

程 瑞,汪国莲,孙玉东,等. 萝卜 *HAK/KUP/KT* 基因家族鉴定与表达特性分析[J].江苏农业学报,2023,39(3):777-787.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2023.03.019

萝卜 *HAK/KUP/KT* 基因家族鉴定与表达特性分析

程 瑞^{1,2}, 汪国莲^{1,2}, 孙玉东^{1,2}, 王林闯^{1,2}, 罗德旭^{1,2}, 王 玮^{1,2}, 仲秀娟^{1,2}, 赵建锋^{1,2}

(1.江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所/淮安市设施蔬菜重点实验室,江苏 淮安 223001; 2.淮阴师范学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室,江苏 淮安 223001)

摘要: 钾元素是植物生长发育过程中必需的主要矿质营养元素之一,对作物的产量和品质有决定性影响,细胞内 K^+ 含量水平在很大程度上受 K^+ 转运蛋白控制。通过生物信息学方法从全基因组水平鉴定出萝卜 K^+ 转运蛋白 *HAK/KUP/KT* 基因家族成员,并对其基因结构、蛋白质特性、保守基序、染色体定位、启动子顺式作用元件、系统进化及表达特性等进行分析。结果表明,鉴定出的 17 个萝卜 *HAK/KUP/KT* 基因不均等地分布在萝卜 6 条染色体及 Scaffold00840 上,根据与拟南芥的同源关系将其命名为 *RsHAK1~RsHAK17*; *RsHAKs* 基因结构、保守基序、蛋白质理化特性等均具有高度保守性,启动子区域存在大量与环境因素、植物激素、逆境胁迫应答等有关的顺式作用元件;系统进化分析结果显示,17 个 *RsHAKs* 基因聚为 4 个亚家族,全基因组复制事件是 *RsHAKs* 基因扩张的主要驱动力。转录组和 qRT-PCR 表达分析结果表明,除 *RsHAK5* 仅在萝卜根部表达外,其他 *RsHAKs* 在萝卜各器官及发育过程中均有特异性表达,且在高钾渗透胁迫下在叶片中相对表达量显著上调,*RsHAK3*、*RsHAK9*、*RsHAK11* 和 *RsHAK12* 在根部呈现明显的缺钾诱导表达模式。研究结果为进一步全面解析 *HAK/KUP/KT* 基因在萝卜中的生物学功能以及提高萝卜栽培品质提供了一定理论依据。

关键词: 萝卜; 钾转运蛋白; 基因家族; K^+ ; 表达分析

中图分类号: S631.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)03-0777-11

Identification and expression characteristics analysis of *HAK/KUP/KT* gene family in radish

CHENG Rui^{1,2}, WANG Guo-lian^{1,2}, SUN Yu-dong^{1,2}, WANG Lin-chuang^{1,2}, LUO De-xu^{1,2},
WANG Wei^{1,2}, ZHONG Xiu-juan^{1,2}, ZHAO Jian-feng^{1,2}

(1. Huaiyin Institute of Agricultural Sciences in Xuhuai Region of Jiangsu/Huai'an Key Laboratory for Facility Vegetables, Huai'an 223001, China; 2. Huaiyin Normal University/Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology Around Hongze Lake, Huai'an 223001, China)

Abstract: Potassium is one of the essential main mineral nutrient elements in the process of plant growth and development, and has a decisive impact on the yield and quality of crops. The level of intracellular K^+ content is largely controlled by K^+ transport proteins. Members of the radish K^+ transport protein related *HAK/KUP/KT* gene family were identified from whole genome-wide level by bioinformatics methods, and the gene structure, protein properties, conserved motifs,

chromosomal localization, promoter cis-acting elements, phylogenetic evolution and expression characteristics were analyzed. The results showed that the 17 radish *HAK/KUP/KT* genes were unequally distributed on six chromosomes and Scaffold00840, and were named *RsHAK1~RsHAK17* according to their homology with *Arabidopsis*. The gene structure, conserved motifs, physicochemical properties of proteins of *RsHAKs* genes were highly conserved, and there were a large number of cis-acting ele-

收稿日期:2022-08-11

基金项目:江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(21)2020];江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室自主研发课题(17H-ZHL015);淮安市农业科学研究院横向课题(0012021028H)

作者简介:程 瑞(1991-),男,安徽潜山人,博士,助理研究员,从事园艺作物种质创新应用与遗传育种研究。(Tel) 18762046231; (E-mail) chengrui@jaas.ac.cn

通讯作者:赵建锋, (E-mail) 350043736@qq.com

ments related to environmental factors, plant hormones and responses to adversity stresses in the promoter region. Phylogenetic analysis showed that 17 *RsHAKs* genes clustered into four subfamilies, and whole genome-wide replication events were the main driver of the *RsHAKs* genes expansion. The results of transcriptome and qRT-PCR expression analysis showed that except for *RsHAK5*, which was only expressed in radish roots, other *RsHAKs* were specifically expressed in different organs and different development processes of radish, and the relative expression in leaves was significantly up-regulated under high potassium osmotic stress. *RsHAK3*, *RsHAK9*, *RsHAK11* and *RsHAK12* showed obvious expression patterns induced by potassium deficiency in roots. Overall, the results provide theoretical basis for further comprehensive analysis of the biological functions of *HAK/KUP/KT* gene and improving the cultivation quality of radish.

Key words: radish; potassium transport protein; gene family; K^+ ; expression analysis

钾元素是植物体内新陈代谢所必需的主要矿物质营养之一,参与气孔运动、细胞生长、信号转导、渗透调节和质膜电位的维持等,在植物生长发育和抵御逆境胁迫中起重要作用^[1-2]。植物吸收钾离子(K^+)有 2 套运输系统,即 K^+ 通道和 K^+ 转运蛋白^[3-4]。*HAK/KUP/KT*(high-affinity K^+/K^+ uptake permease/ K^+ transporter)作为植物体内最大的 K^+ 转运蛋白家族,在植物生长调控、养分代谢、逆境应答等过程中发挥至关重要的作用^[5]。自 1997 年研究人员从大麦中克隆出第一个植物钾转运蛋白编码基因 *HAK1*^[6]以来,迄今已有水稻^[7]、小麦^[8]、玉米^[9]、大豆^[10]、马铃薯^[11]、油菜^[12]、木薯^[13]、番茄^[14]、辣椒^[15]、梨^[16]、石榴^[17]、香蕉^[18]等作物通过全基因组分析鉴定出 *HAK/KUP/KT* 家族成员。*HAK/KUP/KT* 基因一般含有 10~15 个跨膜区域,具有保守的 K^+ 转运结构域(K^+ -trans)^[19-20],主要定位于细胞膜系统,在植物的根、茎、叶和果实等器官中均有表达^[21]。已有研究结果表明,*HAK/KUP/KT* 家族成员包含 4 个亚家族(I~IV),每个亚家族均有较为保守的结构和功能^[7]。亚家族 I 基因主要在根中表达,参与植物根系对环境中的 K^+ 的吸收、运输^[22-23];亚家族 II 基因主要参与植物的生长调节等生理过程^[24];亚家族 III 和 IV 的功能研究报道较少^[16]。

