

苹果 β -微管蛋白基因家族鉴定及表达特性分析

黄慧玲^{1,3}, 王延翔^{1,3}, 王悦^{1,3}, 宁芹芹^{1,3}, 李明^{1,3}, 郝鹏博^{1,3}, 丛柳^{1,3},
白团辉^{1,3}, 史江莉^{1,3}, 焦健^{1,3}, 王苗苗^{1,3}, 刘昱^{1,3}, 赵玉洁^{1,3},
万然^{1,3}, 申亚文^{1,3}, 张恒涛², 张坤玺^{1,3*}, 郑先波^{1,3*}

(¹河南农业大学园艺学院, 郑州 450046; ²中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009;

³河南省苹果种质创新与利用工程研究中心, 郑州 450046)

摘要:【目的】鉴定苹果 β -微管蛋白家族基因, 并探究其差异表达模式, 为进一步开展苹果微管蛋白的功能研究提供理论基础。【方法】基于苹果基因组数据库鉴定苹果 β -微管蛋白家族成员, 并对苹果 β -微管蛋白家族基因进行生物信息学分析, 通过实时荧光定量PCR(RT-qPCR)分析其在苹果不同砧木类型及不同组织中的表达模式。【结果】苹果基因组中有13个苹果 β -微管蛋白家族成员, 随机分布在11条染色体上, 通过进化树分析可将其聚为5个亚组; 多序列比对和基因结构分析表明苹果 β -微管蛋白家族有较强的保守性; 通过启动子顺式作用元件分析发现脱落酸响应元件、茉莉酸甲酯响应元件和厌氧诱导元件在苹果 β -微管蛋白家族基因启动子中分布最为广泛。苹果 β -微管蛋白家族基因存在一定的组织表达特异性, 且*MdTUB4*在矮化砧木中的表达量显著低于乔化砧木, 而*MdTUB12*表达趋势相反, 表明了*MdTUB4*和*MdTUB12*可能参与调控苹果矮生。【结论】鉴定了13个 β -微管蛋白家族基因, 分析了其在苹果矮生中的差异表达特性, 为进一步研究微管蛋白调控苹果矮生提供了理论基础。

关键词: 苹果; 微管蛋白; 基因家族; 矮生

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2025)04-0693-14

Identification and expression characterization of apple β -tubulin gene family in apple

HUANG Huiling^{1,3}, WANG Yanxiang^{1,3}, WANG Yue^{1,3}, NING Qinqin^{1,3}, LI Ming^{1,3}, HAO Pengbo^{1,3},
CONG Liu^{1,3}, BAI Tuanhui^{1,3}, SHI Jiangli^{1,3}, JIAO Jian^{1,3}, WANG Miaomiao^{1,3}, LIU Yu^{1,3}, ZHAO Yu-
jie^{1,3}, WAN Ran^{1,3}, SHEN Yawen^{1,3}, ZHANG Hengtao², ZHANG Kunxi^{1,3*}, ZHENG Xianbo^{1,3*}

(¹College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China; ²Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China; ³Research Center for Apple Engineering and Technology of Germplasm Innovation and Utilisation of Henan Province, Zhengzhou 450046, Henan, China)

Abstract: 【Objective】 Microtubule is composed of α - and β - tubulin heterodimers. It is known that α - and β - tubulins are encoded with large family genes and selected expression of α - and β - tubulin family genes plays key roles in regulating various biological processes, including plant growth and development, stress responses and signaling transduction. However, little is known about apple tubulin family genes and their potential functions. Therefore, the present study was to identify the apple β -tubulin family genes and to determine the candidate β -tubulin genes involved in regulating apple dwarfing. 【Methods】 Using *Arabidopsis thaliana* β -tubulin amino acid sequences as reference, apple β -tubulin family genes were identified from the apple reference genome GDDH13 v1.1. In the following, bioinformatic analysis was conducted to dissect the physicochemical properties, chromosome localization, phylogenetic relationships, gene structure, conserved motifs, collinearity, three-dimensional structure prediction

收稿日期: 2024-12-31

接受日期: 2025-01-22

基金项目: 河南省自然科学基金青年科学基金项目(242300421568); 国家自然科学基金青年科学基金项目(32402496); 河南省重大科技专项(221100110400); 河南省大宗水果产业技术体系(HARS-22-09-Z2); 河南省中央引导地方科技发展资金项目(Z20241471014)

作者简介: 黄慧玲, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果树分子生物学。E-mail: huanghuiling0315@163.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: xbzhen@henau.edu.cn; E-mail: zhangkunxi@henau.edu.cn

and cis-acting elements in their promoter regions of the identified apple β -tubulin family genes. Different tissues including mature and young leaves, xylem, phloem and stem tips of column apple Runtai No. 1 were collected as materials to analyze the tissue expression patterns of apple β -tubulin family genes through quantitative real-time PCR (RT-qPCR). To screen the candidate β -tubulin genes involved in regulating apple dwarfing, the relative expressions of apple β -tubulin family genes in the shoot apex of three apple dwarfing rootstocks (T337, Pamajul and JM7) and three common rootstocks (*Malus prunifolia*, *M. micromalus* and *M. hupehensis*) were compared by RT-qPCR. **【Results】** A total of 13 apple β -tubulin sequences were identified from the apple genome. The lengths of these 13 apple β -tubulins were from 444 aa to 450 aa, and the molecular weights ranged from 49.92 ku to 50.46 ku. The 13 apple β -tubulin genes were randomly distributed on 11 apple chromosomes, and fragment replication events were the main factor attributed to the expansion of apple β -tubulin family genes. Furthermore, phylogenetic tree analysis revealed that apple β -tubulin family can be divided into 5 subfamilies: Class I had 6 members with nomenclature of MdTUB1 to MdTUB6, and MdTUB10 and MdTUB11 were classified into Class II. Except for Class III having only one member of MdTUB9, Class IV and Class V both had 2 members with nomenclatures of MdTUB7 and MdTUB8, MdTUB12 and MdTUB13 separately. Multiple sequence alignments showed that the amino acid sequences of the apple β -tubulins were highly conserved at the N-terminus, but only displayed slight differences at the C-terminus, which was also corroborated by three-dimensional structure prediction of apple β -tubulin family proteins, suggesting that the C-terminus differences might correlate with posttranslational modifications. Gene structure analysis showed that all 13 apple β -tubulin family genes contained 3 exons and 2 introns, and the amino acid sequences contained 10 conserved motifs, indicating that the functions of apple β -tubulin family members were probably highly conserved. The cis-acting element analysis of the promoter region showed that the abscisic acid responsive element, the methyl jasmonate responsive element and the anaerobic induction element were intensively distributed in the promoters of apple β -tubulin family genes. Furthermore, apple β -tubulin family genes displayed certain tissue expression specificities in the column apple Runtai No. 1 variety, for instance, *MdTUB2*, *MdTUB6*, *MdTUB9*, *MdTUB10* and *MdTUB11* were highly expressed in the phloem and *MdTUB3* and *MdTUB5* were mainly expressed in the young leaves. The relative expression of *MdTUB1*, *MdTUB4* and *MdTUB12* in xylems, young leaves and stem tips were significantly higher than in mature leaves and phloem. *MdTUB8* was widely expressed in the detected tissues except for mature leaves, and *MdTUB7* was highly expressed in young leaves and stem tips. In addition, the expression of *MdTUB13* in stem tips were significantly higher than that in other detected tissues. This suggested that different tissues may selectively express different apple β -tubulin family genes to facilitate their growth and development. Furthermore, we found that the expression of *MdTUB4* in the three common rootstocks (*M. prunifolia*, *M. micromalus* and *M. hupehensis*) was significantly higher than that in dwarfing rootstocks (T337, Pamajul and JM7), suggesting that *MdTUB4* may positively regulate apple dwarfing. However, the expression pattern of *MdTUB12* displayed opposite so that the relative expression of *MdTUB12* was significantly higher in dwarfing rootstocks, suggesting *MdTUB12* might negatively participate in regulating apple dwarfing. Apart from the *MdTUB4* and *MdTUB12*, similar expression patterns were not observed with other apple β -tubulin family genes. These results indicated that MdTUB4 and MdTUB12 might be the candidate β -tubulin dwarfing genes involved in regulating apple dwarfing. **【Conclusion】** A total of 13 β -tubulin family genes were identified from the whole apple genome. Different apple tissues may selectively express specific β -tubulin genes to facilitate its growth and development. Furthermore, the selective expression of β -tubulin family genes is highly correlated with apple dwarfing and *MdTUB4* and *MdTUB12* might be the key

genes involved in regulating apple dwarfing. The results will provide a theoretical basis for further research on the regulatory functions of apple dwarfing by β -tubulin genes.

