

刘 筠,郭 毅,李效雄,等. 黑果枸杞 SPL 转录因子家族成员鉴定与生物信息学分析[J]. 江苏农业学报,2024,40(11):2001-2012.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.11.003

黑果枸杞 SPL 转录因子家族成员鉴定与生物信息学分析

刘 筠¹, 郭 毅², 李效雄³, 胡晓桐¹, 马 瑞¹, 杜 雨¹, 贾西贝¹, 柳 迪¹, 马彦军¹
(1.甘肃农业大学林学院,甘肃 兰州 730070; 2.甘肃林业职业技术学院,甘肃 天水 741020; 3.兰州资源环境职业技术大学,甘肃 兰州 730030)

摘要: SPL(SQUAMOSA promoter-binding protein-like)家族成员参与植物的生长发育和胁迫响应,为探究黑果枸杞 SPL 家族基因在盐胁迫下的耐盐分子机制,本研究对其基因家族成员进行了鉴定和生物信息学分析。结果表明,从黑果枸杞转录组数据中共筛选出 20 个 SPL 基因家族成员,分为 8 个亚家族,蛋白质亚细胞定位预测结果显示 SPL 蛋白主要定位于细胞核,20 个 SPL 蛋白均具有 SBP 保守结构域。黑果枸杞 SPL 家族蛋白质相对分子量为 15 296.08~130 310.8;等电点为 5.64~9.65;总原子数为 2 106~18 214;氨基酸数量为 133~1 176 aa;脂溶指数为 46.35~87.53;均为亲水性蛋白质和不稳定蛋白质。黑果枸杞 SPL 家族蛋白质结构分析结果表明,无规则卷曲和 α -螺旋占比较大。表达模式分析结果表明,在 NaCl 胁迫下不同器官中黑果枸杞 SPL 家族基因具有不同的表达趋势,*LrSPL9* 在根和叶中均为高表达。该研究结果可为黑果枸杞 SPL 基因家族成员盐胁迫响应方面的进一步研究提供参考。

关键词: 黑果枸杞; NaCl 胁迫; SPL 转录因子; 生物信息学分析

中图分类号: S722.3⁺6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)11-2001-12

Identification and bioinformatics analysis of SPL transcription factor family members in *Lycium ruthenicum*

LIU Yun¹, GUO Yi², LI Xiaoxiong³, HU Xiaotong¹, MA Rui¹, DU Yu¹, JIA Xibei¹, LIU Di¹, MA Yanjun¹
(1.College of Forestry, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2.Gansu Forestry Polytechnic, Tianshui 741020, China; 3.Lanzhou Resources & Environment Voc-Tech University, Lanzhou 730030, China)

Abstract: The SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL) family members are involved in plant growth and development and stress response. To investigate the salt tolerance molecular mechanism of *Lycium ruthenicum* SPL family genes under salt stress, the gene family members were identified and analyzed by bioinformatics. The results showed that 20 SPL family members were screened from transcriptome data of *Lycium ruthenicum*, and they were divided into eight subfamilies. The results of protein subcellular localization prediction showed that SPL proteins were mainly located in the nucleus, and 20 SPL proteins had SBP conserved domains. The relative molecular weight of SPL family proteins in *Lycium ruthenicum* was 15 296.08–130 310.8. The isoelectric point was 5.64–9.65, the total number of atoms was 2 106–18 214, the number of amino acids was 133–1 176 aa, and the lipid solubility index was 46.35–87.53. All of them were hydrophilic proteins and unstable proteins. The results of protein

structure analysis of SPL family in *Lycium ruthenicum* showed that random coil and α -helix accounted for a large proportion. The results of expression pattern analysis showed that the SPL family genes of *Lycium ruthenicum* had different expression trends in different organs under NaCl stress, and *LrSPL9* was highly expressed in roots and leaves. The results of this study can provide a reference for further research on salt stress response of SPL gene family members in *Lycium ruthenicum*.

收稿日期:2023-12-07

基金项目:甘肃省高校产业支撑计划项目(2023CYZC-46);兰州资源环境职业技术大学重点研究项目(X2022ZD-05);兰州市科技计划项目(2022-2-22)

作者简介:刘 筠(1995-),女,甘肃礼县人,硕士,研究方向为林木遗传育种。(E-mail)1223318211@qq.com

通讯作者:郭 毅,(E-mail)465092169@qq.com

Key words: *Lycium ruthenicum*; NaCl stress; SPL transcription factor; bioinformatics analysis

SPL (SQUAMOSA promoter-binding protein-like) 是一类广泛存在于植物中的重要的特异性转录因子,其蛋白质均具有 SBP 结构域^[1-2]。SPL 转录因子最初是在金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 中发现并由此得名^[3], SPL 在植物生长发育过程中参与花的发育及调控、根的发育、非生物与生物的胁迫应答^[4-5]。例如在盐胁迫或干旱胁迫下 SPL 家族成员会通过调节基因参与信号转导的丰度、脯氨酸合成和花青素代谢等来响应盐胁迫或干旱胁迫^[2]。研究人员在对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的研究中发现,沉默 *miR156* 靶向的 *SPL2*、*SPL9*、*SPL11* 基因,可增强拟南芥遭受高温胁迫、盐胁迫和干旱胁迫后的恢复能力^[6];水稻 (*Oryza sativa*) 中 *miR156* 靶向调节 *SPL* 基因,可增强水稻遭受盐胁迫、干旱胁迫后的恢复能力。白桦 (*Betula platyphylla*) 中 *BpSPL6* 基因转至拟南芥后进行盐胁迫和干旱胁迫试验^[7],结果发现胁迫发生后, *BpSPL6* 基因启动子驱动的 *GUS* 基因表达量有所下降。铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 中 *DoSTM3* 基因在 NaCl 胁迫下其相对表达水平与对照组相比显著降低^[8],推测 *SPL* 基因可能参与植物盐胁迫和干旱胁迫的响应。

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum*) 为茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium*) 多年生落叶小灌木。因果实中含有丰富的花青素、维生素、蔗糖和脂肪等^[9],并且可广泛应用于医药、纺织、食品等领域,在植物中有“软黄金”的美称^[10]。它还是中国盐碱地区和荒漠地区的重要建群树^[11-12]。但是现在关于黑果枸杞耐盐基因的相关报道相对较少,所以研究其耐盐分子机理对于人工栽培和良种选育具有现实意义。

目前已从拟南芥^[6]、水稻^[13]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[14]、玉米 (*Zea mays*)^[15]、番茄 (*Solanum lycopersicum*)^[16]、圆齿野鸦椿 (*Euscaphis konishii*)^[17]、红花 (*Carthamus tinctorius*)^[18]、芥蓝 (*Brassica oleracea* var.)^[19]、马尾松 (*Pinus massoniana*)^[20] 和山羊草 (*Aegilops tauschii*)^[21] 等多种植物中鉴定出 SPL 转录因子家族基因,但在黑果枸杞中尚未有 *SPL* 基因的相关研究报道。本研究基于不同浓度 NaCl 在不同胁迫时间处理下的黑果枸杞转录组数据,通过生物信息学方法系统鉴定黑果枸杞 *SPL* 基因家族成员,并分析其编码的蛋白质理化性质、亚细胞定位、保守结构域、蛋白质结构及系统进化树及表达模式,为深入研究 *SPL* 基因

