DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94096

对马铃薯类受体激酶 CRK 基因家族的鉴定及响应病原真菌信号的表达分析

张卫娜 范艳玲 康益晨 杨昕宇 石铭福 要凯 赵章平
张俊莲 秦舒浩*

甘肃农业大学园艺学院, 甘肃兰州 730070

摘要: 富含半胱氨酸的类受体激酶(cysteine-rich receptor-like kinase, CRK)在植物生长发育和环境适应过程中发挥重要的作用。本研究鉴定了马铃薯 CRK (*StCRK*)家族成员, 并对其理化性状、进化特征、亚细胞定位、染色体位置和表达模式进行分析。鉴定获得 8 个 *StCRKs*, 其氨基酸序列大小为 459~686 aa, 分子量介于 50.75~77.50 kD, 等电点介于 5.84~8.75, 主要位于质膜。进化分析将来自马铃薯、拟南芥、香蕉、苹果、水稻、番茄和棉花的 CRKs 分为 9 个亚组, 2 号、3 号和 5 号染色体上的 *StCRKs* 分布于亚组 I (6 个成员)和 VI (2 个成员); 存在 2 个串联重复基因簇, 包含 4 个成员。*StCRKs* 启动子区域存在多种顺式调控元件, 主要响应激素、低温、防卫和逆境等信号。接种晚疫病病菌 (*Phytophthora infestans*, *Pi*)和干腐病菌 (*Fusarium sulphureum*, *Fs*)后, 分别发现 8 个和 6 个 *StCRKs* 为差异表达。其中, *StCRK4* 和 *StCRK8* 响应 *Pi* 和 *Fs* 信号, 在接种以上 2 种病原菌后, 表达量上调 8 倍以上, 推测其响应多个真菌信号, 可能在马铃薯对真菌病害的广谱抗性中起重要作用, 可作为进一步抗病研究和功能分析的候选基因。

关键词: CRK; 顺式表达元件; 生物信息学分析; 晚疫病病菌; 马铃薯晚疫病病菌

Genome wide identification and expression analysis of CRK gene family in response to fungal pathogen signals in potato

ZHANG Wei-Na, FAN Yan-Ling, KANG Yi-Chen, YANG Xin-Yu, SHI Ming-Fu, YAO Kai, ZHAO Zhang-Ping, ZHANG Jun-Lian, and QIN Shu-Hao*

College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: Cysteine-rich receptor-like kinase (CRK) plays an important role in plant growth and environmental adaptation. In this study, potato CRK (*StCRK*) family members were identified, and their physical and chemical characteristics, evolutionary characteristics, subcellular location, chromosome location and expression patterns were analyzed. Eight *StCRK* members were identified, with amino acid size from 459 to 686 aa, molecular weight of 50.75–77.50 kD, and isoelectric point of 5.84–8.75. *StCRKs* were mainly located on plasma membrane. CRKs from potato (*Solanum tuberosum*), apple (*Malus pumila* Mill.), Thale Cress (*Arabidopsis thaliana*), rice (*Oryza sativa*), cotton (*G. hirsutum*), banana (*Musa acuminata*), and tomato (*Solanum lycopersicum*) could be divided into nine subgroups, and *StCRKs* were belonged to subgroups I (6 members) and VI (2 members). Moreover, *StCRKs* distributed on chromosomes 2, 3, and 5, contained two tandem repeat gene clusters, including four members. There were many cis-regulated elements in the *StCRKs* promoter region, which mainly respond to hormones, low temperature, defense and stress signals. After inoculating *Phytophthora infestans* (*Pi*) and *Fusarium sulphureum* (*Fs*), eight and six *StCRKs* gene differentially expressed, among them, *StCRK4* and *StCRK8* had the expression levels by more than eight times. It is speculated that they may

本研究由甘肃农业大学园艺学科建设项目(GAU-XKJS-2018-225), 国家自然科学基金项目(31260311), 甘肃省自然科学基金项目(1606RJZA034), 中国博士后科学基金项目(2012M512042, 2014T70942)和国家现代农业产业技术体系(马铃薯)建设专项(CARS-09-P14)资助。This study was supported by the Discipline Construction Fund Project of Gansu Agricultural University (GAU-XKJS-2018-225), the National Natural Science Foundation of China (31260311), the Natural Science Foundation of Gansu Province (1606RJZA034), the China Postdoctoral Science Foundation (2012M512042, 2014T70942), and the China Agriculture Research System (Potato, CARS-09-P14).

*通信作者(Corresponding author): 秦舒浩, E-mail: qinsh@gsau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 844741204@qq.com

Received (收稿日期): 2019-06-28; Accepted (接受日期): 2019-12-26; Published online (网络出版日期): 2020-01-19.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200119.1526.002.html>

respond to multiple fungal signals, and play an important role in potato's broad-spectrum resistance to fungal diseases, and can be used as candidate genes for further needed on disease resistance and functional analysis.

