

引用格式:

赵影, 张凤洁, 付成成, 王莹, 段甜甜, 李雪垠. 谷子 $CrRLK1L$ 基因家族鉴定及其在非生物胁迫下的表达模式分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(6): 37–49.

ZHAO Y, ZHANG F J, FU C C, WANG Y, DUAN T T, LI X Y. Identification of the  $CrRLK1L$  gene family in *Setaria italica* and analysis of their expression pattern under abiotic stress[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2025, 51(6): 37–49.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 谷子 $CrRLK1L$ 基因家族鉴定及其在非生物胁迫下的表达模式分析

赵影<sup>1</sup>, 张凤洁<sup>2</sup>, 付成成<sup>1</sup>, 王莹<sup>1</sup>, 段甜甜<sup>1</sup>, 李雪垠<sup>1\*</sup>

(1. 山西农业大学生命科学学院, 山西 晋中 030800; 2. 山西农业大学农学院, 山西 晋中 030800)

**摘要:** 为了解谷子中 $CrRLK1L$ 基因家族成员组成及其生物学功能, 基于谷子基因组信息对谷子 $CrRLK1L$ 家族成员进行鉴定与生物信息学分析, 并对其在干旱、高温、低温等非生物胁迫下的表达模式进行分析。结果显示: 谷子中共鉴定到29个 $CrRLK1L$ 基因家族( $SiCrRLK1L$ )成员, 其序列均较保守, 推测其可能具有相同的功能; 与拟南芥相比, 谷子 $CrRLK1L$ 家族与水稻具有更近的亲缘关系; 大部分 $SiCrRLK1L$ 基因在植物根部的表达量较高, 具有组织特异性, 且一部分 $SiCrRLK1L$ 基因表达水平受逆境胁迫影响较大;  $SiCrRLK1L$ 家族基因中含有与干旱胁迫等逆境相关的响应元件;  $SiCrRLK1L7$ 、 $SiCrRLK1L23$ 、 $SiCrRLK1L25$ 、 $SiCrRLK1L27$ 在干旱、低温(4 °C)和高温(37 °C)胁迫下均有不同的表达模式。

**关键词:** 谷子;  $CrRLK1L$ 基因家族; 抗逆; 非生物胁迫

中图分类号: Q943.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2025)06-0037-13

## Identification of the $CrRLK1L$ gene family in *Setaria italica* and analysis of their expression pattern under abiotic stress

ZHAO Ying<sup>1</sup>, ZHANG Fengjie<sup>2</sup>, FU Chengcheng<sup>1</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, DUAN Tiantian<sup>1</sup>, LI Xueyin<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030800, China; 2. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030800, China)

**Abstract:** To elucidate the composition and biological functions of the  $CrRLK1L$  gene family in foxtail millet(*Setaria italica*), the  $CrRLK1L$  family members were identified and analyzed based on the foxtail millet genome information. The expression patterns of these genes under abiotic stresses such as drought, high temperature, and low temperature were also investigated. The results showed that a total of 29  $CrRLK1L$  genes( $SiCrRLK1L$ ) were identified, exhibiting high sequence conservation, which implied potential functional redundancy among members. Compared with *Arabidopsis thaliana*, the  $CrRLK1L$  family shared a closer phylogenetic relationship with rice(*Oryza sativa*), suggesting monocot-specific evolutionary conservation. Most  $SiCrRLK1L$  genes displayed elevated expression levels in root tissues, indicating pronounced tissue specificity, possibly associated with root development and stress perception. An abundance of stress-related cis-regulatory elements, such as drought stress were identified in the  $SiCrRLK1L$  family, supporting their role in abiotic stress adaptation.  $SiCrRLK1L7$ ,  $SiCrRLK1L23$ ,  $SiCrRLK1L25$  and  $SiCrRLK1L27$  were significantly regulated under

收稿日期: 2025-01-08

修回日期: 2025-02-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD1000700, 2018YFD1000706); 国家自然科学基金项目(31801434); 山西省重点研发项目(202302140601003); 山西农业大学科技创新基金项目(2017YJ28)

作者简介: 赵影(1999—), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士研究生, 主要从事谷子基因资源开发与分子育种, zhaoying123456789@163.com;

\*通信作者, 李雪垠, 博士, 副教授, 主要从事特色杂粮种质资源发掘与分子育种研究, lixueyin2010@163.com

drought, low temperature( $4^{\circ}\text{C}$ ) and high temperature( $37^{\circ}\text{C}$ ) stresses, exhibiting distinct temporal expression patterns.

**Keywords:** *Setaria italica*; *CrRLK1L* gene family; stress resistance; abiotic stress

类受体激酶(receptor-like kinase, RLK)是一类具有广泛生物学功能的蛋白激酶<sup>[1]</sup>, 参与植物细胞生长和分化、抗逆、抗病等过程。类受体激酶家族也是一类数量巨大的跨膜蛋白激酶家族, 具有胞内区、跨膜区和胞外区3类结构域<sup>[2]</sup>, 根据其多变的胞外区结构域可将其分为15个不同的亚家族<sup>[3]</sup>。

长春花类受体激酶亚家族(*CrRLK1L*)最早在长春花属植物中被发现, 其家族成员广泛存在于被子植物中。目前, 关于拟南芥和水稻中*CrRLK1L*基因功能的研究已被陆续报道。研究<sup>[4]</sup>显示, *CrRLK1L*家族成员在植物生长发育阶段发挥着重要作用, 如调节植物细胞伸长、参与生物和非生物胁迫应答、维持细胞壁完整性等。*CrRLK1L*家族成员*FER*参与调控拟南芥生长阶段的细胞伸长<sup>[5]</sup>。另外*THE1*、*HERK1*、*HERK2*也调控细胞伸长, 不过*CrRLK1L*基因存在功能冗余现象<sup>[6-7]</sup>。*FER*、*ANX1*和*ANX2*也在花粉管的识别中发挥作用, 参与调控拟南芥的受精过程<sup>[8-9]</sup>。*CrRLK1L*家族的功能在水稻中也有报道。*LIU*等<sup>[10]</sup>研究表明, *RUP0*在水稻花粉管中特异表达, 参与水稻的生殖发育。

最近, 类受体激酶在非生物胁迫中的作用也被相继报道。植物类受体激酶(RLK)在植物对干旱胁迫的响应中起着关键作用<sup>[11]</sup>。*FER*是调控细胞内外信号的关键中心, 它参与了多种激素信号转导途径, 如脱落酸(ABA)、油菜素甾醇、乙烯等<sup>[12]</sup>。另外, *fer*突变体对高盐、低温以及高温胁迫敏感;*FER*能够通过直接或间接的方式调控ABA信号通路<sup>[13]</sup>, 在植物受非生物胁迫时发挥关键作用<sup>[14]</sup>。

近些年来, 全球气候变暖、极端天气和土壤盐碱化等逐渐成为影响农作物产量的因素。因此, 提高作物的抗逆境胁迫能力, 特别是抗旱、耐高低温等能力, 成为农业生产中亟待解决的问题。谷子(*Setaria italica*)属于二倍体农作物, 是一年生的草本植物, 起源于中国, 种植历史悠久。谷子作为C<sub>4</sub>植物, 具有耐旱、耐贫瘠等优点, 是优质的种质资源<sup>[15]</sup>。目前, 许多学者已将谷子作为禾本科C<sub>4</sub>植物抗逆的模式作物<sup>[16]</sup>。虽然*CrRLK1L*家族在植物抵御环境变化中发挥关键作用, 然而, 大部分的研究聚

