

红阳猕猴桃 *SnRK1* 的克隆及其在果实中的表达分析

蒋开秀^{1,2}, 刘林娅², 何 斌², 宋姝熠², 龚小见^{1*}, 黄亚成^{2*}

1. 贵州师范大学贵州省山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室, 贵州贵阳 550001; 2. 六盘水师范学院生物科学与技术学院, 贵州六盘水 553004

摘 要: 红阳猕猴桃属于我国自主培育的优良品种, 具有独特的红色性状和高糖低酸特性, 因其香气浓郁, 味道独特而备受欢迎。其果实的生长发育受到多种因素的影响, 其中植物的蔗糖非发酵-1-相关蛋白激酶 1 (SnRK1) 在调控碳水化合物代谢以及应对生物和非生物胁迫方面起重要的开关作用。因此, 本研究以红阳猕猴桃为材料, 克隆得到红阳猕猴桃 SnRK1 家族 2 个基因的全长 cDNA, 分别命名为 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2*, 利用生物信息学方法分析 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的理化性质、基因结构、保守基序、蛋白保守结构域及顺式作用元件等, 并采用实时荧光定量检测 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在不同组织和果实不同处理下的表达特性。结果表明: *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因分别含有 1548、1545 bp 的开放阅读框, 编码 515、514 个氨基酸。生物信息学分析发现 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的氨基酸序列与其他植物 SnRK1 蛋白具有较高同源性; 氨基酸序列显示, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 包含了 SnRK1 家族特有的结构 STKc AMPK_alpha、AMPK_C、UBA_SnRK1_plant; 进化树分析表明 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因属于 SnRK1 家族; 组织特异性分析显示, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 在红阳猕猴桃各个组织中均有表达, 在果实中表达丰度最高; 在果实发育过程中, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的表达量均呈先下降后上升的趋势; qRT-PCR 分析表明 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的表达受 ABA、GA₃、ET、CPPU 的调控。随着贮藏时间的增加, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的表达量呈先下降后上升的趋势, 推测 *AcSnRK1* 基因可能调控蔗糖合酶的表达。本研究结果表明 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在红阳猕猴桃果实发育和贮藏过程中发挥重要作用, 为进一步阐述 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的功能奠定基础。

关键词: 红阳猕猴桃; *SnRK1*; 基因克隆; 生物信息学分析; 表达分析

中图分类号: S663.4 文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of SnRK1 in *Actinidia chinensis* var. Hongyang

JIANG Kaixiu^{1,2}, LIU Linya², HE Bin², SONG Shuyi², GONG Xiaojian^{1*}, HUANG Yacheng^{2*}

1. Key Laboratory for Information System of Mountainous Areas and Protection of Ecological Environment, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. School of Biological Science and Technology, Liupanshui Normal University, Liupanshui, Guizhou 553004, China

Abstract: Hongyang kiwifruit is a distinguished variety independently developed in China. It features a distinctive red coloration, possesses high sugar content and low acidity, and is favored for its rich aroma and unique flavor profile. The growth and development of fruits are influenced by a multitude of factors, among which sucrose non-fermentation-1-associated protein kinase 1 (SnRK1) plays a pivotal role in the regulation of carbohydrate metabolism and the response to both biotic and abiotic stresses. Therefore, in this study, we cloned the full-length cDNA of 2 genes in the *SnRK1* family of Hongyang kiwifruit, named *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2*. The physical and chemical properties, gene

收稿日期 2024-09-04; 修回日期 2024-09-24

基金项目 六盘水师范学院科研培育项目 (No. LPSSY2023KJZDPY07); 国家自然科学基金项目 (No. 32360740); 六盘水师范学院研究生科研项目 (No. LPSSYLPY202317)。

作者简介 蒋开秀 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果树生理生化与分子生物学。*通信作者 (Corresponding author): 龚小见 (GONG Xiaojian), E-mail: gongxiaojian1@163.com; 黄亚成 (HUANG Yacheng), E-mail: yachenghuang1314@126.com。

structure, conserved motifs, protein conserved domains, and cis-acting elements of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* were systematically analyzed using bioinformatics approaches. The expression characteristics of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* genes in different tissues and fruits were quantitatively detected by real-time fluorescence. *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* genes contained an open reading frame of 1548 bp and 1545 bp, respectively, encoding proteins containing 515 and 514 amino acids with highly consistent sequences (96.31%) respectively. Both genes contained 10 exons and 2 introns. Bioinformatics analysis showed that *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* had high homology with other plant *SnRK1* proteins. The amino acid sequence showed that *STKc_AMPK_alpha*, *AMPK_C* and *UBA_SnRK1_plant* were unique to the *SnRK1* family. Evolutionary tree analysis showed that *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* belonged to the *SnRK1* family. Tissue specific analysis showed that *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* were expressed in all tissues of Hongyang Kiwifruit, but the expression abundance was the highest in fruit. During fruit development, the expression levels of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* decreased first and then increased. qRT-PCR analysis showed that the expression of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* was responsive to ABA, GA₃, ET and CPPU. With the increase of storage time, the expression levels of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* showed a downward trend first and then an upward trend, suggesting that *AcSnRK1* gene might regulate the expression of sucrose synthase. The results of this study indicate that *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* genes play an important role in the development and storage of Hongyang kiwifruit, which would lay a foundation for further elucidation of the functions of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* genes.

