



张春利,解潇飞,张莹,等.马铃薯 *PYL5* 基因对非生物胁迫的响应分析及其启动子的活性鉴定[J].江西农业大学学报, 2024, 46(2): 302–313.

ZHANG C L, XIE X F, ZHANG Y, et al. Response analysis of potato *PYL5* gene to abiotic stress and activity identification of its promoter[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2024, 46(2): 302–313.

马铃薯 *PYL5* 基因对非生物胁迫的响应分析 及其启动子的活性鉴定

张春利^{1,2}, 解潇飞^{1,2}, 张莹^{1,2}, 张锋^{1,2}, 孙超^{1,2}, 毕真真^{1,2},
刘玉汇², 刘震², 姚攀锋^{2*}, 白江平^{1,2*}

(1. 甘肃农业大学 农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学 省部共建旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】脱落酸(ABA)作为一种“应激激素”在植物生长发育和响应干旱、盐等非生物胁迫过程中发挥重要作用, PYR/PYL/RCARs (以下简称“PYL”)作为 ABA 受体在多种植物中也被广泛研究。基于对马铃薯 *StPYL5* 基因生物信息学及表达模式分析, 并通过对其启动子活性鉴定, 为进一步揭示马铃薯 *StPYL5* 功能及抗逆育种提供依据。【方法】根据转录组数据克隆得到 *StPYL5* 基因, 通过 DNAMAN、MEGA 等软件分析了 *StPYL5* 的分子特征; 通过 qPCR 检测了 *StPYL5* 基因的组织特异性及其对非生物胁迫的响应; 利用 PlantCARE 网站对 *StPYL5* 基因启动子进行了分析, 并通过瞬时转化烟草对其活性进行了鉴定。【结果】*StPYL5* 基因全长 534 bp, 共编码 177 个氨基酸, 蛋白质分子量 20.19 ku, 理论等电点(pI)为 5.97。系统进化分析显示, *StPYL5* 与 SpPYL9-like 亲缘关系较近。组织特异性分析结果显示, 青薯 9 号(QS9)中 *StPYL5* 在根和叶中表达量较高, 其次分别是茎和花, 在块茎中表达量较低。不同胁迫下 *StPYL5* 表达量分析表明, 青薯 9 号(QS9)中 *StPYL5* 在干旱、低温、盐和 ABA 胁迫下的表达量先升高后降低, 且 *StPYL5* 的表达受 MeJA 和 SA 的诱导。此外, 笔者成功克隆得到 2 000 bp 的 *StPYL5* 基因启动子。在烟草中的瞬时转化后的组织化学染色结果表明, *StPYL5* 基因启动子具有成功启动下游 *GUS* 报告基因表达的启动子活性。【结论】全面分析了 *StPYL5* 基因的分子特征及其在多种非生物胁迫下的表达谱, 并成功克隆到具有活性的 *pStPYL5* 启动子, 该结果为深入研究 *StPYL5* 基因的功能以及马铃薯抗逆育种提供依据。

关键词: 马铃薯; ABA 信号通路; *StPYL5*; 基因克隆; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号: S532 文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1000-2286(2024)02-0302-12



Response analysis of potato *PYL5* gene to abiotic stress and activity identification of its promoter

ZHANG Chunli^{1,2}, XIE Xiaofei^{1,2}, ZHANG Ying^{1,2}, ZHANG Feng^{1,2}, SUN Chao^{1,2},
BI Zhenzhen^{1,2}, LIU Yuhui², LIU Zhen², YAO Panfeng^{2*}, BAI Jiangping^{1,2*}

收稿日期: 2023-11-26 修回日期: 2024-01-19

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系(CARS-09-P10)和甘肃省科技计划项目(23JRRA1414)

Project supported by National Potato Industry Technology System (CARS-09-P10) and Science and Technology Program of Gansu Province (23JRRA1414)

作者简介: 张春利, 硕士生, orcid.org/0009-0003-9431-523X, 2324941692@qq.com; *通信作者: 姚攀锋, 助理研究员, 博士, 主要从事马铃薯抗逆相关调控机理研究, orcid.org/0000-0003-1291-3555, yaopf@gsau.edu.cn; 白江平, 教授, 博士, 主要从事马铃薯抗逆生理与分子生物学研究, orcid.org/0000-0002-2532-1631, baijp@gsau.edu.cn。

©《江西农业大学学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 协议

(1.College of Agriculture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2.State Key Laboratory of Arid Habitat Crops, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: [Objective] Absciscic acid (ABA), as a stress hormone, plays an important role in plant growth, development, and response to abiotic stresses such as drought and salt. PYR/PYL/RCARs (referred to as “PYL” hereafter) as ABA receptors in various plants, are widely studied. Based on the bioinformatics and expression pattern analysis of potato *StPYL5* gene and the identification of its promoter activity, this study provides a basis for further revealing the function of potato *StPYL5* and resistance breeding. [Method] In this study, *StPYL5* gene was cloned based on transcriptome data. The molecular characteristics of *StPYL5* was analyzed using software such as DNAMAN and MEGA. The tissue specificity of the *StPYL5* gene and its response to abiotic stress were examined by qPCR. The *StPYL5* gene promoter was analyzed using the PlantCARE website, and its activity was identified through transient transformation in tobacco. [Result] The results showed that the full-length of the *StPYL5* gene was 534 bp, encoding 177 amino acids. The protein had a molecular weight of 20.19 ku, and the theoretical isoelectric point (*pI*) was 5.97. Phylogenetic analysis revealed a close relationship between *StPYL5* and *SpPYL9*-like. Tissue specificity analysis showed that the expression pattern of *StPYL5* in potato cultivar Qingshu 9 (QS9) was the highest in leaves and roots, followed by stems, flowers, and tubers. Expression analysis under different stresses showed that the expression level of *StPYL5* in QS9 increased initially and then decreased under drought, low temperature, salt, and ABA stress. The expression of *StPYL5* was induced by MeJA and SA. In addition, a 2 000 bp *StPYL5* gene promoter was successfully cloned. Tissue staining after transient transformation in tobacco demonstrated that the *StPYL5* gene promoter had promoter activity to drive downstream *GUS* reporter gene expression. [Conclusion] This study comprehensively analyzed the molecular characteristics of the *StPYL5* gene and its expression profile under various abiotic stresses. The successful cloning of the active *pStPYL5* promoter provides a foundation for further investigating the function of the *StPYL5* gene and potato breeding for stress tolerance.

