

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.03.003

毛果杨 *PLD* 基因家族全基因组水平鉴定及其盐胁迫下的表达分析

刘 聪¹, 张 洋¹, 夏德安¹, 陈雪冰¹, 魏志刚^{2*}

(1. 东北林业大学, 林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150000; 2. 国家林业与草原局盐碱地研究中心, 北京 100091)

摘要: [目的] 对本模式植物毛果杨 *PLD* 基因家族的进化中的选择压力、启动子中顺式作用元件、组织表达特性以及盐胁迫下表达模式进行分析, 为挖掘 *PtrPLD* 在非生物胁迫中作用提供参考。[方法] 利用拟南芥 *PLD* 基因家族蛋白序列比对得到毛果杨基因组同源基因, 再经过保守结构域鉴定后确定 *PtrPLD* 基因; 利用软件 ClustalW 和 MEGA 对 *PtrPLD* 和 *AtPLD* 基因的氨基酸序列进行比对和系统进化分析; 利用 MEME、Plant-mPloc、ExPasy 等软件工具分析 *PtrPLD* 基因及编码蛋白的特征; 利用 Tbttools 软件分析同源基因的 *Ka/Ks* 值; 利用 Plantcare 在线工具分析 *PtrPLD* 启动子中顺式作用元件; 利用 Phytozome 转录组数据库以及 qRT-PCR 分析 *PtrPLD* 组织表达特性; 利用 qRT-PCR 分析各组织中 *PtrPLD* 对盐胁迫响应情况。[结果] *PtrPLD* 家族的 16 个基因可分为 C2-PLD 和 PX/PH-PLD 2 个亚家族, 分别包含 13 个和 3 个基因; 有 7 对旁系同源基因且它们之间的 *Ka/Ks* 均远小于 1; *PtrPLD* 家族基因启动子区含有大量非生物胁迫和激素响应元件, 其中, *PtrPLDδ4* 启动子共含有 9 种、20 个元件; *PtrPLD* 家族编码的蛋白均含有 Motif 1~4, 且同一进化分支上的基因编码蛋白序列高度保守。*PtrPLD* 基因家族表达特性分析表明, *PtrPLD* 家族基因在根、茎和叶中具有表达特异性, 并且多数成员主要在根部表达; NaCl 胁迫下, *PtrPLD* 家族基因在根、茎和叶中表达量在 0~72 h 内均表现为先上升后下降再上升的变化趋势。[结论] *PtrPLD* 家族基因在毛果杨响应盐胁迫过程中有着重要作用, 本研究对于今后 *PtrPLD* 家族基因生物学功能的鉴定与非生物逆境胁迫响应基因资源的挖掘具有推动作用。

关键词: 毛果杨; *PLD* 基因家族; 生物信息学分析; 盐胁迫

中图分类号: Q943

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)03-0023-14

植物作为固着生物, 需要应对干旱、盐碱、低温、高温以及病虫害侵袭等多种逆境胁迫, 而对胁迫信号的感知和转导是植物应对环境胁迫的前提和基础^[1]。研究表明, 植物体内胁迫信号的转导需要多种信号转导物质参与, 如 ABA、乙烯、H₂O₂ 和 NO 等激素和小分子化合物^[2] 以及信号转导蛋白 G 蛋白^[3]、磷脂酶 A^[4]、磷脂酶 C^[5]、磷脂酶 D (PLD)^[6] 等激酶, 其中, PLD 能够水解磷酸二脂键使细胞膜磷脂产生磷脂酸 (PA) 和可溶性头

基, 而 PA 是多种激素信号和胁迫信号转导过程的第二信使, 在信号转导、膜迁移、细胞程序性死亡和细胞骨架重排等多种细胞活动中发挥着重要作用^[7-10]。研究表明, PLD 的典型特征是具有 2 个间隔 250~400 个氨基酸的 HKD (HxKxxxxD) 结构域, 虽然 2 个 HKD 在蛋白初级结构上相距较远, 但它们在三级结构上能形成互作, 且这种互作也是其酶活性发挥的关键^[11-15]。根据氨基酸序列特征, PLD 可分为 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 ϕ 7 种类型, 其中, PLD α 、

收稿日期: 2020-08-15 修回日期: 2020-01-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31770640); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (CAFYBB2020ZA005)

* 通讯作者: 魏志刚, 教授. 主要研究方向: 林木基因组学. Email: zhigangwei1973@163.com

PLD γ 、PLD δ 和PLD ζ 数量较多,PLD β 和PLD ϵ 数量较少,而PLD ϕ 发现较晚且较少见^[13,16]。根据蛋白的N端结构特征和其酶活性对Ca²⁺的依赖性,PLD也可分为C2-PLD、PX/PH-PLD和SP-PLD 3个亚族,其中,C2-PLD蛋白的N端含有一个高度保守Ca²⁺依赖型磷脂结合C2结构域,需要结合Ca²⁺以维持酶活性^[12];PX/PH-PLD的N端特征是一个串连的PX(phoxhomology)和PH(pleckstrin homology)结构域,活性不依赖于Ca²⁺^[13];SP-PLD亚家族规模较小,于2007年在水稻(*Oryza sativa* L.)中被首次发现,其N端含有信号肽,而不是C2、PX或PH结构域^[13]。其中,PLD α 、PLD β 、PLD γ 、PLD δ 和PLD ϵ 属于C2-PLD亚家族,PLD ζ 属于PX/PH-PLD亚家族,PLD ϕ 属于SP-PLD亚家族^[11]。植物中,首个PLD于1994年从蓖麻(*Ricinus Communis* L.)^[17]中克隆出来后,随后水稻^[18]、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)^[19]、玉米(*Zea mays* L.)以及烟草(*Nicotiana tabacum* L.)^[20]等多个物种中相继被克隆出PLD。随着多个植物全基因组序列的发布^[21-27],人们发现PLD在植物中多以基因家族形式存在,如PLD家族成员拟南芥有12个^[12]、水稻有17个^[13]、白菜(*Brassica rapa* Lour.)有18个^[14]、亚洲棉(*Gossypium arboreum* L.)有19个^[11]、葡萄(*Vitis vinifera* L.)有11个^[28]、大豆(*Glycine max* L.)有18个^[15]等。

研究发现,PLD在植物响应逆境胁迫反应中有着重要作用,如在拟南芥中,*AtPLDa1*的沉默会严重减弱植株由ABA诱导的耐旱反应^[29]; *Atplda1*缺陷型株系中由创伤诱导的JA合成和相关基因的表达显著降低^[30]; *Atpld δ* 缺陷型株系对H₂O₂胁迫的敏感性显著上升^[31]; *AtPLD δ* 在响应真菌(*Blumeria graminis* DC.)胁迫的防御信号转导过程中有着关键作用, *Atpld δ* 突变体株系中响应微生物的早期应激响应基因的上调表达被显著延迟^[32]; C2-PLD突变体株系在响应缺氧胁迫过程中关键信号转导物质PA和胞质钙的含量上升显著受阻^[33];在其他植物中,如在毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.in Rev.Hort.)中过表达*AtPLDa1*能够显著提高其耐盐性与耐旱性^[34];过表达黄瓜(*Cucumis sativus* L.)*CsPLDa*的烟草抗旱性增强^[35];小麦(*Triticum aestivum* L.)*TaPLDa*能够响应多种胁迫下表达上调,过表达*TaPLDa*的拟南芥耐旱能力显著增强^[36]。由此可见,PLD家族在植物应对逆境

胁迫时具有重要生物学功能。

毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)是首个全基因组测序的木本植物^[37],也是研究木本植物生长发育、材质材性、逆境胁迫响应和其他重要性状的模式植物。然而,目前为止,尚无毛果杨PLD家族鉴定及其在逆境胁迫响应特性的研究报道。本项研究在全基因组水平鉴定出毛果杨PLD家族全部成员的基础上,对其系统进化、同源关系、选择压力在其家族进化中的作用、基因结构、家族各基因的顺式作用元件和蛋白保守基序进行分析,从而全面阐述该基因家族的基本特征。此外,利用实时荧光定量PCR和已报道的毛果杨转录组数据,对其PLD家族基因的组织表达特性以及盐胁迫的响应特性进行分析。本研究为进一步阐明毛果杨PLD家族基因的生物学功能和抗逆基因的挖掘奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 毛果杨PLDs家族成员鉴定及基本特征分析

利用报道的拟南芥PLD的氨基酸序列比对Phytozome网站(<https://phytozome.jgi.doe.gov>)中的毛果杨基因组数据库^[12],同时在毛果杨数据库检索已注释的PLD,将获得的序列结果汇总并剔除重复序列后作为候选基因。为了验证初始结果的可靠性,将候选基因的氨基酸序列上传至HMMER网站(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer>)以及NCBI保守结构域数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)鉴定保守结构域,以含有2个间隔250~400氨基酸的PLD典型HKD结构域(HMM模型登录号为PF00614)为标准进行筛选,并根据保守结构域鉴定蛋白类型,最终鉴定出毛果杨PLD家族全部成员^[11,14,38-40]。

