

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2024)02-0097-09

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2024.02.001

遗传育种

# 马铃薯 *StNF-YA9* 基因的生物信息学及其表达分析

徐文瑾<sup>1,2</sup>, 范军亮<sup>1,2</sup>, 李世贵<sup>1,2</sup>, 王凯彤<sup>2,3</sup>, 张宁<sup>1,2\*</sup>, 司怀军<sup>1,2</sup>

(1. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070;

2. 省部共建干旱生境作物学国家重点实验室/甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:** NF-Y 是一种普遍存在于真核生物中的转录因子, 通常以 NF-YA/B/C 异源三聚体的形式发挥作用, 其中 NF-YA 转录因子通过特异性结合 DNA 启动子区域的 CCAAT box, 调控下游靶基因表达以应对胁迫。通过前期对马铃薯 *NF-Ys* 基因家族的分析, 发现沉默马铃薯 *StNF-YA9* 基因, 马铃薯对干旱胁迫更为敏感。因此, 从马铃薯品种 'Atlantic' 中克隆了 *StNF-YA9* 基因, 生物信息学分析表明该基因总长度为 1 231 bp, CDS 区长 723 bp。通过构建 *StNF-YA9* 亚细胞定位融合表达载体确定其定位在细胞核中; 采用 qRT-PCR 分析该基因组织和逆境胁迫下表达模式, 结果表明其在叶片中相对表达量最高, 芽中相对表达量最低, 受到聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 和脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 诱导上调表达。研究结果为马铃薯 *StNF-YA9* 基因后续功能研究提供理论基础。

**关键词:** 马铃薯; *StNF-YA9*; 克隆; 生物信息学分析; 亚细胞定位

## Bioinformatics and Expression Analysis of the *StNF-YA9* Gene in Potato

XU Wenjin<sup>1,2</sup>, FAN Junliang<sup>1,2</sup>, LI Shigui<sup>1,2</sup>, WANG Kaitong<sup>2,3</sup>, ZHANG Ning<sup>1,2\*</sup>, SI Huaijun<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. State Key Laboratory of Aridland Crop Science/Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** NF-Y is a transcription factor ubiquitous in eukaryotes, typically functioning as NF-YA/B/C heterotrimers. The NF-YA transcription factor regulates the expression of downstream target genes in response to stress by specifically binding to the CCAAT box in the DNA promoter region. It was discovered that the potato exhibits increased sensitivity to drought stress when the *StNF-YA9* gene is silenced through a comprehensive analysis of the potato *NF-Ys* gene family. In this research, the *StNF-YA9* gene was cloned from the potato variety 'Atlantic'. Bioinformatics analysis showed that the total length of *StNF-YA9* gene was 1 231 bp, and the CDS region length was 723 bp. The subcellular localization fusion expression vector of *StNF-YA9* was constructed to determine its localization in the nucleus. The expression pattern of *StNF-YA9* in potato tissues and under stress was analyzed by qRT-PCR. The results showed that the relative expression of the *StNF-YA9* gene was highest in leaves and lowest in buds. The expression was up-regulated by

收稿日期: 2024-03-25

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1602103); 甘肃省科技重大专项计划项目(23ZDNA006)。

作者简介: 徐文瑾(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为马铃薯生物技术育种。

\*通信作者(Corresponding author): 张宁, 博士, 教授, 研究方向为马铃薯遗传育种, E-mail: ningzh@gsau.edu.cn。

polyethylene glycol (PEG) and abscisic acid (ABA). The results would provide the theoretical basis for subsequent functional studies on the potato *StNF-YA9* gene.

**Key Words:** potato; *StNF-YA9*; cloning; bioinformatics analysis; subcellular localization

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是茄科(Solana-ceae)茄属(*Solanum* L.)一年生草本植物<sup>[1]</sup>。马铃薯原产于南美洲安第斯山脉, 约在1 600年前, 经现在的印度尼西亚从南线和经俄罗斯从北线传入中国<sup>[2]</sup>。马铃薯是全球公认第四大粮食作物, 具有适应性广、丰产性好、营养丰富和经济效益高等特点, 兼具蔬菜、粮食、饲料以及工业加工原料等多种用途。中国马铃薯种植面积仅次于小麦(*Triticum aestivum* L.)、玉米(*Zea mays* L.)和水稻(*Oryza sativa* L.), 约为460.6万hm<sup>2</sup>, 占全球马铃薯种植面积的29.9%; 中国马铃薯产量为1 830.9万t, 总产占全球的25.3%, 单产为世界平均水平的85.5%, 马铃薯生产对确保粮食安全具有重大意义<sup>[3]</sup>。然而, 由于马铃薯根系较浅, 且块茎产量、数量和质量受水分条件影响较大, 对水分亏缺十分敏感, 常被视为一种干旱敏感型作物<sup>[4]</sup>。全世界干旱、半干旱地域面积分别约占陆地面积的24%及10.9%, 这些干旱地域遍布在50多个国家和地区, 中国干旱、半干旱地域面积占全国的52.5%<sup>[5]</sup>。马铃薯作为重要旱作农作物, 在其生长周期中, 干旱胁迫对其生长、产量和品质的影响极其严重, 干旱胁迫使马铃薯植株代谢紊乱和生理生化功能失常, 最终导致马铃薯块茎畸形, 品质变劣, 产量下降<sup>[6]</sup>。由于干旱胁迫严重影响马铃薯的产量和品质, 因此, 解析马铃薯响应干旱胁迫分子机理, 选育具备较强耐旱能力品种, 对马铃薯抗旱遗传研究及品种改良具有重要意义。

植物在生长周期中常受到各种逆境胁迫, 植物作为固着生物无法主动逃避, 只能被动适应。因此, 在漫长的适应过程中, 植物进化出各种策略应对胁迫, 其中就包括通过功能基因调节。响应干旱胁迫的功能基因其表达产物根据功能可分为三类, 即具有转录调控作用的蛋白质、具有保护属性的蛋白质和参与水分子吸收及转运的蛋白质<sup>[7]</sup>。核因子Y(Nuclear factor-Y, NF-Y)是一种广