焦于水稻和拟南芥, 而关于谷子中*CrRLK1L*基因家族(*SiCrRLK1L*)生物学功能的研究较少。本研究对*SiCrRLK1L*基因家族的成员进行鉴定及生物信息学分析, 同时, 分析*SiCrRLK1L*基因家族在干旱(PEG胁迫)、高温( $37^{\circ}\text{C}$ )和低温( $4^{\circ}\text{C}$ )这3种非生物胁迫下的表达模式, 以期系统分析谷子中该家族在非生物胁迫下的作用机制, 为谷子*CrRLK1L*功能研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 谷子*CrRLK1L*基因家族鉴定

利用PFAM网站的马来凝集素结构域MLD(PF12819)和类受体激酶蛋白结构域(PF07714)构建*SiCrRLK1L*的隐马尔可夫模型, 利用TBtools软件进行序列比对, 筛选得到谷子*CrRLK1L*家族候选基因。从谷子氨基酸序列库(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中下载谷子*CrRLK1L*家族成员的核苷酸序列与蛋白序列, 通过MEME-Suite(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)分析谷子*CrRLK1L*的蛋白基序, 利用NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析其保守结构域。

### 1.2 谷子*CrRLK1L*基因家族生物信息学分析

利用ExPASy-ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)对*SiCrRLK1L*基因家族的脂肪族指数、不稳定指数等理化性质进行研究, 并利用Cell-PLoc 2.0(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)预测其亚细胞定位<sup>[17]</sup>。

利用MEGA 11.0工具, 对经过筛选的谷子*SiCrRLK1L*、拟南芥*AtCrRLK1L*以及水稻*OsCrRLK1L*家族成员进行多序列比较, 然后创建系统进化树。利用TBtools(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>), 将*SiCrRLK1L*基因在染色体上的位置进行可视化, 并对*SiCrRLK1L*基因的保守序列进行分析, 探讨其内含子与外显子的结构。利用PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)平台, 鉴定*SiCrRLK1L*基因起始密码子ATG上游2 000 bp的序列中包含的顺式作用元件<sup>[18]</sup>。将*SiCrRLK1L*蛋白氨基酸序列上传到SWISS-MODEL(<https://swissmodel.expasy.org/>)

model.expasy.org/), 对蛋白三维结构进行分析。

### 1.3 谷子*CrRLK1L*家族基因表达水平分析

从Phytozome提取谷子*CrRLK1L*基因在不同组织和时期以及不同胁迫处理下的转录组FPKM数据, 使用TBtools软件对数据进行对数化( $\log_2$ )处理并绘制谷子*CrRLK1L*基因的表达热图。

### 1.4 谷子*CrRLK1L*家族基因在非生物胁迫下表达模式分析

#### 1.4.1 试验材料及培养条件

将未休眠的谷子种子用70%乙醇消毒后, 均匀地平铺到培养基中, 放入培养箱中培养10 d后, 移栽入水培盒中培养1周, 之后对其进行胁迫处理。培养液配制: 大量元素溶液, 10 mL; 含 $\text{Ca}^{2+}$ 溶液, 10 mL; 微量元素溶液, 1 mL; 含铁盐溶液, 5 mL; 含磷溶液, 0.5 mL, 加蒸馏水定容至1 L, 之后调节pH至5.9~6.0。选取长势一致、大小相近的谷子幼苗, 将其随机分成4组。

1) 干旱(PEG6000胁迫)处理组: 将幼苗分别在PEG6000溶液(体积分数为20%)中培养0.5、1.0、3.0、

6.0和12.0 h;

2) 低温(4 °C)处理组: 在4 °C培养箱中分别处理0.5、1.0、3.0、6.0和12.0 h;

3) 高温(37 °C)处理组: 在37 °C培养箱中分别处理0.5、1.0、3.0、6.0和12.0 h;

4) 对照组: 在正常培养箱中培养。

分别将上述不同处理时期(0.5、1.0、3.0、6.0和12.0 h)的样品置于-80 °C冰箱存放, 待用。

#### 1.4.2 各时期RNA的提取和实时荧光定量PCR

从-80 °C冰箱中取出样本, 使用OMEGA植物RNA提取试剂盒提取RNA, 然后进行cDNA的反转录, 最后将所得cDNA储存在-20 °C的冰箱里。针对*SiCrRLK1L*基因开展qRT-PCR引物设计(表1), 最佳产物长度在100 bp左右, 限定在80~200 bp范围内。以*Si-β-Actin*作为内参基因。qRT-PCR体系如下: 10 μL qPCR Master Mix, 上下游引物各0.4 μL, 2.0 μL cDNA, 7.2 μL ddH<sub>2</sub>O。扩增条件为: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性10 s, 58 °C退火10 s, 72 °C延伸30 s, 循环数为40。每个样品重复3次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算*SiCrRLK1L*基因的相对表达量<sup>[19]</sup>。

表1 实时荧光定量引物

Table 1 Real time fluorescent quantitative primers

基因名称	长度/bp	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>SiCrRLK1L7</i>	123	TACCGCTTGCCTTCAGTGT	TGCAACCTTGGTCTCATCCC
<i>SiCrRLK1L23</i>	133	GGGCTCCACTACACCTCACAC	ATTCAGGCCCGACCTTGAG
<i>SiCrRLK1L25</i>	154	GAGGTGCTCAAGGAGATCCAG	AGGATGCAGCGTCAGGTT
<i>SiCrRLK1L27</i>	125	CCCCTTGTGATGGTGGGAAA	AGCCCCTGAGTCCATACT

## 2 结果与分析

### 2.1 *SiCrRLK1L*基因家族成员鉴定

本研究在谷子全套基因中共筛选到29个*SiCrRLK1L*基因, 根据其在染色体上的次序, 依次命名为*SiCrRLK1L1~SiCrRLK1L29*(表2)。由表2可见:*SiCrRLK1L*家族成员的氨基酸数量为724~958个; 相对分子质量预测值为 $79.91 \times 10^3$ ~ $104.99 \times 10^3$ ; 蛋白等

电点为5.53~9.06; 亲水系数为-0.288~-0.011, 亲水系数预测值均为负数, 表明该家族蛋白具有一定的亲水性; 脂肪族指数为77.42~92.07; 不稳定性指数为26.17~47.63, 大多数*SiCrRLK1L*蛋白质都为稳定蛋白。亚细胞定位结果显示, 29个*SiCrRLK1L*蛋白均定位于叶绿体中。已有研究表明, 拟南芥中部分*CrRLK1L*成员(如*FER*、*THE1*等)定位于质膜上<sup>[20~21]</sup>。

表2 *SiCrRLK1L*基因家族成员基本理化性质分析

Table 2 Analysis of basic physical and chemical properties of the *SiCrRLK1L* gene family

基因名称	基因ID	染色体 编号	氨基酸 数量/个	相对分子 质量/ $10^3$	等电点	亲水系数	脂肪族 指数	不稳定性 指数	亚细胞 定位
<i>SiCrRLK1L1</i>	Seita.1G087000	1	724	79.91	5.53	-0.232	81.80	47.63	叶绿体
<i>SiCrRLK1L2</i>	Seita.1G087100	1	898	99.28	6.13	-0.170	89.14	38.40	叶绿体
<i>SiCrRLK1L3</i>	Seita.2G030500	2	842	93.05	5.85	-0.225	84.41	36.03	叶绿体

表2(续)

