

胡祥祥, 许 姣, 宋梦瑶, 等. 红花 *CDPK* 基因家族的鉴定及表达分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(4): 39–46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.04.006

红花 *CDPK* 基因家族的鉴定及表达分析

胡祥祥¹, 许 姣^{1,2}, 宋梦瑶^{1,2}, 朱昀昊^{1,2}

(1. 河南中医药大学药学院, 河南郑州 450046; 2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 河南郑州 450046)

摘要:钙依赖性蛋白激酶(CDPK)是植物细胞内 Ca^{2+} 信号识别及转导的重要媒介,在植物的生长发育以及逆境响应过程中起着重要的作用。本研究通过多种生物信息学的方法和手段,对鉴定出来的 30 个 *CDPK* 基因进行分析鉴定,结果显示 30 个 *CtCDPK* 基因所编码的氨基酸分子量为 47 781.96 ~ 93 251.66 ku,等电点为 5.09 ~ 9.27;基因结构预测结果表明,所有 *CtCDPK* 基因均含有 6 ~ 13 个外显子;染色体定位结果表明,30 个 *CtCDPK* 基因分别定位在 10 条染色体上,其中 8 号染色体上最多,有 5 个,2 号、4 号染色体上没有;系统发育树分析结果显示将其分为 6 个亚家族;表达分析结果表明 *CtCDPK* 基因在不同组织、不同发育阶段中表达模式有所差异。

关键词:红花;*CDPK* 基因家族;生物信息学分析;表达分析;染色体定位

中图分类号:S567.21+9.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)04-0039-07

Ca^{2+} 作为第二信使,负责协调植物对内外界各种刺激的感知,在植物体内多种信号途径传导过程中起重要作用。钙信号感应器识别 Ca^{2+} 浓度变化,将信号传递至下游级联系统,激活植物逆境响应机制。钙依赖蛋白激酶(CDPK)是 *CDPK-SnRK* 超家族的主要成员^[1],广泛存在于植物和一些原生生物中,具有典型的丝氨酸和苏氨酸激酶结构域及 EF-hand 结构域,在植物生长和发育、激素信号传导中发挥重要作用^[2]。研究表明,*CDPK* 在植物中主要以器官分布为主,且参与植物生长发育的大部分过程,如细胞骨架建成、气孔运动、以及生物与非生物胁迫响应等^[3-5]。此外,*CDPK* 还参与植物细胞内其他的信号通路,如脱落酸(ABA)信号通路、茉莉酸信号通路、水杨酸合成途径等等^[6]。目前,已有研究对许多植物的全基因组水平进行 *CDPK* 及相关基因家族鉴定。

红花(*Carthamus tinctorius* L.)是菊科红花属植物,一种重要的草本植物,以花入药,有活血化瘀之功效。红花种子含油率为 20% ~ 40%,平均亚油酸

含量高于 75%,素有“亚油酸之王”的美誉,同时还含有丰富的维生素和人体必需的氨基酸^[7]。红花喜欢温暖、干燥的气候,较一般植物有着较强的抗寒能力。但是红花对栽培条件要求较高,抗旱怕涝,这也是目前影响红花产业发展的一个重要因素。然而,对于 *CDPK* 基因家族是否介导红花生长发育的调控目前尚无研究报道。

本研究通过对红花全基因组数据库的搜索,筛选出 *CDPK* 基因家族成员,通过构建系统进化树、染色体定位、基因组比较等生物信息学方法,分析 *CDPK* 基因的进化关系,以期探究红花 *CDPK* 基因家族功能奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 红花 *CDPK* 基因家族的鉴定

分别从红花基因组数据库(<http://safflower.scu.ec.edu.cn>)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)数据库 TAIR(<https://www.arabidopsis.org/>)下载红花的 30 个 *CDPK* 基因蛋白序列以及拟南芥 21 个 *CDPK* 基因的蛋白序列,进行本地 BLASTp 比对,得到最佳比对结果,通过 Pfam 和 CDD 在线工具对得到的序列进行结构域确认,选择同时含有 CDPK 蛋白典型结构域的蛋白序列,利用在线工具 ExPasy ProtParam 对 *CtCDPK* 蛋白的分子量、等电点(pI)等进行分析。利用 GPS-Lipid 网站预测 N-豆蔻酰化和十六烷酰化的位点。利用 CELLO V2.5 网站预测红花 *CDPK* 蛋白的亚细胞定位信息。

收稿日期:2022-03-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:81603232);国家重点研发计划(编号:2017YFC1702800);河南省重大科技专项(编号:171100310500);河南省科技攻关项目(编号:172102310539)。

作者简介:胡祥祥(1999—),女,河南信阳人,硕士研究生,主要从事药用植物分子生物研究。E-mail:212725252@qq.com。

通信作者:朱昀昊,博士,副教授,主要从事药用植物分子生物研究。

E-mail:guxinhan123@163.com。

1.2 红花 CDPK 基因家族染色体定位

利用 Perl 程序从红花基因组注释信息中获得得到 *CtCDPK* 基因的染色体位置信息,之后利用 MapChart 软件构建红花染色体定位图。

1.3 系统进化树的构建与分析

利用从拟南芥数据库 TAIR 下载 21 个 *AtCDPK* 蛋白序列,运用 MEGA 7.0 软件,将下载的 21 个 *ATCDPK* 蛋白与鉴定得到的 30 个 *CtCDPK* 蛋白进行序列比对,通过邻接法构建系统进化树^[8]。

1.4 基因结构和保守基序、保守结构域分析

根据红花基因组注释信息 GFF 文件中 *CDPK* 基因的外显子和内含子位置信息,利用 GSDS 网站 (<http://gsds.gao-lab.org/>) 绘制红花 *CDPK* 基因结构图。利用 MEME 在线网站 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对红花 *CDPK* 蛋白序列保守基序进行分析。

