

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.07.003

引用格式:马蓉,杨攀,张蕴文,等.星星草 *PtCASP1* 基因克隆及其在盐和涝胁迫下的表达模式分析[J].草地学报,2026,34(7):2366—2376

MA Rong, YANG Pan, ZHANG Yun-wen, et al. Cloning of *PtCASP1* Gene in *Puccinellia tenuiflora* and Analysis of its Expression Patterns under Saline and Stagnant Stress[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(7):2366—2376

星星草 *PtCASP1* 基因克隆及其在盐和涝胁迫下的表达模式分析

马蓉¹, 杨攀¹, 张蕴文², 胡晓炜¹, 王会², 王沛^{1*}

(1. 西南民族大学 四川若尔盖高寒湿地生态系统国家野外科学观测研究站, 草地资源学院, 四川 成都 610041;

2. 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041)

摘要:星星草(*Puccinellia tenuiflora*)是一种对盐涝交互逆境有独特适应性的盐生植物,内皮层加厚形成的质外体屏障可能是其适应这一环境的关键。凯氏带和木栓层是根内皮层水和溶质径向运输的质外体屏障。本研究以星星草为材料,通过基因克隆获得凯氏带形成关键基因 *PtCASP1*,并对该基因进行生物信息学分析、亚细胞定位及盐、涝和盐涝复合胁迫下的表达模式分析。结果表明,*PtCASP1*基因全长 552 bp,编码 184 个氨基酸,为疏水性稳定蛋白,具有响应赤霉素、干旱、低温及光反应等顺式作用元件。系统进化分析表明 *PtCASP1* 与多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)、看麦娘(*Alopecurus aequalis*)的亲缘关系较近。免疫荧光分析显示,*PtCASP1* 蛋白分布于细胞核与细胞膜。*PtCASP1* 基因在根中表达量显著高于叶,且受盐、涝及盐涝复合胁迫诱导,均在各处理 72 h 时表达量最高。本研究可为今后深入研究凯氏带在星星草适应盐涝交互逆境中的功能提供参考。

关键词:星星草; *PtCASP1*; 基因克隆; 亚细胞定位; 表达分析; 盐涝复合胁迫

中图分类号:Q943

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)07-2366-11

Cloning of *PtCASP1* Gene in *Puccinellia tenuiflora* and Analysis of its Expression Patterns under Saline and Stagnant Stress

MA Rong¹, YANG Pan¹, ZHANG Yun-wen², HU Xiao-wei¹, WANG Hui², WANG Pei^{1*}

(1. National Field Observation and Research Station(Sichuan Zoige) for Alpine Wetland Ecosystem, College of Grass land resources, Southwest Minzu University, Chengdu, Sichuan Province 610041, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Southwest Minzu

University, Chengdu, Sichuan Province 610041, China)

Abstract: *Puccinellia tenuiflora* is a halophyte with remarkable adaptability to the combined stress of saline and stagnant. The apoplastic barrier formed by endodermal thickening is likely crucial for this adaptation, in which the Casparian strip and suberin lamellae serve as key apoplastic barriers in endodermis for the radial transport of water and solutes. In this study, using *Puccinellia tenuiflora* as material, we cloned *PtCASP1*, a key gene involved in Casparian strip formation. Bioinformatic analysis, subcellular localization, and expression pattern analysis under saline, stagnant and combined saline-stagnant stresses were conducted. The results showed that the *PtCASP1* gene was 552 bp in length, encoding 184 amino acids. It was a hydrophobic, stable protein and contained cis-acting elements responsive to gibberellin, drought stress, low temperature stress, and light response. Phylogenetic analysis indicated that *PtCASP1* was closely related to those in *Lolium multiflorum* and *Alopecurus aequalis*. Immunofluorescence analysis revealed that the *PtCASP1* protein exhibited dual localization in the nucleus and cell membrane. The expression level of the *PtCASP1* gene in the roots of *Puccinellia*

收稿日期:2025-11-03;修回日期:2025-12-14

基金项目:四川省科技计划项目(2024NSFSC0310);西南民族大学“双一流”项目(CX2023013);西南民族大学青藏高原研究院创新团队项目(2024CXTD11)资助

作者简介:马蓉(2000-),女,回族,宁夏中宁人,硕士研究生,主要从事牧草逆境生理与分子生物学研究,E-mail:18328569843@163.com;

*通信作者 Author for correspondence, E-mail:wangpei@swun.edu.cn

tenuiflora was significantly higher than that in the leaves, and it responded to saline, stagnant, and combined saline-stagnant stresses, with the highest relative expression levels at 72 hours post-treatment for all stress conditions. This study provides a reference for further investigation into the function of the Casparian strip in helping *Puccinellia tenuiflora* adapt to saline-stagnant combined stress.

Key words: *Puccinellia tenuiflora*; *PtCASP1*; Gene cloning; Subcellular localization; Expression analysis; Combined saline-stagnant stress

土壤盐害和涝害是限制全球范围内作物和饲草生产的两大类非生物胁迫^[1-3]。由于不合理灌溉和季节性暴雨频发,全世界近一半的灌溉地已受到次生盐碱化的危害,且这一危害仍在扩大^[4];同时由于盐碱化导致地表水下渗减少,世界上许多盐碱地也受到涝害的影响^[5],盐害和涝害往往同时存在,共同构成盐涝复合胁迫。星星草(*Puccinellia tenuiflora*)是广泛分布于盐碱化湿地草原的一类禾本科碱茅属(*Puccinellia*)优良牧草,拒 Na^+ 能力极强,能在高盐分环境中完成生活史,且可维持体内低 Na^+ 水平^[6-7]。课题组前期研究发现,星星草对盐涝复合胁迫有独特的强适应能力,且这一特性可能与内皮层凯氏带(Casparian strip)有关^[8]。凯氏带是植物根内皮层分化的标志之一^[9],也是重要的水和溶质径向运输的质外体屏障,在植物响应盐和涝的过程中发挥着重要作用^[10-13]。

当植物面对非生物胁迫时,植物根部凯氏带会被诱导而提早形成,以抵御对自身发育不利的物质进入,从而达到抗胁迫、适应劣势环境的目的^[14]。这种提前形成凯氏带以应对胁迫的现象在植物中相当普遍,有研究报道当水稻(*Oryza sativa*)受到缺氧胁迫时凯氏带也会在根系提前形成^[15],另一项研究报道盐胁迫同样会导致水稻凯氏带提前形成^[16],在盐胁迫条件下,凯氏带有效地阻止了土壤中过量的 Na^+ 流入中柱^[17],此外,在玉米(*Zea mays*)根中,盐胁迫下,凯氏带形成得更早、更厚、更宽^[17]。在棉花(*Gossypium hirsutum*)等其他作物中也观察到了类似的现象^[16]。精确定位于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)根系内皮层凯氏带形成位置的凯氏带结构域蛋白(Casparian strip domain proteins, CASPs)是最早被鉴定的调控凯氏带正确形成的家族蛋白,通过转录组分析,在拟南芥中鉴定出5个在内皮层特异性表达的 *AtCASP*s 蛋白(*AtCASP1*~5),研究证实多个 *AtCASP*s 蛋白之间存在互作,形成稳定的跨膜聚合物,引导凯氏带细胞壁物质的定位与沉积,且 *AtCASP*s 家族成员存在功能冗余,协同调控凯氏带的空间定位与形态组装^[18]。*AtCASP*s 蛋白家族在植物中发挥着多种关键作用,包括凯氏带的形成、矿物质元素的吸收、生长发育的调节以及对

