

## 玉米PLCs基因家族鉴定及表达谱分析

董洁静<sup>1,2,3,4</sup>, 徐晶宇<sup>1,2,4</sup>, 林俊俊<sup>1,2,3,4</sup>, 贺琳<sup>1,2,4</sup>, 赵长江<sup>1,2,3,4,\*</sup>, 李佐同<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江大庆163319

<sup>2</sup>黑龙江省现代农业栽培技术与作物种质改良重点实验室, 黑龙江大庆163319

<sup>3</sup>黑龙江省秸秆资源化利用工程技术研究中心, 黑龙江大庆163319

<sup>4</sup>黑龙江省普通高校寒地作物种质改良与栽培重点实验室, 黑龙江大庆163319

**摘要:** 磷脂酶C (phospholipase C, PLC)是一类能够水解磷脂的酶, 作为磷脂酶家族中的一员, 在调节植物生长及响应逆境胁迫中发挥重要作用。本文通过对ZmPLCs蛋白的系统发育、其基因结构及启动子中的逆境相关顺式作用元件数量, 以及基因的组织特异性表达模式等生物信息学进行研究; 并用NaHCO<sub>3</sub>和低温处理玉米转录组数据, 构建ZmPLCs基因表达谱。结果显示, 在玉米基因组水平上共鉴定出9个玉米PLCs基因, 基于玉米PLCs水解底物的不同, 9个ZmPLCs基因被分为2个亚族, 分别定位在玉米的1、2、3、5和9号染色体上。ZmPI-PLCs编码蛋白包含典型的X、Y和C<sub>2</sub>结构域, ZmNPCs蛋白包含典型的磷酸酯酶结构域, ZmPLCs蛋白N端由延长链和螺旋结构组成, 多定位于线粒体和叶绿体。ZmPLCs基因替换发现ZmPLCs家族可能是通过变异进行扩增的。在9个ZmPLCs基因启动子上包括脱落酸、盐和低温等激素和非生物胁迫相关元件高度富集, 转录组数据分析ZmPI-PLC2和ZmNPC2上调响应NaHCO<sub>3</sub>, ZmPI-PLC5和ZmNPC3上调响应低温, ZmPI-PLC3和ZmPI-PLC4与玉米根系发育有关, 这与基因表达模式相印证, 进一步表明玉米PLCs基因参与植物对多种非生物逆境的响应, 以及作物对非生物抗性利用的潜在应用价值。

**关键词:** 玉米; PLC; 非生物逆境; 表达分析; 生物信息学

磷脂酶(phospholipase, PL)是一类能够水解磷脂的酶类, 根据酶解磷脂位置不同分为磷脂酶C、磷脂酶D、磷脂酶A1和磷脂酶A2, 4种磷脂酶均在植物生长发育、生物胁迫及非生物胁迫中起重要的调控作用。植物中的PLCs可以依据反应底物的不同被分成两个亚家族, 分别是磷脂酰肌醇特异PLC (phosphoinositide-specific PLC, PI-PLC)和非特异PLC (non-specific PLC, NPC)。ZmPI-PLC蛋白N端由EF指型结构域组成, 具有螺旋-环-螺旋结构, 该区域是Ca<sup>2+</sup>结合区域, 也是酶的催化核心一部分 (Testerink和Munnik 2005)。植物磷脂酶C受Ca<sup>2+</sup>调控 (Putta等2016), 如果敲除EF指型结构域导致Ca<sup>2+</sup>依赖的PLC酶活性降低 (Munnik 2014)。PLC蛋白C端是由大约120个氨基酸残基组成的C<sub>2</sub>结构域, 这个区域与磷脂及Ca<sup>2+</sup>的结合相关, 并且结构域的大小和功能均有所差别 (Chen等2011)。在马铃薯、水稻的PI-PLCs中, 该结构域疏水残基与K-(K,R)-T-K区域能够控制C<sub>2</sub>结构域特异性与磷脂结合 (Xue等2009)。在一些植物中, C<sub>2</sub>结构域调控PLC附着于细胞膜上, 在缺失EF指型结构域时, C<sub>2</sub>结构域仍能完成相应功能 (Tasma等2008; Kim等2004)。位于EF指型结构和C<sub>2</sub>结构域之间的X结构域和Y

结构域是PLC结构中最保守的2个结构域, 当蛋白折叠后, 这两个区域靠近形成催化活性中心 (Lin等2004)。

已有大量研究表明, 植物PLCs基因在逆境胁迫响应中具有重要的调节作用。在模式植物拟南芥中, *AtNPC4*基因可以提高高渗透胁迫的抗性 (Munnik和Vermeer 2010), 脱落酸引起*AtPLC6*表达上调, 并且参与冷胁迫反应 (Sanchez和Chua 2001; Gaude等2008); 生长素和细胞分裂素引起*AtPLC6*、*AtPLC7*和*AtPLC8*不同程度的上调表达, 并且这些基因都可以被盐胁迫、干旱和冷害诱导上调 (Lin等2004; Peters等2010)。此外, 干旱胁迫诱导绿豆*VrPLC3*、烟草*NtPLC1*、马铃薯*StPLC1*和*StPLC2*及豇豆*TluPLC1*和*TluPLC2*上调或下调表达 (Shi等2017; Xia等2017; Chen等2017; Mahmud等2017)。上述研究表明表明PLCs在植物的生长发育及对环境因子的反应中具有重要的作用。

收稿 2018-02-07 修定 2018-05-29

资助 黑龙江省自然科学基金(QC2016036)和黑龙江农垦总局科技攻关项目(HNK135-02-05)。

\* 共同通讯作者: 赵长江(zhaocj15@126.com)、李佐同(lxg6401999@163.com)。

迄今为止, 玉米PLCs基因在玉米整个生育阶段和逆境胁迫中的功能还没有系统的报道。本研究在全基因组水平对玉米PLCs基因家族进行分析, 对其系统进化、蛋白结构、组织和逆境表达谱分析, 揭示玉米PLCs在生长发育及逆境胁迫响应中的作用, 对作物的抗逆育种提供新的基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 基因家族成员鉴定

采用3种方法对玉米(*Zea mays* L.) PLCs基因家族成员进行鉴定。(1)在玉米基因组数据库(<http://www.maizegdb.org/>)和NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中搜索已发表的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtPLCs蛋白序列;(2)根据PI-PLCs基因典型的PI-PLC-X、PI-PLC-Y、C<sub>2</sub>保守结构域及NPCs基因的Phosphoesterase family结构域搜索玉米基因组和NCBI数据库;(3)在NCBI数据库中搜索关键词“maize”和“PLC”利用NCBI、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)数据库对非冗余的蛋白序列进行保守结构域分析。