Keywords: *Actinidia chinensis* var. Hongyang; *SnRK1*; gene cloning; bioinformatics analysis; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.02.006

蔗糖非发酵-1 相关蛋白激酶 1 (sucrose non-fermenting 1-related protein kinase, *SnRK1*) 蛋白是一类广泛存在于植物中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是酵母中 SNF1 和动物中 AMPK 的同源蛋白, 是一个能量感受器, 可被能量缺乏所激活^[1]。*SnRK1* 基因是由 3 个亚基组成的异三聚体, 包括催化 α 亚基、支架 β 亚基和腺嘌呤核苷酸 AMP 或 ADP 结合 γ 亚基^[2-3]。*SnRK1* 是 *SnRK* 超家族中的一个重要分支, 在植物中高度保守且广泛参与了调控多种生理过程, 主要参与了植物的生长发育^[4]。在草莓中的研究表明, *FaSnRK1a* 基因可以上调 *FaSUS1* 和 *FaSUS3* 基因表达提高蔗糖合酶 (SUS) 活性, 促进果实中蔗糖的积累, 从而影响果实的发育^[5]。马铃薯中的反义表达 *SnRK1* 基因可使其蔗糖合成酶基因表达急剧下调, 并且导致蔗糖合成酶的活性降低了 30%, 说明 *SnRK1* 在转录水平上能对蔗糖合成酶基因进行调节, 影响蔗糖合成酶的活性, 从而降低块茎中淀粉含量^[6]。将大麦中 *SnRK1* 进行沉默表达, 导致其花粉发育受阻, 花粉中只含有少量或不含有淀粉, 这可能与不能利用输入的蔗糖有关, 即沉默表达后的 *SnRK1* 无法激活蔗糖合成酶的活性^[7]。番茄中过表达 *mhSnRK1* 基因可增加番茄叶片和成熟果实中淀粉含量^[8]。以上结果表明, *SnRK1* 通过调控蔗糖合酶的表达, 在源和库组织之间对蔗糖分配发挥着至关重要的作用。此外, *SnRK1* 还参与激素信号传导、生物胁迫和非生物胁迫等过程, 如

在小麦萌发和幼苗早期生长过程中, *SnRK1* 受到 ABA 的负调控^[5]; 在拟南芥中, *SnRK1* 通过调控胁迫应答基因的表达和 ABA 信号通路参与糖和黑暗响应^[9]。

猕猴桃也称奇异果, 含有丰富的维生素 C、微量元素、氨基酸和膳食纤维, 此外, 还具有重要的保健功能, 有“水果之王”的美称^[10-12], 深受消费者喜爱, 具有极高的经济效益^[13-14]。现有研究在猕猴桃果实中鉴定到较多与果实发育和品质形成有关的基因, 这些基因的调控机制为果实品质和产量的改善提供了一定的基础。本课题组前期研究已经证实蔗糖合酶与果实发育密切相关^[15], 且已有的研究也表明, *SnRK1* 能够调控蔗糖合酶的活性, 影响果实的产量和品质。本研究以红阳猕猴桃为材料, 克隆得到了 2 个 *SnRK1* 成员, 对其进行生物信息学分析, 并分析其在红阳猕猴桃不同组织、果实发育时期和后熟软化阶段的表达特性, 以期为深入研究红阳猕猴桃 *SnRK1* 蛋白激酶的生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试品种为种植在贵州省六盘水市米箩乡的 8 年生的红阳猕猴桃。激素处理材料的采集参照刘林娅等^[16]的方法。不同组织和果实不同发育时期材料的采集参照任东立等^[15]的方法。后熟软化时期的果实于花后 138 d 采集,

分别在采集后 2、4、6、8、15、17、19 d 取样。每个实验均设置 3 个生物学重复，样品采集后立即用锡箔纸包裹置于液氮中速冻，置于-80 ℃冰箱保存，用于后续 RNA 的提取。

1.1.2 菌株与试剂 逆转录试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 均购自天根生化科技(北京)有限公司; Trans Taq[®] HiFi DNA Polymerase High Fidelity (HiFi) 购自北京全式金生物技术有限公司; Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (P505) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; SYBR 试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他生化试剂为进口或国产分析纯试剂。DNA 序列测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 *AcSnRK1* 基因全长 cDNA 克隆 红阳猕猴桃总 RNA 提取参照实验室改良的 CTAB 法，浓度和质量检测符合实验要求，可用于下一步实验^[17]。按照逆转录试剂盒操作说明书合成 cDNA 第一链。基于红阳猕猴桃转录组测序信息，设计 *SnRK1* 基因序列的特异引物(表 1)，以逆转录的产物为模板，利用 PCR 法对 *SnRK1* 基因进行 cDNA 全长扩增。反应条件：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1.5 min，28 次循环；72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂

糖凝胶进行电泳检测目的条带，并按照 TIANGEN 公司凝胶回收试剂盒说明书进行凝胶回收，回收产物连接到 PEASY-T1 载体送公司测序。

1.2.2 *AcSnRK1* 基因的生物信息学分析 在 NCBI 网站相关程序中对 *SnRK1* 蛋白序列进行 BLAST 比对和保守结构域预测，利用其他在线网站和软件预测 *SnRK1* 蛋白的理化性质、亚细胞定位预测、跨膜结构域以及进行氨基酸同源比对和构建进化树。

(1) *AcSnRK1* 基因的理化性质、亚细胞定位和染色体定位。利用 ExPASy(<https://www.expasy.org/tools>)在线软件预测 *SnRK1* 氨基酸数量、相对分子质量(MW)、理论等电点(pI)，不稳定系数(instability index)、脂溶性系数(aliphatic index)和疏水性(grand average of hydropathicity)。使用 WOLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>)在线软件预测 *SnRK1* 编码蛋白的亚细胞定位。将红阳猕猴桃基因结构注释信息和基因 ID 上传至 TBtools 软件的 Gene Location Visualize from GTF/GFF 工具中，分析染色体定位。

(2) *SnRK1* 系统发育树构建。使用 MEGA11 软件的 Clustal W 算法的默认参数进行序列比对，利用 Neighbor-Joining 法，设置 1000 次 bootstrap 检验重复，其他参数默认，将得到的建树信息导入 EvolView 2 (<https://evolgenius.info/evolview-v2/#login>)在线软件中对进化树进行美化。