从Phytozome网站中获得*PtrPLD*家族成员的染色体位置、基因序列和开放阅读框长度等信息,并根据基因编码蛋白类型和进化关系进行命名,染色体位置信息经Tbtools软件进行可视化处理^[41]。通过ExPasy(<https://web.expasy.org>)在线预测其等电点与分子量^[42],通过Plant-mPLoc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/>)在线预测其亚细胞定位位置^[43]。

1.2 系统进化分析

将鉴定出的毛果杨全部*PtrPLDs*以及拟南芥*AtPLDs*编码的氨基酸序列在MEGA X软件的

ClustaW 程序中进行多重序列比对^[44]。采用邻近法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树, 其中, bootstrap 设置 1000 次重复, 再经最大似然法 (Maximum-likelihood) 验证, 得到系统发育进化树数据, 经 Evoview (<https://www.evolgenius.info/evolview/>) 网站可视化处理^[12, 44-45]。

1.3 同源基因对的 *Ka* 和 *Ks* 分析

Blast 相互比对 *PtrPLDs* 的 CDS 序列, 超过 300 个 bp 且同源性超过 80% 为标准确定为同源基因对^[46-47], 同源关系经 Tbtools 软件可视化处理^[41]。利用 Tbtools 软件计算同源基因对之间的同义替换率 (*Ks*)、非同义替换率 (*Ka*) 以及 *Ka/Ks* 比率, 并以此分析 *PtrPLD* 家族基因进化过程中的选择压力^[41, 46, 48]。

1.4 基因结构及蛋白保守型基序分析

从毛果杨数据库 (<https://genome.jgi.doe.gov/portal/pages/dynamicOrganismDownload.jsf?organism=Ptrichocarpa>) 下载基因组数据后, 通过 TBtools 软件提取各 *PtrPLD* 外显子、内含子长度及位置信息并进行可视化处理^[41]。

将各 *PtrPLD* 氨基酸序列提交到 Motif Elicitation 网站的 MEME 程序 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 中分析保守基序并进行可视化处理^[41, 49]。

1.5 启动子区顺式作用元件分析

在 Phytozome 网站 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 中将各 *PtrPLD* 起始密码子前 2 000 bp 的序列作为启动子区域汇总, 再上传至 Plantcare 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 进行顺式作用元件在线分析^[46]。

1.6 *PtrPLD* 家族基因的组织表达及其对盐胁迫的响应特性分析

组织表达特异性: 在 Phytozome 网站 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) 中下载各 *PtrPLD* 在各组织中的表达量数据, 再采用 qRT-PCR 进行验证。野生型毛果杨来自中国科学院上海生命科学研究院, 用组织培养的方法扩繁后, 将 1 月大小的组培苗移植到土壤中, 在 25℃、长日照 (光照 16 h 黑暗 8 h) 温室中培养 3 周。分别采集根、茎和叶组织, 提取总 RNA 后反转录获得 cDNA 用于 qRT-PCR。每组处理重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量并利用 Tbtools 可视化^[41]。

盐胁迫下的响应特性: 将 1 月大小的组培苗移植到土壤中, 在 25℃、长日照 (光照 16 h 黑暗 8 h)

温室中培养 3 周时, 将长势一致的幼苗随机分成 7 组, 每组包含 5 棵毛果杨幼苗。用 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理 3、6、12、24、36、72 h, 同时用水处理作为对照组。分别采集上述处理组内各植株材料的根、茎和叶组织, 提取总 RNA 后反转录获得 cDNA 进行 qRT-PCR 分析。每组处理重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量并利用 Tbtools 可视化^[41]。

RNA 提取、反转录及 qRT-PCR: 利用植物总 RNA 提取试剂盒 (MiniBEST, TaKaRa) 提取总 RNA, 然后采用 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time, TaKaRa) 试剂盒反转录 RNA 获得 cDNA 用于 qRT-PCR。根据荧光定量引物设计原则, 利用 NCBI Primer-Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer) 工具设计特异性的 *PtrPLD* 家族基因定量引物, 以 *PtrACTIN* 为内参基因 (表 1), 并通过 PCR、电泳验证引物特异性^[50]。在赛默飞 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行试验, 体系如下: $2\times$ TransStart TOP/Tip Green qPCR Supermix 10 μL 、上下游混合引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.4 μL 、cDNA 1.5 μL 、Passive Reference Dye (50 \times) 0.4 μL 、加 ddH₂O 至 20 μL 。反应程序: 94℃ 30 s; 94℃ 5 s, 60℃ 15 s, 72℃ 35 s, 循环 40 次; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 30 s。

2 结果与分析

2.1 *PtrPLD* 家族成员及其编码蛋白基本特性

根据已报道的 *AtPLD* 家族各基因氨基酸序列比对毛果杨的基因组数据库得到 18 个候选基因, 再经过 HKD 结构域且二者间隔 250~400 个氨基酸为标准筛选, 剔除 *Potri.001G112100.1* 和 *Potri.T180000.1* (2 个基因所编码的蛋白中 HKD 序列不符合 HxKxxxxD 特征), 共得到 16 个 *PtrPLD* (表 2)。按编码 PLD 蛋白类型和进化关系命名为 *PtrPLD* α 1 到 *PtrPLD* ζ 3 (表 2); 同时, 对 *PtrPLD* 家族成员编码蛋白特性进行分析, 结果表明, *PtrPLD* 家族基因编码蛋白的氨基酸残基数为 645~1 141、分子量为 73.79~129.02 kDa、理论等电点为 5.41~6.90、单个 HKD 结构域跨度在 35 个氨基酸左右、2 个 HKD 结构域间隔均在 300 个氨基酸左右 (表 2)。亚细胞定位预测发现, *PtrPLD* α 1 和 *PtrPLD* α 2 定位在细胞质中, *PtrPLD* α 3、*PtrPLD* α 4、*PtrPLD* α 5 和 *PtrPLD* α 6 定位在内质网和液泡中, *PtrPLD* β 1 定位在叶绿体中, *PtrPLD* β 2 定位在叶绿体和细胞质

表1 毛果杨 *PtrPLD* 定量引物序列
Table 1 *PtrPLD* quantitative primer sequence

| 定量引物名称 qRT-PCR primer name | F端引物序列(5'-3') F-terminal primer sequence (5'-3') | R端引物序列(5'-3') R-terminal primer sequence (5'-3') |
|----------------------------------|--|--|
| <i>PtrPLDa1</i> | TTGATAAAGATGCAGAGATTCAGGG | AATATCAACCTTGTGCTTCTCCA |
| <i>PtrPLDa2</i> | GAATGGAAGCCCCACTTACG | AGTTGAGGATTCGGCTTTCC |
| <i>PtrPLDa3</i> | GCATGGCTTCTCCACAAG | AAGGATTCTGGTCTCCCAA |
| <i>PtrPLDa4</i> | TAGGCCAGCTTGATGACACT | CCTGGTAAATCGTCGTCCAA |
| <i>PtrPLDa5</i> | TCATTGCTCCGTTACCCCA | TAAAATCGGAGGAGCAGGGA |
| <i>PtrPLDa6</i> | TGGGAGGATACCAACCACAT | ATCCTGTTGAGAGTTCGC |
| <i>PtrPLDβ1</i> | CCTCACTCTGTTTTGTGGGC | ACAGCAATCACAGCCTATCCA |
| <i>PtrPLDβ2</i> | AGCGTCTCGTAACCTGAAA | TGGACAATCCCCTGAACAAGAA |
| <i>PtrPLDδ1</i> | TGTGACCAGGTGAGATGTGG | AAAACCCACTGGTTGCTCCT |
| <i>PtrPLDδ2</i> | CACACAAAGGGTCACGAGGT | CAGCCATTTTATTGGGCGGG |
| <i>PtrPLDδ3</i> | CTCAGCTTTTCAAGCAGCA | CATAGCGCCATCACAAAGA |
| <i>PtrPLDδ4</i> | CTTTGTGATGGCCGCTATGATACACC | GAAACTTCGTCCAAACTCTGACCATT |
| <i>PtrPLDδ5</i> | ATACCAAAAGCCCAAGGCAA | ATGCCAACGAGTGACCTTTT |
| <i>PtrPLDξ1</i> | CTAGCTCCCGGCTTGATTC | ATGGCGCAGAACCCTCAAAT |
| <i>PtrPLDξ2</i> | TTGACCACGTTGGCTGGTT | TTAATTGCGCTGACGATGCC |
| <i>PtrPLDξ3</i> | CCACCTTTTGAACGCTCCAG | GAGAAAGGGAGAGACGGTGG |
| <i>PtrActin</i> | AGGCAGGTTTCGACGAGATGA | TCCATCACCAGAATCCAGCACA |

