

引用格式: 吕绍芝, 钱禛锋, 饶席兵, 等. 割手密 *SnRK2* 基因家族全基因组鉴定及干旱胁迫表达分析[J]. 西北植物学报, 2024, 44(5): 0729-0738. [LÜ S Z, QIAN Z F, RAO X B, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *SnRK2* gene family under drought stress in *Saccharum spontaneum* L. [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2024, 44(5): 0729-0738.] DOI: 10.7606/j.issn.1000-4025.20230671

割手密 *SnRK2* 基因家族全基因组 鉴定及干旱胁迫表达分析

吕绍芝¹, 钱禛锋¹, 饶席兵¹, 吴华英¹, 何丽莲^{1,2}, 李富生^{1,2*}

(1 云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2 云南农业大学 甘蔗研究所, 昆明 650201)

摘要 【目的】探究割手密 *SnRK2* 基因家族成员在干旱胁迫中的调控机制, 为抗旱性甘蔗品种的选育提供候选基因。【方法】以全基因组数据为基础从割手密中鉴定 *SnRK2* 基因, 并对其进行生物信息学分析和干旱胁迫下的表达分析。【结果】在割手密基因组中共鉴定出 11 个 *SnRK2* 基因家族成员, 命名为 *SsSnRK2.1-SsSnRK2.11*, 且这些基因不均匀地分布于 8 条染色体上。SnRK2 蛋白的氨基酸残基数为 227~580, 分子质量为 25 683.53~64 695.8 kD, 等电点为 4.62~8.94, 且均为亲水性蛋白。系统发育树可将其分为 3 个亚组, 且同亚组中的保守基序基本相似, 外显子数量以 7~9 个为主。*SsSnRK2* 基因家族成员的启动子中含有多种激素类和逆境胁迫响应类的作用元件。割手密 *SsSnRK2* 基因家族成员的表达具有组织特异性。所有的 *SsSnRK2* 基因均能不同程度地响应干旱胁迫。【结论】割手密 *SnRK2* 基因家族在响应干旱胁迫过程中发挥重要作用, 可为割手密的抗逆性研究提供一定的理论依据。

关键词 割手密; *SnRK2* 基因家族; 干旱胁迫; 表达分析

中图分类号 Q786; S332.4; S566.1 文献标志码 A

Genome-wide identification and expression analysis of the *SnRK2* gene family under drought stress in *Saccharum spontaneum* L.

LÜ Shaozhi¹, QIAN Zhenfeng¹, RAO Xibing¹, WU Huaying¹, HE Lilian^{1,2}, LI Fusheng^{1,2*}

(1 College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2 Sugarcane Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract [Objective] This study aims to explore the regulatory mechanism of *SnRK2* family members under drought stress in *Saccharum spontaneum* L., in order to provide candidate genes for cultivating drought resistant sugarcane varieties. [Methods] This study identified *SnRK2* genes in *S. spontaneum* L. based on whole genome data, and conducted bioinformatics analysis and expression analysis under drought stress. [Results] 11 *SnRK2* members were identified and named as *SsSnRK2.1* to *SsSnRK2.11*, which were unevenly distributed on 8 chromosomes. The amino acid residues of *SsSnRK2*s were ranged from 227 to 580, the molecular weights were from 25 683.53 kD to 64 695.8 kD, the isoelectric points were from 4.62 to 8.94, and all were hydrophilic proteins. The 11 *SsSnRK2*s could be divided into 3 subgroups, and the conserved motif sequences within the same subgroup were highly similar, with the number of exons ranging from 7 to 9. The promoters of *SsSnRK2* members contained various hormone-related and abiotic

收稿日期: 2023-10-22; 修改稿收到日期: 2023-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960451); 国家重点研发计划项目(2018YFD1000503); 云南省作物生产与智慧农业重点实验室专项(202105AG070007); 云南省重大科技专项(202202AE090021)

作者简介: 吕绍芝(1998—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事作物种质资源评价与利用研究。E-mail: 1965255822@qq.com

* 通信作者: 李富生, 教授, 硕、博士生导师, 主要从事甘蔗种质资源与利用研究。E-mail: lfs810@sina.com

stress responsive elements. *SsSnRK2* members were expressed in a tissue-specific manner. All *SsSnRK2* genes were able to respond to drought stress to various degrees. [Conclusion] The *SsSnRK2* family plays a significant role in response to drought stress, providing a basis for the study of stress resistance in *S. spontaneum* L. .

Key words *Saccharum spontaneum* L. ; *SnRK2* gene family; drought stress; expression analysis

植物在生长发育过程中常遭受如干旱、高温、低温、盐害等非生物胁迫^[1]。为适应环境变化,植物通过长期进化形成了多种抵御逆境的机制^[2]。其中,蔗糖非酵解相关蛋白激酶(SnRKs)是植物中特有的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,广泛存在于植物中,可调控植物生长发育和抵御逆境胁迫的反应^[3]。根据序列相似性和C端结构域的保守性,SnRK蛋白激酶分为3个亚家族:SnRK1、SnRK2和SnRK3^[4]。而SnRK2和SnRK3亚家族是植物中所特有的,可能参与对环境胁迫的反应。SnRK2亚家族成员含有高度保守的激酶结构域、ATP结合结构域和丝氨酸/苏氨酸活性位点^[5]。研究表明,SnRK2广泛参与植物对逆境胁迫的响应。*SnRK2s*可以通过ABA信号通路调控植物的生长发育以及抵御逆境胁迫的能力^[6]。例如,甘蔗中的*SoSnRK2.8*、*SoSnRK2.9*和*SoSnRK2.10*可被ABA强烈诱导表达,而*SoSnRK2.1*、*SoSnRK2.2*和*SoSnRK2.4*则可被低温、盐胁迫和渗透胁迫强烈诱导^[7]。Fatima等^[8]发现大多数*VrSnRK2*基因的表达均受到干旱胁迫的诱导,其中*VrSnRK2.6c*在干旱胁迫下的表达水平最高(12倍)。而过表达小麦*TaSnRK2.9*基因则可增强烟草对干旱和盐胁迫的耐受性,并增加了烟草的存活率、种子发芽率和根长^[9]。此外,与野生型植株相比,过表达*MpSnRK2.10*的转基因苹果植株具有更少的ROS和MDA积累,表现出更强的耐旱性^[10]。*OsSAPK9*通过与水稻*OsSGT1*的相互作用,发挥对盐胁迫响应和抗病的正调控作用^[11]。截至目前,已有众多学者对甘蔗^[7]、水稻^[12]、玉米^[13]、棉花^[14]等植物中的*SnRK2*家族基因进行了广泛的研究。割手密作为甘蔗抗逆性育种过程中重要的野生亲本,研究干旱胁迫下割手密相关基因的表达模式和分子机制,对于培育更加抗旱的甘蔗品种具有重要意义。但目前关于割手密*SnRK2*基因家族成员鉴定及表达的相关研究鲜见报道。