(3) *AcSnRK1* 结构域序列分析。将在 Pfam (<http://pfam-legacy.xfam.org/>)数据库下载 TCP 转录因子的隐马尔可夫模型(HMM)和 NCBI 的 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)结果利用 TBtools 软件进行保守结构域可视化，进一步确定目的序列均含有 *SnRK1* 蛋白结构域。将在 Clustal X 序列比对后的结果导入 DNAMAN 软件中进行编辑，仅保留保守结构域序列，导出图片，使用 PowerPoint 软件进行标注，并使用 WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>)在线软件生成一致的序列标识。

(4) *AcSnRK1* 基因结构及保守基序分析。在 MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)网站中上传 *AcSnRK1* 和 *AcSnRK2* 氨基酸序列，分析红阳猕猴桃基因家族转录因子的蛋白质保守基序，motif 最大检索数设置为 6 个，其他参数为默认值。将保守基序结果、Clustal X 序列比对后的结果、红阳猕猴桃基因结构注释信息和蛋

表 1 引物序列及用途
Tab. 1 Primers sequence and use

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
AcSnRK1.1-F1	TTTCACTTGTGTTCTGATC	全长 cDNA 扩增
AcSnRK1.1-R1	AGTCCTCCCATTCTATCATT CATTG	
AcSnRK1.2-F1	TATAGAAATCTCCGAAAT TTGGGG	
AcSnRK1.2-R1	ATTAAGGAAACAATAGTTA GCCAGT	
q-AcSnRK1.1-F1	GGAAAAAGTTAGAAGAGA AATCAAG	实时荧光定量
q-AcSnRK1.1-R1	TAACCTACCCTTTTCCACG	
q-AcSnRK1.2-F1	TAGCGTGGACATGTTTCTG	
q-AcSnRK1.2-R1	TTGTGCCCTGTCAAAGC	
18S-S2	TTTGATGGTATTGCTACTC GGA	
18S-A2	GAATCATCAGAGCAACGGG C	
GAPDH-S1	CGTCCTTCCCTCCCTCAAA	
GAPDH-A1	TCTTCTTGGTGACCTGGAC GA	

白信息导入 TBtools 软件的 Gene Structure View (Advanced) 工具中, 将目标基因的基因结构及保守基序进行可视化分析。

(5) *AcSnRK1* 基因的顺式作用元件分析。将红阳猕猴桃基因组全序列提交到 TBtools 软件中, 截取起始密码子上游 2000 bp 序列作为基因的启动子区, 使用 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线软件进行顺式作用元件预测, 再利用 TBtools 软件进行可视化分析。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 分析 采用伯乐公司的 CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪分析不同处理对 *AcSnRK1* 基因表达的影响, 具体的操作步骤参照仪器使用说明书。取不同处理样品的 RNA 为材料, 逆转录合成 cDNA 第一链后用于实时荧光定量分析。选用 *18S* 和 *GAPDH* 作为内参基因, 基因的荧光定量引物见表 1, 按照生工生物工程(上海)股份有限公司的 TBgreenII 说明书设计反应程序。

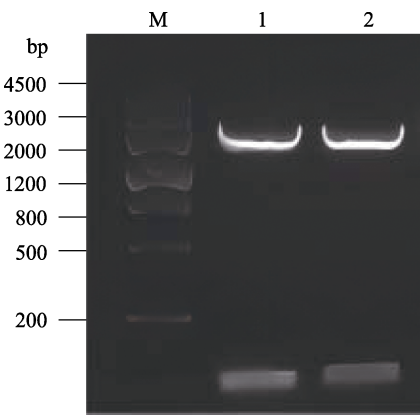
1.3 数据处理

所有试验数据均由 3 次重复试验获得, 并与 *18s* 和 *GADPH* 的表达数据进行了归一化处理, 以 3 个生物重复和 3 个技术重复的平均值±标准误差表示。实验结果采用 $E^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法进行分析, 使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行单因素方差分析。

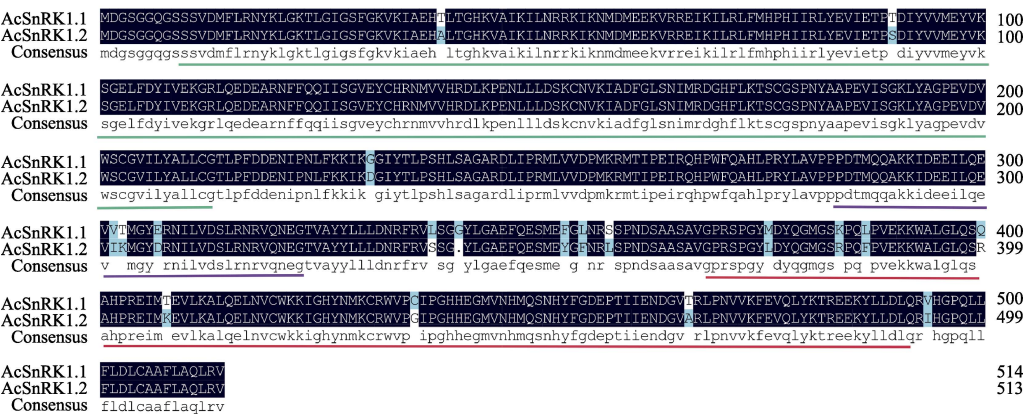
2 结果与分析

2.1 *AcSnRK1* 基因的克隆与序列分析

通过其他物种的 *SnRK1* 基因序列, 在猕猴桃基因组网站 (<http://kiwifruitgenome.org/>) 上进行 Blast 检索, 获得该基因的基因组序列。根据已知序列设计引物, 通过反转录 PCR 扩增得到目的基因, 命名为 *AcSnRK1.1* (PSS35124) 和 *AcSnRK1.2* (PSS33671), 其全长分别为 2189、2056 bp(图 1), 开放阅读框分别为 1548、1545 bp, 分别编码 515、514 个氨基酸。氨基酸序列比对表明 2 个基因的氨基酸序列相似性为 96.31%(图 2)。