表2 毛果杨 *PLD* 基因及所编码蛋白的特征
Table 2 Characteristics of *PLD* genes and encoded proteins in *Populus trichocarpa*

| 基因名称 Gene name | 登录号 ID | 基因位置 Gene location(5'-3') | 蛋白 Protein | | | | | | |
|-------------------|--------------------|------------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------|--|
| | | | 氨基酸数/ aa | 等电点 PI | 分子量/ kDa | 亚细胞定位 Subcellular localization | HKD位置 Location Coordinates | | |
| <i>PtrPLDa1</i> | Potri.003G035300.1 | 4 527 875-4 531 587 | 645 | 6.16 | 73.79 | C | 185-221 | 493-520 | |
| <i>PtrPLDa2</i> | Potri.003G037700.1 | 4 909 260-4 912 047 | 759 | 6.73 | 86.87 | C | 300-336 | 608-635 | |
| <i>PtrPLDa3</i> | Potri.003G032800.1 | 4 092 810-4 086 017 | 808 | 5.41 | 91.75 | E,V | 326-364 | 654-681 | |
| <i>PtrPLDa4</i> | Potri.018G131200.1 | 15 250 553-15 246 358 | 808 | 6.57 | 91.83 | E,V | 327-365 | 655-682 | |
| <i>PtrPLDa5</i> | Potri.001G193000.1 | 17 591 592-17 585 937 | 808 | 5.63 | 91.82 | E,V | 326-364 | 654-681 | |
| <i>PtrPLDa6</i> | Potri.006G253900.1 | 25 888 555-25 896 527 | 791 | 5.85 | 89.89 | E,V | 309-347 | 637-664 | |
| <i>PtrPLDβ1</i> | Potri.002G152100.1 | 11 493 281-11 501 595 | 1 141 | 6.54 | 126.41 | Chl | 655-690 | 992-1 019 | |
| <i>PtrPLDβ2</i> | Potri.014G074700.1 | 6 036 483-6 044 469 | 1 122 | 6.4 | 124.16 | Chl,C | 639-674 | 974-1 001 | |
| <i>PtrPLDδ1</i> | Potri.007G060300.1 | 6 495 119-6 501 652 | 867 | 6.90 | 98.19 | C | 367-402 | 715-742 | |
| <i>PtrPLDδ2</i> | Potri.005G105600.1 | 8 078 955-8 085 766 | 882 | 6.65 | 100.29 | C | 382-417 | 730-757 | |
| <i>PtrPLDδ3</i> | Potri.005G246000.1 | 25 011 569-25 017 349 | 836 | 6.77 | 95.29 | C | 345-380 | 684-711 | |
| <i>PtrPLDδ4</i> | Potri.002G016100.1 | 930 355-925 137 | 794 | 6.77 | 90.27 | C | 303-338 | 643-670 | |
| <i>PtrPLDδ5</i> | Potri.003G015000.1 | 1 911 667-1 901 766 | 853 | 6.87 | 96.57 | C | 362-397 | 701-728 | |
| <i>PtrPLDξ1</i> | Potri.013G012300.1 | 813 485-807 432 | 1 111 | 6.26 | 126.35 | C | 485-512 | 907-933 | |
| <i>PtrPLDξ2</i> | Potri.008G211100.1 | 16 452 650-16 466 873 | 1 140 | 6.4 | 129.02 | C | 513-540 | 938-964 | |
| <i>PtrPLDξ3</i> | Potri.010G006300.1 | 579 514-567 938 | 1 123 | 6.26 | 126.77 | C | 496-523 | 922-948 | |

注: C: 细胞质; E: 内质网; V: 液泡; Chl: 叶绿体。

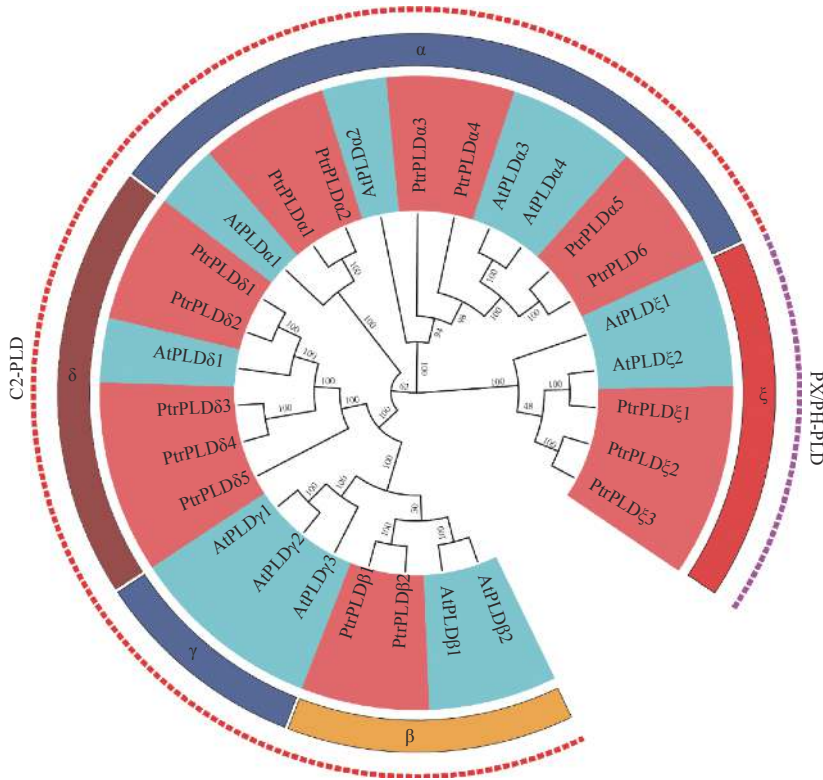
Notes: C, cytoplasm; E, Endoplasmic reticulum; V, Vacuole; Chl, Chloroplast.

中, *PtrPLD* δ 1~5 和 *PtrPLD* ξ 1~3 均定位在细胞质中 (表 2)。

2.2 *PtrPLD* 家族的进化关系

为了解 *PtrPLD* 家族成员的进化关系, 将 16 个 *PtrPLDs* 与 12 个 *AtPLDs* 编码的蛋白构建进化树。根据拟南芥 *PLD* 基因家族进化关系, 将

PtrPLD 家族分为 α 、 β 、 δ 及 ζ 4 个类型, 其中 α 类型有 6 个, β 类型有 2 个, δ 类型有 5 个, ζ 类型有 3 个, 未鉴定出 γ 、 ϵ 和 φ 类型的 *PtrPLD* (图 1)。结果表明: 毛果杨基因组并不存在 SP-*PLD* 亚族, PX/PH-*PLD* 亚家族规模较小仅有 3 个成员, C2-*PLD* 亚家族共有 13 个成员。



注: *PtrPLDs* 标记为红色背景, *AtPLDs* 标记为绿色背景, α 、 β 、 δ 、 γ 及 ζ 类型分别在蛋白名称旁标记不同颜色, 紫色虚线范围内为 PX/PH-*PLD* 亚家族成员, 红色虚线范围内为 C2-*PLD* 亚家族成员。

Notes: *PtrPLDs* are marked as red background, *AtPLDs* are marked as green backgrounds, α 、 β 、 δ 、 γ and ζ types are marked in different colors close to protein names, purple dashed lines are in the PX/PH-*PLD* subfamily, and red dashed lines are C2-*PLD* subfamily members.

图 1 毛果杨与拟南芥 *PLD* 基因家族的系统发育进化分析。

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *PLD* gene family in *Populus trichocarpa* and *Arabidopsis thaliana*.