萝卜(*Raphanus sativus* L.)是重要的十字花科蔬菜之一,其营养丰富,药用价值高,被誉为“小人参”,在中国蔬菜生产中占有重要地位。中国是世界第一萝卜种植大国,栽培面积近 1.2×10^6 hm^2 ,约占世界萝卜栽培总面积的 40%^[25]。钾元素对果蔬品质的形成具有重要影响,然而,尚不清楚萝卜对钾的吸收利用机制。目前,*HAK/KUP/KT* 在多种园艺作物中已有报道,但在全基因组水平对萝卜 *HAK/KUP/KT* 基因的鉴定和分析未见报道。萝卜基因组数据库的公布和不断完善^[26-27]为在全基因组水平鉴定和分析萝卜 *HAK/*

KUP/KT 基因提供了重要基础。本研究对萝卜基因组中的 *HAK/KUP/KT* 基因家族成员进行鉴定,并对其基因结构、蛋白质特征、保守基序、染色体定位、启动子顺式作用元件、系统进化及表达特性等进行分析,为进一步研究萝卜 *HAK/KUP/KT* 基因家族成员的生物学功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 萝卜 *HAK/KUP/KT* 家族成员的鉴定

萝卜基因组数据信息从已公布的萝卜基因组数据库(<http://radish-genome.org>)中获取^[28]。拟南芥和水稻的 *HAK/KUP/KT* 家族基因编码的蛋白序列分别从拟南芥数据库 TAIR(<http://www.arabidopsis.org>)、水稻基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)中获得。以拟南芥 13 个 *HAK/KUP/KT* 蛋白序列作为靶序列,在萝卜基因组数据库中进行 BLASTP 比对,筛选阈值为 1×10^{-10} ,初步获得萝卜 *HAK/KUP/KT* 基因家族候选成员。采用 ORF(Open Reading Frame,开放阅读框)Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi>)对候选基因序列 ORF 的完整性进行分析,剔除没有完整 ORF 的基因;进一步通过 Pfam 数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)进行 K^+ 转运保守结构域(PF02705)验证,并利用 NCBI 数据中 CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)在线软件复筛,最终确定萝卜 *HAK/KUP/KT* 家族成员,并统一使用 *RsHAK* 进行命名。

1.2 萝卜 *RsHAK* 蛋白理化特性及基因序列特征分析

利用在线软件 ExPASy(<http://www.expasy.org>)对萝卜 *RsHAK* 蛋白序列的相对分子质量、理论等电点、不稳定系数、亲水性(GRAVY)等进行分析;利用 WoLFPSORT(http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)对萝卜 *RsHAK* 进行亚细胞定位预测;利

用软件 TMHMM Server. 2.0 (<http://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 进行 *RsHAKs* 跨膜结构域分析; 利用在线软件 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/tools/meme>) 分析萝卜 *RsHAKs* 蛋白保守基序 (Motif)^[29], 并利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 和 Pfam 数据库对 Motif 序列进行注释分析。

染色体信息从萝卜基因组数据库获得, 萝卜 *RsHAKs* 基因染色体定位图利用软件 TBTools 绘制^[30]。基因内含子/外显子结构分布利用 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 进行分析^[31]。启动子序列信息以起始密码子上游 2 000 bp 的核酸序列进行分析, 利用 PLACE 平台 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) 进行预测^[32]。

1.3 萝卜 *RsHAK* 系统进化树构建及基因复制事件分析

利用软件 CLUSTALW 和 MEGA 7.0 对萝卜、拟南芥和水稻 *HAK/KUP/KT* 蛋白进行多重比对, 基于邻接法 (Neighbor-joining method, NJ method) 构建系统发育树, *Bootstrap* 设定为 1 000。使用 MCScanX 软件识别 *RsHAK* 基因的重复事件^[33-34]。

K_a (非同义替换率)、 K_s (同义替换率) 和 K_a/K_s 值使用 KaKs_Calculator 2.0 软件进行计算^[35], 并利用 K 值预算复制事件发生的时期 (T) ($T = K_s/2\lambda$)^[34]。本研究中, 我们假设萝卜同义替换的 λ 值为 5.9×10^{-9} ^[26-28]。

1.4 萝卜 *RsHAK* 时空表达分析

为分析 *RsHAK* 在萝卜生长发育过程中及各器官中的表达模式, 从已公布的萝卜参考基因组数据库中下载相关 RNA-seq 数据。每个 *RsHAK* 基因的表达水平通过 FPKM (Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) 方法表示。*RsHAKs* 基因时空表达热图利用 R 包 pheatmap 进行分析绘制。

1.5 *RsHAK* 在缺钾和高钾胁迫下的表达模式分析

以江苏淮安地方萝卜品种紫芽青为试验材料。使用 50 孔穴盘进行育苗, 待幼苗生长至 2~3 张真叶时, 选取长势相对一致的萝卜幼苗, 用清水小心冲洗根部基质, 开始水培。每 7 d 换 1 次营养液, 调整 pH 值为 7.0 ± 0.1 , 采用改良的 Hoagland 营养液配方进行水培^[16,36], 以 K^+ 浓度 0 mmol/L 为缺 K^+ 处理, 以 3 倍 K^+ 浓度 (18 mmol/L) 高渗 Hoagland 营养液为高

K^+ 胁迫处理, 并保持氮、磷等其他营养元素一致, 具体试验方法参照 Wang 等^[16] 的方法。处理 15 d 后分别收集萝卜根部和叶片样品备用。采用 Trizol 法提取样品总 RNA, 然后使用 PrimeScript[®] RT 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。基因的特异引物 (表 1) 利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库在线软件 Primer designing tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计, 其中, *RsHAK14* 和 *RsHAK15* 的编码区序列完全一致, 无法设计特异性引物。利用荧光定量 PCR 技术分析 *RsHAKs* 在正常培养、缺 K^+ 和高 K^+ 胁迫条件下, 在紫芽青萝卜地上部分及地下部分的相对表达量, 试验具体参数参考孙小川等^[25] 的研究。

表 1 萝卜 *RsHAK* 基因的实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used in qRT-PCR analysis for *RsHAK* genes in radish

基因	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')
<i>RsHAK1</i>	CCCGGCTATAGGACTCGTCT	ACGGAACCTGAACCGACTTC
<i>RsHAK2</i>	AACCAAAGCCAGTCTCTCGG	CGATTGTGACAGCGATGCGAG
<i>RsHAK3</i>	TCTGGGGCTTTGTTCTCTTG	TGATATGCAAGCCAGCACCA
<i>RsHAK4</i>	GTTTTGCCTCTTCAAGCGT	AGCCAGCAGATACGTTAGCC
<i>RsHAK5</i>	GGCCCGATTCTTCAGCATA	TGTCTCCGTACACCACTCCT
<i>RsHAK6</i>	TGCTTTGCAGACCTTAGGGG	GACCAATGACAAGGCTCCGA
<i>RsHAK7</i>	TTTGACGCCTCGTCTGACTC	ACACCACCCTGATGCTTTG
<i>RsHAK8</i>	GGTCAACGCTCGTTATGGG	TGGTCAATTCCGTGATCGGT
<i>RsHAK9</i>	CCGCGACGTGCATAAAGATG	CCGTGAGCCTCTCATTGGTT
<i>RsHAK10</i>	GTCCACGCTCGAGAAACAGA	AAATGGCAGGCGTTAGGACA
<i>RsHAK11</i>	TCGGTTCGAGGTGAAGTGTG	AAATCGCAGGCGTTAGGACA
<i>RsHAK12</i>	GCCAAGCCACAATATCAGCG	TCCAGTTGATGTCCGAACG
<i>RsHAK13</i>	ATACGGAACTGCGGTTGTGG	GGACCCATCCTCTCTCGTTG
<i>RsHAK14</i>	CAAGCTACGATCTCGGGGAC	AGCCGATCATGAGCATCCAG
<i>RsHAK15</i>	CAAGCTACGATCTCGGGGAC	AGCCGATCATGAGCATCCAG
<i>RsHAK16</i>	ATAGCAACCACAACAGCAACAATA	TTATGCGGTGAATCGGCTG
<i>RsHAK17</i>	AGCGCTTATTCACCTCAACCATAC	TCGTGTCTAATGTGATACCGTG
<i>RsActin</i>	GCATCACACTTTCTACAAC	CCTGGATAGCAACATACAT

