

油莎豆生长素受体 TIR1 基因家族鉴定及响应盐胁迫和外源 IBA 的表达分析

李昕儒, 高宇, 苗淑楠, 李腾, 董书言, 史先飞, 薛金爱, 季春丽*, 李润植*

山西农业大学农学院, 山西太谷 030801

摘要: 特色油料作物油莎豆 (*Cyperus esculentus* L.) 地下块茎可积累大量油脂, 且具有适应性广和抗逆性强等特点, 是研究植物抗逆性和地下营养器官富集油脂的优异材料。运输抑制剂响应蛋白 1 (transport inhibitor response protein 1, TIR1) 作为生长素受体可调控植物生长发育和响应非生物胁迫。然而, 油莎豆 *CeTIR1* 的相关研究鲜有报道。本研究基于油莎豆转录组数据筛选鉴定出 4 个油莎豆 *TIR1* 基因 (*CeTIR1-1*、*CeTIR1-2*、*CeTIR1-3* 和 *CeTIR1-4*), 并采用 RT-PCR 技术克隆到 4 个 *CeTIR1* 成员的 ORFs。生物信息学分析表明, 4 个 *CeTIR1* 蛋白含有典型的 F-box 蛋白结构域、AMN1 超结构域和 Transp_inhibit 结构域。*CeTIR1s* 序列长度、编码蛋白相对分子量和等电点等理化性质差异较小。4 个 *CeTIR1* 分别与禾本目莎草科、木犀科及十字花科的植物来源的 TIR1s 在进化上亲缘关系较近。基因表达分析显示, 油莎豆 *CeTIR1* 基因在不同组织表达水平差异显著, 均在块茎组织中高表达, 在根和叶组织中表达量较低。盐胁迫处理下油莎豆幼苗抗氧化酶活性和 MDA 含量升高, 添加外源 IBA 处理后, 盐胁迫油莎豆幼苗的抗氧化酶活性进一步升高且 MDA 含量降低。这预示着 IBA 可以缓解盐胁迫对油莎豆幼苗生长的不利影响。qRT-PCR 结果显示, 4 个 *CeTIR1* 基因在盐胁迫处理幼苗中表达量增加, 外源添加 IBA 亦可显著上调 *CeTIR1-2* 基因的表达。综合分析显示 *CeTIR1-2* 可能是参与调控油莎豆幼苗响应盐胁迫的一个重要基因。研究结果可为挖掘生长素调控油莎豆生长发育和抗逆性相关功能基因以及油莎豆逆境栽培研究提供科学依据和重要参考。

关键词: 油莎豆; 运输抑制剂响应蛋白 1 (TIR1); 吲哚丁酸 (IBA); 盐胁迫; 基因表达

中图分类号: S565.9 文献标识码: A

Identification of Auxin Receptor Gene TIR1 Family in *Cyperus esculentus* and the Expression Analysis in Response to Salt Stress and Exogenous IBA

LI Xinru, GAO Yu, MIAO Shunan, LI Teng, DONG Shuyan, SHI Xianfei, XUE Jin'ai, JI Chunli*, LI Runzhi*

College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China

Abstract: *Cyperus esculentus* is a special oil crop, with its underground tuber accumulating a large amount of oil, and also having the advantages of wide adaptability and strong stress resistance. This crop is a superior germplasm material for studying plant stress resistance and oil enrichment in the underground vegetative organs. Transport inhibitor response protein 1 (TIR1) can regulate plant growth and development and abiotic stress response as an auxin receptor. However, few reports on *CeTIR1* have been reported. In this study, four *TIR1* genes, namely *CeTIR1-1*, *CeTIR1-2*, *CeTIR1-3* and *CeTIR1-4*, were identified from *C. esculentus* transcriptome data and the ORFs were further cloned by RT-PCR. All the four *CeTIR1* proteins con-

收稿日期 2022-08-02; 修回日期 2022-10-21

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31902344); 山西省高等学校科技创新项目 (No. 2019L0376); 山西省基础研究项目 (No. 20210302124170)。

作者简介 李昕儒 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 作物遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 季春丽 (JI Chunli), E-mail: jichunli@sxau.edu.cn; 李润植 (LI Runzhi), E-mail: rli2001@126.com。

tained a typical F-box protein domain, AMN1 superdomain and Transp_inhibit domain, revealed by bioinformatics analysis. No significant difference was detected among the four CeTIR1 proteins in regarding sequence length, relative molecular weight, isoelectric point and other physicochemical properties. The four CeTIR1s were closely related to TIR1s derived from plants of Cyperaceae, Oleaceae and Cruciferae in the evolution. Gene expression profiling showed that the expression levels of CeTIR1 family genes were significantly different in different tissues of *C. esculentus*, with the highest expression in tuber tissues and lower expression in root and leaf tissues. The antioxidant enzyme activity and MDA content of *C. esculentus* seedlings increased under salt stress. After adding exogenous IBA treatment, the antioxidant enzyme activity of *C. esculentus* seedlings under salt stress further increased whereas the MDA content decreased. This indicated that IBA could alleviate the adverse effects of salt stress on the growth of *C. esculentus* seedlings. qRT-PCR results showed that expression levels of the four CeTIR1 genes increased in *C. esculentus* seedlings treated with salt stress, and exogenous addition of IBA could significantly up-regulate the expression of CeTIR1-2 gene. Comprehensive analysis demonstrates that CeTIR1-2 may be an important gene involved in regulating the response of *C. esculentus* seedlings to salt stress. Together, the results would provide the scientific basis and important reference for exploring the related function genes involved in auxin regulating the growth and development and stress resistance of *C. esculentus*, as well as the *C. esculentus* cultivation in the saline-alkali land.

Keywords: *Cyperus esculentus* L.; transport inhibitor response protein 1 (TIR1); indole butyric acid (IBA); salt stress; gene expression

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.05.003

油莎豆 (*Cyperus esculentus* L.) 又称油莎草、老虎豆等, 是莎草科莎草属多年生草本植物^[1], 其块茎富含油脂、蛋白质、淀粉、糖等营养成分^[2]。油莎豆是目前发现的唯一已知地下部分营养器官积累大量油脂的作物^[3], 油脂中油酸含量高达 68%~75%, 品质和营养成分可媲美橄榄油、榛子油等优质食用油, 且优于菜籽油及芝麻油等^[4]。油莎豆块茎还可制作其他食品或药品, 地上部分亦可用于优质牧草饲料, 是一种集油、粮、草、饲、药于一体的多用途经济作物^[4-5]。油莎豆种植范围广, 具有适应性强、高抗逆性等特点^[6-7], 也是植物抗逆性研究的理想作物材料。