环境胁迫的响应^[19-21]。

因此,本研究以调控凯氏带正确形成的 *AtCASP1* 基因为参照,在星星草中克隆 *CASP* 基因,命名为 *PtCASP1*,并对 *PtCASP1* 基因编码的蛋白质进行生物信息学分析和亚细胞定位,同时分析了 *PtCASP1* 基因在盐、涝及盐涝复合胁迫下的表达模式。初步探讨该基因在星星草响应盐、涝及盐涝复合胁迫中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料培养与处理

星星草种子由西南民族大学草地资源学院种质资源库保存。选取饱满的星星草种子均匀撒播在铺有吸水纸的筛网上,在温度 23/18℃(昼/夜)、相对湿度 40%~60% 的培养室中黑暗萌发。7 d 出苗后用 1/2 Hoagland 营养液浇灌,并移至光照环境(16/8 小时,光/暗),每隔 3 d 更换一次基质。14 d 后选取长势一致的幼苗,固定在已打孔的泡沫板上,将根系完全浸入 1/2 Hoagland 营养液的水培盆中,恢复培养 7 d,全程用产气泵对根系进行通气。设四个处理:对照组(control)继续生长;盐处理组(saline)用含 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 的 1/2 Hoagland 营养液浇灌;涝处理组(stagnant)使用含 0.1% 琼脂的 1/2 Hoagland 营养液培养(含 0.1% 琼脂的营养液可降低氧的可用性,以模拟缺氧涝胁迫)^[22-23];盐和涝共处理组(saline+stagnant)用含 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 和 0.1% 琼脂的 1/2 Hoagland 营养液进行处理。对照和盐处理均对根系通气,其余两个处理不通气。随机选取生长良好的植株根系,液氮速冻,−80℃冰箱保存,用于目的基因的克隆;于对照处理后 168 h 取根和叶进行组织特异性分析;同时取各处理的根系样品,在 0 h, 3 h, 24 h, 72 h, 168 h 时间点取样(三个生物学重复)进行荧光定量检测。

1.2 *PtCASP1* 基因克隆

本研究在拟南芥数据库中查找 *AtCASP1* 基因序列,利用 TBtools 软件,在已发表的星星草参考基因组

(<http://xhhuanglab.cn/data/alkaligrass.html>)中进行本地 BLAST 比对,筛选得到候选基因,通过与拟南芥中的 *AtCASP1* 基因构建系统进化树和氨基酸序列比对,得到同源性最高的序列(基因 ID 为 Pt_Ch0404765),命名为 *PtCASP1*。采用 Primer Premier 5.0 设计 *PtCASP1* 扩增引物(表 1),NCBI Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)进行引物特异性检验。采用 CTAB 法提取 DNA,以 gDNA 为模板,使用北京擎

科生物科技股份有限公司的高保真酶(2×T8 High-Fidelity Master Mix)进行 PCR 扩增,扩增体系及程序均按照说明书进行,扩增得到的产物经琼脂糖凝胶电泳检测后进行目的片段的回收,将目的片段与 pClone007 Vector Kit 载体连接后,通过冻融法将连接好的载体转化进大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,于含有氨苄的 LB 固体培养基上培养,筛选阳性单克隆菌,菌液鉴定后送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序验证。

表 1 引物信息

Table 1 Information about the primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	用途 Function
<i>PtCASP1</i> -F	AAACATCCAGAATGAACTCCGAC	基因克隆
<i>PtCASP1</i> -R	ACCACACCATAGCACACTTATACTG	Gene cloning
<i>qPtCASP1</i> -F	CTACCTCATCCTTTCTCTCCAC	实时荧光定量 PCR
<i>qPtCASP1</i> -R	CCTTGTGTGCTAAGTAAACAATAGC	Real-Time fluorescence quantitative
<i>PtActin</i> -F	TTGCCCTTGACTACGACCA	内参基因
<i>PtActin</i> -R	GGAAACGCTCAGCACCAAT	Reference gene
1300-GFP-F	CACCATGAACTCCGACGAGCGTGGCGAGACCTCC	亚细胞定位载体构建
1300-GFP-R	CGCCGCGCCTGGCCAGGGCAATGGCG	Construction of a subcellular localization vector

1.3 生物信息学分析

首先利用在线工具 ExPasy 对 *PtCASP1* 蛋白的理化性质进行分析,利用 SOPMA 在线软件和 SWISS-MODEL 在线工具对 *PtCASP1* 蛋白的二级结构和三级结构进行分析预测,为了深入研究基因的潜在调控功能,利用 TBtools 提取 *PtCASP1* 基因编码序列(Coding sequence, CDS)的起始密码子前 2000 bp 的核酸序列作为该基因的启动子序列,通过 PlantCARE 对其进行启动子区域顺式作用元件分析,利用 TBtools 对 *PtCASP1* 基因的基因组 DNA 序列和 CDS 序列进行比对,对其外显子和内含子进行分析,利用 NetPhos 3.1 在线软件预测 *PtCASP1* 蛋白的磷酸化位点,利用在线软件 TMHMM 和 SignalP 5.0 对蛋白进行跨膜结构域及信号肽预测,从 PFAM 数据库获得 DUF588 结构域的隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model, HMM)(PF04535),并使用 HMMER3.0 软件在星星草蛋白质数据库中搜索 *PtCASPs* 基因^[24]。然后,将这些 *PtCASPs* 序列提交给 NCBI-CDD,以确认保守的 DUF588 和 Marvel 结构域的存在,将星星草、水稻^[24]和拟南芥^[24]的 *CASPs* 基因家族成员构建系统进化树,通过 DNAMAN 软件对星星草 *PtCASP1* 蛋白与水稻、玉米、拟南芥、小麦(*Triticum aestivum*)、多花黑麦草

(*Lolium multiflorum*)、俯垂臭草(*Melica nutans*)、看麦娘(*Alopecurus aequalis*)、稷(*Panicum miliaceum*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、三芒草(*Aristida adscensionis*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、冰湖野米(*Zizania palustris*)、海雀稗(*Paspalum vaginatum*)和尾稈草(*Urochloa reptans*)的氨基酸序列进行多重比对分析。对星星草 *PtCASP1* 基因及其编码蛋白进行生物信息学分析,所用软件名称及网址如表 2 所示。

1.4 星星草 *PtCASP1* 表达载体构建及亚细胞定位分析

为了进一步分析 *PtCASP1* 蛋白在细胞中的定位,将克隆获得的 *PtCASP1* 与 pCambia1300-GFP 载体进行连接和转化,然后通过菌落 PCR 进行鉴定,载体检测所用引物序列见表 1。经菌落 PCR 检测后,选取阳性克隆送至生工生物工程股份有限公司进行测序,最后获得 pCambia1300-GFP-*PtCASP1* 载体。采用电转化法将构建好的载体转化至农杆菌菌株 GV3101 中进行表达,采用农杆菌侵染法对烟草叶片进行侵染,使其进入细胞内部,转化 2 d 后,使用尼康 AI 共聚焦显微镜观察结果,用激发滤光片在 500~550 nm 处检测 GFP 荧光。

