

花生 4CL 基因家族鉴定及对干旱与盐胁迫响应分析

张泽 杨秀丽 宁东贤

(山西农业大学小麦研究所, 临汾 041000)

摘要: 【目的】分析花生4-香豆酸:CoA连接酶(4-coumarate:CoA ligase, 4CL)基因家族成员基本特性及其对干旱和盐胁迫的响应,为培育花生耐旱抗盐品种提供重要的目标基因。【方法】通过HMM文件及NCBI CDD和Pfam数据库在全基因组水平鉴定花生4CL基因家族成员;利用ExPASy-ProtParam工具进行蛋白理化性质分析;通过MEGA7及itol工具进行系统进化分析;通过MEME及NCBI中的CD-search工具进行蛋白保守基序和保守结构域分析;通过PlantCARE及TBtools进行启动子元件分析及可视化;通过RNA-seq数据及RT-qPCR分析花生4CLs转录水平变化。【结果】借助花生Tifrunner基因组参考数据,鉴定到56个花生4CL基因,氨基酸长度介于239-1 208之间,pI介于5.5-9.22之间,蛋白脂肪系数介于80.2-103.13之间,不稳定性指数在25.51-48.79之间,GRAVY值在-0.367-0.139之间;花生A与B基因组的20条染色体上,Ah4CLs基因不均匀地分布,5和15号染色体Ah4CLs基因密度最高;同一个聚类分支,Ah4CLs具有相似的保守基序组成及相似的内含子-外显子分布结构,外显子数量在1-18之间;Ah4CLs启动子区域富含光、非生物胁迫、激素及生长发育响应元件;Ah4CLs表达具有组织特异性,在根、花及种子中表达量较高;在ABA、盐与干旱胁迫处理下,部分Ah4CLs转录水平显著增加,特别是Ah4CL28在ABA、干旱及盐处理下均明显转录上调,这些基因在花生应对非生物胁迫中可能发挥着重要作用。【结论】鉴定到的56个花生4CL基因家族成员有不同结构与特性,在部分基序及结构域上具有保守型,Ah4CLs在影响花生生长发育的同时,还参与非生物胁迫响应。

关键词: 花生; 4CL基因; 基因家族; 进化分析; 共线性分析; 启动子分析; 干旱胁迫; 盐胁迫

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2024-1266

Identification of 4CL Gene Family in *Arachis hypogaea* L. and Expression Analysis in Response to Drought and Salt Stress

ZHANG Ze YANG Xiu-li NING Dong-xian

(Institute of Wheat Research, Shanxi Agricultural University, Linfen 041000)

Abstract: 【Objective】To analyze the basic characteristics of peanut 4CL (4-coumarate:CoA ligase) gene family members and their responses to drought and salt stress in order to provide important target genes for breeding peanut varieties tolerant to drought and salt. 【Method】The members of peanut 4CL gene family were identified by HMM file, NCBI CDD, and Pfam databases at the whole genome level. ExPASy-ProtParam was used to analyze the physicochemical properties of proteins. MEGA7 and itol tools were used for phylogenetic analysis. The conserved motifs and conserved domains of proteins were analyzed by MEME and CD-search tools in NCBI, respectively. The cis-acting elements were analyzed and visualized by PlantCARE and TBtools, respectively. The transcriptional changes of peanut 4CLs were analyzed by RNA-seq data and RT-qPCR. 【Result】Based on the reference data of peanut Tifrunner genome, 56 peanut 4CL genes were identified, with amino acid length ranging from 239 to 1 208, pI ranging from 5.5 to 9.22, and aliphatic index ranging from 80.2 to 103.13. The instability index (II) was 25.51-48.79, and GRAVY was -0.367-0.139. The Ah4CLs were unevenly distributed on 20 chromosomes of peanut A and B genome, and the Ah4CLs gene density was the highest on chromosomes 5 and 15. In the same clustering branch, Ah4CLs had similar conserved motif

收稿日期: 2024-12-27

基金项目: 山西省科技重大专项计划“揭榜挂帅”项目-重大基础前沿与民生公益类项目(202201140601025-4-04), 山西农业大学生物育种工程项目(YZGC018), 山西农业大学小麦研究所项目(ZZCX202401)

作者简介: 张泽, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 植物基因工程与分子生物学; E-mail: zhangzelab3027@163.com

通信作者: 杨秀丽, 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 作物遗传育种及栽培; E-mail: yangxiuli1234@163.com;

宁东贤, 男, 副研究员, 研究方向: 作物遗传育种及栽培; E-mail: xmsndx@163.com

composition and intron-exon distribution structure, with exon number ranging from 1 to 18. *Ah4CLs* promoter regions were rich in light, abiotic stress, hormone and growth response elements. The expression of *Ah4CLs* was tissue-specific and higher in the root, flower and seed. Under ABA, salt and drought stress, the transcription levels of some *Ah4CLs* significantly increased, especially *Ah4CL28* was significantly up-regulated under ABA, drought, and salt stress. These genes may play an important role in peanut response to abiotic stress. 【Conclusion】 The 56 identified peanut *4CL* gene family members have different structures and characteristics, and some motifs and domains are conserved. *Ah4CLs* not only affects plant growth and development but also participates in abiotic stress response.

Key words: peanut; *4CL* genes; gene family; phylogenetic analysis; synteny analysis; promoter analysis; drought stress; salt stress

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 作为重要的油料及经济作物, 是国家食用油供给的重要支柱^[1]。干旱、半干旱以及盐渍化的土壤环境是花生种植过程中面临的主要非生物胁迫, 使得花生品质与产量受到较为严重的影响^[2-5]。抗逆优质花生品种的选育是缓解胁迫的重要方式之一。苯丙烷类代谢途径是植物正常生长所必需的, 大量次生代谢产物的前体都由这一途径产生, 在植物生长发育以及外部环境胁迫中发挥重要功能^[6]。

4CL是苯丙烷类代谢通路中的重要枢纽蛋白, 催化肉桂酸及其甲氧基或者羟基衍生物反应生成对应的CoA酯^[7]。这些辅酶A酯是植物酚类次级产物的重要中间体, 如木质素单体和类黄酮等^[8]。已有的研究表明, 4CL蛋白序列中存在一些保守的多肽基序, 特别是BOX I (SSGTTGLPKG V) 和BOX II (GEICIRG)^[7], BOX I代表腺苷单磷酸 (AMP) 结合域, 这段基序在所有腺苷酸形成酶家族成员中高度保守^[9]。BOX II并不直接参与催化反应, 但是这一保守序列的缺失会导致4CL酶活性的几乎完全丧失^[10]。随着许多物种基因组测序的完成, 许多编码腺苷酸形成酶的基因被发现与已鉴定的*4CL*基因密切相关^[11], 但它们大多数的生化功能仍不清楚。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中, 发现有9个基因与*4CLs*编码基因相似, 被不同的研究人员鉴定归类为*4CL*或类*4CL*基因^[12-13]。

已有报道表明, 许多*4CLs*在非生物胁迫中发挥着重要的功能, 经历胁迫时, 其表达量会发生显著变化^[14-15]。白光、紫外线照射以及外源ABA和PEG处理, 均可刺激马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) *St4CL6*和*St4CL8*的表达上调, 同时抑制*St4CL5*的表达^[16]。*Gh4CL7*沉默棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) 株系对干旱胁迫表现出较强的敏感性, 而*Gh4CL7*过表达拟南芥植株对干旱的耐受性增强^[17]。盐胁迫

