

姜玉素, 李 珍, 王庆莲, 等. 草莓 *KEA* 家族基因的克隆、鉴定及表达分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35( 2 ): 391-399.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.021

## 草莓 *KEA* 家族基因的克隆、鉴定及表达分析

姜玉素<sup>1,2</sup>, 李 珍<sup>2</sup>, 王庆莲<sup>3</sup>, 赵密珍<sup>3</sup>, 宋志忠<sup>2,3</sup>

(1. 烟台职业学院, 山东 烟台 264670; 2. 鲁东大学农学院, 山东 烟台 264025; 3. 江苏省农业科学院果树研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:**  $K^+/H^+$  逆向转运体(KEA)介导细胞中  $K^+$  和  $H^+$  的动态平衡, 在维持植物体内的离子平衡、生长发育和信号转导中起重要作用, 然而, 相关研究主要体现在模式作物拟南芥中, 果树中 *KEA* 家族基因的功能依然未知。本研究以 Yellow Wonder 5AF8 草莓为材料, 筛选并克隆 *KEA* 家族基因, 并对其进行生物信息学鉴定和表达特征分析, 为研究果树  $K^+/H^+$  平衡及钾素动态平衡机制提供基因资源和理论依据。结果表明, 在草莓基因组中检索并克隆到 5 个 *KEA* 家族基因, 命名为 *FveKEA1* ~ *FveKEA5*, 属于典型的植物  $K^+/H^+$  逆向转运体基因; 编码的蛋白质与 7 种已报道的不同科属植物的 *KEA* 家族蛋白在氨基酸水平上具有 25.00% 的一致性, 并可分为 2 个亚族( Group I 和 Group II), 其中, 草莓 *FveKEA1* 和 *FveKEA2* 属于 Group I, 只含有 4 个 Motif 基序, 而 *FveKEA3* ~ *FveKEA5* 属于 Group II, 含有 7 个 Motif 基序; 系统进化树表明草莓 *FveKEA2* 和 *FveKEA4* 分别与葡萄 *VvKEA2* 和苹果 *MdoKEA6* 紧密聚在一起, 草莓 *FveKEA1*, *FveKEA3* 和 *FveKEA5* 分别与葡萄 *VvKEA1*、白杨 *PtrKEA4*、桃 *PpeKEA4* 等相应成员在遗传距离上较近; 草莓 *KEA* 家族蛋白主要定位于细胞质膜, 均含有 12~14 个跨膜区, 除 *FveKEA3* 外, 均为稳定蛋白, 且只有 *FveKEA5* 含有信号肽; 转录表达谱分析结果揭示草莓 *KEA* 家族基因在多种组织或器官中均有表达, 实时荧光定量 PCR 结果表明 *FveKEA1* 在 5AF8 草莓不同组织中的整体表达水平最高, 在花瓣和未成熟果实中的表达量最为突出, 其次是 *FveKEA4*, 而其他 3 个基因的整体表达水平相对较低。此外, 在草莓 *KEA* 基因启动子区域鉴定到至少 16 种顺式作用元件, 且均含有光感应、胚乳表达和脱落酸(ABA)响应的作用元件。

**关键词:** 草莓;  $K^+/H^+$  逆向转运体; 生物信息学分析; 基因克隆与表达

**中图分类号:** S668.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)02-0391-09

## Cloning, characterization and expression analysis of *KEA* family genes in strawberry

JIANG Yu-su<sup>1,2</sup>, LI Zhen<sup>2</sup>, WANG Qing-lian<sup>3</sup>, ZHAO Mi-zhen<sup>3</sup>, SONG Zhi-zhong<sup>2,3</sup>

(1. Yantai Vocational College, Yantai 264670, China; 2. School of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, China; 3. Institute of Pomology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** In plants,  $K^+$  efflux antiporters (KEAs) mediate the cellular  $K^+/H^+$  homeostasis and play key role in the

收稿日期: 2018-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501743、31301764); 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201721); 泰州市科技支撑计划项目(TN201708)

作者简介: 姜玉素(1973-), 女, 山东烟台人, 硕士, 讲师, 主要进行食品发酵与分子生物学研究。(Tel) 13863857817; (E-mail) jiangyusu906552@163.com

通讯作者: 宋志忠, (Tel) 025-84390255; (E-mail) szhzh2000@163.com

ion balance, growth and development and signal transduction. However, the relevant studies mainly focused on model plant *Arabidopsis*, the functions of *KEA* family genes in fruit trees were rarely known. Using Yellow Wonder 5AF8 strawberry as material, *KEA* family genes bioinformatics identification and gene expression characteristics were analyzed to provide gene resources and theoretical foundation for the study of  $K^+/H^+$  balance and  $K^+$  homeostasis mechanisms in fruit trees. Results showed that five

*KEA* family genes were isolated from strawberry, named *FveKEA1*–*FveKEA5*, which belonged to the typical plant  $K^+/H^+$  antiporter gene. The encoded proteins shared an overall identity of 25.00% at the amino acid level with the *KEA* family proteins of seven different families, and could be divided into two subgroups, Group I and Group II. *FveKEA1* and *FveKEA2* belonged to Group I, and contained four Motif motifs. *FveKEA3*–*FveKEA5* belonged to Group II, and contained seven Motif motifs. Phylogenetic tree analysis showed that *FveKEA2* and *FveKEA4* of strawberry were closely related to *VvKEA2* of grape and *MdoKEA6* of apple, respectively, and *FveKEA1*, *FveKEA3* and *FveKEA5* were closely related to *VvKEA1* of grape, *PtrKEA4* of polar and *PpeKEA4* of peach, correspondingly. All *FveKEA* proteins were majorly localized in plasma membrane and contained 12–14 transmembrane domains (TMs). All strawberry *KEA* proteins were stable protein with the exception of *FveKEA3*, and only *FveKEA5* possessed the signal peptide. The results of transcriptional profiling revealed that *FveKEA* genes could be detected in various tissues or organs of strawberry. qRT-PCR analysis results indicated that *FveKEA1* had the highest expression level in different tissues of 5AF8 strawberry on the whole and the most prominent expression level in petals and immature fruits, followed by *FveKEA4*, while the overall expression levels of the other three genes were relatively low. Moreover, at least 16 cis-acting elements were identified in the promoter region of strawberry *KEA* family genes, and all of them contained elements of light sensing, endosperm expression and abscisic acid response.

