

烟草 TPP 基因家族鉴定及表达模式分析

刘涛^{1,2}, 郭存³, 邹宗庆⁴, 金立权⁵, 吴健⁵, 文利超^{1,2},
邓智超^{1,2}, 初雨蒙^{1,2}, 王凌涛⁶, 李伟^{1*}, 郭永峰^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所 烟草行业基因资源利用重点实验室, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 3. 云南省烟草公司昆明市石林分公司, 昆明 650000; 4. 福建省烟草公司龙岩市公司, 福建 龙岩 361000; 5. 山东临沂烟草有限公司兰陵分公司, 山东 临沂 277700; 6. 湖北省烟草公司十堰市公司竹溪县营销部, 湖北 十堰 442300)

摘要: 海藻糖-6-磷酸磷酸酶 (TPP) 是植物海藻糖代谢过程的关键酶, 在植物的生长发育及非生物胁迫响应过程中发挥着重要的作用。为挖掘参与烟草发育及抗逆胁迫的 TPP 基因家族成员, 本研究通过生物信息学的方法, 在普通烟草基因组中共鉴定出了 15 个 TPP 基因, 其中 7 个 TPP 基因定位在染色体上。系统进化分析发现, 新鉴定的烟草 TPP 成员可分为 3 个亚家族, 分别为 CLASS I、CLASS II 和 CLASS III。共线性分析表明, 有 5 个烟草 *NiTPP* 基因分别与 7 个拟南芥 *AtTPP* 基因形成同源基因对。启动子分析发现, *NiTPP* 成员的启动子上存在多种激素和非生物胁迫响应元件。表达模式分析发现, *NiTPP* 基因表达具有一定的组织特异性, 大部分 *NiTPP* 基因在根中的表达量最高, 有 12 个 *NiTPP* 基因在干旱胁迫下表达量上调, 13 个 *NiTPP* 基因能够被盐胁迫显著诱导表达。这说明 *NiTPP* 基因家族成员在烟草非生物胁迫应答中发挥着重要作用。

关键词: 烟草; 海藻糖-6-磷酸磷酸酶 (TPP); 干旱胁迫; 盐胁迫; 表达模式

中图分类号: S572.03

文献标识码: A

文章编号: 1007-5119 (2022) 06-0001-08

Identification and Expression Pattern Analysis of the TPP Gene Family in Tobacco

LIU Tao^{1,2}, GUO Cun³, ZOU Zongqing⁴, JIN Liquan⁵, WU Jian⁵, WEN Lichao^{1,2},
DENG Zhichao^{1,2}, CHU Yumeng^{1,2}, WANG Lingtao⁶, LI Wei^{1*}, GUO Yongfeng^{1*}

(1. Key Laboratory of Tobacco Gene Resources, Institute of Tobacco Research of CAAS, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. Kunming Branch of Yunnan Provincial Tobacco Company, Kunming 650000, China; 4. Fujian Tobacco Company Longyan City Company, Longyan, Fujian 361000, China; 5. Shandong Linyi Tobacco Co., Ltd., Lanling Branch, Linyi, Shandong 277700, China; 6. Hubei Tobacco Company Shiyan City Company Zhuxi County Marketing Department, Shiyan, Hubei 442300, China)

Abstract: Trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP) is a key enzyme in trehalose metabolism and plays an important role in plant growth and abiotic stress response. In order to excavate members of the TPP gene family involved in tobacco development and stress response, we identified 15 *NiTPP* genes in the common tobacco genome through bioinformatic methods, with 7 of the *NiTPP* genes located on chromosomes. Phylogenetic analysis revealed that the newly identified tobacco TPP family members could be divided into three subfamilies: CLASS I, CLASS II and CLASS III. Syntenic analysis revealed that there were eight homologous gene pairs between *Arabidopsis* and tobacco. Sequence analysis showed that the promoters of *NiTPP* genes contained various hormone- and stress-related elements. Furthermore, the expression of *NiTPP* genes was studied in different tissues and most of the *NiTPP* genes were expressed at the highest level in roots. The expression pattern analysis showed that 12 *NiTPP* genes were up-regulated under drought stress, and 13 *NiTPP* genes could be induced by salt treatments. This indicates that the *NiTPP* gene family members play an important role in drought and salt stress responses of tobacco.

Keywords: tobacco; trehalose-6-phosphate phosphatase (TPP); drought stress; salt stress; expression pattern

海藻糖是一种非还原性双糖, 由两分子 α -葡萄糖组成, 广泛分布于植物、动物以及微生物中^[1]。研究发现海藻糖在植物应对各种生物以及非生物

胁迫中发挥重要作用^[2]。在极温、高渗透压及干燥失水等胁迫条件下, 海藻糖能在细胞表面形成特殊的保护膜, 降低逆境对生物分子结构的损害, 维持

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程 (ASTIP-TRIC02)

作者简介: 刘涛 (1998-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 烟草育种。E-mail: 2230928343@qq.com

*通信作者, E-mail: 李伟, liwei06@caas.cn; 郭永峰, guoyongfeng@caas.cn

收稿日期: 2022-06-07

修回日期: 2022-09-27

生命体的生命过程和生物特征^[3-4]。

海藻糖在植物中的合成主要包括以下两个步骤：第1步，通过海藻糖-6-磷酸合成酶(TPS)，尿苷二磷酸-葡萄糖(UDPG)和葡萄糖-6-磷酸葡萄糖(G6P)合成一种磷酸化中间体海藻糖-6-磷酸(T6P)；第2步，海藻糖-6-磷酸(T6P)在海藻糖-6-磷酸磷酸酶(TPP)催化下去磷酸化合成海藻糖^[5-6]。TPP是海藻糖合成途径的限制性酶，在高等植物中广泛分布，随着植物全基因组测序的进行，TPP基因家族已在多种物种中被鉴定^[7-9]，主要特征是它们都含有一个Trehalose_PPase保守结构域。TPP基因已被证实参与拟南芥^[10-11]、水稻^[12-14]、玉米^[15-16]等多种植物的非生物胁迫响应。在烟草中，外源施加海藻糖不仅能够提高烟苗的抗旱能力，还能钝化烟草花叶病毒进而减轻病毒对烟叶的伤害^[17-18]。WANG等^[19]从普通烟草中克隆出了*NiTPPL*基因，发现热胁迫可显著提高*NiTPPL*基因的转录水平，同时NaCl、PEG和低温胁迫也可轻微诱导其表达。