在黑果枸杞抗盐胁迫方面的作用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用植物材料是保存于甘肃农业大学林学院组培实验室的黑果枸杞组培苗,组培苗培养条件及培养基配方见表 1。在配置好的培养基中快速繁殖黑果枸杞组培苗,14 d 后选取生长健壮、长势相对一致的黑果枸杞组培苗炼苗 5 d,然后将其移栽到配置好的 1/2 Hoagland 营养液 (pH 为 5.7) 中再培养 14 d,之后将其移入 1/2 Hoagland 营养液中进行盐胁迫 (NaCl) 处理^[22-23]。盐胁迫处理方式有 3 种,分别是不加 NaCl、加入 50 mmol/L NaCl、加入 250 mmol/L NaCl,分别在盐胁迫处理 0 h、1 h 和 12 h 进行取样^[24]。对相同的 NaCl 处理方式的样品分别进行 3 个生物学重复。经过 NaCl 处理后,选择不同方位生长良好的主根和完整的叶片取样,选取的测试样品重量约 0.1 g,采集样品后用液氮速冻并保存于 -80 ℃ 冰箱中备用。样品密封后送至上海欧易生物医学科技有限公司进行转录组测序。

表 1 黑果枸杞的组培条件与培养基配方

Table 1 The tissue culture conditions and medium formula of *Lycium ruthenicum*

组培条件		培养基配方	
项目	水平	项目	水平
光照时间 (h)	16	1/2 MS 培养基 (g/L)	2.47
光照度 (lx)	700	琼脂 (g/L)	5
昼/夜温度 (℃)	22±2/20±2	蔗糖 (g/L)	20
相对湿度 (%)	65	NAA (mg/L)	0.2
pH	5.7	IBA (mg/L)	0.2

1.2 生物信息学分析

1.2.1 黑果枸杞 *SPL* 基因家族成员的鉴定 在 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 SPL 家族 (PF03110)^[21,25] 的隐马尔可夫模型文件,使用 TBtools 软件进行数据初筛,然后根据 SPL 家族蛋白质保守结构域 SBP,用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 在线软件和 SMART (<https://smart.embl.de/>) 在线软件再次筛选,最终得到黑果枸杞 *SPL* 基因家族成员。

1.2.2 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质亚细胞定位预测及理化性质分析 应用 WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 在线软件预测黑果枸杞 SPL 家族蛋白质亚细胞定位, 采用 Expasy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件对黑果枸杞 SPL 家族蛋白质理化性质和亲疏水性进行分析, 使用 SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) 在线软件预测黑果枸杞 SPL 家族蛋白质信号肽, 使用 ChiPlot (<https://www.chiplot.online/>) 在线软件绘制黑果枸杞 SPL 家族蛋白质亚细胞定位预测结果。

1.2.3 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质结构和保守结构域分析 利用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线软件进行黑果枸杞 SPL 家族蛋白质二级结构预测和分析, 采用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线软件分析黑果枸杞 SPL 家族蛋白质保守基序, 使用 TBtools 软件对黑果枸杞 SPL 蛋白的系统进化、保守结构域和保守基序进行数据可视化。

1.2.4 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质系统进化分析 在 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 数据库下载拟南芥 SPL 家族蛋白质数据, 在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库下载番茄 SPL 家族蛋白质数据和烟草 (*Nicotiana tabacum*) SPL 家族蛋白质数据, 利

用 MEGA-X 软件的 MUSCLE 工具进行黑果枸杞、番茄、烟草和拟南芥 SPL 蛋白的多序列比对, 然后使用 MEGA-X 软件最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统发育树, 并把 Bootstrap 参数设置为 1 000。使用 ChiPlot TVBOT (<https://www.chiplot.online/tvbot.html>)^[26] 在线软件绘制黑果枸杞、番茄、烟草和拟南芥 SPL 家族蛋白质的系统进化树。

1.2.5 黑果枸杞 SPL 基因家族成员的表达模式分析 根据软件^[27-28] 计算得到的 FPKM (Fragments per kilobase per million reads sequenced) 数据, 使用 ChiPlot 在线软件绘制黑果枸杞 SPL 基因家族成员在其根与叶中的表达模式以及黑果枸杞 SPL 基因响应盐胁迫的表达分析。

2 结果与分析

2.1 黑果枸杞 SPL 基因家族成员鉴定

黑果枸杞转录组数据在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) 的登录号为 SRR7700825^[29-31]。通过 SPL 家族的隐马尔可夫模型文件和 TBtools 软件初筛黑果枸杞 SPL 基因家族成员后, 在 NCBI Conserved Domains 和 SMART 上进一步去除无 SBP 保守结构域的氨基酸序列, 最终得到黑果枸杞 SPL 基因家族成员 20 个, 分别命名为 *LrSPL1* ~ *LrSPL20* (表 2)。

表 2 黑果枸杞 SPL 基因家族成员及编码的蛋白质理化性质

Table 2 The SPL gene family members and the physicochemical properties of their encoded proteins in *Lycium ruthenicum*

基因		编码的蛋白质						
名称	编号	相对分子量	等电点	不稳定指数	脂溶指数	亲水指数	总原子数	氨基酸序列长度 (aa)
<i>LrSPL1</i>	TRINITY_DN1255_c0_g1_i1_1	20 333.18	8.61	52.03	72.81	-0.867	2 846	178
<i>LrSPL2</i>	TRINITY_DN15150_c0_g1_i1_3	32 953.19	8.78	62.08	50.48	-0.954	4 489	290
<i>LrSPL3</i>	TRINITY_DN15841_c0_g1_i1_10	55 401.14	9.07	50.55	65.17	-0.510	7 663	507
<i>LrSPL4</i>	TRINITY_DN16713_c0_g1_i1_6	49 660.48	8.59	44.86	62.60	-0.587	6 855	450
<i>LrSPL5</i>	TRINITY_DN17487_c0_g1_i1_7	34 012.75	8.71	69.03	55.56	-0.671	4 653	311
<i>LrSPL6</i>	TRINITY_DN18187_c0_g1_i3_8	32 843.29	9.29	46.67	60.93	-0.687	4 539	291
<i>LrSPL7</i>	TRINITY_DN197_c0_g1_i1_3	38 936.95	9.21	50.32	54.45	-0.727	5 342	362
<i>LrSPL8</i>	TRINITY_DN23889_c0_g1_i2_5	47 607.20	9.11	52.03	56.37	-0.678	6 574	433
<i>LrSPL9</i>	TRINITY_DN24604_c0_g1_i3_10	109 745.30	5.64	58.92	80.81	-0.415	15 247	988
<i>LrSPL10</i>	TRINITY_DN24775_c0_g2_i9_2	130 310.83	6.53	46.93	87.53	-0.164	18 214	1 176
<i>LrSPL11</i>	TRINITY_DN24794_c0_g1_i4_4	86 517.53	6.55	52.40	76.18	-0.404	12 055	768
<i>LrSPL12</i>	TRINITY_DN24900_c1_g2_i2_5	112 204.41	6.74	50.41	83.12	-0.313	15 665	1 018
<i>LrSPL13</i>	TRINITY_DN24900_c1_g3_i2_5	108 478.74	8.02	43.97	82.14	-0.400	15 140	978
<i>LrSPL14</i>	TRINITY_DN25049_c2_g3_i1_1	15 738.58	8.80	78.27	46.35	-1.199	2 160	137
<i>LrSPL15</i>	TRINITY_DN27675_c0_g1_i7_7	79 657.47	6.16	52.60	76.37	-0.414	11 081	706

