浙 江 农 林 大 学 学 报, 2021, **38**(2): 225-234 Journal of Zhejiang A&F University doi: 10.11833/j.issn.2095-0756.20200370

桂花己糖激酶基因家族成员的序列及表达分析

庞天虹^{1,2,3}, 钱婕妤^{1,2,3}, 付建新^{1,2,3}, 顾翠花^{1,2,3}, 张 超^{1,2,3}

(1. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院,浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省园林植物种质创新与利用 重点实验室,浙江 杭州 311300; 3. 浙江农林大学 南方园林植物种质创新与利用国家林业和草原局重点实验 室,浙江 杭州 311300)

摘要:【目的】研究桂花 Osmanthus fragrans 已糖激酶家族成员序列特征及表达变化规律。【方法】选取 3 个不同花色 桂花品种'堰虹桂'O. fragrans 'Yanhong Gui'、'玉玲珑'O. fragrans 'Yulinglong'、'金球桂'O. fragrans 'Jinqiu Gui',从转录组数据中筛选得到 HXK 同源基因,进行序列分析和系统进化树分析,并利用实时荧光定量 PCR 检测不同品种桂花不同组织及不同发育阶段的 OfHXKs 基因表达情况。【结果】筛选得到 OfHXK1~OfHXK4 基因, 分析表明不同品种桂花 OfHXK1、OfHXK3 和 OfHXK4 基因核苷酸序列相似性均高于 99%。OfHXKs 基因编码 461~510 个 氨基酸残基,均包含 2 个保守的磷酸化作用位点和 1 个糖结合位点。OfHXK1 和 OfHXK2 具有 N 端膜锚定结构,与拟南 芥 Arabidopsis thaliana AtHXK1 与 AtHXK2 聚为一支;无跨膜区域的 OfHXK3 与 AtHXK3 亲缘关系较近,推测二者具有 催化作用但无糖信号传导功能;OfHXK4 蛋白腺苷结合位点处多出 11 个氨基酸残基,与 AtHKL1 和 AtHKL2 亲缘关系 较近。4 个桂花 HXK 基因成员在桂花 1 年生茎、2 年生茎、嫩叶、成熟叶和花序中均有表达。随着花开放的进程,整体 上 OfHXK1、OfHXK3 和 OfHXK4 基因的表达量呈现先上升后下降的趋势,而 OfHXK2 基因在 3 个品种花序发育过程中表 达模式不同。【结论】根据序列分析与进化树分析,推测桂花 OfHXK1~OfHXK4 均具有催化已糖磷酸化的功能, OfHXK1和 OfHXK2 具有糖信号感知和转导的功能。OfHXK1、OfHXK3 和 OfHXK4 基因随花序发育呈现有规律升降的表 达模式,可能与其参与糖类物质代谢有关。图 6 表 4 参 30

Sequence and expression analysis of hexokinase gene family members in Osmanthus fragrans

PANG Tianhong^{1,2,3}, QIAN Jieyu^{1,2,3}, FU Jianxin^{1,2,3}, GU Cuihua^{1,2,3}, ZHANG Chao^{1,2,3}

(1. School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization for Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Germplasm Innovation and Utilization for Southern Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Germplasm Innovation and Utilization for Southern Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aims to analyze the sequence characteristics and expression changes of hexokinase family members of *Osmanthus fragrans*. [Method] Based on the transcriptome data of *O. fragrans* cultivars 'Yanhong Gui', 'Yulinglong' and 'Jinqiu Gui', *HXK* homologous genes were selected for sequence analysis and phylogenetic tree analysis, and real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the

收稿日期: 2020-06-09; 修回日期: 2020-08-02

基金项目:浙江省基础公益研究计划项目(LY19C160002, LY19C160006)

作者简介: 庞天虹 (ORCID: 0000-0003-4805-7308),从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: 1051369239@qq.com。通 信作者: 张超 (ORCID: 0000-0001-8118-5251),副教授,博士,从事观赏植物遗传育种研究。E-mail: zhangc@zafu.edu.cn