烟草是我国重要的经济作物，在烟草的生长发育过程中，干旱、低温、机械损伤、病虫害等非生物和生物胁迫，均会导致烟叶减产降质，造成经济损失。而海藻糖在植物抗逆过程中发挥重要作用，TPP作为合成海藻糖的关键酶，在烟草中的基因功能鲜有研究。因此，本研究利用比较基因组学和生物信息学手段，对烟草基因组中的TPP基因家族进行全面鉴定和分析，包括：系统进化分析，基因结构及TPP蛋白保守结构域分析，共线性分析，启动子顺式作用元件分析，组织特异性和非生物胁迫表达模式分析，为进一步明确*NiTPP*基因功能和烟草抗逆品种培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料、试剂、仪器

材料：普通烟草品种K326，保存于中国农业科学院烟草研究所。将烟草种子先用75%酒精和过氧化氢消毒后，在超净工作台上播种到MS培养基上，转至人工气候室培养，温度23℃，每天光照16h，黑暗8h。待其长出4片真叶后，移到MS液体培养基上培养(对照)，以300mmol/L甘露醇MS液体培养基模拟干旱处理，以100mmol/L NaCl

MS液体培养基作为盐胁迫处理，培养0、1、3和6h后分别取8株。

试剂：康为世纪RNA提取试剂盒(FFPE DNA/RNA Kit)、康为世纪反转录试剂盒(HiFi-MMLV cDNA Kit)。

仪器：ABI公司Veriti96 PCR仪和7500型荧光定量PCR仪。

1.2 试验方法

1.2.1 烟草TPP家族鉴定及基本特征分析 从TAIR(<https://www.arabidopsis.org>)数据库中下载拟南芥TPP家族成员的蛋白序列作为种子序列在烟草基因组数据库(ftp://ftp.solgenomics.net/genomes/Nicotiana_tabacum/)中进行同源比对搜索(BLASTP, E值<100)。获得的序列在Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)数据库中对其保守结构域分析^[20]，因为TPP家族成员都包含Trehalose_PPase结构域(PF02358)，因此去除不含Trehalose_PPase结构域的序列。利用在线网站Expasy(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)中的ProtParam计算蛋白长度、分子量和等电点^[21]。

1.2.2 系统进化分析 在NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载水稻和小麦的TPP基因家族蛋白质序列。使用MEGA X软件对拟南芥、小麦、水稻和烟草的TPP基因家族蛋白质序列进行多序列比对(MUSCLE法)和构建系统进化树(邻接法，bootstrap设置为1000)^[22]。

1.2.3 烟草TPP家族基因结构及蛋白质保守结构域分析 在茄科数据库(<http://solgenomics.net/>)中下载普通烟草K326的CDS和gDNA序列，从中提取TPP基因家族的信息，通过在线网站GSDS(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析其基因结构^[23]。使用在线工具MEME(<http://meme.sdsc.edu/meme/>)分析*NiTPP*基因家族成员的保守结构域^[24]。

1.2.4 启动子和共线性分析 在NCBI中提取烟草TPP基因家族上游2000bp的启动子序列，利用在线工具PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)检测顺式作用元件，筛选后用TBtools软件进行可视化。将拟南芥和K326全基因组进行比对，对其共线性进行分析，建立同源基因对^[25]。

1.2.5 基因表达模式分析 从 NCBI 的 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) 中下载 EDWARDS 等^[26]2017 年发布的普通烟草 K326 转录组数据 (GSE95717), 提取不同组织和低温、干旱胁迫下的转录组数据, 进行分析。

1.2.6 RNA 提取和 Real-time PCR 分析 取对照、干旱和盐处理 0、1、3 和 6 h 共 4 个时间段的烟草

幼苗各 8 株, 提取 RNA, 再反转录获得 cDNA。根据 *NtTPP* 基因的 CDS 序列, 使用 qPrimerDB-qPCR Primer Database (<https://biodb.swu.edu.cn/qprimerdb/>) 在线数据库设计 qRT-PCR 引物 (表 1)。将提取的 cDNA 稀释 20 倍作为 qRT-PCR 的模板。以 *NtActin* 作为内参基因, 每个样品 3 次重复, 最终试验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行分析。

表 1 qRT-PCR 引物信息

Table 1 The information of qRT-PCR primers used in this study

基因名称	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')
Gene name	Forward primer sequences	Reverse primer sequences
<i>NtTPP01</i>	TGTTAAACACTACCCACGTCT	TCAAGTAAGAACTCGACAGCTT
<i>NtTPP02</i>	AGATCTCTTGTTGAGCTCACAA	TGACCAACTCTTCTCATCTACG
<i>NtTPP03</i>	GTGTTGAAGAAAAGAGGTGGAC	TCCTTGGGTTAATCGTAGCTTT
<i>NtTPP04</i>	AGTCGTAAGGTCAGTGCTTAAA	ATCTTCATCGGTTTCGATCATCA
<i>NtTPP05</i>	CGATTAAGCCAAGGGAGAAAAG	GAGACAAGAATGCCAAAACCTT
<i>NtTPP06</i>	CGGCGAAGAAATCATTCAAGAA	TGAGGGATGATGAACAATCCAA
<i>NtTPP07</i>	TGGATGATCAAGTATCCGTCAG	TCTTCCACTTATGATGGCTGTT
<i>NtTPP08</i>	CATTACCGGCATGCTTACAAG	TTTCAAGCAAGTAAACCAGAGC
<i>NtTPP09</i>	TCCTTTCAGCAAATTGTTAGCC	GATGATGGCTGTTGGGAAATAC
<i>NtTPP10</i>	TTTGTCCAATTGTTGATGACCC	CAACTGATAAACCTTGTGCACGG
<i>NtTPP11</i>	CTTGGATTATGATGGCACCTTG	TGACAGTAGGAAAAGTGATTAGCA
<i>NtTPP12</i>	GGGTTGATTCAATGAGAGCTTC	TCTTTCCTTTAGAACACCGAT
<i>NtTPP13</i>	GTTTTAGACTATGACGGCACC	TAGCAAGTTTTCTCACTGTTGC
<i>NtTPP14</i>	CCAGCCTGCTCGTAAATTTTTA	CCTTTGCACCGTTAATGTCTTT
<i>NtTPP15</i>	CTTTGTGCGGATGTCAAATACA	CCTTTGTGCACTTATCATCTC
<i>NtActin</i>	ACCTCTATGGCAACATTGTGCTCAG	CTGGGAGCCAAAGCGGTGATT