M: DL4500 DNA marker; 1: *AcSnRK1.1*; 2: *AcSnRK1.2*.
图 1 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的全长克隆
Fig. 1 Full length cloning of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* gene



绿色水平横线表示 STKc_AMPK_alpha 保守结构域, 紫色水平横线表示 UBA_SnRK1_plant 保守结构域, 红色水平横线表示 AMPK_C 保守结构域。

The green horizontal line represents the STKc_AMPK_alpha conserved domain, the purple horizontal line represents the UBA_SnRK1_plant conserved domain, and the red horizontal line represents the AMPK_C conserved domain.

图 2 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequenc alignment of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2*

2.2 *AcSnRK1* 基因的生物信息学分析

2.2.1 *AcSnRK1* 的理化性质、亚细胞定位及染色体定位 使用 ExPASy 软件对 SnRK1 家族成员进

行蛋白质理化性质分析发现, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因分别编码 515、514 个氨基酸, 相对分子质量为 58.68、58.75 kDa, 等电点为 8.22、

8.56, 呈碱性, 不稳定系数为 45.61、45.92。Wolf 亚细胞定位预测结果显示, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 均定位在细胞质中。*AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 在染色体定位结果显示, 2 个基因随机分布在 2 条染色体上, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 分别分布在 2 号和 3 号染色体上。

2.2.2 SnRK1 的系统发育分析 利用 MEGA 11 软件, 采用 NJ 法构建 *AcSnRK1.1*、*AcSnRK1.2* 与其他物种 SnRK 氨基酸序列的系统进化树。系统进化分析表明, *AcSnRK1.1*、*AcSnRK1.2* 与同一分支的平邑甜茶(*Malus hupehensis*)、桃(*Prunus persica* L.) 的亲缘关系较近, 且 19 个 SnRK 蛋白明显聚为 3 个不同的组, 分别对应于 SnRK 蛋白家族的 3 个亚家族。而 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 均聚在 SnRK1 亚家族中(图 3), 由此推断 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 均属于红阳猕猴桃 SnRK1 亚家族成员。

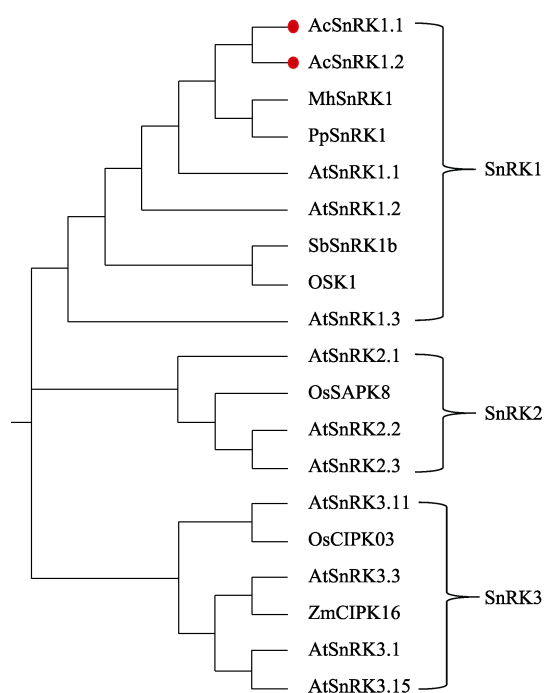


图 3 *AcSnRK1* 蛋白和其他植物的 SnRK 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *AcSnRK1*s and SnRKs of other plant

2.2.3 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的基因结构、蛋白保守结构域及保守序列分析 利用 TBtools 软件对 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的外显子-内含子结构进行分析, 结果表明, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因均含有 2 个内含子和 10 个外显子(图 4)。此外, 对 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因

的蛋白保守结构域进行分析发现, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 蛋白均含有 SnRK1 家族特有的保守结构域: STKc_AMPK_alpha、AMPK_C、UBA_SnRK1_plant 结构域(图 4)。对 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的保守基序进行分析, 结果显示 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 蛋白均含有 6 个 motif 元件(图 4)。综上可知同一个亚族中的成员具有高度相似的基因结构与保守基序, 该结果与系统发育进化树分类结果一致。

2.2.4 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的启动子顺式作用元件分析 为更好地了解红阳猕猴桃的 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的转录调控及潜在功能, 利用 PlantCARE 软件分析 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的启动子区域(起始密码子上游 2000 bp)的顺式调控元件。结果显示, 所有启动子序列中共有 36 个顺式作用元件, 从中筛选出 17 个与激素信号通路及生长发育相关顺式元件[主要包含脱落酸响应元件、赤霉素响应元件、水杨酸响应元件、茉莉酸甲酯(MeJA)响应元件、生长素响应元件、光响应元件、生长调节、干旱、低温应答元件]分析发现, *AcSnRK1* 基因中的顺式作用元件大多与生长调节(生长素、糖代谢)、激素响应(脱落酸、赤霉素等)、胁迫应答(脱水胁迫、创伤)和光响应(光信号)等相关(图 5)。表明 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的功能相对保守, 每个亚族成员的表达模式比较相近。

2.3 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因表达模式分析

2.3.1 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在不同组织中的表达分析 为了分析 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在红阳猕猴桃不同组织中的表达模式, 利用 qRT-PCR 技术检测其在红阳猕猴桃的雌花、雄花、芽、树皮、叶和果实中的表达量。结果表明: *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在红阳猕猴桃的 6 个组织或器官中均有表达, 但表达量存在差异, 2 个基因在果实中的表达量显著高于其他组织(图 6), 说明 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因可能在果实的生长发育过程中发挥重要作用。