2 结果与分析

2.1 萝卜 *RsHAK* 基因家族鉴定及理化特性分析

在萝卜 *RsHAK* 基因家族中共鉴定出 17 个 *RsHAKs* 基因, 通过 NCBI 和 Pfam 数据库进一步验证后, 根据与拟南芥 *HAK/KUP/KT* 家族成员之间的同

源关系将萝卜 *RsHAK* 基因分别命名为 *RsHAK1*~*RsHAK17*(表 2)。17 个 *RsHAKs* 基因分布在萝卜染色体 2、染色体 3、染色体 4、染色体 6、染色体 7、染色体 8、染色体 9 和 Scaffold00840(基因支架)上(图 1),具有高度保守性,均具有 13~14 个跨膜区,编码区序列(CDS)长度为 2 148~2 598 bp,编码氨基酸数为 715~865 aa,蛋白质相对分子质量为 79 490~96 330,理论

等电点为 5.19~8.97,53%的成员为酸性蛋白质;亚细胞定位预测结果显示,除 *RsHAK2*、*RsHAK10*、*RsHAK11* 分布在液泡膜上外,其余 *RsHAK* 主要定位于质膜上(表 2)。此外,*RsHAK14* 和 *RsHAK15* 的编码区长度和蛋白质序列长度完全一致,且位于 2 号染色体相邻位置(图 1),来自于串联复制事件。

表 2 萝卜 *RsHAK* 序列特性分析

Table 2 Characteristics of *RsHAK* sequences in radish

基因名	基因注释号	染色体	起始位置	终止位置	基因全长 (bp)	编码区序列(CDS)长度(bp)	蛋白质序列 (aa)	蛋白质相对分子质量	理论等电点	不稳定系数	亲水性	跨膜区 (个)	亚细胞定位
<i>RsHAK1</i>	Rs354340	6	46 053 295	46 057 049	3 755	2 148	715	79 490	7.82	36.51	0.453	13	质膜
<i>RsHAK2</i>	Rs559270	Scaffold00840	16 212	19 872	3 661	2 357	783	87 790	6.83	44.89	0.375	14	液泡膜
<i>RsHAK3</i>	Rs289430	6	43 944	47 558	3 615	2 340	779	86 490	8.97	42.84	0.392	13	质膜
<i>RsHAK4</i>	Rs306920	6	10 736 257	10 740 000	3 744	2 496	831	92 250	6.32	40.14	0.375	13	质膜
<i>RsHAK5</i>	Rs374130	7	21 141 989	21 151 422	9 434	2 355	784	87 720	8.46	28.00	0.217	13	质膜
<i>RsHAK6</i>	Rs044910	2	41 199 520	41 203 662	4 143	2 586	861	95 140	5.19	42.20	0.324	13	质膜
<i>RsHAK7</i>	Rs067940	2	28 598 187	28 601 965	3 779	2 598	865	96 330	5.25	43.05	0.284	13	质膜
<i>RsHAK8</i>	Rs144650	3	27 130 242	27 133 944	3 703	2 589	862	96 040	5.57	43.81	0.269	13	质膜
<i>RsHAK9</i>	Rs064940	2	30 233 884	30 238 007	4 124	2 343	780	87 500	7.85	37.18	0.312	14	质膜
<i>RsHAK10</i>	Rs453510	9	3 484 479	3 487 932	3 454	2 352	783	87 390	8.61	44.53	0.248	13	液泡膜
<i>RsHAK11</i>	Rs071040	2	5 006 401	5 010 897	4 497	2 322	773	86 260	8.46	43.70	0.291	13	液泡膜
<i>RsHAK12</i>	Rs433450	8	16 353 293	16 356 708	3 416	2 379	792	88 740	8.65	36.72	0.317	14	质膜
<i>RsHAK13</i>	Rs161450	4	6 847 658	6 851 286	3 629	2 424	807	90 800	6.08	35.71	0.242	14	质膜
<i>RsHAK14</i>	Rs053250	2	34 513 034	34 516 063	3 030	2 439	812	91 020	6.65	35.14	0.291	14	质膜
<i>RsHAK15</i>	Rs053280	2	34 501 227	34 504 398	3 172	2 439	812	91 020	6.65	35.14	0.291	14	质膜
<i>RsHAK16</i>	Rs161440	4	6 854 857	6 859 294	4 438	2 424	807	90 320	8.03	35.29	0.301	14	质膜
<i>RsHAK17</i>	Rs432130	8	14 688 250	14 691 700	3 451	2 403	800	89 590	6.56	36.72	0.317	14	质膜