2 结 果

2.1 *NtTPP* 基因家族鉴定和理化性质分析

以拟南芥的 TPP 家族成员的蛋白质序列为种子序列, 在烟草基因组数据库中进行 BLASTP 检索, 获得候选烟草 TPP 基因家族成员。利用 Pfam 数据库对候选成员保守结构域分析后, 筛选得到 15 个烟草 TPP 基因家族成员, 其中有 7 个基因定位在染色体上。通过 Prot Param 工具分析烟草 TPP 基因家族

成员的理化性质, 结果表明其蛋白质长度在 223~435 个氨基酸之间, 分子量在 25 705.3~48 902.13 Da 之间, 等电点在 6.31~9.68 之间 (表 2)。

2.2 *NtTPP* 基因家族系统进化分析

为进一步了解烟草 TPP 家族成员的进化关系, 对单子叶植物 (水稻、小麦) 和双子叶植物 (拟南芥、烟草) 的共 62 条蛋白质序列进行比对, 并构建进化树 (图 1)。按照之前的文献报道^[7], 我们将系

表 2 普通烟草 TPP 基因家族鉴定及理化性质分析

Table 2 The characteristics of the TPP members in tobacco

基因名称	基因 ID	蛋白长度	分子量	等电点	连锁群	起始位置	终止位置
Gene name	Gene ID	Protein length/aa	Molecular mass/Da	Isoelectric point	Location	Start Position	End Position
<i>NtTPP01</i>	Nitab4.5_0001383g0040.1	384	42 926.97	8.15	Nt04	70 812 519	70 814 732
<i>NtTPP02</i>	Nitab4.5_0001780g0140.1	435	48 902.13	8.61	Nt06	85 094 078	85 097 062
<i>NtTPP03</i>	Nitab4.5_0001992g0100.1	346	38 795.35	9.1	Nt12	85 019 098	85 020 917
<i>NtTPP04</i>	Nitab4.5_0000104g0240.1	418	46 634.78	9.37	Nt13	101 282 910	101 286 732
<i>NtTPP05</i>	Nitab4.5_0000715g0110.1	378	42 675.23	9.33	Nt13	8 853 017	8 857 428
<i>NtTPP06</i>	Nitab4.5_0000675g0030.1	282	31 608.43	9.56	Nt16	82 514 204	82 515 591
<i>NtTPP07</i>	Nitab4.5_0000993g0080.1	384	43 425.68	8.74	Nt23	18 597 052	18 599 406
<i>NtTPP08</i>	Nitab4.5_0002589g0130.1	404	45 399.3	9.28	Nitab4.5_0002589	369 236	375 265
<i>NtTPP09</i>	Nitab4.5_0003531g0040.1	390	44 230.48	6.72	Nitab4.5_0003531	295 026	297 184
<i>NtTPP10</i>	Nitab4.5_0003881g0060.1	325	37 051.37	7.05	Nitab4.5_0003881	92 699	94 642
<i>NtTPP11</i>	Nitab4.5_0004470g0070.1	223	25 705.3	6.31	Nitab4.5_0004470	164 604	167 122
<i>NtTPP12</i>	Nitab4.5_0004910g0020.1	306	34 985.55	9.68	Nitab4.5_0004910	189 692	193 481
<i>NtTPP13</i>	Nitab4.5_0008008g0010.1	396	44 342.42	9.66	Nitab4.5_0008008	45 543	49 358
<i>NtTPP14</i>	Nitab4.5_0009175g0020.1	384	43 552.8	8.54	Nitab4.5_0009175	69 359	71 599
<i>NtTPP15</i>	Nitab4.5_0009281g0010.1	351	39 406.97	6.55	Nitab4.5_0009281	57 319	59 501

统进化树分为4个分支即 CLASS I、CLASS II、CLASS III 和 CLASS IV。其中 CLASS III 只包含 3 个 NtTPP 基因家族成员,表明这 3 个基因与其他几

个物种的亲缘关系较远。NtTPP 在亚家族 CLASS I 和 CLASS II 的成员数目均为 6 个,但在亚家族 CLASS III 中并没有 NtTPP 家族成员。

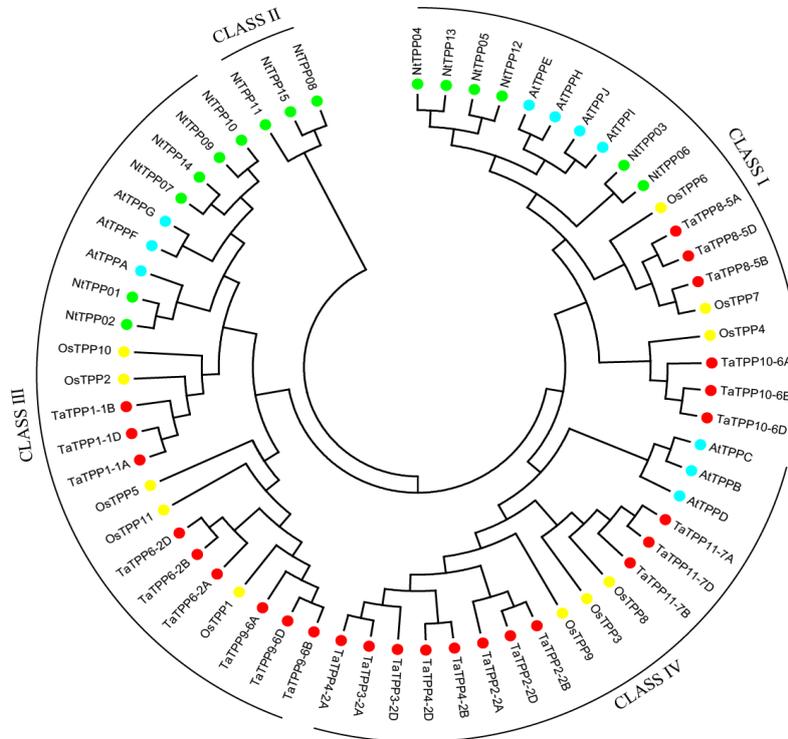


图1 普通烟草 TPP 基因家族的系统进化分析

Fig. 1 The phylogenetic analysis of TPP members in tobacco

2.3 NtTPP 基因结构和蛋白质保守基序分析

对 NtTPP 基因家族成员的基因结构分析发现(图2),外显子数目最多的是 NtTPP02,包含 13 个外显子,最少的是 NtTPP06,仅有 6 个外显子。CLASS I 亚家族的外显子数目为 6~10 个,CLASS II 亚家族 8~10 个,CLASS III 亚家族 10~13 个。其中 NtTPP07 和 NtTPP14 的外显子、内含子数目一致,均为 11 个,并且其位置和长度非常相似,表明这两个基因在进化关系上极其保守。

