

烟草 CYP71D 亚家族的生物信息学分析

王 蕾^{1,2}, 赵泽玉^{1,2}, 陈明丽¹, 龚达平^{1*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要: 细胞色素 P450 (CYP450) 是一类超基因家族编码的多功能氧化酶, 在生物合成、代谢解毒及植物防御方面具有重要作用。其中 CYP71D 属于 CYP450 的一个亚家族, 主要在次生代谢物合成和病虫害防御方面起作用。为了更好地了解烟草 CYP71D 亚家族基因特征和功能, 本研究利用生物信息学分析手段及烟草转录组数据, 对 CYP71D 亚家族基因的结构和表达等进行了分析。结果发现, 在烟草中共有 42 个 CYP71D 亚家族成员, 各成员在染色体上并非均匀分布, 其氨基酸长度和等电点差异较大, 但基因结构、保守结构域数目和分布高度一致; 二级结构分析表明, 烟草 CYP71D 亚家族成员具备 P450 蛋白特征结构域; 基因表达模式分析显示, 多数 CYP71D 基因在根、叶、花中特异表达, 大部分基因参与了 IAA 激素、黑胫病、温度等逆境胁迫反应。这为烟草 CYP71D 亚家族基因功能的深入研究及烟草抗逆品种的培育奠定了基础。

关键词: 烟草; CYP71D 亚家族; 生物信息学分析

Bioinformatic Analysis of CYP71D Subfamily Genes in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

WANG Lei^{1,2}, ZHAO Zeyu^{1,2}, CHEN Mingli¹, GONG Daping^{1*}

(1. Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Cytochrome P450 (CYP450) is a supergene family which encodes multifunctional oxidase, playing an important role in biosynthesis, metabolic detoxification, and plant defense. In CYP450 family, the CYP71D subfamily genes mainly function in secondary metabolite synthesis and pest control. In order to better understand the genetic characteristics and functions of tobacco CYP71D subfamily genes, their gene structure and expression pattern were analyzed by bioinformatics tools and transcriptome data. The results showed that there are 42 members in tobacco CYP71D subfamily and they were distributed on the chromosome unevenly. Besides, their amino acid lengths and isoelectric points were quite different, while their gene structure and conserved-domain distribution were highly consistent. The secondary structure analysis showed that CYP71D subfamily members contained the typical conserved domains in P450 proteins. The gene expression pattern analysis showed that most CYP71D genes were specifically expressed in roots, leaves and flowers, and some of them were induced by various elicitors, including phytohormone IAA, temperature and black shank. This study contributes to further researches in the function of CYP71D subfamily genes and breeding for stress-resistant tobacco cultivars.

Keywords: tobacco; CYP71D subfamily; bioinformatics analysis

细胞色素 P450 (cytochrome P450) 是一类以血红素为辅基的 B 族细胞色素超家族蛋白酶, 经过进化扩张形成, 广泛存在于各种动物、植物、真菌和细菌中, 是植物代谢中最大的酶家族^[1]。1969 年 FREAR^[2] 首次在棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) 发现 P450s, 随后陆续在其他多种植物中发现了 P450s, 如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.)^[3], 水稻 (*Oryza sativa* L.)^[4], 苜蓿 (*Medicago sativa* L.)^[5], 菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.)^[6] 等。目前已从植物中发现了

127 个 P450 基因家族, 分为 11 个簇, 包括单家族簇和多家族簇。CYP71 簇 (简称 71 clan) 是一个多家族簇, 包含 CYP71、CYP82、CYP93 等多个家族, 覆盖了超过半数的 P450 基因^[7-8]。CYP71D 亚家族则位于 CYP71 簇的 CYP71 家族。

植物 P450 的功能主要归为两大类, 一类参与植物次生代谢物质的合成, 如苯丙烷、萜类、植物激素类、黄酮类、木质素和生物碱等^[9]; 一类参与解毒途径, 催化外源化合物如除草剂、杀虫剂等变

基金项目: 中国烟草总公司科技重大专项项目“K326 和红花大金元品种蚜虫抗性的定向改良” [110201801024(JY-01)]

作者简介: 王 蕾 (1994-), 女, 硕士研究生, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: wanglei941220@163.com

*通信作者, E-mail: gongdaping@caas.cn

收稿日期: 2019-10-16

修回日期: 2020-01-02

成非毒性物质^[10]。CYP71D 亚家族在植物中主要参与生物碱类、萜类、黄酮类等抗病原物有关次生代谢物的合成。辣椒 *CYP71D19* (AF122821)形成的产物在病菌侵染果实表皮时起保护作用^[11]；烟草 *CYP71D20* 能体外催化 5-非手性-马兜铃烯(5-epi-aristolochene)和 1-脱氧衣壳二醇(1-deoxycapsidiol)形成萜类植保素-甜椒素^[12]；烟草腺毛中的 *CYP71D16* 能催化叶面香气物质西柏三烯二醇的合成^[13-16]，但并不受外源 MeJA 的诱导^[17]。

烟草是重要的经济作物，也是重要模式植物之一。解敏敏等^[18]从烟草基因组中鉴定了 44 个 P450 家族，共 263 个成员，并分析了 P450 基因在各个组织的表达情况，但对烟草 CYP71D 亚家族基因功能的研究还不够详细。本研究采用生物信息学的方法从烟草基因组中鉴定了 42 个 CYP71D 基因，并分析了 CYP71D 亚家族成员的基因结构、二级元件及表达模式，以期对烟草 CYP71D 基因的功能研究及抗病虫品种的培育提供参考。

1 材料与方法

1.1 烟草 CYP71D 亚家族成员的鉴定及理化性质分析

从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 P450 家族种子序列 (Pfam ID: PF00067)，用 HMMER3.0 检索烟草 K326 蛋白数据库^[19] (<https://solgenomics.net/>)，获得候选 P450 蛋白。将其与番茄 P450 家族 (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>) 比对得到候选烟草 CYP71D 蛋白序列^[20]。利用 ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析烟草 CYP71D 亚家族成员的氨基酸长度、分子量和等电点等理化性质。

