



巨桉扩展蛋白*EgrEXPA8*和*EgrEXPA10*基因的克隆和表达特性分析

罗萍, 王晓萍, 张昊楠, 范春节, 王玉娇, 徐建民

引用本文:

罗萍, 王晓萍, 张昊楠, 范春节, 王玉娇, 徐建民. 巨桉扩展蛋白*EgrEXPA8*和*EgrEXPA10*基因的克隆和表达特性分析[J]. *热带亚热带植物学报*, 2023, 31(6): 827–834.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4672>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

巨桉BR11基因的克隆和表达分析

Gene Cloning and Expression Analysis of BR11 in *Eucalyptus grandis*

热带亚热带植物学报. 2019, 27(6): 684–692 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4044>

毛竹APX家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255–264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

巨桉SuSy基因家族的生物信息学分析

Bioinformatics Analysis of SuSy Gene Family in *Eucalyptus grandis*

热带亚热带植物学报. 2018, 26(6): 580–588 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3929>

铁皮石斛*DoSMT2*基因的克隆与表达分析

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591–598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

铁皮石斛WOX转录因子的鉴定和分析

Identification and Analysis of WOX Transcription Factor in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(3): 301–310 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4294>

向下翻页, 浏览PDF全文

巨桉扩展蛋白 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因的克隆和表达特性分析

罗萍¹, 王晓萍¹, 张昊楠^{1,2}, 范春节¹, 王玉娇¹, 徐建民^{1*}

(1. 中国林业科学研究院热带林业研究所, 国家林业和草原局热带林木培育重点实验室, 广州 510520; 2. 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 为探讨扩展蛋白在桉树生长发育中的作用, 以在桉树初生生长到次生长转换转录组测序中筛选出的差异表达基因 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 为基础, 从巨桉(*Eucalyptus grandis*)中克隆了 2 个扩展蛋白基因 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10*, 分别编码 249 和 244 个氨基酸, 属于亲水蛋白, 但 *EgrEXPA8* 稳定性高于 *EgrEXPA10*。qRT-PCR 分析表明, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因均在幼叶和茎尖组织中表达量较高, 在木质部和韧皮部表达量较低; 且在茎顶端初生生长阶段表达量较高, 而在下部次生长节间表达量较低, 可能其主要参与巨桉的初生生长或者负调控次生长; 另外在盐胁迫、茉莉酸甲酯处理下其均被抑制表达; 而在水杨酸、缺硼、缺磷处理下均上调表达。这说明 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 在巨桉响应逆境胁迫时起到重要作用, 且呈现出相似的调控方式。

关键词: 巨桉; 扩展蛋白; 基因克隆; 基因表达; 非生物胁迫

doi: 10.11926/jtsb.4672

Cloning and Expression Analysis of *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* Genes in *Eucalyptus grandis*

LUO Ping¹, WANG Xiaoping¹, ZHANG Haonan^{1,2}, FAN Chunjie¹, WANG Yujiao¹, XU Jianmin^{1*}

(1. Key Laboratory of State Forestry and Grassland Administration on Tropical Forestry, Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, China; 2. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: To elucidate the function in growth and development of expansins in *Eucalyptus*, two expansin genes *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* were cloned based on differential expression genes in the transcriptome of transition from primary growth to secondary growth of *E. grandis*. *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* encoded 249 and 244 amino acids, respectively. *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* were hydrophilic proteins. However, the stability of *EgrEXPA8* was higher than that of *EgrEXPA10*. qRT-PCR analysis showed that the expression of *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* were high in young leaves and stem apex, and low in xylem and phloem. The expression of them was high in stem apex at primary growth stage, and low in internode at secondary growth stage, indicating that the two genes might be mainly involved in primary growth or negative regulation of secondary growth in *E. grandis*. The expressions of *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* were inhibited under salt stress and methyl jasmonate treatment, but significantly up-regulated treated with salicylic acid, under boron and phosphorus deficiency. Therefore, it was suggested that *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* genes in *E. grandis* would play an important role in response to stress.

Key words: *Eucalyptus grandis*; Expansin; Gene clone; Gene expression; Abiotic stress

收稿日期: 2022-05-19 接受日期: 2022-08-25

基金项目: 十四五国家重点研发计划课题(2022YFD2200203)资助

This work was supported by the 14th five-year National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2022YFD2200203).

作者简介: 罗萍(1997年生), 女, 硕士研究生, 研究方向为林木遗传育种。E-mail: 183407647@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jianmxu@163.com

扩展蛋白(expansin, EXP)是植物中重要的蛋白之一,最早在黄瓜(*Cucumis sativus*)的根尖细胞壁中被发现^[1],是一类能够使植物细胞壁松弛的活性蛋白,在植物生长发育和逆境抗性过程中发挥着重要的作用^[2]。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和毛果杨(*Populus trichocarpa*)中各有 36 个 EXP 成员^[3-4],葡萄(*Vitis vinifera*)中有 29 个^[5],水稻(*Oryza sativa*)中有 58 个^[3]。根据结构的差异,扩展蛋白可分为 4 个亚家族,分别为扩展蛋白 A、B 亚家族(EXPA、EXPB)和类扩展蛋白 A、B 亚家族(EXLA、EXLB)^[6]。其中 EXPA 主要参与植物的根毛发生与伸长^[7]、种子萌发^[8-9]、果实软化^[10-11]、木质部的形成^[12]、纤维发育^[13]、茎和节间的伸长^[14]、叶片发育^[15]等重要发育过程,同时也参与响应植物非生物胁迫的过程,如耐盐性^[16]、抗旱性^[17]、抗重金属^[18]等;EXPB 则主要参与花粉管伸长^[19-22]等。