Keywords: CRK; *cis*-elements; bioinformatic analysis; *Fusarium sulphureum* (Fs); *Phytophthora infestans* (Pi)

植物类受体激酶(receptor-like kinase, RLK)是一类定位在细胞膜上的单次跨膜蛋白,由数量庞大的不同种类的蛋白质组成^[1]。RLKs的分子结构和功能与动物的受体蛋白激酶相似,在几乎所有的生命活动中起重要的调控作用。植物中的第1个RLK基因是1990年由开拓者 John C Walker 和 Ren Zhang 教授在玉米中发现的^[2]。此后,在植物中陆续鉴定到越来越多的RLKs,在模式植物拟南芥中约有600多个^[3],而在水稻中约有1130多个,被认为是植物体中最大的一类受体基因^[4]。一个典型的RLK由N端信号肽序列、胞外受体结构域、跨膜结构域和胞内激酶区构成^[5]。N端信号肽具有疏水的功能,蛋白质合成的过程中起识别胞外信号的作用。植物RLK的胞外结构域能识别细胞外生长、发育和各种环境因子,进而将信息传递至胞内激酶区,使之发生磷酸化或去磷酸化等反应,开启或关闭下游靶蛋白,从而调节植物的生长发育和逆境响应^[6-7]。根据RLKs胞外结构域氨基酸序列的差异,可将其分为:富含亮氨酸重复序列型(leucine-rich repeats, LRR)、Malectin、类凝集素型(lectin-like)、Lysin motif (LysM)、DUF26等,进而其分为40余个亚家族^[4]。其中,富含半胱氨酸的类受体激酶(cysteine-rich receptor-like kinase, CRK)是一类广泛存在于动物和植物中的膜受体蛋白,具有1个N端信号肽、1个跨膜结构域、1个C端的胞内丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域(Ser/Thr protein kinase domain)以及1个通常由1~4个拷贝的strss-antifung 结构域构成的胞外结构域(extracellular domain)^[8]。研究发现,拟南芥有44个CRKs,陆地棉中有70个^[9-10]。

CRKs在植物生长发育、激素信号传导、非生物胁迫和病原体防御以及细胞过敏性死亡中发挥至关重要的作用^[11-12]。拟南芥中,过表达 *AtCRK4*、*AtCRK6*、*AtCRK7* 或 *AtCRK36* 均可增强植物防御病原菌早期和中期的免疫反应^[13-14]。当拟南芥受丁香假单胞菌 *Pst* DC3000 侵染后, *AtCRK5* 或 *AtCRK13* 过表达的植株细胞迅速发生过敏性死亡,诱导病原菌相关防御基因上调表达^[15-17],而突变体 *atcrk20* 则通过加速胞外活性氧的爆发诱导细胞过敏性死亡,从而抑制病原菌的生长^[18]。水稻中也有相似的研究, *OsCRK6* 和 *OsCRK10* 与 *OsNPR1* 互作可以介导水稻

对多种病原菌的广谱性免疫反应^[19]。但是,在大麦中,瞬时沉默 *HvCRK1* 能够增强表皮细胞对白粉病菌 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* 的抗性而不影响 R 基因介导的抗病途径^[20],这些研究表明 CRKs 在植物免疫抗病中起重要调控作用,但是不同 CRKs 的功能和作用方式不同。

CRKs 作为对植物生长发育和抗逆性具有重要功能的植物类受体激酶中的一大类,其在马铃薯基因组中的分布、表达及功能尚未见报道。本研究采用生物信息学的分析方法,分析马铃薯 CRK 基因家族的成员数量、染色体定位、进化及其分类;预测编码蛋白质的生理生化特性和顺式表达元件;分析 *StCRKs* 对干腐病和晚疫病病菌侵染时的响应模式,以期为进一步研究马 *StCRKs* 的功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 数据搜索和 CRKs 鉴定

马铃薯基因组、CDS 和蛋白序列及染色体位置等信息均下载自马铃薯基因组在线数据资源(http://potato.plantbiology.msu.edu/integrated_searches.shtml)。拟南芥、香蕉、苹果、水稻、番茄和棉花蛋白序列分别下载自拟南芥在线信息资源(Arabidopsis information resource, TAIR: <http://www.arabidopsis.org/>)、香蕉基因组数据库(<https://banana-genome-hub.southgreen.fr/>)、苹果基因组数据库(Genome Database of Rosaceae species, GDR: <https://www.rosaceae.org/>)、水稻基因组数据库(Rice Genome Annotation Project, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>)、茄科植物基因组数据库(Solanaceae Genomics Resource: <http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)和棉花基因组数据库(<http://www.cottongen.org/>)。利用 HMMER3.0 软件(HMMER 3.0, <http://hmmer.janelia.org/>)鉴定马铃薯 CRK 基因。利用保守域预测软件 Pfam (<http://pfam.janelia.org/>)和 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de/>)初步鉴定获得的候选基因,确保其 N-末端含有一个或多个 Stress-antifung 结构域、C-末端 Pkinase 结构域和跨膜结构域。