1.2 烟草 CYP71D 亚家族基因结构、保守结构域和二级结构元件分析

利用 MEGA 7.0 对 CYP71D 亚家族基因进行多序列比对构建邻接进化树。利用基因预测信息分析 CYP71D 亚家族成员基因结构，利用 MEME (<http://meme-suite.org/>) 预测分析 CYP71D 亚家族成员蛋白序列的保守结构域，使用 TBtools 软件进行可视化。以 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 获得的拟南芥 *AtAOS* (*CYP74A*) 的

结构信息为模板分析 CYP71D 亚家族成员的二级结构。

1.3 烟草 CYP71D 亚家族基因表达模式聚类分析

从 NCBI SRA 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) 下载烟草转录组 (RNA-seq) 数据，包括 TN90 各个组织 (根、茎、幼叶、成熟叶、衰老叶、未成熟花、成熟花、衰老花和果实)；在 H₂O 和 IAA 中处理 24 和 72 h 的南江 3 号种子；感染黑胫病 12、72 h 的红花大金元成熟茎组织；高温、中温、低温胁迫下 20、40、60 d 云烟 87 的根和叶组织；4 °C 处理 0、4、24、48 h 的 NC567 和台烟 8 号叶组织。利用 TopHat2^[21] 和 Cufflink 程序分析转录组数据并计算表达量，使用 pheatmap 程序绘制热图。

2 结果

2.1 烟草 CYP71D 亚家族成员的鉴定及理化性质分析

应用 HMMER3.0 软件检索烟草 K326 蛋白数据库，共获得 639 条候选 P450 蛋白序列。将其与番茄每个亚家族 P450 蛋白序列比对，鉴定了烟草 CYP71D 亚家族中 93 个成员。剔除过短片段 (氨基酸序列 < 350) 和不包含 K 螺旋 (ExxR) 及血红素结合域 (FxxGxxxCxG) 的蛋白^[22]，最终得到 42 个烟草 CYP71D 亚家族成员 (表 1)。烟草 CYP71D 基因在 17 条染色体上并非随机分布。其中 22 号染色体上分布数量最多，有 10 个基因。在 scaffold Nitab4.5_0000390 上有 4 个 CYP71D 基因串联分布，在 scaffold Nitab4.5_0001182、Nitab4.5_0001264、Nitab4.5_0004164、Nitab4.5_0006052 和 Nitab4.5_0008401 上分别有 2 个 CYP71D 基因串联分布。对烟草 CYP71D 亚家族成员理化性质分析发现，除 *Nitab4.5_0000163g0260.1* 外，其他成员氨基酸长度在 417~559 aa 之间，分子量介于 47~63 kD 左右，理论等电点在 6.39~9.44 之间 (表 1)。

2.2 烟草 CYP71D 亚家族基因结构与保守结构域分析

系统进化分析和基因结构分析显示 (图 1)，烟草 CYP71D 亚家族大部分成员只有一个内含子，小部分成员包含多个内含子，多由较长的 2 个外显子和几个非常短的外显子组成。CYP71D 亚家族成员间基因结构与进化距离存在紧密联系，亲缘关系

越近则基因结构越相似,内含子大小越接近。利用 MEME 搜索烟草 CYP71D 亚家族成员的保守基序显示,亚家族成员保守基序(motif)的种类、数目和分布高度一致^[23]。其中,31 个含有全部 10 个保守基序,11 个存在 1~3 个保守基序的缺失。

2.3 烟草 CYP71D 亚家族二级结构预测及分析

以拟南芥 *AtAOS (CYP74A)* 基因的二级结构为模板,对烟草 CYP71D 基因的二级结构分析表明(图 2),所有 CYP71D 家族蛋白序列中都含有 P450 蛋白典型的保守结构域,包括 PERF 结构域(PxRx)、

K 螺旋(ExxR)和 C 末端的血红素结合域(FxxGxxxCxG)。血红素结合域是鉴定 P450 蛋白的主要特征结构,该结构域中存在与铁元素形成硫醇盐离子键的绝对保守的半胱氨酸残基(Cys),K 螺旋中的谷氨酸(Glu)和精氨酸(Arg)也绝对保守^[24],参与 P450 核心结构的稳定,与 PERF 结构域形成盐桥发生相互作用。6 个底物识别位点(substrate recognition sites, SRS)^[25]通过诱导-契合机制识别底物,与底物结合参与随后的催化反应,这些可变区域存在较大差异。

表 1 烟草 CYP71D 基因的理化特性及在 scaffold、染色体位置

Table 1 Physicochemical properties of the genes of CYP71D subfamily and their location in scaffold, chromosome