Keywords: *Solanum tuberosum* L.; ABA signaling pathway; *StPYL5*; gene cloning; abiotic stress; expression analysis

【研究意义】作为茄科一年生草本植物,马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)因其富含营养成分和广泛的药用价值而被誉为“十全十美”的营养佳品,既可作为粮食、蔬菜和饲料,也可作为工业原料^[1-4]。由于它适应性强、栽培管理简便且产量高、效益好,已成为当今世界上仅次于水稻、小麦和玉米之后的第四大粮食作物。然而,马铃薯作为一种浅根系作物,对水分胁迫表现出了相当高的敏感度^[5],尤其是在块茎膨大期遭受到干旱、低温、盐等胁迫后会严重影响马铃薯产量。因此,挖掘马铃薯抗逆基因对马铃薯抗逆育种具有重要的意义。【前人研究进展】Jensen等^[6]研究表明从马铃薯块茎形成到成熟水分亏缺大于30%,则会使产量严重下降;凌永胜^[7]发现马铃薯在块茎开始形成或膨大期遭受低温冷害后,块茎韧皮部会出现网状坏死,严重时会导致维管束周围出现黑点;赵海红等^[8]对马铃薯进行盐碱试验后发现盐碱土壤对块茎的形成和膨大都产生了抑制作用。当植物受到非生物胁迫时,可通过(abscisic acid, ABA)诱导气孔关闭减少水分流失,以抵御逆境带给植物的损害^[9]。有研究^[10-11]发现,当胁迫来临时ABA在胞内大量产生,而PYL蛋白作为ABA的受体,首先感应到并与之结合,随后PYL-ABA复合物又与PP2C(A类蛋白磷酸酶2C, clade A protein phosphatase 2C, PP2C)结合,形成PYL-ABA-PP2C三元复合物形式使得PP2C失去活性,从而解除了对激酶SnRK2s(sucrose non-fermenting 1-related protein kinase subfamily 2)的抑制效应,使激酶SnRK2s被激活^[12],被激活后的SnRK2s会对其下游的转录因子或效应蛋白进行磷酸化,从而启动ABA应答基因的表达^[13],诱导气孔关闭降低蒸腾作用,从而提高植物的抗逆性。综上所述,ABA受体蛋白PYL处于ABA信号转导途径中双重负调控系统PYL-PP2C-SnRK2最上游,起着识别ABA信号、抑制PP2C蛋白磷酸酶活性、进而启动ABA信号转导的关键作用。Ren等^[14]在拟南芥中过表达*VaPYL4*经冷

冻处理、干旱和盐处理后,转基因植物的抗性均高于野生型,说明过表达 *VaPYL4* 提高了拟南芥对干旱和盐胁迫的抗性。在水稻中,过表达 *OsPYL5* 能诱导许多胁迫响应基因的表达,从而提高水稻的耐干旱和耐盐胁迫能力^[15]。【本研究切入点】迄今为止,研究者们对 *PYLs* 的研究多集中在水稻^[16]、番茄^[17]和大豆^[18]等中,然而对于马铃薯 *PYL* 基因的信息鲜有报道^[19]。【拟解决的关键问题】本研究从马铃薯中克隆 *StPYL5* 基因,并通过生物信息学、组织特异表达以及在不同逆境条件下的表达分析,为 *PYLs* 基因在马铃薯中的功能研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用植物材料青薯9号(QS9)由本实验室保存。RNAprep pure 植物总RNA提取试剂盒和ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover 分别购于天根生化科技(北京)有限公司和上海硕盟有限公司。TB Green Premix Ex Taq™ II 购于宝日医生物技术(北京)有限公司。离心管、96孔板等均购于康宁生命科学(吴江)有限公司。引物及测序均由北京擎科生物科技有限公司西安分公司合成。

1.2 试验处理

(1)基因克隆及组织特异性表达模式分析:取45 d马铃薯盆栽植株的根、茎、叶、花及块茎,样品用液氮迅速冷冻,置-80℃冰箱保存。每个组织取3个生物学重复。

(2)非生物逆境胁迫下的表达模式分析:将马铃薯组培苗茎段接种于MS固体培养基,在温度为(22±2)℃,光强为25.0~37.5 μmol/(m²·s),光照16 h、黑暗8 h的条件下培养28 d。然后,将植株根部的培养基冲洗干净,用滤纸轻拭吸干植株根部表面残留的水分,用低温(4℃)、200 mmol/L甘露醇、100 mmol/L NaCl、100 μmol/L脱落酸(ABA)、100 μmol/L水杨酸(SA)和100 μmol/L茉莉酸甲酯(MeJA)进行处理,其中甘露醇和NaCl是浸根处理,ABA、SA、MeJA是叶面喷施处理,分别于胁迫0,1,3,6,12 h时取样,液氮迅速冷冻后于-80℃冰箱保存。每个样品取3个生物学重复。

1.3 总RNA提取及cDNA合成

用植物总RNA提取试剂盒提取各样品的RNA,通过10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,并用超微量分光光度计检测RNA的纯度和浓度,随后将所提RNA用cDNA合成试剂盒(TOYOBO)反转录为cDNA,20 μL反应体系为:RNA 2 μL,4×DN Master Mix(加入1/50 gDNA Remover)2 μL,5×RT Master Mix II 2 μL,Nuclease-free Water 14 μL。产物于-20℃保存备用。

1.4 *StPYL5* 基因的克隆

以QS9花中提取的cDNA为模板进行PCR扩增。使用KOD FX高保真酶参考说明进行目的基因扩增,扩增体系:2×PCR buffer for KOD FX 25 μL、2 mmol/L dNTPs 12.5 μL、10 nmol/μL Primer-F/R各1 μL、cDNA 2 μL、KOD FX(1.0 U/μL)1 μL,无菌水补充至50 μL。扩增程序:94℃预变性2 min;98℃变性10 s,56℃退火30 s,68℃延伸1 min,30个循环;68℃延伸7 min。利用Primer Premier 5.0软件设计特异引物(*StPYL5*-F:ATGGAAGATGAGTACATTAGGAGACAC;*StPYL5*-R:CTACATTCTATCAATAGGTTCCGTATG)。通过10 g/L琼脂糖凝胶电泳对PCR产物进行检测,并回收目的条带。将回收的PCR产物连接到克隆载体pEASY®-Blunt Cloning Vector,经菌落PCR鉴定后,将阳性克隆送至北京擎科生物科技有限公司西安分公司进行测序。

1.5 *StPYL5* 基因的生物信息学分析

通过PlantCARE在线工具启动子分析网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对*StPYL5*基因上游2 000 bp的启动子区域进行功能预测,并利用在线网站(http://plantregmap.gao-lab.org/binding_site_prediction.php)预测*StPYL5*可能结合的转录因子。利用ExPASy在线工具分析蛋白质的理化性质(<http://web.expasy.org/protparam/>),包括蛋白的亲水/疏水性(<https://web.expasy.org/protscale/>);利用SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测蛋白二级结构;利用SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/interactive/PdpeDJ/models/>)预测蛋白三级结构;通过

NCBI在线工具对 *StPYL5* 基因序列进行保守结构域分析,并对 *StPYL5* 蛋白进行 BLAST,选择与 *StPYL5* 蛋白序列同源性较高的几个物种,用 DNAMAN 软件进行氨基酸多序列比对,用 MEGA 6 构建系统进化树。

1.6 *StPYL5* 基因的表达分析

根据 *StPYL5* 基因序列设计荧光定量引物,以马铃薯肌动蛋白(actin)为内参基因,通过 qPCR 检测 *StPYL5* 基因的表达量。内参引物 actin-F:AGGAGCATCCTGTCCTCCTAA;actin-R:CACCATCACCAGAGTCAACA。目标基因引物 *StPYL5*-F:AGGTACCAGATTCCGTCGTC;*StPYL5*-R:TTACCGTCTCCGTCGATGAG。PCR 反应体系:2×TB Green Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)10 μL,ROX Reference Dye II 0.4 μL,PCR Forward Primer(10 μmol/L)/PCR Reverse Primer(10 μmol/L)各 0.8 μL,cDNA 1 μL,ddH₂O 7 μL。反应程序:95 °C 预变性 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,40 个循环;溶解曲线分析:95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s。使用 Excel 2023 和 SPSS 22.0 软件进行数据整理及方差分析。*StPYL5* 基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的方法进行计算。

