

丹参 Pht1 基因家族的挖掘、鉴定及其特征性分析

穆帝秀, 孙莹, 王清蓉, 陈新*, 严铸云

成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 对丹参 *Salvia miltiorrhiza* 基因组中存在的 Pht1 基因家族成员进行挖掘、鉴定和功能预测分析, 为进一步研究和利用 Pht1 这一功能基因家族奠定基础。方法 基于丹参基因组数据库及 NCBI 数据库, 借助生物信息学方法, 首先筛选获得丹参 Pht1 家族候选基因的序列, 进而对其进行多重序列比对、保守结构查找及系统进化树构建, 最后完成其特征性分析和生物学功能预测。结果 从丹参基因组中共挖掘出了 12 个新的 Pht1 候选基因, 加上已报道的 Smpht1, 共 13 个 Pht1 成员, 其同源性高达 74.34%, 并对 9 个成员提供了比较可靠的功能注释。该家族基因中, Smpht1&Sm1、Sm4&Sm6、Sm5&Sm11 这 3 对成员可能属于彼此协同进化的同功能基因; Smpht1、Sm1、Sm3、Sm5、Sm7 及 Sm11 这 6 个成员在丹参根部表达, 除了受缺磷特异性诱导表达的 Sm7 和不受磷素供缺因素所影响的 Sm3 以外, 其余 4 个均有可能属于缺磷诱导增强表达型基因, 进而对丹参磷素吸收起着重要作用; 另外, Sm7 与 Sm16 还有可能在丹参花器官中表达而参与植株花期磷素平衡的调节; Sm14 则很有可能是一个菌根诱导特异性表达的磷转运基因。结论 首次系统地 从丹参基因组中挖掘筛选出 Pht1 基因家族, 并发现了具有特征性生物学功能的成员, 这将为进一步阐明 Pht1 在丹参生长发育和药效成分代谢中所起作用的相关研究提供背景支持和思路参考。

关键词: 丹参; Pht1 基因家族; 特征分析; 功能预测; 诱导表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)01-0194-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.027

Exploration, identification, and characterization of Pht1 gene family in *Salvia miltiorrhiza*

MU Di-xiu, SUN Ying, WANG Qing-rong, CHEN Xin, YAN Zhu-yun

School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To provide a basis for further study and utilization of the functional gene family of Pht1 in *Salvia miltiorrhiza*, the Pht1 gene family members from *S. miltiorrhiza* genome should be explored, identified and functionally predicted. **Methods** By utilizing the bioinformatics methods, based on the genomic and NCBI database of *S. miltiorrhiza*, the sequences of Pht1 family candidate genes of *S. miltiorrhiza* were obtained firstly by screening, and then carried on the multiple sequence alignment, conserved structure lookup as well as phylogenetic tree construction. Finally, the characteristic analysis and biological function prediction were carried out. **Results** The results showed that 12 Pht1 candidate genes were extracted from the genome of *Salvia miltiorrhiza*, together with the reported Smpht1, there are 13 Pht1 members in total, their homology as high as 74.34%, and nine members of them could provide more reliable functional annotation. Among the gene family members, Smpht1 & Sm1, Sm4 & Sm6, Sm5 & Sm11, in which these three pairs may share similar function as well as coevolution relation between each other; Smpht1, Sm1, Sm3, Sm5, Sm7, and Sm11, all of the six members can be only expressed in the roots of *S. miltiorrhiza*. furthermore, except Sm7 induced by p-deficiency and Sm3 member unaffected by the phosphorus supply factor, the other four probably belong to the P-deficiency induced up-regulated expressive genotype, which play an important role in phosphorus absorption of *S. miltiorrhiza*; Moreover, both Sm7 and Sm16 are possible to expressed in the flower organs of *S. miltiorrhiza* and then participate in the regulation of phosphorus balance in the flowering stage of plants. In addition, Sm14 is likely to be a mycorrhizal-induced specific expressive gene with the function of phosphorus transfer in Pht1 family members. **Conclusion** The Pht1 gene family was screened and identified systematically from the genome of *S. miltiorrhiza* for the first time, in addition, the members with characteristic and biological function were found out, which will provide dependable background support and ideas reference for the further research on the role of Pht1 in

收稿日期: 2017-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173493)

作者简介: 穆帝秀, 女, 在读硕士, 研究方向为药用植物分子生物学研究。Tel: 18215519076 E-mail: mudixiu314@163.com

*通信作者 陈新, 男, 硕士生导师, 教授, 主要从事药用植物分子生物学研究。Tel: 13982280625 E-mail: chennew@tom.com

the growth and development of *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; Pht1 gene family; characteristic analysis; functional prediction; induction expression

磷是植物生长发育的关键营养元素之一,但因其 在土壤中的移动性差,易造成有效磷的缺乏,纵使外 界施给足够量的磷,植物不仅无法吸收,反而会导致 植株磷中毒、土壤磷浪费及环境污染等问题^[1]。研究 表明植物对磷吸收和转运是一个逆浓度梯度的主动 运输过程,主要依靠根系细胞膜上的磷转运蛋白 (phosphate transporter, Pht)^[2]来完成。近年来,随着 对植物磷代谢的深入研究,越来越多的 Pht 基因在众 多植物中被克隆鉴定,大致可分为 Pht1~4 和 Pho1、 2 共 6 个亚族^[1],其中又以 Pht1 研究最深入,该家族 成员众多,在植物界中广泛存在,参与了植物根部磷 的吸收和转运、共生体磷的获取以及地上部磷的分布 等多个与磷代谢相关的过程^[1,3],其共生体主要为丛枝 菌根(arbuscular mycorrhizal, AM)真菌与植物根系 形成的一种互惠共生体^[4],能很大程度上促进宿主植 物对磷的吸收利用,有“生物肥料”之称。据 NCBI 数据库数据显示,截至目前共登陆注释了 4 800 余个 植物 Pht 基因,但大多属于模式植物和经济作物,而 在药用植物中仅见于丹参 *Smpht1*^[5]和菊花 *CmPT1*^[6] 这 2 个成员,其余物种的相关研究多停留于对宏观现 象的阐述,对其机制上的探索则亟待深入。

