

赖彪,陈春帆,刘春渝,等.茎瘤芥 *BXL* 基因家族的全基因组鉴定及在瘤状茎膨大过程中的表达分析[J].华中农业大学学报,2020,39(6): 155-163.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.06.021

茎瘤芥 *BXL* 基因家族的全基因组鉴定及 在瘤状茎膨大过程中的表达分析

赖彪,陈春帆,刘春渝,朱纯真,杜丽娜

长江师范学院现代农业与生物工程学院,重庆 408100

摘要 为深入解析 *BXL* 家族基因在茎瘤芥发育中的功能,利用生物信息学方法从茎瘤芥全基因组鉴定出 16 个 *BjuBXL*,并系统分析了 *BjuBXL* 家族蛋白的理化性质、基因结构、保守基序、染色体定位和在茎膨大过程中的表达。结果表明:16 个 *BjuBXL* 基因分为 7 类,共 2 个亚族,其中 *BjuBXL1-1*~*BjuBXL1-4* 与拟南芥中参与细胞壁代谢和植物发育的 *AtBXL1* 亲缘关系相近;7 个 *BjuBXL* 定位于 A 亚基因组的 5 条染色体上,8 个定位于 B 亚基因组的 4 条染色体上;荧光定量 PCR 分析表明 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 在茎膨大过程中均明显上调,而且在茎的内髓区(P2~P4)表达量均显著高于外髓区(P1),可能参与茎膨大过程中茎内髓区的细胞壁代谢。

关键词 茎用芥菜;茎瘤芥(*Brassica juncea* var. *tumida*);*BXL*;转录组;茎膨大;品质改良

中图分类号 S 637.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)06-0155-09

木聚糖是双子叶植物次生壁中主要的半纤维素成分,是由 β -1,4 木糖苷键连接 D-木糖残基为主链的复杂分子多聚糖。木聚糖的水解在一系列酶的作用下完成,其中,内切 β -1,4-木糖酶(β -1,4-endoxy-lanase, EC 3.2.1.8)和 β -D-木糖苷酶(β -D-xylosi-dase, *BXL*, EC 3.2.1.37)是水解木聚糖主链的关键酶。不溶性的木聚糖首先由内切木糖酶催化水解为较短的可溶性的低聚木糖,然后由 *BXL* 从非还原性末端进一步水解为木糖^[1-2]。*BXL* 是木聚糖完全降解的关键酶,已广泛应用于食品、能源、造纸等行业^[3-5]。目前,国内外对 *BXL* 的研究主要集中在细菌和真菌等微生物,对植物中 *BXL* 的研究较少^[1-2]。目前已从小麦粉^[1]、大麦幼苗^[6]、拟南芥的茎^[7]等植物材料中分离得到 *BXL*。多数植物 *BXL* 属于第 3 族糖苷水解酶(family 3 of glycoside hydrolases, GH3)^[6-8]。*BXL* 的氨基酸序列具有 GH3 家族保守的 N-端和 C-端催化域,其中含有可能参与底物结合的 WGR 和 KH 基序^[7-9]。*BXL* 催化低聚木糖水解的过程是一种酸碱催化反应,在其活性位点上有 2 个关键催化氨基酸残基:亲核催化的天冬氨酸(Asp)和酸碱催化谷氨酸(Glu)^[6-7,10]。

目前关于 *BXL* 家族基因在植物上的功能研究还很少。在模式植物拟南芥上 *AtBXL1* 的下调表达导致细胞壁组分改变,且果荚变小和种子变少,可能参与了细胞壁半纤维素代谢和植物发育,此外, *AtBXL1* 还受到黑暗和糖饥饿处理的诱导^[11-13]。有研究对杨树(*Populus trichocarpa*) *BXL* 家族基因进行了全基因组鉴定和表达分析,并发现氮处理可诱导 3 个 *PtBXL* 基因在上部茎干中的表达^[14]。此外,在梨(*Pyrus pyrifolia*)^[15]、草莓(*Fragaria ananassa*)^[16-17]和桃(*Prunus persica*)^[18]果实上的研究表明 *BXL* 可能参与果实成熟过程中的质地变化。

茎用芥菜属于十字花科芸薹属芥菜种的变种,包括茎瘤芥(*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee)、笋子芥(*B. juncea* var. *carassicaulis*)和抱子芥(*B. juncea* var. *gemmifera*)^[19]。芥菜是由二倍体 *B. rapa* (AA)和 *B. nigra* (BB)杂交后经自然的染色体加倍而形成的异源四倍体(AABB)物种^[20]。茎瘤芥的瘤状膨大的茎是其收获器官,可鲜食,亦是加工腌制榨菜的优异原料。茎瘤芥在发育过程中瘤状茎的膨大与光周期和温度等外界环境条件和激素

收稿日期:2020-05-28

基金项目:国家自然科学基金项目(31701928);重庆市科技局基础科学与前沿技术研究专项(cstc2017jcyjAX0226);重庆市教委科学技术研究项目(KJ1712305);长江师范学院校级科研项目(2016KYQD19 和 2016XJQN07)

赖彪,博士,讲师。研究方向:果蔬分子生物学及遗传育种。E-mail: laibiaoscau@163.com

通信作者:杜丽娜,博士,副教授。研究方向:果蔬分子生物学。E-mail: dulina05@163.com

水平如生长素、赤霉素和细胞分裂素相关^[21-22]。茎瘤芥发育过程中茎的膨大是由细胞增殖、细胞膨大和分化这些基本细胞活动参与的复杂的过程^[23]。研究表明,细胞壁代谢相关的多聚半乳糖醛酸酶(PG)和木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(XTH)在瘤状茎膨大过程中基因表达显著提高,可能在茎瘤芥茎膨大中发挥着重要的作用^[24-25]。