1.7 *StPYL5* 基因启动子的克隆及瞬时转化

以 QS9 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。使用 KOD FX 高保真酶参考说明进行目的基因扩增,扩增体系/扩增程序以及鉴定、测序等同材料与方法的 1.4。利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *StPYL5* 启动子基因序列的特异引物。*pStPYL5*-F:TATCTTTACTAAAATATTCAAC;*pStPYL5*-R:ATTATTCATCATCTCCAACCAA。将培养 3~4 周的烟草从土里移栽到霍格兰营养液中培养 4~5 d 后注射烟草叶片,注射后 48 h 开始取样染色,样品在 GUS 染色液中 37 °C 孵育 24 h 后用无水乙醇脱色除去叶绿素,样本保存于乙醇中,用普通光学显微镜观察。

2 结果与分析

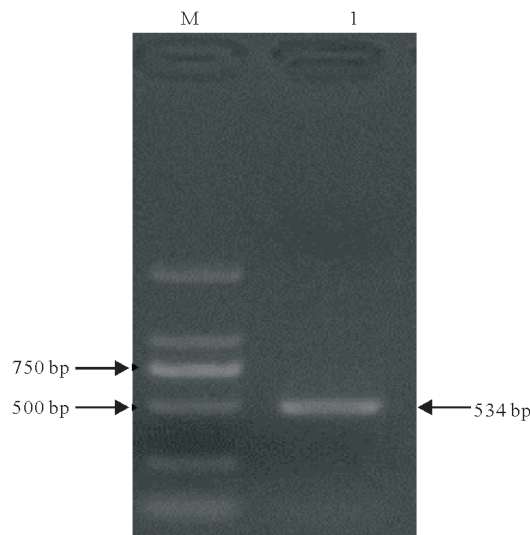
2.1 *StPYL5* 基因的克隆

以马铃薯花组织为模板克隆得到 *StPYL5* 基因,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,如图 1 所示,获得约 500 bp 左右大小的条带。将其回收纯化后连接到克隆载体上,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,37 °C 过夜培养,挑取单菌落进行 PCR 检测并进行测序,结果显示 *StPYL5* 基因序列全长 534 bp。

2.2 *StPYL5* 编码氨基酸的生物信息学分析

2.2.1 *StPYL5* 蛋白结构分析

ExPASy ProtParam 的预测结果表明 *StPYL5* 蛋白分子量为 20.19 ku,理论等电点(*pI*)为 5.97,分子式为 C₈₈₃H₁₄₂₀N₂₆₂O₂₆₈S₆,不稳定系数为 43.88,亲水指数(GRAVY):-0.337,脂溶指数为 96.72。利用 SOPMA 在线分析软件预测蛋白的二级结构,结果(图 2)表明该蛋白中 α-螺旋占 39.55%,β-转角占 9.04%,无规则卷曲占 31.07%及延伸链占 20.34%。利用 NCBI 在线工具 Conserved Domains Search 对 *StPYL5* 蛋白序列进行保守结构域分析,结果显示该序列编码的氨基酸具有 1 个 SRPBCC 超家族典型的疏水性配体结合结构域。利用 SWISS-MODEL 在线工具,对蛋白三级结构进行同源建模,预测结果显示,GMQE(global model quality estimation)为 0.65,QMEAN(qualitative model energy analysis)为 0.70,与数据库模型相似度为 51.25%(>50%),说明该结构模型质量较高,可进行后续分析(图 3)。利用 ExPASy-ProtScale 在线工具预测 *StPYL5* 蛋白的亲/疏水性,结果显示,蛋白多肽链的第 48 和 128 位分别是氨基酸的最低分值和最高分值,分别为-2.678 和 2.156,整体来看亲水性蛋白较多,为亲水性蛋白(图 4)。

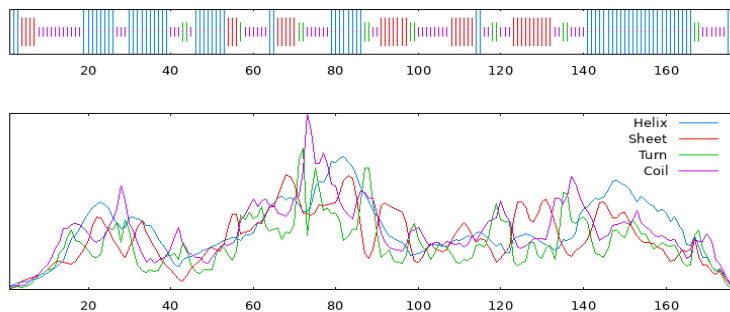


M: Marker D2000; 1: PCR 产物。

M: Marker D2000; 1: PCR product.

图 1 *StPYL5* 基因 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *StPYL5* gene



蓝色代表 α 螺旋,红色代表延伸链,绿色代表 β 转角,紫色代表无规则卷曲。

Blue represents α helix, red represents extended strand, green represents β Angle, and purple represents irregular coil.

图2 StPYL5白二结构预测

Fig.2 Prediction of secondary structure of StPYL5protein

2.2.2 StPYL5 蛋白进化分析

通过 DNAMAN 对 StPYL5 蛋白与 DsPYL9、SIPYL9、NtPYL3-like、NsPYL9-like、VvPYL8、SpPYL9-like、InPYL8-like、MePYL8 和 SdPYL5-like 共 8 个物种的 PYLs 进行多序列比对,结果显示,StPYL5 与 SdPYL5-like 和 SpPYL9-like 相似性最高均为 98.31%,其次依次为 SIPYL9 (97.74%)、NtPYL3-like (96.61%)、NsPYL9-like (96.05%)、DsPYL9 (96.05%)、InPYL8-like (87.58%) 和 MePYL8 (85.88%) (图 5)。并且在对 StPYL5 蛋白进行保守结构域分析时发现,StPYL5 编码的氨基酸中除了具有 SRPBCC 超家族典型的疏水性配体结合结构域外,还具有多个疏水配体的结合位点,这预示着该蛋白在结合配体或底物后的潜在功能。用 MEGA 6 将 StPYL5 与 SIPYL9、SpPYL9-like、NtPYL3-like、AtPYR1-like、RcPYL8、GmPYL4、ZoPYL4-like、CsPYL4、BnPYL5、ObPYL10-like 和 ZmPYL10 进行系统发育树分析,结果(图 6)表明,StPYL5 与 SIPYL9 和 SpPYL9-like 亲缘关系最近。

2.3 StPYL5 基因的表达分析

2.3.1 StPYL5 基因在不同组织中的表达模式分析

组织表达分析结果显示,在 QS9 的根和叶中 StPYL5 表达量最高,表达量分别是块茎的 12.3 倍和 12.4 倍;茎中的表达量是块茎的 10.8 倍;在花中的表达量是块茎的 2.9 倍(图 7)。StPYL5 在马铃薯的各个部位均有表达,说明 StPYL5 可能在植物生长发育过程和应对逆境时发挥重要作用。