**Key words:** strawberry;  $K^+/H^+$  antiporter; bioinformatics analysis; gene cloning and expression

钾离子( $K^+$ )是细胞中含量最为丰富的金属阳离子之一,控制着细胞基础膜电位,调节细胞渗透平衡,在植物光合作用、蒸腾作用、气孔开关和信号传导等多种生命活动中起关键作用<sup>[1-2]</sup>。园艺研究中,钾素营养与果树生长发育、花开放、果实品质和产量等密切相关<sup>[3-7]</sup>,但果树钾素营养高效利用的分子基础研究较少。

CPAs(Cation proton antiporters)定位于细胞质膜、液泡膜和线粒体、叶绿体、内质网等细胞器膜,是一类广泛存在于植物、动物、真菌和细菌的阳离子-质子逆向转运体,可将细胞中的 $K^+$ 、 $Na^+$ 、 $Li^+$ 等阳离子排出,并引起细胞内 $H^+$ 的内流和积累<sup>[8-9]</sup>,维持细胞 $K^+$ 和 $H^+$ 的动态平衡。植物中,CPAs介导细胞中离子和pH的稳态,在维持植物体内的渗透平衡、生长发育和信号转导中起重要作用<sup>[8-16]</sup>。植物CPAs被分为2个亚族:CPA1和CPA2,其中,CPA1亚族主要是NHX( $Na^+/H^+$  exchanger)转运体,CPA2亚族包括KEA( $K^+$  efflux antiporter,  $K^+/H^+$  逆向转运体)和CHX(Cation/ $H^+$  exchanger)转运体<sup>[8-10]</sup>。近20年,NHX和CHX的研究报道相对较多,有关KEA亚族的研究最为稀少,主要体现在模式作物拟南芥中,Maser等在2011年最早揭示拟南芥中有6个*AtKEA*转运体基因<sup>[11]</sup>,但所有*AtKEA*基因的功能至今依然没有完全被解析。最近研究结果表明:拟南芥*AtKEA*转运体定位于维管组织、保卫细胞和花萼等不同组织部位<sup>[12]</sup>,拟南芥*AtKEA1*–3转运体在光合作用、pH调控及叶绿体渗透调节等方面起关键作

用,并在转录水平受外界渗透胁迫、盐胁迫和ABA胁迫的调控<sup>[13-16]</sup>。

果树中KEA家族基因的功能依然未知,仅见于梨KEA家族基因的克隆及生物信息学分析<sup>[17]</sup>。草莓[*Fragaria vesca*]是一种全球重要的水果,随着基因组序列的公布,迅速成为最具研究潜力的园艺作物之一<sup>[18]</sup>。本研究从草莓中克隆并鉴定了5个KEA家族基因,并通过实时荧光定量PCR分析组织特异性表达特征,为研究果树钾素营养与离子动态平衡提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及取样

供试材料为江苏省农业科学院草莓资源圃中的草莓Yellow Wonder 5AF8,于2018年3月采样。所取样品依次为盛花期草莓植株的根、叶片、花瓣、花药和草莓发育不同时期的果实(参照Fait等<sup>[19]</sup>描述,即:小绿果、白果、转色果、成熟果)。

### 1.2 草莓KEA基因克隆

以6个拟南芥KEA家族基因(TAIR数据库, <http://www.arabidopsis.org/browse/genefamily/index.jsp>)编码的氨基酸序列为参考,在Phytozome strawberry genome database (<http://www.phytozome.net>)中检索草莓基因组中可能的KEA家族基因。检索结果在Pfam (<http://pfam.xfam.org/search>)在线服务器预测功能结构域。根据Phytozome获得的草莓KEA基因CDS序列(coding sequence),分别设计引

物,利用 Prime STAR™ HS DNA 聚合酶(TaKaRa,大连)进行 PCR 扩增,测序验证后,用于特异性表达引物设计。

### 1.3 草莓 KEA 家族基因生物信息学分析

在草莓基因组数据库中获得 KEA 家族各基因的 CDS 编码区序列及基因组 DNA 序列,然后通过 Gene structure display (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>)在线服务器进行基因结构分析,利用在线软件 TMPredict ([http://ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html))分析草莓 KEA 家族蛋白的跨膜结构域,使用在线服务器 MEME(v4.8.1) (<http://meme-suite.org/tools/meme>)预测草莓 KEA 家族蛋白的保守结构域,使用在线工具 ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>)评估 KEA 蛋白成员的理论等电点、分子量、稳定性等理化性质,利用在线软件 SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>)预测 KEA 家族蛋白的信号肽情况,利用 PSORT 在线服务器 (<http://psort.hgc.jp/form.html>)预测草莓 KEA 家族蛋白的亚细胞定位,利用 Phyre2 在线服务器 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)分析草莓 KEA 家族蛋白的三级结构,利用 ClustalX 2.0 软件对 5 个草莓 KEA 转运体与梨(12 个)、苹果(7 个)、桃(5 个)、葡萄(4 个)、橙(5 个)、杨树(4 个)等已知物种的同源 KEA 转运体进行氨基酸序列比对分析<sup>[16]</sup>,用分子进化遗传分析软件 MEGA 7.0 中的邻接法(Neighbor-joining)构建系统进化树。利用 Kang 等建立的草莓不同发育阶段的表达谱数据库 Strawberry Genomic Resources (<http://bioinformatics.towson.edu/strawberry/>)<sup>[18]</sup>获得草莓 KEA 家族基因在不同组织的表达谱信息。为分析草莓 KEA 家族基因的启动子区域,在 Phytozome 草莓基因组数据库检索目的基因 CDS 区域起始密码子 ATG 的上游 1.5 kb 左右片段的启动子区域,并通过 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线网站分析草莓 KEA 启动子序列中是否含有的 *cis*-顺式作用元件。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 分析

