

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.02.010

毛果杨 *MAP65* 基因家族的扩张与表达分析

薛丽¹, 刘晓霞¹, 罗莹¹, 吕中睿¹, 张建国^{1,2,3}, 饶国栋^{1,2,3*}

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 2. 南京林业大学, 南方现代林业协同创新中心, 江苏南京 210000; 3. 国家林业和草原局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: [目的] 以林木模式植物毛果杨为研究材料, 旨在研究毛果杨 *MAP65* 基因家族成员的扩张与表达情况, 为 *MAP65* 的功能研究提供参考。[方法] 利用 BLASTP 基于 Phytozome 数据库鉴定毛果杨的 *MAP65* 基因家族成员, 采用 Prot-Param、Plant-mPLoc、LocTree3、Wolfpsort、MAGA7.0、GSDS、MEME、MCSanX、TB-tools、BioEdit Sequence Alignment Editor、DnaSP5、plantCARE 等工具分析其理化性质, 预测其亚细胞定位, 构建系统进化树, 绘制基因结构图, 分析保守结构域、基因复制事件、启动子元件, 并基于基因芯片数据分析 *PtMAP65* 基因家族成员在不同组织中的表达量。[结果] 利用 BLASTP 比对方法鉴定得到了 9 个 *MAP65* 基因。系统进化分析结果显示: 植物 *MAP65* 基因家族分为 5 个亚组, 且每个亚组都具有相似的基因结构和保守结构域。毛果杨基因组内共线性分析及同义突变频率 (K_s)、非同义突变频率 (K_a) 分析结果表明: *PtMAP65* 基因家族中有 6 对片段复制基因, 且复制基因在进化过程中受到强化选择的作用。*PtMAP65* 基因家族成员的表达数据分析显示: 该基因家族成员在不同组织中有不同的表达模式, 暗示其功能的分化。启动子的顺式作用元件分析表明: *PtMAP65s* 的启动子中有较多的光响应元件和激素响应元件。[结论] 片段复制是 *PtMAP65* 基因家族进化扩张的主要动力, 推测基因家族成员之间存在功能分化。

关键词: 毛果杨; *PtMAP65*; 系统进化分析; 基因结构

中图分类号: S718

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)02-0092-10

微管是由 α -、 β -微管蛋白以异二聚体的形式组装而成的中空管状结构^[1]。植物细胞中, 微管可以快速的聚合或者解聚、迅速转变微管列阵, 对细胞的正常扩张和分化具有重要作用。微管结合蛋白 (MAP) 是一类对微管的组装和功能具有调控作用的蛋白^[2]。Changjie 等最早从烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) BY-2 ('Bright Yellow-2') 悬浮培养细胞中分离得到一类与微管紧密结合且分子量约为 65 kD 的蛋白, 即 *MAP65*^[3]。*MAP65* 蛋白通常定位于一种或几种微管列阵上, 是一类可与微管交联并促进微管成束的微管结合蛋白^[4]。

从烟草 BY-2 悬浮培养细胞中分离出小原生质

体, 制备胞质提取物, 之后加入紫杉醇协助组装微管, 再将微管和 MAP 低温高速离心以去组装, 经过数次组装-去组装循环, 分离得到 3 个烟草 *MAP65* 蛋白^[5]。后用同样的方法在胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 悬浮细胞中分离得到 3 个胡萝卜 *MAP65* 蛋白^[6]。随着拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 与水稻 (*Oryza sativa* L.) 基因组测序的完成, 拟南芥和 水稻中分别鉴定出了 9 和 11 个 *MAP65* 蛋白家族成员^[7-8]。小立碗藓 (*Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp.) 中克隆得到了 5 个 *MAP65* 基因^[9]。对拟南芥 *MAP65* 蛋白家族的研究表明, 9 个成员之间氨基酸相似性为 28%~79%, C 端序列同源性

收稿日期: 2020-08-12 修回日期: 2020-12-18

基金项目: 中央级公益性科研院所专项资金项目 (CAFYBB2018QB001)

* 通讯作者: 饶国栋, 副研究员, 硕士生导师. 主要研究方向: 林木遗传育种. Email: rgd@caf.ac.cn

尤其低, C端包含与微管特定结合的结构域, 决定了微管聚合的速率, 不同基因的C端微管结合结构域不同, 故以不同的效率促进微管聚合^[10]。 *ATMAP65-1* 和 *ATMAP65-2* 促进扩增细胞的轴向生长, 但不是维持细胞营养生长和生殖生长所必需^[11]。 *ATMAP65-3* 的缺失导致成膜体异常, 胞质分裂不完全及植株发育异常^[12]。 *ATMAP65-4* 和 *ATMAP65-3* 具有高度同源性, 功能相似, 交联成膜体中的相邻反向平行的微管, 这2个基因的同时缺失会导致植株生长受到严重影响^[13]。 *ATMAP65-5* 在整个细胞周期中均有表达, 且对微管解聚药具有更强的耐受力^[14]。 *ATMAP65-6* 对微管聚合没有促进作用, 但可诱导微管形成网状结构, 该蛋白定位于线粒体, 可能参与线粒体相关功能的实现^[15]。植物中 *MAP65* 基因家族的成员数量较多, 且在细胞周期的不同微管阵列中具有不完全相同的定位模式, 在不同组织中的表达量亦存在差异, 这预示该基因家族在植物中具有功能的分化^[10,16-17]。

毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) 作为第一个完成基因组测序的木本植物, 为鉴定木本植物 *MAP65* 基因家族成员和分析其进化及功能提供了可能^[18]。本研究在毛果杨中鉴定出9个 *MAP65*, 通过其理化性质分析、亚细胞定位的预测、系统进化分析、基因结构和保守结构域分析、共线性分析及同义突变频率 (*Ks*)、非同义突变频率 (*Ka*) 分析、组织表达量以及启动子顺式作用元件分析, 探究了 *PtMAP65* 基因家族的进化扩张模式, 以期揭示 *PtMAP65* 基因家族的进化生物学意义, 并为进一步研究 *PtMAP65* 基因家族成员的潜在功能提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 *PtMAP65* 基因家族成员的鉴定及理化性质分析

在拟南芥数据库 (<https://www.arabidopsis.org>) 下载 *ATMAP65* 基因家族9个成员的蛋白质序列, 将其作为靶序列, 使用 BLASTP 方法在 Phytozome (v12.1, <https://phytozome.jgi.doe.gov/>) 中的毛果杨 v3.1 蛋白质组数据库中进行搜索, 期望阈值设为 -10, 其他参数默认; 候选基因再通过在线工具 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行保守结构域鉴定, 最后得到9个 *PtMAP65* 蛋白。利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/>) 计算 *PtMAP65* 蛋白