用 MEME 软件对 NtTPP 基因家族成员的蛋白质序列进行分析(图2),共鉴定出 15 个保守基序(Motif 1~15)。CLASS I 和 CLASS II 亚家族的保守基序均为 8~12 个,CLASS III 亚家族中 NtTPP11 仅有 4 个保守基序,其余两个均为 8 个。其中 Motif 1 (TPP 结构域)在烟草 NtTPP 基因家族中高度保守,该结构在海藻糖-6-磷酸磷酸酶(TPP)去磷酸化过程中起着重要的作用。值得注意的是,Motif 11 仅存在于 CLASS I 亚家族,Motif 14 仅存

在于 CLASS II 亚家族,暗示这两个亚家族功能可能比较特异。

2.4 NtTPP 基因家族启动子分析

分析上游调控序列有助于解释基因调控的机制,进而预测其潜在功能^[27]。使用在线工具 PlantCARE 对 NtTPP 基因家族成员的上游 2000 bp 序列进行顺式作用元件分析(图3)。结果表明,在 12 个 NtTPP 基因(NtTPP01、NtTPP02、NtTPP03、NtTPP04、NtTPP06、NtTPP07、NtTPP08、NtTPP10、NtTPP12、NtTPP13、NtTPP14 和 NtTPP15)的启动子区域检测到与干旱响应相关的顺式作用元件(MBS);在 13 个 NtTPP 基因(NtTPP01、NtTPP02、NtTPP03、NtTPP04、NtTPP05、NtTPP06、NtTPP07、NtTPP10、NtTPP11、NtTPP12、NtTPP13、NtTPP14 和 NtTPP15)的启动子区域检测到与脱落酸响应相关的顺式作用元件(ABRE);在 9 个 NtTPP 基因(NtTPP03、NtTPP05、NtTPP06、NtTPP07、NtTPP09、

NtTPP10、*NtTPP11*、*NtTPP13* 和 *NtTPP14*) 的启动子区域检测到与防御和逆境响应相关的顺式作用元件(W-box、富含 TC 重复序列)。除此之外, *NtTPP* 基因家族的启动子区域还包含茉莉酸甲酯响应元件、赤霉素响应元件、生长素响应元件、乙烯响应

元件、机械伤害响应元件、厌氧响应元件和低温响应元件。值得注意的是 *NtTPP04* 含有 5 个脱落酸响应元件, *NtTPP06* 含有高达 8 个防御和逆境响应的顺式作用元件。表明 *NtTPP* 基因家族与烟草的抗逆相关。

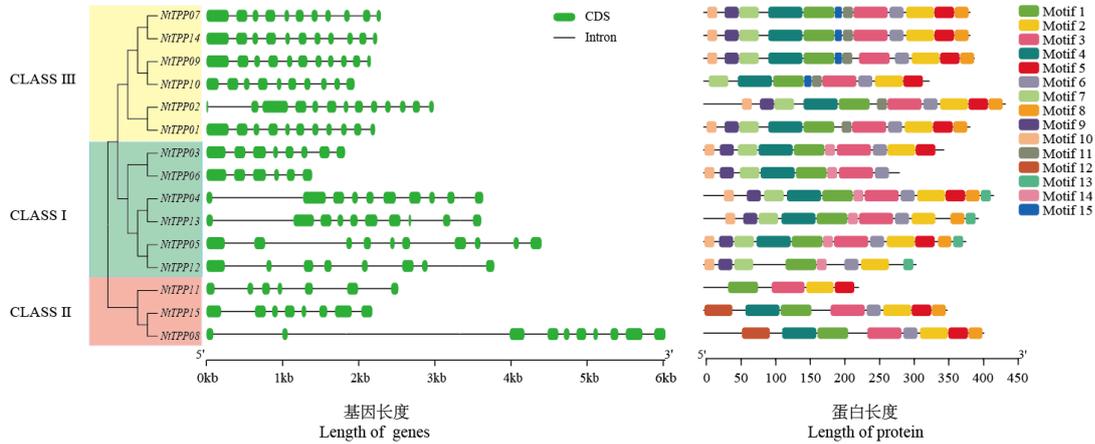


图 2 普通烟草 TPP 基因家族的基因结构及保守基序分析

Fig. 2 Analysis of gene structure and conserved motifs of TPP members in tobacco

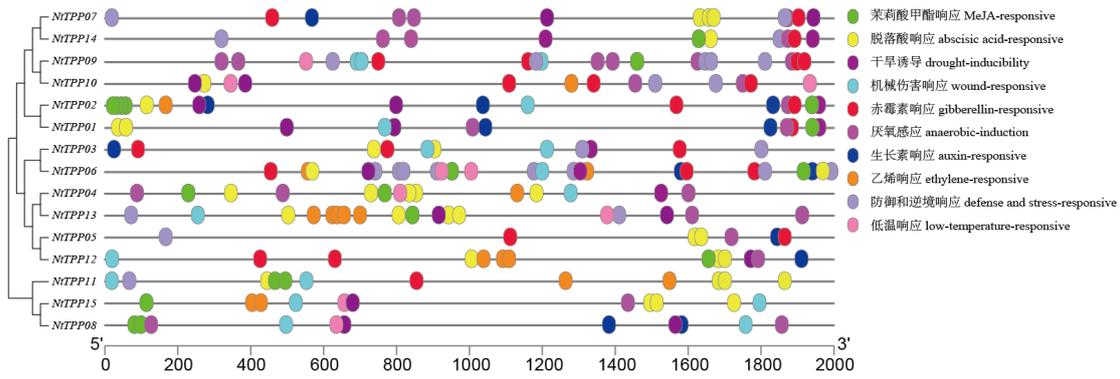


图 3 普通烟草 TPP 基因启动子区顺式作用元件分析

Fig. 3 Statistics diagram of cis-elements in the promoter region of *NtTPP* genes

2.5 *NtTPP* 基因家族的共线性分析

对烟草 *NtTPP* 基因的潜在生物学功能进行分析, 探索新基因与已经充分研究的基因的关系, 通过共线性分析建立拟南芥与烟草之间的同源基因对(图 4)。分析结果表明, 普通烟草 *NtTPP01* 与拟南芥 *AtTPPA* 为同源基因对, *NtTPP03* 与 *AtTPPD*、