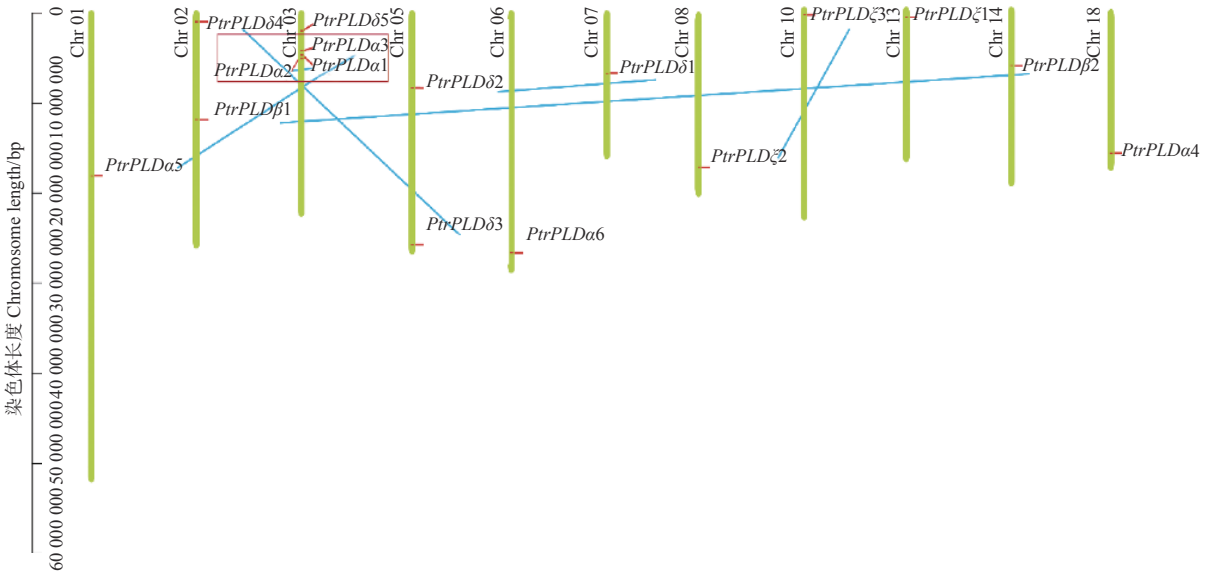
2.3 *PtrPLD* 家族基因扩张

为了分析 *PtrPLD* 家族扩张原因, 利用 Tbttools 构建了家族基因染色体定位图以及同源关系图^[41]。结果表明: 毛果杨 16 个 *PtrPLDs* 不均匀地分布在 1、2、3、5、6、7、8、10、13、14 和 18 号染色体上, 其中, 3 号染色体上有 4 个基因、2 号和 5 号染色体上有 2 个, 其余的染色体上均仅有 1 个 *PtrPLD* 家族基因 (图 2)。

毛果杨 *PtrPLD* 家族共线性分析以及序列 Blastn 分析结果表明: *PtrPLD* α 1 和 *PtrPLD* α 2、*PtrPLD* α 5 和 *PtrPLD* α 3、*PtrPLD* β 1 和 *PtrPLD* β 2、*PtrPLD* δ 1 和 *PtrPLD* δ 4 以及 *PtrPLD* δ 2、*PtrPLD* δ 3

和 *PtrPLD* δ 4、*PtrPLD* ζ 2 和 *PtrPLD* ζ 3 有共线性关系且同源片段长度远大于 300 bp 同源性超过 80% (表 3), 因此上述基因对是由基因复制事件的进化形成的旁系同源基因^[46-47]。其中, 3 号染色体上出现由 *PtrPLD* α 1、*PtrPLD* α 2 和 *PtrPLD* α 3 形成的基因簇 (图 2), *PtrPLD* α 1 和 *PtrPLD* α 2 同源性极高 (表 3), 因此, *PtrPLD* α 1 和 *PtrPLD* α 2 是由基因串联复制事件演化而来。综上所述, 多数 *PtrPLDs* 具有基因复制现象, 表明基因复制是 *PtrPLDs* 家族扩张的主要原因。

为了阐明选择压力在 *PtrPLD* 家族进化中的作用, 利用 Tbttools 分析了 *PtrPLD* 家族同源基因的



注：红色方框代表这些基因属于一个基因簇，蓝色线条连接同源基因。

Notes: The homologous *PtrPLD* gene is connected by a light blue line, and the red box indicates that these genes belonging to a gene cluster.

图2 *PtrPLDs* 基因染色体分布

Fig. 2 Chromosome distribution of *PtrPLDs*

表3 同源基因的 Ka/Ks 比值及同源性

Table 3 Ka/Ks values and homologous status of homologous genes

| 同源基因 Paralogous gene | | 非同义替换率 Ka | 同义替换率 Ks | Ka/Ks | 同源片段长度 The length of homologous fragment/bp | 同源性 Homology |
|----------------------|-----------------|----------------|---------------|------------|--|-----------------|
| 基因1 Gene1 | 基因2 Gene2 | | | | | |
| <i>PtrPLDα1</i> | <i>PtrPLDα2</i> | 0.035 6523 | 0.064 7533 | 0.550 5866 | 1 777 | 0.99 |
| <i>PtrPLDα5</i> | <i>PtrPLDα3</i> | 0.036 0217 | 0.243 9526 | 0.147 6586 | 2 426 | 0.93 |
| <i>PtrPLDβ1</i> | <i>PtrPLDβ2</i> | 0.071 6041 | 0.249 5736 | 0.286 9057 | 2 986 | 0.92 |
| <i>PtrPLDδ1</i> | <i>PtrPLDδ4</i> | 0.059 9965 | 0.261 6273 | 0.229 3205 | 1 520 | 0.91 |
| | <i>PtrPLDδ2</i> | 0.214 0527 | 1.707 4231 | 0.125 3659 | 1 487 | 0.92 |
| <i>PtrPLDδ3</i> | <i>PtrPLDδ4</i> | 0.050 3757 | 0.306 9272 | 0.164 1291 | 1 487 | 0.92 |
| <i>PtrPLDξ2</i> | <i>PtrPLDξ3</i> | 0.046 1424 | 0.277 4425 | 0.166 3134 | 2 982 | 0.91 |

Ks 值、 Ka 值和 Ka/Ks 值。结果发现：7 对同源基因 Ka/Ks 均远小于 1 (表 3)，表明 *PtrPLD* 家族在进化过程中经历了较强的纯化选择。

2.4 *PtrPLD* 家族基因结构以及保守域特征

为了解 *PtrPLD* 家族各基因系统进化与其基因结构及其编码蛋白中保守基序之间的关系，对 *PtrPLD* 家族基因外显子与内含子的结构以及编码蛋白保守结构域进行了分析。结果表明：*PtrPLD* 家族各基因的内含子和外显子分布方式在保持家族保守性的同时，在进化过程中也产生了明显的分化。除 *PtrPLDα5* 和 *PtrPLDδ3* 外，其他的家族基因最后一个外显子均紧靠 3' 端 UTR (图 3)。同时，多数处于同一进化分支上的基因结构较为相

似，如 *PtrPLDβ1* 和 *PtrPLDβ2* 均仅含有 4 个外显子；值得注意的是，*PtrPLDα1* 和 *PtrPLDα2* 均含有 20 个外显子，但内含子与外显子在基因中的分布松散，同时，上述 2 个基因序列长度虽然超过 12 000 bp，且远大于家族内其他基因序列长度，然而二者编码氨基酸长度却是家族中最短的；此外，*PtrPLDβs* 基因长度均在 5 000 bp 以下，但其氨基酸数量最多，长度最长 (图 3)。

PtrPLD 家族基因编码蛋白具有 20 个基序，其中 Motif 1、Motif 2、Motif 3 和 Motif 4 为家族共有基序。虽然不同基因编码蛋白所含基序数量与种类存在一定的差异，但相同分支的基因编码蛋白具有相似的基序组合，而不同亚族、类型间的基序有

