

苹果全基因组 *AHK* 家族成员鉴定及表达分析^①

鲍俊华, 李珂, 王程程, 张东

西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100

摘要: 通过生物信息学分析, 将从苹果全基因组中鉴定出的 11 个组氨酸激酶蛋白基因(*MdAHKs*)依次命名为 *MdAHK1*~*MdAHK11*, 依据是这些基因在染色体上的位置; 此外, 对 *MdAHK1*~*MdAHK11* 的理化特性、系统进化关系、蛋白基序及启动子元件进行了分析. *MdAHK* 编码的蛋白大小为 901~1 230 aa; 等电点介于 4.95 和 8.56 之间; 对蛋白保守基序的分析发现, *MdAHKs* 家族成员中有 4~10 个保守基序, 根据系统进化分析将 *MdAHKs* 家族 11 个成员分为了 A1, A2 和 A3 共 3 个亚家族. 此外, 利用 RT-qPCR 技术检测了试验材料苹果砧木“M9-T337”中 *MdAHKs* 在不同组织以及不定根发育不同时期的表达量; 结果发现 *MdAHKs* 家族中 *MdAHK1*, *MdAHK4*, *MdAHK5* 和 *MdAHK9* 在根、茎中高表达, 同时响应 6-BA 处理表达量显著下调, Lovastatin(细胞分裂素抑制剂)处理表达量呈上调趋势. 结合生物信息学分析和荧光定量结果推测 *MdAHK4*, *MdAHK5*, *MdAHK9* 可能在介导苹果砧木不定根的发育过程中发挥重要作用.

关键词: 苹果砧木; *MdAHK*; 不定根发育; 生物信息学

中图分类号: S661.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2021)09-0065-10

Genome-wide Identification and Expression Analysis of *AHK* Family Gene During Adventitious Root Development in Apple

BAO Junhua, LI Ke, WANG Chengcheng, ZHANG Dong

College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China

Abstract: In this study, a total of 11 histidine kinase protein (*AHK*) were identified from the apple genome by bioinformatics. According to the position of the gene in the chromosome, *MdAHK* genes were named *MdAHK1*-*MdAHK11*. Additionally, we further systematically analyzed its physical and chemical characteristics, evolutionary relationships, Protein motif and promoter elements. *MdAHK* proteins contained from 901 to 1230 amino acids and the isoelectric points is from 4.95 to 8.56. Conservative base sequence analysis showed that 4-10 conserved motifs existed in the *MdAHK* proteins. These genes could be classified into three subgroups(A1, A2 and A3) according to its homology by phylogenetic analysis. Additionally, ‘M9-T337’ apple rootstock were as material, fluorescence quantitative PCR confirmed the changes of *MdAHK* family genes expression in different tissues and different stages during adventitious root formation. The results showed that *MdAHK1*, *MdAHK4*, *MdAHK5* and *MdAHK9* of the *MdAHKs* family

① 收稿日期: 2020-08-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1000803); 陕西省科技统筹重点项目(2017NY0055); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-27); “仲英青年学者”项目.

作者简介: 鲍俊华, 硕士研究生, 主要从事砧木繁育及脱毒工作.

通信作者: 张东, 博士, 教授.

were highly expressed in roots and stems, and the expression level was significantly down-regulated in response to 6-BA treatment, and was significantly up-regulated under lovastatin (cytokinin inhibitor) treatment. The results of bioinformatics analysis and fluorescence quantitative analysis showed that *MdAHK4*, *MdAHK5* and *MdAHK9* might be involved in the regulation of adventitious root development of apple rootstock.

Key words: apple rootstock; *MdAHK*; adventitious root development; bioinformatic

苹果(*Malus domestica* Borkh.)作为一种世界性水果,栽培历史悠久,种植范围虽然广泛,但主要分布在温带地区^[1].世界苹果的种植栽培模式经历了3个阶段:乔化稀植→乔化密植→矮化密植^[2].目前,我国矮砧密植苹果园占比非常少,甚至不足10%,优良矮化砧木高效繁育技术体系尚未很好建立^[3-4].造成这一局面的原因是矮化砧木在实际生产中受不定根形成困难的限制,以至于矮化砧木目前多以中间砧的形式在苹果栽培上利用^[5].由此看来,苹果园的矮化集约栽培的关键在于矮化砧木的选用,因此加强无性砧木育种技术对促进我国矮化苹果的种植,提高果业效率,增加果农收入等具有重要意义^[6].

植物的根系是土壤和植物茎等地上部分进行物质交换的媒介^[7].植物的根系包含了主根、侧根和须根,此外,不定根也是植物根系的一部分.根系中不定根是在茎、叶或胚轴等组织发生的根,发生的位置并不固定^[8-9].不定根形成是薄壁细胞或根原基与维管束之间的细胞经过分化,随后经过薄壁细胞分裂增大形成形成层,而后不定根原基分化形成不定根^[10-11].研究发现苹果砧木 M9 不定根的发育可分为3个阶段:形成层细胞分裂阶段、不定根原基形成阶段和不定根原基分化形成不定根阶段^[11].多种因素可影响不定根发育,其中植物基因型是该生长发育过程的主要决定性影响因素^[12].此外,多种内源激素影响不定根的发生,如细胞分裂素(cytokinin, CTK),它的主要生理功能为促进细胞分裂,生长素(IAA)与细胞分裂素共同调控植物不定根的发生,两者对不定根发育具有相互拮抗作用^[13].在植物组织培养条件下,CTK/IAA 比值较大时不利于不定根的分化和形成,当 CTK/IAA 的比值较小时能有效地促进苹果砧木不定根的发生^[14].通过上述现象可以得知,细胞分裂素显著影响了苹果砧木不定根的发生.细胞分裂素信号转导途径是一种具有双组分的激素信号通路,组氨酸激酶(HK)是位于生物膜上的 CTK 信号受体,通过表达出组氨酸激酶蛋白参与非生物胁迫从而调控植物发育的过程^[15].在拟南芥中,有3个 *HK* 基因(*AHK4/CRE1/WOL*, *AHK2* 和 *AHK3*);玉米中有3个 *HK* 基因(*ZmHK1*, *ZmHK2* 和 *ZmHK3a*);水稻中有6个 *HK* 基因(*OsHK1~OsHK6*).它们的共同特点为结构保守,均含配体结合位点(ligand binding site)、激酶结构域(His kinase domain)和接收结构域(receiver domain)3个主要组成部分^[16-20].拟南芥中 *CRE1* 功能缺失,降低了对 CK 的敏感度^[18]; *AHK2* 超表达后提高了 CK 诱导基因的表达^[21]; *AHK2*, *AHK3* 和 *AHK4* 的单突到多突变体表型逐渐严重,尤其是同时缺失时对根的发育具有重要影响^[22-23].