后, 杜仲 (*Eucommia ulmoides* Oliv.) 中多数*Euc4CLs*的表达量显著增加, 尤其是*Euc4CL9*、*Euc4CL17*和*Euc4CL27*^[18]。由此可见, 在非生物胁迫响应与调控方面, *4CL*基因在不同物种中相对保守。花生*4CL*基因家族尚未进行比较系统的全基因组鉴定与分类, 在非生物胁迫尤其是干旱与盐胁迫中的功能尚不明确。

本研究借助花生品种Tifrunner基因组参考数据进行花生*4CL*基因家族的鉴定, 并对其进化关系、蛋白特性以及表达模式等方面进行分析, 同时借助转录组数据以及RT-qPCR分析鉴定受干旱与盐胁迫响应的*Ah4CLs*, 进而为抗旱耐盐花生新品种的培育提供重要的基因位点, 借助基因工程手段对这些位点进行改善或许可以为花生抗逆性的提高以及花生产业化提供重要的帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

采用试验材料为花生品种狮头企^[19], 该品种已经进行了全基因组组装与测序, 并公布了参考基因组数据, 便于进行引物合成与基因表达分析。用0.5%的次氯酸钠溶液将花生种子进行消毒灭菌, 并用无菌水清洗, 随后在无菌双层滤纸上进行萌发, 光照/黑暗时间为16 h/8 h, 温度为20 °C, 相对湿度为60%, 将萌发且生长一致的幼苗进行种植, 待长到3-4叶期时, 将花生幼苗的根浸入Hoagland培养液中进行处理, 参照已报道的文献, 用20% PEG6000模拟干旱胁迫^[20], 200 mmol/L NaCl模拟盐胁迫^[21], 分别在处理0、6、12、24和48 h时取材花生展开叶、幼叶以及根部, 用液氮速冻后, 放到-80 °C进行保存备用。

1.2 方法

1.2.1 花生*4CL*基因家族成员鉴定与蛋白理化性质分析 花生Tifrunner品种基因组已被用于多项分子研究, 具有更好的连续性与完整性, 其全基因组文

件、基因组注释文件以及蛋白序列文件在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/taxonomy/3818/>) 中下载获得。通过 HMM 文件 PF00501 和 PF13193 的筛选获得了花生中 4CL 候选成员，并通过 NCBI CDD 和 Pfam 数据库进一步分析候选成员的蛋白结构域。最终将在 CDD 数据库中包含 4CL 结构域和 AFD_class_I 超家族结构域以及在 Pfam 数据库中包含 AMP-binding 和 AMP-binding_c 结构域的蛋白鉴定为花生 4CL 基因家族成员。利用 ExPASy 上的 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具预测花生 4CL 蛋白的理化性质。

1.2.2 花生 4CL 基因家族成员染色体分布及进化分析 花生 4CL 基因家族的染色体分布位置基于 Tifrunner 基因组注释文件，候选 *Ah4CL* 基因在花生染色体上的物理分布借助 TBtools^[22] 工具进行注释。为了进一步研究的方便，花生 4CL 基因按照染色体位置进行重新命名。利用 MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>) 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 将鉴定的 56 个 *Ah4CL* 蛋白与拟南芥 4CL 蛋白进行多序列比对和系统发育树的构建，Bootstrap 值设为 1 000。最后利用 itol (<https://itol.embl.de/>) 在线工具对系统发育树进行美化。

1.2.3 花生 4CL 基因家族蛋白保守基序、结构域及基因结构分析 花生 Tifrunner 基因组注释文件辅助进行基因结构分析。为了分析花生 4CL 蛋白保守域，使用 NCBI 中的 CD-search 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 进行搜索，将得到的 hitdata.txt 文件进行进一步结构域分析。利用 MEME 版本 5.5.5 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 进行 4CL 家族蛋白的保守基序分析，将获得的 meme.xml 文件用于进一步基序分析。最后使用 TBtools 工具将上述分析结果进行可视化。

1.2.4 花生 4CL 基因家族成员共线性及启动子元件分析 利用花生 Tifrunner 基因组及其注释文件，构建花生 4CL 基因家族成员的种内共线性图谱，将花生染色体信息文件、共线性文件、基因密度文件以及基因位置文件利用 TBtools 进行可视化。为了分析花生 4CL 基因启动子的顺式作用元件，从花生 Tifrunner 基因组数据中提取了每个 *Ah4CL* 基因编码序列 (CDS) 上游 2 000 bp 的启动子序列。使用 Plant-

CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plant-care/html/>) 进行分析，并用 TBtools 将元件进行可视化。

1.2.5 花生 4CL 基因转录组数据分析 表达模式分析转录组数据来源于 NCBI 的 SRA 数据库中研究课题 SRP302163，花生叶片 ABA、干旱及盐处理转录组数据源于研究课题 SRP215177，通过 Cufflinks^[23] 分析 FPKM (fragments per kilobase of transcript per million fragments) 值，并用 TBtools 绘制热图。

1.2.6 花生组织 RNA 提取、反转录及 RT-qPCR 用 RNAiso Easy (TaKaRa) RNA 提取试剂盒进行总 RNA 的提取，随后用 PrimeScript™ FAST RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 反转录试剂盒进行 cDNA 第一链的合成，最后使用 2 × SYBR Green qPCR Master Mix (Selleck) 在 LineGene9600 荧光定量 PCR 仪上进行 RT-qPCR，使用 2^{-ΔΔCt} 方法计算检测基因的相对转录量^[24]，内参基因为花生 *Actin7* (LOC112783163) 基因。RT-qPCR 所用引物见表 1。

表1 RT-qPCR所用基因引物
Table 1 Genetic primers for RT-qPCR

基因名称 Gene name	正向引物 Forward primer (5′-3′)	反向引物 Reverse primer (5′-3′)
<i>Ahactin7</i>	TTGGAATGGCTCAGAAGG ATGC	AGTGCTGCCTCAGTAAGA AGC
<i>Ah4CL21</i>	GAGAGAGCGAGGATGAA GGC	AGCTCCTCTGACCACGAT CT
<i>Ah4CL22</i>	TCTTGGACAGAGCGGGGA TA	GTGTCTCTTCCAATGCC GA
<i>Ah4CL28</i>	GCTACACTTGGACCCTTG CT	GGCAGAGGAAGGATGGTG TC
<i>Ah4CL37</i>	AGCCCTTGTGCCTTTCTC TC	CATGGCCCTCAACTGAAC CT
<i>Ah4CL49</i>	CGAGAATTTGAGCAGCGT GG	ACTCCACCATCTCCTCT CC
<i>Ah4CL53</i>	CTCTGCACTCCCTCAACC TG	GCCTGGTTTACGCTCTCC TT