1.2 马铃薯 CRKs 的生物信息学分析

分别使用在线分析工具 ExPASyProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)、CELLO v.2.5 (

life.nctu.edu.tw/), WoLF PSORT (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>)和 MapDraw 确认分析^[21]理化性质、亚细胞定位和染色体位置可视化。利用 ClustalX1.83 软件^[22]进行多序列比对,并用进化分析软件 MEGA5.0 (<http://www.megasoftware.net/>),以邻接法(Neighbor-joining method)构建进化树,执行参数为 Poisson 模式(Poisson Model)、部分删除(Partial deletion)和 1000 次重复有根树(Bootstrap replicated 1000)。

1.3 马铃薯 *CRKs* 结构分析

从马铃薯基因组数据库中下载马铃薯外显子和内含子分布数据的存储文件,利用 GSDS 2.0 网站(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制 *CRK* 基因结构分布图。

1.4 马铃薯 *CRKs* 启动子顺式元件(*cis-element*)分析

从马铃薯基因组中提取 *CRK* 基因转录起始位置上游 1500 bp 序列查找启动子顺式作用元件,在 PlantCARE 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测分析。

1.5 马铃薯 *CRKs* 响应干腐病和晚疫病病菌侵染的表达模式分析

采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)法检测马铃薯 *CRKs* 响应干腐病和晚疫病病菌侵染的表达模式。用于响应干腐病和晚疫病病菌侵染表达模式分析的材料分别是马铃薯‘陇薯 7 号’块茎和‘荷兰 15 号’叶片。‘陇薯 7 号’块茎由甘肃省定西市农业科学研究院提供,硫色镰刀菌(*Fusarium sulphureum*)由甘肃农业大学食品科学与工程学院李永才教授课题组提供。在马铃薯的赤道部位均匀地打 3 个 3 mm 深、直径 3 mm 的小孔,于每个小孔中接种提前备好的 20 μL *F. sulphureum* 的孢子悬浮液(浓度 1.0×10^6 孢子 mL^{-1})。

用聚乙烯袋包装后装入纸箱,在室温 25℃ 条件下贮藏。每个处理包括 5 个马铃薯块茎,重复 3 次。接种不同时间(1 d、2 d、3 d 和 4 d)后,取接种点向外 0.5 cm 的块茎组织,以打孔后不接种块茎为对照。3 次生物学试验重复。‘陇薯 7 号’块茎种植后,取叶片用 2.5 mmol L^{-1} 水杨酸(salicylic acid, SA)和茉莉酸(jasmonic acid, JA)处理 1 h 和 3 h 用于验证试验。‘荷兰 15 号’叶片为本实验室自己种植,晚疫病菌(HB 09-16-2)由华中农业大学田振东教授课题组惠赠,接种方法和培养条件参照蒋锐(2017)博士论文^[23]。分别于接种 1 d、4 d、6 d 和 8 d 等不同时间点采样。每个处理重复 3 次,锡箔纸包裹标记,液氮速冻后保存于 -80℃ 超低温冰箱备用。

利用 RNAout 试剂盒(160906-50, Tiandz, 北京)提取组织总 RNA,经质量检测合格后分别采用试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047, TaKaRa, 大连)和 SYBR Premix Ex Taq II (TliRNaseH Plus)(RR820, TaKaRa, 大连)进行 cDNA 合成和 qRT-PCR 扩增。采用在线软件 Primer 3.0 (<http://primer3.ut.ee/>)设计引物,以 elongation factor 1- α (*ef1a*)(GenBank 登录号为 AB061263)作为内参基因^[24],引物序列如表 1 所示。反应结束后分析荧光值变化曲线及溶解曲线,并采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算基因的相对表达量^[25]。

1.6 统计分析

利用 Microsoft Excel 2010 软件处理原始数据,利用 *t*-test ($P < 0.05$)法分析差异显著性,采用软件 OriginPro 8.0 进行图形可视化,所有数值均表示为“平均数 $\pm$ 标准差”。

表 1 马铃薯 *CRKs* 引物
Table 1 Primers of *StCRKs*

基因登录号 Gene accession number	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse prime (5'-3')
AB061263	ATTGGAAACGGATATGTCTCA	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
PGSC0003DMG402000515	ACTCTGGCTCTCTACTACAAACAGT	CTTCCACACCTGAAACCAAAATGAC
PGSC0003DMG400021394	AAGAGTCCCCTTGATACAGAACCA	ATCGAATTCATACAAGAGGTCCAGC
PGSC0003DMG400013525	CAACACAACCACCATTCTCAATTC	AAGATTGTGTAGAGGAGCTTGTTG
PGSC0003DMG400018101	CTCCTCCAGATACAAGCAGTTCATC	TCACCTGATTGAGAGCTAGAAATGC
PGSC0003DMG400006912	TCGTGTTCAAGAGTTATGTCACCAG	AATTCCAAGCAAGTCGAAGTCAGAT
PGSC0003DMG400013524	CATATGTAGTACGCAACCTGAGCAT	CTTCAGCATAGCATAGGACACAGTC
PGSC0003DMG400015170	TCATGATCAGACTGTTGACTTCGTC	AAGCAGTGAATGGAGCAACAAAATC
PGSC0003DMG400015171	TACAAAAGCCAGTGAAGGAGAAGAC	TATAATTGCCTGTTTCTTGAGCGGA