续表2 Continued2

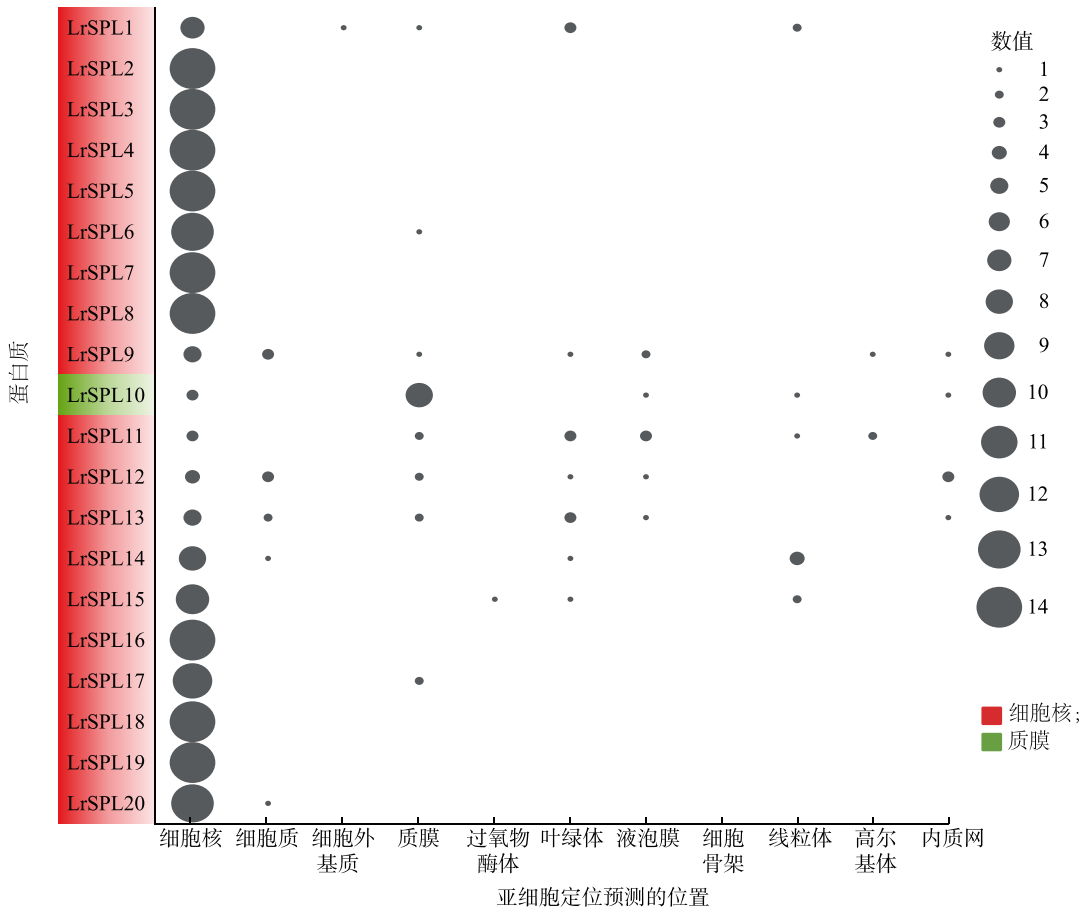
基因		编码的蛋白质						
名称	编号	相对分子量	等电点	不稳定指数	脂溶指数	亲水指数	总原子数	氨基酸序列长度(aa)
LrSPL16	TRINITY_DN3222_c0_g1_i1_9	31 681.73	8.14	66.46	52.45	-0.791	4 301	290
LrSPL17	TRINITY_DN4757_c0_g1_i1_2	15 296.08	9.65	66.07	54.96	-1.062	2 106	133
LrSPL18	TRINITY_DN6412_c0_g1_i1_10	44 550.45	8.83	54.93	71.53	-0.656	6 193	391
LrSPL19	TRINITY_DN9613_c0_g1_i1_4	53 717.50	8.15	61.14	67.75	-0.656	7 450	479
LrSPL20	TRINITY_DN9749_c0_g1_i1_8	43 369.97	9.11	55.57	69.39	-0.787	6 029	376

等电点大于 7.00 的为碱性蛋白质,小于 7.00 的为酸性蛋白质;不稳定指数大于 40.00 的为不稳定蛋白质,小于 40.00 的为稳定蛋白质;亲水指数大于 0 的是疏水性蛋白质,小于 0 的是亲水性蛋白质。

2.2 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质亚细胞定位及理化性质

从图 1 可知,黑果枸杞 SPL 家族蛋白质中除 LrSPL10 蛋白亚细胞定位于质膜,其余 19 个蛋白质亚细胞定位在细胞核,并且 20 条蛋白质氨基酸序列都不含有信号肽。从表 2 可见,黑果枸杞 SPL 蛋白相对分子量为 15 296.08~130 310.8;等电点为 5.64~9.65,

除 LrSPL9、LrSPL10、LrSPL11、LrSPL12、LrSPL15 蛋白之外,其余 15 个 LrSPL 蛋白的等电点都大于 7.0,说明黑果枸杞 SPL 家族蛋白质大多数富含碱性氨基酸;不稳定系数为 43.97~78.27,均为不稳定蛋白质;脂溶指数为 46.35~87.53;亲水指数为 -1.199~-0.164,全部是亲水性蛋白质;总原子数为 2 106~18 214;氨基酸个数为 133~1 176 aa。



数值为蛋白质亚细胞定位预测网站(WoLF PSORT)中的得分。

图1 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质亚细胞定位

Fig.1 Subcellular location of SPL family proteins in *Lycium ruthenicum*

ExPASy-ProtScale 在线软件分析黑果枸杞 SPL 家族蛋白质的亲水性和疏水性,结果如图 2 所示, LrSPL1 最高值为 2.456, 在 113 位;最低值为 -3.322, 在 152 位。LrSPL2 最高值为 1.767, 在 192 位;最低值为 -3.989, 在 232 位。LrSPL3 最高值为 1.233, 在 362 位;最低值为 -3.600, 在 226 位。LrSPL4 最高值为 2.244, 在 150 位;最低值为 -3.356, 在 244 位。LrSPL5 最高值为 1.789, 在 23 位;最低值为 -3.744, 在 96 位。LrSPL6 最高值为 1.467, 在 243 位;最低值为 -3.600, 在 205 位。LrSPL7 最高值为 1.667, 在 103 位;最低值为 -3.422, 在 142 位。LrSPL8 最高值为 1.678, 在 186 位;最低值为 -3.356, 在 227 位。LrSPL9 最高值为 3.311, 在 961 位;最低值为 -3.578, 在 210 位。LrSPL10 最高值为 3.344, 在 1149 位;最低值为 -3.544, 在 215 位。LrSPL11 最高值为 2.522, 在 344 位;最低值为 -4.067, 在 193 位。LrSPL12 最高值为 3.344, 在 991 位;最低值为 -3.544, 在 215 位。LrSPL13 最高值为 3.311, 在 951 位;最低值为 -3.611, 在 223 位。LrSPL14 最高值为 2.544, 在 87 位;最低值为 -3.544, 在 127 位。LrSPL15 最高值为 2.522, 在 374 位;最低值为 -4.067, 在 193 位。LrSPL16 最高值为 1.667, 在 38 位;最低值为 -3.422, 在 77 位。LrSPL17 最高值为 1.967, 在 32 位;最低值为 -3.544, 在 71 位。LrSPL18 最高值为 1.778, 在 92 位;最低值为 -3.633, 在 278 位。LrSPL19 最高值为 2.122, 在 242 位;最低值为 -3.633, 在 281。LrSPL20 最高值为 1.678, 在 268 位;最低值为 -3.633, 在 176 位。由此可见,20 条 LrSPL 蛋白氨基酸序列均存在明确的亲水区域和疏水区域,并且亲水区域多于疏水区域,表明 LrSPL 家族蛋白质均为亲水性蛋白质。

2.3 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质结构和保守结构域

LrSPL 蛋白质二级结构预测和分析结果(表 3、图 3)表明,20 个蛋白质均含有 α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲和延伸链。在 LrSPL 家族蛋白质中 α -螺旋分布占比 11.00%~48.91%, β -转角分布占比 0.75%~8.43%,无规则卷曲分布占比 37.23%~70.72%,延伸链分布占比 7.30%~18.21%,其中无规则卷曲> α -螺旋>延伸链> β -转角的 LrSPL 蛋白最多,有 17 个,所占比例为

85.00%;2 个 LrSPL 蛋白二级结构表现为无规则卷曲>延伸链> α -螺旋> β -转角,比例是 10.00%;1 个 LrSPL 蛋白二级结构表现为 α -螺旋>无规则卷曲>延伸链> β -转角,比例是 5.00%。LrSPL 蛋白空间结构的不同决定了蛋白质功能的差异,为后续黑果枸杞 SPL 家族的蛋白质研究提供参考。