目前茎瘤芥基因组测序已完成,为从基因组水平研究茎瘤芥提供了重要基础^[20]。本研究利用生物信息学技术,筛选茎瘤芥 *BjuBXL* 家族基因并进行生物信息学分析,并通过实时荧光定量技术对茎瘤芥 *BjuBXL1-1/2* 基因在瘤状茎不同组织、发育阶段和部位的表达进行分析,旨在为研究 *BjuBXL* 在茎瘤芥发育中的功能提供基础,并为茎瘤芥品质改良提供候选基因。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于实时荧光定量 PCR 检测的茎瘤芥样品采自‘永安小叶’品种,9月中旬播种育苗,1个月后移植,种植于重庆涪陵区长江师范学院校内实验基地,采用正常的水肥管理。为研究 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 基因在瘤状茎不同发育阶段和茎不同部位的表达,在茎瘤芥的瘤状茎膨大过程中于瘤状茎直径 2、4、6、8 和 10 cm 五个发育阶段取样,分别标记为 D1~D5。D1 阶段取整个茎,D2~D4 阶段时取瘤状茎最大横切面 1 cm 厚度的茎组织,并从表皮到内髓等距分为 2 个部分取样,分别标记为 D2/D3/D4-P1 和 D2/D3/D4-P2。D5 阶段时取瘤状茎最大横切面 1 cm 厚度的茎组织,并从外层到内髓等距分为 4 个部分取样,分别标记为 D5-P1~D5-P4。并取其他组织样品包括:根、叶(成熟叶)、花、茎组织(D4-P2)。取样后迅速放入液氮中,置于-80℃冰箱保存。

1.2 茎瘤芥 *BjuBXL* 基因家族成员的鉴定

首先,参照文献[11],确定拟南芥中 *BXL* 基因家族成员,利用拟南芥信息资源网(TAIR, <http://www.arabidopsis.org>)提取拟南芥中的 7 个 *BXL* 家族基因的蛋白序列,利用 Blastp 软件对其在已经发布的茎瘤芥基因组中进行比对^[20],筛选出与拟南芥同源性高的 *BXL* 序列,并逐一进行序列分析和验证,最终获得茎瘤芥 *BjuBXL* 基因家族成员候选基因。

1.3 茎瘤芥 *BjuBXL* 基因家族成员的基本特性分析

利用在线软件 ExPASy (ExPASy, <http://www.expasy.org/tools/>)预测茎瘤芥 *BjuBXL* 家族成员蛋白的分子质量、等电点和亲疏水性。利用在线软件 PSORT II (<https://www.genscript.com/psort.html>)对蛋白进行亚细胞定位预测。

1.4 多重序列比对和构建系统进化树

利用 Clustal X 和 Gendoc 软件将茎瘤芥 *BjuBXL* 氨基酸序列进行多重序列比对分析。利用 Clustal X 和 MEGA 5.0 软件,通过邻接法(Bootstrap 设定为 1 000)构建茎瘤芥和拟南芥 *BXL* 系统进化树。

1.5 茎瘤芥 *BjuBXL* 基因家族的基因结构、保守基序和染色体定位分析

使用软件 TBtools 软件,根据已经发布的茎瘤芥基因组注释数据^[20],分析 *BjuBXL* 家族成员的的外显子-内含子结构和染色体定位信息^[26]。应用 MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>)^[27]预测茎瘤芥 *BXL* 的保守基序,并利用 TBtools 软件对 Motif 元件作图。

1.6 茎瘤芥 *BjuBXL* 在不同发育阶段茎的转录组中的表达分析

下载已发布的茎瘤芥不同发育阶段茎的转录组数据(SRP151320),该数据库使用的材料为‘涪杂 2 号’茎瘤芥 4 个不同膨大阶段的茎组织(Stage 1~Stage 4 直径分别为 2、4、6 和 8 cm),共 3 个生物重复^[28]。通过该转录组数据库分析茎瘤芥 *BjuBXL* 家族成员在不同发育阶段茎中的表达模式。