2 结果

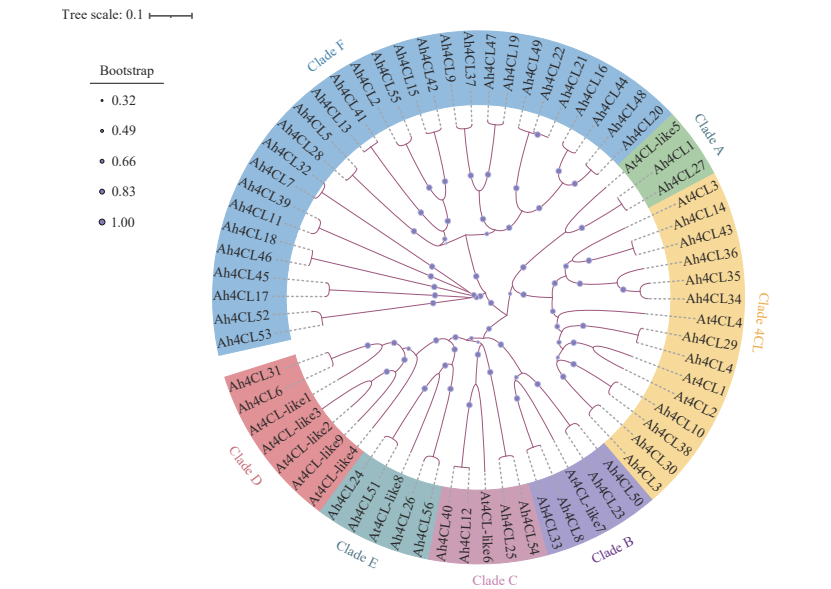
2.1 花生 4CL 基因家族鉴定及蛋白理化性质分析 借助 NCBI 中花生品种 Tifrunner 的全基因组数据，通过 HMM 文件 (PF00501, PF13193) 的筛选以及 NCBI CDD 和 Pfam 数据库的分析，最终共鉴定出 56 个 *Ah4CL* 基因 (附表 1)。为了便于后续分析，

依据基因在染色体上的位置对所有基因进行系统的命名。利用 ExPASy-ProtParam 工具对 *Ah4CL* 基因家族蛋白的基本特性进行分析 (附表 1)。*Ah4CLs* 编码多种蛋白质, 氨基酸长度范围 239–1 208, 蛋白的分子量范围为 26.52–134.62 kD, 理论等电点范围为 5.5–9.22。脂肪族指数在 80.2–103.13 之间, 表明不同 *Ah4CL* 蛋白表现出不同程度的热稳定性。同时, 不稳定性指数在 25.51–48.79 之间, 其中低于 40 的 *Ah4CL* 蛋白有 39 个, 高于 40 的蛋白有 17 个, 表明后一类 *Ah4CL* 蛋白质的稳定性较低。GRAVY 值表示 *Ah4CL* 蛋白的疏水或亲水性特征, 范围为 -0.367–0.139, 其中有 39 个负值, 表明这些蛋白为亲水性蛋白, 剩余 17 个为正值, 为疏水性蛋白。

2.2 花生 4CL 蛋白的进化分析

为了进一步分析花生 4CL 家族的系统发育以及功能特征, 利用 MEGA 软件对花生和拟南芥的 4CL 蛋白进行进化分析 (图 1)。随后, 根据已有报道所描述的 4CL 基因家族的分类方法对它们的聚类情况进行分类。所有 4CL 基因家族成员被划分为 7 个分支

(Clade 4CL 和 A–F)。位于 Clade 4CL 的花生 4CL 蛋白, 共有 11 个。其中, 花生 4CL 蛋白 *Ah4CL14*、*Ah4CL34*、*Ah4CL35*、*Ah4CL36* 和 *Ah4CL43* 与拟南芥中的 *At4CL3* 蛋白有较强的同源性。其余 6 个蛋白分别为 *Ah4CL3*、*Ah4CL4*、*Ah4CL10*、*Ah4CL29*、*Ah4CL30* 和 *Ah4CL38*, 与拟南芥中的 *At4CL1*、*At4CL2* 和 *At4CL4* 具有较高的同源性。这些蛋白聚类到 Clade 4CL, 表明它们可能参与木质素和类黄酮的生物合成。进化枝 A–E 均包含拟南芥 *At4CL*-like 蛋白, 其中, *Ah4CL1* 和 *Ah4CL27* 聚集在 Clade A 中, *Ah4CL8*、*Ah4CL23*、*Ah4CL33* 和 *Ah4CL50* 聚类在 Clade B 中, *Ah4CL12*、*Ah4CL25*、*Ah4CL40* 和 *Ah4CL54* 聚类在 Clade C 中, *Ah4CL6* 和 *Ah4CL31* 聚类在 Clade D 中, 在 Clade E 中有 *Ah4CL24*、*Ah4CL26*、*Ah4CL51* 和 *Ah4CL56*。在 Clade F 中, 缺少 *At4CL*-like 蛋白, 只有 *Ah4CL* 蛋白。基于之前的文献报道, 该分支可能含有 AAE (acyl activating enzymes) 或 AAEL (acyl activating enzyme-like) 蛋白。这些 4CL-like 蛋白可能在植物代谢和多种天然化合物合成途径中发挥作用。



不同区域颜色表示不同分类亚组分支, 包括 Clade 4CL 与 Clade A–F
Different regional colors indicate different classification subgroup branches, including Clade 4CL and Clade A–F

图 1 花生与拟南芥 4CL 蛋白的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of 4CL protein in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arabidopsis thaliana*

2.3 花生 4CL 基因的染色体分布及共线性分析

通过分析花生 4CL 基因在染色体上的位置 (图 2),

发现有 56 个 4CL 基因不均匀地分布在花生 A 和 B 基因组的 20 条染色体上。5 和 15 号染色体 *Ah4CL* 基因密度

最高，为10.71%，其次是1和13号染色体，*Ah4CLs*密度为8.93%。接着是7和11号染色体，*Ah4CLs*密度为7.14%。17和19号染色体，*Ah4CLs*基因密度为5.36%。2、3、4、8、12、14、18和20号染色体含有2个*Ah4CL*基因，基因密度为3.57%。含有1个*Ah4CL*基因的为6、9、10和16号染色体，基因密度为1.79%。