总体而言,大量研究表明 *AHK* 在调节植物的生长发育方面具有重要作用,但对 *AHK* 家族基因分析和鉴定工作目前主要集中在拟南芥和水稻等模式植物上.苹果中 *MdAHK* 家族成员参与植物一些生长发育过程的原理尚未有试验明确说明,尤其是 *MdAHKs* 在调控苹果砧木不定根发育的过程尚未有人获得研究成果.因此本试验通过对苹果 *MdAHK* 家族成员进行系统鉴定并定量验证了 *MdAHKs* 各家族成员在“M9-T337”砧木不同组织(果、花、叶、茎、花芽、腋芽、侧根和须根)及不同时期的表达情况;进一步解析苹果中 *MdAHK* 的潜在功能,有助于开展 *MdAHK* 调控不定根发育的后续分子机理的研究,从而丰富调控不定根发育的理论依据.

1 试验材料

1.1 植物材料及处理方法

试验材料为“M9-T337”苹果砧木组培苗.设置组培环境为湿度70%~80%;昼间温度为(25±1)℃,夜间温度为(15±1)℃;光照16h和黑暗8h.基本培养基配方为MS+30g/L蔗糖+8g/L琼脂(pH值5.8);第1种对照培养基配方为基本培养基基础上另外加入0.5mg/L IBA;第2种6-BA处理的培养基配方为基本培养基中加入0.6mg/L的6-BA和0.5mg/L的IBA;第3种细胞分裂素抑制剂处理的培养基配方为基本培养基中加入0.5mg/L IBA和0.6mg/L细胞分裂素抑制剂(Lovastatin).后期的图表中分别以

I,I+6-BA 和 I+Lov 表示上述 3 种处理。

取样的时间分为 5 个时期,即不定根发育 1 d,3 d,7 d,11 d 和 19 d,每种试验处理和各个取样时期分别设有 3 个生物学重复。每次取样时需要 50 株苹果组培苗,要求这些苹果组培苗的生长状态良好且相似,样品选取完成后,在每个组培苗样品茎的基部位置(长度约 0.5 cm)取试验材料。此外,在国家苹果改良中心杨凌分中心种质资源圃采集“M9-T337”植株不同部位组织(侧根、侧根上的细小根毛、茎、叶、花、果、花芽和腋芽)用于组织特异性表达分析。将上述采集的所有试验材料均放入液氮进行冷冻处理,保存在-80℃的超低温冰箱内以便接下来的试验使用。

1.2 试验方法

1.2.1 苹果 *MdAHKs* 基因鉴定及系统进化分析

登录拟南芥生物信息资源官方网站(TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>),在该信息资源网站上直接下载拟南芥组氨酸激酶蛋白的一级结构序列,之后可以直接访问 NCBI(https://www.rosaceae.org/tools/ncbi_blast),然后以拟南芥 AHKs 氨基酸序列搜索苹果序列,两者进行分析和对比,去除其中的相同序列部分,于是在整个苹果基因组中还剩下 11 个 *MdAHK* 基因。根据这 11 个基因在染色体上的位置,将这 11 个 *MdAHK* 基因按次序命名。

下载拟南芥和苹果蛋白序列构建系统进化树,选用 MEGA5.10 软件^[24]进行分析;进化树生成算法采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ),校验参数 Bootstrap 设置为 1 000,缺口设置“complete deletion”,模式采用“poisson correction”,具体参数设置参考前人的研究方法^[25]。

1.2.2 苹果 *MdAHKs* 保守基序及启动子顺式元件分析

登录在线的 MEME 数据库(<http://meme.nbcr.net/meme/>),在该数据库中下载 AHK 蛋白的保守基序。基序的数量参数设置为 10,其余的参数为默认。在 PlantCARE 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析 *MdAHK* 基因转录区域的起始位置上游 1 500 bp 的基因序列区域启动子顺式作用元件^[26]。

1.2.3 苹果基因型及组织表达分析

登录 GEO 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; 登录号: GSE42873),在该数据库上下载苹果 10 个不同基因型(M67,M74,M20,M49,M14,GD,X8877,X442×X2596,X4102 和 X3069×X922)在苹果不同组织(花、果、幼苗、种子、叶、根和茎)中的基因表达量,并将得到的基因表达数据利用 MEV4.9.0 软件制图。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)分析

利用实时荧光定量 PCR 技术可测定苹果 *MdAHK* 家族的每个成员在组培条件下“M9-T337”砧木的不同组织(茎、叶、花、果、花芽、腋芽、侧根和须根以及不定根)发育的 5 个时期(1 d,3 d,7 d,11 d 和 19 d)的表达模式并进行分析。利用 Primer premier 6.0 软件,设计基因的特异性定量引物(表 1),苹果内参基因特异性引物(EF-1 α -F: 5'-ATTCAAGTATGCCTGGGTGC-3'; EF-1 α -R: 5'-CAGTCAGCCTGTGATGT-TCC-3')的分析方法参照前人的研究^[27]。

表 1 *MdAHK* 基因实时定量 PCR 引物

基因名称	上游引物(5'~3')	下游引物(5'~3')
<i>MdAHK1</i>	GAGCAACAATCAAGCATCC	ATCAGCCACAGCAATCAC
<i>MdAHK2</i>	CGGAATCGGAATACCAGAA	CCATTAGAAGAGAACAGAGAAC
<i>MdAHK3</i>	GGAATAGGATTGAGCATTAGC	GAAGTAGCCACGAGAAGTAT
<i>MdAHK4</i>	TGTGTTGGTAGTGGTTGAT	TGATGCTATGACTTGCTAAC
<i>MdAHK5</i>	GCTTCAATTACCGCACAAT	TCCTCCATTCTCAACAT
<i>MdAHK6</i>	CGATAGATGTTGAGACTGAATC	TTCTACTCCTGTGTCTCTC
<i>MdAHK7</i>	GGTTCTCTGTTCTCTTCTAATG	TTGGTTCCGATAATGTCTCA
<i>MdAHK8</i>	GGCTACTTACCATACTGACAT	CTGTGCTGCTGTTATCTCA
<i>MdAHK9</i>	GCTTCAATTACCGCACAAT	CCACCATTTCGTCTCAACA
<i>MdAHK10</i>	GAGGACACAGGAGTAGGAA	CCAATCTTCGGAATGCTAAC
<i>MdAHK11</i>	CTATCGTAAGATGATGGAAGTC	CAGCATAGTCCTGTTGGTT
<i>Actin</i>	ATTCAAGTATGCCTGGGTGC	CAGTCAGCCTGTGATGTTCC

以上述的各种组织材料所提取的 RNA 进行反转录即可直接得到反应材料 cDNA, 以此 cDNA 为 qPCR 模板, 利用实时荧光定量 PCR 试剂盒在实时荧光定量 PCR 仪上进行 RT-qPCR 试验. 反应体系见表 2.

