

条斑紫菜 *Tubulin* 和 *Kinesin* 基因家族鉴定及失水胁迫表达模式分析*

崔正彩¹ 孔凡娜¹ 茅云翔^{1,2} 孙斌¹ 王俊皓¹ 董道英¹

(1. 中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003; 2. 海南热带海洋学院水产与生命学院 热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室 三亚 572022)

摘要 微管是细胞骨架的主要成分,其结构及动力学机制对提高生物体耐受性具有重要作用。微管网络如何通过结构的动态变化调控适应环境变化已成为胁迫生物学领域的研究热点之一。条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*)能够适应潮间带复杂多变的环境,是研究潮间带大型海藻抗逆机制的良好材料。目前对紫菜微管相关基因家族构成及其生物学功能的研究较少。本研究利用生物信息学方法,在条斑紫菜基因组中共鉴定出 4 个 *Tubulin* 基因(*Py α -tubulin 1*、*Py α -tubulin 2*、*Py β -tubulin* 和 *Py γ -tubulin*)和 11 个 *Kinesin* 基因(*PyKinesin 1*—*PyKinesin 11*),并对其理化性质、基因结构、蛋白特征、染色体定位、系统进化和失水胁迫下的表达模式进行了系统分析。结果显示:条斑紫菜中有 3 种微管蛋白(*Tubulin*)亚型;该家族成员散布于 1 号和 2 号染色体上,*Py α -tubulin 1* 和 *Py α -tubulin 2* 为串联重复基因;*PyTubulin* 家族成员在基因结构和蛋白特征方面均较为保守,且在转录水平对失水胁迫不敏感。条斑紫菜中有 5 种驱动蛋白(*Kinesin*)亚型,亚家族种类和基因数量均少于高等植物;该家族基因散布于 1 号、2 号和 3 号染色体上,无串联重复基因;*PyKinesin* 家族成员在基因结构和蛋白特征方面存在一定差异,*PyKinesin 1* 在中高度失水胁迫下表达量显著上调。本研究为进一步理解 *Tubulin* 和 *Kinesin* 基因家族的进化和功能、解析微管在条斑紫菜响应失水胁迫中的作用奠定了基础。

关键词 条斑紫菜; *Tubulin*; *Kinesin*; 基因家族; 失水胁迫

中图分类号 S917.3 doi: 10.11693/hyh20200600174

微管作为细胞骨架的重要组成部分,是多种非生物胁迫的感受器,在植物抗逆性中发挥重要作用(Krasylenko *et al.*, 2012),微管网络结构的排列影响着微管对环境信号的敏感性(Mirabet *et al.*, 2018)。微管响应环境信号变化方式包括介导细胞内物质运输、调节胞内信号的转导、调控细胞壁纤维丝的组装以及调节自身结构动态重排等多种生物学过程(Oakley, 1999; 陈志玲等, 2003; Paradez *et al.*, 2006; Mineyuki, 2007)。 α -和 β -*tubulin*是构成微管蛋白亚基的基本结构成分(Nogales *et al.*, 1998),其构象变化能够调节微管的动态稳定性(Shaw *et al.*, 2003),使微管骨架通过不断重构响应各种生物和非生物刺激(王朝凤等, 2019),对

微管发挥生物学功能具有重要意义。驱动蛋白Kinesin是沿微管轨道进行长距离运输的动力蛋白超家族(Lee *et al.*, 2004),具有保守的微管结合位点和运动结构域(Reddy, 2001)。Kinesin家族蛋白不仅能够通过调节微管结合蛋白的运输参与微管结构的调控,还能够直接结合在微管末端促进微管的解聚(周浩等, 2014),对微管的动态稳定性及结构重排都具有十分重要的作用。

植物微管通过微管蛋白及其相关蛋白的调节参与多种生物学过程从而适应环境胁迫。拟南芥通过磷脂酶调节微管的稳定性以实现对其耐热性的负调控(Zhang *et al.*, 2017),通过微管相关蛋白调节皮层微管

* 国家自然科学基金项目, 41976146 号, 31672641 号。崔正彩, 硕士研究生, E-mail: 17860723190@163.com

通信作者: 孔凡娜, 副教授, E-mail: fnkong@ouc.edu.cn

收稿日期: 2020-06-21, 收修改稿日期: 2020-07-19

的重组以提高其耐盐性(Zhou *et al.*, 2017)。玉米微管通过调节细胞壁结构和胞内膨压以增强对干旱环境的耐受性(Baskin *et al.*, 1999); 杨树叶片通过微管结构的变化调节诱导气孔关闭以减少干旱条件下的水分流失(Swamy *et al.*, 2015); 仙鹤藓(*Atrichum undulatum*)通过叶片微管重排以迅速对失水胁迫做出响应(陈志玲等, 2003); 石南星绿藻(*Asterochloris erici*)的 *Tubulin* 基因在转录水平显著响应于失水胁迫(Gasulla *et al.*, 2013); 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *Kinesin-13A* 基因缺失突变体在干旱条件下比野生型更早出现萎蔫死亡现象(魏丽勤, 2005)。

条斑紫菜生长于潮间带地区, 受潮汐影响, 潮间带地区海水周期性涨落, 条斑紫菜每天都要经历干湿、温度以及渗透压等各种环境因子的急剧变化, 是研究潮间带大型海藻非生物胁迫响应机制的理想模式生物。目前对潮间带海藻细胞骨架在其适应潮间带环境中的作用机制研究甚少。本研究首次在全基因组水平分析了条斑紫菜微管相关基因 *Tubulin* 和 *Kinesin* 基因家族的组成及其特点, 并通过实时荧光定量 PCR 技术探究了叶状体中表达丰度高的 3 个 *PyTubulin* 和 2 个 *PyKinesin* 在失水胁迫处理下的表达模式, 为探究微管在条斑紫菜响应失水胁迫中的作用奠定基础, 也为进一步解析条斑紫菜响应逆境胁迫的调控机制提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*) RZ 纯系, 从海洋生物遗传与育种教育部重点实验室紫菜种质库获取。

1.1.2 实验试剂 RNA 提取试剂盒(购自 OMEGA); DNA 酶(购自 OMEGA); 反转录试剂盒(购自 TAKARA); 琼脂糖凝胶回收试剂盒(购自全式金); 快速质粒小提试剂盒(购自天根); 2×Taq Plus Master Mix (购自南京诺唯赞); ChamQ™ SYBR Color qPCR Master Mix (购自南京诺唯赞)。

1.2 方法

1.2.1 基因家族鉴定 本研究采用隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model, HMM)对条斑紫菜 *Tubulin* 和 *Kinesin* 基因家族进行鉴定: 从 Pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)下载 *Tubulin* 和 *Kinesin* 家族保守结构域 HMM 模型(PF00022), 通过 hmmsearch 检索条斑紫菜 *Tubulin* 和 *Kinesin* 蛋白种子序列, E-value

设置为 $1 \times e^{-20}$; 根据提取的蛋白种子序列构建条斑紫菜特异性 HMM 模型, 利用所构建模型通过 hmmsearch 再次检索并提取条斑紫菜 *Tubulin* 和 *Kinesin* 蛋白序列, 设置 E-value<0.01; 将提取到的蛋白序列去重复后, 根据蛋白 ID 号提取对应基因序列, 获得 *PyTubulin* 和 *PyKinesin* 基因家族序列信息。通过软件 SnapGene 分析蛋白等电点(pI)和分子量(Mw), 通过在线网站 Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)预测蛋白亚细胞定位。