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 作为药用植物 中的模式植物,又是市场上供不应求的大宗药材, 因其种植地广泛分散,难以形成规范化的标准栽 培,导致丹参药材质量参差错落,这就使得丹参 的品质和产量提高成为人们关注的焦点。众多研 究表明^[7-10],磷素可直接影响丹参药材的品质品 效,其施用量的多少与丹参产量及有效成分间存在 一定的相关性,且均存在一个最适施用量,过高或 过低都不利于丹参生物量和次生代谢物的积累, 但其中的相关机制尚不明确,因而亟需对其进行 深入研究。如今,丹参基因组测序工作已获得初步 成功,将有必要在此基础上借助各种生信分析的 新方法对丹参分子生物学方面的科学问题进行 深入研究,尤其是对于各类功能基因的挖掘和预 测。所以,本研究利用 *Smpht1*^[5]这一已知信息对 丹参基因组序列进行 Pht1 信息挖掘,筛选出可能 存在的 Pht1 基因成员,并参照其他植物的研究成 果对其系统进化和生物学功能进行预测分析和总 结,以期为进一步认识和利用 Pht1 基因奠定基础, 也为深入研究 Pht1

在丹参生长发育和药效成分代谢中的作用机制 提供可靠的研究思路和参考。

1 材料

凝胶成像系统仪、My cyclor™ Thermal cyclor、 NanoPhotometer™P-Class 购自 BIO-RAD 公司。 NCBI、EMBL-EBI、DDBJ 数据库。

2 方法

2.1 序列的获取

首先利用丹参全基因组的 cDNA 序列构建本地 Blast 数据库,根据文献^[5] *Smpht1* 的 GeneBank 登录 号(JQ898683),通过在 NCBI 数据库检索获得到 *Smpht1* 的 cDNA 全长后,以其为线索,借助软件 blast-2.2.31⁺对丹参编码基因数据库“*Salvia.cds*”中 进行本地 blastn 搜索,获得丹参的 Pht1 同源基因, 根据其他物种中 Pht1 核酸序列的长度进行筛选,舍 去长度不足 1 000 bp 的序列。同时,以“Phosphate transporter”为关键词,到 NCBI 数据库搜索模式 植物拟南芥、水稻及研究较为深入全面的丹参近缘 物种(茄科茄属植物土豆 *Solanum tuberosum* L.、茄子 *Solanum melongena* L.、番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill.、辣椒 *Capsicum frutescens* L. 和烟 草 *Nicotiana tabacum* L.)的 Pht 注册序列,并结合 相关文献报道确定其准确性和完整性。

2.2 目标序列比对与分析

首先将获取的目标序列分别在 NCBI、 EMBL-EBI、DDBJ 3 大数据库进行 blast 在线比对和 注释,对结果进行综合分析,通过同源性确定其是 否为可编码 Pht 的基因,以筛选出目标序列作进一 步分析考察,借助 GSDS 在线系统对其中同源性极 高(identity=100%)的成员序列进行基因结构分析; 将初步获得的目标序列导入 DNAMAN 8.0 与 MEGA 7.0 软件中进行多重序列比对并将其可读框(open reading frame, ORF)翻译成对应的氨基酸序列,结 合二者的比对修剪结果,再借助 DNAMAN 和 ClustalW2 在线工具分析其保守域及相互间的同源关 系;为更全面可靠地分析预测成员间的系统进化关 系,采用“双软件双方法”构建支持率高的系统进化 树,即 MEGA 与 DNAMAN 对目标序列构建系统进化 树,进化树生成算法采用邻接(neighbor-joining, NJ) 与最大似然法(maximum likelihood, ML)^[11-12],校

验参数 Bootstrap 重复 1 000 次对构建好的系统发生树进行评估;将利用 MEME^[13]在线工具对丹参 Pht1 预测成员与水稻 Pht1 全家族成员的氨基酸序列进行保守基序分析。

3 结果与分析

3.1 丹参 Pht1 成员及其在线比对结果

以已知 SmPht1^[5]基因的 cDNA 序列在“salvia.cds”库中进行本地 blastn 搜索,共获得 17 条序列(表 1),分别重新编号为 Sm1~Sm17。综合其在 3 大数据库中进行 blast 在线比对的结果分析,根据同源性初步鉴定是否具有可编码 Pht 的功能。MEGA 处理修饰得到各个基因的氨基酸序列

(约 530 个氨基酸残基),再结合 DNAMAN 软件综合分析整个丹参 Pht1 家族基因氨基酸序列的同源性和保守域,结果发现这 13 个预测成员的同源性非常高,并以此对其进行取舍。从表 1 可看出,共淘汰了 5 条缺失严重及结果异常的序列,最后筛选出 12 条结果可观的序列作为丹参 Pht1 家族候选基因。其中,Sm1 与 Smpht1 的序列联配效果良好,相似度高达 99%,但在序列上各有缺失,覆盖率不高,虽不能排除二者属于同一基因的可能,但也无法证明,故此将其作同功能基因的 2 个成员处理。