黑果枸杞 20 个 LrSPL 蛋白氨基酸序列中均含有 1 个 SBP 结构域;其中 LrSPL9、LrSPL10、LrSPL12 和 LrSPL13 还分别含有 1 个 Ank_2 superfamily 结构域(图 4B)。MEME 在线软件对 LrSPL 家族蛋白质的分析结果显示,LrSPL 蛋白共包含 5 个保守基序,分别为 motif 1、motif 2、motif 3、motif 4 和 motif 5,其中含 5 个 motif 的 LrSPL 蛋白有 4 个,含 4 个 motif 的 LrSPL 蛋白有 2 个,含 3 个 motif 的 LrSPL 蛋白有 13 个,含 2 个 motif 的 LrSPL 蛋白有 1 个,除 LrSPL17,其余蛋白质均含 motif 1、motif 3 和 motif 4(图 4C)。由此推测,motif 1、motif 3 和 motif 4 相比其他基序的保守性较高,与 LrSPL 家族蛋白质结构域的保守性基本一致。

2.4 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质的系统进化

为了更全面地了解黑果枸杞 SPL 家族蛋白质的系统进化关系,将其 20 个 SPL 蛋白,番茄的 29 个 SPL 蛋白,烟草的 13 个 SPL 蛋白和拟南芥的 16 个 SPL 蛋白,共 78 个 SPL 蛋白构建系统进化树(图 5)。根据 4 种植物的 SPL 家族蛋白质系统进化树可知,黑果枸杞 SPL 家族成员可分为 8 个亚家族,黑果枸杞中存在 3 个同源基因对。在 SPL 家族蛋白质系统进化树的 78 个成员中,第 I 亚家族 LrSPL4 与烟草 Nt59156 的亲缘关系最近,LrSPL8 与番茄 SI010321004 的亲缘关系最近;第 II 亚家族 LrSPL7 与番茄 SI004249164 的亲缘关系最近,LrSPL16 与烟草 Nt59145 的亲缘关系最近;第 III 亚家族 LrSPL3、LrSPL6 与番茄 SI004252249、SI025884439 的亲缘关系近,LrSPL18 和 LrSPL20 与拟南芥 At1G69170 的亲缘关系最近,LrSPL19 与番茄 SI004239031 的亲缘关系最近,LrSPL5 与烟草 Nt59148 的亲缘关系近;第 IV 亚家族 LrSPL10、LrSPL12、LrSPL13 与番茄 SI004239889 的亲缘关系近,LrSPL9 与烟草 Nt59149 的亲缘关系近;第 V 亚家族,LrSPL2 与番茄 SI004229775 的亲缘关系最近;第 VI 亚家族 LrSPL1 与烟草 Nt59154、Nt59153 的亲缘关系近,

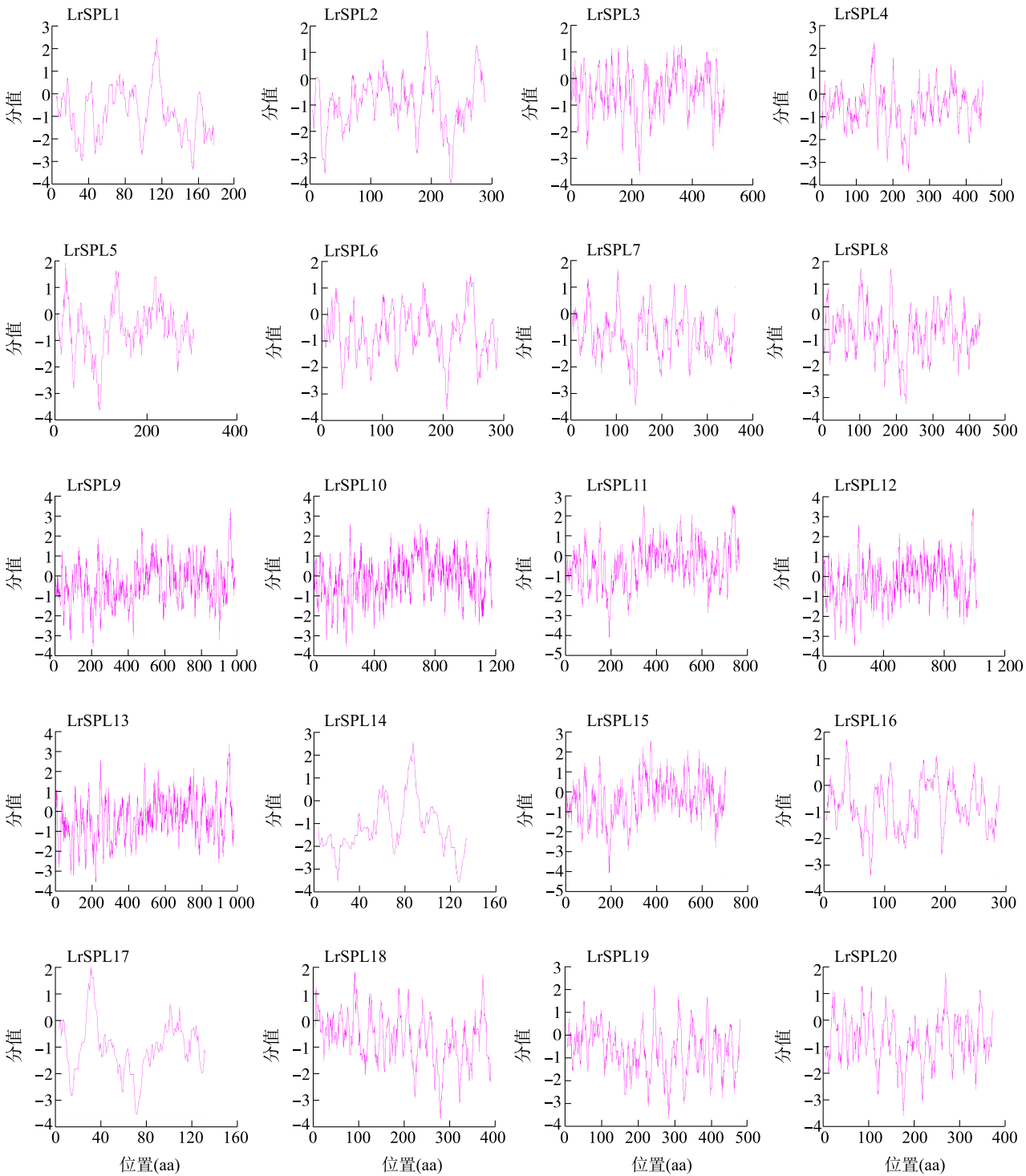


图 2 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质的亲疏水性
Fig.2 Hydrophilicity and hydrophobicity of SPL family proteins in *Lycium ruthenicum*

LrSPL17 与番茄 SI004243367 的亲缘关系最近;第Ⅶ亚家族 LrSPL14 与烟草 Nt59157 的亲缘关系最近;第Ⅷ亚家族 LrSPL11、LrSPL15 与番茄 SI019070792、SI019070794、SI010323003 的亲缘关系近。根据以

上结果,黑果枸杞 SPL 家族蛋白质与番茄 SPL 家族蛋白质亲缘关系最近,其次是烟草。因此推测 Lr-SPL 家族蛋白质具有多样性,而亲缘关系较近的蛋白质可能还具有相似或相近的生物学功能。