家族的分子量和等电点; 利用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/>)、LocTree3 (<https://roslab.org/>) 和 Wolfpsort (<https://www.genscript.com/>) 预测 *PtMAP65* 蛋白家族的亚细胞定位。

1.2 植物 *MAP65-Likes* 基因系统进化树的构建

利用 MAGA7.0 中的 ClustalW 程序, 将毛果杨、拟南芥、烟草、水稻、玉米 (*Zea mays* L.)、巨桉 (*Eucalyptus grandis* Hill)、挪威云杉 (*Picea abies* (L.) Karst.)、北美云杉 (*Picea sitchensis* (Bongard) Carrière)、莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard) 等物种的 *MAP65-Like* 蛋白序列进行多重序列比对; 以莱茵衣藻作为外类群, 采用邻接法 (NJ) 构建系统进化树, 模型为 p-distance, 成对删除, 校验参数 (Bootstrap) 为 1 000 次和 5 000 次重复。毛果杨、拟南芥、烟草和水稻 *MAP65* 蛋白家族系统进化树构建方法同上。

1.3 毛果杨、拟南芥、烟草和水稻 *MAP65* 家族成员的基因结构和保守结构域分析

利用 GSDS (2.0, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析毛果杨、拟南芥、烟草和水稻 *MAP65s* 的基因结构; 利用 MEME (v5.1.1, <http://meme-suite.org/>) 分析其蛋白序列的保守结构域, 最大结构域数目设置为 15。

1.4 毛果杨染色体定位、共线性分析及 *Ka/Ks* 计算

从毛果杨基因组注释文件中获得 *PtMAP65* 基因家族染色体定位的位置信息; 在 linux 系统下利用 MCScanX 进行毛果杨基因组内共线性分析, 并使用 TBtools (v0.6696) 作图。利用 BioEdit Sequence Alignment Editor 比对复制基因对的 CDS 序列, 再用 DnaSP5 计算复制基因对的 *Ks* 和 *Ka*, 根据 *Ks* 值计算进化时间 (*T*): $T = Ks/2\lambda$, $\lambda = 9.1 \times 10^{-9}$ ^[19]。

1.5 *PtMAP65* 基因家族成员启动子顺式作用元件分析

使用 TBtools (v0.6696) 从毛果杨基因组序列文件中获取 *PtMAP65* 基因家族成员起始密码子上游 2 000 bp 的 DNA 序列作为启动子, 使用 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子中的顺式作用元件。

1.6 *PtMAP65* 基因家族成员表达特性

PtMAP65 基因家族成员在不同组织中的表达数据来源于 Poplar eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/>), 利用 TBtools (v0.6696) 分析制作基因表达热图, 取 log_{scal}, 极限值设置为 2 000, 其他参数默认。

2 结果与分析

2.1 *PtMAP65* 基因家族成员的鉴定与理化性质分析

通过在线 BLASTP 比对,从毛果杨中鉴定出 14 个候选的 *MAP65s*。SMART 和 NCBI-CDD 分析结果显示:14 条蛋白序列都具有完整或不完整的 MAP65_ASE1 结构域 (PF03999); 经过比对建树分析,删除影响树形的序列,最后得到 9 个 *MAP65s*。

根据其在染色体上的分布情况,将其命名为 *PtMAP65-1* 到 *PtMAP65-9* (表 1)。*PtMAP65* 蛋白家族成员的氨基酸长度变化范围为 570~730 aa,分子量变化范围为 64.65~83.00 kDa,等电点变化范围为 5.17~8.45。综合考虑 *PtMAP65* 蛋白家族成员用 3 种方法预测的亚细胞定位,最终预测:*PtMAP65-1*、*PtMAP65-3* 和 *PtMAP65-9* 位于细胞核,*PtMAP65-8* 位于叶绿体,其余成员位于细胞质。

表 1 *PtMAP65* 基因家族及其理化性质

Table 1 The information of the *PtMAP65* gene family

基因名称 Gene name	基因登陆号 ID (Phytozome v12.1)	DNA长度 DNA length/bp	CDS长度 CDS length/bp	氨基酸长度 amino acid length/aa	分子量 Molecular weight/kDa	等电点 pI	预测的亚细胞定位 Predicted subcellular localization
<i>PtMAP65-1</i>	Potri.001G055100	4 089	1 809	602	68.73	5.70	细胞核
<i>PtMAP65-2</i>	Potri.001G356500	5 285	1 746	581	65.05	5.17	细胞质
<i>PtMAP65-3</i>	Potri.003G173300	4 551	1 779	592	67.62	5.87	细胞核
<i>PtMAP65-4</i>	Potri.003G192400	6 668	1 713	570	64.65	7.25	细胞质
<i>PtMAP65-5</i>	Potri.008G139700	7 530	1 803	600	68.12	7.14	细胞质
<i>PtMAP65-6</i>	Potri.011G092500	4 939	1 749	582	65.37	5.21	细胞质
<i>PtMAP65-7</i>	Potri.012G129600	4 717	1 755	584	67.08	5.41	细胞质
<i>PtMAP65-8</i>	Potri.014G070100	4 294	2 163	720	81.53	8.45	叶绿体
<i>PtMAP65-9</i>	Potri.015G131400	4 795	2 193	730	83.00	5.65	细胞核

