

蓖麻 *RcACA* 基因家族鉴定及非生物胁迫下表达模式分析

李艳肖¹, 张春兰², 耿柳婷¹, 陈艳秋¹, 张丽¹, 向殿军^{1*}, 刘鹏^{1*}

1 内蒙古民族大学农学院, 内蒙古 通辽 028000

2 内蒙古民族大学生命科学与食品学院, 内蒙古 通辽 028000

李艳肖, 张春兰, 耿柳婷, 陈艳秋, 张丽, 向殿军, 刘鹏. 蓖麻 *RcACA* 基因家族鉴定及非生物胁迫下表达模式分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2861-2873.

LI Yanxiao, ZHANG Chunlan, GENG Liuting, CHEN Yanqiu, ZHANG Li, XIANG Dianjun, LIU Peng. Identification and expression pattern analysis of *RcACA* gene family in castor under abiotic stresses[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2861-2873.

摘要: 自抑制 Ca^{2+} -ATPase 酶(auto-inhibited Ca^{2+} -ATPase, ACA)作为 Ca^{2+} -ATPase 的亚家族之一, 在植物细胞内维持 Ca^{2+} 浓度平衡发挥着重要的作用。为探究蓖麻(*Ricinus communis*) *RcACA* 基因家族的功能及基因表达模式, 文中采用生物信息学手段鉴定蓖麻 *RcACA* 基因家族成员, 预测分析了其基础的理化性质、亚细胞位置、蛋白的二级和三级结构、保守域、保守基序、基因结构、染色体位置及共线关系、进化特征、启动子顺式作用元件, 并通过蓖麻转录组数据中的表达量(fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM)分析 *RcACA* 基因在非生物胁迫下的表达模式。结果表明, 在蓖麻中共鉴定到 8 个 *RcACA* 基因家族成员, 均是酸性蛋白且定位在细胞质膜; 所有蛋白的二级和三级结构中 α -螺旋和不规则卷曲较多; *RcACA* 基因被聚为 3 类, 同一类别中基因的结构与保守基序相似; 均有典型的 4 个结构域 *RcACA3*-*RcACA8*, 还有 1 个 Ca^{2+} -ATPase N 端自抑制结构域(N-terminal autoinhibitory domain); *RcACA* 基因多位于染色体长臂, 拥有 2 对共线关系。*RcACA* 基因编码区上游拥有较多的光响应作用元件, 激素诱导类作用元件较少。种间聚类显示 ACA 基因在物种间的进化是保守的。组织表达模式分析显示, *RcACA* 基因拥有明显的组织表达特异性, 且多数基因在雄花中表达量最高; 非生物胁迫表达分析表明, *RcACA2*-*RcACA8* 在高盐和干旱胁迫下均上调表达, *RcACA1* 在低温胁迫的 0-24 h 上调表达, 表明 *RcACA* 基因积极地响应非生物胁迫。上述结果为探究 *RcACA* 基因在蓖麻生长发育和逆境胁迫中的作用提供了理论参考。

关键词: 蓖麻; *RcACA* 基因家族; 生物信息学; 非生物胁迫; 表达模式

资助项目: 国家自然科学基金(31860389, 32060492); 内蒙古自治区自然科学基金(2020LH03006, 2022MS03057)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860389, 32060492) and the Natural Science Foundation of the Inner Mongolia Autonomous Region, China (2020LH03006, 2022MS03057).

*Corresponding authors. E-mail: XIANG Dianjun, xiangdianjun00@126.com; LIU Peng, mindaliupeng@126.com

Received: 2022-10-11; Accepted: 2022-12-02; Published online: 2022-12-05

Identification and expression pattern analysis of *RcACA* gene family in castor under abiotic stresses

LI Yanxiao¹, ZHANG Chunlan², GENG Liuting¹, CHEN Yanqiu¹, ZHANG Li¹, XIANG Dianjun^{1*}, LIU Peng^{1*}

1 College of Agriculture Life Science, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

2 College of Life Science and Food Engineering, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028000, Inner Mongolia, China

Abstract: Auto-inhibited Ca^{2+} -ATPase (ACA) is one of the Ca^{2+} -ATPase subfamilies that plays an important role in maintaining Ca^{2+} concentration balance in plant cells. To explore the function and gene expression pattern of the *RcACA* gene family in castor, bioinformatics analysis was used to identify the members of the *RcACA* gene family in castor. The basic physical and chemical properties, subcellular location, protein secondary and tertiary structure, conserved domain, conserved motif, gene structure, chromosome location and collinear relationship, as well as the evolutionary characteristics and promoter *cis*-acting elements were predicted and analyzed. The expression pattern of the *RcACA* gene under abiotic stress was analyzed by expression (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments, FPKM) in castor transcriptome data. The results showed that 8 *RcACA* gene family members were identified in castor, acidic proteins located in the plasma membrane. In the secondary structure of all proteins, the α -helix and random coil is more; the *RcACA* genes were clustered into three categories, and the design of the genes in the same category was similar to the conserved motif. Both of them had four typical domains, *RcACA3*–*RcACA8* had a Ca^{2+} -ATPase N-terminal autoinhibitory domain. The *RcACA* gene is mostly located on the long arm of the chromosome and has 2 pairs of collinear relationships. There are more light response elements but fewer hormone-induced elements located upstream of the *RcACA* coding region. Interspecific clustering showed that the evolution of *ACA* genes among species was conservative. Tissue expression pattern analysis showed that *RcACA* genes showed apparent tissue expression specificity, and most of the genes showed the highest expression level in male flowers. Expression analysis under abiotic stress showed that *RcACA2*–*RcACA8* were up-regulated under high salt and drought stress, and *RcACA1* was up-regulated at 0–24 h under low-temperature stress, indicating that *RcACA* genes positively responded to abiotic stresses. The above results provide a theoretical basis for exploring the role of the *RcACA* gene in castor growth, development and stress response.

Keywords: castor (*Ricinus communis*); *RcACA* gene family; bioinformatics; abiotic stress; expression pattern

高等植物的 Ca^{2+} -ATPase 家族是 P-type ATPase 超家族的第 2 类亚家族, 在植物应对各种刺激如冷、热、渗透、盐和干旱等信号的特异

性反应过程中有着至关重要的作用^[1]。自抑制 Ca^{2+} -ATPase 酶(auto-inhibited Ca^{2+} -ATPase, ACA) 蛋白家族属于 Ca^{2+} -ATPase 家族, 不仅含有 4 个

典型的结构域(E1-E2 ATP 酶, C-末端阳离子 ATP 酶, N-末端阳离子 ATP 酶和卤代酸脱卤酶-like 水解酶), 部分家族成员还拥有一个 N 端自抑制结构域 (Ca^{2+} -ATPase N-terminal autoinhibitory domain)^[2]。已经在紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、水稻(*Oryza sativa*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 和大豆(*Glycine max*)中分别鉴定到 13、12、13 和 24 个 ACA 蛋白家族成员^[3-5], 而它们中多数成员拥有 N 端自抑制结构域。苜蓿的 *MtACA2-MtACA8* 拥有完整的 5 个功能明确的结构域, 而大豆 ACA 家族成员除了 Group IV 中的 *GmACA9*、*GmACA15* 和 *GmACA22* 缺失 N 端自抑制结构域外, 其余的 21 个成员均有 5 个结构域^[5-6]。N 端自抑制结构域是由自抑制蛋白组成, 它与几种受 Ca^{2+} 调控的蛋白相互作用, 在分子内(抑制)和分子间(激活)调节各信号通路之间的串扰, 以响应不同生物及非生物胁迫^[7]。