2.3.2 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在果实发育时期的表达分析 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在红阳猕猴桃果实不同发育时期的表达模式如图 7 所示, 随着果实的发育, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的表达量均呈先下降后上升的趋势, 在花后 38~

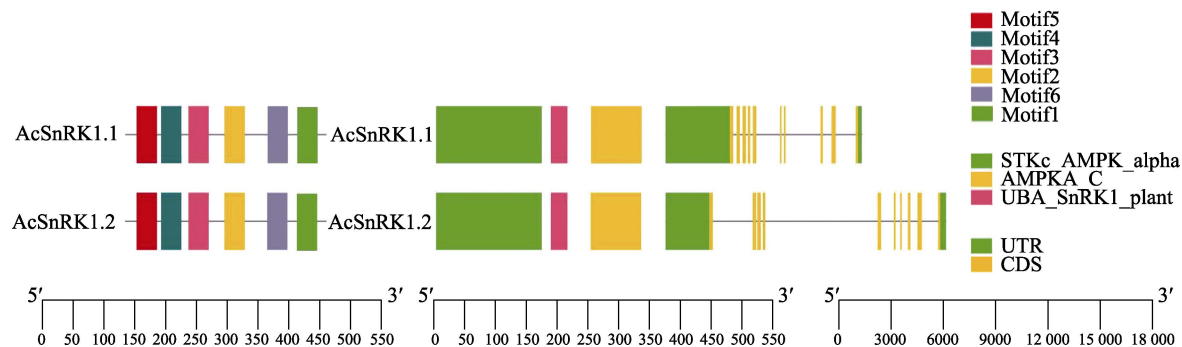


图 4 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的基因结构、蛋白保守结构域及保守序列分析

Fig. 4 Gene structure, protein conserved domain and conserved sequence analysis of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2*

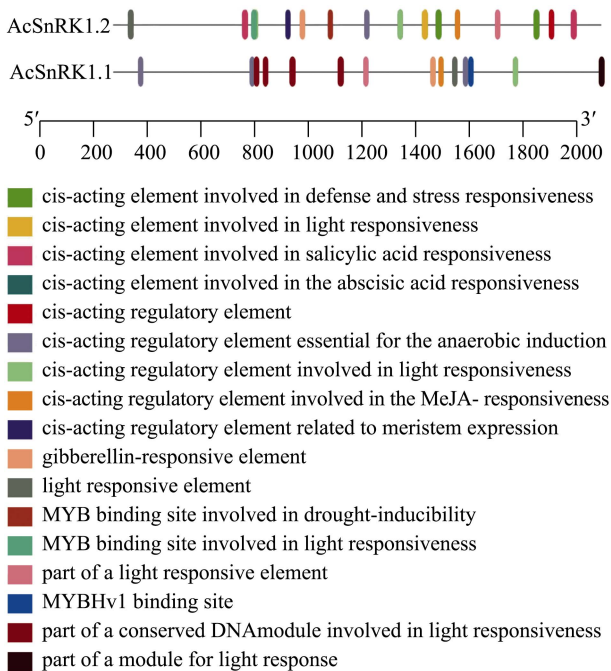
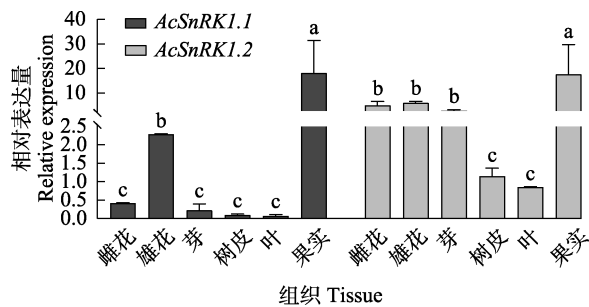


图 5 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 5 Analysis of cis-acting elements of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* gene promoters



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 6 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在不同组织中的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* in different tissues

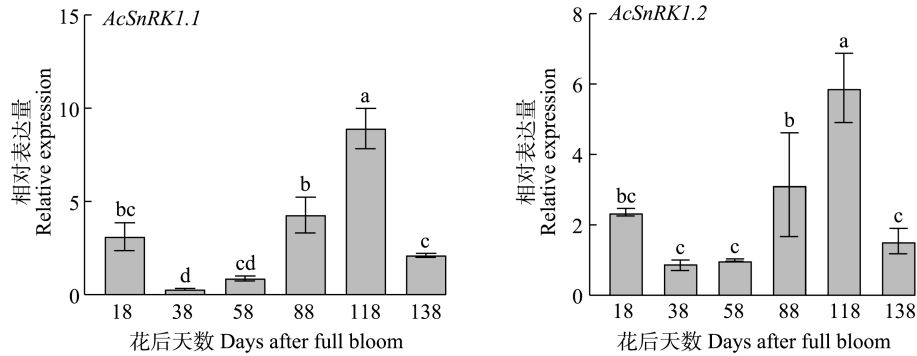
118 d 的果实中的表达量明显上升, 差异显著, 表明 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的表达和果实生长发育可能存在相关性。

2.3.3 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在不同激素中的表达分析 红阳猕猴桃果实经不同激素 (ABA、 GA_3 、ET、CPPU) 处理后, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的表达模式如图 8 所示, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在 GA_3 处理 0~6 h 时, 表达量明显上调, 6 h 时表达量最高, 6 h 之后表达量开始下调; *AcSnRK1.1* 在 ET 处理前期, 表达量无明显变化, 9 h 时表达量开始下调; *AcSnRK1.2* 在 ET 处理 3~6 h 时, 表达量呈上升趋势, 6 h 后表达量开始下调; *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在 CPPU 处理 3~9 h 时表达量明显上升, 9 h 后表达量开始下降; ABA 处理后, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 在 ABA 处理前期下调表达, 其中, *AcSnRK1.1* 持续下调表达, *AcSnRK1.2* 后期上调表达但总体呈现下降趋势。