泛存在于真核生物中的转录因子, 通过调控特定基因表达在植物生长发育中发挥重要作用。目前, 已在许多植物中发现NF-Y基因。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)基因组中分别包括10个NF-YA基因、13个NF-YB基因和13个NF-YC基因<sup>[8]</sup>; 水稻基因组包含11个NF-YA基因、11个NF-YB基因和12个NF-YC基因<sup>[9]</sup>; 小麦中NF-YA、NF-YB和NF-YC基因分别有18、34和28个<sup>[10]</sup>。番茄(*Solanum lycopersicum* L.)中有59个NF-Y基因<sup>[11]</sup>。Li等<sup>[12]</sup>完成了马铃薯NF-Ys基因家族分析, 共鉴定出41个*StNF-Y*基因, 包括10个*StNF-YA*, 22个*StNF-YB*和9个*StNF-YC*, 在马铃薯12条染色体上均有分布。

NF-Y转录因子在植物中主要以NF-YA/B/C三聚体的形式发挥功能, 研究表明, 三聚体中主要通过NF-YA与下游靶基因结合调控下游基因表达<sup>[13]</sup>; NF-YA作为NF-Y转录因子复合体中调控下游靶基因表达的重要亚基, 在参与植物生长发育和抵御逆境胁迫过程中具有重要意义。在棉花(*Gossypium* spp.)重要抗旱种质资源二倍体野生种异常棉(*G. anomalum*)中发现15个NF-YA基因对干旱持续时间有不同程度的响应, 11个NF-YA基因含有干旱诱导的MYB结合位点(MYB binding site involved in drought-inducibility, MBS)<sup>[14]</sup>; 在甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)中*BnaNF-YA2*受聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)、高温、低温处理诱导表达; 过表达*BnaNF-YA2*改善了甘蓝型油菜在PEG和甘露醇处理条件下的生长状况<sup>[15]</sup>; 在马铃薯中*StNF-YA8*基因表达可被干旱诱导<sup>[16]</sup>, 沉默马铃薯*StNF-YA9*基因, 在干旱胁迫条件下, 马铃薯叶片脯氨酸(Proline, Pro)含量积累减少, 对干旱胁迫更敏感<sup>[12]</sup>。本试验基于*StNF-YA9*前期研究结果, 从马铃薯中克隆获得了*StNF-YA9*基因, 对其进行生物信息学分析, 并通过PEG、脱落酸(Abscisic acid, ABA)、NaCl胁迫处理马铃薯

植株分析该基因在逆境胁迫下的表达情况, 为进一步研究 *StNF-YA9* 基因在马铃薯生长发育过程中如何发挥作用和行使功能提供理论基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

马铃薯品种‘Atlantic’试管苗和盆栽苗, 普通本氏烟草(*Nicotiana benthamian* L.)。

#### 1.1.2 载体、菌株及试剂

亚细胞定位载体 pCAMBIA1300-35S-EGFP、大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 DH5 $\alpha$  和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)感受态细胞 GV3101, 由甘肃农业大学马铃薯生物技术创新团队实验室保存并提供。

TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂、FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂盒和质粒小提试剂盒, 购自天根生化科技(北京)有限公司; 2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)、利福平(Rif)、乙酰丁香酮(ACE)、硫酸卡那霉素(Kan), 购自北京索莱宝科技有限公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 限制性核酸内切酶 *Sal* I 和 *Sac* I, 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 同源重组试剂盒 ClonExpress<sup>®</sup> II One Step Cloning Kit, 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 实时荧光定量酶 2 $\times$  Universal Blue SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Master Mix, 购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 植物材料培养及处理

为获得马铃薯盆栽苗, 将马铃薯品种‘Atlantic’试管苗接种于含有 3% 蔗糖 MS 培养基中, 在 22  $^{\circ}$ C 光照培养箱中培养, 16 h 光照/8 h 暗循环。21 d 后, 将幼苗移植到 10 cm  $\times$  10 cm 包含营养土壤和蛭石体积比为 3:1 混合物的塑料盆中, 保持温度在 24  $^{\circ}$ C, 16 h 光照/8 h 黑暗循环和 60% 相对湿度条件生长 45 d。随后采集一部分植株的根、芽、茎和叶进行组织特异性分析。其余植株选择长势一致的进行胁迫处理。采用叶面喷施含 0.1 mmol/L ABA 溶

液方式作为 ABA 胁迫处理; 分别用 200 mmol/L NaCl 和 20% PEG 6000(w/v) 灌溉幼苗作为盐胁迫处理和模拟干旱胁迫处理, 处理后 3、6、12 和 24 h 收集叶片, 立即用液氮冷冻, 在 -80  $^{\circ}$ C 环境保存以备后续试验, 每个样本采集 3 株独立的幼苗, 并进行 3 个生物学重复。

本氏烟草的培养: 将烟草种子撒在含有体积比为 1:1 的营养土和蛭石混合物的 10 cm  $\times$  10 cm 花盆中, 在光照强度 2 000 Lx, 光照周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 温度为 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C 条件下培养 4~5 周后用于相关试验。

#### 1.2.2 RNA 提取及 cDNA 合成

将之前保存于 -80  $^{\circ}$ C 环境中马铃薯组织取出, 按照天根 TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂说明书提取总 RNA, 随后根据试剂盒说明书将总 RNA 反转录为 cDNA, 在 -20  $^{\circ}$ C 环境保存以备后续试验。

#### 1.2.3 马铃薯 *StNF-YA9* 基因克隆

根据 *StNF-YA9* 基因去除终止子的 CDS 序列和 pCAMBIA1300-35S-EGFP 载体序列通过 TaKaRa 在线工具(<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools>)设计带有同源臂且酶切位点为 *Sal* I、*Sac* I 的特异性引物(表 1)。以 cDNA 为模板克隆, 在冰上加样, 反应体系: *Taq* 酶 10  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L、‘Atlantic’ cDNA 1  $\mu$ L、上下游引物各 1  $\mu$ L; 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min 循环 1 次, 94  $^{\circ}$ C 25 s、63.2  $^{\circ}$ C 25 s、72  $^{\circ}$ C 15 s 循环 34 次, 72  $^{\circ}$ C 5 min 循环 1 次, 4  $^{\circ}$ C 保存。扩增 PCR 产物由 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收。