### 1.2 基因基本特征

通过MaizeSequence (<http://www.maizesequence.org/index.html>)数据库获取ZmPLCs基因登录号、编码序列长度和氨基酸数量。分子式、分子量和等电点分析采用Expasy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protaparam/protparam>)。采用Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和WolfPSORT Prediction (<https://wolfsort.hgc.jp/>)进行亚细胞定位分析。

### 1.3 进化系统分析

通过PLCs蛋白的保守结构域, 在Phytozome v11.0 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>)数据库中对其他物种进行筛选, 将筛选出的植物PLCs蛋白与ZmPLCs蛋白通过软件MEGA 6.0构建系统发育树。

### 1.4 染色体定位及替换率分析

通过玉米数据库分析基因在染色体上的定位, 并采用RCircos软件绘制定位图。ZmPLCs蛋白序列通过软件MEGA 6.0比对, 其结果使用DNAsp软件计算非同义替换率Ka、同义替换率Ks以及比值(Ka/Ks) (比值保留2位小数)。

### 1.5 基因结构和蛋白保守基序分析

利用GSD (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)进行基因结构分析, 通过NCBI对ZmPLCs基因的保守结构进行研究。通过MEME ([http://meme-suite.org/opal-jobs/appMEME\\_4.11.21484372785819316597740/meme.html](http://meme-suite.org/opal-jobs/appMEME_4.11.21484372785819316597740/meme.html))对ZmPLCs蛋白保守基序进行分析。

### 1.6 蛋白质结构分析

采用([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html))预测ZmPLCs蛋白二级结构, 通过MEGA 6.0构建系统发育树; 采用SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/>)预测ZmPLCs蛋白三级结构。

### 1.7 基因表达和启动子顺式元件数量分析

供试基因在玉米不同组织、器官和发育阶段的表达数据来自Maize eFP ([http://bar.utoronto.ca/efp\\_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi](http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi))数据库, 通过Cluster version 3.0和Tree View version 1.6软件进行聚类分析; 基因翻译起始位点上游2 000 bp的启动子序列在Phytozome v11.0数据库中获得, 提交至Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行统计激素和逆境相关作用元件数量。

### 1.8 NaHCO<sub>3</sub>和低温处理玉米幼苗转录组学分析

选择玉米自交系合344于1/2Hoagland培养液培养。待玉米生长至三叶一心, 于1/2Hoagland培养液中加入浓度为100 mmol·L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>进行处理, 于处理不同时间(0、12、24和72 h)后对根系进行取样。玉米幼苗分别进行22 (对照)、10和5°C低温处理72 h, 对叶片进行取样。液氮冷冻, -80°C保存。将样品用干冰运送至上海敏芯信息科技有限公司用IlluminaHiSeq平台进行测序。

## 2 实验结果

### 2.1 ZmPLCs基因家族的鉴定和命名

通过3种方法共鉴定出9个ZmPLCs基因(表1)。根据基因结构、蛋白质结构域和进化关系的不同, 可以把这9个ZmPLCs基因分成ZmPI-PLCs和ZmNPCs两类。在ZmPI-PLCs亚家族中共有5个成员, 分别命名为ZmPI-PLC1~ZmPI-PLC5, 编码蛋白质氨基酸数量最小为586 aa, 最大为789 aa, 分子量介于65.6~87.7 kDa之间, 等电点在5.89~6.46之间。除了

表1 *ZmPLCs*基因家族的基本特征Table 1 Characters of putative *ZmPLCs* gene family

基因名	登录号	编码区/bp	氨基酸/aa	分子式	分子量/kDa	等电点	亚细胞定位
<i>ZmPI-PLC1</i>	GRMZM2G114354-T01	2 179	789	C <sub>3946</sub> H <sub>6131</sub> N <sub>1073</sub> O <sub>1137</sub> S <sub>29</sub>	87.7253	6.25	细胞质基质/细胞核/叶绿体/线粒体
<i>ZmPI-PLC2</i>	GRMZM2G129238-T01	2 067	587	C <sub>3003</sub> H <sub>4674</sub> N <sub>826</sub> O <sub>872</sub> S <sub>21</sub>	66.9744	6.46	叶绿体/线粒体/细胞核
<i>ZmPI-PLC3</i>	GRMZM2G137435-T01	2 279	586	C <sub>2938</sub> H <sub>4573</sub> N <sub>805</sub> O <sub>867</sub> S <sub>25</sub>	65.846	6.40	线粒体/叶绿体/细胞核/细胞质基质
<i>ZmPI-PLC4</i>	GRMZM5G889467-T01	2 189	586	C <sub>2931</sub> H <sub>4566</sub> N <sub>802</sub> O <sub>865</sub> S <sub>25</sub>	65.6808	6.40	线粒体/叶绿体/细胞核/细胞质基质
<i>ZmPI-PLC5</i>	GRMZM2G157760-T01	2 381	665	C <sub>3279</sub> H <sub>5128</sub> N <sub>944</sub> O <sub>1000</sub> S <sub>28</sub>	74.6721	5.89	线粒体/细胞质基质/叶绿体
<i>ZmNPC1</i>	GRMZM2G081719-T01	1 971	530	C <sub>2629</sub> H <sub>4088</sub> N <sub>732</sub> O <sub>755</sub> S <sub>12</sub>	58.4145	9.09	叶绿体/细胞核/线粒体/细胞质基质
<i>ZmNPC2</i>	GRMZM2G479112-T01	2 156	515	C <sub>2569</sub> H <sub>3941</sub> N <sub>727</sub> O <sub>752</sub> S <sub>14</sub>	57.4918	6.25	线粒体/叶绿体
<i>ZmNPC3</i>	GRMZM2G139041-T01	2 318	542	C <sub>2721</sub> H <sub>4206</sub> N <sub>762</sub> O <sub>787</sub> S <sub>13</sub>	60.6027	7.37	叶绿体/线粒体/细胞质基质
<i>ZmNPC4</i>	GRMZM2G422670-T01	1 626	541	C <sub>2631</sub> H <sub>4030</sub> N <sub>724</sub> O <sub>788</sub> S <sub>19</sub>	59.0204	5.82	细胞质基质/细胞核/叶绿体

*ZmPI-PLC1*主要定位在细胞质基质和细胞核中,其余4个基因编码蛋白主要定位在叶绿体和线粒体中。

在*ZmNPCs*亚家族中有4个成员,分别命名为*ZmNPC1*~*ZmNPC4*,编码的蛋白质大小相近,氨基酸链的长度介于515~542 aa之间,分子量在57.4~60.6 kDa之间变化,等电点最小为5.82,最大为9.09。除