基因名称	基因ID	染色体 编号	氨基酸 数量/个	相对分子 质量/ $10^3$	等电点	亲水系数	脂肪族 指数	不稳定性 指数	亚细胞 定位
<i>SiCrRLK1L4</i>	Seita.2G183100	2	894	97.97	5.55	-0.163	81.93	37.53	叶绿体
<i>SiCrRLK1L5</i>	Seita.2G183300	2	897	99.46	5.81	-0.177	85.30	41.50	叶绿体
<i>SiCrRLK1L6</i>	Seita.2G183500	2	886	97.63	5.89	-0.181	85.05	35.72	叶绿体
<i>SiCrRLK1L7</i>	Seita.3G041700	3	841	92.18	6.87	-0.105	89.92	26.17	叶绿体
<i>SiCrRLK1L8</i>	Seita.3G172100	3	876	95.65	6.37	-0.100	92.07	38.22	叶绿体
<i>SiCrRLK1L9</i>	Seita.3G172200	3	958	104.70	6.59	-0.244	84.27	38.31	叶绿体
<i>SiCrRLK1L10</i>	Seita.3G172300	3	958	104.36	6.94	-0.205	85.11	36.37	叶绿体
<i>SiCrRLK1L11</i>	Seita.3G172500	3	955	104.52	7.07	-0.218	83.81	34.18	叶绿体
<i>SiCrRLK1L12</i>	Seita.3G172800	3	954	104.99	7.89	-0.201	86.76	38.37	叶绿体
<i>SiCrRLK1L13</i>	Seita.3G288700	3	874	95.06	6.15	-0.210	80.13	33.47	叶绿体
<i>SiCrRLK1L14</i>	Seita.3G289000	3	912	101.01	6.08	-0.240	79.24	40.95	叶绿体
<i>SiCrRLK1L15</i>	Seita.3G289100	3	753	82.52	7.22	-0.238	77.42	36.61	叶绿体
<i>SiCrRLK1L16</i>	Seita.3G330900	3	944	104.09	6.80	-0.163	88.17	41.49	叶绿体
<i>SiCrRLK1L17</i>	Seita.3G331000	3	914	100.19	6.54	-0.134	89.10	42.43	叶绿体
<i>SiCrRLK1L18</i>	Seita.3G338700	3	943	104.82	6.55	-0.288	83.86	39.01	叶绿体
<i>SiCrRLK1L19</i>	Seita.5G110400	5	863	92.97	5.86	-0.011	88.49	36.82	叶绿体
<i>SiCrRLK1L20</i>	Seita.5G130300	5	917	101.31	6.55	-0.189	84.88	38.50	叶绿体
<i>SiCrRLK1L21</i>	Seita.5G470500	5	944	103.68	6.39	-0.173	85.97	43.69	叶绿体
<i>SiCrRLK1L22</i>	Seita.7G240600	7	851	94.45	6.18	-0.230	82.39	38.06	叶绿体
<i>SiCrRLK1L23</i>	Seita.7G272000	7	837	92.17	6.34	-0.137	90.13	37.69	叶绿体
<i>SiCrRLK1L24</i>	Seita.7G334000	7	925	102.13	5.73	-0.186	89.62	39.56	叶绿体
<i>SiCrRLK1L25</i>	Seita.8G001700	8	928	102.38	5.68	-0.171	90.08	39.03	叶绿体
<i>SiCrRLK1L26</i>	Seita.8G244300	8	767	84.43	5.78	-0.152	87.85	36.07	叶绿体
<i>SiCrRLK1L27</i>	Seita.9G414400	9	885	95.72	5.77	-0.173	79.88	32.07	叶绿体
<i>SiCrRLK1L28</i>	Seita.9G447800	9	864	92.48	9.06	-0.098	84.38	43.18	叶绿体
<i>SiCrRLK1L29</i>	Seita.9G559900	9	862	93.60	5.95	-0.115	82.83	44.30	叶绿体

## 2.2 谷子*CrRLK1L*基因在染色体上的分布及共线性分析结果

染色体定位分析结果(图1)表明, 29个*SiCrRLK1L*基因不均匀地分布在1~3号、5号、7~9号

染色体上, 其中, 基因分布数量最少的是1号和8号染色体(各2个), 而基因数量分布最多的是3号染色体(12个); 同时, 在1号、2号和3号染色体上共发现了5个串联基因簇, 其中3号染色体上串联基因簇数量最多(3个)。

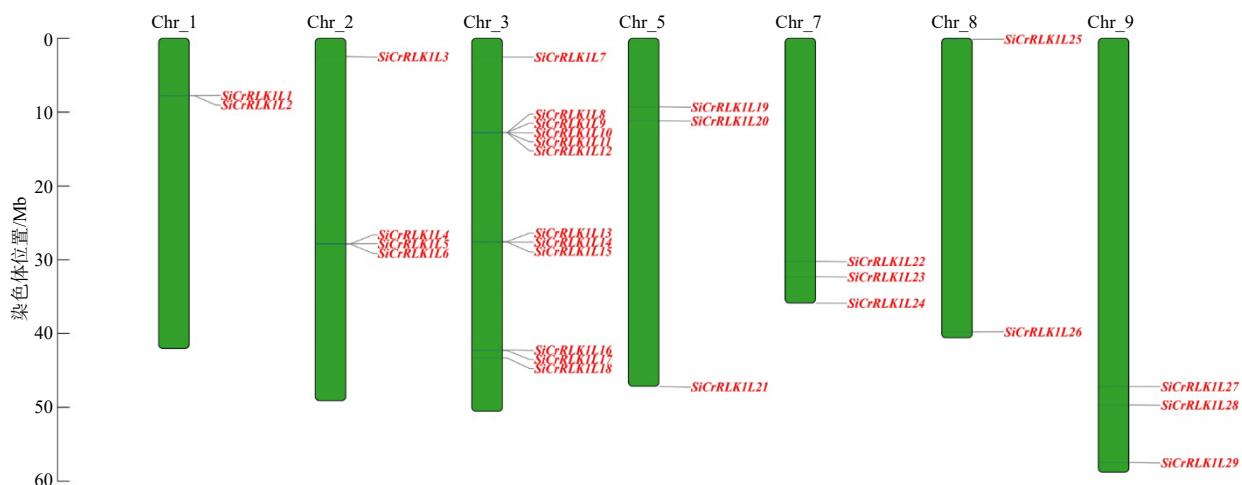
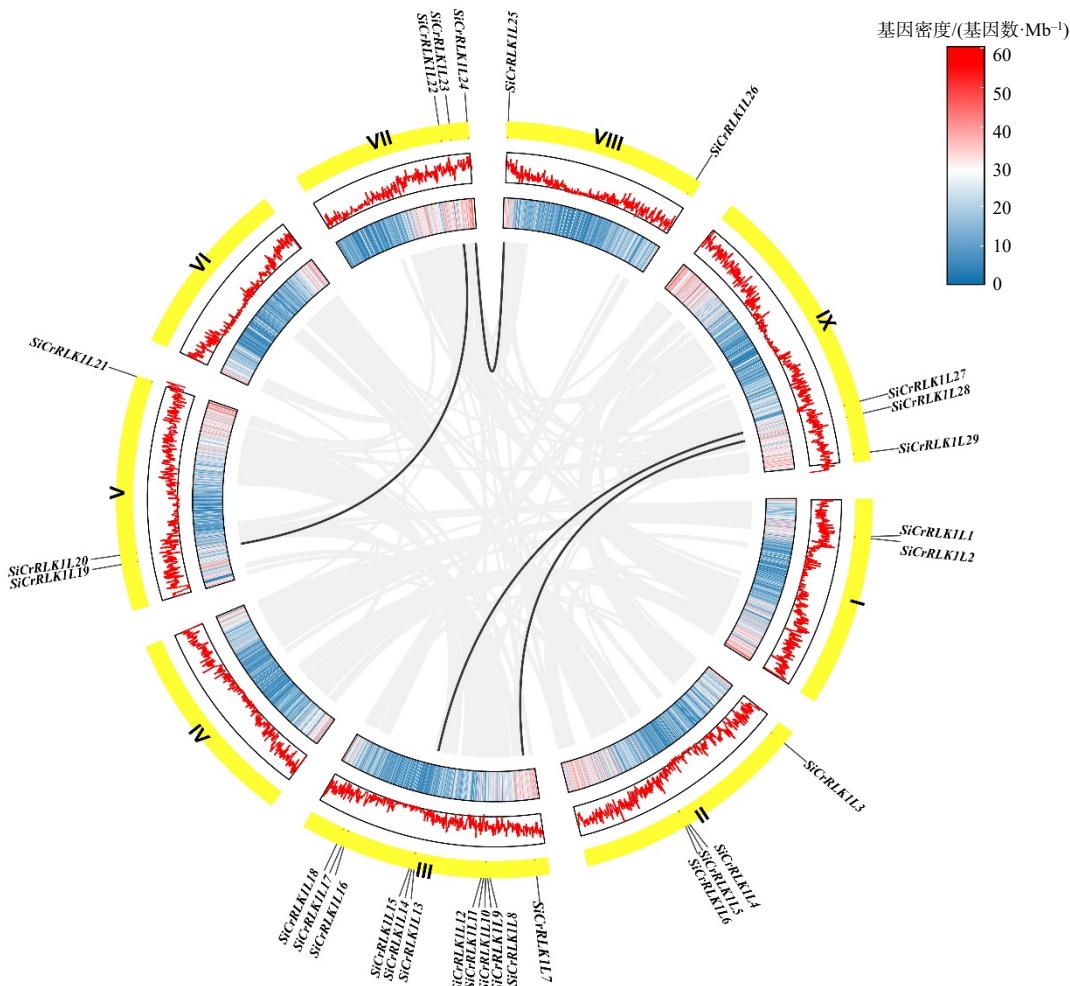
图1 *SiCrRLK1L*基因家族成员在染色体上的定位

