

彭金凤, 于健, 付丹阳, 等. 花生 *RLCK-VII* 亚家族的全基因组鉴定、系统进化与表达模式分析[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(2): 225-239.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2026.02.002

花生 *RLCK-VII* 亚家族的全基因组鉴定、系统进化与表达模式分析

彭金凤¹, 于健¹, 付丹阳¹, 孙亚亚¹, 陈圆圆², 陈佳佳¹

(1.江苏农林职业技术学院风景园林学院, 江苏 镇江 212400; 2.河南农业大学林学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 受体样胞质激酶 VII 亚家族 (*RLCK-VII*) 作为植物先天免疫的关键调节因子, 同时参与植物发育过程与非生物胁迫的响应。本研究对花生 *RLCK-VII* 亚家族进行了系统分析, 以揭示其在进化、表达及功能上的特征。系统发育分析将该亚家族分为 8 个分支, 所有成员均包含保守的 Motif2 和 Motif7, 表明其功能具有保守性。共线性分析结果显示, 该家族主要通过染色体片段复制事件扩张, 为其新功能与表型多样性提供了遗传基础。启动子顺式作用元件分析结果显示, 所有基因均含有光响应元件, 且脱落酸与茉莉酸甲酯响应元件出现频率较高, 与其参与胁迫应答的功能相符。*RLCK-VII-4* 和 *RLCK-VII-70* 在根和果皮中相对表达量较高。在胚胎发育后期, *RLCK-VII-29* 和 *RLCK-VII-59* 相对表达量较高, 这些基因与种子成熟过程相关。*RLCK-VII-20* 和 *RLCK-VII-58* 等基因在花和子房柄组织中相对表达量较高。*RLCK-VII-4*, *RLCK-VII-58* 和 *RLCK-VII-70* 在茎中的相对表达量显著高于其在根、叶、花中的相对表达量 ($P < 0.05$), *RLCK-VII-20* 在茎和花中的相对表达量显著高于其在根、叶中的相对表达量 ($P < 0.05$)。在干旱胁迫下, 多个基因相对表达量显著升高, 其中 *RLCK-VII-26*, *RLCK-VII-30*, *RLCK-VII-59* 和 *RLCK-VII-92* 基因相对表达量升高 5 倍以上, *RLCK-VII-52*, *RLCK-VII-71*, *RLCK-VII-83*, *RLCK-VII-87* 和 *RLCK-VII-92* 相对表达量升高 10 倍以上。油菜素内酯和脱落酸处理诱导 *RLCK-VII-11*, *RLCK-VII-5* 等基因相对表达量升高。*RLCK-VII-1*, *RLCK-VII-7* 和 *RLCK-VII-22* 等基因相对表达量不受激素和非生物胁迫调控。综上, 本研究系统解析了花生 *RLCK-VII* 亚家族的进化与表达模式, 为深入理解其在植物免疫、生长发育及胁迫应答中的功能提供了理论依据。

关键词: 花生; *RLCK-VII*; 系统发育分析; 表达模式; 基因复制

中图分类号: S565.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2026)02-0225-15

Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression pattern analysis of the peanut *RLCK-VII* subfamily

PENG Jinfeng¹, YU Jian¹, FU Danyang¹, SUN Yaya¹, CHEN Yuanyuan², CHEN Jiajia¹

(1. College of Landscape Architecture, Jiangsu Vocational College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China; 2. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: The receptor-like cytoplasmic kinase VII subfamily (*RLCK-VII*) acts as a key regulator of plant innate immunity, and is also involved in plant developmental processes and abiotic stress responses. In this study, a systematic

收稿日期: 2025-11-16

基金项目: 江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究项目(24KJ11-80003); 镇江市创新能力建设计划项目(SS2024010)

作者简介: 彭金凤(1992-), 女, 新疆昌吉人, 博士, 讲师, 主要从事植物保护和生物信息学研究。(E-mail) pj912530@163.com

通讯作者: 陈佳佳, (E-mail) jiajiachen@jsafc.edu.cn

analysis of the peanut *RLCK-VII* subfamily was performed to reveal its evolutionary, expressional, and functional characteristics. Phylogenetic analysis divided this subfamily into eight clades, and all members contained conserved Motif2 and Motif7, indicating the conservation of their functions. Collinearity analysis showed that this family mainly expanded through chromosomal segment duplication

events, which provided a genetic basis for its new functions and phenotypic diversity. Analysis of promoter *cis*-acting elements revealed that all genes contained light-responsive elements, and abscisic acid- and methyl jasmonate-responsive elements had high frequencies, which was consistent with their functions in stress responses. *RLCK-VII-4* and *RLCK-VII-70* showed relatively high expression levels in roots and peels. In the late stage of embryonic development, *RLCK-VII-29* and *RLCK-VII-59* had relatively high expression levels, and these genes were associated with the seed maturation process. Genes such as *RLCK-VII-20* and *RLCK-VII-58* exhibited relatively high expression levels in flowers and pedicels. The relative expression levels of *RLCK-VII-4*, *RLCK-VII-58*, and *RLCK-VII-70* in stems were significantly higher than those in roots, leaves, and flowers ($P < 0.05$), while the relative expression levels of *RLCK-VII-20* in stems and flowers were significantly higher than those in roots and leaves ($P < 0.05$). Under drought stress, the relative expression levels of multiple genes increased significantly, among which the expression levels of *RLCK-VII-26*, *RLCK-VII-30*, *RLCK-VII-59*, and *RLCK-VII-92* increased more than five-fold, and the expression levels of *RLCK-VII-52*, *RLCK-VII-71*, *RLCK-VII-83*, *RLCK-VII-87*, and *RLCK-VII-92* increased more than ten-fold. Brassinosteroid and abscisic acid treatments induced the increased expression of genes such as *RLCK-VII-11* and *RLCK-VII-5*. The relative expression levels of genes including *RLCK-VII-1*, *RLCK-VII-7*, and *RLCK-VII-22* were not regulated by hormones or abiotic stresses. In conclusion, this study systematically clarified the evolutionary and expression patterns of the peanut *RLCK-VII* subfamily, which provides a theoretical basis for further understanding its functions in plant immunity, growth and development, and stress responses.

Key words: *Arachis hypogaea* L.; *RLCK-VII*; phylogenetic analysis; expression pattern; gene duplication

植物通过细胞持续感知并响应外部及内源刺激,将这些信号转化为精确的细胞与分子响应,以适应不断变化的局部环境^[1]。在此过程中,受体样激酶(*RLK*)家族作为植物中较大的跨膜受体蛋白家族之一,在胞外信号感知、胞内信号转导和下游分子响应方面发挥了重要作用^[2]。其典型结构包括胞外配体结合结构域、跨膜结构域以及负责下游信号转导的保守胞质丝氨酸/苏氨酸激酶结构域^[3]。

受体样胞质激酶(*RLCK*)是 *RLK* 信号通路中的关键调节因子,通过与相应 *RLK* 及其下游底物相互作用,参与调控多种细胞过程^[4-5]。目前,已在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和水稻(*Oryza sativa*)中分别鉴定出 149 个和 379 个 *RLCK* 家族成员^[3,6]。系统发育分析将拟南芥 *RLCK* 家族成员分为 17 个亚家族^[3]。其中,*RLCK-VII* 亚家族成员作为多种细胞膜定位的受体样激酶(*RLK*)的作用靶点,在植物应对复杂病原体的防御信号通路中发挥保守功能^[7]。拟南芥灰霉病诱导激酶 1(*BIK1*)和 *PBL1* 是 *RLCK-VII* 亚家族的重要成员,它们通过与 *FLS2*、*EFR*、*CERK1* 和 *PEPR1* 等受体样激酶(*RLK*)直接互作,介导植物对多种病原相关分子模式(PAMP)的识别与响应,进而激活钙内流、活性氧暴发、胼胝质沉积、气孔关闭及幼苗生长抑制等一系列防御反应^[5]。此外,其他 *RLCK-VII* 亚家族成员也参与调控植物对特定病原的特异性防御,如拟南芥的 *PCRK1/PCRK2*^[8-9]、