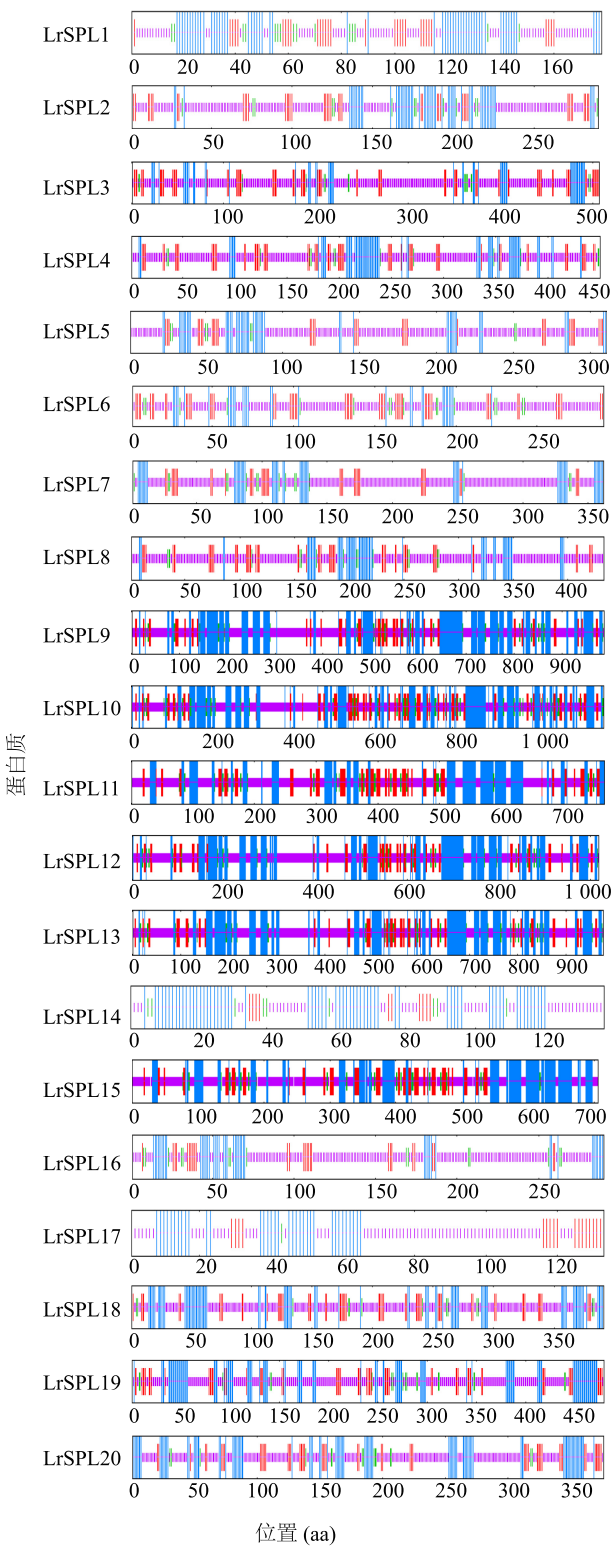
表 3 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质二级结构

Table 3 Secondary structure of SPL family proteins in *Lycium ruthenicum*

蛋白质	α -螺旋 (%)	β -转角 (%)	无规则卷曲 (%)	延伸链 (%)
LrSPL1	31.46	8.43	42.13	17.98
LrSPL2	19.31	4.48	61.03	15.17
LrSPL3	12.03	3.16	68.24	16.57
LrSPL4	17.33	2.89	64.89	14.89
LrSPL5	16.08	2.57	70.42	10.93
LrSPL6	11.00	5.50	65.29	18.21
LrSPL7	14.64	4.70	70.72	9.94
LrSPL8	14.78	3.46	68.59	13.16
LrSPL9	36.03	4.25	48.00	11.64
LrSPL10	33.93	6.21	44.73	15.14
LrSPL11	28.78	5.34	49.35	16.54
LrSPL12	34.18	4.13	49.80	11.89
LrSPL13	33.64	4.91	49.49	11.96
LrSPL14	48.91	6.57	37.23	7.30
LrSPL15	32.01	5.24	47.73	15.01
LrSPL16	15.86	5.17	69.66	9.31
LrSPL17	26.32	0.75	60.15	12.78
LrSPL18	22.76	3.32	58.82	15.09
LrSPL19	24.84	3.97	57.83	13.36
LrSPL20	24.73	3.99	57.45	13.83

2.5 黑果枸杞 SPL 基因家族成员在盐胁迫下的表达模式

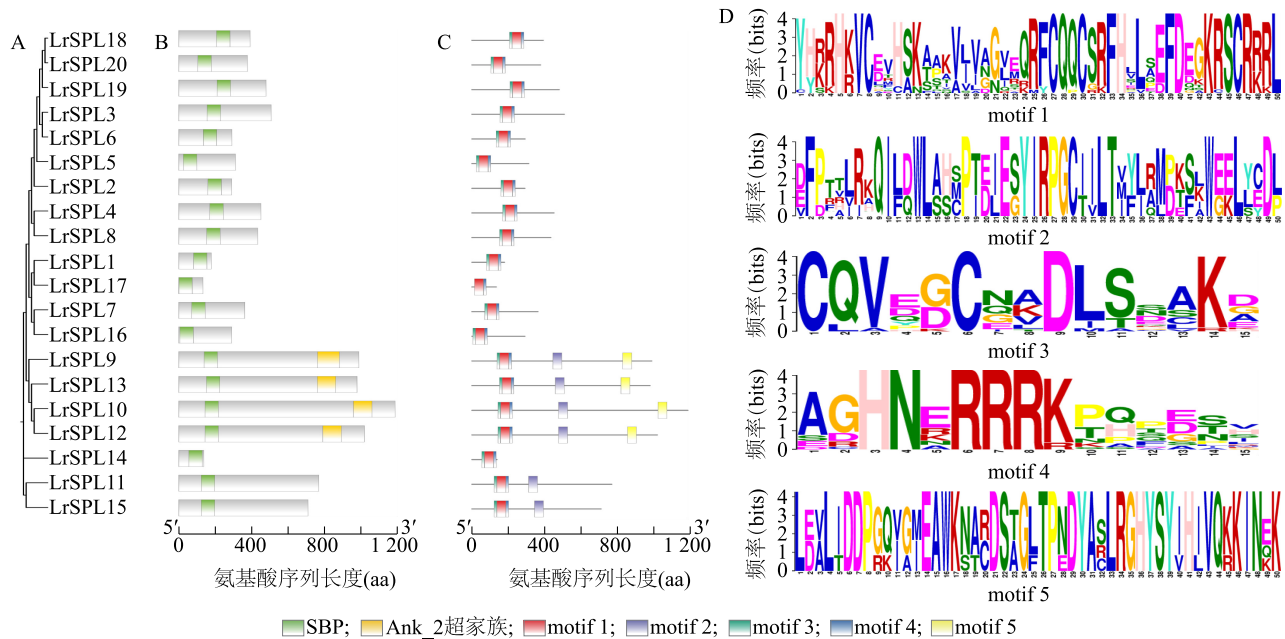
为初步探索黑果枸杞 SPL 基因的功能,通过不同浓度 NaCl、不同胁迫时间处理,研究 20 个 *LrSPL* 基因在黑果枸杞根与叶中的表达(图 6)。结果表明,在盐胁迫下,不同 *LrSPL* 基因在不同器官中的表达量存在差异,并且 SPL 基因在黑果枸杞根中比在叶中更活跃。其中 *LrSPL20* 在根部和叶片的表达量较低,而 *LrSPL9* 在根部和叶片的表达量都较高,*LrSPL1*、*LrSPL2*、*LrSPL10*、*LrSPL12*、*LrSPL14* 和 *LrSPL17* 在根部下调,叶片上调;*LrSPL3*、*LrSPL4*、*LrSPL5*、*LrSPL6*、*LrSPL8*、*LrSPL9*、*LrSPL11*、*LrSPL15* 和 *LrSPL19* 在根部上调,叶片下调。*LrSPL1*、*LrSPL2* 和 *LrSPL5* 在 NaCl 浓度为 50 mmol/L,胁迫时间为 1 h 和 12 h 时(L50_1、L50_12),在叶片的表达量与对照(L0)相比均呈上升趋势;NaCl 浓度为 250 mmol/L,