#### 1.2.4 马铃薯 *StNF-YA9* 基因生物信息学分析

在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中搜索马铃薯 *StNF-YA9* 基因(GenBank: No. XM\_015310406.1)并通过 NCBI ORF finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)进行开放式阅读框分析; 通过 ExPASy server([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) ProtParam 工具分析马铃薯 *StNF-YA9* 蛋白基本理化性质; 通过 SOPMA(<https://web.expasy.org/protparam/>)分析马铃薯 *StNF-YA9* 蛋白二级结构; 通过 SWISS-MODEL(

del.expasy.org/) 预测马铃薯 *StNF-YA9* 蛋白三级结构; 利用 SMART 网站 (<https://smart.embl.de/>) 分析

该蛋白结构域; 通过 DNAMAN 6.0 软件对马铃薯 *StNF-YA9* 同源蛋白进行多重序列比对。

表1 试验所用引物

Table 1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	用途 Purpose
StNF-YA9-F	AGAACACGGGGACGAGCTCATGTTTCAAAAATCGGATGCTGA	基因克隆
StNF-YA9-R	TGCTCACCATGTGCGACGAAATGTTCCGAGTGCATGCA	
Ef1 $\alpha$ -F	GATGGTCAGACCCGTGAACA	内参基因
Ef1 $\alpha$ -R	CCTTGAGTACTTCCGGGCTC	
Primer-YA9-F	GCCAGTTGAAGTGAAAGAGGAGCCAAT	荧光定量PCR
Primer-YA9-R	TGTCGGTGACGCGATTCTGCTGA	

### 1.2.5 马铃薯 *StNF-YA9* 基因亚细胞定位

用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Sac* I 对 pCAMBIA1300-35S-EGFP 载体进行双酶切并回收, 通过同源重组法将线性化的载体和 *StNF-YA9* 基因连接构建 pEGFP-*StNF-YA9* 亚细胞定位融合表达载体。重组反应体系为: 线性化 pCAMBIA1300-35S-EGFP 空载体 10.5  $\mu$ L、5 $\times$ CE II Buffer 4  $\mu$ L、*StNF-YA9* 目的片段 2.5  $\mu$ L、Exnase II 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 1  $\mu$ L, 冰上加样, 充分混匀并短暂离心后, 置于 PCR 仪中 37  $^{\circ}$ C 反应 30 min, 然后将重组产物立即置于冰上, 从 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中取出大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 参照王凯彤<sup>[17]</sup>方法将重组质粒导入大肠杆菌感受态细胞中, 对获得的菌液进行菌液 PCR 检测, 反应体系和条件同 1.2.3, 将检测出合适条带的菌液送生工生物工程(上海)有限公司测序, 将测序合适的菌液提取质粒, 命名为 pEGFP-*StNF-YA9*。参照王芳芳<sup>[18]</sup>方法将 pEGFP-*StNF-YA9* 重组质粒导入农杆菌 GV3101 感受态细胞进行烟草瞬时转化, 烟草暗处理 48 h 后, 用刀片避开叶脉取 5 mm  $\times$  5 mm 浸染过的叶片制片, 在 LSM800 激光共聚焦扫描显微镜(Germany)下观察 GFP 荧光信号分布情况。

### 1.2.6 马铃薯 *StNF-YA9* 基因组织特异性和表达分析

采用 2  $\times$  Universal Blue SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Master Mix 说明书中两步法对 *StNF-YA9* 基因进行 qRT-

PCR 分析。通过在线工具 Primer3 Plus (<https://www.primer3plus.com/>) 以马铃薯 *StEF1 $\alpha$*  基因 (GenBank No. AB061263.1) 为内参基因设计引物 (表 1)。qRT-PCR 反应体系为: 2  $\times$  Universal Blue SYBR<sup>®</sup> Green qPCR Master Mix 10  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L、cDNA 模板 1  $\mu$ L、上下游引物各 0.5  $\mu$ L, qRT-PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 30 s 循环 1 次, 95  $^{\circ}$ C 15 s、60  $^{\circ}$ C 30 s 循环 40 次。试验设计 3 个生物学重复和技术性重复, 通过 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法计算基因相对表达量<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯 *StNF-YA9* 基因克隆

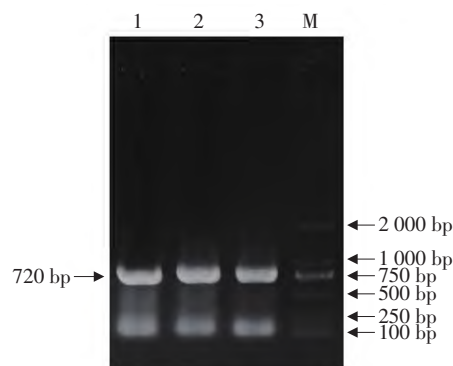
马铃薯 *StNF-YA9* 基因 CDS 区序列长 723 bp。以马铃薯品种 'Atlantic' 的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增不含终止密码子的 *StNF-YA9* 基因 CDS 区序列, 并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示克隆出的马铃薯 *StNF-YA9* 基因片段大小在 720 bp 左右 (图 1)。

### 2.2 马铃薯 *StNF-YA9* 基因的生物信息学分析

马铃薯 *StNF-YA9* 基因生物信息学结果显示, 该基因总长度为 1 231 bp, CDS 区为 723 bp, 编码 240 个氨基酸, 其中丝氨酸 (Ser) 占比最高 (10.8%)。根据 NCBI 分析, *StNF-YA9* 基因包含 6 个外显子, 分布在 10 号染色体上 (PGSC gene ID: Soltu.DM.10G028300.1; Chromosome location: chr10)。StNF-YA9 蛋白理化性质分析显示, 其相对分子质量为



