

芒果铁还原酶（FRO）编码基因的鉴定与表达模式分析

韩广栋¹, 孙丰沛^{1*}, 任姿颖¹, 曹晶雯¹, 高爱平², 黄建峰², 宋志忠^{1,3**}

1. 鲁东大学农林工程研究院/山东省高校作物高产抗逆分子模块育种重点实验室, 山东烟台 264025; 2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 3. 剑桥大学植物系, 英国剑桥 CB2 3EA

摘要: 铁 (Fe) 是植物生长发育的必需微量元素之一, 参与植物体内多种生命活动和代谢过程。有关铁素吸收、转运和分配吸收的分子机制研究主要体现在一年生模式作物, 果树中铁吸收与转运相关基因的生物学功能依然未知。本研究从二倍体芒果桂热 82 中克隆并鉴定了 11 个铁还原酶 (FRO) 编码基因, 命名为 *MiFRO1*~*MiFRO11*; 除 *MiFRO1* 缺失 Motif2~Motif5 基序外, 其他 *MiFROs* 均含有 10 个典型的 Motif 基序, 除 *MiFRO3* 具有独特的三级结构外, 其他 *MiFROs* 拥有相近的三级结构; 11 种不同科、属植物 FRO 蛋白的氨基酸水平一致性约为 42.07%, *MiFROs* 的氨基酸水平一致性约为 62.43%; 系统进化树表明 *MiFROs* 倾向于单独聚集在一起, 在系统发育树上与其他 10 种植物的同源蛋白进化距离较远; 实时荧光定量 PCR 表明 *MiFRO8* 在芒果树体中的整体表达水平最高, *MiFRO4*、*MiFRO5*、*MiFRO8* 和 *MiFRO11* 在成年树体新生叶片和嫁接苗叶片中的表达量最高, *MiFRO6* 和 *MiFRO7* 在成年树体新生韧皮部和嫁接苗茎部的表达水平最高, *MiFRO1* 和 *MiFRO10* 在幼果的表达水平最高, *MiFRO2* 和 *MiFRO9* 在嫁接苗根部的表达量最高, 而 *MiFRO3* 在盛花期花朵中的表达量最高。此外, *MiFROs* 在根部易受缺铁和 NaCl 胁迫的诱导而显著增加; *MiFRO3*、*MiFRO5* 和 *MiFRO8* 受高铁毒害的抑制, 表达量降低; *MiFRO2*、*MiFRO5*、*MiFRO7* 受 ABA 胁迫, 其表达量增加; *MiFRO1*、*MiFRO5* 受 PEG 胁迫, 其表达量增加, *MiFRO2*、*MiFRO6* 和 *MiFRO7* 受低温 (4 °C) 抑制, 其表达量降低, 但 *MiFROs* 对热胁迫 (45 °C) 不敏感。本研究为明确芒果铁的吸收与转运机制提供基因资源, 并为解析热带作物果树铁素营养与高效利用奠定理论基础。

关键词: 芒果; 铁吸收; 铁还原酶; 非生物胁迫; 表达模式

中图分类号: S667.7 文献标识码: A

Identification and Expression Pattern Analysis of Ferric Reduction Oxidase Encoding Genes in Mango

HAN Guangdong^{1*}, SUN Fengpei^{1*}, REN Ziyang¹, CAO Jingwen¹, GAO Aiping², HUANG Jianfeng², SONG Zhizhong^{1,3**}

1. Engineering Research Institute of Agriculture and Forestry, Ludong University / Key Laboratory of Molecular Module-based Breeding of High Yield and Abiotic Resistant Plants in Universities of Shandong, Yantai, Shandong 264025, China; 2. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Department of Plant Science, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EA, England

Abstract: Iron (Fe) is one of the essential trace mineral elements in plants to maintain normal growth and development that plays an important role in various life processes. Researches towards molecular mechanism of Fe uptake, transport and distribution are mainly focused on the annual model plants. Biological functions of genes towards Fe uptake and transport in fruit trees are still unknown. In this study, 11 ferric reduction oxidase encoding genes (*FROs*) were isolated and identified from diploid mango Guire 82, named by *MiFRO1*–*MiFRO11*. All mango *FRO* had ten typical motifs ex-

收稿日期 2022-11-03; 修回日期 2023-01-06

基金项目 国家重点研究计划子课题 (No. 2019YFD1000504); 国家自然科学基金项目 (No. 31501743); 国家留学基金项目 (No. 202208370080)。

作者简介 韩广栋 (2001—), 男, 本科生, 研究方向: 果树遗传育种; *同等贡献作者: 孙丰沛 (2001—), 男, 本科生, 研究方向: 果树分子生物学。**通信作者 (Corresponding author): 宋志忠 (SONG Zhizhong), E-mail: szzh2000@163.com。

cept for MiFRO1 lacking Motif2–Motif5. All mango FRO possessed similar tertiary structure, with the exception that MiFRO3 exhibited distinct tertiary structure. The amino acid sequences of FRO from 11 plants shared an overall identity of 42.07%, while mango FRO shared an overall identity of 62.43%. Phylogenetic tree analysis showed that mango FRO were prone to be closely clustered together lonely, which was far away from the homologs of the other ten plants in genetic distance. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that *MiFRO3* was the most abundant expressed gene during different parts of Guire 82 mango on the whole. In particular, *MiFRO4*, *MiFRO5*, *MiFRO8* and *MiFRO11* were highly expressed in the leaves of both mature trees and grafted seedlings. *MiFRO6* and *MiFRO7* were highly expressed in phloem or stem, *MiFRO1* and *MiFRO10* were highly expressed in young fruits, *MiFRO2* and *MiFRO9* were highly expressed in seedling roots, while *MiFRO3* was highly expressed in full bloom flowers. In addition, expression of *FRO* in mango roots were mainly induced under iron depletion and NaCl stress, respectively, while *MiFRO3*, *MiFRO5* and *MiFRO8* were significantly reduced under iron toxicity. Expression of *MiFRO2*, *MiFRO5* and *MiFRO7* were increased under ABA treatment, and *MiFRO1* and *MiFRO5* were enhanced under PEG treatment. Expression of *MiFRO2*, *MiFRO6* and *MiFRO7* were decreased under low temperature (4 °C). However, *FRO* changed little under heat stress (45 °C) in mango roots. This study would provide gene resources to elucidate the molecular mechanisms of Fe uptake and transport in mango, and lay a theoretical foundation to reveal Fe nutrition and high utilization in tropical fruit crops.