1.7 实时荧光定量 PCR

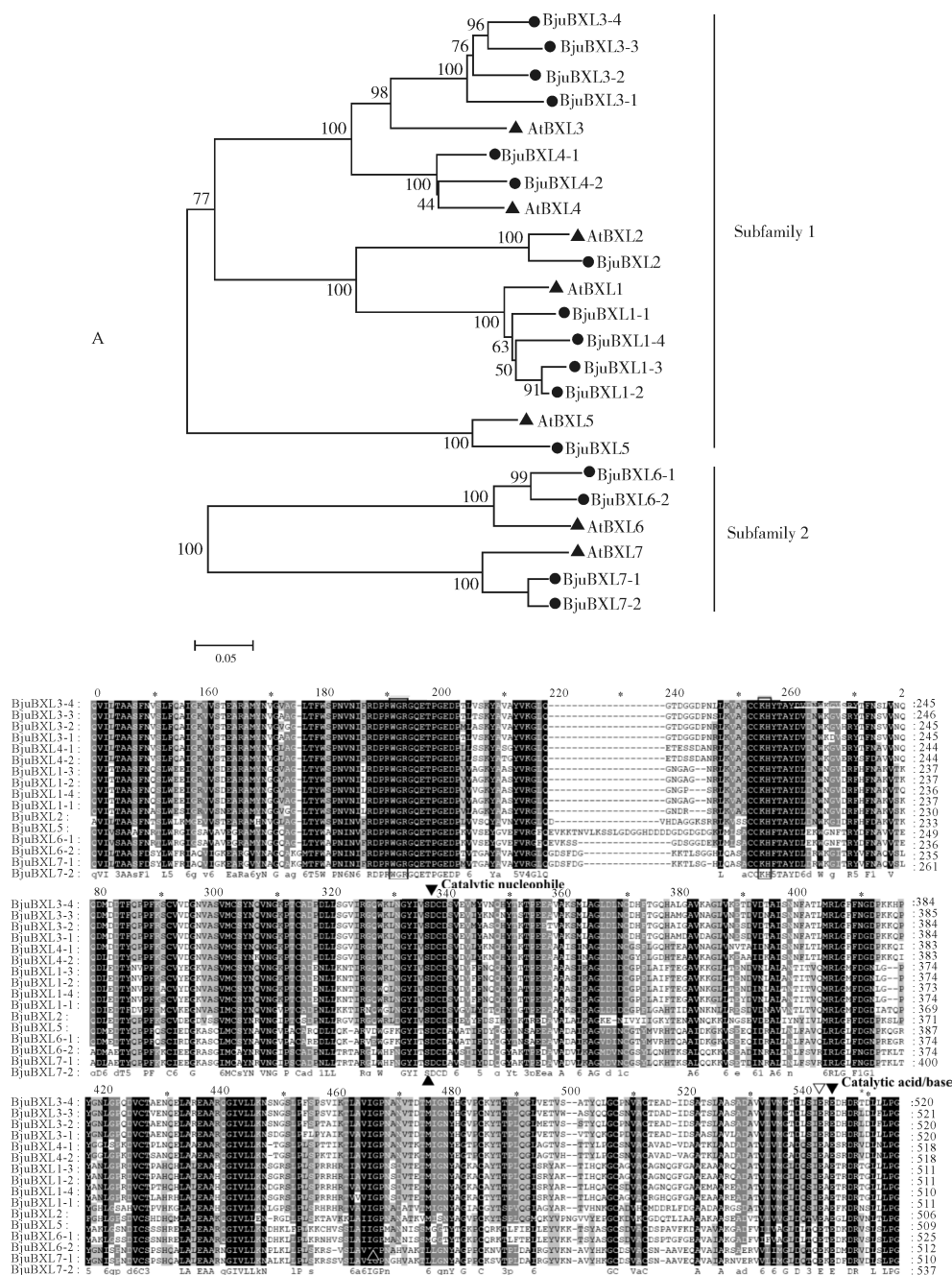
实时荧光定量 PCR 在 ABI QuantStudio 3 Real-Time PCR System 上进行,以茎瘤芥 *TUB* 基因为内参^[24],运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据分析^[29]。使用的引物如下: *BjuBXL1-1-F*: GAAGGGATTGTTGACGGAGT, *BjuBXL1-1-R*: GCCCAAGATTAGCATACGG; *BjuBXL1-2-F*: CCGAACACTCCGTTTCTGTC, *BjuBXL1-2-R*: CCACTCGTAGCCTCCAATACC; *BjuTUB-F*: GCGTCTTGTC-CGTGAGATTGC, *BjuTUB-R*: GCCGAGATGAGGTGGTTAAGGT。

2 结果与分析

2.1 茎瘤芥 *BjuBXL* 基因家族鉴定及序列分析

为鉴定茎瘤芥中 *BjuBXL* 基因家族,利用

Blastp 软件将拟南芥 *BXL* 家族基因 (*AtBXL1-7*) 的氨基酸序列在茎瘤芥基因组数据库中搜索, 共筛选到 16 个 *BjuBXL* 家族成员。将茎瘤芥 *BjuBXL* 家族成员与拟南芥 *AtBXL1-7* 进行系统进化分析, 根据其与拟南芥中 *AtBXL* 的同源关系进行排序命名 (图 1A), 与 *AtBXL1* 聚类的有 4 个 (*BjuBXL1-1~BjuBXL1-4*), 与 *AtBXL2* 聚类的有 1 个 (*BjuBXL2*), 与 *AtBXL3* 聚类的有 4 个 (*BjuBXL3-1~BjuBXL3-4*), 与 *AtBXL4* 聚类的有 2 个 (*BjuBXL4-1* 和 4-2), 与 *AtBXL5* 聚类的有 1 个 (*BjuBXL5*), 与 *AtBXL6* 聚类的有 2 个 (*BjuBXL6-1* 和 6-2), 与 *AtBXL7* 聚类也有 2 个 (*BjuBXL7-1* 和 7-2)。*BXL* 家族基因分为 2 个亚类, 亚类 1 包括: *BXL1~5*, 亚类 2 包括 *BXL6* 和 *BXL7*。



方框内为 WGR 和 KH 保守位点, 实心三角形为推测的亲核催化氨基酸残基位点 (Asp) 和酸碱催化氨基酸残基位点 (Glu), 空心三角形为推测的酸碱催化氨基酸残基替代位点 (Glu)。The redboxes indicate conserved WGR and KH motifs. Solid triangles represent the putative catalytic nucleophile (Asp) and putative catalytic acid/base (Glu). Hollow triangles represent the putative alternative catalytic acid/base residue (Glu).