表 2 实时荧光定量 PCR 反应体系

试 剂	体 积/ μL
SYBR Premix ExTaq II	5.0
cDNA	1.0
Forward-引物	0.5
Reverse-引物	0.5
ddH ₂ O	3.0

反应程序为: 95 ℃ 预变性 3 min, 94 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 复性 20 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 40 个循环. 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因的相对表达量^[28].

利用 Excel 2010 和 SPSS 17.0 软件对 RT-qPCR 的测定结果数据进行整理, 每组数据在 t-test 为 0.05 水平上进行统计分析, 最后通过 SigmaPlot 13.0 软件进行图表绘制.

2 结果与分析

2.1 苹果 MdAHK 基因家族成员鉴定和理化特性分析

通过生物信息学的分析, 苹果全基因组中共鉴定出 11 个属于 MdAHK 基因这一家族的基因, 并将它们依据其染色体位置依次命名为 MdAHK1~MdAHK11. MdAHK 家族的 11 个成员分别定位到了 2 号、8 号、9 号、11 号、13 号、15 号、16 号和 17 号染色体上. 其中有 3 个染色体(13、15 和 16 号)上分别定位了 2 个基因, 而其他的染色体分别定位了 1 个基因. 此外, MdAHK 的 CDS 序列为 2 706 ~3 693 bp, 其中, MdAHK4 的蛋白质编码区序列最短, 为 2 706 bp, MdAHK1 的蛋白质编码区序列最长, 达到 3 690 bp. MdAHK 蛋白氨基酸长度为 901(MdAHK4)~1 230(MdAHK8). MdAHK 分子量为 10 049.36 ~138 022.11 Da, 其中 MdAHK4 的分子量最小, MdAHK1 分子量最大. MdAHK 蛋白的等电点为 4.95(MdAHK7)~8.56(MdAHK10). 在 11 个苹果 AHK 蛋白家族中, 不稳定性指数为 37.77(MdAHK8)~50.70(MdAHK7), 均大于 35, 说明它们是不稳定性蛋白. MdAHK 蛋白的亲水指数最小为 -0.601(MdAHK7), 最大为 -0.094(MdAHK10), 亲水指数越小的蛋白亲水性越强, 疏水性越弱(表 3).

表 3 MdAHK 基因家族

基因名称	基因登录号	染色体位置	编码区 长度 /bp	氨基酸 长度 /aa	基因链	分子量 /DMWA	亲水 指数	等电点	不稳定性 系数 II	脂肪族氨 基酸指数 (AI)
MdAHK1	MD02G1128300	Chr02: 10371196..10377110	3 690	1 229	—	138 022.11	-0.316	6.96	39.30	86.63
MdAHK2	MD08G1047400	Chr08: 3585752..3590654	3 075	1 024	+	115 089.49	-0.579	4.96	49.66	77.11
MdAHK3	MD09G1121900	Chr09: 9395362..9403547	3 684	1 227	—	137 245.82	-0.171	6.43	41.40	90.63
MdAHK4	MD11G1315000	Chr11: 42723278..42727157	2 706	901	—	100 049.36	-0.294	7.23	38.58	90.31
MdAHK5	MD13G1017000	Chr13: 1092724..1098104	3 027	1 008	+	112 239.17	-0.137	6.64	39.26	89.00
MdAHK6	MD13G1120900	Chr13: 8883411..8889878	3 120	1 039	+	116 038.31	-0.106	7.85	41.69	91.66
MdAHK7	MD15G1046500	Chr15: 3187188..3192778	3 057	1 018	—	114 608.72	-0.601	4.95	50.70	76.60
MdAHK8	MD15G1243500	Chr15: 19999610..20005701	3 693	1 230	—	137 790.01	-0.284	6.54	37.77	88.55
MdAHK9	MD16G1014900	Chr16: 1165319..1171015	3 027	1 008	+	112 055.84	-0.145	7.34	38.06	89.29
MdAHK10	MD16G1120900	Chr16: 8700835..8707495	3 081	1 026	+	114 136.21	-0.094	8.56	42.56	91.77
MdAHK11	MD17G1113000	Chr17: 9662143..9670375	3 681	1 226	—	136 519.79	-0.148	6.27	40.25	92.06

2.2 苹果 MdAHK 基因系统进化及保守基序分析

利用苹果中鉴定出的 MdAHK 蛋白(11 个)的蛋白序列和拟南芥中的 AHK(5 个)的蛋白序列构建系统进化树, 并将其分为 A1, A2 和 A3 共 3 个蛋白序列亚组, 其中 A1 和 A2 分别包含 6 条蛋白序列, A3 含有 4 条蛋白序列(图 1). 由图 1 可知, 苹果中 MdAHK1, MdAHK8 与拟南芥中 AHK1 同源性较高, 可能存

在相似的功能; 苹果中 *MdAHK2*, *MdAHK7* 与拟南芥中 *AHK5* 同源性较高; *MdAHK4*, *MdAHK5*, *MdAHK9* 与拟南芥中 *AHK4* 同源性较高, *MdAHK3*, *MdAHK11* 与拟南芥中 *AHK2* 同源性较高; *MdAHK6*, *MdAHK10* 与拟南芥中 *AHK3* 同源性较高可能具有相似的功能. 上述的系统进化关系分析结果为后续开展苹果中 *MdAHKs* 家族基因的研究提供参考依据.