Key words: Apple; β -tubulins; Gene families; Dwarfing

作为植物细胞骨架的重要组成部分,微管(microtubule)对植物组织形态建成、生长发育、胞内物质运输、信号转导等方面均有至关重要的作用^[1-2]。微管是高度动态变化的25 nm管状结构,主要由 α -微管蛋白(α -tubulin, TUA)和 β -微管蛋白(β -tubulin, TUB)异源二聚体组成。自1987年微管蛋白被鉴定后,已发现 α -微管蛋白和 β -微管蛋白通常由多个家族基因编码:拟南芥有6个*AtTUAs*和9个*AtTUBs*^[3];水稻有4个*OsTUAs*和8个*OsTUBs*^[4-6];杨树有8个*PttTUAs*和20个*PttTUBs*^[7],龙眼已鉴定到6个*DITUAs*和9个*DITUBs*^[8]。植物不同组织在不同的发育阶段,可以选择性地表达一个或多个微管蛋白家族成员,进而聚合形成不同稳定性和排列的微管阵列,调控植物组织生长发育和抗逆性^[1,9-11]。如棉花*GhTUB6*和*GhTUB1*分别在纤维细胞起始和伸长时期高度表达;而在纤维发育后期,*GhTUB7*特异性高表达^[12-14]。此外,异常表达微管蛋白基因,常常引起微管的结构和排列变化,最终影响植物的生长发育和抗逆性^[9-10]。例如,大豆 α -微管蛋白的点突变体*it1*导致大豆株高降低,株型紧凑^[15];拟南芥 α -微管蛋白*tua6*突变体引起下胚轴表皮细胞内微管呈斜向甚至纵向排列,抑制下胚轴细胞的纵向伸长,促进细胞横向扩张,最终导致产生更短更粗的下胚轴^[16];玉米 α -tubulin4基因点突变体*ZmDos1*微管排列的方向发生改变,从而引起原生木质部导管次生壁沉积方向变成螺旋形,最终影响其耐旱性^[17]。

苹果(*Malus domestica* Borhk.)是中国最重要的落叶果树之一,其种植面积和产量均居全国首位。苹果矮化密植具有早花、易于管理等优点,苹果栽培模式正由传统的乔化稀植向矮化密植发展。在生产上主要利用矮化砧木或者矮生品种来实现矮化密植,苹果矮化或矮生的机制研究多集中在激素调控领域,普遍认为激素调控树体节间的细胞分裂和细胞伸长,从而调控矮化或矮生^[18-20]。而从植物细胞生长发育来看,微管的排列决定了细胞的伸长和分裂,也是调控植物矮化的中心,而且大部分激素都通过调节微管的排列来促进或抑制细胞的伸长^[1,21-22],但微管调控苹果矮化或矮生的相关研究鲜有报道。因

此,笔者在本研究中鉴定了苹果 β -微管蛋白家族基因,对其进行系统进化树、基因结构分析等生物信息学分析,并通过RT-qPCR明确其在苹果不同组织及不同砧木中的表达模式,为进一步探究苹果 β -微管蛋白家族基因的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

选取种植于河南农业大学毛庄苹果试验基地的矮化砧木 T337、Pamajul、JM7,乔化砧木楸子(*M. prunifolia*)、西府海棠(*M. micromalus*)、平邑甜茶(*M. hupehensis*)和柱形苹果润太一号为试验材料,在同一时期选取1年生枝条的木质部、韧皮部、成熟叶片、幼嫩叶片和茎尖等组织部位,将采集好的样品用锡箔纸包裹,液氮速冻后运送至实验室,存放于-80 °C的超低温冰箱中,以备后续使用。

1.2 试验方法

1.2.1 苹果MdTUBs家族基因的鉴定与分析 利用Pfam数据库(<http://pfam-legacy.xfam.org>)获得TUBs家族基因保守结构域Pfam登录号:PF00091/PF03953,通过隐马尔可夫模型(hidden markov model, HMM)在苹果基因组数据库(<https://www.rosaceae.org>)中搜索所有含有该结构域且E-value<1⁻⁷的基因序列;同时以拟南芥中9个*AtTUBs*基因的序列为模板鉴定苹果MdTUBs基因,在苹果基因组数据库网站中进行比对筛选并命名。利用MEGA11软件将苹果与其他植物的TUBs基因家族成员氨基酸序列进行序列比对,使用TBtools软件构建邻接系统发育树,bootstrap复制为1000,最后使用iTOL(<https://itol.embl.de>)在线工具进行美化。利用MEME-suite(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)在线工具对苹果MdTUBs家族成员的保守基序(motif)进行分析,保守基序个数设为10个。根据下载的苹果MdTUBs的CDS序列与DNA全长序列,使用TBtools软件绘制基因结构图。

1.2.2 苹果MdTUBs家族的染色体定位及共线性分析 根据苹果基因组注释文件,利用TBtools获取染色体位置信息并绘制染色体位置分布图,对Md-

TUBs 家族在进化过程中可能发生的基因复制事件,利用 TBtools 软件 One StepMCSanX-Super Fast 等程序分析苹果 MdTUBs 物种内共线性关系,并使用 TBtools 软件的 Advanced Circos 程序对结果进行可视化分析。

1.2.3 苹果 MdTUBs 家族蛋白三维结构预测 将苹果 MdTUBs 家族成员蛋白序列依次上传到蛋白质三维结构在线预测网站 (Swiss-Model <https://swissmodel.expasy.org>),即可得到各成员的蛋白质三维预测结构。

1.2.4 苹果 MdTUBs 基因家族成员顺式作用元件分析 使用 TBtools 软件从苹果全基因组序列中提取 MdTUBs 基因家族每个成员基因序列上游 2000 bp 区域的序列作为启动子序列,将其上传至在线预测网站 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测 MdTUBs 基因家族启动子区域顺式作用元件,并使用 TBtools 软件的 Simple

BioSequence Viewer 程序对预测的结果进行可视化作图。

1.2.5 植物 RNA 的提取和 cDNA 合成 将不同苹果砧木和润太一号苹果的各个组织的样品在液氮预冷的研钵中快速研磨成粉末状,分别取 50~100 mg 分装到 2 mL 离心管内,用于提取总 RNA。总 RNA 按照华越洋 RNA 提取试剂盒(北京华越洋生物科技有限公司)试验操作说明提取,检测所提取的总 RNA 浓度,采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳对获得的总 RNA 样品检测后,按照 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper0)逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)说明书上的步骤进行逆转录获得 cDNA,用于实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析。

1.2.6 RT-qPCR 分析 根据获得的 13 个苹果 β -tubulin 的碱基序列,通过 Primer Premier 5 设计特异性的定量引物(表 1),引物均由生工生物公司合成。RT-qPCR 的反应体系(10 μ L):5 μ L SYBR Green PCR

表 1 定量引物的设计

Table 1 Design of quantitative PCR primers

基因名称 Gene name	引物序列-F(5'-3') Primer sequences-F(5'-3')	引物序列-R(5'-3') Primer sequences-R(5'-3')
<i>MdTUB1</i>	CCTCACTCTCCAAAACCCTTCG	CACTGGCCTCCCTGGATGTG
<i>MdTUB2</i>	TCAAATCCAACCGTTACGACC	AGGGTTAGGGTTTGGGGTCT
<i>MdTUB3</i>	GGAGAGGGATCGAGGGACAA	ATCAATGCCAGAAAGCAAGCG
<i>MdTUB4</i>	TAGCAGTTCAGTGGTCCGAA	AAACCCACCATCAAACAAAATGCAC
<i>MdTUB5</i>	TGTACCCGTCCAAGTGGAGA	CCAAGGCTCACAAGTGAAGC
<i>MdTUB6</i>	ATATCCGCCCTCTTACTCCCT	CGATCTGGTTGCCGCATTG
<i>MdTUB7</i>	ACACCGACTTCGGATACACTC	ACTTGGAGCCGATCTGGTTG
<i>MdTUB8</i>	AACCCTAAAAGCGCAGCAGA	CCAGAAGTGGAGCCGATCT
<i>MdTUB9</i>	GGTGCTTGATGAATCGTGCC	ATACAAGGACCCCTCCCACA
<i>MdTUB10</i>	AGCGCAGTGGTGTTTAGGA	AGAAGTCTCGAAAAGATGGCTCA
<i>MdTUB11</i>	TCTTACGCATCTTCCCCGTTT	GTGTTACCGGTGTACTGCC
<i>MdTUB12</i>	AGGAGGAAGAGCTGGAGGATT	AACCCAAATCCCACGAATGGA
<i>MdTUB13</i>	GCTGGAGAAGTGGAGATTGGA	TCCCTAAGAATGGGAAGGCT

Master mix,各 0.5 μ L 的正、反向引物,1 μ L cDNA,3 μ L ddH₂O,利用荧光定量仪(北京酷搏科技有限公司)进行苹果 β -tubulin 各家族基因的表达量分析,以苹果 *Actin* 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行苹果 β -tubulin 各基因家族的定量分析^[23]。

1.2.7 数据分析与作图 试验数据使用 Microsoft Office Excel 进行统计,差异显著性分析使用 SPSS 软件进行单因素方差分析,使用 Graphpad Prism 8.0 软件绘制柱形图。

2 结果与分析

2.1 苹果 MdTUBs 基因家族成员鉴定与分析

利用隐马尔可夫模型(HMM)在苹果基因组数据库中搜索 MdTUBs 基因,并以拟南芥 AtTUBs 基因家族的氨基酸序列为参考,最终从苹果 GDDH13 v1.1 基因组中鉴定到 13 个 MdTUBs 基因家族成员。根据其拟南芥微管蛋白 AtTUBs 的相似性,对苹果中的 MdTUBs 进行命名(表 2)。通过分析发现,13

