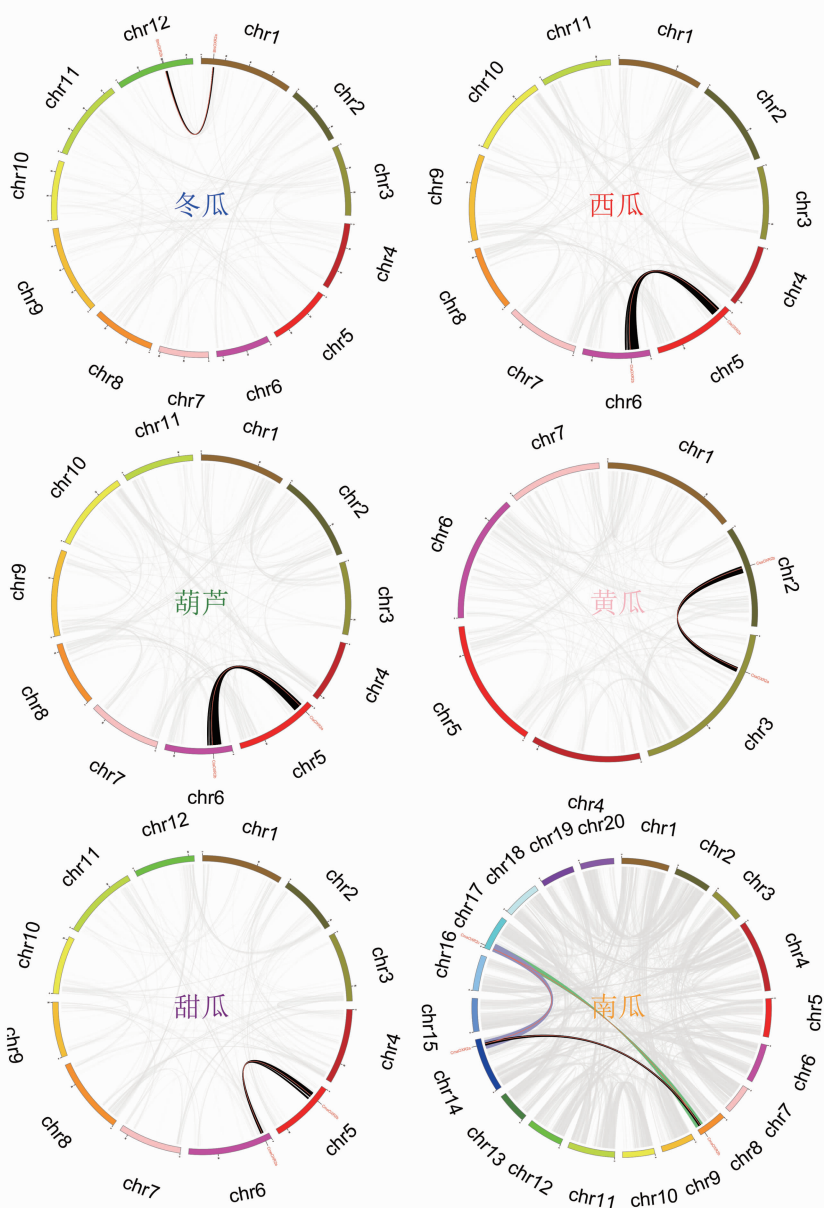


图4 6 种葫芦科作物 37 个 OXR 基因启动子的顺式作用元件分析

2.6 复制分析及基因选择压力分析

6 个葫芦科作物物种内的共线性分析发现,在葫芦科 OXR 基因家族中,只有 OXR2 亚族发生了复

制(图 5)。其中,南瓜 OXR2 复制基因对较多,而冬瓜、黄瓜、甜瓜、西瓜和葫芦由于近期没有发生全基因组复制事件,其复制基因对较少。



红色线条表示 OXR 共线基因对; 黑色、紫色和绿色线条表示 OXR 基因对位于的共线块; 灰色线条表示所有共线基因对  
图5 6 种葫芦科作物 OXR 基因家族的共线性分析