桉树(*Eucalyptus*)是世界三大速生树种之一,具有生长速度快、轮伐周期短、适应性强以及木材质量较好等优点,广泛应用于制浆造纸、木材加工、医疗和香料等产业,因此具有十分重要的经济价值以及生态价值^[23]。其大量优良基因的功能尚待挖掘,巨桉(*E. grandis*)基因组测序的完成为开展相关研究提供了基础^[24],目前在巨桉中共发现 35 个 EXP 家族成员^[25],其中 EXPA 亚家族成员 24 个,但其在桉树生长发育或者响应胁迫中的具体功能尚未见报道。

前期对桉树不同节间进行转录组测序,在初生生长到次生生长的转换过程中 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 存在差异表达,尤其是在次生长阶段表达量显著下降,说明其可能参与到桉树的次生长或者木质部发育的负调控。本研究以巨桉无性系 GL1 为材料,克隆了 2 个扩展蛋白基因 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10*,对其基因结构及编码的蛋白结构和理化性质等进行了分析,采用 qRT-PCR 技术分析它们的组织表达模式及对不同胁迫的响应,并初步对 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因功能进行分析,为其功能挖掘和分子调控机制研究提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

使用巨桉(*Eucalyptus grandis*)无性系 GL1 组培苗为材料,选取生长健壮的生根苗移植到中国林业科学研究院热带林业研究所温室培养,6 个月后苗木

生长至约 1.5 m,分别取根、茎尖、木质部、韧皮部、幼叶、成熟叶,同时选取从顶端起第 1、3、5、7、9、11 节间作为初生生长到次生长转换的材料。

生根的组培苗移植至温室后,经改良霍格兰营养液水培生长至约 20 cm 高,选取生长健壮、根系良好的水培苗,分别用 0.1 mmol/L 茉莉酸甲酯(MeJA)、0.1 mmol/L 水杨酸(SA)进行喷施、200 mmol/L NaCl 溶液灌根,并在处理后 0、1、6、24 和 168 h 收集叶片。将水培苗转移至去除磷(磷酸二氢钾)或硼元素(硼酸)的改良霍格兰营养液中培养,分别在 6、24、48、96 和 21 d 后收集叶片。每处理 5 株苗,每处理 3 个重复,取样统一采集顶端向下第 4~6 片叶片。所有样品采集后迅速置于液氮中速冻,随后立即转入超低温冰箱-80 °C 保存,用于 RNA 提取。

1.2 菌株与质粒

克隆载体 pEASY-T1 Simple Cloning Vector 购于全式金生物技术(北京)有限公司,DH5 α 大肠杆菌感受态细胞购自擎科生物科技(北京)有限公司,植物 RNA 提取试剂盒购于艾德莱生物科技(北京)有限公司,DNA 回收试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司,反转录试剂购于美国英杰生命技术有限公司(Invitrogen),荧光定量 PCR 试剂 TB Green[®] Premix Ex TaqTM 购于大连宝日医生物技术有限公司(TaKaRa)。

1.3 RNA 的提取与 cDNA 的合成

按照 Aidlab EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒的说明书进行 RNA 提取,然后经过 DNase I 消化基因组 DNA,得到纯化的总 RNA。采用琼脂糖凝胶电泳以及 NanoDrop one (购于美国赛默飞世尔科技公司)检测 RNA 质量和浓度,分别取 1 μ g 检测合格的总 RNA,采用 SuperscriptIII 反转录试剂盒进行 cDNA 合成。

1.4 基因克隆与测序

从 Phytozome 13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)数据库中分别下载 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因序列。利用 Primer 5.0 软件设计巨桉 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因的特异性克隆引物(表 1),由擎科生物科技(北京)有限公司合成。以稀释 10 倍的 cDNA 为模板,采用 Q5 High-Fidelity PCR Kit (NEB) 进行 PCR 反应,采用 20 μ L 反应体系,反应程序为:98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 10 s, 68 °C/70 °C (*EgrEXPA8*/*EgrEXPA10*)退火 20 s, 72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 2 min。利用 1.5%的琼脂糖

凝胶电泳检测 PCR 产物, 并使用天根(北京)胶回收试剂盒回收位置正确且条带明亮的产物, 随后连接到 pEASY[®]-T1CloningKit 载体上并转入 DH5 α 感受

态细胞, 在抗性平板上挑取平滑的菌落摇菌进行菌液 PCR 验证, 选取正确的样本菌液送睿博兴生物技术(北京)有限公司进行测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
<i>EgrEXPA8</i> -F	CAAAGCCAAGCCACATCAGA	<i>EgrEF2</i> -R	TGATGAGCCTCTCTGGTTTGACCT
<i>EgrEXPA8</i> -R	AAGTCACACCTCGAAGACCTC	q <i>EgrEXPA8</i> -F	ATCTGGCACAATGGGAGGTG
<i>EgrEXPA10</i> -F	AGCGTTCGGACAGCCACCA	q <i>EgrEXPA8</i> -R	GTTGCACCGCATCTCGTAAC
<i>EgrEXPA10</i> -R	GGCGTGGAAATGAATCGAAGAC	q <i>EgrEXPA10</i> -F	CCCTCCTCAACTCCATTTCG
<i>EgrEF2</i> -F	TCCAATCCGAGTCGCTGTCATTGT	q <i>EgrEXPA10</i> -R	CGAAATGGAGTTGAGGAGGG