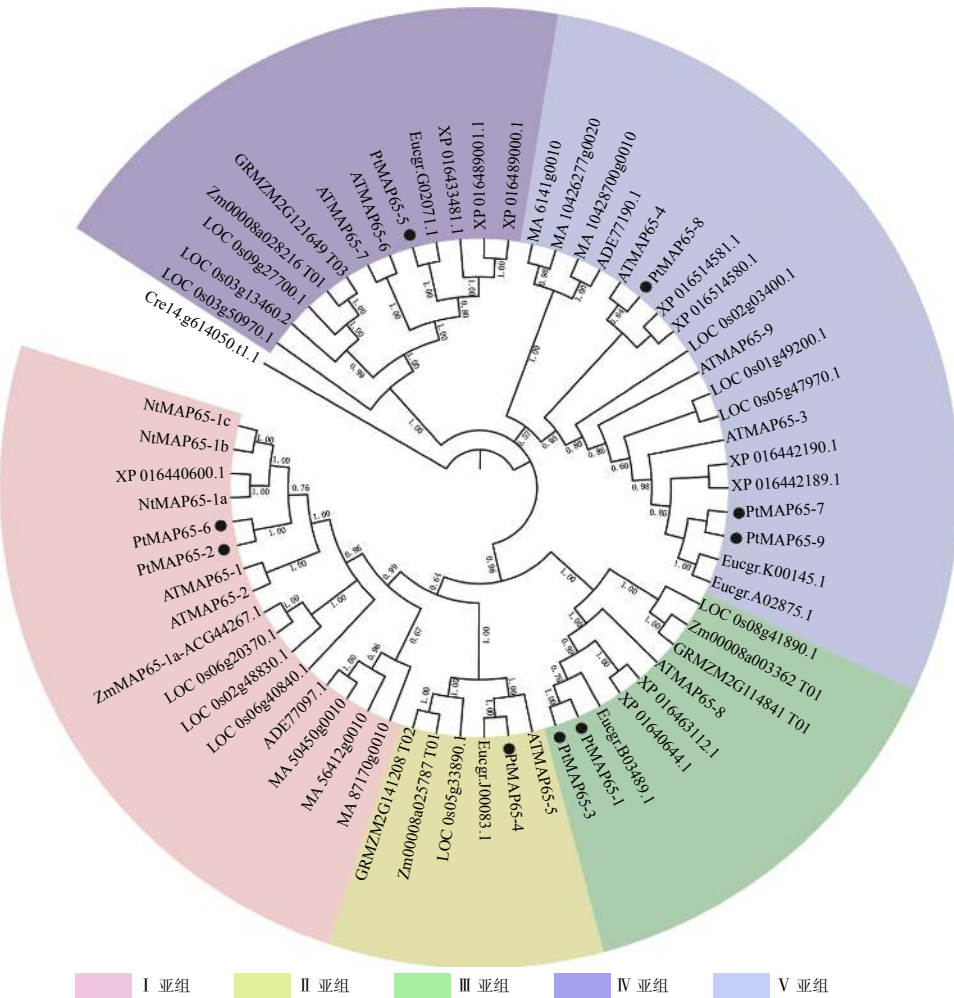
2.2 植物 MAP65-Likes 系统进化分析

为研究植物 MAP65-Likes 的系统进化关系,采用邻接法对毛果杨、拟南芥、烟草、水稻、巨桉、挪威云杉等物种的 MAP65-Like 蛋白构建系统进化树,校验参数 (Bootstrap) 分别为 1 000 次和 5 000 次重复,结果差异很小,图 1 中系统进化树的 Bootstrap 为 1 000。从图 1 可以看出:该植物基因家族分为 I、II、III、IV 和 V 5 个亚组,裸子植物的 MAP65-Likes 仅分布于 I 亚组和 V 亚组中,且独立地聚为一簇;被子植物的 MAP65-Likes 在 5 个亚组中均有分布,且单子叶和双子叶植物 MAP65s 均匀地分布于各个亚组,这说明 5 个亚组的分化发生于裸子植物和被子植物分化之后、单子叶植物和双子叶植物分化之前。在 I、II、III 和 IV 4 个亚组中,单子叶植物和双子叶植物的 MAP65-Likes 各自聚为一簇,在 V 亚组中,双子叶植物毛果杨、拟南芥和烟草的 4 个 MAP65-Likes 聚为一簇,其他 8 个 MAP65-Likes 与单子叶植物水稻的 3 个 MAP65s 聚为一簇。在 I 亚组中,*PtMAP65-2/PtMAP65-6* 组

成旁系同源基因对,并与 *ATMAP65-1/ATMAP65-2* 这一对旁系同源基因聚为一支;在 II 亚组中,*PtMAP65-4/Eucgr.J00083.1* 组成直系同源基因对,并与 *ATMAP65-5* 聚为一支;在 III 亚组中,*PtMAP65-1/PtMAP65-3* 组成旁系同源基因对,并与 *Eucgr.B03489.1* 聚为一支;在 V 亚组中,*PtMAP65-7/PtMAP65-9* 组成旁系同源基因对,并与旁系同源基因对 *Eucgr.K00145.1/Eucgr.A02875.1* 聚为一支,另外,*PtMAP65-8/ATMAP65-4* 组成直系同源基因对;在 IV 亚组中,*PtMAP65-5/Eucgr.G02071.1* 组成直系同源基因对,这表明 MAP65 家族中毛果杨与巨桉的亲缘关系最近,这也与二者是多年生木本植物相一致。

2.3 毛果杨、拟南芥、烟草和水稻 MAP65 家族成员的基因结构和保守结构域分析

为分析 MAP65 家族成员的基因结构特征,利用 GSDS 绘制了毛果杨、拟南芥、烟草和水稻 MAP65 家族成员的基因结构图。图 2A 表明:在 I 亚组中,9 个 MAP65s 有 9 个外显子、8 个内含



