假俭草 NRATI 基因生物信息学和表达特性分析

徐 鑫^{1,2}, 王浩然², 张 苓², 李晓慧², 张 兵¹, 郭海林², 李建建^{2,①}

[1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009; 2. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 国家林业和草原局暖季型草坪草种质创新与利用工程技术研究中心, 江苏 南京 210014]

摘要: 为探析 NRATI 基因在假俭草[Eremochloa ophiuroides (Munro) Hack.] 耐铝分子机制中的作用,本研究基于假俭草全长转录组测序数据,采用 PCR 和 RACE 技术从假俭草耐铝基因型品系 E105 中克隆到 1 个 NRATI 基因,命名为 EoNRATI,并对其进行了生物信息学分析;同时,采用 qRT-PCR 技术对 1.0 mmol·L⁻¹Al³⁺胁迫 48 h 内假俭草根、茎和叶中该基因的相对表达量进行了比较。结果显示: EoNARTI 基因开放阅读框(ORF)长度为 1 614 bp,编码538 个氨基酸。EoNARTI 蛋白的理论相对分子质量约 58 430,理论等电点为 pI 7.03,不稳定指数为 30.98,疏水性氨基酸占比达 67.2%,且包含 10 个跨膜区。并且,EoNARTI 蛋白主要定位于质膜、液泡和内质网,其二级和三级结构均以 α-螺旋和无规卷曲为主。氨基酸序列比对结果显示: EoNRATI 与柳枝稷(Panicum virgatum Linn.) NRATI 的序列一致性达 84.53%。系统进化分析结果显示: EoNRATI 与柳枝稷 NRATI 首先聚在一起,并与硬直黑麦草(Lolium rigidum Gaud.)等 10 种植物的 NRATI 聚为一个分支,而二穗短柄草[Brachypodium distachyon (Linn.) P. Beauv.]等 6 种植物的 Nramp5 聚为另一个分支。qRT-PCR 分析结果显示: 胁迫 48 h 内 EoNRATI 基因在假俭草根、茎和叶中均有表达;胁迫 12 和 24 h,该基因在根和叶中的相对表达量显著高于胁迫 0 h;胁迫 48 h,该基因在根中的相对表达量仍保持在较高水平,但在叶中的相对表达量降至胁迫 0 h 水平。研究结果显示: EoNRATI 蛋白为一种稳定的疏水性膜蛋白,可能参与假俭草对铝胁迫的应答反应。

关键词: 假俭草; EoNRAT1 基因; 基因克隆; 生物信息学分析; 表达特性

中图分类号: Q943.2; Q786; S548 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2023)02-0038-09 DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2023.02.05

Analyses on bioinformatics and expression characteristics of *NRAT1* gene from *Eremochloa ophiuroides* XU Xin^{1,2}, WANG Haoran², ZHANG Ling², LI Xiaohui², ZHANG Bing¹, GUO Hailin², LI Jianjian^{2, ①} [1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Warm-Season Turfgrass Germplasm Innovation and Utilization Engineering Technology Research Center of National Forestry and Grassland Administration, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China], *J. Plant Resour.* & *Environ.*, 2023, 32(2); 38–46

Abstract: In order to explore the role of *NRAT1* gene in aluminum-tolerant molecular mechanism of *Eremochloa ophiuroides* (Munro) Hack., one *NRAT1* gene was cloned from aluminum-tolerant genotype strain E105 of *E. ophiuroides* by using PCR and RACE technologies based on full-length transcriptome sequencing data of *E. ophiuroides* and named *EoNRAT1*, and bioinformatics analysis was performed for this gene; meanwhile, relative expression levels of *EoNRAT1* gene in root, stem, and leaf of *E. ophiuroides* under 1.0 mmol · L⁻¹Al³⁺ stress within 48 h were compared by using qRT-PCR technology. The results show that the length of open reading frame (ORF) of *EoNART1* gene is 1 614 bp, encoding 538 amino acids. The theoretical relative molecular mass of EoNART1 protein is about 58 430, the

收稿日期: 2022-07-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072608); 江苏省植物资源研究与利用重点实验室开放基金项目(JSPKLB201841)

作者简介:徐 鑫(1997—),男,江苏南通人,硕士研究生,主要从事假俭草耐铝性研究。

①通信作者 E-mail: lijianjian2015@ cnbg. net

引用格式:徐 鑫,王浩然,张 苓,等. 假俭草 NRATI 基因生物信息学和表达特性分析[J]. 植物资源与环境学报,2023,32(2):38-46.

theoretical isoelectric point is pI 7.03, the instability index is 30.98, the hydrophobic amino acids account for 67.2%, and this protein contains 10 transmembrane domains. Moreover, EoNART1 protein is mainly located in plasma membrane, vacuole, and endoplasmic reticulum, its secondary and tertiary structures mainly consist of α-helix and random coil. The alignment result of amino acid sequence shows that the sequence identity between EoNRAT1 and NRAT1 from Panicum virgatum Linn. reaches 84.53%. The phylogenetic analysis result shows that EoNRAT1 and NRAT1 from P. virgatum are first clustered together, and clustered into one clade with NRAT1 from 10 species such as Lolium rigidum Gaud., while Nramp5 from 6 species such as Brachypodium distachyon (Linn.) P. Beauv. are clustered into the other clade. The qRT-PCR analysis result shows that EoNRAT1 gene is expressed in root, stem, and leaf of E. ophiuroides within 48 h of stress; at 12 and 24 h of stress, the relative expression levels of EoNRAT1 gene are significantly higher than that at 0 h of stress; at 48 h of stress, the relative expression level of EoNRAT1 gene in root still maintains a relatively high level, but that in leaf decreases to the level at 0 h of stress. It is suggested that EoNRAT1 protein is a stable hydrophobic membrane protein, which may be involved in response of E. ophiuroides to aluminum stress.