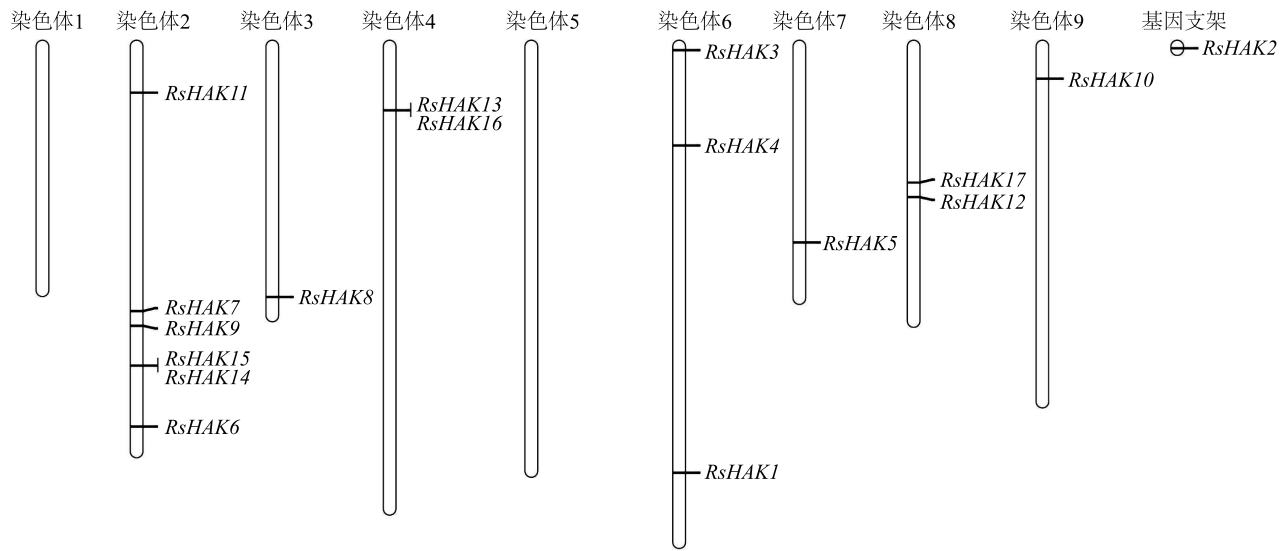
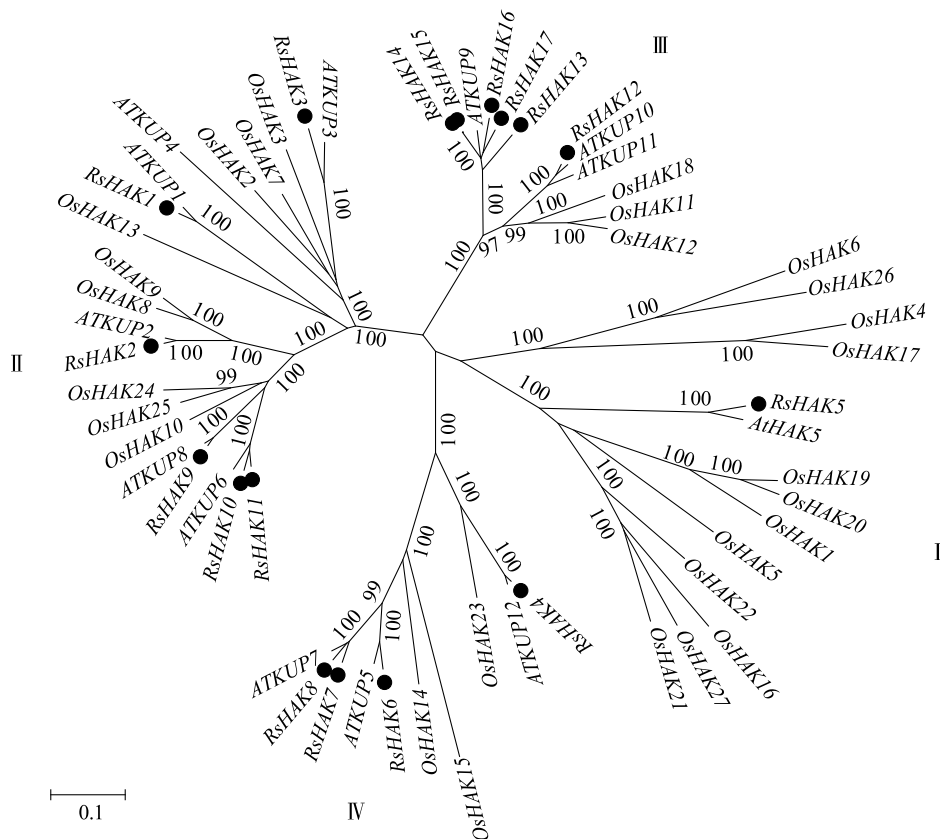


图 1 萝卜 *HAK/KUP/KT* 基因家族成员染色体定位
Fig.1 Chromosomal localization of *HAK/KUP/KT* genes in radish

2.2 萝卜 *RsHAK* 系统进化、基因结构及保守基序分析

为研究萝卜 *RsHAK* 的进化关系,选择与拟南芥、水稻 *HAK/KUP/KT* 共同构建系统进化树(图2)。结果显示,3个物种的 *HAK/KUP/KT* 可以聚为4个亚家族(I~IV);*RsHAK* 主要分布在亚家族II(6个)、亚家族III(6个)、亚家族IV(4个),亚家族I中仅含有 *RsHAK5*。基因结构分析结果表明,

RsHAK 基因结构高度保守,除 *RsHAK5* (9 434 bp) 外,基因序列全长集中在3 030~4 497 bp,大部分含有7~10个外显子(图3)。其中, *RsHAK16* 和 *RsHAK5* 含有较长的内含子,尤其是 *RsHAK5*,可能为更古老的基因。保守基序分析确定了10个 Motif 为萝卜 *RsHAK* 蛋白重要保守基序,这些 Motif 在 *RsHAK* 蛋白中均有分布,可能对 *RsHAK* 蛋白功能起重要作用(图3)。



Rs 表示萝卜; *Os* 表示水稻; *At* 表示拟南芥。I~IV 表示 4 个亚家族; 黑圈表示 *RsHAKs* 基因家族成员。

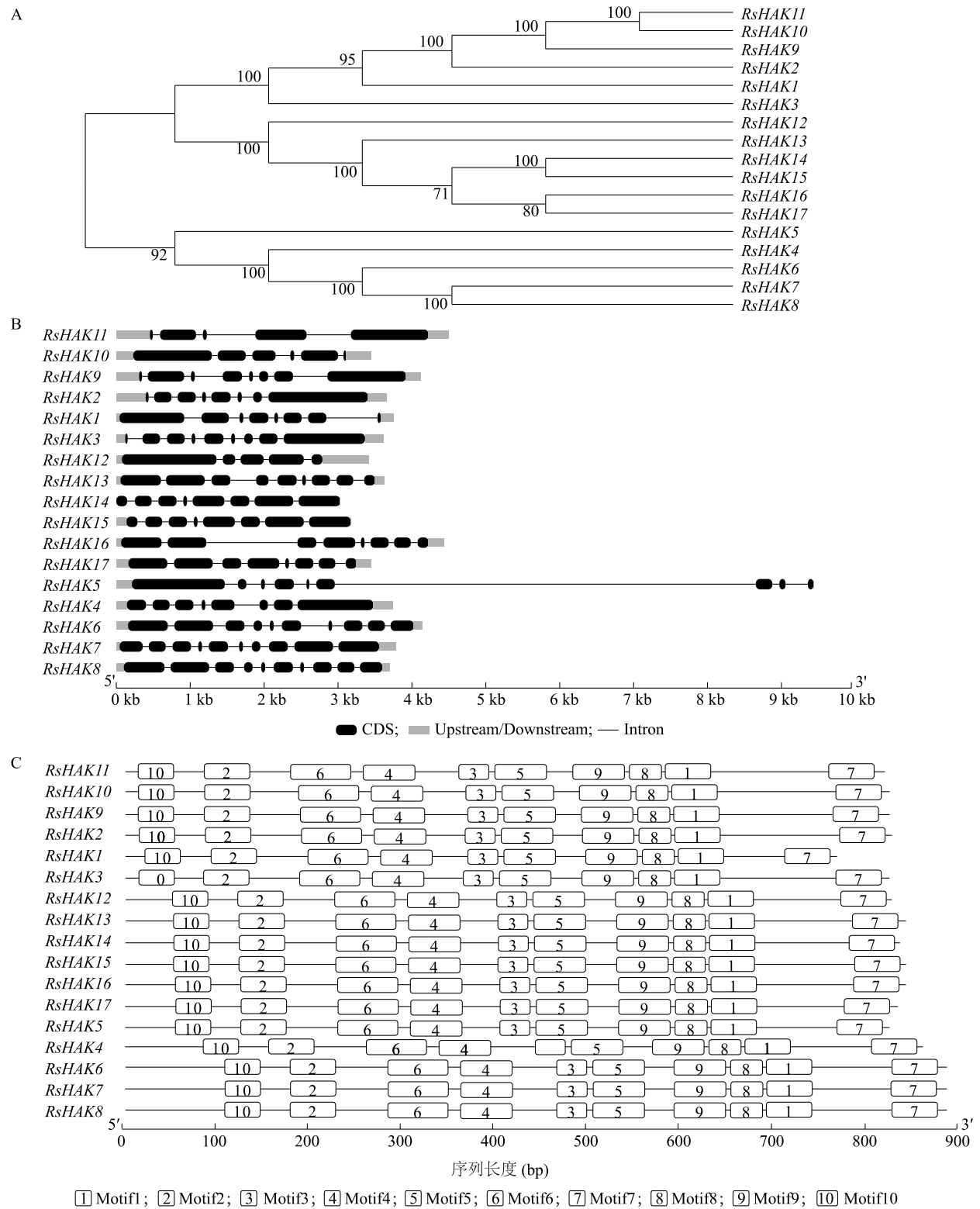
图2 萝卜与拟南芥、水稻 *HAK/KUP/KT* 基因家族系统进化分析

Fig.2 Phylogenetic analysis of *HAK/KUP/KT* gene family in radish, *Arabidopsis* and rice