ACA 基因家族在植物中除了感知 Ca^{2+} 信号外, 还积极响应多种生理作用, 例如花粉的发育、气孔的开/关、生殖及花粉管生长、花序结构和赤霉素信号转导等^[1,8-11]。拟南芥表达谱研究发现, *AtACA2*、*AtACA7*、*AtACA9* 和 *AtACAI1* 在花粉发育阶段高度表达, 其中 *AtACA2*、*AtACA9* 和 *AtACAI1* 则主要在花粉管中表达^[11]。敲除 *AtACA9* 的拟南芥植株与野生植株相比, 花粉量变少、出现半不育性的表型和品质差的花粉。*AtACA8*、*AtACA10* 和 *AtACA13* 还参与植株的营养生长和生殖生长, 其中 *AtACA8* 在种子的早期发育过程中有着重要贡献^[12-13]。除此之外, ACA 基因家族还参与多种非生物胁迫的诱导, 例如过表达水稻 *OsACA6* 的烟草(*Nicotiana tabacum*)与野生型相比, 在盐胁迫下的活性氧含量、过氧化氢酶含量和 Na^+ 浓度均降低, 并提高了烟草对于盐胁迫的耐受性^[14]。*OsACA6* 还拥有冷诱导型启动子, 其表达受冷胁迫诱导, 过表达烟草可提高其

在冷环境中的耐冷性^[15]。*AtACA4* 在 NaCl 胁迫下的拟南芥幼苗中显著上调表达, 而 *AtACA4* 和 *AtACA2* 在酵母中过表达显著增强了菌株的耐盐性, 说明 *AtACA4* 在植株的耐盐过程中有重要作用^[16]。脱落酸(abscisic acid, ABA)处理的拟南芥幼苗中 *AtACA8* 和 *AtACA9* 呈缓慢攀升的表达模式, 并且 *AtACA8* 蛋白在质膜中的积累表明其可能参与 ABA 介导的应激反应^[17]。然而, 迄今为止, 关于蓖麻(*Ricinus communis*) ACA 基因的功能及成员鉴定的研究鲜有报道。

我国内蒙古通辽地区作为蓖麻的重要产区, 耕地的土壤盐渍化面积占可灌溉土地面积的 40%, 且在作物生长季平均最低气温仅 16.1 °C, 这些不利环境严重影响着蓖麻的生长及籽粒的品质^[18-19], 而 ACA 家族基因在应对如低温、盐和干旱胁迫的过程中发挥着重要作用^[14-16]。蓖麻全基因组测序工作的完成成为从基因层面揭示蓖麻重要基因家族的功能奠定了基础^[20-21]。因此, 本研究利用生物信息学手段鉴定蓖麻全基因组中的 *RcACA* 基因家族成员, 分析其成员的序列特征、保守基序和成员间的共线性关系等, 并利用课题组的蓖麻转录组数据筛选 *RcACA* 基因家族成员的 FPKM 表达值, 初步阐述蓖麻 *RcACA* 在非生物胁迫下的表达特征, 以期为深入研究蓖麻 *RcACA* 基因家族在非生物胁迫中的相关功能提供依据。

1 材料与方 法

1.1 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的筛选与基本理化性质分析

首先, 在 Pfam (<https://pfam.xfam.org>) 数据库中下载 ACA 基因家族的特征结构域卤酸脱卤酶样水解酶(haloacid dehalogenase-like hydrolase) (PF00702)、N 端阳离子转运 ATP 酶(cation transporting ATPase N-terminal) (PF00690)、C 端阳离子转运 ATP 酶(Cation transporting ATPase

C-terminal) (PF00689)和 E1-E2 ATP 酶(E1-E2 ATPase) (PF00122)的 HMM 格式文件。其次,在 Oil Plants Database (oilplants.iflora.cn)中下载蓖麻的编码序列(coding sequence, CDS)序列文件、基因组及它的注释文件和蛋白质序列文件。利用本地 HMMER 程序筛选出蓖麻的 *RcACA* 基因家族成员,手动剔除结构域缺失的序列。另外,在 TAIR (<https://www.arabidopsis.org>)网站下载拟南芥 ACA 家族蛋白质,利用本地 BLAST 程序筛选出蓖麻的 *RcACA* 蛋白质,并与 HMMER 结果整合,最终在蓖麻中共筛选出 8 个 *RcACA* 基因家族成员。并利用 ExPASy (<https://www.expasy.org>)和 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>)工具分别对蛋白质的基本理化性质和亚细胞位置进行预测。利用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测 *RcACA* 蛋白质的二级结构。将蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的蛋白质序列提交至 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>),预测 *RcACA* 蛋白质的三级结构。

1.2 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的进化关系及基因结构分析

蓖麻的 8 个 *RcACA* 蛋白质系统发生进化树的构建在 MEGA 11.0 软件上进行可视化操作,bootstrap 值设置成 1 000 次,其他参数默认。将 8 个蛋白质序列提交至 MEME (<https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html>)网站预测蛋白质的保守基序,motifs 数量设置为 10,其他参数默认,保存 xml 格式文件并提交至 Tbtools 进行可视化。利用 NCBI-CD Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)得到家族成员的结构域文件,手动调整结构域文件后提交至 Tbtools 进行可视化处理。最后,利用 Tbtools 展示 *RcACA* 家族成员的结构区,包括 CDS 区及非翻译区(untranslated region, UTR)、保守基序和结构域。

1.3 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员在染色体中的位置及共线性分析

使用 Tbtools 提取蓖麻基因注释文件中 *RcACA* 家族成员的位置及共线性关系信息,并使用 Advanced Circos 可视化结果。

1.4 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的启动子顺式作用元件预测

利用蓖麻的基因注释文件获取 8 个家族成员翻译起始位点上游的 1 500 bp 启动子序列,并提交至 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)网站,手动整理得到交互式信息,仅保留响应类和调控类元件,并利用 Tbtools 及 Excel 软件可视化预测的结果。

1.5 物种间 *RcACA* 基因家族成员的聚类分析

将拟南芥与蓖麻的 ACA 蛋白质序列整理至同一 Fasta 格式文件中,使用 MEGA 11.0 软件比对蛋白质序列,并将可视化结果提交至 iTol (<https://itol.embl.de>)进行美化处理。

1.6 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的表达模式分析

以‘通篦 5 号’为试验材料,将籽粒饱满的蓖麻种子用 75%浓度的酒精消毒 30 s 后,于 28 °C 催芽,4 d 后挑选发芽整齐一致的种子均匀地摆放在 3 个发芽盒(规格 32 cm×25.5cm×12 cm)中,在 25 °C、16 h 光周期[450 μmol/(m²·s)]、相对湿度 70%–75% 的培养箱中培养,待 2 片子叶完全展开后开始浇灌 1/2 Hoagland’s 营养液。长至 4 叶龄时,对幼苗分别进行高盐(300 mmol/L NaCl 溶液)、干旱(10% PEG 6000 模拟干旱)和低温(4 °C)胁迫处理。分别在时间梯度 0、12 和 24 h 剪取真叶组织并迅速存于液氮中速冻,6 h 后转移至-80 °C 冰箱中备用。3 株幼苗的叶片为 1 次生物学重复,每个处理重复 3 次。使用 Total RNA Extractor (生工生物工程(上海)股份有限公司)试剂盒提取植物的总 RNA,使用 Qubit2.0 RNA 检测试剂盒(Life)在 Qubit2.0 荧光计(Invitrogen)上检测 RNA 浓度及纯度。将高盐、