Key words: Eremochloa ophiuroides (Munro) Hack.; EoNRAT1 gene; gene cloning; bioinformatics analysis; expression characteristics

铝(Al)在地壳中的含量仅次于氧(O)和硅(Si), 是1种在土壤中普遍存在的元素,占地壳总质量的 7%~8%[1-3]。铝在土壤中通常以硅酸盐或氧化铝的 形式存在,溶解度很低,一般对植物无毒性。然而,当 土壤酸碱度低于 pH 5.5 时,土壤中铝的溶解度大大 增加,产生大量的 Al3+,这些 Al3+可与多种亚细胞器 (如细胞壁、质膜、细胞骨架和细胞核)结合,影响各 种亚细胞器的正常功能[4-5],从而使植物受到铝毒 害[6-9]。铝毒是当前酸性土壤中限制植物生长和作 物产量的主要因子之一[10]。目前,全球的酸性土壤 面积较大,占可耕地面积的40%~50%[11-12]。中国酸 性土壤分布区域较广,遍布南方14个省级行政区,总 面积高达 2.18×106 km2,约占全国耕地总面积的 20%[13]。近年来,土壤酸化程度日益加剧,植物受到 的铝毒危害越来越严重[7,12,14-15]。为了减轻酸性土 壤的铝毒性,人们通常向土壤中添加石灰、磷酸盐、有 机物等物质(即酸中和法),但这些措施的成本往往 较高,且会对环境造成一定的污染,因此,这些措施并 不完全适用于酸性土壤铝毒害问题的解决。通过对 植物进行遗传选育和改良,有针对性地培育能很好地 适应酸性土壤铝毒胁迫的优质植物,是解决酸性土壤 铝毒害的根本途径,对于降低酸性土壤中作物的栽培 成本、提高酸土地区土地的利用率及改善局部生态环 境具有重要意义。

假俭草[Eremochloa ophiuroides (Munro) Hack.] 又名百足草、蜈蚣草,是禾本科(Poaceae) 蜈蚣草属 (Eremochloa Buse)中惟一可用作草坪草的优良暖季 型 C₄草本植物^[16]。假俭草原产于中国中部和南部, 主要分布于长江流域及其以南地区。研究发现,假俭草是 1 种耐铝性尤为突出的暖季型草坪草,对土壤中铝的耐受阈值显著高于其他常见的暖季型草,如狗牙根[Cynodon dactylon (Linn.) Pers.]、结缕草(Zoysia japonica Steud.) 和海滨雀稗(Paspalum vaginatum Sw.) $^{[17]}$ 。在 AlCl₃·6H₂O 浓度超过 0.75 mmol·L $^{-1}$ 的环境下,假俭草仍可保持较高的生长量和草坪质量,表现出较强的耐铝性 $^{[18]}$ 。因此,探析假俭草耐铝毒的分子机制,对于培育耐铝植物新品种具有重要的指导意义。

虽然植物自身具有外排抗铝机制,但当遇到铝胁迫后仍然会有部分 Al³+进入植物体内,致使机体受到铝毒害。研究发现,水稻(*Oryza sativa* Linn.)的根细胞膜上存在铝特异转运蛋白 NRAT1^[19],该蛋白可将 Al³+转运到植物细胞内。NRAT1 属于与自然抗性相关的巨噬细胞蛋白(natural resistance-associated macrophage protein, Nramp)家族,但与该蛋白家族其他成员的相似性很低^[20]。在高等植物中, Nramp 蛋白在矿物元素从土壤到植物不同器官和组织的运输过程中发挥着重要作用^[19,21-22]。

为了探究 NRATI 基因在假俭草耐铝分子机制中的作用,本研究以假俭草耐铝基因型品系 E105 为研究材料,采用 PCR 和 RACE 技术克隆到 $1 \land NRATI$ 基因,对其进行了生物信息学分析,并采用 qRT-PCR 技术分析了该基因在 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Al}^{3+}$ 胁迫48 h 内的时空表达特性,以期为假俭草 NRATI 基因的功能研究提供重要参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

在江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园)草业中心试验苗圃内国家主要暖季型草坪草种质资源库中,选择假俭草耐铝基因型品系 E105 的当年生幼嫩枝条,将枝条首节扦插水培。水培营养液为 1/4 Hoagland 溶液,培养期间使用通气泵通气,光照强度为 $120 \sim 150~\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$,光照时间为 $12~h \cdot d^{-1}$,空气相对湿度为 70%,温度为 $20~\% \sim 30~\%$ 。待生根后继续培育 $2\sim3~$ 周,选取生长健壮、根系发达的植株进行根尖总 RNA 提取和铝胁迫处理。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆 对假俭草全长转录组测序数据 (数据暂未公开)进行分析,获得假俭草 *NRAT1* 基因 的参照序列并设计特异引物,引物序列见表 1。这些 引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1 用于假俭草 NRATI 基因克隆的引物序列
Table 1 Sequence of primers used for cloning NRATI gene from Eremochloa ophiuroides (Munro) Hack.