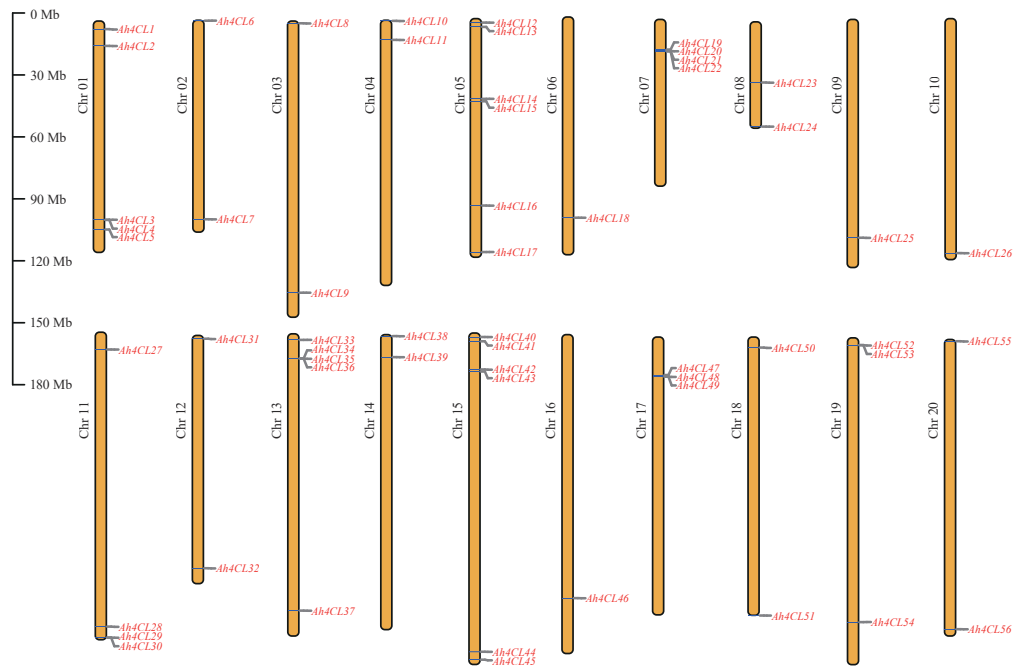


图2 花生 4CL 基因染色体分布分析

Fig. 2 Analysis of chromosome distribution of 4CL gene in peanut

对花生 4CL 基因家族的 56 个基因进行种内共线性分析 (图 3)，发现共线性基因有 37 对。在 Clade 4CL 分支中，Chr1 上的 *Ah4CL3* 与 Chr11 上的 *Ah4CL29* 具有共线性，Chr4 上的 *Ah4CL10* 与 Chr14 上的 *Ah4CL38* 基因共线，Chr5 上的 *Ah4CL14* 分别与 Chr13 上的 *Ah4CL34* 和 Chr15 上的 *Ah4CL43* 存在共线性，另外，Chr13 上的 *Ah4CL34* 和 Chr15 上的 *Ah4CL43* 之间也存在共线性。全基因组复制或倍体化、串联复制以及片段复制事件在花生 4CL 基因家族的进化中起着至关重要的作用。

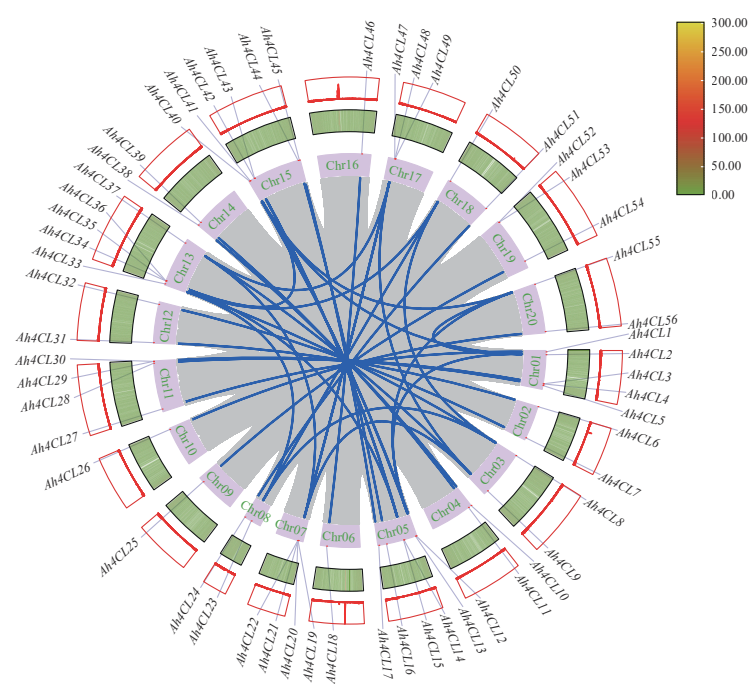
2.4 花生 4CL 蛋白保守基序、结构域以及基因结构分析

为了更深入地了解 *Ah4CL* 基因家族，对每个 *Ah4CL* 蛋白的保守基序、结构域和基因结构进行分析 (图 4)。利用 MEME 工具预测 *Ah4CL* 基因家族的保守蛋白基序，在 *Ah4CL* 基因家族中，鉴定了 10 个不同的基序 (Motif 1–10) (表 2)。Ah4CL 蛋白的保

守基序数量在 6–10 之间 (图 4-B)。在同一个聚类分支中，花生 4CLs 具有相似的保守基序组成，表明它们之间有密切的进化关系。*Ah4CL* 基因家族的所有成员在 NCBI CDD 数据库中都具有 4CL 结构域。同时，在 Pfam 数据库中都具有 AMP binding 和 AMP binding_C 结构域 (图 4-C)。*Ah4CL* 基因的外显子数量在 1–18 个之间，在同一聚类分支的 *Ah4CL* 基因具有相似的内含子–外显子分布结构 (图 4-D)。

2.5 花生 4CL 基因启动子顺式作用元件分析

为了分析花生 4CL 基因家族成员所参与的潜在的转录调控机制，对每个成员上游 2 000 bp 启动子序列进行顺式作用元件预测 (图 5)。结果显示，花生 4CL 基因家族启动子区域富含多种顺式作用元件，包括光响应元件、非生物胁迫 (低温、干旱等) 响应元件、植物激素 (脱落酸、茉莉酸甲酯、生长素、赤霉素和水杨酸) 响应元件，以及生长发育 (类黄酮生物合成和昼夜节律) 响应元件。鉴定花生 4CL 基因



粉红色框表示花生染色体,灰色线条指示花生4CL基因位置,蓝色线条连接的Ah4CL基因之间存在共线性

The pink box indicates the peanut chromosomes, while the gray lines denote the positions of the 4CL genes in peanuts. The blue lines illustrate the collinearity observed between the Ah4CL genes

图3 花生4CL基因家族成员共线性分析

Fig. 3 Syntenic relationship of peanut 4CL gene family members

家族成员中有很很大一部分启动子区包含有脱落酸和干旱响应相关的顺式作用元件,表明Ah4CLs在非生物胁迫响应以及调控过程中可能发挥着关键的功能。

2.6 花生4CL基因组织表达模式分析

基因组织特异性表达模式探索可以帮助我们更好的分析Ah4CL基因潜在的生物学功能。Ah4CL基因家族不同成员具有不同的表达模式(图6-A),表明它们具有多方面功能。具体而言,Ah4CL15、Ah4CL42、Ah4CL29、Ah4CL38、Ah4CL5和Ah4CL10在根中表达水平较高,Ah4CL15、Ah4CL18、Ah4CL46和Ah4CL52在叶片中表达量相对较高,Ah4CL17、Ah4CL45、Ah4CL28和Ah4CL8在花中表现出更高的表达水平,可能在花生生殖生长过程中发挥着重要的功能。另外,Ah4CL15、Ah4CL42以及Ah4CL5在花生种子中有较高表达,可能在花生籽粒正常生长发育过程中起着重要的作用。Ah4CL基因的多样性以及不同组织特异表达模式保障着花生发育以及生理功能的正常运行。