2.3 萝卜 *RsHAK* 基因家族的扩张

为确定萝卜 *RsHAK* 基因的扩张模式,从萝卜基因组数据库中提取染色体位置信息(图1)。*RsHAK* 基因家族成员中16个位于染色体,1个位于 Scaffold00840。萝卜3号、7号和9号染色体各包含1个 *RsHAK* 基因;4号和8号染色体各有2个 *RsHAK* 基因;6号染色体有3个 *RsHAK* 基因;2号染色体包含6个 *RsHAK* 基因。*RsHAK* 在2号染色体(*RsHAK14* 和 *RsHAK15*)、4号染色体(*RsHAK13* 和 *RsHAK16*)上各有1对发生过串联复制的基因对,表明萝卜

RsHAK 家族基因在进化过程中发生了少量的串联重复现象。利用 MCScanX 软件对萝卜 *RsHAK* 基因进行扩张模式分析,结果显示,萝卜 *RsHAK* 基因有9个成员彼此间(11对)存在共线性关系(表3),表明萝卜 *RsHAK* 基因家族在进化过程中发生了大量的基因复制现象,是萝卜 *RsHAKs* 基因多样性的主要驱动力。共线性基因对的 *Ka* 和 *Ks* 计算结果(表3)表明,所有基因对的 *Ka/Ks* 比值均 <1.0000 ,说明纯化选择在 *RsHAK* 基因扩张过程中起主要作用。利用公式 $T=Ks/2\lambda$ 计算 *RsHAKs* 基因对重复事件的演



A: *RsHAK* 基因家族进化关系; B: *RsHAKs* 基因结构; C: *RsHAKs* 蛋白质氨基酸序列保守基序。CDS(编码序列)、Upstream(上游)/Downstream(下游)、Intron(内含子)表示基因结构; Motif 表示蛋白质氨基酸序列保守基序。

图 3 萝卜 *RsHAK* 基因结构和保守基序分析
Fig.3 Analysis of *RsHAK* gene structure and conserved motifs in radish

化时间,结果表明,萝卜 *RsHAK* 基因家族全基因组复制事件发生在 $5.55\times 10^6\sim 10.90\times 10^6$ 年前。

表 3 萝卜 *RsHAK* 家族基因进化分析

Table 3 Divergence between paralogous *RsHAK* gene pairs in radish

共线性基因对	<i>Ka</i>	<i>Ks</i>	<i>Ka/Ks</i>	基因扩张 发生时间 ($\times 10^6$ 年)
<i>RsHAK7-RsHAK8</i>	0.047 3	0.405 8	0.116 5	7.282 8
<i>RsHAK10-RsHAK11</i>	0.044 1	0.496 7	0.088 9	5.553 5
<i>RsHAK13-RsHAK14</i>	0.096 9	0.580 1	0.167 1	10.442 9
<i>RsHAK13-RsHAK15</i>	0.096 9	0.580 1	0.167 1	10.442 9
<i>RsHAK13-RsHAK16</i>	0.077 1	0.442 4	0.174 3	10.896 3
<i>RsHAK13-RsHAK17</i>	0.070 7	0.572 2	0.123 5	7.721 8
<i>RsHAK14-RsHAK16</i>	0.082 9	0.496 2	0.167 0	10.438 6
<i>RsHAK14-RsHAK17</i>	0.068 9	0.469 7	0.146 8	9.174 4
<i>RsHAK15-RsHAK16</i>	0.082 9	0.496 2	0.167 0	10.438 6
<i>RsHAK15-RsHAK17</i>	0.068 9	0.469 7	0.146 8	9.174 4
<i>RsHAK16-RsHAK17</i>	0.047 8	0.450 9	0.106 0	6.623 0

Ka:非同义替换率;*Ks*:同义替换率。

2.4 萝卜 *RsHAK* 启动子序列分析

基因的启动子元件通过基因上游 2 kb 序列进行分析,利用 PLACE 数据库(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>)对 17 个 *RsHAK* 基因启动子区域的顺式作用元件进行鉴定和分类。共鉴定出 154 个长度

大于 4 bp 的顺式作用元件,*RsHAK* 基因启动子区域除存在大量基本启动子元件 CAAT-box 外,大多数 *RsHAK* 基因的启动子包含多种与生长发育及抗性相关的调控元件,如光响应、ABA(脱落酸)响应、MeJA(茉莉酸甲酯)响应、昼夜节律调节等涉及光周期、对植物激素响应及对环境压力应答的调控元件(表 4)。结果表明,萝卜 *RsHAK* 基因不仅参与 K^+ 吸收代谢,还在植株生长发育和逆境胁迫响应过程中发挥重要作用。

2.5 萝卜 *RsHAK* 家族基因表达模式及缺钾/高钾胁迫响应分析

基于转录组测序数据,以 FPKM 值代表基因表达量对萝卜中 *RsHAK* 基因的表达水平进行分析,并以此绘制相对表达量热图(图 4)。结果表明,除 *RsHAK14* 和 *RsHAK15* 外,其他 15 个基因在萝卜根、叶、花等器官及各发育阶段中均有表达(图 4)。*RsHAK1* 主要在萝卜成熟叶(播种后第 28 d)中表达,*RsHAK2* 主要在雌蕊中表达,*RsHAK3*、*RsHAK5*、*RsHAK10* 和 *RsHAK13* 主要在根中表达。说明, *RsHAK* 家族成员在萝卜生长发育过程中及不同组织中表达存在特异性,可能在多个发育阶段发挥多种调控作用。

表 4 萝卜 *RsHAK* 启动子序列元件分析

Table 4 *In silico* analysis of cis-acting regulatory elements in *RsHAK* promoter region of radish

顺式作用元件	序列	功能注释	数量
CAAT-box	CAAAT/CCAAT	启动子和增强子区域中的共同顺式作用元件	234
Box 4	ATTAAT	与光反应有关的保守 DNA 模块元件	45
ABRE	SVHACGTGBM	参与脱落酸反应的顺式作用元件	39
G-box	YACGWB	参与光反应的顺式作用调节元件	38
ARE	AAACCA	厌氧诱导所必需的顺式作用调节元件	36
TGACG-motif	TGACG	参与茉莉酸甲酯反应的顺式作用调节元件	25
CGTCA-motif	CGTCA	参与茉莉酸甲酯反应的顺式作用调节元件	25
GT1-motif	GGTTAA/GGTTAAT	光响应元件	24
LTR	CCGAAA	参与低温反应的顺式作用元件	15
TCT-motif	TCTTAC	光响应元件	13
GATA-motif	RGATARGR	光响应元件	12
AE-box	AGAAACWW	光响应元件	11
TGA-element	AACGAC	生长素应答元件	11
MBS	CAACTG	参与干旱诱导的 MYB 结合位点	10
TC-rich repeats	GTTCCTTAC/ATTCTCTAAC	参与防御和应激反应的顺式作用元件	10

