

澳洲坚果锌指蛋白基因 *MiZFP11* 响应干旱和高温胁迫的功能分析

杨祥燕¹, 蔡元保^{1*}, 曾黎明¹, 杨为海^{2*}, 林玉虹¹, 巫辅民¹, 赵 渊¹, 胡 玲¹

1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所/广西亚热带特色水果质量安全控制重点实验室, 广西南宁 530001; 2. 宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西宜春 336000

摘 要: CCCH 型锌指蛋白在植物生长发育及响应逆境胁迫中发挥重要的调控作用。本研究以澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种为试验材料, 采用 RT-PCR 技术获得澳洲坚果锌指蛋白基因 *MiZFP11*, 分析其编码蛋白的结构特征和亚细胞定位, 并利用实时荧光定量 PCR 技术分析其在不同组织中以及干旱、高温胁迫下的表达水平。RT-PCR 克隆结果表明, 克隆获得的澳洲坚果锌指蛋白基因 *MiZFP11* (GenBank 注册号为 MT332641), 与 CCCH 型锌指蛋白基因较高同源。生物信息学分析表明, 澳洲坚果 *MiZFP11* 蛋白相对保守的 C 端含有 LCCL 结构域, 属于 C3H13 亚类锌指蛋白。蛋白基本性质分析表明, *MiZFP11* 蛋白是不稳定的亲水蛋白和非分泌非跨膜蛋白, 且以丝氨酸磷酸化修饰为主。蛋白高级结构分析表明, *MiZFP11* 蛋白的二级和三级结构主要由无规则卷曲、 α -螺旋和延伸链交错组成。烟草叶片的瞬时表达和共聚焦显微分析显示, *MiZFP11* 蛋白定位于细胞核, 与亚细胞定位预测结果一致。实时荧光定量 PCR 分析表明, 澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种的 *MiZFP11* 基因在叶片中的表达量最高, 在根、小花和小果中也有较高的表达量, 在茎中的表达量则最低。干旱胁迫 1~36 h, 叶片中的 *MiZFP11* 基因在 JW 品种中表现出“升-降-升-降”的表达模式, 在桂热 1 号品种中表现出“升-降”的表达模式, 2 个品种整体上均受诱导上调表达。高温胁迫 1~36 h, 叶片中的 *MiZFP11* 基因在 JW 和桂热 1 号品种中均表现出“升-降”的上调表达模式, 且 JW 品种的表达量明显高于桂热 1 号品种。因此, *MiZFP11* 基因在不同组织中均有显著差异表达, 且受干旱和高温胁迫诱导后显著上调表达, 推测 *MiZFP11* 基因在澳洲坚果组织生长发育, 尤其在响应干旱和高温胁迫中起重要作用。

关键词: 澳洲坚果; CCCH 型锌指蛋白; 干旱胁迫; 高温胁迫; 功能分析

中图分类号: 664.9

文献标志码: A

Functional Analysis of Zinc Finger Protein Gene *MiZFP11* from Macadamia in Response to Drought and High Temperature Stresses

YANG Xiangyan¹, CAI Yuanbao^{1*}, ZENG Liming¹, YANG Weihai^{2*}, LIN Yuhong¹, WU Fumin¹, ZHAO Yuan¹, HU Ling¹

1. Guangxi Key Laboratory of Quality and Safety Control for Subtropical Fruits / Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, China

Abstract: CCCH-type zinc finger protein plays an important regulatory role in plant growth, development, and response to stress. In this study, a zinc finger protein gene *MiZFP11* was isolated from macadamia (*Macadamia integrifolia*) variety JW and Guire No.1 by RT-PCR, and the structural characteristics and subcellular localization of its encoded protein was analyzed. Expression levels of *MiZFP11* in drought and high temperature treatments and the tissues of macadamia

收稿日期 2024-10-03; 接受日期 2024-10-29

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32060652); 广西科技计划项目 (桂农科 AB241484005); 广西农业科学院基本科研业务专项 (桂农科 2021YT154)。

作者简介 杨祥燕 (1984—), 女, 硕士, 高级农艺师, 研究方向: 果树生理与分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 蔡元保 (CAI Yuanbao), E-mail: caiyuanbao205@163.com; 杨为海 (YANG Weihai), E-mail: seayang2004@126.com。

were investigated by quantitative real-time PCR. RT-PCR cloning showed that a new gene *MiZFP11* from macadamia was highly homologous to CCCH zinc finger protein genes, with GenBank registration number MT332641. Bioinformatics analysis indicated that *MiZFP11* belonged to C3H13 subclass zinc finger protein with an LCCL domain at relatively conservative C-terminus. Analysis of protein basic properties indicated that *MiZFP11* was an unstable hydrophilic protein without signal peptide and transmembrane segment, which was mainly phosphorylated with serine. Protein structure analysis showed that the secondary and tertiary structures of *MiZFP11* were mainly composed of random coil, α -helix and extended strand. Transient expression of tobacco leaves and the confocal microscopy detection indicated that *MiZFP11* was localized in the nucleus, which was consistent with the subcellular localization predicted results. qRT-PCR analysis showed that expression of *MiZFP11* gene was highest in leaves of macadamia variety JW and Guire No.1, next was in roots, small flowers and small fruits, with the lowest in stems. Under drought stress for 1–36 hours, expression level of *MiZFP11* gene in leaves increased with an “up-down-up-down” pattern in JW and an “up-down” pattern in Guire No.1. Under high temperature stress for 1–36 hours, expression level of *MiZFP11* in leaves increased with “up-down” patterns in JW and Guire No.1, and expression level in JW was significantly higher than that of Guire No.1. Therefore, *MiZFP11* was significantly expressed in different tissues of macadamia, and was significantly up-regulated under drought and high temperature stresses, which speculated that *MiZFP11* gene plays an important role in the growth and development of macadamia tissues and the response to drought and high temperature stresses.

