



大豆 TGL 基因家族全基因组鉴定及高盐胁迫响应研究

王晓丽¹, 王 敏¹, 岳爱琴¹, 赵晋忠², 王利祥¹, 张永坡², 高春艳², 杜维俊¹

(1. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030800; 2. 山西农业大学 基础部, 山西 太谷 030800)

摘 要: 三酰甘油脂肪酶(TGL)是甘油三酯分解代谢的主要酶, TGLs 能水解参与植物生长发育和非生物胁迫反应的长链脂肪酸甘油三酯(TAG)。为研究大豆 TGL 基因家族的基因成员及其对高盐胁迫的响应, 本研究通过同源比对方法在大豆中鉴定 *GmTGLs* 基因并对其进行生物信息学分析, 根据 RNA-seq 数据库并采用荧光定量 PCR 方法分析盐胁迫下基因的表达量差异, 并对主要盐胁迫响应基因进行生物信息学分析。结果显示: 共从大豆中鉴定出 15 个 *GmTGLs* 基因, 不均匀地分布在 11 条染色体上, 其编码氨基酸序列为 392 ~ 701 aa。这些 *GmTGLs* 均有保守结构域 Abhydro_lipase (PF04083)。启动子顺式作用元件分析表明, *GmTGLs* 的启动子包含光响应顺式元件, 激素响应元件及 ARE、LTR、TC-rich repeats 和 MBS 等胁迫响应元件。转录组数据分析表明 *GmTGL3*、*GmTGL14* 基因在所有组织中均有表达, *GmTGL3*、*GmTGL14*、*GmTGL2* 和 *GmTGL6* 基因在盐胁迫后表达上调, *GmTGL2* 和 *GmTGL3* 基因的表达变化最明显。荧光定量 PCR 分析结果表明 *GmTGL2* 和 *GmTGL3* 可能分别主要在盐胁迫的后期和前期参与响应, 进一步证实 TGL 基因家族参与了大豆对盐胁迫的反应过程。

关键词: 大豆; 三酰基甘油脂肪酶; 生物信息学分析; 高盐胁迫; 表达分析

Genome-Wide Identification of Soybean TGL Gene Family and The Response to High Salt Stress

WANG Xiao-li¹, WANG Min¹, YUE Ai-qin¹, ZHAO Jin-zhong², WANG Li-xiang¹, ZHANG Yong-po², GAO Chun-yan², DU Wei-jun¹

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030800, China; 2. Department of Basic Courses, Shanxi Agricultural University, Taigu 030800, China)

Abstract: Triacylglycerol lipase (TGL) is the main enzyme of triglyceride catabolism. TGLs can hydrolyze long-chain fatty acid triglycerides involved in plant growth, development and abiotic stress response. In order to study the TGL gene family members in soybean and their response to high salt stress, this study identified *GmTGL* genes in soybean, and analyzed the physicochemical properties, systematic evolution, gene structure, conserved domain, chromosome location and tissue expression pattern based on bioinformatics methods. We analyzed the differences of gene expression under salt stress based on the RNA-seq database and the fluorescence quantitative PCR method. The results showed that a total of 15 *GmTGL* genes were identified from soybean, their encoding amino acid sequences ranged from 392 to 701 aa, and the *GmTGL* genes was unevenly distributed on 11 chromosomes. These *GmTGLs* all shared a common conserved domain Abhydro_lipase (PF04083). The promoter analysis showed that the promoter of *GmTGLs* contained *cis*-responsive elements, hormone responsive elements, and stress responsive elements such as ARE, LTR, TC-rich Repeats and MBS. *GmTGL3* and *GmTGL14* were expressed in all soybean tissues, and the expressions of *GmTGL3*, *GmTGL14*, *GmTGL2* and *GmTGL6* were up-regulated in response to salt stress. *GmTGL2* and *GmTGL3* genes with the most obvious up-regulated expression under salt stress were selected for semi-quantitative analysis, which was further verified that TGL gene family could participate in the response process of soybean to salt stress.

Keywords: soybean; triacylglycerol lipase; bioinformatics; high salt stress; expression analysis

盐胁迫作为主要的非生物胁迫之一, 会对植物的生长发育造成有害影响。在盐胁迫环境中, 植物的出苗率、发芽状况乃至产量输出都会大幅下降^[1]。目前, 我国盐碱化土地达到近 1 亿 hm², 且面积仍在上升^[2]。因此, 研究植物对非生物胁迫的响应机制至关重要。在盐胁迫下, 大豆激活一系列的防御机制以增加耐盐性^[3]。决定耐盐性的基因包

括离子转运蛋白^[4-5]、转录因子^[6-7]及生长素转运蛋白编码基因。目前已报道的蛋白有谷胱甘肽 s-转移酶^[8]、胚胎发生晚期丰富蛋白^[9]、钙调磷酸酶样蛋白^[10]、黄酮合酶^[11]等。

在大豆种子发育过程中, 光合产物以糖的形式输入, 糖酵解产生的丙酮酸通过丙酮酸脱氢酶复合体转化为乙酰辅酶 A, 将其转化为脂肪酸生物合成

收稿日期: 2021-09-30

基金项目: 山西农业大学省部共建有机旱作农业国家重点实验室自主研发项目 (202105D121008-3-8); 山西农业大学育种工程项目 (YZGC096); 山西省自然科学基金 (201901D111225); 山西农业大学农学院育种工程重点培育专项 (YZ2021-05)。

第一作者: 王晓丽 (1997—), 女, 硕士研究生, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: 1316661466@qq.com。

通讯作者: 杜维俊 (1968—), 女, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: duweijun68@126.com。