引物名称 Primer name	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)
EoNRATI-F	GAGATGTGGAATGTGCTGT
EoNRATI-R	CAATTAAAGGGCGTTCAGC
3'RACE Outer	GAGTTCATCATAGCAGGCTTCAT
3'RACE Inner	GTTGACATACCTGAGACCATCGGC
5'RACE Outer	GCCACACTCGATGAGGAAGTATC
5'RACE Inner	GTCTTTCTTGAGAGGACCAAGGC

采用 FlaPure Plant Total RNA Extraction Kit 植物总 RNA 提取试剂盒(北京金沙生物科技有限公司)提取根尖总 RNA,并采用 UnionScript First – strand cDNA Synthesis Mix for qPCR 试剂盒(北京金沙生物科技有限公司)反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,选用 KOD-Plus – Neo 高保真酶试剂盒[东洋纺(上海)生物科技有限公司]进行基因克隆。扩增体系总体积 50.0 μ L,包括 $10\times$ Buffer 5.0 μ L,dNTPs Mixture 5.0 μ L,MgSO₄溶液 3.0 μ L,cDNA 模板2.0 μ L,KOD-Plus – Neo 高保真酶 1.0μ L, 0μ D 0μ L, 0μ D 0μ D

限公司]进行基因两端序列的克隆,反应体系和扩增程序均参照试剂盒说明书。

所有扩增产物在质量体积分数 1%的琼脂糖凝胶上电泳,切取与预测序列大小一致的条带,采用DNA凝胶回收试剂盒(北京金沙生物科技有限公司)进行回收和纯化。将纯化产物连接到 pClone007 载体(南京擎科生物科技有限公司)上,并转化到大肠杆菌 TOP10 菌株中,挑取阳性克隆送南京擎科生物科技有限公司进行测序。

根据测序结果,用 DNAMAN 软件将扩增得到的中间片段、3′端片段和 5′端片段进行比对和拼接,从而获得假俭草 NRATI 基因的全长 cDNA 序列。

生物信息学分析 利用 NCBI 网站(http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/)的 ORF Finder 程序对获得的 假俭草 NRAT1 基因序列的开放阅读框(open reading frame, ORF)进行预测:利用 Geneious Prime 软件对预 测的 ORF 进行 mRNA 和氨基酸序列分析:利用 Protparam 工具(https://web.expasy.org/protparam/) 分析假俭草 NRAT1 蛋白的基本理化性质:利用 ProtScale 工具(https://web.expasy.org/protscale/)分 析假俭草 NRAT1 蛋白的亲水性和疏水性;利用 TMHMM server v2.0 工具(https://services.healthtech. dtu. dk/service. php? TMHMM - 2.0) 预测假俭草 NRAT1 蛋白的跨膜结构;利用 SOPMA 工具(https:// npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page =/ NPSA/npsa sopma.html) 预测假俭草 NRAT1 蛋白的 二级结构,并利用 SWISS – MODEL 软件(https:// swissmodel. expasy. org/) 进行同源建模。利用 MUSCLE Alignment 软件将假俭草 NRAT1 的氨基酸 序列与 NCBI 网站中玉米 (Zea mays Linn.)、高粱 [Sorghum bicolor (Linn.) Moench]、短花药野生稻 (Oryza brachyantha A. Chev. et Roehr.)、水稻、少花古 尔德草[Dichanthelium oligosanthes (Schult.) Gould]、 粱[Setaria italica (Linn.) Beauv.]及柳枝稷(Panicum virgatum Linn.) NRAT1 的氨基酸序列进行比对,并利 用 ESPrint 3.0 软件将比对结果可视化;然后,利用 NCBI 网站的蛋白数据库,通过 BLASTp 同源比对获 得上述 7 种植物及其余 10 种植物 NRAT1 同源蛋白 的氨基酸序列,这 10 种植物有狗尾草[Setaria viridis (Linn.) Beauv.]、稷(Panicum miliaceum Linn.)、二粒 小麦(Triticum dicoccoides Korn)、硬直黑麦草(Lolium rigidum Gaud.)、二穗短柄草[Brachypodium distachyon

(Linn.) P. Beauv.]、豇豆[Vigna unguiculata (Linn.) Walp.]、甜瓜(Cucumis melo Linn.)、烟草(Nicotiana tabacum Linn.)、林烟草(N. sylvestris Speg.)和渐狭叶烟草(N. attenuata Torr. ex S. Watson),利用 ClustalX 2.1 和 MEGA 11 软件采用邻接法构建系统进化树,迭代值设为 1 000。

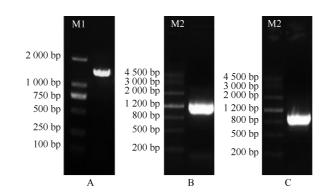
1.2.3 铝胁迫处理及基因表达特性分析 将适量 $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 加入到 1/4 Hoagland 营养液中,制成 1.0 mmol· L^{-1} Al^{3+} 处理液,处理液酸碱度为 pH 3.9 至 pH 4.1。采用前述培养条件,用 1.0 mmol· L^{-1} Al^{3+} 处理液培养假俭草,在培养 0、12、24 和 48 h 分别 取植株的根、茎和叶,每次选取 $2\sim3$ 株,将不同植株的同一器官样品混匀,取各组织样品约 0.1 g,用去离子水清洗干净样品表面后,立即放入液氮中速冻。每个处理 3 个生物学重复。