蓝色表示 α -螺旋,红色表示延伸链,绿色表示 β -转角,紫色表示无规则卷曲。

图 3 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质二级结构中元件分布

Fig.3 Element distribution of secondary structure of SPL family proteins in *Lycium ruthenicum*



A: LrSPL 蛋白系统进化树; B: LrSPL 家族蛋白质保守结构域; C: MEME 预测的 LrSPL 家族蛋白质保守基序; D: MEME 预测的 LrSPL 家族蛋白质的 5 个保守位点 LOGO 图。

图 4 黑果枸杞 SPL 家族蛋白质氨基酸序列结构分析

Fig.4 Amino acid sequence structure analysis of SPL family proteins in *Lycium ruthenicum*

胁迫时间为 1 h 和 12 h 时 (L250_1、L250_12), 在叶片的表达量呈下降趋势; *LrSPL9*、*LrSPL19* 和 *LrSPL20* 在 NaCl 浓度为 50 mmol/L, 胁迫时间为 1 h 和 12 h 时 (R50_1、R50_12), 在根部的表达量与对照 (R0) 相比均呈上升趋势; NaCl 浓度为 250 mmol/L, 胁迫时间为 1 h 和 12 h 时 (R250_1、R250_12), 在根部的表达量与对照相比也呈上升趋势。由此推测 *LrSPL1*、*LrSPL2*、*LrSPL5*、*LrSPL9*、*LrSPL19*、*LrSPL20* 在响应盐胁迫的过程中发挥调控作用。

3 讨论

SPL 转录因子是植物中特有的重要转录因子^[32], 但是在植物基因家族的鉴定与生物信息学分析中 SPL 家族的研究相对较少。目前已在拟南芥、水稻、玉米、番茄、圆齿野鸭椿、红花、芥蓝、马尾松、山羊草、小麦^[25]、桂花 (*Osmanthus fragrans*)^[33]、甜橙 (*Citrus sinensis*)^[34] 和甘薯 (*Dioscorea esculenta*)^[35] 等不同植物中鉴定出 SPL 基因家族成员, 但在不同植物中 SPL 基因家族的成员数量存在差异。本研究通过生物信息学方法鉴定得到 20 个黑果枸杞 SPL 基因家族成员, 而拟南芥有 16 个 SPL 基因, 水稻有 19 个 SPL

基因^[36], 小麦有 56 个 SPL 基因, 番茄有 29 个 SPL 基因, 圆齿野鸭椿有 29 个 SPL 基因, 红花有 21 个 SPL 基因, 芥蓝有 31 个 SPL 基因, 马尾松有 11 个 SPL 基因, 山羊草有 18 个 SPL 基因, 桂花有 29 个 SPL 基因, 甜橙有 15 个 SPL 基因, 甘薯有 30 个 SPL 基因。SPL 基因家族成员在已完成测序的植物与黑果枸杞的鉴定结果中数量未出现较大差别。

本研究中 LrSPL 蛋白家族中多数成员的等电点大于 7.0, 这与大部分植物 SPL 蛋白家族成员的等电点大于 7.0 的情况基本一致^[37-39]。通过黑果枸杞 SPL 蛋白保守基序分析结果可知, 除了 *LrSPL17* 外, 其余 19 个蛋白质均含 motif 1、motif 3 和 motif 4。这与圆齿野鸭椿、芥蓝、马尾松、山羊草、甜橙、拟南芥与番茄^[35] 等 SPL 蛋白均是 motif 1 在 SPL 家族蛋白中占多数的情况类似。根据蛋白质系统进化树分析结果可知, LrSPL 家族蛋白质可以分为 8 个亚族。*LrSPL18* 和 *LrSPL20* 聚类于第Ⅲ亚家族的同一支中, *LrSPL10* 和 *LrSPL12* 聚类于第Ⅳ亚家族的同一支中, *LrSPL11* 和 *LrSPL15* 聚类于第Ⅷ亚家族的同一支中。聚类在同一分支的蛋白质其保守结构域的组成、排列顺序及位置基本相同, 说明 LrSPL 的分类结果进一步得到了保守基序的支持, 也意味着