在农业生产中, 作物生长常受到非生物胁迫的危害。干旱、洪涝、高温、低温、盐碱和重金属等非生物胁迫直接影响植物新陈代谢、生长和发育, 不仅会降低作物产量, 甚至在极端情况下会导致植物死亡^[8]。盐胁迫是最普遍的非生物胁迫之一, 严重影响全球农业生产^[9]。盐胁迫破坏植物渗透平衡系统, 导致植物膜脂过氧化, 抑制营养物质的吸收, 影响植物正常生长发育^[10]。植物进化出各种机制抵御盐胁迫的侵害, 包括调节离子稳态、激活渗透胁迫途径、介导植物激素信号传导以及调节细胞骨架动力学和细胞壁组成等^[11]。其中, 植物激素在细胞间的信号转导, 不仅调节植物生长和发育, 还可以调节植物非生物胁迫响应, 在植物抵御非生物胁迫的应答中起着至关重要的作用^[12]。生长素作为一类生长促进激素, 参与植物对盐胁迫信号的感知和防御, 可以通过调

节气孔闭合来调节水分平衡和渗透性稳态, 进而提高植物对盐胁迫的耐性^[10]。

运输抑制剂响应蛋白 1 (transport inhibitor response protein 1, TIR1) 是植物响应生长素信号的一类重要蛋白^[13]。TIR1 蛋白 N 端有引起蛋白水解的 SCF 蛋白复合物成分之一 F-box 结构域, C 端有富集多个亮氨酸序列 (LRR) 的 AMN1 超结构域^[14]。生长素与受体 TIR1 蛋白结合后, TIR1 编码 F-box 蛋白可以与 S 期激酶相关蛋白 1 (SKPI) 类似物 ASK1 和 ASK2 及 Cullin 形成 SCF (SKPI/cullin/F-box) 型 26S 泛素蛋白酶复合体, 该复合体与生长素以及 Aux/IAA 转录因子相互作用^[15], 促使 Aux/IAA 蛋白经泛素化修饰后进入 26S 蛋白酶体途径降解, 进而激活与生长素反应相关的基因^[16]。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中过表达 MiR393-TIR1 (*mTIR1*) 基因, 生长素信号传导增加可能触发生长素介导的下游途径, 通过渗透调节和增加 Na⁺排出来增强植物盐胁迫抗性, 从而显著增强转基因拟南芥抗盐能力^[17]。大白菜 (*Brassica rapa*) *BrTIR1* 启动子上存在响应盐胁迫的顺式作用元件, *BrTIR1* 在大白菜响应盐胁迫中发挥重要作用^[18]。盐胁迫信号对植物生长素受体基因 *TIR1* 的表达也起着调控作用, 如 NaCl 胁迫处理能够调控灰绿藜 (*Chenopodium glaucum* L.) *CgTIR1* 基因的表达^[19]等。油莎豆作为一种抗逆性强、综合利用价值高的粮油兼用新型经济作物, 关于 *CeTIR1* 基因的生物学特性、响应盐胁迫和生长素信号的调控等鲜有报道。

本研究基于实验室的油莎豆转录组数据鉴定获得油莎豆 *CeTIR1* 基因家族的编码序列并对其进行克隆；通过生物信息学分析其编码蛋白的序列特征、理化性质、高级结构和生物进化关系；测定盐胁迫及添加生长素处理后油莎豆幼苗 POD、SOD 酶活性和 MDA 含量；通过 qRT-PCR 分析油莎豆 *CeTIR1* 基因组织表达特性及其在盐胁迫和添加生长素处理后的表达谱。本文旨在为后续深入研究 *CeTIR1* 功能和 *CeTIR1* 参与外源生长素介导植物盐胁迫抗逆性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

油莎豆种质材料为山西农业大学分子农业与生物能源研究所保存的晋农 1 号, 2021 年 4 月 22 日种植于山西农业大学农学院农作站。取晋农 1 号萌发时期 (80 d) 的油莎豆根、叶及块茎样品, 液氮速冻后保存于 -80°C 备用。另选取大小均匀、饱满、无虫眼的油莎豆块茎, 发芽预处理后, 置于人工气候培养箱中培养, 设置培养条件为温度 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 、光暗比 16/8。选取生长 25 d, 长势良好且基本均匀一致的油莎豆幼苗分别用 Hoagland 营养液添加 250 mmol/L NaCl, 250 mmol/L NaCl+1 mg/L IBA 处理, 并以不添加 NaCl 和 IBA 的幼苗为对照 (CK), 取处理 0、3、12、24、48、72 h 时的油莎豆幼苗, 经液氮冷冻后, 存于 -80°C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 油莎豆 *CeTIR1* 基因克隆 基于本实验室油莎豆转录组数据库筛选鉴定出 4 个油莎豆 *TIR1* 基因 (*CeTIR1-1*、*CeTIR1-2*、*CeTIR1-3* 和 *CeTIR1-4*)。根据 4 个基因的 CDS 序列, 设计 PCR 引物 (表 1) 用于基因编码序列的克隆。以油莎豆萌发时期块茎的 cDNA 作为模板, 用 TOBOYO 的 KOD-Plus-Neo 高保真酶扩增目的基因 CDS 序列。取 PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。用 *EasyPure*[®] Quick Gel Extraction Kit (TRANS) 试剂盒对正确的目的片段进行回收纯化。使用核酸仪测量产物浓度, 将 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上, 转入到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 转化产物涂板后挑取单克隆菌落, 菌检为阳性后送至北京擎科生物科技有限公司测序。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
ORF TIR1-1 F	ATGGCAGATGAACCGGCG
ORF TIR1-1 R	TTACAAGATCTTAACAAACGCGCG
ORF TIR1-2 F	ATGCGAGAGGAGATCTCTGACATG
ORF TIR1-2 R	TTACAAGATCTTAACAAAAGATGGTGC
ORF TIR1-3 F	ATGTCTGAGGAGGAGGAGGACG
ORF TIR1-3 R	CTACAATATCTTGACAAATTGCGGT
ORF TIR1-4 F	ATGAAGGTCCAATCGGCCA
ORF TIR1-4 R	TTACAGAGTCCATACAAAATCAGGTGC
qRT TIR1-1 F	CGACACGATTGGAGATGAAGG
qRT TIR1-1 R	GCGTTGACAGAAGAAGAGGATT
qRT TIR1-2 F	GCTCGGTCTCGCAGTGATT
qRT TIR1-2 R	GGCACAACTACGCAATCG
qRT TIR1-3 F	GTGCCGTATCCTGTCAACCT
qRT TIR1-3 R	TCCAGTTCGTCATCCTCATTCA
qRT TIR1-4 F	TTCGAGGAGACAGTGACC
qRT TIR1-4 R	TCCACATTCAACATCGGCATT
Ce18S rRNA F	CTACGTCCCTGCCCTTTGTACA
Ce18S rRNA R	ACACTTCAACGGACCATTCAA

