

三浅裂野牵牛植物防御素基因家族鉴定及表达分析

张洁¹, 李旭涛², 董静静²

(1. 晋中职业技术学院 生物工程系, 山西 晋中 030602; 2. 长治学院 生命科学系, 山西 长治 046011)

摘要:植物防御素普遍存在于植物中,是植物先天免疫的组成部分,具有抗真菌、细菌及抑制蛋白酶活性等作用,在植物生长发育、抗病、逆境胁迫应答中发挥重要作用。为了在甘薯中开展相关分子生物学研究及抗性分子育种,为植物防御素在抗菌类药剂生产研发、植物保护等方面开展相关研究工作奠定基础,对甘薯(*Ipomoea batatas*(L.)Lam.)近缘野生种三浅裂野牵牛(*Ipomoea trifida*)全基因组水平的植物防御素基因PDF家族成员进行鉴定和表达分析。结果表明,在其基因组中共鉴定到15个防御素蛋白,其等电点变化范围为7.56~9.30,表明这些蛋白质均呈弱碱性。染色体定位发现,这15个*ItfPDFs*基因不均匀分布于4条染色体上(Chr03、Chr06、Chr13和Chr14)。转录组数据分析表明,*ItfPDF14*在愈伤组织、根、茎、叶、花中均有表达,并且能够响应不同非生物胁迫,推测*ItfPDF14*可能在三浅裂野牵牛生长发育及非生物胁迫响应中发挥着重要功能。*ItfPDF11*、*ItfPDF13*、*ItfPDF14*和*ItfPDF15*可能参与调控三浅裂野牵牛的花芽发育。在进化过程中,基因片段复制可能是该基因家族成员扩张的重要方式。

关键词:三浅裂野牵牛;防御素基因;生物信息学;表达分析

中图分类号:Q7 文献标识码:A 文章编号:1002-2481(2024)06-0053-08

Identification and Expression Analysis of Plant Defensin Gene Family in *Ipomoea trifida*

ZHANG Jie¹, LI Xutao², DONG Jingjing²

(1. Department of Biotechnology, Jinzhong Vocational & Technical College, Jinzhong 030602, China;

2. Department of Life Sciences, Changzhi University, Changzhi 046011, China)

Abstract: Plant defensin is commonly found in plants, and it is the component of the innate immunity of plants, serving functions such as antifungal, antibacterial, and protease inhibition, and playing important roles in plant growth and development, disease resistance, and stress response. In order to provide a reference basis for molecular biology research and resistance breeding in sweet potatoes and lay a foundation for research and development of plant defensin the production of antimicrobial agents and plant protection, in this study, the members of the plant defensin gene(PDF) family was identified and analyzed at the genome-wide level in *Ipomoea trifida*, a species related to sweet potato(*I. batatas*(L.) Lam). The results showed that there were 15 plant defensin proteins in the genome and their isoelectric point ranged from 7.56 to 9.30, indicating that these proteins were alkaline. Chromosome localization analysis revealed that the 15 *ItfPDFs* genes were unevenly distributed across four chromosomes(Chr03, Chr06, Chr13, and Chr14). Based on transcription data, the expression of *ItfPDF* genes under different tissue types(callus-follower, callus-stem, flower, flower bud, leaf, root, and stem) was found and they could respond different abiotic stress, inferring that *ItfPDF* could play an important role in growth and development, and abiotic stress response of *Ipomoea trifida*. *ItfPDF11*, *ItfPDF13*, *ItfPDF14*, and *ItfPDF15* might also play roles in flower bud development of *Ipomoea trifida*. In the process of evolution, gene fragment replication could be an important mechanism for the members of the *ItfPDF* gene family.

Key words: *Ipomoea trifida*; defensin genes; bioinformatics; expression analysis

在自然界中,植物在生长发育过程中不断面临害虫和其他微生物的攻击,如真菌和细菌等病原体的侵袭。同时,植物也会受到恶劣环境的影响,如盐、热、干旱胁迫等。为了克服这些逆境胁迫,植物中已经建立了一套保护自身免受害虫、病原体、不

良环境攻击的复杂机制^[1]。此外,逆境胁迫下,植物体内还会产生许多防御因子,如聚乙炔、酚类、生物碱、萜类、过氧化氢、防御素和防御素相关蛋白^[2-3],进一步增强其抗逆能力。

植物防御素是一类具有强抗菌活性的短肽,具

收稿日期:2024-04-04

基金项目:山西省研究生教育创新项目(2020BY057)

作者简介:张洁(1981-),女,山西静乐人,讲师,博士,主要从事植物分子育种研究工作。

有 45~54 个氨基酸残基,由 8 个半胱氨酸残基形成,以稳定一个螺旋和 3 个 β -折叠的 $Cs\alpha\beta$ (Cysteine stabilized $\alpha\beta$ motif) 三维结构^[4]。该结构类似于昆虫和哺乳动物的防御肽,揭示了它们具有共同的起源。防御素主要作用于病原微生物的细胞膜上,与磷脂外侧结合,破坏细胞膜结构,改变膜的通透性,产生 Ca^{2+} 向内流动、 K^+ 向外流动和介质液化等现象^[5]。植物防御素普遍存在于植物体内,包括根、茎、叶、花、果实和种子等部位,在种子发芽和幼苗生长过程中起着重要的保护作用^[6-10],是植物先天免疫的组成部分,具有抗真菌、抗细菌或抑制蛋白酶活性等作用^[11-14]。此外,植物防御素也存在于不同的组织中,如气孔、木质部、薄壁细胞以及胞外区域^[15]。植物防御素在保护植物免受病原微生物和其他昆虫侵害方面发挥着重要作用,预计将在不久的将来成为提高作物生产力的重要手段,在抗菌类药物生产研发、植物保护、作物抗病性分子育种等领域具有极大的应用前景^[16]。