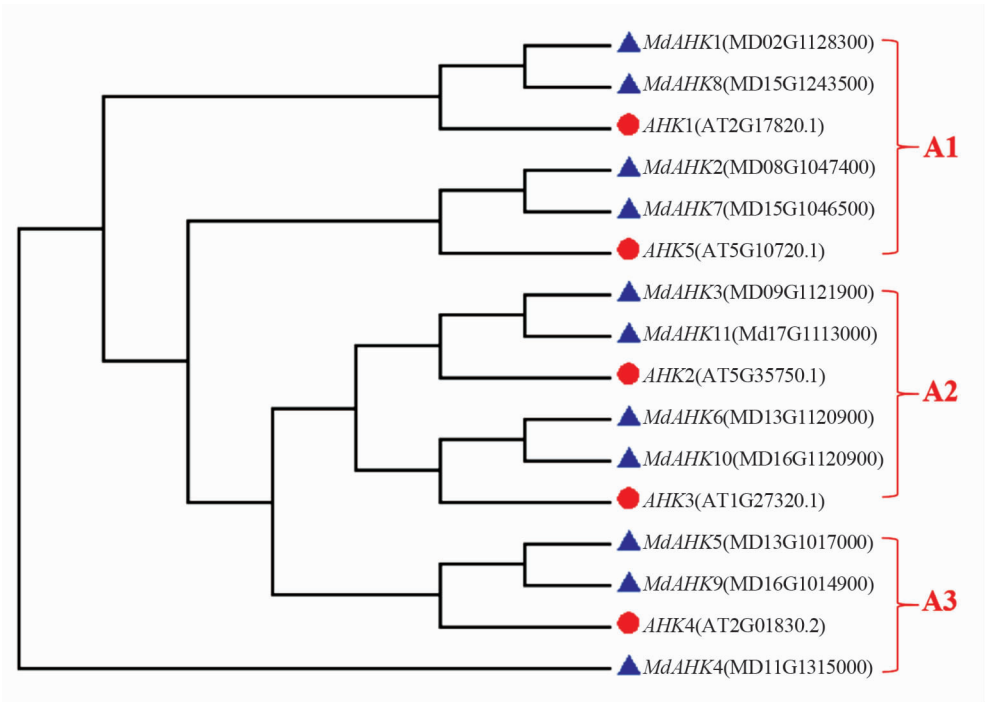


图 1 苹果(Md)和拟南芥(At)AHK 蛋白的系统进化树

保守基序分析发现, 11 个 *MdAHK* 基因的保守基序数量在 4~10 之间不等, 其中保守基序数量最少的 *MdAHK4* 只有 4 个保守基序, *MdAHK1* 和 *MdAHK8* 保守基序数均为 6 个, *MdAHK2* 和 *MdAHK7* 具有 7 个保守基序. 而其他 *MdAHK* 成员具有 10 个保守基序(图 2).

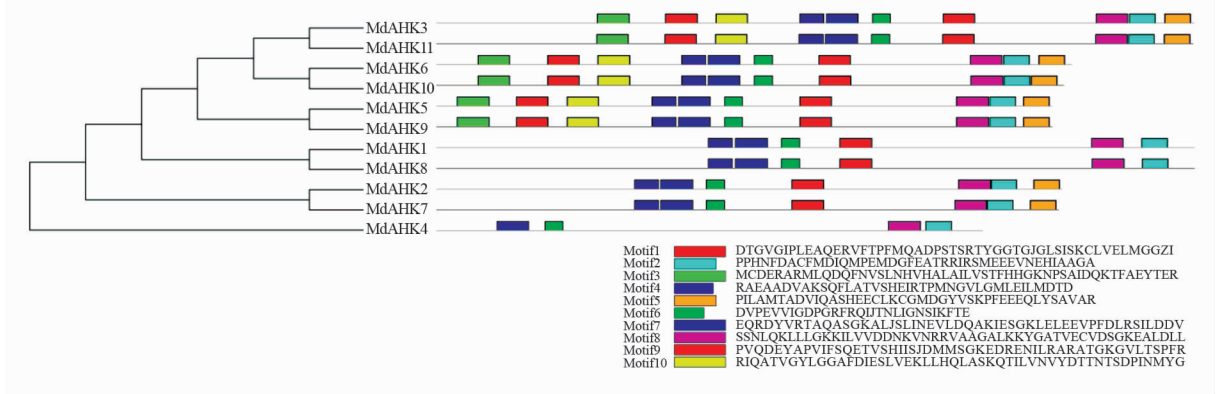


图 2 *MdAHK* 蛋白基序示意

2.3 苹果 *MdAHK* 基因家族启动子元件分析

通过对 *MdAHK* 基因家族转录起始位置上游 1 500 bp 的启动子序列进行启动子元件分析, 搜索其顺式作用元件的种类及其数量, *MdAHK* 启动子共鉴定筛选出 9 种顺式作用元件, 其中包括光信号、赤霉素、茉莉酸甲酯、玉米素、生长素、脱落酸、水杨酸和胁迫反应等相关的顺式作用元件. 而且每个 *MdAHK* 基因启动子对应的顺式作用元件种类和数目均存在较大的差异. 其中 *MdAHK5*, *MdAHK6*, *MdAHK8* 和 *MdAHK9* 的顺式作用元件最少, 只有 14 个; *MdAHK7* 顺式作用元件数量最多, 有 27 个; 其余成员基因的顺式作用元件数量介于 17 和 25 个之间(表 4).

表 4 *MdAHK* 基因启动子的顺式作用元件

基因名称	茉莉酸 甲酯	胁迫	赤霉素	水杨酸	生长素	脱落酸	分生 组织	光信号	玉米素 代谢	总数
<i>MdAHK1</i>	2	4	0	1	0	0	0	6	5	18
<i>MdAHK2</i>	4	3	0	1	2	1	0	7	3	21
<i>MdAHK3</i>	0	4	0	2	3	2	3	6	2	22
<i>MdAHK4</i>	0	3	0	1	1	5	0	12	3	25
<i>MdAHK5</i>	0	2	1	3	0	1	0	6	1	14
<i>MdAHK6</i>	2	0	1	0	1	0	1	4	5	14
<i>MdAHK7</i>	6	5	1	0	0	2	0	8	5	27
<i>MdAHK8</i>	2	3	0	0	0	0	1	6	2	14
<i>MdAHK9</i>	0	1	1	2	0	2	0	7	1	14
<i>MdAHK10</i>	0	1	2	0	0	2	0	7	5	17
<i>MdAHK11</i>	4	2	2	2	1	0	1	5	2	19