1.2.2 生物信息学分析 利用 NCBI 数据库在线工具 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对从本实验室油莎豆转录组数据鉴定获得的 *CeTIR1* 基因编码的氨基酸序列的保守结构域进行分析。使用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) 在线软件预测 *CeTIR1* 基因家族编码蛋白的 Motif; 利用 ExPasy 网站提供的 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 工具分析 *CeTIR1* 基因家族编码蛋白的氨基酸组成、理论等电点、相对分子质量和原子组成等理化性质; 使用在线分析网站 TMHMM Server 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 对 *CeTIR1* 蛋白跨膜区进行预测分析; 运用 ExPasy 网站提供的 ProtScale 工具 (<https://web.expasy.org/protscale/>) 对蛋白疏水区域进行预测分析; 使用在线分析网站 PSORT II (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 预测 *CeTIR1* 基因家族编码蛋白的亚细胞定位; 使用 SOPMA 网站 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 进行蛋白二级结构的预测分析; 通过在线软件 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 进行蛋白三级结构建模分析。使用 Genedoc 软件对 *CeTIR1* 基因家族编码蛋白和其他物种 TIR1 蛋白

的氨基酸序列进行多序列比对; 利用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 通过 MEGA 7.0 软件构建所测物种 TIR1 蛋白 (表 2) 的系统发育树, 参数设置 bootstrap 1000, 其余参数默认。

表 2 供试植物 TIR1 蛋白序列基本信息
Tab. 2 Basic information of test plant TIR1 protein sequences

植物 Plant	拉丁名 Latin name	蛋白 Protein	NCBI 登录号 NCBI accession
大豆	<i>Glycine max</i>	GmTIR1	XP_006584933.1
蓖麻	<i>Ricinus communis</i>	RcTIR1	XP_015578180.1
花生	<i>Arachis hypogaea</i>	AhTIR1	XP_025689973.1
野生水稻	<i>Oryza brachyantha</i>	ObTIR1	XP_006647937.3
椰子	<i>Cocos nucifera</i>	CnTIR1	EHA8586401.1
康藏嵩草	<i>Carex littledalei</i>	CITIR1	KAF3330046.1
油棕	<i>Elaeis guineensis</i>	EgTIR1	XP_010942647.1
柳枝稷	<i>Panicum virgatum</i>	PvTIR1	XP_039787433.1
油橄榄	<i>Olea europaea</i>	OeTIR1	CAA3002003.1
高粱	<i>Sorghum bicolor</i>	SbTIR1	XP_002465737.1
油菜	<i>Brassica napus</i>	BnTIR1	XP_022569407.1
穆子	<i>Eleusine coracana</i>	EcTIR1	GJN22350.1
黑麦草	<i>Lolium rigidum</i>	LrTIR1	XP_047075560.1

1.2.3 抗氧化相关酶活性测定 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性采用氮蓝四唑 (NBT) 光还原法测定, 过氧化物酶 (POD) 活性采用愈创木酚法测定, 丙二醛 (MDA) 含量采用硫代巴比妥酸法测定^[20]。

1.2.4 油莎豆 *CeTIR1* 基因表达实时荧光定量 PCR 分析 利用 Primer 6.0 设计检测 *CeTIR1* 基因表达的 qRT-PCR 引物, 以 *Ce18S RNA* 为内参基因 (表 1)。采用北京全式金公司的 *TransZol Plant* 试剂盒提取总 RNA。使用 Genstar 公司的 StarScript II cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录。使用 TaKaRa 公司的 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒, 进行实时荧光定量 PCR 分析。反应程序为: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 62 °C 1 min, 39 个循环, 设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[21] 计算基因相对表达量。

1.3 数据处理

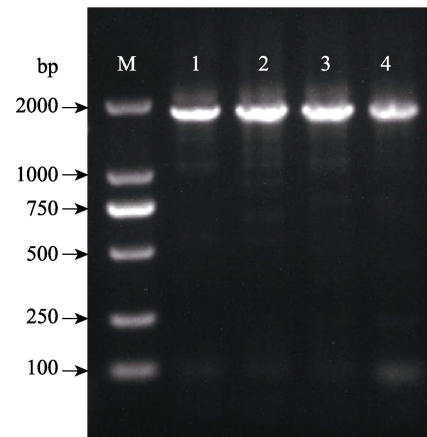
使用 SPSS Statistics 26.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 油莎豆 *CeTIR1* 基因的 ORF 克隆

用晋农 1 号块茎 cDNA 作为模板进行 PCR 扩

增, 扩增产物电泳分离鉴定结果如图 1 所示, PCR 反应扩增得到的目的基因条带与预期相符。经测序验证, 油莎豆 *CeTIR1* 基因家族成员 *CeTIR1-1*、*CeTIR1-2*、*CeTIR1-3* 和 *CeTIR1-4* 基因的 ORFs 分别为 1770、1875、1836、1800 bp。经测序鉴定, 扩增到各 *CeTIR1* 基因的 ORF 序列与前期测得的转录组数据一致。



M: DL2000 DNA marker; 1~4: *CeTIR1-1*~*CeTIR1-4* ORF 扩增产物。

M: DL2000 DNA marker; 1~4: PCR amplification of *CeTIR1-1*~*CeTIR1-4* ORF.

图 1 油莎豆 *CeTIR1* 基因家族的 ORF 克隆

Fig. 1 Cloning of ORFs of *CeTIR1* genes in *C. esculentus*

2.2 油莎豆 *CeTIR1* 蛋白的理化性质分析

对 *CeTIR1* 基因家族编码蛋白保守结构域进行分析, 结果显示 (图 2), *CeTIR1* 家族蛋白与拟南芥 *AtTIR1* 都含有典型的 3 个结构域: 富集多个亮氨酸序列 (LRR) 的 AMN1 超结构域、F-box_5 结构域 (为 SCF 型泛素 E3 连接酶复合体中的一个组分引起蛋白水解) 和 Transp_inhibit 结构域 (是 LRR 区域的特定单位)。Motif 预测结果显示 (图 3), *CeTIR1* 家族蛋白有 6 个 Motif, 与 *AtTIR1* 结构相似。*CeTIR1* 家族蛋白与拟南芥 *AtTIR1* 类似, 有典型的 TIR1 蛋白保守结构域和保守 Motif, 预示着油莎豆 *CeTIR1* 可能与拟南芥 *AtTIR1* 有相似的生物学功能。

4 个 *CeTIR1* 蛋白之间理化性质差异不明显 (表 3)。蛋白序列最长为 *CeTIR1-2* (624 aa), 最短为 *CeTIR1-1* (589 aa)。*CeTIR1* 理论等电点在 5.13~6.72 之间, 不稳定系数在 42.64~46.33 之间, 均为酸性不稳定蛋白。除 *CeTIR1-3* 蛋白为疏水性蛋白, 其余 *CeTIR1* 蛋白均为亲水性蛋白。*CeTIR1* 蛋白均无跨膜区域。亚细胞定位分析显示