1.5 生物信息学分析

利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线分析氨基酸序列的理化性质, 包括理论等电点、氨基酸长度以及蛋白分子量等; 利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 在线工具分析蛋白质的疏水性和亲水性; 利用 SOPMA (https://npsapra.bi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线工具进行蛋白质二级结构和三级结构分析; 利用 NCBI 的 Conserved domains database (CDD) 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对蛋白进行结构域预测; 在拟南芥信息数据库 (<https://www.Arabidopsis.org/index.jsp>) 中检索并下载了所有 EXPA 蛋白的氨基酸序列, 利用 Clustal 程序对桉树扩展蛋白 *EgrEXPA8*、*EgrEXPA10* 与拟南芥扩展蛋白 EXPA 亚家族所有成员进行多序列比对分析, 使用 MEGA 6.0 软件, 采用邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建系统进化树; 同时利用 NCBI BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线查找在拟南芥、杨树、水稻、葡萄、大豆 (*Glycine max*) 和黄瓜中的同源序列, 并通过 PFAM 和 SMART 对不同植物的同源序列进行验证, 下载各成员的蛋白序列, 并利用 DNAMAN 软件进行蛋白质同源序列分析, 利用 MEGA 6.0 内置的 Clustal W 程序进行多重序列比对, 并采用邻接法构建系统进化树。

1.6 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 的差异表达分析

将巨桉 RNA 样品进行反转录, 以稀释 10 倍的 cDNA 样品为模板, 根据克隆的 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 测序结果, 利用 Primer Premier 5.0 软件分别设计特异性定量引物, 由北京擎科生物科技有限

公司合成(表 1), 以 *EgrEF2* 为内参基因。使用 Roche 公司的 Light Cycler 96 荧光定量分析仪以及大连宝日医生物技术有限公司(TaKaRa)的 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒。实时定量 PCR 的反应体系为 20 μ L, 包括 1 μ L cDNA、10 μ L SYBR Green I Master、10 μ mol/L 的正反向引物各 0.8 和 7.4 μ L, 用 ddH₂O 补足。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 34 s, 共 40 个循环。溶解曲线分析程序采用 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。每个样品 3 次生物学重复以及 3 次技术重复, 根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[26]计算目的基因的相对表达量。

1.7 数据统计分析

采用 SPSS22 分析软件对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Duncan 多重比较($P=0.05$), 然后利用 GraphPad Prism 8 进行制图。

2 结果和分析

2.1 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因克隆

提取巨桉叶片的 RNA, 反转录为 cDNA, 以此为模板, 根据扩展蛋白基因 Eucgr.J00120.1 和 Eucgr.I01954.1 序列设计引物(表 1), 进行 PCR 扩增, 克隆目的基因。扩增产物经电泳检测, 2 个扩展蛋白片段长度均约为 750 bp (图 1)。回收目的片段, 连接到 T 载体上并进行测序, 其长度分别为 750 和 735 bp, 编码 249 和 244 个氨基酸, 命名为 *EgrEXPA8* (Eucgr.J00120.1) 和 *EgrEXPA10* (Eucgr.I01954.1)。

2.2 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 蛋白的理化性质分析

采用 ProtParam 对 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 蛋白理化性质进行分析。*EgrEXPA8* 蛋白的理论分子量为 26.52 kD, 等电点(pI)为 7.53, 脂溶性指数为 61.20。

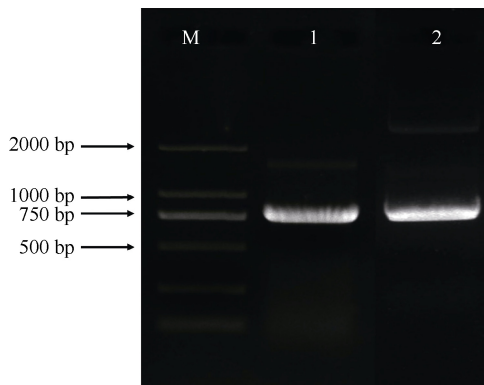


图 1 巨桉 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因的 PCR 扩增电泳图。M: DL 2000 DNA Marker; 1: *EgrEXPA10*; 2: *EgrEXPA8*。

Fig. 1 PCR amplification of *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* gene in *Eucalyptus grandis*. M: DL 2000 DNA Marker; 1: *EgrEXPA10*; 2: *EgrEXPA8*.

EgrEXPA10 蛋白的理论分子量与 *EgrEXPA8* 近似, 为 26.29 kD, 等电点为 9.1, 脂溶性指数为 69.10。此外, *EgrEXPA8* 蛋白不稳定性指数为 31.20, 而 *EgrEXPA10* 达 40.32, 表明其稳定性低于 *EgrEXPA8*。这也表明这 2 个蛋白可能具有不同的功能。

ProtScale 预测巨桉 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 蛋白为亲水性蛋白。SOPMA 和 SWISS-MODEL 工具同源建模法预测表明, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 蛋白的二级和三级结构主要以延伸链和无规卷曲为主(图 2)。结构域预测表明 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 蛋白均含有 2 个保守结构域 DPBB_1 和 Pollen_allerg_1。