编号 Number	序列号 Gene_number	氨基酸数目 Number of amino acids	分子量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	Scaffold 号 Scaffold_number	Scaffold 位置 Location in scaffold	染色体位置 Location in chromosome
1	<i>Nitab4.5_0000970g0040.1</i>	504	57925.03	8.08	Nitab4.5_0000970	85925~84295	Nt01
2	<i>Nitab4.5_0009464g0010.1</i>	434	49264.21	9.23	Nitab4.5_0009464	9115~7481	Nt01
3	<i>Nitab4.5_0000256g0030.1</i>	512	58334.62	8.58	Nitab4.5_0000256	166454~168673	Nt04
4	<i>Nitab4.5_0002717g0030.1</i>	486	54947.92	8.53	Nitab4.5_0002717	128043~129699	Nt04
5	<i>Nitab4.5_0002046g0040.1</i>	523	59484.43	8.56	Nitab4.5_0002046	19904~18208	Nt06
6	<i>Nitab4.5_0003571g0010.1</i>	506	57792.20	8.01	Nitab4.5_0003571	235904~237647	Nt06
7	<i>Nitab4.5_0003352g0010.1</i>	450	51088.83	8.74	Nitab4.5_0003352	124509~122715	Nt07
8	<i>Nitab4.5_0000163g0260.1</i>	655	74885.07	9.42	Nitab4.5_0000163	1138701~1134673	Nt08
9	<i>Nitab4.5_0004164g0040.1</i>	520	58948.83	8.99	Nitab4.5_0004164	244244~246539	Nt09
10	<i>Nitab4.5_0004164g0050.1</i>	505	57707.14	7.99	Nitab4.5_0004164	166981~169800	Nt09
11	<i>Nitab4.5_0005524g0030.1</i>	493	55931.39	9.44	Nitab4.5_0005524	51214~55501	Nt11
12	<i>Nitab4.5_0001461g0070.1</i>	504	57085.33	7.16	Nitab4.5_0001461	293185~294853	Nt13
13	<i>Nitab4.5_0020114g0010.1</i>	489	55483.60	8.98	Nitab4.5_0020114	1620~32	Nt13
14	<i>Nitab4.5_0000977g0140.1</i>	509	58298.79	8.89	Nitab4.5_0000977	657117~659268	Nt14
15	<i>Nitab4.5_0000532g0010.1</i>	499	56554.94	6.92	Nitab4.5_0000532	10413~12185	Nt15
16	<i>Nitab4.5_0002328g0040.1</i>	502	57108.36	8.09	Nitab4.5_0002328	367461~370247	Nt16
17	<i>Nitab4.5_0003031g0010.1</i>	505	57697.54	7.19	Nitab4.5_0003031	66656~68287	Nt16
18	<i>Nitab4.5_0004646g0010.1</i>	559	63071.00	8.93	Nitab4.5_0004646	45798~48127	Nt16
19	<i>Nitab4.5_0008809g0010.1</i>	417	47217.54	6.39	Nitab4.5_0008809	84564~86338	Nt16
20	<i>Nitab4.5_0000188g0200.1</i>	503	56830.28	9.03	Nitab4.5_0000188	883791~885738	Nt17
21	<i>Nitab4.5_0009556g0010.1</i>	466	53430.82	9.35	Nitab4.5_0009556	8589~6628	Nt17
22	<i>Nitab4.5_0008401g0010.1</i>	497	56533.47	8.48	Nitab4.5_0008401	102506~100880	Nt18
23	<i>Nitab4.5_0008401g0020.1</i>	467	52687.39	7.95	Nitab4.5_0008401	78652~75372	Nt18
24	<i>Nitab4.5_0000390g0020.1</i>	527	60060.43	7.69	Nitab4.5_0000390	123229~125499	Nt19
25	<i>Nitab4.5_0000390g0050.1</i>	468	53602.88	9.12	Nitab4.5_0000390	574838~572704	Nt19
26	<i>Nitab4.5_0000390g0090.1</i>	543	62147.19	7.96	Nitab4.5_0000390	850447~852807	Nt19
27	<i>Nitab4.5_0000390g0100.1</i>	497	57034.42	9.02	Nitab4.5_0000390	830171~828011	Nt19
28	<i>Nitab4.5_0000470g0190.1</i>	508	57761.00	7.00	Nitab4.5_0000470	810299~812156	Nt19
29	<i>Nitab4.5_0000418g0010.1</i>	511	58358.34	8.68	Nitab4.5_0000418	182018~183963	Nt22
30	<i>Nitab4.5_0001182g0050.1</i>	502	57144.39	8.54	Nitab4.5_0001182	445316~448276	Nt22
31	<i>Nitab4.5_0001182g0070.1</i>	499	56820.16	8.97	Nitab4.5_0001182	594636~591900	Nt22
32	<i>Nitab4.5_0002188g0020.1</i>	499	56326.62	7.96	Nitab4.5_0002188	366998~368571	Nt22
33	<i>Nitab4.5_0005698g0010.1</i>	456	52046.61	9.08	Nitab4.5_0005698	183364~185556	Nt22
34	<i>Nitab4.5_0006052g0010.1</i>	497	56970.37	8.67	Nitab4.5_0006052	109038~111096	Nt22
35	<i>Nitab4.5_0006052g0040.1</i>	497	56962.26	8.84	Nitab4.5_0006052	77967~75815	Nt22
36	<i>Nitab4.5_0006713g0010.1</i>	511	58008.43	7.71	Nitab4.5_0006713	52743~55664	Nt22
37	<i>Nitab4.5_0008489g0010.1</i>	544	62271.34	8.79	Nitab4.5_0008489	52588~50310	Nt22
38	<i>Nitab4.5_0010289g0010.1</i>	512	58228.21	7.19	Nitab4.5_0010289	22779~20585	Nt22
39	<i>Nitab4.5_0000543g0130.1</i>	474	54213.98	6.39	Nitab4.5_0000543	511866~510006	Nt23
40	<i>Nitab4.5_0000919g0090.1</i>	505	57953.36	8.53	Nitab4.5_0000919	663076~661471	Nt23
41	<i>Nitab4.5_0001264g0060.1</i>	509	58084.64	8.33	Nitab4.5_0001264	146855~145195	Nt24
42	<i>Nitab4.5_0001264g0080.1</i>	509	57927.83	9.07	Nitab4.5_0001264	214338~212670	Nt24