1.5 顺式作用元件预测

利用 TBTools 提取红花 *CtCDPK* 基因家族成员密码子上游 1 500 bp,然后提交到 PlantCARE 数据库预测顺式作用元件,然后利用 GSDS 网站绘图。

1.6 蛋白互作网络分析

将红花 *CDPK* 蛋白序列导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>),建立蛋白互作网络 (protein-protein interaction networks, PPI),将结果保存为 TSV 文件,然后通过 Cytoscape 软件将 PPI 网络可视化。

1.7 红花 CDPK 基因家族表达模式分析

从 NCBI 数据库分别下载红花 3 个部位:叶、花瓣、种子 (PRJNA76135) 上传于 2011 年 10 月 29 日的高通量测序原始数据;5 个时期:小芽期、中芽期、初花期、盛花期、烂花期 (PRJNA774916) 上传于 2021 年 10 月 27 日的高通量测序原始数据,利用 NCBI SRA Toolkit 将测序数据 sra 文件转换为 fasta 文件,利用转录组定量工具 Kallisto 计算 TPM,将其作为基因表达量,利用 Tbttools 将结果可视化。

2 结果与分析

2.1 红花 CDPK 基因家族的理化性质分析

根据鉴定筛选结果在红花中共获得 30 个 *CDPK* 基因家族成员,并依次命名为 *CtCDPK1* ~ *CtCDPK30* (表 1)。随后通过对红花 *CDPK* 蛋白基因家族进行分子量及等电点的理化性质分析,分析结果表明,其中最长的 *CtCDPK16* 编码 855 个氨基

酸,分子量为 93 251.66;最短的 *CtCDPK12* 编码 418 个氨基酸,分子量为 47 781.96。30 个 *CDPK* 蛋白家族等电点介于 5.09 ~ 9.26 之间,大部分蛋白等电点小于 7。亚细胞定位结果表明,大部分成员定位在叶绿体和细胞质中,小部分定位在线粒体等其他地方。与此同时,大部分基因家族成员 N 端并没有发现豆蔻酰化保守序列位点,但是均有十六烷酰化的保守序列位点。

2.2 染色体定位分析

由红花 *CDPK* 基因在染色体上的位置分布 (图 1) 可知,*CtCDPK* 基因在各条染色体上分布不均匀,除 2 号、4 号染色体上没有分布外,其余 10 条染色体上均有分布,在 8 号染色体上分布数量最多,有 5 条;在 5 号染色体上只分布 1 条。

2.3 系统进化分析

通过 MEGA 构建红花与拟南芥 *CDPK* 基因家族进化树。参照拟南芥 *CDPK* 分组情况,可将所有的 *CDPK* 基因分成 6 类 (I ~ VI)。第 I 组家族成员最多,并且红花 *CtCDPK* 家族成员主要集中在此家族,有 8 个拟南芥 *CDPKs* 和 19 个红花 *CDPKs*;第 III 组的数量最少,包含 1 个红花 *CDPKs* (图 2)。

2.4 红花 CDPK 基因家族结构特征

根据全基因组注释信息中基因的内含子、外显子信息,绘制红花 *CtCDPK* 基因家族成员基因结构图,结果 (图 3 - C) 显示,*CtCDPK* 基因内含子数量在 5 ~ 13 个之间,外显子数量在 6 ~ 13 个之间,含有内含子数最少的是 *CtCDPK12*,含有 5 个内含子,内含子数量最多的是 *CtCDPK16*,含有 14 个内含子,并且 *CtCDPK16* 所含外显子数量也是最多的,为 13 个,同一亚家族的外显子数量较为稳定。在同一个基因家族中,含有共同 motif 的成员有可能功能相似,使用 MEME 在线软件来识别它们的保守基序,结果 (图 3 - B) 显示,motif2、motif1、motif5、motif4、motif12、motif7、motif9 存在于每个家族成员,这些 motif 构成了 *CDPK* 基因典型的结构域,motif3 存在于除 *CtCDPK29* 外的每个家族成员;motif6 存在于除 *CtCDPK4*、*CtCDPK18*、*CtCDPK1* 外的所有成员;同时,只有 *CtCDPK6*、*CtCDPK2* 和 *CtCDPK29* 不含 motif8,且 *CtCDPK29* 也不含 motif10,除此之外,*CtCDPK12* 和 *CtCDPK13* 既不含 motif10 也不含 motif11。同一亚家族的成员,结构相似。