AtTPPB 和 *AtTPPC* 为同源基因对, *NtTPP04* 与 *AtTPPI* 和 *AtTPPJ* 为同源基因对, *NtTPP05* 与 *AtTPPB* 为同源基因对, *NtTPP07* 与 *AtTPPG* 为同源基因对。烟草中有 5 个 *NtTPP* 基因与拟南芥的 7 个 *AtTPP* 基因形成共线对。

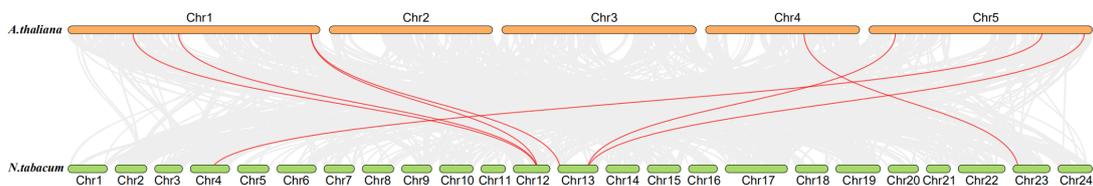


图 4 普通烟草和拟南芥的共线性分析

Fig. 4 Syntenic relationship analysis between *TPP* genes in tobacco and *Arabidopsis*

2.6 *NtTPP* 基因家族表达模式

利用普通烟草转录组数据对 *NtTPP* 基因在不同组织的表达模式分析, 结果表明 (图 5), *NtTPP* 基因在不同组织中的表达量变化较大。大部分 *NtTPP* 基因在根中的表达量最高, 在茎尖的表达量最低, 包括 CLASS 亚家族的 *NtTPP03*、*NtTPP06* 和 *NtTPP04*, CLASS 亚家族的 *NtTPP11*、*NtTPP15* 和 *NtTPP08*, CLASS 亚家族的 *NtTPP09* 和 *NtTPP10*。CLASS 亚家族的 *NtTPP05* 和 *NtTPP12* 在茎中表达量较高, 但在茎尖中表达量非常低。

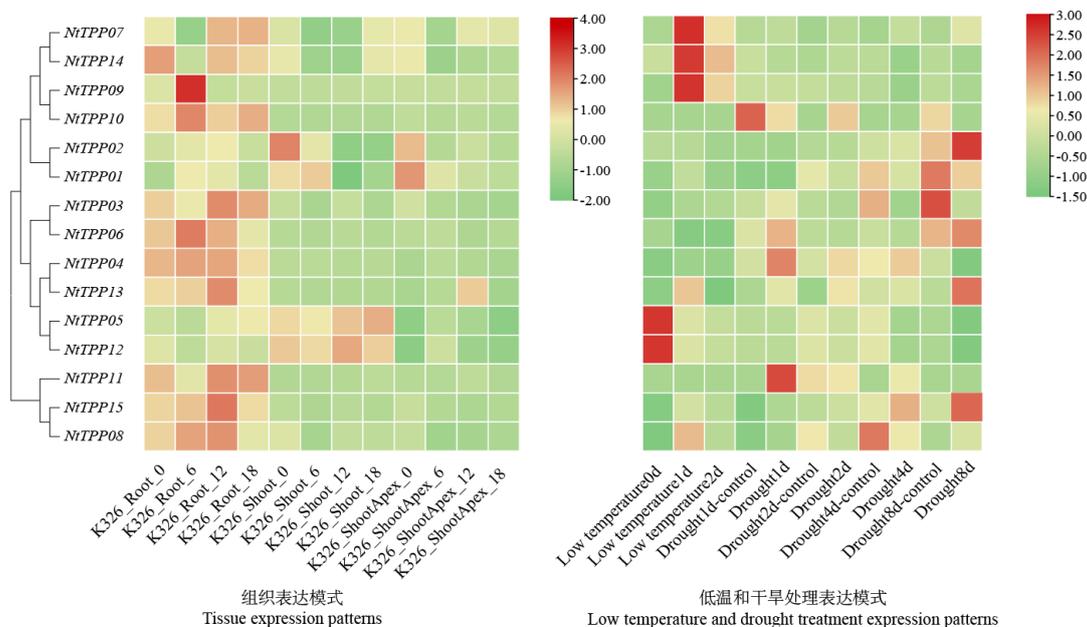
对烟草转录组数据库中的低温和干旱数据进行分析发现, 低温处理 1 d, CLASS 亚家族的 *NtTPP07*、*NtTPP14* 和 *NtTPP09* 表达量明显上调, 但 CLASS 亚家族的 *NtTPP05* 和 *NtTPP12* 表达量出现下调趋势。干旱处理 1 d 时, *NtTPP11* 和 *NtTPP04* 表达量明显上调, *NtTPP10* 表达量下调较多。此外, *NtTPP02*、*NtTPP13* 和 *NtTPP15* 表达量随着处理时间的增加逐渐上升, 在干旱处理 8 d 时达到最高。

2.7 胁迫处理下烟草 *NtTPP* 基因家族表达模式

为进一步探究 *NtTPP* 基因的潜在功能, 对 15

个 *NtTPP* 基因在干旱和盐胁迫处理下的表达模式进行分析表明(图 6、7), 在干旱处理下, *NtTPP01*、*NtTPP02*、*NtTPP07*、*NtTPP08*、*NtTPP09*、*NtTPP11*、*NtTPP12*、*NtTPP14* 和 *NtTPP15* 的表达量逐渐升高, 并在 6 h 达到最高, 其中, *NtTPP07*、*NtTPP08* 和 *NtTPP15* 在 6 h 时表达倍数分别达到 13、12 和 14 倍, *NtTPP04* 在 1 h 时表达量最高, 但 *NtTPP03*、*NtTPP05* 和 *NtTPP10* 的表达量出现下降的趋势。除此之外, *NtTPP06* 表达量呈现先上升再下降的趋势。干旱处理下有 12 个 *NtTPP* 基因表达量呈现不同程度升高。

在盐胁迫处理下, *NtTPP01*、*NtTPP02*、*NtTPP05* 和 *NtTPP12* 表达量均出现先升高再降低再升高的趋势, *NtTPP06* 和 *NtTPP09* 表达量逐渐升高, 并都在 6 h 时达到最高, 表达倍数分别达到 23 和 13 倍, 但 *NtTPP03* 和 *NtTPP10* 的表达量却出现下降的趋势。*NtTPP04*、*NtTPP08*、*NtTPP11*、*NtTPP13*、*NtTPP14* 和 *NtTPP15* 在盐胁迫处理 1 h 时表达量最高, 其中 *NtTPP11* 在 1 h 时表达倍数达到 12 倍, 随后迅速下降。盐胁迫处理下有 13 个 *NtTPP* 基因表达量呈现不同程度升高。



注：红色和绿色分别表示基因表达的上调和下调。

Note: Red and green indicate the up-regulation and down-regulation of gene expression respectively.