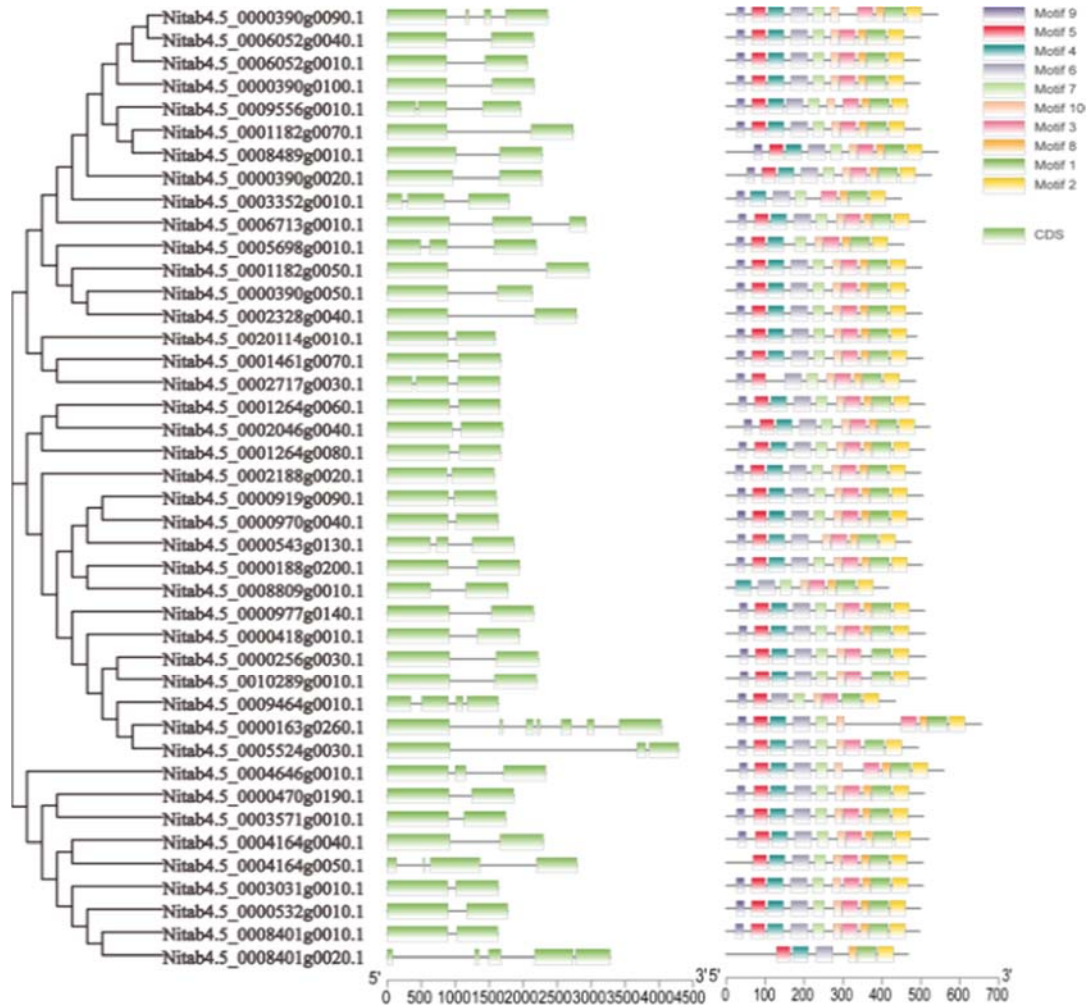


图 1 烟草 CYP71D 亚家族基因结构与保守结构域比较

Fig. 1 Comparison of gene structure and conserved motifs of CYP71D subfamily members in tobacco