通过葫芦科 OXR2 复制基因对的  $K_a/K_s$  分析,发现  $K_a/K_s$  的值均小于 1,表明这些复制基因对受到纯化选择(表 2)。在同义突变率  $K_s$  分析中, *CmaOXR2b* - *CmaOXR2c* 复制基因对的  $K_s$  值为 0.364 422,南瓜近期发生特异的全基因组复制事件(specific whole-genome duplication,sWGD)的  $K_s$  值为 0.32<sup>[13]</sup>,二者相差不大。此外, *CmaOXR2b* - *CmaOXR2c* 共线对所在的共线区块所含的基因对数

(183 对)远多于 *CmaOXR2a* - *CmaOXR2c* 共线对所在的共线区块所含的基因对数(72 对),证实 *CmaOXR2b* - *CmaOXR2c* 是由南瓜的近期发生 sWGD 而产生的。

2.7 共线性分析

为研究 OXR 基因家族在葫芦科内的进化历史,根据之前报道的物种分化树将葫芦科作物两两开展共线性分析。结果发现,亲缘关系越近, OXR 所

表 2 6 种葫芦科 OXR 基因家族成员的基因复制分析

复制基因对	复制类型	非同义突变率	同义突变率	非同义突变率/ 同义突变率	选择压力
<i>BhiOXR2a</i> – <i>BhiOXR2b</i>	片段复制	0.336 418	1.317 69	0.255 308	纯化选择
<i>ClaOXR2a</i> – <i>ClaOXR2b</i>	片段复制	0.328 893	1.706 31	0.192 751	纯化选择
<i>LsiOXR2a</i> – <i>LsiOXR2b</i>	片段复制	0.359 410	2.137 93	0.168 112	纯化选择
<i>CsaOXR2a</i> – <i>CsaOXR2b</i>	片段复制	0.339 797	1.630 57	0.208 391	纯化选择
<i>CmeOXR2a</i> – <i>CmeOXR2b</i>	片段复制	0.352 921	1.600 09	0.220 563	纯化选择
<i>CmaOXR2a</i> – <i>CmaOXR2b</i>	片段复制	0.363 645	1.512 27	0.240 463	纯化选择
<i>CmaOXR2b</i> – <i>CmaOXR2c</i>	全基因组复制	0.118 333	0.364 42	0.324 714	纯化选择
<i>CmaOXR2c</i> – <i>CmaOXR2a</i>	片段复制	0.378 952	1.461 34	0.259 317	纯化选择

在的共线性区块越大,如黄瓜和甜瓜、西瓜和葫芦。*ClaOXR1* 和 *ClaOXR3* 位于西瓜的 10 号染色体上, *LsiOXR1* 和 *LsiOXR3* 位于葫芦的 3 号染色体上,都在同一个较大的共线块 (OXR1 + OXR3 block) 中。此外,葫芦科不同作物同一亚族成员间存在一定的

共线性。不同作物 *OXR2a* 之间、不同作物 *OXR2b* 之间存在共线性,不同作物 *OXR2a* 和 *OXR2b* 间不存在共线性,说明在葫芦科祖先物种中可能发生了古老的复制事件,产生了 *OXR2a* 和 *OXR2b* (图 6)。