1.2.2 基因结构及蛋白序列分析 为探究 *PyTubulin* 和 *PyKinesin* 家族基因结构和蛋白序列特征, 本研究对基因内含子-外显子分布、蛋白保守基序和蛋白保守结构域进行预测分析。根据 *PyTubulin* 和 *PyKinesin* 家族基因组信息和转录本 ID 进行基因结构注释, 从 Gff 注释文件中获得基因位置信息, 通过网站 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析内含子-外显子分布。通过在线网站 MEME (<http://meme-suite.org/index.html>)预测蛋白保守基序, 分布模型选择 anr, 预测数量设置为 10, 最短 motif 设置为 6 aa, 最长 motif 设置为 50 aa。将蛋白序列提交至在线网站 SMART(<http://smart.embl.de/>)预测蛋白结构域, 预测模型为 Normal。

1.2.3 染色体定位及基因复制分析 本研究通过 SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>)分析获得条斑紫菜的染色体长度信息, 根据 *PyTubulin* 和 *PyKinesin* 基因 ID 在 Gff 文件中提取相应的基因位置信息, 将提取到的染色体长度信息和基因位置信息提交至网站 MapGene2 Chrom (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/), 绘制基因在染色体上的分布图。为探究 2 个家族中基因复制情况, 本研究以两条序列一致度 >75%, 比对区域序列长度 >较长序列的 75%, 基因距离 <100 kb 为标准进行串联重复基因筛选, 通过 ClustalW 比对串联重复基因的 CDS 序列, 根据输出文件计算得到串联重复基因的非同义替换率/同义替换率(Ka/Ks)值, 并分析串联重复基因的进化模式。

1.2.4 基因家族系统进化分析 系统进化分析所用脐形紫菜(*Porphyra umbilicalis*)、紫球藻(*Porphyridium purpureum*)、角叉菜(*Chondrus crispus*)、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、团藻(*Volvox carteri*)、长囊水云(*Ectocarpus siliculosus*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)以及水稻(*Oryza sativa*)蛋白序列均下载自 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 条斑紫菜(*P. yezoensis*)和坛紫菜(*P.*

haitanensis)相关序列均来自本实验室通过二代测序和三代测序获得的高质量基因组。利用本研究中基因家族鉴定方法,从 NCBI 下载的蛋白序列信息中提取各物种 *Tubulin* 和 *Kinesin* 家族成员蛋白序列,利用 ClustalW 对提取的蛋白序列进行多序列比对,使用 Mega7 构建系统进化树,建树方法为最大似然法(Maximum Likelihood),建树模型为泊松模型(Poisson Model),迭代 1000 次。

1.2.5 失水胁迫材料处理 参考 Kim 等人(2009)对紫菜叶状体失水的处理方法,挑选同批培养的生长状态良好且日龄为 45 d 的条斑紫菜叶状体进行不同程度失水胁迫处理,处理条件分别设置为失水 10%、30%、50%、60%、70%、80%,失水 50%后复水 30 min,失水 80%后复水 30 min 和失水 80%后复水 60 min,每组设置三个生物学平行。将藻体置于(10±1) °C 培养箱中恒温失水,光照为 35—45 μmol photons/(m²·s),样品失水过程需将藻体平整展开以保证失水均匀,通过二氧化硅促进失水以缩短中高度失水处理组的失水时间,将失水时间控制在 0.5 h 以内。藻体失水率按公式(1)计算,其中藻体鲜重为处理前去除藻体表面残留的水分后测得的重量,藻体干重为 60 °C 下将新鲜藻体烘干至藻体重量不再变化时测得的重量。

$$WL(\%) = \frac{FW - TW}{FW - DW} \times 100, \quad (1)$$

式中,WL:藻体失水率;FW:藻体鲜重;TW:失水后藻体重量;DW:藻体干重。

1.2.6 基因表达水平检测 通过对实验室前期转录组数据分析,选取在条斑紫菜叶状体中表达丰度较高的 *Pya-tubulin 2*、*Pyβ-tubulin*、*Pyγ-tubulin*、*PyKinesin 1* 和 *PyKinesin 10*,探究 *PyTubulin* 和 *PyKinesin* 在不同失水胁迫下的表达模式。以未经失水处理的条斑紫菜 RZ 纯系叶状体为对照组,不同失水和复水条件处理的条斑紫菜 RZ 叶状体为实验组,每组设置 3 个生物学平行和 3 个技术重复,通过 qRT-PCR 技术检测目的基因在不同程度失水胁迫下的表达变化,引物序列如表 1 所示。内参基因为不同失水条件下在条斑紫菜中表达稳定的 *PyUBC* 基因(Gao *et al.*, 2018),在内参基因的校正下,用 2^{-ΔΔCt} 法计算得到目的基因的相对表达量,并通过数据统计软件 SPSS (Statistical Product and Service Solutions)对不同失水胁迫条件下基因的相对表达量进行独立样本 *T* 检验,置信区间百分比为 95%。

表 1 qRT-PCR 所用引物序列
Tab.1 Primer sequences used in qRT-PCR

基因名称	引物序列(5'—3')
<i>PyUBC</i>	F: CGCTGACCGTTTCCAAG
	R: CGACTGCGGTTGGACTT
<i>Pya-tubulin 2</i>	F: GGTTTCACCGTCTACCCTTCG
	R: CGCCTCATTGTCCAGCATCA
<i>Pyβ-tubulin</i>	F: TGATTGGTTACGCCCGCT
	R: CCGCTGTTCTTCGTCTGGA
<i>Pyγ-tubulin</i>	F: ATTGGGTGATGGGGGAGTCT
	R: GCTTGGCACTTGGTACAGGG
<i>PyKinesin 1</i>	F: CGGCTCGACCTGTCCAAGTA
	R: CGCAAAGACGGCTTCCAC
<i>PyKinesin 10</i>	F: CGCAGGCCATCAATAAGTCG
	R: CGCCCAATCTCACACGCAT

2 结果与分析

2.1 基因家族的鉴定

经过 hmmsearch 检索和比对筛选,最终确定条斑紫菜基因组中 *Tubulin* 基因家族有 4 个成员,均含有 *Tubulin* 家族保守结构域,分别命名为 *Pya-tubulin 1*、*Pya-tubulin 2*、*Pyβ-tubulin* 和 *Pyγ-tubulin*。cDNA 序列最短为 1377 bp,最长为 2529 bp,编码多肽的氨基酸数量为 454—465,分子量从 49.51—51.42 kDa,等电点从 4.33 到 4.97 不等。对蛋白进行亚细胞定位预测,预测结果显示 *Pya-tubulin 1* 和 *Pya-tubulin 2* 定位于线粒体,*Pyβ-tubulin* 和 *Pyγ-tubulin* 定位于细胞质。条斑紫菜 *Kinesin* 家族共鉴定出 11 个成员,均含有驱动蛋白保守运动域,将 11 个 *PyKinesin* 分别命名为 *PyKinesin 1—PyKinesin 11*,cDNA 序列最短为 1272 bp,最长为 4101 bp,编码多肽的氨基酸数量为 423—1366,分子量从 41.91—128.26 kDa,等电点从 4.79 到 10.96 不等。亚细胞定位预测结果显示有 8 个蛋白定位于细胞核,3 个蛋白定位于细胞质。*PyTubulin* 和 *PyKinesin* 基因家族蛋白特征如表 2 所示。

2.2 基因结构和蛋白结构域分析

条斑紫菜 *Tubulin* 家族基因结构和蛋白结构域分析结果表明,*PyTubulin* 基因结构简单,4 个基因均不含内含子(图 1a);蛋白保守基序相似性较高,所有家族成员均包含 motif1-motif 8,*Pyγ-tubulin* 缺少 motif 9