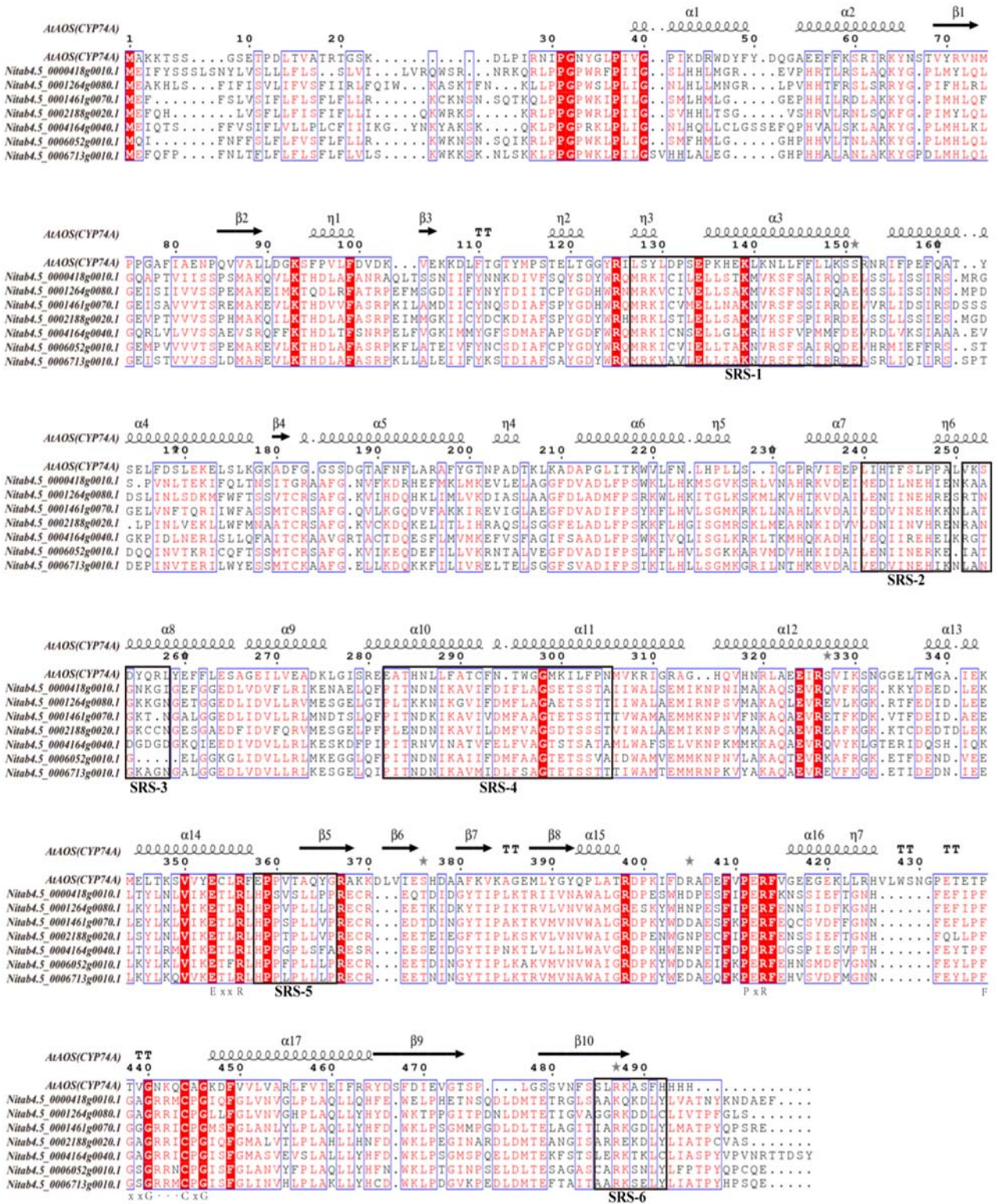
2.4 烟草 CYP71D 亚家族基因表达模式分析

烟草不同组织及诱导胁迫下的CYP71D基因表达数据聚类分析显示,烟草 CYP71D 基因的表达模式大致分为 6 个不同的类群,如图 3 所示。第 1 类基因,除 *Nitab4.5_0005698g0010.1* 受温度胁迫在根和叶中表达外,其他基因主要在花中表达。第 2 类基因,部分具有组织特异性表达,如 *Nitab4.5_0000418g0010.1* 和 *Nitab4.5_0001264g0080.1* 仅在衰老花中特异表达,并且 *Nitab4.5_0000418g0010.1* 在黑胫病感染的茎组织中表达量上调 *Nitab4.5_0001264g0080.1* 在 IAA 中吸胀 24 h 和未经处理萌发 72 h 的种子中高表达; *Nitab4.5_0000977g0140.1* 在未经处理的休眠种子中特异表达,在 H₂O 和 IAA 中吸胀后萌发 72 h 的种子中表达量较高;该类剩余其他基因在所有组织中都几乎不表达。第 3 类基因,在根、休眠种子中表达量较高,受 IAA、温度和黑胫病菌胁迫调控。第

4 类基因可能是参与温度响应的基因,在根中的表达受温度胁迫调控。第 5 类基因主要在叶和根组织中表达,受温度、黑胫病菌诱导。第 6 类基因,可能是参与胁迫应答的基因,受 IAA、黑胫病菌、温度等多个因素诱导调控,在休眠种子和根中高表达。

3 讨论

本研究利用生物信息学方法,从烟草基因组中鉴定得到了 42 个 CYP71D 亚家族成员。相比番茄基因组中 16 个 CYP71D 基因^[26],烟草 CYP71D 基因的数目是番茄的 2.6 倍,这可能是由于烟草为异源四倍体,大多数基因包含两个拷贝。CYP71D 基因在染色体上并非均匀分布,一半成员成簇分布,这可能是基因复制的结果^[27]。CYP71D 亚家族成员间内含子保守情况与进化相关^[28],烟草 CYP71D 亚家族中大多数成员只有一个内含子,进化距离越近,内含子长度越接近,基因结构越相似。

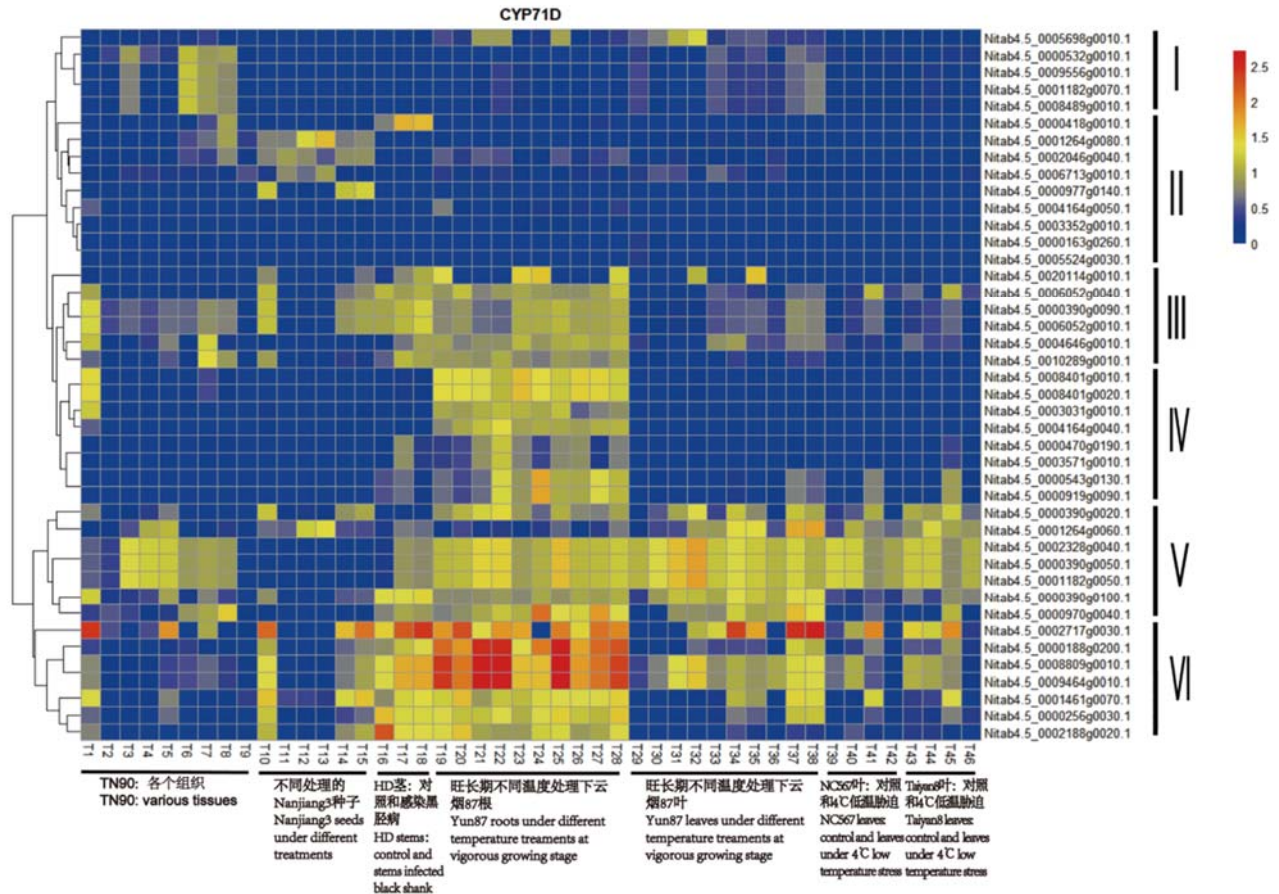


注：第一行基于 *AtAOS* 的结构标注烟草代表性 P450 蛋白的二级结构元件，包括 α 螺旋， β 折叠；红色覆盖区表示严格一致性的序列；黑框表示预测的 SRS 区域。

Note: The first line is labeled secondary structure elements of representative proteins of CYP71D subfamily in tobacco based on the structure of *AtAOS*, including alpha helix, beta folding. The red cover regions represent sequences possessing consistent sequences. The black frames represent predicted SRS region.

