

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2021)03-0193-16

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2021.03.001

遗传育种

马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的鉴定与表达分析

秦天元^{1,2}, 许德蓉^{1,2}, 王一好^{1,2}, 孙超^{1,2}, 毕真真^{1,2}, 刘玉汇^{1,2}, 张俊莲¹, 白江平^{1,2*}

(1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070;

2. 甘肃省干旱生境作物学重点实验室/甘肃省作物遗传改良与栽培种创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 研究利用最新报道(2020年)的杂合二倍体马铃薯‘RH89-039-16’基因组信息鉴定出23个马铃薯 *StSnRK2* 家族成员, 分别被命名为 *StSnRK2.1*~*StSnRK2.23*。通过生物信息学方法, 分析了其基因结构、保守基序、理化性质、共线性关系, 研究了其与水稻、玉米和拟南芥的 *SnRK2* 的系统进化关系, 并利用转录组测序技术探究了家族成员在不同逆境胁迫下的基因表达规律。结果表明, 马铃薯 *StSnRK2* 家族成员不均匀地分布在12条染色体上, 家族成员蛋白长度为298~491 aa, 分子量为32.6~55.4 kD, 等电点4.51~9.47。系统进化树分析发现该基因家族可分为3个亚族, 分别含有13、8和2个 *StSnRK2* 基因, 在这些成员中共找到10个保守基序, 其中保守基序1~9均包含于3个亚组中, 而保守基序10则特异性分布于亚组 I。23个 *StSnRK2* 成员的表达模式表明, 有15个基因在ABA胁迫24 h时表达量发生显著上调, 证明这部分基因对马铃薯响应ABA胁迫具有重要的作用。这些结果为阐明 *StSnRK2* 基因家族的进化关系和进一步研究 *StSnRK2* 基因的功能特性提供了有价值的信息。

关键词: RH89-039-16全基因组; 马铃薯; *StSnRK2* 基因家族; 比较基因组; 表达分析

Identification and Expression Profile of *StSnRK2* Family Genes in Potato

QIN Tianyuan^{1,2}, XU Derong^{1,2}, WANG Yihao^{1,2}, SUN Chao^{1,2}, BI Zhenzhen^{1,2},LIU Yuhui^{1,2}, ZHANG Junlian¹, BAI Jiangping^{1,2*}

(1. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 2. Gansu Provincial Key Lab of Aridland Crop Science/Gansu Key Lab of Crop Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: In the recent study (2020), 23 *StSnRK2* family members were identified from the reference genome of the newly reported hybrid diploid potato 'RH89-039-16'. All the members were named from *StSnRK2.1* to *StSnRK2.23*. The gene structure, conserved motifs, collinearity and physiochemical properties were predicted through bioinformatics methods. Furthermore, the phylogenetic relationships of *StSnRK2* family members was analyzed among rice, maize and *Arabidopsis*, and the gene expression patterns of *StSnRK2* family members was explored under different stress conditions using transcriptome sequencing technology. *StSnRK2* members were unevenly assigned into 12 chromosomes, and there members contained from 298 to 491 amino acids. Their relative molecular weight varied from 32.6 to 55.4 kD, with isoelectric points ranging from 4.51 to 9.47. Phylogenetic analyses showed that 23 *StSnRK2* proteins were divided into three subfamilies, including 13, 8 and 2 genes, respectively. A total of 10 conserved motifs were found in these members,

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 国家自然科学基金(31660432, 31460369, 31960442, 32060502); 国家马铃薯产业技术体系(CARS-09-P14); 中国科学院“西部之光”人才培养计划(2014-01)。

作者简介: 秦天元(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为马铃薯遗传育种。

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

among which conserved motifs from 1 to 9 were all contained in three subgroups, while the 10 conserved motifs were specifically distributed in subgroup I. The expression patterns of 23 *StSnRK2* members showed that 15 genes were significantly up-regulated under ABA stress for 24 h, indicating that these genes play a vital role in potato response to ABA stress. These findings provide useful information to elucidate *StSnRK2* gene family's evolutionary relationship and to further analyze the functional characteristics of *StSnRK2* gene.

Key Words: RH89-039-16 whole genome; potato; *StSnRK2* gene family; comparative genome; gene expression analysis

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.), 在生物分类学中属于茄科(Solanaceae)龙葵亚属(Subg. *Solanum*), 一年生植物, 是全世界第一大粮菜兼用型作物^[1,2]。马铃薯是块茎类作物, 在整个马铃薯生长发育过程中, 逆境胁迫能够改变马铃薯生长期内的源库关系, 进而影响块茎的形成, 从而造成马铃薯产量降低和品质下降^[3-5]。为了避免逆境胁迫造成的不利影响, 植物通过调节自身细胞产生有利的化感物质或启动相关基因的表达来响应逆境胁迫, 从而形成抵抗各种胁迫的自我保护机制, 维持自身正常的生长发育^[6,7]。在响应逆境胁迫的机制中, 植物蛋白激酶磷酸化起着非常重要的作用, 其中, *SnRK2* 蛋白激酶家族是普遍存在于植物中的一类蔗糖非酵解型蛋白激酶, 其功能主要参与脱落酸(Absciscic acid, ABA)依赖及非ABA依赖的非生物胁迫, 从而影响植物生长发育^[8,9]。根据前人的研究, 在玉米中共发现*SnRK2*基因家族有11个成员, 其中有7个家族成员分别受NaCl、低温和热处理诱导表达^[10,11]。此外, 杨树中*SnRK2*家族成员*PtSnRK2.5*和*PtSnRK2.7*在拟南芥中的过表达表明, 盐胁迫下拟南芥的叶绿素含量和根系伸长量相对于对照均保持不变, 提高了植株的存活率。同时, *PtSnRK2.7*或还可影响脂质代谢、类黄酮代谢相关基因、转录因子和一些离子转运相关基因的表达^[12]; 甘蔗*SnRK2*家族成员*SoSnRK2.1*在烟草中的过量表达可以提高烟草的抗旱性^[13]; 研究发现, 拟南芥种子在萌发、生长和休眠等生育期*AtSnRK2.2/3/6*基因在干旱胁迫后其表达量发生变化, 表明这些基因可响应ABA的信号转导^[14-18]; 此外, 在水稻中关于*SnRK2*家族成员的研究表明, 在盐胁迫下, *SAPK4*基因可通过调节水稻体内的离子平衡, 来响应逆境胁迫^[19]。目前, 越来越多的植物研究表明, *SnRK2*家族蛋白激酶可参与响应植物非生物胁迫和ABA依赖^[16,20,21]。

目前, 关于*SnRK2*家族基因已在多种作物中得到了广泛的研究。例如小麦^[22,23]、玉米^[24]、水稻^[19,25]、高粱^[26]、烟草^[27]等。马铃薯作为全球第四大粮食作物, 研究干旱胁迫下马铃薯相关基因的表达模式和分子机制, 对于提高马铃薯品质和产量具有重要意义。目前国内外关于马铃薯中*StSnRK2*基因家族成员的研究相对较少^[28-30]。通过对前期在干旱条件下马铃薯*StSnRK2*基因成员表达谱的分析, 发现*StSnRK2*家族成员中不同基因的表达存在差异。因此, 本文采用比对的方法, 从新发布的马铃薯全基因组数据库中系统地鉴定并分析了*StSnRK2*基因家族成员, 并对其序列特征、染色体定位和基因复制等方面进行了综合分析。这些结果为进一步分析马铃薯*StSnRK2*基因家族的分化过程和生物学功能奠定了基础, 同时也为马铃薯抗逆基因的挖掘和筛选提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 马铃薯*StSnRK2*基因家族成员的鉴定

从Spud DB数据库下载马铃薯最新杂合二倍体参考基因组序列(http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/rh_potato_download.shtml)鉴定马铃薯基因组中的*StSnRK2*基因家族成员^[31]。利用*SnRK2*基因家族的隐马尔可夫模型(注册号: PF00069.25)和本地Blast等多种比对的方法进行多重搜索^[32]。此外, 根据NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中关于拟南芥、水稻、玉米等物种的*SnRK2*基因序列作为种子序列, 为了尽可能地搜索真正的*StSnRK2*基因家族成员, 使用 e 值 $\leq 1e-20$ 来基于Blast算法进行搜索。将经过多重比对后的*StSnRK2*家族成员的蛋白序列提交到CDD数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)和Pfam数据库(<http://pfam.xfam.org/>)来进一步确认符合*StSnRK2*保守域的