分别采集草莓 5AF8 不同部位的组织材料,液氮冷冻后-80℃冰箱保存,通过 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit(TaKaRa,大连)提取样品的总 RNA,并利用 PrimeScript™ RT reagent Kit 反转录

试剂盒(TaKaRa,大连)合成第一链 cDNA 作为模板,用于实时荧光定量 PCR。利用 NCBI/Primer-BLAST 在线服务器,设计草莓 KEA 基因的特异性表达引物(表 1),以草莓 Ubiquitin (GenBank No. MH114011)为目的基因,通过 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪检测 KEA 基因在草莓植株不同组织的表达特征。荧光染料使用 SYBR Green (TaKaRa,大连),反应体系参照说明书,反应程序为:95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火 34 s(40 个循环);最后 72℃延伸 10 s。每个样品进行 3 次重复,不同样品在实时荧光定量 PCR 仪获得相应的 *Ct* 值,经内参基因 *Actin* 均一化处理后,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的相对表达量<sup>[20]</sup>。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用的特异性引物序列

Table 1 Specific primers used for quantitative RT-PCR

基因	引物序列 (5'→3')	扩增大小 (bp)
<i>FveKEA1</i>	F: TCTGCGGATTTGGACGACTT	169
	R: GACAGCCAAGATGGCTCAGT	
<i>FveKEA2</i>	F: AACTTCCTCCTAACGGGGCT	208
	R: TGGTGTTCAAATGCCTTGCT	
<i>FveKEA3</i>	F: GTTCAACCCTTCCCTCGACC	134
	R: GGACTTCGGAGTGTTGTCTT	
<i>FveKEA4</i>	F: CCAATACCACGATGCGCCTA	158
	R: TCCTAGGTTTCGGCTTTGCC	
<i>FveKEA5</i>	F: AGCATCTGTGGCATTCTGCT	148
	R: ATTGCGAATGGGCTCAACCT	
<i>FveActin</i>	F: TGGGTTTGCTGGAGATGAT	156
	R: CAGTAGGAGAACTGGGTGC	

## 2 结果与分析

### 2.1 草莓 KEA 家族基因的筛选与克隆

以 6 个拟南芥 KEA 家族基因的氨基酸序列为参考,在 Phytozome strawberry genome database (<http://www.phytozome.net>)草莓基因组数据库中检索到 5 个 KEA 家族基因,检索结果在 Pfam 在线服务器预测到 K/H 交换结构域(K/H exchanger domain) (PF00999)和 TrkA-N domain (PF02254)功能结构域,均属于典型的 KEA 家族蛋白。检索获得各基因的碱基序列后,以 CDS 序列起始密码子 ATG 和终止密码子 TAG 所在位置 20 bp 左右的序列作为上



下游引物,以 5AF8 草莓幼叶 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板,PCR 扩增各个候选基因的 CDS 序列,分别连接到 pGEM-T 载体,转化大肠杆菌感受态菌株 DH5a,筛选阳性转化子送北京擎科生物技术有限公司测序。经测序验证后,获得草莓 5AF8 的 KEA 家族各基因的 CDS 序列及相应翻译得到的氨基酸序列,获得的草莓 KEA 家族基因分别命名为 *FveKEA1*~*FveKEA5*。

## 2.2 7 种不同科属植物 KEA 家族成员的系统发育树

将草莓(蔷薇科)、桃(蔷薇科)、梨(蔷薇科)、苹果(蔷薇科)、葡萄(葡萄科)、橙(芸香科)、白杨(杨柳科)等 7 种不同科属物种的 KEA 家族基因(表 2),通过 ClustalX 2.0 进行氨基酸水平的多重序列比对。结果表明,供试物种的 KEA 家族基因之间具有较高的同源性,同源关系较近的两者的序列一致性均高于 66.05%;7 种植物 42 个 KEA 家族成员在氨基酸水平依然具有 25.00%的一致性,在核苷酸水平具有 25.60%的一致性;5 个草莓 KEA 家族成员在氨基酸水平具有 41.88%的一致性(图 1),在核苷酸水平具有 40.97%的一致性。利用 MEGA 7.0 建立系统进化树,结果表明,7 种植物 KEA 家族成员可分为 2 个亚族,Group I 和 Group II,其中,草莓 *FveKEA1* 和 *FveKEA2* 属于 Group I,而 *FveKEA3*、*FveKEA4* 和 *FveKEA5* 属于 Group II(图 1 和表 3)。此外,7 种植物 KEA 家族基因在遗传进化关系上有差异,草莓和蔷薇科植物(苹果和桃)、葡萄科葡萄、杨柳科白杨在遗传距离上是较近的,其中,草莓 *FveKEA2* 和 *FveKEA4* 分别与葡萄 *VvKEA2* 和苹果 *MdoKEA6* 紧密聚在一起,草莓 *FveKEA1*、*FveKEA3* 和 *FveKEA5* 分别与葡萄 *VvKEA1*、白杨 *PtrKEA4*、桃 *PpeKEA4* 等相应成员在遗传距离上较近(图 1)。身为芸香科植物,橙 KEA 成员则聚集在一起,与白杨 *PtrKEA1* 和 *PtrKEA2* 在遗传距离上较近,且均属于 Group I 亚族(图 1)。

