# 了步植物 Guihaia Feb. 2024, 44(2): 303-312

#### DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202304008

李慧敏, 袁萍, 段红英, 等, 2024. 地黄氧-酰基转移酶 WSD 基因的鉴定与表达分析 [J]. 广西植物, 44(2): 303-312. LI HM, YUAN P, DUAN HY, et al., 2024. Identification and expression analyses of O-acyltransferase WSD genes in *Rehmannia glutinosa* [J]. Guihaia, 44(2): 303-312.



# 地黄氧-酰基转移酶 WSD 基因的鉴定与表达分析

李慧敏,袁 萍,段红英,周延清\*

(河南师范大学生命科学学院,河南新乡453000)

**摘 要:**植物蜡酯合成酶催化长链醇和长链脂肪酸合成蜡酯,对植物蜡质合成及其抗旱、抗致病菌袭击和紫 外辐射、抗寒和昆虫侵害等环境胁迫具有非常重要的作用;镉是环境中含量最高的有毒重金属之一,严重威 胁植物的生长发育、质量、产量和食用安全。为研究地黄蜡酯合成酶基因镉胁迫表达,该文从地黄全长转录 组测序数据中鉴定其成员,并用生物信息学技术与 qRT-PCR 对其编码蛋白质的理化性质、系统进化和保守 结构域及其组织表达与镉胁迫表达进行分析。结果表明:(1)鉴定出两个蜡酯合成酶基因 *RgOATWSD*1 与 *RgOATWSD*2,其编码蛋白质的长度、理论等电点和相对分子量依次为 463 aa 与 473 aa、8.86 与 9.34、51.31 kD 与 52.49 kD,均为不稳定蛋白。(2)二者均具有 acyl\_WS\_DGAT 保守域与 DUF1298 超家族,前者占其氨 基酸序列的 92.65% ~ 94.50%。(3) 二者均定位于内质网中,二级结构以无规卷曲与α螺旋为主; RgOATWSD1 为跨膜蛋白,而 RgOATWSD2 不是。(4) 二者均在地黄根、茎、叶中差异表达。(5) 二者表达均 受镉胁迫诱导,但其表达变化趋势不同。该研究鉴定了两个镉胁迫应答反应的蜡酯合成酶基因,为地黄 *RgOATWSD* 的镉胁迫表达及功能研究奠定了基础。

# Identification and expression analyses of O-acyltransferase WSD genes in *Rehmannia glutinosa*

LI Huimin, YUAN Ping, DUAN Hongying, ZHOU Yanqing\*

( College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453000, Henan, China )

**Abstract**: Plant wax ester synthase catalyzes the synthesis of wax esters from long-chain alcohols and fatty acids, and plays very important roles in plant wax synthesis and some resistances to drought, pathogenic bacteria, ultraviolet radiation, cold and insect invasion and other environmental stresses; cadmium (Cd) is one of the toxic heavy metals with the highest content in environment, and seriously threatens plant growth, development, quality, yield, and plant

收稿日期: 2023-07-06

基金项目:河南省重点研发与推广专项科技攻关项目(212102110405);河南省自然科学基金(182300410018);河南省高校科技 创新团队支持计划项目(23IRTSTHN022)。

第一作者:李慧敏(1997-),硕士,研究方向为植物遗传,(E-mail)2004283157@stu.htu.edu.cn。

<sup>\*</sup>通信作者:周延清,博士,教授,研究方向为植物遗传,(E-mail)yqzhou@htu.edu.cn。

food safety. In order to explore the Cd stress expressions of wax ester synthase genes in *Rehmannia glutinosa*, we identified its wax ester synthase genes from its full-length transcriptome sequencing data, analyzed both physiochemical properties, phytogenetic trees and conserved domains with bioinformatics methods, and tissue expressions and Cd stress expressions using qRT-PCR. The results were as follows: (1) Two wax ester synthase genes, named as *RgOATWSD1* and *RgOATWSD2*, were identified, whose coding proteins were unstable hydrophobic proteins with amino acid lengths of 463 aa and 473 aa, isoelectric points of 8.86 and 9.34 and molecular weights of 51.31 kD and 52.49 kD, respectively. (2) Both proteins contained a conserved acyl\_WS\_DGAT domain and DUF1298 superfamily, in which the former accounted for 92.65% to 94.50% of the amino acid sequence. (3) Both proteins were located in the endoplasmic reticulum and both secondary structures were mainly composed of random coil and  $\alpha$ -helix;RgOATWSD2 was not transmembrane protein but RgOATWSD1. (4) Both were differentially expressed in the roots, stems and leaves of *R. glutinosa* plants. (5) Both expressions were highly responsive to Cd stress, but both expression change trends were different under Cd stress. This study identifies two wax ester synthase genes in response to Cd stress, and lays a foundation for further research on Cd stress expression and other functions of *RgOATWSD*.

Key words: Rehmannia glutinosa, O-acyltransferase WSD, bioinformatics, gene expression, cadmium stress

随着我国工业化与城市化进程的加快,土壤和 食品的重金属污染问题日益加剧,其中,重金属镉 (Cd)是其首要污染物。镉污染土壤的治理难度很 大,不但对植物生长发育、质量和产量具有严重不 良影响,而目镉通过食物链从植物转移到动物和人 体内,也会严重危害动物和人的健康。因此,当前 具有较高的环保和经济价值的土壤污染治理方法 是利用自然生长植物或遗传改良植物吸收、解毒与 富集镉污染土壤中的镉对其进行修复(陈思思等, 2022;罗艳芳等,2022;于永昂等,2022)。迄今为止, 虽然已经鉴定了对镉胁迫应答的构树转录因子 BpbZIP1 (陈思思等, 2022)、花生 NAS 家族(罗艳芳 等,2022)、小麦 TaAlaAT 基因(于永昂等,2022)、伴 矿景天 WRKY 基因家族(王剑超等, 2023) 和水稻 OsPT1 等基因(姜南等, 2023), 但是还有很多植物 镉胁迫应答反应基因有待挖掘与功能研究,如植物 蜡酯合成酶(wax ester synthase, WS or WSD)基因。

蜡酯是长链醇和长链脂肪酸在蜡酯合成酶催 化下经过酯化反应生成的酯,广泛存在于动物、植 物和微生物,具有多种重要的生物学功能。就植 物而言,蜡酯主要存在于植物初生芽表面的角质 层中或者霍霍巴的种子油中,防止植物水分流失、 致病菌袭击、紫外辐射和昆虫侵害(肖一凡等, 2020)与抗旱(肖一凡等,2020;王春语等,2023) 及抗寒(朱聪等,2022)等环境胁迫。目前,从小麦 (温宏伟等,2021)、高粱(王春语等,2023)、椰子 (朱聪等,2022)、拟南芥和霍霍巴(肖一凡等, 2020)、丝颖针茅和紫花针茅(Yang et al., 2020)、 芜菁(Yang et al., 2019)、尖叶石竹(Zhou et al., 2018)、葡萄(Nicolas et al., 2020)、苹果(Wang et al., 2022)和向日葵(Shalini & Martin, 2020)等植物中克隆了蜡酯合成酶,但是尚未见从地黄中克隆WSD 基因及其镉胁迫表达的报道。

地黄(*Rehmannia glutinosa*)为玄参科地黄属多 年生草本的植物,生长在我国辽宁、内蒙古和河南 等地(周延清等,2020)。其块根是我国著名中药 材,每年需求量较高,约1.5×10<sup>7</sup>kg。在药材上,它 分为鲜地黄和生地黄、熟地黄三类。鲜地黄味道 甘苦,清热、生津、凉血与补血;生地黄味甘性寒, 清热滋阴;熟地黄性微温,味道甘甜,补血滋阴、填 髓益精(徐军和傅喆暾,2017)。地黄种质资源、药 理作用、化学成分、栽培育种和组学等方面研究较 多,然而,地黄 Cd 污染及其胁迫研究很少,仅有地 黄 *RgABCC* 基因 Cd 胁迫的报道(Zhao et al., 2009;Yang et al., 2021)。因此,有待深入研究地 黄 Cd 胁迫应答反应基因。