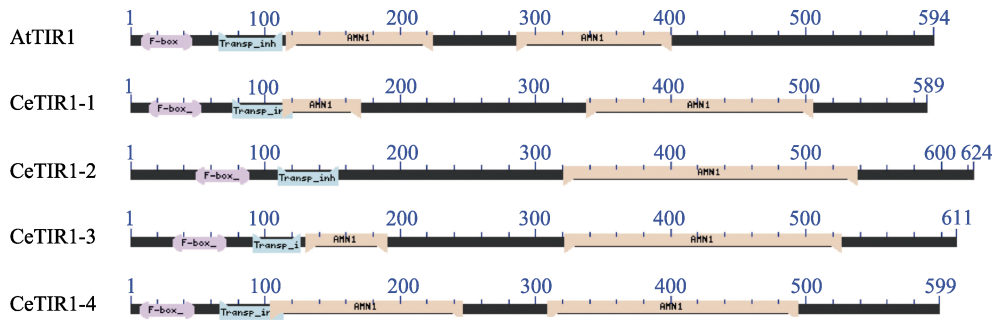


图 2 油莎豆 CeTIR1 家族蛋白功能结构域

Fig. 2 Functional domains of TIR1 family proteins from *C. esculentus*

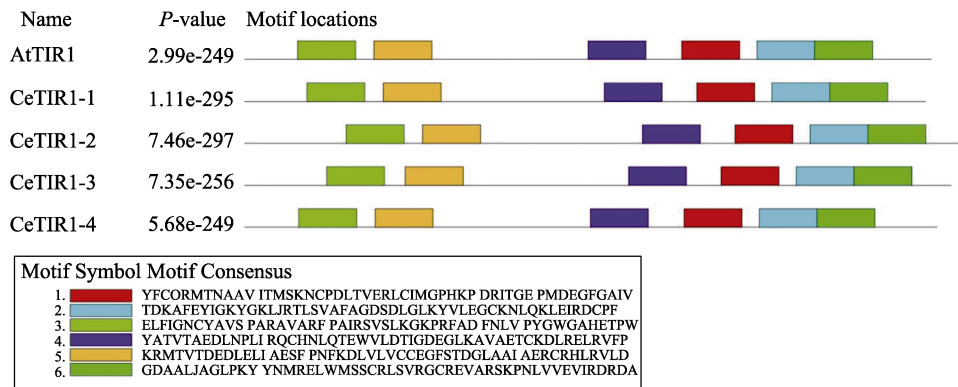


图 3 油莎豆 CeTIR1 家族蛋白保守 Motif 预测

Fig. 3 Prediction of the conserved motifs in CeTIR1 family proteins from *C. esculentus*

表 3 油莎豆 CeTIR1 家族蛋白理化性质

Tab. 3 Physicochemical properties of CeTIR1 family proteins from *C. esculentus*

蛋白 Protein	氨基酸 Amino acid	相对分子质量 Molecular weight/kDa	理论等电点 Theoretical pI	不稳定系数 Instability index	脂肪族指数 Aliphatic index	亲水系数 GRAVY	跨膜结构 Transmembrane structure	亚细胞定位 Subcellular localization
AtTIR1	594	66.80	6.99	47.58	94.83	0.009	0	细胞核
CeTIR1-1	589	65.67	5.13	42.64	91.88	-0.050	0	细胞核
CeTIR1-2	624	70.32	5.26	45.63	92.66	-0.080	0	细胞核
CeTIR1-3	611	67.11	6.10	46.33	98.00	0.017	0	细胞核
CeTIR1-4	599	66.37	6.72	45.34	94.06	-0.041	0	细胞核

CeTIR1 蛋白均位于细胞核内。CeTIR1 蛋白理化性质相似，预示着它们可能发挥类似的功能。

2.3 油莎豆 CeTIR1 蛋白的高级结构预测分析

CeTIR1 蛋白二级结构预测结果显示(表 4)，4 个 CeTIR1 蛋白主要是由 α -螺旋、延伸链、 β -转角和无规则卷曲组成，其中 α -螺旋和无规则卷曲占比较高。CeTIR1 蛋白预测三级结构结果显示(图 4)，以膜蛋白 c2p1nE 为模版，CeTIR1 家族蛋白和 AtTIR1 蛋白都为螺旋环状结构。AtTIR1 蛋白与模版的相似性为 96%。CeTIR1 家族蛋白中，CeTIR1-1、CeTIR1-2、CeTIR1-3 和 CeTIR1-4 蛋白与模版的相似性分别为 96%、91%、93%和

95%。通过以上分析预测 4 个 CeTIR1 家族蛋白可能发挥与 AtTIR1 蛋白相似的生物学功能。

表 4 油莎豆 CeTIR1 家族蛋白的二级结构

Tab. 4 Secondary structure of CeTIR1 family proteins from *C. esculentus*

蛋白 Protein	α -螺旋 α -helix/%	β -转角 β -turn/%	延伸链 Extended strand/%	无规则卷曲 Random coil/%
AtTIR1	48.32	4.88	14.48	32.32
CeTIR1-1	50.42	4.58	13.24	31.75
CeTIR1-2	50.48	3.85	13.14	32.53
CeTIR1-3	49.26	3.44	12.11	35.19
CeTIR1-4	50.25	4.34	12.52	32.89

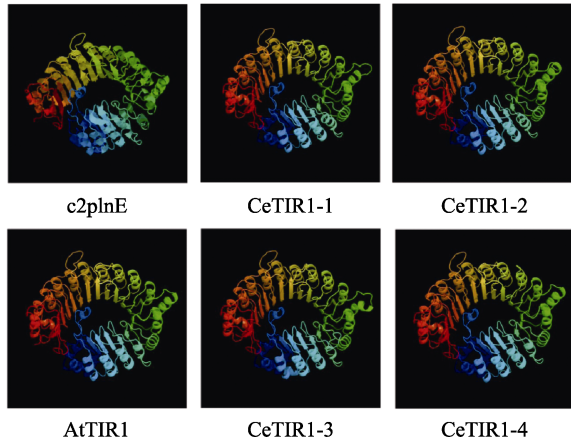


图 4 油莎豆 CeTIR1 家族蛋白三级结构预测

Fig. 4 Prediction of the tertiary structure of CeTIR1 family proteins from *C. esculentus*

2.4 油莎豆 CeTIR1 蛋白多序列比对和系统进化树

多序列比对结果显示 (图 5), 4 个 CeTIR1 蛋白和拟南芥 AtTIR1 蛋白具有较高的相似度, 都含有典型的 F-box 蛋白结构域、AMN1 超结构域和 Transp_inhibit 结构域。通过 MEGA 7.0 软件构建油莎豆 CeTIR1 蛋白与其他物种 TIR1 蛋白的系统发育树, 结果显示 (图 6), 4 个油莎豆 CeTIR1 的进化关系有明显的差异。从多序列比对和进化关系上来看, 油莎豆 CeTIR1-1 和 CeTIR1-2 在同