2 结果与分析

2.1 马铃薯 CRKs 鉴定

以马铃薯基因组序列为参考序列, 经分析和过滤, 共获得 14 个蛋白序列, 通过与基因编号对应, 发现部分基因对应 1 个以上的蛋白序列, 所对应蛋白序列完全相同。最终获得对应的 8 个 CRKs, 其对应蛋白的氨基酸序列大小介于 459~686, 分子量和等电点

分别介于 50.75~77.50 kD 和 5.84~8.75 (表 1)。利用在线软件 CELLO v.2.5 和 WoLF PSORT 对 8 个基因的亚细胞定位进行预测, 发现 DMG400013524 和 DMG400015171 位于质膜, 其他基因利用 2 种软件预测的结果有所区别, 其中 4 个基因位于质膜或者叶绿体, DMG400015170 位于质膜或者细胞质, 而 DMG400006912 位于质膜或者液泡。

表 2 马铃薯 CRKs
Table 2 CRKs in potato

基因登录号 Gene accession number		基因编号	氨基酸数	分子量	等电点	亚细胞定位
Gene ID [#]	STWG 1.0 ^b	Genetic code	AA size	Molecular weight (kD)	Isoelectric point	Subcellular localization
PGSC0003DMG402000515	PGSC0003DMP400001023/ PGSC0003DMP400001024	<i>StCRK1</i>	616	67.40	8.53	PM ^a , Chlo ^b
PGSC0003DMG400021394	PGSC0003DMP400037082	<i>StCRK2</i>	608	67.23	8.07	PM ^a , Chlo ^b
PGSC0003DMG400013525	PGSC0003DMP400023929	<i>StCRK3</i>	656	72.73	8.75	PM ^a , Chlo ^b
PGSC0003DMG400018101	PGSC0003DMP400031539	<i>StCRK4</i>	681	75.52	6.37	PM ^a , Chlo ^b
PGSC0003DMG400006912	PGSC0003DMP400012233/ PGSC0003DMP400012234/ PGSC0003DMP400012235	<i>StCRK5</i>	668	75.21	5.84	PM ^a , Vacu ^b
PGSC0003DMG400013524	PGSC0003DMP400023928/ PGSC0003DMP400023926	<i>StCRK6</i>	656	73.21	6.42	PM ^{a,b}
PGSC0003DMG400015170	PGSC0003DMP400026615/ PGSC0003DMP400026616/ PGSC0003DMP400026617	<i>StCRK7</i>	459	50.75	7.27	PM ^a , Cyto ^b
PGSC0003DMG400015171	PGSC0003DMP400026620	<i>StCRK8</i>	686	77.50	7.23	PM ^{a,b}

亚细胞定位, “a” 和 “b” 表示通过网络软件 CELLO v.2.5 和 WoLF PSORT 预测蛋白的定位; PM: 质膜; Vacu: 液泡; Chlo: 叶绿体; Cyto: 细胞质; [#]以 “PGSC...” 开始的基因编号是来自马铃薯基因组测序联盟数据库(<http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/>)。For subcellular localization, “a” and “b” indicate the localization of protein predicted by using online software CELLO v.2.5 and WoLF PSORT; PM: plasma membrane; Vacu: vacuole; Chlo: chloroplast; Cyto: cytoplasm; [#]: Gene ID beginning with “PGSC...” is from Database of Potato Genome Sequencing Consortium (<http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/>).

2.2 马铃薯、拟南芥、香蕉、苹果、水稻、番茄和棉花 CRK 家族进化树分析

从图 1 看出, CRKs 可以分为 9 个亚组(图 1), 其亚组 III 和亚组 IV 中, 除 Gh-A01G2043 和 MD09G1104200 外, 其余成员均来自水稻和香蕉 2 种单子叶植物, 而亚组 VI-IX 的家族成员都来自棉花、马铃薯、苹果、拟南芥、番茄等双子叶植物。马铃薯 8 个 CRKs 分布于亚组 I 和 VI, 其中 6 个分布于亚组 I, 2 个分布于亚组 VI。其亚组 I 中, 基因 PGSC0003DMP400037082 和 PGSC0003DMP400001023 同源性较高, 马铃薯基因 PGSC0003DMP400031539、PGSC0003DMP400023928 和 PGSC0003DMP400012234 分别与番茄基因 Solyc03g112730.3.1、Solyc05g1005070.2.1 和 Solyc02g067780.3.1 同源性较高, 均达 99% 以上。

2.3 马铃薯 CRKs 的染色体定位

通过下载马铃薯 CRKs 相关染色体定位信息, 利

用软件 MapDraw 进行染色体定位并进行可视化分析。结果显示, 马铃薯的 8 个 CRKs 中, 3 号和 5 号染色体上均分布 3 个 CRKs, 2 号染色体上分布 2 个 CRKs。其中, PGSC0003DMG400013524 和 PGSC0003DMG400013525、PGSC0003DMG400015170 和 PGSC0003DMG400015171 在染色体上的相对位置小于 100 kb, 推断为串联重复基因簇。