图 1 *BjuBXL* 家族基因系统进化 (A) 和序列比对 (B) 分析

Fig.1 The phylogenetic tree (A) and multiple alignment (B) of *BjuBXL* gene family

16 个 *BjuBXL* 蛋白序列比对分析显示(图 1B), 它们均含有 WGR 和这 2 个参与底物结合的保守位点,此外,它们还均包含木糖水解酶 2 个保守的活性位点氨基酸残基即亲核催化氨基酸残基 Asp 和 2 个候选的酸碱催化氨基酸残基 Glu^[6-7,9]。

茎瘤芥中 *BjuBXL* 家族基因理化性质分析(表 1)显示,*BjuBXL* 家族基因的推测蛋白最短为 769 个氨基酸(*BjuBXL* 7-1, BjuA027714),最长为 984 个氨基酸(*BjuBXL* 5, BjuB025113);分子质量为 83.37~109.32 ku;等电点介于 5.44~9.01,其中有 12 个 *BjuBXL* 蛋白的等电点大于 7,偏碱性。亲疏水性均值(GRAVY)为-0.273~-0.049,均小于 0,表明 *BjuBXL* 均为亲水性蛋白;亚细胞定位预测结果显示,7 个定位于线粒体,6 个定位于内质网,2

个定位于细胞外,1 个定位于高尔基体。

2.2 茎瘤芥 *BXL* 家族基因的结构和保守基序分析

对 *BjuBXL* 的基因结构进行比较分析,结果表明,*BjuBXL* 家族基因所含外显子和内含子数量差异较大。亚类 1(*BXL* 1~5)的外显子数量较多,为 5~11 个,其中,*BjuBXL* 2 外显子数量最多,为 11 个;而亚类 2(*BXL* 6 和 *BXL* 7)中外显子数量较少,为 3~5 个(图 2)。

利用 MEME 在线网站分析 *BjuBXL* 的 Motif 元件及保守序列(图 2),结果显示:所有的 *BjuBXL* 的氨基酸序列均含有 10 个保守的 Motif 元件。保守位点 WGR 和 KH 分别位于 Motif 2 和 Motif 1,亲核催化氨基酸位点(Asp)和酸碱催化氨基酸位点(Glu)分别位于 Motif 4 和 Motif 7。

表 1 茎瘤芥 *BXL* 基因家族蛋白理化性质

Table 1 The physicochemical properties of protein of *BXL* gene family in *Brassica juncea* var. *tumida*

基因名称 Gene name	基因序号 Gene accession No.	ORF 长度/bp ORF length	蛋白质 长度/aa Protein length	蛋白质 分子质量/ku Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	亲疏水性 均值 GRAVY	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>BjuBXL</i> 1-1	BjuB037524	2 319	772	83.645	8.99	-0.072	线粒体 Mitochondrial
<i>BjuBXL</i> 1-2	BjuA005917	2 319	772	83.372	8.97	-0.073	线粒体 Mitochondrial
<i>BjuBXL</i> 1-3	BjuA005913	2 637	878	95.326	8.78	-0.128	线粒体 Mitochondrial
<i>BjuBXL</i> 1-4	BjuA031822	2 637	878	95.643	8.22	-0.126	线粒体 Mitochondrial
<i>BjuBXL</i> 2	BjuA037691	2 799	932	101.493	9.01	-0.167	细胞外 Extracellular
<i>BjuBXL</i> 3-1	BjuA027366	2 325	774	83.665	5.44	-0.049	内质网 Endoplasmic reticulum
<i>BjuBXL</i> 3-2	BjuB030523	2 325	774	83.788	8.15	-0.135	细胞外 Extracellular
<i>BjuBXL</i> 3-3	BjuB036221	2 844	947	103.049	7.02	-0.227	线粒体 Mitochondrial
<i>BjuBXL</i> 3-4	BjuB009721	2 892	963	104.692	8.47	-0.174	线粒体 Mitochondrial
<i>BjuBXL</i> 4-1	BjuA008536	2 334	777	83.525	6.74	-0.092	高尔基体 Golgi
<i>BjuBXL</i> 4-2	BjuB001802	2 901	966	104.607	7.05	-0.273	线粒体 Mitochondrial
<i>BjuBXL</i> 5	BjuB025113	2 955	984	109.318	8.44	-0.245	内质网 Endoplasmic reticulum
<i>BjuBXL</i> 6-1	BjuB009776	2 379	792	86.514	5.77	-0.174	内质网 Endoplasmic reticulum
<i>BjuBXL</i> 6-2	BjuB036142	2 337	778	84.967	5.64	-0.174	内质网 Endoplasmic reticulum
<i>BjuBXL</i> 7-1	BjuA027714	2 310	769	83.877	8.65	-0.179	内质网 Endoplasmic reticulum
<i>BjuBXL</i> 7-2	BjuB029928	2 391	796	86.743	8.68	-0.135	内质网 Endoplasmic reticulum

2.3 茎瘤芥 *BXL* 基因家族的染色体定位分析

茎瘤芥基因组包括 A(J01-J10)和 B(J11-

J18)2 个亚基因组,共 18 条染色体^[20]。利用基因组信息分析了 16 个 *BjuBXL* 家族成员在染色

图 2 *BjuBXL* 基因家族基因结构和保守位点分析Fig.2 The structure and motif analysis of *BjuBXL* gene family

体上的定位(图 3)。结果显示:15 个 *BjuBXL* 分别定位于 9 条染色体上,其中有 7 个定位于 A 亚基因组,包括 *BjuBXL1-2* 和 *BjuBXL1-3* 在 J01 号染色体上,*BjuBXL4-1* 在 J02 号染色体上,*BjuBXL3-1* 和 *BjuBXL7-1* 在 J07 号染色体上,*BjuBXL1-4* 在 J09 号染色体上和 *BjuBXL2* 在 J09 号染色体上;有 8 个定位于 B 亚基因组,*BjuBXL3-4* 和 *BjuBXL6-1* 在 J12 号染色体上,*BjuBXL5* 在 J15 号染色体上,*BjuBXL7-2* 和 *BjuBXL3-2* 在 J17 号染色体上,*BjuBXL6-2*、*BjuBXL3-3* 和 *BjuBXL1-1* 在 J18 号染色体上;而 *BjuBXL4-2* 定位于未组装到染色体上的 Scaffold00153。