2.3 同源分析和系统进化分析

根据 Sampedro 等^[27]的分类方法, 27 个 EXPA

蛋白可分为 10 个类群, *EgrEXPA10* 属于第 I 类群, 与拟南芥的 *AtEXPA5* 亲缘关系最近, *EgrEXPA8* 属于第 III 类群, 与拟南芥的 *AtEXPA8* 亲缘关系最近(图 3: A)。同源序列分析表明, *EgrEXPA8* 与其他植物扩展蛋白的同源性为 73.83%~82.81%, 其中与葡萄 *VvEXPA8* 的同源性最高。从构建的进化树可见, 巨桉 *EgrEXPA8* 与葡萄、大豆、杨树、拟南芥聚在同一支上(图 3: B), 亲缘关系较近。*EgrEXPA10* 与其他植物扩展蛋白的同源性为 67.43%~82.38%, 与葡萄 *VvEXPA10* 的同源性最高, 巨桉 *EgrEXPA10* 与黄瓜 *CsEXPA5* 的亲缘关系最近, 且与葡萄、大豆、杨树、拟南芥聚在同一支上(图 3: C)。

2.4 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 的表达模式

利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 在不同组织和不同节间的表达模式。结果表明, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 在根、茎尖、木质部、韧皮部、幼叶、成熟叶中呈现相似的表达特征, 均在幼叶和茎尖表达量最高, 而在木质部和韧皮部中相对较低(图 4: A)。*EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 均在茎的 9 和 11 节间的表达量显著降低, 说明 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 可能参与桉树初生生长阶段细胞壁的维持, 也可能参与桉树负调控次生长。同时, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 在茎节间的表达略微不同, 随着节间的次生发育越来越成熟, *EgrEXPA8* 均被抑制表达, *EgrEXPA10* 在中间节间上调表达, 而在未木质化或者木质化程度较高的两端节间被抑制表达, 其中在茎的节间 7 表达量最高(图 4: B)。

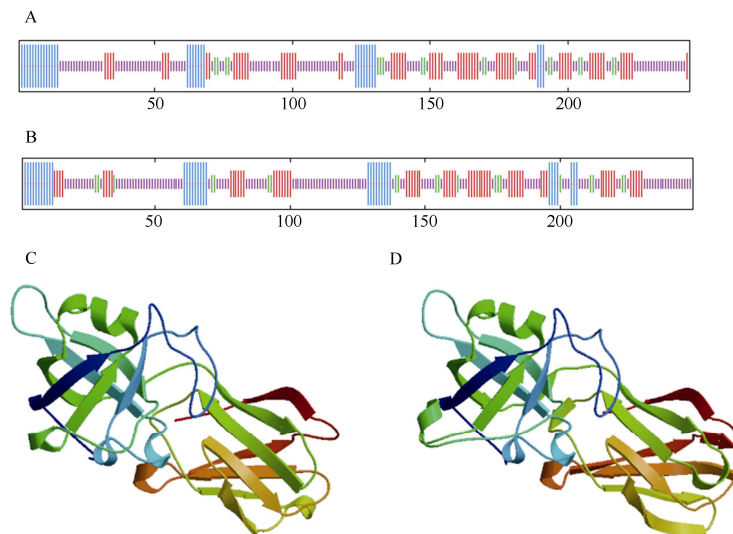


图 2 巨桉 *EgrEXPA8* (A, C) 和 *EgrEXPA10* (B, D) 的二级(A, B)和三级(C, D)结构模型

Fig. 2 Secondary (A, B) and tertiary (C, D) structures model of *EgrEXPA8* (A, C) and *EgrEXPA10* (B, D) of *Eucalyptus grandis*