expression of OfHXKs genes in different tissues and development stages of O. fragrans. [Result] Four HXK homologous genes OfHXK1-OfHXK4 were screened, and sequence identity of OfHXK1, OfHXK3 and OfHXK4 from different cultivars is more than 99%. OfHXKs encode 461-510 amino acid residues, including two conserved phosphorylation motifs phosphate 1 and phosphate 2, and one sugar binding motif. Sequence analysis and phylogenetic tree analysis showed that OfHXK1 and OfHXK2 have N-terminal membrane anchoring structures, which are grouped together with AtHXK1 and AtHXK2 from Arabidopsis thaliana. OfHXK3 without transmembrane region is closely related to AtHXK3, so it was speculated that OfHXK3 has catalytic effect but without sugar signaling function. OfHXK4 protein with 11 amino acid insertions at the adenosine binding domain, is closely related to AtHKL1 and AtHKL2. Four HXK gene members from O. fragrans are all expressed in the annual stem, biennial stem, tender leaves, mature leaves and inflorescence. With the development of flower, the expression levels of OfHXK1, OfHXK3 and OfHXK4 genes increase first and then decrease, while the expression patterns of OfHXK2 genes during flower development are different in the three cultivars. [Conclusion] According to sequence analysis and evolutionary tree analysis, it is speculated that OfHXK1-OfHXK4 all have the function of catalysing hexose phosphorylation, and OfHXK1 and OfHXK2 have the function of sugar sensing and signaling. The expression patterns of OfHXK1, OfHXK3, and OfHXK4 genes during the inflorescence development of the three varieties showed a regular increase and decrease with the process of flower opening, which may be associated with their functions in sugar metabolism. [Ch, 6 fig. 4 tab. 30 ref.]

Key words: Osmanthus fragrans; hexokinase; gene cloning; expression analysis

桂花 Osmanthus fragrans 是中国十大名花之一,深受人们喜爱。前人研究报道桂花花香主要成分为 α-紫罗兰酮、β-紫罗兰酮、芳樟醇及其氧化物、罗勒烯等挥发性物质^[1],而桂花花色主要成分是类胡萝 卜素化合物^[2]。桂花的花香和花色是其最主要的观赏性状,与花香和花色相关次生代谢物质的合成与积 累直接影响到桂花的观赏品质。植物呼吸作用不仅提供植物所需的能量,一系列的中间产物还为多种次 生代谢化合物合成提供原料,在植物体内有机物转变方面起到枢纽作用。已糖激酶 (hexokinase, HXK) 具有己糖磷酸化功能,经 HXK 磷酸化的己糖才能进行植物呼吸代谢的糖酵解途径,为植物生长 和发育提供能量和中间代谢产物^[3-6]。高等植物 *HXK* 基因以多基因家族形式存在^[7-11]。拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 6 个 *HXK* 家族成员中,AtHXK1~3 能磷酸化葡萄糖^[10],其中 AtHXK1 还具有感知 和传递己糖信号的功能^[12-13]。AtHXK1 在强光条件下对植物根、叶和花序的生长和发育有促进作用^[13]。 此外,拟南芥成花转变^[14] 和种子萌发^[15]、植物花青素积累^[16] 和脂肪族硫甙生物合成^[17]等植物生命活动 都与 HXK 介导的己糖信号转导息息相关。目前,未见桂花 *HXK* 基因功能有关的研究报道。本研究基于 桂花不同花色品种转录组数据筛选 *OfHXKs* 相关 Unigene 序列,分析不同 *OfHXKs* 基因家族成员核苷酸 序列及其编码的氨基酸序列,并与其他物种 HXK 蛋白进行多重比对和进化树分析,同时分析不同桂花 品种不同发育阶段花瓣以及不同组织中 *OfHXKs* 基因表达特征,为进一步揭示桂花不同 *OfHXKs* 基因成 员功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

选择浙江农林大学桂花资源圃生长状况良好的地栽桂花'堰虹桂'Osmanthus fragrans 'Yanhong Gui'(YHG)、'玉玲珑'O. fragrans 'Yulinglong'(YLL)、'金球桂'O. fragrans 'Jinqiu Gui'(JQG)为材料,依据桂花花序不同发育阶段^[18],对这3个桂花品种顶壳期(S₁)、铃梗期(S₂)、初开期(S₃)、盛开期(S₄)花瓣分别进行取样,取样时间均为10:00。同时还对'堰虹桂'1年生茎、2年生茎、嫩叶、成熟叶和盛开时花序进行取样,用于不同组织中OfHXKs 基因表达分析。用液氮速冻暂存样品,后存于-80℃冰箱。

1.2 主要试剂和仪器

RNA 提取试剂盒采用 RNAprep Pure Plant Kit(天根,北京);反转录试剂盒使用 PrimeScript™ RT Master Mix(Perfect Real Time)(Takara,大连);荧光定量试剂盒使用 TB Green® *Premix Ex Taq*™ Ⅱ(Tli RNaseH Plus)(Takara,大连)。实时荧光定量 PCR 仪为 LightCycler®480 Ⅱ(Roche,德国)。