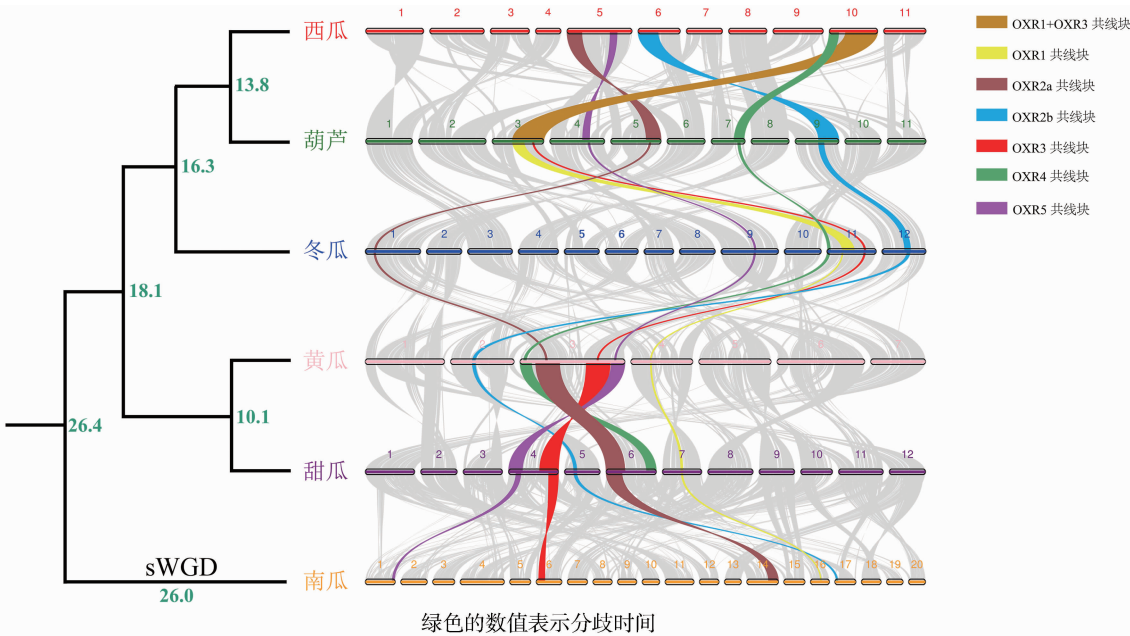


图6 6 种葫芦科作物间 OXR 家族成员的共线性分析

2.8 葫芦科 OXR 基因家族的组织表达谱分析

基于葫芦科基因组数据库中已发表的表达谱数据,分析 OXR 基因在不同组织中的表达模式。结果(图 7)显示,不同亚族基因的表达模式有所差异,如冬瓜 *BhiOXR3* 在根、茎、叶、花中表达量无明显差异,而 *BhiOXR4* 在叶片中表达量明显高于其他组织。此外,不同作物相同亚族基因表达也存在一定的差异,冬瓜、葫芦、甜瓜、黄瓜 OXR4 基因在叶片中表达量明显高于其他组织,而南瓜 OXR4 基因则无明显的叶片高丰度表达。值得注意的是,复制基因

对 (*BhiOXR2a* – *BhiOXR2b*、*LsiOXR2a* – *LsiOXR2b*、*CsaOXR2a* – *CsaOXR2b*、*CmaOXR2b* – *CmaOXR2c*) 在不同组织中的表达存在较大差异,出现表达分化现象。

3 讨论与结论

抗氧化 (OXR) 基因有助于保护真核生物免受活性氧的伤害<sup>[22]</sup>。目前,OXR 基因家族已在拟南芥、小麦、向日葵和某些十字花科植物的基因组中被鉴定出来,并深入研究了部分基因的功能<sup>[7–8,23–25]</sup>。