27 303. 44 U, 理论等电点为 9.23, 为碱性蛋白。*StNF-YA9* 蛋白脂肪系数为 49.96, 其亲水性平均值为 -0.981, 为亲水蛋白。*StNF-YA9* 蛋白二级结构由无规则卷曲、 $\alpha$ -螺旋、延伸链和 $\beta$ -转角 4 种结构组成, 分别为 56.25%、18.33%、16.67% 和 8.75%(图 2)。此外, 还预测了 *StNF-YA9* 蛋白三级结构(图 3A)。对 *StNF-YA9* 氨基酸序列保守结构域的分析表明, *StNF-YA9* 包含 CBF(CCAAT-Binding transcription Factor) 结构域(图 3B)。通过 DNAMAN 软件对 10 个物种中的 *StNF-YA9* 氨基酸进行同源序列比对发现, 马铃薯 *StNF-YA9* 蛋白与番茄 *NF-YA9* 蛋白序列相似度最高, 为 92.95%, 与拟南芥 *NF-YA9* 亲缘关系最远, 为 24.68%(图 4)。



注: M. DNA 标准分子量 DL 2 000, 1、2、3. 目的片段。  
Note: M. DNA marker DL 2 000, 1, 2, 3. The target fragment.

图 1 马铃薯 *StNF-YA9* 基因 PCR 产物  
Figure 1 Result of PCR product of *StNF-YA9* gene

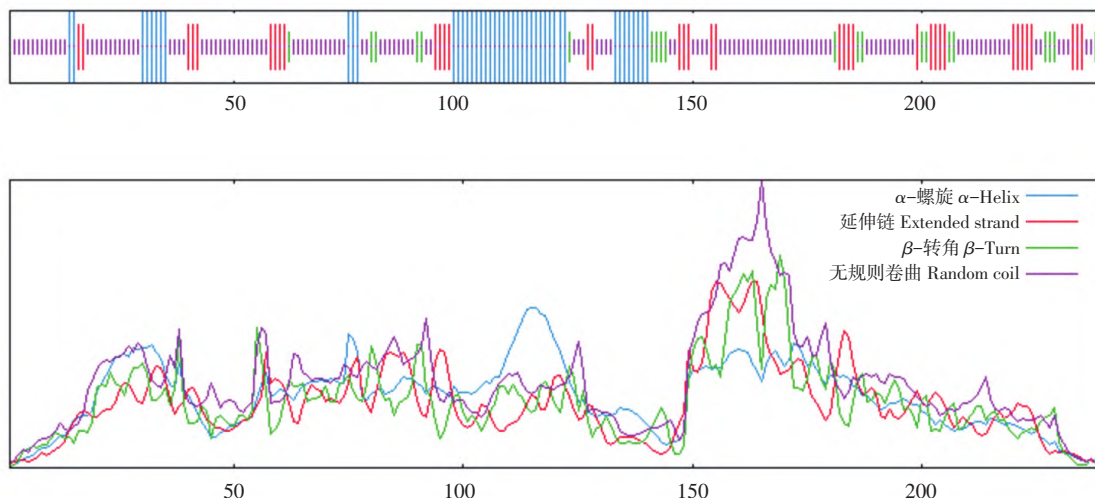
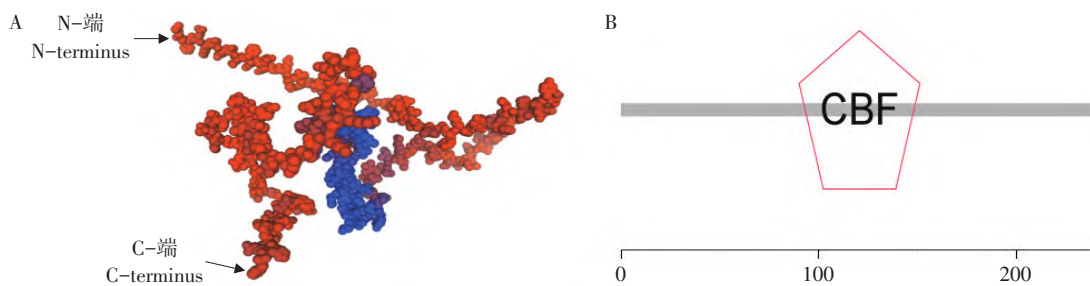