图 2 烟草代表性 CYP71D 蛋白和拟南芥 *AtAOS* 的多序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of representative proteins from CYP71D subfamily in tobacco and *Arabidopsis thaliana*



注: T1~T9, TN90 根、茎、幼叶、成熟叶、衰老叶、未成熟花、成熟花、衰老花和果实; T10~T12, 南江3号休眠种子对照、在 H₂O 中吸胀 24 h, 在 IAA 中吸胀 24 h; T13~T15, 南江3号萌发种子对照, 在 H₂O 吸胀 24 h, 在 IAA 吸胀 24 h; T16~T18, 未感染及感染黑胥病 12、72 h 的红花大金元成熟茎; T19~T28, 旺长期不同温度处理下云烟 87 根 (对照, 较高温 20、40、60 d, 中温 20、40、60 d, 较低温 20、40、60 d); T29~T38, 旺长期不同温度处理下云烟 87 叶 (对照, 较高温 20、40、60 d, 中温 20、40、60 d, 较低温 20、40、60 d); T39~T42, 4 °C 处理 0、4、24、48 h 的 NC567 叶; T43~T46, 4 °C 处理 0、4、24 和 48 h 的台烟 8 号叶。

Note: T1-T9, TN90 tissues from roots, stems, young leaves, mature leaves, senescent leaves, immature flowers, mature flowers, senescent flowers and capsules; T10-T12, Nanjiang3 dormant seeds (control, seeds imbibed in H₂O for 24 h, seeds imbibed in IAA for 24 h); T13-T15, Nanjiang3 seeds germinated (control, seeds imbibed in H₂O for 24 h, seeds imbibed in IAA for 24 h); T16-T18, HD mature stems uninfected and infected black shank for 12, 72 h; T19-T28, Yun87 roots under different temperature treatments at vigorous growing stage (control, higher temperature for 20 d, 40 d, 60 d, medium temperature for 20, 40, 60 d, lower temperature for 20, 40, 60 d); T29-T38, Yun87 leaves under different temperature treatments at vigorous growing stage (control, higher temperature for 20, 40, 60 d, medium temperature for 20, 40, 60 d, lower temperature for 20, 40, 60 d); T39~T42, NC567 leaves were treated at 4 °C for 0, 4, 24, 48 h; T43~T46, Taiyan8 leaves were treated at 4 °C for 0, 4, 24, 48 h.

图3 烟草 CYP71D 亚家族基因表达模式的聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis of the expression pattern of genes of the CYP71D subfamily in tobacco

P450 功能的多样性是为了适应各种组织不同代谢途径和环境胁迫进化的结果。大多数进化距离较近的 CYP71D 亚家族成员在表达谱特征上也比较相似, 说明他们可能具有类似的功能。大多数 P450 基因在植物各组织中表达量较低, 特别是一些参与内源信号分子代谢途径的 P450 基因, 受外界生物与非生物胁迫诱导时才响应表达。烟草 CYP71D 基因的表达模式分析表明, CYP71D 亚家族基因在 IAA 诱导、黑胥病和温度胁迫下, 表达量发生不同程度的上调或下调, 该 CYP71D 家族可能主要参与外界胁迫应答反应。

休眠种子和萌发种子中 CYP71D 基因的表达模式完全相反。CYP71D 基因在生长素响应的种子次生休眠过程中可能参与了黄酮醇生物合成、赤霉素代谢等, 在生长素响应的种子萌发过程中可能参与了脱落酸、生长素、茉莉酸和水杨酸介导的激素信号通路^[29]。在黑胥病菌诱导下, 烟草 CYP71D 亚家族有近一半的基因表达量发生变化。李立芹等^[30]、苏振刚等^[31]运用抑制性消减杂交技术 (SSH) 筛选的黑胥病抗性相关的差异表达基因中也包含了 P450 基因。此外, 在烟草抗黑胥病过程中发现有 5 个 miRNA 的靶基因编码细胞色素 P450^[32-33]。这表

明 P450 基因在烟草对黑胥病的抗病过程中起着非常重要的作用。当烟草根和叶受冷热胁迫时, 显著影响烟草生理特征^[34]。本研究中分别有约 1/2 和 1/3 的 CYP71D 基因表达量发生变化。已有研究表明, 在多年生黑麦草和高羊茅中, CYP71 家族基因参与温度胁迫响应^[35]。茶树在冷热胁迫下, CYP71A26 基因表达量下降, 而 CYP71B34 表达量上升^[36]。本研究还发现, 烟草部分 CYP71D 成员受多种逆境胁迫和激素响应均出现表达量明显变化, 这些基因具体的分子调控机理还有待进一步研究。

4 结 论

本研究通过生物信息学方法从烟草基因组中鉴定出 42 个 CYP71D 亚家族基因, 这些基因在染色体上并非均匀分布, 理化性质差异较大, 但基因结构和保守结构域高度一致。表达模式分析表明, CYP71D 亚家族大部分基因参与 IAA 诱导、黑胥病和温度等胁迫过程, 可能在植物防御反应方面具有重要的作用。这为 CYP71D 亚家族基因功能的深入研究和抗逆烟草品种的培育提供了参考。