2.4 *MdAHK* 在不同品种和不同器官中的表达

为了初步验证预测结果，探究苹果 *MdAHK* 基因家族各个成员在不同组织中的表达量，从 GEO 数据库提取并下载了来自于 10 个基因型的苹果不同组织(花、果、幼苗、种子、叶、根和茎)中的表达量。总体的结果分析如图 3 所示，其中 11 个 *MdAHKs* 基因在 M49 叶、M20 幼果、M74 花和 M74 果中均具有较高的表达，而在 M14 叶、X442×X2596 种子和 X3069×X922 种子中的表达量相对较低。其中 *MdAHK1*，*MdAHK8*，*MdAHK10* 在 M20 幼果、M74 花、M74 果中高表达，*MdAHK5*，*MdAHK9* 在根和茎中低表达。值得一提的是，本研究主要是针对苹果砧木不定根发育研究，应重点分析和关注不同基因在苹果砧木根和茎生长发育过程中的表达情况。通过图 3 的结果显示，其中 *MdAHK4*，*MdAHK5* 和 *MdAHK9* 在根(GD 和 X8877)和茎(GD 和 X8877)中的表达水平相对高于其他家族成员。这也预示 *MdAHK4*，*MdAHK5* 和 *MdAHK9* 基因在调控苹果根发育方面可能存在着潜在功能。这些结果为进一步研究 *MdAHK* 基因的功能提供了参考依据。

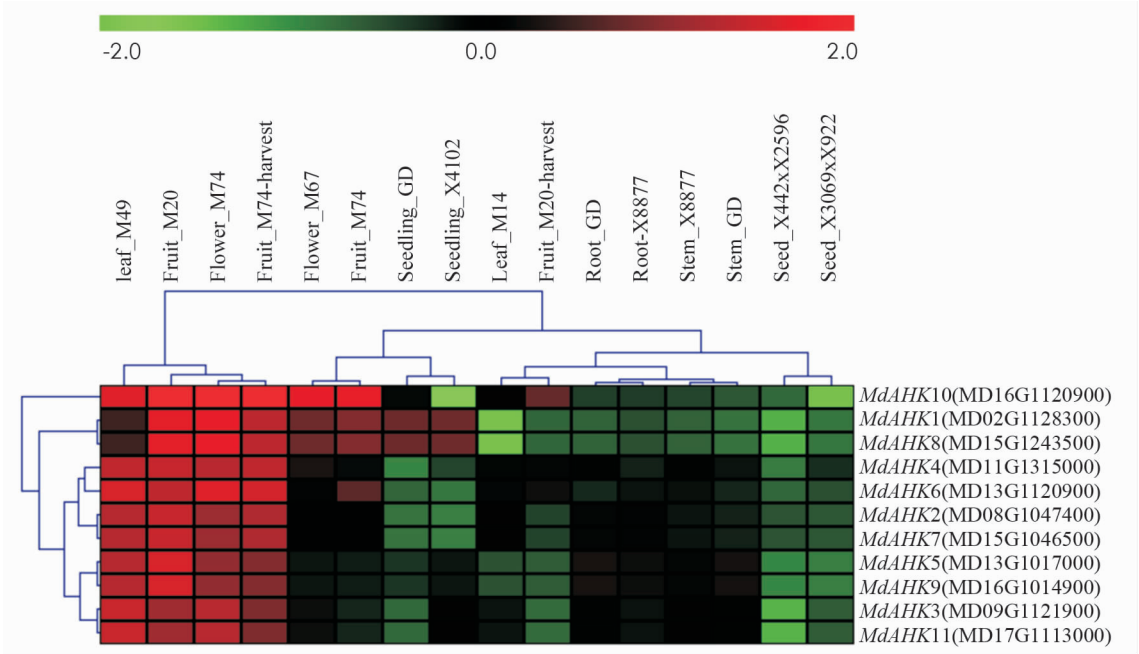
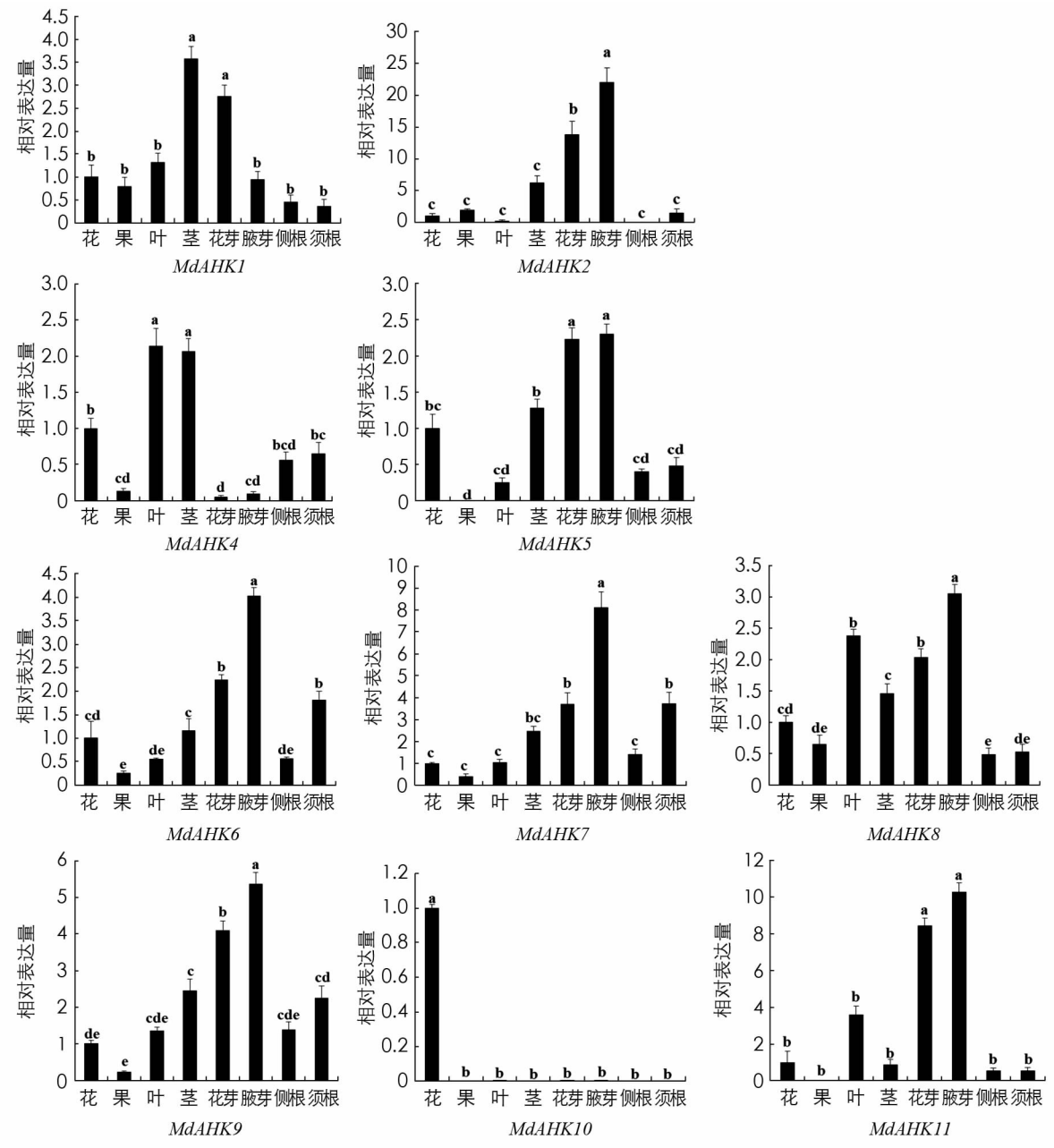