淘汰序列中,Sm9 与 Sm3 均与水稻 OsPT8 匹配率为 100%,但 Sm9 的结果是反向联配,可见 Sm9

表 1 丹参 Pht1 核酸序列注释情况

Table 1 Annotation overview of Pht1 nucleotide sequences in *S. miltiorrhiza*

编号	“salvia.cds”位点名称	长度/bp	在线 blast 比对结果	文献	注释
^b Sm1	SMil_00012750-RA_Salv	1 548	与 Smpht1 ^c 相似性为 99%,覆盖率为 82%	5	仅在根部表达的缺磷诱导增强型 Pht 基因,负责磷的吸收
^a Sm2	SMil_00029056-RA_Salv	705	只显示为 Pht1 家族基因		序列太短,不作后续分析
^b Sm3	Os10t0444700-01_Osat	1 626	与水稻 OsPT8 ^c 相似度为 100%	14	组成型 Pht,负责磷的吸收和转运
^b Sm4	SIN_1022332_Sind	1 575	与芝麻预测基因 SiPT1-4 ^c 相似度为 100%		Pht 基因,具体功能未见报道
^b Sm5	Os03t0150600-01_Osat	1 584	与水稻 OsPT1 ^c 相似度为 100%	14	缺磷诱导增强型 Pht 基因
^b Sm6	SIN_1021425_Sind	1 575	芝麻预测基因 SiPT1-4-like ^c 相似度为 100%,多为预测基因		Pht 基因,具体功能未见报道
^b Sm7	AT3G54 700.1_Atha	1 608	拟南芥 AtPT1-7 ^c 相似度为 100%	15	根部缺磷诱导特异性表达,花器官也有表达,负责磷的吸收和转运
^a Sm8	SMil_00029053-RA_Salv	927	虽比对结果显示为 Pht1 成员,但覆盖率与匹配率相对较低,均低于 80%		上游缺失约 650 bp,保守域缺失,舍弃,不作后续分析
^a Sm9	Os10t0444850-00_Osat	1 215	与水稻 OsPT8 ^c 相似度为 100%		上游序列缺失 380 bp,比对结果为反向联配,淘汰,不作后续分析
Sm10	SMil_00008713-RA_Salv	1 191	均为预测基因 Pht 成员,如猴面花、油棕、椰枣		上游缺失约 380 bp,但保守序列未缺失,仍作后续分析
Sm11	Os10t0444600-00_Osat	1 146	与水稻 OsPT3 (ID: AF536963, CDS: 1 581 bp)相似度为 99%,占其编码区的覆盖率为 77%	14	3'末端和 5'均缺失部分序列,但未影响到保守区域
Sm12	Scf00 009.g1 531.t1_Ugib	1 587	结果均在 75%以下,多为预测基因,但仍属于 Pht 家族基因		负责磷体内运输与磷平衡
^a Sm13	Os10t0444566-00_Osat	1 011	与水稻 OsPT3 高达 99%,但覆盖率仅为 63%(结果反向联配)		但保守区域序列正常,可能在该家族中进化地位较高
Sm14	SMil_00002436-RA_Salv	1 590	相似度集中于 70%~80%,且多有预测基因,可能在该家族中进化地位较高	16-18	上游缺失 530 bp,保守域丢失,且为反义链,舍弃,不作后续分析
Sm15	Scf00 146.g10 480.t1_Ugib	1 947	与白羽扇豆 LaPT1 有 77%(ID: AY026321, CDS: 1 631 bp),相似度 75%,覆盖率 94%	19	其中 EcPT4 与 ZmPT1-6 已有功能验证,属于受 AMF 特异性诱导表达型基因
^b Sm16	AT5G43 340.1_Atha	1 551	与拟南芥 AtPT1-6 ^c 相似度高达 100%	15	上游冗余 350 bp 根部缺磷诱导特异性表达,主要负责磷的吸收
^a Sm17	SMil_00029055-RA_Salv	432	结果少且杂乱		组织特异性高,仅在花器官中表达,维持花期磷平衡
					序列太短,不作进一步分析

a-淘汰序列 b-NCBI 中同源性高 (identity=100%) 的序列 c-将根据 GeneBank 登陆号作基因结构简图

a-the sequence that has been eliminated b-the sequence with high homology (identity = 100%) in NCBI c-the sequence with GSDS based on their accession number in GenBank

极有可能是 Sm3 的反义链,类似现象可推测: Sm13 也极有可能是 Sm11 的反义链,另外 3 条即 Sm2、Sm8 和 Sm17 序列缺失严重,可能为该家族基因成员的子片段。Sm3~7 与 Sm16 这 6 条序列在其他物种的该基因家族中存在同源性一致的成员,说明这 6 个基因在该家族的进化程度上比较保守,功能比较基础和原始,可能参与了植物整个生命过程中对磷素的吸收和转运,不易受到外界环境信号的影响和调控,另外, Sm11 虽部分序列缺失,但也可能为同类基因,根据 OsPT3 推测其功能。其余 5 条与其他物种的 Pht1 家族成员同源性相对偏低(集中于 70%~80%),且存在大量预测基因,说明这些成员在该家族中的进化程度较高,并存在物种间差异,其功能易受外界环境信号的影响和调控。其中较为特别的是 Sm14,其检索结果显示与小米和玉米的相关基因成员的相似度高:占小米 Pht1 基因 EcPT4 (ID: KJ842586, CDS: 66~1 715 bp) 编码区覆盖率为 90%,相似度 79%;占玉米 Pht1 基因 ZmPT1-6 (ID: AJ830010, CDS: 50~1 714 bp) 编码区覆盖率为 90%,相似度 78%,并且已进行功能验证^[16,18], EcPT4 和 ZmPT1-6 这 2 个基因的表达均受 AM 特异性诱导,据此推测, Sm14 在丹参植物中也有类似功能。

根据以上筛选的 12 个预测的新成员,对其中相似性极高 (identity≈100%) 即在其他物种的该基因家族中存在一致性的成员,借助 GSDS 在线基因结构显示系统,根据已知序列特性推测其基因结构,结果如图 1 所示,这 7 个成员均仅有外显子,无内含子,说明这些成员的保守性较高,进化较原始,功能较基础且不易受外界环境信号的影响和调控。