表2 苹果 MdTUBs 基因家族成员基本信息

Table 2 Basic information of apple β -tubulin gene family members

基因名称 Gene name	染色体位置 Chromosome position	碱基长度 Base length/bp	氨基酸长度 Amino acid length/aa	分子质量 Molecular weight/ku	基因ID Gene ID
<i>MdTUB1</i>	Chr01:297 866	1344	448	50.31	MD01G1201800
<i>MdTUB2</i>	Chr12:238 747	1344	448	50.43	MD12G1158100
<i>MdTUB3</i>	Chr11:712 372	1341	447	50.37	MD11G1084600
<i>MdTUB4</i>	Chr07:337 780	1344	448	50.30	MD07G1270800
<i>MdTUB5</i>	Chr01:182 023	1344	448	50.39	MD04G1143700
<i>MdTUB6</i>	Chr03:644 799	1341	447	50.35	MD03G1080000
<i>MdTUB7</i>	Chr08:955 136	1350	450	50.45	MD08G1012800
<i>MdTUB8</i>	Chr15:641 556	1350	450	50.46	MD15G1011800
<i>MdTUB9</i>	Chr05:404 610	1335	445	49.92	MD05G1269400
<i>MdTUB10</i>	Chr06:357 178	1350	450	50.13	MD06G1226500
<i>MdTUB11</i>	Chr14:315 868	1350	450	50.20	MD14G1235900
<i>MdTUB12</i>	Chr14:160 403	1332	444	49.96	MD14G1103900
<i>MdTUB13</i>	Chr06:201 638	1332	444	49.99	MD06G1082200

个苹果 β -微管蛋白的编码区碱基长度均在1332~1350 bp之间,氨基酸长度在444~450 aa之间;最长的MdTUBs成员是MdTUB7、MdTUB8、MdTUB10和MdTUB11,分子质量介于49.92~50.46 ku。

2.2 苹果 MdTUBs 家族成员染色体分布定位及共线性分析

为了将MdTUBs家族基因在苹果染色体上的位置可视化,利用生物信息学分析工具TBtools绘制了MdTUBs家族成员在苹果的11条染色体上的分布图(图1)。分析结果显示,13个MdTUBs基因家族

成员不均匀地分布在11个苹果染色体上,在6号和14号染色体上分布2个,其余染色体上均分布1个。为探究苹果MdTUBs基因家族的进化机制,对定位在染色体上的13个MdTUBs基因家族成员进行共线性分析(图2),通过MCscan分析,鉴定了苹果MdTUBs基因家族的串联重复和片段重复基因对,在同一染色体上距离小于200 kb的紧密相关基因被定义为串联重复,其余的则被定义为片段重复^[24]。苹果种内共线性分析发现,苹果MdTUBs基因家族没有串联重复事件序列,但存在18个片段重

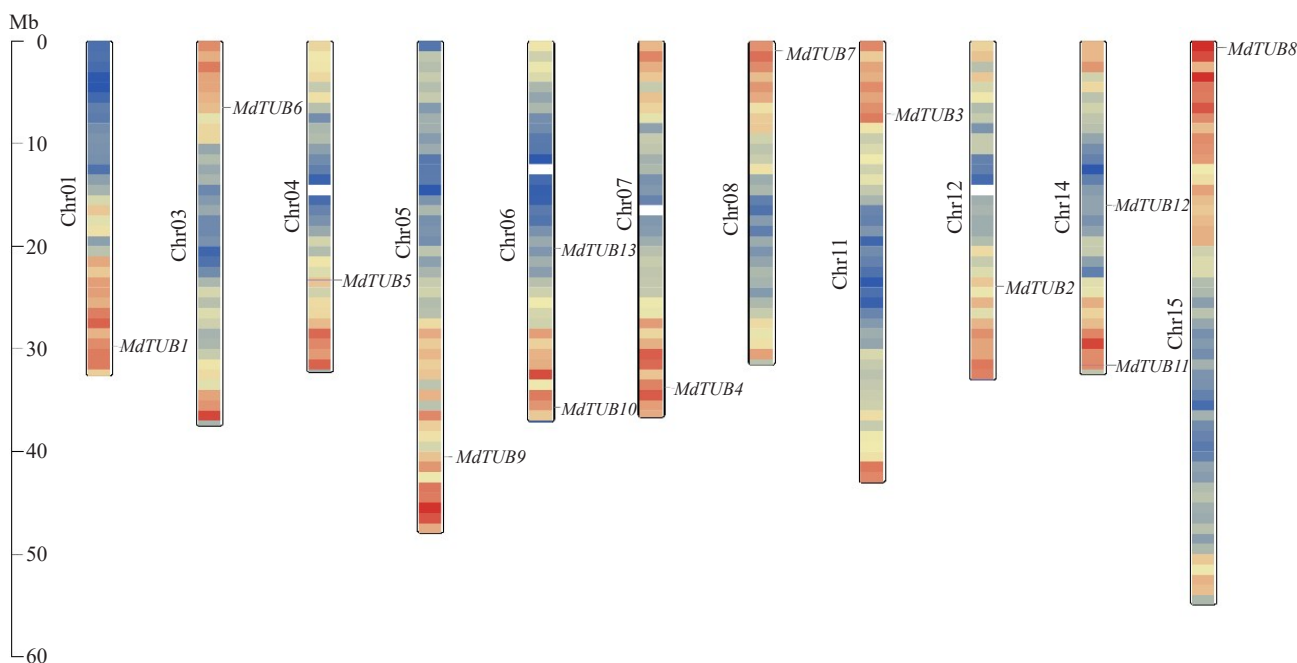


图1 苹果 MdTUBs 家族基因在染色体上的分布

Fig. 1 Chromosomal distribution of apple β -tubulin family genes

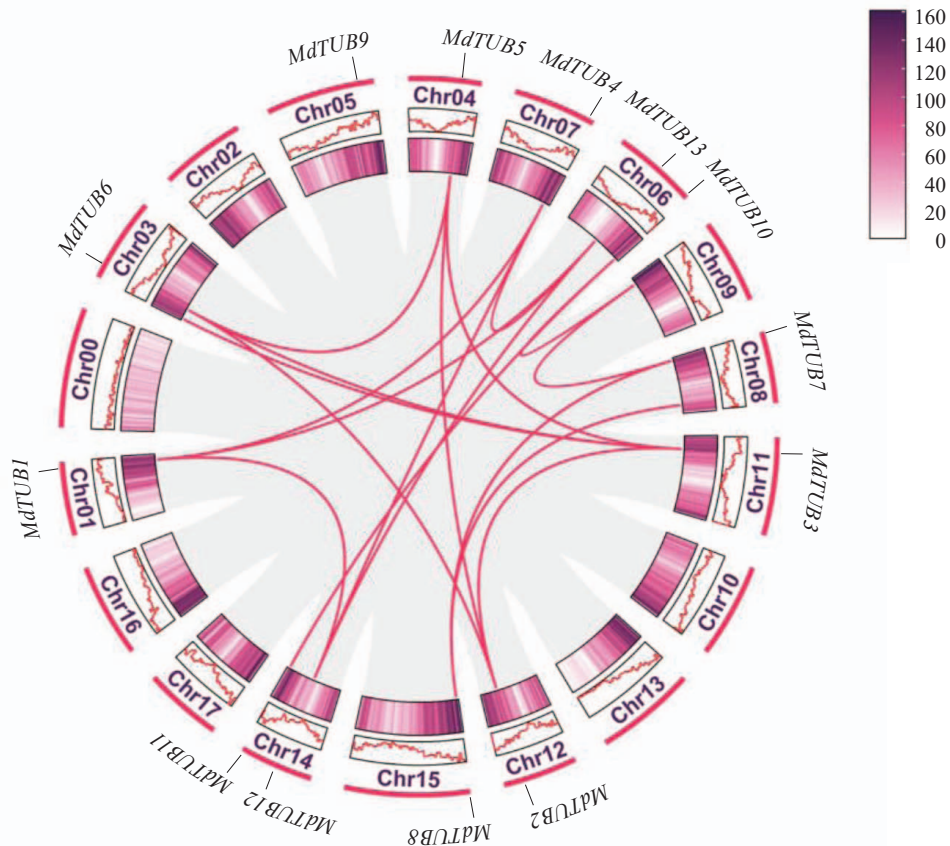


图2 苹果 MdTUBs 基因家族成员间共线性分析

Fig. 2 Collinearity analysis of β -tubulin gene family members in apple

复基因对,结果表明了片段重复在苹果 MdTUBs 基因家族进化中起主导作用。

2.3 苹果 MdTUBs 基因家族的进化树分析

使用 MEGA11 对来自苹果、拟南芥、牛筋草、陆地棉、苜蓿、水稻、狗尾草、马铃薯、小麦、玉米、百日菊等的 TUBs 家族成员构建系统进化树(图3),结果显示苹果 MdTUBs 基因家族成员可以分为5大类,除了 MdTUB9 之外,其余家族成员都是以成对的形式出现在系统进化树中。第一类包括6个成员,分别为 MdTUB1~6,其中 MdTUB1 与 MdTUB4、MdTUB2 与 MdTUB5、MdTUB3 与 MdTUB6 有较近的亲缘关系且以成对的形式出现。第二类包括 MdTUB10 和 MdTUB11,与苜蓿 MtTUB2 归为一类。第三类只有1个成员 MdTUB9,与拟南芥 AtTUB4、AtTUB9 归为一类。第四类包括2个成员 MdTUB7 和 MdTUB8,也是以成对的形式出现,与陆地棉 GhTUB6 归为一类。第五类包含2个成员,即 MdTUB12 和 MdTUB13,与苜蓿 MtTUB6、陆地棉 GhTUB7 和 GhTUB10 归为一类。