2.5 顺式作用元件分析

根据 PlantCARE 数据库预测顺式作用元件,GSDS

表 1 红花 *CtCDPK* 基因家族蛋白理化性质

基因名称	基因 ID	氨基酸长度 (aa)	分子量 (ku)	pI	亲水指数	亚细胞 定位	豆蔻酰化	十六烷 酰化
<i>CtCDPK1</i>	CtAH01T0057900	594	67 802.17	9.26	-0.600	叶绿体	Yes	Yes
<i>CtCDPK2</i>	CtAH01T0231500	470	52 958.89	5.85	-0.595	叶绿体	No	Yes
<i>CtCDPK3</i>	CtAH03T0004100	513	57 526.76	7.20	-0.480	叶绿体	Yes	Yes
<i>CtCDPK4</i>	CtAH03T0142300	551	62 356.69	9.27	-0.637	叶绿体	No	Yes
<i>CtCDPK5</i>	CtAH03T0201500	484	53 906.74	5.51	-0.536	细胞质	Yes	Yes
<i>CtCDPK6</i>	CtAH05T0158700	539	60 436.51	6.47	-0.421	线粒体	No	Yes
<i>CtCDPK7</i>	CtAH06T0039900	624	69 432.96	5.85	-0.477	叶绿体	No	Yes
<i>CtCDPK8</i>	CtAH06T0040500	608	67 883.54	5.72	-0.400	叶绿体	No	Yes
<i>CtCDPK9</i>	CtAH06T0095800	517	57 745.14	5.43	-0.349	叶绿体	No	Yes
<i>CtCDPK10</i>	CtAH06T0233500	541	61 446.72	5.88	-0.459	叶绿体	No	Yes
<i>CtCDPK11</i>	CtAH07T0078700	516	58 613.79	5.75	-0.576	细胞质	Yes	Yes
<i>CtCDPK12</i>	CtAH07T0251100	418	47 781.96	8.44	-0.359	线粒体	Yes	Yes
<i>CtCDPK13</i>	CtAH07T0251200	452	51 407.27	8.09	-0.455	线粒体	No	Yes
<i>CtCDPK14</i>	CtAH08T0084800	553	61 789.34	5.49	-0.391	细胞质	No	Yes
<i>CtCDPK15</i>	CtAH08T0102500	623	69 695.08	5.61	-0.395	细胞质	No	Yes
<i>CtCDPK16</i>	CtAH08T0165500	855	93 251.66	7.96	-0.384	叶绿体	Yes	Yes
<i>CtCDPK17</i>	CtAH08T0226900	529	60 465.18	5.72	-0.484	细胞质	No	Yes
<i>CtCDPK18</i>	CtAH08T0264000	538	59 373.87	6.34	-0.367	内质网	Yes	Yes
<i>CtCDPK19</i>	CtAH09T0103800	495	55 998.07	5.53	-0.364	叶绿体	No	Yes
<i>CtCDPK20</i>	CtAH09T0145300	526	59 179.39	5.79	-0.451	细胞质	Yes	Yes
<i>CtCDPK21</i>	CtAH09T0296300	546	61 569.84	6.00	-0.595	细胞质	No	Yes
<i>CtCDPK22</i>	CtAH10T0010200	533	60 015.41	5.79	-0.442	细胞质	No	Yes
<i>CtCDPK23</i>	CtAH10T0034300	530	59 608.24	5.99	-0.404	内质网	No	Yes
<i>CtCDPK24</i>	CtAH10T0251100	572	63 432.21	5.46	-0.362	细胞质	No	Yes
<i>CtCDPK25</i>	CtAH11T0103800	537	61 140.78	6.68	-0.443	细胞质	No	Yes
<i>CtCDPK26</i>	CtAH11T0184100	592	66 498.53	5.86	-0.387	液泡	No	Yes
<i>CtCDPK27</i>	CtAH11T0196300	542	61 817.71	6.53	-0.485	细胞质	No	Yes
<i>CtCDPK28</i>	CtAH11T0240500	558	62 297.94	5.98	-0.382	细胞质	No	Yes
<i>CtCDPK29</i>	CtAH12T0022400	500	54 785.53	5.09	-0.136	细胞核	No	Yes
<i>CtCDPK30</i>	CtAH12T0095300	514	57 797.14	5.98	-0.450	细胞质	No	Yes

网站的绘图结果表明,在多数 *CtCDPK* 基因中出现频率最高的顺式作用元件是光响应元件,有 25 种,包括 G - Box、G - box、Box 4、GT1 - motif、TCT - motif、GA - motif、I - box 等,由此推测 *CtCDPK* 在红花响应光调控过程中发挥重要作用。此外还有胁迫响应元件、激素应答响应元件、生长发育响应元件,其中胁迫响应元件主要有厌氧诱导 (ARE)、防御与应激 (TC - rich repeats)、干旱诱导 (MBS)、低温响应 (LTR)、损伤响应 (WUN - motif) 等 5 种,表明含有这些响应元件的基因可能会在受到胁迫的情况下提高植物的抗逆性,其中 LTR 主要存在于 *CtCDPK14* 中;WUN - motif 只存在于 *CtCDPK11* 中;

激素应答响应元件及生长发育响应元件出现频率比较低,只能在少数 *CtCDPK* 基因中预测到。

2.6 红花 *CDPK* 基因家族蛋白互作网络

如图 5 所示,红花 CDPK 蛋白之间以及与其他如 ABF1、OZS1、XLG2、ABF4 等蛋白间存在较强的关联,其中尤其是与 XLG2 蛋白关联最强。根据互作网络节点大小可以直观地看出核心蛋白除上述关联性较强的蛋白之外还有 AT4G34150、*CtCDPK28*、*CtCDPK21*、*CtCDPK23* 等。XLG2 蛋白属于 G - alpha 超家族,作为对触发水杨酸 (SA) 途径的病原体抗性的正调节剂。ABF1 鉴定为与脱落酸反应元件结合的蛋白质,可能介导 ABA 反应的转录

