DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04108

甘蓝型油菜 *SnRK* 基因家族生物信息学分析及其与种子含油量的关系

唐靖泉 王 南 高 界 刘婷婷 文 静 易 斌 涂金星 傅廷栋
沈金雄*

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 / 国家油菜工程技术研究中心, 湖北武汉 430070

摘 要: 蔗糖非发酵相关蛋白激酶(sucrose non-fermenting-1-related protein kinase, SnRK)是植物中广泛存在的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 它们参与调控植物的信号传导、逆境响应和种子生长等生物学过程。为了解析甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)中 *SnRK* 基因家族的性质及其对种子含油量的影响, 本研究对 *BnSnRK* 基因家族的系统进化、基因结构、蛋白质理化性质、保守基序、蛋白质二级结构、顺式作用元件和亚细胞定位预测等进行分析, 并通过候选基因关联分析、单倍型分析和 qRT-PCR 筛选影响种子含油量的 *BnSnRK* 基因。结果显示, 鉴定得到 92 个 *BnSnRK* 成员, 分为 3 个亚族, 分布于甘蓝型油菜 19 条染色体上, 亚族之间蛋白质理化性质差异显著。多数基因拥有 7~14 个外显子; 同一亚族的 motif 分布情况更相似。*BnSnRK* 家族主要在细胞质中表达, 蛋白质二级结构主要以 α -螺旋和不规则卷曲为主。关联分析筛选出与油菜种子含油量相关的 12 个家族成员, 基因 *BnaC02g10730D* 可能负向调控甘蓝型油菜种子含油量, 基因 *BnaA07g12290D*、*BnaA10g22850D*、*BnaA08g18050D*、*BnaC04g44390D* 可能正向调控甘蓝型油菜种子含油量。不同环境之间种子含油量差异显著, 且与含油量相关的 12 个成员均含有 MYB、MYC 和 ABA 响应元件, 环境特异的含油量关联基因可能与植物非生物胁迫响应相关。本研究为 *BnSnRK* 基因功能验证及育种工作提供了理论参考。

关键词: 甘蓝型油菜; 种子含油量; 蔗糖非发酵相关蛋白激酶; 关联分析; 生物信息分析

Bioinformatics analysis of *SnRK* gene family and its relation with seed oil content of *Brassica napus* L.

TANG Jing-Quan, WANG Nan, GAO Jie, LIU Ting-Ting, WEN Jing, YI Bin, TU Jin-Xing, FU Ting-Dong, and SHEN Jin-Xiong*

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement / National Engineering Research Center of Rapeseed, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: Sucrose non-fermenting-1-related protein kinase (SnRK) is a widely existed serine/threonine protein kinase in plants, which is involved in the regulation of biological processes such as signal transduction, stress response and seed growth. In order to explore the mechanism of the *SnRK* gene families and its influence on the seed oil content of *Brassica napus* L., *BnSnRK* gene family system evolution, gene structure, physical and chemical properties of protein, conservative motif, protein secondary structure, *cis*-element and subcellular localization prediction were analyzed, and *BnSnRK* genes affecting oil content of seeds were screened by candidate genes association analysis, haplotype analysis and qRT-PCR. The results showed that 92 *BnSnRK* members were identified and divided into three subgroups, distributed on 19 chromosomes of *Brassica napus* L. The physical and chemical properties of proteins were significantly different among subgroups. Most genes had 7–14 exons; the motifs of the same subfamily were more similar in distribution. The *BnSnRK* family was mainly expressed in the cytoplasm. 12 family members related to the oil content were screened out by association analysis in rapeseed. Genes *BnaC02g10730D* might negatively regulate seed oil content, while genes *BnaA07g12290D*, *BnaA10g22850D*, *BnaA08g18050D*, and *BnaC04g44390D* might positively regulate seed oil

本研究由国家自然科学基金项目(31871654)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (31871654).

* 通信作者(Corresponding author): 沈金雄, E-mail: jxshen@mail.hzau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 519736700@qq.com

Received (收稿日期): 2020-05-15; Accepted (接受日期): 2020-08-19; Published online (网络出版日期): 2020-09-08.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200907.1027.002.html>

content of *Brassica napus* L. There were significant differences in seed oil content under different environments, and 12 oil-related members all contained MYB, MYC and ABA response elements. Environment-specific oil-related genes might be related to plant abiotic stress response. This study provides a theoretical basis for *BnSnRK* gene functional verification and breeding.

Keywords: *Brassica napus*; seed oil content; sucrose non-fermenting-1-related protein kinase; association analysis; bioinformatics analysis

蔗糖非发酵相关蛋白激酶(sucrose non-fermenting-1-related protein kinase, SnRK)是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,这类蛋白激酶都包含1个典型的真核 Ser-Thr 激酶的催化结构域,广泛参与调控植物的生长发育。1998年,Halford和Hardie^[1]提出了 SNF1 (sucrose non-fermenting protein kinase 1)相关激酶(SnRK)的名称。它与酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中调控碳代谢的 SNF1 具有同源性和功能相似性^[2]。Harmon等^[3]基于序列相似性和结构域将其分成 SnRK1、SnRK2 和 SnRK3 三个亚组。研究表明,SnRK1 与糖、ABA 信号传导途径有关,并且在代谢调节中发挥核心作用^[4-5]。SnRK2 和 SnRK3 是植物特有的亚家族^[6],SnRK2 在植物对非生物胁迫和养分限制的反应中以 ABA 依赖和独立的方式发挥关键作用^[7-9],其分子机制已有报道^[10]。SnRK3 也称为钙调磷酸酶 B (calcineurin B-like protein, CBL)相互作用蛋白激酶(calcineurin B-like interacting protein kinase, CIPK),也参与 ABA 信号的转导和非生物胁迫响应^[11-13]。SnRK3 蛋白家族还参与多种生物胁迫反应,调节植物细胞内离子平衡,在植物生长发育中起到至关重要的作用^[14-15]。非生物胁迫反应功能可能影响脂质代谢,群体在适应环境时既要面临环境的威胁又要进行世代的传递,因此能量分配在两者之间发生调节,使群体更好地适应环境^[16]。在甘蓝型油菜和拟南芥中,不同拷贝的干旱反应基因 *LEA3* 和 *VOC* 过表达增强了耐旱性和油含量^[17]。