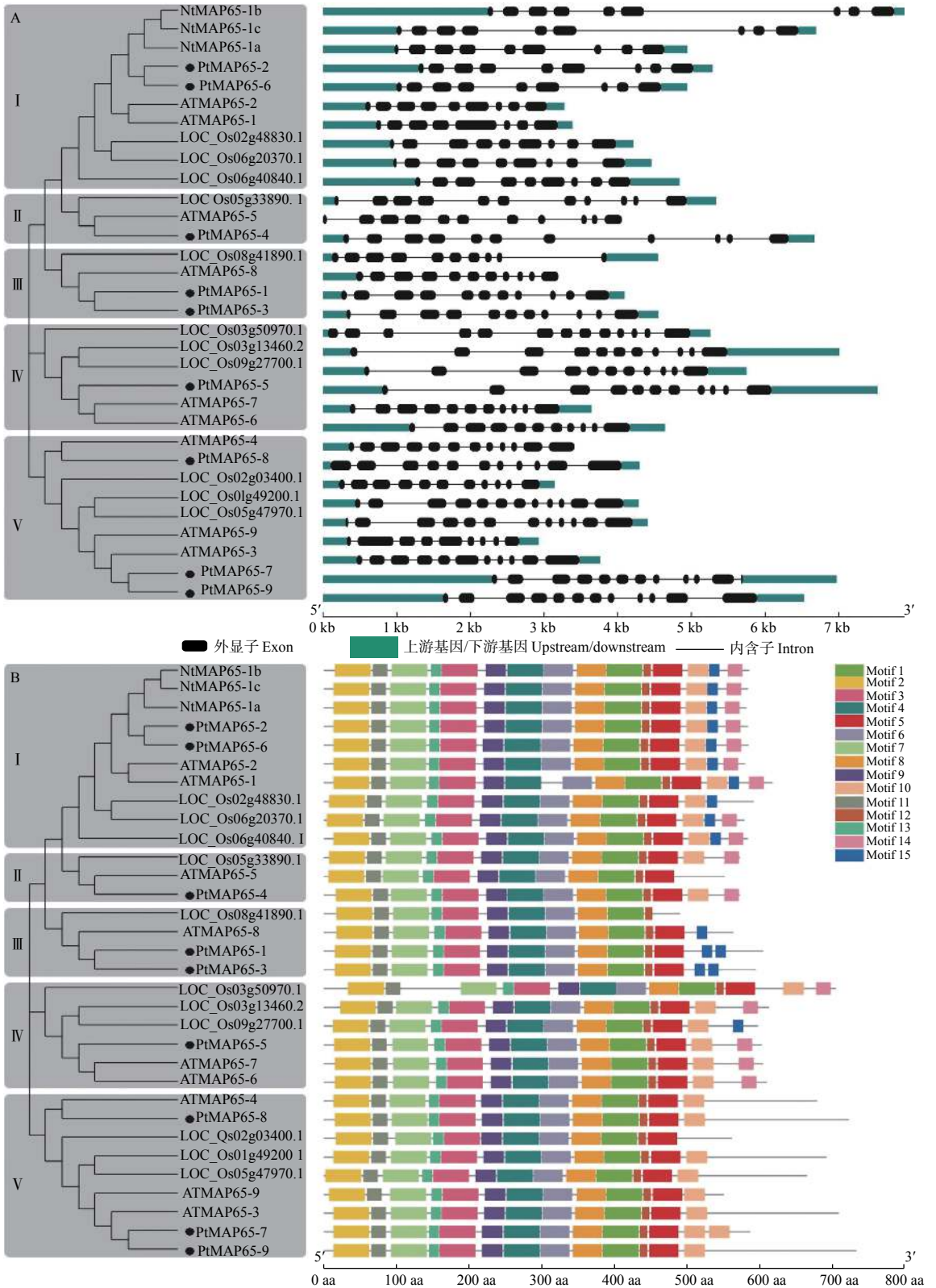
I 亚组 II 亚组 III 亚组 IV 亚组 V 亚组

注: 系统进化树中包括: 9个毛果杨 *MAP65s*(Potri.001G055100, Potri.001G356500, Potri.003G173300, Potri.003G192400, Potri.008G139700, Potri.011G092500, Potri.012G129600, Potri.014G070100, Potri.015G131400); 9个拟南芥 *MAP65s*(AT5G55230, AT4G26760, AT5G51600, AT3G60840, AT2G38720, AT2G01910, AT1G14690, AT1G27920, AT5G62250); 11个水稻 *MAP65s*(LOC Os02g03400.1, LOC Os03g13460.2, LOC Os09g27700.1, LOC Os05g49790.1, LOC Os02g48830.1, LOC Os05g33890.1, LOC Os06g40840.1, LOC Os03g50970.1, LOC Os01g49200.1, LOC Os08g41890.1, LOC Os06g20370.1); 13个烟草 *MAP65-Likes*(NtMAP65-1a, NtMAP65-1b, NtMAP65-1c, XP 016463112.1, XP 016460644.1, XP 016442189.1, XP 016489001.1, XP 016514581.1, XP 016489000.1, XP 016442190.1, XP 016514580.1, XP 016440600.1, XP 016433481.1); 7个玉米 *MAP65-Likes*(Zm00008a003362 T01, ZmMAP65-1a-ACG44267.1, GRMZM2G141208 T02, Zm00008a028216 T01, GRMZM2G121649 T03, Zm00008a025787 T01, GRMZM2G114841 T01); 5个巨桉 *MAP65-Likes*(Eucgr.J00083.1, Eucgr.B03489.1, Eucgr.A02875.1, Eucgr.K00145.1, Eucgr.G02071.1); 6个挪威云杉 *MAP65-Likes*(MA 87170g0010, MA 50450g0010, MA 10426277g0020, MA 6141g0010, MA 10428700g0010, MA 56412g0010); 2个北美云杉 *MAP65-Likes*(ADE77097.1, ADE77190.1); 1个莱茵衣藻 *MAP65-Likes*(Cre14.g614050.t1.1); 图1的校验参数(bootstrap)为1000。

Notes: The phylogenetic tree includes 9 *Populus* *MAP65s*(Potri.001G055100, Potri.001G356500, Potri.003G173300, Potri.003G192400, Potri.008G139700, Potri.011G092500, Potri.012G129600, Potri.014G070100, Potri.015G131400); 9 *Arabidopsis* *MAP65s*(AT5G55230, AT4G26760, AT5G51600, AT3G60840, AT2G38720, AT2G01910, AT1G14690, AT1G27920, AT5G62250); 11 rice *MAP65s*(LOC OS02g03400.1, LOC OS03g13460.2, LOC OS09g27700.1, LOC OS05g49790.1, LOC OS02g48830.1, LOC OS05g33890.1, LOC OS06g40840.1, LOC OS03g50970.1, LOC OS01g49200.1, LOC OS08g41890.1, LOC OS06g20370.1); 13 tobacco *MAP65-Likes*(NtMAP65-1A, NtMAP65-1B, NtMAP65-1c, XP 016463112.1, XP 016460644.1, XP 016442189.1, XP 016489001.1, XP 016514581.1, XP 016489000.1, XP 016442190.1, XP 016514580.1, XP 016440600.1, XP 016440600.1, XP 016440600.1, XP 016433481.1); 7 maize *MAP65-Likes*(Zm00008a003362 T01, ZMMAP65-1A-ACG44267.1, GRMZM2G141208 T02, Zm00008a028216 T01, GRMZM2G121649 T03, Zm00008a025787 T01, GRMZM2G114841 T01); 5 *Eucalyptus grandis* *MAP65-Likes*(Eucgr.J00083.1, EUCgr. B03489.1, EUCgr. A02875.1, EUCgr. K00145.1, eucgr. G02071.1); 6 *Picea abies* *MAP65-Likes*(MA 87170G0010, MA 50450G0010, MA 10426277G0020, MA 6141G0010, MA 10428700g0010, MA 56412G0010); 2 *Picea sitchensis* *MAP65-Likes*(ADE77097.1, ADE77190.1); 1 *Chlamydomonas reinhardtii* *MAP65-Likes*(CRE14. g614050.t1.1); The bootstrap is 1000.