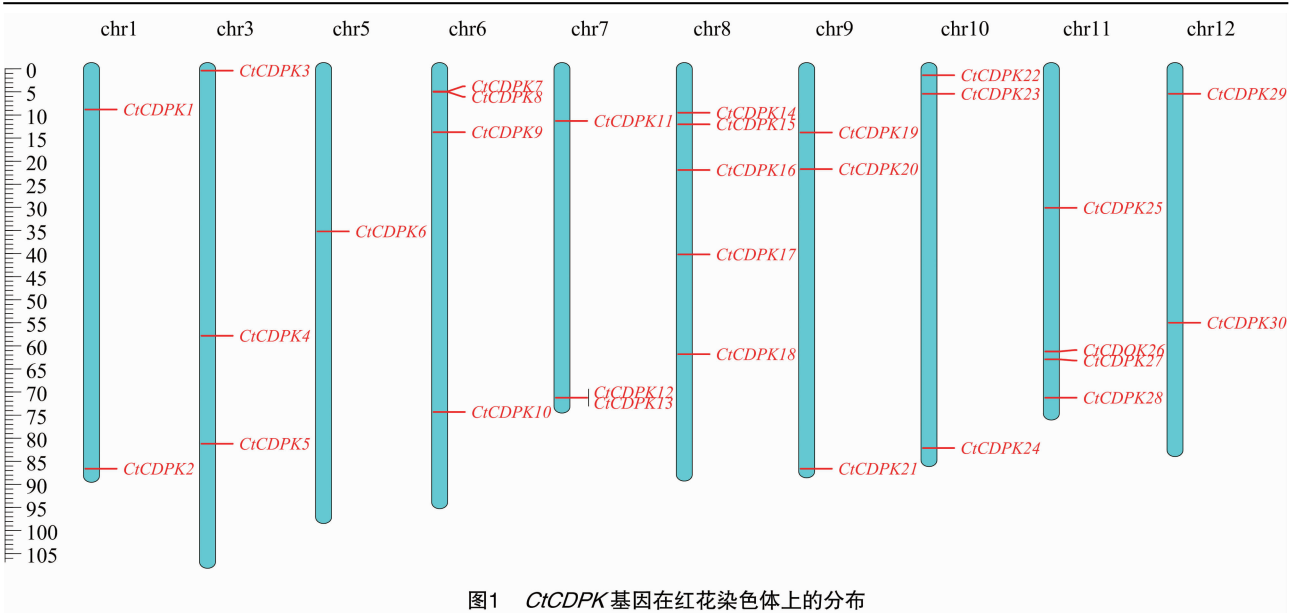


图1 *CiCDPK* 基因在红花染色体上的分布

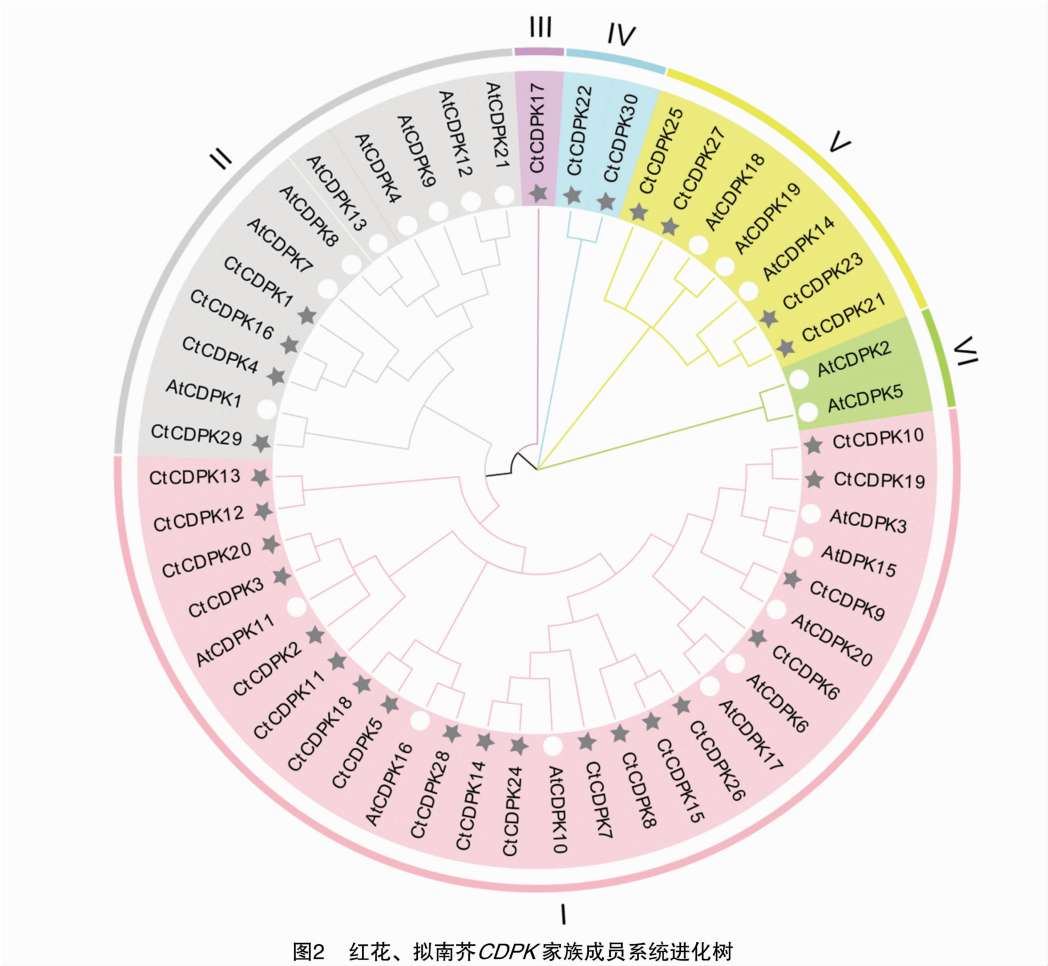


图2 红花、拟南芥 *CDPK* 家族成员系统进化树

调控,属于 bZIP 家族,能够与 rd29B 基因启动子的 ABA 反应元件特异性结合。拟南芥 *CDPK* 基因家族中的 AT5G66210.1 作为协调茎伸长和血管发育的发育控制调节剂,与之对应的 *CiCDPK1*、