本研究基于已公布的割手密基因组,用生物信息学方法系统地鉴定割手密*SnRK2*基因家族,并对这一基因家族进行综合分析,包括蛋白质理化性质、系统发育结构、基因结构、保守基序和染色体定位等,同时通过qRT-PCR分析割手密*SnRK2*家族基因的表达模式。本研究旨在为进一步解析割手密*SnRK2*基

因家族成员在干旱胁迫中的调控机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

研究所用割手密材料为90-53无性系(2n=64),取自云南省省级甘蔗昆明种质资源圃(云南农业大学校园内,海拔1950m)。将材料以盆栽的方式种植于云南农业大学甘蔗研究所的温室大棚中,当供试材料处于苗期(大部分割手密幼苗具5~6个叶片)时进行干旱胁迫处理,分别在处理后的0,2,4,6d对+1叶组织进行采样,迅速置于液氮中保存,然后放于-80℃冰箱中保存备用,所有处理均设3个生物学重复。

1.2 割手密*SnRK2*基因家族成员的全基因组鉴定与蛋白理化性质分析

从割手密数据库(http://www.life.illinois.edu/ming/downloads/Spontaneum_genome/), Sspon_v20190103)中下载割手密基因组数据,从TAIR数据库中获取拟南芥*SnRK2*家族蛋白序列(<https://www.arabidopsis.org/>),从Ensembl Plants数据库(<https://plants.ensembl.org/index.html>)中获得水稻和高粱*SnRK2*家族蛋白序列(表1),并将这些序列作为探针进行BlastP搜索,设定阈值为 $P < 1.0 \times 10^{-10}$,序列一致度大于50%。同时,从Pram数据库(<http://pram.xfam.org/>)中下载*SnRK2*蛋白激酶结构域(PF00069)和蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(PF07714)的隐马尔可夫模型(HMM)文件,用于分析候选的蛋白序列^[15]。对获得的候选蛋白序列去冗余后,用保守域数据库NCBI-CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)和在线软件SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)进一步筛选其结构域,最终确定割手密*SnRK2*基因家族成员。最后,通过ExPASy数据库(<https://www.expasy.org/protparam>)分析割手密*SnRK2*蛋白的理化性质。

1.3 系统进化分析

用MEGA7.0软件的邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统发育树,对*SnRK2*家族基因进行分类,用在线网站Evolview(<https://www.omics-class.com/article/671>)对进化树进行美化。

表 1 拟南芥、水稻和高粱的 *SnRK2* 基因信息Table 1 The information of *SnRK2* genes in *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, and *Sorghum bicolor*

拟南芥 <i>A. thaliana</i>		水稻 <i>O. sativa</i>		高粱 <i>S. bicolor</i>	
基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	基因 ID Gene ID
<i>AtSRK2.1</i>	AT5G08590	<i>OsSAPK1</i>	Os03g0390200	<i>SbSnRK2.1</i>	Sb001G350700
<i>AtSRK2.2</i>	AT3G50500	<i>OsSAPK2</i>	Os07g0622000	<i>SbSnRK2.2</i>	Sb002G379400
<i>AtSRK2.3</i>	AT5G66880	<i>OsSAPK3</i>	Os10g0564500	<i>SbSnRK2.3</i>	Sb001G294400
<i>AtSRK2.4</i>	AT1G10940	<i>OsSAPK4</i>	Os01g0869900	<i>SbSnRK2.4</i>	Sb003G370100
<i>AtSRK2.5</i>	AT5G63650	<i>OsSAPK5</i>	Os04g0691100	<i>SbSnRK2.5</i>	Sb006G279100
<i>AtSRK2.6</i>	AT4G33950	<i>OsSAPK6</i>	Os02g0551100	<i>SbSnRK2.6</i>	Sb004G173500
<i>AtSRK2.7</i>	AT4G40010	<i>OsSAPK7</i>	Os04g0432000	<i>SbSnRK2.7</i>	Sb006G083000
<i>AtSRK2.8</i>	AT1G78290	<i>OsSAPK8</i>	Os03g0764800	<i>SbSnRK2.8</i>	Sb001G078800
<i>AtSRK2.9</i>	AT2G23030	<i>OsSAPK9</i>	Os12g0586100	<i>SbSnRK2.9</i>	Sb008G147000
<i>AtSRK2.10</i>	AT1G60940	<i>OsSAPK10</i>	Os03g0610900	<i>SbSnRK2.10</i>	Sb008G147000

1.4 基因结构、保守序列和染色体定位分析

用在线软件 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.cn>) 对基因结构进行分析。割手密 *SnRK2* 蛋白的保守基序预测分析用在线软件 MEME (<http://meme-suite.org/>), 参数 $E \leq 0.05$, 输出最大基序数设置为 10。根据割手密基因组注释 gff3 文件, 用 TBtools 软件对染色体定位进行可视化。

1.5 启动子顺式作用元件分析

用 TBtools 软件提取家族成员起始密码子上游 2 000 bp 的序列作为启动子序列, 用在线软件 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 进行顺式作用元件预测, 并用 TBtools 软件对预测结果进行可视化。

1.6 割手密 *SnRK2* 基因家族的表达模式分析

为研究在不同组织中 *SsSnRK2* 基因的表达模

式, 用 SGD 数据库 (<http://sugarcane.zhangjisen-lab.cn/sgd/html/mRNA.html>) 中的转录组数据得到 *SsSnRK2* 在茎和叶片不同发育时期的表达数据, 用 R 语言 (<http://www.r-project.org>) 的热图包, 基于 FPKM 对所有 *SsSnRK2* 基因表达量数据进行热图的绘制。

1.7 *SsSnRK2* 基因 qRT-PCR 表达模式分析

用 Trizol 试剂盒 (天根, 北京) 提取各干旱胁迫处理下的叶片总 RNA。用 Fast Quant RT Super Mix 试剂盒 (天根, 北京) 进行 RNA 反转录, 合成 cDNA。用 Primer 5.0 设计荧光定量引物 (表 2), 选用 *GAPDH* 为内参基因。用 $2 \times$ RealStar SYBR Mixture 试剂盒 (GenStar, 北京), 在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行反应。*SnRK2s* 基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算, 每个样品设置 3 次重复。