图 2 *StNF-YA9* 蛋白二级结构预测

Figure 2 Secondary structure prediction of *StNF-YA9* protein

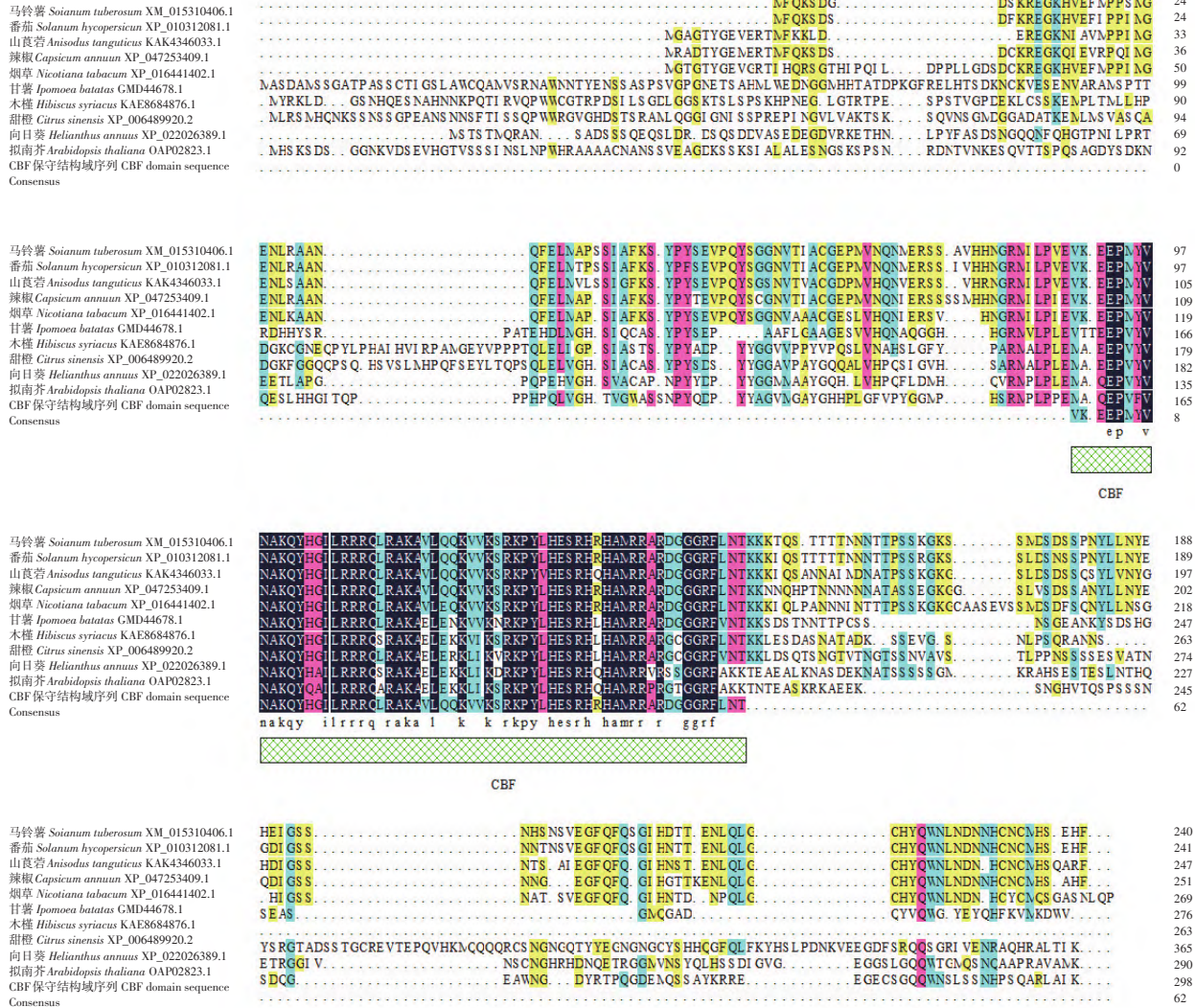


注: A. *StNF-YA9* 蛋白三级结构预测, B. *StNF-YA9* 保守结构域。

Note: A. Tertiary structure prediction of *StNF-YA9* protein, B. Conserved domain of *StNF-YA9* protein.

图 3 *StNF-YA9* 蛋白三级结构预测和保守结构域

Figure 3 Tertiary structure prediction and conserved domain analysis of *StNF-YA9* protein



注: 黑色. 同源级别=100%, 蓝色. 同源级别≥75%, 粉色. 同源级别≥50%, 黄色. 同源级别≥33%。

Note: Black. Homologous level=100%, Blue. Homologous level≥75%, Pink. Homologous level≥50%, and Yellow. Homologous level≥33%.

图4 StNF-YA9氨基酸序列及其他物种同源序列多重比较

Figure 4 Multiple homology comparisons of StNF-YA9 amino acid sequence with other species

2.3 亚细胞定位观察

以 pCAMBIA1300-35S-EGFP 空载体为空白对照, 在激光共聚焦显微镜下观察 pEGFP-StNF-YA9 融合表达载体在烟草叶片细胞中的瞬时表达。结果显示(图 5), 在对照组中, GFP 信号在烟草细胞的细胞膜、细胞质和细胞核中表达, 无特异性分裂, 而在试验组中, pEGFP-StNF-YA9 融合蛋白主要在细胞核中表达, 在细胞膜和细胞质中不表达。

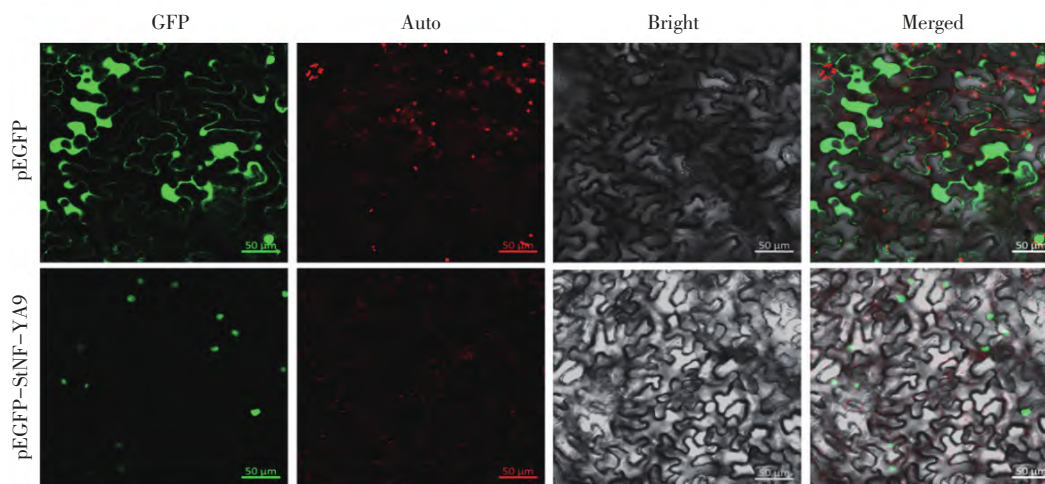
2.4 马铃薯 StNF-YA9 基因组织特异性和表达分析

为分析 StNF-YA9 基因在不同组织的表达量差异, 采集不同组织进行组织特异性表达分析, qRT-PCR 结果表明(图 6), StNF-YA9 基因在马铃薯组织中的表达水平存在差异。该基因在叶片中的相对表达量最高, 芽中的相对表达量最低; StNF-YA9 基因在马铃薯组织中表达量的整体趋势

为: 叶 > 根 > 茎 > 芽。

通过 qRT-PCR 分析 *StNF-YA9* 基因在 PEG、NaCl 和 ABA 胁迫处理后的马铃薯植株相对表达量, 结果表明, 在 PEG 和 ABA 胁迫处理下, *StNF-YA9* 基因表达量呈先增后减趋势, 处理 12 h 时表达量