本研究以地黄为研究材料,从其全长转录组 测序数据中查找 Wax ester synthase、WS 或 WSD 及 其编码基因(*RgOATWSD*),采用生物信息学、盆栽 法与实时荧光定量 PCR 的方法,通过对其两个基 因编码蛋白质的理化性质、系统进化和保守结构 域及其组织表达与镉胁迫表达进行分析,拟探讨 以下问题:(1)地黄中是否有蜡酯合成酶基因; (2)地黄蜡酯合成酶基因大小及其编码蛋白质的 特征如何;(3)地黄蜡酯合成酶基因空间表达模式 及其镉胁迫表达如何。 1 材料与方法

#### 1.1 材料

地黄"金九"品种全长转录组测序数据(https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA780233)的基 因注释表与 CDS 表;河南师范大学生命科学学院 气候室中培养的盆栽"金九"地黄植株。其光照周 期为每天 16 h 光,8 h 暗,培养温度为( $26\pm 2$ )℃, 光照强度为 2 000 lx。

### 1.2 方法

1.2.1 氧-酰基转移酶 WSD 基因家族成员获取 打开上述基因注释表文件,点击查找,输入 Wax ester synthase、WS 或 WSD,点击全部查找,出现目 标酶及其对应的基因名。利用其基因名在上述 CDS 表中查找其基因及其大小与碱基序列,命名 为 RgOATWSD 基因。

1.2.2 RgOATWSD 基因的生物信息学分析 利用 NCBI ( https://www. ncbi. nlm. nih. gov/home/ analyze/)中的 ORF Finder 进行氨基酸序列的推导, 并利用 Blastn 工具查找与 RgOATWSD 蛋白同源性 较高的序列:运用软件 DNAMAN 6.0 进行氨基酸的 多重序列比对:利用 MEGA 6.0 软件构建系统进化 树;利用 ExPASy-ProtParm 在线分析软件(https:// web.expasy.org/protparam/) 预测 RgOATWSD 蛋白的 理化性质;通过在线网址 WoLF PSORT (https:// wolfpsort.hgc.jp/)对 RgOATWSD 蛋白进行亚细胞定 位预测;利用 TMHMM 2.0 进行跨膜结构域的分析; 通过 NCBI 的 Conserved Donmain Search (https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/ Structure/cdd/wrpsb.cgi) 对 其保守结构域进行在线分析:利用 SignalP (http:// www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)进行信号肽预 测;利用 NetNGlyc 1.0 (http://www.cbs.dtu.dk/ services/NetNGlyc/)进行 N-糖基化位点预测;利用 NetPhos 2. 0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/ NetPhos/)进行磷酸化位点预测;通过 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\_automat.pl? page=npsa\_sopma.html)及SWISS-MODEL(https:// swissmodel.expasy.org/)预测蛋白质的二级和三级 结构。

1.2.3 镉处理地黄幼苗的培养和处理 将地黄新 鲜块根切成 2~3 cm 小块,种于花盆基质(营养土 与蛭石比例为 1:1.5)中,在气候室培养;2~3 d 浇1次水,生长4周后,挑取长势一致的幼苗进行 处理;用40 mmol・L<sup>-1</sup>镉水溶液浇地黄幼苗(CT), 用同样体积的水浇同样数量的地黄幼苗(CK),两 组均设置3个重复;处理12h后,分别取CT与CK 的根、茎和叶,洗净,晾干,液氮速冻,于-80℃冰 箱中保存备用(袁萍,2023)。

1.2.4 qRT-PCR 技术检测基因表达 根据 RgOATWSD1与 RgOATWSD2 基因的碱基序列,用 Primer Premier 5 设计其 qRT-PCR 的引物:(1) RgOATWSD1 基因的正向引物为F(5'-AGCGAGTT GTTGCTGATGC-3'),反向引物为R(5'-GTTGCCCC ACTGACTTCCA-3')。(2) RgOATWSD2 基因的正向 引物为F(5'-TGATAAGTCGCCGATTAGGTC-3'),反 向引物R(5'-CTTTTGATGGTTCGATGTGCTC-3')。这 些引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;按 照我们前期研究中提取地黄的总 RNA 方法与 qRT-PCR 技术,以地黄基因 TIP41 为内参基因,用 qRT-PCR 检测两基因在 CT 与 CK 的根、茎、叶中 的表达水平,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算其表达量(Li et al., 2022)。

## 2 结果与分析

#### 2.1 RgOATWSD 基因家族的鉴定

在上述基因注释结果表中查到 Wax ester synthase-like Acyl-CoA acyltransferase domain 或 Oacyltransferase WSD1 (*Arabidopsis thaliana*)与 Oacyltransferase WSD1-like isoform X2 [*Sesamum indicum*],以及基因 F01\_transcript\_13342 和 F01\_ transcript\_16419,在 CDS 表中查到两个基因大小 分别为1 392 bp 和1 422 bp,其碱基序列如图1所 示,并将其分别命名为 *RgOATWSD*1 和 *RgOATWSD2*,统称 *RgOATWSD* 基因。

# 2.2 RgOATWSD 氨基酸序列的推导、同源性比对 以及系统进化分析

根据 *RgOATWSD*1 和 *RgOATWSD*2 基因序列, 利用软件 DNAMAN 6.0 推导出其分别编码由 463 和 473 氨基酸残基组成的蛋白质,并将其分别命 名为 RgOATWSD1 和 RgOATWSD2 (图 1),统称 RgOATWSD 蛋白。

利用 DNAMAN 6.0 进行氨基酸多重序列比对, 比对结果如图 2 所示。由图 2 可知, RgOATWSD1 与白花泡桐 [*Paulownia fortunei* (KAI3448120.1)]、