SnRK 在油脂调控中的功能研究仍处于起步阶段,酵母中 SNF1 家族是真核生物中参与脂质代谢和碳水化合物存储的调节剂之一,而且从酵母(SNF1)到植物(SnRK1)的进化上是保守的^[18]。哺乳动物 AMP 依赖性蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate(AMP)-activated protein kinase, AMPK)通过控制酶的磷酸化来抑制包括脂质的一些合成代谢过程,并激活脂肪酸分解氧化和糖酵解的代谢过程^[19]。酿酒酵母的 SNF1 激酶和哺乳动物 AMPK 与植物 *SnRKs* 同源。拟南芥中,SnRK1 能磷酸化 WR1,促进其降解,负调控油脂代谢^[20]。棉花 *GhCIPK6* 过表达植株与野生型相比,种子总油含量减少, $C_{18:1}$ 等含量增加^[21]。

在甘蓝型油菜中,过表达 *CIPK9* 其含油量显著低于野生型对照^[22]。因此 SnRK 家族可能在调控油脂代谢和能量平衡中发挥关键作用。本研究对甘蓝型油菜中 *SnRK* 基因家族进行了全面的比较分析,包括基因家族成员鉴定、理化性质分析、含油量相关成员鉴定和与白菜甘蓝之间的共线性等分析。这项研究是关于甘蓝型油菜中 *BnSnRK* 基因家族的首次报道,扩展了研究者对 *SnRK* 基因家族在结构、功能和进化中的理解。

1 材料与方法

1.1 甘蓝型油菜中 *SnRK* 基因家族成员的鉴定和进化树构建

本研究以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) SNRK 蛋白序列作为查询序列,对甘蓝型油菜(*Brassica napus*)基因组进行 BlastP 搜索与筛选,通过 tblastn 补充,手动去除冗余,并将候选蛋白序列逐一提交 NCBI 网站在线工具 Conserved Domain Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)进行结构域确认。提取 92 个 *SNRK* 基因家族成员的氨基酸序列,利用软件 MEGA 7.0,采用邻接法(Neighbor Joining)构建系统进化树,Bootstrap 值为 500,其他参数使用默认值。

1.2 甘蓝型油菜 *SnRK* 基因家族相关信息学分析

将基因 GFF3 注释文件与基因组序列导入软件 TBtools^[23]绘制外显子—内含子结构图。利用 MEME 在线工具(<http://meme-suite.org/tools/meme>)和 NCBI-CDD 数据库进行氨基酸保守基序分析。利用 ExPasy (<https://web.expasy.org/>)在线工具 ProtParam 分析蛋白理化特征。通过 SPSS 软件进行多重比较,利用 R 绘制箱线图。使用 WoLFPSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)在线工具预测亚细胞定位。利用 eggNOG (<http://eggnogdb.embl.de/#/app/emapper>)对 92 个甘蓝型油菜 *SnRK* 基因进行富集分析,选择 HMMER 算法和十字花科数据库进行注释,其他选项默认。使用 R 软件包 clusterProfiler 和 ggplot2 进行二级分类并绘制 GO 富集柱形图。采用 PRABI (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)分析蛋白二级结构;采用 plantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/>)

plantcare/html)分析启动子上游 3 kb 区域的顺式作用元件。

1.3 甘蓝型油菜 *SnRK* 基因家族与含油量性状的关联分析

530 份油菜材料的重测序基因型数据和江苏、湖北武汉、重庆 3 个地区的表型数据由华中农业大学油菜研究室郭亮教授提供,通过 SPAGedi 软件计算各材料间的亲缘关系,最后用 R 语言 mrMLM 软件包中 mrMLM 和 FASTmrMLM 方法进行关联分析。通过软件 SPSS 进行单倍型分析中的方差分析和多重比较。

1.4 基因家族成员在染色体上的分布和共线性分析

利用甘蓝型油菜 ‘damor-bzh’、拟南芥、白菜和甘蓝的基因组序列和 GFF3 注释文件,通过 MCscanX^[24]工具进行比对分析并利用 TBtools 软件作图。

1.5 qRT-PCR 验证分析

高油材料 P₁ 是华中农业大学油菜研究室选育的半冬性甘蓝型油菜新品系, P₂ 为一个来源于加拿大的春性甘蓝型油菜 DH 系,两者种子含油量平均值分别为 52.53%和 46.59%。亲本材料 P₁、P₂ 及其构建的 F₂ 分离群体中高、低油单株各 8 个衍生的 F_{2:3} 家系材料在 2017 年 10 月种植于华中农业大学油菜转基因基地试验田。高、低油材料开花 35 d 的种子含油量分别为 49.49%和 45.39%。表达量分析中,取开花后 15 d 和 35 d 的高低油材料角果,取其幼嫩种子进行检测,使用 NanoDrop 2000 超微量核酸检测仪检测 RNA 样品的质量与浓度。RNA 样品原液进行反转录(Prime ScriptTMRT reagent Kit, TaKaRa),按照试剂盒的使用标准步骤合成 cDNA 第 1 链。对关联分析筛选到的 12 个甘蓝型油菜含油量关联基因设计引物,依据 2^{-ΔΔCt} 方法分析基因的相对表达量。甘蓝型油菜内参基因为 *Actin*。样本间表达量用双尾 *t* 测验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜 *SnRKs* 成员鉴定及性质分析