2.7 花生4CL基因在盐和干旱胁迫下的表达水平分析

为了探究Ah4CL基因在花生非生物胁迫应答中的潜在功能,首先通过转录组数据分析Ah4CL基因在盐、干旱胁迫以及ABA处理下的表达水平变化(图6-B)。结果显示,Ah4CL基因对盐和干旱胁迫的响应存在差异,表明不同的Ah4CL在非生物胁迫中发挥的作用不同。其中,Ah4CL28和Ah4CL37基因在模拟干旱(PEG)处理后表达量上调2倍以上。盐处理后,Ah4CL21、Ah4CL22、Ah4CL28、Ah4CL49和Ah4CL53的表达水平显著升高。ABA在植物非生物胁迫响应过程中发挥着重要的功能,ABA处理下Ah4CL21、Ah4CL22、Ah4CL28、Ah4CL38、Ah4CL43、Ah4CL49和Ah4CL53表达量也上调2倍以上。值得注意的是,Ah4CL21、Ah4CL22、Ah4CL28、Ah4CL49和Ah4CL53在盐和ABA处理后均出现上调,表明在花生中这些基因可能在ABA信号调节通路中参与盐胁迫调控,尤其是Ah4CL28在干旱、盐以及ABA处理

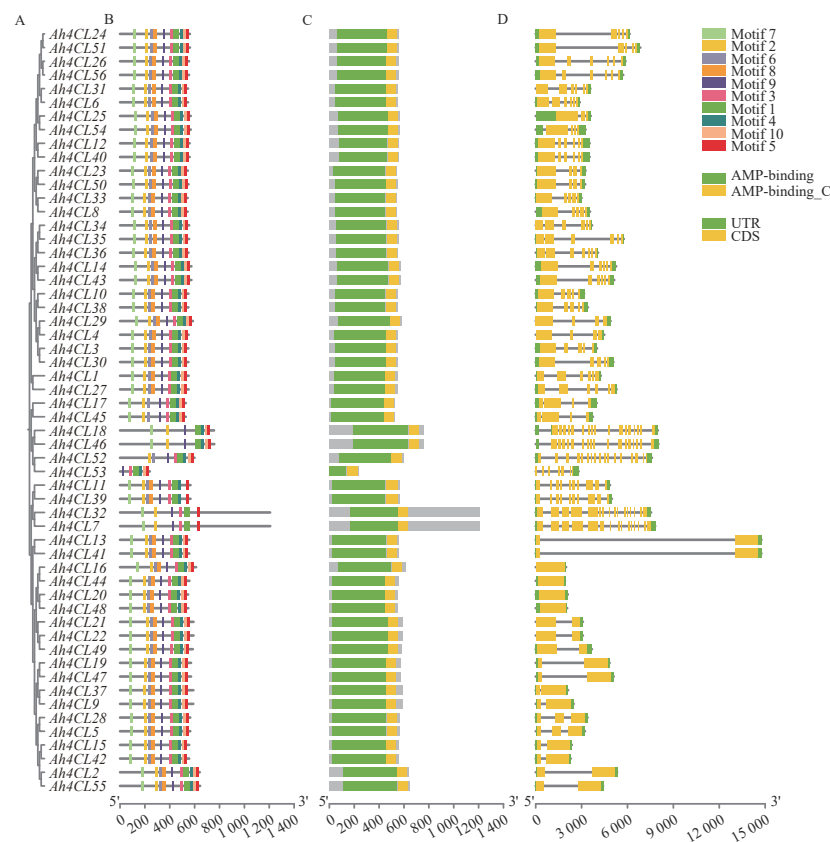


图4 花生4CL家族成员进化关系(A)、保守基序(B)、保守结构域(C)及基因结构(D)分析

Fig. 4 Phylogenetic relationship (A), conserved motif (B), conserved domain (C), and gene structure (D) analysis of peanut 4CL family members

表2 花生4CL家族蛋白保守基序序列

Table 2 Conserved motif sequences of peanut 4CL family proteins

基序 Motif	序列 Sequence	E值 E_value
Motif 1	GWLHTGDLGYIDEDGYJFIVDRCLKELIKY KGEQVAPAELEAVLYSHP	3.8e-1 534
Motif 2	LLYSSGTTGLPKGVVLTHRGL	1.8e-653
Motif 3	GEICIRGPTIMKGYLKBPEAT	2.1e-581
Motif 4	DAAVVRPDEEAGEVPACFVV	4.8e-540
Motif 5	VVFIDSJPKTSTGKILRKDLR	2.8e-488
Motif 6	KSEDEVYLWTLPMFHVNLGCFP	2.8e-448
Motif 7	SPAFYELHLAVPMAGAVLTANP	7.2e-402
Motif 8	AVGGTNCMRKFDKAILEAIEKHKVT	5.4e-457
Motif 9	PGAIVSQGYGMTETG	6.9e-322
Motif 10	ITEEEHEFCQKQVAPYKRPK	3.5e-402

下均出现上调，表明这一基因在花生应对非生物胁迫中可能发挥着至关重要的作用。

RT-qPCR 实验结果显示，在 PEG6000 处理下，*Ah4CL28* 的表达量在叶片中出现显著上调（图 7-A），在根中仅在处理 24 h 时出现显著上调（图 7-C），*Ah4CL37* 的表达量在干旱处理 6 与 12 h 时，在叶片中有显著的上调（图 7-B），而在根中仅在处理后 24 h 有显著增加（图 7-D）。

在盐处理 12 与 24 h 时，*Ah4CL21* 的表达量在叶片中显著上调（图 8-A），而在根中仅在处理后 12 h 有显著增加（图 8-F）；在盐处理 12、24 与 48 h 时，*Ah4CL22* 的表达量在叶片中显著上调（图 8-B），而在根中，在处理后 12 与 24 h 时表达量出现显著增加（图 8-G）；在盐处理 6、12 与 24 h 时，*Ah4CL28* 的表达量在叶片中显著上调（图 8-C），而在根中，在处理后 6、12、24 与 48 h 时有显著增加（图 8-H）；在盐处理 12、24 与 48 h 时，*Ah4CL49* 的表达量在叶片中显著上调（图 8-D），而在根中仅在处理后 12 h