2.4 苹果 MdTUBs 基因家族的序列比对

对苹果 MdTUBs 家族成员的氨基酸进行了多序列比对分析(图4),发现13个 MdTUBs 蛋白氨基酸序列的一致度达到94.77%,表明了苹果 MdTUBs 成员之间具有高度保守性。此外,13个苹果 MdTUBs 成员的N端氨基酸序列高度保守,只有C末端氨基酸序列表现出较大的差异。

2.5 苹果 MdTUBs 微管蛋白家族基因的结构和保守基序分析

根据基因组注释信息,利用 TBtools 软件对苹果 MdTUBs 基因家族的基因结构进行可视化分析(图5),结果表明苹果 MdTUBs 家族成员的基因结构高度相似。为了明确苹果 MdTUBs 家族基因的蛋白保守结构域,将苹果 MdTUBs 家族成员蛋白序列上传至在线工具 MEME-suite,获得基因结构注释文件,配合使用金冠苹果基因组数据库 gff3 文件,利用 TBtools 软件作图分析(图5),结果显示苹果13个 MdTUBs 蛋白质序列中均含有10个保守基序(motif 1~10),表明这些 MdTUBs 蛋白序列具有极其相

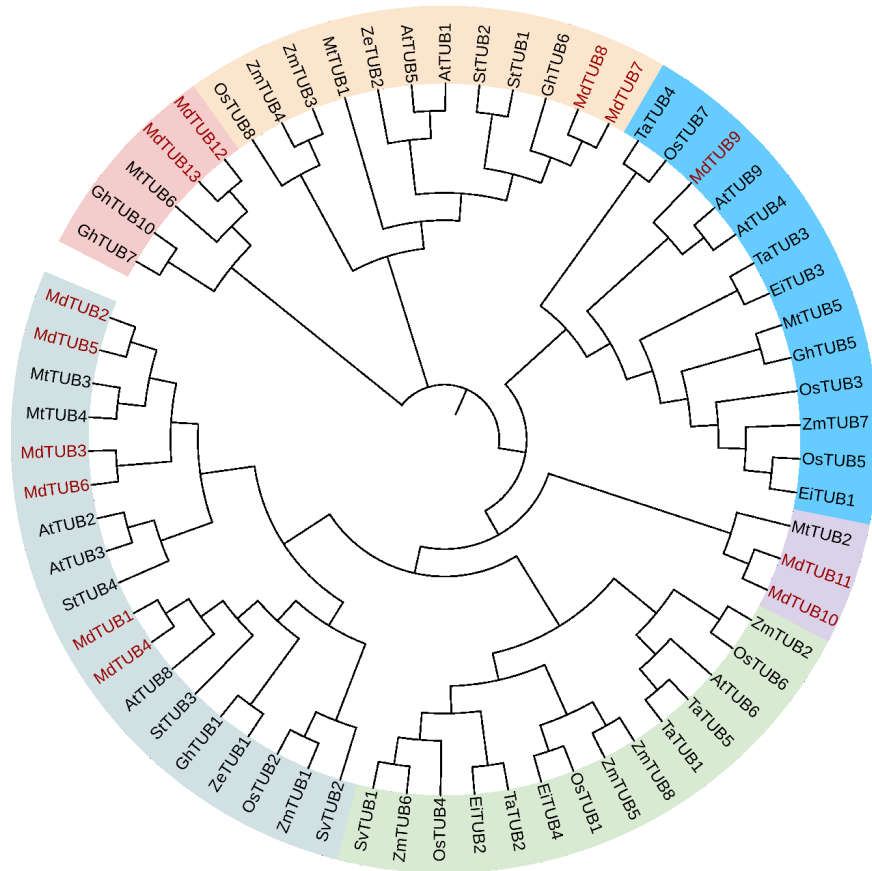


图3 苹果 MdTUBs 家族成员的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of apple β -tubulin family members

似的保守结构域分布模式,可能具有相似的生物学功能。

2.6 苹果 MdTUBs 微管家族蛋白三维结构预测

将 MdTUBs 微管蛋白家族各成员蛋白序列上传至 Swiss-Model 在线工具,预测各成员的蛋白三维结构模型(图6),苹果 MdTUBs 微管蛋白家族的蛋白结构预测的 GMQE 值均大于 0.85,证明预测结构较为可信。根据预测结果可以发现,苹果 MdTUBs 微管蛋白家族的蛋白结构基本一致,所有的苹果 MdTUBs 家族蛋白的 C 端尾部均有一段不同数量的谷氨酸或甘氨酸残基构成的 CTT 结构,可能与蛋白翻译后修饰密切相关^[25]。

2.7 苹果 MdTUBs 家族基因启动子顺式作用元件分析

顺式作用元件在一定程度上可以反映基因的转录调控作用,为了进一步明确苹果 MdTUBs 家族成员的调控模式及潜在功能,利用 Plant CARE 预测了苹果 13 个 MdTUBs 基因 2000 bp 启动子的顺式作用元件,并使用 TBtools 软件进行可视化分析。苹果

MdTUBs 家族成员启动子区域的顺式作用元件如图 7 所示,每个 MdTUBs 家族成员都含有至少 4 种顺式作用元件,依据其功能可以将这些顺式作用元件分为四大类,分别是与生长和发育调节相关的响应元件、激素响应元件、植物代谢响应元件和胁迫响应元件^[26],表明了苹果 MdTUBs 家族成员可能在植物激素调控、生长发育、植物代谢和应对环境胁迫方面发挥作用。

2.8 苹果 MdTUBs 家族基因在柱形苹果润太一号组织中的表达分析

以柱形苹果润太一号 1 年生枝条的成熟叶片、韧皮部、木质部、嫩叶和茎尖 5 个组织为材料,利用 RT-qPCR,分析了苹果 MdTUBs 家族基因在不同组织中的表达水平。如图 8 所示, MdTUB2、MdTUB6、MdTUB9、MdTUB10 和 MdTUB11 在韧皮部组织中都有较高的表达量,在嫩叶和茎尖中表达量较少; MdTUB3 和 MdTUB5 在嫩叶组织中表达量最高,其次是成熟叶和茎尖; MdTUB1、MdTUB4 和 MdTUB12 在木质部、嫩叶和茎尖的表达量高于成熟叶和韧皮部;