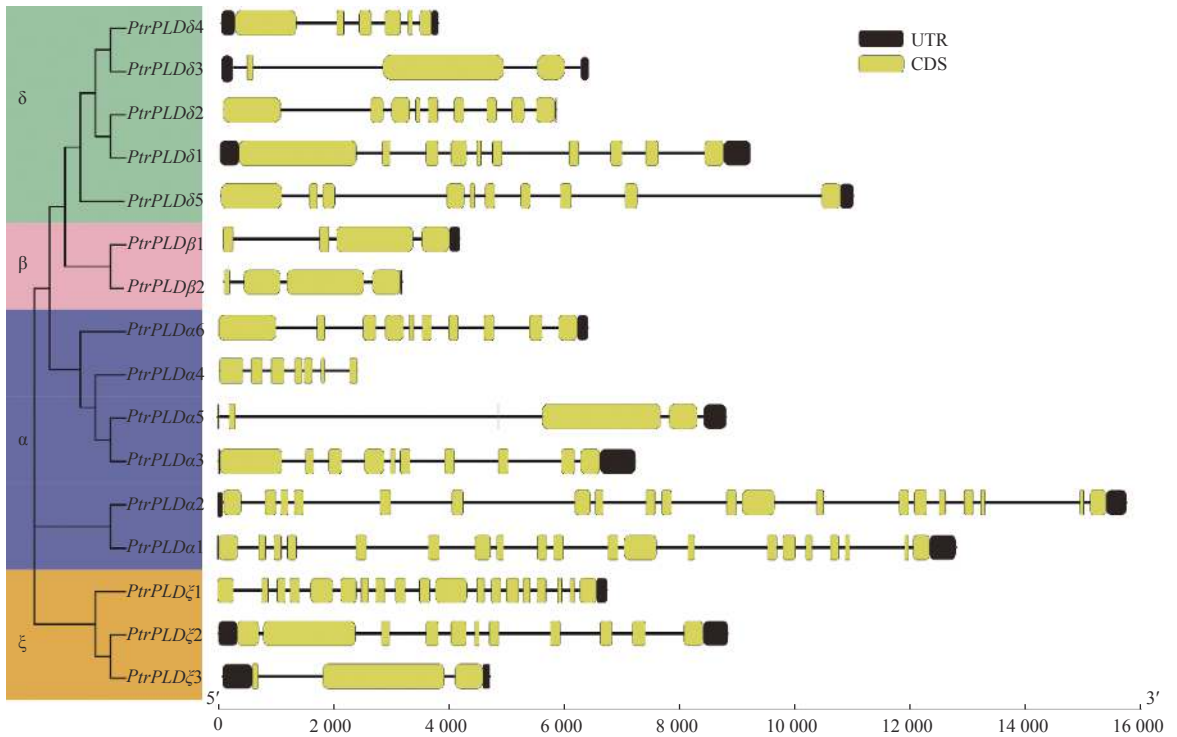


图3 *PtrPLD* 家族基因的外显子-内含子结构分析

Fig. 3 Exon-intron organization analysis of *PtrPLD* genes

明显的区别 (图4)。上述结果表明: *PtrPLD* 家族基因编码蛋白结构在具有保守性的同时也产生了明显分化。

2.5 *PtrPLD* 家族基因启动子元件特征

为了解 *PtrPLD* 家族基因可能的生物学功能和调控特性, 在利用 PlantCARE 分析家族成员启动子的同时, 结合 *PtrPLD* 家族基因系统发育树分析各基因启动子元件组成与基因的进化之间是否具有相关性。结果表明: *PtrPLD* 家族 16 个基因启动子中共包含 2 类、12 种、154 个顺式作用元件 (表4)。一大类是非生物胁迫响应元件, 如厌氧诱导元件 (ARE)、损伤反应元件 (WUN-motif)、胁迫响应元件 (STRE)、MYB 干旱诱导性结合位点 (MBS)、DREB/CBF 转录因子识别位点 (DRE)、抗病和胁迫诱导元件 (TC-rich repeats) 以及低温响应元件 (LTR); 另一大类是植物激素响应元件, 如生长素响应元件 (TGA-element)、水杨酸诱导元件 (TCA-element)、茉莉酸甲酯响应元件 (CGTCA-motif 和 TGACG-motif)、ABA 应答元件 (ABRE)。

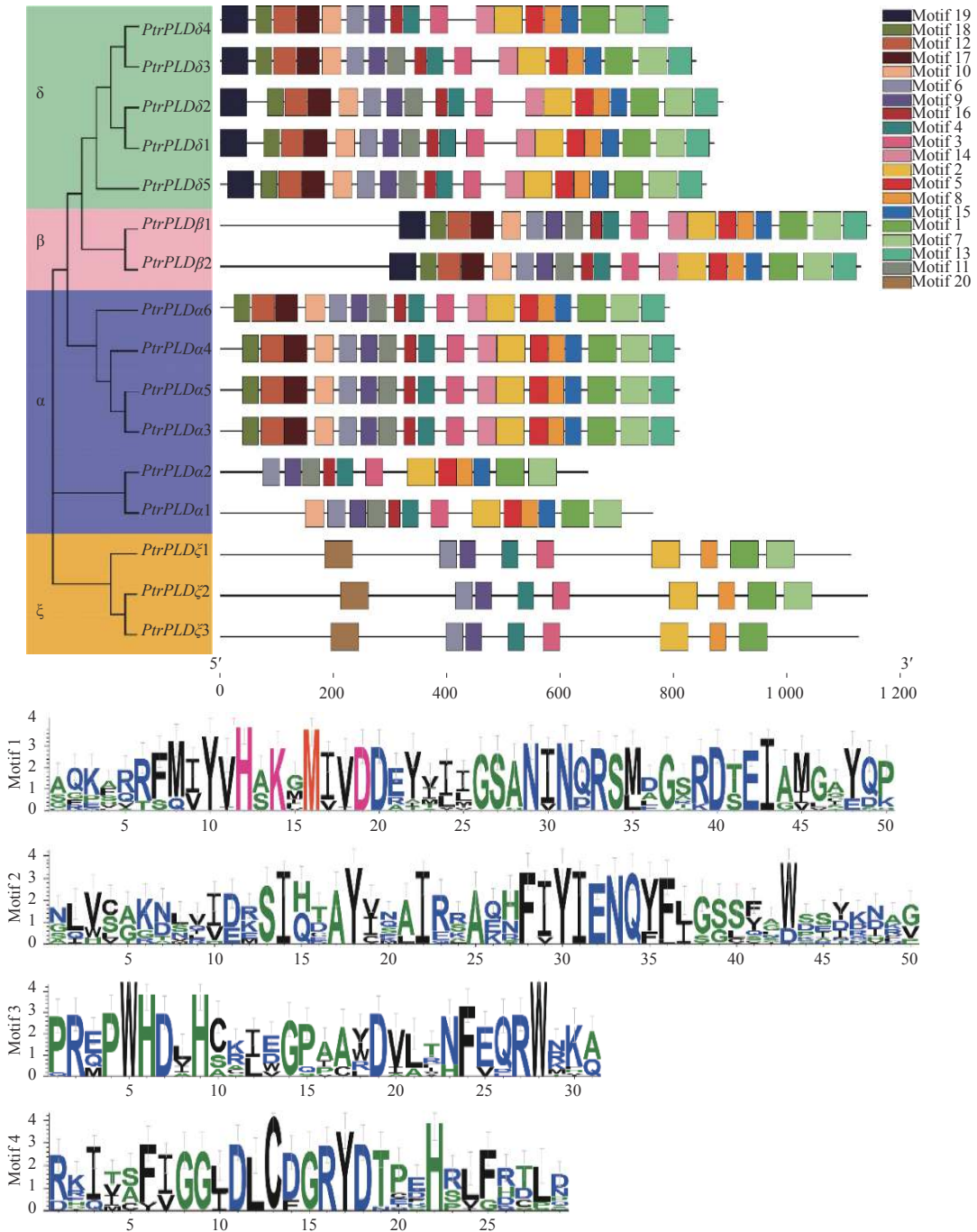
PtrPLD 家族各基因启动子含有元件的种类和数量存在差异, 其中, *PtrPLD* δ 启动子中含有的顺

式作用元件数量最多, 如 *PtrPLD* δ 4 启动子中具有的元素数量最多 (20 个), 而 *PtrPLD* α 6 和 *PtrPLD* ξ 3 启动子中仅含有 2 个元件。上述结果表明, 基因在进化的同时, 其启动子中元件也会产生相应的分化。

此外, 在所有顺式作用元件中 ABA 应答元件 ABRE 数量最多, 在 11 个 *PtrPLD* 启动子中有 48 个 ABRE, 其中, *PtrPLD* δ 1、*PtrPLD* δ 2 以及 *PtrPLD* δ 4 含有的 ABRE 元件达 8 个; 厌氧诱导元件 ARE 含量次之, 共有 19 个, 分布在 *PtrPLD* α 6、*PtrPLD* δ 4、*PtrPLD* δ 2 等 11 个基因启动子中; 而 DREB/CBF 转录因子识别位点 DRE 数量最少, 仅 4 个, 分布在 *PtrPLD* δ 1、*PtrPLD* δ 3、*PtrPLD* δ 4 和 *PtrPLD* ξ 3 基因启动子中。上述结果表明: *PtrPLD* 家族不同的亚族基因响应植物激素和非生物胁迫的能力存在差异。

2.6 *PtrPLD* 家族基因的组织表达与盐胁迫响应的特性

为了解 *PtrPLD* 家族基因的表达模式, 对 phytozome 网站中 *PtrPLD* 家族各基因在不同组织的表达量进行分析。结果表明: 6 个 *PtrPLD* α 型蛋白基因中 *PtrPLD* α 1、*PtrPLD* α 2 和 *PtrPLD* α 6 在茎



注：Motif 1~20 用不同的颜色表示，Motif 1~4 序列展示在下方。

Notes: Motif 1~20 are indicated by different colors. The sequences of the motifs 1~4 are shown below.