2.3.2 StPYL5 基因在逆境胁迫下的表达分析

(1) StPYL5 基因在非生物胁迫下的表达分析。为了探究 StPYL5 对非生物胁迫的响应,利用 qPCR 检测了 StPYL5 基因在干旱、盐和低温条件下的表达水平。结果表明,干旱处理后,StPYL5 的表达量在 1 h 时上调是对照的 4.9 倍,3 h 以后表达量开始下调,且在 12 h 时达到最低值是对照的 0.37 倍(图 8A)。低温处



图3 StPYL5 蛋白三级结构预测

Fig.3 Tertiary structure prediction of StPYL5protein

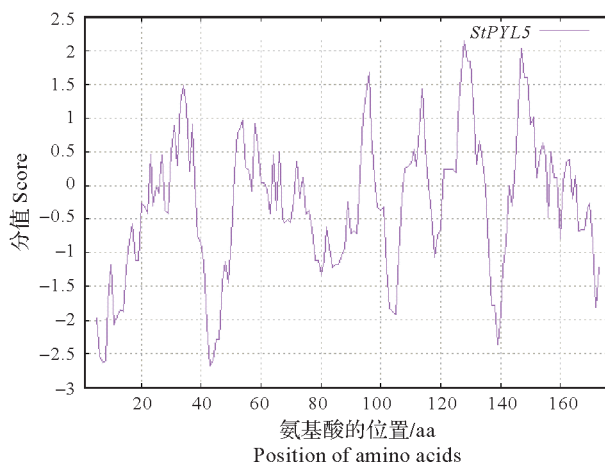
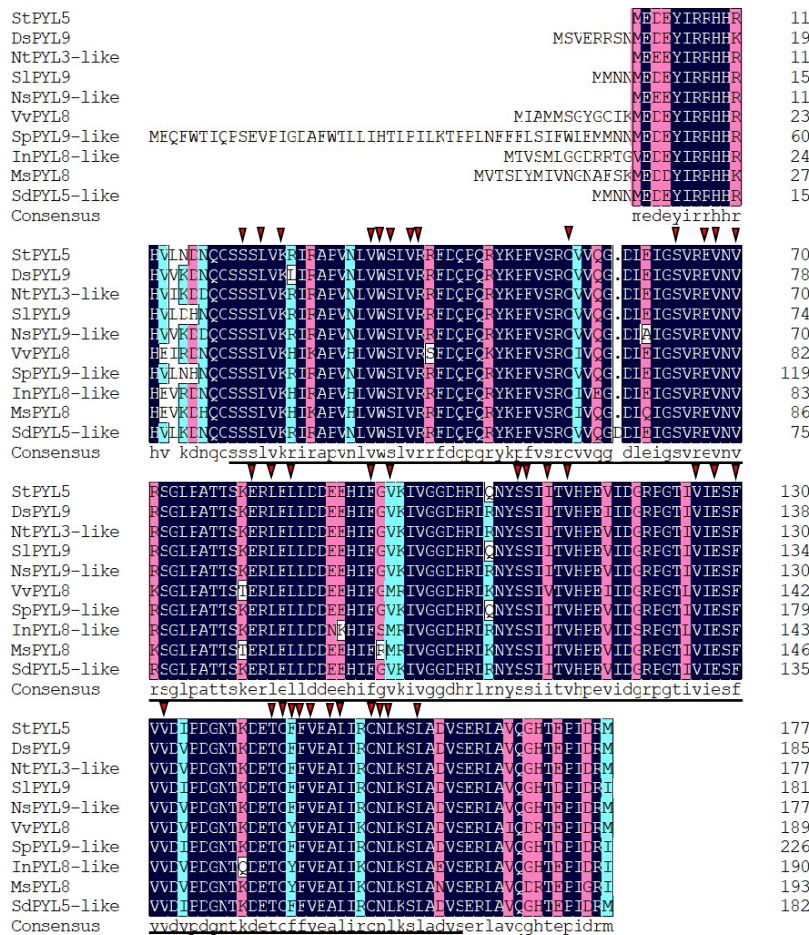


图4 StPYL5 蛋白的亲/疏水性预测

Fig.4 Prediction of hydrophilic/hydrophobic properties of StPYL5 protein



1. 不同的颜色代表序列间的相似度,其中深蓝色表示 100%;粉色表示 $\geq 75\%$;蓝色表示 $\geq 50\%$;2. 黑线标注出来的序列是 SRPBCC 蛋白家族典型的结构域;红色的三角表示假定的疏水配体结合位点;3. St: 马铃薯;Ds: 曼陀罗 (MCD7450320.1);Sl: 番茄 (XP_004252608.1);Nt: 绒毛状烟草 (XP_009601305.1);Ns: 林烟草 (XP_009797969.1);Vv: 葡萄 (XP_010659134.1);Sp: 潘那利番茄 (XP_015061823.1);In: 牵牛 (XP_019151655.1);Me: 木薯 (XP_021604441.1);Sd: 欧白英 (XP_055805327.1)。

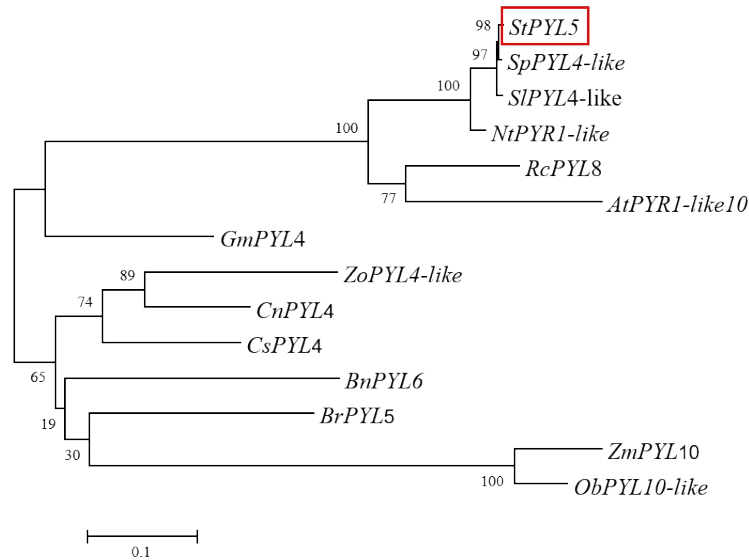
1. Different colors represent the similarity between sequences, where dark blue represents 100%. Pink indicates $\geq 75\%$; Blue said 50% or more; 2. The sequence highlighted by the black line is the typical domain of SRPBCC protein family; The red triangle indicates the putative hydrophobic ligand binding site; 3. St: *Solanum tuberosum*; Ds: *Datura stramonium* (MCD7450320.1); Sl: *Solanum lycopersicum* (XP_004252608.1); Nt: *Nicotiana tomentosiformis* (XP_009601305.1); Ns: *Nicotiana sylvestris* (XP_009797969.1); Vv: *Vitis vinifera* (XP_010659134.1); Sp: *Solanum pennellii* (XP_015061823.1); In: *Ipomoea nil* (XP_019151655.1); Me: *Manihot esculenta* (XP_021604441.1); Sd: *Solanum dulcamara* (XP_055805327.1)。

图 5 StPYL5 蛋白序列与其他物种蛋白序列同源性比对

Fig.5 Homology alignment of StPYL5 protein sequences with protein sequences from other species