图 5 普通烟草 TPP 基因家族的组织表达模式及低温和干旱处理表达模式分析

Fig. 5 Tissue expression patterns, low temperature and drought treatments analysis of *NtTPP* members in common tobacco

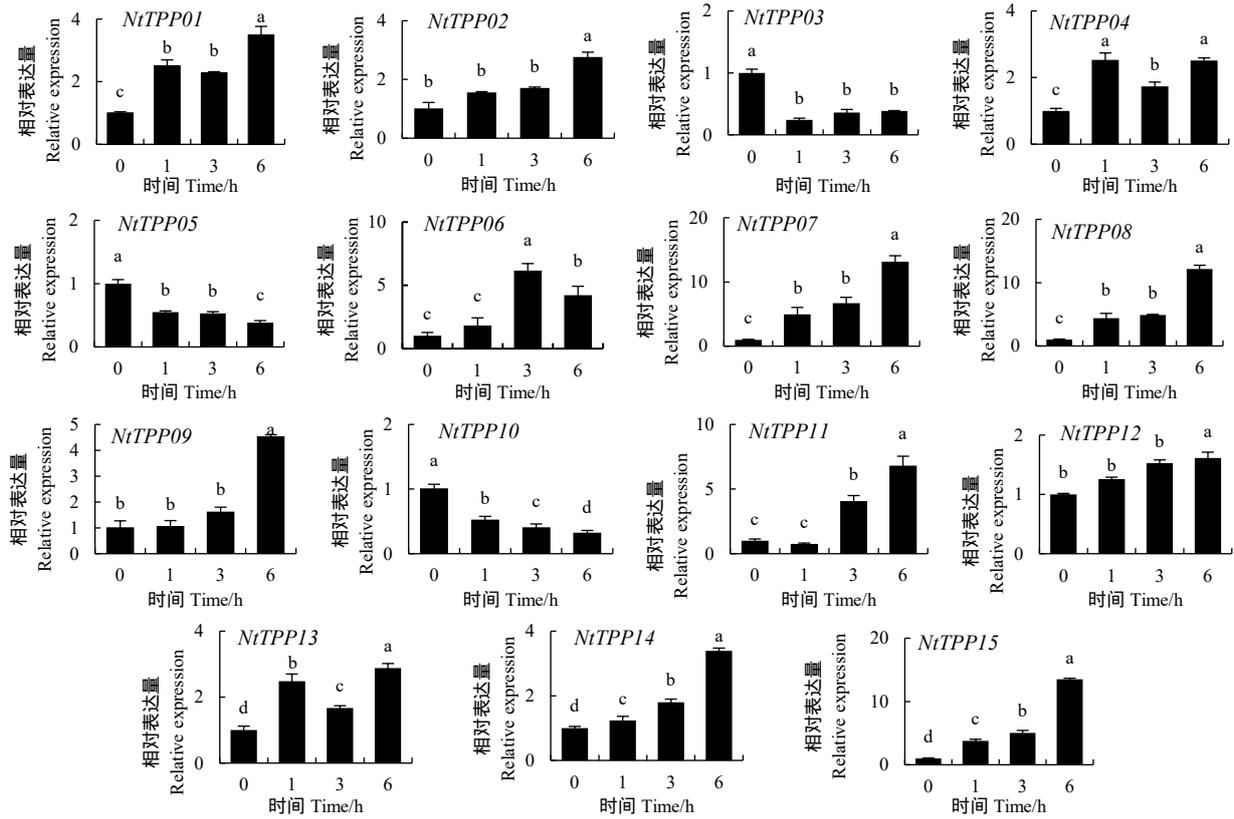


图 6 普通烟草 TPP 基因家族在干旱处理下的表达模式分析
Fig. 6 qRT-PCR analysis of NtTPP members under drought treatments

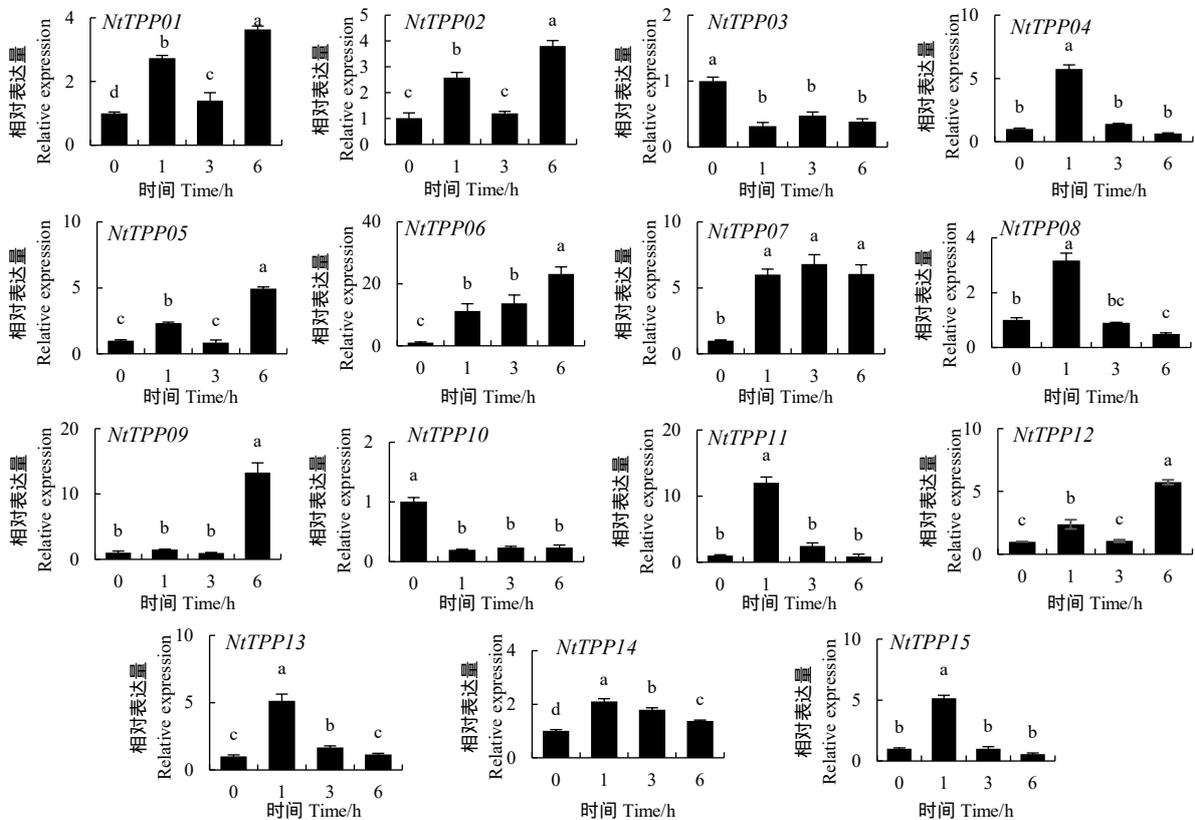


图 7 普通烟草 TPP 基因家族在盐处理下表达模式分析
Fig. 7 qRT-PCR analysis of NtTPP members under salt treatments