图 4 PtrPLD 蛋白的保守基序分析

Fig. 4 Conserved motifs analysis of PtrPLD proteins

中的表达水平较高，*PtrPLDα4* 和 *PtrPLDα5* 在根部的表达水平较高，*PtrPLDα3* 在嫩叶和根部的表达水平较高，并未有明显的表达部位偏好；2 个 *PtrPLDβ* 型蛋白基因在根部的表达水平均较高；5 个 *PtrPLDδ* 型蛋白基因中只有 *PtrPLDδ2* 在根、嫩

叶和成熟叶的表达水平较高，其他 4 个均在根的表达量较高；3 个 *PtrPLDζ* 型蛋白基因均在茎节的表达水平较高，根部次之，叶中表达量最低（图 5A）。同时，利用 qRT-PCR 对 *PtrPLD* 家族各基因在根、茎和叶中的表达量做进一步分析，结果表明：

表 4 *PtrPLD* 家族基因启动子区域各顺式作用元件分析Table 4 Analysis of cis acting elements in *PtrPLD* genes promoter region

| 基因名称 Gene name | 植物激素响应元件 Phytohormone response element | | | | | 非生物胁迫响应元件 Abiotic stress response element | | | | | | | 共计 Amount |
|-------------------|---|-------------|-------------|------|-------------|--|-----------|------|-----|-----|----------------|-----|--------------|
| | TGA-element | TCA-element | CGTCA-motif | ABRE | TGACG-motif | ARE | WUN-motif | STRE | MBS | DRE | TC-richrepeats | LTR | |
| <i>PtrPLDδ4</i> | 1 | 0 | 2 | 8 | 2 | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 20 |
| <i>PtrPLDδ3</i> | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 7 |
| <i>PtrPLDδ2</i> | 2 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| <i>PtrPLDδ1</i> | 0 | 0 | 0 | 8 | 4 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 18 |
| <i>PtrPLDδ5</i> | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 9 |
| <i>PtrPLDβ1</i> | 1 | 0 | 0 | 7 | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 |
| <i>PtrPLDβ2</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 6 |
| <i>PtrPLDα6</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>PtrPLDα4</i> | 1 | 1 | 2 | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 11 |
| <i>PtrPLDα5</i> | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| <i>PtrPLDα3</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| <i>PtrPLDα2</i> | 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 10 |
| <i>PtrPLDα1</i> | 0 | 1 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 8 |
| <i>PtrPLDξ1</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 11 |
| <i>PtrPLDξ2</i> | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| <i>PtrPLDξ3</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 共计 Amount | 8 | 7 | 9 | 48 | 11 | 19 | 14 | 15 | 8 | 4 | 6 | 5 | 154 |

16个 *PtrPLD* 家族基因中有9个在根部的表达水平较高,3个在茎部表达水平较高,4个在叶部表达水平较高。qRT-PCR与 phytozome 网站中的基本相符,大部分的基因在根部的表达水平较高,但不同的是qRT-PCR结果中的 *PtrPLDα3* 和 *PtrPLDα5* 在叶中表达水平较高;3个 *PtrPLDξ* 型蛋白基因中 *PtrPLDξ1* 在叶部表达水平较高, *PtrPLDξ2* 和 *PtrPLDξ3* 均在根部的表达量较高(图5B); *PtrPLDδ2* 在叶中的表达水平高于根部的。

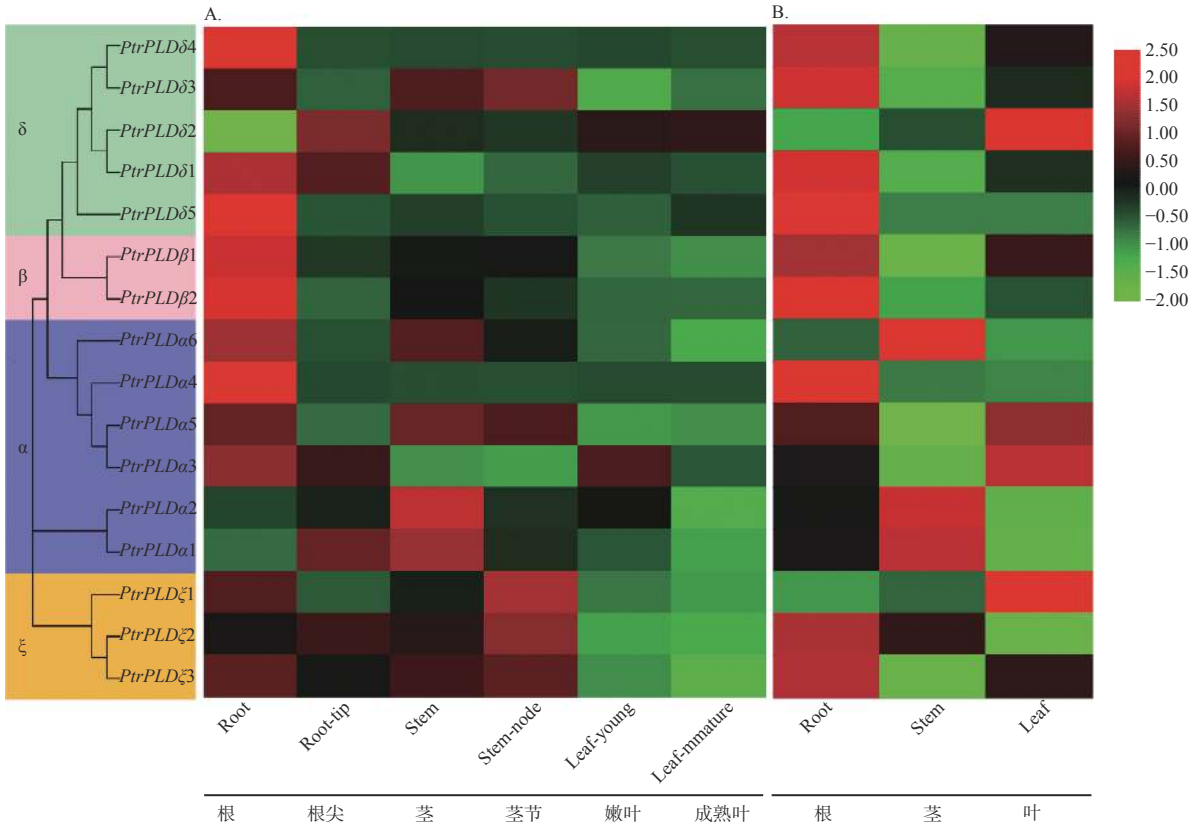
为了阐明 *PtrPLD* 家族基因的盐胁迫响应特性,利用qRT-PCR对100 mmol·L⁻¹NaCl胁迫处理3、6、12、24、48、72 h的毛果杨幼苗的根、茎、叶中 *PtrPLD* 家族各基因的表达进行了研究。结果(图6)表明:NaCl胁迫对16个 *PtrPLD* 基因在各组织中表达均产生了影响;在根、茎、叶3种组织中全部 *PtrPLD* 家族基因在盐胁迫后12 h内表现出显著的表达上调趋势,且大部分是在6 h或12 h时达到表达高峰,之后快速下调,在48 h到72 h之间又略有上升。较为独特的是, *PtrPLDδ4* 在茎

部的表达高峰处于胁迫处理72 h时; *PtrPLDα1* 在根、茎、叶中的48~72 h之间的上调表达趋势相较于其他 *PtrPLD* 的均较明显。从响应速度来看,叶和茎部中大多数 *PtrPLD* 家族基因响应盐胁迫的快速上升期发生在3 h或6 h,而在根部中的快速上升期发生在6 h或12 h。

此外,各部位中均有部分 *PtrPLD* 家族基因在12 h内的表达高峰前出现下调表达的情况,而不是在胁迫处理后一直上调表达达到峰值,如根部中的全部 *PtrPLDα*、*PtrPLDδ1*、*PtrPLDδ3* 和 *PtrPLDδ4*,茎部的 *PtrPLDδ2*、*PtrPLDδ4* 和 *PtrPLDδ5*,叶部的 *PtrPLDα2*、*PtrPLDδ1* 和 *PtrPLDδ4*。

3 讨论

研究表明, *PLD* 以多基因家族的形式存在于拟南芥^[12]、水稻^[13]、白菜^[14]、亚洲棉^[11]等植物中,并在胁迫响应中起到重要作用^[10, 17, 29, 34]。然而,目前为止,尚无模式植物毛果杨 *PLD* 家族基因基本特征及其在逆境胁迫响应特性的研究报导。



注：A.基于 phytome 网站数据的 *PtrPLD* 家族基因组织表达特异性；B.基于 qRT-PCR 结果的 *PtrPLD* 家族基因组织表达特异性

Notes: A. Tissue expression specificity of *PtrPLD* family genes based on phytome website data; B. Tissue expression specificity of *PtrPLD* family genes based on qRT-PCR results

图5 *PtrPLD* 家族基因组织表达特异性

Fig. 5 Tissue expression specificity of *PtrPLD* family genes

本研究通过对毛果杨全基因组分析，共鉴定出 16 个 *PtrPLD*，其编码蛋白包括 3 个 PX/PH-PLD 和 13 个 C2-PLD 亚家族成员（图 1），这与其他植物中 C2-PLD 成员数量相对较少的情况相同^[12]。*PtrPLD* 家族中共有 7 对具有旁系同源关系，其中 *PtrPLD α 1* 和 *PtrPLD α 2* 是由基因串联复制事件演化而来，其余的 6 对是由基因组复制事件演化而来，这表明基因复制是 *PtrPLD* 基因家族扩张的主要原因（图 2 和表 3）。*PtrPLD* 家族中的 7 对同源基因的 *Ka/Ks* 比值远低于 1（表 3），表明它们在进化过程中经过了较强的纯化选择，有害的非同义替换在进化过程消失，极少数的无害或有益替换得以保留^[48]。上述现象间接证明了 *PtrPLD* 家族基因在毛果杨的生命活动中发挥着重要作用。