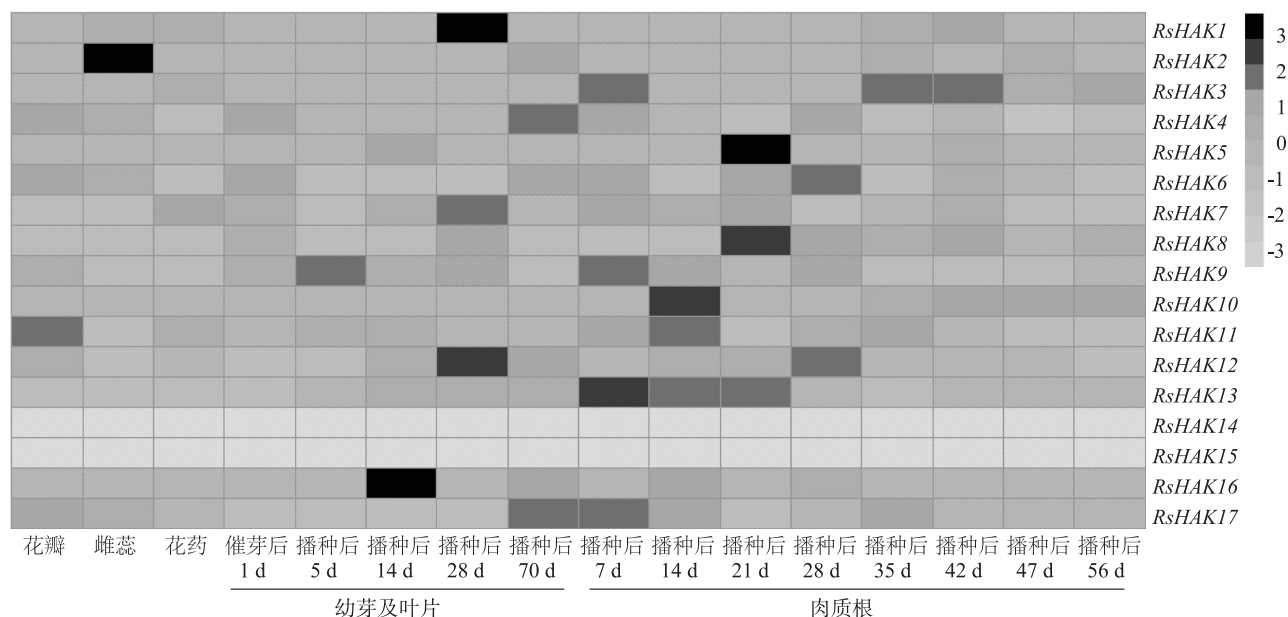


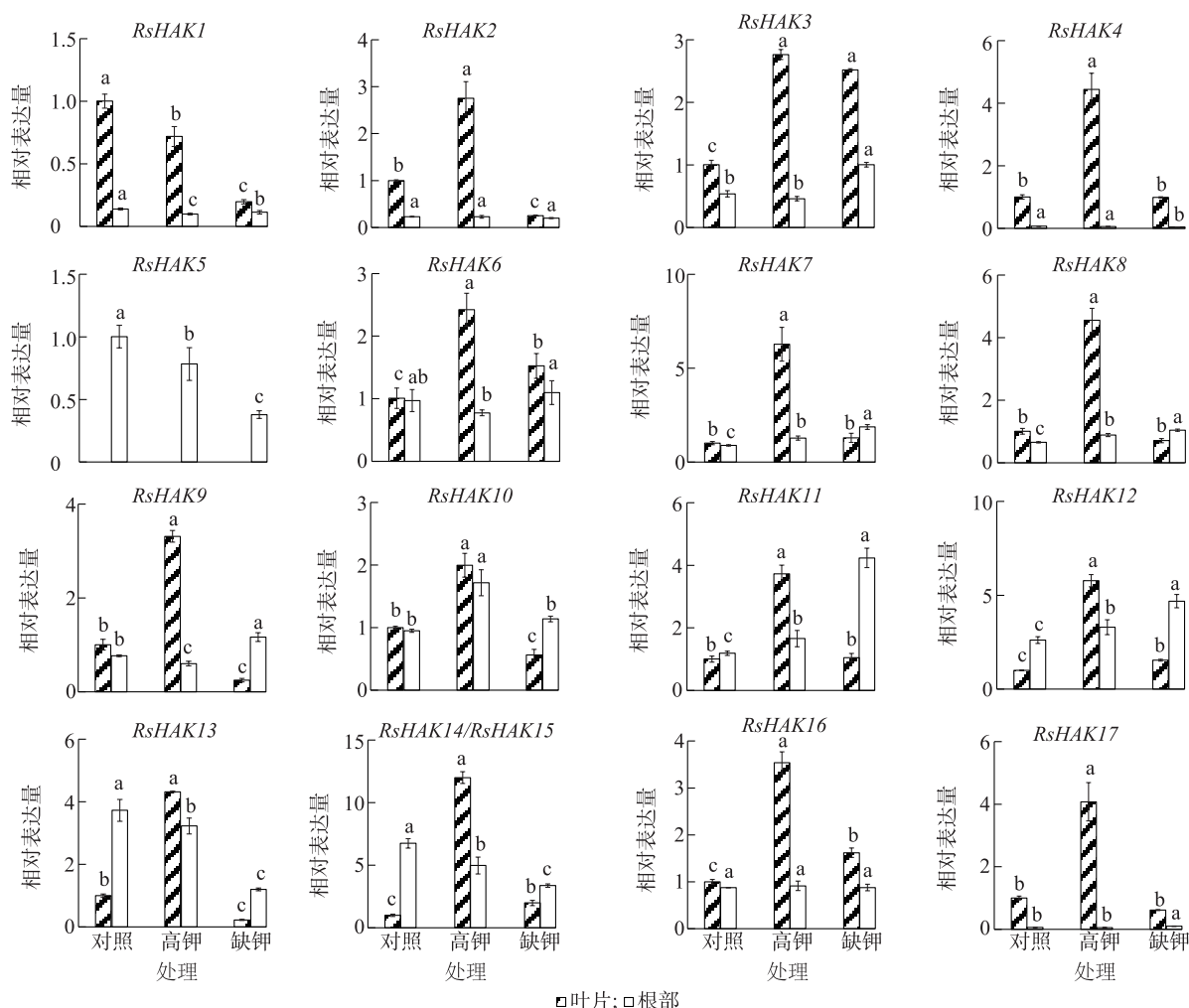
图 4 萝卜 *RsHAK* 基因转录组数据时空表达分析

Fig.4 Spatio-temporal expression analysis of transcriptomic data of *RsHAK* genes in radish