Keywords: macadamia; CCCH zinc finger protein; drought stress; high temperature stress; functional analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.03.002

澳洲坚果 (*Macadamia integrifolia*) 是山龙眼科 (Proteaceae) 澳洲坚果属 (*Macadamia*) 名优果树, 原产于澳洲亚热带雨林地区, 享有“坚果之王”的美誉, 中国的澳洲坚果种植面积居于全世界首位。由于全球干旱、高温天气频繁及国内主产区多为山地种植, 水分和温度成为影响澳洲坚果生长发育及稳产、增产的关键因子^[1]。锌指蛋白 (zinc finger protein, ZFP) 是一类含有以锌指结构域为特征的转录因子, 在植物生长发育、逆境胁迫应答等方面起着重要的调控作用^[2]。因此, 挖掘澳洲坚果锌指蛋白基因及功能验证, 为了解澳洲坚果的生长发育及干旱、高温胁迫应答的分子基础提供重要的科学理论依据。

锌指蛋白是植物基因组中最为丰富的转录因子家族之一, 通过保守残基半胱氨酸 (Cys) 和组氨酸 (His) 与 Zn^{2+} 相结合, 形成稳定的手指结构域, 在细胞生长与分化、基因表达调控、蛋白-蛋白互作等生命活动过程中起重要的作用^[3]。依据手指结构域的半胱氨酸和组氨酸的数目与位置, 可将锌指蛋白分成 C2H2、C2C2、C2HC、C3H (即 CCCH)、C3HC4、C4HC3 等多个类型。其中, C2H2 型的成员在细胞内的数目最多, 在植物中的相关研究也最多, 其相关功能也最为清楚, 而 CCCH 型的成员数目最少, 在植物中的相关研究相对较少^[4]。CCCH 型锌指蛋白广泛存在于动植物和微生物中。目前, 在植物中, 虽然已经主要从模式植物全基因组中鉴定出 CCCH 型锌指蛋

白成员, 如从拟南芥和水稻中分别鉴定出 68 个和 67 个成员^[5], 从毛果杨鉴定出 91 个成员^[6], 从番茄鉴定出 80 个成员^[7], 从马铃薯鉴定出 50 个成员^[8]。但是只有少数 CCCH 型锌指蛋白在植物研究中获得功能验证。综合已有的 CCCH 型锌指蛋白基因的功能研究表明, CCCH 型锌指蛋白基因在植物生长发育、种子萌发、叶片衰老、诱导开花等生育过程^[9-11], 同时在响应盐、干旱和高温胁迫及病原菌感染等生物或非生物胁迫中起着重要的调控作用^[2, 12-14]。

CCCH 型锌指蛋白基因在植物生长发育及响应逆境胁迫中发挥着重要的调控功能, 但澳洲坚果 CCCH 型锌指蛋白基因的功能研究在国内外还尚未报道。本研究以澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种为试验材料, 克隆获得 CCCH 型锌指蛋白基因 *MiZFP11*, 分析其编码蛋白的结构特征和亚细胞定位, 并利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *MiZFP11* 基因在不同组织器官中以及其在干旱、高温胁迫下的表达水平, 为深入研究 CCCH 型锌指蛋白基因在澳洲坚果生长发育和耐旱、耐热下的分子机理提供科学依据, 并为澳洲坚果耐旱、耐热品种的遗传选育提供优异基因和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究采用的材料为澳洲坚果 (*Macadamia integrifolia*) JW 和桂热 1 号品种, 由广西亚热带

作物研究所提供与鉴定。JW 和桂热 1 号品种属于国内澳洲坚果主要栽培品种, JW 品种具有适应性强、耐高温极强、抗旱性较好等特性; 桂热 1 号品种具有对高温敏感、抗旱性较差等特性。植物 RNA 提取试剂盒、DNA 消化酶、荧光定量 PCR 试剂、反转录试剂盒、DNA 回收试剂盒、pMD20-T 载体等生化试剂和试剂盒购于 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理、RNA 提取与 cDNA 合成 组织表达分析样品: 以树龄 5~6 a 的澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种嫁接苗为取样试材, 分别收集苗期的根、茎、叶和刚开放的小花、谢花后 30~45 d 的小果。干旱和高温胁迫表达分析样品: 将接穗苗龄 6 m 的澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种嫁接苗, 用 20% 浓度的 PEG 6000 干旱处理和 42 °C 高温处理, 分别收集处理后 1、3、6、12、24、36 h 的叶片样品, 以 0 h 为试验对照 (CK), 每个试验重复 3 次。采用蔡元保等^[15]的 CTAB 改良法提取与纯化样品的总 RNA, 并通过反转录试剂盒合成所有样品的 cDNA。

1.2.2 目的基因克隆 在本课题组澳洲坚果耐旱和耐高温转录组测序的基础上, 根据基因表达差异的显著性, 筛选获得 *MiZFP11* 基因。通过同源序列比对, 在该基因的编码区外设计引物 ZFP11-F 和 ZFP11-R (表 1), 并由北京擎科生物科技公司合成引物。以澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种叶片的 cDNA 为模板, 扩增包括编码区在内的 *MiZFP11* 基因全长序列。利用 DNA 回收试剂盒回收目的片段, 连接到 pMD20-T 载体上, 并送至北京擎科生物科技公司进行测序。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequences (5'-3')	退火温度 Tm/°C	用途 Purpose
ZFP11-F	AGCGAAAGGTCAGGT AAGGTGTA	57.2	编码区克隆
ZFP11-R	AAGAGGGCAATCGAA AATAGAGA		
QZFP11-F	GTTGTGCGAGTGGCG TGAGAGTA	61.5	荧光定量检测
QZFP11-R	CCCAGTTCAAAGGGC TGGTGATA		
QMDH-F	GCTGGTCTCATCTATT CTTTCC	58.0	内参基因
QMDH-R	CGTCCAACCTTCTTCCT TGAG		

1.2.3 生物信息学分析 基于 NCBI 数据库和 SMART 在线软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析 *MiZFP11* 蛋白的保守结构域。通过 NCBI 数据库进行蛋白同源序列比对, 并使用 DNAMAN 9.0 软件进行蛋白序列的多重比对, 构建同源蛋白的系统进化树 (自举值为 1000)。利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 在线软件分别分析 *MiZFP11* 蛋白的理化性质和磷酸化位点。使用 PSORT (<http://www.psort.org>)、SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 在线软件分别预测 *MiZFP11* 蛋白的亚细胞定位、信号肽和跨膜结构。采用 SOPMA (<http://www.expasy.org>) 和 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件分别进行 *MiZFP11* 蛋白的二级结构分析和三级结构的同源建模^[16]。

1.2.4 亚细胞定位分析 将澳洲坚果 *MiZFP11* 基因的 CDS 插入绿色荧光蛋白载体 pBWA(V)HS-GFP (武汉伯远生物科技有限公司), 构建含目的基因的融合表达载体 pBWA(V)HS-*MiZFP11*-GFP。将空载体 (对照) 和融合表达载体通过电转化法转入农杆菌 (GV3101) 感受态细胞。将 OD₆₀₀ 约为 0.6 的农杆菌侵染液注射到烟草叶片下表皮内, 弱光培养 48 h 后取样, 采用激光共聚焦荧光显微镜检测叶片中荧光信号的分布情况。