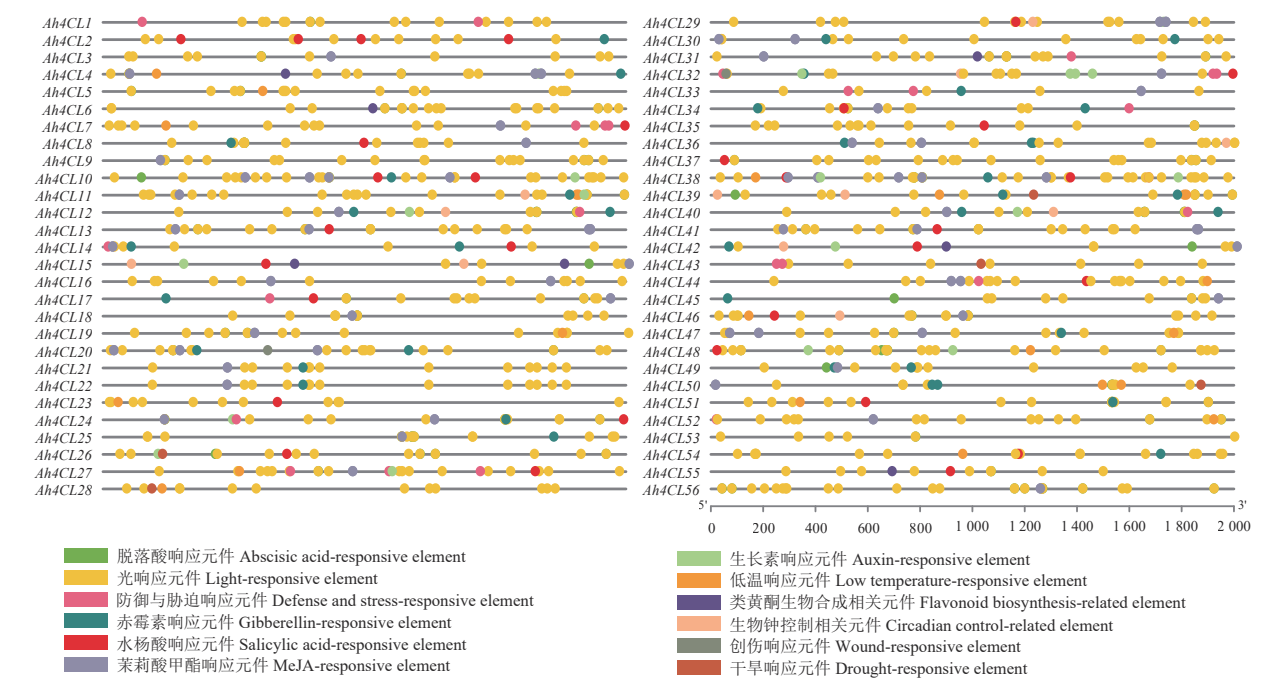


图5 花生4CL基因启动子区顺式作用元件分析

Fig. 5 Analysis of *cis*-acting elements in the promoter regions of peanut 4CL genes

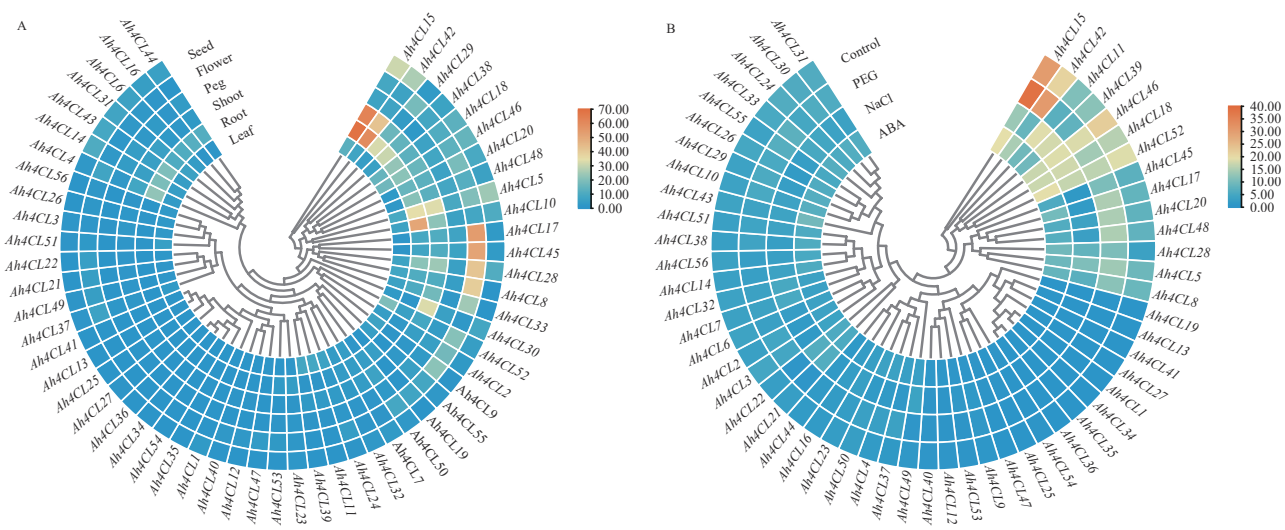


图6 花生4CL基因在不同组织(A)及在干旱、盐及ABA处理后(B)的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of peanut 4CL genes in different tissues (A) and after drought, salt and ABA treatment (B)

时有显著增加 (图8-I); 在盐处理6、24与48 h时, *Ah4CL53*的表达量在叶片中显著上调 (图8-E), 而在根中, 在处理6、12与48 h时有显著增加 (图8-J), 进一步表明这些 *Ah4CL* 基因家族成员可能在花生应对干旱与盐胁迫中起着关键作用。

3 讨论

3.1 花生 *Ah4CLs* 的鉴定与基本特性分析

苯丙烷类物质的合成是陆生植物正常生长发育及抵御外界复杂环境所必需的^[25]。4CL作为苯丙烷类物质代谢过程中的关键酶发挥着重要的作用^[26]。

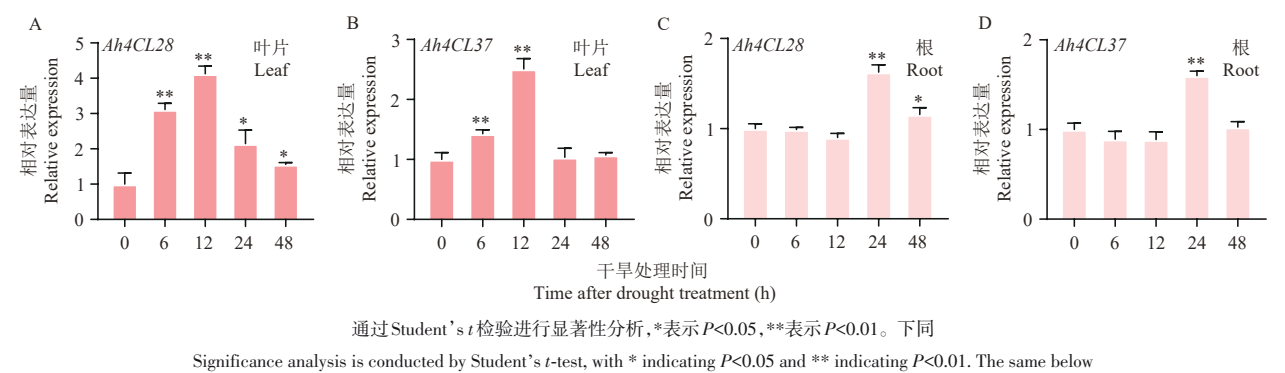


图7 模拟干旱处理后*Ah4CL28*及*Ah4CL37*表达水平变化

Fig. 7 *Ah4CL28* and *Ah4CL37* expression alterations after simulated drought treatment