PBL27^[10]、*PBL19*^[11] 和 *RIPK*^[12], 辣椒 (*Capsicum annuum*) 的 *CaPIK1*^[13], 水稻的 *OsRLCK107*^[14]、*OsRLCK118*^[14-15] 和 *OsRLCK185*^[16] 等。该亚家族的部分成员如水稻的 *OsGUDK*^[17-18] 和大麦 (*Hordeum vulgare*) 的 *Esi47*^[19] 还参与非生物胁迫响应过程。

栽培花生(*Arachis hypogaea* L.)是一种重要的异源多倍体豆科油料作物,富含蛋白质,广泛种植于热带和亚热带地区^[20]。研究表明,栽培花生可能由两个二倍体祖先种杂交并经历染色体加倍演化而来^[21]。目前,研究者已完成了陆地棉(*Gossypium hirsutum*)^[22]等作物中 *RLCK-VII* 亚家族的系统鉴定,但该亚家族在花生中尚未得到全面解析。因此,本研究拟对花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因进行全基因组鉴定,并系统分析其基因结构、染色体定位、亚细胞定位、系统发育关系、保守基序及胁迫响应模式,以期深入解析其在花生逆境应答与胁迫耐受中的作用。

1 材料与方法

1.1 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员鉴定

以 46 个拟南芥 *RLCK-VII* 氨基酸序列作为查询序列,在花生基因组注释数据中进行 BLASTp 同源搜索^[7]。剔除冗余序列后,利用 SMART 数据库对候选蛋白质序列进行结构域分析,仅保留包含典型胞内激酶结构域的序列用于后续研究。筛选过程中

采用该数据库默认的期望值 (*E*-value) 阈值^[23]。

1.2 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员蛋白质理化性质分析与亚细胞定位预测

从花生基因组资源 (PGR) 数据库中检索基因位置和蛋白质长度。利用 ExPASy Compute pI/Mw 工具 (https://web.expasy.org/compute_pi/) 计算 *RLCK-VII* 蛋白等电点。利用 Plant-mPLoc 工具 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 进行亚细胞定位预测。

1.3 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员系统发育分析

使用 ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)^[24] 对 101 个花生 *RLCK-VII* 亚家族成员及 46 个拟南芥 *RLCK-VII* 亚家族成员的氨基酸序列进行多序列比对。基于比对结果,用 MEGA 10.2^[25] 软件构建最大似然系统发育树,并通过 1 000 次自展值 (*Bootstrap*) 重复检验评估各分支的置信度。

1.4 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员蛋白质与基因结构分析

利用 MEME Suite (version 5.3.3)^[26] 分析蛋白质中的保守基序。利用 TBtools 软件对基因的外显子、内含子结构及保守基序分布进行绘图展示^[27]。

1.5 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因启动子中顺式作用元件分析

为探究启动子中的顺式调控元件,使用 TBtools 提取 *RLCK-VII* 基因 ATG 起始密码子上游 2 kb 的启动子序列,并通过 PlantCARE 数据库进行顺式作用元件注释^[28]。

1.6 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因共线性分析

采用 MCScanX 识别花生基因组中 *RLCK-VII* 基因的复制事件,构建物种内共线性图谱^[29]。比对花生与拟南芥 *RLCK-VII* 基因之间的同源基因对,构建物种间共线性图谱。利用 Circos 软件对共线性关系进行绘图展示^[30]。

1.7 *RLCK-VII* 亚家族成员的表达谱分析及其 RT-qPCR 验证

基于 PGR 数据库公开的 Illumina RNA-seq 数据,分析 101 个花生 *RLCK-VII* 基因在植物激素 (水杨酸、多效唑、乙烯利、油菜素内酯和脱落酸) 处理、干旱胁迫处理以及低温胁迫处理下的转录丰度。

将花生种子于 25 °C、14 h 光照/10 h 黑暗条件下培育至三叶期。将植株置于 10 °C 低温条件下培养 24 h,以室温培养作为对照。提取 RNA,使用

HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 反转录为 cDNA。qPCR 分析所用引物如下:*RLCK-VII-21-FP* (5'-TGGAGAGGGAGGGTTTCGG-3')、*RLCK-VII-21-RP* (5'-ACAATCCCCTCCCGGT-3')、*RLCK-VII-71-FP* (5'-TGGAGAGGGAGGGTTTCGG-3')、*RLCK-VII-71-RP* (5'-ACAATCCCCTCCCGGT-3')、*RLCK-VII-86-FP* (5'-AATCGGAGCAGCTCGTGG-3')、*RLCK-VII-86-RP* (5'-AGGCCCATCGAGCAGTA-3')、*RLCK-VII-87-FP* (5'-TTGGTGGATTGGGCGAGG-3')、*RLCK-VII-87-RP* (5'-CGCGGCTTGAGCTCCTTT-3')。

基于 PGR 数据库公开的 Illumina RNA-seq 数据,分析 101 个 *RLCK-VII* 基因在花生营养器官 (根、根尖、茎、茎尖、叶)、生殖与果实发育相关组织 (花、子房柄) 以及种子不同发育时期子叶、果皮、胚、种皮中的转录丰度。

提取 RNA,反转录并利用特异引物 (*RLCK-VII-4-FP/RP*、*RLCK-VII-20-FP/RP*、*RLCK-VII-58-FP/RP*、*RLCK-VII-70-FP/RP*) 进行 qPCR 验证。待花生完全开花后,分别提取根、茎、叶和花 RNA,使用 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 反转录为 cDNA。qPCR 分析所用引物如下:*RLCK-VII-4-FP* (5'-GCTTCGGAGTGCTGT-3')、*RLCK-VII-4-RP* (5'-CCTCGCCATTCCACCAG-3')、*RLCK-VII-20-FP* (5'-TGCAGCGCGAACTCTCA-3')、*RLCK-VII-20-RP* (5'-GGGGATTCTCGGCAAGGC-3')、*RLCK-VII-58-FP* (5'-TCAAACCGGCCGACTCAC-3')、*RLCK-VII-58-RP* (5'-TGGGCCGTTCTATCGA-3')、*RLCK-VII-70-FP* (5'-GCTTCGGAGTGCTGT-3')、*RLCK-VII-70-RP* (5'-CCTCGCCATTCCACCAG-3')。

qPCR 分析均以 *ELF1B* 为内参基因,扩增引物为 *ELF1B-FP* (5'-AAGCTTCCCTGGCAAAGCTCAA-3')、*ELF1B-RP* (5'-TTCCTCAGCTGCCTTCTTATCC-3')^[31]。

2 结果与分析

2.1 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员鉴定

如表 1 所示,从花生基因组中鉴定出 101 个 *RLCK-VII* 亚家族成员,*RLCK-VII* 亚家族成员氨基酸序列长度为 247~624 aa,相对分子量为 2.687×10^4 ~ 6.885×10^4 。亚细胞定位预测结果表明,*RLCK-VII* 主要定位于叶绿体和细胞核。

表1 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员蛋白质理化性质与亚细胞定位Table 1 Physicochemical properties and subcellular localization of proteins in the peanut *RLCK-VII* subfamily