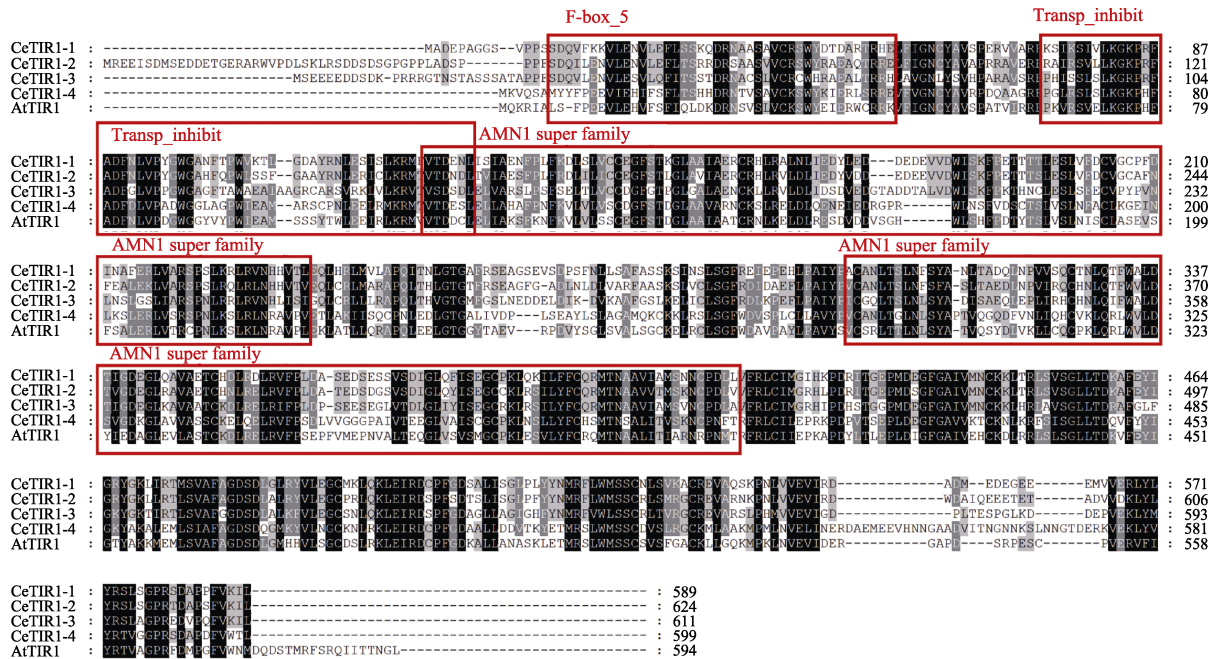
一支与禾本目莎草科的康藏嵩草 CITIR1 关系较近, 序列一致性值分别为 78.68%和 69.12%; CeTIR1-3 与木犀科油橄榄 OeTIR1 关系较近, 序列一致性值为 39.02%; 油莎豆 CeTIR1-4 与十字花科油菜 BnTIR1 关系较近, 序列一致性值为 51.31%。进化关系上的差异, 预示着它们可能差异化行使功能。

2.5 油莎豆 CeTIR1 基因家族组织表达特性分析

为进一步探究油莎豆 CeTIR1 基因家族在不同组织器官中的表达特性, 以晋农 1 号的根、叶、块茎的 cDNA 为材料, 以 *Ce18S rRNA* 作为内参基因, qRT-PCR 检测各 *CeTIR1* 基因的表达量。结果如图 7 所示, 油莎豆 CeTIR1 基因家族的表达特性呈多样性。油莎豆 CeTIR1 基因家族在各组织中均有表达, 其中, 在根中 *CeTIR1-2* 表达量最高, 在叶中 *CeTIR1-4* 表达量最高, 在块茎中 *CeTIR1-2* 表达量最高。相比较而言, 油莎豆 *CeTIR1* 基因家族均在块茎组织中高表达, 在根和叶组织中表达量较低。

2.6 外源 IBA 可缓解盐胁迫对油莎豆幼苗生长的损害

盐胁迫处理下, 油莎豆中 SOD 和 POD 活性随处理时间的延长呈先增加后下降的趋势, 在 48 h 时均达到最大值后开始下降。对盐胁迫下的



红色方框代表 CeTIR1s 保守结构域。

The red box represents the conserved domain in CeTIR1s.

图 5 油莎豆 CeTIR1 蛋白与其他物种 TIR1 蛋白序列比对

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of CeTIR1s with TIR1 proteins from other plant species

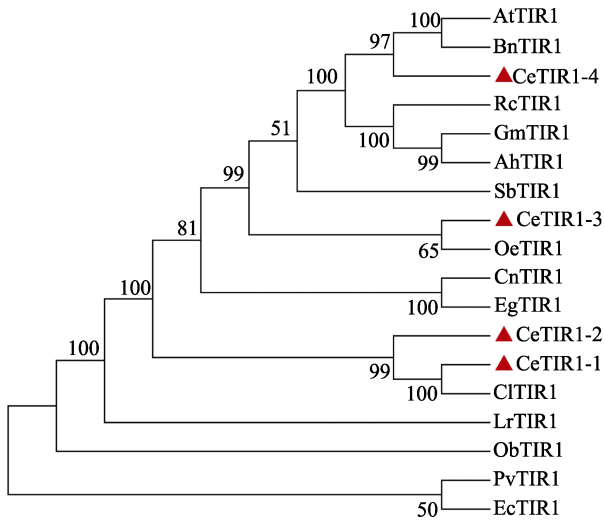
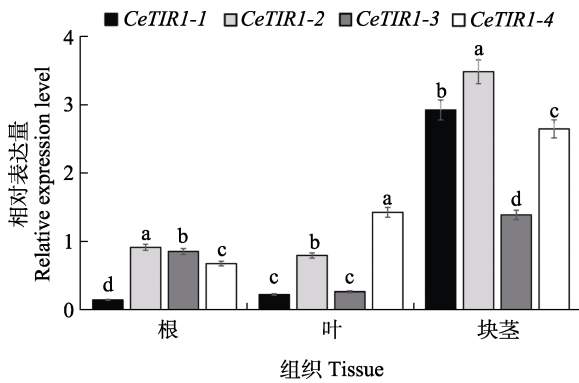


图6 不同植物生长素受体蛋白 (TIR1s) 系统进化树
Fig. 6 Phylogenetic tree of different plant auxin receptor proteins (TIR1s)