理后, *StPYL5* 呈现出先升高后降低的趋势,且在 1 h 时上调表达并达到最高值,其表达量分别是对照的 1.5 倍和 1.8 倍;随后基因表达开始降低,12 h 时表达量达到最低值,表达量分别是对照的 0.36 和 0.56 倍 (图 8B)。盐处理后, *StPYL5* 的表达量呈现出先升高后降低的趋势,在 1 h 时上调表达,随后下调表达,其中在 3 h 时表达量达到最低值是对照的 0.57 倍 (图 8C)。

(2) *StPYL5* 基因在激素处理下的表达分析。明确了 *StPYL5* 在非生物胁迫中的表达模式后,进一步探究了该基因对激素胁迫的响应。结果显示,ABA 处理后, *StPYL5* 在 1 h 时上调表达,表达量是对照的 1.8 倍,随后下调表达,并且在 12 h 时达到最低值是对照的 0.50 倍 (图 8D)。MeJA 和 SA 处理后, *StPYL5* 均上调表达,其中 MeJA 处理的 12 h 时基因表达量达到最高值,是 0 h 的 4.5 倍 (图 8E),SA 处理在 3 h 时基因表达量达到最高值,是 0 h 的 3.5 倍 (图 8F)。

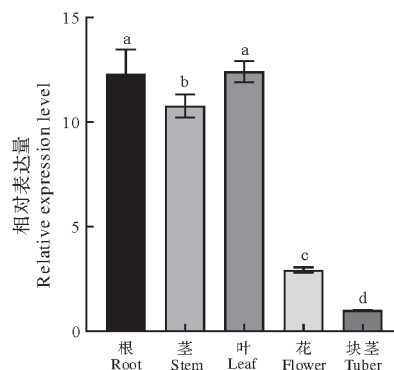


Zo: 生姜 (XP_042444933.1); Cn: 椰子 (KAG1371521.1); Gm: 大豆 (KAh1242161.1); Cs: 大麻 (XP_030481200.1); Sp: 潘那利番茄 (XP_015089437.1); Sl: 番茄 (XP_004252608.1); Bn: 甘蓝型油菜 (XP_022574136.1); Br: 白菜 (XP_009122151.1); Nt: 绒毛状烟草 (XP_009601305.1); Zm: 玉米 (NP_001343946.1); Ob: 长花药野生稻 (XP_015697189.2); St: 马铃薯; Rc: 月季花 (XP_040368419.1); At: 拟南芥 (NP_194521.2)。

Zo: *Zingiber officinale* (XP_042444933.1); Cn: *Cocos nucifera* (KAG1371521.1); Gm: *Glycine max* (KAh1242161.1); Cs: *Cannabis sativa* (XP_030481200.1); Sp: *Solanum pennellii* (XP_015089437.1); Sl: *Solanum lycopersicum* (XP_004252608.1); Bn: *Brassica napus* (XP_022574136.1); Br: *Brassica rapa* (XP_009122151.1); Nt: *Nicotiana tomentosiformis* (XP_009601305.1); Zm: *Zea mays* (NP_001343946.1); Ob: *Oryza brachyantha* (XP_015697189.2); St: *Solanum tuberosum*; Rc: *Rosa chinensis* (XP_040368419.1); At: *Arabidopsis thaliana* (NP_194521.2)。

图 6 StPYL5 蛋白的系统进化树分析

Fig.6 Phylogenetic tree analysis of StPYL5 protein



显著性分析使用 Duncan's 法进行多重比较 ($P < 0.05$)。设置 *StPYL5* 在块茎中的表达水平为 1。

Significance analyses were performed using Duncan's method for multiple comparisons ($P < 0.05$).

The expression level of *StPYL5* in tubers was set to 1.

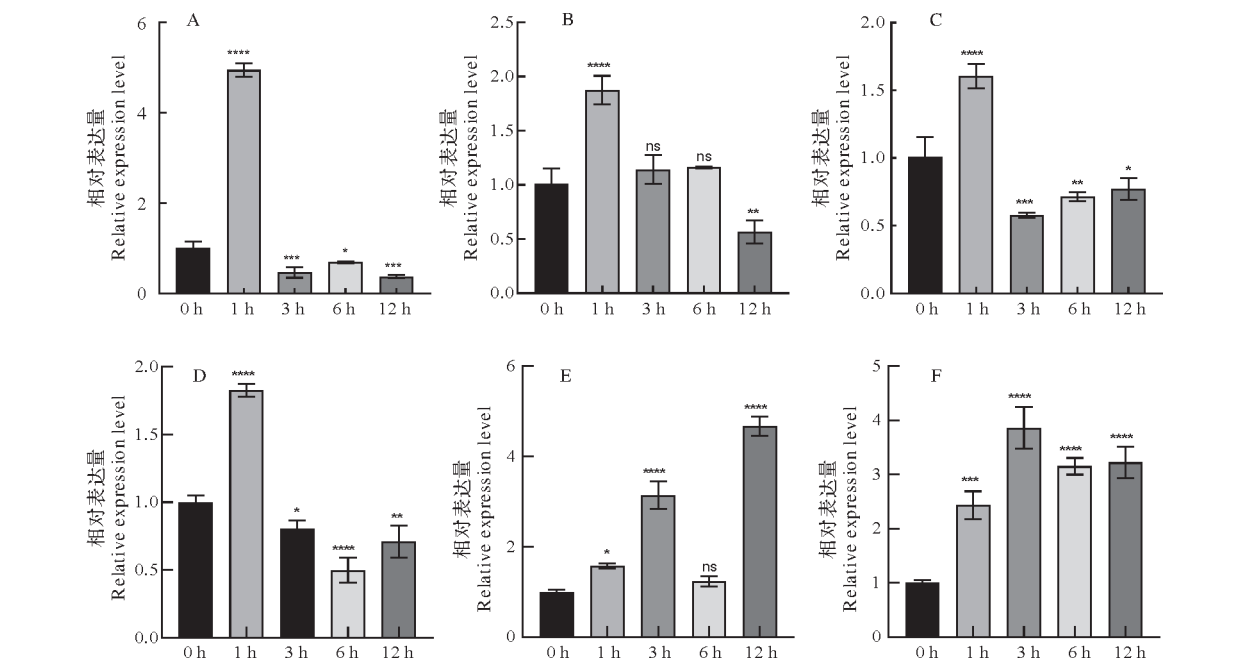
图 7 StPYL5 在 QS9 不同组织的基因表达量

Fig.7 Gene expression of *StPYL5* in different tissues of QS9

2.4 StPYL5 基因启动子克隆及活性鉴定

2.4.1 StPYL5 基因启动子分析

根据马铃薯基因组数据,选取 *StPYL5* 基因上游 2 000 bp 序列作为其启动子进行研究。转录因子结合位点预测结果显示, *StPYL5* 基因启动子可能被 6 类共 28 个转录因子结合,参与植物分生组织形成、种子萌发和叶片形态形成的调节等生物学过程及对胁迫条件的响应等多个转录调控路径(表 1)。对 *StPYL5* 基因启动子元件分析结果显示, *StPYL5* 基因启动子除了含有多个启动子必须的 TATA-box、CAAT-box 外,还有大量参与光响应元件、茉莉酸甲酯 (MeJA) 响应元件、低温反应元件、厌氧诱导相关的顺式调节元件和参与分生组织表达相关的调控元件等应答元件(表 2)。