2.4 马铃薯 CRKs 的结构和蛋白质功能结构域分析

利用 CRKs 家族成员单独构建的进化树和外显子-内含子结构如图 3 所示。CRKs 家族成员单独构建的进化树和图 1 所示结果一致。*StCRKs* 具有相对保守的基因结构和蛋白功能结构域(图 3)。马铃薯 CRKs 长度介于 3.2~5.1 kb, 外显子数目为 6~8 个, 较为接近。保守结构域分析结果显示, 马铃薯 CRK 家族中 7 个蛋白质具有 2 个 stress-antifung 结构域和 1 个 Pkinase_Tyr 结构域, 而 PGSC0003DMP400026615

图 1 马铃薯、拟南芥、香蕉、苹果、水稻、番茄和棉花 CRK 家族进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of CRKs in potato (*Solanum tuberosum*) (▼), apple (*Malus pumila* Mill.), Thale Cress (*Arabidopsis thaliana*), rice (*Oryza sativa*), cotton (*G. hirsutum*), banana (*Musa acuminata*), and tomato (*Solanum lycopersicum*)

图 2 马铃薯 CRKs 染色体定位

Fig. 2 Chromosomal distribution of the *StCRKs*

代表串联重复基因簇。 indicates tandem duplication genes.

(*StCRK7*)只含有 1 个 stress-antifung 结构域和 1 个 Pkinase_Tyr 结构域, 此外, PGSC0003DMP400026615 (*StCRK7*)和 PGSC0003DMP400026620 (*StCRK8*)除了具有 stress-antifung 和 Pkinase_Tyr 结构域外, 还含

有 1 个功能未知的 DUF3403 (PF11883)结构域。结合 *StCRK* 蛋白家族系统发育树分析结果, 位于进化树同一分支的同源基因具有相似的基因结构和功能结构域, 推测它们具有相似的生物学功能。

2.5 马铃薯 *CRKs* 家族 *cis*-element 分析

为进一步理解基因的调控功能, 本研究对启动子序列中顺式元件进行了分析。通过马铃薯基因组

提取 *CRKs* 起始密码子上游 1500 bp 启动子序列, 利用在线工具 PlantCARE 进行顺式元件分析, 并提取了响应激素和逆境相关的 15 类顺式元件。由图 4 可知,

图 3 马铃薯 *CRKs* 的基因结构和蛋白功能结构域分析

Fig. 3 Gene structure and protein functional domain analysis of *StCRKs*

A: 马铃薯 *CRKs* 进化树; B: 马铃薯 *CRKs* 基因结构; C: 马铃薯 *CRK* 蛋白的功能结构域。

A: phylogenetic tree of *StCRKs*; B: gene structure of *StCRKs*; C: functional domains of *StCRKs*.

图 4 预测马铃薯 *CRKs* 启动子中顺式调控元件

Fig. 4 Putative regulatory *cis*-elements in *StCRKs* promoters

A 和 B: 脱落酸响应元件; C: GARE-motif; D 和 E: 赤霉素响应元件; F 和 G: 生长素响应元件; H: 茉莉酸甲酯响应元件; I: 水杨酸响应元件; J: 玉米醇溶蛋白代谢调控元件; K: 厌氧诱导响应元件; L: 缺氧响应元件; M: 防御和压力响应元件; N: 黄酮类代谢响应元件; O: 低温响应元件。

A and B: are the abscisic acid responsive elements; C: GARE-motif; D and E: the Gibberellin responsive elements; F and G: the auxin responsive elements; H: the Methyl jasmonate responsive element; I: the Salicylic acid responsive elements; J: the regulatory element for Zein metabolism; K: the Anaerobic responsive elements; L: the anoxic responsive elements; M: the defense and stress responsive elements; N: the flavonoid responsive elements; O: the low-temperature responsive elements.

StCRKs 启动子区域富含响应植物激素和逆境胁迫的顺式作用元件(图 4)。如图所示, 与植物激素响应相关的顺式元件有 5 类, 分别为脱落酸响应元件(A 和 B)、茉莉酸甲酯响应元件(H)、水杨酸响应元件(I)、赤霉素响应元件(C、D 和 E)和生长素响应元件(F 和 G); 与生长发育相关的顺式元件有两类: 玉米醇溶蛋白代谢调控元件(J)和黄酮类代谢元件(N); 而胁迫响应相关的顺式元件主要包括: 厌氧诱导响应元件(K)、缺氧响应元件(L)、低温响应元件(O)和防御和压力响应元件(M)。这暗示了马铃薯 *CRK* 基因家族在马铃薯生长发育及多种激素和胁迫中的潜在作用。

为验证所预测 *cis*-element 的准确性, 经 SA 和

JA 分别处理马铃薯叶片后检测了 6 个 *StCRKs* 的表达情况(图 5)。*StCRK4*、*StCRK5* 和 *StCRK8* 启动子区域均存在响应 SA 信号的 *cis*-element。SA 处理后, 以上 3 个 *StCRKs* 均为差异表达。其中, *StCRK8* 上调最高, SA 处理 1 h 和 3 h 后, 其表达量分别上调至对照的 5.71 倍和 11.22 倍。此外, *StCRK7* 启动子存在响应 MeJA 信号的 *cis*-element, JA 处理 1 h 和 3 h 后其表达量也发生显著上调, 分别上调至对照的 5.95 倍和 4.73 倍。*StCRK2* 和 *StCRK6* 启动子区域不存在响应 SA 和 MeJA 中任何一种激素的 *cis*-element。尽管 SA 和 JA 处理后以上 2 个 *StCRKs* 也发生不同程度的变化, 但变化幅度较小。以上结果表明, 对 *StCRKs* 启动子区域 *cis*-element 预测的结果准确性较高。