的前体^[12]。脂肪酸和碳水化合物在合成过程中竞争质体中新固定的碳,这些固定碳被输出并在内质网(ER)中组装成甘油三酯(TAG)。TAG 从内质网释放并以油体形式在胞质中积累,可以根据细胞的需要被回收用于膜生物合成或在过氧化物酶体中代谢^[13]。三酰甘油脂肪酶(TGL)在种子萌发和幼苗发育中起着关键作用,是一种丝氨酸水解酶,能够水解 TAG,并通过 β -氧化在过氧化物酶体中进一步代谢,生成乙酰辅酶 A^[14-15]。关于 TGL 在拟南芥生长发育过程中的作用报道较多^[16-19]。在拟南芥的根、茎、叶、花和荚果中均能检测到 TGL 基因 *At2g15230* 和 *At2g31690* 的少量表达,但在刚萌发的幼苗和衰老的莲座叶中均能检测到这两个基因的大量表达^[20]。拟南芥中 TGL 基因 *AtLIP1* 通过改变 TAG 在不同时期的组成表达来影响种子萌发^[21-22]。

近年来,越来越多的研究表明在正常生长条件下,植物营养组织中不积累 TAG,而在非生物胁迫下诱导 TAG 合成,TAG 参与了植物的非生物胁迫反应^[23]。干旱和高盐条件会导致细胞脱水,从而诱导 Mg^{2+} 的积累,由于 DAG 向 TAG 转化的增加,番茄冷敏感器 SFR2 同源物(SISFR2)在盐和干旱反应中通过翻译后激活机制在低温胁迫中发挥作用^[24]。TGL 通过调控 TAG 的生物化学反应来参与植物的非生物胁迫响应。缺氮条件下脱落酸信号通路转录因子 ABI5 与拟南芥中编码 TAG 脂肪酶的 TGL 基因 *AtDGAT1* 的表达协同上调,而脱落酸可诱导 *AtDGAT1* 的表达^[25]。提高大豆的抗盐、抗旱等多重抗性对大豆高产稳产起到了极大的促进作用。为了研究大豆 TGL 在盐胁迫下的响应机制,本研究通过生物信息学方法从大豆中筛选并鉴定 TGL 同源序列,并对其理化性质、进化关系及基因结构进行分析,预测 *GmTGLs* 基因启动子顺式作用元件,并利用实时荧光定量 PCR 检测其对高盐胁迫的响应情况,为进一步深入研究大豆 TGL 基因家族的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为耐盐材料汾豆 105^[26]。

1.2 试验设计

在 Ensembl 数据库(Ensembl<http://plants.ensembl.org/index.html>)中下载大豆基因组 CDS 序列、蛋白序列 gff3 文件。在 TAIR 数据库(<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>)中下载拟南芥 *AtLIP1*、*ATMPL1* 基因及其编码蛋白序列,以其蛋白序列为参考检索大豆中 TGL 基因家族成员,并用 Tbttools 进行 BLAST,从大豆蛋白组中筛选同源序列。

大豆汾豆 105 种子用 75% 乙醇消毒,于山西农业大学大豆温室种植,幼苗在 25 °C/20 °C(光/暗)、16 h/8 h(光/暗)周期培养箱中生长,直到第二个三出复叶开始展开。在盐胁迫处理下,将生长均匀的植株分别置于 0,50,75,100,150 和 200 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液中放置 30 h。分别取处理 0,1,3,6,12,24,36 和 48 h 的大豆幼苗根系组织,在液氮中冷冻,放置于 -80 °C 冰箱备用。以未经处理的幼苗作为对照,与胁迫处理植株的同时种植和收获。由于在大豆盐胁迫试验常用盐浓度 100 mmol·L⁻¹^[27] 处理下表型差异明显,对此浓度培养的大豆幼苗进行 RNAseq 和 ChIP-seq 分析。进行 3 次生物学重复。所得表达谱数据利用 Tbttools 软件^[28] heatmap 分析包绘制基因表达模式热图。

为了验证 *GmTGL2* 和 *GmTGL3* 响应盐胁迫的生物学功能,采用荧光定量 PCR 方法分析耐盐材料汾豆 105 在盐胁迫后的基因表达量。当第一对真叶完全展开时,用 150 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液对植株进行盐胁迫处理,分别在处理 1,3,6,9,12,24,36 和 48 h 取根部,以不处理为对照材料。

为了进一步分析验证 *GmTGL2* 基因的生物学功能,对其编码蛋白理化性质、结构及基因组织表达模式进行生物信息学分析预测。

1.3 方法

1.3.1 大豆 TGL 基因家族序列鉴定 从 Pfam 蛋白家族数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)中下载 TGL 结构域(PF04083)对应的隐马尔科夫模型(HMM)文件,利用 HMMER 3.0 从大豆基因组数据库中检索 *GmTGL* 基因,去除所有冗余序列,对剩余序列进行分析,并将其提交到 SMART 数据库和 Pfam 数据库中,确认 TGL 结构域的存在,从而确定其基因家族成员。利用 ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)数据库对 TGLs 蛋白进行理化性质分析。

1.3.2 基因系统进化分析及保守结构域分析 利用 MEGA-X 软件进行 TGLs 基因进化树构建。以已经公布的两个拟南芥 TGL 基因 *AtLIP1*、*ATMPL1* 和大豆 TGLs 蛋白序列为比对文件,选择 Muscle 程序,输出 meg 文件,利用 NJ(Neighbor-Joining)邻接法对基因家族进行进化分析。通过 Evolview(<http://www.omicsclass.com/article/671>)在线工具进行进化树美化。利用 MEME(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)数据库,基于 motif 保守结构域对 TGLs 基因进行分析,motif 设置为 10,用 Tbttools 软件进行美化。