## 2.3 草莓 KEA 基因及编码蛋白质特征分析

草莓 KEA 家族基因主要定位于 1 号(*FveKEA5*)、2 号(*FveKEA2* 和 *FveKEA3*)和 7 号(*FveKEA1* 和 *FveKEA4*)染色体上,含有至少 27 个长度不一的内含子,其中 *FveKEA3* 基因拥有最多(34 个)的内含子数目(表 3);*FveKEA1* 基因 CDS 编码区最长,其次是 *FveKEA3*,*FveKEA5* 最短,其编码氨

基酸数目和分子量与 CDS 长度成正比(表 2);保守基序分析结果表明草莓 *FveKEA1* 含有 4 个 Motif 基序(Motif4~Motif7),*FveKEA2* 蛋白含有 4 个 Motif 基序(Motif2、Motif4、Motif6 和 Motif7),而 *FveKEA3*、*FveKEA4* 和 *FveKEA5* 均含有 7 个 Motif 基序,即 Motif1~Motif7(图 2 和表 3)。蛋白质三级结构预测分析结果表明草莓 *FveKEA1*、*FveKEA2* 和 *FveKEA5* 拥有相似的三级结构,暗示这 3 个蛋白质可能拥有相近的功能,而 *FveKEA3* 和 *FveKEA4* 则分别拥有独特而差异明显的三级结构(图 2)。

此外,*FveKEA4* 的等电点(*PI*)>7.00,其他草莓 KEA 家族蛋白的等电点均小于 7.00,表明 *FveKEA4* 含有的碱性氨基酸较多,而其他 4 个成员的酸性氨基酸较多;草莓 KEA 家族蛋白均含有 12~14 个跨膜区,且只有 *FveKEA5* 具有信号肽,位于第 22~23 氨基酸区域;此外,*FveKEA3* 蛋白的不稳定指数>40,为不稳定蛋白,而其他 4 个成员均小于 40,为稳定蛋白(表 3)。

## 2.4 草莓 KEA 基因启动子顺式作用元件分析

*cis*-顺式作用元件预测结果表明,草莓 KEA 家族基因启动子区域鉴定到至少 16 种顺式作用元件,包括营养和发育、激素响应、胁迫响应、昼夜规律等不同生命过程的调控元件(表 4)。其中,3 种(光感应、胚乳表达和脱落酸 ABA 响应)转录元件在全部 5 个 *FveKEA* 基因的启动子中均能预测到,茉莉酮酸甲酯(除 *FveKEA2* 基因)和赤霉素(除 *FveKEA5* 基因)响应作用元件在 4 个基因的启动子区域能检测到,水杨酸响应、热胁迫、厌氧感应、干旱诱导、低温感应和生长素响应相关的顺式作用元件均在不同的 3 个 *FveKEA* 基因的启动子区域出现,防御与胁迫、昼夜规律和真菌激发子响应相关的顺式作用元件均能在不同的 2 个 *FveKEA* 基因的启动子区域出现,此外,玉米蛋白代谢(*FveKEA2*)和乙烯响应(*FveKEA3*)相关的顺式作用元件分别在一个 *FveKEA* 基因的启动子区域鉴定到(表 4)。