最终家族基因成员^[31,33,34]。

1.2 马铃薯 *StSnRK2* 基因的生物信息学分析

利用 CDD 和 Pfam 数据库将最终鉴定到的 *StSnRK2* 基因进行系统发育分析。将所有家族成员基因的蛋白序列先使用 ClustalX (版本 1.83) 软件^[35]结合系统默认参数进行比对。将比对后的文件保存为 meg 格式后, 再使用 MEGA7 软件^[36]进行系统进化树的构建, 使用方法为最大似然数法, 其中将 Bootstrap 值设置为 1 000, 最后根据系统发育树的拓扑结构, 可以将马铃薯 *StSnRK2* 基因成员分为不同的亚族。ExPASy 网站 (<http://web.expasy.org/protparam/>)^[31] 用来计算 *StSnRK2* 基因成员的氨基酸数量、分子量和等电点 (pI) 等指标。利用本地 MEME 工具 (版本 4.11.2, <http://alternate.meme-suite.org/tools/meme>) 采用 Perl 语言来搜索马铃薯 *StSnRK2* 家族成员序列中的保守基序^[37]。通过在线软件 (PG2C, http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/) 和 (GSDS, <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 来分别构建马铃薯 *StSnRK2* 家族成员基因的染色体位置图和外显子-内含子结构图。采用 Perl 语言编写代码来提取马铃薯 *StSnRK2* 家族成员基因编码区上游 1.5 kb 的序列, 并提交到在线数据库 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 中进行该基因家族中重要的顺式作用元件的鉴定。利用 MCScanX^[38] 和 Circos^[39] 软件来研究马铃薯不同染色体间 *StSnRK2* 基因的串联重复和片段复制现象, 并借助于烟草参考基因组来进一步探究马铃薯 *StSnRK2* 基因与烟草之间的比对基因组分析^[31]。

1.3 马铃薯 *StSnRK2* 的基因表达模式分析

本试验利用马铃薯数据库 (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml) 中已上传的关于马铃薯二代 Illumina 的公共 RNA-seq 数据, 并自主进行 Cufflink 和 Tophat 的分析。具体挑选为马铃薯 *StSnRK2* 基因在 150 mmol/L NaCl 下处理 24 h、260 μ mol/L 甘露醇 (Mannitol) 下处理 24 h、50 μ mol/L ABA 下处理 24 h 和 10 μ mol/L 吲哚乙酸 (Indoleacetic acid, IAA) 下处理 24 h 的 FPKM 值, 并根据其 FPKM 值进一步研究马铃薯 *StSnRK2* 基因家族中不同基因的表达模式, 运用 R 软件中的 Heatmap 包来绘制马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的表达模

式热图。

1.4 马铃薯 *StSnRK2* 基因的 qPCR 分析验证

采用 RNA prep Pure Plant Kit (TIANGEN) 试剂盒来提取马铃薯的总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性、用核酸测定仪 (P100) 检测 RNA 的浓度与纯度。检测合格后, 使用 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO) 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 用于后期基因表达量的测定。使用 QuantStudio5 实时荧光定量 PCR (ABI, 美国) 进行 qPCR 的测定。反应体系为 20 μ L: SYBR Premix Ex Tap TM 10 μ L, 引物 F (10 μ mol/L) 0.8 μ L, 引物 R (10 μ mol/L) 0.8 μ L, cDNA 2 μ L, ROX Reverence Dye (2X) 0.4 μ L, ddH₂O 6 μ L。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 95 $^{\circ}$ C 处理 15 s。试验以肌动蛋白 (actin) 为内参基因, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算马铃薯 *StSnRK2* 基因的相对表达量^[31]。

2 结果与分析

2.1 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族成员的鉴定与分析

采用本地 Blast 的生物信息学方法进行分析, 从马铃薯 ‘RH89-039-16’ 全基因组中共鉴定和分析了 *StSnRK2* 基因 38 个 *StSnRK2*, 再通过局部保守序列的 BLASTP 发现 28 个序列。删除两种方法比对后的重复序列, 最终保留 26 个特征序列, 并提交至 CDD 和 Pfam 在线数据库中进行保守 *StSnRK2* 蛋白结构域的确认。最后, 共鉴定到 23 个 *StSnRK2* 家族成员, 分别命名为 *StSnRK2.1~StSnRK2.23* (表 1)。表 1 列出了基因 ID、染色体位置、氨基酸数、分子量和 pI。马铃薯中 *StSnRK2* 家族基因长度范围从 286 (*RHC11H2G0520*) 到 491 个氨基酸 (*RHC01H2G4721*) 不等。*StSnRK2* 的分子量为 32.6 (*RHC11H2G0520*) ~ 55.4 kD (*RHC01H2G4721*)。*StSnRK2* 基因分布于 12 对马铃薯染色体上。*StSnRK2* 基因的预测等电点为 4.51 (*RHC11H2G0520*) ~ 9.47 (*RHC02H2G1792*)。以上结果表明, *StSnRK2* 基因家族中, 不同基因的长度相差较大, 且与分子量有关。此外, 大多数 *StSnRK2* 蛋白 (65%) 的 pI 小于 7.0, 由于 pI 主要取决于氨基酸中酸性氨基酸和碱性氨基酸的比值, 因此推断该家族大多数基因蛋白可能是一类酸性蛋白 (表 1)。

表1 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族信息
Table 1 Information of *StSnRK2* gene family in potato