CiCDPK4、*CiCDPK16* 均有此作用。此外,*CiCDPK19*、*CiCDPK23* 均与 ABF4 互作,作为钙介导的脱落酸信号通路的调节剂。

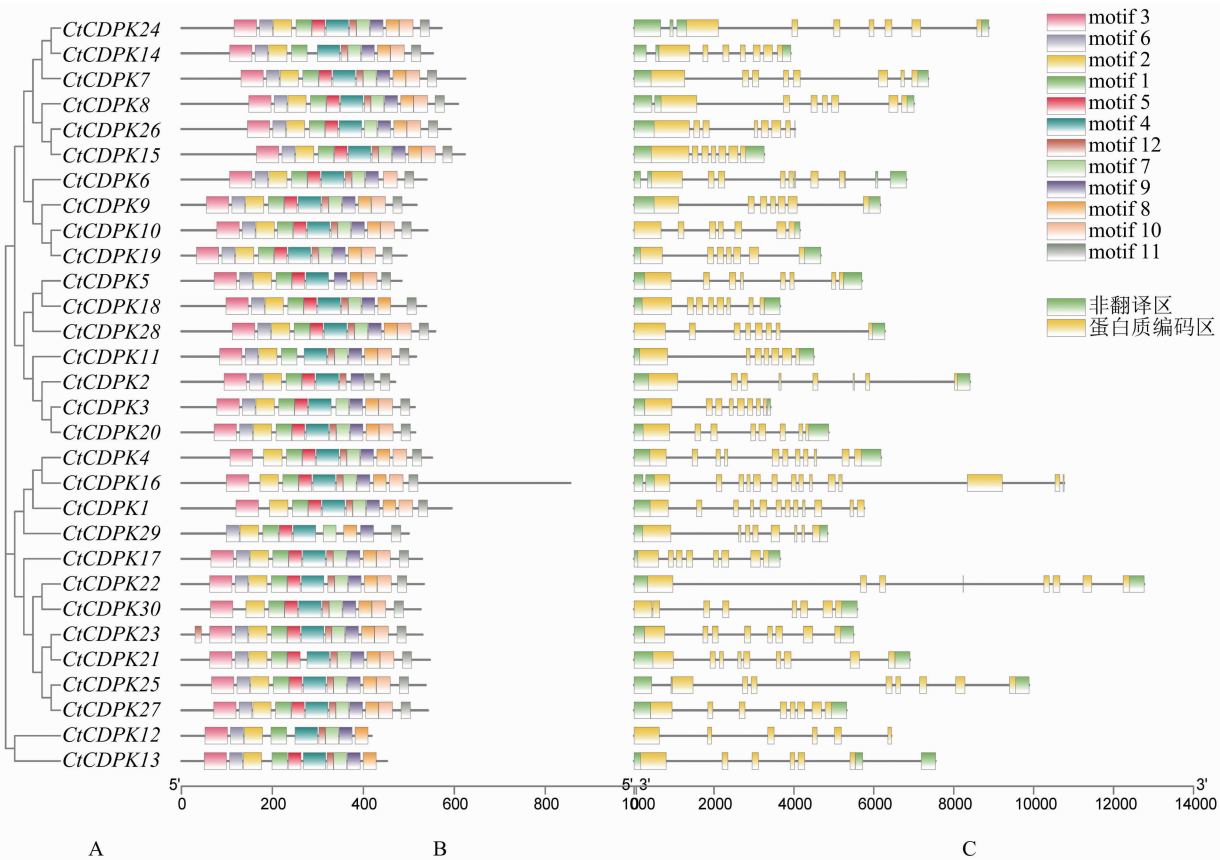


图3 红花 CDPK 基因家族进化树(A)、基序(B)和基因结构(C)