1990 年, COLILLA 等^[17]和 MENDEZ 等^[18]最早在小麦 (*Triticum turgidum*) 和大麦 (*Hordeum vulgare*) 胚乳中发现植物防御素,起初命名为 γ -thionine,后来发现其在序列和结构上与昆虫防御肽类似,最终命名为植物防御素。DEBEER 等^[19]从十字花科植物日冠花 (*Heliophila coronopifolia*) 中分离出 4 个具有同源性的防御素基因 (*Hc-AFP1-4*),并发现这些防御素基因对日冠花灰霉病 (*Botrytis cinerea*) 具有抵抗能力。许多植物中的防御素基因 (Plant defensin gene, PDF) 已被成功克隆,包括大蒜^[20]、甘蓝型油菜^[21]、萝卜^[22]等。研究表明,植物防御素参与植物的非生物胁迫响应^[23]。盐胁迫可诱导大蒜 *AsPDF1* 表达^[11],小麦防御素基因可响应冷胁迫诱导^[24]。LIU 等^[25]在异源四倍体油菜籽 (*Brassica napus*) 全基因组水平进行鉴定,共得到 37 个 PDFs 基因家族成员,并发现这些基因不同程度地响应各种营养胁迫 (硝酸盐限制、铵过量、饥饿、缺钾、镉毒性) 和盐胁迫,推测它们可能参与营养胁迫和盐胁迫响应。通过转基因技术,在受体植物中过量表达植物防御素基因,可以增强植物的抗逆性。如 LI 等^[22]在小麦中过量表达萝卜防御素基因 *RsAFP2*,提高了小麦对禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 和纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 的抗病性。防御素 *TAD1* 赋予了转基因小麦对白霉病 (Snow mold) 和赤霉病 (*Fusarium head blight*) 的抵抗能力^[24]。马铃薯中过量表达苜蓿防御素基因后,对大丽花轮枝

孢菌 (*Verticillium dahliae*) 的抗性提高^[26]。防御素基因在植物抗逆性中发挥重要作用,这为培育植物抗性品种提供了新方向和新途径。

甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 在我国种植面积广,但是干旱、盐、热胁迫等不良环境条件以及种植过程易感染各种真菌病、病毒病,严重影响其产量。同时甘薯六倍体的复杂遗传背景,使其分子生物学相关研究相对滞后。研究表明,三浅裂野牵牛 (*I. trifida*) 是甘薯的二倍体近缘野生种^[27-28],其基因组信息的挖掘将为甘薯抗性分子育种相关研究提供理论依据。目前,已在异源四倍体油菜籽^[25]、小麦^[29]、番茄^[30]、芸薹属 3 种植物^[31]等物种中开展了植物防御素基因家族成员的全基因组鉴定。本研究对三浅裂野牵牛中 *ItfPDFs* 基因家族进行分析,旨在为甘薯防御素基因的克隆和功能分析提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 三浅裂野牵牛防御素基因家族成员的鉴定

在密歇根州立大学甘薯资源库 (Sweetpotato Genomics Resource, <http://sweetpotato.plantbiology.msu.edu/>) 下载三浅裂野牵牛基因组数据。从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 中获得 PDF 保守结构域 (Gamma-thionin) 的隐马尔可夫模型文件 (Hidden Markov Models, HMM) PF00304,并使用 HMMER 3.0 软件筛选三浅裂野牵牛基因组,获得候选序列 (E -value > 0.05)。为了验证这些序列是否为 PDF 蛋白,利用 NCBI 在线工具 CD-search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 和 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析其保守结构域,根据是否存在 PDF 基因家族特有的保守结构域 (Gamma-thionin, PF00304),最终确定 *ItfPDFs* 基因家族成员。

1.2 ItfPDF 蛋白的理化性质分析

为了进一步研究 ItfPDFs 蛋白的理化性质,使用在线程序 ExPASy Proteomics Server (<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行理化性质预测分析,包括氨基酸数量 (Number of amino acids)、相对分子质量 (Molecular weight, MW) 以及等电点 (Protein isoelectric, pI) 等。

1.3 染色体定位分析

在甘薯资源库下载得到关于三浅裂野牵牛基因位置信息的 GFF 文件。利用上述 1.1 中确定的 *ItfPDFs* 基因家族成员的基因 ID 和 TBtools^[32] 软件

中的 Gene Location Visualize from GTF/GFF 工具进行染色体定位分析,获取 *ItfPDFs* 基因家族各成员的染色体位置信息,绘制出染色体定位图。

1.4 多序列比对和系统进化分析

在 TAIR 网站 (<http://www.arabidopsis.org>) 获取拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 防御素蛋白 (AtPDF) 的序列信息。使用 MEGA 7.0 软件进行 *ItfPDFs* 的多序列比对 (基于 Muscle 法), 使用 JalView 软件提取多序列比对结果, 选取包含特征结构域的等长序列, 提交至在线软件 Weblogo 进行保守结构域的可视化。通过计算分析、参数比对, 筛选得到 *ItfPDFs* 基因家族最适的 WAG 氨基酸替换模型, 并使用最大似然法 (Maximum likelihood method) 的 P-距离 (P-distance) 模型建立 *ItfPDFs* 和 AtPDFs 的系统进化树。校验参数 (Bootstrap) 取值为 1 000, 其他运行参数设置为默认值。使用 FigTree 软件对进化树进行处理。

1.5 保守基序分析和基因结构分析

使用 MEME 在线工具 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对 *ItfPDFs* 基因家族成员进行保守基序分析, 利用 TBtools^[32] 对 *ItfPDFs* 基因家族成员的基因结构进行分析, 使用 TBtools^[32] 软件的 Gene Structure View 工具对分析结果进行可视化。

1.6 表达模式分析

利用甘薯资源库下载得到三浅裂野牵牛的转录组数据, 通过 TBtools^[32] 软件的 HeatMap 工具绘制 *ItfPDFs* 基因家族在不同组织、非生物胁迫下的基因表达热图 (数据均为 FPKM 值经过 \log_2 处理)。

2 结果与分析

2.1 三浅裂野牵牛防御素基因家族成员的鉴定

使用 HMMER 3.0 软件筛选三浅裂野牵牛基因组, 共鉴定到 15 条候选 *ItfPDFs* 序列, 利用 NCBI 在线工具 CD-search 和 SMART 对这 15 条序列进行保守结构域分析, 结果表明 (图 1), 这 15 条序列都有 PDF 基因家族特有的 Gamma-thionin 保守结构域, 根据各成员在染色体上的相对位置, 将它们依次命名为 *ItfPDF1*~*ItfPDF15*。