表 2 生物信息学分析所用软件信息

Table 2 Information of the software used for bioinformatics analysis

软件名称 The name of software	分析项目 The item analyzed	网址 Website
NCBI-Blast	序列比对 Sequence alignment	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
ExPasy	蛋白理化性质分析 The characteristic analysis of physical and chemical of protein	https://web.expasy.org/
SOPMA	蛋白二级结构分析 Secondary structure analysis of protein	https://npsa-prabi.ibcp.fr/
Swiss-Model	蛋白三级结构分析 Tertiary structure analysis of protein	https://www.swissmodel.expasy.org/
Plant CARE	顺式作用元件分析 <i>Cis</i> -acting element analysis	https://bioinformatics.psb.ugent.be/
NetPhos 3.1	磷酸化位点预测 Phosphorylation site prediction	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/
TMHMM	跨膜结构域预测 Transmembrane domain prediction	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
SignalP 5.0	信号肽预测 Signal peptide prediction	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/
DNAMAN 6.0	序列比对 Sequence alignment	本地软件 Local software
Snap Gene	序列比对 Sequence alignment	本地软件 Local software
MEGA 6.0	系统进化树构建 Phylogenetic tree construction	本地软件 Local software
TB tools	顺式作用元件分析 <i>Cis</i> -acting element analysis	本地软件 Local software

1.5 *PtCASP1* 基因表达模式分析

分别取星星草幼苗各处理后的根和叶为材料,提取各样品总 RNA,反转录为 cDNA 后,以此为模板进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测。根据目的基因测序序列的保守区设计特异性荧光定量 PCR 引物(表 1),选择星星草 *PtActin* 基因为荧光定量 PCR 的内参基因^[25],使用 Takara TB Green®Premix Ex Taq™II(Tli RNaseH Plus)实时荧光定量 PCR 试剂盒,反应程序和体系见说明书。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算在不同处理下 *PtCASP1* 基因的相对表达量。

1.6 数据分析

数据使用 Excel 2021 和 SPSS 27.0 软件进行单因素方差分析;采用 Duncan 多重比较检验分析组间差异 ($P<0.05$);使用 GraphPad Prism 10 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 基因克隆与序列分析

以星星草 gDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得一条大小约 900 bp 的条带(图 1),与目的片段的预期大小一致。测序结果显示克隆得到的 *PtCASP1* 基因总长度为 887 bp,完整的 CDS 序列长度为 552 bp,共编码 184 个氨基酸(图 2A)。测序结果与参考基因组序列比对发现 CDS 区有两个碱基不同,但是编码氨基酸一致(图 2B)。

2.2 蛋白理化性质分析

利用在线工具 ExPasy 对 *PtCASP1* 蛋白的理化

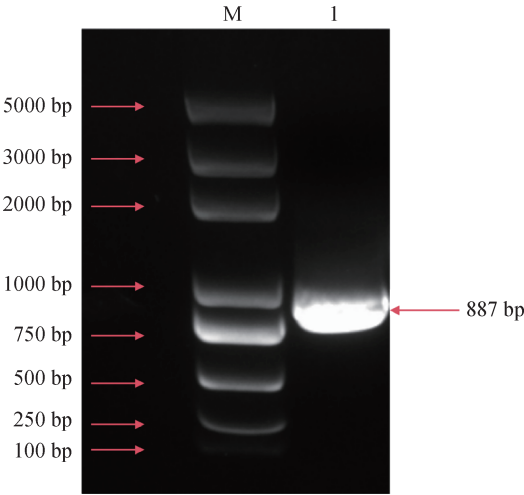


图 1 星星草 *PtCASP1* 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products of *Puccinellia tenuiflora PtCASP1*

注:M 为 DL5000; 1 为 *PtCASP1* 扩增片段

Note:M represents DL5000; 1 represents products of *PtCASP1*

性质进行分析,结果显示,*PtCASP1* 蛋白由 185 个氨基酸组成,相对分子量为 19 833.55 kDa,理论等电点(Isoelectric point, PI)为 10.34,属于碱性蛋白,负电荷残基为 9,正电荷残基为 17,脂肪系数为 131.03,平均亲水性为 0.853,不稳定系数为 26.03,属于疏水性稳定蛋白。

2.3 蛋白质二级、三级结构分析

利用 SOPMA 在线软件对星星草 *PtCASP1* 基因编码的蛋白质二级结构进行分析(图 3A),发现该蛋白的二级结构主要构成元件为 α -螺旋、延伸链、无规则卷曲,结构占比分别为 63.59%,6.52%和 29.89%。其中,延伸链占比最小, α -螺旋和无