采用 FlaPure Plant Total RNA Extraction Kit 植物 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,根据获得的假俭草 NRATI 基因的 cDNA 全长序列设计引物(正向引物 序列为 5′-GGGCACGGAACATCATCACT-3′,反向引 物序列为 5'-ATGGCATTGGCATACTTGGA-3'),以管 家基因 EoCACS 作为内参基因(正向引物序列为 5'-TAAGATGTGATGTGACGGGAAAG-3′,反向引物序列 为 5′-TCTGGTGGCACGAAACTGACT-3′), 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 荧光定量试 剂(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)及 qTOWER 2.2 荧光定量梯度 PCR 仪(德国耶拿分析仪器股份公 司)进行 qRT-PCR。扩增体系总体积 20.0 µL,包括 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10.0 μL (南京诺唯赞生物科技股份有限公司)、 $10 \mu mol \cdot L^{-1}$ 正向和反向引物各 0.4 μL、cDNA 模板 2.0 μL 及 ddH,O 7.2 μL。扩增程序:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 10 s、60 ℃退火并延伸 20 s,共 40 个循环。共设 置3次技术重复。循环反应结束后进行溶解曲线分 析,利用 PCR 仪自带的分析系统自动进行基线和 C_{T} 值分析,并采用相对定量法[23]对扩增结果进行分析。

2 结果和分析

2.1 EoNRATI 基因的克隆及序列分析

根据假俭草全长转录组测序数据获得假俭草 NRATI基因,命名为 EoNRATI。通过 PCR 扩增获得 该基因的中间片段(图 1-A),并利用 RACE 技术获 得该基因的 3′端和 5′端片段(图 1-B,C)。经过对比和拼接,最终获得该基因的全长 cDNA 序列。



M1: DL2000 DNA marker; M2: DNA marker III.

A: PCR 扩增结果 PCR amplification result; B: 3'RACE 扩增结果 3'RACE 加增结果 3'RACE 加增结果 5'RACE amplification result.

图 1 假俭草 NRATI 基因的扩增结果

Fig. 1 Amplification result of NRAT1 gene from Eremochloa ophiuroides (Munro) Hack.

对获得的 *EoNRAT1* 基因序列的开放阅读框进行预测分析,结果(图 2)显示:该基因的开放阅读框长度为 1 614 bp,编码 538 个氨基酸。

2.2 EoNRAT1 蛋白的理化性质

预测分析结果表明: EoNRAT1 蛋白的分子式为 $C_{2693}H_{4263}N_{659}O_{739}S_{23}$,理论相对分子质量约 58 430,理论等电点为 pI 7.03。该蛋白共包括 8 377 个原子,含有 20 种基本氨基酸,其中,亮氨酸(Leu)含量最高(12.1%),组氨酸(His)含量最低(1.3%);含 40 个带负电荷的氨基酸残基,并含 40 个带正电荷的氨基酸残基;在 280 nm 波长下的摩尔消光系数为 65 360 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$,脂肪系数为 116.93,平均亲水系数为 0.619,不稳定指数为 30.98。此外, EoNRAT1 蛋白还含有 9 个半胱氨酸(Cys)(图 2)。

亲水性和疏水性分析结果(图 3)显示:EoNRAT1 蛋白多肽链第 26 位的谷氨酸(Glu)亲水性标度值最低(-2.944),说明此氨基酸的亲水性最强;该蛋白多肽链第 477 位缬氨酸(Val)的亲水性标度值最高(3.122),说明此氨基酸的疏水性最强。统计结果显示:EoNRAT1蛋白中亲水性氨基酸占比为 32.8%,疏水性氨基酸占比为 67.2%,据此推断该蛋白为疏水性蛋白。

2.3 EoNRAT1蛋白的跨膜区分析

跨膜结构预测结果(图 4)显示: EoNRAT1 蛋白



方框示半胱氨酸及其密码子 The boxes show cysteine and its codons.

图 2 假俭草 NRAT1 基因的开放阅读框及编码的氨基酸序列

Fig. 2 Open reading frame and encoded amino acid sequence of NRAT1 gene from Eremochloa ophiuroides (Munro) Hack.

含有 10 个跨膜区,由 235 个氨基酸组成,分别位于83~102、153~175、184~206、226~248、269~291、329~351、371~393、397~419、435~457 及 472~494位。并且,该蛋白主要定位于质膜、液泡和内质网。据此推测,该蛋白是一个膜蛋白。

2.4 EoNRAT1蛋白的二级和三级结构

二级结构预测结果(图 5-A)显示: EoNRAT1 蛋

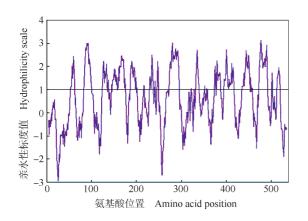
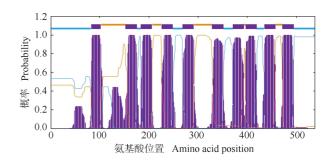


图 3 假俭草 NRAT1 蛋白的亲水性和疏水性分析 Fig. 3 Hydrophilicity and hydrophobicity analysis on NRAT1 protein from *Eremochloa ophiuroides* (Munro) Hack.