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

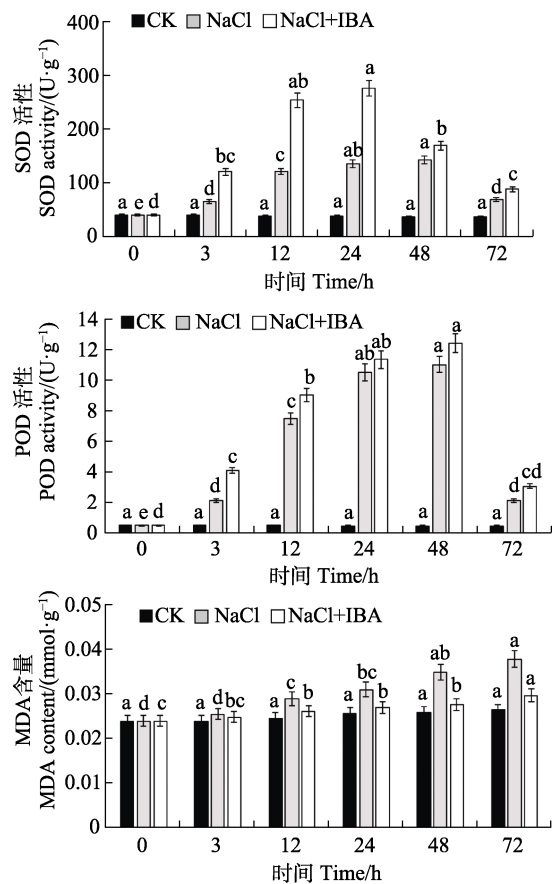
图7 油莎豆 *CeTIR1* 基因家族组织特异性表达分析

Fig. 7 Tissue-specific expression analysis of *C. esculentus* CeTIR1 family genes

油莎豆幼苗外源添加 IBA 处理 12、24 h 时, 油莎豆幼苗 SOD 活性升高趋势明显, 处理 48 h 时幼苗 SOD 活性下降。添加 IBA 处理的 SOD 活性仍高于仅盐胁迫处理的 SOD 活性(图 8)。外源 IBA 处理下, POD 活性相比仅盐胁迫处理的 POD 活性升高。在 IBA 处理 48 h 时, 幼苗 POD 活性达到峰值(图 8)。盐胁迫处理对油莎豆幼苗产生一定的损伤, 对盐胁迫下的油莎豆幼苗外源添加 IBA 处理显著提升油莎豆幼苗抵御盐胁迫的抗性。因此, IBA 处理可以缓解盐胁迫对于油莎豆幼苗的伤害。

盐胁迫处理下, MDA 的含量缓慢升高且在处理 72 h 时达到最高, 油莎豆幼苗细胞膜过氧化程度愈加严重。对盐胁迫下的油莎豆幼苗外源添加 IBA 处理后, 幼苗 MDA 含量降低(图 8)。幼苗

细胞膜过氧化程度随盐胁迫处理时间增加而加剧, 外源 IBA 减轻了盐胁迫下油莎豆幼苗细胞膜的损伤。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

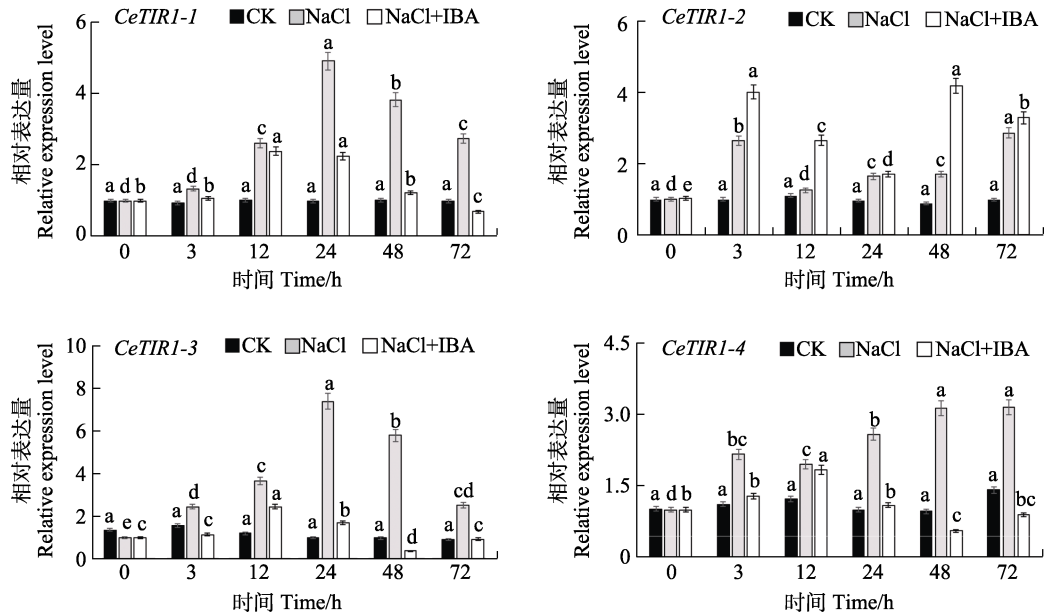
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图8 外源 IBA 对盐胁迫下油莎豆幼苗抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响

Fig. 8 Effects of exogenous IBA on antioxidant enzyme activities and MDA content in *C. esculentus* seedlings under salt stress

2.7 油莎豆 *CeTIR1* 基因在盐胁迫及外源 IBA 处理后的表达谱分析

油莎豆 *CeTIR1* 基因在盐胁迫下的表达分析如图 9 所示, 随着盐胁迫处理时间延长, *CeTIR1-1* 和 *CeTIR1-3* 表达量逐渐升高, 在 24 h 时达到最高后下降。*CeTIR1-4* 表达量随处理时间延长逐渐升高。*CeTIR1-2* 表达量在 3 h 时升高, 在 12 h 时降低, 而后又在 72 h 时显著升高。盐胁迫下油莎豆幼苗外源添加 IBA 处理, *CeTIR1-1*, *CeTIR1-3* 和 *CeTIR1-4* 表达量在 24、48、72 h 时相比盐胁迫处理条件下这 3 个基因表达量显著降低。然而, *CeTIR1-2* 表达量在 3、12、48、72 h 时相比盐胁迫处理显著升高, 且在不同时间相对表达量均高



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 9 不同处理条件下油莎豆 *CeTIR1s* 的表达谱

Fig. 9 Expression profiles of *CeTIR1s* under different treatment conditions

于盐胁迫处理。以上结果表明 *CeTIR1-1*、*CeTIR1-2*、*CeTIR1-3* 和 *CeTIR1-4* 可能都参与盐胁迫抗逆反应。尤其是 *CeTIR1-2* 基因在外源 IBA 处理时高表达。可见，外源 IBA 处理显著上调了 *CeTIR1-2* 基因表达，*CeTIR1-2* 可能进一步激活相关信号通路及其相关生理生化反应，从而缓解了盐胁迫对油莎豆幼苗的损伤。由此推测 *CeTIR1-2* 基因可能是参与调控油莎豆幼苗盐胁迫抗性的主要基因。

3 讨论

土壤盐渍化会严重阻碍植物生长发育，降低作物产量，给全球农业生产和粮食安全带来严重威胁^[22-23]。在植物抵御非生物胁迫过程中，生长素起到了提高植物对非生物胁迫适应性的关键作用^[24]。生长素信号通路离不开上游的调控因子生长素受体的参与，生长素受体是控制生长素信号通路的开关^[25]。TIR1 是一种被广泛研究的生长素受体，可介导 Aux/IAA 蛋白的快速降解，进而导致生长素调控基因表达的变化^[26]。因此，研究油莎豆生长素受体 *CeTIR1* 基因是否参与生长素响应和盐胁迫应答及其作用机制，对于油莎豆抗逆性改良和提高油莎豆在盐碱地等逆境种植管理有重要科学参考价值。