图 3 *MdAHK* 在苹果不同品种(M67, M74, M20, M14, M49, GD, X8877, X442×X2596, X4102 和 X3069×X922)不同器官中的表达情况

2.5 *MdAHK* 在苹果砧木“M9-T337”不同组织部位的表达

以砧木“M9-T337”为试验材料，测定了苹果 *MdAHKs* 在果、花、叶、茎、花芽、腋芽、侧根和须根中的表达模式，可将其大致分为 5 类。第 1 类：*MdAHK10* 在花中表达量最高，而在其他组织部位的表达量

较低或不表达;第 2 类: *MdAHKs* 所有家族成员均可以在果实中表达但在果实中仅具有较低的表达水平,其中 *MdAHK5*,*MdAHK11* 在果实中甚至不表达,但在苹果的腋芽和花芽中的表达较高且显著高于其他组织部位;第 3 类: *MdAHK2*,*MdAHK6*,*MdAHK7* 和 *MdAHK9* 在苹果腋芽和花芽中的表达水平较高,而在其侧根和须根中表达量较低;第 4 类: *MdAHK8* 在腋芽中的表达量最高,其次是在叶中高表达,而在茎、侧根和须根中表达量较低;第 5 类: *MdAHK1* 和 *MdAHK4* 在茎中具有较高表达水平,其中 *MdAHK4* 在叶中同样高表达,而在其他组织中的表达量较低(图 4)。



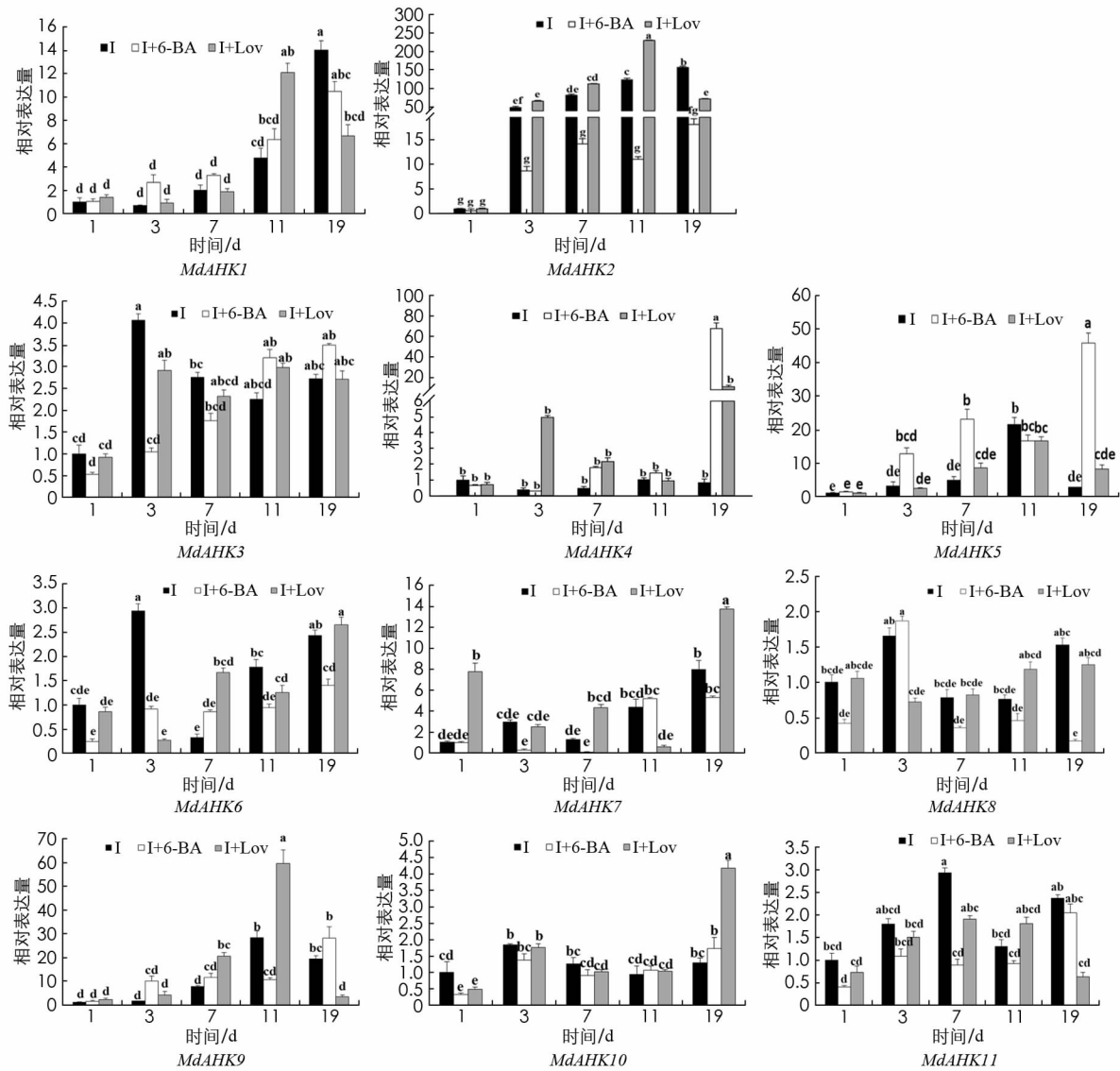
不同小写字母表示差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 4 *MdAHKs* 在“M9-T337”组培苗不同组织部位的表达量