在甘蓝型油菜中共鉴定出 92 个 *SnRK* 基因,其中 *SnRK1* 类成员 8 个, *SnRK2* 类成员 23 个, *SnRK3* 类成员 61 个(图 1),成员比例和 *SnRK* 基因家族在白菜中的比例相似^[25]。预测的氨基酸数在 285 (*BnaC06g38790D*)到 626 (*BnaA07g20630D*)范围内不

等,基因全长介于 858 bp (*BnaA06g22800D*)到 8540 bp (*BnaC01g16330D*)之间。*BnSnRK* 的理论等电点(pI)为 4.70~9.44,分子量为 32.31275~70.7989 kD。亚族间在分子量、等电点和氨基酸数上存在显著差异(附图 2)。

BnSnRK 所编码蛋白质的二级结构主要有 α -螺旋、 β -转角与不规则卷曲(附表 1),与前人研究结果相似^[26]。在 92 个编码蛋白中,主要是 α -螺旋(31.58%~45.50%)和不规则卷曲(29.95%~44.92%), β -转角较少(4.14%~12.56%),亚族间的蛋白质二级结构有显著差异。甘蓝型油菜中 *SnRK* 基因家族的分子功能主要体现在催化活性,涉及到的生物学过程主要包括应激响应、细胞过程和代谢过程(附图 3)。亚细胞定位预测(附图 1)表明,大部分 *BnSnRK* 成员在细胞核和细胞质中均会表达,所有 *BnSnRK1* 成员都预测到细胞核和细胞质中的定位信号。*BnSnRK3* 亚族定位预测明显区别于其他 2 个亚族,在叶绿体中有很高的表达参数。*BnSnRK2* 亚族在细胞骨架中有很高的表达参数。此外,与前人发现的 *SnRK3* 成员在膜系统上参与离子平衡的研究结果一致^[15,27],有部分 *BnSnRK* 基因也在内质网、质膜、液泡膜和线粒体中表达,以 *BnSnRK3* 亚族成员为主。

SnRK 基因家族在植物非生物胁迫应答反应和油脂调控中具有重要作用^[28-30]。对 *BnSnRK* 基因家族成员启动子上游 3 kb 区域的顺式作用元件进行分析,得到 9 种可能影响植物种子含油量的顺式作用元件(附图 4)。*BnSnRK* 所有成员中均有 MYB 类转录因子应答元件;除 *BnaA01g23120D* 和 *BnaC05g29370D* 外,其余基因中都有 MYC 类转录因子应答元件;除基因 *BnaA06g39390D*、*BnaA05g16720D* 和 *BnaC05g29370D* 外,ABA 响应元件存在于其他所有 *BnSnRK* 成员中。此外,53 个成员存在低温响应元件,44 个成员存在干旱响应元件。

基于 *BnSnRK* 氨基酸序列构建系统发育进化树并分析基因结构和保守基序发现, *SnRK3* 亚族部分成员只有 1 个或 2 个外显子,且极少有内含子, *SnRK1* 所有成员都具有 10 个外显子,说明 *SnRK1* 亚族的基因结构相对比较稳定。*SnRK2* 亚族成员的基因结构会随着其在进化树中表现出的聚类关系而相似,但整个亚族的外显子数量跨越了 7~14 的范围(图 2)。这些结果与前人研究结果相似^[31],即 *BnSnRK* 基因家族激酶结构域位于 N 端附近,中间是连接结构域, C 端是调节结构域(图 2)。进一步分析发现, *BnSnRK1*

图 1 基于 *BnSnRK* 的油菜种子含油量和脂肪酸组分的关联分析

Fig. 1 Association analysis of seed oil content and fatty acid components based on *BnSnRK* in rapeseed

图示为较宽松筛选条件下的关联分析结果汇总。点状标注共 8 层, 从内圈到外圈的表型为含油量、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、芥酸、花生烯酸。正方形标注表示 18 碳类脂肪酸组分。

The figure shows the summary of the association analysis results under the looser screening conditions. There were eight layers of dotted labeling, and the phenotypes from inner to outer circles in order were oil content, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, erucic acid, and arachidonic acid. The square label shows the composition of 18 carbon fatty acids.

的结构域十分保守, *BnSnRK2* 亚族的上游可能表现有 3 种, 而 *BnSnRK3* 成员最多, 但它的下游非常保守, 只有 CIPK_C 一种结构域, 上游存在 2 种结构域, 分别为 STKc_SnRK3 和 PKc_like superfamily (图 2)。92 条 *BnSnRK* 蛋白共预测到 61 个保守基序(附图 5)。其中 motif4、motif7、motif10、motif3、motif19、motif2、motif1 和 motif5 存在于 3 个亚族中, 具有非常高的保守性。3 个亚族保守基序的区别主要集中在蛋白质下游区域, 结合系统进化树可发现, 亲缘关系最近的 *BnSnRK* 蛋白具有更相似的保守基序构成。

2.2 *BnSnRK* 与含油量性状的关联分析

2.2.1 显著关联的 SNP 及其对应基因 对 5 个环境的表型数据和基因型数据进行分析, 设置阈值 $-\lg(P\text{-value}) = 4.11$, 共检测到 14 个与种子含油量

显著关联的 SNP 位点。这些标记对应 8 个甘蓝型油菜 *SnRK* 基因家族成员, 其中 2 个基因存在环境重复, 分别为 *BnaA07g12290D* 和 *BnaA10g22850D* (附图 6)。标记为 s7970 的位点表型贡献率最大, 为 12.95%, 对应基因为 *BnaA10g22850D* (表 1)。