参考文献

- [1] DANIÈLE W R, RENÉ F. Cytochromes P450: a success story[J]. *Genome Biology*, 2000, 1(6): 1-9.
- [2] FREAR D S, SWANSON H R, TANAKA F S. N-Demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton[J]. *Phytochemistry*, 1969, 8(11): 2157-2169.
- [3] MAO G, SEEBECK T, SCHRENKER D, et al. CYP709B3, a cytochrome P450 monooxygenase gene involved in salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13(1): 169.
- [4] KAIFA W, HUIQIN C. Global identification, structural analysis and expression characterization of cytochrome P450 monooxygenase superfamily in rice[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 35.
- [5] LI L, CHENG H, GAI J, et al. Genome-wide identification and characterization of putative cytochrome P450 genes in the model legume *Medicago truncatula*[J]. *Planta*, 2007, 226(1): 109-123.
- [6] SHAIENDAR K M, SRIKIRAN C S, BABU P R, et al. Classification of cytochrome P450s in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2015, 301(1): 211-216.
- [7] NELSON D, DANIÈLE W R. A P450-centric view of plant evolution[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(1): 194-211.
- [8] NELSON D R. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1814(1): 14-18.
- [9] 解敏敏. 烟草重要基因篇: 8. 烟草 P450 基因[J]. *中国烟草科学*, 2015, 36(2): 118-120.
XIE M M. Important genes of tobacco: 8. Tobacco P450 gene[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2015, 36(2): 118-120.
- [10] MOORE M T, KRÖGER R. Effect of three insecticides and two herbicides on rice (*Oryza sativa*) seedling germination and growth[J]. *Archives of Environmental Contamination & Toxicology*, 2010, 59(4): 574-581.
- [11] OH B, KO M K, KIM Y, et al. A cytochrome P450 gene is differentially expressed in compatible and incompatible interactions between pepper (*Capsicum annuum*) and the anthracnose fungus, *colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, 12(12): 1044-1052.
- [12] RALSTON L, KWON S T, SCHOENBECK M, et al. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-epiaristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*)[J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2001, 393(2): 222-235.
- [13] WANG E M, WANG R, DEPARASIS J, et al. Suppression of a P450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(4): 371-374.
- [14] 向章敏, 唐远驹, 郑少清, 等. 不同晾晒烟品种西柏烷二萜醇的研究[J]. *中国烟草科学*, 2015, 36(5): 53-58.
XIANG Z M, TANG Y J, ZHENG S Q, et al. Study on cembrenediol content in different cultivars of sun-cured tobacco[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2015, 36(5): 53-58.
- [15] 何康, 张怀宝, 杜咏梅, 等. 超临界 CO₂ 萃取烟花中西柏三烯二萜工艺研究[J]. *中国烟草科学*, 2017, 38(2): 81-87.
HE K, ZHANG H B, DU Y M, et al. Studying of supercritical CO₂ extraction of cembratriene-diols from tobacco flowers[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2017, 38(2): 81-87.
- [16] 付秋娟, 杜咏梅, 刘新民, 等. 超高效液相色谱法测定烟草西柏三烯二萜[J]. *中国烟草科学*, 2017, 38(3): 67-73.
FU Q J, DU Y M, LIU X M, et al. Determination of cembratriene-diol in tobacco by ultra performance liquid chromatography[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2017, 38(3): 67-73.
- [17] 冯琦, 王永, 武东玲, 等. 外源 MeJA 诱导烟草叶片防御反应[J]. *中国烟草科学*, 2013, 34(5): 83-88.
FENG Q, WANG Y, WU D L, et al. Defense response of tobacco leaf surface to exogenous methyl jasmonate[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2013, 34(5): 83-88.
- [18] 解敏敏, 龚达平, 李凤霞, 等. 烟草细胞色素 P450 的基因组学分析[J]. *遗传*, 2013, 35(3): 379-387.
XIE M M, GONG D P, LI F X, et al. Genome-wide analysis of cytochrome P450 monooxygenase genes in the tobacco[J]. *Inheritance*, 2013, 35(3): 379-387.
- [19] EDWARDS K D, FERNANDEZ P N, DRAKE S K, et al. A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 448.
- [20] NELSON D R. Cytochrome P450 nomenclature[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1998, 107: 15-24.
- [21] KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, et al. TopHat 2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions[J]. *Genome biology*, 2013, 14(4): R36.
- [22] SYED K, MASHELE S S. Comparative analysis of P450 signature motifs ExxR and CxG in the large and diverse kingdom of fungi: Identification of evolutionarily conserved amino acid patterns characteristic of P450 family[J]. *Plos One*, 2014, 9(4): e95616.
- [23] RUPASINGHE S, SCHULER M A. Homology modeling of plant cytochrome P450s[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2006, 5: 473-505.
- [24] 贺丽虹, 赵淑娟, 胡之璧. 植物细胞色素 P450 基因与功能研究进展[J]. *药物生物技术*, 2008(2): 142-147.
HE L H, ZHAO S J, HU Z B. Gene and function research progress of plant cytochrome P450s[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2008(2): 142-147.
- [25] 王珺霞, 毕杰, 卢星宇, 等. 哺乳动物细胞色素 P450 酶中底物识别位点与功能的进化关系[J]. *生物物理学报*, 2015, 31(2): 154-164.
WANG J X, BI J, LU X Y, et al. Evolutionary relationship of substrate recognition sites with protein functions of mammalian cytochrome P450 enzymes[J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2015, 31(2): 154-164.
- [26] VASAV A P, BARVKAR V T. Phylogenomic analysis of cytochrome P450 multigene family and their differential expression analysis in *Solanum lycopersicum* L. suggested tissue specific promoters[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 116.
- [27] HOLUB E B. The arms race is ancient history in *Arabidopsis*, the wildflower[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(7): 516-527.