1.2.5 组织和胁迫表达分析 以苹果酸脱氢酶基因 *MDH* 作为内参基因^[17-18], 设计 *MiZFP11* 基因和内参基因的荧光定量 PCR 引物 (表 1)。以澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种 cDNA 为模板, 利用荧光定量 PCR 分析 *MiZFP11* 基因在不同组织的表达水平, 以及在干旱和高温胁迫下叶片中的表达水平。实时荧光定量 PCR 的反应体系 (20 μL): 10 μL 2×SYBR Green qPCR Master Mix、1 μL cDNA 模板、上/下引物各 1.0 μL, ddH₂O 补足。反应程序: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 10 s, 58.0 °C 或 61.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环。所有 RT-qPCR 实验技术重复和样品重复均为 3 次。

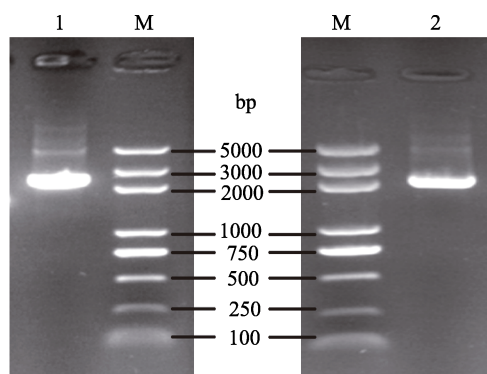
1.3 数据处理

应用 2^{-ΔΔCt} 法分析 *MiZFP11* 基因的相对表达量^[19], 并使用 SPSS 18.0 软件分析表达量的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 *MiZFP11* 基因克隆

用澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种的叶片 cDNA 作为 PCR 模板, 用全长引物克隆 *MiZFP11* 基因的编码区。结果表明(图 1), 2 个品种的 *MiZFP11* 基因序列一致, cDNA 全长 2817 bp, 开放阅读框 ORF 为 2436 bp, 编码 811 个氨基酸。序列比对显示, *MiZFP11* 基因与植物锌指蛋白(ZFP)家族基因的核苷酸序列都有 73% 以上的相似性。因此, 将该基因命名为 *MiZFP11*, GenBank 登录号为 MT332641。



M: DL5000 DNA marker; 1: JW 品种的 *MiZFP11* 扩增结果;
2: 桂热 1 号品种的 *MiZFP11* 扩增结果。
M: DL5000 DNA marker; 1: Amplification result of *MiZFP11*
in variety JW; 2: Amplification result of *MiZFP11*
in variety Gui Re No.1.

图 1 澳洲坚果 *MiZFP11* 基因克隆

Fig. 1 Coding amplification of *MiZFP11* in macadamia

2.2 *MiZFP11* 蛋白的同源性比对

筛选出 NCBI 数据库同源性高的锌指蛋白与 *MiZFP11* 蛋白进行多序列同源比对。结果显示(图 2), *MiZFP11* 蛋白与其他植物已知的 CCCH 型锌指蛋白具有极高的同源性, 尤其是该家族的 C3H13 亚类蛋白, 如与莲(*Nelumbo nucifera*) NnC3H13 (XP_010272511.1) 达到 76.85%, 与华盖木(*Magnolia sinica*) MsC3H13 (XP_058110946.1) 达到 73.71%, 与胡杨(*Populus euphratica*) PeC3H13 (XP_011010612.1) 达到 68.10%, 与决明(*Senna tora*) StC3H13 (KAF7820600.1) 达到 65.95%。而且, 这些 CCCH 型锌指蛋白都含有钾依赖钠钙交换体的特征序列和 LCCL 结构域, 尤其是蛋白 C 端的氨基酸序列相对保守。

2.3 澳洲坚果 *MiZFP11* 蛋白的系统进化分析

为了明确不同植物间 CCCH 型锌指蛋白的系统进化关系, 选择 26 个物种的代表性 CCCH 型

C3H13 亚类锌指蛋白构建系统进化树。结果显示(图 3), *MiZFP11* 蛋白与 CCCH 型锌指蛋白的 C3H13 亚类成员具有高度的同源性, 所有 C3H13 亚类成员被明显分成 2 个组(I 和 II), 其中 I 组又分成 3 个亚组(I-1、I-2 和 I-3), II 组又分成 2 个亚组(II-1 和 II-2), *MiZFP11* 蛋白被分在 II-2 亚组, 与莲 NnC3H13 (XP_010272511.1) 和华盖木 MsC3H13 (XP_058110946.1) 的同源性最高, 处于同一亚组, 推测具有类似的结构和功能。

2.4 澳洲坚果 *MiZFP11* 蛋白的基本性质分析

MiZFP11 蛋白的基本理化特性分析结果表明, *MiZFP11* 蛋白的分子式为 $C_{4005}H_{6390}N_{1240}O_{1306}S_{28}$, 分子量为 93.706 kDa, 总原子数是 12 969, 蛋白等电点为 6.63, 带负电荷的残基数(Asp+Glu)为 150 个, 带正电荷的残基数(Arg+Lys)为 145 个, 不稳定系数为 49.07 (>40, 为不稳定蛋白), 平均亲水性系数为 -1.235 (负数, 为亲水蛋白), 因此推测 *MiZFP11* 蛋白是不稳定的亲水蛋白。