3 讨论

本研究在普通烟草基因组中鉴定得到 15 个 *TPP* 基因,均含有 *TPP* 保守结构域。系统进化分析将其划分为 3 个亚家族,分别是 CLASS 1、CLASS 2 和 CLASS 3,其中 CLASS 1 亚家族的 *NtTPP08*、*NtTPP15* 和 *NtTPP11* 与其他物种的 *TPP* 基因亲缘关系较远,说明它们在烟草中可能发挥特有的功能。进化分析发现烟草中没有亚家族 CLASS 2 成员,这与 *TPP* 基因在拟南芥、水稻以及小麦中的进化不一致,表明 CLASS 2 亚家族成员可能在烟草长期的进化过程中丢失。对其基因结构和蛋白保守结构域的分析发现,同一亚家族内基因结构非常相似, Motif 1 (*TPP* 结构域)在所有的 *NtTPP* 基因家族成员中均有, Motif 11 仅存在于 CLASS 1 亚家族, Motif 14 仅存在于 CLASS 2 亚家族。对其启动子上的顺式作用元件分析表明, *NtTPP* 基因家族成员包含大量与植物激素响应以及抗逆响应相关的顺式作用元件,进一步表明该基因家族在影响烟草生长发育及抗逆胁迫中扮演着重要的角色。

对烟草 *NtTPP* 基因家族转录组数据分析发现, *NtTPP* 基因家族的大多数成员在低温和干旱胁迫条件下均有响应。前人研究发过表达 *AtTPPF*、*OsTPP3* 和 *ZmTPP1* 分别能提高拟南芥、水稻和玉米的耐旱性^[11,14-15];过表达 *AtTPPD* 基因能提高拟南芥高盐胁迫耐受性^[10]。我们进一步利用 qRT-PCR 对 *NtTPP* 基因的表达模式进行验证,发现除 *NtTPP03* 和 *NtTPP10* 外,其他烟草 *NtTPP* 家族成员在干旱和盐胁迫诱导下表达量不同程度增加。其中 *NtTPP07*、*NtTPP08* 和 *NtTPP15* 在干旱胁迫下表达量增加较大, *NtTPP06*、*NtTPP09* 和 *NtTPP11* 在盐胁迫下表达量增加较大。另外 *NtTPP04* 在干旱胁迫条件下表达量显著上调,该基因是拟南芥 *AtTPPI* 在烟草中的同源基因,先前的研究表明, *AtTPPI* 可通过减少气孔开放和改善根系结构来提高拟南芥的抗旱能力^[28], *NtTPP04* 在干旱条件下表达量上调暗示着该基因在烟草中也有相似功能。另外, *NtTPP04* 在盐胁迫条件下转录水平也显著升高,表明该基因在烟草抵御逆境过程中有着重要作用。本研究通过 *NtTPP* 基因家族成员在非生物胁迫下的表达模式分析,初步鉴定一些抗逆基因 *NtTPP04*、*NtTPP06*、*NtTPP07*、*NtTPP08*、*NtTPP09*、*NtTPP11*

和 *NtTPP15*,为研究其功能差异和提高栽培烟草的耐受性奠定基础。

4 结论

本研究从普通烟草基因组中鉴定到 15 个 *TPP* 基因,划分为 3 个亚家族,分别为 CLASS 1、CLASS 2 和 CLASS 3,均含有保守的 *TPP* 结构域。启动子分析发现大量与逆境响应有关的顺式作用元件存在于 *NtTPP* 家族成员的启动子上,并且大部分 *NtTPP* 基因在根中的表达量较高,同时对干旱和盐胁迫均有响应,说明 *NtTPP* 基因可能主要利用根部来提高烟草的抗逆能力,具体的作用机制还需要进一步在烟草中对该基因进行敲除以及过表达等方式来验证。

参考文献

- [1] ELBEIN A D, PAN Y T, PASTUSZAK I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule[J]. *Glycobiology*, 2003, 13(4): 17R-27R.
- [2] PAUL M J, PRIMAVESI L F, JHURREEA D, et al. Trehalose metabolism and signaling[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 417-441.
- [3] SUNDARAMURTHI P, PATAPOFF T-W, SURYANARAYANAN R. Crystallization of trehalose in frozen solutions and its phase behavior during drying[J]. *Pharm Res*, 2010, 27(11): 2374-2383.
- [4] HACKEL C, ZINKEVICH T, BELTON P, et al. The trehalose coating effect on the internal protein dynamics[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2012, 14(8): 2727-2734.
- [5] AVONCE N, MENDOZA-VARGAS A, MORETT E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis[J]. *BMC Evol Biol*, 2006, 6: 109.
- [6] PONNU J, WAHL V, SCHMID M. Trehalose-6-phosphate: connecting plant metabolism and development[J]. *Front Plant Sci*, 2011, 2: 70.
- [7] DU L, LI S, DING L, et al. Genome-wide analysis of trehalose-6-phosphate phosphatases (TPP) gene family in wheat indicates their roles in plant development and stress response[J]. *BMC Plant Biol*, 2022, 22(1): 120.
- [8] RAHMAN M M, RAHMAN M M, EOM J S, et al. Genome-wide identification, expression profiling and promoter analysis of trehalose-6-phosphate phosphatase gene family in rice[J]. *Journal of Plant Biology*, 2021, 64(1): 55-71.
- [9] 张颖, 陈浩, 管淑君, 等. 玉米 *TPP* 家族基因生物信息学及表达分析[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(8): 2450-2459.
- [10] ZHANG Y, CHEN H, GUAN S J, et al. Bioinformatics and expression analysis of *TPP* family genes in maize[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(8): 2450-2459.
- [11] KRASENSKY J, BROYART C, RABANAL F A, et al. The redox-sensitive chloroplast trehalose-6-phosphate phosphatase *AtTPPD* regulates salt stress tolerance[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(9): 1289-1304.
- [12] LIN Q, YANG J, WANG Q, et al. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase family gene *AtTPPF* improves the drought tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 381.
- [13] PRAMANIK M H R, IMAI R. Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice[J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 58(6): 751-762.
- [14] SHIMA S, MATSUI H, TAHARA S, et al. Biochemical characterization of rice trehalose-6-phosphate phosphatases supports distinctive functions of these plant enzymes[J]. *FEBS J*, 2007, 274(5): 1192-1201.