1.3.3 基因结构及顺式作用元件分析 利用 Tbttools 软件,通过 gff 文件,获得 *GmTGLs* 基因结构信息。利用 Tbttools 中 GFF3 工具从大豆基因组信息中提取所有大豆 CDS 上游 2 000 bp,从中调取 *GmTGL* 基因家族成员启动子序列,并将其提交到 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线数据网站^[29],进行顺式作用元件预测分析。

1.3.4 基因组织表达模式及盐胁迫表达模式分析预测 从 Phytozome 数据库 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)中检索 *GmTGLs* 基因在 9 个组织(根、茎、芽、叶、花、根瘤、根尖、豆荚和种子)和 3 个不同处理(氨、氮和尿素)中的表达数据。在大豆基因芯片表达谱数据库中获得 *Glycine max* Williams 82 大豆高盐转录组数据^[30]。利用 TBtools 软件中的 heatmap 分析包,采用欧氏距离和层次聚类的完全连锁方法绘图。

1.3.5 RNA 提取和荧光定量 PCR 检测 用 TRIzol 法提取植株根部总 RNA,使用反转录试剂盒 TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 将其反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR。*GmTGL2* 基因的上下游引物分别为 5'-CGCGTAGGATAGAAGCCAAG-3'和 5'-ATACATGCTCCGCCACAGAG-3';*GmTGL3* 基因的上下游引物分别为 5'-TTGATGAAGGGTG-CCAGGGT-3'和 5'-CTGCAACTTGTCTTTCTCTCC3';内参基因 *GmCYP2* 的上下游引物分别为 5'-CG-GGACCAGTGTGCTTCTTCA-3'和 5'-CCCCTCCACT-ACAAAGGCTCG-3'。采用 PerfectStart[®] Green qPCR

SuperMix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR,总反应体系 20 μL:10 μL 2 × SuperRealPreMix Plus、0.6 μL 正向引物(10 μmol · L⁻¹)、0.6 μL 反向引物(10 μmol · L⁻¹)、1 μL cDNA 模板、7.8 μL RNase-free ddH₂O。使用美国伯乐 CFX 96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪,反应程序采用三步法:94 ℃ 30 s;94 ℃ 5 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s,40 个循环。

1.3.6 *GmTGL2* 基因生物信息学分析 使用在线网站 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>)预测蛋白疏水性,使用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋白跨膜结构。使用 Prabi 在线网站 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测分析蛋白二级结构;使用 SWISS-MODEL 进行三级结构建模及分析。使用 BAR 在线网站 (http://bar.utoronto.ca/eplant_soybean/)分析预测 *GmTGL2* 基因在不同组织中的表达模式。

1.4 数据分析

采用 SPSS 19.0 和 Excel 2016 进行数据统计分析,采用 GraphPad Prism 5.0 作图,使用 CS 6.0 进行图片编辑。

2 结果与分析

2.1 大豆 TGL 家族基因鉴定

如图 1 所示,共筛选出 15 条 TGL 同源基因,按照其在染色体上的位置分别命名为 *GmTGL1* ~ *GmTGL15*,分别分布在 2、5、7 ~ 10、13、14、16、19、20 号染色体上,其中 8 和 13 号染色体上包含两个同源基因,20 号染色体上包含 3 个同源基因。

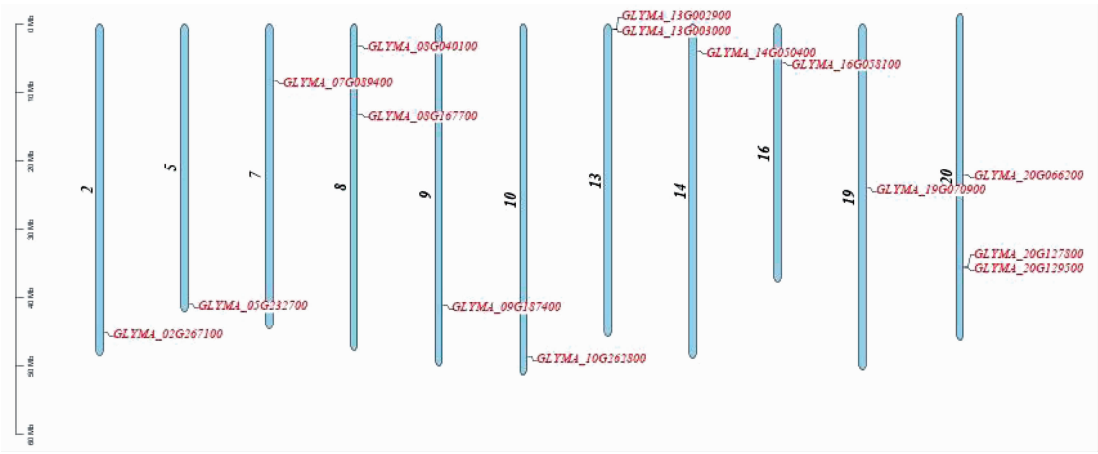


图 1 大豆 TGL 基因家族成员染色体分布

Fig. 1 The chromosome distribution of TGL gene family in *Glycine max*

2.2 大豆 TGL 蛋白理化性质分析

如表 1 所示,*GmTGLs* 基因编码蛋白质的氨基酸数量介于 392 aa (*GmTGL7*) 和 701 aa (*GmTGL3*) 之

间;理论 pI 介于 4.73 (*GmTGL5*) 和 6.76 (*GmTGL14*) 之间;分子量为 44 166.93 ~ 79 202.73 Da。不稳定系数为 38.03 ~ 52.35,其中 10 个为稳定蛋白,5 个