已有研究表明^[5] Smpht1 编码高亲和性的磷转运蛋白,且表达组织特异性强,仅在丹参根部有表达,对丹参磷素吸收起着重要作用。OsPT1(对应 Sm5)、OsPT3(对应 Sm11)和 OsPT8(对应 Sm3)在水稻磷素吸收过程中均起到重要作用^[20],在缺磷条件下均可促进植株根部对磷酸盐的吸收,且在种子发芽过程中就参与了磷素转运。另外 OsPT1 和 OsPT3 为缺磷诱导增强表达型基因,在缺磷条件下促进磷的吸收,OsPT1 和 OsPT8 所编码的基因均属于组成型表达,无论是否供磷,在植株根部和地上部均能持续表达,缺磷增强,说明这 2 种蛋白在植株缺磷时还可将磷素转运到新组织或者根部,参与植物体内磷素再利用的重新分配过程。由此可推测,丹参 Pht1 预测成员 Sm3、Sm5 及 Sm11 也具有与其相对应的表达特性和功能;另外, Mudge 等^[15]利用启动子融合方法对 AtPT1-6(对应 Sm16)和 AtPT1-7(对应 Sm7)的研究表明,在拟南芥成熟植株的绒毡层组织和花粉粒中均能检测到二者的表达产物,而 AtPT1-7 在根部受缺磷诱导表达。有趣的是, AtPT1-6 这一基因仅在拟南芥的花器官中表达,对拟南芥花期的磷素平衡及花粉的发育起着重要的调节作用,并且只在植物内部参加磷的转运,而非从低磷浓度的土壤中对外源磷进行吸收,表明其可能属于低亲和性的磷转运体。同理可推测,丹参中 Sm16 成员也有以上特异的功能特征。

遗憾的是,对于芝麻的 Pht1 预测基因 SiPT1-4(对应 Sm6)和 SiPT1-4-like(对应 Sm6)的功能仅注释为 Pht1 家族基因,却未有实验证实其具体功能。但从系统发育程度来看,芝麻和丹参的亲缘关系相比该研究领域中的其他物种更亲近,由此可推测该 2

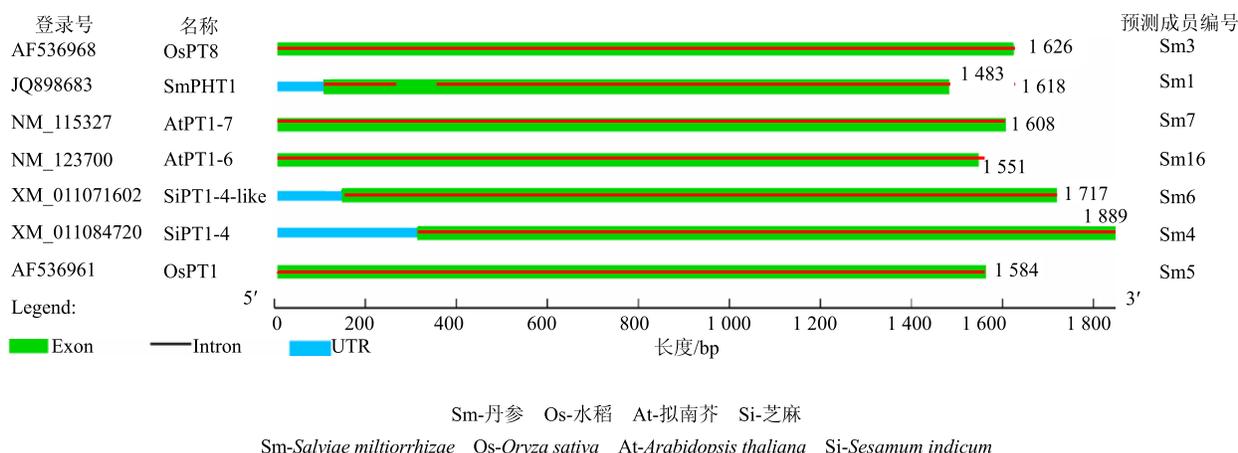


图 1 GSDS 输出的基因结构图
Fig. 1 GSDS output of gene structure

个基因成员的家族地位相对较高，而且 Sm4 和 Sm6 的相似度高达 94%，二者极有可能是同功能基因。并且，由于丹参转录组数据库尚不成熟，目前还不能系统地寻找出基因成员确切的表达特征。

3.2 丹参 Pht1 家族基因编码氨基酸的序列分析

首先将丹参 Pht1 家族基因的核酸序列通过 MEGA 处理得到各个基因的氨基酸序列，再结合 DNAMAN 软件综合分析整个家族成员的同源性和保守域，结果发现这 13 个预测成员的同源性高达 74.34%，且各成员均含有 Pht1 保守的特征序列^[21]GGDYPLSATIMSE，见图 2-A。由此可推测，这些基因均属于 Pht1 家族的成员。再利用 MEGA 和 DNAMAN 对其氨基酸序列比对结果构建 ML 和 NJ 系统进化树，结果均一致，仅显示 MEGA (NJ) 输出结

果，见图 2-B，该家族成员进化树的分支较为分散并未集中成簇，可见其进化水平存在差异。

同时，借助 ClustalW2 工具在线比对得到丹参 Pht1 各预测成员相互间的序列联配得分矩阵，结果见表 2，其得分在 56.05%~96.18%。结合系统发育树和联配得分矩阵图的结果可知，Sm4 与 Sm6 不仅联配得分最高，且平行处于发育树的同一分支上，可见二者进化程度相当，其编码蛋白功能也应相似，其次是 Sm1 与 Smpht1 以及 Sm5 与 Sm11，这 2 组成员也具有各自类似的特点。反之，Sm14 这一成员在系统发育树中处于最外围分支上，且与其他所有预测成员的联配得分均低 (56.05%~61.21%)，说明该成员与其他成员的亲缘关系较远，其编码蛋白的功能上也可能存在较大的差异。