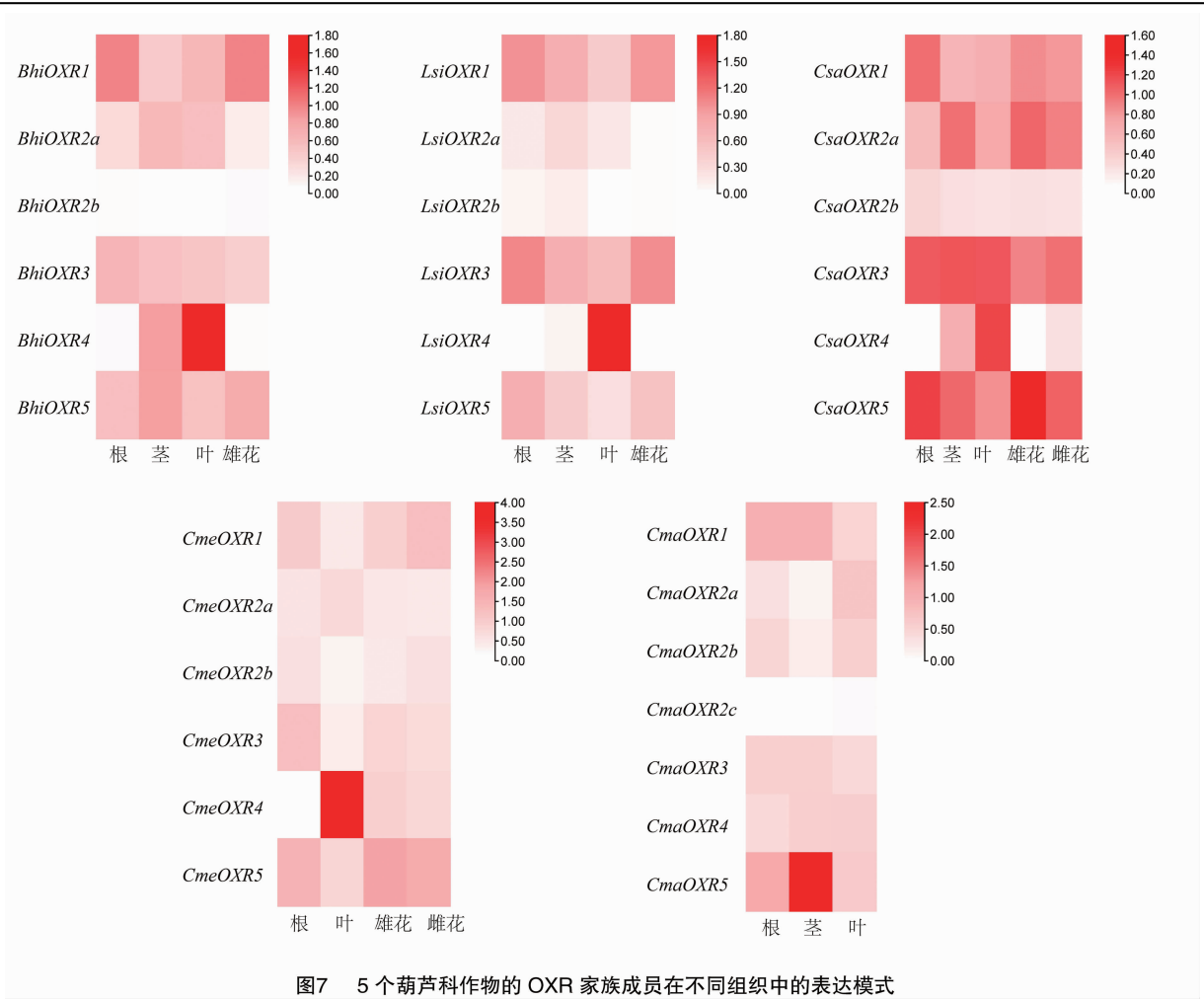


图7 5个葫芦科作物的 OXR 家族成员在不同组织中的表达模式

然而,关于葫芦科 OXR 家族基因的研究还未见报道。本研究基于葫芦科基因组数据库,从 6 个葫芦科作物中共鉴定出 37 个 OXR 基因,其中冬瓜、黄瓜、西瓜、甜瓜和葫芦均有 6 个 OXR 基因,而南瓜有 7 个 OXR 基因。

根据氨基酸序列和保守结构域的相似性,葫芦科 OXR 基因家族可分为 5 个亚家族,这一结果同拟南芥、向日葵和十字花科植物的分类结果相似<sup>[7-8,25]</sup>。同一亚家族的拟南芥 OXR 基因和葫芦科 OXR 基因编码的氨基酸个数、开放阅读框和分子量的大小都相似,其内含子-外显子的数量及保守基序相似,说明同一亚家族内的 OXR 基因可能具有相似的生物学功能。