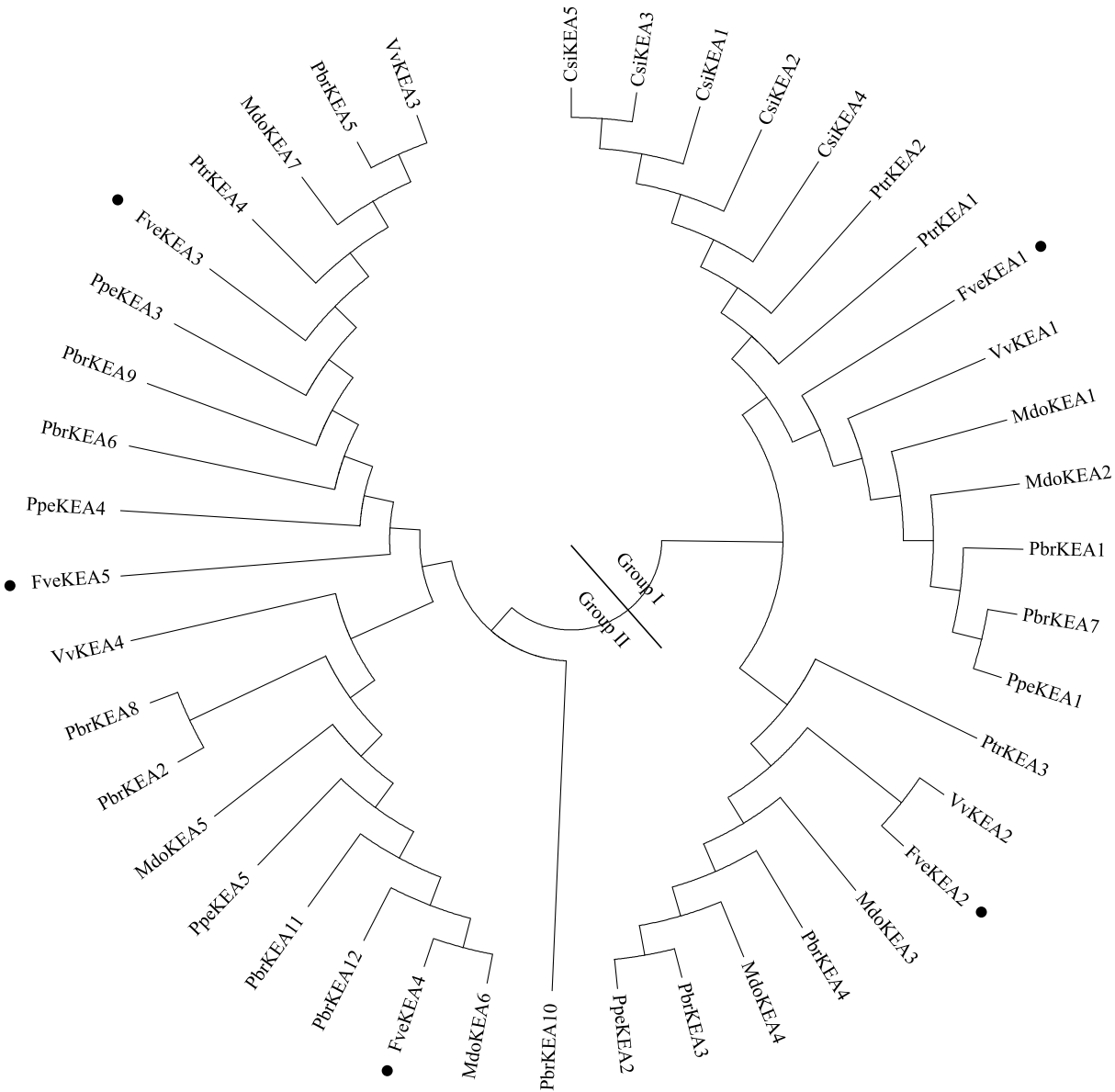
## 2.5 草莓 KEA 蛋白亚细胞定位预测及 KEA 基因表达谱分析

亚细胞定位预测结果表明草莓 *FveKEA* 蛋白主要定位于细胞质膜,其次是内质网膜(*FveKEA2* 除外)和液泡膜(*FveKEA2* 和 *FveKEA5* 除外),*FveKEA2* 在叶绿体和线粒体等细胞器的膜上也有检测到,*FveKEA3* 也定位于核膜上(表 5)。

表 2 7 种植物 KEA 家族蛋白信息

Table 2 Information of KEA family proteins from seven plants

物种	蛋白质	登录号	编码区 (bp)	氨基酸数目	分子量
草莓	FveKEA1	mrna19087.1	3 651	1 217	131 970
	FveKEA2	mrna01712.1	2 418	806	87 770
	FveKEA3	mrna02678.1	3 582	1 194	131 060
	FveKEA4	mrna13402.1	2 019	673	73 350
	FveKEA5	mrna11420.1	1 743	581	62 530
梨	PbrKEA1	Pbr001286.1	3 678	1 226	132 420
	PbrKEA2	Pbr004889.1	2 229	743	80 160
	PbrKEA3	Pbr007039.1	2 298	766	82 830
	PbrKEA4	Pbr009904.1	2 301	767	82 910
	PbrKEA5	Pbr015588.2	1 674	558	60 260
	PbrKEA6	Pbr019828.1	1 767	589	62 990
	PbrKEA7	Pbr031450.1	3 183	1 061	114 860
	PbrKEA8	Pbr036088.1	2 400	800	86 680
	PbrKEA9	Pbr036420.2	1 743	581	62 200
	PbrKEA10	Pbr038070.1	1 164	388	41 770
	PbrKEA11	Pbr038477.1	2 244	748	81 110
	PbrKEA12	Pbr041608.1	2 514	838	90 540
苹果	MdoKEA1	MDP0000144878	2 346	782	121 520
	MdoKEA2	MDP0000165222	3 390	1 130	134 600
	MdoKEA3	MDP0000173207	2 949	983	106 800
	MdoKEA4	MDP0000206618	3 009	1 003	109 760
	MdoKEA5	MDP0000244586	3 726	1 242	85 300
	MdoKEA6	MDP0000818940	1 743	581	41 590
	MdoKEA7	MDP0000903895	1 173	391	62 530
桃	PpeKEA1	Prupe.2G162700	3 669	1 223	132 060
	PpeKEA2	Prupe.8G077000	2 436	812	63 450
	PpeKEA3	Prupe.1G413300	1 773	591	91 250
	PpeKEA4	Prupe.7G212100	1 830	610	62 650
	PpeKEA5	Prupe.2G283800	1 734	578	61 130
葡萄	VvKEA1	MH118299	1 836	612	64 500
	VvKEA2	MH118298	1 689	563	61 410
	VvKEA3	MH118297	1 731	577	62 480
	VvKEA4	MH118300	1 566	522	56 210
橙	CsiKEA1	orange1.1g001051m	3 519	1 173	126 900
	CsiKEA2	orange1.1g001096m	3 474	1 158	125 400
	CsiKEA3	orange1.1g000968m	3 621	1 207	130 270
	CsiKEA4	orange1.1g001810m	3 030	1 010	109 560
	CsiKEA5	orange1.1g004361m	2 277	759	83 400
白杨	PtrKEA1	Potri.002G157200.1	3 645	1 215	87 830
	PtrKEA2	Potri.014G080800.1	3 648	1 216	130 800
	PtrKEA3	Potri.009G080800.1	2 469	823	89 300
	PtrKEA4	Potri.012G130500.1	1 752	584	64 050