2.3.4 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在果实后熟软化阶段的表达分析 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在红阳猕猴桃果实后熟软化阶段的表达模式如图 9 所示, 随着贮藏时间的增加, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的表达量呈先下降后上升的趋势, 在第 6 天表达量最低, 6 d 后表达量逐渐升高, 说明 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 在果实后熟软化时期也发挥重要作用。

3 讨论

SnRK1 是植物体内复杂信号网络的中心枢纽之一^[18], 参与植物碳氮代谢、生长发育、胁迫应答等多种生理过程的调控^[19]。*SnRK1* 属于保守的基因家族^[20], 本研究克隆得到红阳猕猴桃 *SnRK1* 家族的 2 个基因, 命名为 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2*,

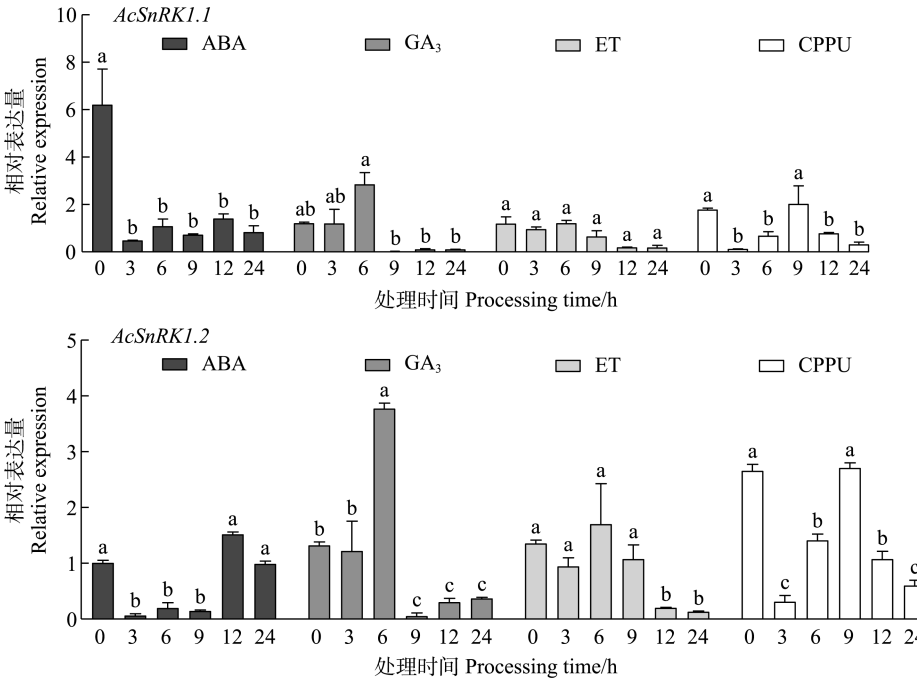


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 7 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在果实不同发育时期的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* genes at different developmental stages of fruit

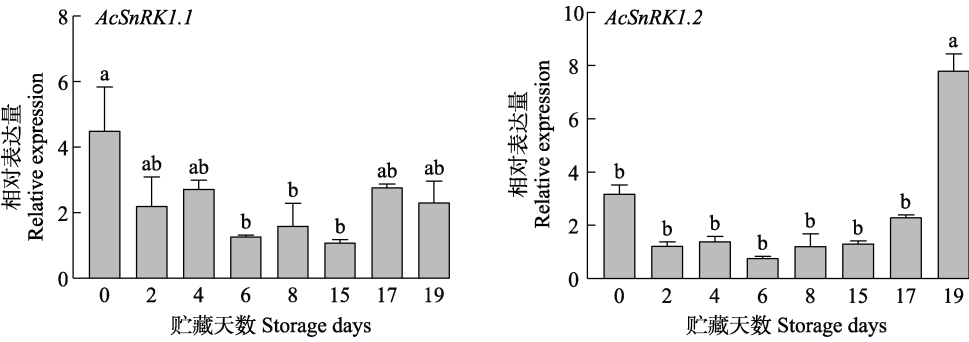


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 8 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在不同激素处理中的表达分析

Fig. 8 Expression of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* in different hormone treatments



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 9 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在不同贮藏天数的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of *AcSnRK1.1* and *AcSnRK1.2* genes during different storage days

分别含有 1548、1545 bp 的开放阅读框, 分别编码 515 和 514 个氨基酸, 预测其主要定位于细胞质中。迄今为止, 已在多种植物中克隆得到 *SnRK1* 蛋白家族成员, 如拟南芥 3 个^[21]、水稻 4 个^[22]。草莓 *FaSnRK1α* 在叶片中表达量最高, 果实中表达量最低^[20]。番茄 *SlSnRK1.2* 在根和茎中表达量较高, 在幼嫩叶片中表达量较低^[13]。*PdSnRK1α* 在桃的根尖中表达量最高, 在花蕊、韧皮部、雄蕊、叶中表达水平较低^[23]。在平邑甜茶中, *MhSnRK1* 和 *MhAKINβγ* 基因均在叶中表达量最高^[24]。而 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 在红阳猕猴桃的 6 种组织中均有表达, 在果实中表达量最高。本研究只对红阳猕猴桃 *AcSnRK1* 家族中与果实发育最相关的 2 个基因进行了分析, 在红阳猕猴桃中可能还有成员尚未被鉴定。