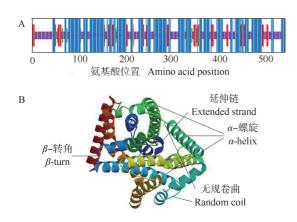
—: 跨膜氨基酸 Transmembrane amino acids; —: 膜内氨基酸 Intramembrane amino acids; —: 膜外氨基酸 Extracellular amino acids.

图 4 假俭草 NRAT1 蛋白的跨膜区分析

Fig. 4 Transmembrane domain analysis on NRAT1 protein from *Eremochloa ophiuroides* (Munro) Hack.

白的二级结构由 α -螺旋、 β -转角、延伸链、无规卷曲构成,其中, α -螺旋占比最高(53.53%),无规卷曲占比也较高(31.78%),表明二者为该蛋白二级结构的主要构件。

三级结构预测结果(图 5-B)显示: EoNRAT1 蛋白的三级结构也由 α -螺旋、 β -转角、延伸链及无规卷曲构成,与二级结构预测结果一致,并且该蛋白在三级结构上以 α -螺旋和无规卷曲为主。



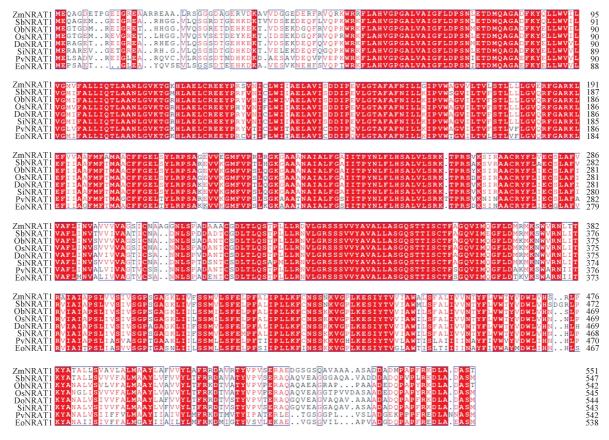
—: α-螺旋 α-helix; —: β-转角 β-turn; —: 延伸链 Extended strand; —: 无规卷曲 Random coil.

图 5 假俭草 NRAT1 蛋白的二级结构(A)和三级结构(B)预测 Fig. 5 Prediction of secondary structure (A) and tertiary structure (B) of NRAT1 protein from *Eremochloa ophiuroides* (Munro) Hack.

2.5 EoNRAT1 蛋白氨基酸序列比对及系统进化分析

氨基酸序列比对结果(图 6)显示: EoNRAT1 与 其余 7 种植物 NRAT1 的氨基酸序列具有较高的一致 性,其中, EoNRAT1 与柳枝稷 NRAT1 的氨基酸序列 同源性最高,序列一致性达到 84.53%; 与少花古尔德 草、粱、短花药野生稻、水稻、高粱 NRAT1 的氨基酸序 列一致性逐渐降低; 而与玉米 NRAT1 的氨基酸序列 同源性最低,序列一致性为 72.06%。

系统进化分析结果(图7)显示:供试18种植物被分为2个分支。EoNRAT1与柳枝稷NRAT1首先聚在一起,然后,与硬直黑麦草等10种植物的NRAT1聚为一个分支,说明EoNRAT1与柳枝稷NRAT1的亲缘关系最近,并且与硬直黑麦草等10种



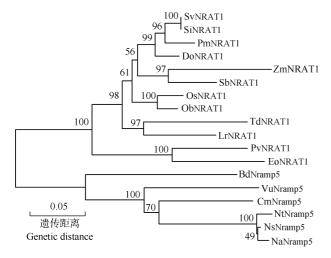
Zm: 玉米 Zea mays Linn. (NP_001334019.1); Sb: 高粱 Sorghum bicolor (Linn.) Moench (XP_002451480.2); Ob: 短花药野生稻 Oryza brachyantha A. Chev. et Roehr. (XP_006646836.1); Os: 水稻 Oryza sativa Linn. (NP_001396197.1); Do: 少花古尔德草 Dichanthelium oligosanthes (Schult.) Gould (OEL35611.1); Si: 粱 Setaria italica (Linn.) Beauv. (XP_004952002.1); Pv: 柳枝稷 Panicum virgatum Linn. (XP_039788063.1); Eo: 假俭草 Eremochloa ophiuroides (Munro) Hack. 括号内编号为 NCBI 登录号 The numbers in brackets are NCBI access numbers.

方框内的红底部分表示序列一致性为 100%, 白底部分表示序列一致性在 75%以上 The red background parts in the boxes indicate the sequence consistency of 100%, and the white background parts indicate the sequence identity above 75%.