2.2.2 单倍型分析 随后对环境重复基因进行单倍型分析, 将每个基因上的标记按位置顺序进行组合(表 1), 得到 *BnaA07g12290D* 的 4 个单倍型和 *BnaA10g22850D* 的 3 个单倍型。每个环境中含油量最高和最低的单倍型相同(附图 7), 基因 *BnaA07g12290D* 的单倍型 TAAC 拥有最高含油量, 平均值为 42.00%, 表型贡献率为 50.01%。基因 *BnaA10g22850D* 的单倍型 CTC 中含油量最高, 为 41.82% (附表 2), 表型贡献率为 50.00%。另外 *BnaA10g21470D*、*BnaA07g20630D*、*BnaA06g31030D*、

图 2 *BnSnRK* 基因家族代表性成员的系统进化树、CDD 保守结构和基因结构构成

Fig. 2 Phylogenetic tree, CDD conservative structures, and gene structures of representative members of *BnSnRK* gene family

BnSnRK 基因家族分为 3 个亚族, 红色区域为 *SnRK1* 亚族, 蓝色区域为 *SnRK2* 亚族, 黄色区域为 *SnRK3* 亚族。

The *BnSnRK* gene family are divided into three subfamilies; the red region represents *SnRK1* subfamily, the blue region represents *SnRK2* subfamily, and the yellow region represents *SnRK3* subfamily.

表 1 重复检测到的油菜种子含油量关联位点

Table 1 Repeatedly detected sites associated with seed oil content of rapeseed

基因名称 Gene name	环境 Environment	标记 Marker	染色体 Chromosome	LOD 值 LOD value	阈值 $-\log_{10}(P)$	表型贡献率 R^2 (%)	单倍型频率 Haplotype frequency
<i>BnaA07g12290D</i>	E2	s5667	A7	3.79	4.53	7.79	0.42
<i>BnaA10g22850D</i>	E2	s7970	A10	4.50	5.33	12.95	0.30
<i>BnaA07g12290D</i>	E4	s5664	A7	3.42	4.14	1.99	0.48
<i>BnaA07g12290D</i>	E4	s5675	A7	4.46	5.23	3.07	0.28
<i>BnaA10g22850D</i>	E4	s8059	A10	5.44	6.26	6.70	0.11
<i>BnaA10g22850D</i>	E4	s8018	A10	8.16	9.06	6.34	0.09
<i>BnaA07g12290D</i>	E5	s5674	A7	5.07	5.87	4.16	0.28

BnaA01g35110D、*BnaA03g17840D* 和 *BnaA03g10160D* 共 6 个基因具有环境特异性。采用 LSD 法对含油量表型进行方差分析发现, 5 个环境的含油量有显著差

异。这些基因可能在特异环境下才对种子含油量产生影响, 表明这些基因对种子含油量的贡献受环境影响。

2.2.3 脂肪酸组分关联分析 为筛选到更多与含油量相关的候选基因, 调低 *P*-value 的阈值至 $1e^{-3}$, 表型设为总含油量和重庆环境的脂肪酸组分, 筛选同时关联总含油量与组分的基因, 得到更多显著关联位点(图 1)。它们分别对应 11 个基因: *BnaA04g15530D*、*BnaA06g22800D*、*BnaA07g12290D*、*BnaA07g20630D*、*BnaA08g18050D*、*BnaA08g25520D*、*BnaA09g51540D*、*BnaC02g10730D*、*BnaC03g16860D*、*BnaC04g06790D*、*BnaC04g44390D*。

2.3 高低油材料中候选基因表达量的验证分析

为了解这些基因在甘蓝型油菜种子发育过程中的活跃程度, 本研究针对 *BnaA04g15530D*、*BnaA06g22800D*、*BnaA07g12290D*、*BnaA07g20630D*、*BnaA08g18050D*、*BnaA08g25520D*、*BnaA09g51540D*、*BnaC02g10730D*、*BnaC03g16860D*、*BnaC04g06790D*、*BnaC04g44390D* 和 *BnaA10g22850D* 共 12 个基因进行了表达量分析。12 个基因中, *BnaA07g12290D*、*BnaA08g18050D*、*BnaC02g10730D*、*BnaC04g44390D* 和 *BnaA10g22850D* 的 *t* 检验差异显著。相较于低油材料, 基因 *BnaC02g10730D* 在高油材料中的相对表达量为 0.235, 表达水平较低。基因 *BnaA07g12290D*、*BnaA10g22850D*、*BnaA08g18050D*、*BnaC04g44390D*

在高油材料中的表达量分别是低油材料的 2.854、1.769、4.429 和 116.705 倍(图 3-A)。值得注意的是, 除基因 *BnaA07g12290D* 和基因 *BnaA04g15530D* 在 2 个时期表现为不同的调控方向外, 其他基因在 2 个时期中对高低油材料的调控正负方向一致(图 3-B)。

2.4 *BnSnRK* 基因家族的同源共线性分析

BnSnRK 基因在 A 染色体组 1~10, C 染色体组 1~9 上都有分布, 另有 *BnaA01g35110D*、*BnaA04g28130D*、*BnaA05g34860D*、*BnaA06g39390D* 和 *BnaA10g29660D* 5 个基因注释到 Random 染色体上, 成员在染色体组上的分布没有按亚族分类明显聚集(附图 8)。在甘蓝型油菜基因组内, 共得到 119 个旁系同源基因对, 然而尚未发现 *BnSnRK* 中距离小于 100 kb 且覆盖度和比对相似性均>75%的串联重复基因。在 12 个候选基因中, 位于 A 染色体组上的数量是 C 染色体组的 2 倍(图 4-A)。