了*ZmNPC4*主要定位在细胞质基质和细胞核中,其余3个蛋白都主要定位在叶绿体和线粒体中。

## 2.2 *ZmPLCs*蛋白进化关系分析

选择拟南芥、水稻、高粱、二穗短柄草和玉米PLCs的蛋白序列构建进化树。如图1显示,*ZmPLCs*在进化树中被分成了*ZmPI-PLCs*和*ZmNPCs*

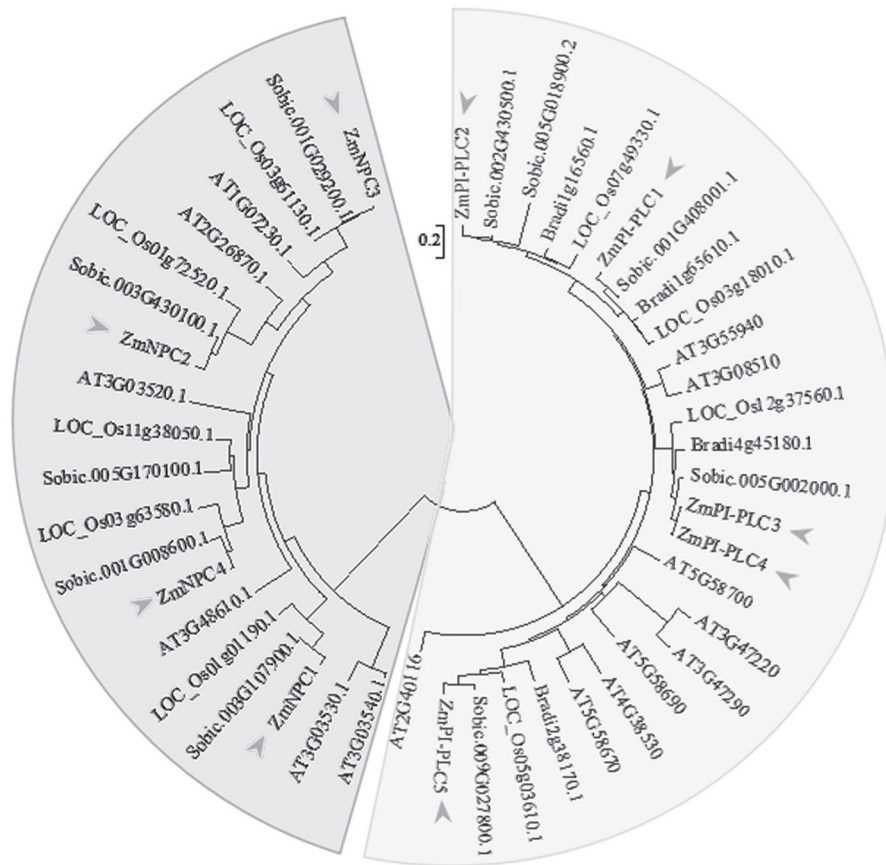


图1 植物PLCs蛋白进化树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of PLCs from plants

图中▲表示*ZmPLCs*基因编码蛋白;浅灰色扇形表示PI-PLCs亚家族;深灰色扇形表示NPCs亚家族。

两大类。在ZmPI-PLCs亚家族中ZmPI-PLC3和ZmPI-PLC4的蛋白序列同源性较高,并且与高粱Sobic.005G002000.1同源性达到79%;其他ZmPI-PLCs蛋白分别位于另外几个分支下,与其他物种同源性不足10%。ZmNPCs亚家族中ZmNPC3与高粱Sobic.001G029200.1同源性较高,达到97%。ZmNPC2与高粱Sobic.003G430100.1同源性达49%;而ZmNPC1和ZmNPC4与其他物种的同源性都小于10%。

### 2.3 ZmPLCs基因家族染色体定位及基因替换

ZmPLCs基因家族染色体定位如图2所示,ZmPI-PLC3和ZmPI-PLC4基因定位于1号染色体,ZmPI-

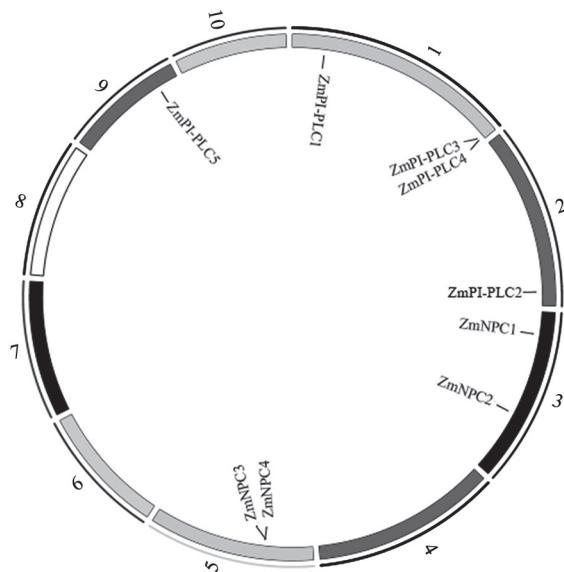


图2 ZmPLCs基因家族在玉米染色体上的分布  
Fig.2 Chromosomal distributions of ZmPLCs gene family in the maize genome  
阿拉伯数字代表对应的染色体。

PLC1、ZmPI-PLC2和ZmPI-PLC5基因分别定位于1、2和9号染色体。ZmNPC3和ZmNPC4基因定位于5号染色体,ZmNPC1和ZmNPC2基因定位于3号染色体。其中,ZmPLC3和ZmPLC4基因及ZmNPC3和ZmNPC4基因在染色体上的位置很近。

相对进化速率分析结果(表2)显示,ZmPI-PLCs与ZmNPCs基因替换率( $Ka/Ks$ ) $<1$ ,ZmPI-PLCs亚家族各基因表现为纯化选择关系;ZmNPCs亚家族各基因都是正选择关系。

### 2.4 ZmPLCs基因家族结构分析

分析ZmPLCs家族基因的内含子和外显子结构,结果(图3)发现,ZmPI-PLCs亚家族中,外显子数目从6~12不等,其中ZmPI-PLC3和ZmPI-PLC4基因有9个外显子,除此之外,其他基因外显子数都不相同。在ZmNPCs亚家族中,除了ZmNPC3基因有3个外显子,其他的ZmNPCs基因都有2个外显子。