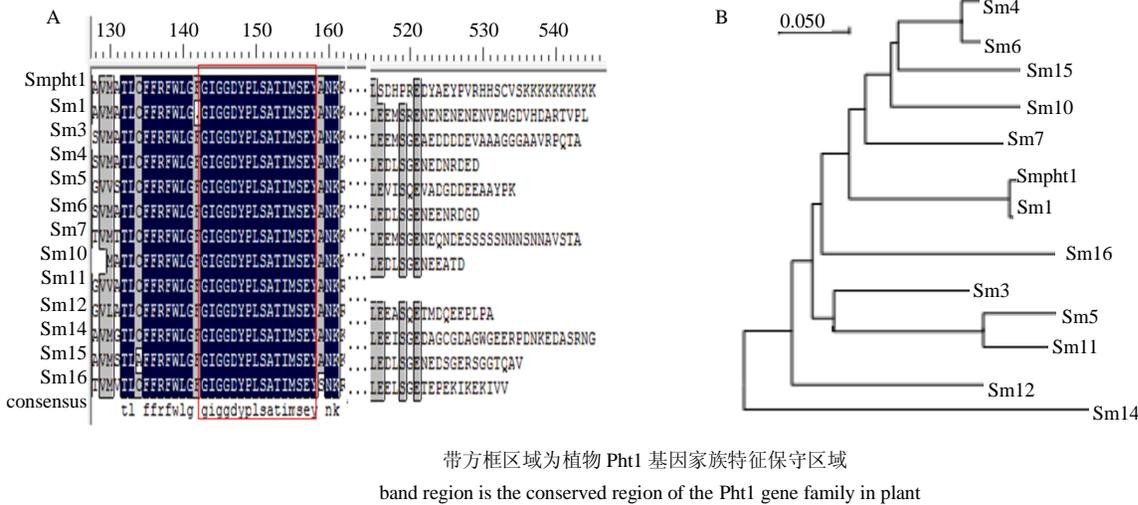


图 2 丹参 Pht1 预测成员保守域 (A) 及系统进化树 (B)

Fig. 2 Conserved sequences (A) and phylogenetic tree (B) of Pht1 predicted genes in *S. miltiorrhizae*

表 2 丹参 Pht1 预测成员序列联配得分矩阵

Table 2 Percent identity matrix of predicted Pht1 in *S. miltiorrhizae*

基因	Sm14	Sm16	Sm7	Sm10	Sm15	Sm4	Sm6	Smpht1	Sm1	Sm12	Sm3	Sm5	Sm11
Sm14	100.00%												
Sm16	56.05%	100.00%											
Sm7	59.35%	69.08%	100.00%										
Sm10	59.74%	69.63%	80.41%	100.00%									
Sm15	60.31%	68.54%	80.65%	82.58%	100.00%								
Sm4	61.21%	70.39%	82.53%	84.09%	86.26%	100.00%							
Sm6	61.21%	69.41%	82.53%	85.10%	84.92%	96.18%	100.00%						
Smpht1	57.23%	64.92%	71.85%	66.67%	68.76%	70.92%	70.53%	100.00%					
Sm1	59.01%	68.02%	78.79%	75.63%	75.94%	79.64%	79.24%	82.17%	100.00%				
Sm12	60.58%	65.76%	72.28%	71.46%	71.35%	72.52%	71.76%	65.82%	70.58%	100.00%			
Sm3	59.58%	68.02%	74.48%	72.34%	73.91%	77.39%	76.44%	67.65%	73.88%	72.05%	100.00%		
Sm5	59.27%	65.24%	71.89%	67.94%	69.07%	72.94%	71.59%	65.81%	71.37%	69.47%	75.90%	100.00%	
Sm11	60.69%	66.84%	73.74%	70.00%	73.49%	74.74%	73.68%	72.22%	73.67%	73.49%	78.74%	89.21%	100.00%

3.3 与其他物种 Pht 基因系统发育树的构建与分析

首先,将 13 个预测成员与模式植物拟南芥^[22]的 Pht1~4 这 4 个亚家族共 19 个基因成员的核酸序列导入 MEGA 软件,借助其 ClustalW 功能进行多重比对,对结果进行整理修饰过后分别采用 ML 和 NJ 方法构建系统进化树,同时与 DNAMAN 输出结果作比较,虽这几种结果较为一致,其中以 MEGA 构建的 ML 树支持率最高,结果见图 3,且与 Guo 等^[23]的研究结果相吻合,从结果中可看出,这 13 个成员均与拟南芥的 Pht1 基因同属于一个分支,再一次验证了这 12 个预测成员均属于 Pht1 家族。

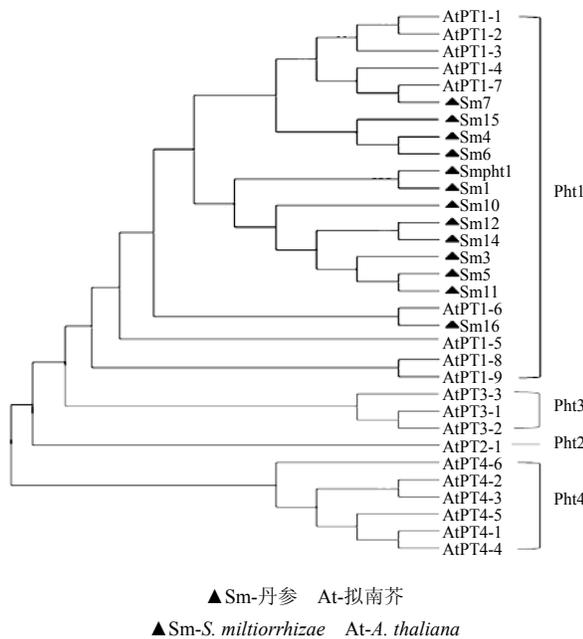


图 3 丹参 Pht1 预测成员与拟南芥 Pht1~4 进化树分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis among predicted Pht1 in *S. miltiorrhizae* and Pht1—4 in *A. thaliana*

采用类似方法,进一步将该 13 个成员与模式植物拟南芥、水稻及目前研究较多的近缘种中已报道的 Pht1 家族成员做氨基酸序列的进化树分析,综合对比 MEGA 与 DNAMAN 分别对 ML 和 NJ 2 种方法建树的输出结果,以 MEGA 构建的 NJ 树支持率更高,见图 4。结果表明,丹参各个预测成员较为均匀地分布在各大分支上,说明各成员间存在进化程度和功能的差异,其中,Sm14 与茄科植物及水稻中已报道的受 AMF 特异性诱导表达的成员同属一个分支,说明丹参中该成员也极有可能具有该特异性。而受 AMF 诱导增强表达的成员则较为分散,暂无规律可循,因此在丹参预测成员中还不能推断