	RgOATWSD1 and RgOATWSD1		RgOATWSD2 and RgOATWSD2
51	LEMKEIAEAASKS*	451	SCIEYAFEIISKAALQSPPTTKT*
351	CTTGAAATGAAAGAAATTGCAGAGGCAGCCAGCAAATCGTGA	1351	TCATGTATTGAATATGCCTTTGAAATAATCTCAAAAGCTGCACTCCAATCTCCTCCCACCACAAAAACATAG
26	D L Q I L V A K E I I P D P K V L A K C F E D A L	426	MISYVGKLRIAMTMEKGFMDPNKFK
276	GATTTGCAAATCCTGGTTGCAAAAGAAATAATCCCAGACCCCAAAGTTTTAGCCAAGTGTTTTGAAGATGCCTTG	1276	ATGATAAGCTATGTGGGGAAGCTGAGAATTGCAATGACAATGGAGAAAGGTTTCATGGATCCAAATAAAT
01	KHIRVTSSSLPHAITMHMVSYAGIA	401	MALDNQPIKGLYFVVAGPPQSVSVT
201	AAGCACATAAGAGTGACATCAAGCAGTCTACCACATGCAATCACAATGCATATGGTGAGTTATGCAGGAATAGCT	1201	ATGGCTTTGGATAATCAACCTATTAAAGGATTGTACTTTGTTGTGGCTGGACCCCCTCAGAGTGTATCAGTGACA
76	V C N T T F T I S N V I G P R E E I T V A G N H V	376	T A R Y I H G T L K N T S M A I S N L I G P V E K
126	GTTTGTAACACAACCTTCACTATATCAAACGTAATTGGCCCCCGGGAGGAGATCACAGTGGCTGGC	1126	ACAGCACGATACATCCATGGGACATTAAAGAATACAAGCATGGCGATTTCCAATTTGATAGGACCTGTCGAAAAA
51	F S Y K I G D L I M S L F G A K L A C I L N Y R I	351	Q R N S A A V L L T G Q L L N L I R K I R G P E A
051	TTCTCCTACAAAATTGGGGATTTAATCATGTCTCTTTTTGGAGCAAAGCTTGCTT	1051	CAGAGAAAACTCGGCCGCAGTTTTGTTGACTGGTCAACTTCTTAATCTCATAAGAAAAATACGAGGTCCTGAGGCA
26	G S D P I Q F V K R A K A M I D K K K L S L E A P	326	I P K L T A H D L Q N P L G F V R K A H R T I K R
76	GGTTCAGATCCAATCCAGTTTGTGAAGAGAGAGAGAAAAGCTATGATTGACAAGAAAAAGCTTTCGCTAGAGGCCCCC	976	ATACCCAAACTGACCGCTCATGATCTGCAAAACCCACTCGGTTTTGTTAGGAAAGCACATCGAACCATCAAAAGA
01	M N S N S G S Q W G N K F G M L L L P V Y Y H R G	301	K S L D E M I K P G S E M L W G N R F A F L Q C P
01	ATGAATAGTAACTCTGGAAGTCAGTGGGGCAACAAATTCGGAATGCTTCTCTTACCTGTTTATTATCATAGAGGT	901	AAATCACTGGATGAGATGATTAAACCCGGTTCAGAAATGCTGTGGGGAAACCGGTTTGCATTCTTGCAATGTCCT
76	E G L R M T G V A M V N L R S Q A G L Q D M S K L	276	K T S E E S G T A K S T A L V L L N T R A V G G Y
26	GAGGGGCTTCGGATGACAGGTGTTGCCATGGTCAATTTGAGATCACAAGCAGGATTGCAGGATATGTCAAAGCTT	826	AAAACAAGTGAAGAATCAGGGACAGCAAAAATCCACAGCATTAGTGTTGCTCAACACTCGGGCCGTGGGAGGCTAC
51	N D V L F G I I S C G L S R Y L D I R S P K A L P	251	K S R L K V T I N D V I T G I I T L G T R L Y M Q
51	AATGATGTTCTTTTTGGGATAATCTCATGCGGGGCTCTCGAGGTACTTGGACATCAGATCACCGAAAGCTCTGCCT	751	AAGAGCAGGCTTAAAGTGACTATTAATGATGTGATAACGGGTATAATTACATTGGGGACACGTTTATACATGCAA
26	R R L A S A R F R L D D M K I V K R V V A D A T I	226	G G D G V E F R P V V T I T T A V D L D Q I K M I
76	CGGAGGTTGGCGTCGGCGAGGTTCCGATTAGACGACATGAAGATTGTCAAGCGAGTTGTTGCTGATGCGACCATT	676	GGTGGTGATGGGGTGGAGTTCAGGCCCGTTGTCACGATTACGACTGCTGTTGATCTTGACCAGATTAAGATGATT
01	F V L R V L W L K D K T T A V S G G D G V E L W P	201	N T A C D F G W A L L K S S L V K D D K S P I R S
01	TTTGTTTTAAGGGTGTTGTGGTTGAAGGATAAGACCACCGCCGTGAGCGGCGGGGATGGGGGTGGAGCTCTGGCCG	601	AATACGGCCTGTGACTTTGGGTGGGCCCTGTTGAAGAGCAGTTTGGTGAAGGATGATAAGTCGCCGATTAGGTCC
76	A P N R R R W S V L A L V K V V W F T L I Y V L E	176	NGESNNSGGNGLFLRRAPRFLKGLV
26	GCGCCGAATAGGAGGAGGTGGAGTGTGTTGGCGTTGGTGAAGGTTGTTTGGTTTACTTTGATTTATGTTTTGGAG	526	AACGGCGAATCTAATAATTCTGGTGGAAATGGGCTTTTTTTGAGACGGGCTCCGAGGTTTTTGAAAGGCCTGGTT
51	LLSCCRRADDPAQRPTIGGVGSASA	151	M G A L L S C L Q R L D D P S L P L T F P S R Q S
51	CTGCTGTCGTGTTGCAGGAGAGCAGACGATCCGGCACAGCGGCCGACTATCGGTGGCGTAGGATCGGCGTCGGCC	451	ATGGGGGGCACTTTTGTCATGTCTCCAAAGACTCGACGACCCTTCGTTGCCGTTAACGTTTCCGTCGAGGCAGTCT
26	LLTAHKTLVFRVHHALGDGISLMSM	126	KYPTQNAAGHVVFKLHHSLGDGYSL
76	CTGCTCACGGCGCATAAGACCTTGGTTTTCCGTGTGCACCACGCGCTCGGGGACGGGATTTCATTAATGTCAATG	376	AAATACCCAACCCAAAACGCAGCCGGACATGTCGTTTTCAAGCTCCACCATTCGTTGGGCGACGGCTACTCTCTA
01	A V N D F I A D L S V S S P L P T D K P L W E I H	101	F T D Y L S K I A M E E L P L N R P L W E I H I I
01	GCCGTCAACGATTTCATCGCCGATCTATCCGTCTCGTCGCCTCTCCCCACCGATAAACCCCTGTGGGAGATTCAC	301	TTCACCGATTACCTGTCCAAAATCGCCATGGAAGAGCTTCCCCTGAATCGCCCATTATGGGAAATTCACATAATC
6	V D V D R H V I V R H H P L S D L D P S I S D E D	76	E V N L K D H V N V P T F P N D M P T E Y Y D Q C
26	GTAGACGTTGACCGCCACGTCATCGTACGGCACCACCCCCTCTCCGACCTCGATCCTTCGATCTCCGACGAGGAC	226	GAAGTAAACCTCAAAGACCACGTAAACGTCCCAACATTCCCAAATGACATGCCGACAGAATACTACGACCAATGT
1	M L K H P R F C S L M V R D S C G R E H W R K T Q	51	F L P I N P R F S S I M V T E K K G A K K W K K V
51	ATGCTCAAACACCCCAGATTTTGCAGCCTCATGGTAAGAGACTCCTGCGGACGCGAACACTGGCGCAAAACTCAA	151	TTTTTGCCCATAAATCCACGTTTCTCCTCCATCATGGTCACAGAGAAAAAAGGAGCGAAGAAAATGGAAAAAAGTG
6	V I N C A I A V D S P L D V D A I K A E V R S S I	26	L T I L G V L E T E F P L D D S M T M P L L K N V
6	GTTATCAACTGCGCCATCGCCGTCGATTCCCCCTTGGACGTCGACGCCATTAAAGCAGAAGTTCGGAGCTCAATC	76	CTCACAATACTTGGAGTTTTGGAAACTGAATTTCCTCTTGATGATTCCATGACCATGCCTCTGCTTAAAAACGTG
	M E E T A E R D Q P L T P A G R L F L Q P G M D Q	1	MEVEQEEMLEPVSPSAQYLKSSALS
	ATG GAGGAGACTGCGGAGAGAGACCAACCACTAACCCCCGCCGGCCG	1	ATGGAGGTTGAGCAAGAGGAAATGTTGGAGCCTGTGAGCCCCAGTGCACAGTACTTGAAAAGCTCAGCTTTATCA

\*表示终止密码。方框中密码子为起始密码子。

\* indicates termination codon. The codon in box is the start codon.