图1 植物 *MAP65-Likes* 系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of plant *MAP65-Likes* protein sequences



注: (A) *MAP65* 家族的基因结构图; (B) *MAP65* 家族的保守结构域。

Notes: (A) Gene structure of *MAP65* family; (B) The conserved domain of the *MAP65* family.

图 2 *MAP65* 家族的基因结构和保守结构域分析

Fig. 2 Gene structures and protein domains analysis of *MAP65* gene family

子,仅 *ATMAP65-1* 有 8 个外显子、7 个内含子;在 II 亚组中, *MAP65* 有 11 个外显子、10 个内含子;在 III 亚组中, 3 个 *MAP65* 有 11 个外显子、10 个内含子, *LOC_Os08g41890.1* 有 10 个外显子、9 个内含子;在 IV 亚组中, 5 个 *MAP65* 有 11 个外显子、10 个内含子, 仅 *LOC_Os03g50970.1* 有 13 个外显子、12 个内含子;在 V 亚组中, *MAP65* 的外显子个数为 9~12、内含子个数为 8~11。另外,在各个亚组中,外显子的长度相似,内含子的长度差异较大,而同一物种的 *MAP65* 之间的内含子长度更相似。

利用 MEME 分析了 *MAP65* 蛋白家族的保守结构域。图 2B 表明:各个 *MAP65* 蛋白家族成员具有 11~15 个不等的结构域,第 1、2、3、4、6、7、8、9、11、12 和 15 个结构域较保守,在 32 条 *MAP65* 蛋白序列中均有分布。另外,植物 *MAP65* 蛋白序列的 C 端结构域较多变,各个亚组

的 *MAP65* 蛋白具有相似的结构域分布。

2.4 *PtMAP65* 基因家族的染色体定位和进化扩张

根据毛果杨基因组序列文件和注释文件,分析了 9 个 *PtMAP65* 基因在染色体的定位情况。*PtMAP65-1* 和 *PtMAP65-2* 位于 Chr01, *PtMAP65-3* 和 *PtMAP65-4* 位于 Chr03, *PtMAP65-5* 到 *PtMAP65-9* 分别位于 Chr08、Chr11、Chr12、Chr14 和 Chr15。毛果杨基因组内共线性分析结果显示: *MAP65* 基因家族中共有 6 对复制基因,且均为片段复制,其中 *PtMAP65-7*、*PtMAP65-8* 和 *PtMAP65-9* 互为复制基因(图 3)。利用 DnaSP5 计算复制基因对的 K_a 和 K_s , 算得的 K_s 值为 0.2341~1.9338, 表明复制时间最早发生于 106.25 百万年前,最晚发生于 12.86 百万年前;除复制基因对 *PtMAP65-4/Potri.001G032566* 的 K_a/K_s 为 0.6173 外,其余复制基因对的 $K_a/K_s < 0.25$, 表明 *PtMAP65* 基因家族在进化过程中受到强纯化选择的作用(表 2)。