- 优化研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2021.
- XIAO L. Research on ecosystem service function and network optimization of Nanping City based on ecological landscape pattern[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2021.
- [21] 曾强, 吴平, 陈星峰, 等. 南平植烟土壤质地状况及其与土壤养分的关系[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2763-2765.
- ZENG Q, WU P, CHEN X F, et al. Study on status of soil texture and its relationship with soil nutrient in Nanping tobacco-growing area[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(5): 2763-2765.
- [22] 陈朝阳, 陈志厚, 贺鹏, 等. 南平烟区植烟土壤主要养分丰缺分区研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(11): 250-257.
- CHEN C Y, CHEN Z H, HE P, et al. The study on the regionalization of the abundance and deficiency of the soil main nutrients in Nanping tobacco-growing areas[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(11): 250-257.
- [23] 李湘伟, 陈爱国, 戴培刚, 等. 南平烤烟种植生态适宜性评价[J]. 中国烟草科学, 2012, 33(2): 77-81.
- LI X W, CHEN A G, DAI P G, et al. Ecological suitability evaluation of Nanping tobacco planting areas[J]. Chinese Tobacco Science, 2012, 33(2): 77-81.
- [24] 李佳轶, 刘文, 任天宝, 等. 植烟土壤物理特性及碳库对不同粒径生物质炭的动态响应[J]. 中国土壤与肥料, 2019(2): 14-23.
- LI J Y, LIU W, REN T B, et al. Dynamic response of tobacco planting soil physical properties and carbon pool to different biochar particle sizes[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2019(2): 14-23.
- [25] 李井军, 彭海峰, 刘学莉, 等. 湖南嘉禾植烟土壤肥力特征和物理性状分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2013, 28(2): 211-217.
- LI J J, PENG H F, LIU X L, et al. Analysis of fertility characteristics and physical character of soil in Jiasha tobacco-growing areas in Hunan[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2013, 28(2): 211-217.
- [26] 张世昌. 福建耕地土壤 pH 空间分布及动态分析[J]. 中国农技推广, 2019, 35(2): 49-51, 32.
- ZHANG S C. Spatial distribution and dynamic analysis of soil pH in cultivated land in Fujian[J]. China Agricultural Technology Extension, 2019, 35(2): 49-51, 32.
- [27] 唐韵, 向德明, 周清明, 等. 龙山县植烟土壤 pH 时空变异与影响因子研究[J]. 中国土壤与肥料, 2020(6): 100-106.
- TANG Y, XIANG D M, ZHOU Q M, et al. Temporal and spatial variation of soil pH and its influencing factors in tobacco-growing areas of Longshan county[J]. Soil and fertilizer Science in China, 2020(6): 100-106.
- [28] 李渊博, 包晓容, 穆童. 烟草施肥方式研究进展[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(4): 20-23.
- LI Y B, BAO X R, MU T. Research progress of tobacco fertilization methods[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2020, 48(4): 20-23.

(上接第8页)

- [14] JIANG D, CHEN W, GAO J, et al. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase *OsTPP3* increases drought tolerance in rice[J]. Plant Biotechnology Reports, 2019, 13(3): 285-292.
- [15] ACOSTA-PÉREZ P, CAMACHO-ZAMORA B D, ESPINOZA-SÁNCHEZ E A, et al. Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase genes and analysis of its differential expression in maize (*Zea mays*) seedlings under drought stress[J]. Plants (Basel), 2020, 9(3): 315.
- [16] RODRÍGUEZ-SALAZAR J, SUÁREZ R, CABALLERO-MELLADO J, et al. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants[J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 296(1): 52-59.
- [17] 徐向丽, 易克, 蒋红梅, 等. 外源海藻糖对干旱胁迫下烟草幼苗抗旱性的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(33): 18675-18677.
- XU X L, YI K, JIANG H M, et al. Effect of exogenous trehalose on the drought-resisting of tobacco seedling under drought stress[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(33): 18675-18677.
- [18] 陈芊伊. 外源海藻糖增强烟草对普通花叶病抗性的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2017.
- CHEN Q Y. The research of disease resistance to TMV in tobacco enhanced by trehalose treatment[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017.
- [19] WANG Y J, HAO Y J, ZHANG Z G, et al. Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells[J]. J Plant Physiol, 2005, 162(2): 215-23.
- [20] FINN R D, COGGILL P, EBERHARDT R Y, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(D1): D279-D285.
- [21] GARG V K, AVASHTHI H, TIWARI A, et al. MFPP1 - multi FASTA protparam interface[J]. Bioinformatics, 2016, 12(2): 74-77.
- [22] 邓智超, 田冬冬, 宋青松, 等. 烟草 OSCA 基因家族鉴定及非生物胁迫诱导表达模式分析[J]. 中国烟草科学, 2022, 43(1): 14-21.
- DENG Z C, TIAN D D, SONG Q S, et al. Genome wide identification and expression analysis of the OSCA gene family in response to abiotic stresses in tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2022, 43(1): 14-21.
- [23] HU B, JIN J, GUO A Y, ZHANG H, et al. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [24] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37: W202-W208.
- [25] 李志远, 宋青松, 刘江, 等. 普通烟草脂氧合酶基因家族鉴定及表达模式分析[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(5): 86-94.
- LI Z Y, SONG Q S, LIU J, et al. Identification and expression analysis of the lipoxygenase gene family in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(5): 86-94.
- [26] EDWARDS K D, FERNANDEZ-POZO N, DRAKE-STOWE K, et al. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 448.
- [27] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters[J]. Trends Plant Sci, 2005, 10(2): 88-94.
- [28] LIN Q, WANG S, DAO Y, et al. *Arabidopsis thaliana* trehalose-6-phosphate phosphatase gene *TPPI* enhances drought tolerance by regulating stomatal apertures[J]. J Exp Bot, 2020, 71(14): 4285-4297.