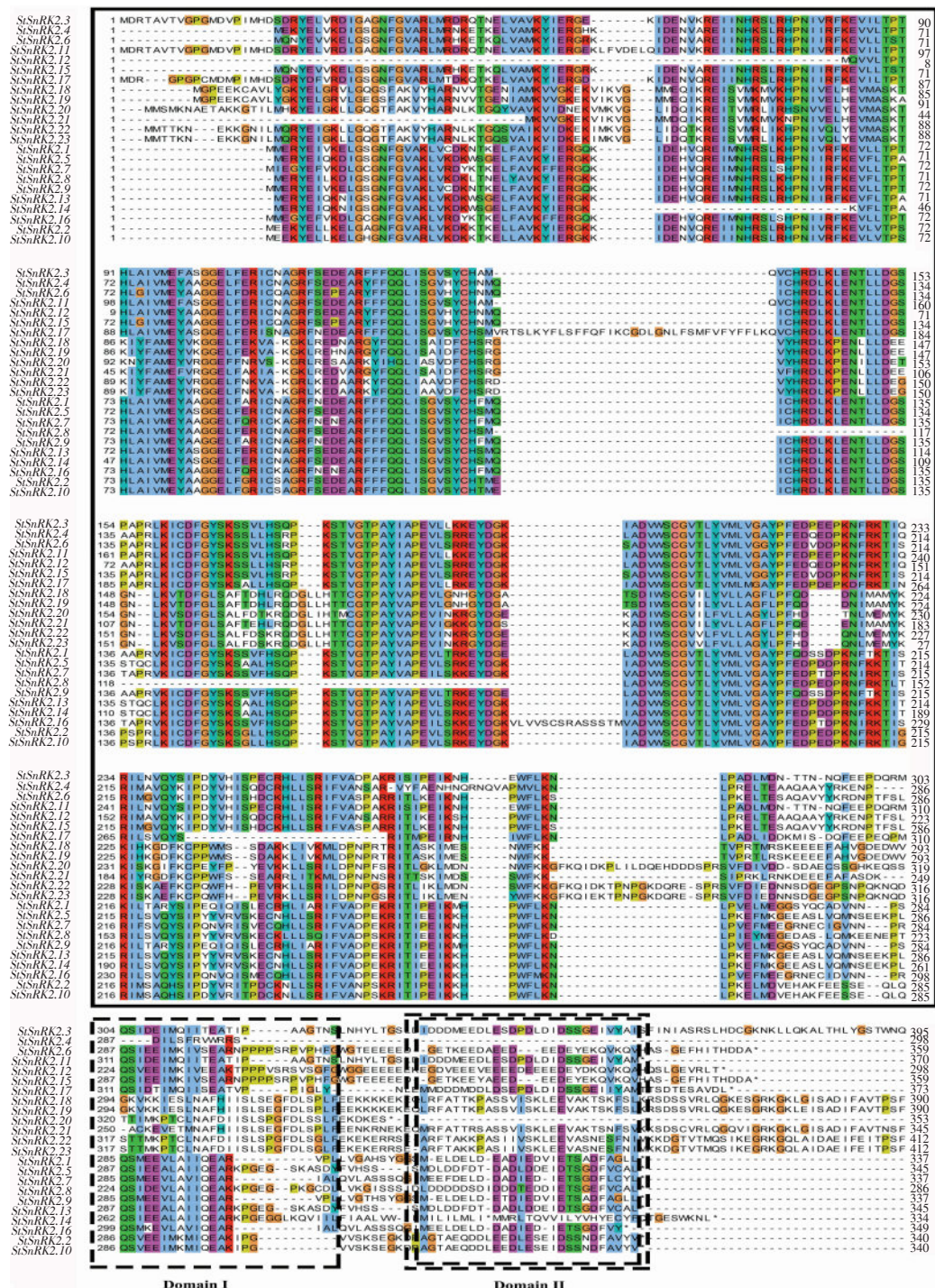
基因名称 Gene name	基因ID Gene ID	亚组 Group	染色体位置 Chromosome location	大小 Size	分子量(Da) MV	等电点 pI
<i>StSnRK2.3</i>	<i>RHC01H2G4721</i>	I	chr1_2:94313011-94317005	491	55 375.7	5.37
<i>StSnRK2.4</i>	<i>RHC01H1G4351</i>	I	chr1_1:85723431-85726493	298	34 372.2	9.21
<i>StSnRK2.6</i>	<i>RHC05H1G2882</i>	I	chr5_1:63924894-63926900	359	41 165.4	6.61
<i>StSnRK2.11</i>	<i>RHC01H1G4875</i>	I	chr1_1:89969522-89972411	370	41 954.2	4.65
<i>StSnRK2.12</i>	<i>RHC01H2G4270</i>	I	chr1_2:90844045-90846804	298	34 073.1	4.79
<i>StSnRK2.15</i>	<i>RHC05H2G2118</i>	I	chr5_2:52762269-52769874	359	41 213.5	6.72
<i>StSnRK2.17</i>	<i>RHC02H1G2993</i>	I	chr2_1:43350733-43355792	374	42 656.3	4.54
<i>StSnRK2.18</i>	<i>RHC12H1G0278</i>	I	chr12_1:1961438-1962736	433	48 600.0	9.30
<i>StSnRK2.19</i>	<i>RHC12H2G0348</i>	I	chr12_2:3943626-3944924	433	48 647.0	9.18
<i>StSnRK2.20</i>	<i>RHC03H2G0570</i>	I	chr3_2:9242175-9243233	353	40 113.0	8.70
<i>StSnRK2.21</i>	<i>RHC07H1G0088</i>	I	chr7_1:1151386-1152537	384	43 308.7	9.28
<i>StSnRK2.22</i>	<i>RHC02H2G1792</i>	I	chr2_2:34967780-34969233	460	52 274.8	9.47
<i>StSnRK2.23</i>	<i>RHC02H1G1575</i>	I	chr2_1:31452010-31453483	462	52 664.2	9.36
<i>StSnRK2.1</i>	<i>RHC04H1G2693</i>	II	chr4_1:72376813-72379648	337	37 875.2	5.28
<i>StSnRK2.5</i>	<i>RHC04H2G0841</i>	II	chr4_2:11150329-11153679	345	39 206.3	5.47
<i>StSnRK2.7</i>	<i>RHC12H1G2488</i>	II	chr12_1:61400369-61404229	337	38 380.7	5.65
<i>StSnRK2.8</i>	<i>RHC11H2G0520</i>	II	chr11_2:5809823-5812616	286	32 578.8	4.51
<i>StSnRK2.9</i>	<i>RHC04H2G2688</i>	II	chr4_2:70033178-70035987	337	37 935.2	5.28
<i>StSnRK2.13</i>	<i>RHC04H1G0858</i>	II	chr4_1:9944976-9948498	345	39 205.3	5.65
<i>StSnRK2.14</i>	<i>RHC04H1G0855</i>	II	chr4_1:9913862-9917423	334	37 965.0	7.74
<i>StSnRK2.16</i>	<i>RHC12H2G2541</i>	II	chr12_2:61340301-61343524	349	39 602.2	6.06
<i>StSnRK2.2</i>	<i>RHC08H1G2753</i>	III	chr8_1:67504152-67507109	340	38 412.7	6.07
<i>StSnRK2.10</i>	<i>RHC08H2G2309</i>	III	chr8_2:53244544-53247518	340	38 478.7	6.20

2.2 马铃薯 *StSnRK2* 氨基酸序列同源性比对及其进化分析

StSnRK2 基因家族成员蛋白主要由2部分组成, 其中70%的部分为N末端激酶结构域, 另外30%的部分位于C末端。其中, 能够响应非生物胁迫的激活区域(Domain I)和ABA激活结构域(Domain II)的部分主要分布在C末端。对马铃薯23条*StSnRK2*氨基酸序列进行多重序列比对, 发现该基因家族在N端具有较高的保守性, 属于*StSnRK2*基因家族成员的核心区域。C末端存在响应非生物胁迫的激活区

域(Domain I), 该结构域存在于所有家族成员中。除*StSnRK2.4*和*StSnRK2.20*两个蛋白外, 其余21个*StSnRK2*蛋白C末端均存在能够响应ABA的结构域(Domain II)(图1)。

为了进一步了解马铃薯*StSnRK2*基因家族成员的同源性, 利用水稻、拟南芥、玉米等物种中已鉴定出的*SnRK2*基因为种子序列, 共同构建了与马铃薯*StSnRK2*的系统发育树, 聚类结果显示为3个亚族: I、II和III, 分别含有13、8、2个*StSnRK2*基因(图2)。

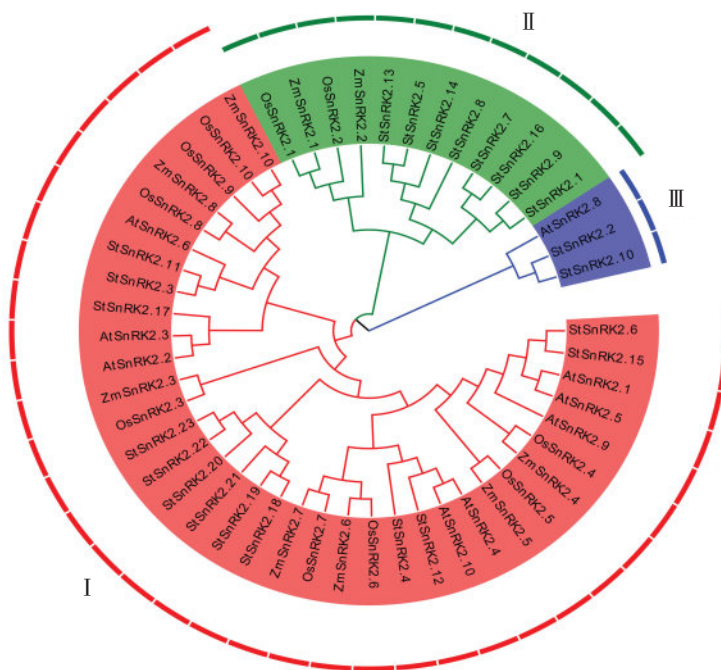


注: 黑色框表示N末端激酶结构域; 单虚线框表示C末端响应非生物胁迫结构域; 双虚线框表示C末端ABA诱导的酸性氨基酸调节结构域。

Note: BBlack box represents N-terminal kinase domain; single dotted line box represents structural domain of C-terminal response to abiotic stress; double dotted lines box represents C-terminal ABA inducible acid amino acid regulatory domain.