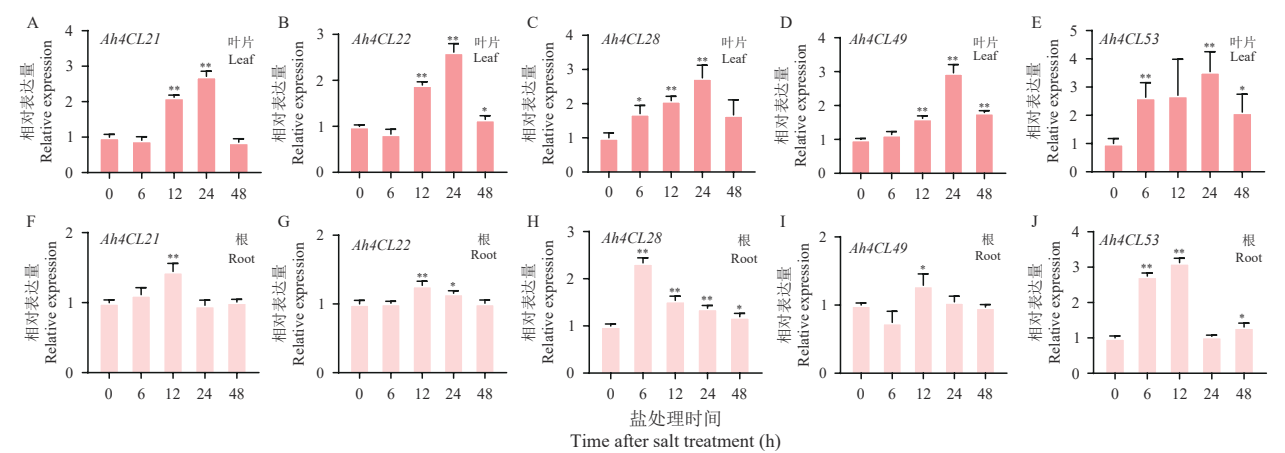


图8 盐处理后*Ah4CL21*、*Ah4CL22*、*Ah4CL28*、*Ah4CL49*及*Ah4CL53*表达水平变化

Fig. 8 *Ah4CL21*, *Ah4CL22*, *Ah4CL28*, *Ah4CL49*, and *Ah4CL53* expression alterations after salt treatment

4CL酶活性影响着多种化合物积累,尤其是类黄酮和木质素^[14]。在这项研究中,通过对花生品种Tif-runner进行全基因组分析,鉴定到花生中56个4CL基因成员。依据已有报道^[11]的研究分类,将整个花生4CL基因成员系统地划分为7个不同的分支,分别记为Clade 4CL和A-F。拟南芥中At4CL1-4位于Clade 4CL分支,已有研究表明At4CL1-4进一步分为2种类型,其中At4CL1、At4CL2和At4CL4属于I型,与木质素生物合成有关,而At4CL3属于II型,与木质素以外的苯丙烷类物质合成相关^[27]。Ah4CL14、Ah4CL34、Ah4CL35、Ah4CL36和Ah4CL43与At4CL3位于同一个子分支,同源关系较近,表明这些Ah4CL蛋白可能参与木质素以外的苯丙烷类物质合成,如类黄酮。另一方面,Ah4CL3、Ah4CL4、

Ah4CL10、Ah4CL29、Ah4CL30和Ah4CL38与At4CL1、At4CL2和At4CL4聚集在同一个子分支,这些蛋白可能与木质素合成相关。Clade A-F中的Ah4CL蛋白与Clade 4CL蛋白都具有AMP-binding和AMP-binding_c结构域以及4CL结构域,进化关系较近,但是在功能上这些4CL-like蛋白可能会有差异。Ah4CLs在染色体上的分布不均匀,但是互相之间却有许多基因表现出高度的相似性和共线性。56个Ah4CL基因家族成员共线性基因有37对,如Ah4CL3与Ah4CL29、Ah4CL10与Ah4CL38和Ah4CL34与Ah4CL43等。多倍体化、串联复制以及片段复制事件可能在花生4CL基因进化中发挥着关键的功能。基因的结构及保守结构域的变化影响着基因的功能^[28]。同一聚类分支的大多数Ah4CL基因表现出相似的内含子-外显子

结构,以及相似的保守基序的数量和分布,这些特征反映出*Ah4CL*基因在进化过程中的功能保守性。

3.2 花生*Ah4CLs*在干旱与盐胁迫中的响应分析

花生在大田生长过程中会遭遇到多种非生物胁迫,尤其是干旱与盐胁迫^[29-30],已有的研究表明*4CL*基因可以响应干旱与盐胁迫,不同的*4CL*成员对于干旱与盐胁迫的响应程度也不同^[15, 31-32]。花生*4CL*基因家族的鉴定与分析将有助于进一步探究花生面对干旱与盐胁迫的调控机理。顺式作用元件影响着基因表达调控^[33],基因启动子上一系列不同的顺式作用元件可能与多种蛋白进行核酸蛋白互作,增加了基因调控的特异性及复杂性。已鉴定的多数*Ah4CLs*含有对脱落酸和干旱响应相关的顺式作用元件,而ABA在植物非生物胁迫的调控中发挥重要作用^[34],表明*Ah4CLs*是花生应对非生物胁迫调控的关键基因。在花生ABA处理之后的转录组数据中发现,*Ah4CL21*、*Ah4CL22*、*Ah4CL28*、*Ah4CL38*、*Ah4CL43*、*Ah4CL49*和*Ah4CL53*表达水平上调2倍以上,表明这些*Ah4CLs*可能参与到ABA信号通路来调控花生的抗逆性。值得注意的是*Ah4CL21*、*Ah4CL22*、*Ah4CL28*、*Ah4CL49*和*Ah4CL53*的表达在盐处理后也出现显著的升高,进一步表明这5个*Ah4CLs*可能在ABA信号通路中来调控花生的抗盐性。此外,在模拟干旱处理下,*Ah4CL28*和*Ah4CL37*的表达出现显著上调,表明这2个*Ah4CLs*基因可能在干旱胁迫中起作用。有趣的是,*Ah4CL28*在ABA、盐以及干旱胁迫下均出现显著上调,表明这一基因在非生物胁迫中的重要性。*4CL*催化产生多种植物酚类次级产物,尤其是木质素与类黄酮,这些组分在植物抗逆性调控过程中发挥关键作用^[35-36]。花生中*Ah4CLs*在木质素及类黄酮等代谢物合成及抗逆性调控中的功能仍需进一步通过遗传材料进行验证与分析。

4 结论

在花生中共鉴定出56个*Ah4CLs*,不同*Ah4CLs*之间存在差异,但相同聚类分支又具有保守性。多倍体化、串联复制以及片段复制事件在*Ah4CLs*基因进化中可能发挥关键作用。*Ah4CLs*响应多种发育、激素以及逆境胁迫信号。*Ah4CL28*和*Ah4CL37*可能参与花生干旱胁迫响应,而*Ah4CL21*、*Ah4CL22*、*Ah4CL28*、*Ah4CL49*和*Ah4CL53*可能参与花生盐胁迫响应过程。