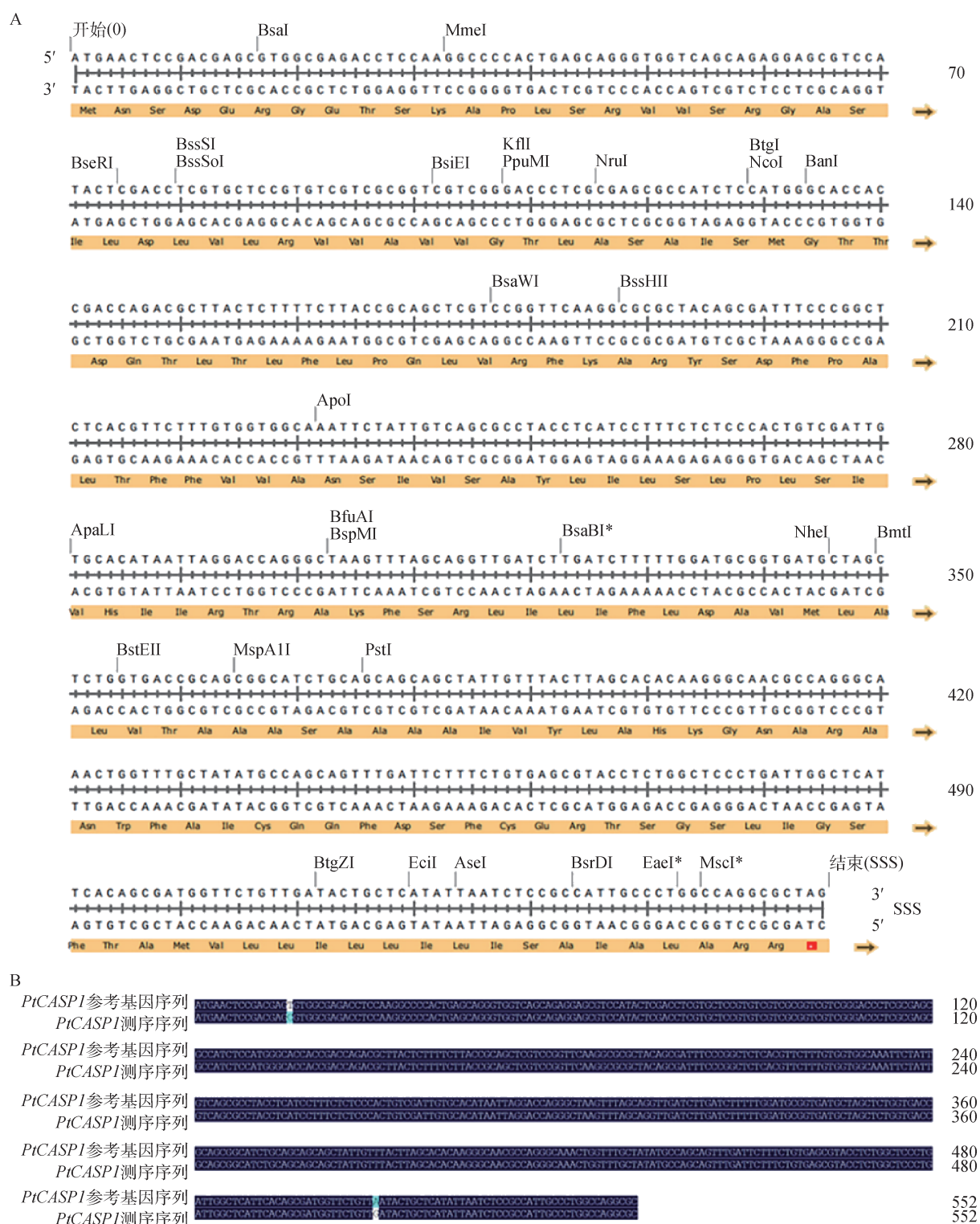


图2 星草星 *PtCASP1* 基因的 CDS 序列、氨基酸序列(A)及 *PtCASP1* 参考基因序列与测序序列比对(B)

Fig. 2 CDS and amino acid sequences of the *PtCASP1* in *Puccinellia tenuiflora* (A) and alignment of the *PtCASP1* reference sequence with the sequenced sequence (B)

规则卷曲为二级结构的主要构成元件。通过在线工具 SWISS-MODEL 对 *PtCASP1* 蛋白进行三级结构预测(图 3B), 评价同源建模(Qualitative Model Energy ANalysis, QMEAN)结果为 0.60, 全

球形模型质量估测(Global Model Quality Estimation, GMQE)值为 0.83, 蛋白的三级结构与二级结构分析结果一致, 均以 α -螺旋和无规则卷曲为主体。

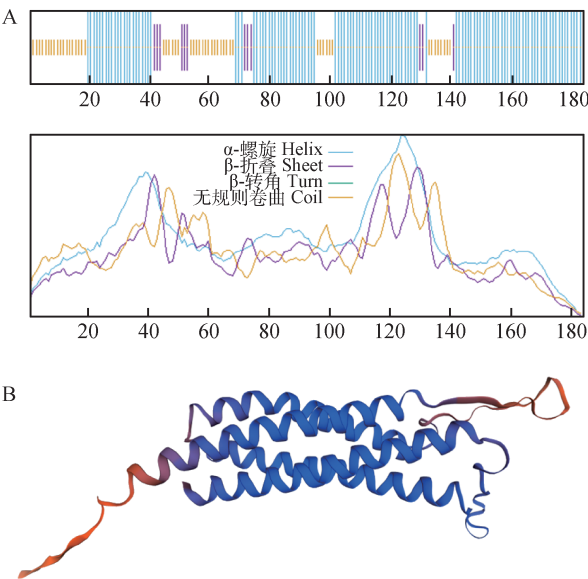


图 3 星星草 *PtCASP1* 蛋白二级结构(A)及三级结构(B)分析
Fig. 3 Analysis of secondary structure (A) and tertiary structure (B) of the *PtCASP1* in *Puccinellia tenuiflora*

2.4 *PtCASP1* 启动子顺式作用元件及外显子内含子分析

为了深入研究 *PtCASP1* 基因的潜在调控功能,本研究利用 PlantCARE 及 TBtools 对 *PtCASP1* 进行启动子区域顺式作用元件及外显子内含子分析, *PtCASP1* 启动子区域含有大量的顺式作用元件(图 4A), 如 TCT-motif, CGTCA-motif, GARE-motif, LTR, MBS 和 ABRE 等。其中 LTR 元件与低温响应有关, TCT-motif 是光响应元件, CGTCA-motif 是茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)响应元件, GARE-motif 是赤霉素响应元件, MBS 元件为参与干旱诱导的 MYB 结合位点, ABRE 则与脱落酸响应相关, 表明 *PtCASP1* 可能在植物响应逆境胁迫过程中发挥重要作用。 *PtCASP1* 基因共含有 3 个外显子及 2 个内含子(图 4B)。

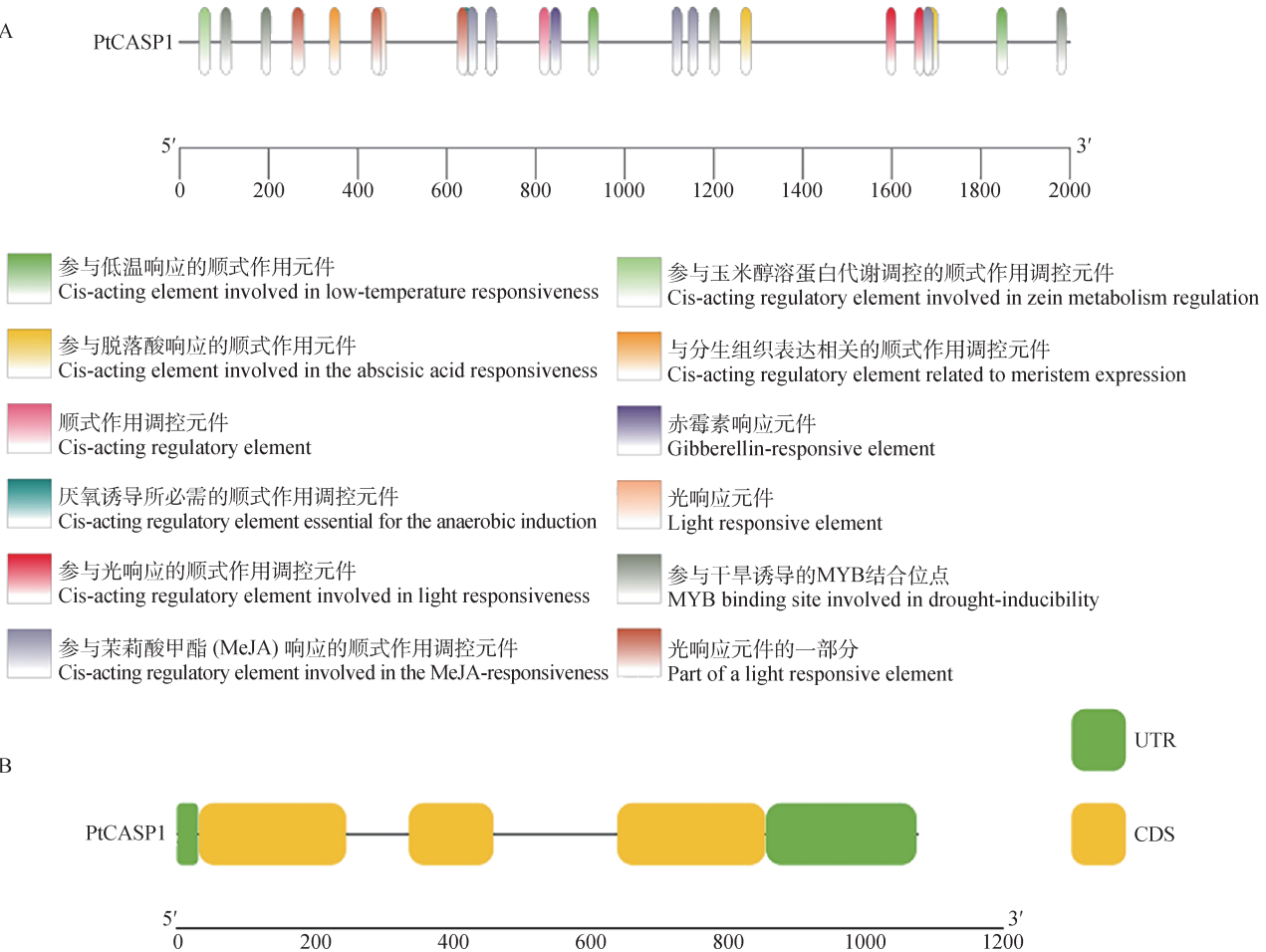


图 4 星星草 *PtCASP1* 启动子顺式作用元件(A)及外显子与内含子分析(B)