从表 1 可以看出, 这 15 条 *ItfPDFs* 蛋白的氨基酸个数为 72~179 个, 其中 *ItfPDF1* 序列最短, *ItfPDF6* 序列最长; 各成员编码的氨基酸数目小于 100 的成员有 14 个, 占比 93.3%, 氨基酸数目在 100~200 个的成员有 1 个, 占比 6.7%。三浅裂野牵牛防御素基因家族蛋白分子质量相差较大, 介于

7 898.32~19 678.64 u, 其中 *ItfPDF6* 最大, *ItfPDF15* 最小; 等电点变化范围为 7.56~9.30, *ItfPDF4* 最小, *ItfPDF5* 最大。

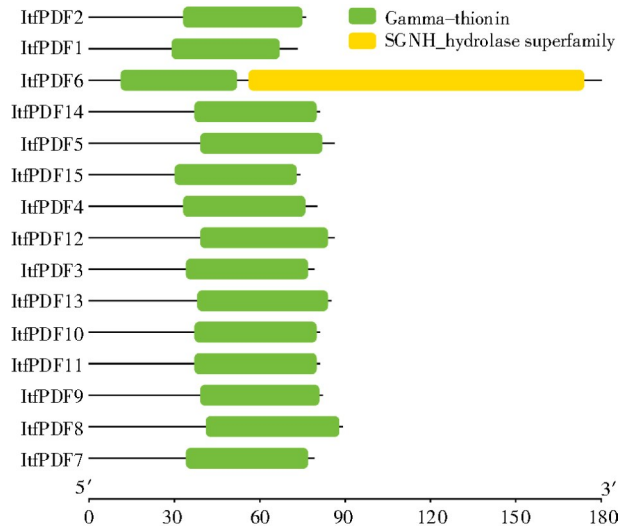


图 1 *ItfPDFs* 蛋白保守结构域鉴定
Fig.1 Identification of the conserved domains of *ItfPDFs*

表 1 *ItfPDF* 蛋白的理化性质分析
Tab.1 Physical and chemical properties of *ItfPDF* proteins

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	等电点 pI	分子质量/u Molecular weight	氨基酸数量/个 Number of amino acids
itf03g27900.t1	<i>ItfPDF1</i>	9.14	8 088.43	72
itf03g27920.t1	<i>ItfPDF2</i>	8.75	8 431.83	75
itf06g14980.t1	<i>ItfPDF3</i>	8.16	8 783.32	78
itf06g15000.t1	<i>ItfPDF4</i>	7.56	8 856.32	79
itf06g15010.t1	<i>ItfPDF5</i>	9.30	9 472.99	85
itf06g27060.t1	<i>ItfPDF6</i>	8.12	19 678.64	179
itf06g27070.t1	<i>ItfPDF7</i>	8.16	8 783.32	78
itf13g01330.t1	<i>ItfPDF8</i>	8.16	9 750.32	88
itf13g01340.t1	<i>ItfPDF9</i>	8.89	8 944.54	81
itf13g01350.t1	<i>ItfPDF10</i>	9.08	8 743.25	80
itf13g01360.t1	<i>ItfPDF11</i>	8.93	8 549.01	80
itf13g01370.t1	<i>ItfPDF12</i>	9.00	9 044.89	85
itf13g01400.t1	<i>ItfPDF13</i>	8.69	9 032.70	84
itf13g01420.t1	<i>ItfPDF14</i>	8.93	8 703.19	80
itf14g00500.t1	<i>ItfPDF15</i>	8.69	7 898.32	73

2.2 染色体定位分析

染色体定位分析结果表明 (图 2), 鉴定到的 15 个 *ItfPDFs* 基因分布于 4 条染色体上 (Chr03、Chr06、Chr13 和 Chr14), 其中, *ItfPDF1* 和 *ItfPDF2* 位于 3 号染色体上, *ItfPDF3*、*ItfPDF4*、*ItfPDF5*、*ItfPDF6* 和 *ItfPDF7* 位于 6 号染色体上, 而 *ItfPDF8*、*ItfPDF9*、*ItfPDF10*、*ItfPDF11*、*ItfPDF12*、*ItfPDF13*

和 *ItfPDF14* 位于 13 号染色体上, *ItfPDF15* 位于 14 号染色体上。除了 *ItfPDF3*、*ItfPDF4* 和 *ItfPDF5* 位于 Chr06 染色体的中下部外, 其余 12 个 *ItfPDFs* 基因

均位于各自所在染色体的端部。除了在染色体 Chr14 上分布有 1 个 *ItfPDF* 外, 在 Chr03、Chr06、Chr13 染色体上均分布多个串联重复的 *ItfPDFs* 基因。

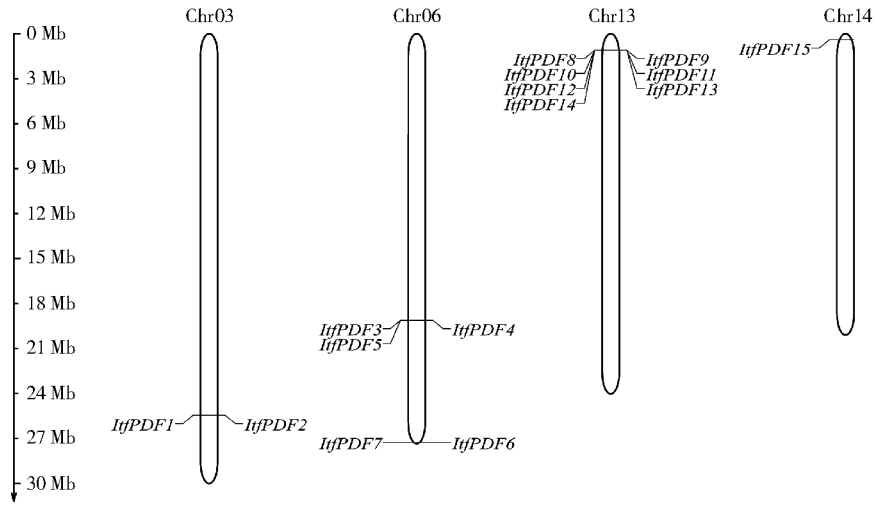


图 2 *ItfPDFs* 基因的染色体定位分析
Fig.2 Chromosomal localization of *ItfPDFs* genes

2.3 保守结构域分析

保守结构域的 Weblogo 分析结果表明(图 3), 在这 15 个 *ItfPDFs* 蛋白的保守结构域中, 第 1、12、19、23、33、43、45、50 位的半胱氨酸残基(C)高度保