A:干旱;B:低温(4 °C);C:NaCl;D:脱落酸(ABA);E:茉莉酸甲酯(MeJA);F:水杨酸(SA)。显著性分析使用Tukey法进行多重比较($P<0.05$),ns表示无显著差异;*,**,***,****分别表示在0.05,0.01,0.001以及0.000 1水平上有显著差异;以每个处理的0 h为CK,如果处理与CK的比值大于1.2或者小于0.8,则被认为上调或者下调^[20]。

A: drought; B: low temperature (4 °C); C: NaCl; D: abscisic acid (ABA); E: Methyl jasmonate (MeJA); F: Salicylic acid (SA); Significance analysis was performed using Tukey's method for multiple comparisons ($P<0.05$); ns indicates no significant difference; *, **, ***, **** indicate significant differences at 0.05, 0.01, 0.001, and 0.000 1 levels, respectively; 0 h of each treatment was used as CK, and if the ratio of treatment to CK was greater than 1.2 or less than 0.8, it was considered to be up or down regulated^[20].

图8 QS9中 *StPYL5* 在不同逆境下的基因表达量

Fig.8 Gene expression in different strains of *StPYL5* under different stresses

表1 *StPYL5* 基因启动子与转录因子结合位点预测表

Tab.1 *StPYL5* gene transcription factors and promoter binding site prediction table

基因家族	数量	基因家族	数量
Gene family	Amount	Gene family	Amount
<i>bZIP</i>	1	<i>hB-other</i>	1
<i>ERF</i>	18	<i>MYB</i>	4
<i>NAC</i>	3	<i>MYB-other</i>	1

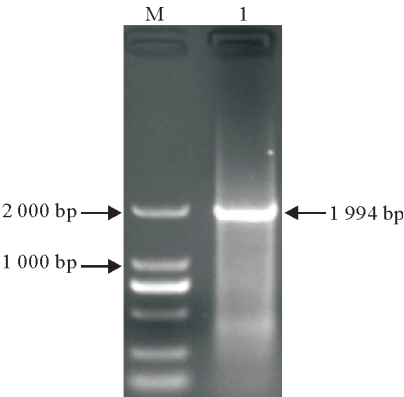
2.4.2 *StPYL5* 基因启动子活性鉴定

首先,笔者根据马铃薯基因组数据设计 *StPYL5* 基因启动子特异引物,以马铃薯叶片组织 DNA 为模版进行 PCR 扩增,得到约 2 000 bp 大小的电泳条带(图 9)。然后,将特异条带回收纯化连接至克隆载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,37 °C 过夜培养,挑取单菌落进行 PCR 检测并进行测序。最后,将测序结果与基因组序列进行比对,结果显示已成功克隆得到 *StPYL5* 基因启动子,该序列全长 1 994 bp。

在此基础上,笔者进一步对 *StPYL5* 基因启动子活性进行鉴定。首先,构建 *StPYL5* 启动子构建至植物过表达载体 pBI101-GUS,并将其转入农杆菌 GV3101。然后,在烟草叶片中瞬时表达(图 10)。最后,通过 GUS 组织化学染色初步鉴定其活性。结果显示,注射了含 *StPYL5* 启动子烟草叶片被 GUS 染色液染成蓝色,说明 *StPYL5* 启动子已成功启动下游报告基因,而阴性对照烟草叶片则呈现微黄色(图 11)。综上所述,本研究成功克隆到具有启动活性的 *StPYL5* 基因启动子。

表 2 *StPYL5* 基因启动子元件
Tab.2 *StPYL5* gene promoter elements

元件名称 Site Name	核心序列 Core sequence	数量 Amount	功能 Function
3-AF3 binding site	CACTATCTAAC	1	保守 DNA 模块阵列(MCA3)的一部分
ABRE	CACGTG/ ACGTG	4	参与脱落酸反应的顺式元件
AE-box	AGAAACTT	1	光响应模块的一部分
ARE	AAACCA	2	厌氧诱导所必需的顺式作用调节元件
ATCT-motif	AATCTAATCC	1	参与光响应的保守 DNA 模块的一部分
Box 4	ATTAAT	1	参与光响应的保守 DNA 模块的一部分
CAAT-box	CAAT/CAAAAT	56	启动子和增强子区域常见的顺式作用元件
CAT-box	GCCACT	2	参与分生组织表达调控元件
CGTCA-motif	CGTCA	1	参与 MeJA 反应的顺式作用元件
G-box	CACGTT/ TCCACATGGCA	6	参与光响应的顺式调节元件
GA-motif	ATAGATAA	1	光响应元件的一部分
GATA-motif	AAGATAAGATT/AAGGATAAGG	2	光响应元件的一部分
LTR	CCGAAA	3	参与低温响应的顺式作用元件
TATA-box	TATATAA/TATA	100	转录起始-30 核心启动子元件
I-box	cCATATCCAAT	1	光响应元件的一部分
TGACG-motif	TGACG	1	参与 MeJA 反应的顺式作用元件



M: Marker D2000; 1: PCR 产物。

M: Marker D2000; 1: PCR product.

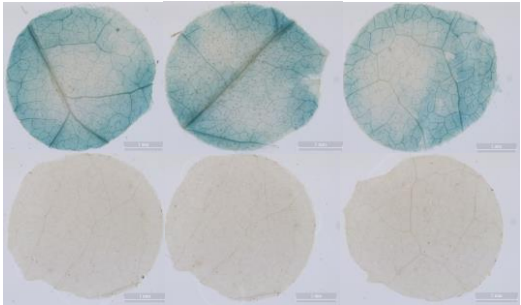
图 9 *StPYL5* 启动子 PCR 克隆产物

Fig.9 PCR cloned product of the *StPYL5* promoter



图 10 注射含 *StPYL5* 启动子菌液的烟草

Fig.10 Tobacco injected with bacterial solution containing the *StPYL5* promoter



pStPYL5

阴性对照

图 11 *StPYL5* 启动子活性鉴定

Fig.11 Identification of *StPYL5* promoter activity

3 讨论与结论

干旱、盐等一直以来严重制约农业生产,威胁人民粮食安全和基本粮食保障,尤其是水资源的短缺,导致农业产量的损失。根据 IWMi 数据^[21],农业用水消耗了人类用水的 70%,预计到 2025 年,农业需水量将增加 17%。在此情况下,研究者们将目光转向了从分子水平改变作物对干旱的耐受性以解决水资源短缺的问题。*AtPYL5* 在叶片和保卫细胞中高表达,表明 *AtPYL5* 可能通过参与调节气孔孔径,控制 CO_2 的吸收和水分的流失以提高植物对水分的利用效率^[22-23]。在本研究中,组织特异性分析发现 *StPYL5* 在马铃薯的茎和叶中高表达,说明 *StPYL5* 可能参与植物调节气孔孔径和蒸腾作用。