OXR 基因的启动子含有多种顺式作用元件,表明 OXR 基因可能参与多种植物代谢调控途径。过表达拟南芥 OXR 基因,可通过影响水杨酸代谢而清除多余的活性氧,从而能够提高对氧化胁迫的耐受性<sup>[7,24]</sup>。葫芦科 OXR 基因的启动子区域包含调控

生长发育、光反应、激素响应和非生物胁迫响应相关元件,这一结果与之前报道的十字花科植物 OXR 基因和小麦 OXR 基因的顺式作用元件<sup>[8,23]</sup>相似,说明葫芦科 OXR 基因可能在抵御生物和非生物胁迫时发挥重要作用。

基因复制是植物基因组进化的主要驱动力,为遗传革新、表型多样性以及物种分化提供了大量的原始遗传物质<sup>[26-27]</sup>。葫芦科 OXR2 亚族成员通过片段复制或全基因组复制发生了扩张,并且 OXR2 复制基因对的  $K_a/K_s$  比值均小于 1。 $K_a/K_s < 1$  表示基因受到纯化选择<sup>[28]</sup>,说明葫芦科 OXR2 亚族在进化上相对保守,有助于维持 OXR2 亚族成员功能的稳定性。通过探寻 OXR 基因家族在葫芦科内的进化历史,发现 6 个葫芦科作物的 OXR2a 和 OXR2b 相互之间都具有共线性关系,推测 OXR2 亚族的成员在这 6 个葫芦科作物的祖先物种中通过古老的复制事件,产生了 OXR2a 和 OXR2b 等 2 个同源基因对,伴随着葫芦科物种的分化,OXR2a 和 OXR2b 也

被保留在了 6 个葫芦科物种的基因组中。南瓜基因组中有 3 个 OXR2 基因,其中 *CmaOXR2b* 和 *CmaOXR2c* 是同源基因,这一发现进一步证实南瓜近期发生了 sWGD 事件<sup>[13]</sup>。

为了研究 OXR 基因的表达特征,本研究从葫芦科基因组数据库下载冬瓜、南瓜、甜瓜、黄瓜和葫芦不同组织的表达谱数据。表达谱分析发现不同亚族 OXR 基因的表达量有差异,表明它们在不同组织器官中的抗氧化作用机制不尽相同。葫芦科 OXR4 亚族的基因的表达模式较为相似,暗示 OXR4 亚族的基因可能具有相似的抗氧化功能。乔鑫通过对梨等 141 种植物基因组中的不同类型的复制基因的鉴定和表达分析,发现复制基因广泛存在非对称表达现象(2 个同源基因拷贝的表达水平已经偏离了 1:1 的对称性表达模式)<sup>[27]</sup>,然而葫芦科 OXR2 亚族内复制基因存在显著的表达差异,也出现了非对称表达的现象。这可能是由于基因复制发生后,2 个同源基因拷贝在启动子区域的分化导致它们之间的表达分化<sup>[29]</sup>,但其表达产生分化的机制还需进一步解析。