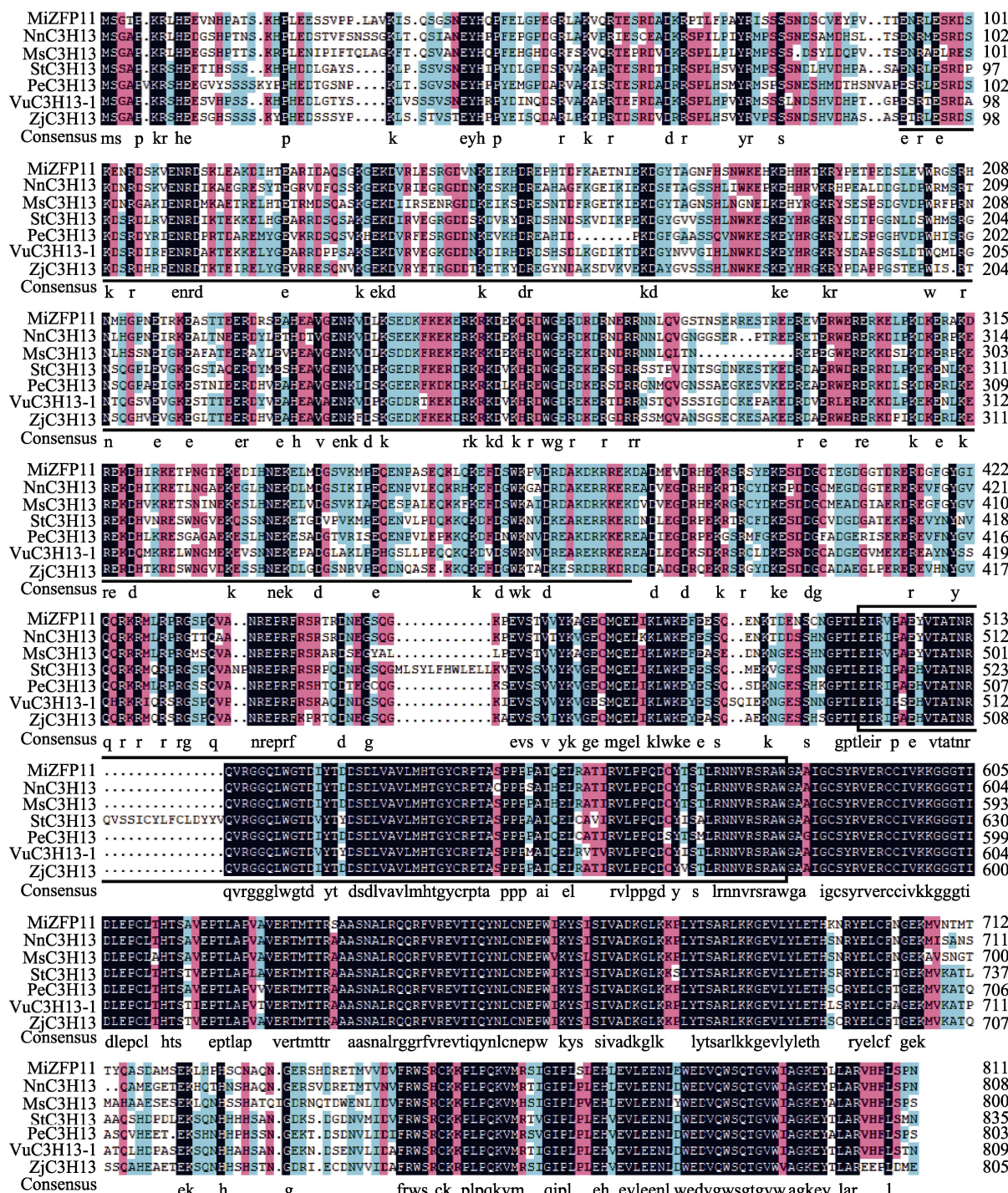
采用 NetPhos 3.1 软件分析 *MiZFP11* 蛋白的磷酸化位点显示, 该蛋白含有 50 个丝氨酸 Ser、36 个苏氨酸 Thr 和 11 个酪氨酸 Tyr, 说明 *MiZFP11* 蛋白发挥调控功能可能以丝氨酸磷酸化修饰为主。SignalP-5.0 和 TMHMM 2.0 软件分析显示, *MiZFP11* 蛋白不存在信号肽和跨膜结构, 为非分泌非跨膜蛋白。

2.5 澳洲坚果 *MiZFP11* 蛋白的高级结构分析

利用 SOPMA 在线软件分析 *MiZFP11* 蛋白二级结构的结果显示(图 4), *MiZFP11* 蛋白的二级结构由 58.20% 的无规则卷曲(主要集中在蛋白的 N 端)、26.76% 的 α -螺旋、10.97% 的延伸链和 4.07% 的 β -转角组成。以蛋白质数据库中巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*) CCCH 型锌指蛋白(A0A6A6K2X0.1.A)为模板, 通过 SWISS-MODEL 网站预测 *MiZFP11* 蛋白的三维立体结构。三级结构的同源建模分析显示(图 5), *MiZFP11* 蛋白与模板蛋白质具有 70.47% 的高度序列相似性, GMQE 值为 0.51, 该蛋白主要由无规则卷曲、 α -螺旋和延伸链交错组成。可见, *MiZFP11* 蛋白三级结构预测与二级结构的分析结果基本一致。

2.6 *MiZFP11* 蛋白的亚细胞定位分析

通过 PSORT 软件的预测分析表明, 澳洲坚果 *MiZFP11* 蛋白定位在细胞核高达 82.6% 中的概率。为进一步验证亚细胞定位的预测结果, 将空载体



下划线表示钾依赖钠钙交换体的特征序列, 方框表示 LCCL 结构域。

The underline indicates K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger, box indicates LCCL domain.

图 2 不同植物 CCCH 型锌指蛋白的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequences alignment of CCCH zinc finger proteins in different plants

pBWA(V)HS-GFP 和融合表达载体 pBWA(V)HS-MiZFP11-GFP, 分别转入农杆菌 GV3101 后注射到烟草叶片下表皮进行瞬时表达分析。激光共聚焦荧光显微镜检测结果显示 (图 6), 注射空载体的烟草整个表皮细胞均分布很强的绿色荧光信号, 而