干旱和低温胁迫的 RNA 样品按照时间梯度命名, 依次为 S0-1-S0-3、S12-1-S12-3 和 S24-1-S24-3; P0-1-P0-3、P12-1-P12-3 和 P24-1-P24-3; C0-1-C0-3、C12-1-C12-3 和 C24-1-C24-3。27 个样本的 cDNA 文库构建、质控和测序(Illumina Novaseq 6000)部分由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。根据 RNA-Seq 数据调取 *RcACA* 基因的胁迫表达量数据, 取 3 次数据的平均值; 并下载 Brown 等^[22]蓖麻的 RNA-Seq 原始数据, 经质控后筛选 *RcACA* 基因的组织表达量。

2 结果与分析

2.1 蓖麻 *RcACA* 家族成员信息及理化性质

在蓖麻全基因组中鉴定到 8 个 *RcACA* 家族

成员, 根据其在染色体上的位置, 依次命名为 *RcACA1*–*RcACA8*, 并分析蛋白质的基本理化性质(表 1)。蓖麻 *RcACA* 基因的 CDS 长度为 2 863 bp (*RcACA1*)–3 477 bp (*RcACA2*); 所推导的氨基酸长度在 956 aa (*RcACA1*)–1 161 aa (*RcACA2*)之间; 跨膜域的数量为 6–8 个; 分子量在 103.97 kDa (*RcACA1*)–126.12 kDa (*RcACA2*)之间; 理论等电点在 5.05 (*RcACA6*)–6.85 (*RcACA7*)之间, 均是酸性蛋白质(pI<7); *RcACA*s 蛋白质的亚细胞预测结果表明均定位在细胞质膜。*RcACA*s 蛋白质的二级、三级结构预测显示(表 2, 图 1), *RcACA2* 的 α -螺旋最多, β -折叠、延伸链和不规则卷曲较少, 分别占比为 51.31%、5.87%、15.67%和 27.15%。

表 1 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员信息

Table 1 Information about the *RcACA* gene family members of castor

Gene ID	Gene name	CDS length (bp)	Amino acids (aa)	Subcellular location	Number of membrane spanning domain	Molecular weight (kDa)	pI
Rc01T000864.1	<i>RcACA1</i>	2 863	956	Plasma membrane	6	103.97	6.28
Rc02T004471.2	<i>RcACA2</i>	3 477	1 161	Plasma membrane	8	126.12	5.59
Rc02T004494.1	<i>RcACA3</i>	3 104	1 035	Plasma membrane	8	111.79	5.89
Rc03T006907.1	<i>RcACA4</i>	3 170	1 058	Plasma membrane	7	113.92	6.31
Rc04T009215.3	<i>RcACA5</i>	3 268	1 091	Plasma membrane	7	117.32	6.59
Rc07T015286.1	<i>RcACA6</i>	3 234	1 079	Plasma membrane	8	116.60	5.05
Rc07T015945.1	<i>RcACA7</i>	3 158	1 054	Plasma membrane	8	114.10	6.85
Rc10T022747.1	<i>RcACA8</i>	3 360	1 121	Plasma membrane	7	120.65	5.77

表 2 蓖麻 *RcACA* 蛋白质的二级结构

Table 2 Secondary structure of the *RcACA* protein of castor

Protein ID	α -helix (%)	Extended strand (%)	β -sheet (%)	Random coil (%)
<i>RcACA1</i>	42.77	19.36	6.91	30.96
<i>RcACA2</i>	51.31	15.67	5.87	27.15
<i>RcACA3</i>	44.65	19.04	6.87	29.44
<i>RcACA4</i>	43.23	19.50	6.15	31.12
<i>RcACA5</i>	43.52	18.36	6.24	31.87
<i>RcACA6</i>	44.44	17.42	6.03	32.11
<i>RcACA7</i>	43.46	19.00	7.52	29.99
<i>RcACA8</i>	45.33	19.13	6.89	28.65

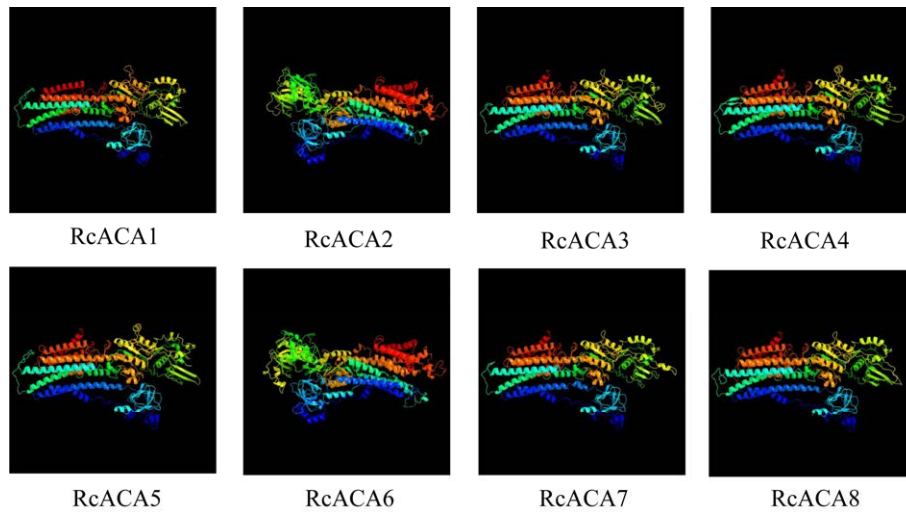


图1 蓖麻 *RcACA* 蛋白质的三级结构

Figure 1 Tertiary structure of the *RcACA* protein of castor.