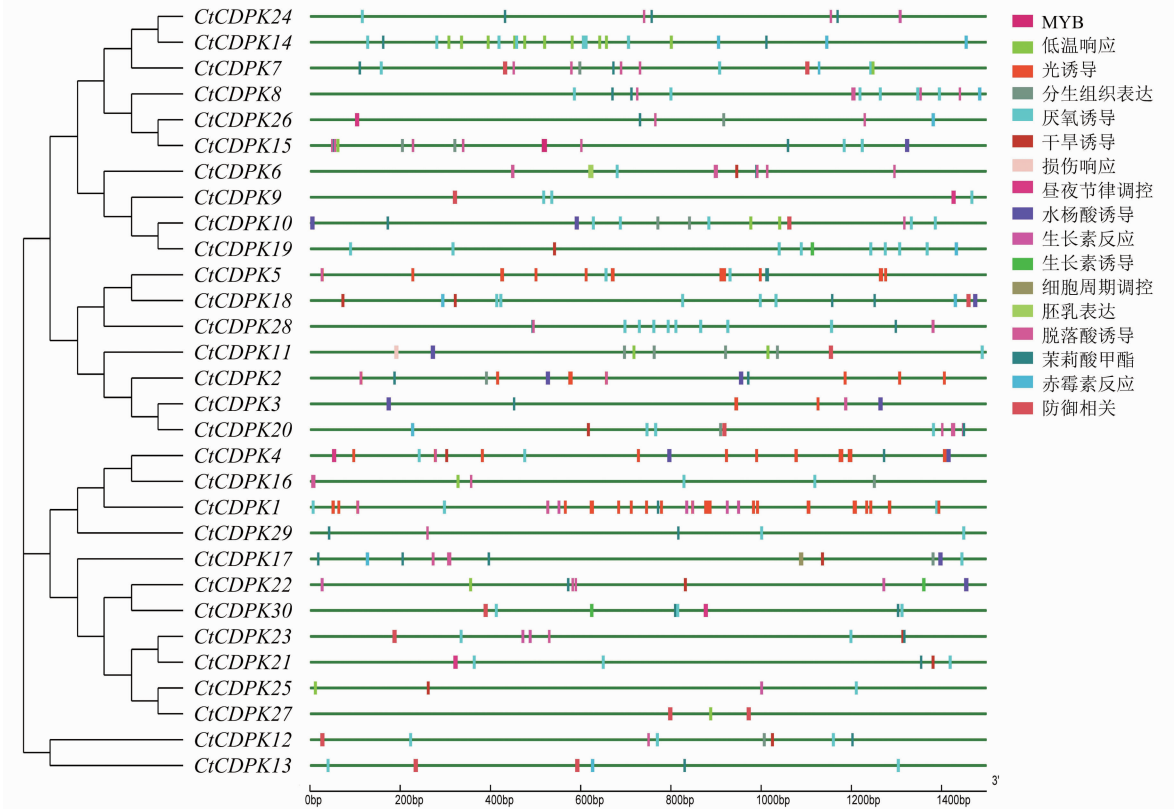


图4 红花 CDPK 基因的顺式作用元件分布

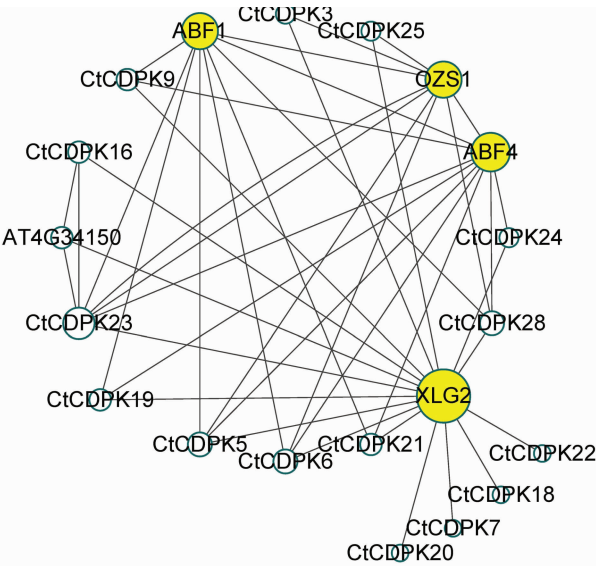


图5 红花 CDPK 基因的蛋白互作网络

2.7 红花 CDPK 基因家族表达模式分析

根据 Tbtools 的结果(图 6),对 *CiCDPK* 基因在 3 个不同组织部位中(种子、叶、花瓣)的表达模式进行分析,发现只有 *CiCDPK12* 未在任一组织中检测到,大部分 *CiCDPK* 基因都可以在 3 种不同的组织中被检测到。其他该家族基因的表达模式也不相同,一些 *CiCDPK* 基因在 3 个不同组织中都有着较

高的表达量,如 *CiCDPK2*、*CiCDPK4*、*CiCDPK23*、*CiCDPK24*,说明这些 *CiCDPK* 基因在红花的生长发育过程中有着不可替代的作用,还有一些 *CiCDPK* 基因只在 1 种组织中表达,具有表达特异性,如 *CiCDPK18*、*CiCDPK27* 只在红花花瓣中表达;此外, *CiCDPK1*、*CiCDPK5* 和 *CiCDPK29* 只在叶和花瓣中表达,在种子中不表达,表明这 3 个基因家族成员调控红花的叶和花瓣的发育,在红花叶和花瓣的发育过程中有一定的调控作用,但还需要进一步研究其功能机制。

根据 NCBI 不同发育阶段下的转录组数据对 *CiCDPK* 基因的表达量作图(图 6 - B),发现 *CiCDPK12* 在初花期及腐烂花期均不表达,在其他的生长发育阶段表达量比较低,而与此相反的是 *CiCDPK21*、*CiCDPK22*、*CiCDPK23*、*CiCDPK24* 这几个基因家族的成员在红花生长的任意阶段,无论是小芽期、中芽期、初花期、盛花期、腐烂花期的表达量都普遍高于其他家族成员,说明这几个成员对于调控红花的整个生长发育阶段有着比较重要的作用, *CiCDPK25* 在腐烂花期 - 1 阶段的表达量明显高于其他发育阶段,说明它在该阶段有特异性表达。