注射融合表达载体的烟草仅在细胞核中显示绿色荧光信号, 表明澳洲坚果 MiZFP11 蛋白定位在细胞核, 与预测结果一致, 具有核蛋白的功能作用。

2.7 MiZFP11 基因的组织表达分析

采用实时荧光定量 PCR, 分析澳洲坚果

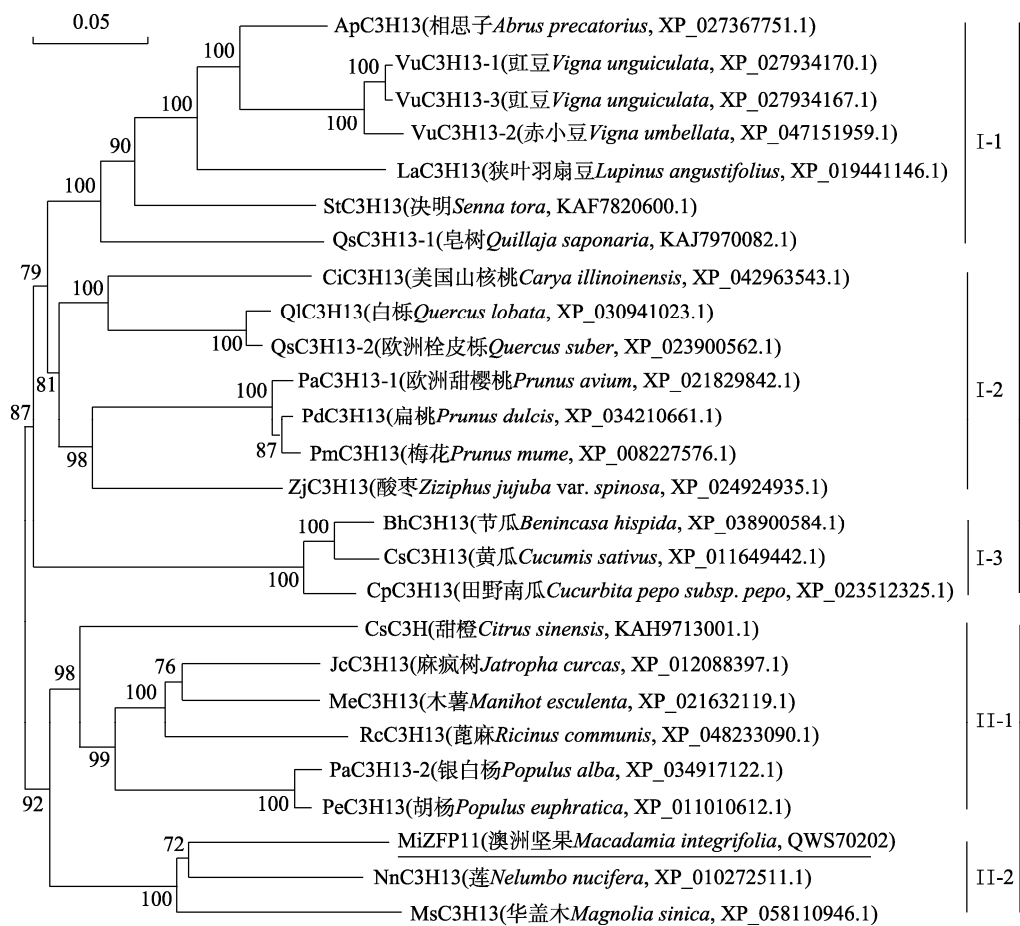


图 3 不同植物 C3H13 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of C3H13 proteins in different plant species

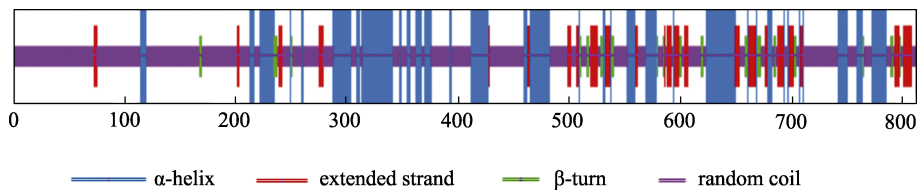


图 4 *MiZFP11* 蛋白的二级结构预测

Fig. 4 Secondary structure analysis of *MiZFP11* protein

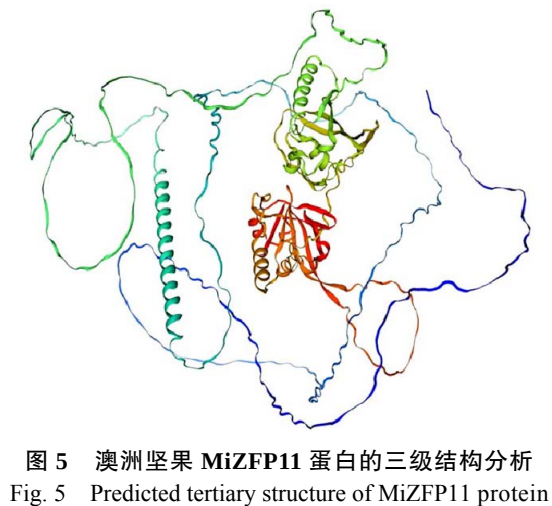


图 5 澳洲坚果 *MiZFP11* 蛋白的三级结构分析

Fig. 5 Predicted tertiary structure of *MiZFP11* protein

MiZFP11 基因在 JW 和桂热 1 号品种不同器官组织中的表达水平。结果显示（图 7），在澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种中，*MiZFP11* 基因在根、茎、叶、小花、小果等器官组织中均有不同程度的表达，其表达量差异显著，其中叶片中的表达量最高，显著高于其他组织，在根、小花和小果中也有较高的表达，在茎中的表达量则最低。

2.8 *MiZFP11* 基因在干旱胁迫下的表达分析

采用实时荧光定量 PCR 分析 *MiZFP11* 基因在干旱胁迫下的表达水平。结果显示（图 8），*MiZFP11* 基因在 JW 品种中受干旱胁迫 1、3 h 后，在叶片中的表达量显著上升，之后有所下降，在

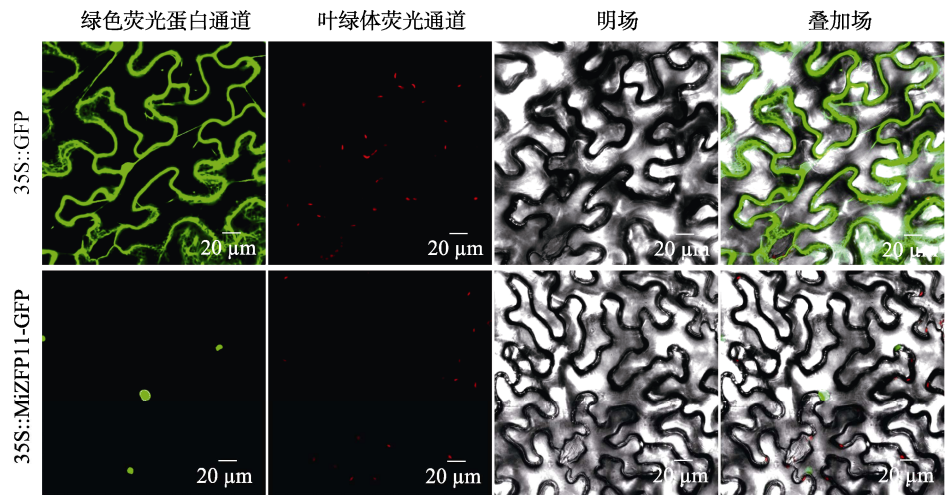
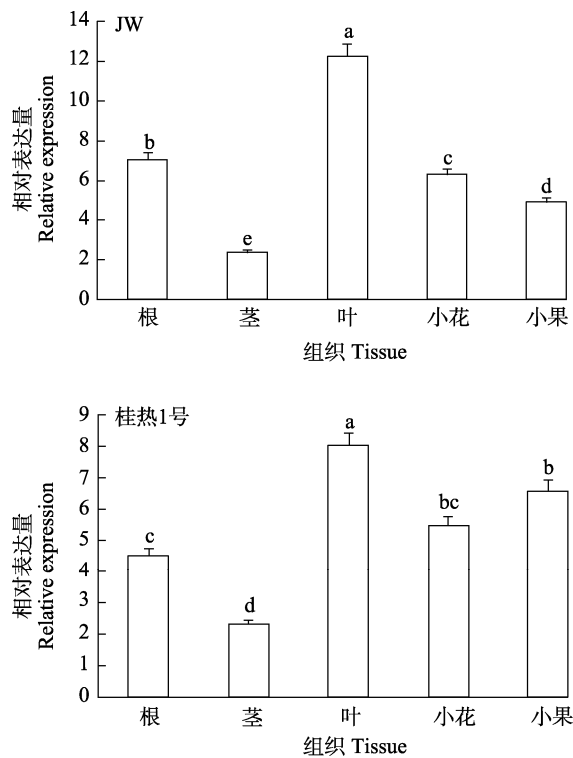