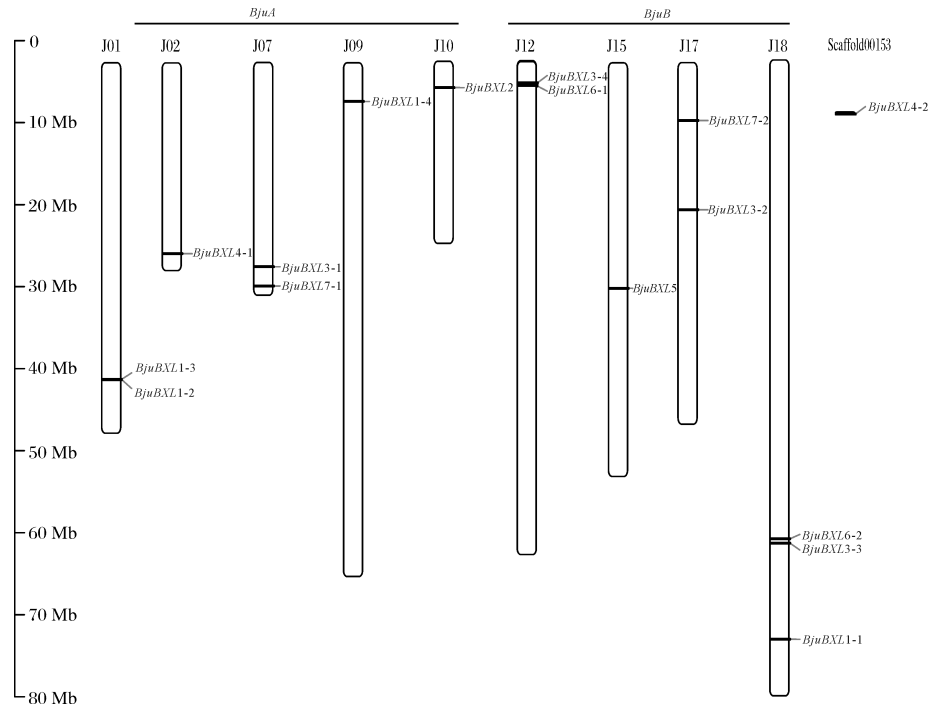
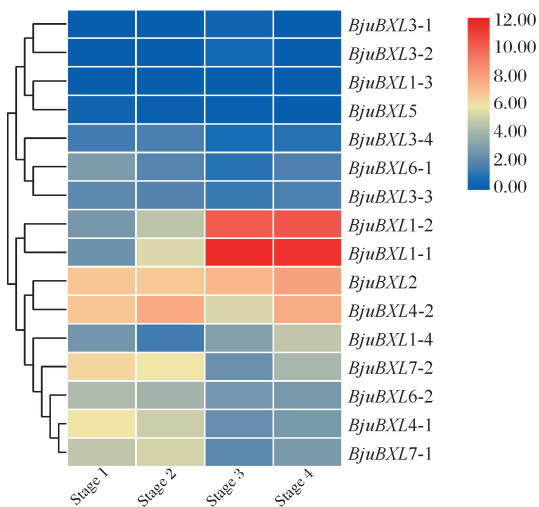
2.4 茎瘤芥 *BXL* 基因家族的表达分析

利用公开的茎瘤芥不同发育阶段茎的转录组数

据库^[28],分析 16 个 *BjuBXL* 在瘤状茎膨大过程中的表达情况(图 4)。结果显示:16 个 *BjuBXL* 的表达聚为两大类,聚类 1 包括 7 个 *BjuBXL*,它们在瘤状茎膨大过程中表达水平较低且变化不明显;聚类 2 包括 9 个 *BjuBXL*,它们在瘤状茎膨大过程中表达水平有较大变化,其中 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 在瘤状茎膨大过程中明显上调,这表明 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 可能参与茎瘤芥瘤状茎的膨大。

2.5 茎瘤芥 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 的表达分析

利用荧光定量 PCR 对 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 在茎瘤芥不同组织、茎的不同发育阶段和不同部位的表达进行了分析(图 5)。组织表达结果显示(图 5A),*BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 的组织表达模式相似,在根、叶、花、果荚和膨大的茎中均有表达,其中在花和

图 3 *BjuBXL* 基因家族染色体定位分析Fig.3 The chromosome location of *BjuBXL* gene family图 4 *BjuBXL* 基因家族在茎瘤芥不同发育阶段瘤状茎转录组中的表达热图Fig.4 Heatmap of *BjuBXL* gene expression in fourdevelopmental stages of stem in *Brassica juncea* var. *tumida*