Fig. 1 Distribution of *CrRLK1L* gene family members on chromosomes in *Setaria italica*

通过对谷子进行物种内共线性分析发现，在谷子 *CrRLKIL* 基因家族中存在片段复制现象(图2)，谷子中共有8个 *SiCrRLKIL* 基因组成4对片段复制基因对，基因数约为 *SiCrRLKIL* 基因家族成员数量的28%。其中，*SiCrRLKIL14* 与 *SiCrRLKIL27*、*SiCrRLKIL7* 与 *SiCrRLKIL28*、*SiCrRLKIL19* 与 *SiCrRLKIL22*、*SiCrRLKIL24*与*SiCrRLKIL25*分别为旁系同源基因，说明该家族基因可能存在功能冗余

或缺失等现象，这可能是谷子中该基因家族数量多的原因之一。

为进一步了解 *SiCrRLKIL* 基因的进化演变过程，对谷子与水稻以及拟南芥的物种间共线性进行探讨，结果(图3)表明，谷子与水稻 *CrRLKIL* 基因组形成的直系同源基因对数量较多，共18个；而谷子与拟南芥的基因对数量较少，仅2个；这说明禾本科作物间有更近的遗传关系。



由外圈至内圈依次为染色体、基因密度和弦图、基因密度热图和谷子共线性展示图。

图2 *SiCrRLKIL* 物种内共线性分析

Fig. 2 Synteny analysis of *SiCrRLKIL*

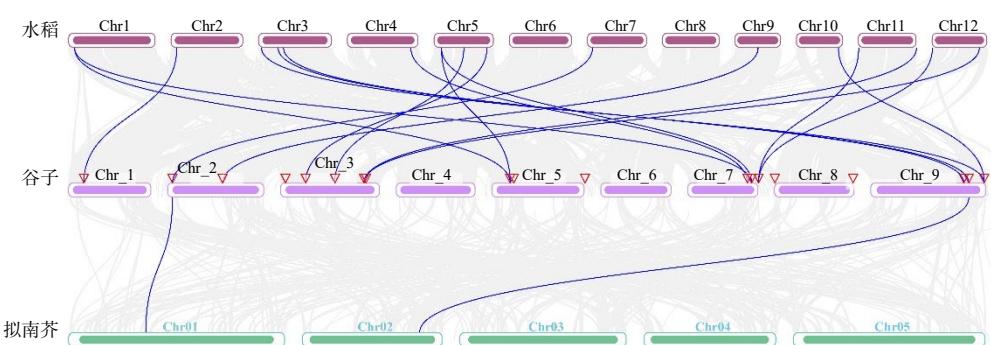


图3 水稻、谷子和拟南芥 *CrRLKIL* 物种间共线性分析

Fig. 3 Synteny analysis of *CrRLKIL* in *Oryza sativa*, *Setaria italica* and *Arabidopsis thaliana*

### 2.3 谷子 $CrRLK1L$ 基因家族成员系统发育分析结果

为进一步了解谷子 $CrRLK1L$ 基因家族的系统进化关系,对鉴定得到的谷子 $CrRLK1L$ 基因序列与拟南芥和水稻 $CrRLK1L$ 基因序列进行多序列比对,构建系统发育树。

结果(图4)显示,  $CrRLK1L$ 基因家族可划分为4

组(group), 谷子 $CrRLK1L$ 基因与水稻 $CrRLK1L$ 基因在前3组中的同源性较高,而谷子 $CrRLK1L$ 基因与拟南芥 $CrRLK1L$ 基因的同源性则在第4组中较高。同源性较高的基因可能具有相似的生物学功能。拟南芥和水稻中关于该家族基因功能的研究较多,而谷子中该家族基因的功能还有待进一步验证。