#### 图 1 RgOATWSD 核苷酸序列及其编码蛋白质的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequences of RgOATWSD and amino acid sequences of its coding RgOATWSD proteins

芝麻 [Sesamum indicum (XP\_011092557.1)]、紫花风铃木 [Handroanthus impetiginosus (PIM99635.1)]的相似度较高,分别为87.79%、83.62%、82.51%; RgOATWSD2 与白花泡桐 (KAI3457227.1)、芝麻(XP\_011100361.1)、松蒿 [Phtheirospermum japonicum (GFP86401.1)]的相似度较高,分别为83.01%、78.69%、77.73%。利用 MEGA 6.0 进行 OATWSD 蛋白系统进化树的构建,结果如图3所示。由图3可知, RgOATWSD1 与白花泡桐聚为一支,进化上亲缘关系最近, RgOATWSD2 与松蒿聚为一支,进化上亲缘关系最近, 其中白花泡桐与松蒿均属于玄参科。

#### 2.3 RgOATWSD 理化学性质

利用 ExPASy-ProtParam tool 在线工具对 RgOATWSD 进行化学性质分析。结果发现, RgOATWSD1由463个氨基酸残基组成,包括20种 氨基酸,其中Ala、Leu和Ser含量高,分别为8.4%、 11.0%和8.2%,相对分子质量为51.31 kD,化学分 子式为  $C_{2283}$   $H_{3693}$   $N_{639}$   $O_{649}$   $S_{26}$ ,带负电荷残基总数 (Asp+Glu) 50 个与带正电荷残基总数(Arg+Lys) 57 个,理论等电点为 8.86,该蛋白不稳定指数预测 结果是 45.19,为不稳定蛋白,脂肪指数为 102.76,总 的亲水性平均系数为 0.049,属于疏水性蛋白; RgOATWSD2 由 473 个氨基酸残基组成,包括 20 种 氨基酸,其中 Leu、Lys 和 Ser 含量多,分别为 11.6%、 7.6%和 7.6%,相对分子质量为 52.49 kD,化学分子 式为  $C_{2353}H_{3791}N_{629}O_{679}S_{23}$ ,带负电荷残基总数(Asp+ Glu) 44 个与带正电荷残基总数(Arg+Lys) 57 个, 理论等电点为 9.34,该蛋白不稳定指数预测结果是 42.93,为不稳定蛋白,脂肪指数为 92.96,总的亲水 性平均系数为-0.140,属于亲水性蛋白。

利用 NetPhos 2.0 工具对 RgOATWSD1 与 RgOATWSD2 编码的氨基酸序列进行在线分析,结 果表明分值大于 0.5 的各类磷酸化位点分别有 42 个和 44 个,并均匀分布在多肽链中。其中, RgOATWSD1 丝氨酸磷酸化位点有 37 个,苏氨酸

#### RgOATWSD1

地黄 Rehmannia glutinosa 紫花风铃木 Handroanthus impetiginosu 肖花池桐 Paulownia fortunei 紫苏 Perilla frutescens 芝麻 Sesamum indicum 独脚金 Striga asiatica

地資 Rehmannia glutinosa 累花风铃木 Handroanthus impetiginosu 自花泡桐 Paulownia fortunei 紫苏 Perilla frutescens 芝麻 Sesamum indicum 契뭵包。Striga asiatica

地黄 Rehmannia glutinosa 紫花风铃木 Handroanthus impetiginosu 白花泡桐 Paulownia fortunei 紫苏 Perilla frutescens 芝麻 Sesamum indicum 独則金 Striga asiatica

地黄 Rehmannia glutinosa 紫花风铃木 Handroanthus impetiginosus 白花泡桐 Paulownia fortunei 紫苏 Perilla frutescens 芝麻 Sesamum indicum 独脚金 Striga asiatica

地黄 Rehmannia glutinosa 紫花风铃木 Handroanthus impetiginosus 白花泡桐 Paulownia fortunei 紫苏 Peerilla frutescens 芝麻 Sesamum indicum 独脚金 Striga asiatica

#### RgOATWSD2

地質 Rehmannia glutinosa 累花风铃木 Handroanthus impetiginosus 自花泡桐 Paulownia fortunci 松蒿 Phtheirospermum japonicum 西班牙鼠尾草 Salvia hispanica 芝麻 Sesamum indicum

地黄 Rehmannia glutinosa 紫花风铃木 Handroanthus impetiginosus 白花泡桐 Paulownia fortunei 松蒿 Phtheirospermum japonicum 西班牙鼠尾草 Salvia hispanica 芝麻 Sesamum indicum

地黄 Rehmannia glutinosa 紫花风铃木 Handroanthus impetiginosu 白花泡桐 Paulownia fortunei 松蒿 Phtheirospermum japonicum 西班牙鼠尾草 Salvia hispanica 芝麻 Sesamum indicum

地黃 Rehmannia glutinosa 紫花风铃木 Handroanthus impetiginosus 白花袍桐 Puhleirospermum japonicum 西班牙鼠尾草 Salvia hispanica 芝麻 Sesamum indicum

地黄 Rehmannia glutinosa 紫花风铃木 Handroanthus impetiginosu 月花泡桐 Paulownia fortunei 松蒿 Phtheirospermum japonicum 西班牙鼠尾草 Salvia hispanica 芝麻 Sessamum indicum