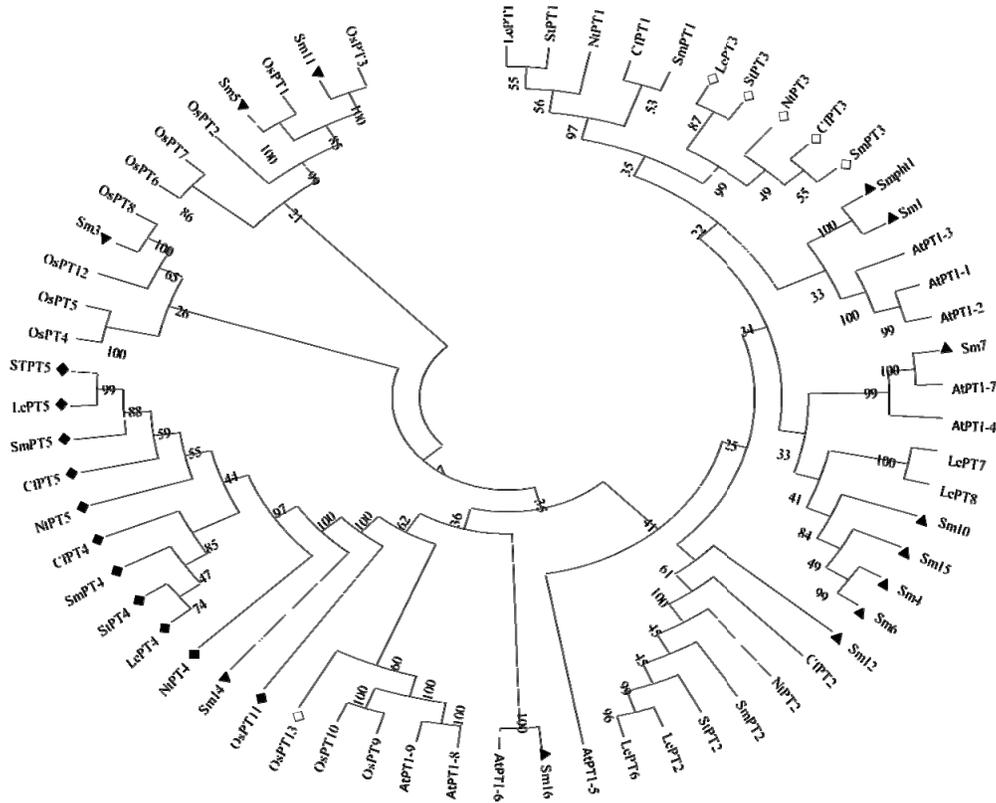
出具有编码类似功能蛋白的基因。

3.4 丹参 Pht1 家族基因的基序分析

利用 MEME 在线工具对丹参和水稻 Pht1 的氨基酸序列进行了保守基序分析,共预测了 8 个 Motifs,结果见图 5,与 Liu 等^[20]对水稻 Pht1 的基序分析结果相比,新增了 2 个 Motif。结果表明,该家族基因成员在 Motif 种类的组成上(Sm10 和 Sm11 因碱基序列有缺失而不纳入比较)大致相同,可能是因为 Pht1 原本就具有高保守特性,但在数量上各成员间存在差异。所以从进化上分析,该家族成员的 Motif 相对保守,所有序列均含有 Motif1~6 这 6 个稳定保守的基序,这与水稻的研究结果吻合,且多了 2 个潜在基序 Motif7 和 Motif8,并且还可根据 Motifs 的序列及位点进一步推断 Motif5 为 Pht1 保守的特征基序。另外,除了 Sm14、OsPT11 和 OsPT13,其余序列均含有 Motif8,结合前面所有 Pht1 成员功能的分析,该 3 个基因表达受 AM 真菌调控,那么 Motif8 很有可能与该功能有关。有趣的是,在构建进化树而进行作氨基酸序列比对时,发现所有会受 AMF 诱导特异性表达的 Pht1 基因中,其氨基酸序列与一般成员之间存在明显差异,但差异性位点多且分散,不易发现其变化规律性,但在 500~510 位点上均有一段共同缺失的区域,即 NNGYNNIG (N 表示该位点的氨基酸具有可变性),如图 5 所示 LePT5&StPT5 因只有部分序列,故未纳入一同展示),刚好对应图 6 中 Motif8 包含的氨基酸序列 DAGYPPGIG,此结果更进一步表明,在植物受 AMF 特异性诱导的 Pht1 基因中,在基因序列的下游区域会缺失 27 个碱基。

4 讨论

通过一系列的生物信息学分析,最终在丹参基因组中筛选出了 12 个 Pht1 候选基因,加上已报道的 SmPht1 共 13 个 Pht1 成员,其同源性高达 74.34%,相互间的同源性在 56.05%~96.18% (图 3),系统进化分支层次分明(图 2),说明丹参 Pht1 家族基因成员在进化过程中保持高度保守的同时,还存在着不同程度的变异,以分配不同的功能作用来共同维持植株体内磷代谢的平衡。在这 13 个成员中,以 SmPht1&Sm1、Sm4&Sm6、Sm5&Sm11 这 3 对基因相互间同源性较高,且在进化树上分别同属一个分支,推测它们每对基因之间属于协同进化的同功能基因。另外,根据对其他物种 Pht1 家族基因生物学



▲Sm-丹参^[5] Os-水稻^[14] At-拟南芥^[15] Le-番茄^[24-26] St-土豆^[25] Sm-茄子^[25] Cf-辣椒^[25] Nt-烟草^[25], 下同
 ◆-受 AMF 特异性诱导表达的基因 ◇-受 AMF 诱导增强表达的基因
 ▲Sm-*Salvia miltiorrhiza*^[5] Os-*Oryza sativa*^[14] At-*Arabidopsis thaliana*^[15] Le-*Lycopersicon esculentum*^[24-26] St-*Solanum tuberosum*^[25]
 Sm-*Solanum melongena*^[25] Cf-*Capsicum frutescens*^[25] Nt-*Nicotiana tabacum*^[25], same as below
 ◆-genes expressed by AMF specific induction ◇-up-regulated expression of genes by AMF induction