在甘蓝型油菜和甘蓝的基因组间共得到了 177 个 *BnSnRK* 共线基因对, 其中 112 个基因对位于 2 个物种间至少 50 个基因的大片段重复上。物种间包含较多基因对的同源片段主要存在于甘蓝的 C03、C01 和甘蓝型油菜的 ChrC03、ChrA01 中, 分别包含了 35、31、19 和 18 个 *BnSnRK* 家族的直系同源基

图3 含油量相关候选基因在甘蓝型油菜种子中的表达分析

Fig. 3 Expression levels of oil-related candidate genes in the seed of *Brassica napus*

A: qRT-PCR 分析 *BnSnRK* 基因家族中含油量相关候选基因在油菜幼嫩种子中的表达; B: 全部候选基因的相对表达。

A: expression of oil-related candidate genes of *BnSnRK* gene family in young seeds of rapeseed detected by qRT-PCR; B: relative expression of all candidate genes.

图 4 甘蓝型油菜 *SnRK* 基因家族同源比对图(A)及甘蓝、甘蓝型油菜和白菜 3 个物种的共线联合比对关系(B)

Fig. 4 Homologous comparison of *SnRK* gene family in *Brassica napus* (A) and collinear association of cabbage, *Brassica napus*, and Chinese cabbage (B)

A 图中浅蓝色背景线为甘蓝型油菜 *SnRK* 基因家族成员之间的共线性基因对, 彩色线条将可能与甘蓝型油菜种子含油量关联的基因成员高亮表示。B 图中灰色背景线代表全基因组中的共线性区块, 高亮线条代表 *BnSnRK* 基因家族成员在 3 个物种间的共线性关系。The light blue background line in figure A is a collinearity gene pair between *SnRK* gene family members of *Brassica napus*. The color line will highlight gene member that may be related to the seed oil content of *Brassica napus*. In figure B, the gray background line represents the collinear block in the whole genome, and the highlighted line represents the collinear relationship between the *BnSnRK* gene family members in three species.

因对(图 4-B)。在甘蓝型油菜和白菜的基因组间共得到了 187 个 *BnSnRK* 基因对, 其中 115 个基因对位于 2 个物种间至少 50 个基因的大片段重复上, 包含较多基因对的同源片段主要存在于白菜的 A01 和甘蓝型油菜 ChrA01、ChrA03、chrC03 染色体中, 包含了 32、18、18、18 个直系同源基因对。

3 讨论

3.1 甘蓝型油菜 *SnRK* 不同亚族间的比较

拟南芥 *SnRK* 3 个亚族的不同结构早在 2003 年就有报道^[31]。大多数 *SnRK2* 在细胞核和细胞质中均

能检测到定位信号, 而部分 *BnSnRK3* 亚族成员的亚细胞定位也证明其存在核或者质膜等其他位置^[12](附图 1)。已有研究表明, *SnRK* 家族成员的磷酸化作用是其他蛋白质进入细胞核的关键^[32]。保守结构域分析表明, *BnSnRK* 存在一些亚族特异的保守基序, 如 motif23、motif25 和 motif14 等仅出现在 *BnSNRK2* 亚族。可以推测, 这些亚族特异的保守基序可能与亚族共有的核导入识别等特征无关, 它们更可能参与到每个亚族独特的互作蛋白等的结合中。3 个亚族的结构域在蛋白质 N 端相对保守, 而在 C 端明显因亚族分类而变化, 同一亚族的保守结构域和基因

结构更相似(图2)。基因家族之间的基因结构与理化性质存在不同,是由于基因家族在进化过程中为了更好地适应环境而作出的结构和性质的变化^[33-34]。

3.2 BnSnRK 的进化

甘蓝型油菜在大约7500年前形成,经白菜和甘蓝杂交后染色体加倍^[35]。油菜中 *BnSnRK* 成员的同源基因数量都小于6,和 Chalhoub 等^[35]报道的拟南芥基因在甘蓝型油菜中普遍存在2~6个直系同源基因的研究结果一致。该基因家族在甘蓝型油菜中不存在串联重复,分别有63.28%和61.50%的物种间共线基因对来自于白菜和甘蓝基因组上>50个基因的片段重复。在92个 *BnSnRK* 成员中,77个来自于上述大片段重复,占家族成员的83.70%。在关联分析结果中,属于 *BnSnRK3* 亚族的基因 *BnaA08g18050D*、*BnaC02g10730D*、*BnaC03g16860D*、*BnaC04g06790D*、*BnaC04g44390D* 仅有1个外显子。研究者在白菜中也发现了22个 *BrSnRK3* 基因没有内含子^[25]。拟南芥中众多 *SnRK* 是基因组复制事件后产生的旁系同源物^[31]。而甘蓝型油菜中, *BnSnRK* 基本上来自白菜和甘蓝的大片段重复,这些大片段重复的基因又可能溯源到拟南芥中^[35]。表达量分析中 *t* 检验显著的5个含油量相关候选基因都在其中。

3.3 BnSnRK 与油菜种子含油量

3.3.1 重复出现在不同环境条件下的总含油量关联基因
环境重复的含油量关联基因分别为 *BnSnRK2* 亚族的 *BnaA07g12290D* 和 *BnaA10g22850D*。有研究者在双低油菜的差异表达基因中找到 *BnaA07g12290D* 在拟南芥中的同源基因 *SnRK2.3*,它产生的激素信号可能调节胚胎发育^[36]。*AtSnRK2.3* 产生的蛋白激酶的破坏,导致ABA抑制性基因表达的上调以及ABA诱导型基因表达的下调^[37],而植物激素ABA的含量被证明可以对十字花科油籽油脂积累进行不同方向的调节,且这种调节可能会改变油脂组分的比例^[38]。Zheng 等^[39]的研究表明, *SnRK2.6* 参与调节拟南芥种子中的油合成、蔗糖合成和叶片中的脂肪酸去饱和,而 *SnRK2.6* 与基因 *BnaA07g12290D* 在进化树上相邻。基因 *BnaA07g12290D* 中存在和亚麻酸含量显著关联的位点(图1),推测其通过对ABA的影响间接改变脂肪酸组分中亚麻酸的含量,进而影响种子总含油量。基因 *BnaA10g22850D* 不存在和脂肪酸组分关联的位点,但其与总油量的显著关联位点位于启动子区域,该区域存在参与胚乳表达的顺式作用元件(附图4)。推测基因 *BnaA10g22850D* 对种子含油量的