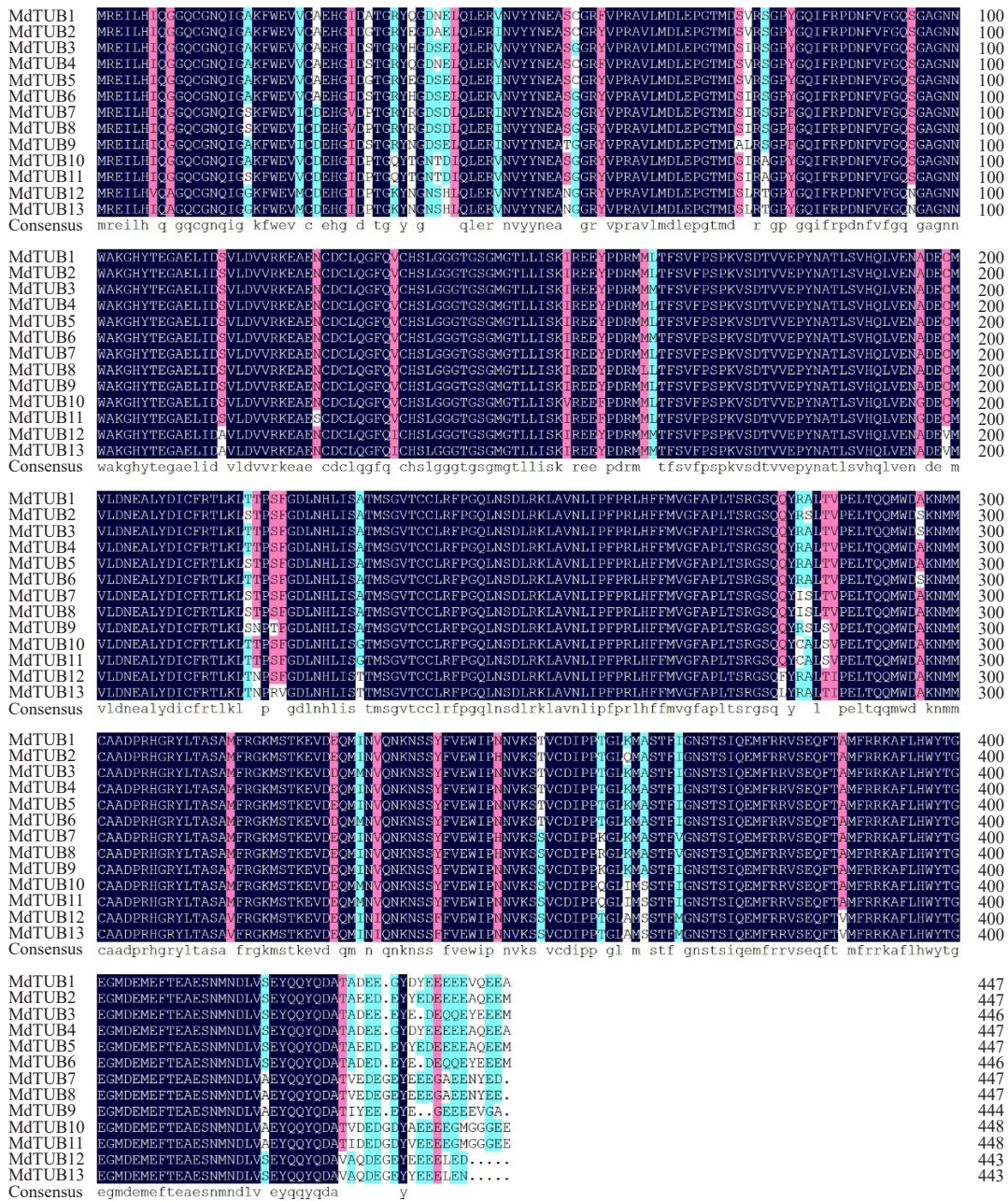


图4 苹果 MdTUBs 家族蛋白多序列比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of apple β -tubulin family proteins

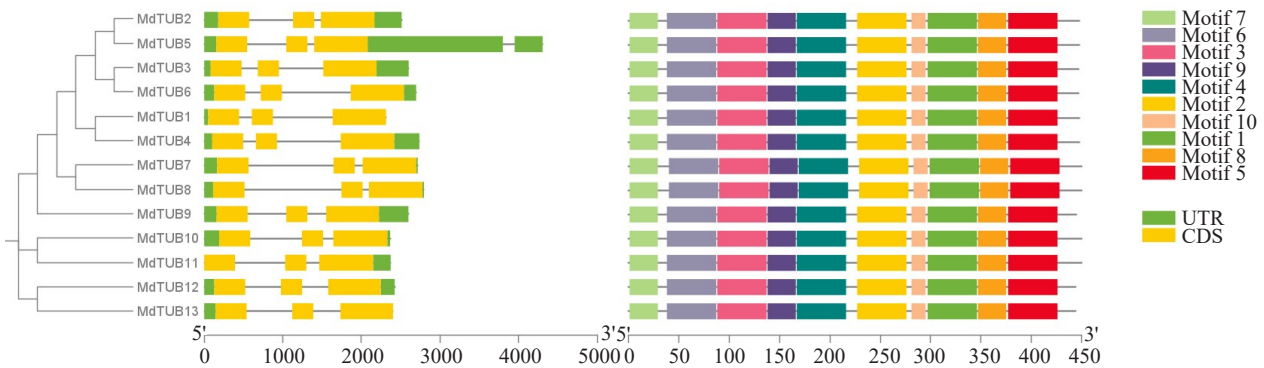


图5 苹果 MdTUBs 基因结构和保守 Motif 分析

Fig. 5 Gene structure and motif analysis of apple β -tubulin

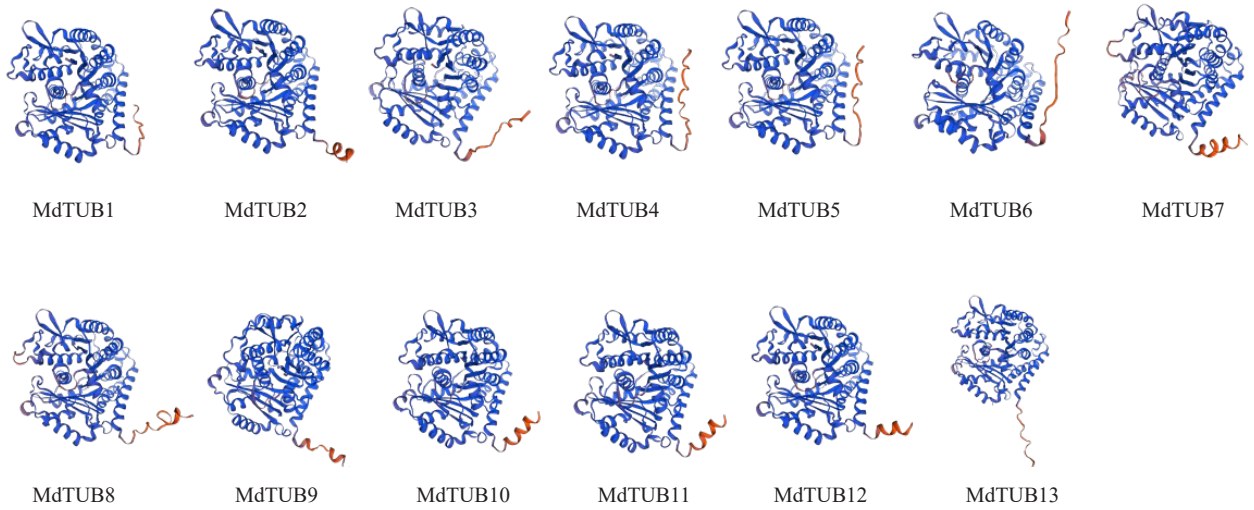


图6 苹果 MdTUBs 家族蛋白三维结构预测

Fig. 6 Three-dimensional structure prediction of apple β-tubulin family proteins

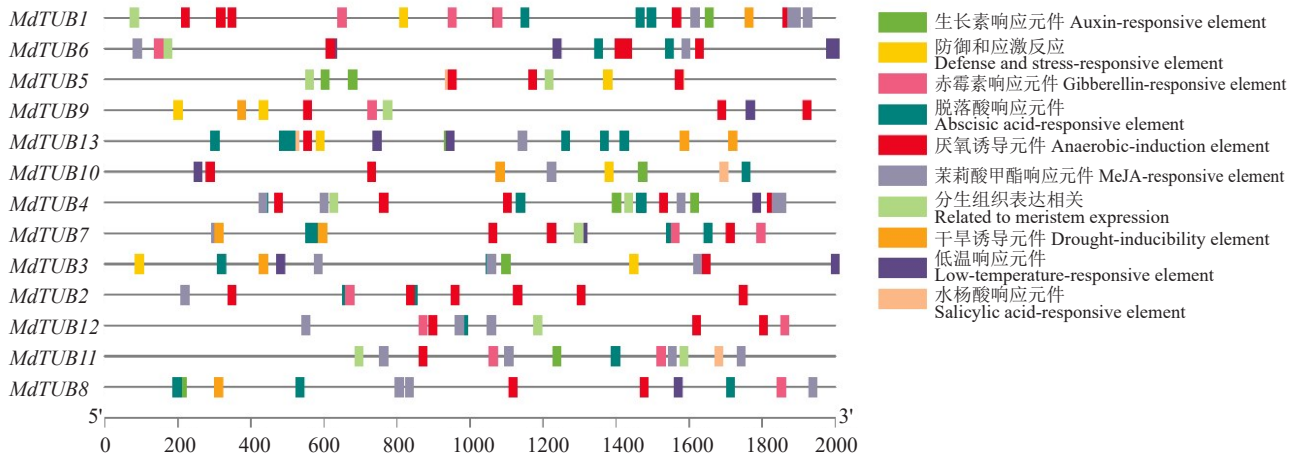
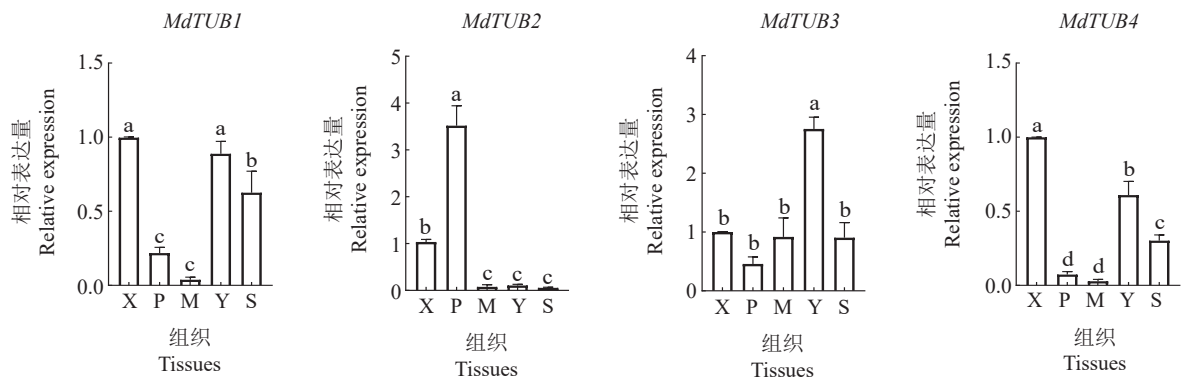