### 2.5 ZmPLCs蛋白结构分析

根据NCBI数据库分析,ZmPI-PLCs亚家族蛋白都含有PI-PLC-X (PF00388)、PI-PLC-Y (PF00387)、C<sub>2</sub> (PF00168)结构域,ZmPI-PLC2和ZmPI-PLC5还含有EF-hand like基序(图4)。其中C<sub>2</sub>结构域位于ZmPI-PLCs蛋白的C端,而PI-PLC-X位于ZmPI-PLCs蛋白的N端。EF手类似基序与PI-PLC-X结构域紧密相邻,PI-PLC-X结构域和PI-PLC-Y结构域之间相隔88~168个氨基酸,PI-PLC-Y结构域和C<sub>2</sub>结构域之间相隔10~20个氨基酸。ZmNPCs亚家族基因含有磷酸酯酶(PF04185)结构域。

### 2.6 ZmPLCs蛋白保守基序分析

对ZmPLCs蛋白进行保守序列分析,结果(图5)显示,在ZmPLCs亚家族中发现10个Motif,其中

表2 ZmPLCs基因家族替换率

Table 2 Replacement rate of ZmPLCs gene family

基因	$Ka/Ks$							
	ZmPI-PLC1	ZmPI-PLC5	ZmPI-PLC4	ZmPI-PLC3	ZmPI-PLC2	ZmNPC4	ZmNPC3	ZmNPC2
ZmNPC1	0.90	0.97	0.92	0.89	0.94	1.14	1.20	1.02
ZmNPC2	0.71	1.00	0.82	0.78	0.81	1.08	1.14	
ZmNPC3	0.73	0.92	0.72	0.67	0.63	1.38		
ZmNPC4	0.75	0.82	0.95	0.91	0.79			
ZmPI-PLC2	1.09	1.08	1.11	1.08				
ZmPI-PLC3	0.97	1.14	1.91					
ZmPI-PLC4	0.99	1.14						
ZmPI-PLC5	0.76							

$Ka$ : 非同义替换;  $Ks$ : 同义替换。

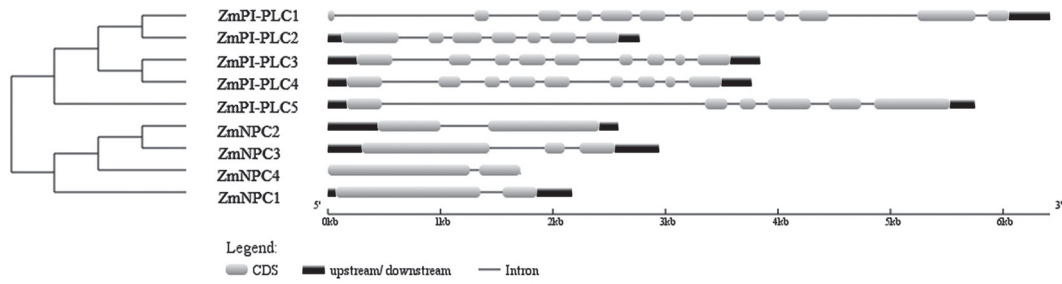


图3 *ZmPLCs*基因家族的结构  
Fig.3 Gene structure of *ZmPLCs* gene family

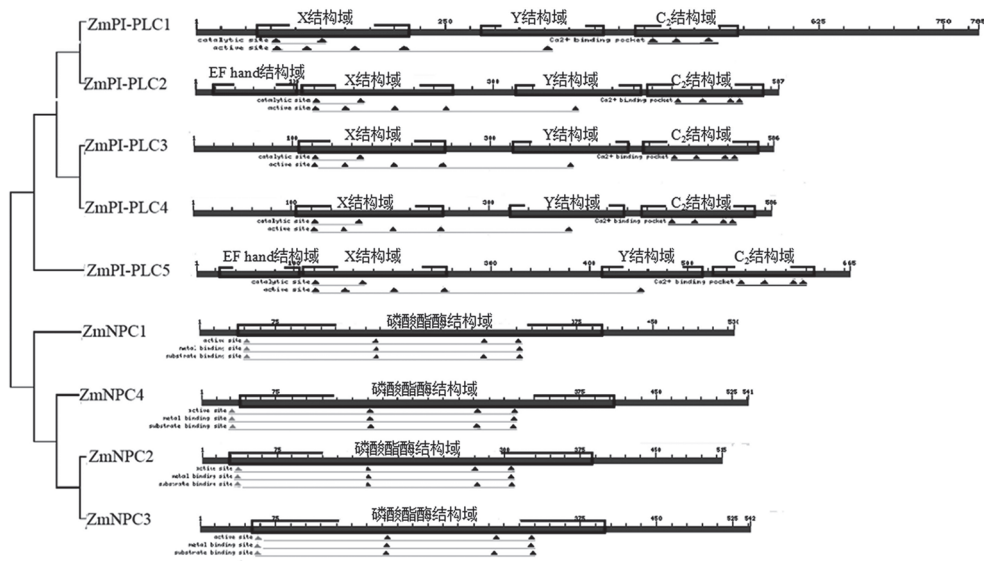


图4 *ZmPLCs*蛋白结构  
Fig.4 Protein structure of *ZmPLCs*  
▲表示Motif位置。



图5 *ZmPLCs*蛋白结构域分析  
Fig.5 Protein domain analysis of *ZmPLCs*

Motif 1、Motif 2、Motif 3和Motif 4分别是PI-PLC-X和PI-PLC-Y结构域中起催化作用的蛋白基序。Motif 5和Motif 6是C<sub>2</sub>结构域中调控Ca<sup>2+</sup>的蛋白结构基序。Motif 7、Motif 8和Motif 9是磷酸酯酶结构域中催化磷酸酯酶的蛋白基序。

## 2.7 ZmPLCs家族蛋白高级结构预测分析

对ZmPLCs家族蛋白二级结构氨基酸数分析结果(表3)显示,  $\alpha$ -螺旋氨基酸数量比例在28.28%~38.35%之间; 延长链氨基酸数量比例在15.66%~22.49%之间;  $\beta$ -折叠氨基酸数量比例在8.12%~12.74%之间; 无规则卷曲氨基酸数量比例在32.10%~41.17%之间。其中 $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲两种二级结构比例较高。对ZmPLCs家族蛋白二级结构和三级结构进行分析, ZmPLCs蛋白结构中ZmPI-PLC1和ZmPI-PLC2相近, ZmPI-PLC3、ZmPI-PLC4和ZmPI-PLC5相似, ZmNPCs亚家族各蛋白三级结构相似(图6)。

## 2.8 ZmPLCs家族基因表达谱分析

ZmPLCs基因在不同组织和发育阶段的表达分析结果(图7)表明, 在玉米不同组织和发育阶段中, ZmPI-PLC2在各组织和发育阶段表达量都较高; 玉米生长后期ZmPI-PLC5在叶片和根中表达量较高; 玉米生长前期ZmNPC3基因在叶片、根、节间和外壳中表达量较高; ZmPI-PLC3和ZmPI-PLC4基因在玉米发育早期阶段根中表达量较高, 在叶和胚乳中表达量较低; ZmNPC2只在花药中表达较高; ZmPI-PLC1、ZmNPC1和ZmNPC4基因在玉米不同组织中表达量都较低。