调控不受ABA的影响,且作用于种子脂肪酸延伸和去饱和之前。

3.3.2 环境特异的含油量关联基因
表达量差异显著的3个环境特异基因都是只具有1个外显子的 *BnSnRK3* 亚族基因。基因 *BnaA04g20000D* 同时作为候选基因 *BnaA08g18050D* 和 *BnaC04g44390D* 的共线基因。前者和 *ATSnRK2.0* 同源,与 *BnaA04g20000D* 分支相近。后者和 *BnaA04g20000D* 同为 *AtSnRK3.7* 的直系同源基因。候选基因 *BnaA08g18050D* 和 *BnaC04g44390D* 都存在种子亚麻酸含量的关联标记,它们都表现出正调控种子含油量(图3-A)。上述结果表明,这2个基因可能在种子发育过程中发挥相似的功能。基因 *BnaA09g51540D* 的表达量差异不显著,但在2个时期的相对表达量分别为0.853和0.688(图3-B),可能负调控种子含油量。其在拟南芥中的同源基因 *AT1g01140* 也被证明负调控种子总含油量,且 *CIPK9* 突变体种子 *C_{18:2}* 的比例显著低于野生型^[22]。基因 *BnaA09g51540D* 也与总含油量和亚麻酸关联(图1),这进一步验证了本研究分析方法是可靠的。*CIPK9* 可以响应非生物胁迫^[40],这可能导致 *BnaA09g51540D* 在高低油材料中表达量差异不显著。

当植物受到非生物逆境胁迫时,会通过一系列信号转导激活与逆境相关的转录因子,并结合相应基因的顺式作用调控元件来启动相应基因的表达,进而对逆境胁迫做出应答反应^[41-43]。*BnSnRK2* 和 *BnSnRK3* 亚族在功能上都参与植物逆境胁迫的应激反应^[12,44]。关联分析得到的11个同时影响脂肪酸组分和总含油量的候选基因在2个亚族都有分布。其中,8个基因(*BnaA06g22800D*、*BnaA07g20630D*、*BnaA08g18050D*、*BnaA08g25520D*、*BnaA09g51540D*、*BnaC03g16860D*、*BnaC04g06790D*、*BnaC04g44390D*)的关联标记位于启动子区域,它们包括在高油材料中表达量较高的 *BnaA08g18050D* 和 *BnaC04g44390D*。这些基因都含有MYB、MYC和ABA响应元件(附图4),推测它们参与植物抗寒、抗旱等胁迫应答机制。高油材料中表达量较低的基因 *BnaC02g10730D* 的关联标记位于基因上非启动子区域,其在葡萄上的同源基因 *VvCIPK10* 能够响应干旱、低温和盐胁迫^[45]。2011年, Malekzadeh 等^[46]的研究证实,水飞蓟在干旱胁迫下会提高籽粒中多不饱和脂肪酸的含量。水分胁迫和温度胁迫也被证明对甘蓝型油菜种子的脂肪酸组成和含油量有影响^[47-48]。本研究以油

酸、亚油酸和亚麻酸为关联分析表型时发现, *SnRK* 基因家族中影响亚麻酸含量的基因不是随机分布, 而与总含油量相关。因此甘蓝型油菜 *SnRK* 基因家族对种子含油量的影响可能与 ABA 等参与抗逆胁迫的激素信号密切相关。

4 结论

本研究在甘蓝型油菜中鉴定出 92 个 *BnSnRK* 基因, 其中, *SnRK1* 类成员 8 个, *SnRK2* 类成员 23 个, *SnRK3* 类成员 61 个。不同亚族在理化性质上有显著差异。*BnSnRK* 家族主要在细胞质中表达, 蛋白质二级结构主要以 α -螺旋和不规则卷曲为主。候选基因关联分析筛选出与油菜种子含油量相关的 12 个家族成员, 基因 *BnaA07g12290D* 的单倍型 TAAC 拥有最大含油量, 平均值为 42.0034%。12 个含油量关联基因均含有 MYB、MYC 和 ABA 响应元件, 可能参与油菜胁迫应答机制。*BnSnRK* 成员可以对种子油脂积累进行不同方向上的调节。

致谢 华中农业大学油菜研究室郭亮教授提供了 530 份油菜材料重测序基因型数据和含油量表型鉴定结果, 加拿大国家科学研究委员会萨斯卡通研究中心 Zou Jitao 博士提供油菜 90K 基因芯片等鉴定出了油菜 *BnCIPK9* 基因。

附图和附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.chinacrops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx>。