基因名称	基因号	染色体	基因位置(bp)	氨基酸序列长度(aa)	蛋白质相对分子量($\times 10^4$)	等电点	亚细胞定位
<i>RLCK-VII-1</i>	AH01G07390	1	9 522 219~9 524 436	432	4.812	5.10	细胞核
<i>RLCK-VII-2</i>	AH01G09330	1	11 875 570~11 880 090	416	4.515	9.43	叶绿体
<i>RLCK-VII-3</i>	AH01G13770	1	32 090 456~32 093 657	390	4.387	9.47	细胞核
<i>RLCK-VII-4</i>	AH01G20880	1	92 695 084~92 697 308	442	4.891	9.08	叶绿体
<i>RLCK-VII-5</i>	AH01G25030	1	97 503 853~97 506 937	431	4.792	9.51	叶绿体
<i>RLCK-VII-6</i>	AH01G34260	1	110 567 420~110 570 157	412	4.610	7.75	细胞核
<i>RLCK-VII-7</i>	AH02G02870	2	3 118 600~3 120 306	247	2.687	5.84	细胞核
<i>RLCK-VII-8</i>	AH02G12630	2	33 041 053~33 045 462	379	4.183	9.26	细胞核
<i>RLCK-VII-9</i>	AH02G17190	2	67 730 626~67 733 194	351	3.918	8.87	细胞核
<i>RLCK-VII-10</i>	AH02G18570	2	73 211 180~73 214 929	411	4.545	9.65	叶绿体
<i>RLCK-VII-11</i>	AH03G02020	3	2 297 541~2 301 124	411	4.563	8.01	细胞核
<i>RLCK-VII-12</i>	AH03G02680	3	2 890 044~2 892 868	403	4.448	9.49	叶绿体
<i>RLCK-VII-13</i>	AH03G02690	3	2 893 476~2 896 523	465	5.232	6.54	细胞核
<i>RLCK-VII-14</i>	AH03G24330	3	49 466 306~49 469 581	455	5.094	9.27	叶绿体
<i>RLCK-VII-15</i>	AH03G26900	3	74 942 064~74 946 128	425	4.753	8.60	细胞核
<i>RLCK-VII-16</i>	AH03G34740	3	125 425 190~125 429 822	389	4.369	7.20	细胞核
<i>RLCK-VII-17</i>	AH03G38390	3	130 760 556~130 762 545	413	4.569	8.94	叶绿体
<i>RLCK-VII-18</i>	AH03G41030	3	134 167 004~134 168 596	362	4.089	8.95	细胞核
<i>RLCK-VII-19</i>	AH03G41870	3	135 181 507~135 185 375	489	5.409	9.30	叶绿体
<i>RLCK-VII-20</i>	AH03G42080	3	135 361 025~135 363 980	422	4.605	9.46	叶绿体
<i>RLCK-VII-21</i>	AH04G00620	4	833 708~837 768	384	4.188	9.53	细胞核
<i>RLCK-VII-22</i>	AH04G03930	4	4 747 239~4 748 959	396	4.373	5.74	细胞核
<i>RLCK-VII-23</i>	AH04G16760	4	74 255 172~74 267 141	426	4.814	8.79	细胞核
<i>RLCK-VII-24</i>	AH04G16930	4	76 430 962~76 434 663	434	4.789	9.58	叶绿体
<i>RLCK-VII-25</i>	AH04G23340	4	110 957 012~110 961 214	433	4.761	9.06	细胞核
<i>RLCK-VII-26</i>	AH04G29420	4	121 800 479~121 804 314	481	5.321	9.71	叶绿体
<i>RLCK-VII-27</i>	AH05G01000	5	944 164~949 065	420	4.674	9.53	细胞核
<i>RLCK-VII-28</i>	AH05G01980	5	2 141 159~2 147 552	410	4.493	9.39	细胞核
<i>RLCK-VII-29</i>	AH05G03410	5	3 621 329~3 623 857	364	4.127	9.53	细胞核
<i>RLCK-VII-30</i>	AH05G09430	5	16 817 311~16 820 660	412	4.517	9.77	细胞核
<i>RLCK-VII-31</i>	AH05G09710	5	18 210 712~18 215 181	496	5.527	9.13	细胞核
<i>RLCK-VII-32</i>	AH05G11830	5	29 369 871~29 372 534	362	4.070	8.47	细胞核
<i>RLCK-VII-33</i>	AH06G09050	6	12 314 542~12 316 788	624	6.885	6.25	细胞核
<i>RLCK-VII-34</i>	AH06G13740	6	19 022 651~19 024 063	374	4.188	8.05	细胞核
<i>RLCK-VII-35</i>	AH06G15540	6	33 996 453~34 000 173	429	4.856	9.56	细胞核
<i>RLCK-VII-36</i>	AH06G19170	6	78 801 706~78 804 885	445	4.971	6.53	细胞核
<i>RLCK-VII-37</i>	AH06G26600	6	105 323 277~105 327 110	428	4.860	9.34	细胞核
<i>RLCK-VII-38</i>	AH07G00040	7	270 295~276 975	513	5.671	9.16	细胞核
<i>RLCK-VII-39</i>	AH07G03720	7	3 243 099~3 245 472	382	4.310	8.38	细胞核
<i>RLCK-VII-40</i>	AH07G10000	7	13 003 898~13 006 950	403	4.503	9.17	叶绿体
<i>RLCK-VII-41</i>	AH08G02260	8	3 988 809~3 991 391	374	4.237	9.55	叶绿体
<i>RLCK-VII-42</i>	AH08G02270	8	4 010 679~4 014 329	381	4.194	8.63	细胞核
<i>RLCK-VII-43</i>	AH08G12130	8	25 438 983~25 442 285	407	4.498	9.25	叶绿体
<i>RLCK-VII-44</i>	AH08G14100	8	28 501 236~28 504 540	430	4.789	8.56	细胞核
<i>RLCK-VII-45</i>	AH09G10250	9	15 589 614~15 593 426	481	5.433	9.00	细胞核
<i>RLCK-VII-46</i>	AH09G17490	9	68 652 164~68 655 744	574	6.281	9.13	细胞核
<i>RLCK-VII-47</i>	AH10G00020	10	24 892~31 514	513	5.670	9.16	细胞核
<i>RLCK-VII-48</i>	AH10G20480	10	94 591 110~94 593 490	377	4.264	8.90	细胞核
<i>RLCK-VII-49</i>	AH10G24170	10	104 766 389~104 770 971	500	5.515	9.58	细胞核
<i>RLCK-VII-50</i>	AH10G24360	10	105 200 668~105 206 782	486	5.417	9.73	细胞核
<i>RLCK-VII-51</i>	AH11G01420	11	1 470 548~1 474 203	506	5.600	4.95	细胞核
<i>RLCK-VII-52</i>	AH11G14090	11	38 443 411~38 446 711	390	4.384	9.47	细胞核
<i>RLCK-VII-53</i>	AH11G22960	11	123 029 145~123 032 133	357	3.992	8.25	细胞核