1.3 方法

1.3.1 *OfHXKs* 序列分析 从转录组中筛选得到 HXK 相关的 Unigene 序列,首先使用美国国家生物信息 中心 (NCBI)数据库中的 BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 对得到的基因序列进行对比;利用 ORF FINDER (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/) 寻找开放阅读框;用 DNAMAN 6.0 软件对不同品种 相同 *HXK* 基因成员进行核苷酸相似性比较,使用'堰虹桂'的 4 个 *HXK* 基因成员序列开展后续序列分 析,包括应用 Prot-Param 在线软件 (http://web.expasy.org/protparam/) 预测所编码蛋白的分子量、理论等电 点 (PI)、不稳定系数、总平均亲水性等;使用 YLoc (https://abi-services.informatik.uni-tuebingen.de/yloc/webloc. cgi)进行亚细胞定位预测;使用 SOPMA 分析软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 对 OfHXKs 家族的蛋白序列进行二级结构预测分析,判断目的基因的氨基酸残基是否处于于 α -螺旋、β 折 叠 (或其他状态)的二级结构;用 SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/)预测 OfHXKs 的三级结 构;应用 SignalP 5.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 对信号肽进行预测;利用 TMHMM 在线软 件 (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) 对信号肽进行预测;采用 MEGAX 软件 中的邻位相邻法 (neighbor-joining, NJ)进行同源聚类,建立系统发育树,并采用 Bootstrap 法 (重复 1 000 次)评估检测系统进化树。

1.3.2 总 RNA 提取与 cDNA 的合成 采用 RNAprep pure Plant Kit(天根,北京)多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒按照说明书步骤提取各样品的总 RNA。使用紫外分光光度计和质量浓度为 1% 琼脂糖凝胶电泳 检测总 RNA 浓度和质量。反转录体系为总 RNA 1.0 μ L, 5×PrimeScript RT Master Mix(TaKara,大连) 2.0 μ L,无 RNA 酶双蒸水 7.0 μ L, PCR 反应的程序设定为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 1 min。反转录 合成的 cDNA 储存于-20 °C 备用。

1.3.3 荧光定量 PCR 根据荧光定量 PCR 引物设计原则利用 Primer Premier 5 进行引物设计,以桂花 Of ACT 为内参基因^[19],引物序列见表 1。荧光定量 PCR 反应体系为: TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa,大连) 5.0 µL,上下游引物 (10 µmol·L⁻¹)各 0.4 µL, cDNA 模板 (反转录 cDNA 稀释 20 倍) 2.0 µL,双蒸水 2.2 µL,每个样品设置 3 个生物学重复。反应程序为两步法: 95 ℃ 预变性 30 s, 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 复性 30 s,重复 40 个循环;然后以 95 ℃ 持续 5 s, 60 ℃ 持续 1 min, 95 ℃ 持续 15 s 作为溶解曲线程序。

	Table 1 Primer sequences of OfHXK gene	es of O. fragrans
基因名称	正向引物序列(5′→3′)	反向引物序列(5′→3′)
OfHXK1	TTCTTCTTCGTCTGGCGTTCTG	GTGCATTAACCCGCATATCCAGG
OfHXK2	ACCTCCCTAAAAACAAGGAGAGTTG	AGTATCCCGTCCCATTTTCTTTAGG
OfHXK3	CACTTATTTGGTCACTCAGTTCCCG	ACACACGTCTATGACAATCTTCCTC
OfHXK4	GCACTCATTGCAGCCTCTCACT	CTCACTCTGACAGTGACCGGCGTTA
OfACT	CCCAAGGCAAACAGAGAAAAAAT	ACCCCACTACCAGAATCAAGAA

表 1	OfHXKs 基因表达分析所用引物序列
· / ·	

2 结果与分析

2.1 桂花花瓣 OfHXKs 基因序列分析

根据桂花不同花色品种转录组 Unigene 序列分析,筛选得到 4 个 HXK 基因的同源基因 (OfHXK1~ OfHXK4),3 个品种中均含有这 4 个 HXK 基因的同源基因。利用 DNAMAN 对不同品种 OfHXK1~ OfHXK4 核苷酸序列进行多序列比对,核苷酸序列相似性比较结果见表 2。不同品种桂花 OfHXK1、 OfHXK3 和 OfHXK4 基因核苷酸序列相似性均高于 99%,而不同品种桂花 OfHXK2 基因核苷酸序列相似 性为 94.42%~98.26%。选择'堰虹桂'的 OfHXK1~OfHXK4 基因推测的氨基酸序列进行后续分析。

利用 DNAMAN 对'堰虹桂'OfHXK1~OfHXK4 氨基酸序列比对。由图 1 可知:不同 OfHXKs 间具 有高度保守的结构域,均包含 2 个保守的磷酸化作用位点 phosphate 1 和 phosphate 2 以及 1 个底物结合 位点 sugar binding。预测 OfHXK1 与 OfHXK2 序列中均包含 12 个疏水通道和 11 个甘氨酸残基,而