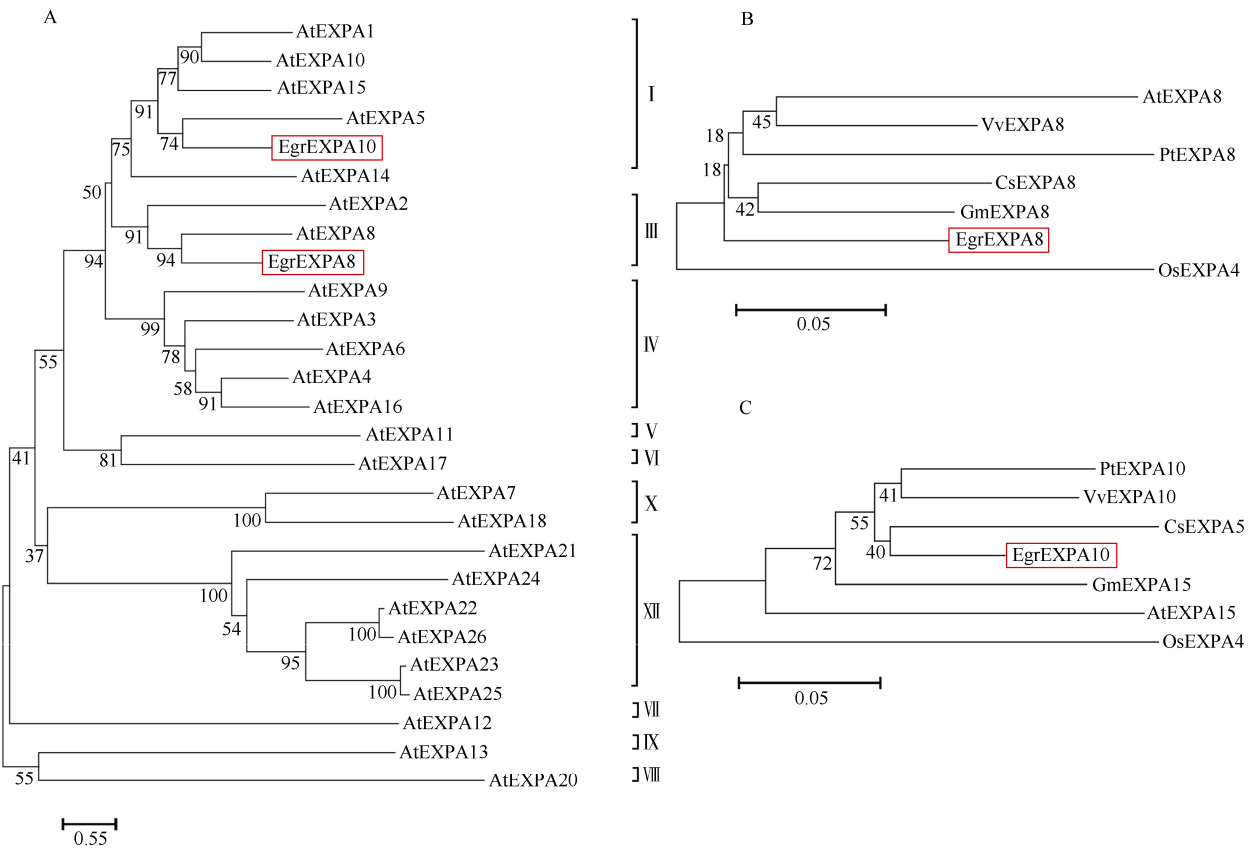


图 3 系统进化树。A: *EgrEXPA8*、*EgrEXPA10* 和拟南芥 α -expansins; B: *EgrEXPA8* 与其他植物 α -expansins; C: *EgrEXPA10* 与其他植物 α -expansins; Egr: 巨桉; Pt: 毛果杨; Gm: 大豆; Vv: 葡萄; At: 拟南芥; Os: 水稻; Cs: 黄瓜。

Fig. 3 Phylogenetic tree. A: *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* with α -expansins in *Arabidopsis thaliana*; B: *EgrEXPA8* and α -expansins in other plants; C: *EgrEXPA10* and α -expansins in other plants. Egr: *Eucalyptus grandis*; Pt: *Populus trichocarpa*; Vv: *Vitis vinifera*; At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*; Cs: *Cucumis sativus*.

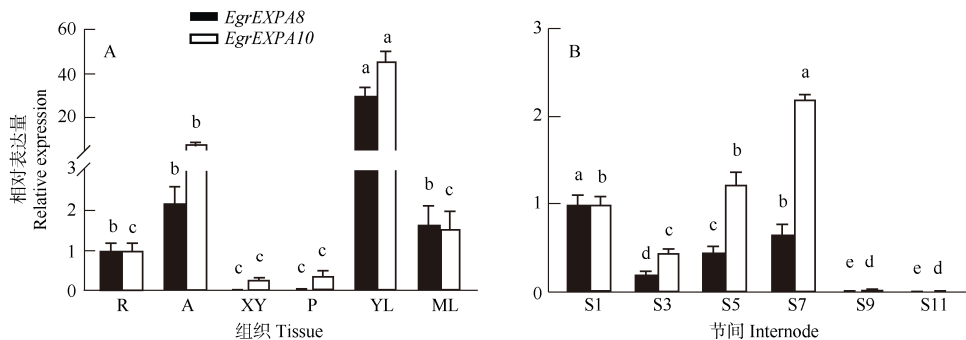


图 4 巨桉 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 的表达模式。R: 根; A: 茎尖; XY: 木质部; P: 韧皮部; YL: 幼叶; ML: 成熟叶。

Fig. 4 Expression patterns of *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* in *Eucalyptus grandis*. R: Root; A: Apical; XY: Xylem; P: Phloem; YL: Young leaf; ML: Mature leaf.

EgrEXPA8 能快速响应盐胁迫, 盐处理 1 h 的表达量急剧下降, 随处理时间的延长, 表达量继续下降。*EgrEXPA10* 的表达量在盐处理后也呈下降的趋势, 与 *EgrEXPA8* 不同的是, 其在处理 6 h 才出现显著降低, 处理 168 h 的表达量呈上升趋势(图 5: A)。*EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 的表达对茉莉酸甲酯表现出

相似的响应方式, 均被抑制表达(图 5: B)。在水杨酸处理下, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 的表达呈现出不同的趋势, *EgrEXPA8* 的表达量迅速显著提高, 且长期喷施处理仍保持着较高水平, *EgrEXPA10* 只在处理 168 h 时比对照显著提高(图 5: C)。长期缺硼条件下, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 的表达量均显著提高, 均在处

理 504 h 后达最高, *EgrEXPA8* 在处理 48 h 内均被抑制表达, 而 *EgrEXPA10* 在处理 24 h 后逐渐上调表达(图 6: A)。缺磷条件下, *EgrEXPA8* 的表达量呈下降-升高-下降的趋势, 在处理 48 h 后达到峰值, 约为对照的 1.6 倍; *EgrEXPA10* 的表达量在处理 24 h 后显著提高, 且在处理 48 h 后达到峰值, 约为对照

的 8~9 倍, 随后其表达量有所下调, 但仍比对照提高(图 6: B)。

这表明巨桉在不同的胁迫和激素处理下, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 的调控途径及调控机制存在差异性, 同时也说明 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 在巨桉响应逆境胁迫中具有重要的调控作用。