图7 苹果 MdTUBs 家族基因启动子区域顺式作用元件分布情况

Fig. 7 Cis-acting elements distribution in the promoter regions of β-tubulin family genes in apple



X. 木质部;P. 韧皮部;M. 成熟叶片;Y. 嫩叶;S. 茎尖。

X. Xylem; P. Phloem; M. Mature leaves; Y. Young leaves; S. Stem tip.

图8 苹果 MdTUBs 家族基因在苹果润太一号不同组织中的表达量

Fig. 8 The relative expression of β-tubulin family genes in different tissues of Runtai No. 1

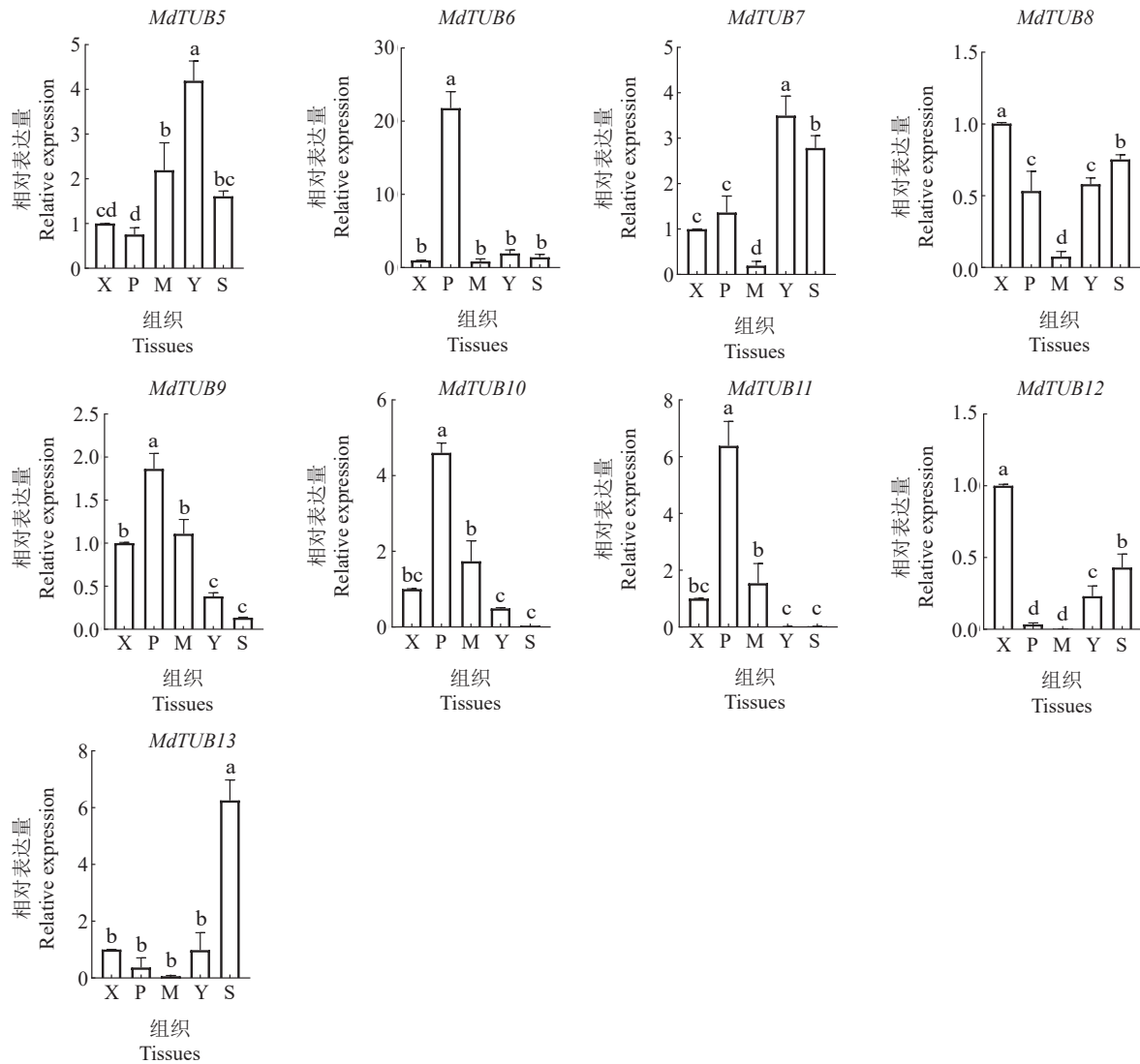


图 8 (续) Fig. 8 (Continued)

*MdTUB8*除了在成熟叶中的相对表达量较低之外,在其他组织中均有一定的表达量;*MdTUB7*在嫩叶和茎尖中的表达量较高而在成熟叶中表达量较低;*MdTUB13*在茎尖中的表达量远高于其他组织,而在成熟叶中几乎不表达。

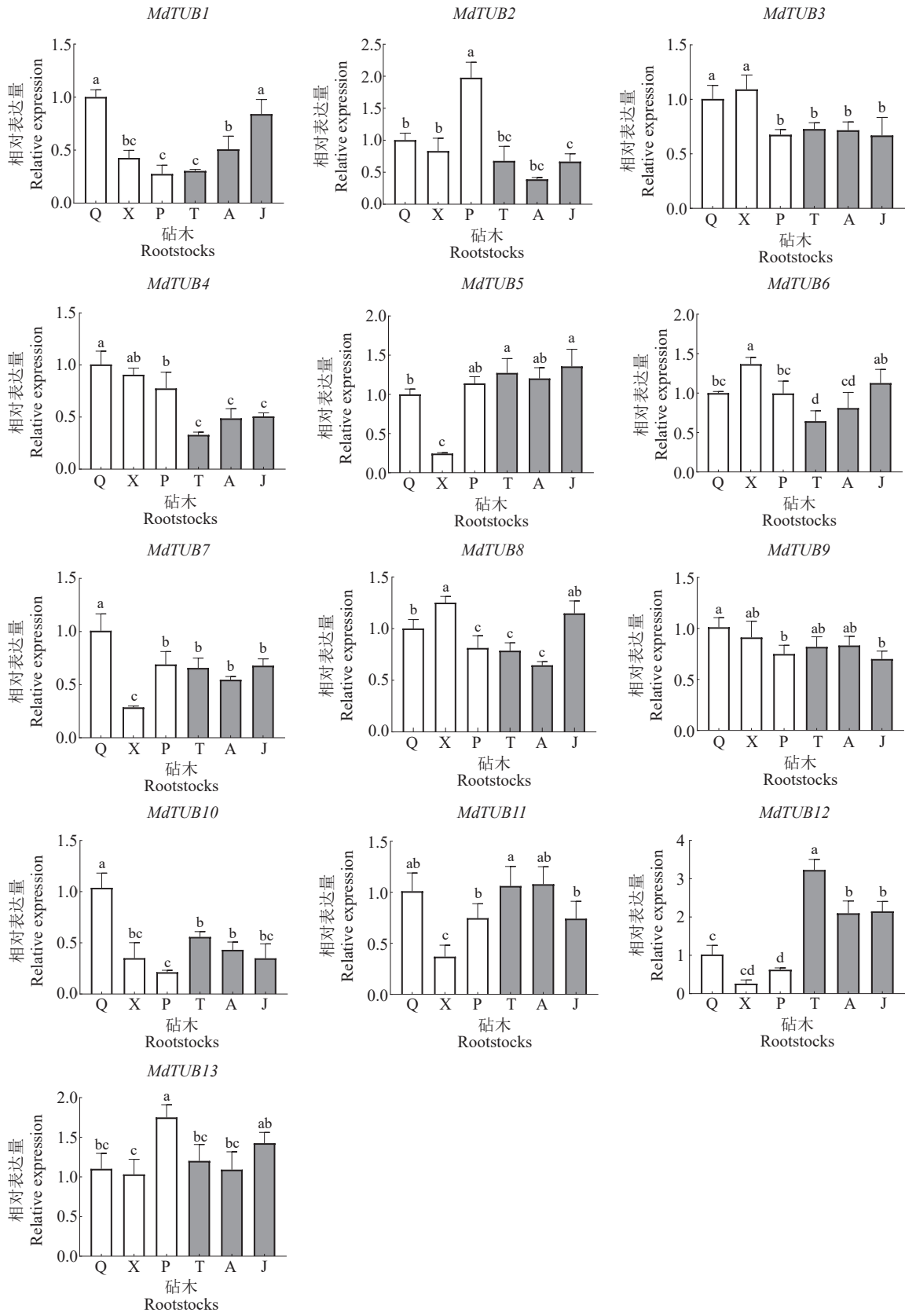
2.9 苹果 *MdTUBs* 家族基因在矮化砧木与乔化砧木茎尖的差异表达分析

以矮化砧木 T337、Pamajul、JM7 和乔化砧木 榧子 (*M. prunifolia*)、西府海棠 (*M. micromalus*)、平邑甜茶 (*M. hupehensis*) 的茎尖为材料,通过实时定量 RT-qPCR,明确其在苹果不同砧木中的表达模式。如图 9 所示,*MdTUB4* 在矮化砧木中的表达量显著低于乔化砧木,而 *MdTUB12* 在矮化砧木中的表达量显著高于乔化砧木,其他苹果 *MdTUBs* 家族成员在矮化和乔化砧木中的表达未见明显规