贾小霞等^[24]研究表明 *StPYL5* 在盐以及干旱胁迫后均下调表达,水分胁迫后表现出先升高后减低的趋势;玉米 *ZmPYL5* 在盐胁迫下下调表达^[25];甘蓝型油菜 *BnPYL9* 的表达水平受到干旱和盐的抑制^[26];葡萄 *VvPYL5* 在高盐和干旱胁迫下下调表达^[27]。本研究中 *StPYL5* 的表达受到盐和干旱的抑制,与前人研究结果相似,说明 *StPYL5* 可能在植物应对盐和干旱时发挥作用。水稻 *OsPYL10* 在冷胁迫后上调表达^[28],葡萄 *VaPYL3* 在冷胁迫后下调表达^[29],而本研究中 *StPYL5* 在冷处理后先上调表达后又下调表达,说明在不同物种中 *StPYL5* 表达模式和对逆境响应的多样性。PYL 作为 ABA 的直接受体,在 ABA 信号通路中发挥重要作用^[30-31]。研究发现外源施加 ABA 使玉米 *ZmPYL5* 在下调表达^[32];马铃薯 *StPYL5* 在 ABA 处理后同样下调表达^[24]。本研究中 *StPYL5* 的表达在 ABA 处理后呈现相同的下调趋势,表明 *StPYL5* 可能在 ABA 信号通路中发挥作用。此外本研究还用 MeJA 和 SA 对材料进行处理后发现, *StPYL5* 在处理均上调表达。而水稻 *OsPYL3* 在不同处理后干旱敏感型品种中被下调表达,在抗旱性材料中被诱导表达^[33]。本研究中, QS9 属于抗旱性材料 *StPYL5* 的表达受到 MeJA 和 SA 的诱导。因此, *StPYL5* 在不同胁迫处理后的差异提示其功能的多样性。

有研究^[24]表明,启动子和转录因子有助于基因功能的预测。本研究中 *StPYL5* 启动子中除了必须的 TATA-box、CAAT-box 外,还有参与光、激素、胁迫以及植物生长发育等相关应答元件。如 Kim 等^[15]研究发现由 *Zea mays* 泛素启动子驱动的 *OsPYL/RCAR5* 在水稻中的组成性表达诱导了许多胁迫应答基因的表达,从而提高了水稻对干旱和盐胁迫的耐受性,Chen 等^[34]研究发现 *OsPYL8* 和 *OsPYL9* 启动子包含多个参与胚乳特异性表达的基序等。说明 *StPYL5* 启动子可能也参与植物抗逆及生长生长发育等,具体功能有待后续实验验证。对启动子与转录因子结合位点预测发现, *pStPYL5* 与对 6 类转录因子(*bZIP*, *ERF*, *NAC*, *hB-othe*, *MYB* 和 *MYB-othe*) 结合。前人研究表明 *MYB* 参与调节植物次生产物的形成^[35]、*CBF* 基因冷调控和抗冻性调控^[36]、抗旱^[37]和耐盐^[38]等过程; *ERF* 在 ABA 信号通路中通过负调控因子参与种子萌发^[39]和胁迫响应^[40]等过程; *NAC* 则参与木质部的形成^[41]和次生壁的发育^[42]等; *hB-othe* 参与分生组织和叶片形态的调节^[43]等。 *pStPYL5* 可被这些转录因子结合暗示其可能参与调控植物生长发育以及应对逆境胁迫。

马铃薯 *StPYL5* 基因被不同胁迫诱导表达或抑制表达,说明 *StPYL5* 基因可能参与马铃薯对非生物胁迫的响应;组织特异性分析表明 *StPYL5* 还有可能参与调节气孔孔径和蒸腾作用,这还需要后续的试验印证此结果。因此, *StPYL5* 更深的作用机理还需进一步的试验验证。

本研究从马铃薯中成功克隆到 *StPYL5*,该基因全长 534 bp,共编码 177 个氨基酸。序列比对及蛋白保守结构域分析发现 *StPYL5* 具有 SRPBCC 超家族典型的疏水性配体结合结构域,系统进化分析显示 *StPYL5* 与 *SpPYL9-like* 亲缘关系较近。 *StPYL5* 在马铃薯的根、茎和叶中高表达,响应各种非生物胁迫。启动子活性鉴定结果显示 *StPYL5* 启动子具有活性。

参考文献 References:

- [1] 贺加永. 中国马铃薯产业发展现状及建议[J]. 农业展望, 2020, 16(9): 34-39.
HE J Y. Status quo and suggestions of China's potato industry development[J]. Agricultural outlook, 2020, 16(9): 34-39.
- [2] 刘昆, 曾荣耀, 蒋艺, 等. 秋播和冬播马铃薯品种筛选比较试验研究[J]. 中国种业, 2022(9): 98-101.
LIU K, ZENG R Y, JIANG Y, et al. Experimental study on selection and comparison of potato varieties between autumn sowing and winter sowing[J]. China seed industry, 2022(9): 98-101.
- [3] 范俊臣, 张之为. 超表达 *StRab5b* 基因对马铃薯耐盐生理特性的影响[J]. 山东农业科学, 2022, 54(9): 49-54.