## 2.9 ZmPLCs基因启动子逆境相关顺式元件分析

在ZmPLCs启动子上检索水杨酸(salicylic acid,

SA)、生长素(auxin)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、赤霉素(gibberellin, GA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、干旱(drought)、盐(NaCl)和低温(low-temperature)等激素和非生物胁迫相关顺式元件并对其进行分析。图8显示, 非生物逆境相关元件中, ZmPLCs基因启动子上低温诱导元件数量最多, 其次是盐诱导元件; 各激素相关诱导元件中脱落酸诱导元件最多, 水杨酸和生长素诱导元件数量最少。ZmPI-PLCs各基因启动子中除ZmPI-PLC3、ZmPI-PLC4和ZmNPC2低温诱导元件较少外, 其他基因启动子中低温诱导元件数量较多。各基因间比较, ZmPI-PLC3、ZmNPC1和ZmNPC3基因启动子中盐诱导元件数量较多; ZmPI-PLC1基因启动子中干旱诱导元件和脱落酸诱导元件数量都很多。

## 2.10 NaHCO<sub>3</sub>和低温胁迫下ZmPLCs基因表达分析

通过转录组测序的方法获得基因表达的结果(图9)所示, 在NaHCO<sub>3</sub>胁迫下, 玉米幼苗根系的ZmPI-PLC2、ZmPI-PLC5、ZmNPC2和ZmNPC3基因表达量显著提高; ZmPI-PLC3、ZmPI-PLC4和ZmNPC4基因表达变化不显著; ZmNPC1基因表达量显著下调。在5°C胁迫下, ZmPI-PLC2和ZmNPC4基因显著下调, ZmNPC3基因显著上调, 其他基因表达量均没有显著性变化。在10°C胁迫下, 玉米幼苗叶片ZmPI-PLC1和ZmNPC1基因表达量变化不显著, 其他ZmPLCs基因表达均显著上调。

## 3 讨论

非生物胁迫可以诱导信号转导以及功能蛋白和转录调控相关的蛋白在内的一系列植物反应。磷脂酶通过编码调节蛋白, 通过正反馈或负反馈

表3 ZmPLCs蛋白二级结构氨基酸数量和比例

Table 3 Secondary structure amino acid number and percentage of ZmPLCs proteins

蛋白	$\alpha$ -螺旋		延长链		$\beta$ -折叠		无规则卷曲	
	数量	比例/%	数量	比例/%	数量	比例/%	数量	比例/%
ZmPI-PLC1	279	35.54	154	19.62	100	12.74	252	32.10
ZmPI-PLC2	166	28.28	132	22.49	58	9.88	231	39.35
ZmPI-PLC3	181	30.89	129	22.01	61	10.41	215	36.69
ZmPI-PLC4	178	30.38	128	21.84	63	10.75	217	37.03
ZmPI-PLC5	255	38.35	120	18.05	54	8.12	36	35.49
ZmNPC1	199	37.55	83	15.66	44	8.30	204	38.49
ZmNPC2	170	33.01	84	16.31	49	9.51	212	41.17
ZmNPC3	194	35.79	91	16.79	51	9.41	206	38.01

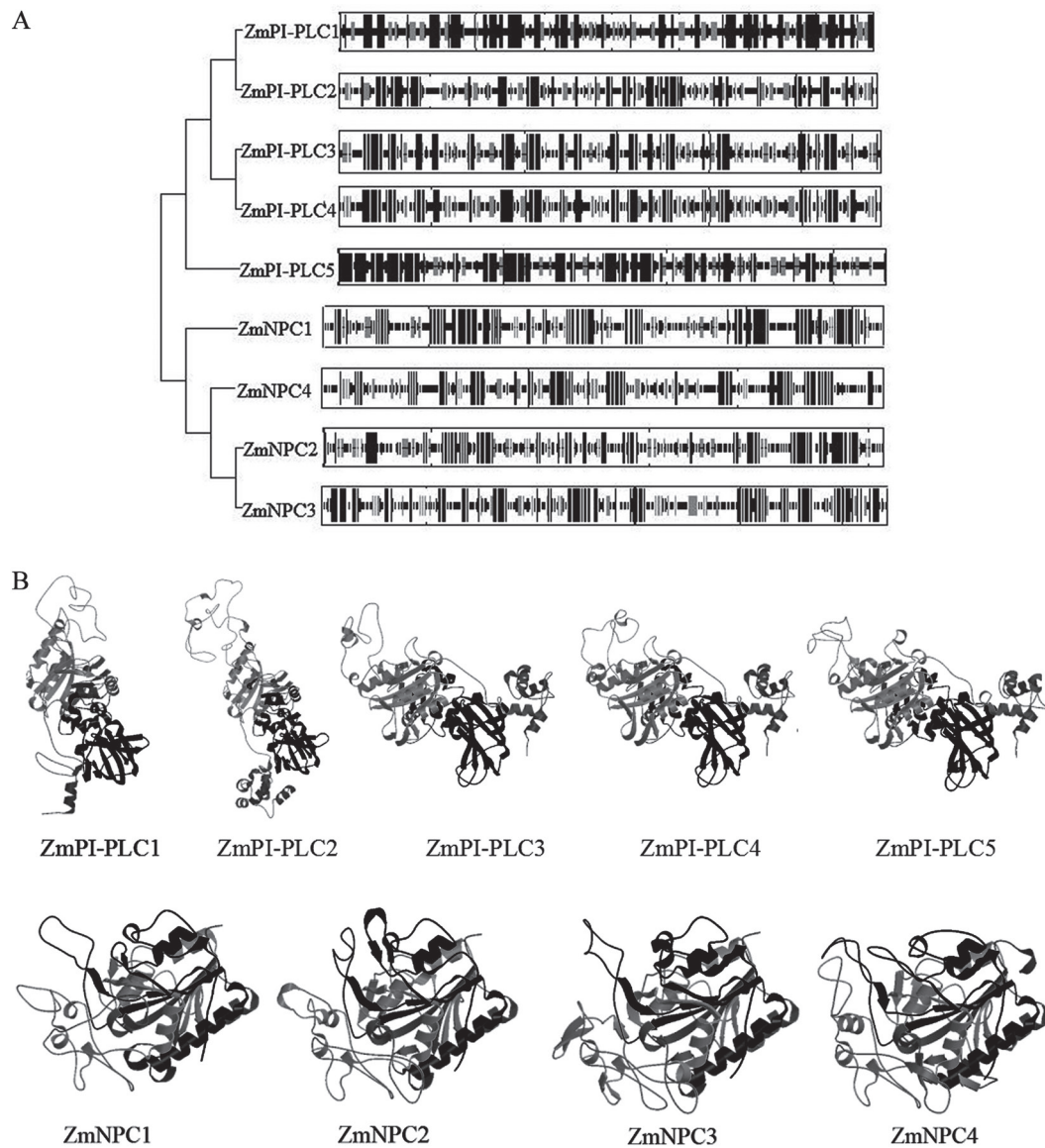


图6 ZmPLCs蛋白的二级结构(A)和三级结构(B)