Keywords: mango; Fe uptake; ferric reduction oxidase; abiotic stress; expression pattern

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.02.001

铁 (Fe) 是植物细胞中必不可少的微量元素之一, 作为铁硫蛋白和细胞色素的组成成分, 参与植物光合作用、呼吸作用、植物激素合成、DNA 修复和氨基酸、嘌呤代谢等多种代谢途径^[1-4]。园艺学中, 铁肥施放与果树的生长、发育、果实品质形成和产量密切相关, 土壤缺铁不利于果树的生长和发育, 特别是石灰性土壤中缺铁现象更为明显, 直接影响作物产量和品质的降低^[5-8]。

土壤中的铁大多为 Fe^{3+} , 植物对 Fe^{3+} 的利用微乎其微^[5, 7-9]。植物中, 有关铁吸收、转运和分配的分子机制研究主要集中在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*) 等模式植物中^[5-6, 9], 果树作物中的研究较少。植物正常生长所需铁浓度为 $10^{-9} \sim 10^{-4}$ mol/L, 然而, 在正常 pH 土壤中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的浓度通常不超过 10^{-15} mol/L, 远远不能满足植物正常生长和发育的需求^[6, 9]。ROMHELD 等^[10]最早提出了 2 种植物根际的铁吸收机制: 吸收机制 I, 即通过定位于根细胞膜表面的 H-ATP 酶向根际分泌 H^+ , 降低周围土壤 pH, 促进 Fe^{3+} 的溶解, 并通过铁还原酶 (ferric reduction oxidase, FRO) 将根系周围的 Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+} , 再通过 Fe^{2+} 转运蛋白 (ferrous iron transporter, IRT) 进入根系被植物吸收利用^[5-6, 9-10], 多见于双子叶植物和非禾本科单子叶植物; 吸收机制 II, 即通过一系列的酶促反应合成和分泌麦根酸类物质, 与根际的 Fe^{3+} 形成螯合物, 由专一的铁载体吸收途径被根系吸收利用, 常见于禾本科单子叶植物。近

期研究表明, 水稻中同时存在吸收机制 I 和吸收机制 II^[5-6, 9-11]。

近几年, 国内外学者有关 FRO 吸收铁的分子机制研究主要集中在拟南芥^[10, 12]和水稻^[11]等一年生模式植物。最早在拟南芥根中克隆获得 *AtFRO2*, 将其在铁还原酶缺陷的突变体 *fro* 互补表达后有效缓解了缺铁胁迫对突变体植株生长的抑制作用, 并显著增强了互补株系根表面的 FRO 活性^[13-14]。水稻 *OsFRO1* 和 *OsFRO7* 主要在旗叶中高量表达, 且在转录水平均受 NaCl、PEG、高温、重金属等非生物胁迫的调控, *OsFRO1* 的 RNAi 干涉株系生长受抑制, 铁含量、叶绿素含量和活性氧 (reactive oxygen scavenging, ROS) 清除能力均显著降低^[11]。然而, 果树学中铁吸收与转运的分子机制未知, 仅在资阳香橙 (*Citrus junos* cv. Ziyang xiangcheng)^[15]和小金海棠 (*Malus xiaojinensis* cv. Cheng et Jiang)^[16]中鉴定出 FRO 同源基因, 热带作物中有关铁营养与高效利用的分子基础依然空白。

杧果 (*Mangifera indica*) 是全球知名的热带果树作物之一, 基因组已完成测序^[17]。本研究以桂热 82 杧果为材料, 克隆杧果 FRO 基因并鉴定其生物信息学特征, 明确杧果 FRO 基因的组织特异性表达特征及其在转录水平对缺铁、铁毒害、ABA、NaCl、PEG、低温和热胁迫的响应差异, 为研究杧果铁的吸收与利用的分子机制提供基因资源, 并为解析杧果铁素营养动态与高效利用奠

定理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 5 年生桂热 82 杧果和 1 年生嫁接幼苗，由中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所提供。分别采集 5 年生桂热 82 杧果的 1 年生新叶（2019 年 4 月 1 日）、新生韧皮部（2019 年 4 月 1 日）、新生根（2019 年 4 月 1 日）、盛开花朵（2019 年 4 月 1 日）、幼果（2019 年 5 月 1 日）和成熟果实（2019 年 8 月 1 日），液氮冷冻后保存于-80℃超低温冰箱备用。按照李又欢等^[18]、张璐等^[19]和 SONG 等^[20]的方法，以 1/2 MS 液体培养基为对照条件，利用 1 年生桂热 82 嫁接幼苗进行缺铁（0 μmol/L FeNa-EDTA）、高铁（500 μmol/L FeNa-EDTA）、ABA（200 μmol/L）、10% PEG 6000（w/V）、NaCl（200 mmol/L）、低温（4℃）和高温（45℃）胁迫，处理 48 h 后^[17-21]，采集根部和叶片材料用于转录水平的表达差异分析。

1.2 方法

1.2.1 杧果 FRO 家族基因克隆 以拟南芥 8 个 FRO 蛋白的氨基酸序列为参考^[10, 12]，在杧果基因组数据库^[17]中检索潜在的杧果 FRO 家族蛋白，下载氨基酸序列及其编码基因的 CDS（coding sequence）序列，检索结果在 Pfam（<http://pfam.xfam.org/search>）在线软件预测功能结构域。根据杧果 FRO 基因的 CDS 序列设计上下游引物，提取 1 年生桂热 82 嫁接幼苗的 RNA，通过 Prime-ScriptTM RT reagent Kit 反转录试剂盒（TaKaRa，大连）合成第一链 cDNA 作为模板，利用 Prime STARTM HS DNA 聚合酶（TaKaRa，大连）扩增杧果 FRO 基因，送生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序验证。

1.2.2 生物信息学分析 通过李又欢等^[18]和 GAO 等^[21]描述的方法，利用 ProtParam（<http://expasy.org/tools/protparam.html>）在线软件分析杧果 FRO 蛋白的氨基酸数目、等电点、脂肪系数、总亲水平均数 GRAVY（grand average of hydropathicity）、不稳定指数等理化性质；运用 SignalP 4.0（<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>）在线软件分析杧果 FRO 蛋白的信号肽存在情况；利用 Phyre 2（<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>）在线软件预测杧果 FRO 蛋白的三级结构。

