

红树植物秋茄分子生物学研究进展

杜照奎^{1,2,3}, 陈河⁴, 李钧敏^{1,2,3}

1 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室, 浙江 台州 318000

2 台州学院生态研究所, 浙江 台州 318000

3 台州学院 生命科学学院, 浙江 台州 318000

4 海南东寨港国家级自然保护区管理局, 海南 海口 571129

杜照奎, 陈河, 李钧敏. 红树植物秋茄分子生物学研究进展. 生物工程学报, 2017, 33(2): 196–204.

Du ZK, Chen H, Li JM. Advances in molecular biology of the mangrove *Sonneratia apetala*, Sheue, Liu & Yong. Chin J Biotech, Chin J Biotech, 2017, 33(2): 196–204.

秋茄 *Sonneratia apetala* Sheue, Liu & Yong 是分布于热带、亚热带海岸带与河口潮间带的常绿红树植物, 在海岸生态系统中具有重要的功能和价值。文中综述了近年来国内外关于秋茄分子生物学方面的研究进展, 主要包括基于分子标记的秋茄亲缘地理关系与遗传多样性研究, 基于双向电泳技术的蛋白质组学研究, 以及逆境胁迫响应基因的克隆与功能验证研究; 最后还结合当前研究现状展望了秋茄分子生物学未来研究工作的方向。

关键词 秋茄, 分子标记, 盐胁迫, 蛋白质组, 基因克隆

Received July 18, 2016; **Accepted** November 14, 2016

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 31270461), Opening Project of Zhejiang Provincial Key Laboratory of Plant Evolutionary Ecology and Conservation (No. EEC2014-05), Project of Taizhou Science and Technology Bureau (No. 1403KY03).

Corresponding author Junmin Li. Tel: +86-576-85137178; E-mail: lijm@tzc.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31270461), 浙江省植物进化生态学与保护重点实验室开放课题 (No. EEC2014-05), 台州市科技局项目 (No. 1403KY03) 资助。

网络出版时间: 2016-12-01

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20161201.1617.001.html>

Kandelia obovata

1
2
3
4

Sheue, Liu & Yong, a mangrove species which distributed in tropical, subtropical coastal and estuarine intertidal, has important ecological functions in coastal ecosystems. Here, we reviewed several aspects of the recent research progress in molecular biological studies of . We focused the phylogeography and genetic diversity of this species by several types of molecular markers, proteome analyses based on two-dimensional electrophoresis platform accomplished for this species, and functional genes isolated under non-biotic stress environment. Finally, based on the current research progress, we proposed some orientations for future molecular biological research on

, molecular marker, salt stress, proteome, gene cloning

断或者树皮被擦伤后，体内富含的单宁酸等酚类物质被氧化，呈现红色，故称红树^[1]。秋茄隶

属（ ）
红树植物，常绿灌木或小乔木；嫩枝的气生根向下生成支柱根，叶片长椭圆形，交互对生，中脉明显；花白色，具短梗，2-5朵排列成二歧聚伞花序；果卵形，萼裂片宿存；胎生。Sheue等^[2]根据叶、叶脉、萼片、花粉和胚轴等形态特征将其划分为2个不同的品种，即秋茄

和秋茄。

大多数红树对低温敏感，降温、不定期的寒冷或霜冻对其生长和分布有着重要影响，而秋茄是红树植物中抗寒能力最强的树种

础。文中综述了近年来国内外有关秋茄亲缘地理关系与遗传多样性分析、蛋白质组学和功能基因发掘等方面的研究进展,并对该物种未来分子生物学研究的方向进行了展望。

亲缘地理关系与遗传多样性

Chiang 等^[14]基于叶绿体和线粒体 DNA 序列分析了东亚秋茄种群间的亲缘地理关系,发现叶绿体 DNA (cpDNA) 基因间隔区、基因间隔区和线粒体 DNA (mtDNA) 内转录间隔区 (ITS) 序列一致表明不同种群来源的秋茄聚为两类,其中泰国 Ranong 种群与马来西亚 Bako 种群聚在一起;而中国钦州、北海、湛江、海口和厦门等地的种群聚在一起,这与 Sheue 等^[2]研究结果相吻合。从系统发育分析结果来看,Ranong 种群与 Bako 种群相关性高,且与中国种群没有检测到相关性,表明 Bako 种群可能起源于印度洋沿岸。