和 motif 10, *Pyβ-tubulin* 缺少 motif 10 (图 1b); 蛋白结构的 Tubulin 蛋白 GTP 酶结构域, 羧基端均含有一个保守的 Tubulin 羧基端结构域(图 1c)。

表 2 条斑紫菜 *Tubulin* 和 *Kinesin* 基因家族蛋白特征
Tab.2 Protein characteristics of *Tubulin* and *Kinesin* gene family in *P. yezoensis*

基因名称	基因 ID	编码序列	氨基酸	分子量 (kDa)	等电点	亚细胞定位
<i>Pyα-tubulin 1</i>	py10637.t1	1977	455	49.51	4.97	线粒体
<i>Pyα-tubulin 2</i>	py10654.t1	1997	454	49.53	4.9	线粒体
<i>Pyβ-tubulin</i>	py04248.t1	1377	458	50.18	4.33	细胞质
<i>Pyγ-tubulin</i>	py03680.t1	2529	465	51.42	4.92	细胞质
<i>PyKinesin 1</i>	py03095.t1	4101	1366	128.26	10.74	细胞核
<i>PyKinesin 2</i>	py03345.t1	2703	900	85.95	6.55	细胞核
<i>PyKinesin 3</i>	py04096.t1	3048	1015	95.05	10.79	细胞核
<i>PyKinesin 4</i>	py04806.t1	1272	423	41.91	10.15	细胞质
<i>PyKinesin 5</i>	py06213.t1	2985	994	90.96	4.85	细胞核
<i>PyKinesin 6</i>	py06963.t1	3783	1260	120.10	5.07	细胞质
<i>PyKinesin 7</i>	py07128.t1	2346	781	73.72	10.96	细胞核
<i>PyKinesin 8</i>	py07129.t1	3969	1323	123.99	4.79	细胞核
<i>PyKinesin 9</i>	py08263.t1	1818	605	54.64	6.62	细胞质
<i>PyKinesin 10</i>	py10378.t1	3400	712	75.26	6.34	细胞核
<i>PyKinesin 11</i>	py10448.t1	3879	1292	120.30	5.94	细胞核

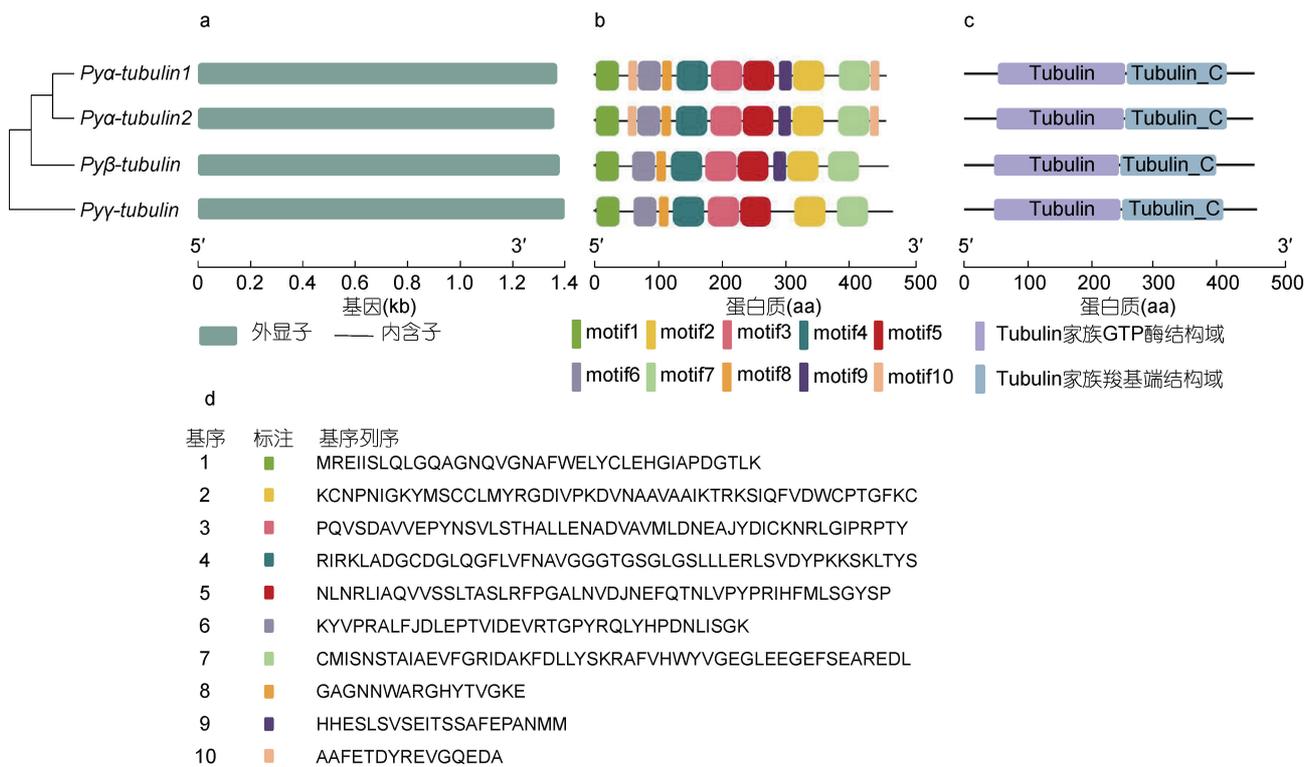


图 1 *PyTubulin* 基因家族基因结构和蛋白结构域

Fig.1 Gene structure and protein domain of *PyTubulin* gene family

注: a: *PyTubulin* 家族内含子-外显子分布; b: *PyTubulin* 家族 motif(基序)分布; c: *PyTubulin* 家族蛋白结构域分布; d: *PyTubulin* 家族 motif(基序)序列信息

条斑紫菜 *Kinesin* 家族基因结构和蛋白结构域分析结果表明, *PyKinesin* 基因结构较为简单, 其中 *PyKinesin 2*、*PyKinesin 3*、*PyKinesin 5* 和 *PyKinesin 9* 均含有 1 个内含子, 其余 7 个基因均不含内含子(图 2a); 不同蛋白保守基序的数量和分布差异较大, 同一蛋白中某一特定 motif 重复出现频率高, 如 motif 5

在 *PyKinesin 3* 中出现了 10 次, 在 *PyKinesin 10* 中没有出现, motif 9 在 *PyKinesin 8* 中连续出现 8 次(图 2b); 蛋白结构域保守, 11 个蛋白均含有典型的驱动蛋白运动域, 其中有 6 个 *Py-Kinesin* 的运动域在氨基端, 3 个 *Py-Kinesin* 的运动域在羧基端, 另外 2 个 *Py-Kinesin* 的运动域位于蛋白序列的中间位置(图 2c)。