s	.MEETAERDOPLTPAGRLFLOPGEDOVINCRIATOSEL.DVDAIRAEVRSSIMLKHPRFCSLMVRDSCGREHWRKTOVDVDRHVIVRHHELSDLD MAEDTAERDHPLTPAGRLFLOROMEDIINAAIANEHPI.OVDAIRSETENSIMLKHPRFCSLMVRDSCGREHWRKTOVDUDRHVIVRHPLSDDH MEETVERDOPLTPAGRLFLOPONEOVINCAIAVEFPE.DVDAIRAEVOSSIMLKHPRFCSLMVRDSGGREYWRKTOVDUDRHVIVRHPLSDDH MEDTEERDEPLTPAGRLFLOPONEOVINCAIAVEFPE.DVDAIRAEVOSSIMLKHPRFCSLMVRDSGGREYWRKTOVDUDRHVIVRHPLSDDH MEDTEERDEPLTPAGRLFLOPONEOVINCAIAVEFPE.DVDAIRAEVESSIMLKHPRFCSLMVRDSGGREYWRKTOVDUDRHVIVRHPLSDDH MEDTEERDEPLTPAGRLFLOPONEOVINCAIAVEFPE.DVDAIRAEVESSIMLKHPRFCSLMVRDSGGREYWRKTOVDUDRHVIVRHPLSDDH MEDAMERDOPLTPAGRLFLOPONOVINCAIAVEFPE.DVDAIRAEVESSIMLKHPRFCSLMVRDSGGREYWRKTOVDUDRHVIVRHPLSDD MEAMERDOPLTPAGRLFLOPINOVINCAIVEFPEDDVEARAEURSSILLOHPRFCSLMVTDSFGREHWRRTOVDUDRHVIVRHPLSDD MAPETLKSDEPLTPAGRLFLOPINOVINCAIVEFPEDDVEARAEURSSILLOHPRFCSLMVTDSFGREHWRRTOVDUDRHVIVRHPISED.D	93 94 93 93 93 93
s	PSISDEDAVNDFIADLSVSSPLPTDKPLWEIHLLTAHKTLVFRVHHALGDGISLMSMLLSCCRRADDPAORPTIGSVGSASAAPNRRWSVLALV SISDEDAVNDFI.ADLSVSSPLPTDKPLWEIHLLMAHKTMVFRVHHALGDGISLMSMLLSCCRRADDPAORPTIGSVGAASAPN.RRWSVUTLL .SISDEDAVNDFMADLSVSSPLPTDKPLWEIHLLMAHKTAVFRVHHALGDGISLMSMLLSCCRRADDPAOPPTIGSVGAASAPN.RRWSVWTLL IS.SDEDAVNDFIADLAVSSPLPTDKPLWEIHLLMAHKTAVFRVHHALGDGISLMSMLLSCCRRADDPAOMPTPGSVAA.ARSORKWSAWTL IHISDDDAVNDFVADLSVSSPLPTDKPLWEIHLLMAHKTVIFRVHHALGDGISLMSMLLSCCRRADPAOMPTPGSVAA.ARSORKWSAWTL DEDAVADFVADLSVSSPLPTDKPLWEIHLLLAHKTVIFRVHHALGDGISLMSMLLSCCRRADPAOMPTPGSVAA.ARSORKWSAWTL DEDAVADFVADLSVSSPLPTDKPLWEIHLLLAHNTAVFRVHHALGDGISLMSMLLSCCRRADPAOMPTFGSVAA.ARSORKWSAWTL	188 187 186 186 188 188
5	KVVWFTLIYVLEFVLRVLWLKDKTTAVSGCDGVELWPRRLASARFRLDDMKIVKRVVADATINDVLFGIISCGLSRYLDIRSPKALPEGLR KVVWFTLYVLEFGLRVMCLRDKTTAVSGCSGVELWPRRLATARRRLDMKRVVRRVTCATINDVLFGIISCGLSRYLDIRSPKALPEGLR KLVWYTLYVVLEFTLRALWLRDKTTAVSGCVGVELWPRRLASARFRLDMKIVKQAVADATINDVLFGIISCGLSRYLDIRSPKGKKHALPEGLR LVVWYTLYVMFFVLRAAWWRDFTTAVSGGCGVELWPRRLASARFRLDMKIVKQAVADATINDVLFGISCGLSRYLDIRSPKGKKHALPEGLR KVVWYTLIYILEFSLRALCLRDKTTAVSGCDGVELWPRRLASARFRLDMKIVKQAVADATINDVLFGVISCGLSRYLDIRSPKALPEGLR KVVWYTLIYLEFSLRALCLRDKTTAVSGCDGVELWPRRLASARFRLDMKIVKQAVADATINDVLFGVISCGLSRYLDIRSPKALPEGLR KAVWFTLIYLEFSLRALCLRDKTTAVSGCDGVELWPRRLASARFRLDMKIVKQAVADATINDVLFGVISCGLSRYLDIRSPKALPEGLR	279 278 281 277 279 274
s	MTGVAMVNLRSCAGIQDMSKLMNSNGGSOMGNKFGMLLLEVYYHRGGSDPIOFVKRAKAMIDKKKLSLEAPFSYKIGDLIMSLEGAKDAGILNYR ITGVAMVNLRTTGLQDLSKLMNSNGGTOMGNKFGMLLLEVYYHRGGSDPIFELKESKSMIDKKKLSLEAPFSYNIGULIMSLEGAKDASILNYR VTGVAMVNLRPOGGLQDISKLMNSNGGTOMGNKFGMLLLEVYYRGGSDPIOFVKRAKAMIDKKKLSLEAPFSYKVGDLIMSLLGAKDASILNYR ITGVAMVNLRPOGGLQDMSKLMNSNGGTOMGNKFGMLLLEVYYRSGSDPIOFVKRAKAMIDKKKLSLEAPFSYKVGDLIMSLLGAKDASILNYR ITGVAMVNLRPOGGLQDMSKLMNSNGGMRKGNKFGMLLLEVYRSSGSDPIOFVKRAKAMIDKKKLSLEAPFSYKVGDLIMSLLGAKDASILNYR ITGVAMVNLRPOGGLQEIMKLINSKSGSRMGNKFGMLLLEVYRSSGSDPIOFVKRAKAMIDKKKLSLEAPFSYKVGDLIMSLFGPKDASILNYR ITGVAMVNLRPOGGLQEIMKLINSKSGSRMGNKFGMLLLEVYRSGSDPIOFVKRAKDMIDKKKLSLEAPFSYKVGDLIMSLFGPKDASILNYR	374 373 376 372 374 369
s	IVCNTTET ISNVIGEREEITVÄENHVÄHIRVISSSLPHAITMHMVSYAGIADLOILVAKEIIPDEVULAKSEDALLEMKEIAEAASKS IVCNTTETISNVIGEREEITVÄENHVÄIRVISSSLPHAITMHMVSYAGMADLOILVAKEIISDEVILAKSEEDALLEMKEIAEAKKSSK IVCNTTETVSNUGEREEITMAGNEVKHIRVASSCLEHAITMHMVSYAGVADLOILVAKEIIPDEVULAKSEEDALLEMKEAAKASSK IVCNTETTISNVGEREEISMAGNEVKHIRVISSSLEHAITMHMVSYAGVADLOILVAKEIIPDEVILAKSEEDALLEMKEAAKASSK IVCNTETTISNVGEREEISMAGNEVKHIRVISSSLEHAITMHMVSYAGVADLOILVAKEIIPDEVILAKSEEDALLEMKEAAKASSK IVCNTETTISNVGEREEISMAGNEVKHIRVISSLEHAITMHMVSYAGVADLOILVAKEIIPDEVILAKSEEDALLEMKEAAKASSK IVCNTETTISNVGEREEISMAGNEVKHIRVISSLEHAITMHMVSYAGVADLOILVAKEIIPDEVILASSEDALLEMKEAAEAATKS IVCNTETTISNVGEREEISMAGNEVKHIRVISSLEHAITMHMVSYAGIADLOILVAKEIIPDEVILASSEDALLEMKEAAEAATKS	463 462 465 461 463 458
s	MEVEQEEMLEPVSPSAQYLKSSALSLTILGVLETEPPLDDSMTMPLLKNVFLPINPRFSSIMVTEKKGAKKWKKVEVNLKDHVNVFTFP MUVEGGEVLEPMSPSQYLKSSALSLTIGVLELGPPFDDSMAMSLLKEVFLPINPRFSSIMVTKKGVKWKKVEVNLKDHVOIF MEVEQEEVLEPMSPSAQYLKSSALSLTIIAVLESEVPIDDSMTLPLLKDVFLPINPRFSSIMVTEKKGVKWKKVEVNLKDHVNVFIFP MRSNNNKLDMEVDSDQVMGAVSFSAQYLKSSALSLTIFGVLELEAHIDDSMTMALLNHVFLPINPRFSSIMVFGKKWKKVEVNLKBHVVEHVRVEVF MKGEEEGLEPMSPSAQYLKSSALSLTIGVLELEAHIDDSMTMSLLKDIFLVINPRFSSIMVTKKGQKKWKKVEVNLEHVILFF MRSNNNKLDMEVDSDQVMGAVSFSAQYLKSSALSLTIGVLESENEIDDSMTMSLLKDIFLVINPRFSSIMVTKKGQKKWKKVEVNLEHVILFF MKGEEEGLEPMSPSAQYLKSSALSLTIGVLESENEIDDSMTMSLLKDIFLVINPRFSSIMVTKKGQKKWKVEVNLEHVILFF	89 89 89 98 88 93
5	NDMPTEYYDOCFTDYLSKIAMBELELNRPLWEIHIIKYPTONAAGHVVFKLHHSLGDGYSLMGALLSCLQRLDDESLPLTFPSRQSNGESNNSGGNGL SMMSTEYYDECFTEYLSKUSMBOLLONRPLWEIHILKYPTKNAAGNLIFKLHHSLGDGYSLMGALLSCLQRLDNELMPLTFPSRQSNRPNONLA SGMPTDYYADCFTEYLSKLATEOLFONQPLWEIHIVKYPTENAAGNLIFKLHHSLGDGYSLMGALLSCLQRUDNELMPLTFPSRQSNRPNONLA SDMSVDYYDECFTEYLSKLATEOLFONQPLWEIHIVKYPTENAAGNLIFKLHHSLGDGYSLMGALLSCLQRUDNELMPLTFPSRQSNRPNONLA SDMSVDYYDECFTEYLSKLATEOLFONQPLWEIHIVKYPTENAAGNLIFKLHHSLGDGYSLMGALLSCLQRUDNELMPLTFPSRQSNRPNONPNAGGNA SGMSVDYYDECFTEYLSKLATEOLFONQPLWEIHIVKYPTENAAGNIFKLHHSLGDGYSLMGALLSCLQRUDDESLPLTFPSRQSNPVTRPNAGGNA SGMSVDYYDECFTEYLSKLATEOLFINGHERPLWEIHIVKYPTENAAGNIFKLHHSLGDGYSLMGALLSCLQRUDDESLPLTFPSRQSNPVTRPNAGGNA	187 184 185 186 183 186
s	FLRRAPRELKGLVNTACDFGWALLKSSLVKDOKSPIRSGGDGVEFRPVVTITAVDLDQIKMIKSRLKVTINDVITGITICETRLYMQKTSEESGTAK FFRWVPRETSVVHRAVDFGSSLKSTLVKDOKSPIRSGGEGVEFRPVTITTMPCIDQIKQIKNLKVTINDVITGIIFFERLYMQKTSESGRAI LYRVPREFTELVYACDFGWSLFKSSLIKDNKSPIRSGEDGVEFRPVTTTTSTDOIKGIKSRLKVTINDVITGIIFFERLYMQKTSESGRA RIPREFTELVYACDFGBVLKSSFVSUKSPIRSGEOGVEFRPVTTTTTITSVDQIKIKARLNVSINDVITGIITIGTTITISTUSGKSKK RIPREFTELVYACDFGBVLKSSFVSUKSFVSUKSFVSUKSFVSUKSFVSUKSFVSUKSFVSUKSFVSUKSTKSSL LURVPREFTELVFTALDFGBVLKSSLIKDCKSPIRSGEDGVEFRPVTTTTAFVIDQLKGKSKLNVTINDVITGVIISGVSUKSK LLGRVPREFTELVFTALDFGWSLFKSTLIKDCKSPIRSGEDGVEFRPVTTTTAFVIDGLKGKSKLNVTNDVITGVIIGVTICTTUSDQIKSK LLGRVPREFTELVFTALDFGWSLFKSTLIKDCKSPIRSGEDGVEFRPVTTTTAFVIDGLKGKSKLNVTNDVITGVIIGVTICTTTSTVOKSK LLGRVPREFTELVFTALDFGWSLFKSSLIKDCKSPIRSGEDGVEFRPVTTTTAFVIDGLKGKSKLNVTNDVITGVIIGVT LGRVPREFTELVFTALDFGWSLFKSSLIKDCKSPIRSGEDGVEFRPVTTTTAFVIDGLKGKSKLNVTNDVITGVIIGVT LGRVPREFTELVFTALDFGWSLFKSSLIKDCKSPIRSGEDGVEFRPVTTTTAFVIDGLKGKSKLNVTNDVITGVIIGVT LGRVPREFTELVFTALTGDFGWSLFKSSLIKSSLIKDCKSPIRSGEDGVEFRFVTVTTTTAFVIDGLKGTKSKLNVTNDVITGVIGVGKSLKSK LUGVPREFTELVFTAFTSLIKDCKSPIRSGEDGVEFRFVTVTTTTAFVIDGUKGKSKLNVTNDVITGVIGVT LGRVPREFTELVFTAFTSLIKDCKSPIRSGEDGVEFRFVTVTTTTAFVIDGUKGTKSKLNVTNDVITGVIGVT LGRVPREFTELVFTAFTSLIKDCKSPIRSGEDGVEFRFVTVTTTTAFVIDGUKGTKSKLNVTNDVITGVT	285 282 283 289 278 284
s	STALVLINTRAVGGYKSLDEMIKPGSEMLWGNRFAFLOC <mark>PIPKLTAHDIQ.NPLGFVRKAHE</mark> TIKROFNSAAVLLTGOLINLIRKIRGFBAAARYIHG STALVLINTRAVGGYKSVDEMAKPGSKMEWGNRFAFLHVSTEKMTDEVLQ.NPLIFVKKAREMIKROFNSAAVYLTGOLINLIGKIRGFBAAARYIHG STALVLINTRAVGGYKSVDEMIKPGSEMEWGNRFAFLEVPIPKLSAAELE.NPLBFVKKANETIKROFNSAAVYLTGOLINLIGKIRGFBAAARYIHG STALVLINTRAVGGYKSVDEMIKPGSEMEWGNRFAFLEVPIPKLFAPVIQNNPLRFVKKANETIKROFNSAAVYLTGOLINLIGKIRGFBAAARYIHG TALVLINTRAVGGYKSVDEMIKPGSEMEWGNRFAFLEVPIPKLFAPVIQNNPLRFVKKANETIKROFNSAAVYLTGOLINLITKKIRGFBAAARYIHG TALVLINTRAUGGYKSVDEMIKENSDSFWGNRFAFLEVPIPKLFAPVIQNPLRFVKKANETIKROFNSAAVYLTGOLINITKKIRGFBAAARYIHG TALVLINTRAIGGYKSVDEMIKENSDSFWGNRFAFLEVPIPKLFAPVIQNPLRFVKANETIKROFNSAAVYLTGOLINITKKIRGFBAAARYIHG STALVLINTRAIGGYKSVDEMIKENSDSFWGNRFAFLOVPIPKLGAABOE.NPLRFVKAHEMIKROFNSATVYLTGOLINITKKIRGFBAARYIHG	382 379 380 387 375 381
s	TIKNTSMAISNLIGPVEK <mark>VALDNOPI</mark> KGLYB <mark>VVAGPPOSVSVTMISYVG</mark> KLRIAMTMEKGENDENKFKSCIPYAFEIISKAALOSPPTTKT TIKNTSMAISNNIGPVEOMTVANOPVKGLYBVVAGPPOSLSVTMISYVGKLRIAMTVEKGENDENKFKSCIPYAFEVIYKAALESSPPTKS TIKNTSMAISNLIGPVEOMALANOPIKGLYBVVAGPOSLSVTMISYVGKLRIAMTMEKGENDENKFKSCIPYAFEVISKAALOSPAPT TLKNTSMAISNLIGPVEOMALANIEVKGLYBAVAGPOSLSVTMISYVGKLRIAMTMEKGENDENKFKSCIPYAFEVISKAALOSPAPT TIKNTSMAISNLIGPVEOMALANIEVKGLYBAVAGPOSLSVTMISYVGKLRIAMTMEKGENDENKFKSCIPYAFEIIKAALEA TIKNTSMAISNLIGPVEOMALANIEVKGLYBAVAGPOSLSVTMISYVGKLRIAMTMEKGENDENKFKSCIPYAFEIIKAALEA TIKNTSMAISNLIGPVEOMALANIEVGKJSVAGPOSLSVTMISYVGKLRIAMTMEKGENDENKFKSCIPYAFEIIKAALEA	473 470 469 473 460 472