					• -							
			Table	2 Compari	ison of nucle	eotide seque	nces of OfH	XKs in O. fra	agrans			
						相似	性/%					
基因名称	OfHXK1-	OfHXK1-	OfHXK1-	OfHXK2-	OfHXK2-	OfHXK2-	OfHXK3-	OfHXK3-	OfHXK3-	OfHXK4-	OfHXK4-	OfHXK4-
	YHG	YLL	JQG	YHG	YLL	JQG	YHG	YLL	JQG	YHG	YLL	JQG
OfHXK1-	100.00											
OfHXK1- YLL	99.87	100.00										
OfHXK1- JQG	99.87	100.00	100.00									
OfHXK2- YHG	72.26	72.19	72.19	100.00								
OfHXK2- YLL	72.21	72.14	72.14	94.42	100.00							
OfHXK2- JQG	71.62	71.55	71.55	95.40	98.26	100.00						
OfHXK3- YHG	58.38	58.45	58.45	59.90	58.37	58.03	100.00					
OfHXK3- YLL	58.38	58.45	58.45	59.83	58.30	57.96	99.73	100.00				
OfHXK3- JQG	58.38	58.45	58.58	59.62	58.23	57.83	99.19	99.33	100.00			
OfHXK4- YHG	59.37	59.37	59.37	58.29	58.67	58.28	52.54	52.61	52.40	100.00		
OfHXK4- YLL	59.63	59.63	59.63	58.86	58.66	58.44	52.65	52.73	52.50	99.71	100.00	
OfHXK4- JQG	59.70	59.70	59.70	58.22	58.53	58.14	52.34	52.40	52.20	99.02	99.28	100.00





下划线为磷酸化位点与底物结合位点;C 为疏水通道氨基酸;+为保守的甘氨酸残基;*为其他保守残基

图 1 桂花 OfHXKs 氨基酸多序列比对图

Figure 1 Multiple sequence alignment of OfHXKs amino acid sequences

OfHXK3 包含 11 个疏水通道和 10 个甘氨酸残基, OfHXK4 则包含 12 个疏水通道和 10 个甘氨酸残基。 与其他序列相比, OfHXK4 氨基酸序列在其 C 端的腺苷结合位点处多出 11 个氨基酸残基 (KNEGAS RSKMR)

2.2 桂花花瓣 OfHXKs 蛋白质基本理化性质分析及其跨膜区域和二级结构预测

利用 ExPASy protparam 预测分析 OfHXKs 家族蛋白质序列的基本理化性质,了解相对分子质量、氨 基酸组成、等电点 (PI)、不稳定系数、总平均亲水性等,结果见表 3。以 OfHXK1 为例,该基因编码的 氨基酸数目为 498 个,蛋白质相对分子量为 53 881.09 Da,理论等电点为 5.41,分子式为 C2387H3857 N₆₅₃O₇₁₉S₂₁, 氨基酸组成有 20 种, 含有负电荷残基 (Asp+Glu)66 个, 正电荷残基数 (Arg+Lys)53 个, 总 平均疏水性为 0.055, 不稳定系数为 47.03, 故推测 OfHXK1 为稳定蛋白质。结果显示: 除 OfHXK4 为不 稳定蛋白质外,其余均为稳定蛋白质。蛋白质信号肽预测使用 SignalP 在线软件默认条件下对 OfHXKs 氨基酸序列 N-端开始前 70 位氨基酸进行信号肽预测分析,结果显示 OfHXKs 氨基酸序列均无 信号肽存在。应用 YLoc 在线软件进行亚细胞定位预测,结果显示 OfHXK1 与 OfHXK2 均定位于细胞质 中,而OfHXK3则定位于叶绿体,OfHXK4位于线粒体。

Table 3 Information of OfHXK proteins in O. fragrans									_
蛋白质	相对分子量	理论等电点	氨基酸数目/个	正电荷	负电荷	不稳定系数	总平均亲水指数	信号肽	亚细胞定位
OfHXK1	53 881.09	5.41	498	53	66	37.03	0.055	无	细胞质
OfHXK2	54328.40	5.91	501	55	62	34.73	-0.077	无	细胞质
OfHXK3	53 812.81	5.99	495	64	59	37.25	-0.023	无	叶绿体
OfHXK4	55 894.38	6.58	510	61	63	46.37	-0.042	无	线粒体

使用 TMHMM 在线软件分析桂花 OfHXKs 蛋白质可能的跨膜区域,结果显示除 OfHXK3 外均具有 跨膜区域 (图 2), OfHXK1、OfHXK2 与 OfHXK4 分别在第 7~24 位氨基酸残基、第 9~28 位氨基酸残基