References

- [1] Halford N G, Hardie D G. SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 735–748.
- [2] Halford N G, Hey S, Jhurrea D, Laurie S, McKibbin R S, Paul M, Zhang Y. Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot*, 2003, 54: 467–475.
- [3] Harmon A C, Gribskov M, Gubrium E, Harper J F. The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytol*, 2001, 151: 175–183.
- [4] Jossier M, Bouly J P, Meimoun P, Arjmand A, Lessard P, Hawley S, Grahame Hardie D, Thomas M. SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABMcA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2009, 59: 316–328.
- [5] Halford N G, Hey S J. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J*, 2009, 419: 247–259.
- [6] Emanuelle S, Hossain M I, Moller I E, Pedersen H L, van de Meene A M, Doblin M S, Koay A, Oakhill J S, Scott J W, Willats W G, Kemp B E, Bacic A, Gooley P R, Stapleton D I. SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK. *Plant J*, 2015, 82: 183–192.
- [7] Kulik A, Wawer I, Krzywińska E, Bucholc M, Dobrowolska G. SnRK2 protein kinases—key regulators of plant response to abiotic stresses. *OMICS*, 2011, 15: 859–872.
- [8] Anderberg R J, Walker-Simmons M K. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 10183–10187.
- [9] Julkowska M M, McLoughlin F, Galvan-Ampudia C S, Ranken-berg J M, Kawa D, Klimecka M, Haring M A, Munnik T, Kooijman E E, Testerink C. Identification and functional characterization of the *Arabidopsis* Snf1-related protein kinase SnRK2.4 phosphatidic acid-binding domain. *Plant Cell Environ*, 2015, 38: 614–624.
- [10] Zhao Y, Zhang Z, Gao J, Wang P, Hu T, Wang Z, Hou Y J, Wan Y, Liu W, Xie S, Lu T, Xue L, Liu Y, Macho A P, Tao W A, Bressan R A, Zhu J K. *Arabidopsis* duodecuplet mutant of PYL ABA receptors reveals PYL repression of ABA-independent SnRK2 activity. *Cell Rep*, 2018, 23: 3340–3351.
- [11] Kim K N, Cheong Y H, Gupta R, Luan S. Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1844–1853.
- [12] Zhang H, Yang B, Liu W Z, Li H, Wang L, Wang B, Deng M, Liang W, Deyholos M K, Jiang Y Q. Identification and characterization of CBL and CIPK gene families in canola (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 8.
- [13] Zhao J, Yu A, Du Y, Wang G, Li Y, Zhao G, Wang X, Zhang W, Cheng K, Liu X, Wang Z, Wang Y. Foxtail millet (*Setaria italica* (L.) P. Beauv) CIPKs are responsive to ABA and abiotic stresses. *PLoS One*, 2019, 14: e0225091.
- [14] de la Torre F, Gutiérrez-Beltrán E, Pareja-Jaime Y, Chakravarthy S, Martin G B, del Pozo O. The tomato calcium sensor Cbl10 and its interacting protein kinase Cipk6 define a signaling pathway in plant immunity. *Plant Cell*, 2013, 25: 2748–2764.
- [15] Tang R J, Zhao F G, Garcia V J, Kleist T J, Yang L, Zhang H X, Luan S. Tonoplast CBL-CIPK calcium signaling network regulates magnesium homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3134–3139.
- [16] Mark C U, Reinhard B, Daniel I B. Asymmetric selection and the evolution of extraordinary defences. *Nat Commun*, 2013, 1: 314–334.
- [17] Liang Y, Kang K, Gan L, Ning S, Xiong J, Song S, Xi L, Lai S, Yin Y, Gu J, Xiang J, Li S, Wang B, Li M. Drought-responsive genes, late embryogenesis abundant group3 (LEA3) and vicinal oxygen chelate, function in lipid accumulation in *Brassica napus* and *Arabidopsis* mainly via enhancing photosynthetic efficiency and reducing ROS. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 2123–2142.
- [18] Ghillebert R, Swinnen E, Wen J, Vandesteene L, Ramon M, Norga K, Rolland F, Winderickx J. The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J*, 2011, 278: 3978–3990.
- [19] Hardie D G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8:

- 774–785.
- [20] Zhai Z, Liu H, Shanklin J. Phosphorylation of WRINKLED1 by KIN10 results in its proteasomal degradation, providing a link between energy homeostasis and lipid biosynthesis. *Plant Cell*, 2017, 29: 871–889.
  - [21] Cui Y, Su Y, Wang J, Jia B, Wu M, Pei W, Zhang J, Yu J. Genome-wide characterization and analysis of CIPK gene family in two cultivated allopolyploid cotton species: sequence variation, association with seed oil content, and the role of GhCIPK6. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 863.
  - [22] Guo Y, Huang Y, Gao J, Pu Y, Wang N, Shen W, Wen J, Yi B, Ma C, Tu J, Fu T, Zou J, Shen J. CIPK9 is involved in seed oil regulation in *Brassica napus* L. and *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 124.
  - [23] Chen C, Xia R, Chen H, He Y. TBtools, a Toolkit for Biologists integrating various HTS-data handling tools with a user-friendly interface. *bioRxiv*, 2018, <https://doi.org/10.1101/289660>.
  - [24] Wang Y, Tang H, Debarry J D, Tan X, Li J, Wang X, Lee T H, Jin H, Marler B, Guo H, Kissinger J C, Paterson A H. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: 49–49.
  - [25] Wu P, Wang W, Duan W, Li Y, Hou X. Comprehensive analysis of the CDPK-SnRK superfamily genes in Chinese cabbage and its evolutionary implications in plants. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 162.
  - [26] 马宗桓, 毛娟, 李文芳, 杨世茂, 吴金红, 陈佰鸿. 葡萄 SnRK2 家族基因的鉴定与表达分析. *园艺学报*, 2016, 43: 1891–1902.
Ma Z H, Mao J, Li W F, Yang S M, Wu J H, Chen B H. Identification and expression profile of the SnRK2 family genes in grapevine. *Acta Horti Sin*, 2016, 43: 1891–1902 (in Chinese with English abstract).
  - [27] Held K, Pascaud F, Eckert C, Gajdanowicz P, Hashimoto K, Corratgé-Faillie C, Offenborn J N, Lacombe B, Dreyer I, Thibaud J B, Kudla J. Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex. *Cell Res*, 2011, 21: 1116–1130.
  - [28] Wang Y, Yan H, Qiu Z, Hu B, Zeng B, Zhong C, Fan C. Comprehensive analysis of *SnRK* gene family and their responses to salt stress in *Eucalyptus grandis*. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 2786–2786.
  - [29] Kim K N, Cheong Y H, Grant J J, Pandey G K, Luan S. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2003, 15: 411–423.
  - [30] 王海波. 小桐子 *SnRK2* 基因家族的全基因组鉴定及特征分析. *分子植物育种*. 2016, 14: 2319–2329.
Wang H B. Genome-wide identification and sequence characterization of *SnRK2* genes family in *Jatropha curcas*. *Mol Plant Breed*, 2016, 14: 2319–2329 (in Chinese with English abstract).
  - [31] Hrabak E M, Chan C W, Gribskov M, Harper J F, Choi J H, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo H G, Sussman M R, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu J K, Harmon A C. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, 2003, 132: 666–680.
  - [32] Lee H J, Park Y J, Seo P J, Kim J H, Sim H J, Kim S G, Park C M. Systemic immunity requires SnRK2.8-mediated nuclear import of NPR1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2015, 27: 3425–3438.
  - [33] Thornton J W, DeSalle R. Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2000, 1: 41–73.
  - [34] Jaramillo M A, Kramer E M. The role of developmental genetics in understanding homology and morphological evolution in plants. *Int J Plant Sci*, 2007, 168: 61–72.
  - [35] Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin I A, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H, Tong C, Samans B, Corréa M, Da Silva C, Just J, Falentin C, Koh C S, Le Clainche I, Bernard M, Bento P, Noel B, Labadie K, Alberti A, Charles M, Arnaud D, Guo H, Daviaud C, Alamery S, Jabbari K, Zhao M, Edger P P, Chelaifa H, Tack D, Lassalle G, Mestiri I, Schnel N, Le Paslier M C, Fan G, Renault V, Bayer P E, Golicz A A, Manoli S, Lee T H, Thi V H, Chalabi S, Hu Q, Fan C, Tollenaere R, Lu Y, Battail C, Shen J, Sidebottom C H, Wang X, Canaguier A, Chauveau A, Bérard A, Deniot G, Guan M, Liu Z, Sun F, Lim Y P, Lyons E, Town C D, Bancroft I, Wang X, Meng J, Ma J, Pires J C, King G J, Brunel D, Delourme R, Renard M, Aury J M, Adams K L, Batley J, Snowdon R J, Tost J, Edwards D, Zhou Y, Hua W, Sharpe A G, Paterson A H, Guan C, Wincker P. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 2014, 345: 950–953.
  - [36] Deng W, Yan F, Zhang X, Tang Y, Yuan Y. Transcriptional profiling of canola developing embryo and identification of the important roles of BnDof5. 6 in embryo development and fatty acids synthesis. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56: 1624–1640.
  - [37] Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 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. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 1345–1363.
  - [38] 崔力勃, 朱乐, 蒋立希. ABA 对于十字花科油籽脂肪酸组成及储藏蛋白的影响及机制. *农业生物技术学报*, 2017, 25: 1059–1071.
Cui L B, Zhu L, Jiang L X. Effects of ABA on fatty acid composition and stored protein of cruciferous oilseeds. *J Agric Biotechnol*, 2017, 25: 1059–1071 (in Chinese with English abstract).
  - [39] Zheng Z, Xu X, Crosley R A, Greenwalt S A, Sun Y, Blakeslee B, Wang L, Ni W, Sopko M S, Yao C, Yau K, Burton S, Zhuang M, McCaskill D G, Gachotte D, Thompson M, Greene T W. The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2010, 153: 99–113.
  - [40] Pandey G K, Cheong Y H, Kim B G, Grant J J, Li L, Luan S. CIPK9: a calcium sensor-interacting protein kinase required for low-potassium tolerance in *Arabidopsis*. *Cell Res*, 2007, 17: 411–421.
  - [41] Ali G M, Komatsu S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *J Proteome Res*, 2006, 5: 396–403.
  - [42] Hadiarto T, Tran L S. Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 297–310.

- [43] Shinozaki K, Shinozaki K Y. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, 1997, 115: 327–334.
- [44] Li J, Wang X Q, Watson M B, Assmann S M. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science*, 2000, 287: 300–303.
- [45] 余义和, 李秀珍, 郭大龙, 张会灵, 杨英军, 李学强, 张国海. 葡萄类钙调磷酸酶 B 亚基互作蛋白激酶 VvCIPK10 的特性与表达. *中国农业科学*, 2016, 49: 3798–3806.
- Yu Y H, Li X Z, Guo D L, Zhang H L, Yang Y J, Li X Q, Zhang G H. Characteristics and expression of calcineurin like B subunit interaction protein VvCIPK10 in grapevine. *Sci Agric Sin*, 2016, 49: 3798–3806 (in Chinese with English abstract).
- [46] Malekzadeh M, Mirmazloum I, Mortazavi S N, Angourani H R, Panahi M. The physicochemical properties and oil constituents of milk thistle (*Silybum marianum* Gaertn. cv. Budakalászi) under drought stress. *J Med Plants Res*, 2011, 5: 1485–1488.
- [47] Mailer R J, Cornish P S. Effects of water stress on glucosinolate and oil concentrations in the seeds of rape (*Brassica napus* L.) and turnip rape (*Brassica rapa* L. var. *silvestris* [Lam.] Briggs). *Aust J Exp Agric*, 1987, 27: 707–711.
- [48] Canvin D T. The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Can J Bot*, 1965, 43: 63–69.