图 2 RgOATWSD 氨基酸序列的同源性比对

Fig. 2 Homology alignment of the RgOATWSD amino acid sequences

的磷酸化位点有 18 个, 酪氨酸磷酸化位点有 7 个; RgOATWSD2 丝氨酸磷酸化位点有 36 个, 苏氨酸的磷酸化位点有 31 个, 酪氨酸磷酸化位点有 12 个。利用 NetNGlyc 1.0 工具对 RgOATWSD1 与 RgOATWSD2 编码氨基酸序列进行在线分析,发现 二者均无 N-糖基化位点。

应用 TMHMM 2.0 工具对 RgOATWSD1 编码的 氨基酸序列进行在线分析,结果显示该蛋白为单 次跨膜蛋白,包括 1~184 位氨基酸在膜内、185~ 207 位氨基酸为跨膜区域、208~463 位氨基酸定位 在膜外。RgOATWSD2 全部定位在膜外,不具有跨 膜结构域。







图 4 RgOATWSD 二级结构预测



利用 SignalP-4.1 工具对编码氨基酸序列进行 在线分析,结果表明 RgOATWSD1 和 RgOATWSD2 蛋白的信号肽无峰值出现,说明地黄 OATWSD 蛋 白不存在信号肽,也说明该蛋白不属于分泌型蛋 白。利用 WoLF PSORT 工具对编码氨基酸序列进 行亚细胞定位分析,结果表明 RgOATWSD1 和 RgOATWSD2 蛋白均可能存在于内质网中。应用 SOPMA 对 RgOATWSD1 和 RgOATWSD2 蛋白进行 二级 结构分析。结果发现, RgOATWSD1 由 39.96%的α螺旋、39.09%的无规卷曲、17.71%的 延伸链和 3.24%的 β 转角共 4 种结构元件组成, 其中 α 螺旋比例最大; RgOATWSD2 由 39.32%的 α 螺旋、41.01%的无规卷曲、16.49%的延伸链和 3.17%的 β 转角共 4 种结构元件组成,其中无规卷 曲的比例最大(图 4)。

#### 2.4 RgOATWSD 保守结构域预测

利用 NCBI 的 Conserved Donmain Search 进行 在线分析,发现 RgOATWSD1 与 RgOATWSD2 均具 有 acyl\_WS\_DGAT 保守域与 DUF1298 超家族,前 者分别覆盖 RgOATWSD1 氨基酸序列的 92.65% 和