PtrPLD 家族基因编码蛋白含有多个基序，表明该基因家族生物学功能的多样性。同时，所有的 *PtrPLD* 家族基因编码蛋白均含有 Motif 1~4 基序（图 4），表明这 4 个基序是该基因家族的特征

基序，且是毛果杨生命活动所必须的。此外，序列比对表明，Motif 1 中的 HKD 基序中的甲硫氨酸高度保守，这种现象也存在于其他植物的 PLD 蛋白中^[11, 51-52]，因此，推测 Motif 1 中的甲硫氨酸是 HKD 基序功能的关键位点。

PtrPLD 家族成员的表达特性分析表明，其中 9 个家族成员在根部表达水平较高，3 个在茎部表达水平较高，4 个在叶部表达水平较高（图 5）。前期研究认为，*PLD* 基因多涉及环境胁迫响应^[10, 17, 29, 34]，而根部是植物感知渗透胁迫的首要部位。据此推测，在毛果杨根部表达水平较高的 9 个 *PtrPLD* 基因可能在根部渗透胁迫信号转导过程中发挥重要作用，而其余 7 个在茎、叶中表达水平较高的可能在茎部或叶部的胁迫信号转导过程中发挥功能。此外，phytozome 网站中数据与 qRT-PCR 结果中的组织表达特性不同的原因可能是所用材料的树龄不同，同时它们在不同发育阶段中的表达模式存在差异所致。

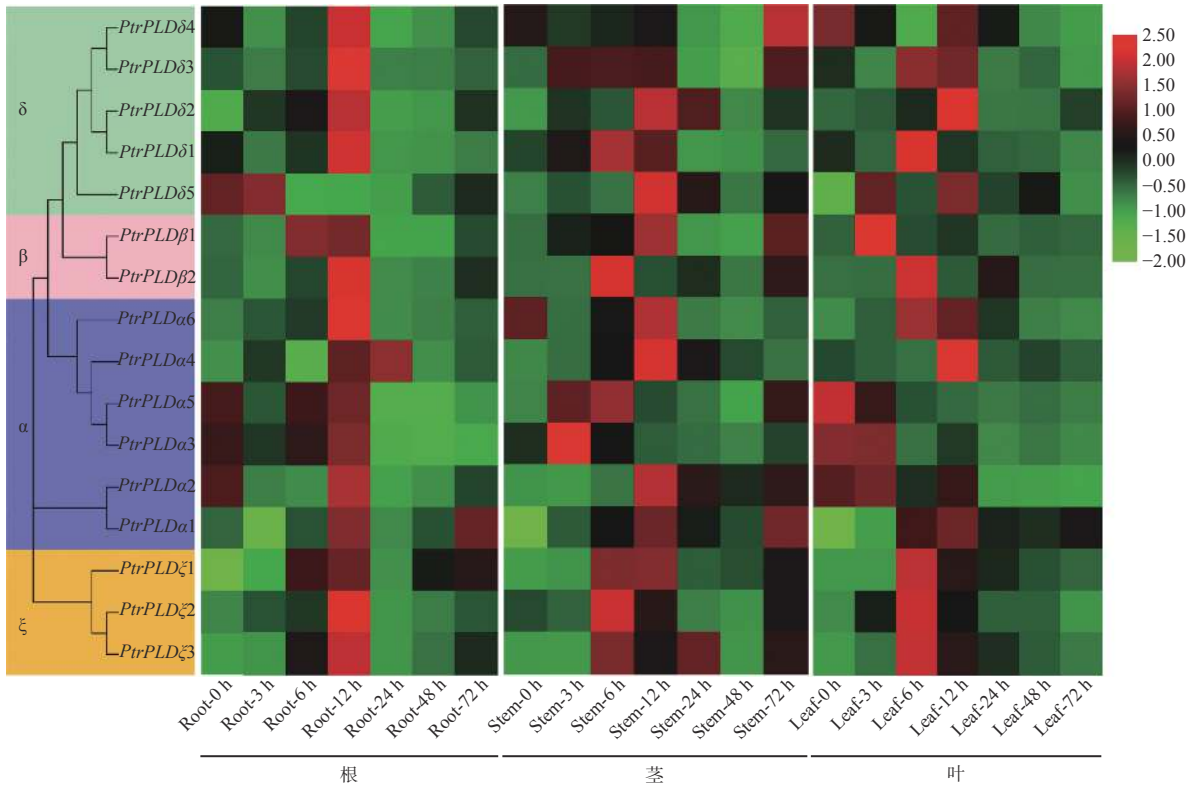


图6 不同组织中 *PtrPLD* 基因家族在盐胁迫下的表达特性

Fig. 6 Analysis of salt stress expression of *PtrPLD* family genes in different tissues

上游转录因子结合下游基因启动子中顺式作用元件, 从而激活逆境响应基因的表达是植物响应环境胁迫的重要环节^[53]。因此, 对基因启动子区域顺式元件的分析, 是鉴定分析基因生物学功能的一项重要内容。本研究发现, *PtrPLD* 家族基因启动子中含有多种与植物激素和逆境胁迫响应相关的两大类响应元件 (表4), 表明该基因家族广泛地参与毛果杨多种逆境胁迫的响应。*PtrPLD* 家族基因在盐胁迫下的响应特性也证实了上述观点。

4 结论

本研究通过氨基酸序列比对及保守结构域检验, 在毛果杨中鉴定了16个 *PtrPLDs*; 通过系统发育进化分析将其分为2个亚族, 4种类型; 利用同源性分析及 *Ka*、*Ks* 分析 *PtrPLD* 基因家族说明基因复制是其家族扩张的主要动力, 且在进化过程中受到较强地纯化选择; 系统发育进化树与基因结构和保守结构域分析表明, 同一亚族、同一类型的 *PtrPLD* 具有相似的基因结构和蛋白保守结构域; 启动子中顺式作用元件分析表明, 16个 *PtrPLDs* 均能够响应多种激素和胁迫信号; 组织表达特异性

以及盐胁迫下的表达特性分析表明, 同一进化分支上基因仍具有相同表达模式, 而不同进化分支的基因存在功能分化。本研究对于 *PtrPLD* 家族基因生物学功能的鉴定和抗逆基因资源挖掘具有积极意义。

参考文献:

- [1] Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(395): 225-236.
- [2] 朱健康, 倪建平. 植物非生物胁迫信号转导及应答[J]. *中国稻米*, 2016, 22(6): 52-60.
- [3] Pandey S, Assmann S. M. The *Arabidopsis* putative Gprotein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein α subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(6): 1616-1632.
- [4] Roos W, Dordschbal B, Steighard J, et al. A redox-dependent, G-protein-coupled phospholipase A of the plasma membrane is involved in the elicitation of alkaloid biosynthesis in *Eschscholtzia californica*[J]. *BBA- Molecular Cell Research*, 1999, 1448(3): 390-402.
- [5] Gao K, Liu Y L, Li B, et al. *Arabidopsis thaliana* phosphoinositide-specific phospholipase C isoform 3 (AtPLC3) and AtPLC9 have an