续表1 Continued1

基因名称	基因号	染色体	基因位置(bp)	氨基酸序列 长度(aa)	蛋白质相对 分子量($\times 10^4$)	等电点	亚细胞定位
<i>RLCK-VII-54</i>	AH11G32920	11	145 639 461~145 642 425	431	4.789	9.51	叶绿体
<i>RLCK-VII-55</i>	AH12G14290	12	36 284 465~36 288 709	379	4.178	9.26	细胞核
<i>RLCK-VII-56</i>	AH12G20230	12	90 389 050~90 391 621	352	3.916	9.13	细胞核
<i>RLCK-VII-57</i>	AH12G21760	12	96 644 503~96 648 218	411	4.539	9.60	叶绿体
<i>RLCK-VII-58</i>	AH12G36590	12	120 383 266~120 386 812	427	4.880	9.37	细胞核
<i>RLCK-VII-59</i>	AH13G03890	13	4 132 260~4 136 002	411	4.572	8.29	细胞核
<i>RLCK-VII-60</i>	AH13G04590	13	4 762 915~4 765 416	403	4.456	9.49	叶绿体
<i>RLCK-VII-61</i>	AH13G04600	13	4 766 138~4 769 204	463	5.213	6.78	细胞核
<i>RLCK-VII-62</i>	AH13G27380	13	50 342 882~50 346 165	452	5.061	9.22	叶绿体
<i>RLCK-VII-63</i>	AH13G31780	13	95 798 021~95 802 016	415	4.651	8.75	细胞核
<i>RLCK-VII-64</i>	AH13G38790	13	127 705 736~127 710 397	389	4.366	6.87	细胞核
<i>RLCK-VII-65</i>	AH13G41480	13	131 548 466~131 550 413	414	4.578	8.80	叶绿体
<i>RLCK-VII-66</i>	AH13G43860	13	134 895 750~134 897 788	362	4.089	8.83	细胞核
<i>RLCK-VII-67</i>	AH13G44540	13	135 684 767~135 688 433	489	5.412	9.30	细胞核
<i>RLCK-VII-68</i>	AH13G44710	13	135 809 492~135 812 489	422	4.602	9.50	叶绿体
<i>RLCK-VII-69</i>	AH13G60050	13	150 642 202~150 644 870	424	4.638	9.45	细胞核
<i>RLCK-VII-70</i>	AH14G00580	14	818 977~820 816	422	4.661	8.91	细胞核
<i>RLCK-VII-71</i>	AH14G01220	14	1 430 756~1 434 921	384	4.189	9.59	细胞核
<i>RLCK-VII-72</i>	AH14G04920	14	5 736 416~5 739 249	396	4.373	5.74	细胞核
<i>RLCK-VII-73</i>	AH14G27100	14	109 233 360~109 237 639	433	4.764	9.06	细胞核
<i>RLCK-VII-74</i>	AH14G34320	14	124 011 039~124 014 930	481	5.317	9.71	叶绿体
<i>RLCK-VII-75</i>	AH14G39360	14	129 507 053~129 512 158	478	5.329	8.15	细胞核
<i>RLCK-VII-76</i>	AH15G10910	15	21 191 635~21 194 296	362	4.068	8.47	细胞核
<i>RLCK-VII-77</i>	AH15G13130	15	30 806 312~30 811 065	496	5.518	9.06	细胞核
<i>RLCK-VII-78</i>	AH16G00090	16	87 659~89 165	387	4.329	8.46	细胞核
<i>RLCK-VII-79</i>	AH16G00100	16	101 567~103 745	279	3.125	9.31	叶绿体
<i>RLCK-VII-80</i>	AH16G12920	16	21 730 047~21 732 397	512	5.635	5.48	细胞核
<i>RLCK-VII-81</i>	AH16G18700	16	44 338 254~44 342 021	429	4.856	9.56	细胞核
<i>RLCK-VII-82</i>	AH16G29950	16	128 406 461~128 419 395	426	4.812	8.79	细胞核
<i>RLCK-VII-83</i>	AH16G33210	16	135 185 830~135 189 576	428	4.847	9.23	细胞核
<i>RLCK-VII-84</i>	AH16G37780	16	142 732 856~142 734 682	396	4.467	8.46	细胞核
<i>RLCK-VII-85</i>	AH16G44690	16	150 705 612~150 708 480	396	4.461	8.46	细胞核
<i>RLCK-VII-86</i>	AH17G00450	17	990 789~993 538	424	4.635	9.45	细胞核
<i>RLCK-VII-87</i>	AH17G04130	17	4 573 980~4 577 882	393	4.322	9.63	细胞核
<i>RLCK-VII-88</i>	AH17G09050	17	13 069 418~13 072 783	403	4.496	9.23	叶绿体
<i>RLCK-VII-89</i>	AH17G20680	17	77 232 964~77 237 556	447	5.017	7.72	细胞核
<i>RLCK-VII-90</i>	AH17G22600	17	102 657 165~102 660 193	302	3.293	8.44	细胞核
<i>RLCK-VII-91</i>	AH17G22660	17	102 792 771~102 795 566	370	4.068	8.81	细胞核
<i>RLCK-VII-92</i>	AH17G22670	17	102 872 627~102 876 205	375	4.246	9.54	叶绿体
<i>RLCK-VII-93</i>	AH18G04190	18	3 456 540~3 459 828	407	4.503	9.24	叶绿体
<i>RLCK-VII-94</i>	AH19G13400	19	20 227 277~20 230 606	481	5.436	9.11	细胞核
<i>RLCK-VII-95</i>	AH19G22410	19	87 653 071~87 656 459	573	6.274	9.08	细胞核
<i>RLCK-VII-96</i>	AH20G00870	20	796 117~800 619	416	4.515	9.43	叶绿体
<i>RLCK-VII-97</i>	AH20G26850	20	120 698 724~120 701 237	378	4.277	8.90	细胞核
<i>RLCK-VII-98</i>	AH20G31340	20	133 585 358~133 589 979	502	5.537	9.58	叶绿体
<i>RLCK-VII-99</i>	AH20G31520	20	134 111 709~134 115 907	339	3.803	9.91	细胞核
<i>RLCK-VII-100</i>	AH00G02550	00	3 181 082~3 183 938	382	4.306	8.38	细胞核
<i>RLCK-VII-101</i>	AH00G03210	00	4 250 563~4 254 223	430	4.798	8.71	细胞核

2.2 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因在染色体上的分布

如图1所示,在101个已鉴定的 *RLCK-VII* 基因中,99个成员分布于20条染色体上,*RLCK-VII-100*和*RLCK-VII-101*未定位到染色体上。13号染色体上 *RLCK-VII* 基因最多,18号染色体仅含有1个 *RLCK-VII* 基因,为 *RLCK-VII-93*。

2.3 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员的系统发育分析

利用101个花生 *RLCK-VII* 亚家族成员和46个拟南芥 *AtRLCK-VII* 亚家族成员的氨基酸序列构建系统发育树。如图2所示,这147个 *RLCK-VII* 亚家族成员被分为8个分支。分支I包含73个 *RLCK-VII* 和31个 *AtRLCK-VII*。分支IV仅含1个成员,为 *AtPBL41*。

2.4 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因和蛋白质结构分析

如图3所示,各 *RLCK-VII* 亚家族成员基因均含有数量不等的内含子,其中 *RLCK-VII-7* 仅含1个内含子。在 *RLCK-VII* 亚家族成员蛋白质中鉴定出10个保守基序,其中基序2和基序7几乎在所有 *RLCK-VII* 亚家族成员蛋白质中存在。

2.5 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因启动子中的顺式作用元件分析

如图4所示,101个 *RLCK-VII* 基因启动子中包含8个胁迫响应顺式调控元件,分别为脱落酸响应元件、生长素响应元件、防御和应激响应元件、赤霉素响应元件、光响应元件、低温响应元件、茉莉酸甲酯响应元件、水杨酸响应元件。

101个 *RLCK-VII* 基因启动子中胁迫响应顺式调控元件为9个(*RLCK-VII-12*)~64个(*RLCK-VII-25*)。101个 *RLCK-VII* 基因启动子中均包含光响应元件,总数为1291个。防御和应激响应元件出现频率最低,仅存在于38个 *RLCK-VII* 基因启动子中,总数为48个。脱落酸响应元件和茉莉酸甲酯(71.3%)响应元件的出现频率较高,与其参与多种胁迫应答的功能相符。

2.6 *RLCK-VII* 亚家族成员基因表达的组织特异性分析

如图5所示, *RLCK-VII-34*、*RLCK-VII-36* 和 *RLCK-VII-51* 在所有检测组织中均未检测到表达,而 *RLCK-VII-53*、*RLCK-VII-78* 和 *RLCK-VII-89* 仅在单一组织中表达。*RLCK-VII-4* 和 *RLCK-VII-70* 在根和果

皮中相对表达量较高。*RLCK-VII-1* 和 *RLCK-VII-6* 在大多数组织中表达几乎检测不到。在胚胎发育后期,*RLCK-VII-29* 和 *RLCK-VII-59* 的相对表达量较高,这些基因与种子成熟过程相关。*RLCK-VII-20* 和 *RLCK-VII-58* 等基因在花和子房柄组织中的相对表达量较高。对 *RLCK-VII-4*、*RLCK-VII-70*、*RLCK-VII-20* 和 *RLCK-VII-58* 基因进行 RT-qPCR 验证。结果表明,RT-qPCR 分析结果与 RNA-seq 数据一致,*RLCK-VII-4*、*RLCK-VII-58* 和 *RLCK-VII-70* 在茎中的相对表达量显著高于其在根、叶、花中的相对表达量 ($P < 0.05$),*RLCK-VII-20* 在茎和花中的相对表达量显著高于其在根、叶中的相对表达量 ($P < 0.05$)。