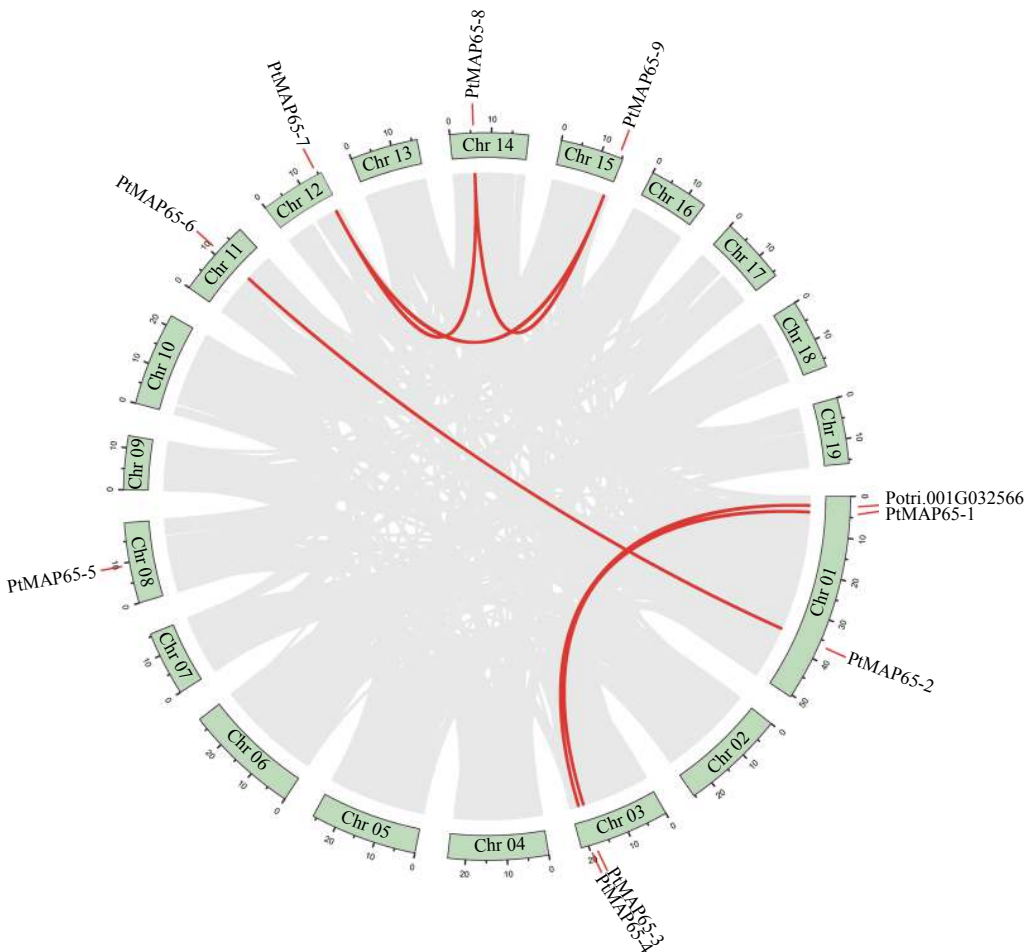


图 3 *PtMAP65* 基因家族染色体分布与复制基因对

Fig. 3 Chromosomal locations and duplicated gene pairs of *PtMAP65* gene family

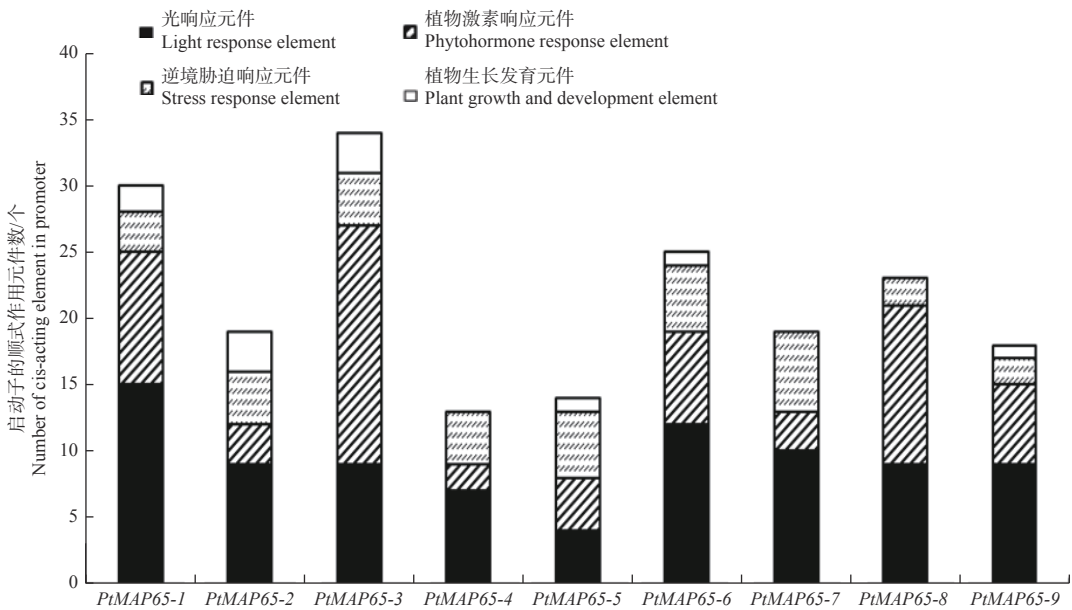
表2 复制基因对的 *Ks*、*Ka* 分析Table 2 *Ks* and *Ka* analysis of duplicated gene pairs

复制基因对 Pair of duplication gene	同义突变频率 <i>Ks</i>	非同义突变频率 <i>Ka</i>	非同义突变率与同义突变率的比值 <i>Ka/Ks</i>	复制时间/(百万年前) Duplication time/(Million years ago)
<i>PtMAP65-1 PtMAP65-3</i>	0.242 3	0.047 6	0.196 5	13.31
<i>PtMAP65-2 PtMAP65-6</i>	0.276 7	0.044 3	0.160 1	15.20
<i>PtMAP65-4 Potri.001G032566</i>	0.234 1	0.144 5	0.617 3	12.86
<i>PtMAP65-7 PtMAP65-8</i>	1.933 8	0.307 3	0.158 9	106.25
<i>PtMAP65-7 PtMAP65-9</i>	0.242 2	0.056 7	0.234 1	13.31
<i>PtMAP65-8 PtMAP65-9</i>	1.761 2	0.300 0	0.170 3	96.77

2.5 *PtMAP65* 基因家族的启动子顺式作用元件分析

为了解转录调控机制,利用 PlantCARE 数据库分析 *PtMAP65* 基因家族启动子的顺式作用元件。根据顺式作用元件的功能,将其分为光响应元件、激素响应元件、逆境胁迫响应元件和植物生

长发育元件。图 4 表明:在 *PtMAP65* 基因家族中,光响应元件和激素响应元件的个数较多,逆境胁迫响应元件和植物生长发育元件的个数较少;*PtMAP65-3* 中的激素响应元件远多于其他基因,*PtMAP65-4*、*PtMAP65-7* 和 *PtMAP65-8* 中未预测到植物生长发育元件。

图4 *PtMAP65* 基因家族启动子的顺式作用元件分析Fig. 4 Cis-elements analysis of *PtMAP65* gene family promoter

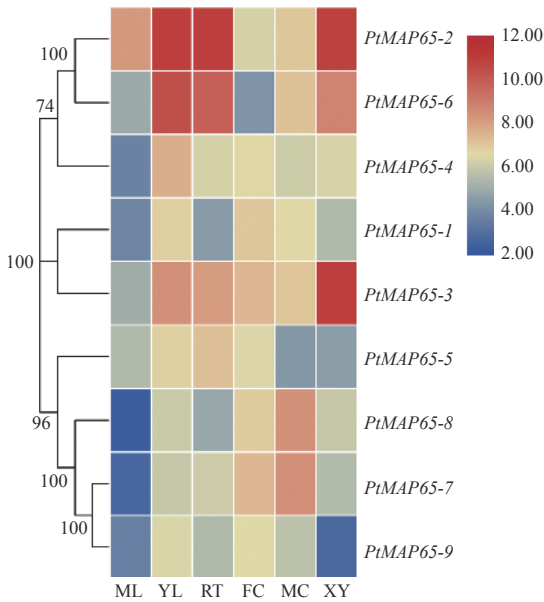
2.6 *PtMAP65* 基因家族的组织表达模式分析

从 Populus eFP browser 数据库下载得到 *PtMAP65* 基因家族成员在成熟叶、幼叶、根、雌花、雄花和木质部中的表达数据,绘制热图。图 5 表明:复制基因对 *PtMAP65-2/PtMAP65-6* 在幼叶、根和木质部均有高度表达;复制基因对 *PtMAP65-7/PtMAP65-8* 在雌花和雄花中高度表达;*PtMAP65-3* 在木质部中表达量最高;*PtMAP65-1* 和 *PtMAP65-4* 主要在幼叶和雌花中表达;*PtMAP65-5*

在幼叶和根中表达水平较高;*PtMAP65-9* 在各个组织表达水平较低。

3 讨论

MAP65 蛋白最早在烟草中发现,是一类具有稳定微管功能的蛋白^[3]。本研究在毛果杨中鉴定出 9 个 *PtMAP65* 基因,保守结构域分析发现,MAP65_ASE(pfam03999) 结构域普遍存在于拟南芥、毛果杨、水稻和烟草 MAP65 蛋白家族中^[16],暗示



注: ML: 成熟叶; YL: 幼叶; RT: 根; FC: 雌花; MC: 雄花; XY: 木质部。

Notes: ML: mature leaves; YL: young leaves; RT: roots; FC: female flowers; MC: male flowers; XY: xylem.