1.2.3 系统发育树分析 根据 GAO 等^[21]和 ZHANG 等^[22]的方法，下载杧果（漆树科）、拟南芥（十字花科）、番茄（*Solanum lycopersicum*，茄科）、玉米（*Zea mays*，禾本科）、水稻（禾本科）、蒺藜苜蓿（*Medicago truncatula*，豆科）、落花生（*Arachis hypogaea*，豆科）、大豆（*Glycine max*，豆科）、葡萄（*Vitis vinifera*，葡萄科）、资阳香橙（芸香科）和小金海棠（蔷薇科）11 种植物 FRO 同源蛋白的氨基酸序列，利用 ClustalX 2.0 软件对其进行氨基酸序列一致性比对分析，利用 MEGA 13.0 软件中的邻接法（Neighbor-joining, NJ）构建 11 种植物 FRO 同源蛋白的系统发育树，分析不同植物 FRO 同源蛋白的遗传进化关系。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析 参考文献^[18-23]的方法，利用 NCBI/Primer-BLAST 在线软件设计杧果 FRO 家族基因的特异性表达引物（表 1），以杧果 *Actin* 为内参，通过 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪检测杧果 FRO 家族基因在不同组织部位的特异性表达特征及其在转录水平上对缺铁、高铁、ABA、PEG 6000、NaCl、低温和高温等非生物胁迫的响应差异。借助 SYBR Green（TaKaRa，大连）荧光染料进行 PCR 反应。反应程序为：95℃预变性 30 s；95℃变性 5 s，58℃退火 34 s，40 个循环；最后 72℃延伸 10 s。由实时荧光定量 PCR 仪获得的 Ct 值经内参基因 *Actin* 均一化处理，采用 2^{-ΔΔC_T} 法计算相对表达量，通过 Log₂ 法计算

表 1 实时荧光定量 PCR 所用的特异性引物
Tab. 1 Specific primers used for qRT-PCR

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	扩增产物 Amplicon product/bp
MiFRO1	F: GGGACCTGAAAGAGCCT R: GCGCAGACCTTGCATCTCC	164
MiFRO2	F: GACGAGTGTGTATGAAGAAG R: GCAGAGTCATGATCACTTGC	174
MiFRO3	F: CCTGAAGCAGTCTGTACACAG R: GTGTCCTCACTGGTGTCTG	149
MiFRO4	F: CAGAGGCGTGTATCGAGAT R: TGGGTTTCGCACTCTGGTCCC	146
MiFRO5	F: GAGATGCACAACACTTGGAC R: GGGTTCCTCACTCTCGTTCCAG	130
MiFRO6	F: GGTCAGATAGAGCTGCACAA R: GTGTGTCCTTACTCTAGTGC	141
MiFRO7	F: GAGGTTGCAGACTACGATGT R: CTCTGGTGCCTGAAACAATG	154
MiFRO8	F: GTGGCGGAGATGGATGAGAA R: CCTGAGACCACATCCACACC	143
MiFRO9	F: GGGTGACACGTGACGAAGGC R: GCTGATCTTGCATCTCCTTC	136
MiFRO10	F: GAGGGCGATGCTCGTCTGTC R: AGAGCAACGCGCTTGTAG	143
MiFRO11	F: GAAGGCGATGCTCGTCTGTC R: CCGGGTGATAGAGCAACA	154

胁迫处理前后表达倍数的变化, 并通过 HemI 软件绘制表达倍数变化的热图。

1.3 数据处理

利用 SPSS 13.0 软件 (SPSS Chicago, 美国) 对本研究的数据进行显著性分析, 芒果幼苗在胁迫处理与对照条件 2 个独立样品间进行 *t*-检验。

2 结果与分析

2.1 芒果 FRO 家族基因的鉴定与克隆

通过 BLAST 同源比对法, 在芒果数据库里

检索到 11 个潜在的铁还原酶蛋白, Pfam 注释为 Ferric reductase, 功能结构域包括 NADPH oxidase、FAD-binding domain 和 Oxidoreductase signature domain 等, 均属于典型的铁还原酶的保守功能域 (图 1)。GO 生物学功能注释为 detoxification (GO: 0098754), 证实均为铁还原酶编码基因, 命名为 *MiFRO1~MiFRO11*。下载 *MiFROs* 的 CDS 电子序列, 设计上下游引物进行 PCR 扩增, 测序验证后提交 NCBI 获得 GenBank 登录号 (表 2)。

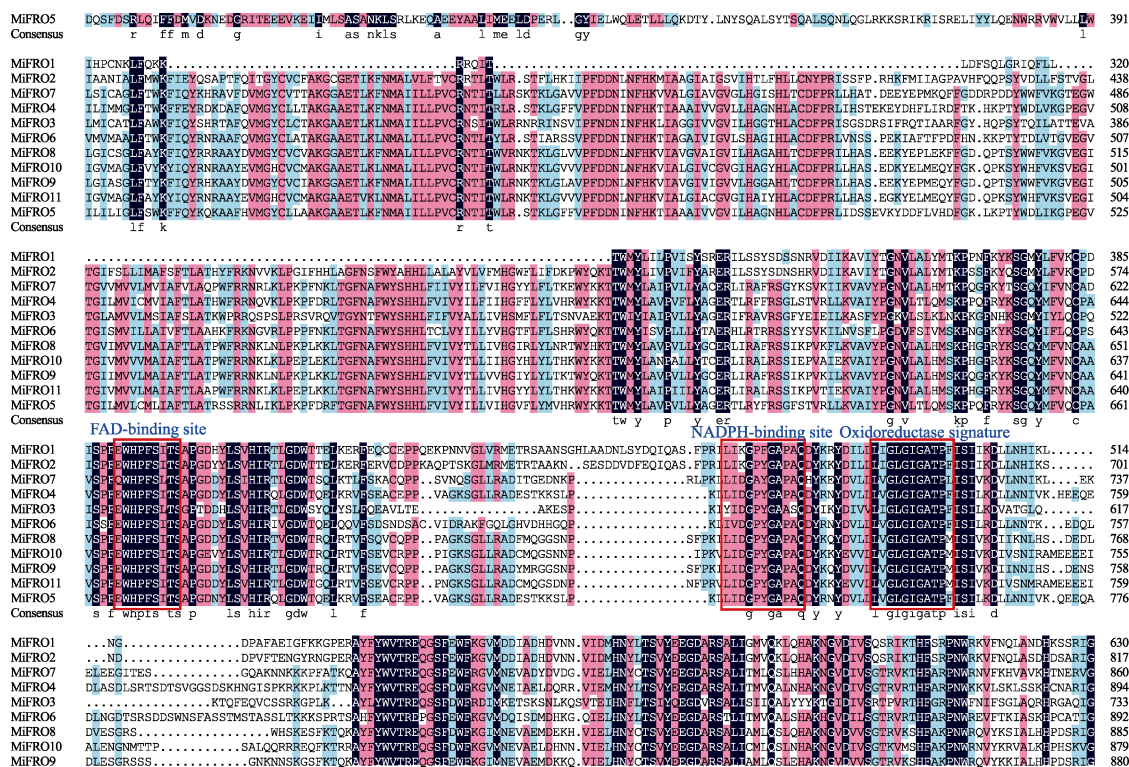


图 1 MiFROs 氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment of MiFRO proteins