表 2 qRT-PCR 分析所用引物

Table 2 Primers used for qRT-PCR analysis

引物名称 Primer name	上游引物 Forward primers (5'→3')	下游引物 Reverse primers (5'→3')
<i>SsSnRK2.1</i>	GCACTATCCTGCTGCTTCG	AATCCTTTCAAATAGCTCACCC
<i>SsSnRK2.2</i>	CGTTTGGTCCTGTGGTGTC	AGCAACTGAAGCAAGTTGTGAT
<i>SsSnRK2.3</i>	AATGAGCAAGCAGTATGAGGAG	GTCAAGATCGGCATCTGAGTC
<i>SsSnRK2.4</i>	ATGTGATGCTGGTTGGTGTC	ACTGCTTGCTCATTGTGCTG
<i>SsSnRK2.5</i>	AACGGGGCAAATAGATGAGA	AATAGCAAGGTGGGTCGGT
<i>SsSnRK2.6</i>	CATACATTGCTCCAGAGGTCC	TTATCCGTTGCTCAGGGTTC
<i>SsSnRK2.7</i>	GGGATGGAGATGCCGATAA	TCCTTGAAGCGGATGATGTT
<i>SsSnRK2.8</i>	TCTTGCCCGTATCTTTGTTG	ACCCTGTTATCCCTCCTGTAGT
<i>SsSnRK2.9</i>	CTTCTTGCCCGTATCTTTGTT	GTGAGTTCCCGTGGTAGGTT
<i>SsSnRK2.10</i>	AAGTATGCCACCGTGATTTGA	TGCGATGTATGCTGTAGTTCC
<i>SsSnRK2.11</i>	TGGTTACTCCAAGTCGTCGCT	GGTCATCTGGGTCTCAAAA
<i>GAPDH</i>	CACGGCCACTGGAAGCA	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC

2 结果与分析

2.1 *SsSnRK2s* 基因鉴定和蛋白理化性质分析

从割手密全基因组中共筛选出 11 个 *SnRK2* 基因,分别命名为 *SsSnRK2.1*–*SsSnRK2.11*,对其编码蛋白进行理化性质分析,结果如(表 3)显示,这

11 个基因所编码的蛋白质具有 227~580 个氨基酸,蛋白质分子质量范围为 25 683.53~64 695.8 kD,理论等电点(pI)的范围为 4.62~8.94,预测到的脂溶系数为 72.23~94.85。*SsSnRK2* 家族中有 7 个蛋白为稳定蛋白,其余 4 个为不稳定蛋白。亲水性平均值预测显示,所有的 *SsSnRK2* 蛋白均为亲水性蛋白。

表 3 *SsSnRK2* 家族成员编码蛋白理化性质

Table 3 Physicochemical properties of proteins encoded by *SsSnRK2* family members

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	氨基酸数目 Numbers of amino acid	蛋白分子 质量 Molecular mass/kD	pI	不稳定系数 Instability index	脂溶系数 Aliphatic index	亲水性平均值 Grand average of hydropathicity
Sspon.01G0011360-1A	<i>SsSnRK2.1</i>	580	64 695.80	8.94	45.27	91.45	-0.138
Sspon.01G0014770-1A	<i>SsSnRK2.2</i>	308	34 916.70	5.46	34.56	87.34	-0.427
Sspon.01G0023360-1A	<i>SsSnRK2.3</i>	307	34 664.41	4.81	36.34	91.82	-0.364
Sspon.01G0050220-1B	<i>SsSnRK2.4</i>	302	33 837.43	4.68	37.86	85.56	-0.295
Sspon.01G0061760-1P	<i>SsSnRK2.5</i>	302	34 248.93	4.62	42.96	90.70	-0.288
Sspon.02G0003200-1A	<i>SsSnRK2.6</i>	227	25 683.53	5.45	36.79	94.85	-0.299
Sspon.02G0029960-1A	<i>SsSnRK2.7</i>	362	40 299.69	4.76	35.08	85.66	-0.260
Sspon.03G0002080-1A	<i>SsSnRK2.8</i>	309	35 896.36	6.04	56.68	72.23	-0.816
Sspon.03G0039650-2D	<i>SsSnRK2.9</i>	364	42 712.43	6.84	53.05	74.15	-0.747
Sspon.04G0029000-1B	<i>SsSnRK2.10</i>	318	35 278.34	5.31	34.02	90.13	-0.209
Sspon.05G0011250-1A	<i>SsSnRK2.11</i>	346	39 632.07	5.75	42.82	76.39	-0.568

2.2 系统发育分析

为进一步研究割手密与其他物种 *SnRK2* 基因家族的进化关系,笔者构建了包括 11 个割手密和已经报道的 10 个拟南芥、10 个水稻和 10 个高粱的 *SnRK2* 蛋白序列的系统发育树(图 1)。结果显示,*SnRK2* 蛋白明显聚类为 3 个亚组(I、II、III),这与仅含割手密 *SnRK2* 蛋白序列的系统发育树一致。

其中,每个亚组中均含有割手密、拟南芥、水稻和高粱的成员,I亚组中共有 4 个割手密 *SnRK2* 成员(*SsSnRK2.2*、*SsSnRK2.8*、*SsSnRK2.9*、*SsSnRK2.11*),II亚组有 2 个成员(*SsSnRK2.1* 和 *SsSnRK2.6*),III亚组有 5 个成员(*SsSnRK2.2*、*SsSnRK2.3*、*SsSnRK2.5*、*SsSnRK2.7*、*SsSnRK2.10*)。

2.3 保守基序与基因结构分析

为了研究割手密 *SnRK2* 家族基因编码蛋白的结构多样性,对所有的 *SnRK2* 家族基因编码的蛋白序列进行了保守基序(motif)元件分析(图 2,A),共鉴定出 10 个保守的基序(motif 1–10)。其中,motif 1–10 均存在于 I 亚组和 III 亚组中,II 亚组中仅含有 motif 1–8。