此外,采用其他分子标记的方法研究秋茄种群的遗传多样性也有较多文献报道。Chen 等^[15]采用 ISSR 技术分析中国东南沿海 7 个秋茄种群的遗传多样性,结果显示种群间的遗传分化系数 (F_{ST}) 为 0.5548,即 55.48% 的变异存在于种群间,44.52% 的变异存在于种群内,这表明种群间的遗传分化程度相对较高;且种群遗传多样性基本上呈现出南方种群高于北方的态势。阮宇等^[16]通过 SSR 分子标记方法检测了中国东南沿海北部(福鼎和宁德)与南部(漳州和深圳)秋茄种群的遗传多样性,遗传多样性指数值分别为 0.648 ± 0.054 和 0.811 ± 0.036 ,结果同样表明大陆东南沿海南方种群的遗传多样性高于北方。

在全新世的地层中,长江三角洲多处发现

了红树植物的花粉^[17],表明在全新世时期,温暖的气候促使海平面上升,我国长江三角洲大部分地区被海水淹没,红树林可能自然分布至浙江省杭州湾和江苏省太湖地区。

有研究表明,大陆东南沿海南部地区可能是亚洲红树植物分布地区的多样性中心之一^[18]。向北流动的黑潮及其分支洋流可能是秋茄种群扩散的助力^[17],秋茄繁殖体在它们的推动下从东南沿澎湖海底峡谷向北扩散至杭州湾和长江三角洲。

而在气候寒冷的冰期,南方地区成为秋茄的避难所,其自然分布可能会缩至福建北部。秋茄北向拓殖的过程中,会经历空间奠基者效应和种群瓶颈效应,因而,种群中某些基因常常会在拓殖过程中丢失,这可能是北部种群的遗传多样性比南方避难所种群要低的原因之一。

蛋白质组学

近年来,秋茄蛋白质组学研究进展较快,促进了人们从分子层面认识秋茄防御逆境胁迫的机理。

重金属镉 (Cd) 通过岩石风化和人类活动进入水体,是对植物有毒的主要环境污染物之一,秋茄分布于河口和海湾,其生长与生存可能遭受着 Cd 胁迫。Weng 等^[19]分析了 Cd 胁迫下秋茄根的蛋白质组变化,结果表明短期 Cd 处理下,共有 53 个蛋白质表达上调或下调。约一半的上调蛋白参与氧化还原反应,包括抗氧化酶类、谷胱甘肽合成所需酶类、三羧酸循环所需酶类,以及用于产生 ATP、NADH 和 NADPH 的磷酸戊糖途径所需酶类。这些结果表明提高抗氧化反应是秋茄应对 Cd 导致的氧化胁迫的重要方式。

编码 172 个氨基酸, 等电点为 8.57, 分子量 18.2 kDa。42–49 位氨基酸残基为推测的 ATP/GTP 结合位点 A 基序 (P-loop), 48–54 位氨基酸残基是插入的 7 个氨基酸残基。Northern 分析表明: 高盐抑制 基因的表达式^[25]。