表 2 MiFROs 理化性质分析

Tab. 2 Physical and chemical properties of MiFRO proteins

蛋白 Protein	数据库登录号 Database ID	GenBank 登录号 GenBank ID	氨基酸数目 Amino acid No.	等电点 pI	脂肪系数 Aliphatic index	总平均亲水性 GRAVY	不稳定性指数 Instability index
MiFRO1	mango000623	OP886856	665	9.06	78.90	-0.43	42.80 (unstable)
MiFRO2	mango004559	OP886857	852	8.10	82.22	-0.18	36.39 (stable)
MiFRO3	mango006835	OP886860	768	9.14	90.56	-0.08	51.55 (unstable)
MiFRO4	mango005555	OP886859	929	9.21	85.47	-0.31	45.45 (unstable)
MiFRO5	mango027985	OP886866	946	9.39	87.75	-0.26	50.99 (unstable)
MiFRO6	mango008382	OP886861	927	8.67	85.09	-0.26	48.10 (unstable)
MiFRO7	mango005248	OP886858	895	9.07	85.83	-0.27	41.13 (unstable)
MiFRO8	mango012545	OP886862	920	9.03	83.43	-0.26	41.70 (unstable)
MiFRO9	mango022480	OP886865	915	9.13	84.43	-0.26	38.74 (stable)
MiFRO10	mango017941	OP886863	914	9.06	84.39	-0.26	42.90 (unstable)
MiFRO11	mango026971	OP886864	918	8.39	84.26	-0.26	40.98 (unstable)

2.2 植物 FRO 同源蛋白系统发育树分析

多重序列比对结果表明,11 种植物 FRO 蛋白之间具有较高的同源性,氨基酸水平具有 42.07% 的一致性,11 个杧果 FRO 蛋白在氨基酸水平具有 62.43% 的一致性(图 1),核苷酸水平具有 57.78% 的一致性。下载杧果、拟南芥、番茄、水稻、玉米、大豆、蒺藜苜蓿、落花生、葡萄、资阳香橙和小金海棠等 11 种植物 FRO 同源蛋白的氨基酸序列^[5-16]进行系统发育树分析,结果表明,MiFROs 集中聚集在一起,且与其他 10 种植物同源蛋白在系统发育树上距离较远,大豆、蒺藜苜蓿和落花生 3 种豆科植物的 FRO 同源蛋白在遗传进化距离最近,葡萄、资阳香橙和小金海棠 3 种果树作物 FRO 同源蛋白聚在一起,水稻和玉米 2 种禾本科植物 FRO 同源蛋白在遗传距离上更为相近(图 2)。

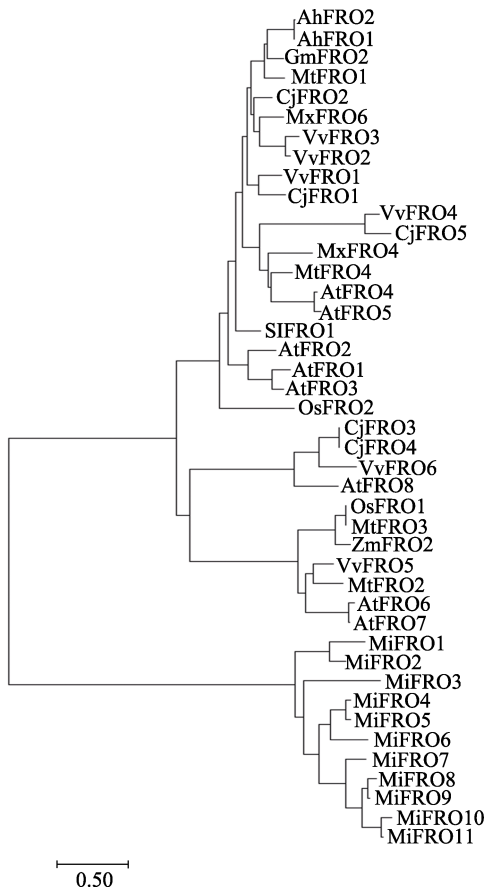


图 2 11 种植物 FRO 同源蛋白系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of FRO homologs from 11 plant species

2.3 MiFROs 的理化性质与高级结构分析

理化性质分析结果详见表 2,所有 MiFROs 的等电点 (pI) >7.00, 含有的碱性氨基酸较多;

MiFROs 的脂肪系数均小于 100,且 GRAVY 亲水指数均小于 0,均为亲水蛋白;信号肽分析表明 MiFROs 均不具有信号肽。稳定性分析表明 MiFRO2 和 MiFRO9 的不稳定指数小于 40,为稳定蛋白,其他 MiFROs 的不稳定性指数大于 40,均为不稳定蛋白(表 2)

Motif 分析结果表明,MiFROs 含有 10 个不同的典型 Motif 基序,其中,MiFRO1 仅含有 6 个 (Motif1、Motif6~Motif10) 基序,缺失 4 个 (Motif2~Motif5) 基序,而其他 MiFROs 拥有全部 10 个 Motif 基序(图 3A)。除 Motif10 含有 32 个特征氨基酸数目外,其他 10 个 Motif 均含有 50 个特征氨基酸数目(图 3B);