- FAN J C, ZHANG Z W. Effects of overexpression of *SlRab5b* gene on salt tolerance of potato [J]. Shandong agricultural sciences, 2012, 54(9): 49-54.
- [4] 陈萌山, 王小虎. 中国马铃薯主食产业化发展与展望[J]. 农业经济问题, 2015, 36(12): 4-11.
- CHEN M S, WANG X H. Development and prospect of potato staple food industrialization in China [J]. Issues in agricultural economy, 2015, 36(12): 4-11.
- [5] 焦志丽. 马铃薯干旱危害及提高抗旱性的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2012.
- JIAO Z L. The research of potato drought damage and improve its drought resistance methods [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2012.
- [6] JENSEN C R, BATTILANI A, PLAUBORG F, et al. Deficit irrigation based on drought tolerance and root signalling in potatoes and tomatoes [J]. Agricultural water management, 2010, 98(3): 403-413.
- [7] 凌永胜. 泉州市冬种马铃薯2008年冷害浅析[J]. 福建农业科技, 2009(1): 25-26.
- LING Y S. Analysis on cold damage of winter potato in Quanzhou City in 2008 [J]. Fujian agricultural science and technology, 2009(1): 25-26.
- [8] 赵海红, 王士强, 胡喜平, 等. 9个马铃薯品种苏打盐碱适应性盆栽试验[J]. 中国马铃薯, 2010, 24(3): 129-132.
- ZHAO H H, WANG S Q, HU X P, et al. A pot experiment on the adaptability of nine potato varieties to soda salt and alkali [J]. Chinese potato journal, 2010, 24(3): 129-132.
- [9] SIRICHANDRA C, DAVANTURE M, TURK E B, et al. The *Arabidopsis* ABA-activated kinase OST1 phosphorylates the bZIP transcription factor ABF3 and creates a 14-3-3 binding site involved in its turnover [J]. Plos one, 2010, 5(11): e13935.
- [10] KIM T H, BÖHMER M, HU H H, et al. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling [J]. Annual review of plant biology, 2010, 61(1): 561-591.
- [11] HIROAKI F, VISWANATHAN C, AMERICO R, et al. In vitro reconstitution of an abscisic acid signalling pathway [J]. Nature, 2009, 462(7273): 660-664.
- [12] MELCHER K, NG L M, ZHOU X E, et al. A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors [J]. Nature, 2009, 462(7273): 602-608.
- [13] 封力. 棉花 (*Gossypium hirsutum*) *PYL* 基因的分离与鉴定 [D]. 武汉: 华中师范大学, 2016.
- FENG L. Isolation and characterization of *PYL* genes in cotton (*Gossypium hirsutum*) [D]. Wuhan: Central China Normal University, 2016.
- [14] REN C, KUANG Y, LIN Y, et al. Overexpression of grape ABA receptor gene *VaPYL4* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis* [J]. BMC plant biology, 2022, 22(1): 271.
- [15] KIM H, LEE K, HWANG H, et al. Overexpression of *PYL5* in rice enhances drought tolerance, inhibits growth, and modulates gene expression [J]. Journal of experimental botany, 2014, 65(2): 453-464.
- [16] SUN L, WANG Y P, CHEN P, et al. Transcriptional regulation of *SlPYL*, *SlPP2C*, and *SlSnRK2* gene families encoding ABA signal core components during tomato fruit development and drought stress [J]. Journal of experimental botany, 2011, 62(15): 5659-5669.
- [17] BAI G, YANG D H, ZHAO Y, et al. Interactions between soybean ABA receptors and type 2C protein phosphatases [J]. Plant molecular biology, 2013, 83(6): 651-664.
- [18] KIM H, HWANG H, HONG J W, et al. A rice orthologue of the ABA receptor, *OsPYL/RCAR5*, is a positive regulator of the ABA signal transduction pathway in seed germination and early seedling growth [J]. Journal of experimental botany, 2012, 63(2): 1013-1024.
- [19] RUIZ-PARTIDA R, ROSARIO S M, LOZANO-JUSTE J. An update on crop ABA receptors [J]. Plants, 2021, 10(6): 1087.
- [20] BAI G, XIE H, YAO H, et al. Genome-wide identification and characterization of ABA receptor *PYL/RCAR* gene family reveals evolution and roles in drought stress in *Nicotiana tabacum* [J]. BMC genomics, 2019, 20(1): 575.
- [21] PENNISI E. The blue revolution, drop by drop, gene by gene [J]. Science, 2008, 320(5873): 171-173.
- [22] DITTRICH M, MUELLER H M, BAUER H, et al. The role of *Arabidopsis* ABA receptors from the *PYR/PYL/RCAR* family in stomatal acclimation and closure signal integration [J]. Nature plants, 2019, 5(9): 1002-1011.
- [23] SANTIAGO J, RODRIGUES A, SAZE A, et al. Modulation of drought resistance by the abscisic acid receptor *PYL5* through inhibition of clade APP2Cs [J]. The plant journal, 2009, 60(4): 575-588.
- [24] 贾小霞, 齐恩芳, 马胜, 等. 马铃薯 *PYL* 基因家族的全基因组鉴定及表达分析 [J]. 作物学报, 2022, 48(10): 2533-2545.

- JIA X X, QI E F, MA S, et al. Genome-wide identification and expression analysis of potato *PYL* gene family[J]. *Acta agro-nomica Sinica*, 2021, 48(10): 2533-2545.
- [25] HE Z H, ZHONG J W, SUN X Y, et al. The maize ABA receptors *ZmPYL8*, *9*, and *12* facilitate plant drought resistance[J]. *Frontiers in plant science*, 2018, 9: 422.
- [26] DI F F, JIAN H J, WANG T Y, et al. Genome-Wide analysis of the *PYL* gene family and identification of *PYL* genes that respond to abiotic stress in *Brassica napus*[J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9(3): 156.
- [27] 马宗恒, 陈佰鸿, 李文芳, 等. 葡萄 *PYL* 基因家族的鉴定与表达分析[J]. *果树学报*, 2018, 35(3): 265-274.
- MA Z H, CHEN B H, LI W F, et al. Identification and expression analysis of *PYL* gene family in grape[J]. *Journal of fruit science*, 2018, 35(3): 265-274.
- [28] VERMA R K, SANTOSH K V V, YADAV S K, et al. Overexpression of ABA receptor *PYL10* gene confers drought and cold tolerance to indica rice[J]. *Frontiers in plant science*, 2019, 10: 1488.
- [29] REN C, KUANG Y F, LIN Y P, et al. Overexpression of grape ABA receptor gene *VaPYL4* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in *Arabidopsis*[J]. *BMC plant biology*, 2022, 22(1): 271.
- [30] MA Y, SZOSTKIEWICZ I, KORTE A, et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors[J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1064-1068.
- [31] PARK S Y, FUNG P, NISHIMURA N, et al. Absciscic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the *PYR/PYL* family of START proteins[J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1068-1071.
- [32] FAN W Q, ZHAO M Y, LI S X, et al. Contrasting transcriptional responses of *PYR1/PYL/RCAR* ABA receptors to ABA or dehydration stress between maize seedling leaves and roots[J]. *BMC plant biology*, 2016, 16: 99.
- [33] LENKA S K, MUTHUSAMY S K, CHINNUSAMY V, et al. Ectopic expression of rice *PYL3* enhances cold and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular biotechnol*, 2018, 60(5): 350-361.
- [34] CHEN Z Q, KONG L, ZHOU Y, et al. Endosperm-specific *OsPYL8* and *OsPYL9* act as positive regulators of the ABA signaling pathway in rice seed germination[J]. *Funct plant biology*, 2017, 44(6): 635-645.
- [35] CHEZEM W R, MEMON A, LI F S, et al. SG2-Type R2R3-MYB transcription factor *MYB15* controls defense-induced lignification and basal immunity in *Arabidopsis*[J]. *Plant cell*, 2017, 29(8): 1907-1926.
- [36] KIM S H, KIM H S, BAHK S, et al. Phosphorylation of the transcriptional repress *MYB15* by mitogen-activated protein kinase 6 is required for freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Nucleic acids research*, 2017, 45(11): 6613-6627.
- [37] DING Y, LIU N, VIRLOUVET L, et al. Four distinct types of dehydration stress memory genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *BMC plant biology*, 2013, 13: 229.
- [38] MA X Y, QIAO Z, CHEN D H, et al. CYCLIN-DEPENDENT KINASE G2 regulates salinity stress response and salt mediated flowering in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant molecular biology*, 2015, 88(3): 287-299.
- [39] SEO-WHA C, SEUL-BEE L, YEON-JU N, et al. *Arabidopsis MAP3K16* and other salt-inducible MAP3Ks regulate ABA response redundantly[J]. *Molecules and cells*, 2017, 40(3): 230-242.
- [40] CHOI D S, HWANG B K. Proteomics and functional analyses of pepper abscisic acid-responsive 1 (ABR1), which is involved in cell death and defense signaling[J]. *Plant cell*, 2011, 23(2): 823-842.
- [41] JERVIS J, HILDRETH S B, SHENG X Y, et al. A metabolomic assessment of *NAC154* transcription factor overexpression in field grown poplar stem wood[J]. *Phytochemistry*, 2015, 115: 112-120.
- [42] SAKAMOTO S, MITSUDA N. Reconstitution of a secondary cell wall in a secondary cell wall-deficient *Arabidopsis* mutant[J]. *Plant and cell physiology*, 2015, 56(2): 299-310.
- [43] MOHAMED E, CLAUDIO S. Structure and function of homodomain-leucine zipper (HD-Zip) proteins[J]. *Plant signaling & behavior*, 2009, 4(2): 86-88.