图 6 假俭草与其他植物 NRAT1 蛋白氨基酸序列比对结果

Fig. 6 Alignment result of amino acid sequences of NRAT1 protein from Eremochloa ophiuroides (Munro) Hack. and other species

植物 NRAT1 的亲缘关系较近。二穗短柄草等 6 种植物的 Nramp5 聚为另一个分支,说明 Nramp 家族不同成员间存在相对较远的亲缘关系。



Sv: 狗尾草 Setaria viridis (Linn.) Beauv. (XP_034591106.1); Si: 粱 Setaria italica (Linn.) Beauv. (XP_004952002.1); Pm: 稷 Panicum miliaceum Linn. (RLM80353.1); Do: 少花古尔德草 Dichanthelium oligosanthes (Schult.) Gould (OEL35611.1); Zm: 玉米 Zea mays Linn. (NP_001334019.1); Sb: 高粱 Sorghum bicolor (Linn.) Moench (XP_ 002451480.2); Os: 水稻 Oryza sativa Linn. (NP_001396197.1); Ob: 短花药野生稻 Oryza brachyantha A. Chev. et Roehr. (XP_006646836.1); Td: 二粒小麦 Triticum dicoccoides Korn (XP_037450684.1); Lr: 硬直黑 麦草 Lolium rigidum Gaud. (XP_047076269.1); Pv: 柳枝稷 Panicum virgatum Linn. (XP_039788063.1); Eo: 假俭草 Eremochloa ophiuroides (Munro) Hack.; Bd: 二穗短柄草 Brachypodium distachyon (Linn.) P. Beauv. (XP_003557325.1); Vu: 豇豆 Vigna unguiculata (Linn.) Walp. (XP_027901704.1); Cm: 甜瓜 Cucumis melo Linn. (XP_016903614.2); Nt: 烟草 Nicotiana tabacum Linn. (XP_016434268.1); Ns: 林烟草 Nicotiana sylvestris Speg. (XP_009783885.1); Na: 渐狭叶烟草 Nicotiana attenuata Torr. ex S. Watson (XP 019245559.1). 括号内编号为 NCBI 登录号 The numbers in brackets are NCBI access numbers.

分支上的数值代表 bootstrap 值 The values on the branches represent the bootstrap values.

图 7 基于假俭草 NRAT1 蛋白及其他植物同源蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of NRAT1 protein from *Eremochloa ophiuroides* (Munro) Hack. and homologous proteins from other species

2.6 铝胁迫下 EoNRAT1 基因的表达特性分析

检测结果(表 2)显示:在 1.0 mmol·L⁻¹Al³⁺胁迫 0 和 48 h, *EoNRATI* 基因在假俭草根中的相对表达量显著高于茎和叶,而在茎和叶中的相对表达量差异不显著;在胁迫 12 和24 h,该基因在叶中的相对表达量最高,且显著高于茎。

由表 2 还可见:在 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Al}^{3+}$ 胁迫下,假 俭草根中 EoNRATI 基因的相对表达量在胁迫12 h 最高,并在胁迫 $12 \sim 48 \text{ h}$ 显著高于胁迫0 h,说明在受到

铝胁迫后,该基因在假俭草根中的相对表达量一直维持在较高水平;而在叶和茎中,该基因的相对表达量则随着胁迫时间延长表现为先升高后降低的趋势,且均在胁迫 12 h 最高。值得注意的是,在胁迫 12 和24 h,假俭草叶中该基因的相对表达量显著高于胁迫0 h,分别为胁迫0 h 的60.3 和18.8 倍;而在胁迫48 h,叶中该基因的相对表达量基本恢复至胁迫0 h 水平。另外,假俭草茎中该基因的相对表达量一直处于较低水平。

表 2 1.0 mmol·L $^{-1}$ Al $^{3+}$ 胁迫下EoNRATI基因在假俭草不同器官中的表达分析($\overline{X}\pm SD$)

Table 2 Expression analysis on *EoNRAT1* gene in different organs of *Eremochloa ophiuroides* (Munro) Hack. under 1.0 mmol \cdot L⁻¹ Al³⁺ stress ($\overline{X}\pm SD$)

胁迫时间/h Stress time -	不同器官中的相对表达量 ¹⁾ Relative expression level in different organs ¹⁾		
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
0	1.01±0.13Ab	0.50±0.10Bb	0.60±0.25Bc
12	8.00 ± 3.36 Ba	$0.81 \pm 0.16 Ba$	$36.16 \pm 7.55 $ Aa
24	$6.12{\pm}1.27\mathrm{ABa}$	$0.17{\pm}0.02\mathrm{Be}$	$11.28{\pm}5.65\mathrm{Ab}$
48	7.46±2.47Aa	$0.04{\pm}0.00\mathrm{Bc}$	$0.87{\pm}0.49\mathrm{Bc}$

1) 同行中不同大写字母表示在同一时间不同器官间差异显著(P<0.05) Different uppercases in the same row indicate the significant (P<0.05) difference among different organs at the same time; 同列中不同小写字母表示在同一器官不同时间间差异显著(P<0.05) Different lowercase in the same column indicate the significant (P<0.05) difference among different times in the same organ.