2.2 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的进化关系与基因结构分析

进化树结果显示(图 2), 8 个 *RcACA* 蛋白共被聚为 3 组, 其中 *RcACA1*、*RcACA4* 和 *RcACA5* 为 Group I, *RcACA3*、*RcACA7* 和 *RcACA8* 为 Group II, *RcACA2* 和 *RcACA6* 为 Group III, 另外这 3 组中的 *RcACA4* 和 *RcACA5*、*RcACA3* 和 *RcACA7/RcACA8*、*RcACA2* 和 *RcACA6* 的步长值为 100%, 说明 *RcACAs* 蛋白质在进化过程中保守, 进化树构建结果合理。Motifs 及结构域的预测结果显示(图 2), motif 1–motif 10 在 *RcACA* 蛋白质中保守, 除 Group II 中的 *RcACA2* 和 *RcACA6* 蛋白缺失 motif 9 外, 其余 *RcACAs* 均有 motif 1–motif 10; 此外, *RcACAs* 蛋白质均含有 *ACA* 家族成员特有的 4 个结构域(E1-E2 ATP 酶, C-末端阳离子 ATP 酶, N-末端阳离子 ATP 酶和卤酸脱卤酶样水解酶), 另外 *RcACA3*、*RcACA4*、*RcACA5*、*RcACA7* 和 *RcACA8* 还拥有 Ca^{2+} -ATPase N-端自抑制结构域, 这种差异形成的原因可能与 *RcACA* 蛋白质的功能相关。而且, Group II 的 *RcACA2* 和 *RcACA6* 的 E1-E2 ATP 酶结构域中缺失 motif 9, 这可能导致该结构域部分功能的丧失, 部分 motif 1 存于 E1-E2 ATP

酶结构域中, 并与 motif 6 和 motif 7 共同组成 E1-E2 ATP 酶结构域的功能; motif 2 均不在这 5 个结构域的功能区内, 且所有 *RcACA* 蛋白质共享 motif 2, 说明这些蛋白质在功能上有一定的相似性。综上所述, motif 和结构域在不同 Group 分布的多样性预示着 *RcACA* 蛋白质在功能上具有多样性。蓖麻 *RcACA* 的基因结构图显示这些基因结构有差异, 同处于 Group II 的 *RcACA3*、*RcACA7* 和 *RcACA8* 基因的内含子组成及分布相似, 说明这 3 个蛋白质是保守进化的(图 2)。

2.3 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员在染色体上的位置及共线性关系

根据基因位置文件信息绘制 *RcACA1*–*RcACA8* 的染色体定位图(图 3), 结果显示, *RcACAs* 成员分布在染色体长臂居多, 其中 *RcChr2* 和 *RcChr7* 拥有 2 个 *RcACAs* 基因, 而 *RcChr1*、*RcChr3*、*RcChr4* 和 *RcChr10* 仅有 1 个 *RcACA* 基因, 其余染色体上无家族成员分布。进一步分析发现, *RcACAs* 基因家族成员中有两对基因存在共线性关系, 分别是位于 *RcChr3* 的 *RcACA4* 和位于 *RcChr4* 的 *RcACA5* 以及位于 *RcChr7* 的 *RcACA7* 和位于 *RcChr10* 的 *RcACA8*, 说明 *RcACAs* 基因在进化过程中存在基因间的片段复制现象。

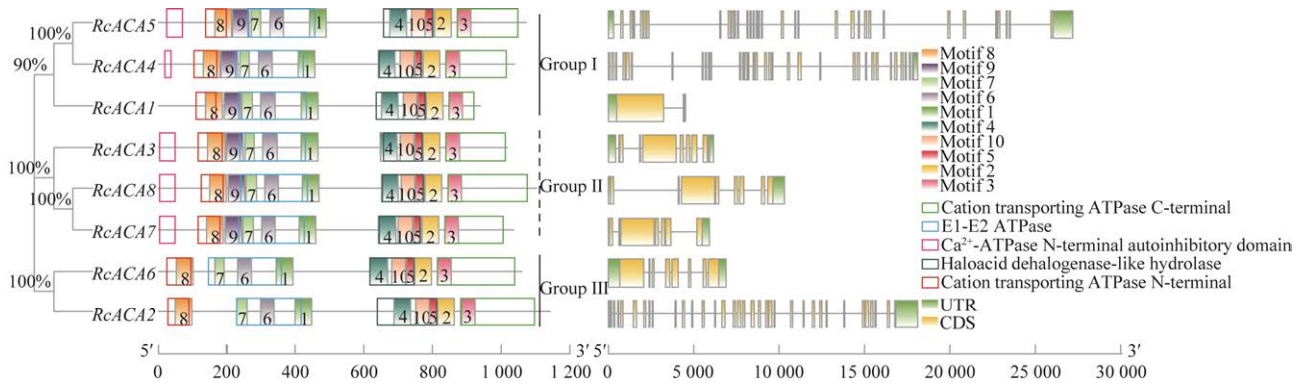


图2 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的进化关系及基因结构

Figure 2 The evolutionary relationship and structure of *RcACA* gene family members in castor.

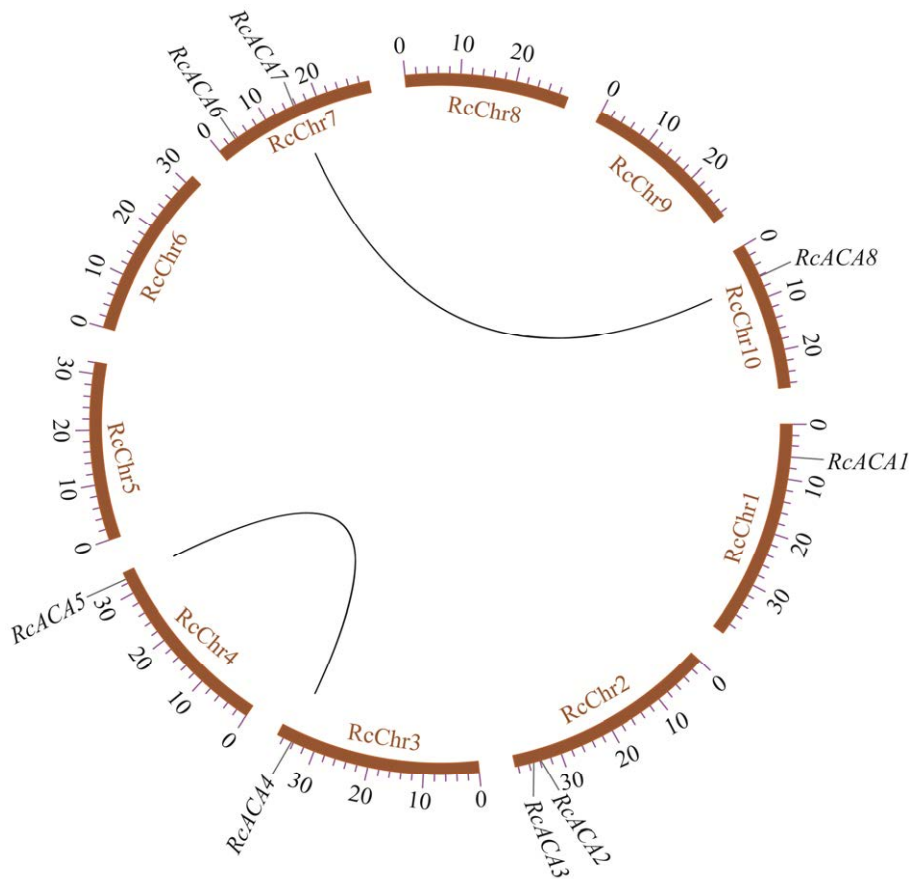


图3 *RcACA* 基因的位置及基因间共线性关系

Figure 3 The location and collinearity of the *RcACA* gene.