图 4 丹参 Pht1 预测成员与其他物种 Pht1 的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic analysis among predicted Pht1 members in *S. miltiorrhiza* and other plant species

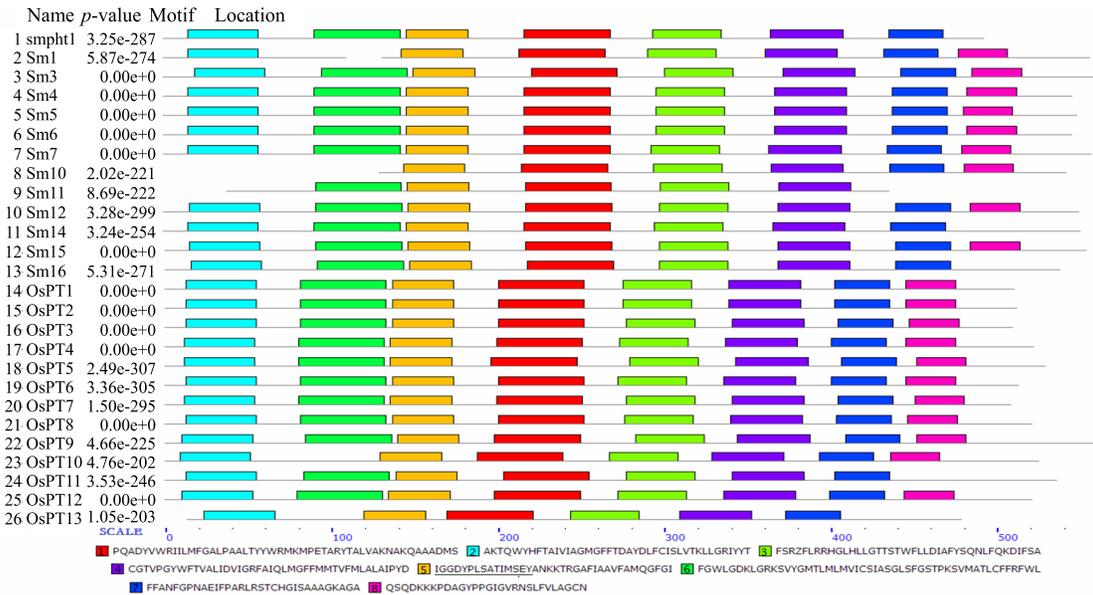


图 5 MEME 预测 SmPT 和 OsPT 基因的模体结构

Fig. 5 Organization of putative motifs in SmPT and OsPT genes predicted by MEME

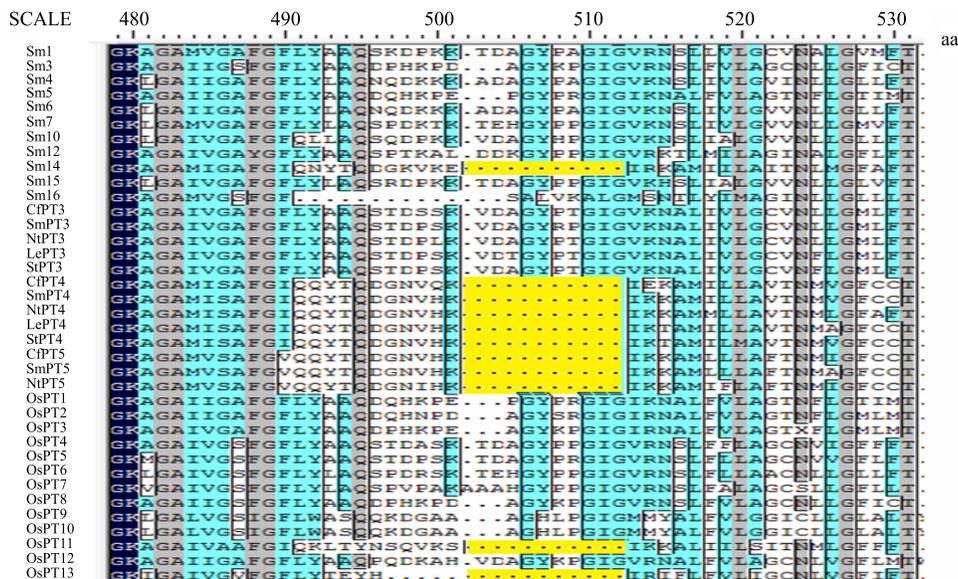


图 6 植物 Pht1 家族中氨基酸序列特异性缺失序列 (黄色填充区域)

Fig. 6 Specific amino acid deletion sequences deleted in Pht1 of plants (region filled in yellow)

功能的参照推测, 有 8 个成员的功能较为明确 (综合表 1、图 1 和图 3 的分析): SmPht1、Sm1、Sm3、Sm5、Sm7 及 Sm11 这 6 个成员将在丹参根部表达, 除了受缺磷特异性诱导表达的 Sm7 和不受磷素供给影响的 Sm3 以外, 其余 4 个均有可能属于缺磷诱导增强表达型基因, 可能对丹参磷素吸收起着重要作用; 另外, Sm7 与 Sm16 还有可能在丹参花器官中表达而参与植株花期磷素平衡的调节作用; 再有, Sm14 编码的则很有可能是一个 AM 真菌诱导特异表达磷转运蛋白, 并发现这类蛋白下游区域存在一个特异性缺失区域—NNGYNNGIG (图 5 和图 6)。这些一系列的预测推断结果, 将为今后进一步认识和利用 Pht1 基因奠定基础, 也为深入研究 Pht1 在丹参生长发育和药效成分代谢中的作用机制提供可靠的研究思路和参考。