Fig. 4 Analysis of cis-acting elements in the promoter (A) and exon-intron structure (B) of *PtCASP1* in *Puccinellia tenuiflora*
注:不同颜色代表不同的顺式作用元件(A);黑色线条代表内含子,黄色方块代表外显子,绿色方块代表 5' UTR 和 3' UTR(B)
Note: Different colors represent distinct cis-acting elements (A); Black lines represent introns, yellow blocks represent exons and green blocks represent the 5' UTR and 3' UTR (B)

2.5 蛋白磷酸化位点、跨膜结构域及信号肽预测

利用 NetPhos 3.1 在线软件预测 PtCASP1 蛋白的磷酸化位点,结果表明,PtCASP1 蛋白包含 14 个丝氨酸(Serine, Ser)位点,4 个苏氨酸(Threonine, Thr)位点,1 个酪氨酸(Tyrosine, Tyr)位点(图 5A)。在线软件 TMHMM 跨膜预测结果分析表明, PtCASP1 蛋白含有 4 个跨膜结构域(图 5B),表明该蛋白属于跨膜蛋白,具有跨膜转运功能。利用 SignalP 5.0 对 PtCASP1 蛋白进行信号肽预测分析,发现 PtCASP1 蛋白不存在信号肽,属于非分泌蛋白(图 5C)。

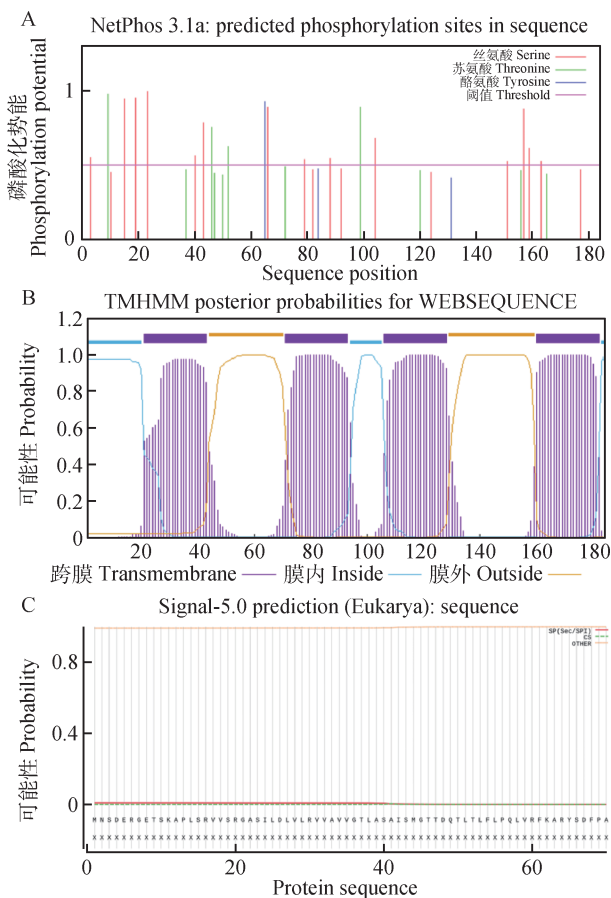


图5 星星草PtCASP1 磷酸化(A)、跨膜结构域(B)及信号肽(C)分析

Fig. 5 Analysis of Phosphorylation (A), transmembrane structure (B) and signal peptide (C) of PtCASP1 in *Puccinellia tenuiflora*

2.6 星星草PtCASP的鉴定与系统进化树分析

利用 DUF588 结构域(PF04535)的隐马尔可夫模型对星星草的 PtCASP 基因进行了全面的搜索^[24],确认了 58 个 PtCASP 基因。为了便于鉴定,将这些基因按照它们在染色体上的位置命名为 *PtCASP_Like 1~PtCASP_Like 58*, *PtCASP1* 保留

了原来的命名(图 6A)。*PtCASP* 的氨基酸数量介于 118 个(*PtCASP_Like 43*)到 482 个(*PtCASP_Like 55*)之间。利用 MEGA 6.0 采用邻接法对星星草、水稻和拟南芥 *CASP* 基因家族成员构建系统进化树,结果发现,这些 *CASP* 分为 5 个亚家族(*CASP*, *CASP_like-I*, *CASP_like-II*, *CASP_like-III* 和 *CASP_like-IV*),并发现 *PtCASP1* 是 *OsCASP3* 的同源基因,与 *OsCASP3~6*, *AtCASP1~6* 在一个分支上, *PtCASP1* 是这一分支上唯一的星星草 *CASP* 基因(图 6A)。

利用 MEGA 6.0 采用邻接法对星星草 PtCASP 蛋白与水稻(*OsCASP1*, *OsCASP3*)、小麦(*TaCASP1*)、玉米(*ZmCASP1*)、拟南芥(*AtCASP1*)、多花黑麦草(*LmCASP1*)、俯垂臭草(*MnCASP1*)、看麦娘(*AeCASP1*)、稷(*PmCASP1*)、二穗短柄草(*BdCASP1*)、三芒草(*AaCASP1*)、大麦(*HvCASP1*)、冰湖野米(*ZpCASP1*)、海雀稗(*PvCASP1*)和尾稗草(*UhCASP1*)构建系统进化树,发现星星草、多花黑麦草与看麦娘在一个分支,说明在进化过程中星星草与多花黑麦草和看麦娘亲缘关系较近(图 6B)。通过 DNAMAN 软件对以上物种的 *CASP1* 的氨基酸序列进行多重比对分析,发现物种间氨基酸的同源性达 56.97%(图 6C)。

2.7 PtCASP1 蛋白亚细胞定位分析

基因的功能与其蛋白在细胞中的定位有着密切的联系。为了研究 PtCASP1 蛋白在细胞中的位置,将 PtCASP1 与 GFP 蛋白融合,成功构建 pCambia1300-GFP-*PtCASP1* 表达载体并转化至农杆菌 GV3101 中。分别将 pCambia1300-GFP 空载体和 pCambia1300-GFP-*PtCASP1* 表达载体的农杆菌菌液注射至烟草叶片中,使 PtCASP1 蛋白在烟草叶片表皮细胞中瞬时表达。荧光显微镜观察结果显示, PtCASP1 蛋白在细胞中同时分布于细胞膜和细胞核(图 7)。