相关研究表明, *SnRK1* 基因与激素信号存在紧密联系, 尤其是 ABA 信号^[19]。本研究分析 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 对 ABA、GA₃、ET、CPPU 处理的响应发现, 果实中的 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 在 ABA 处理前期下调表达, 其中 *AcSnRK1.1* 持续下调表达, *AcSnRK1.2* 在 ABA 处理后期上调表达, 这与小麦中 *SnRK1* 基因受 ABA 负调控的结果一致^[7]。但罗静静等^[20]研究表明, 草莓果实中 *FaSnRK1α* 在 ABA 处理后表达量上调, 说明不同物种中 *SnRK1* 基因对 ABA 是存在应答, 但是应答模式存在差异。*AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 在 GA₃ 处理时呈先上升后下降的趋势, 处理 6 h 的表达量最高, 6 h 后表达量开始下调; *AcSnRK1.1* 在 ET 处理时整体表达量呈下降趋势, *AcSnRK1.2* 在 ET 处理 3~6 h 时, 表达量呈上升趋势, 6 h 后表达量开始下调; *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 在 CPPU 处理 3~9 h 时表达量呈上升趋势, 9 h 后表达量开始下调。这表明 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的表达受 ABA、GA₃、ET、CPPU 的调控。*AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的顺式作用元件中包括响应脱落酸、赤霉素、水杨酸、茉莉酸甲酯、生长素、光响应、生长调节、干旱、低温等应答元件。该结果表明, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 受 ABA、GA₃、ET、CPPU 的调控, 为后续红阳猕猴桃通过外源激素调控 *SnRK1* 基因的表达提供了理论基础。

FaSnRK1α 在果实发育过程中的表达量不断升高, 到果实成熟后表达量略有下降, 在果实发育过程中, *FaSnRK1α* 基因可以上调 *FaSUS1* 和 *FaSUS3* 基因的表达, 表明该基因在果实发育时

期调控了蔗糖合酶的表达, 促进了果实的发育进程^[20]。*MdSnRK1.1* 在番茄中过表达会影响碳氮代谢, 在果实成熟进程中起重要作用^[25]。本研究中 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的表达量在果实发育时期和后熟软化阶段表达量均呈先下降后上升的趋势。在果实发育过程中, 花后 38~118 d 属于果实快速膨大期, 需要提供大量的蔗糖, *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的表达量在这个阶段明显上调。本实验室前期对蔗糖合酶的研究结果表明, 红阳猕猴桃中蔗糖合酶家族的成员中存在果实快速膨大期明显上调的基因, 在后熟软化阶段也存在表达量先下降后上升的基因(数据未发表), 与本研究结果一致。因此, 推测 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在果实快速膨大期和果实后熟软化阶段都参与了蔗糖合酶的调控, 在果实快速膨大期和果实后熟软化阶段起着重要的作用。

4 结论

本研究探讨了 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因在红阳猕猴桃果实发育和贮藏过程中可能调控蔗糖合酶的表达, 并且 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 的表达受 ABA、GA₃、ET、CPPU 的调控, 为进一步阐述 *AcSnRK1.1* 和 *AcSnRK1.2* 基因的功能奠定基础。

参考文献

- [1] 任东立. ‘红阳’猕猴桃叶片蔗糖代谢关键酶的酶学和基因表达特性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学, 2024.
REN D L. Enzymatic properties and gene expression of key sucrose metabolizing enzymes in leaves of ‘Hongyang’ kiwifruit[D]. Guiyang: Guizhou Normal University, 2024. (in Chinese)
- [2] RUAN Y L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65(1): 33-67.
- [3] 王海波, 郭俊云, 田雪莲. 小桐子 *SnRK1* 蛋白激酶 α 亚基基因的克隆及原核表达分析[J]. 生物技术通报, 2019, 35(6): 39-47.
WANG H B, GUO J Y, TIAN X L. Molecular cloning and prokaryotic expression analysis of protein kinase *SnRK1* subunit α gene from *Jatropha curcas*[J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(6): 39-47. (in Chinese)
- [4] 张余, 余舜武, 李佳, 李天菲, 陈晨, 高宁宁, 罗立军. 植物 *SnRK1* 蛋白激酶研究进展[J]. 上海农业学报, 2018, 34(5): 139-148.