和第 5~24 位氨基酸残基处具有跨膜区域,因此判断 OfHXK1、OfHXK2 与 OfHXK4 为跨膜蛋白质,而 OfHXK3 则不属于跨膜蛋白质。

蛋白质的二级结构预测是为了判断目的基因所编码的氨基酸序列残基是处于 α-螺旋、β 折叠还是其 他状态的二级结构。通过 SOPMA 在线预测分析,结果显示桂花 OfHXKs 蛋白质二级结构主要以 α-螺旋 和无规则卷曲为主 (表 4)。使用 SWISS-MODEL 进行三级结构预测,结果显示为图 3。

Table 4 Secondary structures of OfHXK proteins in O. fragrans									
花白氏	α-螺旋		β-转角		无规则卷曲		延伸链		
虫 口灰	氨基酸数目/个	占比/%	氨基酸数目/个	占比/%	氨基酸数目/个	占比/%	氨基酸数目/个	占比/%	
OfHXK1	239	47.99	31	6.22	162	32.53	66	13.25	
OfHXK2	241	48.10	32	6.39	163	32.53	65	12.97	
OfHXK3	208	42.02	31	6.26	188	37.98	68	13.74	
OfHXK4	223	43.73	26	5.10	182	35.69	79	15.49	

表 4 桂花花瓣 OfHXKs 蛋白质二级结构预测



图 3 桂花 OfHXKs 蛋白质三级结构预测 Figure 3 Prediction of tertiary structures of OfHXK proteins in O. fragrans

2.3 OfHXKs 氨基酸序列同源性和系统进化分析

通过 NCBI 在线数据库比对,将4个桂花花瓣 OfHXKs 蛋白质序列分别进行同源性比对。Blastp 比 对结果显示:OfHXK1与油橄榄 Olea europaea XP_022882495.1 同源性为 96.39%,与芝麻 Sesamum indicum XP_022882495.1 同源性为 88.15%;OfHXK2与油橄榄 XP_022843013.1 同源性高达 97.80%; OfHXK3与油橄榄 XP_022884724.1 同源性高达 96.16%,而与阿月浑子 Pistacia vera XP_031283181.1 以 及粉红钟花 Handroanthus impetiginosus PIM98716.1 同源性分别为 82.70% 与 85.45%;OfHXK4 与油橄榄 XP_022873061.1 同源性达到 95% 以上,说明 OfHXKs 具有高度保守性。

利用 MEGAX 软件对 4 个桂花花瓣 OfHXKs 蛋白质和从 NCBI 在线数据库中找到的拟南芥 HXKs 蛋白质序列进行多序列比对,以 100% bootstrap 支持度构建系统进化树进行分析,预测桂花 OfHXKs 的功能。由图 4 所示:所选择蛋白质序列分别为拟南芥 AtHXK1(U28214)、AtHXK2(U28215)、AtHXK3



(BT030472)、AtHKL1(NM_103929)、AtHKL2(NM_112895)和 AtHKL3(NM_119945)。进化树分析结果表明桂花花瓣 OfHXK1与 OfHXK2关系较近,而 OfHXK3和 OfHXK4分别聚集在不同小支,由此推断 OfHXKs 蛋白质之间的功能可能具有一定区别。其中 OfHXK1、OfHXK2 与拟南芥 AtHXK1、AtHXK2 聚集在一支,而 OfHXK3则与拟南芥 AtHXK3 关系较近,OfHXK4则与拟南芥 AtHKL1、AtHKL2 关系 较近。

2.4 桂花 OfHXKs 基因表达分析

以桂花的顶壳期 (S₁)、铃梗期 (S₂)、初花期 (S₃)和盛花期 (S₄)花序以及 1 年生茎、2 年生茎、嫩 叶、成熟叶的 cDNA 为模板,以桂花 ACT 基因为内参,进行实时荧光定量 PCR,检测不同品种桂花不 同组织及不同发育阶段的 OfHXKs 基因表达情况。由图 5 可见:OfHXK1 在'堰虹桂'中的表达量呈现 先上升后下降的趋势;在'金球桂'中同样也在 S₃时期表达量最高,且显著高于'堰虹桂'与'玉玲珑'中相同时期的表达量 (P<0.05);而 OfHXK1 基因在'玉玲珑'中的表达呈现先上升后下降的趋势,于 S₂ 时期的表达量达到最高。OfHXK2 基因在'堰虹桂'中的表达量呈现逐步上升的趋势,于盛花期的 表达量最高;在'金球桂'中,OfHXK2 的表达量随着开放过程未发生变化;OfHXK2 的表达量在'玉 玲珑'中呈现先上升后下降的趋势。OfHXK3 基因在 3 个品种的表达量随着花开放呈现先上升后下降的趋势,均在 S₂ 时期达到最高;S₂ 时期'金球桂'OfHXK3 基因的表达量最高,'玉玲珑'次之。 OfHXK4 基因在'堰虹桂'和'金球桂'中的表达量也是先上升后下降的趋势,在 S₂ 时期达到最高,而 该基因在'玉玲珑'中表达量逐渐下降。S₂ 时期'金球桂'OfHXK4 基因的表达量最高,'堰虹桂'次之。