律。结果表明了 *MdTUB4* 和 *MdTUB12* 可能参与调控苹果矮生。

3 讨论

自 1963 年发现植物微管后,大量的研究揭示了微管在调控植物生长发育中的作用。随着荧光蛋白和转基因技术的应用,使微管在植物细胞内可视化,发现微管是动态变化的管状结构,其快速变化和动态排列对植物细胞有丝分裂、细胞伸长和物质运输都有着重要调控作用,进而调控植物的生长发育、果实的生长发育、木材形成和抗逆性等^[22,27-29]。植物如何调控微管的动态变化和排列进而调控组织器官形态建成一直是研究的热点。普遍认为微管蛋白家族基因的选择性表达对微管的动态变化和排列至关重要。因此,鉴定微管蛋白家族基因成员和分析其表



Q. 楸子; X. 西府海棠 . P. 平邑甜茶; T. T337; A. Pamajul; J. JM7。

Q. *Malus prunifolia*; X. *Malus micromalus*; P. *Malus hupehensis*; T. T337; A. Pamajul; J. JM7.

图9 苹果 *MdTUBs* 家族基因在矮化砧木与乔化砧木茎尖中的表达量

Fig. 9 The relative expression of β-tubulin family genes in shoot tips of dwarf rootstocks and arborescent rootstocks

达模式,可以为全面了解微管蛋白的功能提供基础。随着越来越多的物种全基因组组装成功,已陆续在拟南芥、毛竹、龙眼、杨树、水稻等多种植物中鉴定到了微管蛋白家族基因^[30],而且发现微管蛋白通常以多基因家族的形式出现,在特定的细胞类群和组织器官中,植物可以选择性地表达某个或多个微管蛋白家族基因,进而组装成不同动态性的微管阵列,从而调控特定细胞和组织的生长发育^[31-35]。然而相关的研究在苹果中未有报道。笔者在本研究中基于苹果 GDDH13 v1.1 基因组数据库^[36],鉴定到了 13 个 MdTUBs 家族成员,它们分别定位于 11 条染色体上。对其种内共线性分析发现,苹果 MdTUBs 家族没有串联重复事件序列,只存在 18 个片段重复基因对,表明苹果 MdTUBs 家族扩增主要为片段重复事件。已有研究报道微管蛋白家族成员在真核生物中具有较高的保守性^[37-38],在本研究中,通过多序列比对发现苹果的 13 个 MdTUBs 家族成员的相似度达到 94.77%,通过基因结构分析发现 MdTUBs 家族成员都包含共有的保守基序,三维结构预测发现苹果 MdTUBs 家族蛋白具有较一致的结构,表明了苹果 MdTUBs 家族成员之间具有高度保守性。系统进化树分析发现,苹果 MdTUBs 家族成员聚为五大类,除了 MdTUB9 之外,其余成员均以成对的形式出现在进化树中。在植物的生长和发育过程中,需要整合不同组织或环境信号来调控基因的表达,在这一过程中,转录起始是至关重要的一环,顺式作用元件作为转录因子特异结合的位点,它们在调控基因表达中的作用不可忽视。苹果 MdTUBs 家族基因启动子含有多个激素响应元件和胁迫响应元件,表明苹果 MdTUBs 基因家族可能在植物激素调控和应对环境胁迫方面发挥作用。

已有研究发现在植物发育的特定阶段或特定的细胞类型中会选择性地表达微管蛋白家族基因,参与到不同组织不同的生长发育阶段。例如,水稻在开花前 *OsTUBA1* 和 *OsTUBA2* 大量积累,而在开花过程中 *OsTUBA3* 大量表达^[4-5];在玉米的根系中, *ZmTUB1* 和 *ZmTUB2* 主要表达在根的皮肤中^[39-40], *AtTUA1* 和 *AtTUB9* 在拟南芥的花粉中高度表达^[41];在毛竹中, *PhTUA4* 在花序中表达量相对较高,而 *PhTUA1*、*PhTUB1* 和 *PhTUB11* 分别在根、笋和鞭中的表达量高于叶和花序中^[30,42]。笔者在本研究中发现苹果 MdTUBs 家族基因在不同组织中的表达模式

有一定差异:苹果 *MdTUB2*、*MdTUB6*、*MdTUB9*、*MdTUB10* 和 *MdTUB11* 在韧皮部组织中表达量最高, *MdTUB1*、*MdTUB4*、*MdTUB8* 和 *MdTUB12* 在木质部中表达量最高,而 *MdTUB3*、*MdTUB5* 和 *MdTUB7* 在嫩叶中表达量最高, *MdTUB13* 在茎尖组织中表达量远高于其他组织,这表明它们可能参与调控苹果不同组织的生长发育。

在梨矮生型品种 *Nein Vert* 中鉴定到一个 *PpTUB* 基因 PCP044487.1 可能与矮生相关,其在矮生型梨品种茎尖中的表达量低于乔化梨品种^[43]。笔者在本研究中也得到了相似的结果,在苹果乔化砧木中, *MdTUB4* 的表达量显著高于矮化砧木,而 *MdTUB12* 呈现出了相反的趋势。这表明苹果 MdTUB4 和 MdTUB12 蛋白可能参与调控苹果矮生。随着苹果遗传转化体系和基因编辑的建立和完善^[44-45],后续可通过遗传转化试验获得 *MdTUB4* 和 *MdTUB12* 的转基因苹果,评价其株高、茎粗等生长指标,进一步验证其调控苹果矮生的功能。

4 结 论

在苹果基因组中共鉴定到了 13 个 MdTUBs 家族基因,其蛋白结构高度保守,分为 5 个亚族。共线性分析结果表明,苹果 MdTUBs 家族 13 个成员只存在片段重复事件。苹果 MdTUBs 家族基因在不同组织和不同砧木中表现出了不同的表达模式,表明其可能参与调控苹果矮生等多种生长发育进程。本研究为后续开展苹果微管蛋白相关研究及应用奠定了理论基础。

参考文献 References:

- [1] NICK P. Microtubules and the tax payer[J]. *Protoplasma*, 2012, 249(Suppl. 2):S81-S94.
- [2] GUDIMCHUK N B, MCINTOSH J R. Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 22(12): 777-795.
- [3] KOPCZAK S D, HAAS N A, HUSSEY P J, SILFLOW C D, SNUSTAD D P. The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed alpha-tubulin genes[J]. *The Plant Cell*, 1992, 4(5):539-547.
- [4] JEON J S, LEE S, JUNG K H, JUN S H, KIM C, AN G. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(3): 1005-1014.
- [5] XU C S, CHEN B T, HUANG S J, DENG Z Y, WANG T. A