Fig.6 Secondary structure (A) and tertiary structure (B) of ZmPLCs proteins

来调节植物响应逆境(Arisz等2009)。PLCs编码一个磷脂酶基因家族, PLCs蛋白在植物应对不同逆境反应中发挥显著作用。本研究在玉米基因组水平鉴定出9个*ZmPLCs*基因, 利用生物信息学方法对这些*ZmPLCs*的进化关系、基因结构、蛋白保守结构域、启动子元件和组织部位表达模式等多方面进行综合分析, 利用盐碱和低温玉米幼苗的Solexa转录组测序数据, 对*ZmPLCs*基因家族进行逆境表达谱分析, 明确*ZmPLCs*在盐碱和低温胁迫中的表达情况, 为深入解析*ZmPLCs*作用功能提供前期基础。

蛋白亚细胞定位预测分析发现, *ZmPLCs*蛋白大多定位于线粒体和叶绿体中。有研究指出水稻OsPI-PLC1定位在在烟草和洋葱表皮的细胞质和细胞核内, 参与水稻抗病的信号通路(Song和Robert 2002); 拟南芥NPC5定位在细胞质, 如果磷酸盐减少时便转位到叶绿体产生DAG被用于半乳糖脂的生物合成(Gaude等2008)。本研究中, 也发现该家族成员ZmPI-PLC1有细胞质/细胞核的亚细胞定位, 可能与水稻同源蛋白功能相近。通过调控Ca<sup>2+</sup>信号通路参与植物抗病相关响应。所有拟南芥PI-PLCs成员中除AtPI-PLC2外, 其他8个基因都可以

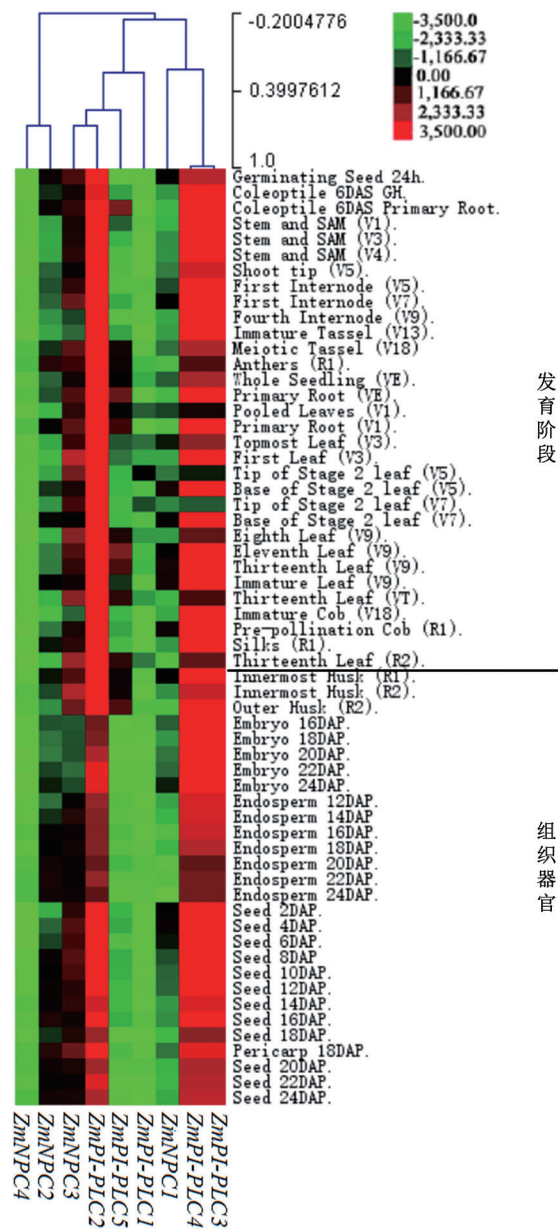


图7 *ZmPLCs*基因在不同组织器官和生长发育阶段的表达  
Fig.7 The expression profile of *ZmPLCs* gene in different tissues and developmental stage

coleoptile: 胚芽期; stem and SAM: 茎秆初期; intermode: 拔节期; leaf: 子叶期; silka: 吐丝期; cob: 结实期; embryo: 胚; endosperm: 胚乳; seed: 种子。

被不同的非生物逆境包括盐胁迫、干旱和冷害诱导而表达(Singh等2013)。通过系统进化可以对不同物种蛋白功能进行提示, 如与*ZmPI-PLC1*处于同一分支的*AtPLC3*是乙烯应答因子的下游靶基因, 它属于转录因子*AP2/ERF*家族, 可以在干旱和盐胁迫初期产生应答(Hunt等2004); 与*ZmNPC3*同一分

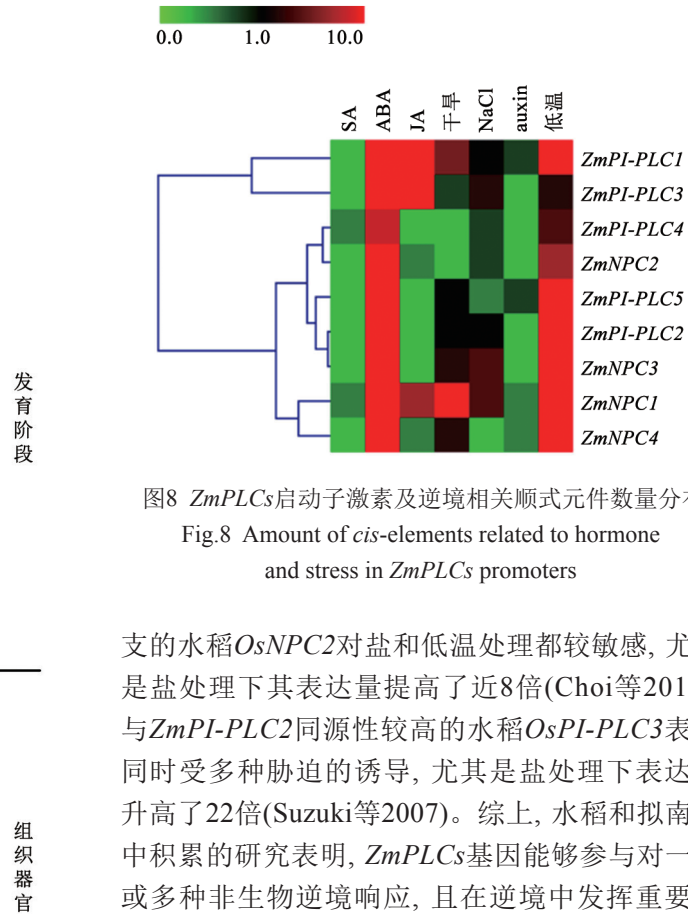


图8 *ZmPLCs*启动子激素及逆境相关顺式元件数量分布  
Fig.8 Amount of *cis*-elements related to hormone and stress in *ZmPLCs* promoters