图 5 各品种桂花不同发育时期花序 OfHXKs 基因相对表达量变化 Figure 5 Expression changes of OfHXK genes during different inflorescence of different O. fragrans cultivars

如图 6 所示:在不同组织中,OfHXK1 在嫩叶中的表达量最高,在成熟叶和盛花期花序中表达量次之,在1年生茎中的表达量最低;OfHXK2 在盛花期花序中的表达量最高,在2年生茎中的表达量最低;OfHXK3 则在茎中表达量最高,在成熟叶中的表达量极低;OfHXK4 在成熟叶中的表达量最高,嫩叶中表达量次之,显著高于1、2年生茎和盛开期花序中的表达量。



图 6 '堰虹桂'不同组织中 OfHXKs 基因表达量变化 Figure 6 Expression changes of OfHXK genes during different tissues of O. fragrans 'Yanhong Gui'

3 讨论

HXK 参与糖代谢的同时也参与己糖信号的感受和传导^[20-22],由于其重要的生物学功能,关于 HXK 蛋白的研究也逐渐成为热点^[9,14,23-25]。本研究在桂花中发现 HXK 基因的 4 个同源基因,表明与其他 植物一样^[6],HXK 基因也是以多基因家族形式存在桂花中,同一 HXK 基因家族成员序列在不同桂花品 种中保守。桂花 OfHXK1~OfHXK4 基因推导的氨基酸序列均包含葡萄糖和 ATP 的结合位点,推测 OfHXK1~ OfHXK4 均具有催化己糖磷酸化的功能。其中,OfHXK4 氨基酸序列在其 N 端的腺苷结合位点处多出 11 个氨基酸残基,这与拟南芥中 HKL1 和 HKL2 腺苷结合位点处多 10 个和 6 个氨基酸残基的情况^[10] 类似。

进化树表明 OfHXK1、OfHXK2 与拟南芥 AtHXK1、AtHXK2 聚集在一支,已知 AtHXK1 和 AtHXK2 具有催化己糖磷酸化的作用^[10],且具有糖感知和传导的功能^[26],推测 OfHXK1 与 OfHXK2 同样具有催化 己糖磷酸化和感知并转导糖信号的功能。OLSSON 等^[27]将植物 HXK 分为 A 类和 B 类,A 类 HXK 具有 质体信号肽,如 AtHXK3;B 类 HXK 具有 N 端膜锚定结构,如 AtHXK1 与 AtHXK2。根据进化树推测 OfHXK1 和 OfHXK2 可能属于 B 类 HXK,此外,核心的糖结合区域 (LGFTFSFP-Q-L/I)在 OfHXK1 和 OfHXK2 序列中极其保守。OfHXK3 与 AtHXK3 聚集于同一小支,拟南芥 AtHXK3 具有催化作用但无糖 信号传导功能^[28],推测无跨膜区域的 OfHXK3 属于 A 类 HXK,具有催化作用但无糖信号传导功能。定 位于线粒体中的拟南芥 AtHKL1 和 AtHKL2 属于酶催化活性不高的 HXK 亚型,其氨基酸序列 C 端的腺 苷结合位点处多出若干个氨基酸残基^[10],而推测聚在一支的 OfHXK4 有相同特点。

桂花 OfHXK1~OfHXK4 基因在 1 年生茎、2 年生茎、嫩叶、成熟叶和盛开时花序中均有表达。其他物种的大部分 HXK 基因,如拟南芥 AtHXK1~AtHXK3、AtHKL1 和 AtHKL2^[10],番茄 Lycopersicon esculentum LeHXK1~LeHXK4^[11],水稻 Oryza sativa OsHXK2~OsHXK9^[8],枸杞 Lycium barbarum LbHXK^[29]和苹果 Malus × domestica MdHXK1^[30],在被检测的组织器官中均有表达。但是 OfHXKs 不同成员在不同组织中的表达水平呈现一定差异。OfHXK1 和 OfHXK2 基因在叶和花中的表达量高于茎中,而 OfHXK3 基因在

茎中的表达量最高,表明 HXKs 基因不同成员虽然磷酸已糖的功能存在冗余^[10],但是不同成员在桂花不同组织中发挥的主导作用存在差异。依据进化树分析,OfHXK1 与 OfHXK2 基因被推测具有糖信号感知和转导功能,可能参与调控桂花花色和花香相关次生代谢物质的生物合成,这可能是 OfHXK1 与 OfHXK2 基因在花中的表达量较高的原因之一。