达到峰值, 在 NaCl 胁迫处理下, *StNF-YA9* 基因的相对表达水平虽然略有上升趋势, 但上升趋势不明显 (图 7)。这表明 *StNF-YA9* 基因受到 PEG 和 ABA 诱导, *StNF-YA9* 基因可能参与马铃薯植株响应干旱和 ABA 胁迫的通路。

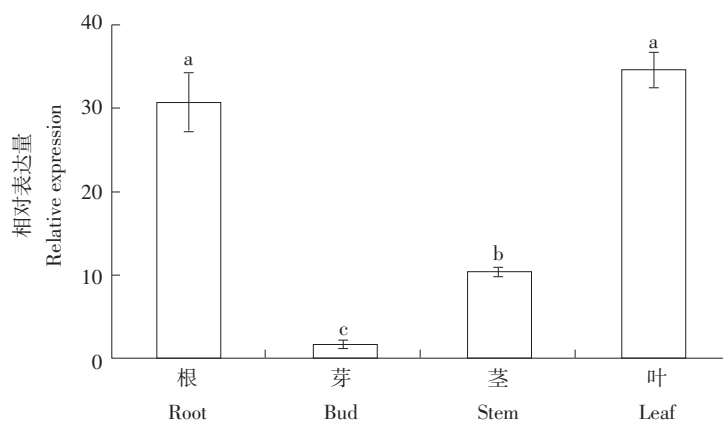


注: pEGFP. 空白对照, pEGFP-*StNF-YA9*. *StNF-YA9* 和 EGFP 融合蛋白, GFP. 暗场下的 EGFP 荧光信号, Auto. 叶绿素的自发荧光, Bright. 明场下的细胞形态, Merged. 组合场。

Note: pEGFP. Blank control, pEGFP-*StNF-YA9*. *StNF-YA9* and EGFP fusion protein, GFP. EGFP fluorescence signal in the dark field, Auto. Autofluorescence of chlorophyll, Bright. Cell morphology under bright field, and Merged. Combination field.

图 5 *StNF-YA9* 的亚细胞定位

Figure 5 Subcellular localization of *StNF-YA9*



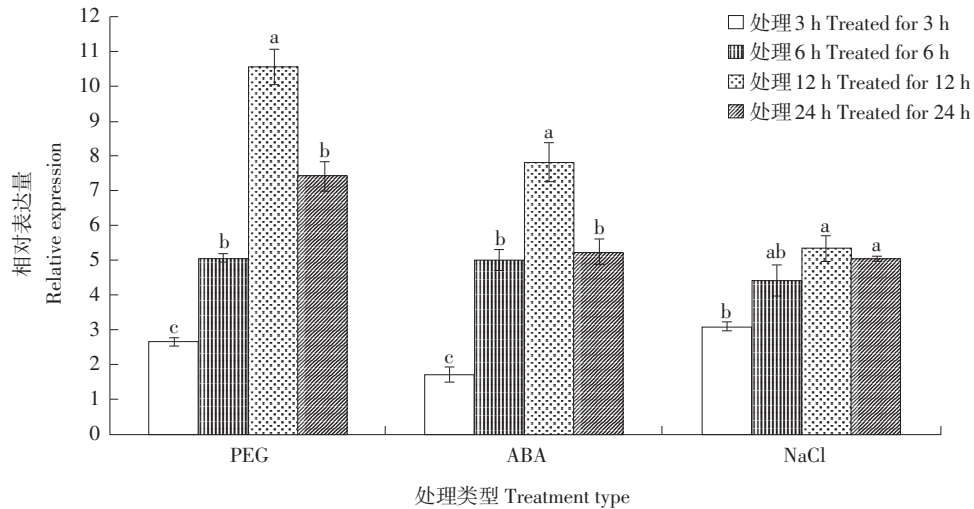
注: 数据表示为平均值±标准差, 不同小写字母表示相同基因不同组织之间差异显著 ( $P < 0.05$ ),  $n=3$ 。处理平均值多重比较采用最小显著差数法。

Note: Data are expressed as mean ± SD. Different lowercase letters indicate significant differences between different tissues ( $P < 0.05$ ),  $n=3$ . Treatment means are separated by using least significant difference (LSD) method.

图 6 *StNF-A9* 基因在马铃薯品种 'Atlantic' 组织特异性表达分析

Figure 6 Tissue-specific expressions analysis of *StNF-A9* gene in potato variety 'Atlantic'





注: 数据表示为平均值±标准差, 不同小写字母表示相同基因相同处理类型不同处理时间之间差异显著( $P < 0.05$ ),  $n=3$ 。处理平均值多重比较采用最小显著差数法。

Note: Data are expressed as mean±SD. Different lowercase letters indicate significant differences between different treatment times in the same treatment for the same gene, respectively ( $P < 0.05$ ),  $n=3$ . Treatment means are separated by using least significant difference (LSD) method.

图7 *StNF-YA9*基因在PEG、ABA、NaCl胁迫处理下相对表达水平

Figure 7 Relative expression levels of *StNF-YA9* gene under PEG, ABA and NaCl stress treatments

### 3 讨论

转录因子作为基因表达的关键调节因子, 在植物响应逆境胁迫、激素调控、细胞分化和组织发育等多个关键过程中扮演着举足轻重的角色<sup>[20]</sup>, 如WRKY转录因子可激活抗氧化酶系统从而调节细胞中依赖ROS的非生物胁迫应答, 这一过程对于维持细胞内稳定性和正常功能具有关键意义<sup>[21]</sup>。自从NF-Y转录因子首次在油菜中被发现以来<sup>[22]</sup>, 大量关于NF-Y基因参与植物响应非生物胁迫的研究被报道。拟南芥中过表达小麦*TaNF-YA10*基因降低耐盐性<sup>[23]</sup>, 玉米中过表达*ZmNF-YB16*可提高玉米抗旱性而增加玉米产量<sup>[24]</sup>, 水稻*OsNF-YA4*基因受到ABA诱导表达<sup>[25]</sup>, NF-Y基因广泛参与植物响应非生物胁迫, 在植物逆境生理中发挥重要作用。