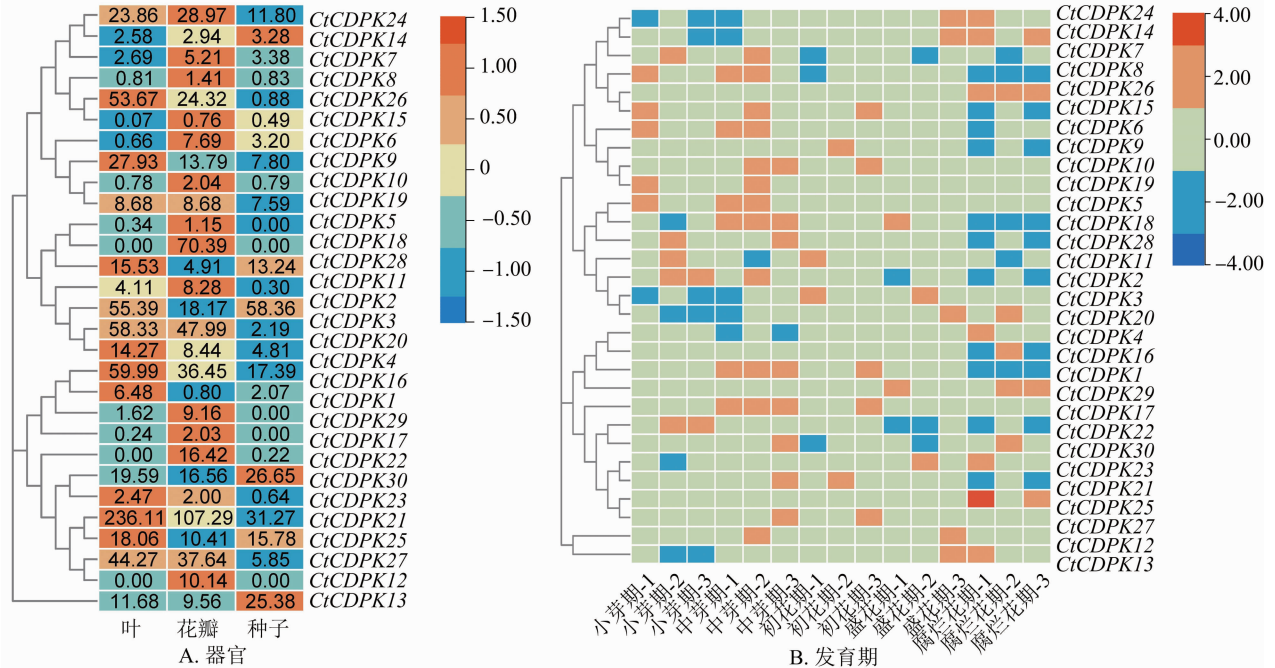


图6 红花 CDPK 基因在不同器官(A)、不同发育期(B)的表达分析

3 讨论与结论

红花作为一种常用的中药材,主要含红花黄色

素、红花甙、红花多糖等,可用于治疗闭经痛经、跌打损伤、心脑血管等疾病^[9],具有广阔的发展前景。*CDPK* 基因家族的身影在植物界中随处可见,二倍体

棉花基因组中鉴定出 41 个 *CDPK* 基因^[10], 辣椒 30 个^[11], 山核桃 25 个^[12], 杨树 30 个^[13], 葡萄 19 个^[14]。本研究从红花基因组中鉴定出 30 个 *CtCDPK* 基因家族成员, 进一步和拟南芥 *CDPK* 基因家族构建系统发育树, 共获得了 6 个亚家族, 6 个亚家族的成员大部分定位于叶绿体, 说明这些 *CtCDPK* 基因家族成员主要在叶绿体中和细胞质中发挥作用。对 *CtCDPK* 蛋白结构域进行分析, 发现所有的 *CtCDPK* 蛋白均含有典型结构域 Ser/Thr 蛋白激酶区, 该结构域也是 *CDPK* 蛋白的主要功能结构域^[15-16]。

自然界中有许多基因或蛋白参与植物生长发育的调控, 目前已有研究证明, 热激蛋白 HSP101 在非胁迫条件下会促进拟南芥开花, 这种促进过程取决于与开花相关基因 *FLC* 及 *SVP* 基因的表达^[17]。有关研究表明, 牡丹 *PI* 基因能够调控植物花器官的形成, 牡丹中 *PsPI* 基因在生殖器官中的表达相对于营养器官来说是高表达的, 花瓣中表达量最高^[18]。基因的表达模式可能与其功能特征相关, 而 *CDPK* 基因在不同植物组织中、不同发育期表达量差异显著, 其中 *CtCDPK12* 在红花的任意组织部位表达量为零, *CtCDPK18* 和 *CtCDPK27* 具有表达选择性, 只在花瓣中有一定的表达量, 在其他组织部位不表达, 在有些植物中也存在这种情况, 如玉米中的 1 个 *CDPK* 基因只在花粉中表达^[19]。

相关研究表明, *CDPK* 基因家族的成员主要参与植株生长和发育的调控, 对矮牵牛在花粉期表达的 2 种 *CDPK* 基因 *PiCDPK1* 和 *PiCDPK2* 的研究发现, 若二者均过量表达, 则前者影响花粉管的生长极性; 后者则抑制了花粉管的伸长能力^[20]。进一步研究表明, 在许多植物体内发现 *CDPK* 基因与抗氧化酶有密切的联系^[21], 酶在植物体内广泛分布, 参与植物的多种代谢途径, 研究结果表明, 玉米体内 *CDPK* 的过量表达, 能够明显提高超氧化物歧化酶和过氧化物酶的活性^[22], 从而加快植物的代谢过程。此外, *CDPK* 基因还能调节种子的萌发过程, 在蓖麻 (*Ricinus communis* L.) 种子早期发育过程中, *RcCDPK2* 的表达量先上升后下降^[23]。同时 *CDPK* 还参与对植物细胞骨架的调节以及对离子和水分跨膜转运的调节等^[24]。

CDPK 基因编码的蛋白质作为 Ca^{2+} 感受器, 贯穿植物的整个生命周期, 参与植物体内的各种生命活动。本研究基于红花基因组数据, 共鉴定出 30 个 *CtCDPK* 基因, 并通过生物信息学分析, 明确 30 个

CtCDPK 基因家族成员的基本信息, 包括进化关系、结构域及酰化位点、互作关系等, 本研究结果为后续深入探究 *CtCDPK* 基因的功能提供了思路。

参考文献:

- [1] Hrabak E M, Chan C W M, Gribskov M, et al. The *Arabidopsis* CDPK - SnRK superfamily of protein kinases[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 666 - 680.
- [2] Zhang K, Han Y T, Zhao F L, et al. Genome - wide identification and expression analysis of the *CDPK* gene family in grape, *Vitis* spp[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 164.
- [3] Cheng S H, Willmann M R, Chen H C, et al. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium - dependent protein kinase gene family[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 469 - 485.
- [4] Ludwig A A, Romeis T, Jones J D G. CDPK - mediated signalling pathways; specificity and cross - talk[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(395): 181 - 188.
- [5] Harmon A C, Gribskov M, Harper J F. CDPKs - a kinase for every Ca^{2+} signal? [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(4): 154 - 159.
- [6] 余琴莺, 尹恒, 安利佳, 等. 谷子逆境应答相关的钙依赖蛋白激酶基因 *SiCDPK1* 的克隆与表达[J]. *作物学报*, 2014, 40(9): 1531 - 1539.
- [7] 谷卫彬, 黎大爵. 世界红花种植的籽油脂脂肪酸组分评价[J]. *植物与资源学报*, 2002, 11(1): 17 - 19.
- [8] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870 - 1874.
- [9] 瞿城, 乐世俊, 林航, 等. 红花化学成分研究[J]. *中草药*, 2015, 46(13): 1872 - 1877.
- [10] Liu W, Li W, He Q L, et al. Genome - wide survey and expression analysis of calcium - dependent protein kinase in *Gossypium raimondii*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98189.
- [11] 林欢, 段伟科, 周怡, 等. 辣椒 *CDPK* 基因家族的鉴定、进化与表达分析[J]. *核农学报*, 2021, 35(1): 7 - 17.
- [12] 赵娟, 朱凯凯, 范平桦, 等. 薄壳山核桃和山核桃 *CDPK* 基因家族的鉴定及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(3): 442 - 456.
- [13] 张进, 李建波, 刘伯斌, 等. 杨树 *CDPK* 基因家族的表达分析及功能预测[J]. *林业科学研究*, 2014, 27(5): 604 - 611.
- [14] Chen C J, Chen H, He Y H, et al. TBtools, a Toolkit for Biologists integrating various biological data handling tools with a user - friendly interface[J]. *bioRxiv*, 2018, DOI:10. 1101/289660.
- [15] Harper J F, Breton G, Harmon A. Decoding Ca^{2+} signals through plant protein kinases[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2004, 55: 263 - 288.
- [16] Harmon A C, Gribskov M, Gubrium E, et al. The CDPK superfamily of protein kinases[J]. *New Phytologist*, 2001, 151(1): 175 - 183.
- [17] Qin F, Yu B Z, Li W Q. Heat shock protein 101 (HSP101) promotes flowering under nonstress conditions[J]. *Plant Physiology*, 2021, 186(1): 407 - 419.