3 讨论和结论

NRAT1 是自然抗性相关的巨噬细胞蛋白 Nramp 家族的成员,该家族成员广泛存在于细菌、真菌、植物 和哺乳动物中[24-25]。Nramp 蛋白主要运输各种金属 离子,包括 Fe²⁺、Mn²⁺、Cd²⁺和 Zn²⁺等^[26]。通常情况 下,NRAT1蛋白在转运金属离子以及调控和维持植 物体内金属离子的平衡方面发挥重要作用。当 Al3+ 进入细胞后,NRAT1 蛋白可在质膜上吸收 Al3+[19],然 后将 Al3+转运并储存在液泡中,从而降低 Al3+的毒害 作用[22]。已有研究发现,虽然 NRAT1 蛋白编码区的 变异能够影响其转运活性,但不会影响其选择 性[27-29]。本研究结果显示: EoNRAT1 蛋白的稳定性 较高,有10个跨膜区,且主要位于质膜、液泡和内质 网上,这与水稻 NRAMP5 蛋白的亚细胞定位预测结 果基本一致[30]。结合其他植物 NRAT1 蛋白的研究 结果[31-32]及本研究的氨基酸序列比对和系统进化分 析结果,不同物种间 NRAT1 基因编码的氨基酸序列

具有较高的一致性,说明 EoNRAT1 基因可能相对保守,后续应开展该基因的保守性研究。本研究的系统进化树中, EoNRAT1 与柳枝稷 NRAT1 首先聚在一起,可能与水稻和柳枝稷同属 C_4 植物,亲缘关系较近有关。

gRT-PCR 分析结果表明: EoNRAT1 基因在假俭 草根、叶、茎中均有表达,但该基因在3个器官中的表 达模式存在差异,表现出明显的时空表达特异性。整 体来看, EoNRATI 基因在假俭草茎中的表达受铝胁 迫影响较小,而在根和叶中的表达受铝胁迫影响较 大。结合八仙花[Hydrangea macrophylla (Thunb.) Ser.] [33] 根中 NRAT1 基因及烟草[34]、拟南芥[24,35] 和 大豆[36]根中 NRAMP 基因的相关研究结果,推测当植 物根部受到铝胁迫后,立即产生并始终维持较强的应 激反应。此外, EoNRAT1 基因在假俭草叶中的相对 表达量还与铝胁迫时间密切相关,在 1.0 mmol·L-1 Al3+胁迫 12 h 达到最高值,而后随处理时间延长显著 下降,在胁迫48h基本恢复至胁迫0h水平,八仙花 叶中的 NRAT1 基因也表现出类似的表达特性[21],表 明假俭草根系在受到铝胁迫后会立即产生较强的应 激反应,但 EoNRAT1 基因不会一直高表达。

假俭草起源于中国中南部,在长期适应南方酸性土壤的铝毒环境中已经形成了高度耐铝机制。本研究中,假俭草根、叶、茎中 EoNRATI 基因的表达水平在受到短时间(12 h)的铝胁迫后显著上调,且根中该基因的表达水平在整个实验期间(胁迫 48 h 内)一直保持在较高水平,保证植物体将进入细胞的 Al³+及时转运出去[26],从而降低植物体受到的铝毒伤害。

综合上述研究结果,假俭草 *EoNRAT1* 基因编码的蛋白为一种稳定的亲水性膜蛋白,可能参与假俭草对铝胁迫的应答反应。

参考文献:

- [1] SINGH S, TRIPATHI D K, SINGH S, et al. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review [J]. Environmental and Experimental Botany, 2017, 137: 177-193.
- [2] BOJÓRQUEZ-QUINTAL E, ESCALANTE-MAGAÑA C, ECHEVARRÍA-MACHADO I, et al. Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1767.
- [3] RAHMAN M A, LEE S-H, JI H C, et al. Importance of mineral nutrition for mitigating aluminum toxicity in plants on acidic soils: current status and opportunities [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19: 3073.
- [4] MAJF, CHENZC, SHENRF. Molecular mechanisms of Al

- tolerance in gramineous plants [J]. Plant Soil, 2014, 381(1): 1-12.
- [5] KOCHIAN L V, PIÑEROS M A, LIU J, et al. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance [J]. Annual Review of Plant Biology, 2015, 66: 571-598.
- [6] RAHMAN R, UPADHYAYA H. Aluminium toxicity and its tolerance in plant: a review[J]. Journal of Plant Biology, 2021, 64 (2): 101-121.
- [7] RYAN P R, DELHAIZE E, JONES D L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots [J]. Annual Review of Plant Biology, 2001, 52: 527-560.
- [8] KOCHIAN L V, PIÑEROS M A, HOEKENGA O A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity[J]. Plant and Soil, 2005, 274; 175–195.
- [9] MA J F. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants [J]. International Review of Cytology, 2007, 264; 225-252.
- [10] SADE H, MERIGA B, SURAPU V, et al. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: tailoring plants to suit to acid soils [J]. Biometals, 2016, 29(2): 187-210.
- [11] MA J F. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants [J]. Plant and Cell Physiology, 2000, 41 (4): 383-390.
- [12] KOCHIAN L V, HOEKENGA O A, PIÑEROS M A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency [J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 459-493.
- [13] 沈仁芳, 赵学强. 酸性土壤可持续利用[J]. 农学学报, 2019, 9 (3): 16-20.
- [14] HUANG C F, YAMAJI N, CHEN Z, et al. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice[J]. The Plant Journal, 2012, 69: 857-867.
- [15] ROY B, BHADRA S. Effects of toxic levels of aluminium on seedling parameters of rice under hydroponic culture [J]. Rice Science, 2014, 21(4): 217-223.
- [16] 柳后起,周守标,谢传俊.假俭草种质资源研究进展[J].草业科学,2008,25(1):59-65.
- [17] BALDWIN C M, LIU H, MCCARTY L B, et al. Aluminum tolerances of ten warm-season turfgrasses [J]. International Turfgrass Society Research Journal, 2005, 10: 811-817.
- [18] YAN J, CHEN J, ZHANG T, et al. Evaluation of aluminum tolerance and nutrient uptake of 50 centipedegrass accessions and cultivars[J]. HortScience, 2009, 44(3): 857-861.
- [19] XIA J, YAMAJI N, KASAI T, et al. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(43): 18381-18385.
- [20] YAMAJI N, HUANG C F, NAGAO S, et al. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice[J]. The Plant Cell, 2009, 21(10): 3339-3349.