图 5 RgOATWSD 保守结构域分析

Fig. 5 Conservative domain analyses of RgOATWSD



图 6 RgOATWSD 三级结构预测 Fig. 6 Prediction of tertiary structures of RgOATWSD

RgOATWSD2 氨基酸序列的 94.50%。该家族是一种酰基转移酶家族,类似 WS 二酰基甘油酰基转移 酶(WS/DGAT)和甘油单酰基转移酶(MGAT)等,具有类似二酰基甘油酰基转移酶和甘油单酰基转移酶相似的活性,后者在其中分别占 7.35% 与 5.50%,功能未知(图 5)。

#### 2.5 RgOATWSD 三级结构分析

应用 SWISS-MODEL 对两种蛋白进行三级结构分析,发现其中包含的二级结构元件与上述二级结构的预测结果相吻合(图4),而 RgOATWSD1 与 RgOATWSD2 的三级结构形态有些不同, RgOATWSD1 比较像球形(图6)。

# 2.6 镉对 *RgOATWSD* 基因在地黄不同组织部位表达的影响

qRT-PCR 结果表明, *RgOATWSD*1 与 *RgOATWSD*2 在 CT 和 CK 的根、茎和叶组织中均有表达,其中, *RgOATWSD*1 在 幼 苗 叶 中 的 表 达 量 最 高, *RgOATWSD*2 在幼苗根的表达量最高。由图 7 可 知,在镉胁迫处理下, *RgOATWSD*1 与 *RgOATWSD*2 基因在地黄根、茎和叶组织中都表达,但其表达水 平均与对照组的表达水平有明显变化且二者的变 化相反, *RgOATWSD*1 在根、茎与叶中的表达均上 调,根部的变化最为明显, *RgOATWSD*2 在根、茎与 叶中的表达均下调,茎部的变化最为明显。以上



不同字母表示基因表达水平显著差异(*P*<0.05)。 Different letters indicate significant differences on gene expression levels (*P*<0.05).

图 7 RgOATWSD 基因在镉处理地黄不同组织部位的相对表达

Fig. 7 Relative expressions of RgOATWSD genes in different tissues of Rehmannia glutinosa under cadmium stress

结果表明,2个基因对地黄镉胁迫响应具有一定的 差异表达。

### 3 讨论与结论

植物脂肪酸代谢途径主要有酰基还原途径与 脱羰基化途径,前者产生蜡酯,蜡酯在生成过程中 虽然需要醛类中间体,但并不释放出来:后者形成 烷烃、醛、酮与仲醇。目前,霍霍巴和拟南芥等植物 的 WS 或者 WSD1 已经被报道,但地黄 WSD 未见报 道。本研究从地黄全长转录组测序数据中鉴定出 两个蜡酯合成酶基因 RgOATWSD1 与 RgOATWSD2, 与其他已知植物蜡酯合成酶基因同源性高,具有蜡 酯合成酶基因的功能(Kunst & Samuels, 2009) 且发 现 RgOATWSD1 和 RgOATWSD2 都定位于内质网, 与拟南芥 WSD1 定位于内质网的结果一致,以及发 现 RgOATWSD1 与霍霍巴的 WS 一样具有跨膜区域 和疏水性(肖一凡等, 2020)。RgOATWSD 在地黄 根、茎与叶组织的空间表达分析表明,RgOATWSD1 与RgOATWSD2在根、茎与叶组织中均有不同程度 的表达,而且在地黄茎与叶中表达的结果与拟南芥 WSD1 基因在茎与叶中表达的结果一致(Patwari et al., 2019)。上述发现表明, RgOATWSD 具有其他植 物物种中已知蜡酯合成酶基因相似的结构特征与 空间表达特性。

植物表皮蜡质是植物与环境之间的保护屏 障,能够保护植物免受干旱、盐、冷、紫外线、病原 菌和昆虫等的侵害。例如,植物表皮蜡酯的积累 和生物合成与植物的抗旱性反应密切相关(Seo et al., 2011; Patwari et al., 2019), 植物角质层蜡酯 的积累有助于抗旱性的提高: 拟南芥 AtWSD1 参与 了干旱期间蜡酯的积累,干旱期间叶片和茎中蜡 酯的积累增加,说明该基因在拟南芥茎和叶组织 中的蜡酯合成中起着关键作用(Patwari et al., 2019):苹果 MdWSD1 基因通过调控酯类和醇类的 合成,影响表皮蜡酯含量(王东阳,2016);芜菁 BrrWSD1 基因的剪接变异体及其在干旱胁迫下合 成蜡酯的作用,证明其与干旱胁迫有关(Yang et al., 2019);在甘蓝中检测到甘蓝 BoWSD1 基因在 不同处理下表现出不同的表达模式,推测其在对 NaCl、干旱、冷和热等非生物胁迫的反应中起重要 作用(Zeng et al., 2020)。但是迄今为止,植物 WSD 基因的 Cd 胁迫表达未见报道。因此,作者在 其团队研究地黄与棉花 Cd 胁迫的同时开展了 RgOATWSD 基因的 Cd 胁迫表达研究(魏喜,2023; 袁萍,2023),发现 RgOATWSD 基因表达对镉胁迫 有显著的应答反应,从而扩宽了植物 WSD 基因非 生物胁迫表达的范围。然而 RgOATWSD 基因的镉 胁迫表达机理尚不清楚。

目前,虽然植物对 Cd 胁迫响应的分子机制很

不清楚(Zhang et al., 2023),但是有一些好的探索 发现。例如.Cd 胁迫会激发植物通过质膜 Ca<sup>2+</sup>信 号调控 Cd 胁迫的分子机制(Zhang et al., 2023); 当植物受到 Cd 胁迫时,植物体启动生理生化网络 调控响应,包括植物维持其体内活性氧和活性氮 的代谢水平及在抗氧化酶类、非酶类抗氧化物质、 钙信号传递、激素、内质网加工、调控蛋白和基因 表达等方面的变化(安婷婷等,2021)。就基因表 达变化而言,主要有参与 Cd 的吸收、转运和解毒 的 NRAMP,参与转运 Cd 至植物地上部的 HMA、 MYB、ABA、ZIP、bHLH 与 RCD1 等基因家族成员, 以上参与植物镉胁迫响应的分子机制比较清楚 (魏喜, 2023)。本研究中的基因 RgOATWSD1 和 RgOATWSD2对Cd胁迫响应未见报道,但发现二 者编码的蛋白质都定位于内质网,因此,推测其 Cd 胁迫响应机制可能类似于上述的基于内质网加工 与基因参与的镉胁迫响应机制(安婷婷等,2021)。

综上所述,本研究成功从地黄全长转录组测 序数据中鉴定出两个地黄蜡酯合成酶基因 *RgOATWSD*1与*RgOATWSD*2,用生物信息学技术分 析了其编码酶的理化特性与结构特点,发现其在 地黄根、茎与叶中的空间表达模式及2个基因表 达模式的差异,进而发现其对镉胁迫应答反应明 显及两者之间的差异。本研究结果扩大了已知地 黄功能基因数据库,丰富了植物镉胁迫应答的蜡 酯合成酶基因信息,为进一步研究其结构功能及 其镉胁迫分子机理奠定基础。

## 参考文献:

- AN TT, HUANG D, WANG H, et al., 2021. Research advances in plant physiological and biochemical mechanisms in response to cadmium stress [J]. Chin Bull Bot, 56(3): 347-362. [安婷婷,黄帝,王浩,等, 2021. 植物响应镉胁迫的生理生化机制研究进展 [J]. 植物学报, 56(3): 347-362.]
- CHEN SS, XIE MH, CUI MK, et al., 2022. Identification of Broussonetia papyrifera transcription factor BpbZIP1 and analysis of its response to cadmium stress [J]. Bull Bot Res, 42(3): 394-402. [陈思思,谢牧洪,崔茂凯,等, 2022. 构树转录因子 BpbZIP1 的鉴定及镉胁迫响应分析 [J]. 植物研究, 42(3): 394-402.]
- JIANG N, SHI Y, ZHAO Z, et al., 2023. Expression and functional analysis of *OsPT*1 gene in rice under cadmium

stress [J]. Biotechnol Bull, 39(1): 166-174. [姜南, 石杨, 赵志, 等, 2023. 镉胁迫下水稻 *OsPT*1 的表达及功能分析 [J]. 生物技术通报, 39(1): 166-174.]