图1 马铃薯23个*StSnRK2*蛋白多序列比对

Figure 1 Alignment of amino acid sequences of *StSnRK2* in potato

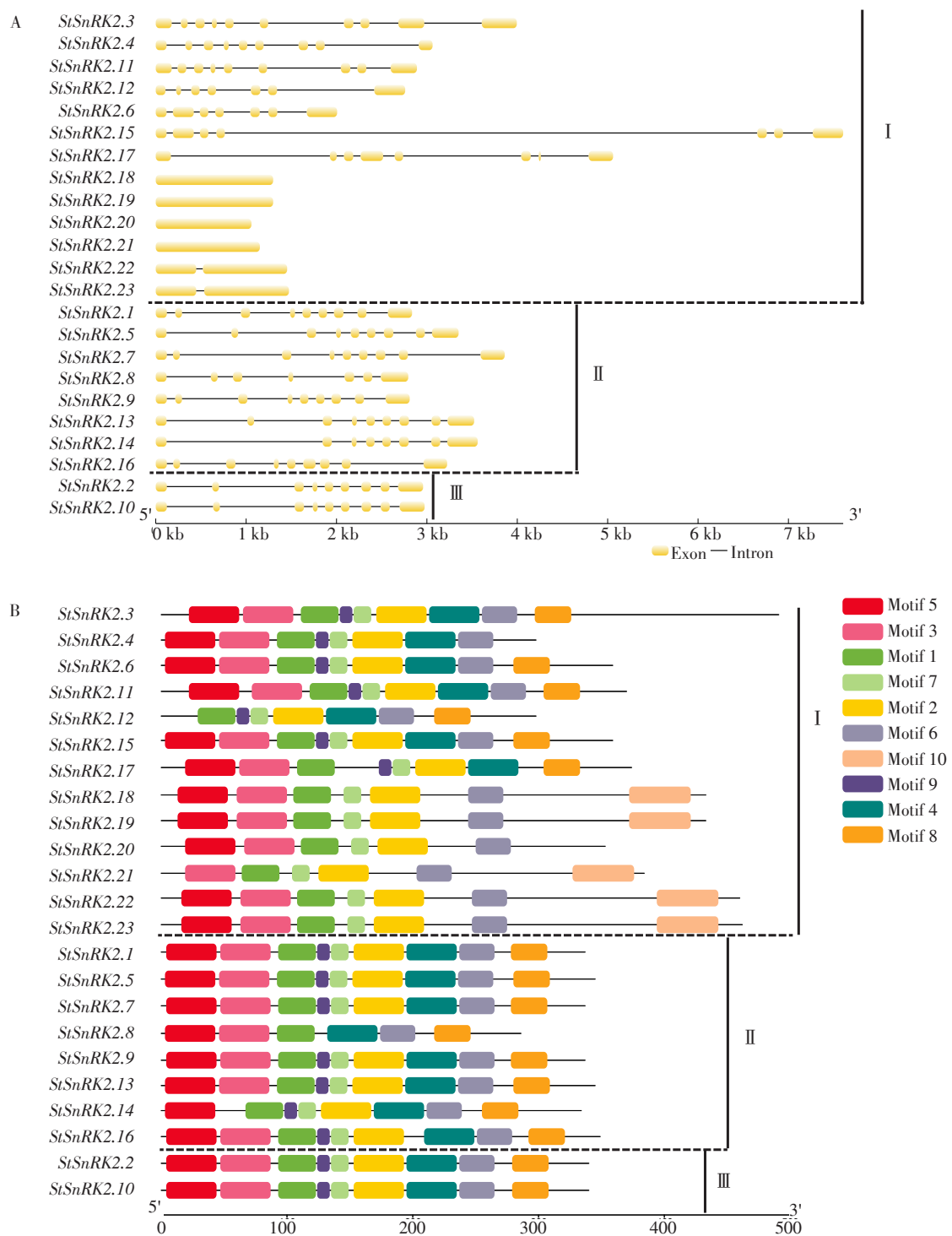
图2 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族系统进化树Figure 2 Unrooted phylogenetic tree of potato *StSnRK2* gene family

2.3 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的结构特征分析

马铃薯 *StSnRK2* 基因家族3个亚族间的基因结构有显著差异。其中, I亚族中外显子的数目为1~10个, 且有部分基因在进化过程中可能完全丢失了内含子; II亚族为7~9个, 而III亚族成员外显子数目只有9个(图3A)。同一亚族的基因外显子结构相似, 但相似的外显子长度却有不同的基因全长, 这说明内含子长度可能有很大的差异。由图3B可知, 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族蛋白共鉴定获得10个保守基序(Motif)。其中, I亚族的蛋白保守序列较II和III亚族结构相对复杂, 第I亚族中包含所有保守基序为Motif 1~Motif 10, 第II亚族和第III亚族中均只包含Motif 1~Motif 9, Motif 10只特异性位于亚族I中。这些结果表明, 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族均含有Motif 1~Motif 9结构域, 但部分成员的其他结构域并不完整。从3个亚族的结构来看, I亚族包含Motif 10的基因均不含Motif 4和Motif 8; II亚族和III亚族中Motif在各个基因上的分布基本一致。说明这些基因在遗传进化过程中可能存在遗传信息的遗失与改变(图3B)。

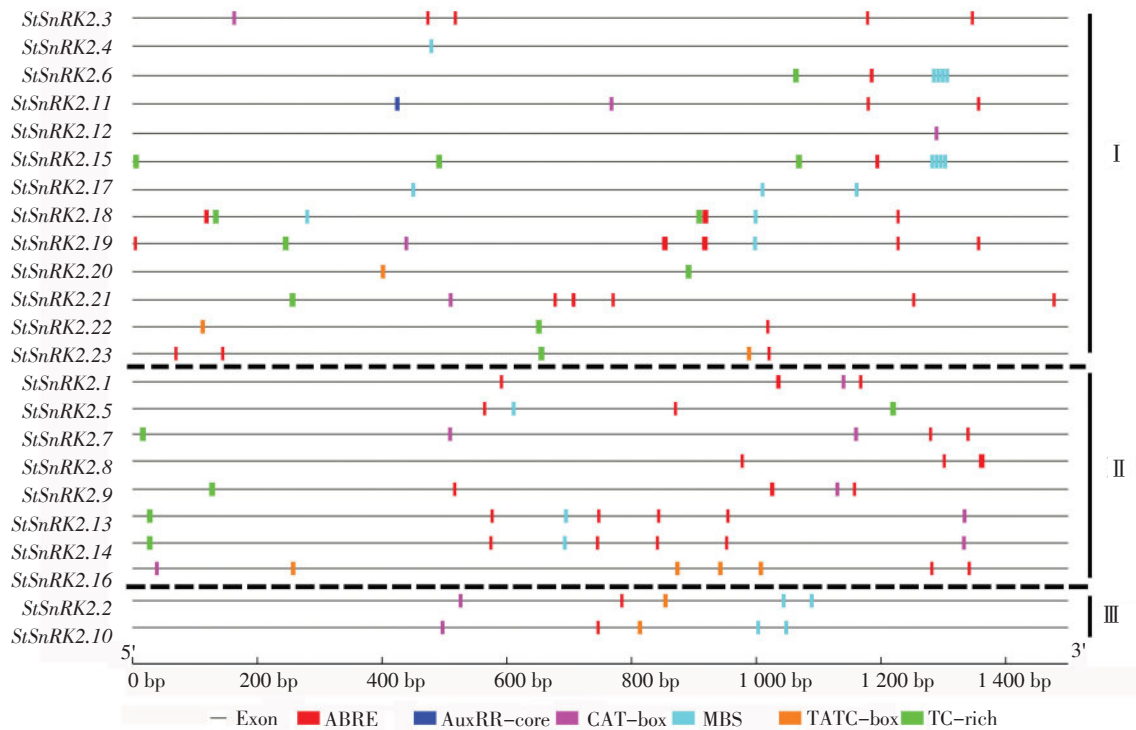
2.4 马铃薯 *StSnRK2* 基因启动子与胁迫相关的顺式元件分析

为了进一步研究 *StSnRK2* 基因在非生物胁迫反应中的潜在调控机制, 利用Perl语言提取 *StSnRK2* 家族基因编码区上游1.5 kb的序列提交到PlantCare网站进行顺式元件的预测。共检测到6个非生物胁迫响应元件, 分别为脱落酸响应元件ABRE, 生长素响应元件AuxRR-core, 与分生组织表达有关的作用元件CAT-box, 参与干旱诱导相关的作用元件MBS, 赤霉素响应元件TATC-box以及参与防御和应激反应的作用元件TC-rich。通过3个亚族中不同顺式元件的分布情况可知, 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族均含有ABRE, CAT-box, MBS和TATC-box顺式作用元件, 其中I亚族基因相对于II亚族富含更多参与生长素响应元件AuxRR-core, 而II亚族基因相对于III亚族富含更多参与防御和应激反应的作用元件TC-rich(图4)。以上结果表明, *StSnRK2* 基因的表达与这些非生物胁迫应激相关且 *StSnRK2* 基因对不同的非生物胁迫作出不同反应可能也与此相关。



注：A. 基因结构；B. 蛋白结构域特征。
Note: A. Gene structure; B. Protein structure.