圆点标注为草莓 KEA 家族蛋白;线条表示亚族 Group I 和 Group II 的分界线。

图 1 7 种植物 KEA 家族蛋白的系统进化树

Fig.1 The phylogenetic tree of KEA family proteins from seven plants

表 3 草莓 KEA 家族基因及编码蛋白质基本信息

Table 3 Basic informations of KEA family genes and encoding proteins in strawberry

基因	登录号	染色体定位	内含子数目	基序数目	亚族	等电点	跨膜区	不稳定性指数	信号肽
<i>FveKEA1</i>	mrna19087.1	LG7;3656495..3667369 forward	20	4	I	5.57	13	39.63(稳定)	无
<i>FveKEA2</i>	mrna01712.1	LG2;7241001..7250450 reverse	17	4	I	5.04	14	35.35(稳定)	无
<i>FveKEA3</i>	mrna02678.1	LG2;18279313..18291148 reverse	34	7	II	6.84	14	42.54(不稳定)	无
<i>FveKEA4</i>	mrna13402.1	LG7;22396259..22403998 forward	21	7	II	7.52	13	29.42(稳定)	无
<i>FveKEA5</i>	mrna11420.1	LG1;4763675..4769132 reverse	19	7	II	5.65	12	33.95(稳定)	有,第 22-23 位氨基酸



图 2 草莓 KEA 家族蛋白三级结构预测  
Fig.2 Tertiary structure prediction of strawberry KEA family proteins

表 4 葡萄 KEA 家族基因启动子顺式作用元件分析  
Table 4 The cis-elements in the promoter regions of KEA family genes in grape

顺式作用元件	<i>FveKEA1</i>	<i>FveKEA2</i>	<i>FveKEA3</i>	<i>FveKEA4</i>	<i>FveKEA5</i>
光感应	14	23	16	15	23
胚乳表达	3	5	4	2	3
脱落酸响应	1	2	2	4	5
茉莉酮酸甲酯	2	—	4	2	2
赤霉素响应	3	2	2	1	—
水杨酸响应	3	1	—	2	—
热胁迫	—	2	—	2	2
厌氧感应	3	—	—	2	2
干旱诱导	1	—	—	1	3
低温感应	—	1	—	2	3
生长素响应	—	—	1	2	1
防御与胁迫	1	3	—	—	—
昼夜规律	—	—	2	1	—
真菌激发子	—	1	—	—	1
玉米蛋白代谢	—	1	—	—	—
乙烯响应	—	—	1	—	—

— 表示未检测到。

表 5 葡萄 KEA 家族蛋白的亚细胞定位预测  
Table 5 Subcellular localization prediction of KEA family proteins in grape

蛋白质	定位在不同细胞器上的比例(%)					
	细胞质膜	内质网膜	液泡膜	叶绿体	线粒体膜	核膜
<i>FveKEA1</i>	85.72	7.14	7.14	—	—	—
<i>FveKEA2</i>	50.00	—	—	42.86	7.14	—
<i>FveKEA3</i>	71.44	14.28	7.14	—	—	7.14
<i>FveKEA4</i>	78.58	7.14	7.14	—	7.14	—
<i>FveKEA5</i>	85.72	14.28	—	—	—	—

—表示未检测到。

草莓表达谱数据库 Strawberry genomic resources 检索结果表明,草莓 *FveKEA* 基因在心皮、花药、果皮、胚、去胚种子、胚珠、子房、花粉、幼苗、花柱、种皮、花粉粒、花瓣、花被和花托等多种组织中均能检测到(图 3);*FveKEA1* 和 *FveKEA4* 的表达量相对较高,其中,*FveKEA1* 主要在花粉粒、花瓣、花被和花托中表达,其次是花药和幼苗,*FveKEA2* 主要在幼苗中表达,在花粉中表达量极低,*FveKEA3* 主要在子房中表达,*FveKEA4* 主要在花柱、种皮和花药中表达,*FveKEA5* 表达量较低,在种皮、花粉和胚中均少量表达(图 3)。

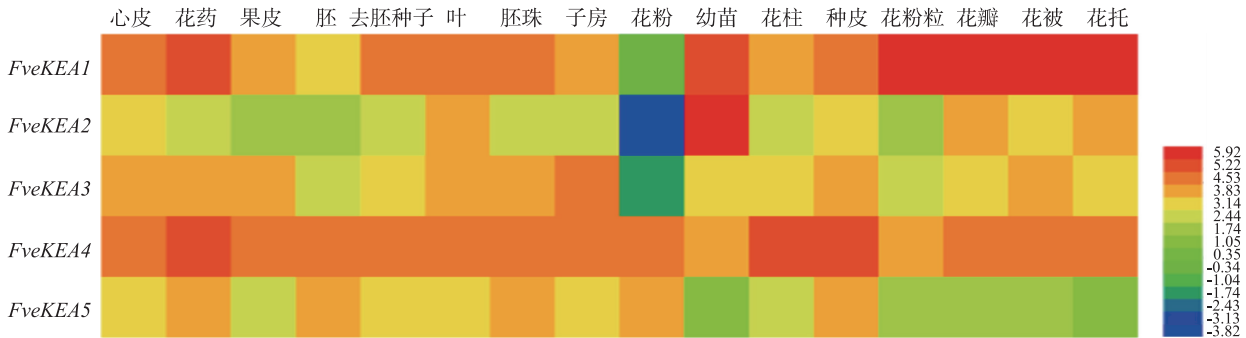


图 3 草莓 KEA 家族基因表达谱分析  
Fig.3 Expression profiles analysis of strawberry KEA family genes