图 6 MiZFP11 蛋白的亚细胞定位分析

Fig. 6 Subcellular localization of MiZFP11 protein



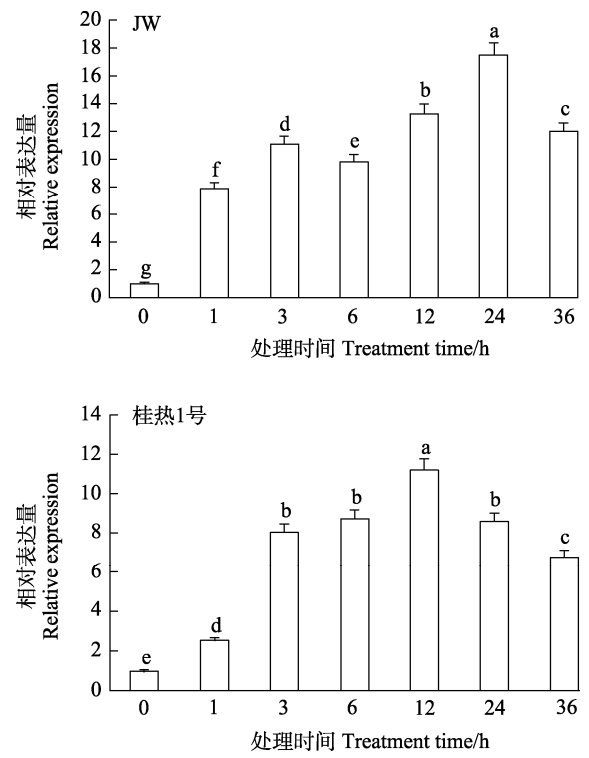
不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$)。

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

图 7 MiZFP11 基因在澳洲坚果不同品种组织中的表达分析

Fig. 7 Expression of MiZFP11 in different tissues of macadamia varieties

24 h 又达到最高峰,表现出“升-降-升-降”的上调表达模式;在桂热 1 号品种中受干旱胁迫后,该基因在叶片中的表达水平显著上升,在 12 h 达到最高峰,之后有所下降,表现出“升-降”的上调表达模式。



不同小写字母代表差异显著 ($P<0.05$)。

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

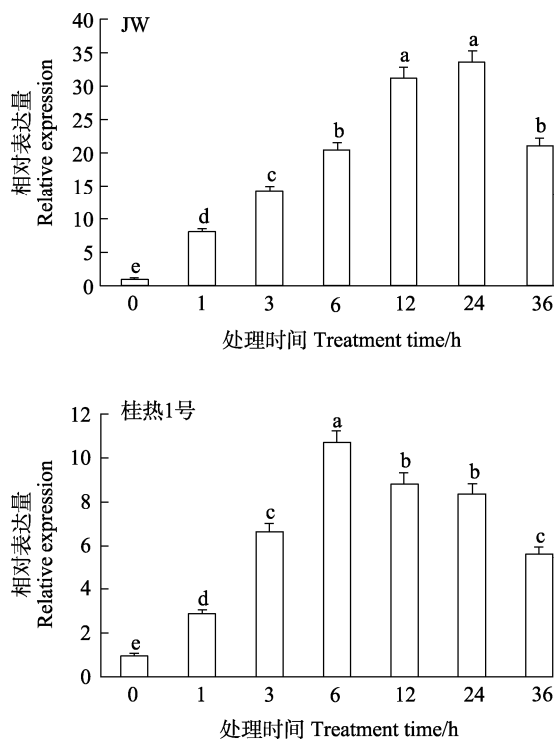
图 8 澳洲坚果不同品种叶片 MiZFP11 基因在干旱胁迫下的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of MiZFP11 in leaves of macadamia varieties under drought stress

2.9 MiZFP11 基因在高温胁迫下的表达分析

采用实时荧光定量 PCR 分析澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种的 MiZFP11 基因在高温胁迫下的表达水平。结果显示 (图 9), MiZFP11 基因受高温胁迫诱导后的表达水平显著上升, JW 和桂热 1

号品种分别在 24 h 和 6 h 达到最高峰，之后表达量有所下降，且 JW 品种在各处理时间点的表达量明显高于桂热 1 号品种，2 个品种的表达情况均表现出“升-降”的上调表达模式。



不同小写字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。

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

图9 澳洲坚果不同品种叶片 *MiZFP11* 基因在高温胁迫下的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of *MiZFP11* in leaves of macadamia varieties under high temperature stress

3 讨论

CCCH 型锌指蛋白是一种真核生物中普遍存在的带有锌指结构域的转录调节因子，其中植物 CCCH 型锌指蛋白已被证实是一类具有识别、结合 RNA 的蛋白^[20-21]。目前，随着全基因组测序技术的日益完善，植物 CCCH 型锌指蛋白基因家族在拟南芥、水稻、番茄、马铃薯、毛果杨等物种中被鉴定出来^[2-3]。但是，植物 CCCH 型锌指蛋白功能的相关研究报道并不多，只有少部分的该家族成员获得功能验证。本研究获得澳洲坚果 CCCH 型锌指蛋白基因 *MiZFP11*，并与该家族的 C3H13 亚类成员具有高度的蛋白同源性，可见，获得的澳洲坚果 *MiZFP11* 基因是植物 CCCH 型 C3H13 亚类锌指蛋白的新成员。而且，26 个代表

性 C3H13 亚类锌指蛋白可明显被聚类成 2 个系统进化分支，推测澳洲坚果 *MiZFP11* 蛋白与其同一分支的高度同源蛋白具有类似的结构和功能。

蛋白质磷酸化研究对于了解蛋白结构功能具有重要的指导意义^[22-23]。*MiZFP11* 蛋白主要是丝氨酸磷酸化修饰，说明 *MiZFP11* 蛋白发挥调控功能中丝氨酸磷酸化起着重要的作用。CCCH 型锌指蛋白普遍分布在植物细胞中的不同位置，其亚细胞定位也具有多样性，但主要定位于细胞核，如水稻 OsDOS 蛋白定位于细胞核^[9]，拟南芥 KHZ1 和 KHZ2 蛋白也定位于细胞核^[24]，侧金盏花 AaZFP3 蛋白主要定位于转基因烟草和拟南芥的细胞质中^[11]，蜡梅 CpC3H3 蛋白具有核定位信号却定位于转基因拟南芥的细胞膜^[13]。*MiZFP11* 蛋白作为一个非分泌非跨膜的亲水蛋白，定位于细胞核，具有核蛋白的功能作用。