本研究分析了 3 个桂花品种不同发育阶段花瓣中 OfHXKs 基因的表达情况,整体上'金球桂'中 OfHXKs 基因表达量最高;随着花开放的进程,OfHXK1、OfHXK3 和 OfHXK4 基因的表达量呈现先上升 后下降的趋势。枸杞中研究发现,随着枸杞果实的发育,HXK 基因表达量在色变期达到峰值,成熟期表 达量又下降^[29]。牡丹 Paeonia suffruticosa 花瓣中的研究发现:随着发育过程 PsHXK1 和 PsHXK2 基因在 花瓣中的表达量呈现先增加后下降的规律,该变化规律与己糖含量有密切的关联^[24]。植物组织器官中的 糖含量在一定范围内增加可以促进 HXK 基因转录本和蛋白质的积累,植物体内己糖的磷酸化水平随之 增加;超过一定阈值后,植物体内糖含量增加则会抑制 HXK 基因转录和蛋白质的积累^[5]。这也就解释了 大部分 OfHXKs 基因表达量先上升后下降的原因。桂花不同品种色素物质和香气挥发物含量不同^[1-2],推 测不同桂花品种对 HXK 己糖磷酸化和糖信号转导作用的需求不同,此外 HXK 不同成员还有功能冗余的 特点,因此 OfHXK2 基因在 3 个桂花品种花瓣中的表达模式不同。

4 结论

本研究根据桂花转录组 Unigene 序列分析,筛选得到 4 个 HXK 基因的同源基因。生物信息学分析结 果表明 4 个基因分别编码 461~510 个氨基酸残基,同时推测 OfHXK1~OfHXK4 均具有催化己糖磷酸化 的功能。进化树分析表明 OfHXK1 和 OfHXK2 与拟南芥 AtHXK1 与 AtHXK2 亲缘关系较近;OfHXK3 与 AtHXK3 亲缘关系较近;OfHXK4 与 AtHKL1 和 AtHKL2 亲缘关系较近。实时荧光定量 PCR 分析表 明桂花 OfHXK1~OfHXK4 基因在 1 年生茎、2 年生茎、嫩叶、成熟叶和花序中均有表达;OfHXK1、 OfHXK3 和 OfHXK4 基因随着花开放的进程,整体上表达量呈现先上升后下降的趋势,而 OfHXK2 基因 在 3 个品种花序发育过程中表达模式不同。

5 参考文献

- [1] FU Jianxin, HOU Dan, WANG Yiguang, *et al.* Identification of floral aromatic volatile compounds in 29 cultivars from four groups of *Osmanthus fragrans* by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Hortic Environ Biotechnol*, 2019, **60**(5): 611-623.
- [2] WANG Yiguang, ZHANG Chao, DONG Bin, et al. Carotenoid accumulation and its contribution to flower coloration of Osmanthus fragrans [J]. Front Plant Sci, 2018, 9: 1499.
- [3] GRANOT D. Role of tomato hexose kinases [J]. *Funct Plant Biol*, 2007, **34**(6): 564 570.
- [4] 程建徽, 谢鸣, 蒋桂华, 等. 植物己糖激酶的信号转导作用[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(6): 50 54.
 CHENG Jianhui, XIE Ming, JIANG Guihua, *et al.* The signaling role of hexokinase in plants [J]. *Chin J Cell Biol*, 2004, 26(6): 50 54.
- [5] WANG Xufeng, LI L M, YANG P P, et al. The role of hexokinases from grape berries (*Vitis vinifera* L.) in regulating the expression of cell wall invertase and sucrose synthase genes [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(2): 337 347.
- [6] KARVE R, LAURIA M, VIRNIG A, et al. Evolutionary lineages and functional diversification of plant hexokinases [J]. Mol Plant, 2010, 3(2): 334 – 346.
- [7] 张超, 王彦杰, 付建新, 等. 高等植物己糖激酶基因研究进展[J]. 生物技术通报, 2012, 28(4): 19-26.
 ZHANG Chao, WANG Yanjie, FU Jianxin, *et al.* Research advances in the hexokinase gene family in higher plant [J].
 Biotechnol Bull, 2012, 28(4): 19-26.
- [8] CHO J, RYOO N, KO S, et al. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (Oryza sativa L.) [J]. Planta, 2006, 224(3): 598 611.
- [9] WANG Jingxue, WANG Xiaomin, GENG Siyu, *et al.* Correction to: genome-wide identification of hexokinase gene family in *Brassica napus*: structure, phylogenetic analysis, expression, and functional characterization [J]. *Planta*, 2018, 248(1): 171-182.