图3 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族成员的结构特征
Figure 3 A structural characteristics of *StSnRK2* family in potato

图4 马铃薯 *StSnRK2* 基因启动子顺式元件预测分析Figure 4 Predicted analysis of cis-elements in *StSnRK2* promoters

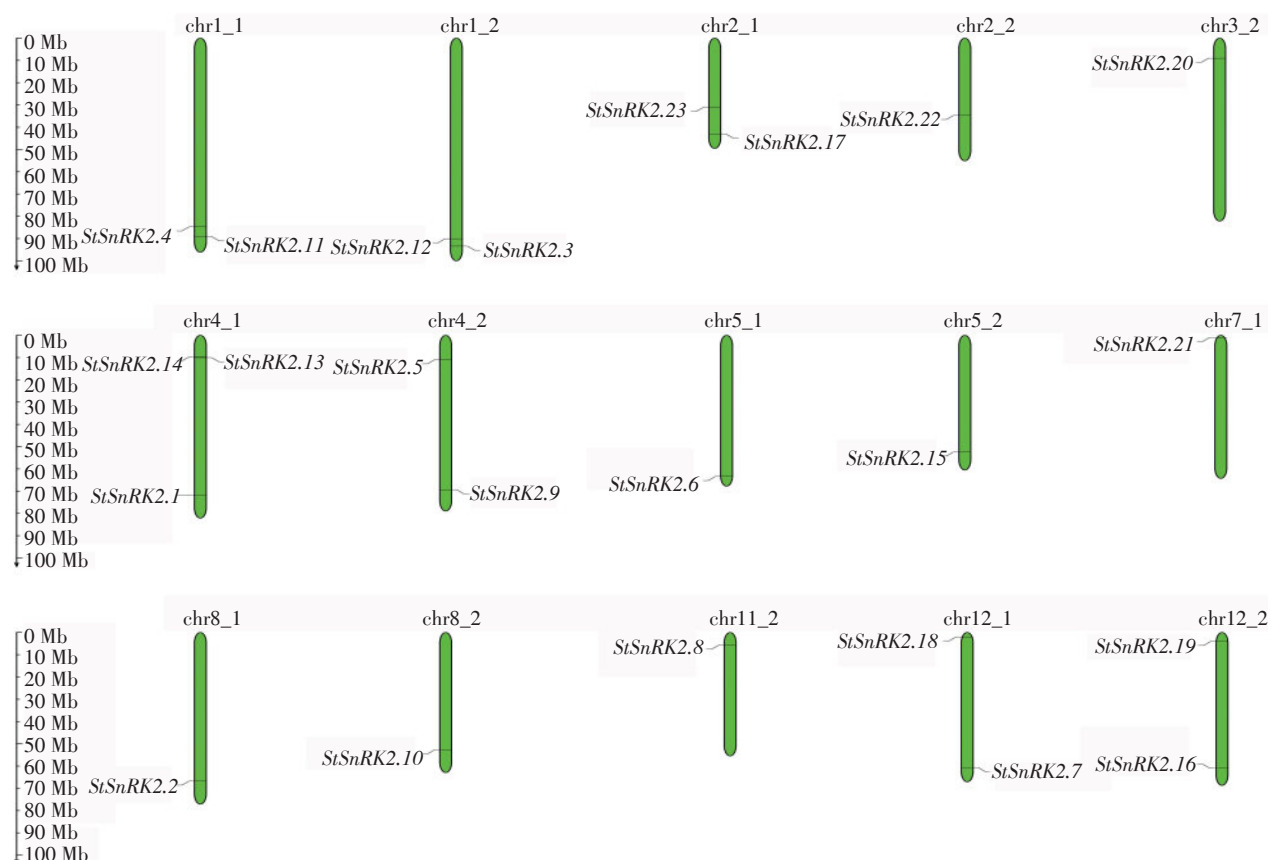
2.5 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的染色体定位分析与基因复制

依据马铃薯 *StSnRK2* 染色体位置信息, 23条基因不均匀地分布在马铃薯其中9对染色体, 共计15条染色体上(图5)。其中4_1号染色体上分布的基因较多为3条, 其余染色体上大多分布于1到2条基因。3_2、4_1、7_1和11_2号染色体上的基因主要分布在其上端, 1_1、1_2、2_1、5_1、5_2、8_1和8_2号染色体的基因则分布在其下端。通过3个亚族基因在染色体上分布情况比较, 发现I亚族基因主要集中在1_1、1_2、2_1、2_2、3_2和7_1号染色体上; II亚族基因主要集中在4_1、4_2和11_2号染色体上; III亚族基因主要集中在8_1和8_2号染色体上。此外, 12_1和12_2号染色体上共同含有I亚族和II亚族基因。在进化过程中, 串联重复和片段复制共同参与了基因家族的产生, 为了进一步研究马铃薯 *StSnRK2* 基因家族在进化过程中遗传信息是否发生了串联重复或大片段基因复制现象, 通过

MCSanX及下游程序对该家族基因的共线性和串联重复基因进行了分析(图6)。结果发现, 15个基因被证实为串联重复和片段复制基因, 占 *StSnRK2* 基因家族所有基因的65.2%。其中, 位于1_1、1_2、4_1、4_2、5_1、5_2、8_1和8_2号染色体上的8个基因为4对独立的串联重复基因, 占有共线性基因的53.3%, 其余7个基因不但发生了串联重复同时也发生了片段复制, 且不均匀分布于4_1、4_2、7_1、12_1和12_2号染色体, 占有共线性基因的46.7%。根据以上结果, 可以推断, 串联重复和片段复制共同促进了马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的扩大。

2.6 烟草和马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的比较基因组分析

为了更进一步研究马铃薯 *StSnRK2* 基因的进化机制, 基于烟草和马铃薯基因组数据库构建物种间全基因组共线性关系。结果显示(图7), 共有10条 *StSnRK2* 基因与5条烟草 *NtSnRK2* 基因构

图5 *StSnRK2* 基因在马铃薯染色体上的位置Figure 5 Chromosome location of *StSnRK2* genes in potato

成10条共线性关系, 其中共线性关系主要集中于马铃薯1、3、4、7、8和12这6对染色体与烟草1、8、9和11号染色体之间。在对烟草和马铃薯基因组间共线性进行分析时, 发现马铃薯 *StSnRK2* 基因与烟草之间的共线性主要集中在1号染色体上, 马铃薯1号、4号和12号染色体的下半部分与烟草的1号染色体上半部分同源, 而7号和12号染色体上半部分与烟草的11号染色体下半部分同源。对于上述结果中存在的同源基因对的位置及类型差异, 推测可能与近缘物种的祖先分化有关, 也进一步为染色体间能够进行基因片段复制融合提供了有力证据, 同时也说明同源染色体间可能还存在一些染色体间不同位置的重排现象。

2.7 马铃薯 *StSnRK2* 基因在干旱胁迫下的表达模式分析

本研究使用的马铃薯 RNA-seq 数据为

FPKM。与原始读取计数相比, FPKM值可以更好地减少样本差异。利用基于R语言的DESeq2软件, 分析并调取23个马铃薯 *StSnRK2* 基因在150 mmol/L NaCl下处理24 h、260 μ mol/L Mannitol下处理24 h、50 μ mol/L ABA下处理24 h和10 μ mol/L IAA下处理24 h的FPKM值, 并根据其FPKM值进行不同胁迫下的基因表达分析。结果显示, 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的3个亚族基因在不同胁迫处理下具有不同程度的表达趋势。其中, 在亚族I中的基因主要响应NaCl、甘露醇和ABA胁迫, 且53.8%的基因在ABA处理24 h后表达量显著升高; II亚族基因主要响应ABA胁迫, 87.5%的基因在ABA处理24 h后高表达; III亚族基因则主要响应NaCl和甘露醇胁迫, 在胁迫24 h时基因表达量有明显的上升。3个亚族内部呈现出不同的表达模式, 有15个 *StSnRK2* 基因在ABA胁迫24 h时表达量发生上调, 证明这部分

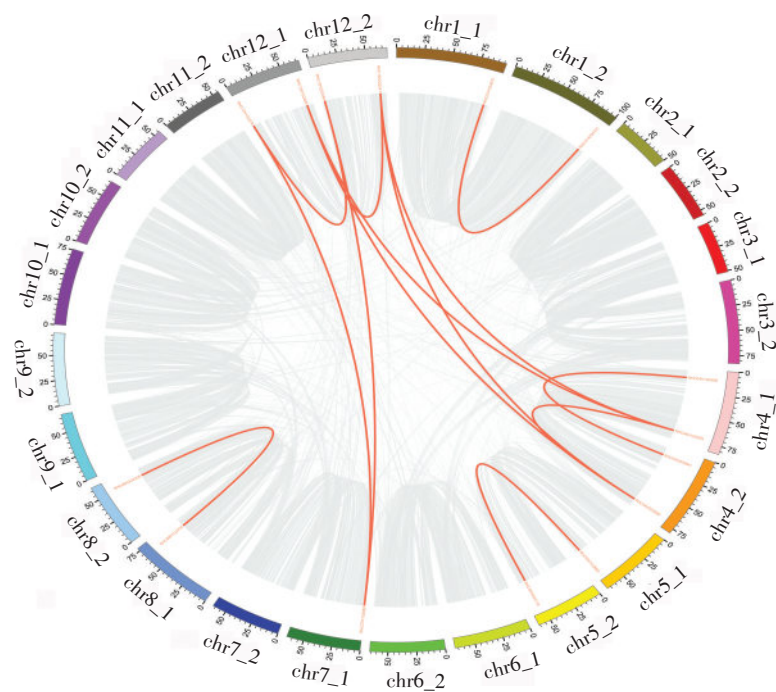


图6 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的共线性分析与基因复制

Figure 6 Collinearity analysis and gene replication of potato *StSnRK2* gene family