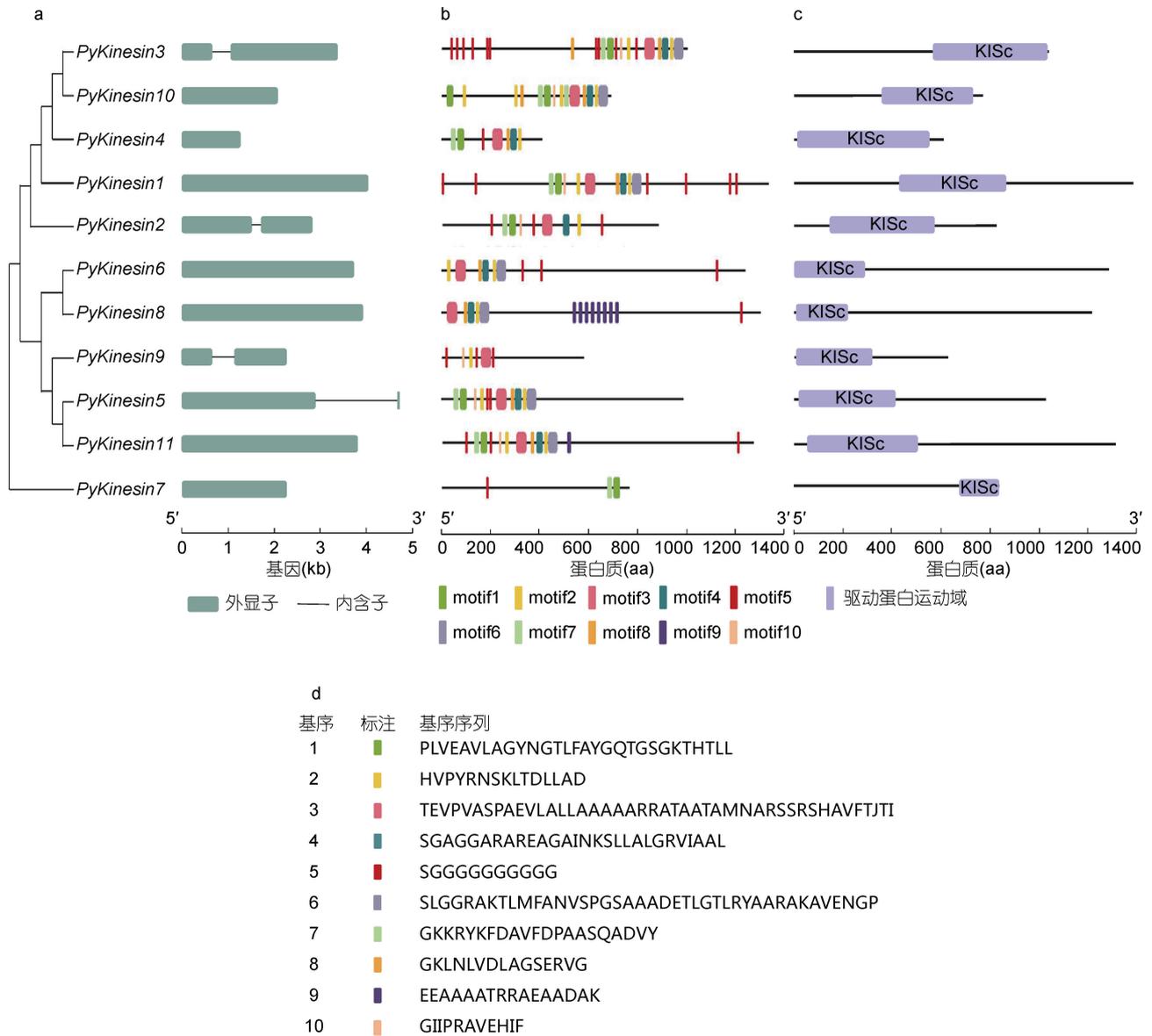


图 2 *PyKinesin* 基因家族基因结构和蛋白结构域

Fig.2 Gene structure and protein domain of *PyKinesin* gene family

注: a: *PyKinesin* 家族内含子-外显子分布; b: *PyKinesin* 家族 motif(基序)分布; c: *PyKinesin* 家族蛋白结构域分布; d: *PyKinesin* 家族 motif(基序)序列信息

2.3 染色体定位与基因复制分析

PyTubulin 基因家族染色体定位分析结果表明 *Py α -tubulin 1*、*Py α -tubulin 2* 和 *Py β -tubulin* 均定位于 2 号染色体, *Py γ -tubulin* 定位于 1 号染色体(图

3)。基因复制分析结果表明 *Py α -tubulin 1* 和 *Py α -tubulin 2* 为串联重复基因, 其非同义替换率 $K_a=0.0166$, 同义替换率 $K_s=0.8126$, $K_a/K_s=0.0204$ 。根据 K_a/K_s 值估算串联重复基因的进化选

择模式, $Ka/Ks=1$ 表示中性选择, $Ka/Ks<1$ 表示纯化选择, $Ka/Ks>1$ 表示正选择(李晓翠等, 2020), 故

Pyα-tubulin 1 和 *Pyα-tubulin 2* 的进化选择模式为纯化选择。

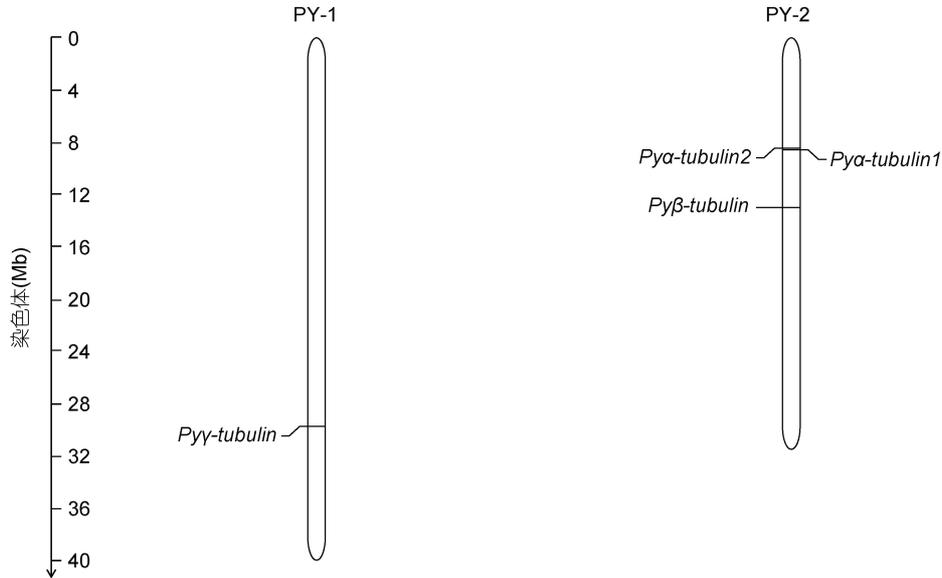


图3 *PyTubulin* 基因家族染色体定位

Fig.3 Chromosomal location of *PyTubulin* gene family
注: PY-1: 条斑紫菜 1 号染色体; PY-2: 条斑紫菜 2 号染色体

PyKinesin 家族染色体定位结果显示, *PyKinesin 2*、*PyKinesin 5*、*PyKinesin 6* 和 *PyKinesin 11* 分布于 1 号染色体, *PyKinesin 3*、*PyKinesin 7*、*PyKinesin 8*、*PyKinesin 9* 和 *PyKinesin 10* 分布于 2 号染色体,

PyKinesin 1 位于 3 号染色体(图 4)。*PyKinesin 4* 由于基因组 Gff 文件中缺少注释信息, 无法定位。基因复制分析结果表明 *PyKinesin* 基因家族没有串联重复基因。