守。另外, 第 10、27、31、35 位的甘氨酸(G), 第 34、40、41、42 位的精氨酸(R), 第 26 位的谷氨酸(E), 第 9 位的赖氨酸(K), 第 28 位的色氨酸(F)也高度保守。

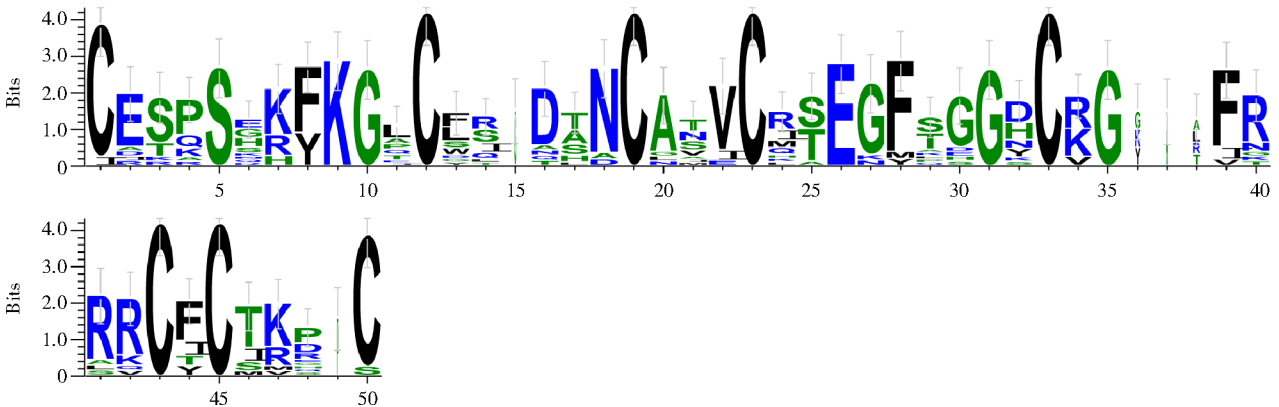


图 3 *ItfPDFs* 保守结构域的 Weblogo 分析
Fig.3 Weblogo analysis of the *ItfPDFs* conserved domains

2.4 保守基序分析及基因结构分析

利用 MEME 工具对 *ItfPDFs* 蛋白的保守基序进行分析(Motif 1~Motif 15 代表 *ItfPDFs* 蛋白质序列中 15 个不同的保守氨基酸基序), 结果表明(图 4-A), 这 15 个 *ItfPDFs* 蛋白中出现频率最多的是 Motif 1、Motif 3 和 Motif 4。除 *ItfPDF8* 之外, 其余的 *ItfPDFs* 成员均包含 Motif 1, 比率为 93.3%; 除 *ItfPDF12* 和 *ItfPDF13* 之外, 其余的 *ItfPDFs* 成员均包含 Motif 3, 比率为 86.7%; 除 *ItfPDF5*、*ItfPDF12*、*ItfPDF13* 和 *ItfPDF15* 之外, 其余的 *ItfPDF*

成员均包含 Motif 4, 比率为 73.3%。表明在 *ItfPDFs* 蛋白中, Motif 1、Motif 3、Motif 4 是重要的保守基序。 *ItfPDF6* 包含的 Motif 数量最多, 有 10 个, 其余 14 个 *ItfPDFs* 蛋白中含 4~6 个 Motif。 *ItfPDF9*、*ItfPDF10*、*ItfPDF11* 和 *ItfPDF14* 含有相同的 4 个 Motif(Motif 1、Motif 2、Motif 3 和 Motif 4)。基因结构分析结果表明(图 4-B), 这 15 个 *ItfPDFs* 基因均含有内含子, 其中, 13 个基因含有 1 个内含子, 占比为 86.7%; *ItfPDF12* 含有 2 个内含子; *ItfPDF6* 含有 3 个内含子。