2.8 PtCASP1 基因的表达模式分析

利用 qRT-PCR 技术,对星星草的根和叶的表达水平进行定量分析,结果表明 *PtCASP1* 基因在根和叶中均有表达,在根中的表达量显著高于叶,其表达量约为叶中的 3 倍(图 8A)。对星星草的根分别进行盐、涝及盐涝复合处理 0 h, 3 h, 24 h, 72 h 及 168 h, *PtCASP1* 仅在盐胁迫处理 72 h 出现显著诱

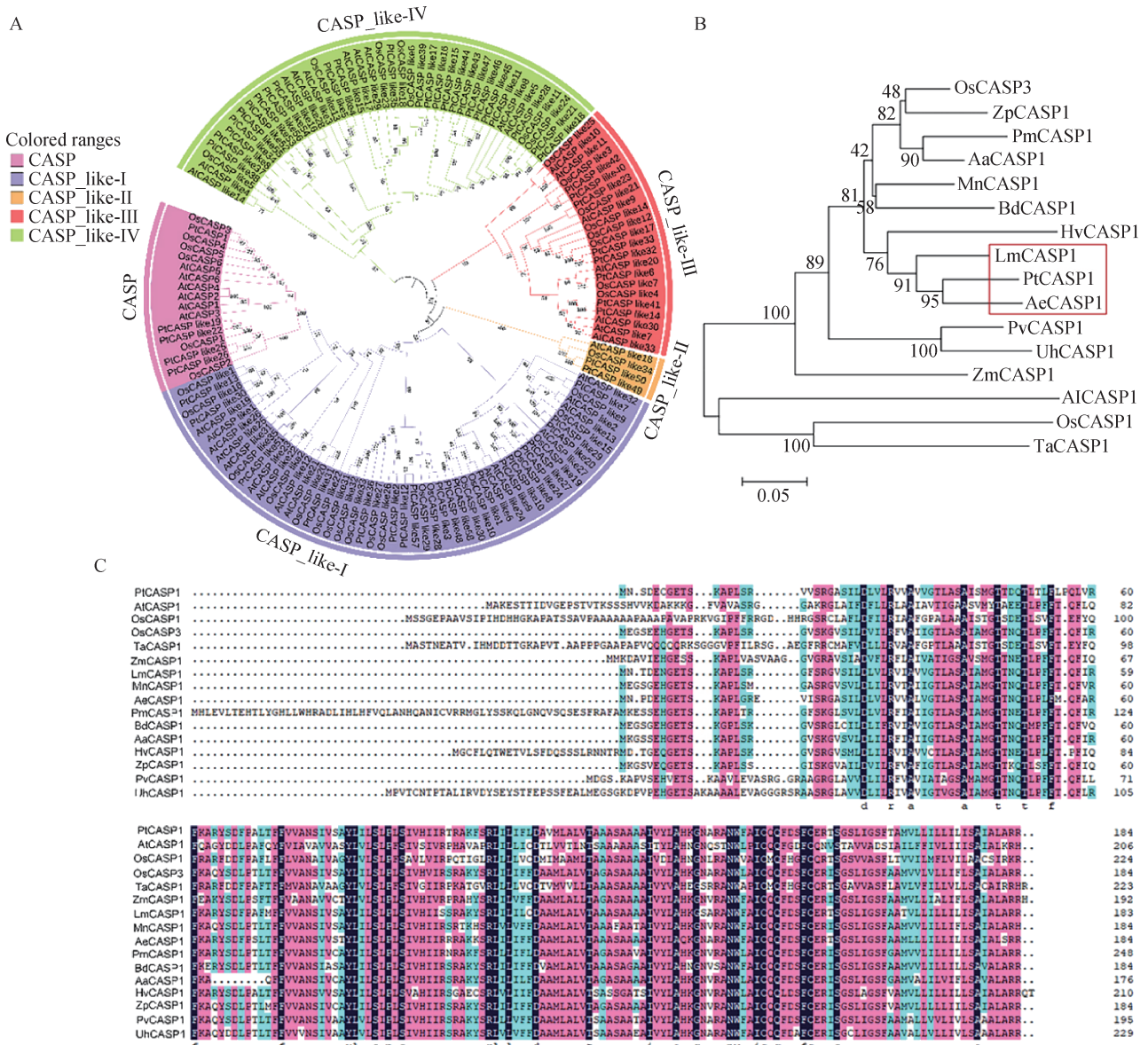


图6 系统发育树及序列比对分析

Fig. 6 Phylogenetic tree and sequence alignment analysis

注:(A)为星星草、拟南芥与水稻 CASP 家族系统发育树;(B)为星星草、拟南芥、其他禾本科 CASP1 及水稻 CASP3 系统发育树;(C)为星星草 *PtCASP1* 与拟南芥及其他禾本科 CASP1 氨基酸序列比对。粉色、紫色、橙色、红色和绿色分别代表 CASP, CASP_like-I, CASP_like-II, CASP_like-III 和 CASP_like-IV(A)

Note: (A) Phylogenetic tree of the CASP family in *Puccinellia tenuiflora*, *Arabidopsis*, and *Oryza sativa*; (B) Phylogenetic tree of CASP1 from *Puccinellia tenuiflora*, *Arabidopsis*, and other Poaceae species, and CASP3 from *Oryza sativa*; (C) Amino acid sequence alignment of *Puccinellia tenuiflora* *PtCASP1* with CASP1 from *Arabidopsis* and other Poaceae species. The colors pink, purple, orange, red and green represent CASP, CASP_like-I, CASP_like-II, CASP_like-III and CASP_like-IV respectively (A)

导表达,在涝胁迫各时间点下均大幅升高,在72 h达到峰值,为对照的3.8倍,在盐涝复合胁迫下表现出先升高后降低的趋势,其中3~72 h表达量相当,为对照的1.7~2.3倍,168 h降低至对照水平(图8B)。以上结果表明,*PtCASP1*基因参与星星草响应盐、涝及盐涝复合胁迫,表明*PtCASP1*基因可能在调控星星草响应盐、涝及盐涝复合胁迫中发挥重要作用。

3 讨论

本研究通过克隆得到一个星星草 *PtCASP1* 基因,该基因序列全长552 bp,编码184个氨基酸。在星星草基因组中,只有一个与拟南芥 *AtCASP1* 同源的基因,而水稻基因组中,存在五个与 *AtCASP1* 高度相似但尚未表征的同源基因(*OsCASP1*~