图 5 SA 和 JA 处理后 6 个马铃薯 *CRKs* 的表达情况

Fig. 5 Expression patterns of six *StCRKs* in response to SA and JA treatments

2.6 *CRKs* 在晚疫病病菌侵染马铃薯叶片中的表达分析

植物 *CRKs* 蛋白参与调节植物对生物胁迫和非生物胁迫的应答。生产中, 马铃薯晚疫病是由致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 引起的, 晚疫病能够导致马铃薯茎叶死亡和块茎腐烂。为进一步分析 *StCRKs* 响应病原真菌的表达模式, 我们通过对马铃薯叶片接种晚疫病病菌, 利用 Realtime PCR 技术检测了叶片中 *CRKs* 的表达特征(图 6)。通过实验发现, 8 个 *CRKs* 对晚疫病病菌都有响应。其中,

StCRK1、*StCRK4* 和 *StCRK8* 随着侵染时间的延长, 其相对表达量呈逐渐上调表达的趋势, 8 d 时分别上调到对照的 13.02 ± 4.40 、 24.72 ± 5.40 和 21.38 ± 2.10 倍。*StCRK3*、*StCRK5*、*StCRK7* 和 *StCRK8* 与对照组相比, 不同时间点均有显著差异。

2.7 *CRKs* 基因家族在干腐病菌侵染马铃薯块茎中的表达分析

马铃薯块茎在贮藏期间极易发生腐烂, 其中由硫色镰刀菌 (*Fusarium sulphureum*) 引起的干腐病是

造成甘肃马铃薯腐烂的最主要病害, 本实验通过接种疏色镰刀菌, 检测块茎在受到病菌侵染时 *StCRKs* 的表达特征(图 7)。马铃薯块茎在贮藏期受病菌侵染后, 未检测到 *StCRK1* 和 *StCRK7* 基因的表达, 而 *StCRK4*、*StCRK5* 和 *StCRK8* 随着病菌侵染时间的延长, 其相对表达量呈逐渐上升的趋势, 且在处理 4 d 时, 分别上升至对照的 8.43 ± 0.60 、 1.72 ± 0.20 和 36.52 ± 7.80 倍; *StCRK6* 和 *StCRK8* 与对照相比, 不同时间点均有显著差异。据此推断, 马铃薯 *StCRK* 基因家族成员

在进化过程中发生了功能分化, 分工协作参与马铃薯对病原菌的响应。

3 讨论

不同物种中 *CRKs* 的数目不尽相同, 水稻中有 39 个 *CRKs*, 而拟南芥中有 44 个^[9], 不同遗传背景的棉花中 *CRKs* 数量不同, *G. hirsutum* 中有 70 个而 *G. barbadense* 中有 54 个^[10]。拟南芥 44 个 *CRKs* 中 19 个成员是以串联成簇的形式排列于 4 号染色体上,

图 6 马铃薯 *CRKs* 响应晚疫病菌侵染的表达分析

Fig. 6 Expression patter of *StCRKs* in response to *Phytophthora infestans* (Pi)

图 7 马铃薯 *CRKs* 响应干腐病菌侵染的表达分析

Fig. 7 Expression patter of *StCRKs* in response to *Fusarium sulphureum* (Fs)

而且序列之间高度相似^[26]。本研究首次基于转录组数据和结构域保守序列,对马铃薯 *CRKs* 成员进行鉴定及生物信息学分析,共获得 8 个家族成员,无规律地分布于 2 号、3 号和 5 号染色体上,进化分析将其分为 2 个进化分支。荧光实时定量 PCR 分析表明 *CRKs* 对干腐病菌和晚疫病病菌侵染的响应情况说明 *CRKs* 可能在调控马铃薯对病原真菌的抗性反应中发挥作用。

部分马铃薯 *CRKs* 基因结构和保守结构域特征与其他基因有显著差异。其中,PGSC0003DMP400026615 (*StCRK7*)和 PGSC0003DMP400026620 (*StCRK8*)除含有典型的 stress-antifung 结构域和 Pkinase_Tyr 结构域外还含有 1 个功能未知的 DUF3403 结构域 (PF11883); *CRKs* 在进化过程中基因结构和保守结构域的差异,为成员之间的功能分化提供遗传变异的基础。通过对外显子和内含子的研究,有助于我们分析了解基因结构和功能上的差异^[27]。马铃薯 *CRKs* 的外显子为 6 个至 8 个,而且位于进化树同一亚族内的 *CRKs* 具有类似的内含子/外显子数目和排列模式,同时它们的保守结构域也具有类似的数量和位置顺序,说明亚族内成员间在进化过程中较为保守。