2.7 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因对植物激素与非生物胁迫的响应模式分析

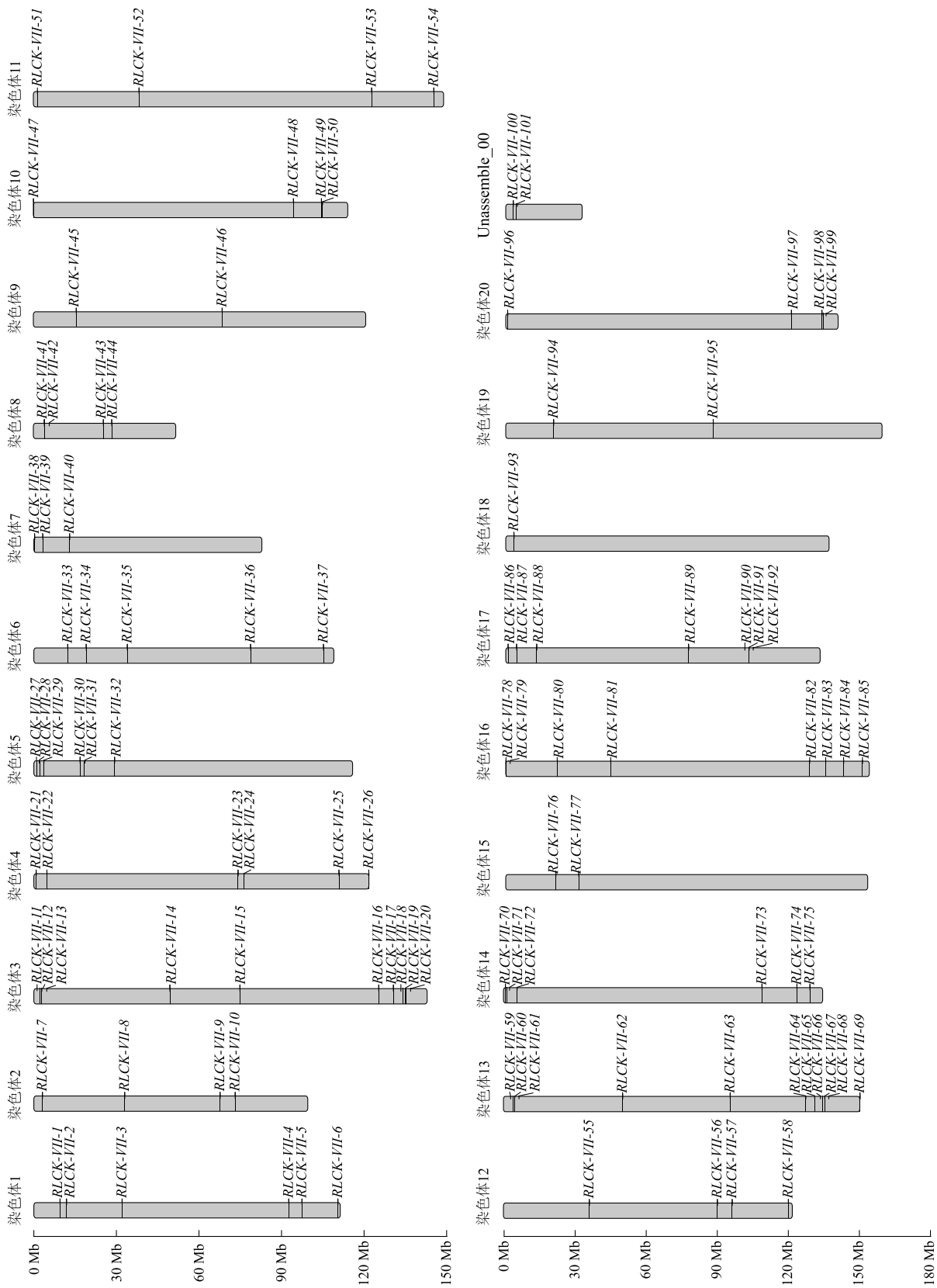
如图6所示,在干旱胁迫下,有多个基因相对表达量显著升高,其中 *RLCK-VII-26*、*RLCK-VII-30*、*RLCK-VII-59* 和 *RLCK-VII-92* 基因相对表达量升高5倍以上,*RLCK-VII-52*、*RLCK-VII-71*、*RLCK-VII-83*、*RLCK-VII-87* 和 *RLCK-VII-92* 相对表达量升高10倍以上。油菜素内酯和脱落酸处理诱导 *RLCK-VII-11*、*RLCK-VII-5* 等基因相对表达量升高。*RLCK-VII-1*、*RLCK-VII-7* 和 *RLCK-VII-22* 等基因相对表达量不受激素和非生物胁迫调控。对低温胁迫下相对表达量较高的 *RLCK-VII-21*、*RLCK-VII-71*、*RLCK-VII-86* 和 *RLCK-VII-87* 基因进行 RT-qPCR 验证。结果表明,RT-qPCR 分析结果与 RNA-seq 数据一致。

2.8 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因的种内和种间共线性分析

如图7所示,花生种内共线性分析共鉴定出130对旁系同源基因,源自59个祖先位点。如图8所示,花生与拟南芥物种间共线性分析共鉴定出121对直系同源基因。

3 讨论与结论

RLCK-VII 亚家族在植物免疫、生长发育及胁迫应答等关键信号通路中发挥重要作用^[5,7]。本研究对花生 *RLCK-VII* 亚家族进行了系统分析,揭示了该亚家族在花生中的进化特征与表达模式。系统发育分析将 *RLCK-VII* 亚家族分为8个分支。Motif2 和 Motif7 在所有成员中均存在,表明该家族在功能上具有保守性。共线性分析结果表明,花生的 *RLCK-VII* 亚家族的扩张主要源于染色体片段复制事件,染