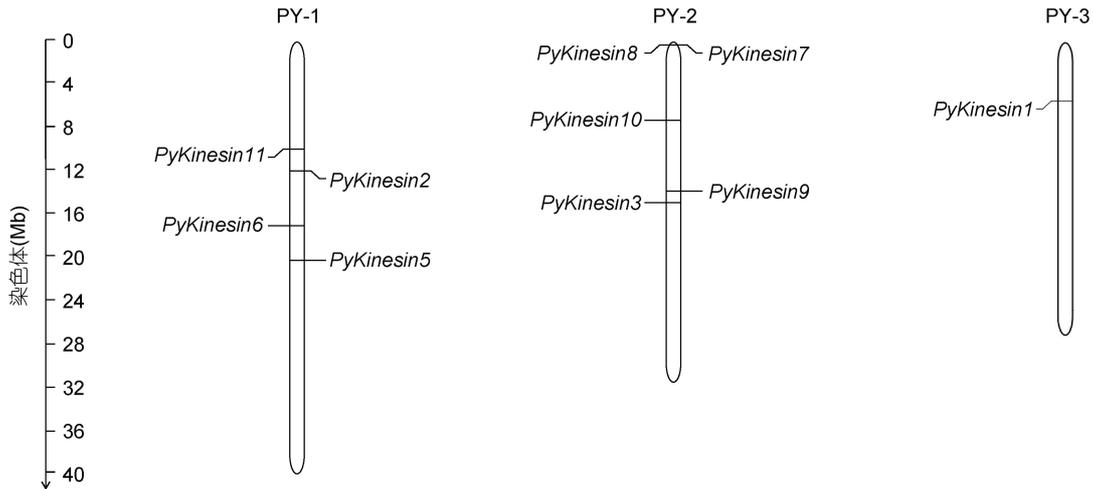


图4 *PyKinesin* 基因家族染色体定位

Fig.4 Chromosomal location of *PyKinesin* gene family
注: PY-1: 条斑紫菜 1 号染色体; PY-2: 条斑紫菜 2 号染色体; PY-3: 条斑紫菜 3 号染色体

2.4 基因家族系统进化分析

对来自条斑紫菜(Py)、坛紫菜(Ph)、脐形紫菜(Pu)、紫球藻(Pp)、角叉菜(Cc)、莱茵衣藻(Cr)、团藻

(Vc)、长囊水云(Es)、拟南芥(At)以及水稻(Os)的 72 条 Tubulin 蛋白序列构建系统进化树(图 5)。结果表明, 10 个物种的 Tubulin 蛋白均包含 α -tubulin、 β -tubulin

和 γ -tubulin 3 大亚家族, 在莱茵衣藻和团藻两种绿藻中还存在 δ -tubulin、 ϵ -tubulin 和 η -tubulin 3 种微管蛋白亚型。在 α -tubulin、 β -tubulin 和 γ -tubulin 3 大亚家族分支中, 红藻、褐藻和绿色植物的 *Tubulin* 分别形

成了独立的姐妹枝, 条斑紫菜的 *Tubulin* 基因均与其他 4 种红藻的 *Tubulin* 聚在一起, 莱茵衣藻和团藻两种绿藻与拟南芥和水稻的 *Tubulin* 聚在一簇, 长囊水云单独成一簇。

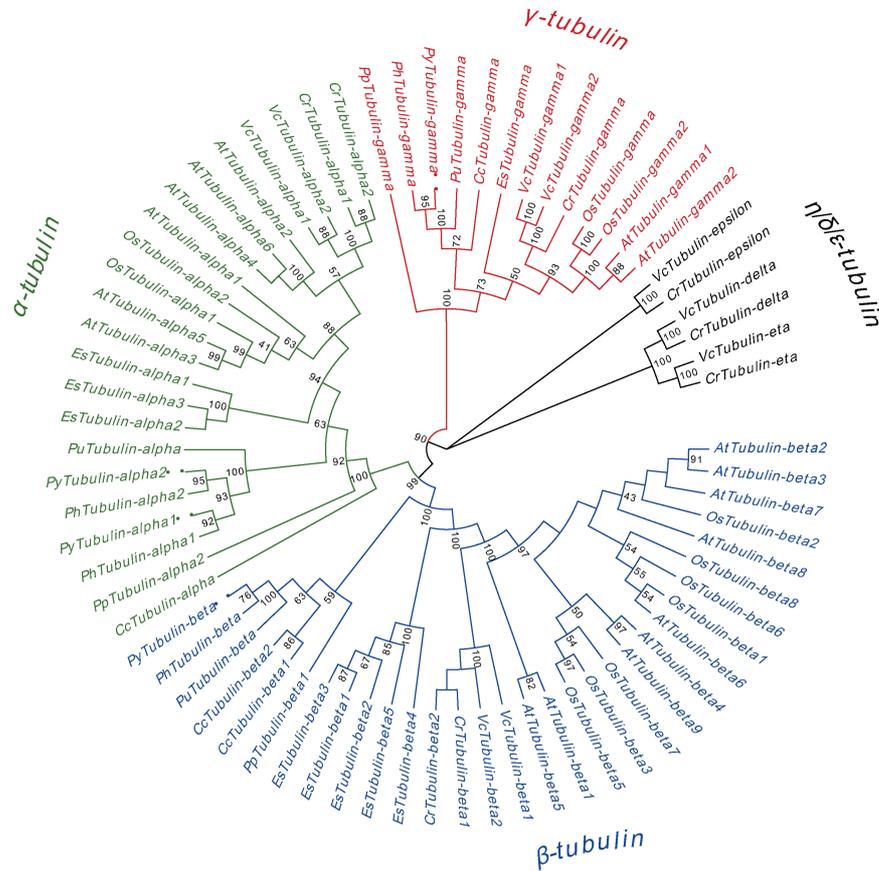


图 5 *PyTubulin* 基因家族系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic analysis of *PyTubulin* gene family

对条斑紫菜(Py)、坛紫菜(Ph)、脐形紫菜(Pu)、角叉菜(Cc)、莱茵衣藻(Cr)、团藻(Vc)、长囊水云(Es)以及拟南芥(At) *Kinesin* 家族的系统进化分析显示(图 6), 152 个 *Kinesin* 家族蛋白共分为 11 个 Group, 其中 Group 和 Group 为藻类中特有的亚型。红藻分布于其中 6 个 Group, 拟南芥和绿藻均分布于其中 9 个 Group, 褐藻长囊水云在 11 个 Group 中均有分布。PyKinesin 家族的 11 个蛋白分布在其中 5 个 Group 中, PyKinesin4 单独聚在 Group 的一个分支中, 其余 10 个 PyKinesin 均和其他红藻 *Kinesin* 聚在一起。系统进化分析结果表明, 4 个红藻的 *Kinesin* 基因亚家族种类和基因数量均明显少于高等植物和其他藻类, 这可能是由于 *Kinesin* 家族在进化过程中发生了基因家族扩张。

2.5 基因表达水平检测

选取条斑紫菜叶状体中表达丰度高的 *Py α -tubulin 2*、*Py β -tubulin*、*Py γ -tubulin*、*PyKinesin 1* 和 *PyKinesin 10* 作为目的基因, 利用 qRT-PCR 技术检测分析 5 个基因在不同失水和复水条件下的转录变化, 检测结果如图 7—10 所示。*Py α -tubulin 2*、*Py β -tubulin* 和 *Py γ -tubulin* 基因在不同失水和复水条件下表现出不同的表达模式, 但表达量变化均不显著, 对失水胁迫没有明显的响应。2 个 *PyKinesin* 基因对失水胁迫呈现出不同的响应模式, *PyKinesin 1* 对失水胁迫敏感, 其表达量随着失水程度的增加显著上调, 在失水 50%、60%、70%以及 80%时达到对照组的 2 倍以上, 复水后表达量下调, 在失水 80%复水 60 min 后下调显著, *PyKinesin 10* 在不同失水和复水胁迫下表达量均无显著变化。