2.4 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的启动子顺式作用元件分析

分析启动子顺式作用元件,可以了解调控基

因表达的诱导因素,进而了解基因功能。对 *RcACA* 全部顺式作用元件的数量及位点进行统计分析发现(图4),*RcACA2* 和 *RcACA6* 是启动子

顺式作用元件数量最多的成员, *RcACA3* 和 *RcACA8* 是启动子顺式作用元件数量最少的成员, 并且 *RcACA8* 除了光响应元件外仅有 1 个低温响应元件和 1 个脱落酸响应元件, 说明不同的 *RcACA* 对逆境胁迫和激素处理等的应答有区别。在这些顺式作用元件中, 光响应元件数量最多, 有 59 个, 占比为 55.2%; 激素响应元件 25 个, 占比为 23.3%; 胁迫响应元件 23 个, 占比为 21.5% (图 4B)。其中 *RcACA4* 启动子序列中的顺式作用元件种类最丰富, 仅缺少防御和胁迫响应元件和新陈代谢元件, 说明 *RcACA4* 可能在蓖麻的冷胁迫响应过程中作用很小; 另外, *RcACA4* 和 *RcACA7* 启动子序列中均有 2 个干旱胁迫响应元件, 可能它们积极应答干旱胁迫; *RcACA3* 同 *RcACA4* 启动子区域均有 1 个昼夜节律控制元件, 表明它们可能响应冷胁迫。以上结果表明, *RcACA* 基因家族的表达可能响应多种逆境, 受多种激素调控, 而光在 *RcACA* 基因表达调控的过程中可能扮演着重要角色。

2.5 蓖麻和拟南芥 *ACA* 基因家族成员的聚类分析

蓖麻(8个)与拟南芥 *ACA*(13个)家族成员的

聚类结果显示(图 5), 21 个 *ACA* 蛋白质共被聚为 4 类(Group I-Group IV), 其中 9 对蛋白质间的步长值是 100%, 足以说明该进化树构建合理。此外, 位于 Group I 的 *RcACA6*-*AtACA1*、Group IV 的 *RcACA1*-*AtACA12* 和 *RcACA5*-*AtACA9* 蛋白质相似性是 100%, 说明这些蛋白质的功能基本相同。

2.6 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的表达分析

2.6.1 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的组织表达模式分析

根据 GEO 数据库信息绘制 *RcACA* 基因的组织表达模式热图。结果显示(图 6), *RcACA* 基因在胚乳中、萌芽的种子中、叶片和雄花中均有表达, 而多数基因在雄花中的表达量较高, 表明 *RcACA* 家族基因可能参与雄花的建成, 此外, *RcACA8* 在叶片中的表达量高于雄花, 表明 *RcACA8* 可能在不利环境中提高在叶片中的表达量来增强植株的抗逆性, 而 *RcACA1* 在萌芽的种子中表达出现峰值, 说明该基因在种子萌发时期有重要作用。*RcACA1*-*RcACA8* 拥有明显的组织表达特异性, 在蓖麻生长发育的不同时期均有作用。

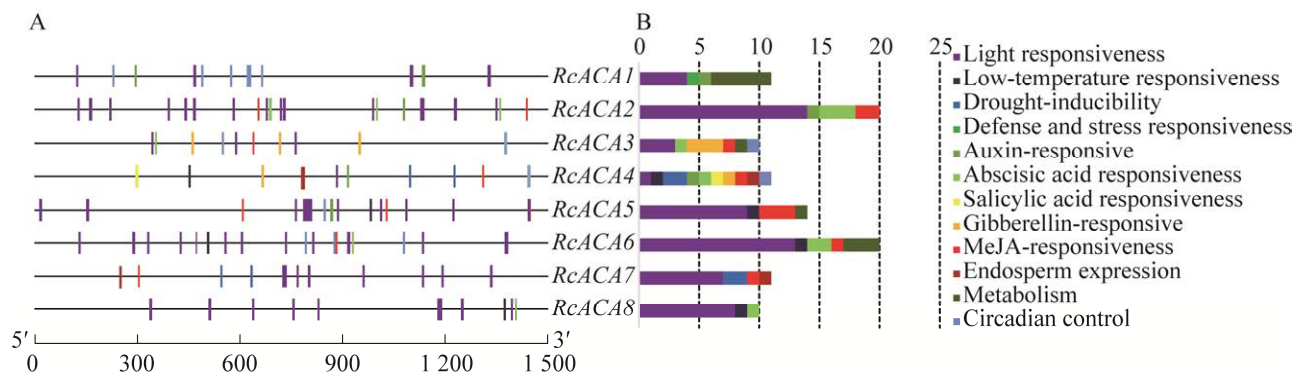


图 4 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员的启动子顺式作用元件预测 A: 启动子顺式作用元件的位置. B: 启动子顺式作用元件的数量

Figure 4 Prediction of promoter *cis*-acting elements of the *RcACA* gene family members in castor. Position (A) and number (B) of promoter *cis*-acting element.

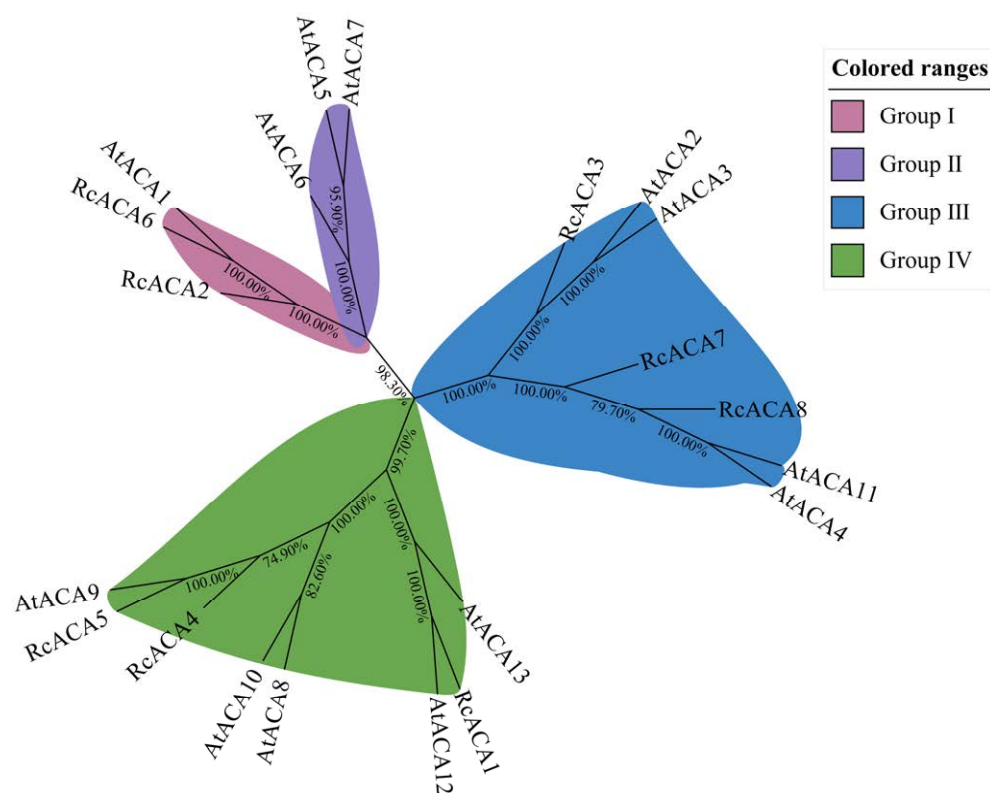


图5 蓖麻和拟南芥 *ACA* 基因家族成员的聚类分析

Figure 5 Cluster analysis of the *ACA* gene family members in castor and *Arabidopsis thaliana*.