5 结语

丹参为常用的活血化瘀药, 因市场需求量大而出现资源短缺, 产量和质量是大规模人工栽培过程中最关心的问题, 磷元素则是关键影响因素之一, 能对丹参生长发育及次生代谢物产生重要的影响。而研究表明^[4]AM 真菌会以不同方式和途径影响植物的磷代谢过程, 进而对植物的生长、抗病性以及产量和品质等都具有重要的作用, 其中的部分作用在丹参中已被证实^[27-28]。本研究中已初步鉴定出与 AM 真菌相关的磷 Pht 基因成员, 这将为阐明 AM 真菌促进丹参生长的作用机制以及利用菌根生物技术提高丹参产量和品质奠定良好基础。

Pht1 家族基因在植物磷营养的吸收和转运中发挥着重要作用, 只有全面深入地认识后才能揭示植物磷代谢的分子机制, 才有助于研究出磷高效吸收的遗传改良品种, 进而在实践应用中实现更高价值。显然, 这一探索路程任重道远, 应先对植物 Pht1 的结构属性、组织分布、信号途径、调控方式以及各成员间相互关系等问题做深入剖析, 并从单个基因到全基因组范围来研究植物 Pht1, 再将这些先进有效的生物研究方法沿用于对药用植物的研究, 将其推向一个新的高度, 进而筛选出低磷有效的基因资源, 为中药资源分子育种研究提供理论依据和技术指导。

参考文献

- [1] Plaxton W C, Lambers H. *Annual Plant Reviews Volume 48: Phosphorus Metabolism in Plants* [M/DB]. [2015-11-31]. <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/978111895884>.
- [2] Bucher M, Rausch C, Daram P. Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants [J]. *J Plant Nutr Soil Sci*, 2001, 164(2): 209-217.
- [3] Karandashov V, Bucher M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(1): 22-39.
- [4] Recorbet G, Abdallah C, Renaut J, et al. Protein actors sustaining arbuscular mycorrhizal symbiosis: underground artists break the silence [J]. *New Phytol*, 2013, 199(1): 26-40.
- [5] 王枫林. 丹参高亲和性磷酸盐转运蛋白基因的克隆与表达分析 [D]. 天津: 南开大学, 2012.

- [6] Peng L, Chen S, Song A, *et al.* A putative high affinity phosphate transporter, CmPT1, enhances tolerance to Pi deficiency of chrysanthemum [J]. *Bmc Plant Biol*, 2014, 14(1): 18-27.
- [7] 薛永峰. 不同氮、磷水平对丹参产量和有效成分的影响 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [8] 韩名宇. 矿质元素对丹参次生代谢物积累的影响与调控 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2015.
- [9] 王 帅. 不同施肥配比对铜川地区丹参生长发育及次生代谢的影响 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2016.
- [10] 夏贵惠. 丹参氮磷钾需求及其与产量质量的关系初探 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [11] Tateno Y, Takezaki N, Nei M. Relative efficiencies of the maximum-likelihood, neighbor-joining, and maximum-parsimony methods when substitution rate varies with site [J]. *Mol Biol Evol*, 1994, 11(2): 261-277.
- [12] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [13] Timothy L. Bailey and michael gribskov, "combining evidence using p-values: Application to sequence homology search" [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(1): 48-54.
- [14] Ai P, Sun S, Zhao J, *et al.* Regulation and function of Pht1 family phosphate transporters in rice [A] // The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI. [C]. Department of Plant Sciences. 2009.
- [15] Mudge S R, Rae A L, Diatloff E, *et al.* Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in Arabidopsis [J]. *Plant J*, 2002, 31(3): 341-353.
- [16] Pudake R N, Mehta C M, Mohanta T K, *et al.* Expression of four phosphate transporter genes from *Finger millet* (*Eleusine coracana* L.) in response to mycorrhizal colonization and Pi stress [J]. *Biotechnology*, 2017, 7(1): 17-26.
- [17] Nagy R, Vasconcelos M, Zhao S, *et al.* Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.) [J]. *Plant Biol*, 2006, 8(2): 186-197.
- [18] Glassop D, Smith S E, Smith F W. Cereal phosphate transporters associated with the mycorrhizal pathway of phosphate uptake into roots [J]. *Planta*, 2005, 222(4): 688-698.
- [19] Liu J, Uhde-Stone C, Li A, *et al.* A phosphate transporter with enhance expression in proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) [J]. *Plant Soil*, 2001, 237(2): 257-266.
- [20] Liu F, Chang X J, Ye Y, *et al.* Comprehensive sequence and whole-life-cycle expression profile analysis of the phosphate transporter gene family in rice [J]. *Mol Plant*, 2011, 4(6): 1105-1122.
- [21] Karandashov V, Bucher M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(1): 22-29.
- [22] Poirier Y, Bucher M. Phosphate transport and Homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Am Soc Plant Biol*, 2002, doi/10.1199/tab.0024.
- [23] Guo B, Jin Y, Wussler C, *et al.* Functional analysis of the *Arabidopsis* PHT4 family of intracellular phosphate transporters [J]. *New Phytol*, 2008, 177(4): 889-898.
- [24] Paszkowski U, Kroken S, Roux C, *et al.* Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 13324-13329.
- [25] Chen A, Hu J, Sun S, *et al.* Conservation and divergence of both phosphate-and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in solanaceous species [J]. *New Phytol*, 2007, 173(4): 817-831.
- [26] Chen A, Chen X, Wang H, *et al.* Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles and genetic redundancy of Pht1 family genes in response to Pi deficiency in tomato [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14(1): 61-75.
- [27] 董 旭, 王 雪, 石 磊, 等. 植物磷转运子 PHT1 家族研究进展 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(3): 799-810.
- [28] Li J H, Qi J X, Yang X Y. Effect of AM fungi on the growth, photosynthetic characteristics and quality of *Salvia miltiorrhiza* Bge under different moisture and phosphorus levels [J]. *Int J Pharma Sci Res*, 2016, 7(1): 18-24.