通过对马铃薯*StNF-YA9*基因进行生物信息学分析表明: *StNF-YA9*蛋白为亲水蛋白, 且含有NF-Y家族标志性的保守结构域CBF, 符合该家族可通过NF-YA结合下游靶基因启动子区CCAAT box

从而调控下游靶基因表达的特点。在进化程度上与番茄亲缘关系最近, 达92.95%, 这与马铃薯和番茄同属茄科茄属, 在进化上拥有共同祖先的属性相符<sup>[26]</sup>。亚细胞定位试验可确定蛋白质在细胞内的位置, 并为研究蛋白质与其他蛋白质之间潜在在相互作用提供线索。通过观察荧光信号发光位置, 确定*StNF-YA9*作用在细胞核上, 这与NF-Y作为转录因子通常在细胞核中行使功能的特性相一致。类似地, 马铃薯中的*StNF-YA8*也在细胞核中表达<sup>[16]</sup>。至于*StNF-YA9*蛋白定位对其特定功能和信号通路的影响, 有必要使*StNF-YA9*基因在植物中稳定表达, 确定其调控下游的靶基因, 然后进行进一步研究。

本研究对马铃薯各组织进行相对表达量分析, 发现*StNF-YA9*基因在不同组织中的表达量存在显著差异, 在根和叶中表达量最高, 在芽中表达量最低。本研究分析了*StNF-YA9*基因在马铃薯遭遇胁迫时相对表达量的变化情况。PEG作为一种高分子化合物, 可在水溶液中形成高渗透压环境。通过加入PEG溶液, 植物生长基质(通常为



培养基或土壤)中水分子因 PEG 存在而被吸附, 减少了植物根系吸水能力, 从而模拟干旱环境。干旱胁迫会导致马铃薯叶片丙二醛含量、可溶性糖含量和 Pro 含量变化趋势存在差异, 叶片叶绿素含量相对值 (SPAD 值) 随着生育期推进逐渐降低, 影响马铃薯正常生长生活<sup>[27]</sup>。ABA 是植物在感知到干旱信号后产生的一种广泛参与的应激激素, 对植物生长调节起着重要作用。ABA 主要在植物根部进行合成, 随后被转运至叶片。叶片中的保卫细胞对 ABA 极其敏感, 随之产生反应促使离子通道开启, 钾离子和阴离子从保卫细胞中流出, 细胞渗透压显著降低, 从而引发气孔关闭, 以帮助植物应对干旱压力。加入外源 ABA 可增强植物非生物胁迫下抗氧化能力, 进而提高植物抗旱性<sup>[28]</sup>。因此通过 PEG、ABA 和 NaCl 处理模拟非生物胁迫, 测定植物特定基因的相对表达量, 一定程度上可反映该基因在植株抵御逆境胁迫中发挥的作用。对马铃薯植株进行 PEG、ABA 和 NaCl 处理后, 定量分析发现胁迫诱导 *StNF-YA9* 表达时, *StNF-YA9* 对 ABA 和 PEG 胁迫较 NaCl 胁迫更为敏感, 在胁迫处理后 12 h 相对表达量达到峰值随后下降, 相同的变化情况在马铃薯 *StWRKY57* 基因上也有发现<sup>[29]</sup>。这可能是马铃薯在受到胁迫后, 响应逆境胁迫的基因 *StNF-YA9* 表达上调, 然而随着胁迫时间增加植物渗透调节系统遭到破坏, 导致基因相对表达量下降。因此, 在后续研究中可通过遗传转化获得 *StNF-YA9* 转基因马铃薯来解析 *StNF-YA9* 功能, 通过酵母单杂交试验等技术挖掘和鉴定 *StNF-YA9* 靶基因, 完善该基因响应非生物胁迫通路。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 罗其友, 刘洋, 高明杰, 等. 中国马铃薯产业现状与前景 [J]. 农业展望, 2015, 11(3): 35-40.
- [ 2 ] 王芳, 刘雁南, 赵文. 推进中国马铃薯主食化进程研究 [J]. 世界农业, 2016(3): 11-14.
- [ 3 ] 徐宁, 张洪亮, 张荣华, 等. 中国马铃薯种植业现状与展望 [J]. 中国马铃薯, 2021, 35(1): 81-96.
- [ 4 ] Eiasu B K, Hammes P S, Sersderma P. Response of potato (*Solanum tuberosum*) tuber yield components to gel-polymer soil amendments and irrigation regimes [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2007, 817(3): 121-130.
- [ 5 ] 周维博. 干旱半干旱地提高灌区水资源综合效益研究进展与思考 [J]. 干旱区资源与环境, 2003(5): 91-96.
- [ 6 ] Mahajan S, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 444(2): 139-158.
- [ 7 ] 陈兰兰, 王丽, 吴亚娟, 等. 植物响应干旱胁迫的分子和微生态机制 [J/OL]. 分子植物育种, 1-15[2024-03-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230406.1634.006.html>.
- [ 8 ] Romier C, Cocchiarella F, Mantovani R, et al. The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(2): 1336-1345.
- [ 9 ] Thirumurugan T, Ito Y, Kubo T, et al. Identification, characterization and interaction of HAP family genes in rice [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 279(3): 279-289.
- [ 10 ] Stephenson T J, McIntire C L, Collet C, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the NF-Y family of transcription factors in *Triticum aestivum* [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 65(1-2): 77-92.
- [ 11 ] Li S, Li K, Ju Z, et al. Genome-wide analysis of tomato NF-Y factors and their role in fruit ripening [J]. BMC Genomics, 2016, 17: 36.
- [ 12 ] Li S, Zhang N, Zhu X, et al. Genome-wide analysis of NF-Y genes in potato and functional identification of *StNF-YC9* in drought tolerance [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 749688.
- [ 13 ] Hackenberg D, Wu Y, Voigt A, et al. Studies on differential nuclear translocation mechanism and assembly of the three subunits of the *Arabidopsis thaliana* transcription factor NF-Y [J]. Molecular Plant, 2012, 5(4): 876-888.
- [ 14 ] 徐珍珍, 季为, 陈祥龙, 等. 异常棉 NF-YA 家族基因鉴定及其在干旱胁迫下的表达分析 [J]. 江苏农业学报, 2023, 39(6): 1265-1274.
- [ 15 ] 王高升, 王佩瑶, 孙念礼, 等. *BnaNF-YA2* 增强甘蓝型油菜渗透胁迫抗性的功能鉴定 [J/OL]. 中国油料作物学报, 1-14[2024-03-20]. <https://doi.org/10.19802/j.issn.1007-9084.2024038>.