为不稳定蛋白。脂肪族氨基酸指数均大于 89。亲水平均数大多数为负值,只有 *GmTGL11* (0.007) 和 *GmTGL15* (0.547) 为正值,说明 *GmTGL11* (0.007) 和 *GmTGL15* (0.547) 为疏水性蛋白,其他 *GmTGLs* 为亲水性蛋白(表 1)。

表 1 大豆 TGL 基因理化性质
Table 1 The physical and chemical proterties analysis of TGL genes in *Glycine max*

基因名称 Gene name	基因座位 ID Gene locus ID	转录本 ID Transcript ID	氨基酸数量 Number of amino acids	理论等电点 Theoretical pI	分子量 Molecular weight/Da	不稳定系数 Instability index	脂肪族氨基酸指数 Aliphatic index	亲水平均数 Grand average of hydropathicity
<i>GmTGL1</i>	Glyma.02G267100	KRH73321	400	5.48	44778.95	35.33	92.15	-0.133
<i>GmTGL2</i>	Glyma.05G232700	KRH73323	651	6.30	73424.20	51.35	90.69	-0.270
<i>GmTGL3</i>	Glyma.07G089400	KRH60147	701	6.64	79202.73	46.52	93.41	-0.173
<i>GmTGL4</i>	Glyma.08G040100	KRH60317	603	5.85	67091.12	52.35	93.40	-0.138
<i>GmTGL5</i>	Glyma.08G167700	KRH60318	408	4.73	45781.91	32.32	93.19	-0.063
<i>GmTGL6</i>	Glyma.09G187400	KRH60319	697	6.75	78289.70	46.83	93.95	-0.164
<i>GmTGL7</i>	Glyma.10G262800	KRH48452	392	5.80	44166.93	40.97	92.24	-0.017
<i>GmTGL8</i>	Glyma.13G002900	KRH41614	415	5.31	46372.71	31.20	89.52	-0.131
<i>GmTGL9</i>	Glyma.13G003000	KRH41615	407	6.03	45694.31	35.39	96.34	-0.086
<i>GmTGL10</i>	Glyma.14G050400	KRH43731	400	5.67	44503.62	32.37	89.27	-0.141
<i>GmTGL11</i>	Glyma.16G058100	KRH43732	410	6.38	45409.84	32.58	95.83	0.007
<i>GmTGL12</i>	Glyma.19G070900	KRH39237	403	6.35	44786.40	36.45	91.44	-0.007
<i>GmTGL13</i>	Glyma.20G066200	KRH39238	403	5.14	44932.93	29.98	89.31	-0.131
<i>GmTGL14</i>	Glyma.20G127800	KRH39240	435	6.76	49197.45	38.33	90.30	-0.156
<i>GmTGL15</i>	Glyma.20G129500	KRH35746	647	5.69	70051.81	38.03	115.89	0.547

2.3 大豆 TGL 基因结构分析

2.3.1 外显子 - 内含子组成结构分析 分析结果显示,*GmTGL1*、*GmTGL6*、*GmTGL9* 和 *GmTGL14* 基因

没有 UTR 结构,其他各基因的外显子数为 5 ~ 14 个(图 2)。

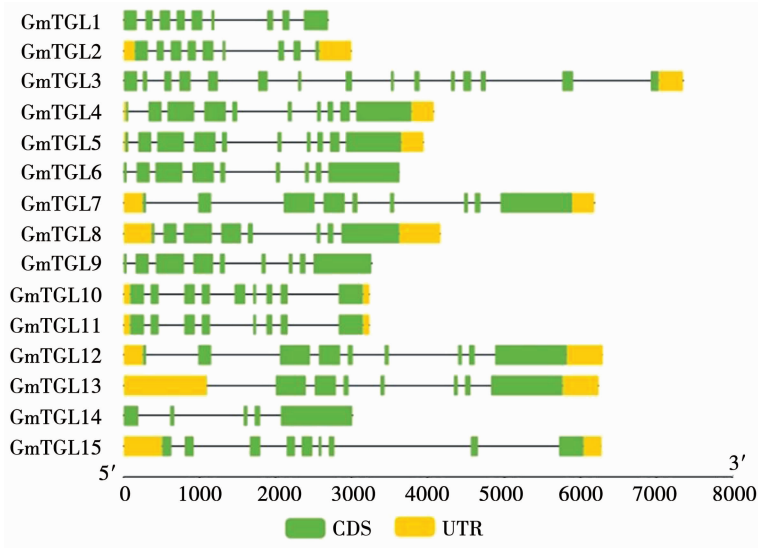


图 2 大豆 TGL 基因外显子 - 内含子组成结构分析

Fig. 2 The structure analysis of exon-intron composition and structure of soybean TGL genes

2.3.2 基因系统进化分析及保守结构域分析 多序列比对结果如图 3 所示,拟南芥 *AtMPL1* 与大豆 *GmTGL5*、*GmTGL8* ~ *GmTGL13* 聚类为 group 1。*AtLIP1* 与 *GmTGL7*、*GmTGL14* 和 *GmTGL15* 聚类为 group 2,而不含拟南芥的 *GmTGL2*、*GmTGL3*、*GmTGL4* 和 *GmTGL6* 聚类为 group 3。group 1 各序列