- [10] KARNE A, RAUH B L, XIA X, *et al.* Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2008, 228(3): 411 425.
- [11] KANDELKFIR M, DAMARIWEISSLER H, GERMAN M A, et al. Two newly identified membrane-associated and plastidic tomato HXKs: characteristics, predicted structure and intracellular localization [J]. Planta, 2006, 224(6): 1341 – 1352.
- [12] JANG J, LEON P, ZHOU L, et al. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants [J]. Plant Cell, 1997, 9(1): 5 19.
- [13] MOORE B D, ZHOU L, ROLLAND F, et al. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling [J]. Science, 2003, 300(5617): 332 336.
- [14] ZHOU L, JANG J, JONES T L, et al. Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1998, 95(17): 10294 – 10299.
- [15] PEGO J V, WEISBEEK P, SMEEKENS S, et al. Mannose inhibits arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step [J]. Plant Physiol, 1999, 119(3): 1017 – 1023.
- [16] ZHENG Yanjun, TIAN Li, LIU Hongtao, et al. Sugars induce anthocyanin accumulation and flavanone 3-hydroxylase expression in grape berries [J]. Plant Growth Regul, 2009, 58(3): 251 – 260.
- [17] MIAO Huiying, WEI Jia, ZHAO Yanting, *et al.* Glucose signalling positively regulates aliphatic glucosinolate biosynthesis
 [J]. J Exp Bot, 2013, 64(4): 1097 1109.
- [18] 向其柏,刘玉莲.中国桂花品种图志[M].杭州:浙江科学技术出版社,2008.
- [19] ZHANG Chao, FU Jianxin, WANG Yiguang, *et al.* Identification of suitable reference genes for gene expression normalization in the quantitative real-time PCR analysis of sweet Osmanthus *(Osmanthus fragrans Lour.)* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): 1 – 17.
- [20] 秦巧平,张上隆,徐昌杰. 己糖激酶与植物生长发育[J]. 植物生理学报, 2003, 39(1): 1-8.
 QIN Qiaoping, ZHANG Shanglong, XU Changjie. Hexokinase and development of plants [J]. Plant Physiol, 2003, 39(1): 1-8.
- [21] HALFORD N G, PURCELL P C, HARDIE D G, *et al.* Is hexokinase really a sugar sensor in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 1999, **4**(3): 117 120.
- [22] PERATA P, MATSUKURA C, VERNIERI P, et al. Sugar repression of a gibberellin-dependent signaling pathway in barley embryos [J]. Plant Cell, 1997, 9(12): 2197 – 2208.
- [23] GRANOT D, DAVIDSCHWARTZ R, KELLY G, et al. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development [J]. Front Plant Sci, 2013, 4: 44.
- [24] ZHANG Chao, ZHANG Lili, FU Jianxin, *et al.* Isolation and characterization of hexokinase genes *PsHXK*1 and *PsHXK*2 from tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andrews) [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(1): 327 336.
- [25] HU Dagang, SUN Cuihui, ZHANG Quanyan, et al. Glucose sensor MdHXK1 phosphorylates and stabilizes MdbHLH3 to promote anthocyanin biosynthesis in apple [J]. *PLoS Genet*, 2016, **12**(8): e1006273. doi: 10.1371/journal.pgen.1006273.
- [26] OLSSON T, THELANDER M, RONNE H. A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucosephosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(45): 44439 – 44447.
- [27] MINET M, DUFOUR M, LACROUTE F, *et al.* Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs [J]. *Plant J*, 1992, **2**(3): 417 422.
- [28] 李浩霞,杨斌,尹跃,等. 枸杞己糖激酶基因 LbHXK 的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2019, 39(6): 1009 1015.
 LI Haoxia, YANG Bin, YIN Yue, et al. Cloning and expression analysis of hexokinase gene (LbHXK) from wolfberry (Lycium barbarum Linn.) [J]. Acta Bot Boreali-Occident Sin, 2019, 39(6): 1009 1015.
- [29] 赵锦, 孙美红, 胡大刚, 等. 苹果己糖激酶基因 MdHXK1 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(8): 1437 1447. ZHAO Jin, SUN Meihong, HU Dagang, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hexokinase gene MdHXK1 in apple [J]. Acta Hortic Sin, 2015, 42(8): 1437 – 1447.
- [30] 张超. 葡萄糖调控牡丹切花花青素苷合成的分子机理[D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
 ZHANG Chao. Molecular Mechanism of Glucose Regulating Anthocyanin Biosynthesis of Tree Peony Cut Flower[D].
 Beijing: Beijing Forestry University, 2014.