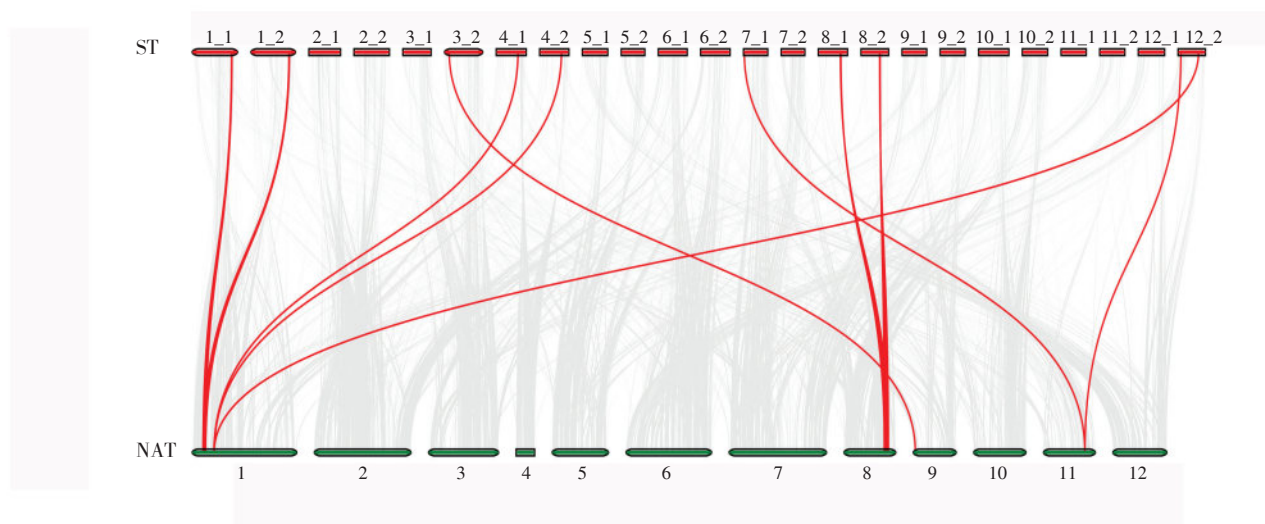


图7 烟草和马铃薯 *StSnRK2* 基因家族基因的比较基因组分析

Figure 7 Comparative genomic analysis of *StSnRK2* gene family genes in tobacco and potato

基因对马铃薯响应 ABA 胁迫具有重要的作用。此外干旱胁迫下的差异表达模式表明, *StSnRK2* 基因家族在不同胁迫条件下 3 个亚族内基因具有不同的反应和调控机制(图 8)。随后重新处理了材料, 并在 3 个亚族内随机选取了 8 个基因 *StSnRK2.2*、*StSnRK2.5*、*StSnRK2.6*、*StSnRK2.9*、*StSnRK2.10*、

StSnRK2.12、*StSnRK2.16*和*StSnRK2.22*进行 qPCR 验证(图 9)。并利用 qPCR 结果和 RNAseq 数据进行相关性分析, 结果发现, qPCR 与 RNAseq 之间具有较强的相关性, 这些结果进一步证实了转录组测序的可靠性(图 10)。以上结果表明, *StSnRK2* 基因家族成员可响应盐、ABA、IAA 等多种非生物胁迫。

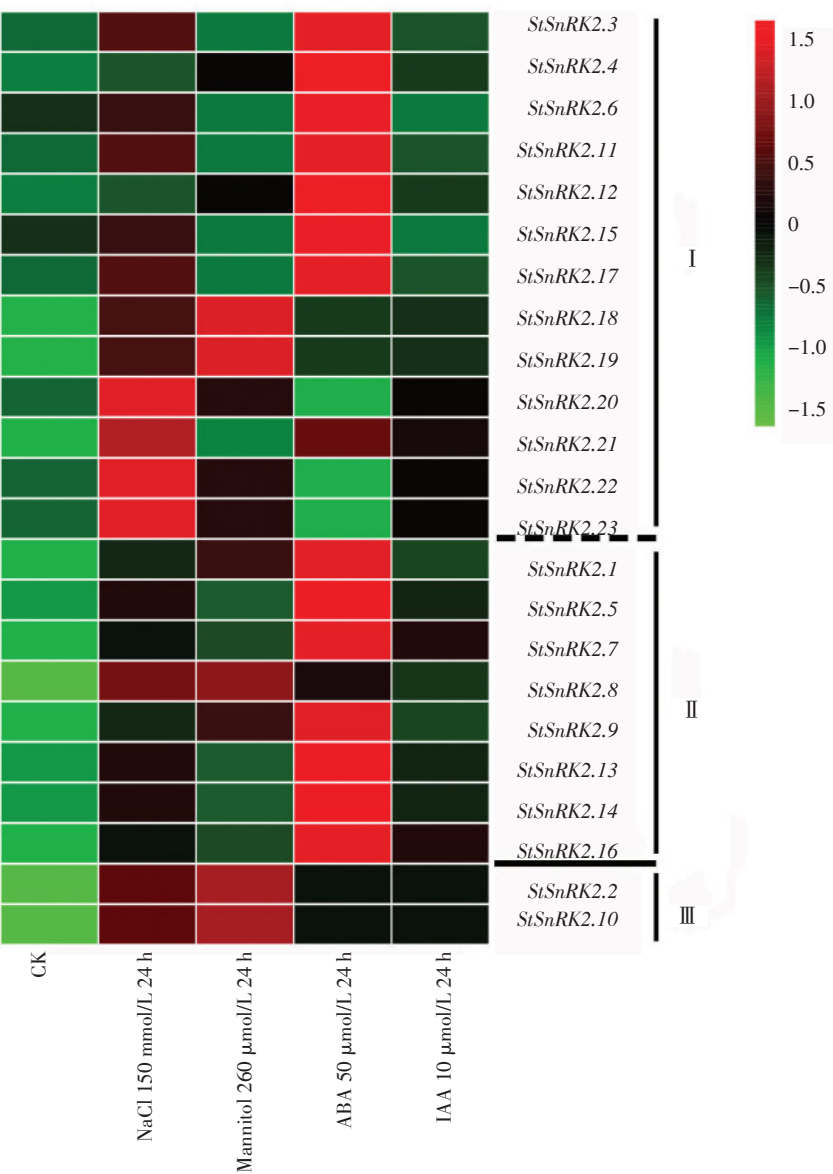


图 8 马铃薯 *StSnRK2* 基因在不同胁迫下的表达模式分析
Figure 8 Expression patterns of potato *StSnRK2* genes under different stresses