均包含所有 Motif,group 2 序列中除 *GmTGL15* 外的其他序列均包含所有 Motif,而 *GmTGL15* 序列中只包含两个 Motif 3。group 3 各序列均只包含 Motif 1、Motif 3 和 Motif 4,*GmTGL2* 序列中包含两个 Motif 1。*GmTGLs* 基因均含有保守结构域:α/β 水解酶结构域 (Abhydro_lipase,PF04083)。

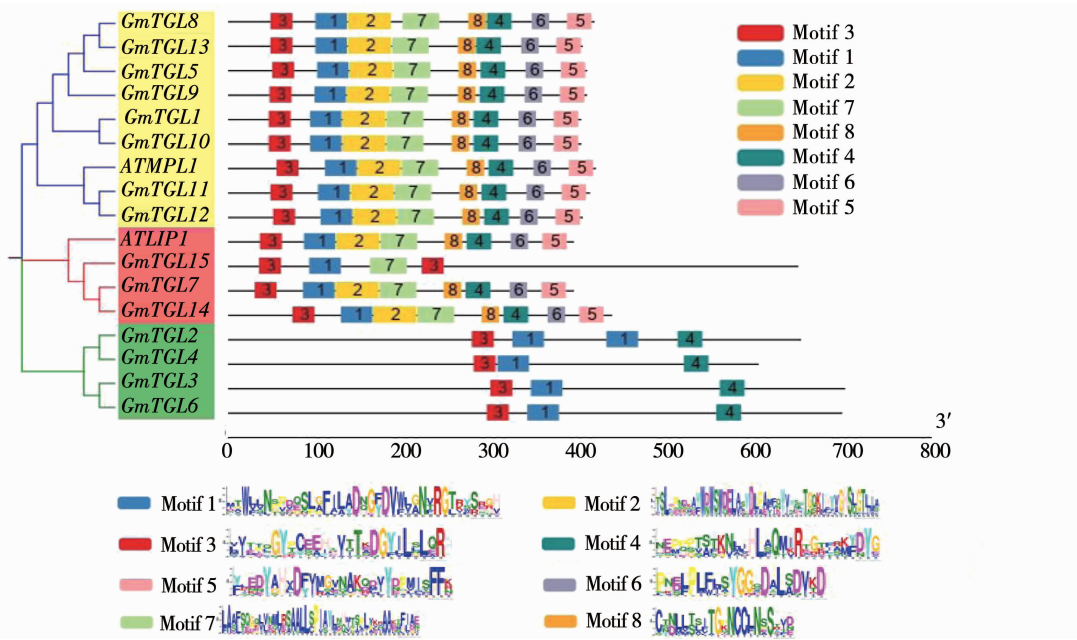


图3 大豆 TGL 基因系统进化树及保守结构域分析
Fig. 3 The phylogenetic tree and conserved domain analysis of soybean TGL genes

2.4 大豆 TGL 基因顺式作用元件分析

启动子顺式作用元件预测分析结果如图 4 所示，共鉴定出 18 个顺式作用元件。除了传统的顺式作用元件外,将其余顺式作用元件分为 3 类:植物生长发育、植物激素响应和胁迫响应元件。植物生长发育元件包括:光响应顺式作用元件 G-Box、与分生组织表达相关的顺式作用调控元件 CAT-box、参与玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式调控元件 O2-site、参与胚乳表达的顺式调控元件 GCN4_motif。植物激素响应元件包括:生长素响应元件 AuxRR-core、参与脱落酸反应的

顺式作用元件 ABRE、赤霉素响应元件 P-box、茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif、水杨酸响应元件 TCA-element。胁迫响应元件包括:对厌氧诱导至关重要的顺式调节元件 ARE、参与低温反应的顺式作用元件 LTR、参与防御和应激反应的顺式作用元件 TC-rich repeats、参与干旱诱导的顺式作用元件 MBS。其中所有基因家族成员都包含光反应元件且数量最多。在植物激素响应元件中参与脱落酸反应的顺式作用元件最多。另外, *GmTGL3*、*GmTGL12* 和 *GmTGL15* 启动子中包含干旱响应顺式作用元件。