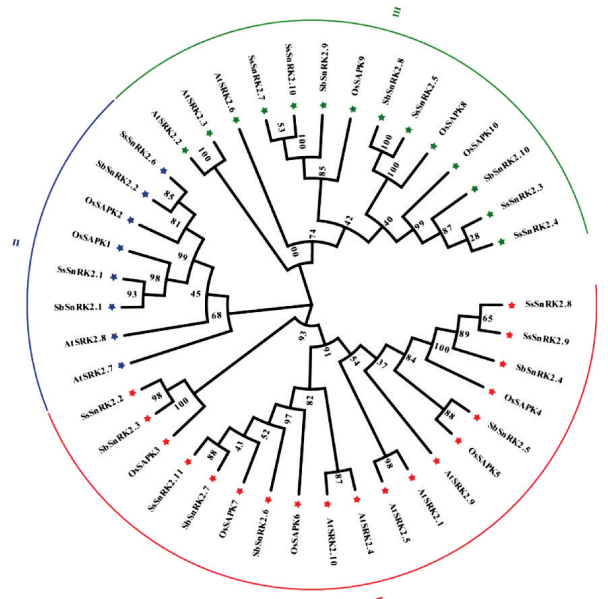


图 1 割手密、拟南芥、水稻和高粱 *SnRK2* 蛋白系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of *SnRK2* protein in *S. spontaneum*, *A. thaliana*, *O. sativa*, and *S. bicolor*

同一亚组内的割手密 *SnRK2* 蛋白往往都会具有相似的基序种类和位置,推测同一亚组内的 *SnRK2* 可能具有相似的生物学功能。基因结构分析(图 2, B)表明, *SsSnRK2* 基因的外显子分布呈现

多样化,数量范围为 5~10 个,主要以 7~9 个为主,内含子数量在 4~8 个范围均有分布。其中, *SsSnRK2.5* 的内含子结构较长, *SsSnRK2.9* 的外显子数量较多(10 个)。

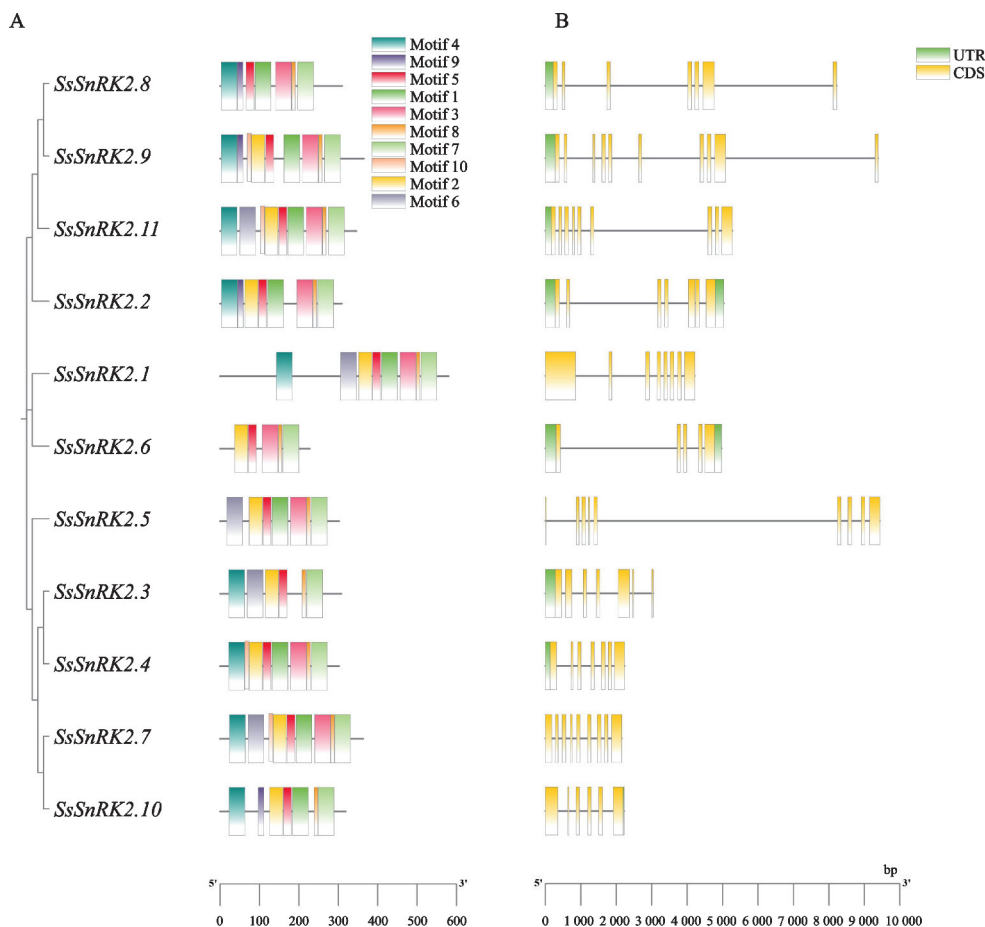


图 2 割手密 *SnRK2* 基因家族的保守基序(A)及基因结构(B)分析

Fig. 2 Motif analysis (A) and structural features (B) within *SnRK2* gene family in *S. spontaneum* L.

2.4 染色体定位分析

染色体定位分析结果(图 3)表明,11 个 *SsSnRK2* 基因不均匀地分布在割手密的 8 条染色体上,其中 Chr1A 分布的数量最多,共有 3 个基因(*SsSnRK2.1*、*SsSnRK2.2*、*SsSnRK2.3*),其余 7 条染色体上均只含有 1 个基因。此外,共线性分析结果表明,割手密 *SnRK2* 基因家族成员之间不存在重复基因对。

2.5 启动子顺式作用元件分析

为进一步分析和预测 *SsSnRK2* 家族基因上游的调控因子,提取了 11 个 *SsSnRK2* 基因 DNA 序列上游 2 000 bp 的序列作为启动子区域进行分析,结果如图 4 所示。在 *SsSnRK2* 基因的上游都存在

着众多激素响应元件,如 ABA 应答元件(ABRE)、生长素应答元件(AuxRR-core、TGA-element)、乙烯应答元件(ERE)、赤霉素应答元件(GARE/P-box)、水杨酸应答元件(TCA-element)、茉莉酸甲酯应答元件(CGTCA-Motif/TGAGG-box)等,且种类与数量存在较大差异性;同时,还预测到了多种与光合作用相关的元件,如 ACE、AE-box、ATCT-motif、box 4、GA-motif 等;另外,也预测到了多种与抗逆相关的元件,例如冷胁迫应答元件(LTR)、干旱胁迫应答元件(MBS)、热胁迫应答元件(HSE)、防御与胁迫应答元件(TC-rich repeats)等。推测 *SsSnRK2* 基因可能参与了割手密的多种抗逆胁迫响应过程。