(下转第 185 页)

- 化利用现状[J]. 中国果菜, 2020, 40(1): 46-52.
- [13] 邓晓君, 杨炳南, 尹学清, 等. 国内马铃薯全粉加工技术及应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(11): 213-218.
- [14] Camire M E, Kubow S, Donnelly D J. Potatoes and human health [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2009, 49(10): 823-840.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 31784—2015 马铃薯商品薯分级与检验规程[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [16] 谢从华, 柳俊. 中国马铃薯从济荒作物到主粮之变迁[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(4): 8-15.
- [17] 蔡兴奎, 谢从华. 中国马铃薯发展历史、育种现状及发展建议[J]. 长江蔬菜, 2016(12): 30-33.
- [18] 刘琳, 赵宇慈, 苏德花, 等. 马铃薯渣饲料化利用研究进展[J]. 中国马铃薯, 2022, 36(1): 63-70.
- [19] 中华人民共和国农业农村部. 农业农村部关于印发《“十四五”全国农产品产地市场体系发展规划》的通知[EB/OL]. [2024-03-01]. <http://www.moa.gov.cn/nybgb>.
- [22] 何铭, 徐建飞, 金黎平. 2022年马铃薯遗传育种研究进展[C]//中国作物学会马铃薯专业委员会. 马铃薯产业与种业创新. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2023.
- [21] 徐宁, 张洪亮, 张荣华, 等. 黑龙江垦区马铃薯产业现状及发展方向[J]. 中国马铃薯, 2021, 35(4): 364-370.
- [22] 于台泽, 贾良良, 牛丽娟, 等. 马铃薯轮作的生态和经济效益——案例分析[J]. 中国马铃薯, 2020, 34(6): 337-349.
- [23] 康鹏玲, 杨素, 马娟娟, 等. 种植密度对马铃薯加工品质的影响[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(1): 83-89.
- [24] 吴东昊, 杨树果. 基于SWOT分析的克山马铃薯品牌建设研究[J]. 黑龙江农业科学, 2023(10): 82-86.
- [25] 金黎平, 罗其友. 我国马铃薯产业发展现状和展望[C]//陈伊里, 屈冬玉. 马铃薯产业与农村区域发展. 哈尔滨: 哈尔滨地图出版社, 2013.
- [26] 张海萍. 马铃薯常见病害防治技术[J]. 世界热带农业信息, 2022(6): 49-50.
- [27] 吴凯龙, 赵海荣, 李宝明. 马铃薯种薯智能仓储库贮藏技术[J]. 内蒙古农业科技, 2014(5): 78.
- [28] 薛芬梅, 蒋桂芳, 张胜利. 马铃薯贮藏保鲜技术[J]. 现代农业科技, 2011(23): 213.
- [29] 郭鑫. 岚县马铃薯产业发展现状及对策研究[J]. 农村经济与科技, 2021, 32(11): 169-170.
- [30] 孙莉莉, 陈海生. 甘肃省马铃薯产业高质量发展研究[J]. 中国马铃薯, 2022, 36(6): 565-572.
- =====
- (上接第105页)
- [16] 王霄, 魏涵, 李世贵, 等. 马铃薯休眠解除相关基因 *StNF-YA8* 的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(1): 50-59.
- [17] 王凯彤. 马铃薯 *StTCP15* 基因在块茎休眠解除过程中的功能研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2022.
- [18] 王芳芳. 马铃薯 *StERF109* 基因的功能鉴定[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021.
- [19] Tang X, Zhang N, Si H, *et al.* Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress [J]. *Plant Methods*, 2017, 13(1): 85.
- [20] Sukunari N V, Mishra A, Kumar A, *et al.* Revisiting the role of transcription factors in coordinating the defense response against citrus bark cracking viroid infection in commercial hop (*Humulus lupulus* L.) [J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 421-433.
- [21] Wang F, Chen H, Li Q, *et al.* GmWRKY27 interacts with GmMYB174 to reduce expression of GmNAC29 for stress tolerance in soybean plants [J]. *Plant Journal*, 2015, 83(2): 224-236.
- [22] Albani D, Robert L S. Cloning and characterization of a *Brassica napus* gene encoding a homologue of the B subunit of a heteromeric CCAAT-binding factor [J]. *Gene*, 1995, 167(1-2): 209-213.
- [23] Ma X, Zhu X, Li C, *et al.* Overexpression of wheat *NF-YA10* gene regulates the salinity stress response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2015, 86: 34-43.
- [24] Wang B, Li Z, Ran Q, *et al.* *ZmNF-YB16* overexpression improves drought resistance and yield by enhancing photosynthesis and the antioxidant capacity of maize plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 709.
- [25] Lee D K, Kim H I, Jang G, *et al.* The NF-YA transcription factor OsNF-YA7 confers drought stress tolerance of rice in an abscisic acid independent manner [J]. *Plant Science*, 2015, 241: 199-210.
- [26] 宋波涛, 涂卫, 王海波, 等. 马铃薯种质演化与分类研究进展[J]. 中国马铃薯, 2023, 37(6): 536-554.
- [27] 郑子凡, 于佳乐, 聂虎帅, 等. 干旱胁迫对18个马铃薯品种生理特性的影响[J]. 中国马铃薯, 2023, 37(4): 306-319.
- [28] 王金丽, 杜晨曦, 周华坤, 等. 外源ABA与植物非生物胁迫抗逆机制[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(13): 12-15.
- [29] 思星如, 陈馨, 魏涵, 等. 马铃薯 *StWRKY57* 基因的生物信息学分析及亚细胞定位[J]. 中国马铃薯, 2023, 37(5): 385-396.