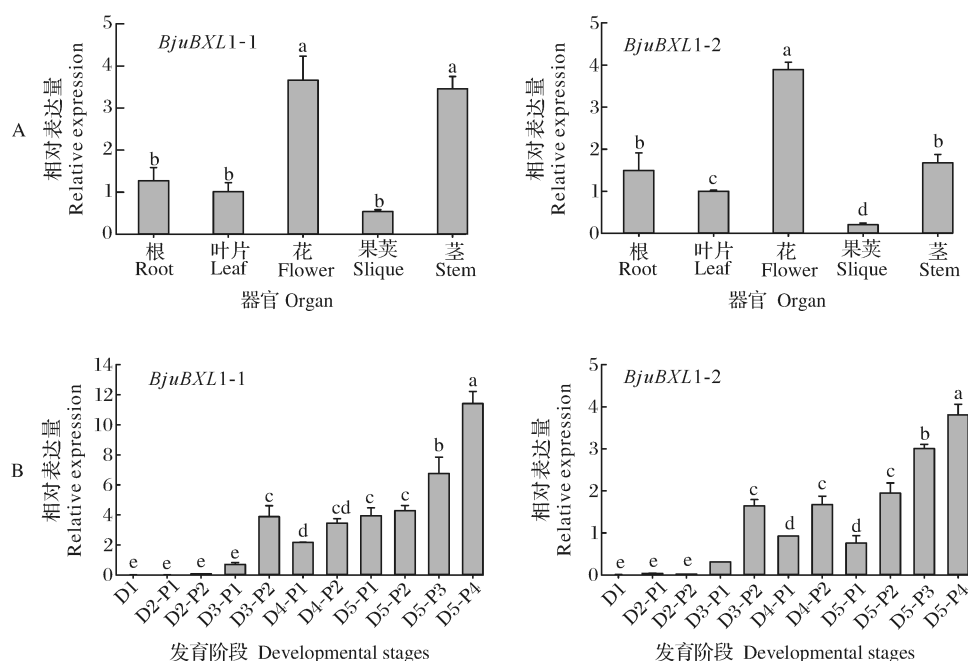
膨大的茎中表达水平较高,在果荚中表达水平最低。*BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 在茎的不同发育阶段的表达显示,随着瘤状茎的膨大,*BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 的表达均显著上调,尤其从 D3(直径为 6 cm)阶段开始显著增加,D5 阶段达到最高。在同一发育阶段茎的不同部位中的表达比较发现,*BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 的表达模式也一致,

在茎内髓区的表达均显著高于外髓区(P1),例如:*BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 在 D3-P2 中的表达分别是 D3-P1 中的 5.64 倍和 5.39 倍,在 D5-P4 中的表达分别是 D5-P1 的 2.89 倍和 5.02 倍,这表明 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 功能可能一致,参与茎瘤芥瘤状茎膨大过程中茎的内髓区的细胞代谢。

3 讨 论

我国茎瘤芥的生产主要集中在重庆、四川和浙江等省市,其中重庆是我国茎瘤芥的核心种植区和主要加工区域,2016 年种植面积达 10 万 hm^2 以上,总产量 280 万 t,茎瘤芥产业是重庆市提高农民收入和助推脱贫攻坚的重要产业之一^[30]。茎瘤芥在生长发育过程中易出现空心、先期抽薹等现象,从而影响了其产量和品质。因此,研究茎瘤芥的发育具有重要的意义。

半纤维素是植物细胞壁中的主要成分之一。BXL 负责将低聚木糖和木二糖水解为木糖单体,是细胞壁半纤维素降解的关键限速酶^[2]。目前,关于 BXL 的研究主要在微生物上,除了模式植物拟南芥和杨树外,很少对 BXL 基因家族有所研究。本研究利用生物信息学分析方法从茎瘤芥基因组数据库中鉴定到 16 个 *BjuBXL* 基因并分析了它们在茎膨大过程中的表达。



柱子上方不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters above the pillars indicate significant difference ($P < 0.05$).

图5 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 在茎瘤芥不同器官(A)、茎的不同发育阶段(B)的表达分析

Fig.5 Changes of transcription levels of *BjuBXL1-1* and *BjuBXL1-2* in different organs(A) and different developmental stages (B) in *Brassica juncea* var. *tumida*

本研究通过对拟南芥 *BXL* 家族基因在茎瘤芥基因组中进行 BLAST 分析,发现拟南芥中 *AtBXL1*~*7* 在茎瘤芥中均有 1~4 个相应的同源基因,通过系统进化分析把 *BjuBXL* 归为 7 类 (*BXL1*-*7*),2 个亚族(图 1)。Chen 等^[14]从杨树中鉴定了 10 个 *PtBXL* 家族基因也归为 2 个亚族,本研究结果与之一致。序列比对和保守基序分析发现 16 个 *BjuBXL* 在 Motif 2 和 Motif 1 上分别含有 WGR 和 KH 保守位点。在拟南芥中的研究表明该保守位点参与底物的结合^[7]。茎瘤芥属于异源四倍体(AABB),分为 A 和 B 两个亚基因组,共 18 条染色体^[20]。本研究染色体定位预测发现有 7 个 *BjuBXL* 定位于 A 亚基因组中的 5 条染色体上,8 个 *BjuBXL* 定位于 B 亚基因组的 4 条染色体上。*BjuBXL1* 和 *BjuBXL3* 均有 4 个同源基因,*BjuBXL1* 有 3 个同源基因定位于 A 亚基因组的 J01 和 J09 染色体上,另一个同源基因定位于 B 亚基因组的 J18 染色体上;*BjuBXL3* 有 1 个同源基因定位于 A 亚基因组的 J07 染色体上,其他 3 个同源基因分别定位于 B 亚基因组的 J12、J17 和 J18 染色体上。

研究表明,拟南芥中 *AtBXL1* 主要在茎组织中表达^[31]。本研究中组织表达分析显示 *BjuBXL1* 表达水平最高的组织是花和膨大的茎组织。茎瘤芥

发育过程中茎的快速膨大与果实成熟过程中的膨大有一定的相似性。有研究表明 *BXL* 参与果实质地变化,例如:在日本梨中 β -D-木糖苷酶基因 *PRXYL* 在果实成熟和采后衰老过程中积累^[15];草莓 β -D-木糖苷酶(*FaXyl1*)基因在果实成熟软化过程中表达量高并具有较高 β -木糖苷酶活性,且其表达受各种植物激素的调控^[16-17];桃 *PpXyl* 的表达与果实冷害症状的累积指标呈负相关^[18]。茎瘤芥在茎的膨大过程中进行着复杂的细胞增殖、细胞膨大和分化等细胞活动,因此,茎的膨大与细胞壁代谢相关酶密切相关^[32]。转录组数据显示茎瘤芥中 *BjuBXL1* 的 2 个同源基因 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 在茎膨大过程中明显上调。qRT-PCR 进一步验证了 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 的表达,并发现它们在茎瘤芥膨大茎的不同部位有显著差异,表现为从外层到内髓(P1~P4)其表达显著上调,这表明 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 主要参与茎瘤芥茎膨大过程中茎内髓区组织细胞壁的代谢。有研究对茎瘤芥发育过程中瘤状茎细胞分裂和核内再复制发生的时空变化进行了分析,结果表明茎瘤芥茎膨大过程中茎的外层细胞主要进行细胞增殖,而内髓区细胞通过核内再复制而增大,而且发现细胞壁重构酶基因 *BjXTH1* 和 *BjXTH2* 在核内的复制细胞中