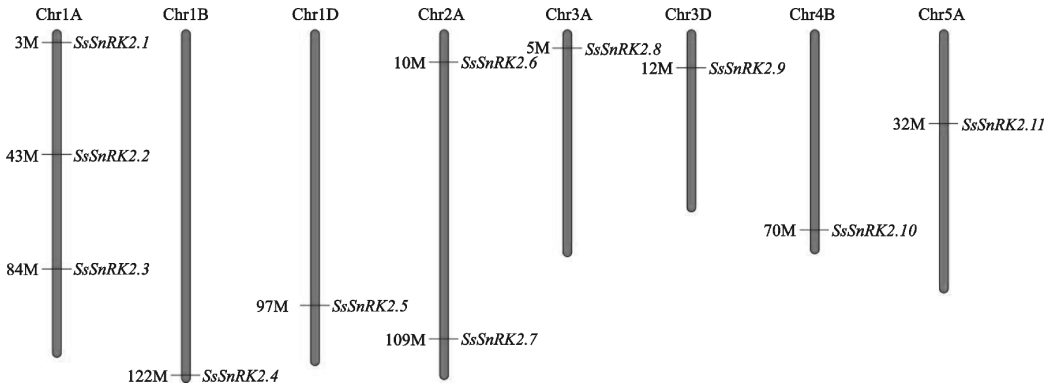


图 3 *SsSnRK2* 基因在割手密染色体上的位置

Fig. 3 Chromosome locations of *SsSnRK2* gene in *S. spontaneum* L.

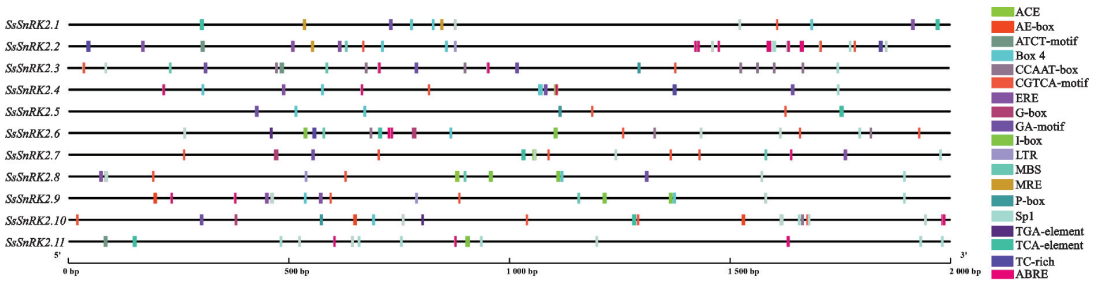


图 4 割手密 *SnRK2* 基因家族成员顺式作用元件分析

Fig. 4 Analysis of *cis*-acting elements of *SnRK2* members in *S. spontaneum* L.

2.6 *SsSnRK2* 基因在不同组织生长发育过程中的表达模式

为探究割手密 *SnRK2* 家族基因在不同组织生长发育过程中的表达模式,用不同时期叶片和茎的转录本数据,构建了割手密 *SsSnRK2* 基因的组织特异性表达量聚类热图。结果(图 5)表明,11 个 *SsSnRK2* 基因在割手密茎和叶的发育过程中普遍表达。

在叶片中,*SsSnRK2.1* 为高表达,*SsSnRK2.5*、*SsSnRK2.2* 均为低表达,而其他 8 个基因在某些时期中表达量较高,在某些时期中为低表达,甚至未表达;在茎中,*SsSnRK2.5* 为高表达,而 *SsSnRK2.10* 只在幼苗时期表达,在其余 6 个发育时期均未表达。这说明 *SsSnRK2s* 基因在不同的组织中具有不同的表达模式。