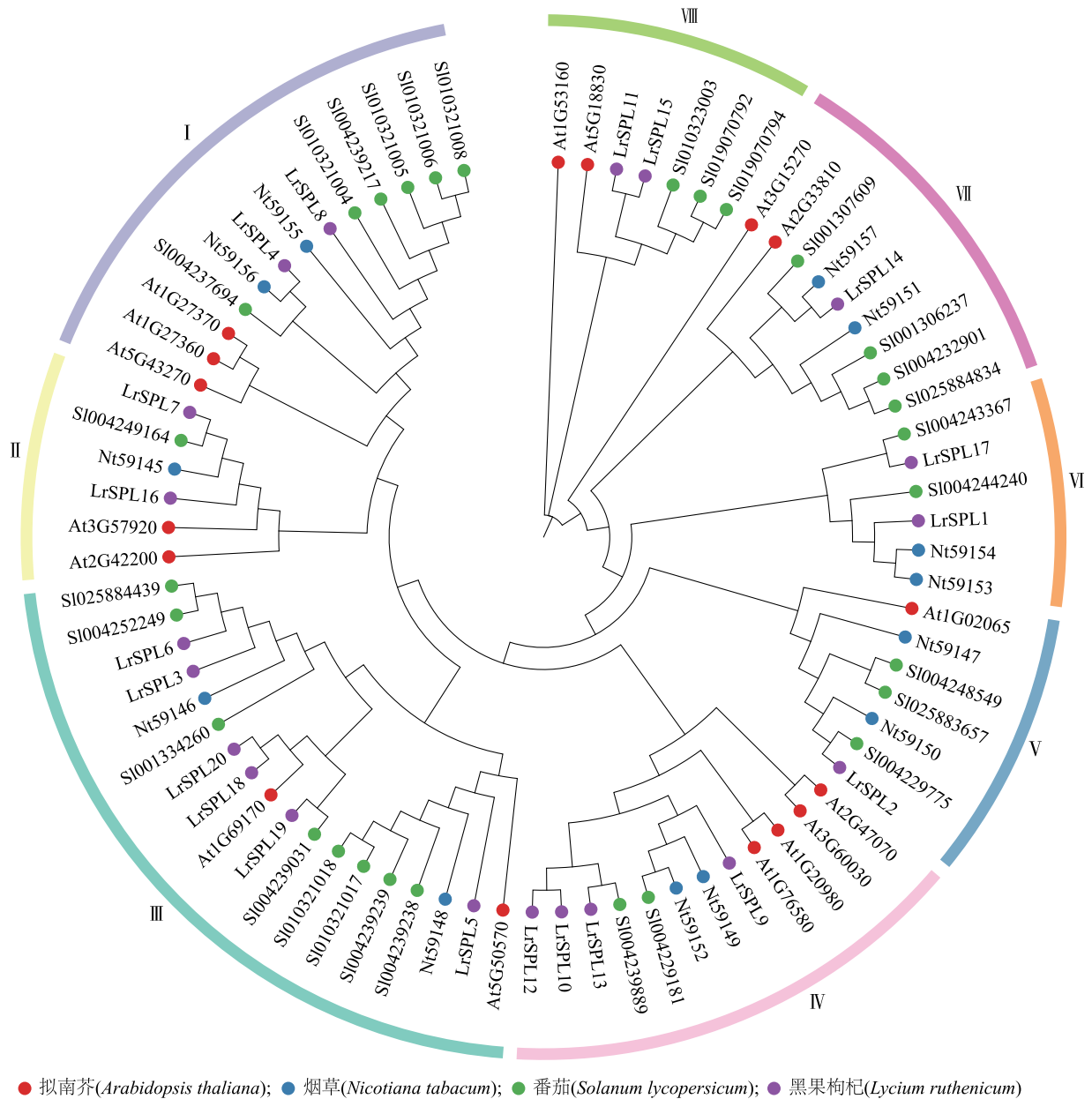


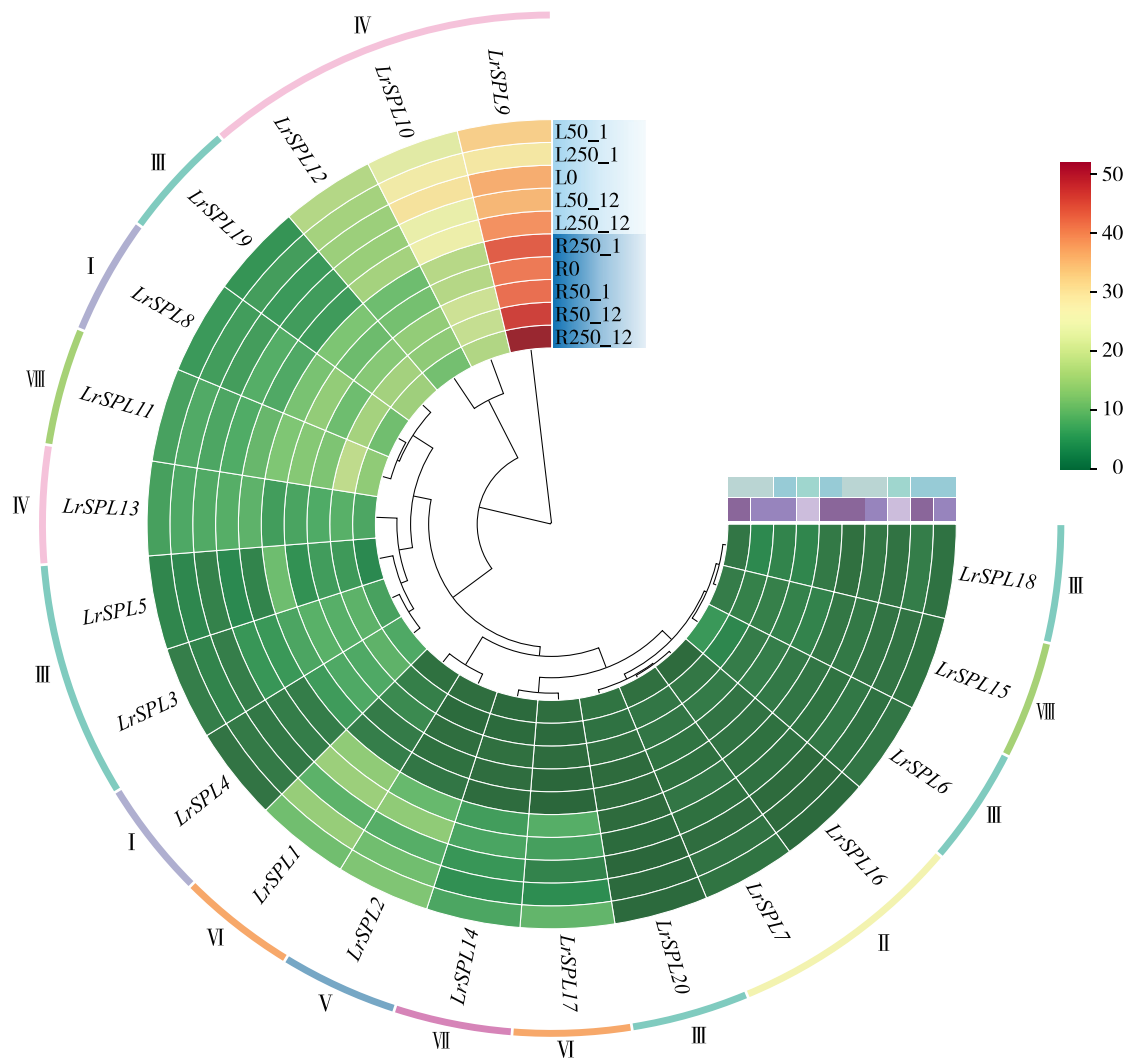
图5 黑果枸杞、番茄、烟草和拟南芥 SPL 家族蛋白质系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of SPL family proteins in *Lycium ruthenicum*, *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana*

LrSPL 亚族成员间序列的高度保守性。所有亚族中的黑果枸杞 SPL 家族成员与番茄 SPL 家族成员相聚较近,表明黑果枸杞与番茄进化距离比拟南芥、烟草更近。

本研究结果表明,SPL 转录因子在植物的生长发育及胁迫应答等过程中具备调控作用^[32]。本研究鉴定到 20 个黑果枸杞 SPL 家族蛋白质均为亲水性蛋白质,在马尾松、圆齿野鸦椿、铁皮石斛等

植物中,它们的 SPL 蛋白也均是亲水性蛋白质,而亲水性蛋白质对植物抵抗非生物胁迫有利^[40]。盐胁迫下,黑果枸杞根与叶的 LrSPL 表达模式分析结果显示,其在不同器官中的表达量存在明显差异,这与其他植物 SPL 基因家族成员的盐胁迫研究结果有相似之处^[35]。在不同浓度盐胁迫下 LrSPL1、LrSPL2 和 LrSPL5 在叶片的表达量,LrSPL9、LrSPL19 和 LrSPL20 在根部的表达量,与荣誉磊



L50_1 表示 NaCl 浓度为 50 mmol/L、胁迫时间为 1 h 时 *LrSPL* 基因在叶片的表达;L250_1 表示 NaCl 浓度为 250 mmol/L、胁迫时间为 1 h 时 *LrSPL* 基因在叶片的表达;L0 表示 NaCl 浓度为 0 mmol/L、胁迫时间为 0 h 时 *LrSPL* 基因在叶片的表达;L50_12 表示 NaCl 浓度为 50 mmol/L、胁迫时间为 12 h 时 *LrSPL* 基因在叶片的表达;L250_12 表示 NaCl 浓度为 250 mmol/L、胁迫时间为 12 h 时 *LrSPL* 基因在叶片的表达。R50_1 表示 NaCl 浓度为 50 mmol/L、胁迫时间为 1 h 时 *LrSPL* 基因在根部的表达;R250_1 表示 NaCl 浓度为 250 mmol/L、胁迫时间为 1 h 时 *LrSPL* 基因在根部的表达;R0 表示 NaCl 浓度为 0 mmol/L、胁迫时间为 0 h 时 *LrSPL* 基因在根部的表达;R50_12 表示 NaCl 浓度为 50 mmol/L、胁迫时间为 12 h 时 *LrSPL* 基因在根部的表达;R250_12 表示 NaCl 浓度为 250 mmol/L、胁迫时间为 12 h 时 *LrSPL* 基因在根部的表达。

图 6 盐胁迫下黑果枸杞 *SPL* 基因家族成员在其根与叶中的表达模式
Fig.6 Expression patterns of *SPL* gene family members in roots and leaves of *Lycium ruthenicum* under salt stress

等^[35]对拟南芥 *SPL* 基因家族成员在盐胁迫下的研究结果,杨乐等^[8]对铁皮石斛 *SPL* 基因家族成员在盐胁迫下的研究结果相似,推测它们可能在响应盐胁迫的过程中发挥着调控作用。*LrSPL* 基因的鉴定与分析结果为进一步研究黑果枸杞在盐胁迫方面的基因表达提供理论依据,为进一步研究此类基因是否具有盐胁迫应答能力以及转基因品种的获取提供参考。

4 结 论

在黑果枸杞转录组中共筛选出 20 个 *SPL* 基因,分为 8 个亚家族。蛋白质亚细胞定位预测中其家族成员主要定位于细胞核,蛋白质结构预测中 20 个蛋白质均含有 α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲和延伸链,蛋白质系统进化树显示在拟南芥、烟草和番茄这 3 种植物中,黑果枸杞 *SPL* 家族蛋白质与番茄 *SPL* 家