专一地表达^[23]。*BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 在膨大茎的内髓区的表达水平最高,可能与内髓区细胞增大过程中细胞的代谢相关。本研究所使用的‘永安小叶’茎瘤芥品种的口感好,但在茎膨大过程中,茎的髓部容易出现空心现象从而影响其商品价值。*BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 在茎快速膨大过程中在中心髓部的表达显著升高是否与内髓区域的空心的发生相关,也值得进一步研究。

综上,本研究从茎瘤芥中鉴定了 16 个 *BXL* 基因,其中 *BjuBXL1-1* 和 *BjuBXL1-2* 基因在茎瘤芥的茎膨大过程中可能具有重要功能,可为进一步研究 *BXL* 在茎瘤芥发育中的作用提供科学依据。

参考文献 References

- [1] CLEEMPUT G, HESSING M, VAN OORT M, et al. Purification and characterization of a [beta]-D-xylosidase and an endo-xyylanase from wheat flour[J]. *Plant physiology*, 1997, 113(2): 377-386.
- [2] SUNNA A, ANTRANIKIAN G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria[J]. *Critical reviews in biotechnology*, 1997, 17(1): 39-67.
- [3] FUJII T, YU G, MATSUSHIKA A, et al. Ethanol production from xylo-oligosaccharides by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* expressing beta-xylosidase[J]. *Bioscience biotechnology biochemistry*, 2011, 75(6): 1140-1146.
- [4] RAGHUKUMAR C, MURALEEDHARAN U, GAUD V R, et al. Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp[J]. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2004, 31(9): 433-441.
- [5] 宫春波, 于翠芳, 张永翠. 功能性甜味剂-木糖醇的性质及其应用研究[J]. *中国食品添加剂*, 2003(5): 83-86. GONG C B, YU C F, ZHANG Y C. The researchment on health function and application in food industry of xylitol[J]. *China food additives*, 2003(5): 83-86 (in Chinese with English abstract).
- [6] LEE R C, HRMOVA M, BURTON R A, et al. Bifunctional family 3 glycoside hydrolases from barley with α -L-arabinofuranosidase and β -D-xylosidase activity[J]. *Journal of biological chemistry*, 2003, 278(7): 5377-5387.
- [7] MINIC Z, RIHOUEY C, DO C T, et al. Purification and characterization of enzymes exhibiting β -D-xylosidase activities in stem tissues of *Arabidopsis* [J]. *Plant physiology*, 2004, 135(2): 867-878.
- [8] HENRISSAT B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. *Biochemical journal*, 1991, 280(2): 309-316.
- [9] DI SANTO M C, ILINA N, PAGANO E A, et al. A Japanese plum alpha-L-arabinofuranosidase/beta-D-xylosidase gene is developmentally regulated by alternative splicing[J]. *Plant science*, 2015, 231: 173-183.
- [10] COLLINS T, GERDAY C, FELLER G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases[J]. *FEMS microbiology reviews*, 2005, 29(1): 3-23.
- [11] GOUJON T, MINIC Z, EL AMRANI A, et al. *AtBXL1*, a novel higher plant (*Arabidopsis thaliana*) putative beta-xylosidase gene, is involved in secondary cell wall metabolism and plant development[J]. *The plant journal*, 2003, 33(4): 677-690.
- [12] LEE E J, MATSUMURA Y, SOGA K, et al. Glycosyl hydrolases of cell wall are induced by sugar starvation in *Arabidopsis* [J]. *Plant and cell physiology*, 2007, 48(3): 405-413.
- [13] LEE E J, KOIZUMI N, SANO H. Identification of genes that are up-regulated in concert during sugar depletion in *Arabidopsis* [J]. *Plant, cell & environment*, 2004, 27(3): 337-345.
- [14] CHEN J Y, QU C, CHANG R, et al. Genome-wide identification of *BXL* genes in *Populus trichocarpa* and their expression under different nitrogen treatments [J/OL]. *3 Biotech*, 2020, 10: 57 [2020-05-28]. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2061-5>.
- [15] AKIHIRO ITAI K Y K T. A β -D-xylosidase-like gene is expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. *Journal of experimental botany*, 1999, 335(50): 877-878.
- [16] BUSTAMANTE C A, CIVELLO P M, MARTÍNEZ G A. Cloning of the promoter region of β -xylosidase (*FaXyl1*) gene and effect of plant growth regulators on the expression of *FaXyl1* in strawberry fruit [J]. *Plant science*, 2009, 177(1): 49-56.
- [17] MARTÍNEZ G A, CHAVES A R, CIVELLO P M. β -xylosidase activity and expression of a β -xylosidase gene during strawberry fruit ripening [J]. *Plant physiology and biochemistry*, 2004, 42(2): 89-96.
- [18] GENERO M, GISMONDI M, MONTI L L, et al. Cell wall-related genes studies on peach cultivars with differential susceptibility to woolliness: looking for candidates as indicators of chilling tolerance [J]. *Plant cell reports*, 2016, 35(6): 1235-1246.
- [19] 万正杰, 李海渤, 姚培杰, 等. 芥菜类蔬菜杂种优势利用的研究进展与展望 [J]. *华中农业大学学报*, 2018, 37(1): 115-120. WANG Z J, LI H B, YAO P J, et al. Progress and prospect of heterosis utilization in mustard (*Brassica juncea* L.) vegetables [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2018, 37(1): 115-120 (in Chinese with English abstract).
- [20] YANG J, LIU D, WANG X, et al. The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection [J]. *Nature genetics*, 2016, 48(10): 1225-1232.
- [21] XU Z, WANG Q, GUO Y, et al. Stem-swelling and photosynthate partitioning in stem mustard are regulated by photoperiod and plant hormones [J]. *Environmental and experimental botany*, 2008, 62(2): 160-167.
- [22] 陈竹君, 汪炳良, 龚兰, 等. 光周期与温度对榨菜发育的影响 [J]. *浙江农业学报*, 1997, 9(1): 10-15. CHEN Z J, WANG B L, GONG L, et al. The effect of temperature and light on development of tuber mustard [J]. *Acta agriculturae Zhejiangensis*,