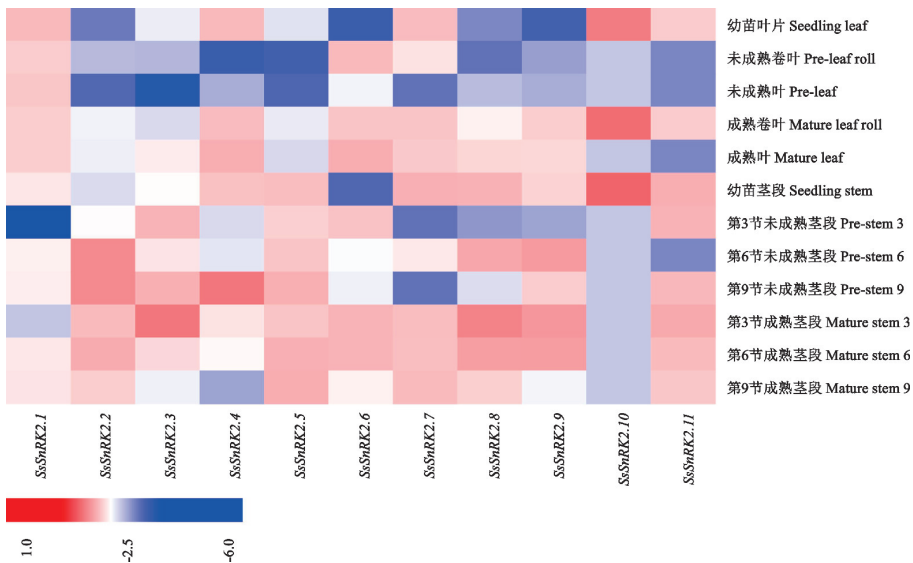


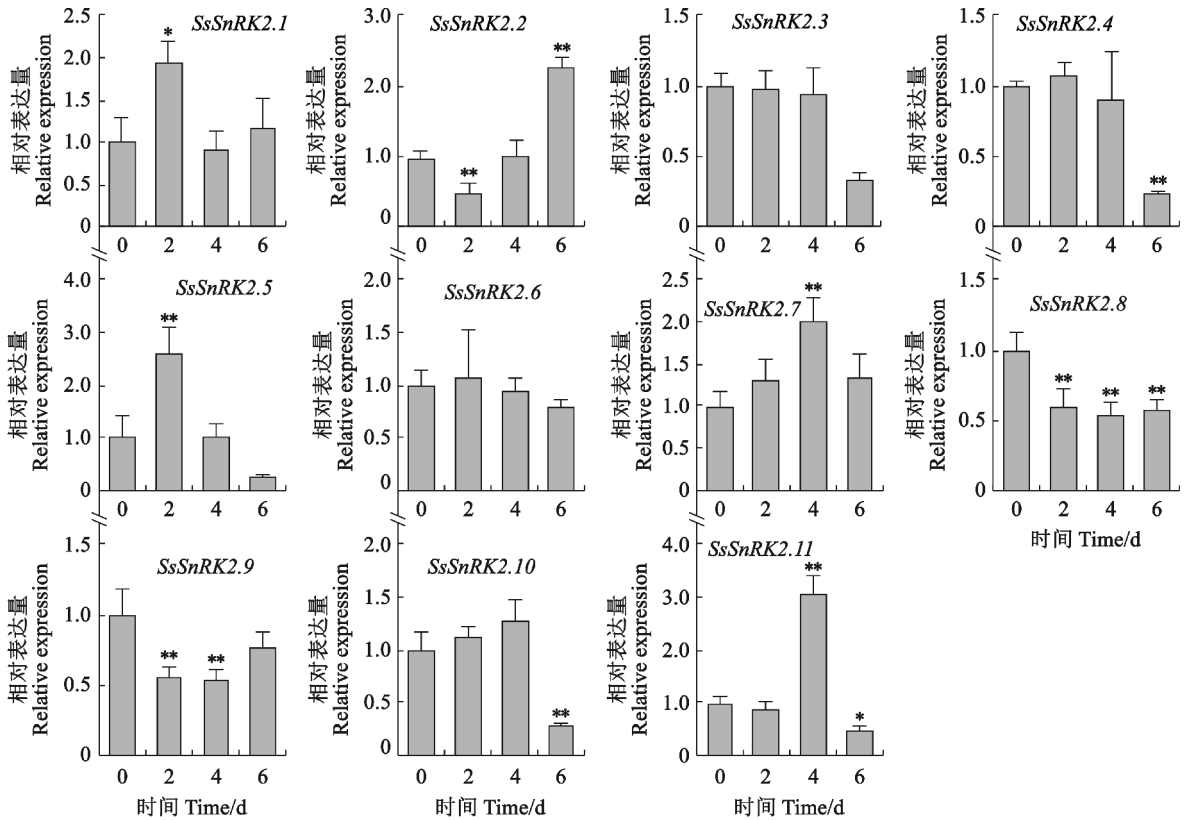
图 5 割手密 *SnRK2* 基因家族成员的组织特异性表达热图

Fig. 5 Heat map of tissue-specific expressions of *SnRK2* members in *S. spontaneum* L.

2.7 *SsSnRK2* 基因的干旱胁迫表达分析

为研究割手密 *SnRK2* 基因家族成员在干旱胁迫下的表达模式,测定了 11 个 *SsSnRK2* 基因在干旱胁迫不同时间下的表达情况。结果(图 6)表明,所有的 *SsSnRK2* 基因都能不同程度响应干旱胁迫。其中 *SsSnRK2.3*、*SsSnRK2.4*、*SsSnRK2.10* 在干旱胁迫后 4 d 的表达量与 0 d 基本保持一致,在处理 6 d

后的表达量均降低,分别为 0 d 的 34%、24%、30%; *SsSnRK2.8*、*SsSnRK2.9* 的表达量在 0 d 最高; *SsSnRK2.1*、*SsSnRK2.5* 在干旱处理 2 d 下的表达量最高;而 *SsSnRK2.7*、*SsSnRK2.11* 在干旱胁迫 4 d 下的表达量最高; *SsSnRK2.2* 的表达量随着干旱胁迫处理时间的变化呈现先降低后升高的趋势,2 d 时的表达量最低,6 d 的表达量最高。



* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

图 6 割手密 *SsSnRK2* 基因在干旱胁迫下的相对表达量

* represent $P < 0.05$, ** represent $P < 0.01$ 。

Fig. 6 The relative expression of *SsSnRK2* genes in *S. spontaneum* L. under drought treatment

3 讨论

3.1 *SsSnRK2* 基因鉴定

SnRK2 在植物响应非生物胁迫和参与多种信号转导途径中发挥关键作用。本研究基于已经报道的拟南芥、水稻和高粱 *SnRK2* 家族基因成员的蛋白质序列,在割手密基因组中鉴定到了 11 个 *SsSnRK2* 基因。前人研究表明,在单子叶植物如甘蔗^[7]、水稻^[12]、玉米^[13]中 *SnRK2* 基因家族成员的数量也在 10~11 之间,但在双子叶植物中,*SnRK2* 家族基因数量的变化较大,如棉花^[14]、樱桃^[16]和毛白杨^[17]中 *SnRK2* 家族基因的数量分别为 20,6,12 个,这表明

该基因家族在单子叶植物中高度保守。另外,对 *SsSnRK2* 蛋白质的理化性质分析显示,所有蛋白的亲水性平均值均为负值,这说明它们均属于亲水性蛋白,这与陈娜娜^[18]和马宗恒等^[19]的研究结果一致,而理化性质相似预示着各个家族成员之间可能具有某些相似的功能^[20]。

3.2 *SnRK2* 家族基因的进化分析

为了更好地分析不同物种中 *SnRK2* 蛋白之间的进化关系,本研究构建了系统发育树,*SsSnRK2* 蛋白被分为 3 组,并与拟南芥、水稻和高粱的同源基因聚在同一组,这表明 *SnRK2* 家族基因的分化起源于单子叶植物和双子叶植物分化之前^[21]。先前

的研究表明, *AtSnRK2.6* 的沉默会导致拟南芥叶片气孔关闭受损和严重的水分损失, 表明 *AtSnRK2.6* 主要在干旱胁迫中发挥正调控作用^[22], 因此与 *AtSnRK2.6* 同源的割手密基因(*SsSnRK2.3*、*SsSnRK2.4*、*SsSnRK2.5*、*SsSnRK2.7*、*SsSnRK2.10*) 在干旱胁迫后可能会诱导 ABA 信号通路并导致气孔关闭, 从而增强割手密的抗旱性。另外, *AtSnRK2.8* 的过表达显著提高了植物的抗旱性^[23], *SsSnRK2.1* 和 *SsSnRK2.6* 可能与参与干旱和渗透胁迫反应的同源基因 *AtSnRK2.8* 具有相似的功能, 但具体还需要进一步验证。