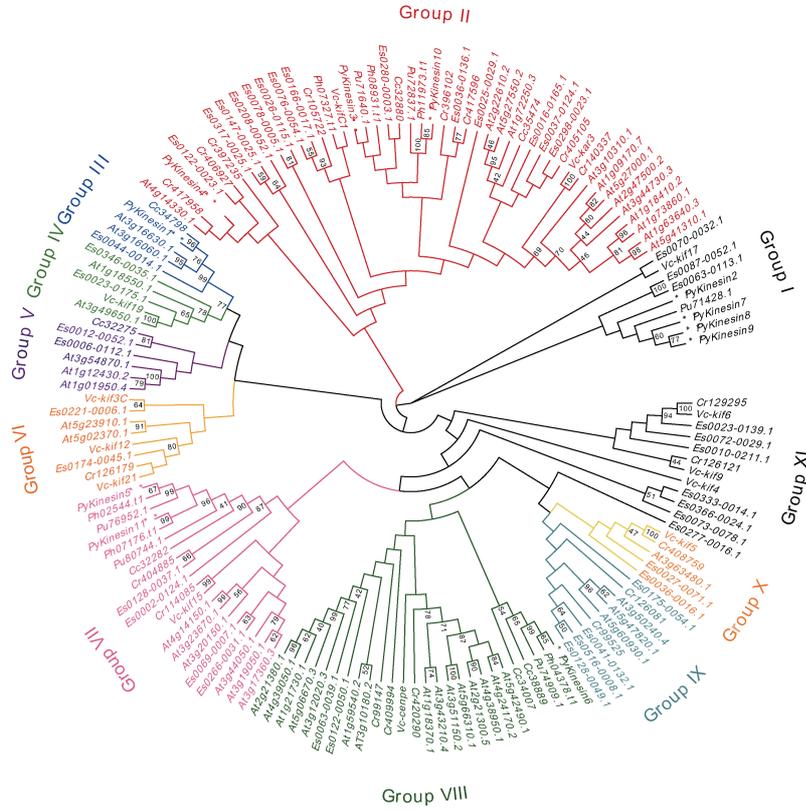


图 6 *PyKinesin* 基因家族系统进化分析
 Fig.6 Phylogenetic analysis of *PyKinesin* gene family

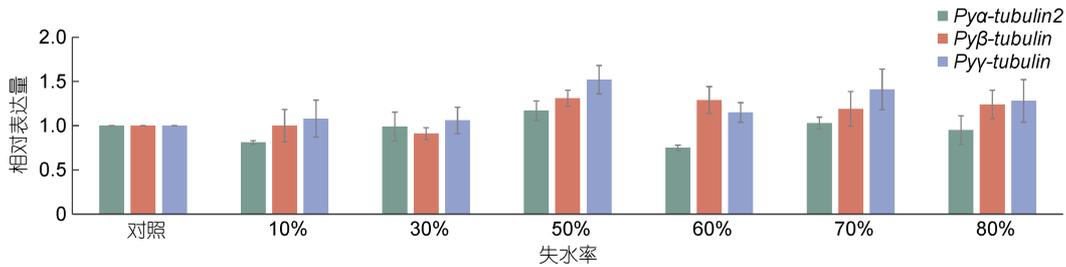


图 7 不同失水条件下 *PyTubulin* 基因表达量

Fig.7 Expression of *PyTubulin* under different dehydration conditions
 注: 10%: 失水 10%处理组; 30%: 失水 30%处理组; 50%: 失水 50%处理组; 60%: 失水 60%处理组; 70%: 失水 70%处理组; 80%: 失水 80%处理组; 相对表达量=表达量平均值±标准差(n=3)

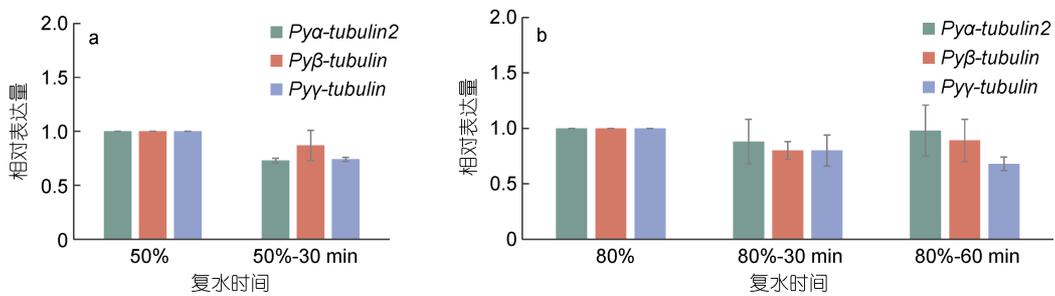
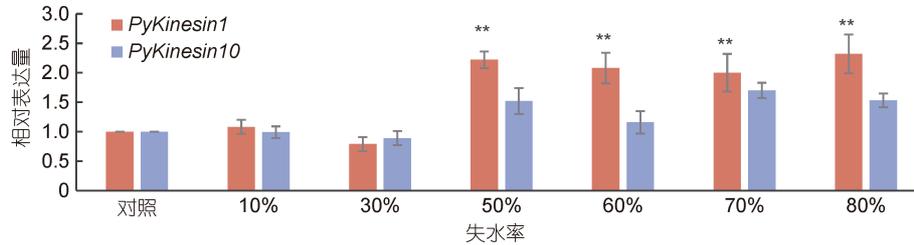
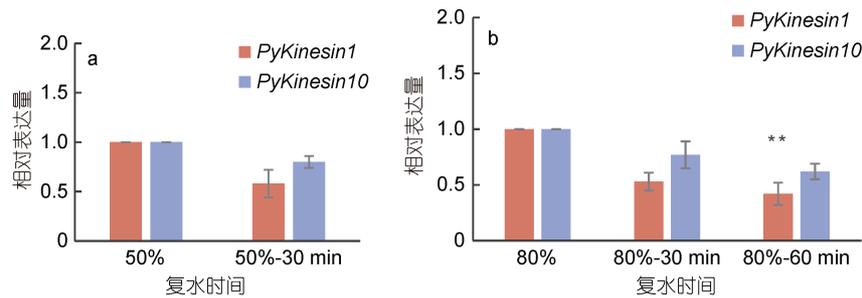


图 8 不同复水条件下 *PyTubulin* 基因表达量

Fig.8 Expression of *PyTubulin* under different rehydration conditions
 注: a: 失水 50%复水组; b: 失水 80%复水组; 50%: 失水 50%处理组; 80%: 失水 80%处理组; 50%-30 min: 失水 50%后复水 30 min 处理组; 80%-30 min: 失水 80%后复水 30 min 处理组; 80%-60 min: 失水 80%后复水 60 min 处理组; 相对表达量=表达量平均值±标准差(n=3)

图9 不同失水条件下 *PyKinesin* 基因表达量Fig.9 Expression of *PyKinesin* under different dehydration conditions

注: 10%: 失水 10%处理组; 30%: 失水 30%处理组; 50%: 失水 50%处理组; 60%: 失水 60%处理组; 70%: 失水 70%处理组; 80%: 失水 80%处理组; 相对表达量=表达量平均值±标准差($n=3$); **: $P<0.01$

图10 不同复水条件下 *PyKinesin* 基因表达量Fig.10 Expression of *PyKinesin* under different rehydration conditions

注: a: 失水 50%复水组; b: 失水 80%复水组; 50%: 失水 50%处理组; 50%-30 min: 失水 50%后复水 30 min 处理组; 80%: 失水 80%处理组; 80%-30 min: 失水 80%后复水 30 min 处理组; 80%-60 min: 失水 80%后复水 60 min 处理组; 相对表达量=表达量平均值±标准差($n=3$); **: $P<0.01$