## 2.6 草莓 KEA 家族基因组织特异性表达分析

荧光定量 PCR 分析结果表明: *FveKEA1* ~ *FveKEA5* 在草莓 5AF8 不同组织中的表达量有差异, *FveKEA1* 在不同组织中的整体表达水平最高(特别是花瓣中), 其次是 *FveKEA4*, 其他 3 个基因在草莓不同组织中的表达水平较为接近, 均显著低于 *FveKEA1* 和 *FveKEA4*, 与表达谱分析结果基本一致(图 4); 在不同组织中, *FveKEA1* 在花瓣和未成熟果实(包括绿果期、白果期和转色期)中的表达量最高, 其次是花药, 花柱中最低; *FveKEA2* 在叶片的表达量最高, 其次是根部, 在花柱和花药中的表达量最低; *FveKEA3* 在不同组织中的表达量没有显著差异; *FveKEA4* 在花柱和花药等花器官中的表达水平最高, 显著高于其他组织; *FveKEA5* 在花柱、花药和未成熟果实(绿果期、白果期及转色期)中的表达水平较高, 显著高于其他组织(图 4)。

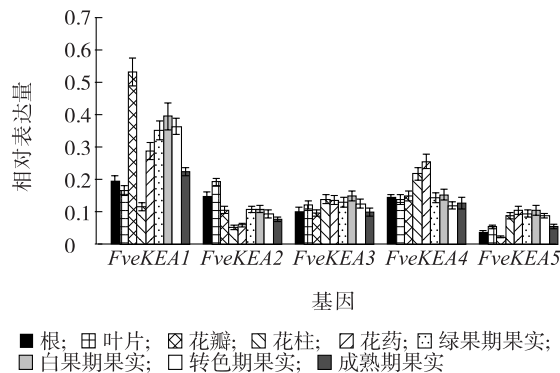


图 4 草莓 KEA 家族基因的组织特异性表达分析

Fig.4 Tissue specific expression analysis of strawberry KEA family genes

## 3 讨论

植物钾素营养研究中, KEA 转运蛋白是一类维持体内  $K^+/H^+$  动态平衡并参与渗透调节和 pH 稳定的逆向转运体。有关  $K^+$  吸收、转运、卸载和分配的研究较为详尽<sup>[21]</sup>, 而对同时转运  $K^+$  和  $H^+$  的 KEA 转运体的研究较少。然而, 相关报道主要集中在模式作物拟南芥、果树作物 KEA 转运体的具体功能依然未知。

基因组测序技术的迅速发展, 为果树作物的科学研究提供了基因资源。本研究从蔷薇科植物中克隆并鉴定了 5 个 *FveKEA* 转运体基因, 与蔷薇科桃和芸香科橙中 KEA 基因成员数目一致, 与葡萄科葡萄和杨柳科白杨接近, 而远低于同属蔷薇科果树的梨和苹

果, 表明, 同一家族基因成员的数目在同一科属的不同作物之间差异较大, 而在相同科属的不同作物之间可能相同或相近, 暗示基因功能的多样性或差异性。此外, 不同物种 KEA 家族成员在遗传进化关系上存在差异, 草莓和同属蔷薇科植物(苹果和桃)在遗传距离上较近, 而芸香科植物橙 KEA 成员则集中聚集在一起, 与蔷薇科和葡萄科果树作物 KEA 进化关系较远。在 5 个草莓 KEA 转运体中, *FveKEA1* 和 *FveKEA2* 同属于 Group I, 且具有相似的 Motif 和高级蛋白质结构, 暗示进化关系上相近的(同一亚族)且具有类似蛋白质 Motif 基序的 2 个转运体之间可能具有相似的功能, 而 *FveKEA3*、*FveKEA4* 和 *FveKEA5* 同属于 Group II, 且具有 7 个相同的 Motif, 但在高级蛋白质结构上差异很大, 暗示遗传关系相近的成员可能在长期进化过程中发生了不同功能的演变。

Kunz 等报道拟南芥 *AtKEA1* ~ *AtKEA3* 主要定位于细胞质膜上<sup>[13-14, 16]</sup>, 本研究中亚细胞定位预测结果表明草莓 *FveKEA1* ~ *FveKEA5* 主要分布在细胞质膜上, 与 Kunz 等报道相一致。Han 等<sup>[12]</sup>报道指出拟南芥 *AtKEA1* 和 *AtKEA3* 主要在地上部表达, 而其他 4 个成员基因在植物全身均有表达; Chen 等<sup>[22]</sup>报道 *GmKEA* 家族基因在大豆不同组织中均有表达, 且差异显著。本研究荧光定量 PCR 结果表明草莓 KEA 家族基因在试验草莓根部、叶片、花器官和不同发育期果实等多种组织中均有表达, 且与转录表达谱分析结果相一致。Zhou 等<sup>[18]</sup>报道梨 KEA 家族基因在花粉形成不同时期的表达量极低, 但没有研究其在其他组织中的表达特征, 与之相应的是, 草莓 KEA 家族基因在盛花期花粉中的表达量相对较低, 与之不同的是, 草莓 KEA 家族基因在花药中均有表达, *FveKEA1* 和 *FveKEA4* 较为显著。特别是, *FveKEA1* 在草莓不同检测组织中的整体表达水平最高, 在花瓣和未成熟果实中尤为突出, 推测 *FveKEA1* 可能是在花开放和草莓幼果发育过程中发挥重要作用的  $K^+/H^+$  逆向转运体。果实成熟是一个复杂的生物学过程, 伴随各种代谢产物的积累和转化, 而在成熟期草莓果实中, 除 *FveKEA4* 外, 其他 4 个基因的表达水平显著下降, 推测这些基因编码的 KEA 逆向转运体的功能在果实成熟时期发挥的较少, 所需的  $K^+$  较少, 有可能将胞内的  $K^+$  外排或者向其他组织(如韧皮部或叶片)转移, 这与同为钾离子转运体的 KT/HAK/KU 家族转运体类似<sup>[23]</sup>。