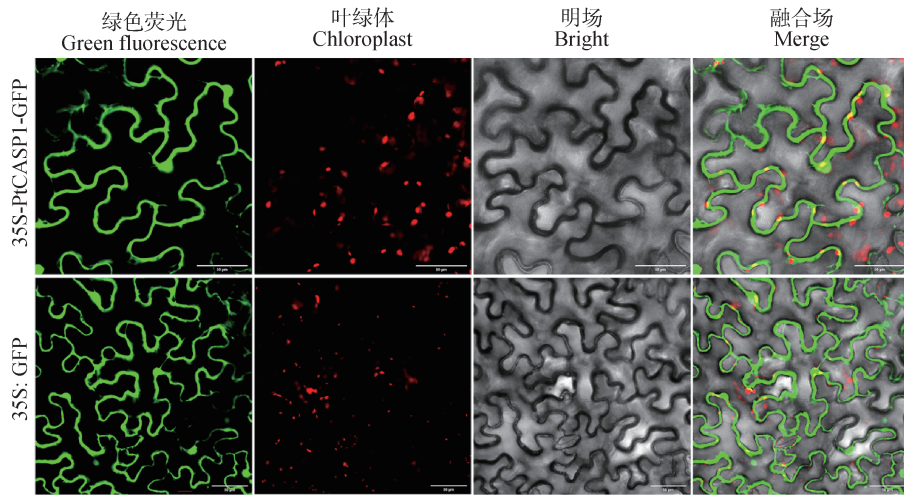


图 7 pCambia1300-GFP-*PtCASPI* 蛋白的亚细胞定位结果

Fig. 7 Subcellular localization of pCambia1300-GFP-*PtCASPI* proteins

注: 35S:GFP: 空白对照(pCambia1300-35S-GFP空载体); 35S-*PtCASPI*-GFP: pCambia1300-GFP-*PtCASPI* 融合蛋白; 比例尺=50 μm
Note: 35S:GFP: Control (pCambia1300-35S-GFP vector); 35S-*PtCASPI*-GFP: pCambia1300-GFP-*PtCASPI* fusion protein. Scale bar = 50 μm

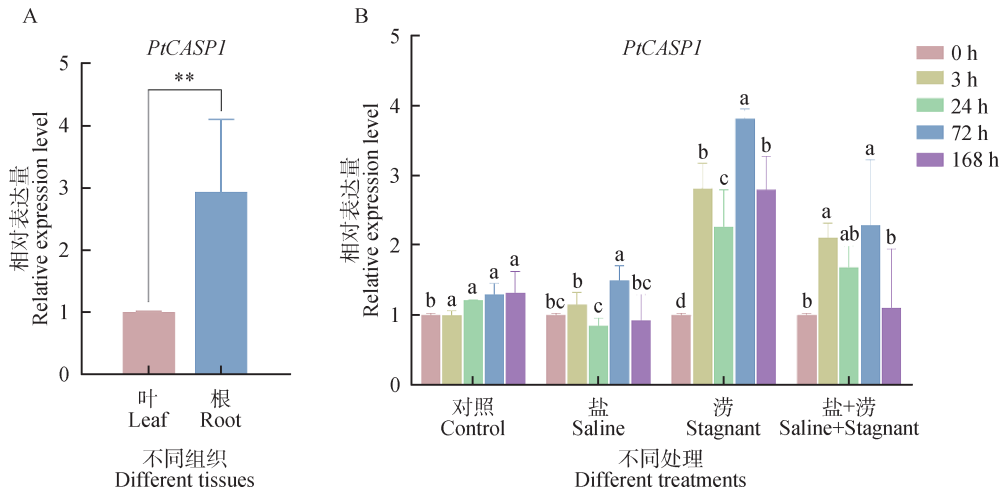


图 8 星星草 *PtCASPI* 基因在不同组织中相对表达量(A)及在根中不同胁迫时间下相对表达量(B)

Fig. 8 Relative expression levels of the *PtCASPI* gene in different tissues of *Puccinellia tenuiflora* (A) and relative expression levels in roots under stress under varying durations (B)

注: 作图采用平均值±标准差(n=9), “**”代表在 $P<0.01$ 水平上存在差异显著; 不同小写字母表示同一处理不同时间下差异显著 $P<0.05$ (Duncan's test)

Note: The data are presented as mean ± standard deviation (n=9). “**” indicates a significant difference at the $P<0.01$ level. Different lower-case letters indicate significant differences ($P<0.05$) among different treatment durations within the same treatment group, as determined by Duncan's test

OsCASP5)^[19]。已有研究表明, 拟南芥中的 *AtCASP1* 蛋白定位于内皮层细胞膜上, 并且部分精准定位于内皮层凯氏带区域(Casparian strip membrane domain, CSD)^[26], 本研究对 *PtCASP1* 基因编码的蛋白进行亚细胞定位分析的结果显示该蛋白同时分布于细胞膜和细胞核上, 这可能与物种间的差异性有关。通过生物信息学分析发现, *PtCASP1* 由三个外显子和两个内含子组成, *PtCASP1* 基因编

码蛋白属于疏水性稳定蛋白, 存在三种氨基酸残基的磷酸化位点, 含有4个跨膜结构域, 具有跨膜转运功能, 这与水稻中 *OsCASP1* 基因报道的结果相一致^[19, 27]。拟南芥中, *AtCASPs* 也被鉴定为含有4个跨膜结构域的跨膜蛋白。有研究在玉米 *ZmCASPL* 基因的启动子区域鉴定出生长发育、生物和非生物胁迫及光响应元件^[21], 本研究对 *PtCASP1* 基因启动子区域的顺式作用元件进行分析, 也发现了光响

应、低温响应和干旱响应等元件的存在,由此推测 *PtCASP1* 基因可能在响应逆境胁迫中发挥重要作用,为后续深入探究 *PtCASP1* 基因功能奠定了理论基础。

本研究对星星草的 *PtCASPs* 基因进行了全面的搜索,确认了 58 个 *PtCASPs* 基因,水稻中 *OsCASPs* 和拟南芥中 *AtCASPs* 基因的总数分别为 41 和 39 个^[24]。*OsCASPs* 的氨基酸数量介于 153 个 (*OsCASP_Like 6*) 到 421 个 (*OsCASP_Like 3*) 之间,*AtCASPs* 的氨基酸数量介于 152 个 (*AtCASP_Like 3*、*AtCASP_Like 15*、*AtCASP_Like 28* 和 *AtCASP_Like 29*) 到 297 个 (*AtCASP_Like 33*) 之间,而 *PtCASPs* 的氨基酸数量介于 118 个 (*PtCASP_Like 43*) 到 482 个 (*PtCASP_Like 55*) 之间,变异幅度更大^[24]。根据系统发育分析,星星草、拟南芥和水稻的 *CASPs* 可分为 5 个亚家族 (*CASP*, *CASP_like-I*, *CASP_like-II*, *CASP_like-III* 和 *CASP_like-IV*)。其中, *PtCASP1* 是唯一与 *AtCASP1~AtCASP6* 及 *OsCASP3~OsCASP6* 聚于同一分支的 *PtCASPs* 成员,且与水稻 *OsCASP3* 和拟南芥 *AtCASP5* 的亲缘关系最为接近。目前研究表明, *CASPs* 基因家族成员均属于凯氏带结构域蛋白,普遍参与调控凯氏带的形成过程^[18]。在拟南芥和水稻中仅有个别成员的功能得到明确验证,其他成员的具体功能尚未被完全揭示,但这并不意味着其他成员不重要。有研究证明多个 *AtCASPs* 蛋白之间存在互作,通过互作形成稳定的跨膜聚合物,作为支架引导凯氏带细胞壁物质的定位与沉积,且 *AtCASPs* 家族成员在功能上存在冗余,协同调控凯氏带的空间定位与形态组装^[18]。