综上所述,本研究利用多种生物信息学分析网站和软件,系统鉴定了 6 种葫芦科作物的 OXR 基因,并综合分析了葫芦科 OXR 基因的系统发育关系、物理化学性质、染色体定位、基因结构、保守基序、顺式作用元件、在葫芦科作物中的进化历史 and 在不同组织中表达模式等。鉴定和分析结果为进一步研究葫芦科作物 OXR 基因家族在响应非生物胁迫方面的生物学功能奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 李 格,孟小庆,蔡 敬,等. 活性氧在植物非生物胁迫响应中功能的研究进展[J]. 植物生理学报,2018,54(6):951–959.
- [2] Czarnocka W, Karpiński S. Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018,122:4–20.
- [3] Foyer C H, Ruban A V, Graham N. Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage [J]. The Biochemical Journal, 2017,474(6):877–883.
- [4] Mittler R. ROS are good [J]. Trends in Plant Science, 2017,22(1):11–19.
- [5] 赵 滢,王振兴,许培磊,等. 山葡萄双丰和左优红叶绿素荧光特性及活性氧代谢与低温伤害的关系[J]. 园艺学报,2018,45(4):650–658.
- [6] Finelli M J, Oliver P L. TLDc proteins; new players in the oxidative stress response and neurological disease [J]. Mammalian Genome, 2017,28(9):395–406.
- [7] Colombatti F, Mencia R, Garcia L, et al. The mitochondrial oxidation resistance protein AtOXR2 increases plant biomass and tolerance to oxidative stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2019,70(12):3177–3195.
- [8] 张梦云,袁凌云,朱世东,等. 十字花科植物抗氧化基因(OXR)的鉴定与生物信息学分析[J/OL]. 分子植物育种,2021:1–11. (2021–08–26) [2022–12–20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210825.1923.021.html>.
- [9] Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. Nature Genetics, 2009,41(12):1275–1281.
- [10] Garcia – Mas J, Benjak A, Sanseverino W, et al. The genome of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012,109(29):11872–11877.
- [11] Guo S G, Zhang J G, Sun H H, et al. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions [J]. Nature Genetics, 2013,45(1):51–58.
- [12] Wu S, Shamimuzzaman M, Sun H, et al. The bottle gourd genome provides insights into Cucurbitaceae evolution and facilitates mapping of a *Papaya ring – spot* virus resistance locus [J]. The Plant Journal, 2017,92(5):963–975.
- [13] Sun H H, Wu S, Zhang G Y, et al. Karyotype stability and unbiased fractionation in the paleo – allotetraploid Cucurbita genomes [J]. Molecular Plant, 2017,10(10):1293–1306.
- [14] Xie D S, Xu Y C, Wang J P, et al. The wax gourd genomes offer insights into the genetic diversity and ancestral cucurbit karyotype [J]. Nature Communications, 2019,10:5158.
- [15] Subramanian B, Gao S H, Lercher M J, et al. Evolvview v3: a webserver for visualization, annotation, and management of phylogenetic trees [J]. Nucleic Acids Research, 2019,47(1):270–275.
- [16] Wang Y P, Tang H B, de Barry J D, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity [J]. Nucleic Acids Research, 2012,40(7):49.
- [17] Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics [J]. Genome Research, 2009,19(9):1639–1645.
- [18] Zhang Z, Xiao J F, Wu J Y, et al. ParaAT: a parallel tool for constructing multiple protein – coding DNA alignments [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012,419(4):779–781.
- [19] Wang D, Zhang Y, Zhang Z et al. KaKs\_Calculator 2.0: a toolkit incorporating gamma – series methods and sliding window strategies [J]. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2010,8(1):77–80.
- [20] Tang H, Bowers J E, Wang X, et al. Synteny and collinearity in plant genomes [J]. Science, 2008,320(5875):486–488.
- [21] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant, 2020,13(8):1194–1202.
- [22] Blaise M, Alsarraf H M A B, Wong Jaslyn E M M, et al. Crystal structure of the TLDc domain of oxidation resistance protein 2 from zebrafish [J]. Proteins, 2012,80(6):1694–1698.

刘万达,杨光,焦奎宝,等. 基于 SLAF-seq 技术的苹果 SNP 位点开发及遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(8):61-66.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.08.008

# 基于 SLAF-seq 技术的苹果 SNP 位点开发及遗传多样性分析

刘万达<sup>1,2</sup>, 杨光<sup>3</sup>, 焦奎宝<sup>3</sup>, 王昆<sup>1</sup>, 王天鹤<sup>2</sup>, 王禹<sup>2</sup>, 吴立仁<sup>3</sup>

(1. 中国农业科学院果树研究所/农业农村部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁兴城 125100;

2. 黑龙江省农业科学院园艺分院, 黑龙江哈尔滨 150040; 3. 黑龙江省农业科学院乡村振兴科技研究所, 黑龙江哈尔滨 150028)