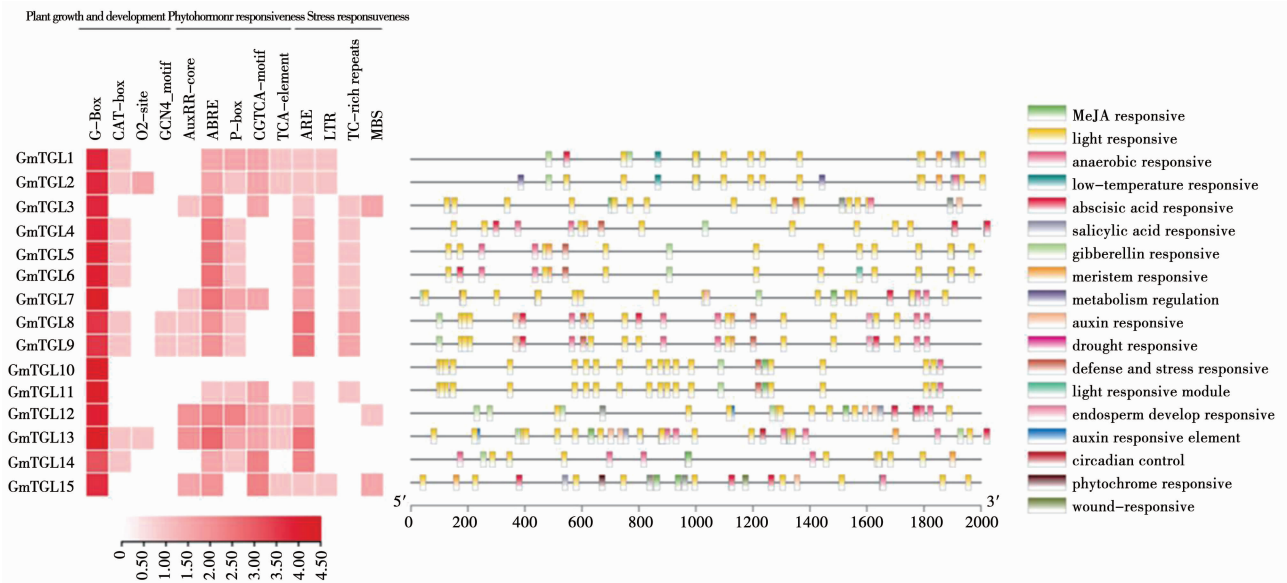


图4 大豆 TGL 基因顺式作用元件分析
Fig. 4 The analysis on cis-acting elements of soybean TGL genes

2.5 大豆 TGL 基因组织表达及盐胁迫表达转录组分析

基于大豆基因组 RNA-seq 数据库的基因表达模式分析结果如图 5A 所示,在所有组织中均未检测到 *GmTGL8*、*GmTGL9*、*GmTGL13* 和 *GmTGL15* 基因表达; *GmTGL3* 在所有组织中的表达量都很高; *GmTGL7* 在地上部分花、叶、茎中的表达量很高; *GmTGL12* 在花中特异表达; *GmTGL14* 除了在根瘤和

根尖中的表达量不高,在其他组织中的表达量都很高。

基于大豆盐胁迫转录组表达数据库中, 100 mmol·L⁻¹ 浓度盐胁迫处理 30 h 后根基因表达量的分析结果如图 5B 所示, *GmTGL7* 和 *GmTGL11* 在对照组中的表达量很高,经过盐胁迫处理后表达下调,而 *GmTGL2* 和 *GmTGL3* 在盐胁迫处理后表达量上调。

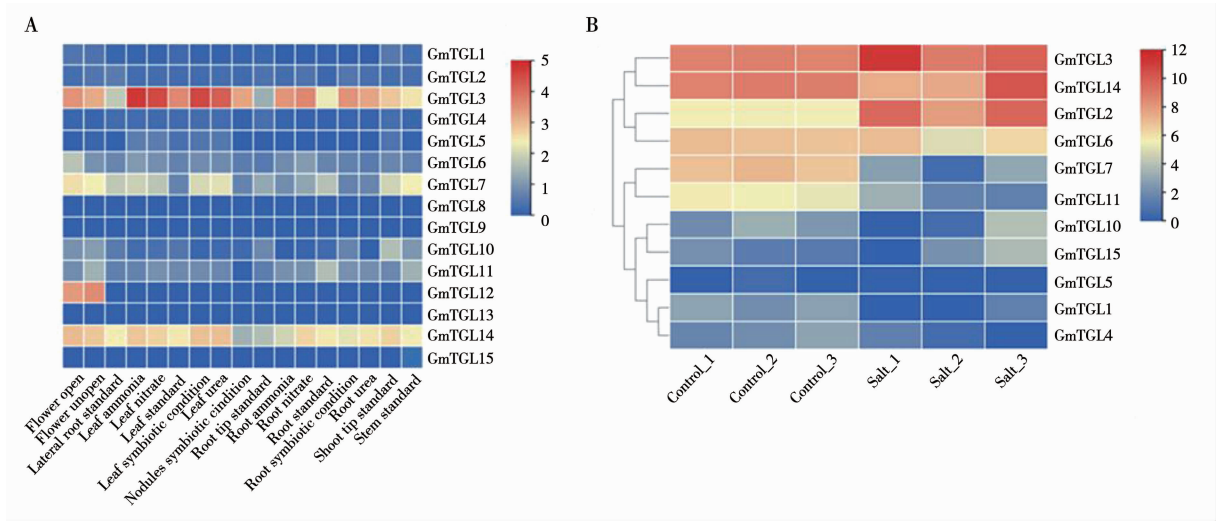


图 5 大豆 TGL 基因在不同组织 (A) 及盐处理后 (B) 表达模式分析

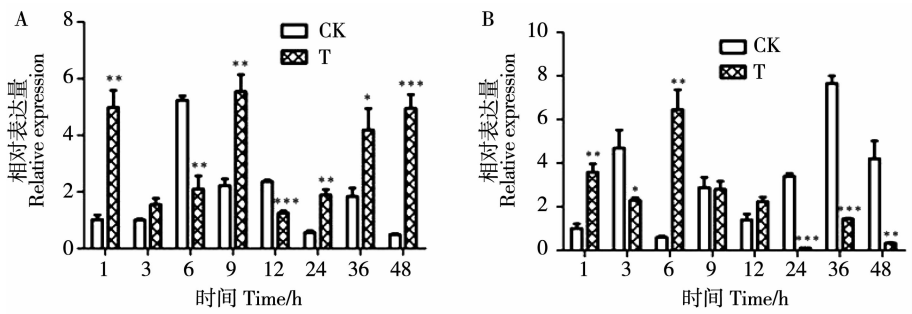
Fig. 5 The expression patterns of soybean TGL genes in different tissues(A) and under salt treatment (B)

2.6 盐胁迫下大豆 TGL 基因表达 qRT-PCR 分析

如图 6 所示, *GmTGL2* 的表达量在盐胁迫处理 1,9,24,36 和 48 h 后显著上调,且在 48 h 上调最高,上调 9.12 倍;在盐胁迫处理 6 和 12 h 后显著下调;表达量变化整体趋势与转录组数据分析结果一致。结果说明 *GmTGL2* 可能在盐胁迫后期参与响应。