Unassemble_00表示未比对到染色体上的基因。

图1 花生*RLCK-VII*亚家族成员的染色体分布

Fig.1 Chromosomal distribution of members of the peanut *RLCK-VII* subfamily

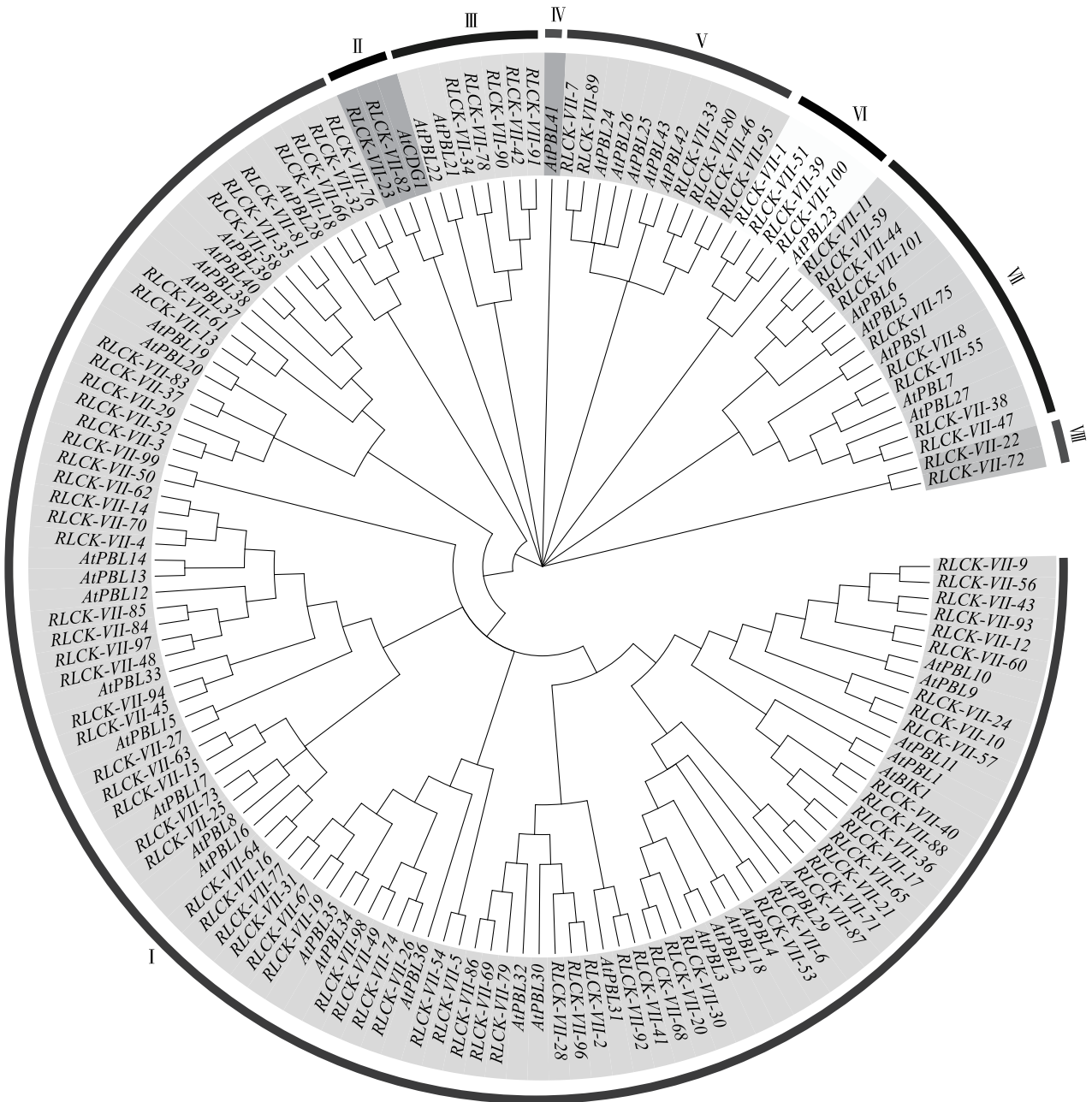


图2 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员与拟南芥 *AtRLCK-VII* 亚家族成员的系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of members of the peanut *RLCK-VII* subfamily and *Arabidopsis thaliana AtRLCK-VII* subfamily

色体片段复制为基因新功能的产生及表型多样性提供了遗传基础^[32]。启动子顺式作用元件分析结果显示,所有 *RLCK-VII* 基因启动子中均含有光响应元件。

RLCK-VII-4 和 *RLCK-VII-70* 在根和果皮中相对表达量较高。在胚胎发育后期, *RLCK-VII-29* 和 *RLCK-VII-59* 相对表达量较高,这些基因与种子成熟

过程相关。*RLCK-VII-20* 和 *RLCK-VII-58* 等基因在花和子房柄组织中相对表达量较高。*RLCK-VII-4*、*RLCK-VII-58* 和 *RLCK-VII-70* 在茎中的相对表达量显著高于其在根、叶、花中的相对表达量 ($P < 0.05$), *RLCK-VII-20* 在茎和花中的相对表达量显著高于其在根、叶中的相对表达量 ($P < 0.05$)。

在干旱胁迫下,多个基因相对表达量显著升高,



A: 蛋白质结构; B: 基因结构; Motif: 模体; UTR: 非翻译区; CDS: 编码序列。

图3 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因和蛋白质结构

Fig.3 Gene and protein structures of members of the peanut *RLCK-VII* subfamily

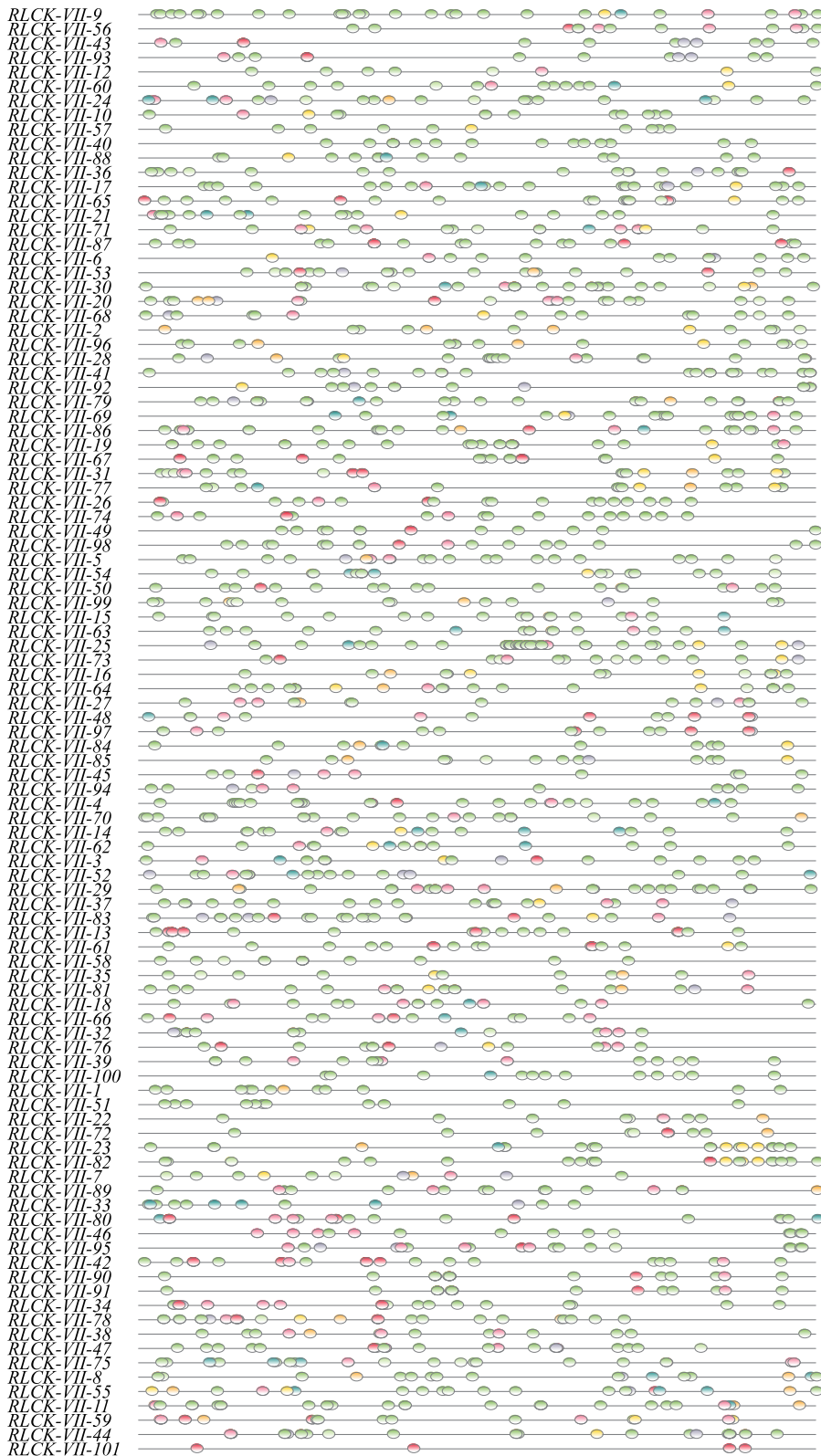
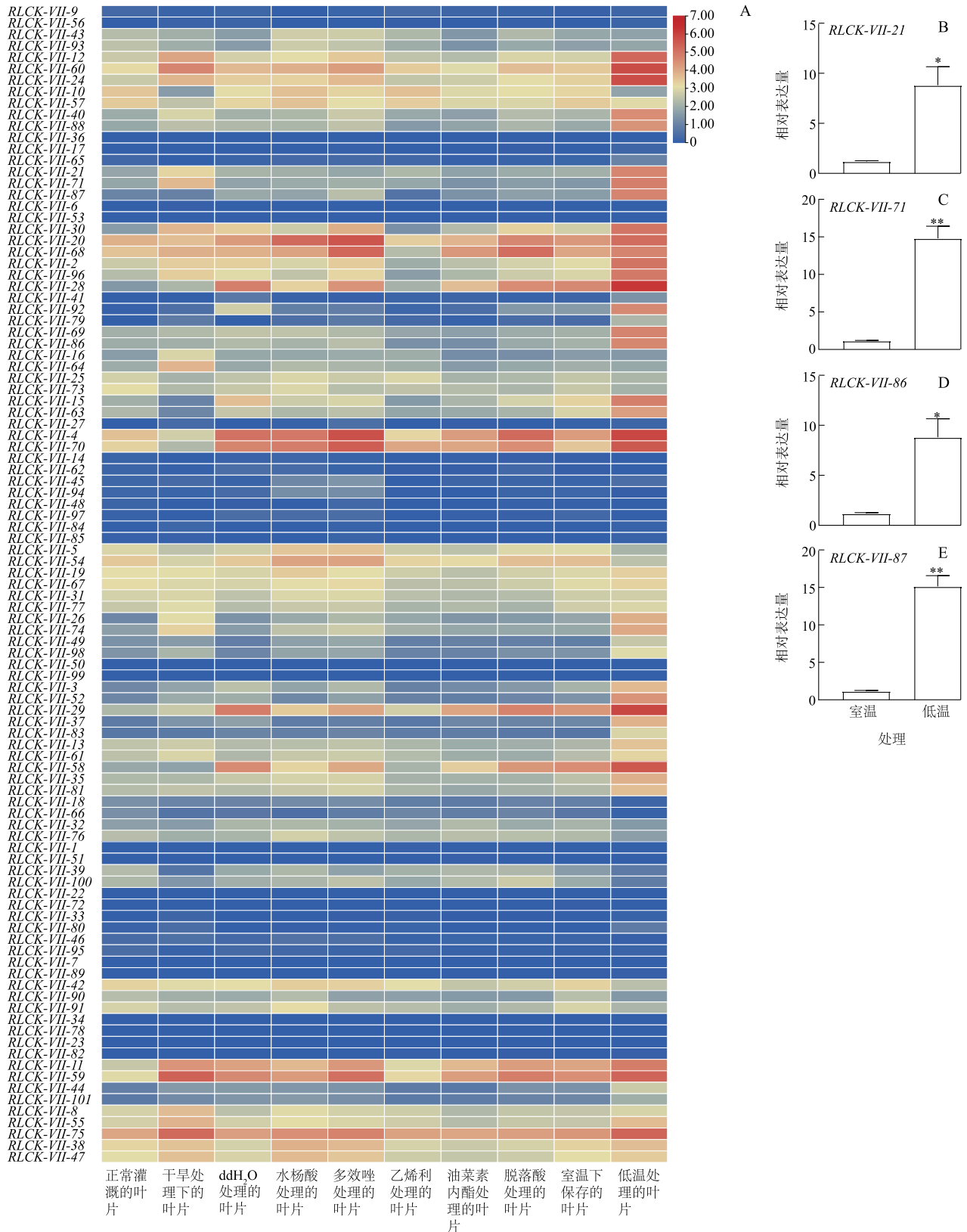