3 讨论

微管是细胞骨架的重要组成部分,目前在真核生物中共鉴定出 7 种微管蛋白,分别是 α 、 γ 、 β 、 δ 、 ϵ 、 ζ 和 η 微管蛋白, α 、 β 、 γ 微管蛋白基因存在于所有真核生物中,是微管聚合的必需基因, δ 、 ϵ 、 ζ 和 η 微管蛋白基因只在少数真核生物中存在(Dutcher, 2001)。在高等植物中通常有多个 α/β -*tubulin* 基因,棉花中至少有 13 个 α -*tubulin*,水稻中至少有 8 个 β -*tubulin* (Radchuk, 2008),而白杨中至少存在 20 个 β -*tubulin* (Oakley *et al*, 2007)。本研究发现,所分析的 5 种红藻中只有 α 、 β 和 γ 3 种微管蛋白基因,其中条斑紫菜中含有 2 个 α -*tubulin*、1 个 β -*tubulin* 和 1 个 γ -*tubulin*,基因数量明显少于高等植物。莱茵衣藻和团藻两种绿藻中除了 α 、 β 和 γ 三种微管蛋白外,还存在 δ -*tubulin*、 ϵ -*tubulin* 和 η -*tubulin*。高等植物拟南芥基因组拥有 61 种驱动蛋白的编码基因,是植物基因组中最大的驱动蛋白库,硅藻中有 25 种驱动蛋白,与绿藻驱动蛋白的数量相近,而红藻驱动蛋白 (*Kinesin*) 种类明显少于高等植物和其他藻类, *Cyanidioschyzon merolae* 中只有 5 种驱动蛋白

(Richardson *et al*, 2006), 脐形紫菜只鉴定出 4 种驱动蛋白(Brawley *et al*, 2017), 本研究在条斑紫菜中鉴定出了 11 个驱动蛋白基因,分为 5 个亚家族。条斑紫菜隶属于红藻门,后者作为一种古老的物种,其微管及其相关蛋白家族成员数量之少,可能与其在进化过程中缺乏薄壁组织且无法形成复杂的多细胞结构有关(Brawley *et al*, 2017)。

高等植物 *Tubulin* 基因中通常含有多个内含子,拟南芥 $\alpha 1$ -*tubulin* 中包含 4 个内含子(Ludwig *et al*, 1988),毛白杨 α -*tubulin* 基因中也均包含 3—4 个内含子(饶国栋等, 2015),而条斑紫菜 *Tubulin* 家族基因结构比高等植物简单,4 个 *Pytubulin* 均不含内含子。衣藻和被子植物所有的驱动蛋白 (*Kinesin*) 都含有内含子,而红藻驱动蛋白普遍缺乏内含子,条斑紫菜驱动蛋白大多不含内含子,少数驱动蛋白基因只有 1 个内含子,这与其他红藻驱动蛋白内含子的数量相近,也支持了红藻基因在进化过程中发生了内含子丢失这一观点(Hoef *et al*, 2005)。

微管骨架是植物细胞响应胁迫信号的传感器,胁迫会引起微管骨架的解体和重新聚合(Ma *et al*, 2019),但不同物种中微管结构对失水胁迫的响应方

式不同。玉米微管在失水胁迫下参与调控气孔形态和细胞壁结构,并通过控制纤维素微纤丝的形成来调节细胞壁的形成和膨压以增强对干旱的耐受性(Baskin *et al.*, 1999),而细胞膨压与微管的排列方向有关,螺旋藻微管随着膨压的升高从纵向/斜向排列向横向排列转换(Iwata *et al.*, 2001)。仙鹤藓(*Atrichum undulatum*)微管骨架在失水胁迫影响下从有规律排列的细丝状重排为无规律排列的较粗的微管束(陈志玲等, 2003)。油菜幼苗细胞的快速失水会导致微管的解聚,但在低失水胁迫压力下,微管结构并没有明显的变化(Bagniewska-Zadworna, 2008)。研究也发现,失水胁迫下 *Tubulin* 基因在转录水平上的表达量也呈现显著变化,如石南星绿藻(*Asterochloris erici*) 2 个 β -*tubulin* 基因的转录产物在失水胁迫后期显著积累(Gasulla *et al.*, 2013),表明 *Tubulin* 基因转录产物的积累与微管骨架形态的变化及结构的重排有密切关联。驱动蛋白(Kinesin)利用 ATP 水解释放的能量沿微管运动,具有保守的运动蛋白结构域,能够牵动分子货物沿着微管作长距离运输(陈珊珊, 2019),直接参与到细胞骨架在多种生物过程中的排列调节。

项目组前期转录组研究表明,条斑紫菜的 *Tubulin* 和 *Kinesin* 家族在叶状体和丝状体中的表达具有显著的世代特异性。本研究进一步采用 qRT-PCR 方法检测了在叶状体中高表达的 *Pya-tubulin 2*、*Py β -tubulin*、*Py γ -tubulin*、*PyKinesin 1* 和 *PyKinesin 10* 在失水胁迫下的表达模式,结果显示,不同成员在失水、复水胁迫下的表达模式不同。*Pya-tubulin 2*、*Py β -tubulin* 和 *Py γ -tubulin* 三个基因在不同失水胁迫条件下表达量虽出现浮动,但并无显著变化,在转录水平对失水胁迫响应不显著,与之前转录组结果一致。转录组分析发现,*Pya-tubulin 1* 在不同失水和复水条件下表达丰度变化不显著,因此推测该基因在转录水平对失水胁迫也不敏感。*PyKinesin 1* 在中高度失水条件下表达量显著上调,在复水后表达水平又迅速降低,*PyKinesin 10* 在失水胁迫下表达量没有显著变化。转录组分析表明,*PyKinesin 1* 在高度失水时表达丰度显著增加,复水后表达丰度降低,*PyKinesin 10* 在不同失水和复水条件下表达丰度变化不显著,与本实验结果一致。转录组分析发现,*PyKinesin* 家族其余基因在失水和复水过程中表达丰度均较低,且没有发生显著变化,推测该家族其余基因在转录水平对失水胁迫不敏感。对 *PyKinesin* 基因家族的系统进化分析发现 *PyKinesin 1* 属于 *Kinesin 13* 家族,有研

究表明, *Kinesin 13* 家族成员具有解聚酶催化活性,能够结合在微管末端促进微管的解聚,在细胞发育、细胞分离以及细胞形态调节等过程均发挥了重要作用(周浩等, 2014)。据此推测, *PyKinesin 1* 在条斑紫菜细胞响应失水胁迫时,可能在微管结构的动态调节中发挥重要作用,但该基因在微管结构的动态调节中如何发挥作用还需要进一步研究。

4 结语

本研究利用生物信息学方法鉴定了条斑紫菜 *Tubulin* 和 *Kinesin* 基因家族,解析了 *PyTubulin* 和 *PyKinesin* 家族成员的组成、基因结构、蛋白结构和进化特点,探究了在叶状体中高表达的 *PyTubulin* 和 *PyKinesin* 基因家族成员在不同失水胁迫条件下的表达变化,为进一步了解微管相关基因在条斑紫菜响应失水胁迫中的作用奠定了基础。