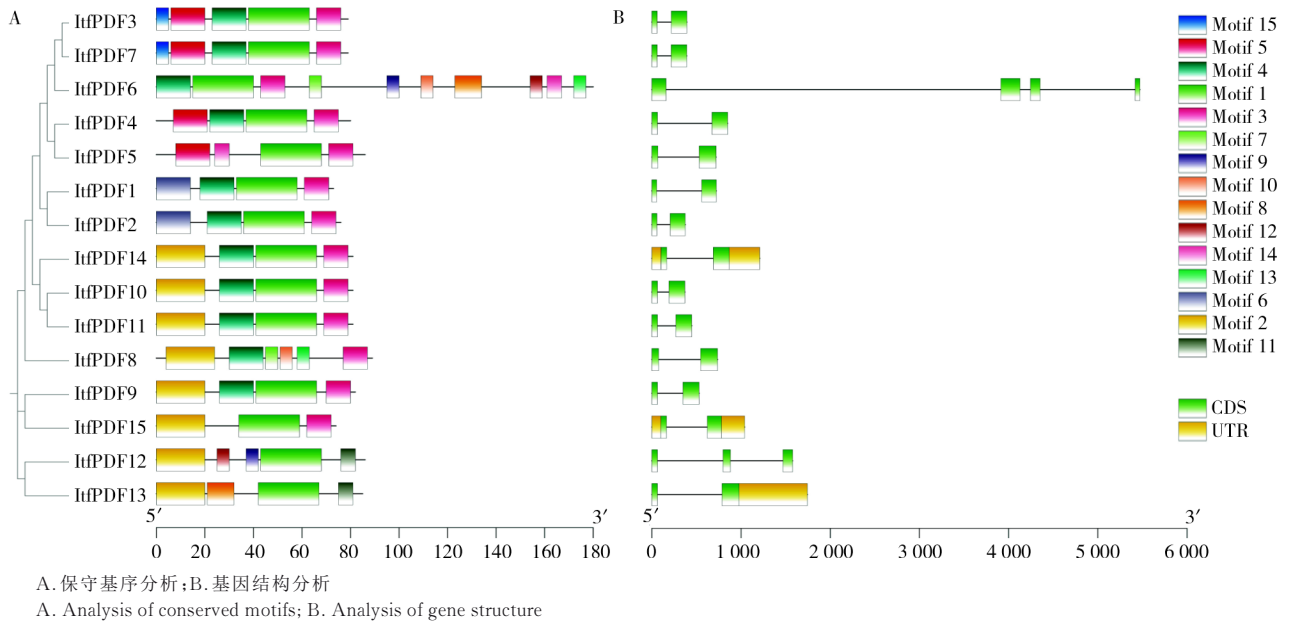


图4 *ItfPDFs* 保守基序和基因结构分析
Fig.4 Analysis of conserved motifs and gene structure of *ItfPDFs*

2.5 系统进化分析

在拟南芥中, *AtPDFs* 家族成员 15 个, 主要分为 PDF1s(图 5 中蓝色分支) 和 PDF2s(图 5 中红色分支) 2 个进化分支^[25]。系统进化分析结果表明, 三

浅裂野牵牛的 *ItfPDFs* 成员均属于 PDF2s 亚族; *ItfPDF1* 蛋白与 *ItfPDF2* 蛋白、*ItfPDF10* 蛋白与 *ItfPDF11* 蛋白、*ItfPDF12* 蛋白与 *ItfPDF13* 蛋白的亲缘关系较近。

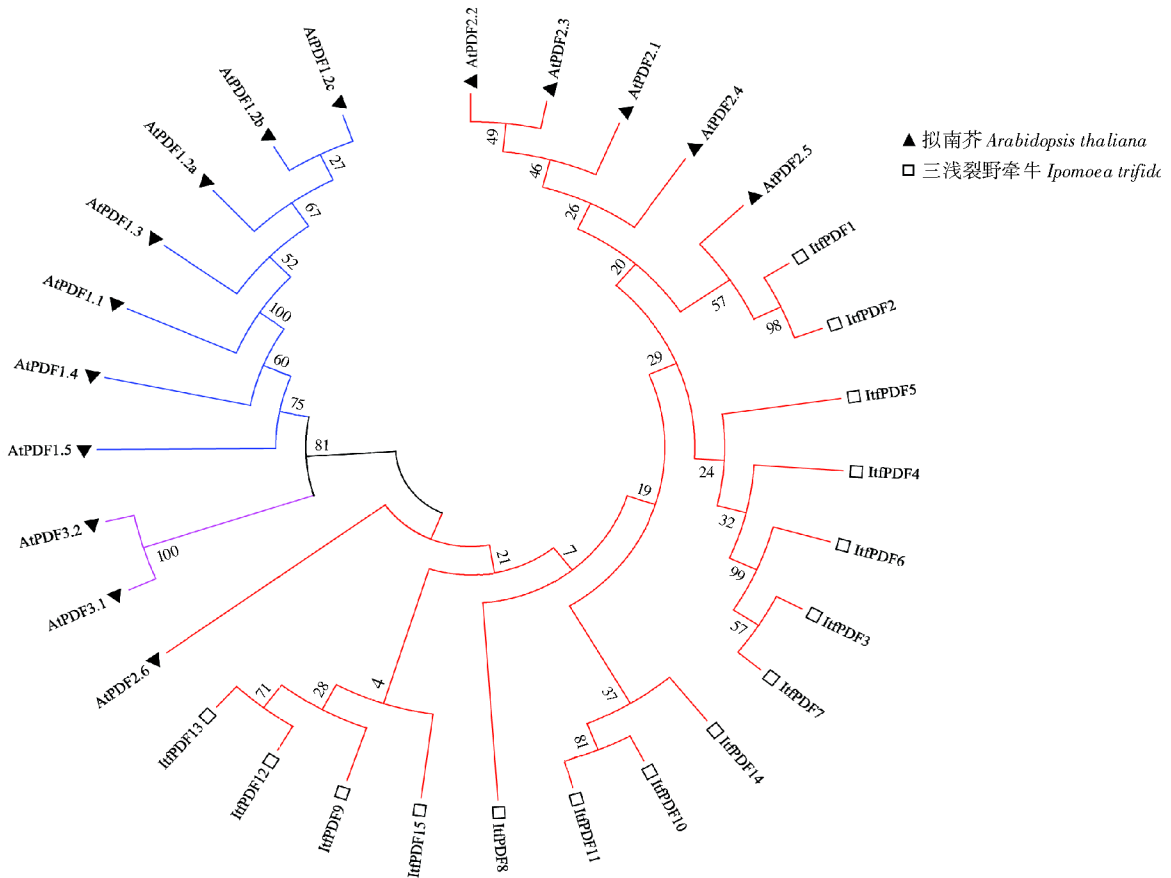
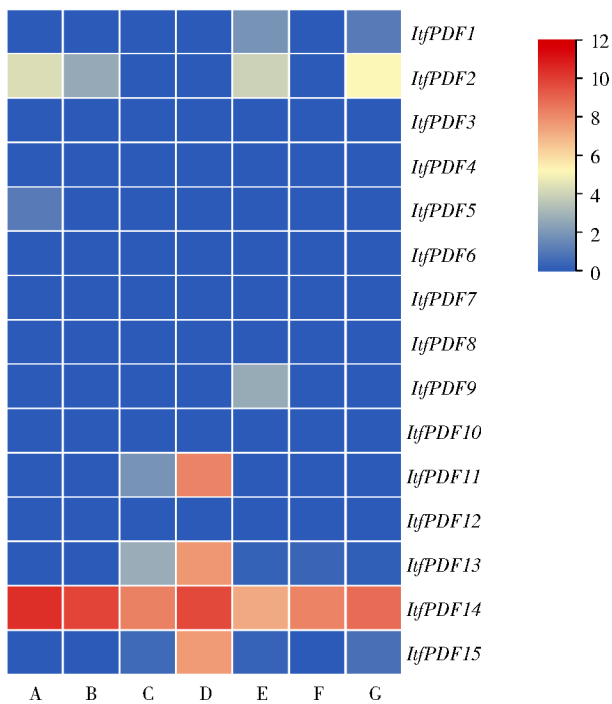