CCCH 型锌指蛋白的空间结构及蛋白序列相对保守。澳洲坚果 *MiZFP11* 蛋白的高级结构主要由无规则卷曲、 α -螺旋和延伸链组成，无规则卷曲主要集中在蛋白的 N 端，尤其是具有功能结构域的保守 C 端富含 α -螺旋和延伸链，这对于稳定 *MiZFP11* 蛋白的空间结构和功能发挥具有重要作用。*MiZFP11* 蛋白的生物信息学分析结果，符合转录因子的特性。*MiZFP11* 蛋白作为锌指类的转录因子，其分析结果为 *MiZFP11* 蛋白行使生物学功能提供科学依据。

CCCH 型锌指蛋白在植物生长发育、种子萌发、叶片衰老等方面发挥重要的调控作用^[9-10]。而且，CCCH 型锌指蛋白基因在植物不同器官组织中普遍表达，并参与其生长发育，如拟南芥的大部分该家族基因在根、叶、花序和种子中均有表达^[5]，其中 *SOMNUS* 基因调控种子萌发^[10]，*AtC3H17* 基因多向性影响其营养发育、开花和种子发育^[25]；水稻 *OsDOS* 基因参与延缓叶片衰老^[9]；油菜 *BcMF30a* 和 *BcMF30c* 基因诱导转基因拟南芥花粉败育^[26]。本研究澳洲坚果 *MiZFP11* 基因在 JW 和桂热 1 号品种的根、茎、叶、小花、小果等器官组织中都有显著差异表达，因此，*MiZFP11* 基因可能参与澳洲坚果不同器官组织的生长发育。

现有研究表明，植物 CCCH 型锌指蛋白基因在响应逆境胁迫中起着重要的调控作用，如水稻 *C3H12* 基因通过 JA 依赖途径增强对白叶枯病的抗性^[12]，通过 ABA 信号转导途径陆地棉 *GhC3H20*

基因增强拟南芥的耐盐性^[14], 番茄 *SIC3H39* 基因调控植株的耐寒性^[27]; 尤其在响应干旱胁迫方面起重要作用, 如过表达 *OsC3H47* 和 *OsTZF1* 基因增强水稻的耐旱性^[28-29], 蜡梅 *CpC3H3* 基因的异源表达可以提高拟南芥的耐旱性^[13]。本研究在干旱胁迫条件下, 叶片中 *MiZFP11* 基因在澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种中均表现出显著的上调表达; 但其表达模式有所差异, 可能与这 2 个品种抗旱性差异有关。可见, CCCH 型锌指蛋白 *MiZFP11* 可能作为正调控因子, 参与澳洲坚果响应干旱胁迫过程。

此外, CCCH 型锌指蛋白基因在响应高温胁迫中也起着重要的调控作用, 如火龙果 *HuTZF3* 基因的异源表达可以提高拟南芥的耐热性^[30]。本研究在高温胁迫下, 叶片中 *MiZFP11* 基因在澳洲坚果 JW 和桂热 1 号品种中均表现出显著的上调表达模式, 且 JW 品种在各高温处理时间点的表达量明显高于桂热 1 号。在田间表现上, JW 品种耐高温极强, 而桂热 1 号品种对高温敏感, 易导致夏季高温天气时嫩叶和嫩梢严重黄化。*MiZFP11* 基因在这 2 个品种的表达特性差异可能与它们对高温胁迫的敏感性有关, 有助于解释 JW 品种的耐热性强于桂热 1 号。可见, *MiZFP11* 蛋白可能作为正调控因子, 参与澳洲坚果响应高温胁迫反应。

综上所述, 本研究获得 1 个澳洲坚果 CCCH 型 C3H13 亚类锌指蛋白的新成员 *MiZFP11* 蛋白, 可能在澳洲坚果组织生长发育及响应干旱、高温胁迫中起重要作用, 为进一步研究该家族基因的耐旱和耐热分子机理及澳洲坚果耐旱、耐热品种选育提供科学理论依据。

参考文献

- HERBERT S W, WALTON D A, WALLACE H M. The influence of pollen-parent and carbohydrate availability on macadamia yield and nut size[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 251(1): 241-246.
- HAN G L, QIAO Z Q, LI Y X, WANG C F, WANG B S. The roles of CCCH zinc-finger proteins in plant abiotic stress tolerance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(15): 8327.
- BOLLIER N, GONZALEZ N, CHEVALIER C, HERNOULD M. Zinc Finger-Homeodomain and Mini Zinc Finger proteins are key players in plant growth and responses to environmental stresses[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(14): 4662-4673.
- LIU Y, KHAN A R, GAN Y. C2H2 zinc finger proteins response to abiotic stress in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(5): 2730.
- WANG D, GUO Y H, WU C A, YANG G D, LI Y Y, ZHENG C C. Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 44.
- CHAI G H, HU R B, ZHANG D Y, QI G, ZUO R, CAO Y P, CHEN P, KONG Y Z, ZHOU G K. Comprehensive analysis of CCCH zinc finger family in poplar (*Populus trichocarpa*)[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 253.
- XU R R. Genome-wide analysis and identification of stress-responsive genes of the CCCH zinc finger family in *Solanum lycopersicum*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289(5): 965-979.
- DENG Z Y, YANG Z J, LIU X Y, DAI X M, ZHANG J K, DENG K X. Genome-wide identification and expression analysis of C3H zinc finger family in potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(16): 12888.
- KONG Z S, LI M N, YANG W Q, XU W Y, XUE Y B. A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice[J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1376-1388.
- KIM D H, YAMAGUCHI S, LIM S, OH E, PARK J, HANADA A, KAMIYA Y, CHOI G. SOMNUS, a CCCH-type zinc finger protein in *Arabidopsis*, negatively regulates light-dependent seed germination downstream of PIL5[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(5): 1260-1277.
- WANG M Q, ZHANG H Z, DAI S Y, FENG S, GONG S F, WANG J G, ZHOU A M. AaZFP3, a novel CCCH-type zinc finger protein from *Adonis amurensis*, promotes early flowering in *Arabidopsis* by regulating the expression of flowering-related genes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(15): 8166.
- DENG H Q, LIU H B, LI X H, XIAO J H, WANG S P. A CCCH-type zinc finger nucleic acid-binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease[J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(2): 876-889.
- LIU H M, XIAO S Q, SUI S Z, HUANG R W, WANG X, WU H F, LIU X. A tandem CCCH type zinc finger protein gene *CpC3H3* from *Chimonanthus praecox* promotes flowering and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 506.
- ZHANG Q, ZHANG J J, WEI F, FU X K, WEI H L, LU J H, MA L, WANG H T. The CCCH-type zinc-finger protein GhC3H20 enhances salt stress tolerance in *Arabidopsis tha-*