图 4 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因启动子中的顺式作用元件

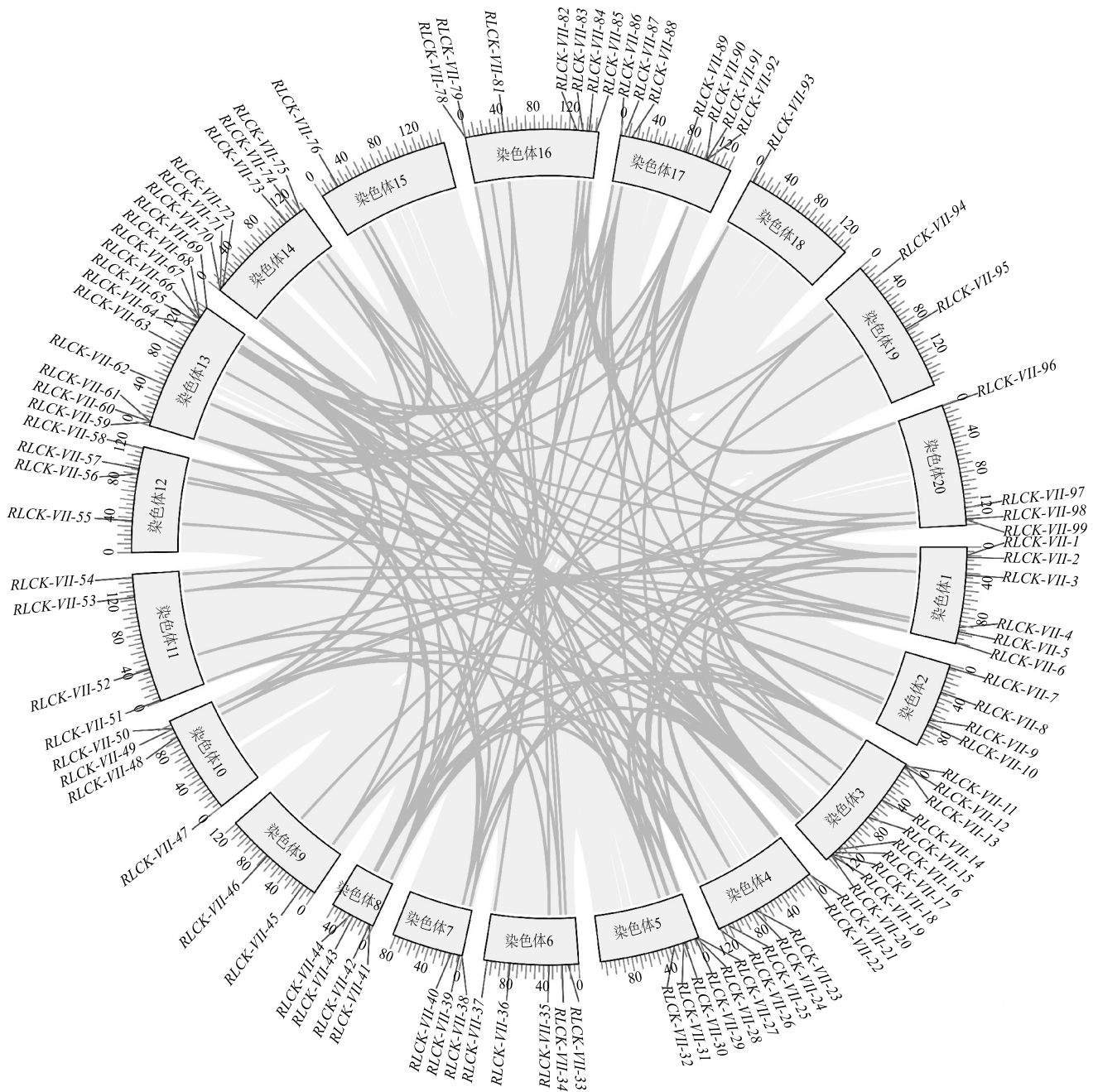
Fig.4 Cis-acting elements in gene promoters of members of the peanut *RLCK-VII* subfamily



A: *RLCK-VII* 亚家族成员基因表达情况; B ~ E: *RLCK-VII-21*、*RLCK-VII-71*、*RLCK-VII-86*、*RLCK-VII-87* 的相对表达量, * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

图 6 植物激素与非生物胁迫处理下花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因的表达模式

Fig.6 Expression patterns of genes of members of the peanut *RLCK-VII* subfamily under plant hormone and abiotic stress treatments