外显子与内含子的获得或缺失会导致基因的结构和功能产生差异^[24]。本研究对割手密 *SnRK2* 基因家族成员的基因结构进行预测分析发现, 同一亚组内的外显子分布较为相似, 但不同亚组之间序列存在差异, 这可能源于内含子和其他非编码区长度的差异, 有学者在藜麦^[25] 和草莓^[26] 中的研究也得到了相似的结果。而通过保守基序分析发现, *SnRK2* 蛋白在不同亚组内的基序顺序高度保守, 同一亚族内基序位置也大致相同, 这说明割手密 *SnRK2* 蛋白在进化过程中保守性较高, 这与马文娟等^[27] 在薄壳山核桃中的研究结果一致。另外, 刘成功等^[28] 对甜瓜的研究结果显示, 甜瓜 *SnRK2* 基因家族成员之间没有发生串联重复或片段重复等基因扩增事件, 这一发现与本研究结果一致, 推测割手密 *SnRK2* 基因家族的成员之间可能具有相对独立的进化关系。

3.3 *SsSnRK2* 基因启动子中的作用元件分析

当植物遭遇非生物胁迫时, 与胁迫相关的转录因子会通过一系列信号转导被激活, 这些转录因子将与下游靶基因启动子的顺式作用元件结合, 启动相关基因的表达^[16]。因此, 解析抗逆相关基因启动子区域中顺式作用元件的功能, 对于阐明植物的抗逆机理尤为重要。根据秦天元等^[29] 的研究结果, 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的 3 个亚族基因中均含有 ABRE、CAT-box、MBS 和 TATC-box 顺式作用元件。许冰霞等^[30] 在谷子 *SnRK2* 家族基因中也发现了众多与不同激素和非生物逆境响应相关的顺式作用元件。本研究对 *SsSnRK2* 启动子的顺式作用元件进行分析发现, 除 *SsSnRK2.5* 外, 其他基因的启动子中都包含了 ABA 应答元件(ABRE), 前人在辣

椒^[31]、南燕麦^[32] 的研究中也得到了相似的结果, 推测这些基因可能为 ABA 依赖型基因, 而 *SsSnRK2.5* 可能作为非 ABA 依赖型基因参与干旱胁迫反应。此外, *SsSnRK2* 启动子中也包含了 ACE、AE-box 等光合作用相关的作用元件以及 LTR、HSE、TC-rich repeats 等抗逆相关的作用元件。值得注意的是, 在本研究中有 7 个基因的启动子区域含有 MBS 作用元件, 由此推测 *SsSnRK2.1*、*SsSnRK2.2*、*SsSnRK2.3*、*SsSnRK2.6*、*SsSnRK2.7*、*SsSnRK2.8*、*SsSnRK2.9* 可能通过与 MYB 转录因子结合并调控基因的表达来提高割手密的抗旱性^[33]。

3.4 *SsSnRK2* 基因在生长发育和干旱胁迫方面的响应

SsSnRK2 基因在不同组织生长发育过程中的表达模式显示, *SnRK2* 基因家族成员的表达具有一定的组织特异性, 例如 *SsSnRK2.1* 在叶片中的表达量较高, *SsSnRK2.5*、*SsSnRK2.2* 的表达量较低, 而 *SsSnRK2.5* 在茎中的表达量较高, 这在敖涛等^[34] 的研究中也得到了类似的结果。已有研究表明 *SnRK2* 蛋白参与调控种子休眠、发芽、性别分化、根系发育、受精、果实成熟等多种生长发育过程^[22], 因此推测, 割手密 *SnRK2* 基因家族成员在不同组织中的特异性表达模式可能与植物在正常生长发育过程中的调控作用有关。另外, 本研究中所有的割手密 *SnRK2* 基因对干旱胁迫均表现出不同程度响应, 虽然其分子机制尚不清楚, 但推测这些基因可能在干旱胁迫中发挥重要功能, 可作为割手密抗旱性研究的候选基因。

4 结 论

研究在全基因组的水平上共鉴定出 11 个割手密 *SnRK2* 基因家族成员, 分布在 8 条染色体上, 系统进化树可将其分为 3 个亚组, 且同亚组中的保守基序基本相似, 外显子数量以 7~9 个为主; 顺式作用元件和 qRT-PCR 分析结果显示, 割手密 *SnRK2* 基因家族与割手密对非生物胁迫的响应密切相关; 表达模式分析结果表明, 割手密 *SsSnRK2* 基因家族成员的表达具有组织特异性。这些结果将有助于进一步对 *SsSnRK2* 基因进行功能验证, 以揭示其在割手密响应干旱胁迫过程中的作用机制。

参考文献:

- [1] ZHANG H Y, JIA H F, LIU G S, *et al.* Cloning and characterization of *SnRK2* subfamily II genes from *Nicotiana tabacum*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(9): 5701-5709.
- [2] BLUM A. Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2017, 40(1): 4-10.
- [3] AHMED B, HASAN F, TABASSUM A, *et al.* Genome-wide investigation of *SnRK2* gene family in two jute species: *Corchorus olitorius* and *Corchorus capsularis*[J]. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 2023, 21(1): 5.
- [4] HRABAK E M, CHAN C M, GRIBSKOV M, *et al.* The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 666-680.
- [5] 韦秀兰, 苏宁, 刘涛, 等. 小麦 *SnRK2* 家族基因鉴定及进化分析[J]. 麦类作物学报, 2023, 43(10): 1326-1334.
- WEI X L, SU N, LIU T, *et al.* Identification of *SnRK2* gene family and evolution analysis in wheat[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2023, 43(10): 1326-1334.
- [6] CHENG C H, WANG Z J, REN Z Y, *et al.* SCFA1PP2-B11 modulates ABA signaling by facilitating SnRK2.3 degradation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(8): e1006947.
- [7] LI C N, NONG Q, XIE J L, *et al.* Molecular characterization and co-expression analysis of the *SnRK2* gene family in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 17659.
- [8] FATIMA A, KHAN M J, AWAN H M, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of *SnRK2* gene family in mungbean (*Vigna radiata*) in response to drought stress[J]. *Crop & Pasture Science*, 2020, 71(5): 469-476.
- [9] FENG J L, WANG L Z, WU Y N, *et al.* *TaSnRK2.9*, a sucrose non-fermenting 1-related protein kinase gene, positively regulates plant response to drought and salt stress in transgenic tobacco[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 9: 2003.
- [10] SHAO Y, ZHANG X L, VAN NOCKER S, *et al.* Overexpression of a protein kinase gene *MpSnRK2.10* from *Malus prunifolia* confers tolerance to drought stress in transgenic *Arabidopsis thaliana* and apple [J]. *Gene*, 2019, 692: 26-34.
- [11] ZHANG F, ZENG D, HUANG L Y, *et al.* Stress activated protein kinase OsSAPK9 regulates tolerance to salt stress and resistance to bacterial blight in rice[J]. *Rice*, 2019, 12(1): 80.
- [12] YU T Y, CEN Q W, KANG L H, *et al.* Identification and expression pattern analysis of the *OsSnRK2* gene family in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 1088281.
- [13] LONG T D, XU B J, HU Y F, *et al.* Genome-wide identification of *ZmSnRK2* genes and functional analysis of *ZmSnRK2.10* in ABA signaling pathway in maize (*Zea mays* L.)[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 309.
- [14] LIU Z, GE X Y, YANG Z R, *et al.* Genome-wide identification and characterization of *SnRK2* gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *BMC Genetics*, 2017, 18(1): 54.
- [15] TANG Y M, LU F Z, FENG W Q, *et al.* Genome-wide identification and expression analyses of *AnSnRK2* gene family under osmotic stress in *Ammopiptanthus nanus* [J]. *Plants*, 2021, 10(5): 882.
- [16] SHEN X J, GUO X, ZHAO D, *et al.* Cloning and expression profiling of the *PacSnRK2* and *PacPP2C* gene families during fruit development, ABA treatment, and dehydration stress in sweet cherry[J]. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 2017, 119: 275-285.
- [17] SONG X Q, OHTANI M, HORI C, *et al.* Physical interaction between SnRK2 and PP2C is conserved in *Populus trichocarpa*[J]. *Plant Biotechnology*, 2015, 32(4): 337-341.
- [18] 陈娜娜. 葡萄 *SnRK2* 基因家族的全基因组鉴定、表达分析及 *VvSnRK2.2* 基因的功能验证[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [19] 马宗桓, 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.
- MA Z H, MAO J, LI W F, *et al.* Identification and expression profile of the *SnRK2* family genes in grapevine[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(10): 1891-1902.
- [20] 葛甜甜, 王楠, 高静, 等. 甘草 *GuWOX* 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 西北植物学报, 2022, 42(3): 398-409.
- GE T T, WANG N, GAO J, *et al.* Identification and expression analysis of *GuWOX* gene family in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, 42(3): 398-409.
- [21] LI J H, SONG J Y, LI C J, *et al.* Genome-wide identification and expression profile analysis of the *SnRK2* gene family in *Nicotiana tabacum* [J]. *Biochemical Genetics*, 2022, 60(5): 1511-1526.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 张玉玲, 张超, 蒋唤唤, 等. 甘蓝型油菜 *RPD3/HDA1* 基因家族鉴定及早熟相关基因挖掘[J]. 西北植物学报, 2023, 43(6): 901-911.
- ZHANG Y L, ZHANG C, JIANG H H, *et al.* Identification of *RPD3/HDA1* gene family in *Brassica napus* and mining of early maturity related members[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, 43(6): 901-911.
- [25] ZHU X L, WANG B Q, WEI X H. Identification and expression analysis of the *CqSnRK2* gene family and a functional study of the *CqSnRK2.12* gene in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)[J]. *BMC Genomics*, 2022, 23(1): 397.
- [26] 刘涛, 王萍萍, 何红红, 等. 草莓 *SnRK2* 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(12): 2150-2163.
- LIU T, WANG P P, HE H H, *et al.* Identification and expression analysis of *SnRK2* gene family in strawberry (*Fragaria vesca*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(12): 2150-2163.
- [27] 马文娟, 朱凯凯, 谌梦云, 等. 薄壳山核桃 *SnRK2* 基因家族鉴定及表达分析[J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(2): 18-28.
- MA W J, ZHU K K, CHEN M Y, *et al.* Identification and expression analysis of *SnRK2* gene family from *Carya illinoensis*[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2023, 32(2): 18-28.
- [28] 刘成功, 李壑, 韩子超, 等. 甜瓜 *SnRK2* 基因家族的鉴定与特征分析[J]. 河南农业科学, 2022, 51(5): 108-116.
- LIU C G, LI H, HAN Z C, *et al.* Identification and characterization of *SnRK2* gene family in melon[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2022, 51(5): 108-116.
- [29] 秦天元, 许德蓉, 王一好, 等. 马铃薯 *StSnRK2* 基因家族的鉴定与表达分析[J]. 中国马铃薯, 2021, 35(3): 193-208.
- QIN T Y, XU D R, WANG Y H, *et al.* Identification and expression profile of *StSnRK2* family genes in potato[J]. *Chinese Potato Journal*, 2021, 35(3):193-208.
- [30] 许冰霞, 尹美强, 李娜, 等. 谷子 *SnRK2* 家族基因的生物信息分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2017, 37(9): 616-621.
- XU B X, YIN M Q, LI N, *et al.* Identification and bioinformatics analysis of the *SnRK2* gene family of *Setaria italica* [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2017, 37(9): 616-621.
- [31] WU Z M, CHENG J W, HU F, *et al.* The *SnRK2* family in pepper (*Capsicum annuum* L.): Genome-wide identification and expression analyses during fruit development and under abiotic stress[J]. *Genes & Genomics*, 2020, 42(10):1117-1130.
- [32] TANG Y M, LU F Z, FENG W Q, *et al.* Genome-wide identification and expression analyses of *AnSnRK2* gene family under osmotic stress in *Ammopiptanthus nanus* [J]. *Plants*, 2021, 10(5): 882.
- [33] 刘建汀, 叶新如, 张前荣, 等. 西葫芦 *NCED* 基因家族鉴定及其响应干旱胁迫分析[J]. 西北植物学报, 2023, 43(4): 569-581.
- LIU J T, YE X R, ZHANG Q R, *et al.* Genome-wide identification and response to drought stress of *NCED* genes family in zucchini (*Cucurbita pepo* L.)[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, 43(4): 569-581.
- [34] 敖涛, 胡尊红, 和珊, 等. 蓖麻 *SnRK2* 基因家族的鉴定和特征分析[J]. 中国油料作物学报, 2015, 37(2): 160-166.
- AO T, HU Z H, HE S, *et al.* Identification and characterization of *SnRK2* gene family in castor bean (*Ricinus communis*)[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2015, 37(2): 160-166.