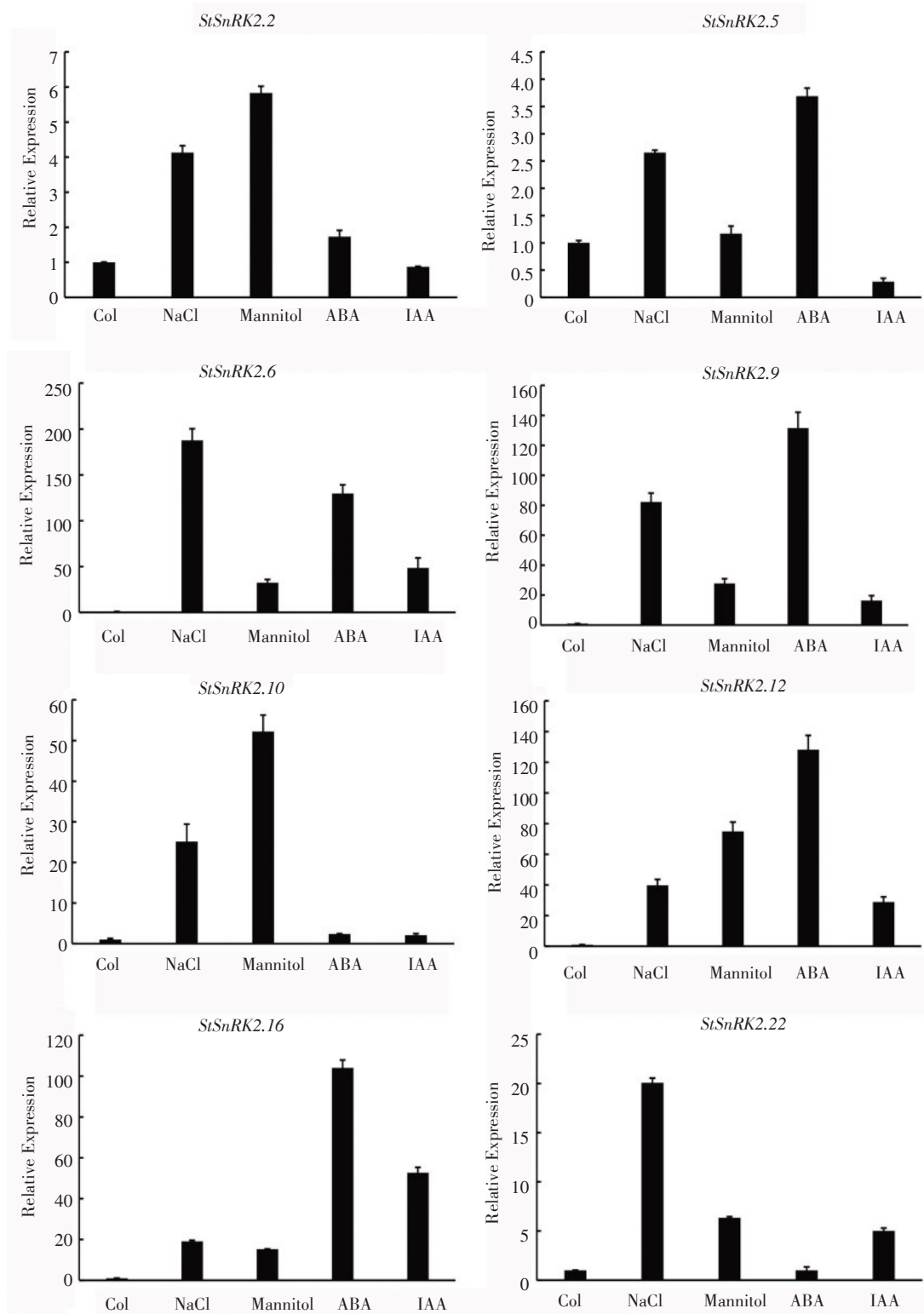
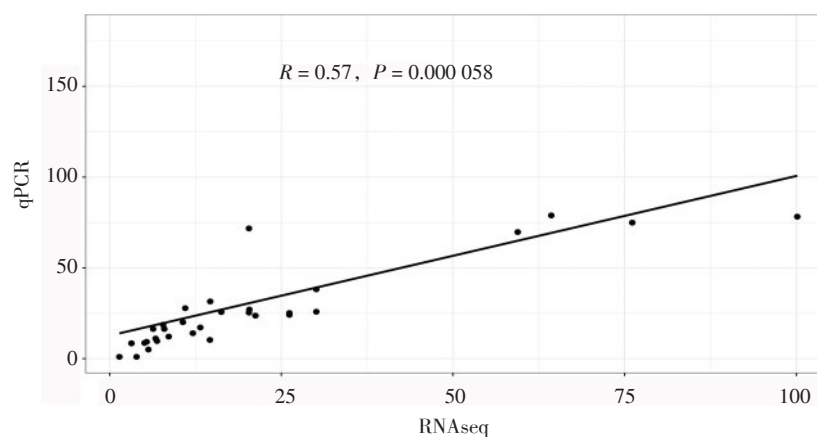


图9 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族部分基因在不同胁迫下的基因表达

Figure 9 Gene expressions of some genes in potato *StSnRK2* gene family under different stresses

图10 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族部分基因 qPCR 和 RNAseq 数据间的相关性分析Figure 10 Correlation analysis between qPCR and RNAseq data of some genes in potato *StSnRK2* gene family

3 讨论

目前, 中国马铃薯主要种植于年平均降水量小于 500 mm 的干旱和半干旱地区。干旱胁迫会极大的影响马铃薯的植株长势, 严重会导致其产量的下降甚至绝收^[40,41]。*SnRK2* 是一类植物中特有的蔗糖非酵解型蛋白激酶, 越来越多的研究表明 *StSnRK2* 家族成员在植物响应抗逆胁迫中发挥重要的作用^[42-44]。随着许多植物全基因组序列的获得, *SnRK2* 基因已经在多个物种中被鉴定出来, 如拟南芥^[17,28]、小麦^[22,23]、玉米^[24]和水稻^[19,25]等。

本研究从马铃薯最新发表的参考基因组 ‘RH89-039-16’ 中经过 Fgense^[45]和 Blast^[46]方法克隆得到了马铃薯 *StSnRK2* 基因家族中的 23 成员, 分别命名为 *StSnRK2.1~StSnRK2.23*。序列比对结果表明, 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族成员在 N 端相对保守, 而在 C 端高度特异, 这与马宗桓等^[47]在葡萄中的研究结果一致。系统发育树显示 *StSnRK2* 基因可分为 3 个不同的亚家族, 而不同亚族的结构域差异又决定了其功能的多样性, 这与 Li 等^[26]在高粱中的研究结果相似。除此之外, 有研究表明植物在受到干旱等逆境胁迫时, 通过调控体内信号传递, 进而激活相应的转录因子并调控植物体内相关抗逆基因的转录表达^[48]。本试验通过对马铃薯 *StSnRK2* 基因家族顺式作用元件分析发现 3 个亚族基因中均含有 ABRE, CAT-box, MBS 和 TATC-box 顺式作用元

件, 这对研究该家族响应抗逆性顺式作用元件的功能提供一定的参考。

研究发现基因家族的扩展和基因组进化机制主要取决于基因复制事件, 其主要的复制模式为串联复制和片段复制^[31,49]。在本研究中, 通过基因共线性分析发现, 在马铃薯 *StSnRK2* 家族成员中共检测到 15 个 *StSnRK2* 重复基因, 其中包括 8 个串联重复基因和 7 个片段重复基因(图 6), 这表明串联重复和片段复制共同促进了马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的进化, 这与 Qin 等^[50]在小麦中关于 SWEET 基因家族成员扩展的研究结果相似。与烟草比对基因组研究结果发现不同染色体间不仅能够进行基因片段复制融合而且还可能存在一些染色体间不同位置的重排现象, 这种复制现象在大多数植物中非常普遍, 且在现代植物核型形成的重要分子机制中起着关键作用^[51]。

SnRK2s 是植物特有的能够响应非生物胁迫的蛋白激酶家族之一, 有研究表明 *SnRK2s* 能够通过结合脱落酸反应元件(ABFs)来激活下游基因, 从而激活 ABA 响应基因的表达^[21,52]。在本研究中, 发现有 15 个 *StSnRK2* 基因在 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 处理 24 h 时表达量发生明显的上调表达, 推测这些成员能够响应 ABA 激素信号传导并参与植物调控胁迫应激过程。除上述 ABA 诱导途径外, *SnRK2s* 亚家族成员对其他非生物胁迫(NaCl、Mannitol、IAA)也高度敏感。上述结果表明马铃薯 *StSnRK2* 基因家族成员可以通

过多种途径对逆境胁迫做出反应, 进而维持植物细胞的正常代谢和生长发育。本研究为马铃薯 *StSnRK2* 基因家族成员提供了较全面的信息, 为进一步研究该基因家族每个成员的功能和作用机理提供了理论依据。

本研究通过对马铃薯 *StSnRK2* 家族进行全基因组分析, 最终确定出23个 *StSnRK2* 基因。基于生物信息学方法, 对 *StSnRK2* 基因在基因结构、系统发育和逆境相关顺式元件等方面进行了全面分析, 并根据系统进化和基因结构特征将马铃薯 *StSnRK2* 家族基因分为3个亚族, 不同亚族内基因的结构、保守 Motif 及顺式作用元件等均不同; *StSnRK2* 基因不均等地分布在12对染色体上, 并有多基因发生了片段复制, 且染色体间不仅能够进行基因片段复制融合还可能存在一些染色体间不同位置的重排现象。*StSnRK2* 基因家族3个亚族之间具有明显的响应不同逆境胁迫的差异性表达, 且有部分基因协同调控了马铃薯应对逆境胁迫的响应。

[参 考 文 献]