秋茄液泡膜内在蛋白 (TIP) 基因 (GenBank 登录号: AF521135) cDNA 全长为 1 099 bp, 含有一个 759 bp 的 ORF, 编码 252 个氨基酸, 等电点为 5.77, 分子量为 26.3 kDa。该氨基酸序列含有 6 个跨膜区和 2 个高度保守的 Asparagine-Proline-Alanine (NPA) 基序。Northern 分析表明高盐抑制该基因在红树 3 个种中的表达, 这种下调表达可能降低液泡膜水分渗透, 有利于盐胁迫下细胞的保水^[26]。将秋茄液泡膜水通道蛋白 基因转化烟草后, 阳性植株在盐胁迫下的根、茎、叶鲜质量, 叶片净光合速率, 叶片组织 Na^+ 、 K^+ 积累和根尖 Na^+ 、 K^+ 内流幅度均高于野生型烟草。表明 KcTIP1 具有与其他水通道蛋白类似的蛋白结构和酶学功能, 基因过表达可以提高转基因烟草的抗盐能力^[27]。

脱水应答蛋白基因 (Responsive to desiccation 22,) 是非常重要的植物抗逆性基因。秋茄 基因的

基因烟草从 24 h 到第 7 天 ,SOD 活性持续增加 , 过氧化氢酶 (CAT) 酶活性也增加了 , 表明转 烟草则可通过上调抗氧化酶的表达减少 Na^+ 对叶绿体的伤害。

硫氧还蛋白 (Trxs) 是一类小分子蛋白 , 具有保守功能区域 (WCXPC) , 可以通过半胱氨酸 (Cys) 的二硫键的形成以及断裂 , 从而具有氧化还原的作用。研究表明 , 过表达 的转基因烟草耐盐性增强 , 其原因是一方面通过提高 CAT 以及抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 的活性来清除 H_2O_2 ; 另一方面通过调节抗坏血酸-谷胱干

将有利于理解红树植物低温适应的分子机理。Fei 等^[37]通过抑制性消减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 技术确定秋茄冷胁迫相关的潜在基因。对文库 670 个克隆中 334 个冷相关的表达序列标签 (ESTs) 进行测序, 其中 143 个 cDNA 根据 NCBI Blast 被分成 10 个组, 如新陈代谢、能量、细胞救援和防御、转录和光合作用等。从文库中选择两个基因 (水通道蛋白基因和锌家族蛋白基因) 进一步通过定量实时 PCR 进行分析, 结果表明, 这两个基因在冷胁迫下转录水平均上调, 与消减 cDNA 文库结果吻合。

热休克蛋白 70 (HSP70) 是 HSP 家庭中的重要成员, 在植物各种应激保护中发挥着作用。Fei 等^[38]通过 RACE 技术克隆得到秋茄 基因 (), 其 ORF 由 1 959 bp 核苷酸构成。荧光定量 PCR 结果显示, 的表达起初维持在一定水平, 冷胁迫 48 h 表达量显著上升, 168 h 到达最高水平。结果表明, 基因的表达可被诱导且在秋茄低温胁迫的保护反应中发挥作用。

小结与展望

秋茄是生活在热带、亚热带潮间海岸带的重要植物, 其特殊的生境使之成为人们研究木本植物对盐、重金属和水淹耐受机理的重要材料。尽管关于秋茄分子生物学的研究逐年增加, 并取得了一定的成果, 但是不得不承认该研究起步较晚, 与杨树、苹果、桃、桑树和麻疯树等许多木本植物相比较为落后, 秋茄的基因组和转录组测序等工作也尚未见报道, 目前较多的工作集中在盐胁迫下蛋白质组和基因克隆的研究, 而功能基因克隆也多限于表达模式分析和原核表达阶段, 对于转基因功能验证方面的工作开展相对较少。秋茄为耐寒性最强的红树

植物, 是海防造林重要的树种, 因而颇受人们的青睐。秋茄已成功引种至浙江省温州和台州海岸带多年, 然而, 由于冬季低温胁迫诱发的越冬困难使得继续北引难度增大许多, 关于生理生态学的研究已有较多报道, 但其深层次的机理仍然不明, 笔者克隆到秋茄与低温胁迫相关的转录因子 基因, 并实现其在原核生物中的表达, 下一步拟通过凝胶阻滞实验探索其与顺式作用原件的结合特性, 旨在揭示秋茄低温适应的分子机理。研究秋茄低温适应的分子机制, 并通过基因工程技术对其进行改造, 培育低温适应能力更强的品系, 扩大秋茄种群规模, 使其向纬度更高的地区种植, 具有重要的理论和现实意义。