支的水稻*OsNPC2*对盐和低温处理都较敏感, 尤其是盐处理下其表达量提高了近8倍(Choi等2011); 与*ZmPI-PLC2*同源性较高的水稻*OsPI-PLC3*表达同时受多种胁迫的诱导, 尤其是盐处理下表达量升高了22倍(Suzuki等2007)。综上, 水稻和拟南芥中积累的研究表明, *ZmPLCs*基因能够参与对一种或多种非生物逆境响应, 且在逆境中发挥重要作用。

基于盐碱( $\text{NaHCO}_3$ )和低温(5和 $10^\circ\text{C}$ )玉米幼苗的Solexa转录组测序数据, 对*ZmPLCs*基因家族进行逆境表达谱分析。*ZmPI-PLC2*和*ZmNPC2*在 $\text{NaHCO}_3$ 胁迫下表达量显著升高, 但非生物胁迫相关顺式元件预测*ZmPI-PLC2*和*ZmNPC2*启动子中并没有较多的盐诱导元件, 可能因为 $\text{NaHCO}_3$ 胁迫下*ZmPI-PLC2*和*ZmNPC2*受pH影响更多。*ZmNPC3*在 $\text{NaHCO}_3$ 胁迫12和72 h的表达量显著升高, 而且组织部位和发育阶段预测*ZmNPC3*在玉米生长早期根系中表达量较高, 说明在玉米生长发育早期可能是通过调节*ZmNPC3*基因提高根系对 $\text{NaHCO}_3$ 的胁迫响应。*ZmPI-PLC3*和*ZmPI-PLC4*在 $\text{NaHCO}_3$ 胁迫各时间点表达变化不显著, 但组织部位和发育阶段预测中*ZmPI-PLC3*和*ZmPI-PLC4*在玉米发育早期根中表达量较高, 可能是*ZmPI-PLC3*和*ZmPI-PLC4*不参与逆境胁迫响应, 只与玉米根系发育有关。低温 $5^\circ\text{C}$ 胁迫下*ZmNPC3*表达量显著上调, 与组织部位和非生物胁迫相关顺式元件预测结果相同, 说明在玉米生长后期可能是通过调节



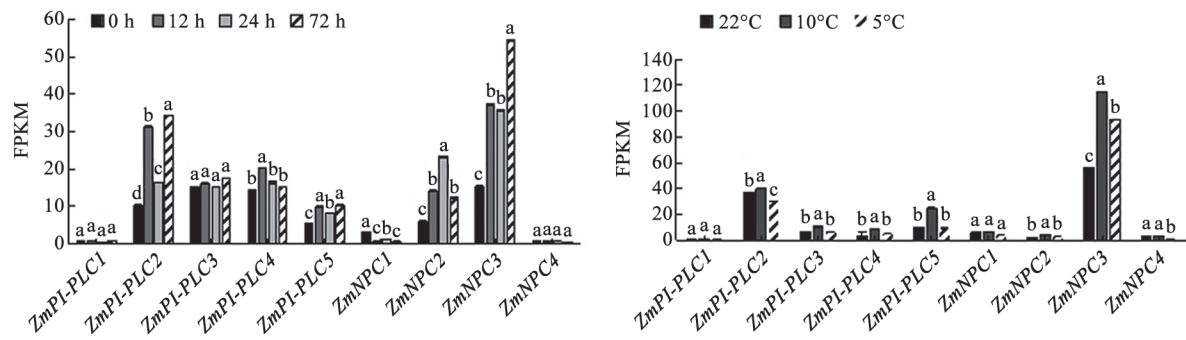


图9 *ZmPLCs*基因在 $\text{NaHCO}_3$  (A)和低温胁迫(B)下的表达量

Fig.9 Gene expression of *ZmPLCs* under  $\text{NaHCO}_3$  stress (A) and low temperature stress (B)

不同小写字母表示在0.05水平有显著差异。

*ZmNPC3*提高叶片对低温胁迫响应。在 $10^\circ\text{C}$ 胁迫下, *ZmPI-PLC5*和*ZmNPC3*表达量显著上调, 表明在玉米生长早期可能是通过调节*ZmPI-PLC5*和*ZmNPC3*基因提高叶片对低温胁迫响应。*ZmPI-PLC1*和*ZmNPC1*基因在 $\text{NaHCO}_3$ 和低温胁迫下都没有显著变化, 但预测*ZmPI-PLC1*和*ZmNPC1*基因启动子中含有较多的干旱诱导元件, 也有较多的ABA相关元件, 说明*ZmPI-PLC1*和*ZmNPC1*可能通过依赖ABA途径响应干旱诱导表达; 预测*ZmNPC2*只在花药中表达, 说明抑制*ZmNPC2*可能导致不规则的花粉管生长和不适宜的生长发育。综上所述, *ZmPLCs*在玉米生长发育和逆境胁迫响应中可能发挥重要的调控作用, 但仍需进一步实验证明。