此外,在草莓 *FveKEA1* ~ *FveKEA5* 启动子区域鉴定到多种顺式作用元件,且均含有光感应、胚乳特异表达和 ABA 响应的作用元件,说明多种顺式作用元件易与草莓 *KEA* 启动区的关键元件相结合进而调控 *KEA* 家族基因的表达水平。特别地,拟南芥<sup>[17]</sup> 和大豆<sup>[21]</sup> 中 *KEA* 家族基因在转录水平易受 ABA 处理的调控,本研究中草莓 *KEA* 基因启动子区域均含有 ABA 响应的作用元件,暗示该家族基因有类似的渗透响应和调节的作用,这为进一步研究草莓 *KEA* 转运体的功能及其调控机理提供了理论支持。

### 参考文献:

- [1] VÉRY A A, SENTENAC H. Molecular mechanisms and regulation of  $K^+$  transport in higher plants [J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 575-603.
- [2] GRABOV A. Plant KT/KUP/HAK potassium transporters: Single family-multiple functions [J]. Annals of Botany, 2007, 99: 1035-1041.
- [3] DEMIRAL M A, KÖSEOĞLU A T. Effect of potassium on yield, fruit quality, and chemical composition of green house-grown aalia melon [J]. Journal of Plant Nutrition, 2005, 28: 93-100.
- [4] YURTSEVEN E, KESMEZ G D, ÜNLÜKARA A. The effects of water salinity and potassium levels on yield, fruit quality and water consumption of a native central anatolian tomato species (*Lycopersicon esculantum*) [J]. Agricultural Water Management, 2005, 78: 128-135.
- [5] HARTZ T K, JOHNSTONE P R, FRANCIS D M, et al. Processing tomato yield and fruit quality improved with potassium fertigation [J]. Hort Science, 2005, 40: 1862-1867.
- [6] 宋志忠,郭绍雷,马瑞娟,等. *KT/HAK/KUP* 家族基因在桃开花期的表达及对钾肥施放的响应分析 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(6): 1177-1185.
- [7] 宋志忠,许建兰,张斌斌,等. 叶面喷施钾肥对霞脆桃果实品质及 *KUP* 基因表达的影响 [J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 1107-1112.
- [8] CHANROJ S, LU Y, PADMANABAN S, et al. Plant-specific cation/ $H^+$  exchanger 17 and its homologs are endomembrane  $K^+$  transporters with roles in protein sorting [J]. Journal of Biology Chemistry, 2011, 286(39): 33931-33941.
- [9] CHANROJ S, WANG G, VENEMA K, et al. Conserved and diversified gene families of monovalent cation/ $H^+$  antiporters from algae to flowering plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 25.
- [10] BASSIL E, BLUMWALD E. The ins and outs of intracellular ion homeostasis:  $NHX$ -type cation/ $H^+$  transporters [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 22: 1-6.
- [11] MASER P, THOMINE S, SCHROEDER J I, et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2001, 126: 1646-1667.
- [12] HAN L, LI J L, WANG L, et al. Identification and localized expression of putative  $K^+/H^+$  antiporter genes in *Arabidopsis* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(5): 1-14.
- [13] ARANDA-SICILIA M N, CAGNAC O, CHANROJ S, et al. *Arabidopsis* KEA2, a homolog of bacterial KefC, encodes a  $K^+/H^+$  antiporter with a chloroplast transit peptide [J]. BBA-Biomembranes, 2012, 1818(9): 2362-2371.
- [14] ZHENG S, PAN T, FAN L G, et al. A novel *AtKEA* gene family, homolog of bacterial  $K^+/H^+$  antiporters, plays potential roles in  $K^+$  homeostasis and osmotic adjustment in *Arabidopsis* [J]. PLoS ONE, 2013, 8(11): e81463.
- [15] ARMBRUSTER U, CARRILLO L R, VENEMA K, et al. Ion antiport accelerates photosynthetic acclimation in fluctuating light environments [J]. Nature Communications, 2014, 5: 5439.
- [16] KUNZ H H, GIERTH M, HERDEAN A, et al. Plastidial transporters KEA1, -2, and -3 are essential for chloroplast osmoregulation, integrity, and pH regulation in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(20): 7480-7485.
- [17] ZHOU H, QI K, LIU X, et al. Genome-wide identification and comparative analysis of the cation proton antiporters family in pear and four other *Rosaceae* species [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2016, 291: 1727-1742.
- [18] KANG C, DARWISH O, GERETZ, et al. Genome-scale transcriptomic insights into early-stage fruit development in woodland strawberry *Fragaria vesca* [J]. Plant Cell, 2013, 25:1960-1978.
- [19] FAIT A, HANHINEVA K, BELEGGIA R, et al. Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development [J]. Plant Physiology, 2008, 148 (2):730-750.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] WANG Y, WU W H. Genetic approaches for improvement of the crop potassium acquisition and utilization efficiency [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2015, 25:46-52.
- [22] CHEN H T, CHEN X, WU B Y, et al. Whole-genome identification and expression analysis of  $K^+$  efflux antiporter (*KEA*) and  $Na^+/H^+$  antiporter (*NHX*) families under abiotic stress in soybean [J]. Journal of Intergrative Agriculture, 2015, 14(6): 1171-1183.
- [23] SONG Z Z, GUO S L, ZHANG C H, et al. *KT/HAK/KUP* potassium transporter genes differentially expressed during fruit development, ripening, and postharvest shelf-life of 'Xiahui6' peaches [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37:131.

(责任编辑:陈海霞)