陈一帆,薛太强,陈思桥,等. 群结腐霉细胞壁降解酶的活性检测及基因表达分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(4):46-51.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.04.007

群结腐霉细胞壁降解酶的活性检测及基因表达分析

陈一帆^{1,2}, 薛太强², 陈思桥², 张金凤², 周冬梅², 魏利辉^{1,2}

(1. 江苏大学环境与安全工程学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014)

摘要:群结腐霉(*Pythium myriotylum*)是一种死体营养型病原菌,可侵染生姜引起茎基腐病,造成生姜产量损失,严重危害该产业发展。群结腐霉含有大量植物细胞壁降解酶(plant cell wall-degrading enzymes, PCWDEs),然而 PCWDEs 在群结腐霉侵染生姜过程中的功能和特性却鲜有报道。运用生物信息学手段预测群结腐霉细胞壁降解酶的种类和数量,并以生姜粉末和葡萄糖为碳源,比较菌丝生长的情况,利用转录组分析比较 PCWDEs 基因在不同碳源条件下的表达差异情况,同时对培养液中主要 PCWDEs 进行酶活检测。转录组数据显示,与葡萄糖培养基相比,生长在生姜粉末培养基上的群结腐霉中 12 个 PCWDEs 编码基因显著上调表达,利用 CAZymes 网站预测 PCWDEs 的底物主要为淀粉和纤维素;酶活检测发现,其中 α -葡萄糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶活性较高,分别降解淀粉和纤维素。结果表明,群结腐霉在生姜粉末上生长过程中的 PCWDEs 以淀粉降解酶和纤维素降解酶为主。

关键词:群结腐霉;植物细胞壁降解酶;转录组;酶活

中图分类号:S436.32 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)04-0046-06

生姜(*Zingiber officinale* Rosc.)是一种重要的经济作物,广泛种植于热带和亚热带地区^[1]。中国是世界上生姜栽培面积最大且生产总量最多的国家之一,也是全球生姜出口大国。由群结腐霉(*Pythium myriotylum*)侵染引起的生姜茎基腐病,是生姜主要病害之一^[2],对生姜产业造成了巨大的经济损失^[3-4]。该病害在生姜上的症状出现在地下根茎部位,表现为水渍状褐色病变,导致块茎腐烂、叶

片变黄,最终使生姜萎蔫和坏死^[5]。群结腐霉在世界各地都有分布,寄主范围广泛,除了生姜外还可以侵染花生等多种作物^[6]。

植物病原菌按营养摄取方式可分为 3 种类型:活体营养型、死体营养型和半活体营养型^[7]。活体营养型病原菌在其整个生命周期内从活的寄主细胞内摄取营养;死体营养型病原菌从死亡(或垂死)的寄主细胞中摄取营养;半活体营养型病原菌最初从活体寄主细胞摄取营养,然后转变为从死亡的寄主细胞中摄取营养。对 3 种类型病原菌分泌的植物细胞壁降解酶(plant cell wall-degrading enzymes, PCWDEs)数量进行比较发现,死体营养型病原菌中的 PCWDEs 数量最多;其次,半活体营养型病原菌,最少的是活体营养型病原菌^[7]。PCWDEs 主要包含 3 种碳水化合物活性酶(CAZymes),分别是糖苷水

收稿日期:2022-04-12

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-24-C-01)。

作者简介:陈一帆(1997—),男,浙江温州人,硕士研究生,主要从事生姜茎基腐病的研究。E-mail:13738370562@163.com。

通信作者:魏利辉,博士,研究员,博士生导师,主要从事蔬菜病害绿色防控研究。E-mail:weilihui@jaas.ac.cn。

[18]郑 赞,王吴宁,刘靖文,等. 牡丹花发育相关基因 *PsPI* 的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种,2021,19(7):2185-2192.

[19]Estruch J J, Kadwell S, Merlin E, et al. Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(19):8837-8841.

[20]Yoon G M, Dowd P E, Gilroy S, et al. Calcium-dependent protein kinase isoforms in petunia have distinct functions in pollen tube growth, including regulating polarity [J]. The Plant Cell, 2006, 18(4):867-878.

[21]麻 浩,王 爽,周亚丽. 植物中钙依赖蛋白激酶的研究进展[J]. 南京农业大学学报,2017,40(4):565-572.

[22]丁艳芬. 玉米 *ZmCPK11* 在 ABA 诱导的抗氧化防护中的功能分析[D]. 南京:南京农业大学,2012.

[23]Fedosejevs E T, Gerdis S A, Ying S, et al. The calcium-dependent protein kinase *RcCDPK2* phosphorylates sucrose synthase at Ser¹¹ in developing castor oil seeds [J]. The Biochemical Journal, 2016, 473(20):3667-3682.

[24]王娇韩,韩胜芳,李小娟,等. 钙依赖蛋白激酶(CDPKs)介导植物信号转导的分子基础[J]. 草业学报,2009,18(3):241-250.