通过 qRT-PCR 进一步分析 17 个 *RsHAKs* 基因在 K^+ 缺失和 K^+ 高渗胁迫条件下的表达模式, 结果 (图 5) 显示, *RsHAK* 在缺 K^+ 和高 K^+ 胁迫下, 地上部和地下部呈现出表达特异性。除 *RsHAK5* 仅在萝卜根部组织中有表达外, 其他 *RsHAKs* 基因在地上和地下部均有表达。*RsHAK5* 在缺 K^+ 和高 K^+ 胁迫下在根部的相对表达量均出现下调, 在缺 K^+ 环境中更为显著。*RsHAK1*、*RsHAK2*、*RsHAK4* 和 *RsHAK17* 主要在萝卜叶片中表达, 其中, *RsHAK2*、*RsHAK4* 和 *RsHAK17* 呈显著的高 K^+ 胁迫诱导型表达模式, 其在叶片中的相对表达量在高 K^+ 胁迫处理下显著上调; *RsHAK3* 和 *RsHAK6~RsHAK16* 在萝卜根和叶中均有较丰富的表达, *RsHAK3*、*RsHAK6* 在缺 K^+ 和高 K^+ 处理下在叶中的相对表达量显著上调, 且对高 K^+ 胁迫的响应更显著, 而在根中的表达则受高 K^+ 胁迫抑制, 仅在缺 K^+ 环境中上调表达; *RsHAK9*、*RsHAK11*、*RsHAK12* 在缺 K^+ 环境中根部相对表达量显著上调, 而在高 K^+ 环境中叶部相对表达量显著上调, *RsHAK7*、*RsHAK8*、*RsHAK9*、*RsHAK14*、*RsHAK15* 在叶片中的相对表达量更易受高 K^+ 胁迫诱导。以上结果表明, 不同 *RsHAK* 在萝卜 K^+ 吸收转运过程及抗逆作用中发挥的功能可能存在较大差异, 具有不同的分工。

3 讨论与结论

HAK/KUP/KT 基因家族作为植物体内最大的 K^+ 转运蛋白家族, 在植物生长发育、营养代谢、抵御逆境等过程中发挥重要作用, 迄今已在多种作物中被鉴定, 但在萝卜中尚未见报道。本研究中, 我们从萝卜全基因组数据中鉴定出 17 个 *RsHAK* 基因, 萝卜 *RsHAKs* 基因数量与拟南芥 (13 个)^[22]、番茄 (19 个)^[14] 和桃 (16 个)^[37] 等相近, 但低于水稻 (27 个)^[7]、玉米 (27 个)^[9]、大豆 (29 个)^[10]、梨 (27 个)^[16] 等。将萝卜 *RsHAK* 与拟南芥、水稻进行系统进化分析, 结果显示聚为 4 个亚家族; *RsHAKs* 基因主要分布在亚家族 II 中, 与水稻^[7] 相似。亚家族 I 中的成员, 如拟南芥中的 *AtHAK5*^[22]、水稻中的 *OsHAK1*^[7] 等都被报道与根系高亲和力 K^+ 吸收有关, 该亚家族中的 *RsHAK5* 基因可能在萝卜根系中对 K^+ 具有高亲和力。亚家族 II 中的成员被报道主要参与了植物发育过程^[38], 本研究中 *RsHAK1~RsHAK3* 和 *RsHAK9~RsHAK11* 分布在亚家族 II 中, 可能在萝卜生长发育过程中发挥重要作用。萝卜 *RsHAK* 基因家族编码的氨基酸为 715~865 aa, 蛋白质相对分子质量为 79 490~96 330, 理论等电点为 5.19~8.97, 基因序列长度、内含子/外显子数目、保守基序类型及



同一部位不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 萝卜 *RsHAK* 在不同 K^+ 浓度下的表达特性分析

Fig.5 Relative expression analysis of *RsHAK* genes under different concentrations of K^+ in radish

数量、跨膜结构域等存在高度保守性,也是萝卜 *RsHAK* 呈现高度保守性的重要原因,这些结果为研究萝卜 *RsHAK* 基因功能奠定了基础。

前人研究结果表明,*HAK/KUP/KT* 基因家族并不只是简单地介导了土壤中初级 K^+ 的吸收,还参与了植株的生长发育、抗逆调控等过程。拟南芥 *AtKUP2* 突变被证明会导致胚轴变短^[39],敲除 *AtKT3* 会导致根部根毛增加^[40]。 K^+ 转运蛋白编码基因还可能参与了盐胁迫调控,如拟南芥中的 *AtHAK1*、*AtHAK2*、*AtHAK6*^[41] 等;部分水稻 *OsHAKs* 参与了激素调控,如 *OsHAK7*、*OsHAK8* 参与吡乙酸调控,*OsHAK16* 参与赤霉素调控,*OsHAK17*、*OsHAK27* 参与了吡乙酸、赤霉素和细胞分裂素代谢等^[7]。本研究在 *RsHAKs* 基因上游启动子序列中发现了一系列参与

光周期和昼夜节律调节、植物激素反应、应答逆境胁迫等的顺式作用元件。在这些调控元件中,光响应元件 Box-4 分布在鉴定出的 17 个 *RsHAK* 基因中,大多数 *RsHAK* 基因的启动子区域还包含 G-box 和 AE-box 等与光周期和昼夜节律调节相关的顺式作用元件。另外,启动子区还包含:低温响应元件 (LTR);植物激素响应元件 TGACG (茉莉酸甲酯)、CGTCA (茉莉酸甲酯)、TGA (生长素);干旱诱导响应元件 MBS 等。上述结果说明,*RsHAKs* 在光周期、激素调节、低温响应、抵抗干旱等方面起重要作用。

土壤溶液中的 K^+ 浓度通常在 0.000 001% ~ 0.000 200%^[42]。因此, K^+ 缺乏是植物必须面对的一种常见的非生物胁迫^[43],但由于近年来化肥的大量不合理施用,导致部分农耕地出现盐渍化等问题。

HAK/KUP/KT 基因对 K^+ 的吸收利用及非生物胁迫响应均具有重要作用,本研究利用 qRT-PCR 分析了萝卜幼苗在缺钾和高钾处理下的表达模式,以此筛选和鉴定可能在缺钾和高钾胁迫应答中发挥重要作用的 *RsHAK* 基因。结果表明,系统进化树中唯一聚类在亚家族 I 中的 *RsHAK5* 仅在萝卜根中表达,且受到缺钾和高钾胁迫抑制;进一步验证了 *HAK/KUP/KT* 基因家族亚家族 I 中基因主要在根中表达,参与植物根系对环境 K^+ 的吸收和运输^[22-23]。与 *AtKUP6*、*AtKUP8* 同源的 *RsHAK8*、*RsHAK9*、*RsHAK10* 在缺钾胁迫下在根中的相对表达量上调,且在高钾环境下叶片中的相对表达量显著上调,拟南芥 *AtKUP6*、*AtKUP8* 已被验证参与根部 K^+ 的流出^[44],推测 *RsHAK8*、*RsHAK9*、*RsHAK10* 可能参与萝卜根部的 K^+ 转运。*RsHAK3* 与 *AtKUP3* 同源,而后者由 K^+ 饥饿强烈诱导^[45],*RsHAK3* 在低钾环境中叶片和根中的相对表达量均显著上调,证实 *RsHAK3* 也存在 K^+ 饥饿诱导表达模式。序列相似的直系同源蛋白质通常具有相似的功能,本研究中 *RsHAKs* 基因表达模式与前人研究结果基本一致,说明 *HAK/KUP/KT* 基因家族在不同物种中具有高度保守性。

参考文献:

- [1] ASHLEY M K, GRANT M, GRABOV A. Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins[J]. J Exp Bot, 2006, 57(2): 425-436.
- [2] MAATHUIS F J, SANDERS D. Plasma membrane transport in context — making sense out of complexity[J]. Curr Opin Plant Biol, 1999, 2(3): 236-243.
- [3] MAATHUIS F J, SANDERS D. Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. PNAS, 1994, 91(20): 9272-9276.
- [4] MAATHUIS F J, SANDERS D. Regulation of K^+ absorption in plant root cells by external K^+ : interplay of different plasma membrane K^+ transporters[J]. J Exp Bot, 1997, 48: 451-458.
- [5] LI W H, XU G H, ALLI A, et al. Plant *KT/HAK/KUP* K^+ transporters: function and regulation[J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2018, 74: 133-141.
- [6] SANTA-MARIA G E, RUBIO F, DUBCOVSKY J, et al. The *HAK1* gene of barley is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter[J]. Plant Cell, 1997, 9(12): 2281-2289.
- [7] GUPTA M, QIU X, WANG L, et al. *KT/HAK/KUP* potassium transporters gene family and their whole-life cycle expression profile in rice (*Oryza sativa*) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 280(5): 437-452.
- [8] 吴胜男, 杨媛, 李英壮, 等. 小麦 *KUP/HAK/KT* 基因家族的全基因组鉴定、系统进化和表达模式分析[J]. 西北农业学报, 2021, 30(3): 351-364.
- [9] ZHANG Z, ZHANG J, CHEN Y, et al. Genome-wide analysis and identification of *HAK* potassium transporter gene family in maize (*Zea mays* L.) [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(8): 8465-8473.
- [10] 晁毛妮, 温青玉, 张晋玉, 等. 大豆 *KUP/HAK/KT* 钾转运体基因家族的鉴定与表达分析[J]. 西北植物学报, 2017, 37(2): 239-249.
- [11] 许赛赛, 张博, 仲阳, 等. 马铃薯 *HAK/KUP/KT* 基因家族鉴定与表达分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(12): 3878-3886.
- [12] 朱乐, 赵鑫泽, 蒋立希. 甘蓝型油菜钾离子转运载体 *HAK/KUP/KT* 家族的全基因组鉴定与分析[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2021, 47(3): 303-313.
- [13] OU W, MAO X, HUANG C, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the *KUP* family under abiotic stress in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. Front Physiol, 2018, 9: 17.
- [14] HYUN T K, RIM Y, KIM E, et al. Genome-wide and molecular evolution analyses of the *KT/HAK/KUP* family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Genes & Genomics, 2014, 36(3): 365-374.
- [15] MARTINEZ-CORDERO M A, MARTINEZ V, RUBIO F. Cloning and functional characterization of the high-affinity K^+ transporter *HAK1* of pepper[J]. Plant Mol Biol, 2004, 56(3): 413-421.
- [16] WANG Y Z, LV J H, CHEN D, et al. Genome-wide identification, evolution, and expression analysis of the *KT/HAK/KUP* family in pear[J]. Genome, 2018, 61(10): 755-765.
- [17] 赵建荣, 杨圆, 秦改花, 等. 石榴 *HAK/KUP/KT* 家族基因鉴定及钾转运功能分析[J]. 园艺学报, 2022, 49(4): 758-768.
- [18] 金龙飞, 张安妮, 滕梦鑫, 等. 香蕉钾转运体 *HAK/KUP/KT* 家族鉴定及其在果实发育和低钾胁迫下的表达分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(2): 30-36.
- [19] RUBIO F, GUILLERMO E S, ALONSO R N. Cloning of *Arabidopsis* and barley cDNAs encoding *HAK* potassium transporters in root and shoot cells[J]. Physiologia Plantarum, 2010, 109(1): 34-43.
- [20] GOMEZ-PORRAS J L, RIAÑO-PACHÓN D M, BENITO B, et al. Phylogenetic analysis of K^+ transporters in bryophytes, lycophytes, and flowering plants indicates a specialization of vascular plants [J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 167.
- [21] 柴薇薇, 王文颖, 崔彦农, 等. 植物钾转运蛋白 *KUP/HAK/KT* 家族研究进展[J]. 植物生理学报, 2019, 55(12): 1747-1761.
- [22] GIERTH M, SCHROEDER P M I. The potassium transporter *AtHAK5* functions in K^+ deprivation-induced high-affinity K^+ uptake and *AKT1* K^+ channel con to K^+ uptake kontributiinetics in *Arabidopsis* roots [J]. Plant Physiology, 2005, 137(3): 1105-

- 1114.
- [23] QI Z, HAMPTON C R, RYOUNG S, et al. The high affinity K^+ transporter *AtHAK5* plays a physiological role in planta at very low K^+ concentrations and provides a caesium uptake pathway in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(3): 595-607.
- [24] RIGAS S, DITENGOU F A, LJUNG K, et al. Root gravitropism and root hair development constitute coupled developmental responses regulated by auxin homeostasis in the *Arabidopsis* root apex [J]. *New Phytologist*, 2012, 197(4): 1130-1141.
- [25] 孙小川,段伟科,黄志楠,等. 萝卜 *DHN* 基因家族的鉴定及表达模式分析[J/OL]. *分子植物育种*, 2022; 1-8[2022-08-05]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210922.1446.005.html>.
- [26] KITASHIBA H, LI F, HIRAKAWA H, et al. Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome [J]. *DNA Res*, 2014, 21(5): 481-490.
- [27] MITSUI Y, SHIMOMURA M, KOMATSU K, et al. The radish genome and comprehensive gene expression profile of tuberous root formation and development [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 1-14.
- [28] JEONG Y M, KIM N, AHN B O, et al. Elucidating the triplicated ancestral genome structure of radish based on chromosome-level comparison with the Brassica genomes [J]. *Theor Appl Genet*, 2016, 129(7): 1357-1372.
- [29] BAILEY T L, WILLIAMS N, MISLEH C, et al. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: 369-373.
- [30] CHEN C, 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.
- [31] HU B, JIN J P, GUO A Y, et al. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(8): 1296-1297.
- [32] HIGO K, UGAWA Y, IWAMOTO M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 297-300.
- [33] WANG Y P, TANG H B, DEBARRY J D, et al. MCSanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene syteny and collinearity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): e49.
- [34] QIAO X, LI M, LI L T, et al. Genome-wide identification and comparative analysis of the heat shock transcription factor family in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*) and five other *Rosaceae* species [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 12.
- [35] NEI M, GOJOBORI T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions [J]. *Mol Biol Evol*, 1986, 3(5): 418-426.
- [36] SHUANG H, CHEN L S, JIANG H X, et al. Boron deficiency growth and photosynthesis, and increases starch and hexoses in leaves of citrus seedling [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 165(13): 1331-1341.
- [37] SONG Z Z, MA R J, YU M L. Genome-wide analysis and identification of *KT/HAK/KUP* potassium transporter gene family in peach (*Prunus persica*) [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(1): 774-787.
- [38] NIEVES-CORDONES M, RODENAS R, CHAVANIEU A, et al. Uneven *HAK/KUP/KT* protein diversity among angiosperms: species distribution and perspectives [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 126.
- [39] ELUMALAI R P, NAGPAL P, REED J W. A mutation in the *Arabidopsis KT2/KUP2* potassium transporter gene affects shoot cell expansion [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 119-131.
- [40] RIGAS S, DEBROSSES G, HARALAMPIDIS K, et al. TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs [J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 139-151.
- [41] MAATHUIS F J. The role of monovalent cation transporters in plant responses to salinity [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1137-1147.
- [42] WESTERMANN D T. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach [J]. *Soil Sci*, 1996, 161(2): 140-141.
- [43] 王 瑜,刘 扬,卓座品,等. 高氮低磷中钾配比对武夷岩茶产量及品质的影响 [J]. *南方农业学报*, 2022, 53(2): 391-400.
- [44] OSAKABE Y, ARINAGA N, UMEZAWA T, et al. Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(2): 609-624.
- [45] KIM E J, KWAK J M, UOZUMI N, et al. *AtKUP1*: an *Arabidopsis* gene encoding high-affinity potassium transport activity [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(1): 51-62.

(责任编辑:陈海霞)