参 考 文 献

- 王朝凤, 孔照胜, 2019. 植物细胞微管研究进展. 中国细胞生物学学报, 41(3): 372—380
- 李晓翠, 康凯程, 黄先忠等, 2020. 小拟南芥 MKK 基因家族全基因组鉴定及进化和表达分析. 遗传, 42(4): 403—421
- 陈志玲, 欧阳浩森, 刘祥林等, 2003. 微管骨架在苔藓植物适应干旱胁迫应答中的功能研究. 生物工程学报, 19(3): 317—321
- 陈珊珊, 2019. 番茄表皮毛形态和内部细胞骨架排布的研究. 杭州: 浙江大学硕士学位论文
- 周浩, 沈涛, 2014. 微管解聚酶驱动蛋白家族成员 KIF2A 研究进展. 生命科学, 26(8): 866—873
- 饶国栋, 睢金凯, 张建国, 2015. 毛白杨 α -微管蛋白基因家族的克隆与序列分析. 林业科学研究, 28(1): 44—49
- 魏丽勤, 2005. 动蛋白 Kinesin-13A 和类锚蛋白 AtANK1 在植物细胞中的分布及功能. 北京: 中国农业大学博士学位论文
- Bagniewska-Zadworna A, 2008. The root microtubule cytoskeleton and cell cycle analysis through desiccation of *Brassica napus* seedlings. *Protoplasma*, 233(3—4): 177—185
- Baskin T I, Meekes H T H N, Liang B M *et al.*, 1999. Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. II. Role of cortical microtubules and cellulose microfibrils. *Plant Physiology*, 119(2): 681—692
- Brawley S H, Blouin N A, Ficko-Blean E *et al.*, 2017. Insights into the red algae and eukaryotic evolution from the genome of *Porphyra umbilicalis* (Bangioophyceae, Rhodophyta). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(31): E6361—E6370
- Dutcher S K, 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(1): 49—54
- Gao D, Kong F N, Sun P P *et al.*, 2018. Transcriptome-wide identification of optimal reference genes for expression

- analysis of *Pyropia yezoensis* responses to abiotic stress. *BMC Genomics*, 19(1): 251
- Gasulla F, Jain R, Barreno E *et al*, 2013. The response of *Asterochloris erici* (Ahmadjian) Skaloud et Peksa to desiccation: a proteomic approach. *Plant, Cell & Environment*, 36(7): 1363—1378
- Hoef E K, Shrestha R P, Lapidot M *et al*, 2005. Actin phylogeny and intron distribution in bangiophyte red algae (rhodoplantae). *Journal of Molecular Evolution*, 61(3): 360—371
- Iwata K, Tazawa M, Itoh T, 2001. Turgor pressure regulation and the orientation of cortical microtubules in *Spirogyra* cells. *Plant and Cell Physiology*, 42(6): 594—598
- Kim J K, Kraemer G P, Yarish C, 2009. Research note: comparison of growth and nitrate uptake by New England *Porphyra* species from different tidal elevations in relation to desiccation. *Phycological Research*, 57(2): 152—157
- Krasylenko Y A, Yemets A I, Blume Y B, 2012. Cytoskeleton-mediated signalling pathways in UV-B perception by plant cell. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(6): 557—564
- Lee Y R J, Liu B, 2004. Cytoskeletal motors in *Arabidopsis*. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. *Plant Physiology*, 136(4): 3877—3883
- Ludwig S R, Oppenheimer D G, Silflow C D *et al*, 1988. The $\alpha 1$ -tubulin gene of *Arabidopsis thaliana*: primary structure and preferential expression in flowers. *Plant Molecular Biology*, 10(4): 311—321
- Ma H X, Liu M, 2019. The microtubule cytoskeleton acts as a sensor for stress response signaling in plants. *Molecular Biology Reports*, 46(5): 5603—5608
- Mineyuki Y, 2007. Plant microtubule studies: past and present. *Journal of Plant Research*, 120(1): 45—51
- Mirabet V, Krupinski P, Hamant O *et al*, 2018. The self-organization of plant microtubules inside the cell volume yields their cortical localization, stable alignment, and sensitivity to external cues. *PLoS Computational Biology*, 14(2): e1006011
- Nogales E, Wolf S G, Downing K H, 1998. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391(6663): 199—203
- Oakley B R, 1999. γ -Tubulin. *Current Topics in Developmental Biology*, 49: 27—54
- Oakley R V, Wang Y S, Ramakrishna W *et al*, 2007. Differential expansion and expression of α - and β -tubulin gene families in *Populus*. *Plant Physiology*, 145(3): 961—973
- Paradez A, Wright A, Ehrhardt D W, 2006. Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(6): 571—578
- Radchuk V V, 2008. The transcriptome of the tubulin gene family in plants. *In*: Blume, Y B, Baird, W V eds. *The Plant Cytoskeleton: A Key Tool For Agro-biotechnology*. New York, NY: Springer Dordrecht, 219—241
- Reddy A S N, 2001. Molecular motors and their functions in plants. *International Review of Cytology*, 204: 97—178
- Richardson D N, Simmons M P, Reddy A S, 2006. Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC Genomics*, 7: 18
- Shaw S L, Kamyar R, Ehrhardt D W, 2003. Sustained microtubule treadmill in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science*, 300(5626): 1715—1718
- Swamy P S, Hu H, Pattathil S *et al*, 2015. Tubulin perturbation leads to unexpected cell wall modifications and affects stomatal behaviour in *Populus*. *Journal of Experimental Botany*, 66(20): 6507—6518
- Zhang Q, Song P, Qu Y N *et al*, 2017. Phospholipase D δ negatively regulates plant thermotolerance by destabilizing cortical microtubules in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 40(10): 2220—2235
- Zhou S, Chen Q H, Li X Y *et al*, 2017. MAP65-1 is required for the depolymerization and reorganization of cortical microtubules in the response to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 264: 112—121

IDENTIFICATION AND EXPRESSION PATTERN ANALYSIS OF *TUBULIN* AND *KINESIN* GENE FAMILY IN *PYROPIA YEZOENSIS* TO DEHYDRATION STRESSES

CUI Zheng-Cai¹, KONG Fan-Na¹, MAO Yun-Xiang^{1,2}, SUN Bin¹, WANG Jun-Hao¹, DONG Dao-Ying¹

(1. The Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
2. Key Laboratory of Utilization and Conservation of Tropical Marine Bioresource (Ministry of Education), College of Fisheries and Life Science, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China)

Abstract Microtubules, the main components of the cytoskeleton, play vital important roles in improving the tolerance of organisms by altering their structures in dynamic mechanisms; and they have become one of the research hotspots in the field of stress biology. *Pyropia yezoensis* is an ideal candidate macroalgae for the investigation of the mechanism of stress resistance because of its fast-changing living conditions in intertidal zone. At present, few studies reported the compositions and biological functions of microtubule-related gene families of *P. yezoensis*. In this study, we identified four *Tubulin* genes (*Py α -tubulin 1*, *Py α -tubulin 2*, *Py β -tubulin*, and *Py γ -tubulin*) and 11 *Kinesin* genes (*PyKinesin I*—*PyKinesin II*) in *P. yezoensis* genome using bioinformatics methods. The physicochemical properties, gene structures, protein characteristics, chromosomal locations, phylogenetic evolution, and expression patterns of the two gene families in *P. yezoensis* under dehydration stress were systematically analyzed. The results show that four *Tubulin* genes could be divided into three subclusters of *Tubulin* gene families and they were scattered on chromosome 1 and chromosome 2 of *P. yezoensis*. *Py α -tubulin 1* and *Py α -tubulin 2* were tandem repeat genes. The *PyTubulin* family was conserved in gene and protein structures and insensitive to dehydration stress in transcription level. Five subclusters of *Kinesin* gene families were identified among the 11 *Kinesin* genes in *P. yezoensis*, which was less than that of higher plants. *PyKinesins* were scattered on all the three chromosomes of *P. yezoensis* and there were no tandem repeat genes. The *PyKinesin* families had certain differences in gene and protein structures. The expression of *PyKinesin I* was significantly enhanced under the medium and high dehydration stress. This study shall laid foundation for further analysis of microtubules in respond to dehydration stress of *P. yezoensis*.

Key words *Pyropia yezoensis*; *Tubulin*; *Kinesin*; gene family; dehydration stress