- KUNST L, SAMUELS L, 2009. Plant cuticles shine: advances in wax biosynthesis and export [J]. Curr Opin Plant Biol, 12(6): 721-727.
- LI JJ, ZHU JL, LI HM, et al., 2022. The effects of NAA on the tuberous root yield and quality of *Rehmannia glutinosa* and its regulatory mechanism by transcriptome and metabolome profiling [J]. Curr Issues Mol Biol, 44(8): 3291-3311.
- LUO YF, WANG CH, ZHANG Z, et al., 2022. Genome-wide identification of peanut *NAS* family and their expression response to iron deficiency and cadmium stress [J]. Plant Physiol J, 58(6): 1119–1132. [罗艳芳, 王朝慧, 张铮, 等, 2022. 花生 *NAS* 家族全基因组鉴定及其基因表达对 缺铁和镉胁迫的响应 [J]. 植物生理学报, 58(6): 1119–1132.]
- NICOLAS D, RICCO T, WONG DCJ, et al., 2020. Drought stress modulates cuticular wax composition of the grape berry [J]. J Exp Bot, 71(10): 3126-3141.
- PATWARI P, SALEWSKI V, GUTBROD K, et al., 2019. Surface wax esters contribute to drought tolerance in Arabidopsis [J]. Plant J, 98(4): 727-744.
- SEO PJ, LEE SB, MI CS, et al., 2011. The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 23(3): 1138-1152.
- SHALINI T, MARTIN A, 2020. Identification, isolation, and heterologous expression of sunflower wax synthase for the synthesis of tailored wax esters [J]. J Food Biochem, 44(10): e13433.
- WANG CY, LI ZJ, WANG P, et al., 2023. Physiological and biochemical analysis of drought resistance in sorghum cuticular wax-deficient mutant sb1 [J]. Biotechnol Bull, 39(5): 46-53. [王春语,李政君, 王平, 等, 2023. 高粱 表皮蜡质缺失突变体 sb1 抗旱生理生化分析 [J]. 生物 技术通报, 39(5): 46-53.]
- WANG DY, 2016. The clone of *MdCER4*, *MdWSD1*, *MdMAH1* and their response to ethylene regulation [D]. Zibo: Shandong University of Technology: 16-25. [王东阳, 2016. 苹果 *MdCER4、MdWSD1、MdMAH1* 基因的克隆及 对乙烯调控的响应[D]. 淄博:山东理工大学: 16-25.]
- WANG HB, LV XY, LI YY, et al., 2022. Identification and expression analysis of WSD (wax ester synthase/ diacylglycerol acyltransferase) gene family in apple [J]. Erwerbs-Obstbau, 6: 1–12.
- WANG JC, QIU WM, JIN KM, et al., 2023. Comprehensive analysis of WRKY transcription factor in Sedum plumbizincicola responding to cadmium stress [J]. J

Nanjing For Univ (Nat Sci Ed), 47(2): 49-60. [王剑 超, 邱文敏, 金康鸣, 等, 2023. 伴矿景天 WRKY 基因家 族鉴定及镉胁迫响应分析 [J]. 南京林业大学学报(自 然科学版), 47(2): 49-60.]

- WEN HW, DANG YF, DONG FF, et al., 2021. Analysis on differentially expressed genes of flag leaf epidermis wax based on transcriptome sequencing in wheat [J]. Shanxi Agric Sci, 49(12): 1462–1466. [温宏伟, 党一飞, 董凡 凡, 等, 2021. 基于转录组测序的小麦旗叶表皮蜡质差 异表 达 基 因 分 析 [J]. 山 西 农 业 科 学, 49(12): 1462–1466.]
- WEI X, 2023. Function and molecular mechanism of *GhRCD1* gene in cotton under Cd stress [D]. Xinxiang: Henan Normal University: 16-25. [魏喜, 2023. 棉花 *GhRCD1* 基因在 Cd 胁迫中的功能及分子机制研究 [D]. 新乡: 河南师范大学: 16-25.]
- XIAO YF, PENG J, ZHANG Y, et al., 2020. Research progress and applications of wax ester synthase [J]. J Beijing Univ Chem Technol (Nat Sci Ed), 47(6): 1-11. [肖一凡, 彭杰, 张扬, 等, 2020. 蜡酯合成酶的研 究进展及其应用 [J]. 北京化工大学学报(自然科学 版), 47(6): 1-11.]
- XU J, FU ZT, 2017. Discussion on the historical evolution and efficacy of processed products of *Rehmannia glutinosa* [J]. J Tradit Chin Med, 39(9): 1913-1916. [徐军,傅 喆暾, 2017. 地黄炮制品名历史沿革及功效考辨探讨 [J]. 中成药, 39(9): 1913-1916.]
- YANG YH, WANG CJ, LI RF, et al., 2021. Transcriptomebased identification and expression characterization of *RgABCC* transporters in *Rehmannia glutinosa* [J]. PLoS ONE, 16(6): e0253188.
- YANG YQ, PU YN, YIN X, et al., 2019. A splice variant of BrrWSD1 in turnip (Brassica rapa var. rapa) and its possible role in wax ester synthesis under drought stress [J]. J Agric Food Chem, 67(40): 11077-11088.
- YANG YQ, ZHOU ZL, LI Y, et al., 2020. Uncovering the role of positive selection site of wax ester synthase/ diacylglycerol acyltransferase in two closely related *Stipa* species in wax ester synthesis under drought stress [J]. J Exp Bot, 71(14): 4159-4170.

- YU YA, ZHANG XB, ZHANG L, et al., 2022. Cloning of *TaAlaAT* gene in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its expression analysis under cadmium stress [J]. Jiangsu Agric Sci, 50(18): 48-53. [于永昂, 张夏冰, 张蕾, 等, 2022. 小麦 *TaAlaAT* 基因的克隆及镉胁迫下表达分析 [J]. 江苏农业科学, 50(18): 48-53.]
- YUAN P, 2023. Study on the tolerance of *Rehmannia glutinosa* to heavy metal cadmium stress [D]. Xinxiang: Henan Normal University: 50-51. [袁萍, 2023. 地黄对重金属 镉胁迫的耐性研究 [D]. 新乡: 河南师范大学: 50-51.]
- ZENG AS, XU YY, SONG LX, et al., 2020. Validation of suitable reference genes for qRT-PCR in cabbage (*Brassica oleracea* L.) under different abiotic stress experimental conditions [J]. J Plant Biochem Biotechnol, 30(1): 184-195.
- ZHAO CJ, BAI L, OU YF, et al., 2009. Decontamination of organochlorine pesticides residue and heavy metal in *Rehmannia glutinosa* Libosch by SFE [J]. J Chromatogr Sci, 47(10): 919-924.
- ZHOU A, LIU E, JIAO L, et al., 2018. Characterization of increased cuticular wax mutant and analysis of genes involved in wax biosynthesis in *Dianthus spiculifolius* [J]. Hortic Res, 5(40): 3–9.
- ZHOU YQ, SHAO LY, GUO MM, et al., 2020. Cloning and bioinformatics analysis of *C3H* gene in *Rehmannia glutinosa* [J]. Guihaia, 40(9): 1281–1287. [周延清, 邵露营, 郭 萌萌, 等, 2020. 地黄 *C3H* 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 广西植物, 40(9): 1281–1287.]
- ZHU C, WANG FY, SUN XW, et al., 2022. Bioinformatics and expression analysis of wax synthesis related genes in coconut [J]. Mol Plant Breed, 20(13): 4289-4295. [朱 聪, 王富有, 孙熹微, 等, 2022. 椰子蜡质合成相关基因 的生物信息学及其表达分析 [J]. 分子植物育种, 20(13): 4289-4295.]
- ZHANG YT, WANG ZQ, LIU YS, et al., 2023. Plasma membrane-associated calcium signaling modulates cadmium transport [J]. New Phytol, 238(1): 313-331.

(责任编辑 周翠鸣)