- [21] 丁海燕,温丹妮,王苗全,等.水稻抗铝机制的研究进展[J]. 生命科学,2013,25(5):532-537.
- [22] 李志奇, 陈海霞. 八仙花 NRATI 基因的克隆及表达分析[J]. 福建农业学报, 2019, 34(6): 646-651.
- [23] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [24] CURIE C, ALONSO J M, JEAN M L E, et al. Involvement of NRAMP1 from Arabidopsis thaliana in iron transport [J]. Biochemical Journal, 2000, 347(3): 749-755.
- [25] NEVO Y, NELSON N. The NRAMP family of metal-ion transporters [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1763; 609-620.
- [26] GUNSHIN H, MACKENZIE B, BERGER U V, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter [J]. Nature, 1997, 388 (6641); 482-488.
- [27] LI J Y, LIU J, DONG D, et al. Natural variation underlies alterations in Nramp aluminum transporter (NRATI) expression and function that play a key role in rice aluminum tolerance [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(17); 6503-6508.
- [28] XIA J, YAMAJI N, CHE J, et al. Differential expression of *Nrat1* is responsible for Al-tolerance QTL on chromosome 2 in rice [J].

- Journal of Experimental Botany, 2014, 65(15): 4297-4304.
- [29] LU M, WANG Z, FU S, et al. Functional characterization of the SbNrat1 gene in sorghum [J]. Plant Science, 2017, 262: 18-23.
- [30] 杨 猛. 水稻 NRAMP 家族基因在 Mn 和 Cd 转运中的功能研究[D]. 武汉; 华中农业大学, 2014; 86-90.
- [31] 尹 华. 莱茵衣藻重金属转运蛋白 NRAMP1 的鉴定与功能解析[D]. 重庆: 西南大学, 2018: 47-52.
- [32] 肖海华, 印莉萍, 韩振海. 苹果属山荆子 *MbNramp1* 基因克隆、序列与表达分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(9): 1409-1415.
- [33] CHEN H, LU C, JIANG H, et al. Global transcriptome analysis reveals distinct aluminum-tolerance pathways in the Alaccumulating species *Hydrangea macrophylla* and marker identification [J]. PLoS ONE, 2015, 10(12): e0144927.
- [34] 焦芳婵,李文正,吴玉萍,等. 烟草 NtNramp1-1 基因克隆及特征分析[J]. 分子植物育种, 2015, 13(11): 2510-2515.
- [35] CAILLIATTE R, LAPEYRE B, BRIAT J F, et al. The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity[J]. Biochemical Journal, 2009, 422(2): 217-228.
- [36] LANQUAR V, RAMOS M S, LELIÈVRE F, et al. Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency [J]. Plant Physiology, 2010, 152(4): 1986-1999.

(责任编辑: 佟金凤)

(上接第 28 页 Continued from page 28)

- [31] BOUDSOCQ M, DROILLARD M J, BARBIER-BRYGOO H, et al. Different phosphorylation mechanisms are involved in the activation of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases 2 by osmotic stresses and abscisic acid[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(4): 491-503.
- [32] LONG T D, XU B J, HU Y F, et al. Genome-wide identification of ZmSnRK2 genes and functional analysis of ZmSnRK2.10 in ABA signaling pathway in maize (Zea mays L.) [J]. BMC Plant Biology, 2021, 21: 309.
- [33] 陈娜娜, 刘金义, 蔡 斌, 等. 苹果 *SnRK2* 基因家族的鉴定和 生物信息学分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29(13): 120-127.
- [34] HUAI J L, WANG M, HE J G, et al. Cloning and characterization of the *SnRK2* gene family from *Zea mays*[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(12): 1861–1868.
- [35] HUANG Z N, TANG J, DUAN W K, et al. Molecular evolution,

- characterization, and expression analysis of *SnRK2* gene family in Pak-choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) [J]. Front Plant Science, 2015, 6: 879.
- [36] SARDA X, TOUSCH D, FERRARE K, et al. Two *TIP-like* genes encoding aquaporins are expressed in sunflower guard cells [J]. The Plant Journal, 1997, 12(5): 1103-1111.
- [37] LI J H, SONG J Y, LI C J, et al. Genome-wide identification and expression profile analysis of the *SnRK2* gene family in Nicotiana tabacum[J]. Biochemical Genetics, 2022, 60(5): 1511-1526.
- [38] DIÉDHIOU C J, POPOVA O V, DIETZ K J, et al. The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8: 49.
- [39] 周 颖, 白艳红, 王 钰, 等. 丹参 *SnRK2* 基因家族的鉴定与表达[J]. 分子植物育种, 2022, 20(7): 2233-2243.

(责任编辑: 吴芯夷)