图5 三浅裂野牵牛 *ItfPDFs* 和拟南芥 *AtPDFs* 的系统进化分析
Fig.5 Phylogenetic analysis of *ItfPDFs* of *I. trifida* and *AtPDFs* of *A. thaliana*

2.6 *ItfPDFs* 基因的组织特异性表达分析

从图 6 可以看出, *ItfPDFs* 基因在不同组织中的表达情况可以分为 2 类: 第 1 类在叶、根、茎、花、花芽、愈伤组织中几乎不表达, 如 *ItfPDF1*、*ItfPDF3*、*ItfPDF4*、*ItfPDF5*、*ItfPDF6*、*ItfPDF7*、*ItfPDF8*、*ItfPDF9*、*ItfPDF10*、*ItfPDF12*; 第 2 类在花芽中表达量高, 例如 *ItfPDF11*、*ItfPDF13*、*ItfPDF14* 和 *ItfPDF15*, 这些基因可能参与花芽发育过程。另外, *ItfPDF14* 在根、茎、叶、花、花芽和愈伤组织中表达量均较高, 可以初步推断 *ItfPDF14* 可能在三浅裂野牵牛生长发育过程中发挥重要的生理作用。



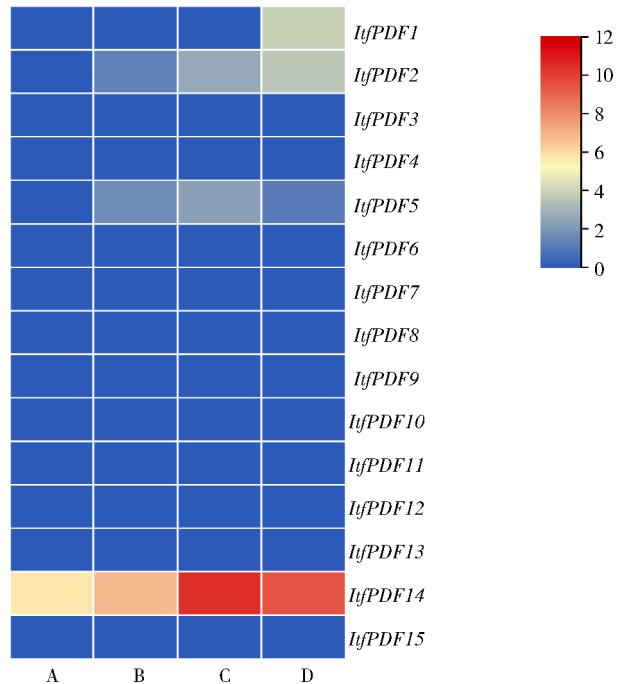
A. 花愈伤组织; B. 茎愈伤组织; C. 花; D. 花芽; E. 叶; F. 根; G. 茎
A. Callus-flower; B. Callus-stem; C. Flower; D. Flowerbud; E. Leaf; F. Root; G. Stem

图 6 *ItfPDFs* 基因的组织特异性表达分析
Fig.6 Tissue-specific expression analysis of the *ItfPDFs* genes

2.7 *ItfPDFs* 基因在非生物胁迫下的表达分析

分析了三浅裂野牵牛的 *ItfPDFs* 基因在冷、热、盐、干旱胁迫下的基因表达情况, 结果表明(图 7), 只有 *ItfPDF14* 基因响应冷胁迫; 热胁迫诱导 *ItfPDF2*、*ItfPDF5* 和 *ItfPDF14* 表达, *ItfPDF14* 的表达量最高; 有 4 个 *ItfPDFs* 基因受盐胁迫诱导表达, *ItfPDF14* 表达量最高, *ItfPDF1* 和 *ItfPDF2* 次之, *ItfPDF5* 最低; 干旱胁迫时, 有 3 个 *ItfPDFs* 基因表达, 其中 *ItfPDF14* 表达量最高, *ItfPDF2* 和 *ItfPDF5* 次之。综上, 大部分 *ItfPDFs* 基因家族成员不响应非生物胁迫, 只有 *ItfPDF1*、*ItfPDF2*、*ItfPDF5* 和 *Itf-*

PDF14 受非生物胁迫诱导表达; *ItfPDF14* 在不同非生物胁迫条件均有较高表达量, 且在干旱和盐胁迫下的表达量高于冷胁迫和热胁迫。说明 *ItfPDF14* 可能在三浅裂野牵牛响应非生物胁迫应答, 尤其是干旱和盐胁迫中发挥重要作用。



A. 冷胁迫; B. 热胁迫; C. 干旱胁迫; D. 盐胁迫
A. Cold stress; B. Heat stress; C. Drought stress; D. NaCl stress

图 7 *ItfPDFs* 基因在非生物胁迫下的表达分析
Fig.7 Expression analysis of *ItfPDFs* genes under abiotic stress

3 结论与讨论

植物防御素是一种阳离子性的多肽, 分子质量约为 5 ku, 包括 1 个 α -螺旋和 3 个反平行的 β -折叠片层结构, 呈现出球形的三维结构, 一般含有 8 个保守的半胱氨酸残基, 形成稳定的 $\beta\alpha\beta\beta$ 结构^[1-4]。本研究鉴定到 15 个 *ItfPDFs* 蛋白, 其结构域中含 8 个高度保守的半胱氨酸残基, 可能与植物防御素功能密切相关。