GmTGL3 的表达量在盐胁迫 1 和 6 h 后显著上调,且分别上调 2.53 和 9.74 倍,而在 3,24,36 和 48 h 显著下调,整体变化趋势与 *GmTGL2* 一致,但与其转录组组数据分析结果不一致,说明 *GmTGL3* 可能在盐胁迫前期发生响应。

上述结果表明, *GmTGL2*、*GmTGL3* 在大豆对盐胁迫的生物学响应过程中可能发挥一定调控作用。



注:A. *GmTGL2*; B. *GmTGL3*; CK. 未处理对照; T. 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理。*、**、*** 分别表示与对照相比存在 10%、5%、1% 显著性水平差异。

Note: A. *GmTGL2*; B. *GmTGL3*; CK. Untreated control; T. 150 mmol·L⁻¹ NaCl treatment. *, ** and *** indicates that there are significant differences at 10%, 5% and 1% level respectively between the two groups.

图 6 盐胁迫下大豆 TGL 基因表达量变化 qRT-PCR 分析

Fig. 6 The qRT-PCR analysis on expression of soybean TGL genes under salt stress

3 讨论

三酰甘油脂肪酶(TGL)是三酰甘油分解代谢的主导酶。随着基因组测序和生物信息学的快速发展,越来越多的TGL基因被发现,植物TGL基因在不同的物种中广泛分布,同一物种中也存在不同的TGL基因,在植物不同的生长发育阶段发挥各自重要的作用^[34]。目前仅有少量的植物TGL基因被克隆,TGL基因的研究多集中在基因的分子结构,其作用机理及调控机制还知之甚少,特别是对非生物胁迫的研究信息仍然有限。本研究基于生物信息学方法,在大豆中共鉴定出15个TGL基因,不均匀地分布在11条染色体上。对这15个TGL基因与拟南芥*ATLIP1*和*ATMLP1*基因进行进化分析发现*GmTGL2*、*GmTGL3*、*GmTGL4*和*GmTGL6*单独聚为一类,说明大豆的这4个TGL基因具有物种特异性,其他*GmTGLs*与拟南芥*AtTGLs*分别聚为两类。

基因结构和 motif 结构域分析的结果显示,*GmTGLs* 基因均含有 α/β 水解酶结构域 (Abhydro_lipase), α/β 水解酶褶皱是几种系统发育起源和催化功能差异很大的水解酶的共同特征,每一种酶的核心都是相似的1个 α/β 薄片,这个结构在许多脂肪酶中的水解酶结构域的N端被发现^[31]。

由于非生物和生物胁迫对作物产量有显著的负面影响,进一步阐明胁迫反应机制是必要的。在未来气候变化的情况下,提高抗逆性是维持或增加作物产量所必需的途径^[32]。对启动子顺式作用元件分析发现,大豆TGL家族成员包含不同的植物生长发育相关作用元件和植物激素反应相关作用元件,同时包含响应非生物胁迫的顺式作用元件,说明TGL基因除了在植物生长发育与代谢过程中发挥作用,还可能参与不同非生物胁迫防御调节反应的一些生物过程。

通过对*GmTGLs* 基因的组织表达模式和响应高盐胁迫应答情况的分析证实,*GmTGL3* 在所有组织中表达量都较高,*GmTGL2* 在高盐胁迫下表达上调最高,其次为*GmTGL3*。为了进一步分析*GmTGL2* 对高盐胁迫的响应情况,对大豆耐盐材料进行盐胁迫并进行实时荧光定量PCR分析,结果证实*GmTGL2* 在高盐胁迫36和48h后表达显著上调。该结果与Zeng等^[33]通过RNA测序分析发现大豆盐胁迫下Glyma.05G232700基因表达量上调的结果一致,进一步说明*GmTGL2* 参与了盐胁迫响应。

4 结论

本研究共鉴定出15个大豆三酰基甘油脂肪酶基因*GmTGLs*,按照其在染色体上的位置,将其命名为*GmTGL1*~*GmTGL15*。*GmTGLs* 氨基酸数量为392~701aa。*GmTGLs* 启动子顺式作用元件包含多种植物响应生长发育、植物激素及逆境应答的元件。本研究系统分析了TGL基因家族结构、特征和进化关系,发现*GmTGLs* 基因均含有 α/β 水解酶结构域。表达分析表明*GmTGL2*和*GmTGL3*可能分别主要在盐胁迫的后期和前期参与响应。本研究为耐盐大豆分子育种潜在基因资源挖掘提供了一定的理论基础。

参考文献

[1] LIN J X, LI Z, SHUAI S, et al. Effects of various mixed salt-alkaline stress conditions on seed germination and early seedling growth of leymus chinensis from songnen grassland of China[J]. Notulae Botanica Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 2014, 42(1): 154-159.

[2] 吴耀荣, 种康, 谢旗. 植物响应非生物胁迫机制的研究进展及趋势[J]. 中国基础科学, 2016, 18(1): 35-40. (WU Y R, CHONG K, XIE Q. Research progress and trend of plant response to abiotic stress [J]. Basic Science of China, 2016, 18(1): 35-40.)

[3] GUAN R X, QU Y, GUO Y, et al. Salinity tolerance in soybean is modulated by natural variation in *GmSALT3* [J]. The Plant Journal, 2014, 80(6): 937-950.

[4] QI X P, LI M W, XIE M, et al. Identification of a novel salt tolerance gene in wild soybean by whole-genome sequencing[J]. Nature Communications, 2014, 5(7): 4340-4350.

[5] HAO Y J, WEI W, SONG Q X, et al. Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants[J]. The Plant Journal, 2011, 68(2): 302-313.