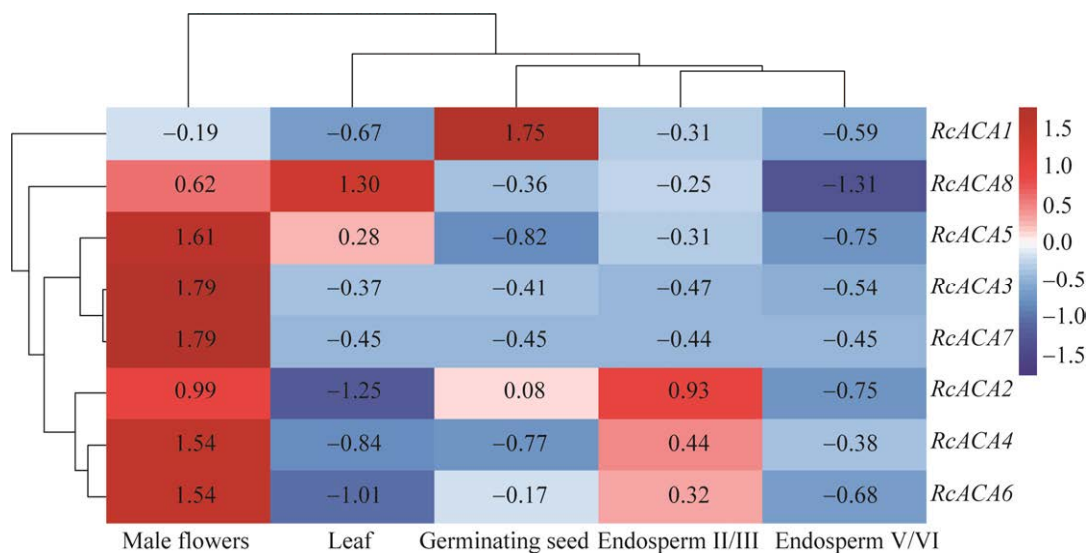


图6 蓖麻 *RcACA* 基因组织表达模式

Figure 6 Tissue expression profile of the *RcACA* genes in castor.

2.6.2 蓖麻 *RcACA* 基因家族成员在非生物胁迫下的表达模式分析

RcACA 基因的胁迫表达分析显示(图7), 这

些基因对高盐和干旱胁迫的敏感程度远高于低温胁迫。*RcACA2*–*RcACA8* 均在高盐和干旱胁迫下上调表达, 且 *RcACA7* 在高盐胁迫的 0–24 h

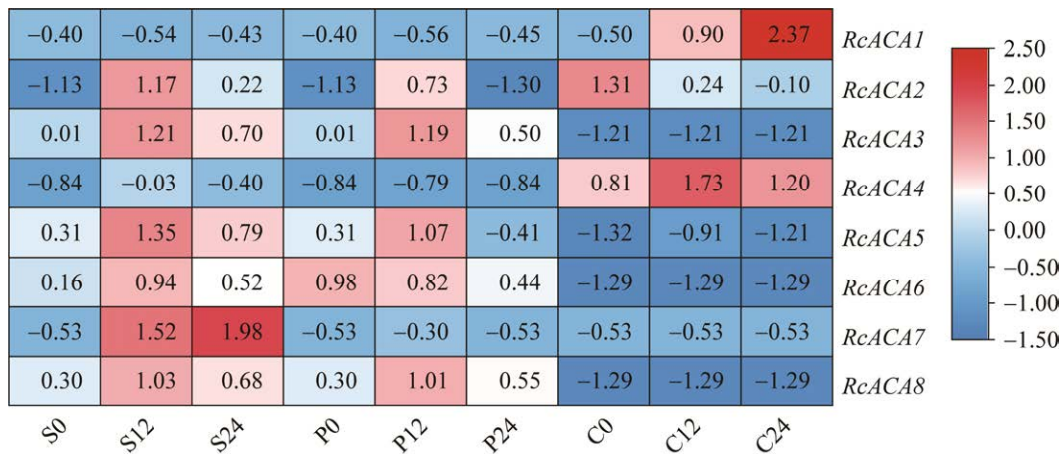


图7 蓖麻 *RcACA* 基因胁迫表达模式 S、P 和 C 分别代表 NaCl 胁迫、PEG 胁迫和 4 °C 胁迫；0、12 和 24 代表胁迫时间

Figure 7 Expression pattern of the *RcACA* gene in castor under stress. S, P and C represent NaCl stress, PEG stress and 4 °C stress, respectively; 0, 12 and 24 represent stress time.

均上调表达,说明该基因可能在蓖麻的耐盐机制中发挥着作用。*RcACA6* 在干旱胁迫的 0–24 h 均下调表达,表明该基因可作为研究蓖麻 *ACA* 家族基因在干旱胁迫作用中的靶基因。*RcACA1* 虽然对高盐和干旱胁迫不敏感,但是它在低温胁迫的 0–24 h 是上调表达的; *RcACA2* 在低温胁迫的 0–24 h 是持续下调表达的;说明这两个基因极有可能在低温环境中发挥作用。综上所述, *RcACA* 基因能够积极地响应非生物胁迫并表达。

3 讨论与结论

Ca^{2+} 在植物的生长、成花和授粉等方面有着突出贡献,因此维持植株的 Ca^{2+} 浓度就显得尤为重要, Ca^{2+} -ATPase 是调节体内 Ca^{2+} 含量的重要蛋白质家族^[1,23]。目前, Ca^{2+} -ATPase 家族在水稻和拟南芥中被大量研究,特别是自抑制 Ca^{2+} -ATPase 酶(auto-inhibited Ca^{2+} -ATPase, ACA) 蛋白质家族的研究相对透彻,多数成员被克隆出来并分析其功能^[3,14]。本研究在蓖麻的全基因组中共鉴定到 8 个 *ACA* 家族成员,成员数量少于

大豆、大白菜(*Brassica rapa pekinensis*)、茄子(*Solanum melongena*)和辣椒(*Capsicum annuum*)等作物^[4,24-25],说明蓖麻基因组在进化过程中的扩增并没有增加 *ACA* 成员的数量。大豆中存在多个 Ca^{2+} -ATPase 的旁系同源基因,基因复制现象频发^[4],模式植物水稻中也仅有 2 对同源基因,我们的研究发现 *RcACA* 也存有 2 对同源基因(图 3),说明 *RcACA* 基因在进化过程中是钝化的,十分保守,而且均是长片段蛋白质,这与拟南芥 *ACA* 蛋白质长度相似^[3];另外, *RcACA* 蛋白质的亚细胞预测结果显示,所有家族成员均定位在细胞质膜,符合该蛋白质家族的亚细胞定位特征^[24,26](表 1)。

本研究将 8 个 *RcACA* 基因共聚为 3 类(图 2),比 *AtACA* 少 1 类(图 5), Group II 中并无 *RcACA* 成员分布^[6]。*RcACA* 蛋白质的结构域预测结果显示(图 2),有 5 个成员拥有 N 端自抑制结构域,所占比例与大豆和大白菜 *ACA* 家族相似^[4,24];对保守域深入分析发现(图 2),E1-E2 ATP 酶结构域不但拥有保守的 motif 6 和 motif 7 外,而且 C