3.1 三浅裂野牵牛 PDF 家族扩张的主要原因分析

本研究共鉴定到 15 个三浅裂野牵牛防御素基因家族成员 *ItfPDFs*。理化性质分析表明, 各成员的等电点介于 7.56~9.30, 均大于 7, 为碱性蛋白, 由此可初步推断其主要在碱性的亚细胞环境中存在并发挥生理作用。已有研究在小麦、水稻、拟南芥、玉米中分别鉴定出 73、15、15、11 个 PDF 蛋白^[33]。不同物种的基因数量差异表明, PDF 蛋白存在功能冗余, 然而, 基因数量并不对应于基因组大

小。小麦中 PDF 蛋白数量远远多于拟南芥、玉米和水稻^[33],说明小麦遗传性状的复杂性,小麦是异源六倍体,在其进化中可能会发生多次基因重复事件,推测这与小麦进化过程中适应多变的外部环境有关。本研究染色体定位分析发现,*ItfPDFs* 基因不均匀地分布于三浅裂野牵牛第 3、6、13、14 号染色体上,大部分分布于染色体的端部,这与在番茄中的研究结果类似^[19]。除了在染色体 Chl14 上分布有 1 个 *ItfPDF* 外,在 Chl03、Chl06、Chl13 染色体上都分布有多个串联重复的 *ItfPDFs* 基因。表明基因片段复制是三浅裂野牵牛进化过程中 PDF 家族成员扩张的主要原因,这与小麦 PDF 基因家族的研究结果类似^[29]。

3.2 三浅裂野牵牛 *ItfPDFs* 基因家族成员的功能

已有的研究表明,防御素主要参与植物抗病性、抗营养胁迫^[24-26],关于参与非生物胁迫响应的相关研究较少。有研究发现,大蒜 *AsPDF1* 在根、鳞茎、叶片中均有表达,但在根中表达量最高,且受盐胁迫诱导表达^[20]。本研究中,鉴定到的 15 个 *ItfPDFs* 基因在三浅裂野牵牛不同组织和非生物胁迫条件下差异表达,可能原因是 *ItfPDFs* 蛋白在进化中发生了功能分化。值得注意的是,*ItfPDF11*、*ItfPDF13*、*ItfPDF14* 和 *ItfPDF15* 在花芽中高表达,这些基因可能参与三浅裂野牵牛的花芽发育过程。*ItfPDF14* 基因在各组织及非生物胁迫下均有较高表达,推测 *ItfPDF14* 基因可能在三浅裂野牵牛的生长发育和非生物胁迫应答中发挥重要作用。关于 *ItfPDF14* 基因功能及其甘薯同源基因的相关功能解析需要后续进一步验证。

相较于传统育种,分子育种技术具有短期、高效、定向改良目标性状等优点。利用转基因技术能够增强植物抗逆性,加速作物遗传改良^[33-35]。随着基因组测序技术以及基因家族分析方法研究^[36-37]的不断深入,植物中将鉴定出更多的防御素基因家族成员。植物功能基因组学和蛋白质组学的快速发展,将逐步解析这些防御素基因在植物抗性中的作用机制。植物防御素具有高效、广谱抗菌的特性,研究人员已注意到植物防御素在植物分子育种、抗菌素生产等多个领域有着广阔的发展前景和无限的应用潜力^[38-39]。本研究鉴定分析了三浅裂野牵牛 *ItfPDFs* 基因家族 15 个成员,推测 *ItfPDF11*、*ItfPDF13*、*ItfPDF14* 和 *ItfPDF15* 可能参与三浅裂野牵牛的花芽发育过程,*ItfPDF14* 基因可能在三浅裂野牵牛的生长发育和非生物胁迫应答中发挥关

键作用。这些结果对于今后深入研究这些基因在抗逆性分子育种方面的作用具有重要的参考价值,同时可为甘薯中 *PDF* 基因的相关研究提供参考依据。

参考文献:

- [1] GACHOMO E W, SEUFFERHELD M J, KOTCHONI S O. Melanization of appressoria is critical for the pathogenicity of *Diplocarpon rosae*[J]. Molecular Biology Report, 2010, 37: 3583-3591.
- [2] VANLOON L C, REP M, PIETERSE, C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. Annual Review of Phytopathology, 2006, 44: 135-162.
- [3] LACERDA A, VASCONCELOS É A R, PELEGRINI P B, et al. Antifungal defensins and their role in plant defense[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 116-123.
- [4] ZHU S, GAO B, TYTGAT J. Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CSab superfamily[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005, 62: 2257-2269.
- [5] SHAHMIRI M, BLEACKLEY M R, DAWSON C S, et al. Membrane binding properties of plant defensins[J]. Phytochemistry, 2023, 209: 113618.
- [6] PORTIELES R, AYRA C, ORLANDO B. Basic insight on plant defensins[J]. Biotechnologia Aplicada, 2006, 23: 75-78.
- [7] ISHAQ N, BILAL M, IQBAL H M N. Medicinal potentialities of plant defensins: a review with applied perspectives[J]. Medicines, 2019, 19, 6(1): 29-36.
- [8] ALMEIDA M S, CABRAL K, KURTENBACH E. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 315(4): 749-757.
- [9] VRIENS K, CAMMUE B, THEVISSSEN K. Antifungal plant defensins: mechanisms of action and production[J]. Molecules, 2014, 19(8): 12280-12303.
- [10] 官丽莉, 崔琪, 李声钊, 等. 植物防御素基因家族结构、功能及调控研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(1): 33-39. GUAN L L, CUI Q, LI S Z, et al. Research progress on the structure, function, and regulation of plant defense hormone gene family[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(1): 33-39.
- [11] 朱立成, 罗辉, 任悍. 植物防御素结构与功能及其抗真菌机制研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(3): 9-14. ZHU L C, LUO H, REN H. Research progress on the structure and function of plant defense peptides and their antifungal mechanisms[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(3): 9-14.
- [12] 何玲, 杨素云, 刘媛, 等. 植物防御素在抗植物病害方面的应用[J]. 现代农业科技, 2017(7): 147-149. HE L, YANG S Y, LIU Y, et al. The application of plant defenses in resistance to plant diseases[J]. Modern Agricultural Technology, 2017(7): 147-149.
- [13] 李平, 桑贤春, 裴炎, 等. 植物防御素基因 *alfAFP* 在毕赤酵母中的分泌表达及对水稻病原菌的抑制[J]. 中国农业科学, 2009, 42(3): 869-875. LI P, SANG X C, PEI Y, et al. Secretion and expression of plant defense gene *alfAFP* in *Pichia pastoris* and its inhibition