- ZHANG Y, YU S W, LI J, LI T F, CHEN C, GAO N N, LUO L J. Research progress of plant SnRK1 protein kinase[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2018, 34(5): 139-148. (in Chinese)
- [5] CROZRT P, MARGALHA L, CONFRARIA A, MARTINHO C. Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5(1): 190.
- [6] CREPIN N, ROLLAND F. SnRK1 activation, signaling, and networking for energy homeostasis[J]. Current Opinion Plant Biology, 2019, 51(1): 29-36.
- [7] 罗静静. *FaSnRK1a* 对草莓果实蔗糖代谢、灰霉病抗性和抗涝性的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- LUO J J. Effects of *FaSnRK1a* on fruit sucrose metabolism, gray mold and water logging resistance of strawberry[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [8] PURCELL P C, SMITH A M, HALFORD N G. Antisense expression of sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves[J]. The Plant Journal, 1998, 14(2): 195-203.
- [9] ZHANG Y, SHEWRY P R, JONES H, BARCELO P, LAZZERI P A, HALFRD N G. Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley[J]. The Plant Journal, 2001, 28(4): 431-441.
- [10] JOSSIER M, BOULY J P, MEIMOUN P, ARJMAND A, LESSARD P, HAWLEY S, GRAHAME HARDIE D, THOMAS M. SnRK1 (SNF1-related kinase1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2009, 59(1): 316-328.
- [11] 张维, 付复华, 罗赛男, 赖灯妮, 朱向荣, 张群. 湖南红心猕猴桃品种品质评价及综合分析[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(5): 201-210.
- ZHANG W, FU F H, LUO S N, LAI D N, ZHU X R, ZHANG Q. Quality analysis and evaluation of Hunan red kiwifruit varieties[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(5): 201-210. (in Chinese)
- [12] 黎晓茜, 龙友华, 尹显慧, 吴小毛, 赵志博, 樊荣, 莫飞旭, 蒋艳玲, 黄亚欣, 唐靖文. 茉莉酸甲酯处理对猕猴桃软腐病菌作用机制及果实品质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 239-248.
- LI X Q, LONG Y H, YIN X H, WU X M, ZHAO Z B, FAN R, MO F X, JIANG Y L, HUANG Y X, TANG J W. Mechanism of action of methyl jasmonate against kiwifruit soft rot and its effect on fruit quality[J]. Food Science, 2019, 40(15): 239-248. (in Chinese)
- [13] 梁郅林. 番茄 *SlSnRK1.2* 基因在番茄与灰霉菌互作过程中的功能研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023.
- LIANG Z L. Functional analysis of *SlSnRK1.2* in interaction between tomato and *Botrytis cinerea*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [14] 黄兴成, 朱华清, 杨叶华, 李渝, 张雅蓉, 刘彦伶, 蒋太明. 贵州省猕猴桃产量特征及影响因素分析[J]. 中国果树, 2023(2): 117-121.
- HUANG X C, ZHU H Q, YANG Y H, LI Y, ZHANG Y R, LIU Y L, JIANG T M. Analysis on yield characteristics and influencing factors of kiwifruit in Guizhou province[J]. China Fruits, 2023(2): 117-121. (in Chinese)
- [15] 任东立, 黄亚成, 刘林娅, 何斌, 鲁明秋, 龚小见. ‘红阳’猕猴桃蔗糖合成酶(*AcSUS1*)的克隆与表达分析[J/OL]. 分子植物育种. (2023-03-15)[2024-08-14]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20230314.1512.024.html>.
- REN D L, HUANG Y C, LIU L Y, HE B, LU M Q, GONG X J. Cloning and expression analysis of sucrose synthase (*AcSUS1*) in ‘Hongyang’ kiwifruit[J/OL]. Molecular Plant Breeding. (2023-03-15)[2024-08-14]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20230314.1512.024.html>. (in Chinese)
- [16] 刘林娅, 杨那, 罗宇璇, 何斌, 赵艳妹, 宋姝熠, 黄亚成. ‘红阳’猕猴桃金属硫蛋白基因 *AcMT2* 的克隆、表达分析及功能鉴定[J/OL]. 分子植物育种, (2024-02-26)[2024-08-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240223.1502.010.html>.
- LIU L Y, YANG N, LUO Y X, HE B, ZHAO Y M, SONG S Y, HUANG Y C. Cloning expression analysis and functional characterization of *AcMT2* in *Actinidia chinensis* var. ‘Hongyang’[J/OL]. Molecular Plant Breeding, (2024-02-26)[2024-08-23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240223.1502.010.html>. (in Chinese)
- [17] 刘林娅, 杨那, 代玥, 罗彩, 陈婷. 一种大量提取猕猴桃不同组织高质量总 RNA 的方法[J]. 江西农业学报, 2020, 32(9): 30-34.
- LIU L Y, YANG N, DAI Y, LUO C, CHEN T. An efficient method for isolating high-quality total RNA from different tissues of kiwifruit (*Actinidia chinensis*)[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2020, 32(9): 30-34. (in Chinese)
- [18] LASTDRAGER J, HANSON J, SMEEKENS S. Sugar signals and the control of plant growth and development[J]. Journal of Experiment Botany, 2014, 65(1): 799-807.
- [19] EMANUELLE S, DOBLIN M S, STAPLETON D I. Molecular insights into the enigmatic metabolic regulator, SnRK1[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(1): 341-353.
- [20] 罗静静, 张亚飞, 张淑辉, 彭福田, 肖元松. 草莓蔗糖非发酵-1-相关蛋白激酶 1(SnRK1) α 亚基编码基因的克隆及

- 表达分析[J]. 植物生理学报, 2018, 54(8): 1341-1348.
- LUO J J, ZHANG Y F, ZHANG S H, PENG F T, XIAO Y S. Cloning and expression analysis of the gene encoding the α -subunit of strawberry sucrose non-fermentation-1-associated protein kinase 1(SnRK1)[J]. Plant Physiology Journal 2018, 54(8): 1341-1348. (in Chinese)
- [21] 刘月. 拟南芥 SnRK1 蛋白激酶调控气孔运动的分子机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2020.
- LIU Y. Functional analysis of SnRK1 kinase regulating stomatal movement in *Arabidopsis*[D]. Jinan: Shandong University, 2020. (in Chinese)
- [22] 何艺琴. 小麦 SnRK 基因家族鉴定、进化及功能分析[D]. 荆州: 长江大学, 2021.
- HE Y Q. Identification, evolution and functional analysis of SnRK gene family in wheat[D]. Jingzhou: Yangtze University, 2021. (in Chinese)
- [23] 于文英. 桃 SnRK1 α 促进根毛发生和生长的机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2024.
- YU W Y. The mechanism of SnRK1 α promoting the generation and growth of root hair in peach[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2024. (in Chinese)
- [24] 李光杰. 平邑甜茶 *SnRK1* 基因的克隆、表达及其功能的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- LI G J. Cloning and expressing regulation of sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 (*SnRK1*) from Pingyitiancha (*Malus hupehensis* Rehd.) and researching of its function[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2009. (in Chinese)
- [25] WANG X, PENG F, LI M. Expression of a heterologous *SnRK1* in tomato increases carbon assimilation, nitrogen uptake and modifies fruit development[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(12): 1173-1182.