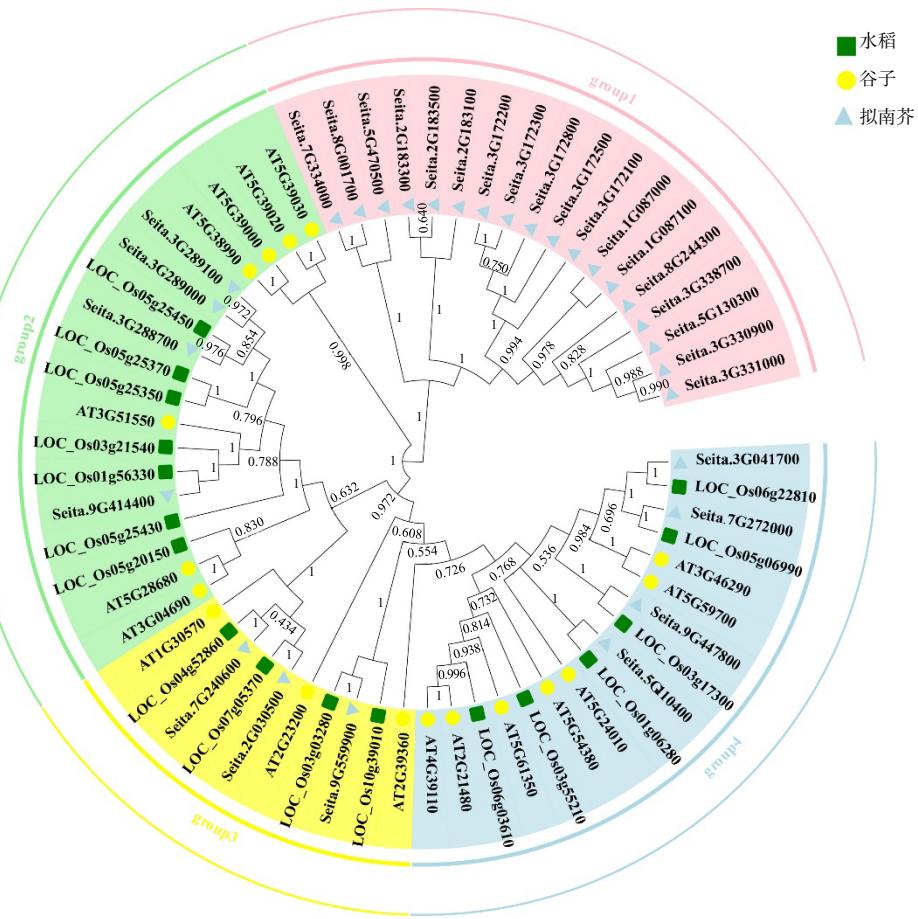


图4 谷子、水稻与拟南芥 $CrRLK1L$ 系统进化树

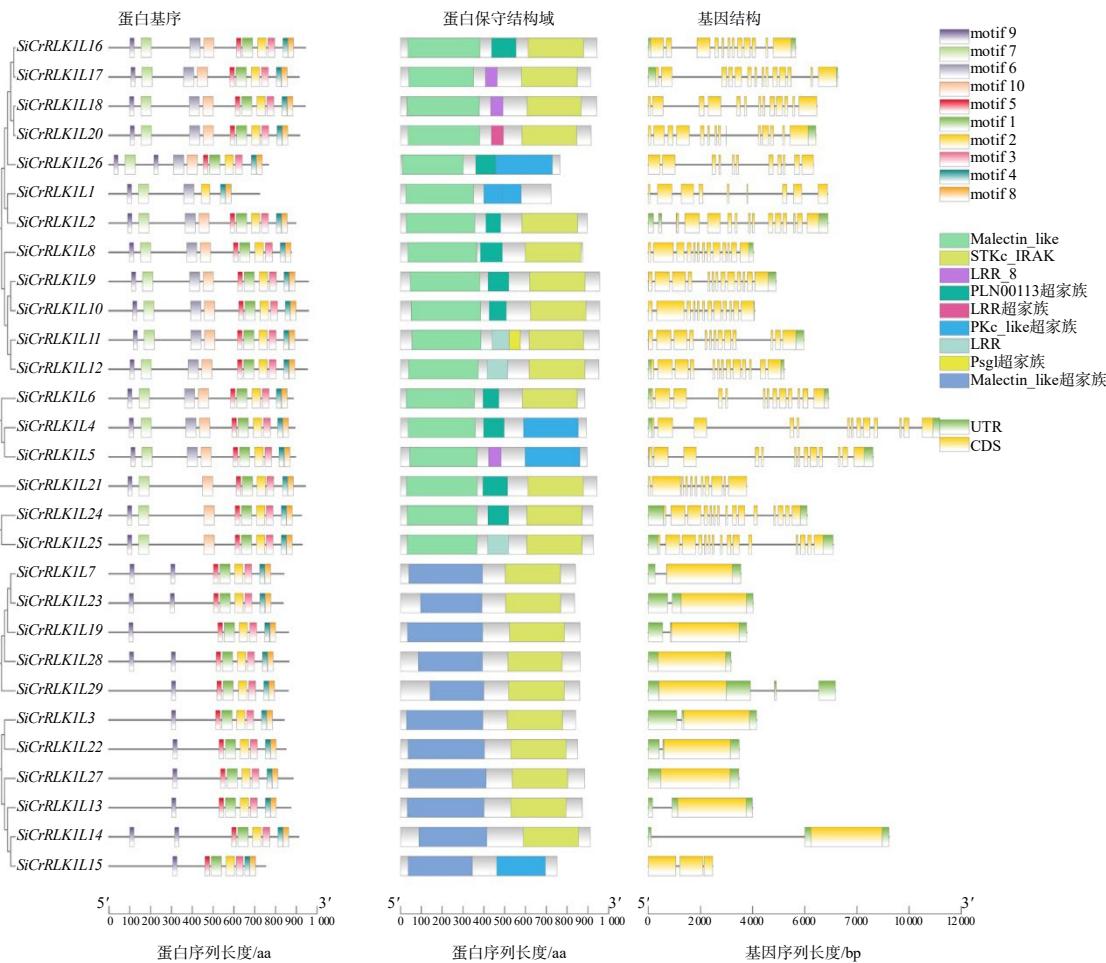
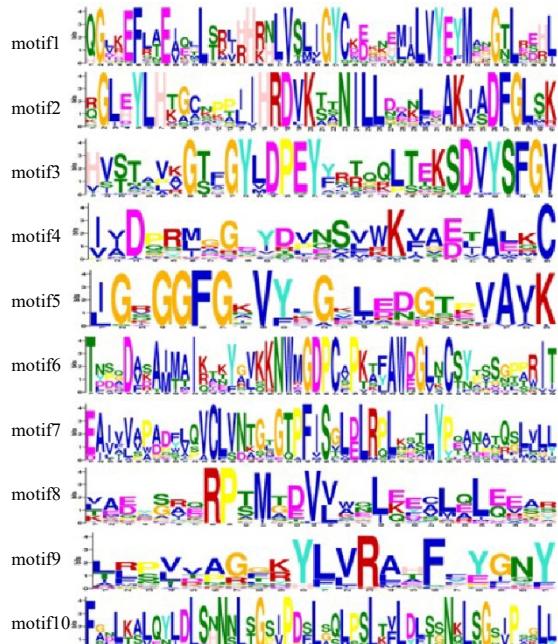
Fig. 4 Phylogenetic tree of  $CrRLK1L$  in *Setaria italica*, *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*

### 2.4 $SiCrRLK1L$ 基因家族蛋白基序、保守结构域与基因结构

为进一步了解 $SiCrRLK1L$ 基因家族的进化保守性,对该家族成员编码的蛋白基序、保守结构域和基因结构展开可视化分析。通过对 $SiCrRLK1L$ 基因结构进行分析发现,绝大多数 $SiCrRLK1L$ 基因是断裂基因,其中,有5个基因含有1个内含子,4个基因无内含子(图5)。根据基因结构的多样性推测, $SiCrRLK1L$ 基因家族在植物生长发育中可能发挥多

种功能。

对 $SiCrRLK1L$ 基因家族蛋白的基序(motif)分析结果(图6)表明,除 $SiCrRLK1L1$ 基因外,谷子中该家族其他成员蛋白基序的种类和数量较保守,都含有蛋白基序1、2、3、4、5、8、9,其中蛋白基序2、4、8、9存在于所有家族基因中,可能发挥着最基础的功能(图6)。另外,谷子中该家族成员都包含Malectin\_like超家族结构域和PKc\_like超家族结构域(图5)。

图5 *SiCrRLK1L*的蛋白基序、保守结构域与基因结构Fig. 5 Protein motif, gene conserved domains and gene structure of *SiCrRLK1L*图6 *SiCrRLK1L*蛋白基序序列Fig. 6 Sequence of *SiCrRLK1L* protein motif

## 2.5 谷子CrRLK1L蛋白的二级结构与三维结构

谷子CrRLK1L蛋白二级结构包括 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、无规卷曲和延伸链，其中无规卷曲在SiCrRLK1L蛋白二级结构中占比最大，能够稳定维持该基因家族的二级结构(表3)。为探究谷子*CrRLK1L*基因家族的蛋白质三级结构，利用同源建模的方法对29个SiCrRLK1L蛋白质三维结构进行预测，以可信度(GMQE)和序列相似度为参考指标，SiCrRLK1L蛋白质的预测结构序列相似度为70.15%~100.00%，可信度为0.70~0.85，说明预测得到的蛋白结构与模板蛋白结构属于同一家族的可能性高，且建模质量好。整体而言，SiCrRLK1L蛋白的三维结构比较保守，大部分成员的N端都有一段保守结构(图7)。