端还包括一小段保守的 motif 1 (D-K-T-G-T-L-T), 说明这段基序可能在此结构域中具有重要功能, 这与前人研究结果一致^[24]; 另外, 虽然 *RcACAs* 基因的组成结构差异很大, 但同组中的结构组成相似(图 2), 且前人研究表明, *ACA* 家族成员的结构组成是不均一的, Group III 中的内含子数量丰富^[14]。

研究发现, Ca^{2+} -ATPase 家族在果实的生长及发育过程中发挥重要作用, 而 *ACA* 作为受 Ca^{2+} 调控的基因家族, 其部分成员的表达会影响果实的发育^[25]。大白菜的 *Bra024117* 和 *Bra003276* 在花期表达量较高, 与自交授粉后的花中表达量保持一致^[24]; 拟南芥 *AtACA9* 和 *AtACA11* 也在花粉发育阶段高表达, 并且敲除 *AtACA9* 的突变植株出现败育现象^[11], 这些结果均说明了 *ACA* 基因家族在成花及种子发育过程中的作用。*RcACA* 的组织表达分析表明(图 6), 多个 *RcACA* 基因在雄花中高水平表达, 说明 *RcACA* 在雄花的发育过程中有重要作用。

研究表明, *ACA* 家族基因在植物应对非生物胁迫的过程中发挥着重要作用^[26-29]。在水稻中, *OsACA6* 对多种胁迫有反应, 包括 ABA、热、盐和干旱胁迫^[14]; *OsACA5* 在盐胁迫和干旱胁迫下表达量显著上升, 但在低温胁迫下表达量无明显变化^[30]; 而 *OsACA3* 和 *OsACA7* 则在低温胁迫下表达显著增加^[31]。在拟南芥中, *AtACA2* 异源表达酵母菌株 K616 可以增强其在高盐 (300 mmol/L NaCl) 胁迫中的存活率, 而 K616 在正常情况下不能承受超 Na^+ 胁迫, 表明 *AtACA2* 是耐盐基因^[16], *RcACA3* 与 *AtACA2* 处于同一分支(图 5), 并且在高盐胁迫的 0–24 h 是上调表达的(图 7), 这与前人研究结果相似; 在干旱胁迫处理下的幼苗中 *AtACA9* 表达量激增, 但对冷胁迫不敏感^[17], 与 *AtACA9* 处于同一分支的 *RcACA5* 在盐和干旱胁迫下上调表达, 在冷胁迫

下不表达(图 5, 图 7), 这与前人研究结果一致。在苜蓿草中过表达大豆的 *GsACA1* 基因可以增强苜蓿的耐盐性^[4], 而苜蓿 *MtACA8* 基因在冷害和冻害胁迫下的表达量远高于盐和干旱胁迫^[5], 因为 *MtACA8* 启动子区域拥有 3 个冷响应而无干旱和盐响应作用元件。蓖麻 *RcACAs* 启动子区域有多种胁迫响应元件和激素调控元件(图 4), 如 *RcACA1* 中无干旱和盐胁迫响应元件, 有 5 个与低温诱导型作用元件, 因此其对于干旱和盐胁迫不敏感, 而在低温胁迫的 0–24 h 持续上调表达, 说明该基因是受低温诱导的, 并且在种子发育阶段发挥作用(图 6); *RcACA4* 有 2 个与低温诱导型作用元件, 虽在低温胁迫处理下上调表达, 但表达量比 *RcACA1* 低且响应持续时间比 *RcACA1* 要短, 因此, *RcACA1* 可以作为研究蓖麻 *RcACA* 在低温胁迫应答过程中的优异靶标; 拥有 2 个干旱胁迫响应元件的 *RcACA7* 在干旱胁迫的 0–24 h 是持续上调表达的, 并有可能参与蓖麻雄花的发育, 说明 *RcACA7* 可作为研究蓖麻 *RcACA* 在干旱胁迫应答过程中的靶标基因。而基因的表达水平受光照调控^[32], 这些 *RcACA* 中的光响应元件数量最多, 且光响应启动子数量最多的 *RcACA2* 在低温胁迫下持续下调表达, 而在干旱和盐胁迫的 0–12 h 上调表达, 说明这些基因积极地响应非生物胁迫, 但它们的抗非生物胁迫机制还需进一步研究。上述结果将有助于阐明蓖麻 *RcACA* 在非生物胁迫过程中的作用, 为后续研究 *RcACA* 基因在非生物胁迫的应答机制提供了一定的理论依据。

REFERENCES

- [1] BOSE J, POTTOSIN II, SHABALA SS, PALMGREN MG, SHABALA S. Calcium efflux systems in stress signaling and adaptation in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2011, 2: 85.
- [2] PEDERSEN CNS, AXELSEN KB, HARPER JF,

- PALMGREN MG. Evolution of plant p-type ATPases[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2012, 3: 31.
- [3] BAXTER I, TCHIEU J, SUSSMAN MR, BOUTRY M, PALMGREN MG, GRIBSKOV M, HARPER JF, AXELSEN KB. Genomic comparison of p-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 618-628.
- [4] SUN MZ, JIA BW, CUI N, WEN YD, DUANMU HZ, YU QY, XIAO JL, SUN XL, ZHU YM. Functional characterization of a *Glycine soja* Ca²⁺ ATPase in salt-alkaline stress responses[J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 90(4): 419-434.
- [5] 张美萍, 杨珺凯, 孙明哲, 贾博为, 孙晓丽. 基于家族分析的苜蓿逆境应答 Ca²⁺ ATPase 家族基因筛选与鉴定[J]. *植物生理学报*, 2017, 53(2): 198-208. ZHANG MP, YANG JK, SUN MZ, JIA BW, SUN XL. Screening and identification of environmental stress responsive *Medicago sativa* Ca²⁺ ATPases based on gene family analyses[J]. *Plant Physiology Journal*, 2017, 53(2): 198-208 (in Chinese).
- [6] KAMRUL HUDA KM, YADAV S, AKHTER BANU MS, TRIVEDI DK, TUTEJA N. Genome-wide analysis of plant-type II Ca²⁺ ATPases gene family from rice and *Arabidopsis*: potential role in abiotic stresses[J]. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 2013, 65: 32-47.
- [7] TIDOW H, POULSEN LR, ANDREEVA A, KNUDSEN M, HEIN KL, WIUF C, PALMGREN MG, NISSEN P. A bimodular mechanism of calcium control in eukaryotes[J]. *Nature*, 2012, 491(7424): 468-472.
- [8] SCHIØTT M, ROMANOWSKY SM, BAEKGAARD L, JAKOBSEN MK, PALMGREN MG, HARPER JF. A plant plasma membrane Ca²⁺ pump is required for normal pollen tube growth and fertilization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(25): 9502-9507.
- [9] GEORGE L, ROMANOWSKY SM, HARPER JF, SHARROCK RA. The ACA10 Ca²⁺-ATPase regulates adult vegetative development and inflorescence architecture in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(2): 716-728.
- [10] WANG Y, ITAYA A, ZHONG XH, WU Y, ZHANG JF, van der KNAAP E, OLMSTEAD R, QI YJ, DING B. Function and evolution of a microRNA that regulates a Ca²⁺-ATPase and triggers the formation of phased small interfering RNAs in tomato reproductive growth[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(9): 3185-3203.
- [11] LUCCA N, LEÓN G. *Arabidopsis* ACA7, encoding a putative auto-regulated Ca(2+)-ATPase, is required for normal pollen development[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(4): 651-659.
- [12] ZHANG J, ZHANG XD, WANG RP, LI WQ. The plasma membrane-localised Ca²⁺-ATPase ACA8 plays a role in sucrose signalling involved in early seedling development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(5): 755-766.
- [13] GARCÍA BOSSI J, KUMAR K, BARBERINI ML, DOMÍNGUEZ GD, RONDÓN GUERRERO YDC, MARINO-BUSLJE C, OBERTELLO M, MUSCHIETTI JP, ESTEVEZ JM. The role of P-type IIA and P-type IIB Ca²⁺-ATPases in plant development and growth[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(4): 1239-1248.
- [14] HUDA KMK, BANU MSA, GARG B, TULA S, TUTEJA R, TUTEJA N. OsACA6, a P-type IIB Ca²⁺ATPase promotes salinity and drought stress tolerance in tobacco by ROS scavenging and enhancing the expression of stress-responsive genes[J]. *The Plant Journal*, 2013, 76(6): 997-1015.
- [15] KAMRUL HUDA KM. Salinity and drought tolerant OsACA6 enhances cold tolerance in transgenic tobacco by interacting with stress-inducible proteins[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 82: 229-238.
- [16] ANIL VS, RAJKUMAR P, KUMAR P, MATHEW MK. A plant Ca²⁺ pump, ACA2, relieves salt hypersensitivity in yeast. Modulation of cytosolic calcium signature and activation of adaptive Na⁺ homeostasis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(6): 3497-3506.
- [17] CERANA M, BONZA MC, HARRIS R, SANDERS D, de MICHELIS MI. Abscisic acid stimulates the expression of two isoforms of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. *Plant Biology*, 2006, 8(5): 572-578.
- [18] BEN HASSEN TRABELSI A, ZAAFOURI K, BAGHDADI W, NAOUI S, OUERGHI A. Second generation biofuels production from waste cooking oil via pyrolysis process[J]. *Renewable Energy*, 2018, 126: 888-896.
- [19] TAO ZX, HUANG WJ, WANG HJ. Soil moisture outweighs temperature for triggering the green-up date in temperate grasslands[J]. *Theoretical and Applied Climatology*, 2020, 140(3): 1093-1105.
- [20] CHAN AP, CRABTREE J, ZHAO Q, LORENZI H, ORVIS J, PUIU D, MELAKE-BERHAN A, JONES