本研究通过生物信息学分析在油莎豆转录组

数据库中鉴定出油莎豆 4 条 *TIR1* 序列。通过功能结构域分析，4 条 *CeTIR1* 基因和拟南芥 *AtTIR1* 基因高度相似，编码蛋白都含有 F-box 结构域。预测其有 TIR1 蛋白功能，可响应生长素信号且在非生物胁迫应答中起作用。通过蛋白高级结构分析和多序列比对显示，油莎豆 *CeTIR1* 蛋白与拟南芥 *AtTIR1* 结构类似。预示其亦可与生长素、Aux/IAA 转录因子相互作用，这与百子莲 *ApTIR1* 蛋白的功能类似^[27]。通过系统进化树分析，油莎豆 *CeTIR1* 蛋白与来自禾本目莎草科的康藏嵩草、木犀科的油橄榄和十字花科的油菜的 TIR1 蛋白等同源性较高。

在不同物种中 TIR1 发挥的功能亦有不同，可能与物种本身特性有关。有报道表明，TIR1 可能调控龙眼体胚发生^[28]，与茶树越冬芽休眠密切相关^[29]，可能与红麻花药败育有关^[30]。亦有研究表明 *TIR1* 基因可以增强植物对盐胁迫的抗逆性。例如，盐穗木 *HcTIR1* 响应高盐胁迫且其表达量与盐胁迫浓度呈现负相关性^[19]。拟南芥过表达 *MiR393-TIR1* (*mTIR1*) 基因的植株抗盐能力显著增强^[17]。本研究发现，油莎豆 *CeTIR1-1*、*CeTIR1-2*、*CeTIR1-3* 和 *CeTIR1-4* 均响应盐胁迫信号，在 NaCl 处理时表达量显著增加。盐胁迫处理下油莎豆幼苗抗氧化酶活性升高，在 48 h 时达到峰值后下降，MDA 的含量也有所升高，说明盐胁迫

迫对油莎豆幼苗生长造成了一定程度的损害。外源 IBA 处理盐胁迫下油莎豆幼苗的 SOD、POD 酶活性提高,MDA 含量降低,说明外源添加 IBA 使盐胁迫下油莎豆幼苗的盐毒害有所缓解。特别是,油莎豆 *CeTIR1-2* 在外源添加 IBA 处理后表达量显著增加,预示着外源 IBA 显著上调 *CeTIR1-2* 基因表达。有研究表明,外源添加一定浓度的 IBA 处理沙冬青幼苗能够促进盐胁迫下幼苗的生长,提高幼苗的耐盐性^[31]。外源生长素能够缓解盐胁迫对小麦幼苗伤害,强化小麦幼苗的抗盐能力^[32]等。但关于 *TIR1* 响应盐胁迫和生长素信号的详尽分子机制的研究还未见报道。外源添加 IBA 对盐胁迫下的油莎豆幼苗起到一定程度的缓解作用,可提高盐胁迫下油莎豆幼苗的抗氧化性,还可能调控油莎豆生长素信号的转导途径。这对于提高植物耐盐性和改善盐碱地有重要意义。综合分析显示,*CeTIR1-2* 是通过生长素调控来响应盐胁迫的一个重要靶标基因。后期将对 *CeTIR1-2* 基因生物学功能等进行进一步深入研究,以阐明 *CeTIR1-2* 介导的抗逆性调控作用机制。

4 结论

本研究基于油莎豆转录组数据鉴定到 4 条油莎豆 *CeTIR1* 基因并对其克隆,4 个 *CeTIR1*s 都含有典型的 F-box 蛋白结构域、AMN1 超结构域和 Transp_inhibit 结构域,均为定位于细胞核的无跨膜区域的不稳定蛋白。油莎豆 *CeTIR* 基因均在块茎组织中高表达,在根和叶组织中表达量较低。油莎豆幼苗在盐胁迫下抗氧化酶活性和 MDA 含量升高,添加外源 IBA 可缓解盐胁迫对油莎豆幼苗生长的不利影响。盐胁迫可诱导 *CeTIR1* 基因的表达,尤其是外源 IBA 可显著上调 *CeTIR1-2* 基因表达,进而激活相关信号通路和胁迫应答体系,提高油莎豆幼苗抗逆性。*CeTIR1-2* 可能是介导生长素信号通路和油莎豆胁迫应答反应的一个重要调节因子。

参考文献

- [1] 王盈希,吴苏喜,周利平,张科红,李普选.油莎豆品质分析及加工利用研究进展[J].食品工业,2020,41(10):273-276.
WANG Y X, WU S X, ZHOU L P, ZHANG K H, LI P X. Research progress on quality analysis, processing and utilization of *Cyperus esculentus*[J]. The Food Industry, 2020, 41(10): 273-276. (in Chinese)
- [2] ADEGUNWA M O, ADELEKAN E O, ADEBOWALE A A, BAKARE H A, ALAMU E O. Evaluation of nutritional and functional properties of plantain (*Musa paradisiaca* L.) and tigernut (*Cyperus esculentus* L.) flour blends for food formulations[J]. Cogent Chemistry, 2017, 3(1): 1383707-1383721.
- [3] 阳振乐.油莎豆的特性及其研究进展[J].北方园艺,2017(17):192-201.
YANG Z L. Characteristics and research progress of *Cyperus esculentus*[J]. Northern Horticulture, 2017(17): 192-201. (in Chinese)
- [4] 陈惠宗.油莎豆的特征特性及栽培技术[J].农村新技术,2018(6):8-9.
CHEN H Z. Characteristics and cultivation techniques of *Cyperus esculentus*[J]. New Rural Technology, 2018(6): 8-9. (in Chinese)
- [5] 王志成,李双寿,梁雄,徐丽君,邹锡玲.中国油莎豆产业发展现状与前景展望[J].科技和产业,2022,22(1):62-67.
WANG Z C, LI S S, LIANG X, XU L J, ZOU X L. Development status and prospect of *Cyperus esculentus* industry in China[J]. Science Technology and Industry, 2022, 22(1): 62-67. (in Chinese)
- [6] 王瑞元,王晓松,相海.一种多用途的新兴油料作物——油莎豆[J].中国油脂,2019,44(1):1-4.
WANG R Y, WANG X S, XIANG H. A multi-purpose novel oil crop—*Cyperus esculentus*[J]. China Oils and Fats, 2019, 44(1): 1-4. (in Chinese)
- [7] 焦兵阳,王英,尹诗慧,张金昊,闫帆,李景文,刘雅婧,王庆钰.油莎豆生物学特性、功能与遗传研究进展[J].现代化农业,2021(1):40-44.
JIAO B Y, WANG Y, YIN S H, ZHANG J H, YAN F, LI J W, LIU Y J, WANG Q Y. Research progress on biological characteristics, function and heredity of *Cyperus esculentus*[J]. Modernizing Agriculture, 2021(1): 40-44. (in Chinese)
- [8] TAHJIB-UL-ARIF M, ZAHAN M I, KARIM M M, IMRAN S, HUNTER C T, ISLAM M S, MIA M A, HANNAN M A, RHAMAN M S, HOSSAIN M A, BRESTIC M, SKALICKY M, MURATA Y. Citric acid-mediated abiotic stress tolerance in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(13): 7235-7260.
- [9] KRONZUCKER H J, BRITTO D T. Sodium transport in plants: a critical review[J]. The New Phytologist, 2011, 189(1): 54-81.
- [10] SMOLKO A, BAUER N, PAVLOVIĆ I, PĚNČÍK A, NOVÁK O, SALOPEK-SONDI B. Altered root growth,