表3 SiCrRLK1L蛋白质二级结构

Table 3 Secondary structure of SiCrRLK1L protein

基因名称	基因ID	$\alpha$ -螺旋占比/%	$\beta$ -转角占比/%	无规卷曲占比/%	延伸链占比/%
<i>SiCrRLK1L1</i>	Seita.1G087000	29.18	3.87	48.13	18.81
<i>SiCrRLK1L2</i>	Seita.1G087100	27.20	4.91	47.49	20.40
<i>SiCrRLK1L3</i>	Seita.2G030500	29.25	3.92	47.32	19.50
<i>SiCrRLK1L4</i>	Seita.2G183100	28.44	4.59	47.26	19.71
<i>SiCrRLK1L5</i>	Seita.2G183300	26.34	4.13	48.88	20.65
<i>SiCrRLK1L6</i>	Seita.2G183500	27.34	4.86	48.02	19.77
<i>SiCrRLK1L7</i>	Seita.3G041700	27.86	4.64	47.74	19.76
<i>SiCrRLK1L8</i>	Seita.3G172100	28.57	5.14	46.40	19.89
<i>SiCrRLK1L9</i>	Seita.3G172200	26.85	4.49	49.32	19.33
<i>SiCrRLK1L10</i>	Seita.3G172300	27.69	5.02	48.69	18.60
<i>SiCrRLK1L11</i>	Seita.3G172500	27.88	4.82	48.22	19.08
<i>SiCrRLK1L12</i>	Seita.3G172800	26.97	5.04	48.37	19.62
<i>SiCrRLK1L13</i>	Seita.3G288700	23.94	5.84	49.71	20.50
<i>SiCrRLK1L14</i>	Seita.3G289000	27.33	4.61	47.75	20.31
<i>SiCrRLK1L15</i>	Seita.3G289100	26.06	5.45	48.80	19.68
<i>SiCrRLK1L16</i>	Seita.3G330900	27.04	4.98	48.36	19.62
<i>SiCrRLK1L17</i>	Seita.3G331000	26.29	5.26	49.18	19.28
<i>SiCrRLK1L18</i>	Seita.3G338700	26.54	5.41	48.41	19.64
<i>SiCrRLK1L19</i>	Seita.5G110400	27.15	4.29	48.38	20.19
<i>SiCrRLK1L20</i>	Seita.5G130300	27.73	5.57	47.16	19.54
<i>SiCrRLK1L21</i>	Seita.5G470500	27.89	4.03	47.93	20.15
<i>SiCrRLK1L22</i>	Seita.7G240600	25.53	5.06	48.24	21.18
<i>SiCrRLK1L23</i>	Seita.7G272000	28.23	4.78	48.21	18.78
<i>SiCrRLK1L24</i>	Seita.7G334000	29.11	2.81	47.08	21.00
<i>SiCrRLK1L25</i>	Seita.8G001700	29.77	3.88	47.14	19.20
<i>SiCrRLK1L26</i>	Seita.8G244300	28.72	5.35	45.17	20.76
<i>SiCrRLK1L27</i>	Seita.9G414400	25.00	6.00	48.30	20.70
<i>SiCrRLK1L28</i>	Seita.9G447800	23.64	0.00	57.13	19.24
<i>SiCrRLK1L29</i>	Seita.9G559900	25.44	4.30	50.99	19.28

## 2.6 SiCrRLK1L基因家族启动子的顺式作用元件

为进一步探索*SiCrRLK1L*基因表达的调控因子, 对各基因的启动子顺式作用元件进行分析, 结果(图8)表明, 29个*SiCrRLK1L*基因启动子中都含有与光响应有关的元件, 并且*SiCrRLK1L*家族中该元件总数最多, 共323个, 推测该家族基因的表达可能

受光诱导。*SiCrRLK1L*基因家族中存在多种激素响应元件, 其中, 数量最多的是茉莉酸甲酯和脱落酸响应元件, 表明*SiCrRLK1L*基因的表达调控可能受植物激素影响; 逆境响应元件总体数量偏少, 其种类包括厌氧/无氧响应元件、干旱胁迫响应元件以及低温胁迫响应元件, 推测*SiCrRLK1L*基因有可能响应干旱胁迫等非生物胁迫信号。