文章所有附表数据请到本刊官网下载 (<http://biotech.aiijournal.com/CN/1002-5464/home.shtml>)。

参考文献

- [1] 刘福星,汪可欣,张璐,等. 国内油料作物市场整合关系研究——以油菜籽、花生和芝麻为例[J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(5): 957-965.
Liu FX, Wang KX, Zhang L, et al. Study on domestic market integration of oil crops—Taking rapeseed, peanut and sesame for examples[J]. Chin J Oil Crop Sci, 2022, 44(5): 957-965.
- [2] 刘海东,陈庆政,林秀芳,等. 干旱胁迫对花生生理特性与产质量的影响[J]. 贵州农业科学, 2022, 50: 25-34.
Liu HD, Chen QZ, Lin XF, et al. Effects of drought stress on physiological characteristics, yield and quality of peanut[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2022, 50: 25-34.
- [3] 朱统国,高华援,周玉萍,等. 花生耐盐性鉴定研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(21): 19-23.
Zhu TG, Gao HY, Zhou YP, et al. Research advances on salt tolerance identification of peanut[J]. Chin Agric Sci Bull, 2014, 30(21): 19-23.
- [4] 徐扬,丁红,张冠初,等. 盐胁迫下花生种子萌发期代谢组学分析[J]. 生物技术通报, 2023, 39(1): 199-213.
Xu Y, Ding H, Zhang GC, et al. Metabolomics analysis of germinating peanut seed under salt stress[J]. Biotechnol Bull, 2023, 39(1): 199-213.
- [5] 徐扬,张瑞英,戴良香,等. 盐胁迫下氮素对花生种子萌发和种子际细菌菌群结构的调控[J]. 生物技术通报, 2024, 40(2): 253-265.
Xu Y, Zhang RY, Dai LX, et al. Regulation of nitrogen application on peanut seed germination and spermosphere bacterial community structure under salt stress[J]. Biotechnol Bull, 2024, 40(2): 253-265.
- [6] Dong NQ, Lin HX. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions[J]. J Integr Plant Biol, 2021, 63(1): 180-209.
- [7] Schneider K, Hövel K, Witzel K, et al. The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate: CoA ligase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(14): 8601-8606.
- [8] Hahlbrock K, Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1989, 40: 347-369.
- [9] Fulda M, Heinz E, Wolter FP. The *fadD* gene of *Escherichia coli* K12 is located close to *rnd* at 39.6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family[J]. Mol Gen Genet, 1994, 242(3): 241-249.
- [10] Stuible H, Büttner D, Ehling J, et al. Mutational analysis of 4-coumarate: CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming

- enzymes [J]. FEBS Lett, 2000, 467(1): 117-122.
- [11] De Azevedo Souza C, Barbazuk B, Ralph SG, et al. Genome-wide analysis of a land plant-specific acyl: coenzyme A synthetase (ACS) gene family in *Arabidopsis*, poplar, rice and *Physcomitrella* [J]. New Phytol, 2008, 179(4): 987-1003.
- [12] Costa MA, Eric Collins R, Anterola AM, et al. An *in silico* assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof [J]. Phytochemistry, 2003, 64(6): 1097-1112.
- [13] Shockey JM, Fulda MS, Browse J. *Arabidopsis* contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-coenzyme a synthetases [J]. Plant Physiol, 2003, 132(2): 1065-1076.
- [14] Lavhale SG, Kalunke RM, Giri AP. Structural, functional and evolutionary diversity of 4-coumarate-CoA ligase in plants [J]. Planta, 2018, 248(5): 1063-1078.
- [15] Chowdhury MEK, Choi B, Cho BK, et al. Regulation of 4CL, encoding 4-coumarate: coenzyme a ligase, expression in kenaf under diverse stress conditions [J]. Plant OMICS, 2013, 6(4): 254-262.
- [16] Nie TK, Sun XX, Wang SL, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the 4-coumarate: CoA ligase gene family in *Solanum tuberosum* [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1642.
- [17] Sun SC, Xiong XP, Zhang XL, et al. Characterization of the *Gh4CL* gene family reveals a role of Gh4CL7 in drought tolerance [J]. BMC Plant Biol, 2020, 20(1): 125.
- [18] Zhong J, Qing J, Wang Q, et al. Genome-wide identification and expression analyses of the 4-coumarate: CoA ligase (*4CL*) gene family in *Eucommia ulmoides* [J]. Forests, 2022, 13(8): 1253.
- [19] Bertioli DJ, Jenkins J, Clevenger J, et al. The genome sequence of segmental allotetraploid peanut *Arachis hypogaea* [J]. Nat Genet, 2019, 51(5): 877-884.
- [20] Zhao XB, Li CJ, Wan SB, et al. Transcriptomic analysis and discovery of genes in the response of *Arachis hypogaea* to drought stress [J]. Mol Biol Rep, 2018, 45(2): 119-131.
- [21] Zhang H, Zhao XB, Sun QX, et al. Comparative transcriptome analysis reveals molecular defensive mechanism of *Arachis hypogaea* in response to salt stress [J]. Int J Genomics, 2020, 2020: 6524093.
- [22] Chen CJ, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [23] Sahraeian SME, Mohiyuddin M, Sebra R, et al. Gaining comprehensive biological insight into the transcriptome by performing a broad-spectrum RNA-seq analysis [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 59.
- [24] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(9): e45.
- [25] Douglas CJ. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees [J]. Trends Plant Sci, 1996, 1(6): 171-178.
- [26] Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis [J]. Mol Plant, 2010, 3(1): 2-20.
- [27] Sun HY, Li Y, Feng SQ, et al. Analysis of five rice 4-coumarate: coenzyme A ligase enzyme activity and stress response for potential roles in lignin and flavonoid biosynthesis in rice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(3): 1151-1156.
- [28] Cheng Y, Ahammed GJ, Yao ZP, et al. Comparative genomic analysis reveals extensive genetic variations of WRKYs in Solanaceae and functional variations of CaWRKYs in pepper [J]. Front Genet, 2019, 10: 492.
- [29] 陈雷, 杨明达, 贺群岭, 等. 基于不同生育时期干旱对花生抗旱性的综合评定 [J]. 花生学报, 2024, 53(2): 31-38, 46.
- Chen L, Yang MD, He QL, et al. Comprehensive evaluation on drought resistance of peanuts at different growth stages [J]. J Peanut Sci, 2024, 53(2): 31-38, 46.
- [30] 吴兰荣, 陈静, 许婷婷, 等. 花生全生育期耐盐鉴定研究 [J]. 花生学报, 2005, 34(1): 20-24.
- Wu LR, Chen J, Xu TT, et al. Identification of salt tolerance in peanut growth duration [J]. J Peanut Sci, 2005, 34(1): 20-24.
- [31] Chen XH, Wang HT, Li XY, et al. Molecular cloning and functional analysis of 4-coumarate: CoA ligase 4 (4CL-like 1) from *Fraxinus mandshurica* and its role in abiotic stress tolerance and cell wall synthesis [J]. BMC Plant Biol, 2019, 19(1): 231.
- [32] Wang CH, Yu J, Cai YX, et al. Characterization and functional analysis of 4-coumarate: CoA ligase genes in mul-berry [J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155814.
- [33] 陈烨, 单思杰, 钟磊坚, 等. 甜橙过氧化氢酶基因 *CsCAT2* 启动子克隆及活性分析 [J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(12): 2755-2763.
- Chen Y, Shan SJ, Zhong LJ, et al. Cloning and activity analysis of the *CsCAT2* promoter in *Citrus sinensis* [J]. J Agric Biotechnol, 2024, 32(12): 2755-2763.
- [34] Danquah A, de Zelicourt A, Colcombet J, et al. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses [J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(1): 40-52.
- [35] Liu QQ, Luo L, Zheng LQ. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(2): 335.
- [36] Shomali A, Das S, Arif N, et al. Diverse physiological roles of flavonoids in plant environmental stress responses and tolerance [J]. Plants, 2022, 11(22): 3158.

(责任编辑 高洁)