植物启动子要正确调控基因的表达水平和表达模式,需要核心启动子以及上下游的顺式作用元件协同作用。Xu 等^[28]对中国华东野生葡萄中受白粉病和赤星病诱导表达的 VpSTS 诱导型启动子的序列分析发现,该启动子含有 Box-W1、TC-rich repeat element、ABRE、MBS 和 LTR 等顺式作用元件。其中,Box-W1 (TTGACC)与欧芹中真菌激酶子响应元件的保守核心序列相似,特异性地被 SA 诱导的转录因子 WRKY 结合蛋白识别^[29]。TC-rich repeat element 最早是从烟草中识别出来的与防御和胁迫相关的顺式作用元件^[30]。MBS 是 MYB 转录因子同源物的结合位点^[31],ABRE 是 ABA 响应的元件^[32],而 LTR 是低温响应顺式元件^[33]。本研究发现,马铃薯的 8 个 *CRKs* 中,有 4 个 *StCRKs* (*StCRK1*、*StCRK2*、*StCRK3*、*StCRK4*)含有 TC-rich repeat element 顺式元件,7 个 *StCRKs* (*StCRK1*、*StCRK2*、*StCRK3*、*StCRK4*、*StCRK5*、*StCRK7* 和 *StCRK8*)具有 ABRE 元件,1 个 *StCRK* (*StCRK1*)具有 MBS 元件,2 个 *StCRKs* (*StCRK4* 和 *StCRK6*)含有 LTR 元件。研究表明,植物激素包括 IAA、ET、SA、ABA、GA、JA 等,在植物对多种病原菌和真菌的抗性反应中起至关重要的作用^[34]。马铃薯 *CRKs* 中含有与 SA、MeJA、IAA、GA 等逆境激素响应元件的基因分别为 3、1、1 和 4 个,推测马

铃薯 *CRKs* 可能通过响应不同的激素信号参与对病原菌的防卫反应。而 SA 和 JA 在植物抗病中的重要作用已被证实,为进一步验证所预测 *cis-elements* 的准确性和 *StCRKs* 对生物胁迫的响应情况,本研究用激素 SA 和 JA 对叶片进行了处理,实验结果表明对 *StCRKs* 启动子区域 *cis-element* 预测的结果准确性较高。而当块茎和叶片分别受到干腐病菌和晚疫病病菌侵染后,*StCRK4* 和 *StCRK8* 基因的表达随着侵染时间的延长而逐渐增强,推断这 2 个基因在马铃薯响应病原真菌的过程中起重要的作用,可作为后续功能分析的候选基因。

4 结论

鉴定出 8 个马铃薯 *CRKs*,并对其理化性质、染色体定位、基因结构和蛋白功能结构域进行分析,预测了 *CRKs* 启动子区域响应多种激素和胁迫的调控元件,并检测了 *CRKs* 响应马铃薯干腐病菌和晚疫病病菌侵染的表达模式,为后续研究 *StCRKs* 感受并传递内外环境刺激,调控其生理机能的分子机制提供了理论基础,为研究 *StCRKs* 的功能及其作用机制提供了参考。

References

- [1] Sakamoto T, Deguchi M, Brustolini O J, Santos A A, Silva F F, Fontes E P. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 229.
- [2] Walker J C, Zhang R. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the *S*-locus glycoproteins of Brassica. *Nature*, 1990, 345: 743–746.
- [3] Shiu S H, Bleecker A B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 10763–10768.
- [4] Shiu S H, Karlowski W M, Pan R, Tzeng Y, Mayer K F, Li W. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *Plant Cell*, 2004, 16: 1220–1234.
- [5] Lehti-Shiu M D, Zhou C, Shiu S H. Origin, diversity, expansion history, and functional evolution of the plant receptor-like kinase/pelle family. In: Receptor-like kinases in plants. Berlin Heidelberg: Springer, 2012. pp 1–22.
- [6] Walker J C. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol Biol*, 1994, 26: 1599–1609.
- [7] Wang G, Ellendorff U, Kemp B, Mansfield J W, Forsyth A, Mitchell K, Bastas K K, Liu C, Woodstorf A, Zipfel C, De Wit P J G M, Jones J D G, Tor M, Thomma B P. A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2008, 147: 503–517.
- [8] Chen Z. A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats. *Plant Physiol*, 2001, 126: 473–476.
- [9] Wrzaczek M, Brosche M, Salojärvi J, Kangasjarvi S, Idanheimo