图5 *PtMAP65* 基因家族在不同组织中的表达模式

Fig. 5 Expression profiles of *PtMAP65* gene family in different tissues

MAP65_ASE 为植物 *MAP65* 家族行使共同功能的主要结构域。研究发现, 植物 *MAP65* 的 C 端包含一个高度分化的微管结合结构域^[20], 这个结构域参与微管聚合、成束, 且对其亚细胞定位有一定影响^[21], 在有丝分裂中期, C 端蛋白的磷酸化可及时地下调 *MAP65* 与微管的结合^[22-23]。进一步分析发现, 毛果杨 *PtMAP65* 蛋白的 C 端同样包含一个高度分化的微管结合结构域, 这可能与毛果杨 *MAP65* 家族的功能分化相关。

片段复制和串联复制是基因家族扩张的主要动力^[24]。毛果杨基因组内共线性分析发现, *PtMAP65* 基因家族中共有 6 对复制基因, 且均为片段复制, 这说明片段复制是 *PtMAP65* 基因家族进化扩张的主要动力。毛果杨经历了 3 次全基因组复制事件, 分别是古老的复制事件、100~120 百万年前的真蔷薇分支复制事件和 60~65 百万年前的杨柳科复制事件^[18]。分析 *PtMAP65* 复制基因发生时间发现, *PtMAP65-7/PtMAP65-8*、*PtMAP65-8/PtMAP65-9* 的复制时间与真蔷薇分支复制事件接近, *PtMAP65-7/PtMAP65-9* 的复制大约发生于 13 百万年前, 由此推测, 位于 Chr14 的 *PtMAP65-8* 经过 2 次片段

复制或者三倍化复制得到位于 Chr12 的 *PtMAP65-7* 和位于 Chr15 的 *PtMAP65-9*。最新研究表明, 被子植物在 20 百万年前亦发生了 1 次全基因组复制事件, 当时气温和 CO₂ 浓度均较低, 保留下来的基因多与盐胁迫、低温胁迫、干旱胁迫等非生物胁迫有关^[25]。分析发现, *PtMAP65-1/PtMAP65-3*、*PtMAP65-2/PtMAP65-6*、*PtMAP65-4/Potri.001G032566.2*、*PtMAP65-7/PtMAP65-9* 这 4 对基因的复制时间均与此次全基因组复制事件的时间相吻合。

通过对植物 *MAP65* 系统发育关系的研究发现, *PtMAP65* 多与 *ATMAP65* 或巨桉 *MAP65* 聚为一支, 这说明毛果杨和拟南芥、巨桉的亲缘关系最相近。前人研究表明: *ATMAP65-1* 定位于除萼片和花药以外的所有植物器官和组织, 且在根表皮细胞、子叶和下胚轴细胞中发现 *ATMAP65-1* 蛋白与微管相结合, 在体外 *ATMAP65-1* 在微管之间形成 25 nm 的交联桥, 促进微管成束^[26]; *ATMAP65-2* 在调节细胞的轴向生长方面具有重要作用; 在 *ATMAP65-1* 和 *ATMAP65-2* 双突变体中, 没有观察到明显的膨胀、变形和其他形态学缺陷的细胞, 但植株生长显著迟缓^[11]。分析发现, *PtMAP65-2*、*PtMAP65-6* 与 *ATMAP65-1*、*ATMAP65-2* 聚为一支, 位于 I 亚组, 且其在雄花和雌花中表达量低, 在其他组织中表达量均较高, 这暗示 *PtMAP65-2* 和 *PtMAP65-6* 可能通过参与细胞骨架的构建进而影响植株形态发生。*ATMAP65-3* 与有丝分裂微管阵列紧密相关, 在有丝分裂过程中, 该蛋白组织纺锤体形态发生和成膜体形成, *ATMAP65-3* 基因突变体根尖、茎尖分裂能力弱, 植株矮小^[27]; 引入 *ATMAP65-4* 拷贝基因的植株显著抑制了由 *ATMAP65-3* 突变引起的细胞质分裂和幼苗生长缺陷, 而 *ATMAP65-3* 和 *ATMAP65-4* 的同时突变将导致植物死亡^[13]。分析发现, *PtMAP65-7/PtMAP65-9* 与 *ATMAP65-3* 聚为一簇, *PtMAP65-8* 与 *ATMAP65-4* 聚为一簇, 位于 V 亚组, 暗示 *PtMAP65-7*、*PtMAP65-8* 和 *PtMAP65-9* 这 3 个基因通过参与细胞分裂过程决定植物的生长发育情况, 但这 3 个基因在毛果杨的各个组织中表达量较低, 其中的调控方式尚需进一步实验来明确。*ATMAP65-8* 在与周质微管的结合较弱, 可能仅结合周质微管中的某一部分^[28]。分析发现, *PtMAP65-1/PtMAP65-3* 与 *ATMAP65-8* 聚为一支, 位于 III 亚组, 这对基因的复制发生于 20 百

万年前的全基因组复制事件, 预测的亚细胞定位在细胞核, 特别的是: *PtMAP65-3* 启动子上的激素响应元件远远高于其他基因, 且该基因在木质部高度表达, 推测 *PtMAP65-3* 可能通过参与各种非生物胁迫响应而影响植物次生生长。综上, *PtMAP65-1*、*PtMAP65-2*、*PtMAP65-3*、*PtMAP65-6*、*PtMAP65-7*、*PtMAP65-8* 和 *PtMAP65-9* 可能紧密结合微管, 通过影响细胞分裂进而影响植物生长, 具体的作用机制及生物学功能仍需进一步研究。

4 结论

本研究利用 BLASTP 比对, 在毛果杨中鉴定了 9 个 *PtMAP65s*; 构建多个物种的 *MAP65s* 系统进化树, 将其分为 5 个亚组; 按不同亚组将基因结构图和保守结构域图归类比较, 同一亚组的 *MAP65s* 具有相似的基因结构和保守结构域; 利用毛果杨基因组内共线性及 *Ka*、*Ks* 分析 *PtMAP65* 基因家族的进化, 片段复制是其扩张的主要动力, 且复制基因在进化过程中受到强纯化选择的作用; 亚细胞定位预测、基于芯片数据的表达量和启动子的顺式作用元件综合分析表明: 在 *PtMAP65* 基因家族中, 不同亚组间的 *PtMAP65s* 已经存在功能分化, 同一亚组内的 *PtMAP65s* 即复制基因对之间仍存在功能冗余。

参考文献:

- [1] 张少斌, 刘 曦, 张立军, 等. 植物微管结合蛋白[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45 (3): 291-298.
- [2] Hamada T. Microtubule-associated proteins in higher plants[J]. Journal of Plant Research, 2007, 120(1): 79-98.
- [3] Changjie J, Sonobe S. Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein[J]. Journal of Cell Science, 1993, 105(1): 891-901.
- [4] Hamada T. Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells[J]. International Review of Cell and Molecular Biology, 2014, 312C: 1-52.
- [5] Smertenko A, Saleh N, Igarashi H, et al. A new class of microtubule-associated proteins in plants[J]. Nature Cell Biology, 2000, 2(10): 750-753.
- [6] Chan J, Rutten T, Lloyd C. Isolation of microtubule-associated proteins from carrot cytoskeletons: a 120 kDa MAP decorates all four microtubule arrays and the nucleus[J]. The Plant Journal, 1996, 10(2): 251-259.
- [7] Hussey P J, Hawkins T J, Igarashi H, et al. The Plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 50(6): 915-924.
- [8] Guo L, Ho C K, Kong Z, et al. Evaluating the microtubule cytoskeleton and its interacting proteins in monocots by mining the rice genome[J]. Annals of Botany, 2009, 103(3): 387-402.
- [9] Kosetsu K, De Keijzer J, Janson M E, et al. MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN65 is essential for maintenance of phragmoplast bipolarity and formation of the cell plate in *Physcomitrella patens*[J]. Plant Cell, 2013, 25(11): 4479-4492.
- [10] Smertenko A, Kaloriti D, Chang H, et al. The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65 isoforms[J]. The Plant Cell, 2008, 20(12): 3346-3358.
- [11] Lucas J R, Courtney S, Hassfurder M, et al. Microtubule-associated proteins MAP65-1 and MAP65-2 positively regulate axial cell growth in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls[J]. The Plant Cell, 2011, 23(5): 1889-1903.
- [12] Sabine Müller, Smertenko A, Wagner V, et al. The plant microtubule-associated protein ATMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function[J]. Current Biology, 2004, 14(5): 412-417.
- [13] Li H, Sun B, Sasabe M, et al. *Arabidopsis* MAP65 - 4 plays a role in phragmoplast microtubule organization and marks the cortical cell division site[J]. New Phytologist, 2017, 215(1): 187-201.
- [14] Van Damme D, Van Poucke K, Boutant E, et al. In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins[J]. Plant Physiology, 2004, 136(4): 3956-3967.
- [15] Mao T, Jin L, Li H, et al. Two microtubule-associated proteins of the *Arabidopsis* MAP65 family function differently on microtubules[J]. Plant Physiology, 2005, 138(2): 654-662.
- [16] Pellman D, Bagget M, Tu Y H, et al. Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Cell Biology, 1995, 130(6): 1373-1385.
- [17] Jiang W, Jimenez G, Wells N J, et al. PRC1: A human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis[J]. Molecular Cell, 1999, 2(6): 877-885.
- [18] Tuskan G A, Difazio S P, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)[J]. Science, 2006, 313(5793): 1596-1604.
- [19] Lynch M, Conery J S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes[J]. Science, 2000, 290(5494): 1151-1155.
- [20] Gaillard J, Neumann E, Van Damme D, et al. Two microtubule-associated proteins of *Arabidopsis* MAP65s promote antiparallel microtubule bundling[J]. Molecular Biology of the Cell, 2008, 19(10): 4534-4544.
- [21] Smertenko A, Chang H, Sonobe S, et al. Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle[J]. Journal of Cell Science, 2006, 119(15): 3227-3237.
- [22] Mao G, Chan J, Calder G, et al. Modulated targeting of GFP-AtMAP65-1 to central spindle microtubules during division[J]. Plant

Journal, 2010, 43(4): 469-478.

- [23] Sasabe, M. Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells[J]. *Genes & Development*, 2006, 20(8): 1004.
- [24] Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, *et al.* The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2004, 4(1): 10-10.
- [25] Wu S, Han B, Jiao Y, *et al.* Genetic contribution of paleopolyploidy to adaptive evolution in angiosperms[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(1): 59-71.
- [26] Smertenko A, Chang H, Wagner V, *et al.* The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(8): 2035-2047.
- [27] Michal Q, Baurès Isabelle, Caroline H, *et al.* The *Arabidopsis* microtubule-associated protein MAP65-3 supports infection by filamentous biotrophic pathogens by down-regulating salicylic acid-dependent defenses[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016(6): 1731-1743.
- [28] Damme D V, Bouget F Y, Poucke K V, *et al.* Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins[J]. *Plant Journal*, 2004, 40(3): 386-398.

Expansion and Expression Analysis of *PtMAP65* Gene Family in *Populus trichocarpa*

XUE Li¹, LIU Xiao-xia¹, LUO Ying¹, LYU Zhong-rui¹, ZHANG Jian-guo^{1,2,3}, RAO Guo-dong^{1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Co-Innovation Center of Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210000, Jiangsu, China; 3. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] To study the expansion and expression of the *MAP65* gene family members by using *Populus trichocarpa*, a model forest plant, as research material. [Method] Using BLASTP to identify the members of *PtMAP65* gene family based on Phytozome database, and using tools such as Prot-Param, Plant-mPLoc, LocTree3, WolfSort, MAGA7.0, GSDS, MEME, MCScanX, TBtools, BioEdit Sequence Alignment Editor, DnaSP5 and plantCARE to analyze the physical and chemical properties, predict subcellular locations, construct a phylogenetic tree, draw a gene structure diagram, analyze conserved domains, gene duplication events and promoter elements; and analyze the expression of *PtMAP65* gene family members in different tissues based on gene chip data. [Result] Nine *MAP65* genes were identified by BLASTP comparison. Phylogenetic analysis showed that the plant *MAP65* gene family can be divided into 5 groups, and each group had a similar gene structure and conserved domain. The results of collinearity analysis and *Ka* and *Ks* analysis of the *P. trichocarpa* genome indicated that there were six pairs of segmental duplication genes in the *PtMAP65* gene family, and the duplication genes were subject to strong purification selection in the evolutionary process. Analysis of the expression data showed that *PtMAP65* gene family members had different expression patterns in different tissues, suggesting their functional divergence. Cis-acting element analysis of the promoter showed that *PtMAP65s* promoter had more light response and hormone response elements than stress response, growth and development elements. [Conclusion] Segmental duplication is a main force driving the evolution and expansion of *PtMAP65* gene family, and it is speculated that there has been functional divergence among the *PtMAP65* gene family members.

Keywords: *Populus trichocarpa*; *PtMAP65*; phylogenetic analysis; gene structure