- additive effect on thermotolerance[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2014, 55(11): 1873-1883.
- [6] Wan S, Tian L, Tian R, *et al.* Involvement of phospholipase D in the low temperature acclimation-induced thermotolerance in grape berry[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2009, 47(6): 504-510.
- [7] Hong Y, Zhao J, Guo L, *et al.* Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses[J]. *Progress in Lipid Research*, 2016, 6: 55-74.
- [8] 王雅静, 张欣莹, 黄桂荣, 等. 植物磷脂酸的特性及其在ABA诱导气孔运动中的作用[J]. *植物学报*, 2019, 54(2): 245-254.
- [9] Welti R, Li W, Li M, *et al.* Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(35): 31994-32002.
- [10] Hong Y, Zhang W, Wang X. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity[J]. *Plant Cell & Environment*, 2010, 33(4): 627-635.
- [11] Tank K, Dong C, Liu J. Genome-wide analysis and expression profiling of the phospholipase D gene family in *Gossypium arboreum*[J]. *Science China-Life Sciences*, 2016, 59(2): 130-141.
- [12] Qin C, Wang X. The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-delective PLD zeta 1 with distinct regulatory domains[J]. *Plant Physiology*, 2002, 128(3): 1057-1068.
- [13] Li G, Lin F, Xue H-W. Genome-wide analysis of the phospholipase D family in *Oryza sativa* and functional characterization of PLD β 1 in seed germination[J]. *CELL RESEARCH*, 2007, 17(10): 881-894.
- [14] 张艺思, 刘高峰, 刘路平, 等. 白菜PLD基因家族全基因组鉴定及对高温胁迫的响应[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(8): 1361-1370.
- [15] Zhao J, Zhou D, Zhang Q, *et al.* Genomic analysis of phospholipase D family and characterization of *GmPLD*s in soybean (*Glycine max*)[J]. *Journal of Plant Research*, 2012, 125(4): 569-578.
- [16] Marek E, Martin P, Fatima C, *et al.* Molecular diversity of phospholipase D in angiosperms[J]. *BMC genomics*, 2002, 3: 2.DOI: 10.1186/1471-2164-3-2.
- [17] Wang X, XU L, Zheng L. Cloning and expression of phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D from *Ricinus communis* L [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(32): 20312-20317.
- [18] Ueki J, Morioka S, Komari T, *et al.* Purification and characterization of phospholipase D (PLD) from rice (*Oryza sativa* L.) and cloning of cDNA for PLD from rice and maize (*Zea mays* L.)[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1995, 36(5): 903-914.
- [19] Pappan K, Qin W, Dyer J H, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of polyphosphoinositide-dependent phospholipase D, PLD-beta, from *Arabidopsis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(11): 7055-7061.
- [20] Lein W, Saalbach G. Cloning and direct G-protein regulation of phospholipase D from tobacco[J]. *BBA- Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2001, 1530(2-3): 172-183.
- [21] The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature*, 2000, 408(6814): 796-815.
- [22] Yu J, Hu S, Wang J, *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*)[J]. *Science*, 2002, 296(5565): 79-92.
- [23] Zhang L, Cai X, Wu J, *et al.* Improved *Brassica rapa* reference genome by single-molecule sequencing and chromosome conformation capture technologies[J]. *Horticulture research*, 2018, 5: 50. DOI: 10.1038/s41438-018-0071-9.
- [24] Li F, Fan G, Wang K, *et al.* Genome sequence of the cultivated cotton *Gossypium arboreum*[J]. *Nature Genetics*, 2014, 46(6): 567-572.
- [25] Ma J, Wan D, Duan B, *et al.* Genome sequence and genetic transformation of a widely distributed and cultivated poplar[J]. *Plant biotechnology journal*, 2019, 17(2): 451-460.
- [26] Laucou V, Launay A, Bacilieri R, *et al.* Extended diversity analysis of cultivated grapevine *Vitis vinifera* with 10K genome-wide SNPs[J]. *PLoS One*, 2018, 13(2): e0192540.
- [27] Schumutz J, Cannon S B, Schlueter J, *et al.* Genome sequence of the palaeopolyploid soybean[J]. *Nature*, 2010, 465(7294): 120.
- [28] Liu Q, Zhang C, Yang Y, *et al.* Genome-wide and molecular evolution analyses of the phospholipase D gene family in Poplar and Grape[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 117. DOI: 10.1186/1471-2229-10-117.
- [29] Sang Y, Zheng S, Li W, *et al.* Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D alpha[J]. *Plant Journal*, 2001, 28(2): 135-144.
- [30] Wang C, Zien C A, Afithile M, *et al.* Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*[J]. *Plant cell*, 2000, 12(11): 2237-2246.
- [31] Zhang W, Wang C, Qin C, *et al.* The oleate-stimulated phospholipase D, PLDdelta, and phosphatidic acid decrease H₂O₂-induced cell death in *Arabidopsis*[J]. *Plant cell*, 2003, 15(10): 2285-2295.
- [32] Pinosa F, Buhot N, Keaaihaal M, *et al.* *Arabidopsis* phospholipase d δ is involved in basal defense and nonhost resistance to powdery mildew fungi[J]. *Plant physiology*, 2013, 163(2): 896-906.
- [33] Premkumar A, Lindberg S, Lager I, *et al.* *Arabidopsis* PLDs with C2-domain function distinctively in hypoxia[J]. *Physiologia Plantarum*, 2019, 167(1): 90-110.
- [34] Zhang T, Song Y, Liu Y, *et al.* Overexpression of phospholipase D α gene enhances drought and salt tolerance of *Populus tomentosa*[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2008, 53(23): 3656-3665.
- [35] Ji T, Li S, Li L, *et al.* Cucumber Phospholipase D alpha gene overexpression in tobacco enhanced drought stress tolerance by regulating stomatal closure and lipid peroxidation[J]. *BMC plant biology*, 2018, 18: 355. DOI: 10.1186/s12870-018-1592-y.
- [36] Wang J, Ding B, Guo Y, *et al.* Overexpression of a wheat phospholipase D gene, TaPLD α , enhances tolerance to drought and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Planta*, 2014, 240(1): 103-115.

- [37] Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1596-1604.
- [38] Finn R D, Penelope C, Eberhardt R Y, *et al.* The Pfam protein families database: towards a more sustainable future[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 44(D1): D279-D285.
- [39] ron M B, Lu S, Andreson J B, *et al.* CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(1): D225-D229.
- [40] unta M, Coggill P, Eberhardt R Y, *et al.* The Pfam protein families database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1): D290-D301.
- [41] Chen C, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [42] Wiershaun G Y. The proteomics protocols handbook[J]. *Biochemistry*, 2006, 71(6): 861-861.
- [43] Chou K, Shen H. Cell-PLoc: a package of Web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms[J]. *Nature protocols*, 2008, 3(2): 153-162.
- [44] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [45] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [46] Wang L, Hu W, Sun J, *et al.* Genome-wide analysis of SnRK gene family in *Brachypodium distachyon* and functional characterization of *BdSnRK2.9*[J]. *Plant Science*, 2015, 237: 33-45.
- [47] Blang G, Wolfe K H. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(7): 1667-1678.
- [48] Hurst L D. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution[J]. *Trends in genetics*, 2002, 18(9): 486-487.
- [49] Bailey T L, Nadya W, Chris M, *et al.* MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(S1): W369-W373.
- [50] Zhang Y, Liu C, Cheng H, *et al.* DNA methylation and its effects on gene expression during primary to secondary growth in poplar stems[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21: 498. DOI: 10.1186/s12864-020-06902-6.
- [51] Luz Irina A. Calderón Villalobos, Sarah Lee, Cesar De Oliveira, *et al.* A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin[J]. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(5): 477-485.
- [52] Yasushi Shimizu Mitao, Tatsuo Kakimoto. Auxin sensitivities of all *Arabidopsis* Aux/IAAs for degradation in the presence of every TIR1/AFB[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(8): 1450-1459.
- [53] Ghulam Muhammad Ali, Setsuko Komatsu. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress[J]. *Journal of proteome research*, 2006, 5(2): 396-403.

Genome-wide Identification of *PLD* Gene Family of *Populus trichocarpa* and Its Responses to Salt Stress

LIU Cong¹, ZHANG Yang¹, XIA De-an¹, CHEN Xue-bing¹, WEI Zhi-gang²

(1. Northeast Forestry University, State Key Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, Harbin 150040, Heilongjiang, China;

2. Research Center of Saline and Alkali Land of National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] To analyze the pressure of selection in the evolution of *PLD* gene family in the woody model plant *Populus trichocarpa*, the cis-acting elements in the promoter, the tissue expression characteristics, and the expression pattern under salt stress in order to provide references for mining the role of *PtrPLD* in abiotic stress. [Method] Using Arabidopsis *PLD* gene family protein sequence alignment to obtain the *P. trichocarpa* genome homologous gene, and then identify the *PtrPLD* gene after the conserved domain identification; using the software ClustalW and MEGA to perform the amino acid sequence alignment and systematic evolution analysis of the *PtrPLD* and *AtPLD* genes; using MEME, Plant-mPLoc, ExPasy and other software tools to analyze the characteristics of *PtrPLD* genes and encoded proteins; using Tbttools software to analyze homologous genes and *Ka/Ks* values; using Plantcare online tools to analyze the cis-acting elements in the promoter of *PtrPLD*; using Phytozome transcriptome database and qRT-PCR to analyze the *PtrPLD* tissue expression characteristics; and using qRT-PCR to analyze the *PtrPLD* response to salt stress in each tissue. [Result] The results show that the *PtrPLD* family can be divided into 2 subfamilies, C2-PLD and PX/PH-PLD, which containing 13 and 3 genes respectively. There are 7 pairs of paralogous genes and the *Ka/Ks* between them is far less than 1. The promoter region of *PtrPLD* family genes contains a large number of abiotic stress and hormone response elements, among which the *PtrPLDδ4* promoter contains 20 elements. The *PtrPLD* family of encoded proteins all contain Motif 1-4, and the sequences on the same evolutionary branch of the evolutionary tree are highly conserved. Analysis of the expression characteristics showed that the *PtrPLD* family genes have specific expression in roots, stems and leaves, and most members are mainly expressed in the roots. Under NaCl stress, the expression level of *PtrPLD* family genes in the roots, stems and leaves showed a trend of up-down-up within 72 hours. [Conclusion] The results show that the *PtrPLD* family genes play an important role in the response of *P. trichocarpa* to salt stress. This study will promote the identification of the biological functions of *PtrPLD* family genes and the mining of genetic resources in response to abiotic stress.

Keywords: *Populus trichocarpa*; *PLD* gene family; bioinformatics analysis; salt stress

(责任编辑: 张 研)