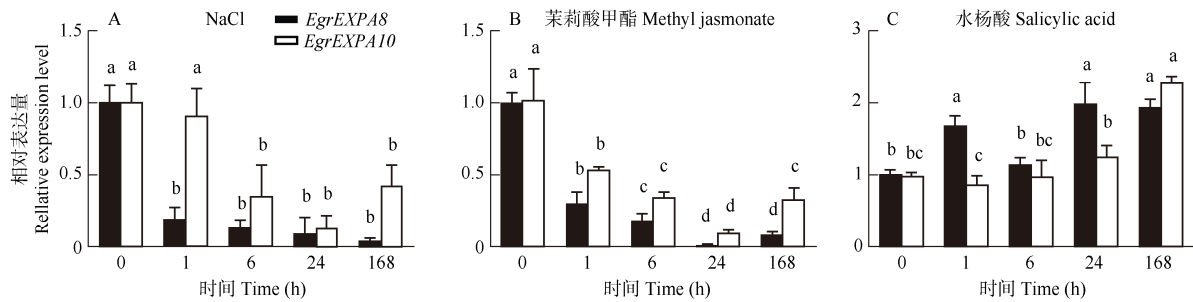


图 5 不同胁迫下巨桉 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 的表达模式

Fig. 5 Expression patterns of *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* in *Eucalyptus grandis* under different stresses

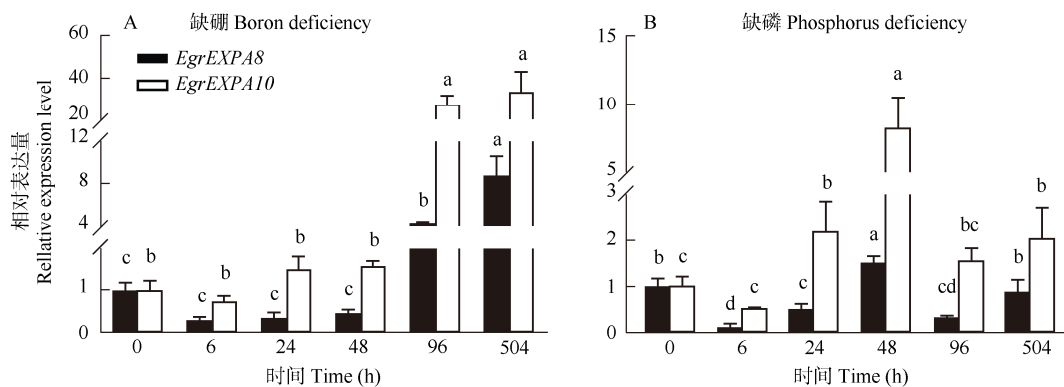


图 6 缺硼和缺磷下巨桉 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 的表达模式

Fig. 6 Expression patterns of *EgrEXPA8* and *EgrEXPA10* in *Eucalyptus grandis* under boron and phosphorus deficiency

3 结论和讨论

扩展蛋白是植物细胞壁的重要组成部分, 主要参与细胞扩张以及一系列发生细胞壁修饰的发育过程以及植物抗病的重要生理过程^[28]。本研究通过转录组数据筛选得到 2 个在茎不同节间差异表达的基因, 并克隆得到 cDNA 序列, 利用生物信息学分析发现这 2 个基因均含有 DPBB_1 结构域和 Pollen_allerg_1 结构域, 均为扩展蛋白基因且属于 EXPA 亚家族成员。采用 qRT-PCR 技术分析 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因在不同组织部位、不同节间以及不同胁迫条件下的表达模式, 以期初步探索它们在桉树生长调控、逆境胁迫过程中的作用。

由于植物扩展蛋白以酶的催化方式使细胞壁

组分松弛、细胞伸展, 因此不同的扩展蛋白基因在植物体内的发育阶段具有不同的表达模式, 且与细胞生长和组织分化一致^[29]。qRT-PCR 结果表明, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因均在分生组织或者细胞分裂旺盛的部位如嫩叶和茎尖中表达量较高, 推测其主要在细胞分裂中起重要作用。另外, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 在茎尖和初生生长占主要作用的上部节间表达量较高, 而在次生生长占主导的下部节间表达量急剧降低, 推断其可能主要调控初生生长或者负调控次生生长, 这与前期转录组的表达趋势一致。已有研究表明外源喷施油菜素内酯(brassinosteroid, BR)可以提高拟南芥 *AtEXPA5* 的表达, 且在 *det2-1* 和 *bri1-301* 突变体中 *AtEXPA5* 的表达量减少, 而在 *bzr1-1D* 功能获得型突变体中表达量增强^[30]。近期研究表明 BR 在

木本植物次生长过程中主要通过促进纤维细胞的增加和减少木质素, 同时促进木质部细胞的膨大起作用^[31-33]。这表明 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 可能参与了 BR 调控次生木质部发育过程。通过构建 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 表达载体, 以探索其在桉树生长调控中的作用尤其是木材形成中的作用。