**摘要:** 为了解黑龙江苹果种质资源的遗传关系, 利用特异性位点扩增片段测序技术 (SLAF-seq) 对在黑龙江地区收集的 31 份苹果种质资源进行 SNP 位点开发和遗传多样性分析。最终获得了 107.52 Mb 读长数据, 不同材料的 SNP 标记数目在 309 012 ~ 540 030 间, 样品测序质量值平均 Q30 为 93.78%, 平均 GC 含量为 40.90%。共开发获得 1 072 115 个 SLAF 标签, 其中, 多态性 SLAF 标签有 275 389 个。通过序列分析, 共得群体 SNP 位点 121 352 个, 基于开发 SNP 分子标记, 结果表明, 31 份苹果种质资源分为 3 个亚群, 特异性的苹果 SNP 位点开发和研究可为苹果种质资源鉴定和遗传多样性分析提供理论基础。

**关键词:** 苹果; SLAF-seq 技术; SNP; 遗传多样性分析

**中图分类号:** S661.102 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2023)08-0061-06

苹果 (*Malus pumila* MILL.) 是我国主要栽培果树树种之一, 分布广、品种多, 具有很高的经济价值, 与柑橘、葡萄、香蕉并称为世界四大水果<sup>[1]</sup>。黑龙江省中小型苹果由于干物质含量高, 口味纯正, 品质佳, 深受广大消费者喜爱与认可。这些苹果种质资源中较大部分是由栽培大苹果品种与野生资源或地方品种杂交获得。两者基因的整合, 获得的苹果资源既具有果实商品性又能够适应黑龙江省

的环境。但经过几代杂交, 近年黑龙江省培育的苹果新品种存在果实品质提高幅度不大、抗寒能力下降明显、适宜栽植区域小等问题, 育种工作进展缓慢。地方品种是非常重要的种质资源, 因此, 研究分析其种质资源群体结构及遗传多样性对资源利用、种质鉴定及现代遗传育种具有十分重要的意义。

特异性位点扩增片段测序 (SLAF-seq) 是一种基于高通量测序技术发展而来的简化基因组测序技术, 具有成本低、通量高、深度高、准确性高等突出优势, 已被广泛用于作物遗传图谱构建、遗传多样性分析、进化关系分析和基因定位<sup>[2-4]</sup>。当前, 基于 SLAF-seq 技术在紫苏、甘薯和金花茶<sup>[5-7]</sup> 等作物上已开发大量的 SNP 标记及遗传进化分析, 但在黑龙江省苹果种质上进行遗传多样性分析及大量 SNP 分子标记开发等尚未见报道。本研究利用

收稿日期: 2022-03-24

基金项目: 农业农村部园艺作物种质资源利用重点实验室开放基金 (编号: NYZS201906); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目 (编号: LH2022C097)。

作者简介: 刘万达 (1982—), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士, 副研究员, 主要从事寒地苹果育种及栽培技术研究。E-mail: haasldw@163.com。

[23] 李寒, 夏鹏亮, 唐艳红, 等. 小麦 OXR 基因家族全基因组生物信息学及表达分析[J/OL]. 分子植物育种, 2022; 1-10. (2022-04-11) [2022-05-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220411.0854.004.html>.

[24] Mencia R, Cécili G, Fabro G, et al. OXR2 increases plant defense against a hemibiotrophic pathogen via the salicylic acid pathway [J]. Plant Physiology, 2020, 184(2): 1112-1127.

[25] Torti P, Raineri J, Mencia R, et al. The sunflower TLDe-containing protein HaOXR2 confers tolerance to oxidative stress and waterlogging when expressed in maize plants [J]. Plant Science,

2020, 300: 110626.

[26] Flagel L E, Wendel J F. Gene duplication and evolutionary novelty in plants [J]. The New Phytologist, 2009, 183(3): 557-564.

[27] 乔鑫. 梨等植物基因组中重复基因的鉴定与进化分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2018: 72-76.

[28] 周至铭, 杨佳宝, 张程, 等. 向日葵 LACS 家族鉴定及响应非生物胁迫表达分析 [J]. 园艺学报, 2022, 49(2): 352-364.

[29] Hahn M W. Distinguishing among evolutionary models for the maintenance of gene duplicates [J]. Journal of Heredity, 2009, 100(5): 605-617.