- liana* and cotton through ABA signal transduction pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(5): 5057.
- [15] 蔡元保, 杨祥燕, 孙光明, 黄强, 刘业强, 李绍鹏, 张治礼. 菠萝花发育相关基因 *AcMADS1* 的克隆与组织表达特性分析[J]. 植物学报, 2014, 49(6): 692-703.
- CAI Y B, YANG X Y, SUN G M, HUANG Q, LIU Y Q, LI S P, ZHANG Z L. Cloning of flowering-related gene *AcMADS1* and characterization of expression in tissues of pineapple (*Ananas comosus*)[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2014, 49(6): 692-703. (in Chinese)
- [16] 杨祥燕, 蔡元保, 张治礼, 孙光明, 孙伟生, 吴青松, 王运儒. 菠萝 MADS-box 基因 *AcMADS2* 的克隆与表达分析[J]. 植物生理学报, 2016, 52(9): 1406-1412.
- YANG X Y, CAI Y B, ZHANG Z L, SUN G M, SUN W S, WU Q S, WANG Y R. Cloning and expression analysis of MADS-box gene *AcMADS2* from pineapple (*Ananas comosus*)[J]. Plant Physiology Journal, 2016, 52(9): 1406-1412. (in Chinese)
- [17] 杨倩, 杨子平, 周娅丽, 陈东泉, 刘恒. 澳洲坚果实时荧光定量 PCR 分析中内参基因的筛选[J]. 热带作物学报, 2020, 41(8): 1505-1512.
- YANG Q, YANG Z P, ZHOU Y L, CHEN D Q, LIU H. Screening of stable reference genes for qRT-PCR analysis in *Macadamia integrifolia*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(8): 1505-1512. (in Chinese)
- [18] 蔡元保, 杨祥燕, 庞新华, 李季东, 林玉虹. 澳洲坚果 *MiSTPP3* 和 *MiSTPP7* 基因克隆与表达分析[J]. 热带作物学报, 2021, 42(11): 3093-3100.
- CAI Y B, YANG X Y, PANG X H, LI J D, LIN Y H. Cloning and expression analysis of *MiSTPP3* and *MiSTPP7* from *Macadamia integrifolia*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(11): 3093-3100. (in Chinese)
- [19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] COOK K B, HUGHES T R, MORRIS Q D. High-throughput characterization of protein-RNA interactions[J]. Briefings in Functional Genomics, 2015, 14(1): 74-89.
- [21] 皮博艺, 阮颖, 黄勇. 植物串联 CCCH 锌指蛋白 RR-TZF 家族研究进展及生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(7): 2171-2177.
- PI B Y, RUAN Y, HUANG Y. Research progress and bioinformatics analysis of RR-TZF family of plant tandem CCCH zinc finger proteins[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(7): 2171-2177. (in Chinese)
- [22] 蔡元保, 杨祥燕, 李季东, 黄思婕, 李穆, 巫辅民. 澳洲坚果 *MiSTPP6* 基因克隆及低温胁迫下表达分析[J]. 南方农业学报, 2021, 52(12): 3205-3211.
- CAI Y B, YANG X Y, LI J D, HUANG S J, LI M, WU F M. Cloning and expression analysis of *MiSTPP6* gene from *Macadamia integrifolia* under cold stress[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(12): 3205-3211. (in Chinese)
- [23] 蔡元保, 杨祥燕, 黄强, 曾黎明, 李冰, 潘如军. 澳洲坚果 *MiSTPP5* 基因在不同组织及低温胁迫的表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(3): 617-624.
- CAI Y B, YANG X Y, HUANG Q, ZENG L M, LI B, PAN R J. Expression analysis of *MiSTPP5* gene in cold stress and different tissues of *Macadamia integrifolia*[J]. Genomics and Applied Biology, 2022, 41(3): 617-624. (in Chinese)
- [24] YAN Z Y, JIA J H, YAN X Y, SHI H Y, HAN Y Z. *Arabidopsis* KHZ1 and KHZ2, two novel non-tandem CCCH zinc-finger and K-homolog domain proteins, have redundant roles in the regulation of flowering and senescence[J]. Plant Molecular Biology, 2017, 95(6): 549-565.
- [25] SEOK H Y, WOO D H, PARK H Y, LEE S Y, TRAN H T, LEE E H, VU NGUYEN L, MOON Y H. AtC3H17, a non-tandem CCCH zinc finger protein, functions as a nuclear transcriptional activator and has pleiotropic effects on vegetative development, flowering and seed development in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Physiology, 2016, 57(3): 603-615.
- [26] XU L A, XIONG X P, LIU T T, CAO J S, YU Y J. Heterologous expression of two *Brassica campestris* CCCH zinc-finger proteins in *Arabidopsis* induces cytoplasmic foci and causes pollen abortion[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(23): 16862.
- [27] XU J, HUANG Z L, DU H Y, TANG M J, FAN P X, YU J Q, ZHOU Y H. SEC1-C3H39 module fine-tunes cold tolerance by mediating its target mRNA degradation in tomato[J]. New Phytologist, 2023, 237(3): 870-884.
- [28] WANG W Y, LIU B H, XU M Y, JAMIL M, WANG G P. ABA-induced CCCH tandem zinc finger protein OsC3H47 decreases ABA sensitivity and promotes drought tolerance in *Oryza sativa*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 464(1): 33-37.
- [29] ILYAS M, HUSSAIN SHAH S, FUJITA Y, MARUYAMA K, NAKASHIMA K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, JAN A. *OsTZF1*, a CCCH-tandem zinc finger protein gene, driven under own promoter produces no pleiotropic effects and confers salt and drought tolerance in rice[J]. Plant Signaling & Behavior, 2022, 17(1): 2142725.
- [30] XU W J, JIAN S G, LI J Y, WANG Y S, ZHANG M Y, XIA K F. Genomic identification of CCCH-type zinc finger protein genes reveals the role of *HuTZF3* in tolerance of heat and salt stress of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(7): 6359.