黑线指示旁系同源 *RLCK-VII* 基因对;数据表示染色体长度(Mb)。

图7 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员基因的共线性分析

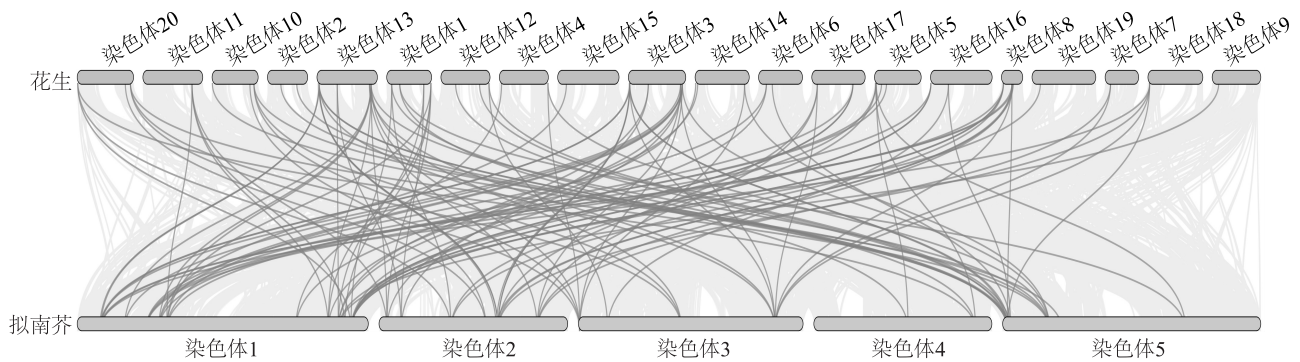
Fig.7 Collinearity analysis of genes of members of the peanut *RLCK-VII* subfamily

其中 *RLCK-VII-26*、*RLCK-VII-30*、*RLCK-VII-59* 和 *RLCK-VII-92* 基因相对表达量升高 5 倍以上, *RLCK-VII-52*、*RLCK-VII-71*、*RLCK-VII-83*、*RLCK-VII-87* 和 *RLCK-VII-92* 相对表达量升高 10 倍以上。油菜素内酯和脱落酸处理诱导 *RLCK-VII-11*、*RLCK-VII-5* 等基因相对表达量升高。 *RLCK-VII-1*、*RLCK-VII-7* 和

RLCK-VII-22 等基因相对表达量不受激素和非生物胁迫调控。

参考文献:

[1] MORRIS E R, WALKER J C. Receptor-like protein kinases: the keys to response [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6 (4): 339-342.



黑线指示直系同源 *RLCK-VII* 基因对。

图8 花生 *RLCK-VII* 亚家族成员与拟南芥 *AtRLCK-VII* 亚家族成员基因的共线性分析

Fig.8 Collinearity analysis of genes of members of the peanut *RLCK-VII* subfamily and *Arabidopsis thaliana AtRLCK-VII* subfamily

- [2] SAKAMOTO T, DEGUCHI M, BRUSTOLINI O J, et al. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-II-RLK subfamily in antiviral defense[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 229.
- [3] SHIU S H, KARLOWSKI W M, PAN R, et al. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice[J]. The Plant Cell, 2004, 16(5): 1220-1234.
- [4] LIN W W, MA X Y, SHAN L B, et al. Big roles of small kinases: the complex functions of receptor-like cytoplasmic kinases in plant immunity and development[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55(12): 1188-1197.
- [5] LIANG X X, ZHOU J M. Receptor-like cytoplasmic kinases: central players in plant receptor kinase-mediated signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 267-299.
- [6] VIJ S, GIRI J, DANSANA P K, et al. The receptor-like cytoplasmic kinase (*OsRLCK*) gene family in rice: organization, phylogenetic relationship, and expression during development and stress[J]. Molecular Plant, 2008, 1(5): 732-750.
- [7] RAO S F, ZHOU Z Y, MIAO P, et al. Roles of receptor-like cytoplasmic kinase vii members in pattern-triggered immune signaling[J]. Plant Physiology, 2018, 177(4): 1679-1690.
- [8] KONG Q, SUN T J, QU N, et al. Two redundant receptor-like cytoplasmic kinases function downstream of pattern recognition receptors to regulate activation of SA biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2016, 171(2): 1344-1354.
- [9] SREEKANTA S, BETHKE G, HATSUGAI N, et al. The receptor-like cytoplasmic kinase PCRK1 contributes to pattern-triggered immunity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana* [J]. New Phytologist, 2015, 207(1): 78-90.
- [10] LI Y J, XUE J, WANG F Z, et al. Plasma membrane-nucleo-cytoplasmic coordination of a receptor-like cytoplasmic kinase promotes EDS1-dependent plant immunity[J]. Nature Plants, 2022, 8(7): 802-816.
- [11] SHINYA T, YAMAGUCHI K, DESAKI Y, et al. Selective regulation of the chitin-induced defense response by the *Arabidopsis* receptor-like cytoplasmic kinase PBL27[J]. Plant Journal, 2014, 79(1): 56-66.
- [12] DU C Q, LI X S, CHEN J, et al. Receptor kinase complex transmits RALF peptide signal to inhibit root growth in *Arabidopsis* [J]. PNAS, 2016, 113(51): E8326-E8334.
- [13] KIM D S, HWANG B K. The pepper receptor-like cytoplasmic protein kinase CaPIK1 is involved in plant signaling of defense and cell-death responses[J]. Plant Journal, 2011, 66(4): 642-655.
- [14] LI Z Q, AO Y, FENG D R, et al. OsRLCK 57, OsRLCK107 and OsRLCK118 positively regulate chitin- and pgn-induced immunity in rice[J]. Rice, 2017, 10(1): 6.
- [15] ZHOU X G, WANG J, PENG C F, et al. Four receptor-like cytoplasmic kinases regulate development and immunity in rice [J]. Plant Cell and Environment, 2016, 39(6): 1381-1392.
- [16] YAMAGUCHI K, YOSHIMURA Y, NAKAGAWA S, et al. OsDRE2 contributes to chitin-triggered response through its interaction with OsRLCK185[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2019, 83(2): 281-290.
- [17] RAMEGOWDA V, BASU S, KRISHNAN A, et al. Rice growth under drought kinase is required for drought tolerance and grain yield under normal and drought stress conditions[J]. Plant Physiology, 2014, 166(3): 1634-1645.
- [18] RAMEGOWDA V, BASU S, GUPTA C, et al. Regulation of grain yield in rice under well-watered and drought stress conditions by GUDK[J]. Plant Signaling & Behavior, 2015, 10(11): e1034421.
- [19] SHEN W, GÓMEZ-CADENAS A, ROUTLY E L, et al. The salt stress-inducible protein kinase gene, *Esi47*, from the salt-tolerant wheatgrass *Lophopyrum elongatum* is involved in plant hormone signaling[J]. Plant Physiology, 2001, 125(3): 1429-1441.
- [20] JIANG C J, LI X L, ZOU J X, et al. Comparative transcriptome analysis of genes involved in the drought stress response of two peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 64.

- [21] SEIJO G, LAVIA G I, FERNÁNDEZ A, et al. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH[J]. American Journal of Botany, 2007, 94(12):1963-1971.
- [22] LIU X Y, LEI Z P, YANG Y, et al. Genome-wide identification of GhRLCK-VII subfamily genes in *Gossypium hirsutum* and investigation of their functions in resistance to *Verticillium* wilt[J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1):421.
- [23] LETUNIC I, BORK P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1):D493-D496.
- [24] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Research, 1994, 22(22):4673-4680.
- [25] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. Mega X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology Evolution, 2018, 35(6):1547-1549.
- [26] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37:W202-W208.
- [27] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8):1194-1202.
- [28] LESCOT M, DÉHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1):325-327.
- [29] WANG Y P, TANG H B, DEBARRY J D, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7):e49.
- [30] KRZYWINSKI M, SCHEIN J, BIROL I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics[J]. Genome Research, 2009, 19(9):1639-1645.
- [31] REDDY D S, BHATNAGAR-MATHUR P, CINDHURI K S, et al. Evaluation and validation of reference genes for normalization of quantitative real-time PCR based gene expression studies in peanut[J]. PLoS One, 2013, 8(10):e78555.
- [32] FREELING M. Bias in plant gene content following different sorts of duplication: tandem, whole-genome, segmental, or by transposition[J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60:433-453.

(责任编辑:成纾寒)