- 1997,9(1):10-15(in Chinese with English abstract).
- [23] SHI H, WANG L L, SUN L T, et al. Cell division and endoreduplication play important roles in stem swelling of tuber mustard (*Brassica juncea* Coss. var. *tumida* Tsen et Lee)[J]. Plant biology, 2012, 14(6): 956-963.
- [24] LI M, XIE F, HE Q, et al. Expression analysis of *XTH* in stem swelling of stem mustard and selection of reference genes[J/OL]. Genes, 2020, 11(1): 113[2020-05-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7016721/>. DOI: 10.3390/genes11010113.
- [25] 罗天宽, 刘斌, 吴海涛, 等. 榨菜瘤状茎膨大相关基因 *orf451* 的克隆及其表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(1): 32-40. LUO T K, LIU B, WU H T, et al. The cloning and expression of gene *orf451* related with swelling of tumor-like stems in tuber mustard (*Brassica juncea* var. *tumida*)[J]. Journal of agricultural biotechnology, 2015, 23(1): 32-40(in Chinese with English abstract).
- [26] CHEN C J, CHEN H, HE Y H, et al. TBtools, a toolkit for biologists integrating various HTS-data handling tools with a user-friendly interface[J/OL]. BioRxiv, 2018: 289660[2020-05-28]. <https://doi.org/10.1101/289660>.
- [27] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J/OL]. Nucleic acids research, 2009, 37(suppl 2): W202-W208[2020-05-28]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>.
- [28] LI M H, SUN B, XIE F J, et al. Identification of the GRAS gene family in the *Brassica juncea* genome provides insight into its role in stem swelling in stem mustard[J/OL]. Peer J, 2019, 7: e6682[2020-05-28]. <https://doi.org/10.7717/peerj.6682>.
- [29] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nature protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [30] 刘义华, 莫言玲, 曾静, 等. 茎瘤芥特晚熟种质资源的鉴定与筛选[J]. 中国瓜菜, 2019, 32(10): 68-71. LIU Y H, MO Y L, ZENG J, et al. Identification and screening of the especially late-maturing tumorous stem mustard resources [J]. China cucurbits and vegetables, 2019, 32(10): 68-71 (in Chinese with English abstract).
- [31] DECOU R, LHERNOULD S, LAURANS F, et al. Cloning and expression analysis of a wood-associated xylosidase gene (*Pt-aBXL1*) in poplar tension wood[J]. Phytochemistry, 2009, 70(2): 163-172.
- [32] LI Y, JONES L, MCQUEEN-MASON S. Expansins and cell growth[J]. Current opinion plant biology, 2003, 6(6): 603-610.

Genome-wide identification of *BXL* family genes in *Brassica juncea* var. *tumida* and their expression during swelling of stem

LAI Biao, CHEN Chunfan, LIU Chunyu, ZHU Chunzhen, DU Li'na

School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University,
Chongqing 408100, China

Abstract In order to further analyze the functions of *BXL* family genes in the development of stem, 16 genes encoding putative *BXL* proteins were identified in the whole genome of *Brassica juncea* var. *tumida* with bioinformatics methods. The gene structure and conserved motifs, chromosomal distribution and gene expression during the swelling of stem of *BjuBXL* family genes and the physicochemical properties of *BjuBXL* family protein were systematically analyzed. The results showed that 16 *BjuBXL* genes were classified into 7 categories and 2 sub-families according to the phylogenetic tree analysis, among which *BjuBXL1-1*, *BjuBXL1-2*, *BjuBXL1-3* and *BjuBXL1-4* are closely related to *AtBXL1*, which is involved in cell wall metabolism and plant development in Arabidopsis. 7 *BjuBXL* genes were located in 5 chromosomes of A subgenomes and 8 *BjuBXL* genes are located in 4 chromosomes of B subgenomes. The results of fluorescence quantitative PCR analyses showed that the transcriptional levels of *BjuBXL1-1* and *BjuBXL1-2* were up-regulated obviously during the swelling of stem. The expression in the inner pith (P2-P4) were significantly higher than that in regions of the outer pith of swollen stem (P1), indicating that *BjuBXL1-1* and *BjuBXL1-2* may play an essential role in the cell wall metabolism of inner pith during the swelling of stem.

Keywords stem mustard; *Brassica juncea* var. *tumida*; *BXL*; gene expression; stem swelling; quality improvement

(责任编辑: 张志钰)