2.6 *MdAHK* 在苹果砧木“M9-T337”不定根发育过程中的表达

试验测定了“M9-T337”苹果砧木组培苗在不同处理条件下的 1 d,3 d,7 d,11 d,19 d 时各基因的表达情况,总体的表达趋势可分为 5 大类.第 1 类:在 IBA 处理下, *MdAHK1* 和 *MdAHK7* 在不定根发育 19 d 时表达量最高, *MdAHK1* 在不定根发育 19 d 时的表达显著高于经过 IBA + Lov 处理下的表达量, *MdAHK7* 在不定根发育 19 d 时的表达量显著低于 IBA + Lov 处理下的表达量;第 2 类:在不定根发育 1~

11 d 内, 3 种处理下的 *MdAHK4*, *MdAHK10* 表达量较低且两者之间差异无统计学意义, 而在不定根发育 19 d 时, *MdAHK4* 在 IBA+6-BA 处理下的表达量显著高于 IBA 和 IBA+Lov 处理, 此外, IBA+Lov 处理下, *MdAHK10* 的表达量显著高于经过 IBA 和 IBA+6-BA 处理的砧木; 第 3 类: IBA+6-BA 处理下, *MdAHK2* 的表达量较低且差异无统计学意义, 而在 IBA 和 IBA+Lov 处理下的表达量显著高于 IBA+6-BA 处理; 第 4 类: 在 IBA+6-BA 处理下, *MdAHK5*, *MdAHK9* 和 *MdAHK11* 在不定根发育 19 d 时表达量最高; 第 5 类: 在 IBA 对照处理下, *MdAHK3*, *MdAHK6* 和 *MdAHK8* 在不定根发育 3 d 时表达量最高, 且高于 IBA+6-BA 处理, 差异有统计学意义(图 5).



相同处理不同时间条件下, 不同小写字母表示差异有统计学意义($p < 0.05$).

图 5 *MdAHKs* 在“M9-T337”砧木不定根发育不同时期的表达量

3 结论与讨论

细胞分裂素在植物根系发育过程中发挥着重要功能, 主要通过抑制不定根原基的萌发来抑制不定根的发生。目前在拟南芥中已经成功地发现了 3 个组氨酸蛋白激酶(AHK), 它们都参与了拟南芥中细胞分裂素的激素信号转导过程^[18]. *AHKs* 已经在拟南芥中被证明仅仅是一类功能冗余的 CTK 信号转导途径的正调节因子^[29], 而且 *AHKs* 启动子上富含激素及胁迫响应进而参与调控植物生长发育^[19]. 又因主根、侧根和不定根组织结构与生理功能的相似性, 因此开展不定根发生的分子机制研究更倾向在侧根基础上开展^[30].

此外,在拟南芥中的研究发现组氨酸激酶 *AHK4* 作为受体蛋白能够有效介导 CTK 信号的产生和感应^[31]. 苹果中的 *MdAHK* 家族成员与拟南芥中的 *AHK* 基因的同源性越高推测其功能越相似,因此推测本研究中与 *AtAHK4* 同源性较高的基因(*MdAHK4*,*MdAHK5*,*MdAHK9*)可能通过介导细胞分裂素信号的产生参与不定根发育的调控. 结合 RT-qPCR 结果对可能参与调控不定根发生的 *MdAHK* 关键基因进行初步筛选. 组织特异性表达分析发现, *MdAHK2*,*MdAHK5*,*MdAHK6*,*MdAHK7*,*MdAHK8*,*MdAHK9* 和 *MdAHK11* 在腋芽和花芽中高表达,在须根和侧根中低表达, *MdAHK10* 只在花中高表达,只有 *MdAHK1* 和 *MdAHK4* 在茎中的表达量最高且与其他组织之间差异有统计学意义,而不定根原基形成的主要组织又位于茎基部,因此推测 *MdAHK1*,*MdAHK4* 可能参与调控不定根原基的形成. 不定根发育过程中 *MdAHK3*,*MdAHK7* 和 *MdAHK10* 的表达量不受 IBA+6-BA 处理和 IBA+Lov 处理的影响,可以初步推测它们有可能不参与调控不定根生长发育的过程. IBA+6-BA 处理和 IBA+Lov 处理都促进了 *MdAHK4* 在不定根发育 19 d 时的表达,同时也抑制了 *MdAHK6* 在诱导期时的表达;IBA+6-BA 处理促进了 *MdAHK5* 在不定根发育 7 d 和 19 d 时的表达,同时抑制了 *MdAHK1* 在不定根发育 19 d 时的表达;IBA+Lov 处理促进了 *MdAHK1* 在不定根发育 11 d 时的表达,但抑制 *MdAHK9* 在不定根发育 19 d 时的表达. 初步分析判定 *MdAHK1*,*MdAHK4*,*MdAHK5*,*MdAHK9* 参与调节不定根的发育过程且主要在不定根的伸长生长期发挥作用,而只有 *MdAHK6* 在不定根形成的诱导期发挥作用. 综上所述,推测 *MdAHK1*,*MdAHK4*,*MdAHK5*,*MdAHK6* 和 *MdAHK9* 可能参与调节不定根发育.

通过启动子顺式元件分析可知, *MdAHKs* 中存在 9 种顺式作用元件,表明其家族的每一个成员不仅受到外界环境,如冷、光、干旱等的影响,而且还受多种激素,如脱落酸(ABA)、生长素(IAA)、茉莉酸(JA)、赤霉素(GA)等的影响和调控,进而参与苹果砧木不定根的生长发育过程. 此外, *MdAHK* 家族成员 *MdAHK4* 与拟南芥 *AtAHK4* 同源性较高,且该基因在茎中的表达水平较高,结合 GEO 数据库中下载的基因表达数据可知 *MdAHK5*,*MdAHK9* 在根、茎中同样高表达. 综上研究结果推测 *MdAHK4*,*MdAHK5*,*MdAHK9* 可能参与调控不定根的生长发育. 本研究对苹果中 *MdAHKs* 家族成员进行了系统鉴定并对其调控不定根的关键成员进行了初步筛选,但具体的功能还需后期深入研究.