- N, Mersmann S, Robatzek S, Karpinski S, Karpinska B, Kangasjarvi J. Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 95.
- [10] 张中起, 王娇, 靳炜, 葛冬冬, 刘康, 吕芬妮, 孙敬. 陆地棉 CRK 基因家族的鉴定及其表达分析. *中国农业科学*, 2018, 51: 2442–2461.
Zhang Z Q, Wang J, Jin W, Ge D D, Liu K, Lyu F N, Sun J. Identification and expression analysis of CRK gene family in upland cotton. *Sci Agric Sin*, 2018, 51: 2442–2461 (in Chinese with English abstract).
- [11] Bourdais G, Burdiak P, Gauthier A, Nitsch L, Salojarvi J, Rayapuram C, Idanheimo N, Hunter K, Kimura S, Merilo E, Vaattovaara A, Oracz K, Kaufholdt D, Pallon A, Anggoro D T, Glow D, Lowe J, Zhou J, Mohammadi O, Puukko T, Albert A, Lang H, Ernst D, Kollist H, Brosche M, Durner J, Borst J W, Collinge D B, Karpinski S, Lyngkjaer M F, Robatzek S, Wrzaczek M, Kangasjarvi J. Large-scale phenomics identifies primary and fine-tuning roles for CRKs in responses related to oxidative stress. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005373.
- [12] Xu X, Yu T, Xu R, Shi Y, Lin X, Xu Q, Qi X, Weng Y, Chen, X. Fine mapping of a dominantly inherited powdery mildew resistance major-effect QTL, Pm1.1, in cucumber identifies a 41.1 kb region containing two tandemly arrayed cysteine-rich receptor-like protein kinase genes. *Theor Appl Genet*, 2016, 129: 507–516.
- [13] Yeh Y, Chang Y, Huang P, Huang J, Zimmerli L. Enhanced *Arabidopsis* pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like kinases. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 322.
- [14] Lee D S, Kim Y C, Kwon S J, Ryu C, Park O K. The *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase CRK36 regulates immunity through interaction with the cytoplasmic kinase BIK1. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1856.
- [15] Chen K, Fan B, Du L, Chen Z. Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2004, 56: 271–283.
- [16] Acharya B R, Raina S, Maqbool S B, Jagadeeswaran G, Mosher S, Appel H M, Schultz J C, Klessig D F, Raina R. Overexpression of CRK13, an *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant J*, 2007, 50: 488–499.
- [17] Chen K, Du L, Chen Z. Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2003, 53: 61–74.
- [18] Ederli L, Madeo L, Calderini O, Gehring C, Moretti C, Buonaurio R, Paolocci F, Pasqualini S. The *Arabidopsis thaliana* cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 1784–1794.
- [19] Chern M, Xu Q, Bart R, Bai W, Ruan D, Szeto W H, Canlas P E, Jain R, Chen X, Ronald P C. A genetic screen identifies a requirement for cysteine-rich-receptor-like kinases in rice NH1 (OsNPR1)-mediated immunity. *PLoS Genet*, 2016, 12: e1006049.
- [20] Rayapuram C, Jensen M K, Maiser F, Shanir J V, Hornshøj H, Rung J H, Gregersen P, Schweizer P, Collinge D B, Lyngkjaer M F. Regulation of basal resistance by a powdery mildew-induced cysteine-rich receptor-like protein kinase in barley. *Mol Plant Pathol*, 2012, 13: 135–147.
- [21] Liu R H, Meng J L. MapDraw: a microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data. *Hereditas*, 2003, 25: 317–321.
- [22] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876–4882.
- [23] 蒋锐. 马铃薯晚疫病广谱抗性 QTL dPI09c 的精细定位及抗性基因克隆. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2017.
Jiang R. Fine Mapping, Cloning and Function Dissection of the Gene Conferring Durable Late Blight Resistance of QTL dPI09c in Potato. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [24] 巩樵, 甘晓燕, 张丽, 陈虞超, 聂峰杰, 石磊, 郭志乾, 宋玉霞. 马铃薯 *StNAC72* 基因克隆及表达分析. *分子植物育种*, 2016, 14: 2589–2595.
Gong L, Gan X Y, Zhang L, Chen Y C, Nie F J, Shi L, Guo Z Q, Song Y X. Cloning and function analysis of the *StNAC72* gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Mol Plant Breed*, 2016, 14: 2589–2595 (in Chinese with English abstract).
- [25] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [26] Miyakawa T, Miyazono K, Sawano Y, Hatano K, Tanokura M. Crystal structure of ginkbilobin-2 with homology to the extracellular domain of plant cysteine-rich receptor-like kinases. *Proteins*, 2009, 77: 247–251.
- [27] Xu G, Guo C, Shan H, Kong H. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 1187–1192.
- [28] Xu W R, Yu Y H, Ding J H, Hua Z Y, Wang Y J. Characterization of a novel stilbene synthase promoter involved in pathogen- and stress-inducible expression from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Planta*, 2010, 231: 475–487.
- [29] Rushton P J, Torres J T, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich I E. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J*, 1996, 15: 5690–5700.
- [30] Diazdeleon F, Klotz K L, Lagrimini L M. Nucleotide sequence of the tobacco (*Nicotiana tabacum*) anionic peroxidase gene. *Plant Physiol*, 1993, 101: 1117–1118.
- [31] Urao T, Yamaguchishinozaki K, Urao S, Shinozaki K. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 1993, 5: 1529–1539.
- [32] Yamaguchishinozaki K, Shinozaki K. *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive *rd29* genes. *Plant Physiol*, 1993, 101: 1119–1120.
- [33] White A J, Dunn M A, Brown K, Hughes M A. Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley. *J Exp Bot*, 1994, 45: 1885–1892.
- [34] Vidhyasekaran P. Plant hormone signaling systems in plant innate immunity. Dordrecht: Springer, 2015. pp 1–458.