植物生长调节剂(如水杨酸等)是生物胁迫及非生物胁迫反应的重要信号分子, 能诱导植物产生持续抗性, 从而减缓植物对多种逆境胁迫的伤害。本研究结果表明, *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因对盐胁迫、水杨酸与茉莉酸甲酯、缺磷、缺硼等逆境的响应方式类似, 推测同一亚家族的扩展蛋白对相同胁迫或植物激素可能有相似的响应模式。在盐处理下, 巨桉叶片内 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因的表达量均显著降低, 这与地黄(*Rehmannia glutinosa*)扩展蛋白基因 *RgEXPA10* 的表达趋势一致^[34]。小麦(*Triticum aestivum*)扩展蛋白 *TaEXPB23* 在茉莉酸甲酯处理后的 mRNA 水平提高^[35], 而本研究中 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因表达在茉莉酸甲酯处理下均被抑制, 可能是由于 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因与 *TaEXPB23* 为不同的亚家族, 其响应方式不同, 也可能是由于物种不同的原因。硼高效品种甘蓝型油菜(*Brassica napus*)在缺硼胁迫下根系中的 *BnaEXPA6*、幼叶中的 *BnaEXPA5* 及老叶中的 *BnaEXPA3*、*BnaEXPA5*、*BnaEXPA8* 和 *BnaEXPA16* 基因的表达水平均显著高于硼低效品种^[36]。巨桉 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10* 基因在长期缺硼胁迫下均显著上调, 且 *EgrEXPA10* 较 *EgrEXPA8* 响应更迅速, 说明这 2 个扩展蛋白可能在桉树缺硼胁迫中发挥着重要作用, 为将来研究桉树中硼响应的机制研究奠定基础。

本研究从巨桉中克隆了 2 个扩展蛋白基因 *EgrEXPA8* 和 *EgrEXPA10*, 可能参与桉树初生细胞壁的维持及次生长, 在盐胁迫、茉莉酸甲酯处理下均被抑制表达, 在水杨酸处理、缺硼、缺磷处理下均被上调表达, 在非生物胁迫响应中起调控作用。

参考文献

- [1] MCQUEEN-MASON S, DURACHKO D M, COSGROVE D J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(11): 1425–1433. doi: 10.1105/tpc.4.11.1425.
- [2] COSGROVE D J. Plant expansins: Diversity and interactions with plant cell walls [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, 25: 162–172. doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.014.
- [3] LEE Y, CHOI D, KENDE H. Expansins: Ever-expanding numbers and functions [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(6): 527–532. doi: 10.1016/s1369-5266(00)00211-9.
- [4] LI H Y, SHI Y, DING Y N, et al. Bioinformatics analysis of expansin gene family in poplar genome [J]. *J Beijing For Univ*, 2014, 36(2): 59–67. [李昊阳, 施杨, 丁亚娜, 等. 杨树扩展蛋白基因家族的生物信息学分析 [J]. *北京林业大学学报*, 2014, 36(2): 59–67. doi: 10.13332/j.cnki.jbfu.2014.02.014.]
- [5] DAL SANTO S, VANNOZZI A, TORNIELLI G B, et al. Genome-wide analysis of the expansin gene superfamily reveals grapevine-specific structural and functional characteristics [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62206. doi: 10.1371/journal.pone.0062206.
- [6] KENDE H, BRADFORD K, BRUMMELL D, et al. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(3): 311–314. doi: 10.1007/s11103-004-0158-6.
- [7] YU Z M, KANG B, HE X W, et al. Root hair-specific expansins modulate root hair elongation in rice [J]. *Plant J*, 2011, 66(5): 725–734. doi: 10.1111/j.1365-313x.2011.04533.x.
- [8] YAN A, WU M J, YAN L M, et al. *AtEXP2* is involved in seed germination and abiotic stress response in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85208. doi: 10.1371/journal.pone.0085208.
- [9] MORRIS K, LINKIES A, MÜLLER K, et al. Regulation of seed germination in the close *Arabidopsis* relative *Lepidium sativum*: A global tissue-specific transcript analysis [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155(4): 1851–1870. doi: 10.1104/pp.110.169706.
- [10] ZHAO W W, FENG L, HU S B, et al. Cloning and expression analysis of *CpEXPA2* gene related to softening of papaya fruit [J]. *J Fruit Sci*, 2018, 35(7): 785–793. [赵湾湾, 冯力, 胡绍彬, 等. 番木瓜果实软化相关 *CpEXPA2* 基因的克隆与表达分析 [J]. *果树学报*, 2018, 35(7): 785–793. doi: 10.13925/j.cnki.gsxb.20180101.]
- [11] HAYAMA H, ITO A, MORIGUCHI T, et al. Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening [J]. *Postharv Biol Technol*, 2003, 29(1): 1–10. doi: 10.1016/s0925-5214(02)00216-8.
- [12] GRAY-MITSUMUNE M, MELLEROWICZ E J, ABE H, et al. Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup A of the α -expansin gene family [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(3): 1552–1564. doi: 10.1104/pp.104.039321.
- [13] BAJWA K S, SHAHID A A, RAO A Q, et al. Stable transformation and expression of *GhEXPA8* fiber expansin gene to improve fiber length and micronaire value in cotton [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 838. doi: 10.3389/fpls.2015.00838.
- [14] KULUEV B, AVALBAEV A, MIKHAYLOVA E, et al. Expression