#### 参考文献(References)

- Arisz SA, Testerink C, Munnik T (2009). Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1791 (9): 869–875
- Chen GQ, Snyder CL, Greer MS, et al (2011). Biology and biochemistry of plant phospholipases. *Plant Sci*, 30: 239–258
- Chen J, Zheng D, Cui H, et al (2017). Roles and mechanisms of *TRPC3* and the *PLC $\gamma$ /PKC/CPI-17* signaling pathway in regulating parturition. *Mol Med Rep*, 17 (1): 898–910
- Choi J, Kim KS, Rho HS, et al (2011). Differential roles of the phospholipase C genes in fungal development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol*, 48 (4): 445–455
- Song FM, Goodman RM (2002). Molecular cloning and characterization of a rice phosphoinositide-specific phospholipase C gene, *OsPI-PLC1*, that is activated in systemic acquired resistance. *Plant Pathol*, 61: 31–40
- Gaude N, Nakamura Y, Scheible WR, et al (2008). Phospholipase C5 (*NPC5*) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*. *Plant J*, 56 (1): 28–39
- Hunt L, Otterhag L, Lee JC, et al (2004). Gene-specific expression and calcium activation of *Arabidopsis thaliana* phospholipase C isoforms. *New Phytol*, 162 (3): 643–654
- Kim YJ, Kim JE, Lee JH, et al (2004). The *Vr-PLC3* gene encodes an expression putative plasma membrane-localized phosphoinositide-specific phospholipase C whose is induced by abiotic stress in mung bean (*Vigna radiata* L.). *FEBS Lett*, 556 (1-3): 127–136
- Lin WH, Ye R, Ma H, et al (2004). DNA chip-based expression profile analysis indicates involvement of the phosphatidylinositol signaling pathway in multiple plant responses to hormone and abiotic treatments. *Cell Res*, 14 (1): 34–45
- Mahmud H, Scherpen FJG, De Boer TM, et al (2017). Peptide microarray profiling identifies phospholipase C gamma 1 (*PLC- $\gamma$ 1*) as a potential target for AML. *Oncotarget*, 8 (40): 67344–67354
- Munnik T (2014). PI-PLC: Phosphoinositide-phospholipase C in plant signaling. *Springer Link*, 20: 27–54
- Munnik T, Vermeer JE (2010). Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant Cell Environ*, 33 (4): 655–669
- Peters C, Li M, Narasimhan R, et al (2010). Nonspecific phospholipase C *NPC4* promotes response to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22 (8): 42–59
- Putta P, Rankenberg J, Korver RA, et al (2016). Phosphatidic acid binding proteins display differential binding as a function of membrane curvature stress and chemical

- properties. *Biochim Biophys Acta*, 1858 (11): 2709–2716
- Sanchez JP, Chua NH (2001). *Arabidopsis PLC1* is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell*, 13 (5): 1143–1154
- Shi M, Zhou L, Zhao L, et al (2017). Csseverin inhibits apoptosis through mitochondria-mediated pathways triggered by  $Ca^{2+}$  dyshomeostasis in hepatocarcinoma *PLC*. *PLoS Negl Trop Dis*, 11 (11): e0006074
- Singh A, Kanwar P, Pandey A, et al (2013). Comprehensive genomic analysis and expression profiling of phospholipase C gene family during abiotic stresses and development in rice. *PLoS ONE*, 8 (4): e62494
- Suzuki M, Tanaka K, Kuwano M, et al (2007). Expression pattern of inositol phosphate-related enzymes in rice (*Oryza sativa* L.): implications for the phytic acid biosynthetic pathway. *Gene*, 405 (1–2): 55–64
- Tasma IM, Brendel V, Whitham SA, et al (2008). Expression and evolution of the phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 46 (7): 627–637
- Testerink C, Munnik T (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci*, 10 (8): 368–375
- Xia L, Liang H, Xu L, et al (2017). Subcellular localization and function study of a secreted phospholipase C from *Nocardia seriolae*. *FEMS Microbiol Lett*, 364 (17): doi: 10.1093/femsle/fnx143
- Xue HW, Chen X, Mei Y (2009). Function and regulation of phospholipid signalling in plants. *Biochem J*, 421 (2): 145–156

## Genome-wide identification and expression analysis of *PLCs* gene family in maize (*Zea mays*)

DONG Jie-Jing<sup>1,2,3,4</sup>, XU Jing-Yu<sup>1,2,4</sup>, LIN Jun-Jun<sup>1,2,3,4</sup>, HE Lin<sup>1,2,4</sup>, ZHAO Chang-Jiang<sup>1,2,3,4,\*</sup>, LI Zuo-Tong<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Agriculture, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China

<sup>2</sup>Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Modern Agricultural Cultivation and Crop Germplasm Improvement, Daqing, Heilongjiang 163319, China

<sup>3</sup>Heilongjiang Engineering Technology Research Center for Crop Straw Utilization, Daqing, Heilongjiang 163319, China

<sup>4</sup>Key Laboratory of Crop Germplasm Improvement and Cultivation in Cold Regions of Heilongjiang Province Education Department, Daqing, Heilongjiang 163319, China

**Abstract:** Phospholipase is a class of enzymes hydrolyzing phospholipids. Phospholipase C (PLC), as a member of the phospholipase family, plays an important role in regulating plant growth and response to stress. To clear the function of *ZmPLCs*, the series analysis were performed by biological information methods, including phylogenetic and conserved motifs of *ZmPLCs*, gene structure and tissue-specific expression patterns of *ZmPLCs*, and number of *cis*-acting elements involved in hormones and stresses in gene promoters. And the stress profile of *ZmPLCs* was constructed through the data of transcriptomes of maize tissues under NaHCO<sub>3</sub> and low temperature treatments respectively. In this study, based on the differences in hydrolysis substrates of maize *PLCs* enzymes, all *ZmPLCs* genes were divided into 2 subfamilies, located on chromosome 1, 2, 3, 5 and 9, respectively. The *ZmPI-PLCs* proteins had typical X, Y and C2 motif, *ZmNPCs* encoded proteins had typical Phosphoesterase motif. *ZmPI-PLCs* complicated N-terminal made up of extending chains and helices, they localized in mitochondria and chloroplast. Gene replacement studies showed that the member amplification of maize *PLCs* family were driven by mutation. In the *ZmPLCs* family, there were a large number of the *cis*-element related to hormones and abiotic stress, for example abscisic acid (ABA), salt (NaCl) and low temperature were highly enriched in gene promoters, supported by the expression profile of maize transcriptome on saline and alkaline and low temperature treatment. *ZmPI-PLC2* and *ZmNPC2* were up-regulated response to NaHCO<sub>3</sub>, *ZmPI-PLC5* and *ZmNPC3* were up-regulated response to low temperatures, *ZmPI-PLC3* and *ZmPI-PLC4* were related to maize root development. All above results suggested that these maize *PLCs* genes may respond to a variety of abiotic stresses and possessed potential functions in improving abiotic stress resistance.

**Key words:** maize (*Zea mays*); PLC; abiotic stress; expression profile; bioinformatic analysis

Received 2018-02-07 Accepted 2018-05-29

This work was supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (QC2016036), Heilongjiang Land Reclamation Bureau Scientific and Technological Research Project (HNK135-02-05).

\*Co-corresponding authors: ZHAO CJ (zhaojcj15@126.com), LI ZT (lxg6401999@163.com).