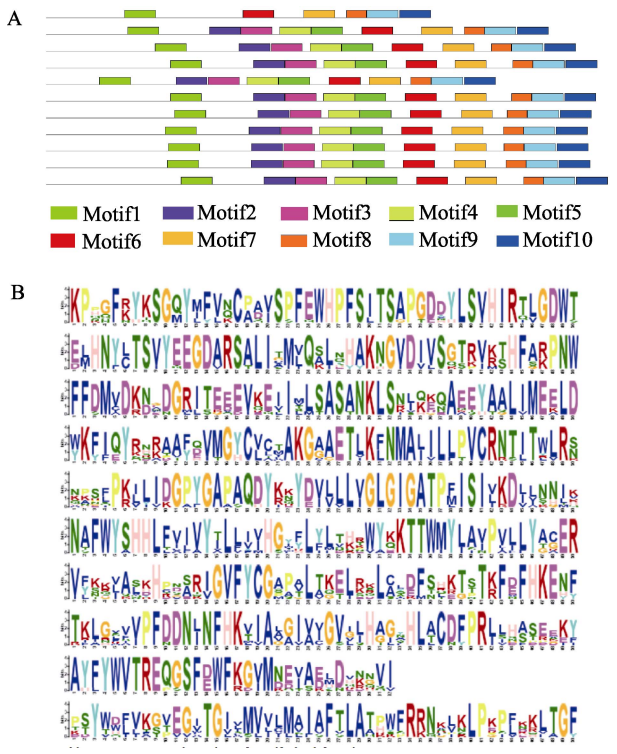


图 3 MiFRO 家族蛋白 Motif 基序预测
Fig. 3 Motif prediction of MiFRO proteins

蛋白质高级结构预测结果表明,MiFROs 三级结构存在差异,其中,MiFRO1、MiFRO2、MiFRO6 和 MiFRO7 具有相似的三级结构,MiFRO4、MiFRO5、MiFRO8、MiFRO9、MiFRO10 和 MiFRO11 具有相似的三级结构,而 MiFRO3 具有独特的三级结构,与其他 MiFRO 成员的三级结构差异较大(图 4)。

2.4 MiFRO 家族基因组织特异性表达分析

实时荧光定量 PCR 分析结果表明,MiFRO

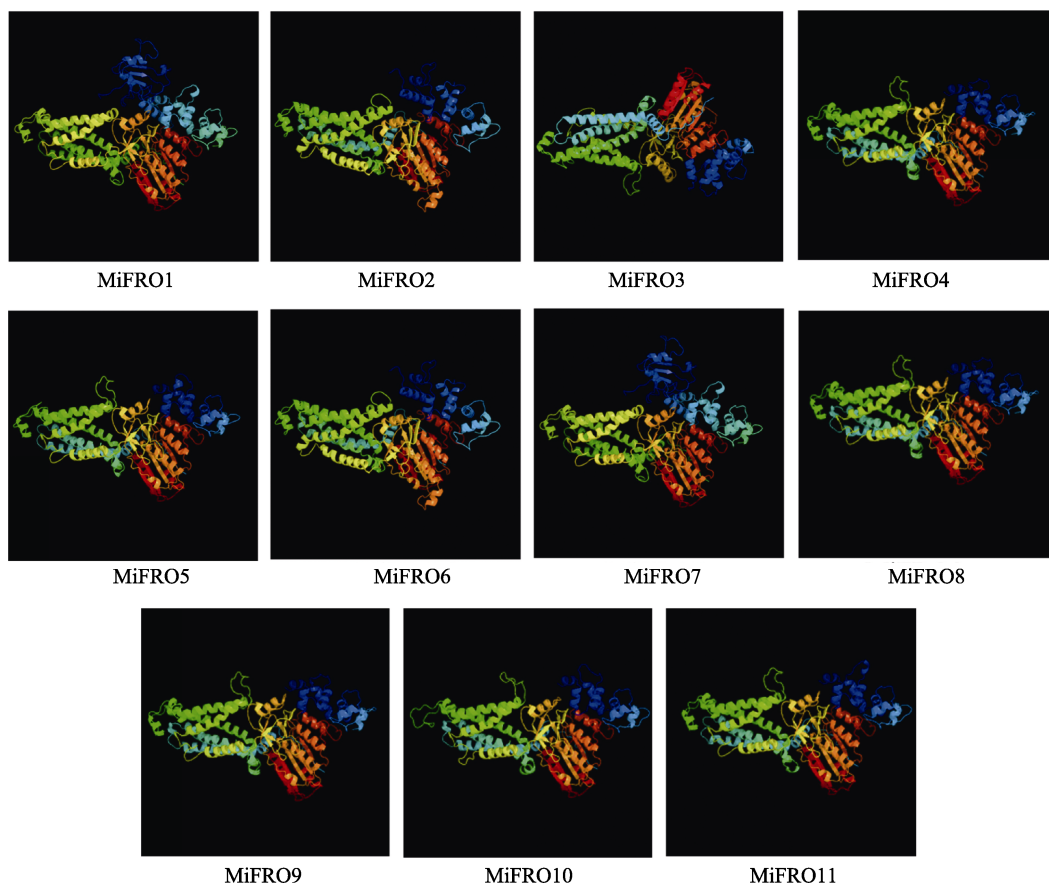


图 4 MiFRO 蛋白三级结构预测

Fig. 4 Tertiary structure prediction of MiFRO proteins

家族基因在 5 年生桂热 82 杧果的新生叶片、新生韧皮部、盛花期花朵、幼果、熟果和 1 年生嫁接苗的叶片、茎部和根部等多种组织中均有表达，且表达量差异显著（图 5）。MiFRO8 在所有检测组织中的整体表达水平最高，其次是 MiFRO11 和 MiFRO6，而 MiFRO1 和 MiFRO2 的整体表达水平相对最低。此外，4 个基因（MiFRO4、MiFRO5、MiFRO8 和 MiFRO11）在杧果不同检测组织中的

表达趋势相似，均在成年树体新生叶片和嫁接苗叶片中的表达量最高，远高于其他检测组织中的表达量，2 个基因（MiFRO6 和 MiFRO7）在成年树体新生韧皮部和嫁接苗茎部的表达量最高，2 个基因（MiFRO1 和 MiFRO10）在幼果的表达水平最高，2 个基因（MiFRO2 和 MiFRO9）在嫁接苗根部的表达量最高，而 MiFRO3 在盛花期花朵中的表达量最高。