- profiles and hormonal regulation of tobacco expansin genes and their involvement in abiotic stress response [J]. *Plant Physiol*, 2016, 206: 1–12. doi: 10.1016/j.jplph.2016.09.001.
- [15] GOH H H, SLOAN J, DORCA-FORNELL C, et al. Inducible repression of multiple expansin genes leads to growth suppression during leaf development [J]. *Plant Physiol*, 2012, 159(4): 1759–1770. doi: 10.1104/pp.112.200881.
- [16] CHEN Y H, HAN Y Y, KONG X Z, et al. Ectopic expression of wheat expansin gene *TaEXPA2* improved the salt tolerance of transgenic tobacco by regulating Na^+/K^+ and antioxidant competence [J]. *Physiol Plant*, 2017, 159(2): 161–177. doi: 10.1111/ppl.12492.
- [17] ZHAO M R, HAN Y Y, FENG Y N, et al. Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(4): 671–685. doi: 10.1007/s00299-011-1185-9.
- [18] ZHANG H, DING Y N, ZHI J K, et al. Over-expression of the poplar expansin gene *PtoEXPA12* in tobacco plants enhanced cadmium accumulation [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 116: 676–682. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.053.
- [19] MOLLET J C, LEROUX C, DARDELLE F, et al. Cell wall composition, biosynthesis and remodeling during pollen tube growth [J]. *Plants*, 2013, 2(1): 107–147. doi: 10.3390/plants2010107.
- [20] LI L C, BEDINGER P A, VOLK C, et al. Purification and characterization of four β -expansins (*Zea m 1* isoforms) from maize pollen [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(4): 2073–2085. doi: 10.1104/pp.103.020024.
- [21] TABUCHI A, LI L C, COSGROVE D J. Matrix solubilization and cell wall weakening by β -expansin (group-1 allergen) from maize pollen [J]. *Plant J*, 2011, 68(3): 546–559. doi: 10.1111/j.1365-313x.2011.04705.x.
- [22] RUSSELL S D, BHALLA P L, SINGH M B. Transcriptome-based examination of putative pollen allergens of rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) [J]. *Mol Plant*, 2008, 1(5): 751–759. doi: 10.1093/mp/ssn036.
- [23] XIE Y J. Research progress on *Eucalyptus* breeding and its strategy in China [J]. *World For Res*, 2011, 24(4): 50–54. [谢耀坚. 中国桉树育种研究进展及宏观策略 [J]. 世界林业研究, 2011, 24(4): 50–54. doi: 10.13348/j.cnki.sjlyyj.2011.04.015.]
- [24] MYBURG A A, GRATTAPAGLIA D, TUSKAN G A, et al. The genome of *Eucalyptus grandis* [J]. *Nature*, 2014, 510(7505): 356–362. doi: 10.1038/nature13308.
- [25] ZHAN N, XIE Y J, CHEN H P, et al. Bioinformatics analysis of *EXP* gene family in *Eucalyptus grandis* [J]. *For Res*, 2018, 31(6): 39–46. [詹妮, 谢耀坚, 陈鸿鹏, 等. 巨桉 *EXP* 基因家族的生物信息学分析 [J]. 林业科学研究, 2018, 31(6): 39–46. doi: 10.13275/j.cnki.lykxyj.2018.06.006.]
- [26] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [27] SAMPEDRO J, COSGROVE D J. The expansin superfamily [J]. *Genome Biol*, 2005, 6(12): 242. doi: 10.1186/gb-2005-6-12-242.
- [28] COSGROVE D J. Loosening of plant cell walls by expansins [J]. *Nature*, 2000, 407(6802): 321–326. doi: 10.1038/35030000.
- [29] CHO H T, COSGROVE D J. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(12): 3237–3253. doi: 10.1105/tpc.006437.
- [30] PARK C H, KIM T W, SON S H, et al. Brassinosteroids control *AtEXPA5* gene expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(4): 380–387. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.11.003.
- [31] YAN H F. The Brassinosteroid's effect on the secondary growth of *Eucalyptus grandis* and preliminary function analysis of the related genes [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2015. [闫慧芳. 油菜素内酯对巨桉次生生长影响及转导途径中相关基因功能初步分析 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2015.]
- [32] ZHENG L W, MA J J, ZHANG L Z, et al. Revealing critical mechanisms of BR-mediated apple nursery tree growth using iTRAQ-based proteomic analysis [J]. *J Proteomics*, 2018, 173: 139–154. doi: 10.1016/j.jprot.2017.12.007.
- [33] PRAMOD S, ANJU M, RAJESH H, et al. Effect of exogenously applied 24-epibrassinolide and brassinazole on xylogenesis and microdistribution of cell wall polymers in *Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit [J]. *J Plant Growth Regul*, 2021, 41(1): 404–416. doi: 10.1007/s00344-021-10313-6.
- [34] WANG F Q, ZHOU Y, HUANG Y, et al. Cloning and expression analysis of the expansin gene *RgEXPA10* in *Rehmannia glutinosa* [J]. *Acta Pharm Sin*, 2015, 50(2): 233–240. [王丰青, 周艳, 黄勇, 等. 地黄扩展蛋白基因 *RgEXPA10* 的克隆与表达分析 [J]. 药学学报, 2015, 50(2): 233–240. doi: 10.16438/j.0513-4870.2015.02.004.]
- [35] HAN Y Y, LI A X, LI F, et al. Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, *TaEXPB23*, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, 54: 49–58. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.02.007.
- [36] WU T, ZENG N, LI W, et al. Genome-wide identification of the expansin gene family and differences in transcriptional responses to boron deficiency in *Brassica napus* L. [J]. *Plant Sci J*, 2021, 39(1): 59–75. [吴涛, 曾妮, 李巍, 等. 甘蓝型油菜扩展蛋白家族的全基因组鉴定及其对缺硼胁迫响应的差异分析 [J]. 植物科学学报, 2021, 39(1): 59–75. doi: 10.11913/PSJ.2095-0837.2021.10059.]