族蛋白质亲缘关系最近,其次是烟草。表达模式分析结果表明,*LrSPL20* 在根部和叶片中均为低表达,*LrSPL9* 在根部和叶片中均为高表达。*LrSPL9*、*LrSPL19* 和 *LrSPL20* 在 NaCl 不同浓度,不同胁迫时间下,与对照相比在根部的表达量均呈上升趋势;*LrSPL1*、*LrSPL2* 和 *LrSPL5* 在低浓度盐胁迫,不同胁迫时间下,与对照相比叶片表达量呈上升趋势,而高浓度盐胁迫下叶片表达量与对照相比呈下降趋势。由此推测 *LrSPL* 基因的功能可能与盐胁迫响应相关。本研究结果为黑果枸杞 *SPL* 基因家族成员的功能鉴定及后续黑果枸杞耐盐基因的进一步筛选提供了参考。

参考文献:

- [1] YAMASAKI K, KIGAWA T, INOUE M, et al. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of arabidopsis SBP-family transcription factors[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 337(1): 49-63.
- [2] 张 磊. SPL 转录因子研究进展[J]. *农业与技术*, 2022, 42(8): 25-27.
- [3] KLEIN J, SAEDLER H, HUIJSER P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*[J]. *Molecular & General Genetics*, 1996, 250(1): 7-16.
- [4] 张 丽. 烟草 *NtabSPL6-2* 和 *NtabSPL6-3* 基因的功能研究[D]. 西安:西北大学, 2019.
- [5] 吴 艳, 侯智红, 程 群, 等. SPL 转录因子的研究进展[J]. *大豆科学*, 2019, 38(2): 304-310.
- [6] CARDON G H, HÖHMANN S, NETTESHEIM K, et al. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition[J]. *The Plant Journal*, 1997, 12(2): 367-377.
- [7] 李 豆, 苏功博, 胡晓晴, 等. 白桦 *BpSPL6* 基因启动子的克隆及表达分析[J]. *北京林业大学学报*, 2022, 44(2): 1-10.
- [8] 杨 乐, 聂 聪, 龙小琴, 等. 铁皮石斛 SPL 膜结合 (STM) 转录因子的全基因组鉴定及表达分析[J]. *广西植物*, 2023, 43(6): 1041-1050.
- [9] 赵建华, 李浩霞, 尹 跃, 等. 枸杞酸性转化酶基因的克隆与表达[J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(5): 1140-1148.
- [10] 王 琴, 刘凤兰, 毛金梅, 等. ‘黑杞一号’与野生黑果枸杞的酚类物质分析[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(10): 1835-1841.
- [11] 郭有燕, 刘宏军, 孔东升, 等. 干旱胁迫对黑果枸杞幼苗光合特性的影响[J]. *西北植物学报*, 2016, 36(1): 124-130.
- [12] 张培通, 郭文琦, 李春宏. 枸杞在江苏沿海滩涂盐碱地的应用前景及实用栽培技术[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(3): 197-199.
- [13] MIURA K, IKEDA M, MATSUBARA A, et al. *OsSPL14* promotes panicle branching and higher grain productivity in rice[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(6): 545-549.
- [14] 刘 霞, 张 斌, 毛新国, 等. 小麦 *tae-MIR156* 前体基因的克隆及其靶基因 *TaSPL17* 多态性分析[J]. *遗传*, 2014, 36(6): 592-602.
- [15] HULTQUIST J F, DORWEILER J E. Feminized tassels of maize *mop1* and *ts1* mutants exhibit altered level of *miR156* and specific *SBP-box* genes[J]. *Planta*, 2008, 229(1): 99-113.
- [16] SALINAS M, XING S P, HÖHMANN S, et al. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato[J]. *Planta*, 2012, 35(6): 1171-1184.
- [17] 孙维红, 卢 玉, 刘钰园, 等. 圆齿野鸦椿 *SPL* 全基因组的鉴定及表达[J]. *亚热带农业研究*, 2024, 20(2): 117-126.
- [18] 宋梦瑶, 赵 乐, 董诚明, 等. 红花 *SPL* 基因家族全基因组鉴定及表达分析[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(19): 36-43.
- [19] 曾东琳, 唐为玲, 曾家晶, 等. 芥蓝 *SPL* 基因家族鉴定及表达分析[J]. *西北植物学报*, 2022, 42(3): 361-370.
- [20] 王春昱, 范付华. 马尾松 *SPL* 基因家族鉴定及其响应低磷胁迫的表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2023, 31(3): 509-517.
- [21] 杨紫贻, 米福贵, 唐 芳, 等. 山羊草 *SPL* 转录因子基因家族分析[J]. *中国草地学报*, 2021, 43(10): 9-17.
- [22] 杜 雨, 刘 筠, 胡晓桐, 等. 黑果枸杞 GRF 转录因子家族鉴定与生物信息学分析[J]. *草地学报*, 2022, 30(6): 1403-1413.
- [23] 贾西贝, 李效雄, 杜 雨, 等. 黑果枸杞 XTH 转录因子家族鉴定与生物信息学分析[J]. *草地学报*, 2023, 31(10): 2916-2924.
- [24] 马彦军, 段慧荣, 魏 佳, 等. NaCl 胁迫下黑果枸杞转录组测序分析[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(2): 100-109.
- [25] 贺金秋, 苗敬南, 马 超, 等. 小麦 *SPL* 家族基因在非生物胁迫下的表达分析[J]. *麦类作物学报*, 2023, 43(10): 1335-1343.
- [26] XIE J M, CHEN Y R, CAI G J, et al. Tree visualization by one table (tvBOT): a web application for visualizing, modifying and annotating phylogenetic trees[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): 587-592.
- [27] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nat Methods*, 2012, 9(4): 357-359.
- [28] ROBERTS A. Ambiguous fragment assignment for high-throughput sequencing experiments[M]. Berkeley: University of California, 2013.
- [29] MA Y J, DUAN H R, ZHANG F, et al. Transcriptomic analysis of *Lycium ruthenicum* Murr. during fruit ripening provides insight into structural and regulatory genes in the anthocyanin biosynthetic pathway[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208627.
- [30] THIKA R J, WEI J, MA R, et al. Identification and expression analysis of the *WRKY* gene family during different developmental stages in *Lycium ruthenicum* Murr. fruit[J]. *Peer J*, 2020, 8: e10207.
- [31] WEI J, THIKA R J, MA Y J, et al. Transcriptome-wide identification and analysis of the KT/HAK/KUP family in black goji under

- NaCl stress[J]. *Agronomy Journal*, 2022, 114(4): 2069-2080.
- [32] 葛奇, 席会鹏. 植物 SPL 转录因子研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2023, 51(23): 25-29, 53.
- [33] 吴秀怡, 田清尹, 杨秀莲, 等. 参与调控桂花花朵开放的 *SPL* 基因鉴定及表达分析[J]. *西北植物学报*, 2021, 41(11): 1801-1809.
- [34] 杨杰, 陈蓉, 胡文娟, 等. 甜橙 *SPL* 基因家族的鉴定及其在成花诱导中的表达分析[J]. *西北植物学报*, 2022, 42(1): 48-56.
- [35] 荣誉磊, 周志林, 赵冬兰, 等. 甘薯、番茄、拟南芥中 *SPL* 转录因子的生物信息学分析[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(20): 74-83.
- [36] 胡丽, 杨范敏, 陈薇兰, 等. 水稻 *SPL* 家族转录因子的生物学功能研究进展[J]. *中国水稻科学*, 2024, 38(3): 223-232.
- [37] 张晓红. 陆地棉开花相关基因的功能研究及调控分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [38] 刘闯. 18 个白桦 *SPL* 基因的鉴定及 *BpSPL8* 基因的功能分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.
- [39] 祁香宁. 猕猴桃 *SBP-box* 转录因子基因的鉴定、进化及其表达分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [40] 骆洋. 茶树花青素还原酶基因的原核表达[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.

(责任编辑: 黄克玲)