- auxin metabolism and distribution in *Arabidopsis thaliana* exposed to salt and osmotic stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(15): 7993-8013.
- [11] ZHAO S, ZHANG Q, LIU M, ZHOU H, MA C, WANG P. Regulation of plant responses to salt stress[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 4609-4624.
- [12] YU Z, DUAN X, LUO L, DAI S, DING Z, XIA G. How plant hormones mediate salt stress responses[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(11): 1117-1130.
- [13] 向美琴, 王攀, 蔡兆明. 白菜生长素受体基因家族鉴定及表达分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(16): 5258-5267.
XIANG M Q, WANG P, CAI Z M. Genome-wide identification and expression pattern analysis of auxin receptor proteins in *Brassica rapa*[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(16): 5258-5267. (in Chinese)
- [14] RUEGGER M, DEWEY E, GRAY W M, HOBBIE L, TURNER J, ESTELLE M. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p[J]. Genes & Development, 1998, 12(2): 198-207.
- [15] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, JONES A M, ESTELLE M. Auxin action in a cell-free system[J]. Current Biology, 2003, 13(16): 1418-1422.
- [16] BENJAMINS R, SCHERES B. Auxin: the looping star in plant development[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 443-465.
- [17] CHEN Z, HU L, HAN N, HU J, YANG Y, XIANG T, ZHANG X, WANG L. Overexpression of a miR393-resistant form of *transport inhibitor response protein 1 (mTIR1)* enhances salt tolerance by increased osmoregulation and Na⁺ exclusion in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56(1): 73-83.
- [18] 代真林, 张荣琴, 杨俊, 张晋豪, 魏兰芳, 刘棋, 姬广海. 大白菜生长素受体基因家族生物信息学鉴定与表达分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2020, 35(6): 938-949.
DAI Z L, ZHANG R Q, YANG J, ZHANG J H, WEI L F, LIU Q, JI G H. Genome-wide identification and expression analysis of the auxin receptor gene family in Chinese cabbage[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2020, 35(6): 938-949. (in Chinese)
- [19] 王波. 拟南芥和盐生植物灰绿藜液泡膜焦磷酸酶基因与 TIR1 基因表达相关性分析[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2007.
WANG B. Analysis on gene expression correlation between *Vacuolar H⁺-pyrophosphatase* and *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1)* in *Arabidopsis thaliana* and halophyte *Chenopodium glaucum*[D]. Urumqi: Xinjiang University, 2007. (in Chinese)
- [20] 高俊凤. 植物生理学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000: 196-197.
- GAO J F. Experimental techniques for plant physiology[M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2000: 196-197. (in Chinese)
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] VAN ZELM E, ZHANG Y, TESTERINK C. Salt tolerance mechanisms of plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2020, 71: 403-433.
- [23] LITALIEN A, ZEEB B. Curing the earth: a review of anthropogenic soil salinization and plant-based strategies for sustainable mitigation[J]. Science of the Total Environment, 2020, 698: 134235.
- [24] IGLESIAS M J, TERRILE M C, WINDELS D, LOMBARDO M C, BARTOLI C G, VAZQUEZ F, ESTELLE M, CASALONGUÉ C A. MiR393 regulation of auxin signaling and redox-related components during acclimation to salinity in *Arabidopsis*[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e107678.
- [25] PEER W A. From perception to attenuation: auxin signalling and responses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2013, 16(5): 561-568.
- [26] DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor[J]. Nature, 2005, 435(7041): 441-445.
- [27] 邹梦雯, 岳建华, 张荻, 申晓辉. 百子莲生长素受体基因 TIR1 的全长 cDNA 克隆及功能分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2015, 33(3): 36-42, 52.
ZOU M W, YUE J H, ZHANG D, SHEN X H. Cloning and functional analysis of full-length cDNA of the auxin receptor gene TIR1 from *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Agricultural Science), 2015, 33(3): 36-42, 52. (in Chinese)
- [28] 赖瑞联, 钟春水, 林玉玲, 赖钟雄. 龙眼生长素受体基因 TIR1 的克隆及表达分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(01): 136-143.
LAI R L, ZHONG C S, LIN Y L, LAI Z X. Cloning and expression analysis of auxin receptor gene TIR1 from *Dimocarpus longan* Lour.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(1): 136-143. (in Chinese)
- [29] 曹红利, 岳川, 周艳华, 王璐, 郝心愿, 曾建明, 杨亚军, 王新超. 茶树生长素受体基因 CsTIR1 的克隆与表达分析[J]. 茶叶科学, 2015, 35(1): 45-54.
CAO H L, YUE C, ZHOU Y H, WANG L, HAO X Y, ZENG J M, YANG Y J, WANG X C. Cloning and expression analysis of auxin receptor gene CsTIR1 in tea plant

- (*Camellia sinensis*)[J]. Journal of Tea Science, 2016, 37(1): 136-143. (in Chinese)
- [30] 陈励虹, 周步进, 周瑞阳. 红麻 *TIR1* 基因克隆及其表达载体构建[J]. 南方农业学报, 2017, 48(8): 1343-1350.
CHEN L H, ZHOU B J, ZHOU R Y. Cloning of *TIR1* gene in *Hibiscus cannabinus* L. and construction of its expression vector[J]. Journal of Southern Agriculture, 2017, 48(8): 1343-1350. (in Chinese)
- [31] 李婧男, 刘强, 李升. 生长素和氯化钙对盐胁迫下沙冬青幼苗的缓解作用[J]. 植物研究, 2010, 30(1): 27-31.
LI J N, LIU Q, LI S. Mitigative effect of IBA and CaCl_2 on under salt stress *Ammopiptanthus mongolicus* seedlings[J]. Bulletin of Botanical Research, 2010, 30(1): 27-31. (in Chinese)
- [32] 刘娟, 马小乐, 尚勋武, 王化俊. 外源 IAA 对小麦‘西旱 2 号’幼苗水分胁迫和 NaCl 胁迫的缓解响应[J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(2): 47-51.
LIU J, MA X L, SHANG X W, WANG H J. Regulation of exogenous auxin IAA on drought and salt stress during seedling stage of spring wheat (cv. Xihan No.2)[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2009, 44(2): 47-51. (in Chinese)