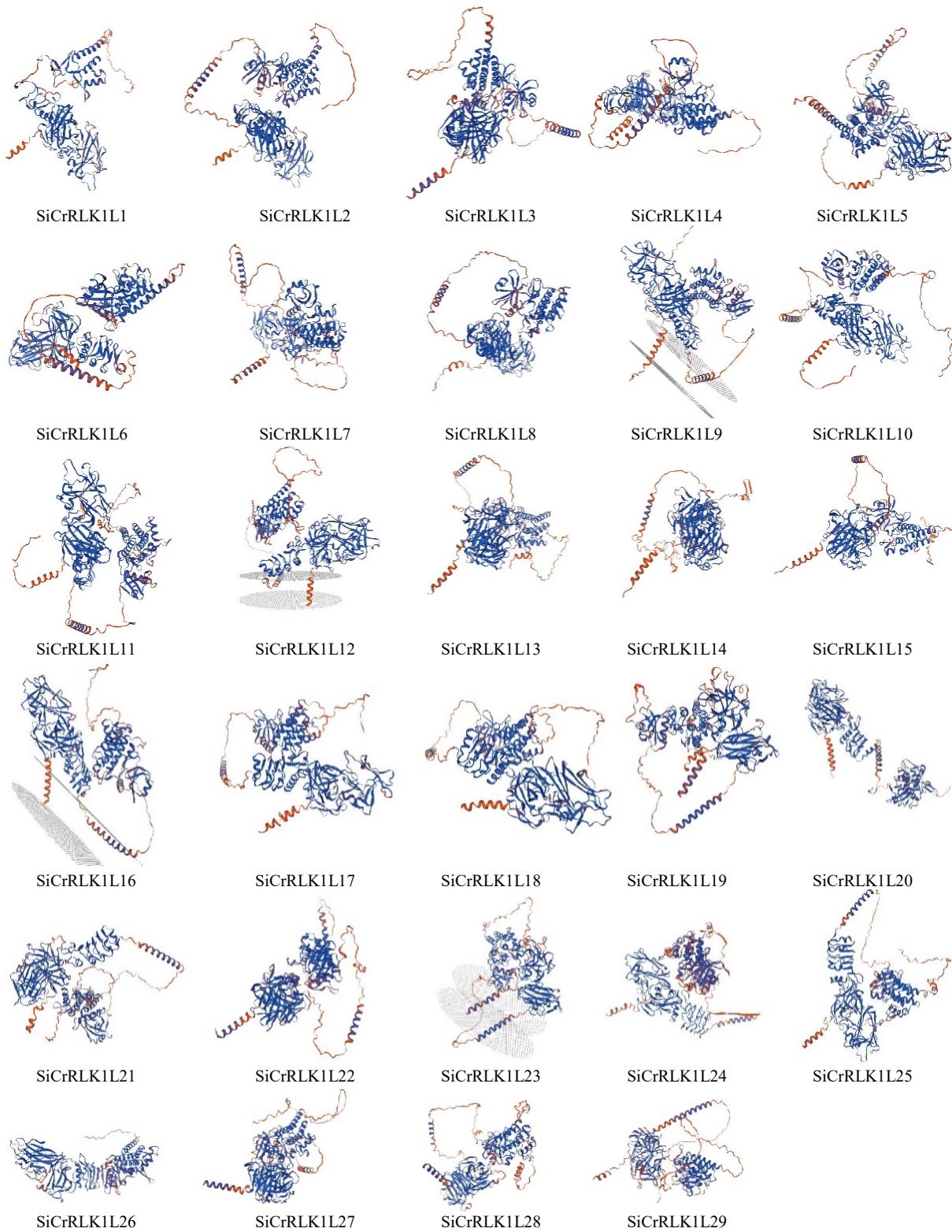


图7 SiCrRLK1L蛋白三维结构

Fig. 7 Three-dimensional structure of SiCrRLK1L proteins

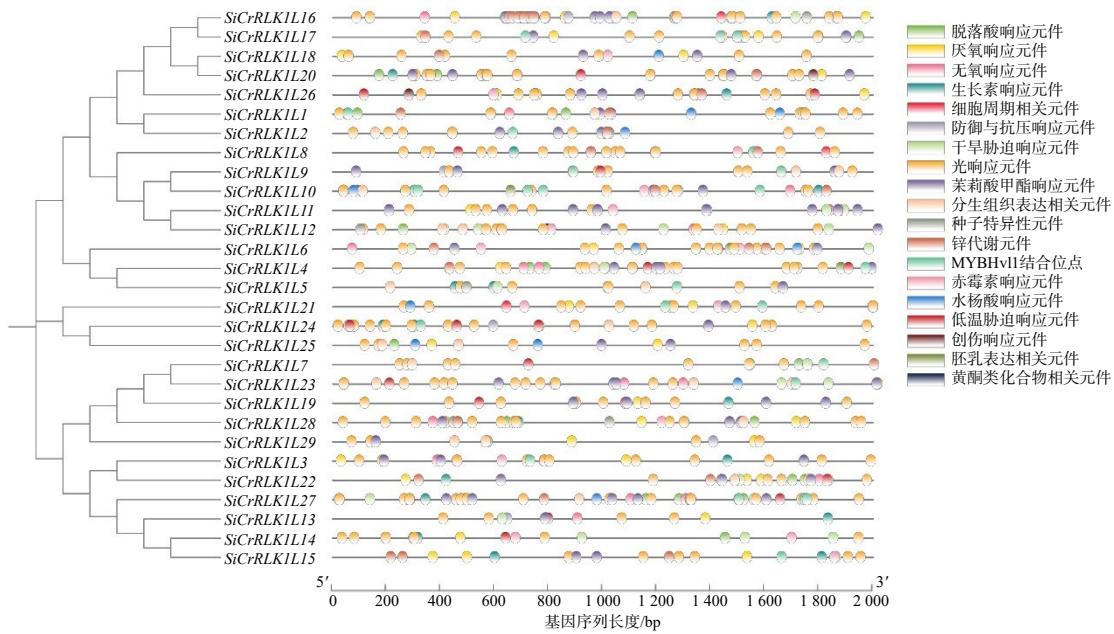


图8 SiCrRLK1L启动子的顺式作用元件

Fig. 8 Cis-acting elements of *SiCrRLK1L* promoters

## 2.7 SiCrRLK1L家族基因的表达模式

基因表达热图分析结果(图9)表明,一部分

*SiCrRLK1L*基因具有组织表达特异性,在根部表达量较高,并且一部分*SiCrRLK1L*基因表达水平受非

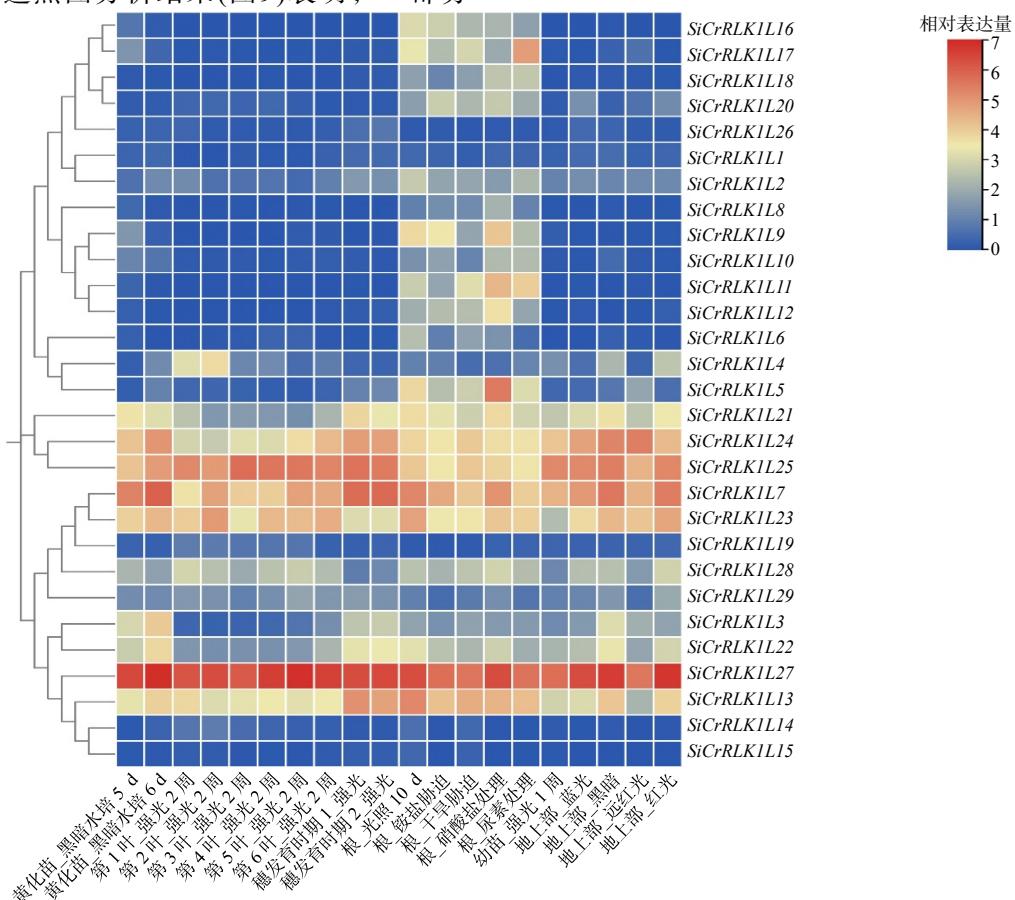


图9 SiCrRLK1L基因表达热图

Fig. 9 The gene expression heatmap of *SiCrRLK1L*

生物胁迫的影响较大；另一部分 $SiCrRLK1L$ 在各组织中的表达量都极低甚至不表达；而 $SiCrRLK1L27$ 在多个组织、多种胁迫下的表达量均较高，推测其可能在植物生长发育中发挥作用。相较于地上部组织，各基因在根组织中的表达量较高，各种胁迫处理会影响其表达量，硝酸盐可能对促进 $SiCrRLK1L$ 在根中的表达具有较好效果。在谷子地上部组织中，穗发育期该家族基因表达量较高。光处理会影响该家族基因在植株中的表达水平，红光或黑暗条件下该家族的基因表达量更高。

## 2.8 非生物胁迫对 $SiCrRLK1L$ 家族基因表达模式的影响

为探究 $SiCrRLK1L$ 基因参与非生物逆境胁迫响应的情况，根据 $SiCrRLK1L$ 基因在各时期、各组织及各种处理下的表达情况，筛选出表达水平高并且

与非生物逆境胁迫密切相关的4个 $SiCrRLK1L$ 基因，分别为 $SiCrRLK1L7$ (Seita.3G041700)、 $SiCrRLK1L23$ (Seita.7G272000)、 $SiCrRLK1L25$ (Seita.8G001700)和 $SiCrRLK1L27$ (Seita.9G414400)，并对其进行实时荧光定量表达分析。结果(图10)表明， $SiCrRLK1L7$ 、 $SiCrRLK1L23$ 、 $SiCrRLK1L25$ 和 $SiCrRLK1L27$ 在受到PEG胁迫0.5 h时相对表达量升高，在胁迫3.0 h时相对表达量明显升高； $SiCrRLK1L7$ 、 $SiCrRLK1L23$ 和 $SiCrRLK1L27$ 在低温胁迫诱导0.5 h时相对表达量升高，而在6.0 h时相对表达量下降。在高温胁迫下， $SiCrRLK1L7$ 在胁迫6.0 h时相对表达量明显升高， $SiCrRLK1L23$ 在胁迫0.5 h时相对表达量升高， $SiCrRLK1L25$ 在胁迫诱导3.0 h时相对表达量升高，而 $SiCrRLK1L27$ 在胁迫12.0 h时相对表达量才明显升高。