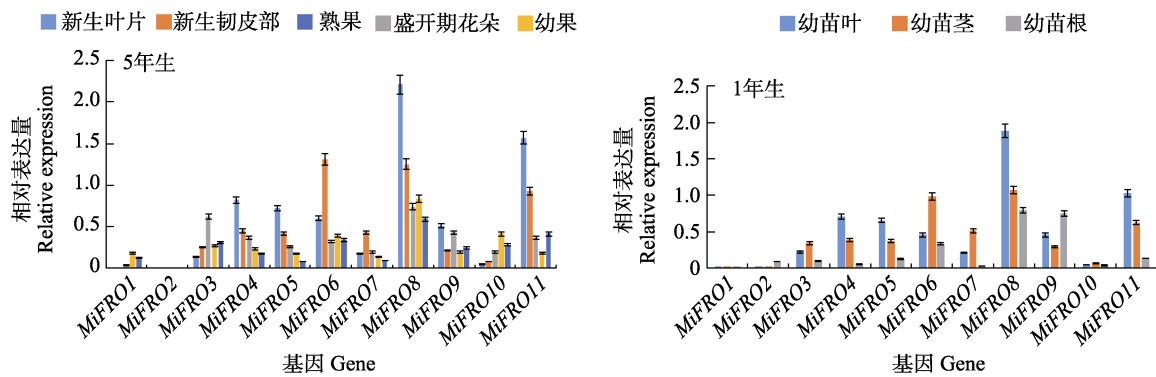


图 5 MiFRO 基因组织特异性表达分析

Fig. 5 Tissue specific expression analysis of MiFRO genes

2.5 幼苗 *MiFROs* 对不同非生物胁迫的差异响应

以 1 年生桂热 82 嫁接苗为材料, 通过实时荧光定量 PCR 分析 *MiFROs* 在杧果根部对缺铁、铁毒害、ABA、PEG 6000、NaCl、低温和热胁迫等非生物胁迫的响应特征。结果表明: *MiFRO* 家族基因对缺铁和 NaCl 胁迫最为敏感, 其中, 8 个基因 (*MiFRO1*、*MiFRO2*、*MiFRO3*、*MiFRO4*、*MiFRO5*、*MiFRO7*、*MiFRO8* 和 *MiFRO10*) 受缺铁胁迫的影响, 在根部的表达水平显著增加, 7 个基因在根部对 NaCl 胁迫有响应, 其中 5 个基因 (*MiFRO1*、*MiFRO2*、*MiFRO5*、*MiFRO7* 和 *MiFRO10*) 被显著诱导, 其表达水平增加, 2 个基因 (*MiFRO6* 和 *MiFRO11*) 被显著抑制, 其表达水平降低; 3 个基因 (*MiFRO3*、*MiFRO5* 和 *MiFRO8*) 受铁毒害抑制, 在根部的表达水平显著

降低; 3 个基因 (*MiFRO2*、*MiFRO5* 和 *MiFRO7*) 和 2 个基因 (*MiFRO1* 和 *MiFRO5*) 分别受 ABA 和 PEG 胁迫的诱导, 其表达水平显著增加; 此外, *MiFRO2*、*MiFRO6* 和 *MiFRO7* 在根部受低温 (4 °C) 胁迫抑制, 其表达水平降低, 然而, *MiFROs* 在根部对热胁迫 (45 °C) 无响应, 其表达水平均无显著变化。4 个基因 (*MiFRO1*、*MiFRO2*、*MiFRO5* 和 *MiFRO7*) 在根部至少对 3 种非生物胁迫有响应, 其中, 尽管 *MiFRO5* 在杧果中的整体表达水平相对较低, 但其对 5 种胁迫处理有响应, *MiFRO2* 和 *MiFRO7* 在杧果根部的表达量极低, 但对 4 种非生物胁迫有响应; *MiFRO9* 在嫁接苗根部的表达量相对较高, 且最为稳定, 对本研究所设置的 7 种非生物胁迫均无响应 (图 6)。

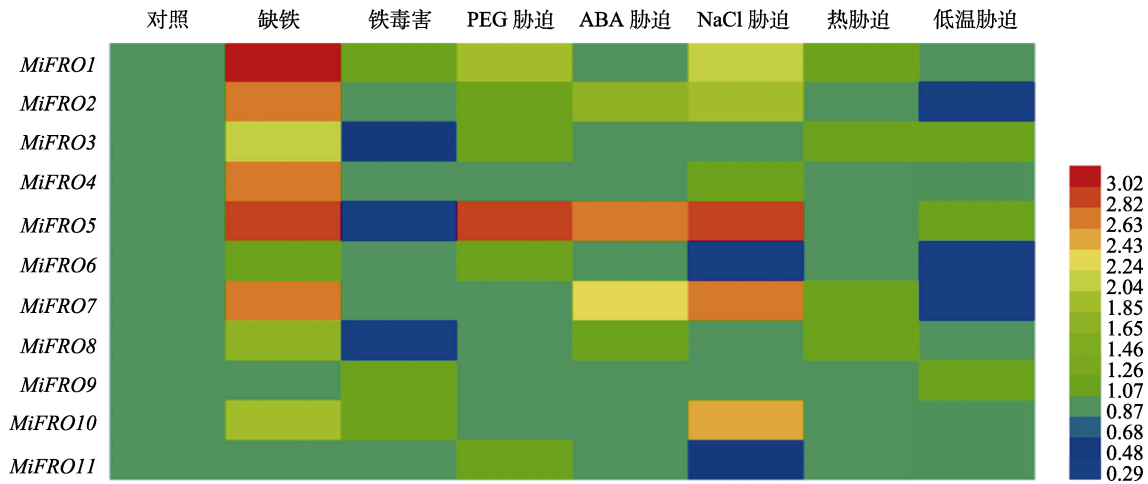


图 6 1 年生杧果嫁接苗根中 *MiFRO* 基因对非生物胁迫的响应差异
Fig. 6 Differential response of *MiFRO* genes under abiotic stresses in roots of 1-year-old grafted mango seedlings

3 讨论

铁元素与果实品质和产量密切相关^[1-4]。然而, 相关研究集中在生理生化层面, 有关果树铁素营养和高效利用的分子机制研究较少。杧果作为双子叶植物, 其根际对铁的吸收属于机制 I^[5-10], 然而, 杧果有关铁吸收与转运的分子机制依然未知。本研究从杧果中克隆并鉴定了 11 个 *MiFROs*, 数量远多于拟南芥 (8 个) 和葡萄 (6 个) 中同源基因的数量^[9, 20], 表明在不同植物之间的 FRO 同源家族基因的数目存在差异。此外, 不同科属植物的 FRO 同源蛋白在遗传进化关系上存在差异, 同属于禾本科或豆科的植物 FRO 同源蛋白倾向于紧密聚在一起, 然而, 相较于本研究所选的多种禾本科、豆科、茄科和十字花科植物, *MiFROs*