- [1] Boguszevska-mafkowska D, Zarzyńska K, Nosalewicz A. Drought differentially affects root system size and architecture of potato cultivars with differing drought tolerance [J]. American Journal of Potato Research, 2019, 97(1): 54–62.
- [2] Adriana E. Quantificação voltamétrica de carbofurano em batata (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae) [J]. Corpoica Ciencia Y Tecnología Agropecuaria, 2017, 18(2): 275–284.
- [3] Mittler R. Abiotic stress, the field environment and stress combination [J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(1): 15–19.
- [4] Wang W. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance [J]. Planta, 2003, 218: 1–14.
- [5] Pierce F J, Burpee C G. Zone tillage effects on soil properties and yield and quality of potatoes (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Soil and Tillage Research, 1995, 35(3): 135–146.
- [6] Farooq M, Wahid A, Kobayashi N. Plant drought stress: effects, mechanisms and management [J]. Agronomy for Sustainable Development, 2009, 29(1): 185–212.
- [7] Siddiqui M H, Al-Khaishany M Y, Al-Qutami M A, et al. Response of different genotypes of faba bean plant to drought stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(5): 10214–10227.
- [8] Umezawa T, Sugiyama N, Takahashi F, et al. Genetics and phosphoproteomics reveal a protein phosphorylation network in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. Science Signaling, 2013(6): rs8.
- [9] Serry K, Sang-Choon Lee, Min-Kyung K, et al. T-DNA tagged knockout mutation of rice OsGSK1, an orthologue of *Arabidopsis* BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stresses [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 65(4): 453–466.
- [10] Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, et al. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein Kinase2 Family by hyperosmotic stress and abscisic acid [J]. Plant Cell, 2004, 16(5): 1163–1177.
- [11] Zhang H, Jia H, Liu G, et al. Cloning and characterization of *NtSnRK2.7* and *NtSnRK2.8* genes involved in abiotic stress responses from *Nicotiana tabacum* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(7): 1673–1682.
- [12] Song X, Yu X, Chiaki H, et al. Heterologous overexpression of poplar *SnRK2* genes enhanced salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Frontiers in Plant Science, 2016(7): 612–623.
- [13] Phan T T, Sun B, Niu Q J, et al. Overexpression of sugarcane gene *SoSnRK2.1* confers drought tolerance in transgenic tobacco [J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(9): 1891–1905.
- [14] Fujii H, Zhu J K. *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(20): 8380–8385.
- [15] Fujii H, Verslues P E, Zhu J K. *Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses *in vivo* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(4): 1717–1722.
- [16] Verslues P E, Fujii H, Zhu J K. Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2007, 19(2): 485–494.
- [17] Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, et al. Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are

- essential for the control of seed development and dormancy [J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(7): 1345–1363.
- [18] Yasunari F, Kazuo N, Takuya Y. *et al.* Three SnRK2 protein Kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology, 2009(12): 2123–2132.
- [19] Diédhiou C J, Popova O V, Dietz K J, *et al.* The SNF1-type serine-threonine protein kinase SAPK4 regulates stress-responsive gene expression in rice [J]. BMC Plant Biology, 2008, 8(1): 49–62.
- [20] Cheng C, Wang Z, Ren Z, *et al.* SCFA1PP2-B11 modulates ABA signaling by facilitating SnRK2.3 degradation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plos Genetics, 2017, 13(8): e1006947–e1006972.
- [21] Bouly J, Gissot L, Lessard P, *et al.* *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, an SNF1-like protein kinase [J]. The Plant Journal, 2010, 18(5): 541–550.
- [22] Niu J S, Yu L, Ma Z Q, *et al.* Molecular cloning and characterization of a serine/threonine protein kinase gene from *Triticum aestivum* [J]. Journal of Plant, 2002, 44(3): 325–328.
- [23] Zhang H, Mao X, Jing R, *et al.* Characterization of a common wheat (*Triticum aestivum* L.) *TaSnRK2.7* gene involved in abiotic stress responses [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(3): 975–988.
- [24] Huai J, Wang M, He J. Cloning and characterization of the *SnRK2* gene family from *Zea mays* [J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(12): 1861–1869.
- [25] Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, *et al.* Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein Kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid [J]. Plant Cell, 2004, 16(5): 1163–1177.
- [26] Li L, Zhang Y, Liu K, *et al.* Identification and bioinformatics analysis of SnRK2 and CIPK family genes in sorghum [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2010, 9(1): 19–30.
- [27] Kelner A. Biochemical characterization of the tobacco 42-kD protein Kinase activated by osmotic stress [J]. Plant Physiology, 2004, 136(2): 3255–3265.
- [28] Boudsocq M, Barbier-Bryggo H, Lauriere C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(40): 41758–41766.
- [29] Riichiro Y, Tokunori H, Kazuya I, *et al.* ABA-activated SnRK2 protein Kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology, 2002, 43(12): 1473–1483.
- [30] Zhao Y, Zhang Z, Gao J, *et al.* *Arabidopsis* duodecuple mutant of PYL ABA receptors reveals PYL repression of ABA-independent SnRK2 activity [J]. Cell Reports, 2018, 23(11): 3340–3351.
- [31] 秦天元, 刘玉汇, 孙超, 等. 马铃薯 *Stlgt* 基因家族的鉴定及其对于旱胁迫的响应分析 [J]. 作物学报, 2021, 47(4): 780–786.
- [32] Altschul S F, Madden T L, Schffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search programs [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389–3402.
- [33] Aron M B, Derbyshire M K, Gonzales N R, *et al.* CDD: NCBI's conserved domain database [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43: 222–228.
- [34] Mistry J, Chuguransky S, Williams L, *et al.* Pfam: The protein families database in 2021 [J]. Nucleic Acids Research, 2020, 49(2): 412–419.
- [35] Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX [J]. Current Protocols Bioinformatics, 2003(1): 1–22.
- [36] Sudhir K, Glen S, Koichiro T. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016(7): 1870–1874.
- [37] Bailey T L, Nadya Williams, Chris M, *et al.* MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34: 369–373.
- [38] Wang Y, Tang H, Debarry J D, *et al.* MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene syntenry and collinearity [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e49.
- [39] Krzywinski M, Schein J, Birol I, *et al.* Circos: An information aesthetic for comparative genomics [J]. Genome Research, 2009, 19: 1639–1645.
- [40] Eiasu B K, Hammes P. Response of potato (*Solanum tuberosum*) tuber yield components to gelpolymer soil amendments irrigation regimes [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 2007, 35: 25–31.
- [41] Walworth J L, Carling D E. Tuber initiation and development in irrigated and non-irrigated potatoes [J]. American Journal of

- Potato Research, 2002, 79(6): 387–395.
- [42] Kulik A, Wawer I, Krzywińska E, *et al.* SnRK2 protein kinases—key regulators of plant response to abiotic stresses [J]. OMICS: a Journal of Integrative Biology, 2011, 15(12): 859–872.
- [43] Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, *et al.* Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signaling in response to osmotic stress [J]. Plant Cell and Environment, 2015, 38(1): 35–49.
- [44] Shin R, Alvarez S, Burch A Y, *et al.* Phosphoproteomic identification of targets of the *Arabidopsis* sucrose nonfermenting-like kinase SnRK2.8 reveals a connection to metabolic processes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(15): 6460–6465.
- [45] Zhang S, Li D, Zhang G, *et al.* The prediction of rice gene by Fgenesh [J]. Agricultural Sciences in China, 2008, 7(4): 387–394.
- [46] Scott M G, Madden T L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(s2): 20–25.
- [47] 马宗恒, 毛娟, 李文芳, 等. 葡萄SnRK2家族基因的鉴定与表达分析 [J]. 园艺学报, 2016, 43(10): 1891–1902.
- [48] Ali G M, Komastu S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress [J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(2): 396–403.
- [49] Wang Y, Liao Y, Wang Y, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of StPP2C gene family in response to multiple stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2020, 19(6): 1609–1624.
- [50] Qin J, Jiang Y, Lu Y, *et al.* Genome-wide identification and transcriptome profiling reveal great expansion of sweet gene family and their wide-spread responses to abiotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2020, 19(7): 1704–1720.
- [51] Guo S, Zhang J, Sun H, *et al.* The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions [J]. Nature Genetics, 2013, 45(1): 51–58.
- [52] Mao X, Li Y, Ur RS, *et al.* The sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 (snrk2) genes are multifaceted players in plant growth, development and response to environmental stimuli [J]. Plant Cell Physiology, 2020, 61(2): 225–242.

丁香酚®



马铃薯晚疫病防治剂



保定市亚达益农农业科技有限公司（原保定市亚达化工有限公司）成立于1997年，是国家定点农药企业，多年来先后获得过河北省高新技术企业、国家科技成果推广示范企业、重合同守信誉企业、消费者信得过企业等荣誉称号。

我公司独家配方生产的植物源农药“丁香酚”牌丁香酚经过多年的推广应用，对预防和治疗马铃薯晚疫病效果显著，具有速效治疗、长效保护、低毒绿色、无交互抗性等特点，是“减药增效”和替代化学药剂的选择产品。

我公司多年来始终坚持“以质量求生存、以信誉求发展，为客户服务、让农民满意”的方针，坚持贯彻国家“农药减量增效、使用零增长”的发展目标，愿与大家携手共进、共同合作、共谋发展。联系电话：0312-8683157