REFERENCES

- [1] Lin YM, Xiang P, Lin P. Studies on tannins of mangroves—a review. *Mar Sci*, 2005, 29(3): 59–63 (in Chinese).
林益明, 向平, 林鹏. 红树林单宁的研究进展. *海洋科学*, 2005, 29(3): 59–63.
- [2] Sheue CR, Liu HY, Yong JWH. (Rhizophoraceae), a new mangrove species from Eastern Asia. *Taxon*, 2003, 52(2): 287–294.
- [3] Chen LZ, Wang WQ, Zhang YH, et al. Damage to mangroves from extreme cold in early 2008 in southern China. *Chin J Plant Ecol*, 2010, 34(2): 186–194 (in Chinese).
陈鹭真, 王文卿, 张宜辉, 等. 2008 年南方低温对我国红树植物的破坏作用. *植物生态学报*, 2010, 34(2): 186–194.
- [4] Das S, Crépin AS. Mangroves can provide protection against wind damage during storms. *Estuar Coast Shelf Sci*, 2013, 134: 98–107.
- [5] Zhao P, Han WD. Genetic diversity of fifteen populations distributed in southeast coast of China by using SRAP. *Genom Appl Biol*, 2009, 28(6): 1151–1156 (in Chinese).
赵鹏, 韩维栋. 中国东南沿海 15 个秋茄种群遗传

- 多样性的 SRAP 分析. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(6): 1151–1156.
- [6] Li NY, Chen SL, Zhou XY, et al. Effect of NaCl on photosynthesis, salt accumulation and ion compartmentation in two mangrove species, *Avicennia marina* and *Sonneratia caseolaris*. *Aquat Bot*, 2008, 88(4): 303–310.
- [7] Zhu Z, Pei ZM, Zheng HL. Effect of salinity on osmotic adjustment characteristics of *Avicennia marina*. *Russ J Plant Physiol*, 2011, 58(2): 226–232.
- [8] Zheng CF, Liu WC, Qiu JB, et al. Comparison of physiological characteristics of *Avicennia marina* at different ages in winter in the northernmost mangrove transplanted area of China. *Acta Ecol Sin*, 2013, 33(3): 132–138.
- [9] Kao WY, Shih CN, Tsai TT. Sensitivity to chilling temperatures and distribution differ in the mangrove species *Avicennia marina* and *Sonneratia caseolaris*. *Tree Physiol*, 2004, 24(7): 859–864.
- [10] Weng BS, Huang Y, Liu JC, et al. Alleviated toxicity of cadmium by the rhizosphere of *Avicennia marina* (S., L.) Yong. *Bull Environ Contam Tox*, 2014, 93(5): 603–610.
- [11] Weng BS, Xie XY, Weiss DJ, et al. *Avicennia marina* (S., L.) Yong tolerance mechanisms to cadmium: subcellular distribution, chemical forms and thiol pools. *Mar Pollut Bull*, 2012, 64(11): 2453–2460.
- [12] Lu HL, Zhang Y, Liu BB, et al. Rhizodegradation gradients of phenanthrene and pyrene in sediment of mangrove (*Avicennia marina* (L.) Druce). *J Hazard Mater*, 2011, 196: 263–269.
- [13] Fang Y, Yan CL, Du JN, et al. Rhizosphere remediation of phenanthrene-contaminated sediment by *Avicennia marina* (L.) Druce. *J Agro-Environ Sci*, 2011, 30(6): 1160–1165 (in Chinese).
- 方宇, 严重玲, 杜静娜, 等. 红树植物秋茄对菲污染沉积物降解作用. *生态学杂志* 2011, 30(6): 1160–1165