- KM, REDMAN J, CHEN G, CAHOON EB, GEDIL M, STANKE M, HAAS BJ, WORTMAN JR, FRASER-LIGGETT CM, RAVEL J, RABINOWICZ PD. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(9): 951-956.
- [21] XU W, WU D, YANG TQ, SUN C, WANG ZQ, HAN B, WU SB, YU AM, CHAPMAN MA, MURAGURI S, TAN Q, WANG WB, BAO ZG, LIU AZ, LI DZ. Genomic insights into the origin, domestication and genetic basis of agronomic traits of castor bean[J]. Genome Biology, 2021, 22(1): 113.
- [22] BROWN AP, KROON JTM, SWARBRECK D, FEBRER M, LARSON TR, GRAHAM IA, CACCAMO M, SLABAS AR. Tissue-specific whole transcriptome sequencing in castor, directed at understanding triacylglycerol lipid biosynthetic pathways[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30100.
- [23] GIFFORD JL, WALSH MP, VOGEL HJ. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca^{2+} -binding helix-loop-helix EF-hand motifs[J]. The Biochemical Journal, 2007, 405(2): 199-221.
- [24] 王洁, 吴晓宇, 杨柳, 段巧红, 黄家保. 大白菜 *ACA* 基因家族的全基因组鉴定与表达分析[J]. 中国农业科学, 2021, 54(22): 4851-4868.
WANG J, WU XY, YANG L, DUAN QH, HUANG JB. Genome-wide identification and expression analysis of *ACA* gene family in *Brassica rapa*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(22): 4851-4868 (in Chinese).
- [25] 刘宇欣, 束艺, 张念, 陈秀玲, 王傲雪. 茄科植物 Ca^{2+} -ATPase 基因家族鉴定及分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(13): 4268-4277.
LIU YX, SHU Y, ZHANG N, CHEN XL, WANG AX. Identification and analysis of Ca^{2+} -ATPase gene family in Solanaceae[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(13): 4268-4277 (in Chinese).
- [26] 周君, 肖伟, 陈修德, 高东升, 李玲. 外源钙对‘黄金梨’叶片光合特性及果实品质的影响[J]. 植物生理学报, 2018, 54(3): 449-455.
ZHOU J, XIAO W, CHEN XD, GAO DS, LI L. Effect of exogenous calcium on leaf photosynthetic characteristics and fruit quality of ‘Whangkeumbae’ pear[J]. Plant Physiology Journal, 2018, 54(3): 449-455 (in Chinese).
- [27] BAEKGAARD L, LUONI L, de MICHELIS MI, PALMGREN MG. The plant plasma membrane Ca^{2+} pump ACA8 contains overlapping as well as physically separated autoinhibitory and calmodulin-binding domains[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(2): 1058-1065.
- [28] YANG X, WANG SS, WANG M, QIAO Z, BAO CC, ZHANG W. *Arabidopsis thaliana* calmodulin-like protein CML24 regulates pollen tube growth by modulating the actin cytoskeleton and controlling the cytosolic Ca^{2+} concentration[J]. Plant Molecular Biology, 2014, 86(3): 225-236.
- [29] 史晓龙, 张智猛, 戴良香, 张冠初, 慈敦伟, 丁红, 田家明. 外源施钙对盐胁迫下花生营养元素吸收与分配的影响[J]. 应用生态学报, 2018, 29(10): 3302-3310.
SHI XL, ZHANG ZM, DAI LX, ZHANG GC, CI DW, DING H, TIAN JM. Effects of calcium fertilizer application on absorption and distribution of nutrients in peanut under salt stress[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2018, 29(10): 3302-3310 (in Chinese).
- [30] SINGH A, KANWAR P, YADAV AK, MISHRA M, JHA SK, BARANWAL V, PANDEY A, KAPOOR S, TYAGI AK, PANDEY GK. Genome-wide expressional and functional analysis of calcium transport elements during abiotic stress and development in rice[J]. The FEBS Journal, 2014, 281(3): 894-915.
- [31] SHANKAR A. Whole genome transcriptome analysis of rice seedling reveals alterations in Ca^{2+} ion signaling and homeostasis in response to Ca^{2+} deficiency[J]. Cell Calcium, 2014, 55(3): 155-165.
- [32] 倪子鑫, 武清扬, 杨云, 邓慧莉, 周子维, 赖钟雄, 孙云. 茶树 *CsCCD* 基因家族全基因组鉴定及乌龙茶 LED 补光晾青下表达分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(1): 359-373.
NI ZX, WU QY, YANG Y, DENG HL, ZHOU ZW, LAI ZX, SUN Y. Genome-wide identification of *CsCCD* gene family in tea plant (*Camellia sinensis*) and expression analysis of the oolong tea processing with supplementary LED light[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(1): 359-373 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)