倾向于单独聚集在一起, 在系统发育树上与其他植物的同源蛋白距离较远, 表明木本果树铁还原酶可能具有与常见的一年生植物中同源蛋白的生物学功能有所差异。除了 *MiFRO1* 缺失 4 个特征 Motif 基序和 *MiFRO3* 具有独特的三级结构外, 其他 *MiFROs* 具有相同的 Motif 基序和相近的三级蛋白结构, 表明特征 Motif、蛋白三级结构和进化关系上相近的铁还原酶 (如 *MiFRO8*、*MiFRO9*、*MiFRO10* 和 *MiFRO11*) 可能具有相似的生物学功能, 但仍需进一步的分子生物学实验证实。

前人研究表明玉米 *ZmFRO2*^[24]、水稻 *OsFRO1* 和 *OsFRO7*^[11]、资阳香橙 *CjFRO1*^[15]、小金海棠 *MxFRO4* 和 *MxFRO6*^[16] 均在叶片中高量表达, 与之相一致的是, 本研究发现 *MiFRO4*、*MiFRO5*、

MiFRO8 和 *MiFRO11* 均在成年芒果树体新生叶片和嫁接苗叶片中高量表达,再次表明 *FRO* 基因可能在植物叶片中铁素的吸收与转运过程中发挥重要作用。此外,本研究发现 *MiFRO3* 在盛花期花朵中的表达量最高,表明该基因可能直接参与芒果花朵中铁素转运或利用过程,而 *MiFRO1* 和 *MiFRO10* 在芒果的幼果中高量表达(远高于其他检测的组织),表明这 2 个基因可能在芒果发育初期这一关键时期维持果实中的铁素动态与平衡,但需进一步的生物学功能验证。这些发现充分表明 *MiFROs* 具有典型的组织特异性表达特征,分别在不同组织/器官中各司其职、发挥铁还原酶的作用。

研究表明 *MiFROs* 在转录水平的表达易受缺铁处理的调控,8 个基因在嫁接苗根部受缺铁胁迫,其表达水平显著增加,推测 *MiFRO* 在缺铁胁迫下更倾向于被诱导激活,以便最大程度地发挥根中铁还原酶的生物学功能,进而调动和富集更多的铁元素,以便维持或保障芒果树体中依赖于铁的基本的生命活动的运作。因此,*FRO* 基因表达水平的增高可能是芒果响应环境缺铁的关键信号之一。此外,受铁毒害抑制,*MiFRO3*、*MiFRO5* 和 *MiFRO8* 基因在芒果根部的表达量显著降低,但受缺铁胁迫诱导而增加,表明这 3 个基因可能是芒果树体中具有活性的铁还原酶蛋白,其活性直接受外界铁素供应水平的调控,这些结果与拟南芥^[21]、玉米^[14]、资阳香橙^[15]和小金海棠^[16]中有关 *FRO* 基因响应铁素供应水平的报道相一致。NaCl 和 ABA 为典型的渗透胁迫物质,已有研究表明小金海棠 *MxFRO4* 和 *MxFRO6* 的表达易受 NaCl 胁迫的影响^[16],而水稻 *OsFRO1* 和 *OsFRO7* 在转录水平极易受 NaCl 和 PEG 的调控,且 *OsFRO7* 在转录水平易受 ABA 胁迫诱导,而 *OsFRO1* 在转录水平对 ABA 无响应^[11]。与之相类似的是,本研究发现 *MiFRO1*、*MiFRO2*、*MiFRO5*、*MiFRO7* 和 *MiFRO10* 受 NaCl 胁迫显著诱导而增加,而 *MiFRO6* 和 *MiFRO11* 受 NaCl 胁迫显著抑制而降低,与此同时,*MiFRO2*、*MiFRO5* 和 *MiFRO7* 在根部受 ABA 处理诱导而显著增高,再次表明 *MiFRO2*、*MiFRO5* 和 *MiFRO7* 这 3 个基因可能在芒果响应和调节渗透胁迫方面发挥关键作用,为进一步研究 *MiFRO* 的功能与调控机理奠定了理论基础。此外,*MiFRO1* 和 *MiFRO5* 在根部受 PEG 显著诱导而增加,初步表明了这 2 个基因倾向于

参与芒果对干旱胁迫的响应机制,但仍需进一步的生物学功能验证。

芒果是典型的热带果树作物,其在温带和寒冷地区的生长适应性很差,本研究发现芒果 *FRO* 在根部的表达均不受热处理(45℃)的影响,表明,芒果铁还原酶的活性不易受高温天气的影响,在 45℃ 极端环境条件下依然可以稳定的发挥功能,进而保障芒果树体中一些需铁的代谢途径或生命活动,在一定程度上解释了芒果之所以作为典型的热带果树作物在热带和亚热带地区广泛分布和栽培的事实。此外,*MiFRO2*、*MiFRO6* 和 *MiFRO7* 在根部的表达量受低温(4℃)抑制而降低,表明,在低温胁迫条件下芒果的生命活力下降,特别依赖于铁元素的代谢活动可能直接受到抑制,这几个 *MiFROs* 通过降低自身的活性进而适应或耐受低温胁迫对芒果生长的影响。值得注意的是,*MiFRO9* 在芒果树体中的整体表达水平较为适中,其在根部的表达量最高(远高于其他检测的组织),且不受本研究设定的 7 种非生物胁迫的调控,表明该铁还原酶蛋白可能持续稳定地发挥自身活性,进而有效地参与芒果树体中铁元素的吸收和转运过程。

参考文献

- [1] LILL R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins[J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 831-838.
- [2] BARTO L L, ABADIA J. Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms[M]. New York: Springer-Verlag, 2006: 85-101.
- [3] BALK J, PILON M. Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16: 218-226.
- [4] COUTURIER J, TOURAINE B, BRIAT J F, GAYMARD F, ROUHIER N. The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 259.
- [5] 张妮娜,上官周平,陈娟. 植物应答缺铁胁迫的分子生理机制及其调控[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(5): 1365-1377.
ZHANG N N, SHANGGUAN Z P, CHEN J. Molecular physiological mechanism and regulation of plant responses to iron deficiency stress[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2018, 24(5): 1365-1377. (in Chinese)
- [6] 李俊成,于慧,杨素欣,冯献忠. 植物对铁元素吸收的分子调控机制研究进展[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(6): 835-842.