- on rice pathogens[J]. Chinese Agricultural Science, 2009, 42(3):869-875.
- [14] GASPAR Y M, MCKENNA J A, MCGINNESS B S, et al. Field resistance to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* in transgenic cotton expressing the plant defensin *NaD1* [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(6):1541-1550.
- [15] CHEN K C, LIN C Y, CHUNG M C, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial protein from mung bean seeds[J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 2002, 43:251-259.
- [16] KAUR J, SAGARAM U S, SHAH D. Can plant defensins be used to engineer durable commercially useful resistance in crop plants[J]. Fungal Biology Reviews, 2011, 25(3):128-135.
- [17] COLILLA F J, ROCHER A, MENDEA E. Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm[J]. FEBS Letters, 1990, 270:191-194.
- [18] MENDEZ E, MORENO A, COLILLA F, et al. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, γ -hordothionin, from barley endosperm[J]. European Journal of Biochemistry, 1990, 194:533-539.
- [19] DEBEER A, VIVIER M A. Four plant defensins from an indigenous South African *Brassicaceae* species display divergent activities against two test pathogens despite high sequence similarity in the encoding genes[J]. BMC Research Notes, 2011, 4:459.
- [20] 陈东, 范海云, 高世雯, 等. 大蒜防御素基因 *AsPDF1* 的克隆与表达分析[J]. 植物生理学报, 2019, 55(2):177-184.
CHEN D, FAN H Y, GAO S W, et al. Cloning and expression analysis of defensin gene *AsPDF1* in garlic[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(2):177-184.
- [21] 王轶, 罗勤, 吴俊, 等. 甘蓝型油菜植物防御素基因的克隆与原核表达[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2005, 42(4):831-834.
WANG Y, LUO Q, WU J, et al. Cloning and prokaryotic expression of plant defense hormone genes in *Brassica napus*[J]. Journal of Sichuan University(Natural Science Edition), 2005, 42(4):831-834.
- [22] LI Z, ZHOU M P, ZHANG Z Y, et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*[J]. Functional & Integrative Genomics, 2011, 11:63-70.
- [23] WU Y R, LIN Y C, CHUANG H W. Laminarin modulates the chloroplast antioxidant system to enhance abiotic stress tolerance partially through the regulation of the defensin-like gene expression[J]. Plant Science, 2016, 247:83-92.
- [24] SASAKI K, KUWABARA C, UMEKI N, et al. The cold-induced defensin *TAD1* confers resistance against snow mold and *Fusarium* head blight in transgenic wheat[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 228:3-7.
- [25] LIU Y, HUA Y, CHEN H, et al. Genome-scale identification of plant defensin (PDF) family genes and molecular characterization of their responses to diverse nutrient stresses in allotetraploid rapeseed[J]. Peer Journal, 2021, 9:e12007.
- [26] GAO A G, HAKIMI S M, MITTANCK C A, et al. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(12):1307-1310.
- [27] LI M, CHEN L, LANG T, et al. Genome-wide identification and expression analysis of expansin gene family in the storage root development of diploid wild sweet potato *Ipomoea trifida* [J]. Genes, 2022, 13(6):1043.
- [28] SATHISH K, PONNIAH J, THIMMAPURAM K B, et al. Comparative analysis of the root transcriptomes of cultivated sweet potato (*Ipomoea batatas*(L.) Lam) and its wild ancestor (*Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don) [J]. BMC Plant Biology, 2017, 17:9.
- [29] DONG Y, WANG Y, TANG M, et al. Bioinformatic analysis of wheat defensin gene family and function verification of candidate genes[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14:1279502.
- [30] 宰文珊, 叶曙光, 苗立祥, 等. 番茄全基因组防御素基因鉴定及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(12):1588-1596.
ZAI W S, YE S G, MIAO L X, et al. Genome-wide identification and expression analysis of defensin genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2015, 23(12):1588-1596.
- [31] 向奥玲, 张涛, 唐蓓, 等. 芸薹属物种 (*B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*) 防御素基因 *PDF1.1* 的生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(9):2799-2806.
XIANG A L, ZHANG T, TANG B, et al. Bioinformatics analysis of defense gene *PDF1.1* in *Brassica* species (*B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*) molecular plant breeding[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(9):2799-2806.
- [32] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant, 2020, 13(8):1194-1202.
- [33] GAO F, LI P, YIN Y, et al. Molecular breeding of livestock for disease resistance[J]. Virology, 2023, 587:109862.
- [34] CAO P, ZHAO Y, WU F, et al. Multi-omics techniques for soybean molecular breeding[J]. International Journal of Molecular Science, 2022, 23(9):4994.
- [35] MOHAPATRA S, BARIK SR, DASH P K, et al. Molecular breeding for incorporation of submergence tolerance and durable bacterial blight resistance into the popular rice variety 'Ranidhan'[J]. Biomolecules, 2023, 13(2):198.
- [36] 董静静, 刘心怡, 刘晓宇, 等. 三浅裂野牛牛 SnRK2 基因家族的鉴定和表达分析[J]. 山西农业科学, 2024, 52(4):42-50.
DONG J J, LIU X Y, LIU X Y, et al. Identification and expression analysis of SnRK2 gene family in *Ipomoea trifida*[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2024, 52(4):42-50.
- [37] 张晓霞, 李瑞森, 张路瑶, 等. 谷子组蛋白 H3 基因家族的鉴定与分析[J]. 山西农业科学, 2023, 51(10):1144-1152.
ZHANG X X, LI R M, ZHANG L Y, et al. Identification and analysis of histone H3 gene family in *foxtail millet*[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2023, 51(10):1144-1152.
- [38] SATHOFF A E, LEWENZA S, SAMAC D A. Plant defensin antibacterial mode of action against *Pseudomonas* species [J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1):173.
- [39] FU J, ZONG X, JIN M, et al. Mechanism and regulation of defensins in host defense[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2023, 8(1):300.