参考文献:

- [1] LI K, LIU Z, XING L, et al. MiRNAs Associated with Auxin Signaling, Stress Response, and Cellular Activities Mediate Adventitious Root Formation in Apple Rootstocks [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 139: 66-81.
- [2] 孙建设. 我国苹果栽培模式的沿革与思考 [J]. *农民科技培训*, 2008(2): 22-24.
- [3] LI B Z, WANG J F, REN X F, et al. Root Growth, Yield and Fruit Quality of 'Red Fuji' Apple Trees in Relation to Planting Depth of Dwarfing Interstock on the Loess Plateau [J]. *European Journal of Horticultural Science*, 2015, 80(3): 109-116.
- [4] 李丙智, 韩明玉, 张林森, 等. 我国苹果矮化砧木应用现状及适应性调查 [J]. *果农之友*, 2010(2): 35-36.
- [5] 沙广利, 郝玉金, 万述伟, 等. 苹果砧木种类及应用进展 [J]. *落叶果树*, 2015, 47(3): 2-6.
- [6] 杨俊霞, 马建芳, 王 沛. 苹果矮化自根砧脱毒苗木组培最适扩繁培养基的筛选试验 [J]. *中国园艺文摘*, 2017, 33(11): 42-43.
- [7] 凌启鸿, 凌 励. 水稻不同层次根系的功能及对产量形成作用的研究 [J]. *中国农业科学*, 1984, 17(5): 3-11.
- [8] STEVENS M E, WOESTE K E, PIJUT P M. Localized Gene Expression Changes during Adventitious Root Formation in Black Walnut (*Juglans nigra* L.) [J]. *Tree Physiology*, 2018, 38(6): 877-894.
- [9] 彭玉全, 朱 进, 李文静, 等. 淹水胁迫对嫁接苦瓜幼苗生长、生理特性及不定根解剖结构的影响 [J]. *植物生理学报*, 2019, 55(6): 756-766.
- [10] 徐 麟. 多能性根原基细胞: 不定根和不定芽再生的机制研究 [C]//长三角植物科学研讨会暨青年学术报告会摘要集. 上海: 第七届长三角植物科学研讨会暨青年学术报告会, 2018.
- [11] 余 亮, 王 飞. 苹果砧木 M9 快繁技术的建立及试管苗生根进程解剖研究 [J]. *西北林学院学报*, 2013, 28(4): 106-110.
- [12] 张生学. 不同基因型甜菜叶柄直接再生体系的建立及影响因素的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [13] WANG J X, YAN X L, PAN R C, et al. Relationship Between Adventitious Root Formation and Plant Hormones [J].

- Plant Physiology Communications, 2005, 41(2): 133-142.
- [14] ZHANG J, ZHANG X, WANG Y, et al. The Dynamic Changes of Endogenous Hormones in the Process of Adventitious Root Formation for Seabuckthorn Cutting Seedling [J]. Global Seabuckthorn Research & Development, 2014(2): 8-14.
- [15] HWANG I, CHEN H C, SHEEN J. Two-Component Signal Transduction Pathways in Arabidopsis [J]. Plant Physiology, 2002, 129(2): 500-515.
- [16] UEGUCHI C, KOIZUMI H, SUZUKI T, et al. Novel Family of Sensor Histidine Kinase Genes in Arabidopsis Thaliana [J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42(2): 231-235.
- [17] HAN Q M, JIANG H W, QI X P, et al. A CHASE Domain Containing Protein kinase OsCRL4, Represents a New At-CRE1-Like Gene Family in Rice [J]. Journal of Zhejiang University-SCIENCE A, 2004, 5(6): 629-633.
- [18] INOUE T, HIGUCHI M, HASHIMOTO Y, et al. Identification of CRE1 as a Cytokinin Receptor from Arabidopsis [J]. Nature, 2001, 409(6823): 1060-1063.
- [19] SUN L J, ZHANG Q, WU J, et al. Two Rice Authentic Histidine Phosphotransfer Proteins, OsAHP1 and OsAHP2, Mediate Cytokinin Signaling and Stress Responses in Rice [J]. Plant Physiology, 2014, 165(1): 335-345.
- [20] YONEKURA-SAKAKIBARA K, KOJIMA M, YAMAYA T, et al. Molecular Characterization of Cytokinin-Responsive Histidine Kinases in Maize. Differential Ligand Preferences and Response to Cis-Zeatin [J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1654-1661.
- [21] HWANG I, SHEEN J. Two-Component Circuitry in Arabidopsis Cytokinin Signal Transduction [J]. Nature, 2001, 413(6854): 383-389.
- [22] HIGUCHI M, PISCHKE M S, MÄHÖNEN A P, et al. In Planta Functions of the Arabidopsis Cytokinin Receptor Family [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(23): 8821-8826.
- [23] NISHIMURA C, OHASHI Y, SATO S, et al. Histidine Kinase Homologs That Act as Cytokinin Receptors Possess Overlapping Functions in the Regulation of Shoot and Root Growth in Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2004, 16(6): 1365-1377.
- [24] 王小非, 刘 鑫, 苏 玲, 等. 番茄 LBD 基因家族的全基因组序列鉴定及其进化和表达分析 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(12): 2501-2513.
- [25] 未 魏. 野生草莓 WRKY 和 MAPK 基因家族鉴定、表达及 FvWRKY42 基因功能研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [26] 李 珂, 刘 桢, 雷 超, 等. 苹果全基因组 CRF 家族成员鉴定及在不定根发育过程中的表达分析 [J]. 园艺学报, 2018, 45(4): 627-640.
- [27] 陈鸿飞, 邵红霞, 樊 胜, 等. 苹果全基因组多聚半乳糖醛酸酶基因家族的鉴定及进化分析 [J]. 园艺学报, 2016, 43(10): 1863-1877.
- [28] 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 [J]. Methods (San Diego, Calif), 2001, 25(4): 402-408.
- [29] SUZUKI T, MIWA K, ISHIKAWA K, et al. The Arabidopsis Sensor His-Kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins [J]. Plant and Cell Physiology, 2001, 42(2): 107-113.
- [30] 胥 猛. 杨树不定根发育的基因表达调控研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- [31] MÄHÖNEN A P, BISHOPP A, HIGUCHI M, et al. Cytokinin Signaling and Its Inhibitor AHP6 Regulate Cell Fate during Vascular Development [J]. Science, 2006, 311(5757): 94-98.

责任编辑 王新娟