- dominant morphological mutant in maize using *Ds2* as a transposon tag[J]. EMBO Journal, 1989, 8(1): 15-22.
- [22] HAY A, JACKSON D, ORI N, et al. Analysis of the competence to respond to *KNOTTED1* activity in *Arabidopsis* leaves using a steroid induction system[J]. Plant Physiology, 2003, 131(4): 1671-1680.
- [23] SATO Y, SENTOKU N, NAGATO Y, et al. Isolation and characterization of a rice homeobox gene, *OSH15*[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 38(6): 983-998.
- [24] 丁伟乔, 徐全乐, 蒲帆, 等. *Pttkn1* 基因异位表达对烟草叶片形态的影响[J]. 西北植物学报, 2008 (3) : 440-446.
DING W Q, XU Q L, PU F, et al. Ectopic expression of *Pttkn1* gene on morphological alteration of tobacco leaves[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2008(3): 440-446.
- [25] BARKOULAS M, HAY A, KOUGIOUMOUTZI E, et al. A developmental framework for dissected leaf formation in the *Arabidopsis* relative *Cardamine hirsuta*[J]. Nature Genetics, 2008, 40(9): 1136-1141.
- [26] BOLDUC N, YILMAZ A, MEJIA-GUERRA M K, et al. Unraveling the *KNOTTED1* regulatory network in maize meristems[J]. Genes and Development, 2012, 26(15): 1685-1690.
- [27] NISHIMURA A, TAMAOKI M, SAKAMOTO T, et al. Over-expression of tobacco *knotted1*-type class1 homeobox genes alters various leaf morphology[J]. Plant and Cell Physiology, 2000, 41(5): 583-590.
- [28] SAKAMOTO T, NISHIMURA A, TAMAOKI M, et al. The conserved KNOX domain mediates specificity of tobacco *KNOTTED1*-type homeodomain proteins[J]. The Plant Cell, 1999, 11(8): 1419-1432.
- [29] TAMAOKI M, KUSABA S, KANO-MURAKAMI Y, et al. Ectopic expression of a tobacco homeobox gene, *NTH15*, dramatically alters leaf morphology and hormone levels in transgenic tobacco[J]. Plant and Cell Physiology, 1997, 38(8): 917-927.
- [30] 董连红. 林烟草 *CBL* 基因家族成员 *Nsy/CBL10* 的功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
DONG L H. Functional analysis of *CBL* family gene *Nsy/CBL10* in *Nicotiana sylvestris*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
- [31] WANG X Q, SHEN X, HE Y M, et al. An optimized freeze-thaw method for transformation of *Agrobacterium Tumefaciens* EHA105 and LBA4404[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2011, 18(5):382-386.
- [32] 刘向真, 王根发, 金立锋, 等. 烟草 *KNOX* 基因家族的结构与表达模式分析[J]. 烟草科技, 2019, 52 (2) : 1-11.
LIU X Z, WANG G F, JIN L F, et al. Structure and expression analysis of *KNOX* gene family in tobacco. Tobacco Sciences and Technology, 2019, 52(2): 1-11.
- [33] LIEBSCH D, SUNARYO W, HOLMLUND M, et al. Class I KNOX transcription factors promote differentiation of cambial derivatives into xylem fibers in the *Arabidopsis* hypocotyl[J]. Development, 2014, 141(22): 4311-4319.
- [34] WOERLEN N, ALLAM G, POPESCU A, et al. Repression of *BLADE-ON-PETIOLE* genes by KNOX homeodomain protein BREVIPEDICELLUS is essential for differentiation of secondary xylem in *Arabidopsis* root[J]. Planta, 2017, 245(6): 1079-1090.
- [35] 张兴伟, 王志德, 任民, 等. 烤烟几个重要植物学性状的遗传分析[J]. 中国烟草科学, 2012, 33 (5) : 1-8.
ZHANG X W, WANG Z D, REN M, et al. Genetic analysis of several important botanic traits in flue-cured tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2012, 33(5): 1-8.
- [36] 宋健, 刘国祥, 程立锐, 等. 雪茄外包皮烟叶片重要性状的遗传分析[J]. 中国烟草科学, 2018, 39 (3) : 18-23.
SONG J, LIU G X, CHENG L R, et al. Genetic effect analysis of important traits of tobacco leaves of cigar wrapper[J]. Chinese Tobacco Science, 2018, 39(3): 18-23.
- [37] 赵环宇, 孙光伟, 王玉军, 等. 植物生长调节剂对烤烟上部叶质量的影响[J]. 中国烟草科学, 2019, 40 (3) : 38-43.
ZHAO H Y, SUN G W, WANG Y J, et al. Effects of plant growth regulators on the quality of upper leaves of flue-cured tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2019, 40(2): 38-43.

(上接第85页)

- [28] PAQUETTE S M, BAK S, FEYEREISEN R. Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of *Arabidopsis thaliana*[J]. DNA Cell Biol, 2000, 19(5): 307-317.
- [29] 李振华. 外源生长素和赤霉素信号调控烟草种子休眠与萌发的机理[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
LI Z H. Mechanism on exogenous auxin and gibberellin signal induced seed dormancy and germination in tobacco[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [30] 李立芹, 鲁黎明. 抑制性消减杂交技术(SSH)及其在烟草生物学研究中的应用[J]. 中国烟草科学, 2011 (3) : 97-102.
LI L Q, LU L M. Application of suppression subtractive hybridization (SSH) on tobacco research[J]. Chinese Tobacco Science, 2011(3): 97-102.
- [31] 苏振刚, 杨爱国, 孙玉合, 等. 黑胫病菌诱导的烟草 SSH 文库构建及其分析[J]. 作物学报, 2011, 37 (10) : 1763-1770.
SU Z G, YANG A G, SUN Y H, et al. Construction and analysis of tobacco SSH library induced by phytophthora parasitica var. nicotianae[J]. Acta Sinica, 2011, 37(10): 1763-1770.
- [32] GARCIA D. A miRacle in plant development: role of micro RNAs in cell differentiation and patterning[J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2008, 19(6): 586-595.
- [33] 黄飞燕, 叶贤文, 王戈, 等. 烟草黑胫病胁迫相关 miRNA 鉴定及功能分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37 (1) : 373-385.
HUANG F Y, YE X W, WANG G, et al. Identification and functional analysis of mi RNA related to tobacco black shank stress[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(1): 373-385.
- [34] 李琦瑶, 王树声, 周培禄, 等. 低温胁迫对烟苗叶形及生理特性的影响[J]. 中国烟草科学, 2018, 39 (1) : 17-23.
LI Q Y, WANG S S, ZHOU P L, et al. Effects of low temperature stress on leaf shape and physiological characteristics in tobacco seedlings[J]. Chinese Tobacco Science, 2018, 39(1): 17-23.
- [35] TAO X, WANG M X, DAI Y, et al. Identification and expression profile of CYPome in Perennial ryegrass and Tall fescue in response to temperature stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1519.
- [36] 单睿阳, 林郑和, 陈志辉, 等. 茶树细胞色素 P450 基因 CYP71A26 与 CYP71B34 的克隆及差异表达特征分析[J]. 茶叶科学, 2018, 38 (5) : 450-460.
SHAN R Y, LIN Z H, CHEN Z H, et al. Molecular cloning and expression analysis of cytochrome P450 CYP71A26 and CYP71B34 genes in tea plants (*Camellia sinensis*)[J]. Tea Science, 2018, 38 (5): 450-460.