- point mutation in the rice alpha-tubulin gene *OstTUBA3* causes grain notching[J]. *New Phytologist*, 2023, 240(3):1052-1065.
- [6] YOSHIKAWA M, YANG G X, KAWAGUCHI K, KOMATSU S. Expression analyses of β -tubulin isotype genes in rice[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44(11):1202-1207.
- [7] OAKLEY R V, WANG Y S, RAMAKRISHNA W, HARDING S A, TSAI C J. Differential expansion and expression of α - and β -tubulin gene families in *Populus*[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(3):961-973.
- [8] SERRATO-DIAZ L M, RIVERA-VARGAS L I, GOENAGA R, FRENCH-MONAR R D. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing inflorescence blight and fruit rot of longan (*Dimocarpus longan* L.) in Puerto Rico[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(2):279.
- [9] BLUME R Y, RABOKON A M, PYDIURA M, YEMETS A I, PIRKO Y V, BLUME Y B. Genome-wide identification and evolution of the tubulin gene family in *Camelina sativa*[J]. *BMC Genomics*, 2024, 25(1):599.
- [10] DIAO L, LIU M Y, LIU Y L, ZHANG X, BAO L. Microtubules composed of $\alpha 4A$ undergo curved growth mainly mediated by its core structure[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2023, 15(1):mjad004.
- [11] 潘婷, 杨慕童, 刘阳轩, 孙秀强, 涂升斌, SMALLE J, 汪松虎. 26S蛋白酶体调控微管蛋白的降解[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2019, 56(2):351-356.
- PAN Ting, YANG Mutong, LIU Yangxuan, SUN Xiuqiang, TU Shengbin, SMALLE J, WANG Songhu. 26S proteasome regulates the degradation of microtubule[J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2019, 56(2):351-356.
- [12] 党媛玥, 马建江, 杨书贤, 宋吉坤, 贾冰, 冯盼, 陈全家, 于雯雯. 棉花 β -tubulin 基因家族的鉴定及其在纤维发育中的表达[J]. *中国农业科学*, 2023, 56(23):4585-4601.
- DANG Yuanyue, MA Jianjiang, YANG Shuxian, SONG Jikun, JIA Bing, FENG Pan, CHEN Quanjia, YU Jiwen. Genome-wide identification and expression analysis of β -tubulin family in cotton fiber development[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56(23):4585-4601.
- [13] CHEN B J, ZHAO J J, FU G Y, PEI X X, PAN Z E, LI H G, AHMED H, HE S P, DU X M. Identification and expression analysis of Tubulin gene family in upland cotton[J]. *Journal of Cotton Research*, 2021, 4(1):20.
- [14] LI Y L, SUN J, LI C H, ZHU Y Q, XIA G X. Specific expression of a β -tubulin gene (*GhTub1*) in developing cotton fibers[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2003, 46(3):235-242.
- [15] SU B H, GUO Y, LI Z F, GAO H W, WEI Z Y, QIU L J. Ideal type 1 is caused by a point mutation in the α -tubulin gene that affects microtubule arrangement in soybean[J]. *The Crop Journal*, 2023, 11(3):713-722.
- [16] MATSUMOTO S, KUMASAKI S, SOGA K, WAKABAYASHI K, HASHIMOTO T, HOSON T. Gravity-induced modifications to development in hypocotyls of *Arabidopsis* tubulin mutants[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(2):918-926.
- [17] HUANG S Q, GUO S Y, DAI L F, MI L Y, LI W R, XING J J, HU Z B, WU W Q, DUAN Z K, LI B Z, SUN T, WANG B J, ZHANG Y, XIAO T Q, XUE Y L, TANG N, LI H, ZHANG C Q, SONG C P. Tubulin participates in establishing protoxylem vessel reinforcement patterns and hydraulic conductivity in maize[J]. *Plant Physiology*, 2024, 196(2):931-947.
- [18] 冯轶, 许雪峰, 张新忠, 吴婷, 王忆, 韩振海. 苹果矮化砧木致矮机理的研究进展[J]. *园艺学报*, 2018, 45(9):1633-1641.
- FENG Yi, XU Xuefeng, ZHANG Xinzong, WU Ting, WANG Yi, HAN Zhenhai. Progress of dwarfing mechanism of apple rootstock[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(9):1633-1641.
- [19] LI J R, CAI H C, PENG H X, DENG Y L, ZHOU S J, TIAN J, ZHANG J, HU Y J, QIN X X, YAO Y C, ZHENG Y, WANG S. The chromosome-level genome assembly of the dwarfing apple interstock *Malus* hybrid 'SH6' [J]. *Scientific Data*, 2024, 11(1):552.
- [20] ZHAO H Y, WAN S Y, HUANG Y N, LI X Q, JIAO T T, ZHANG Z J, MA B Q, ZHU L C, MA F W, LI M J. The transcription factor MdBPC2 alters apple growth and promotes dwarfing by regulating auxin biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 2024, 36(3):585-604.
- [21] 周德宝. 植物激素与细胞骨架的排向[J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(2):224-228.
- ZHOU Debao. Plant hormones and layout of cytoskeleton[J]. *Plant Physiology Communications*, 2005, 41(2):224-228.
- [22] COEN E, COSGROVE D J. The mechanics of plant morphogenesis[J]. *Science*, 2023, 379(6631):eade8055.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [24] CANNON S B, MITRA A, BAUMGARTEN A, YOUNG N D, MAY G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2004, 4:10.
- [25] HAMMOND J W, CAI D W, VERHEY K J. Tubulin modifications and their cellular functions[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2008, 20(1):71-76.
- [26] 胡亚威, 彭淼, 阳灿, 李荣华, 刘鑫, 陈岳文, 杨长耀, 杨金磊, 卢嘉伟, 卢晓鹏, 杨俊枫. 柑橘热应激转录因子的全基因组鉴定及其在柑橘日灼果皮中的表达特性[J]. *果树学报*, 2024, 41(12):2408-2424.
- HU Yawei, PENG Miao, YANG Can, LI Ronghua, LIU Xin, CHEN Yuewen, YANG Changyao, YANG Jinlei, LU Jiawei, LU Xiaopeng, YANG Junfeng. Genome-wide identification of citrus heat stress transcription factors and their expression characteristics in citrus sunburned peel[J]. *Journal of Fruit Science*, 2024, 41(12):2408-2424.
- [27] STEHBENS S, WITTMANN T. Targeting and transport: How

- microtubules control focal adhesion dynamics[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2012, 198(4):481-489.
- [28] BRESSAN C, SAGHATELYAN A. Intrinsic mechanisms regulating neuronal migration in the postnatal brain[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2021, 14:620379.
- [29] BAO M J, DÖRIG R E, VAZQUEZ-PIANZOLA P M, BEUCHLE D, SUTER B. Differential modification of the C-terminal tails of different α -tubulins and their importance for microtubule function *in vivo*[J]. *eLife*, 2023, 12:e87125.
- [30] 朱成磊, 李彩丽, 李晓佩, 史晶晶, 高志民. 毛竹微管蛋白的分子特征及 PeTUA3 的功能[J]. *林业科学*, 2020, 56(7):44-54.
ZHU Chenglei, LI Caili, LI Xiaopei, SHI Jingjing, GAO Zhimin. Molecular characteristics of tubulins and preliminary function analysis of peTUA3 in *Phyllostachys edulis*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56(7):44-54.
- [31] BREVIARIO D, GIANÌ S, MORELLO L. Multiple tubulins: Evolutionary aspects and biological implications[J]. *The Plant Journal*, 2013, 75(2):202-218.
- [32] HSIAO A S, HUANG J Y. Microtubule regulation in plants: From morphological development to stress adaptation[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(4):627.
- [33] LLOYD C, CHAN J. Microtubules and the shape of plants to come[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004, 5(1):13-22.
- [34] CYR R J. Microtubules in plant morphogenesis: Role of the cortical array[J]. *Annual Review of Cell Biology*, 1994, 10:153-180.
- [35] JANKE C, MAGIERA M M. The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 21(6):307-326.
- [36] DACCORD N, CELTON J M, LINSMITH G, BECKER C, CHOISNE N, SCHIJLEN E, VAN DE GEEST H, BIANCO L, MICHELETTI D, VELASCO R, DI PIERRO E A, GOUZY J, JASPER G REES D, GUÉRIF P, MURANTY H, DUREL C E, LAURENS F, LESPINASSE Y, GAILLARD S, AUBOURG S, QUESNEVILLE H, WEIGEL D, VAN DE WEG E, TROGGIO M, BUCHER E. High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development[J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(7):1099-1106.
- [37] SU H, HAO T T, YU M J, ZHOU W Y, WU L, SHENG Y L, YI Z Z. Complex evolutionary patterns within the tubulin gene family of ciliates, unicellular eukaryotes with diverse microtubular structures[J]. *BMC Biology*, 2024, 22(1):170.
- [38] BINAROVÁ P, TUSZYNSKI J. Tubulin: Structure, functions and roles in disease[J]. *Cells*, 2019, 8(10):1294.
- [39] VILLEMUR R, JOYCE C M, HAAS N A, GODDARD R H, KOPCZAK S D, HUSSEY P J, SNUSTAD D P, SILFLOW C D. α -tubulin gene family of maize (*Zea mays* L.): Evidence for two ancient alpha-tubulin genes in plants[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 227(1):81-96.
- [40] VILLEMUR R, HAAS N A, JOYCE C M, SNUSTAD D P, SILFLOW C D. Characterization of four new β -tubulin genes and their expression during male flower development in maize (*Zea mays* L.)[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 24(2):295-315.
- [41] YEMETS A, SHADRINA R, BLUME R, PLOKHOVSKA S, BLUME Y. Autophagy formation, microtubule disorientation, and alteration of *ATG8* and tubulin gene expression under simulated microgravity in *Arabidopsis thaliana*[J]. *NPJ Microgravity*, 2024, 10(1):31.
- [42] HOU D, CHENG Z C, XIE L H, LI X Y, LI J, MU S H, GAO J. The R2R3MYB gene family in *Phyllostachys edulis*: Genome-wide analysis and identification of stress or development-related R2R3MYBs[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9:738.
- [43] 侯董亮, 王彩虹, 田义轲, 肖玉雄, 张蓓. 梨 β -微管蛋白基因及其在矮生型与普通型梨茎尖中的表达差异[J]. *园艺学报*, 2016, 43(2):320-328.
HOU Dongliang, WANG Caihong, TIAN Yike, XIAO Yuxiong, ZHANG Bei. A group of β -tubulin genes and their expression difference in stem tips between the dwarf and standard type pears[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(2):320-328.
- [44] LI H X, SUN H C, DONG H Q, WANG S Y, FAN X Q, LI Y, CHENG L L, ZHANG Z H, WANG Y, ZHANG X Z, XU X F, HAN Z H, LI W. Genome editing of apple squamosa promoter binding protein-like 6 enhances adventitious shoot regeneration[J]. *Plant Physiology*, 2023, 191(2):840-843.
- [45] DAI H Y, LI W R, HAN G F, YANG Y, MA Y, LI H, ZHANG Z H. Development of a seedling clone with high regeneration capacity and susceptibility to *Agrobacterium* in apple[J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 164:202-208.