基因的表达模式与其功能密切相关,同一个基因往往在植物不同生育期的各个部位中有不同程度的表达,以发挥不同功能。在幼苗期,植物的抗逆调控基因一般在根中高表达,有助于植物提高对水分和养分的吸收能力,从而增强幼苗对干旱等胁迫的抵抗力^[28],水稻中的研究也报道过 *OsCASP1* 在根部的表达量较高^[19],这与本研究在星星草中 *PtCASP1* 基因表达模式相同, *PtCASP1* 基因在根中的表达量显著高于叶,而玉米中的研究也发现 *ZmCASPL21* 和 *ZmCASPL47* 只在根中特异性地高表达^[21]。星星草根在盐、涝及盐涝复合胁迫下显著诱导 *PtCASP1* 基因的表达,表明 *PtCASP1* 基因可能参与植物的逆境胁迫响应。有研究报道过小麦

中 *TaCASPs* 对盐胁迫、渗透胁迫、钙离子胁迫存在诱导表达响应,在低温胁迫下表达受抑制^[29]。该研究可以为今后研究该基因功能及其在非生物胁迫下的作用机理提供理论基础。

4 结论

本研究成功克隆得到星星草 *PtCASP1* 基因,该基因完整的 CDS 序列长度为 552 bp,共编码 184 个氨基酸。生物信息学分析结果预测 *PtCASP1* 蛋白为疏水性稳定蛋白,与多花黑麦草、看麦娘亲缘关系较近。亚细胞定位结果显示,该蛋白分布于细胞膜和细胞核。*PtCASP1* 基因在根和叶中均有表达,且在根中表达量显著高于叶。此外,盐、涝以及盐涝复合胁迫均能诱导该基因的表达,推测其在植物逆境响应过程中扮演重要角色。

参考文献

- [1] ROZEMA J, FLOWERS T. Crops for a salinized world[J]. Science, 2008, 322(5907): 1478-1480
- [2] VAN ZELM E, ZHANG Y X, TESTERINK C. Salt tolerance mechanisms of plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2020, 71: 403-433
- [3] ZHANG H M, ZHU J H, GONG Z Z, et al. Abiotic stress responses in plants[J]. Nature Reviews Genetics, 2022, 23(2): 104-119
- [4] MUNNS R, TESTER M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 651-681
- [5] BARRETT-LENNARD E G. The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications[J]. Plant and Soil, 2003, 253(1): 35-54
- [6] ZHANG X, WEI L Q, WANG Z Z, et al. Physiological and molecular features of *Puccinellia tenuiflora* tolerating salt and alkaline-salt stress[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55(3): 262-276
- [7] ZHANG W T, LIU J, ZHANG Y X, et al. A high-quality genome sequence of alkaligrass provides insights into halophyte stress tolerance[J]. Science China Life Sciences, 2020, 63(9): 1269-1282
- [8] 郝彦博. 小花碱茅适应盐涝交互逆境的结构基础和生理机制研究[D]. 成都:西南民族大学, 2023: 35-37
- [9] GELDNER N. The endodermis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 531-558
- [10] ZHUANG Y, LI L. Are cuproproteins part of the multi-protein

- framework for making the Casparian strip? [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2020, 15(10):1798605
- [11] NASEER S, LEE Y, LAPIERRE C, et al. Casparian strip diffusion barrier in *Arabidopsis* is made of a lignin polymer without suberin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(25):10101-10106
- [12] BARBERON M, VERMEER J E M, DE BELLIS D, et al. Adaptation of root function by nutrient-induced plasticity of endodermal differentiation [J]. *Cell*, 2016, 164(3):447-459
- [13] BARBERON M. The endodermis as a checkpoint for nutrients [J]. *New Phytologist*, 2017, 213(4):1604-1610
- [14] 崔亚宁, 满奕, 宋程威, 等. 植物凯氏带化学成分、生理功能及相关调控机制的研究进展 [J]. *中国科学(生命科学)*, 2020, 50(2):102-110
- CUI Y N, MAN Y, SONG C W, et al. Chemical components, physiological functions and regulation mechanism of plant Casparian strips [J]. *Science in China (Series)*, 2020, 50(2):102-110
- [15] KOTULA L, RANATHUNGE K, SCHREIBER L, et al. Functional and chemical comparison of apoplastic barriers to radial oxygen loss in roots of rice (*Oryza sativa* L.) grown in aerated or deoxygenated solution [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(7):2155-2167
- [16] KRISHNAMURTHY P, RANATHUNGE K, FRANKE R, et al. The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Planta*, 2009, 230(1):119-134
- [17] KARAHARA I, IKEDA A, KONDO T, et al. Development of the Casparian strip in primary roots of maize under salt stress [J]. *Planta*, 2004, 219(1):41-47
- [18] ROPPOLO D, DE RYBEL B, TENDON V D, et al. A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347):380-383
- [19] WANG Z G, YAMAJI N, HUANG S, et al. *OsCASPI* is required for casparian strip formation at endodermal cells of rice roots for selective uptake of mineral elements [J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(11):2636-2648
- [20] YANG J H, DING C Q, XU B C, et al. A Casparian strip domain-like gene, *CASPL* negatively alters growth and cold tolerance [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:14299
- [21] XUE B P, LIANG Z C, LI D Y, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *CASPL* gene family in *Zea mays* (L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15:1477383
- [22] KOTULA L, CLODE P L, STRIKER G G, et al. Oxygen deficiency and salinity affect cell-specific ion concentrations in adventitious roots of barley (*Hordeum vulgare*) [J]. *New Phytologist*, 2015, 208(4):1114-1125
- [23] WIENGWEERA A, GREENWAY H, THOMSON C J. The use of agar nutrient solution to simulate lack of convection in waterlogged soils [J]. *Annals of Botany*, 1997, 80(2):115-123
- [24] XUE B P, LIANG Z C, LIU Y, et al. Comparative analysis of casparian strip membrane domain protein family in *Oryza sativa* (L.) and *Arabidopsis thaliana* (L.) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(18):9858
- [25] GUO Q, WANG P, MA Q, et al. Selective transport capacity for K^+ over Na^+ is linked to the expression levels of *PtSOS1* in halophyte *Puccinellia tenuiflora* [J]. *Functional Plant Biology*, 2012, 39(12):1047-1057
- [26] 张锦辉. *ZmCASPL2B2* 响应玉米盐胁迫的生物学功能分析 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022: 9-10
- ZHANG J H. Biological function analysis of *ZmCASPL2B2* in response to salt tolerance in maize [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022: 9-10
- [27] 王志刚. *OsCASPI* 在水稻根内皮层凯氏带形成和矿质元素吸收中的作用机理 [D]. 南宁: 广西大学, 2022: 10-12
- WANG Z G. The mechanism of *OsCASPI* in casparian strip formation at the endodermis and controlling root uptake of minerelements in rice [D]. Nanning: Guangxi University, 2022: 10-12
- [28] 李迪娜, 王凯, 陶佳丽, 等. 偏关苜蓿 *MsMYB44* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析 [J]. *草地学报*, 2026, 34(1):33-42
- LI D N, WANG K, TAO J L, et al. Cloning, subcellular localization and expression analysis of *MsMYB44* gene of *Medicago sativa* 'Pianguan' [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2026, 34(1):33-42
- [29] 费甄臻. 小麦 *CASP* 家族成员分析及功能鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2021: 48-19
- FEI Z Z. Analysis and functional identification of *CASP* family members in wheat [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021: 48-49

(责任编辑 闵芝智)