[6] WANG F, CHEN H W, LI Q T, et al. GmWRKY27 interacts with GmMYB174 to reduce expression of GmNAC29 for stress tolerance in soybean plants[J]. The Plant Journal, 2015, 83(2): 224-236.

[7] CHAI C L, WANG Y Q, VALLIYODAN B, et al. Comprehensive analysis of the soybean (*Glycine max*) GmLAX auxin transporter gene family[J]. Front Plant Science, 2016, 7: 282-294.

[8] JI W, ZHU Y, YONG L, et al. Over-expression of a glutathione transferase gene, *GsGST*, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32: 1173-1179.

[9] LAN Y, CAI D, ZHENG Y Z, et al. Expression in *Escherichia coli* of three different soybean late embryogenesis abundant (LEA) genes to investigate enhanced stress tolerance [J]. Journal of

- Integrative Plant Biology, 2005, 47: 613-621.
- [10] LI Z Y, XU Z H, HE G Y, et al. Overexpression of soybean GmCBL1 enhances abiotic stress tolerance and promotes hypocotyl elongation in *Arabidopsis* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 427: 731-736.
- [11] YAN J H, WANG B A, JIANG Y N, et al. GmFNSII-controlled soybean flavone metabolism responds to abiotic stresses and regulates plant salt tolerance [J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55: 74-86.
- [12] THELEN J J, OHLROGGE J B. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants[J]. Metabolic Engineering, 2002, 4: 12-21.
- [13] ZALE J, JUN J H, KIM J Y, et al. Metabolic engineering of sugarcane to accumulate energy-dense triacylglycerols in vegetative biomass[J]. Plant Biotechnology Journal, 2016, 14: 661-669.
- [14] SANDOVAL G, HERRERA-LOPEZ E J. Lipase phospholipase and esterase biosensors[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1835: 391-425.
- [15] CASAS-GODOY L, GASTEAZORO F, DUQUESNE S, et al. Lipases: An overview[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1835: 3-38.
- [16] CHAPMAN K D, OHLROGGE J B. Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287: 2288-2294.
- [17] HENRY S A, KOHLWEIN S D, CARMAN G M. Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Genetics, 2012, 190: 317-349.
- [18] NOHTURFFT A, ZHANG S C. Coordination of lipid metabolism in membrane biogenesis[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2009, 25: 539-566.
- [19] FAN J, YU L, XU C. A central role for triacylglycerol in membrane lipid breakdown, fatty acid β -Oxidation, and plant survival under extended darkness[J]. Plant Physiology, 2017, 174: 1517-1530.
- [20] PADHAM A K, HOPKINS M T, WANGTW, et al. Characterization of a plastid triacylglycerol lipase from *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 143: 1372-1384.
- [21] WEICHERT H, KOLBE A, KRAUS A, et al. Metabolic profiling of oxylipins in germinating cucumber seedlings-Lipoxygenase-dependent degradation of triacylglycerols and biosynthesis of volatile aldehydes[J]. Planta, 2002, 215: 612-619.
- [22] EASTMOND P J. Sugar-dependent1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds [J]. Plant Cell, 2006, 18: 665-675.
- [23] LU J, XU Y, WANG J, et al. The role of triacylglycerol in plant stress response[J]. Plants, 2020, 9: 472.
- [24] EL-GEBALI S, MISTRY J, BATEMAN A, et al. The Pfam protein families database in 2019 [J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47: D427-D432.
- [25] KONG Y, CHEN S, YANG Y, et al. ABA-insensitive (ABI) 4 and ABI5 synergistically regulate DGAT1 expression in *Arabidopsis* seedlings under stress[J]. FEBS Letters, 2013, 587: 3076-3082.
- [26] 石广成, 杨万明, 杜维俊, 等. 大豆耐盐种质的筛选及其耐盐生理特性分析[J/OL]. 生物技术通报: 1-10 [2021-12-30]. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0843. (SHI G C, YANG W M, DU W J, et al. Screening of salt-tolerant soybean germplasm and analysis of physiological characteristics of its salt tolerance[J]. Biotechnological Bulletin: 1-10 [2021-12-30]. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0843.)
- [27] BELAMKAR V, WEEKS N T, BHARTI A K, et al. Comprehensive characterization and RNA-Seq profiling of the HD-Zip transcription factor family in soybean (*Glycine max*) during dehydration and salt stress [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 950-974.
- [28] 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: 1194-1202.
- [29] LESCOT M, THIJS G, MARCHAL K, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30: 325-327.
- [30] SUN L, SONG G S, GUO W J, et al. Dynamic changes in genome-wide Histone 3 Lysine 27 trimethylation and gene expression of soybean roots in response to salt stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 1031.
- [31] HERNANDEZ M L, WHITEHEAD L, H E Z, et al. A cytosolic acyltransferase contributes to triacylglycerol synthesis in sucrose-rescued *Arabidopsis* seed oil catabolism mutants [J]. Plant Physiology, 2012, 160(1): 215-225.
- [32] 师立松, 赵璇, 付雅丽, 等. 大豆 GAPDH 家族基因生物信息学及其逆境组织表达分析[J]. 大豆科学, 2021, 40(3): 299-308. (SHI L S, ZHAO X, FU Y L, et al. Bioinformatics and tissue expression analysis of GAPDH family genes in soybean[J]. Soybean Science, 2021, 40(3): 299-308.)
- [33] ZENG A L, CHEN P Y, KORTH K L, et al. RNA sequencing analysis of salt tolerance in soybean (*Glycine max*) [J]. Genomics, 2019, 111(4): 629-635.