- LI J C, YU H, YANG S X, FENG X Z. Research progress of molecular regulation of iron uptake in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2016, 52(6): 835-842. (in Chinese)
- [7] TAGLIAVINI M, ABADIA J, ROMBOLÀ A D, ABADÍA A, TSIPOURIDIS C, MARANGONI B. Agronomic means for the control of iron deficiency chlorosis in deciduous fruit trees[J]. Journal of Plant Nutrition, 2000, 23: 2007-2022.
- [8] TAGLIAVINI M, ROMBOLÀ A D. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems[J]. European Journal of Agronomy, 2001, 15: 72-92.
- [9] KOBAYASHI T, NISHIZAWA N K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63: 131-152.
- [10] ROMHELD V, MARSCHNER H. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses[J]. Plant Physiology, 1986, 80(1): 175-180.
- [11] MUHAMMAD I, JIN X Q, SHALMANI A, ALI M, YI S, GAN P F, LI W Q, LIU W T, CHEN K M. Comparative in silico analysis of ferric reduction oxidase (FRO) genes expression patterns in response to abiotic stresses, metal and hormone applications[J]. Molecules, 2018, 23: 1163
- [12] ROBINSON N J, PROCTER C M, CONNOLLY E L, GUERINOT M L. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils[J]. Nature, 1999, 397: 694-697.
- [13] WU H. Molecular and biochemical characterization of the Fe (III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and Cell Physiology, 2005, 46(9): 1505-1514.
- [14] 李利敏, 吴良欢, 马国瑞. 植物吸收铁机理及其相关基因研究进展[J]. 土壤通报, 2010, 41(4): 994-999.
- LI L M, WU L H, MA G R. The progress on iron-absorbing mechanism and related gene in plant[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2010, 41(4): 994-999. (in Chinese)
- [15] 姚利晓, 陈善春, 何永睿. 资阳香橙铁螯合还原酶基因家族的克隆和分析[C]//中国园艺学会, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所. 中国园艺学会 2014 年学术年会论文摘要集. 2014.
- YAO X L, CHEN S C, HE Y R. Cloning and analysis of ferric reduction oxidase family genes in Ziyang xiangcheng[C]//Chinese Society for Horticultural Science, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Summary collection of papers from the 2014 academic annual conference of the Chinese Society for Horticultural Science, 2014. (in Chinese)
- [16] 周正一. 苹果属小金海棠铁还原酶基因 *Mx*FRO4、*Mx*FRO6 的克隆与功能分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2021.
- ZHOU Z Y. Isolation and functional analysis of ferric reductase gene *Mx*FRO4 and *Mx*FRO6 in *Malus xiaojinensis*[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [17] WANG P, LUO Y, HUANG J F, GAO S H, ZHU G P, DANG Z G, GAI J T, YANG M, ZHU M, ZHANG H K, YE X X, GAO A P, TAN X Y, WANG S, WU S Y, CAHOON E B, BAI B B, ZHAO Z C, LI Q, WEI J Y, CHEN H R, LUO R X, GONG D Y, TANG K X, ZHANG B, NI Z G, HUANG G D, HU S N, CHEN Y Y. The genome evolution and domestication of tropical fruit mango[J]. Genome Biology, 2020, 21: 60.
- [18] 李又欢, 鲍中齐, 高爱平, 黄建峰, 王力敏, 张洪霞, 宋志忠. 芒果 NFU 家族基因的克隆、鉴定及其对非生物胁迫的响应分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(7): 1313-1321.
- LI Y H, BAO Z Q, GAO A P, HUANG J F, WANG L M, ZHANG H X, SONG Z Z. Cloning and identification of NFU family genes in mango and responsive analysis to abiotic stresses[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(7): 1313-1321. (in Chinese)
- [19] 张璐, 宗亚奇, 徐维华, 韩蕾, 孙演育, 陈朝晖, 陈松利, 张凯, 程杰山, 唐美玲, 张洪霞, 宋志忠. 葡萄 Fe-S 簇装配基因的鉴定、克隆和表达特征分析[J]. 中国农业科学, 2021, 54(23): 5068-5082.
- ZHANG L, ZONG Y Q, XU W H, HAN L, SUN Z Y, CHEN Z H, CHEN S L, ZHANG K, CHENG J S, TANG M L, ZHANG H X, SONG Z Z. Identification, cloning, and expression characteristics analysis of Fe-S cluster assembly genes in grape[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(23): 5068-5082. (in Chinese)
- [20] SONG Z Z, YANG Y, XU J L, MA R J, YU M L. Physiological and transcriptional responses in the iron-sulphur cluster assembly pathway under abiotic stress in peach (*Prunus persica* L.) seedlings[J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2014, 117(3): 419-430.
- [21] GAO Y C, YU C Y, ZHANG K, ZHANG H X, ZHANG S Y, SONG Z Z. Identification and characterization of the strawberry KT/HAK/KUP transporter gene family in response to K⁺ deficiency[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2021, 43: 1.
- [22] ZHANG Y, SHI X M, LIN S Z, WANG J P, TANG M L, HUANG J F, GAO A P, ZHANG H X, SONG Z Z. Heterologous expression of the *MiHAK14* homologue from *Mangifera indica* enhances plant tolerance to K⁺ deficiency and salinity stress in *Arabidopsis*[J]. Plant Growth Regulation, 2022, 98: 39-49.
- [23] 韩蕾, 李俊林, 高爱平, 黄建峰, 李建召, 宋志忠. 芒果钾通道基因 *MiSPIK* 的克隆、表达与功能分析[J]. 生物技术通报, 2022, 38(10): 164-172.
- HAN L, LI J L, GAO A P, HUANG J F, LI J Z, SONG Z Z. Cloning, expression and functional analysis of potassium channel gene *MiSPIK* in *Mangifera indica*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(10): 164-172. (in Chinese)
- [24] 乔孟欣, 李素贞, 陈景堂. 玉米铁还原酶基因 *Zm*FRO2 的功能分析[J]. 生物技术通报, 2020, 36(11): 9-20.
- QIAO M X, LI S Z, CHEN J T. Functional analysis of ferric reductase gene *Zm*FRO2 in maize[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(11): 9-20. (in Chinese)