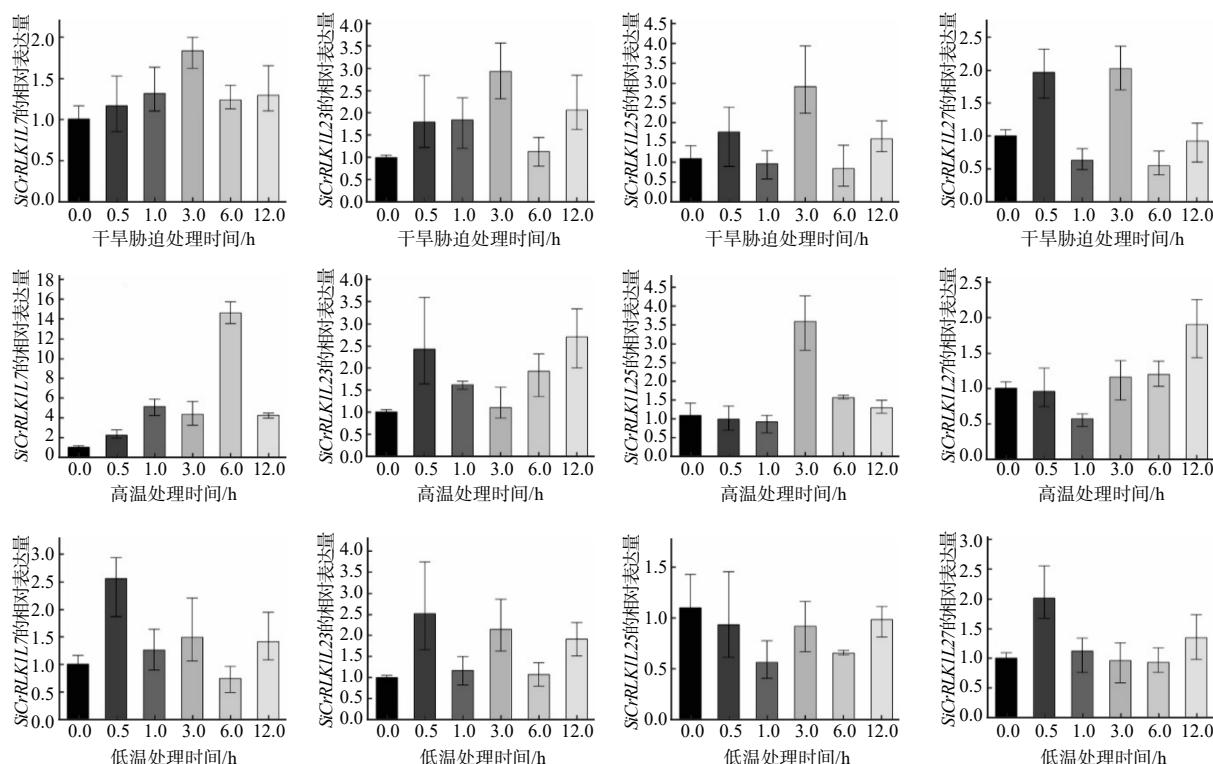


图10  $SiCrRLK1L$ 基因家族成员在干旱、低温和高温处理下的表达模式

Fig. 10 Expression patterns of  $SiCrRLK1L$  gene family under drought, low-temperature and high-temperature treatments in *Setaria italica*

## 3 讨论

$CrRLK1L$ 在植物的生长、发育和免疫过程中发挥重要作用<sup>[22-24]</sup>，目前已分别在水稻、拟南芥、大豆、小麦、番茄中鉴定到16、17、38、42和24个 $CrRLK1L$ 基因<sup>[25-29]</sup>，但关于谷子 $CrRLK1L$ 家族基因的报道较少。本研究在谷子中共鉴定得到29个

$CrRLK1L$ 家族成员，比水稻和拟南芥的 $CrRLK1L$ 家族成员数量多，可能是基因间存在复制现象并形成旁系同源基因所致。系统进化分析结果表明谷子与水稻聚类在同一小分支，说明单子叶植物间亲缘关系更近。

目前，水稻和拟南芥中许多 $CrRLK1L$ 的功能已被

鉴定,为探索谷子中该基因家族的生物学功能提供了研究基础。拟南芥中*FER*、*ANX1*和*ANX2*在花粉管生长和识别方面发挥作用,*FER*在花粉管生长过程中发挥抑制作用,有助于其受精的进行;*ANX1*和*ANX2*则有助于花粉管的极性伸长,避免其过早破裂<sup>[30]</sup>。水稻中*DIS1*和*DIS2*会影响植物花粉数量和质量,并导致雄性败育<sup>[31]</sup>。金鱼草*AmRLK*过表达后会抑制细胞伸长和极性生长。有研究表明,*CrRLK1L*家族在抵御病原微生物的天然免疫反应中发挥功能<sup>[32]</sup>。

谷子*CrRLK1L*家族成员含茉莉酸甲酯、脱落酸、生长素、赤霉素和水杨酸相关元件较多。另外,顺式作用元件分析预测结果显示,*SiCrRLK1L*家族基因中都含有与光响应相关的元件,说明该家族基因的表达可能受光诱导。研究表明,*CrRLK1L*家族成员在不同物种中都起着调控细胞伸长的作用,而像*FER*、*THE1*等基因均不同程度地受生长素、赤霉素等激素诱导。*CrRLK1L*家族成员还含有与干旱、低温等非生物胁迫响应相关的元件。由此推测,*CrRLK1L*家族可能通过光照和激素响应来调控植物生长并参与植物非生物胁迫响应。

通过探究*SiCrRLK1L*基因参与非生物逆境胁迫响应的表达模式发现,*SiCrRLK1L7*、*SiCrRLK1L23*、*SiCrRLK1L25*、*SiCrRLK1L27*这4个*SiCrRLK1L*基因的表达量在干旱胁迫0.5 h和3.0 h时都有所增加,这暗示在植物抵御干旱的过程中*SiCrRLK1L*基因可能发挥重要作用;*SiCrRLK1L*基因在植物不同部位表达趋势不同,后续将对谷子中*SiCrRLK1L*重要基因在植物不同部位的表达进行荧光定量验证,以探究其在植物不同组织部位中的功能。在高温和低温处理下,*SiCrRLK1L*基因的表达量趋势各不相同,可能是因为*SiCrRLK1L*基因在植物应对温度变化中发挥不同作用。研究表明,在拟南芥中,*FER*突变体*fer-4*对干旱、低温和高温非生物胁迫均产生响应,*FER*是干旱胁迫的负调控因子,是低温和高温胁迫响应的正调控因子<sup>[33]</sup>。*fer*突变体在非生物胁迫下存活率降低<sup>[14]</sup>。综上,本研究推测*CrRLK1L*家族可能在植物抵御非生物胁迫中发挥功能。

## 4 结论

本研究共鉴定出29个谷子*CrRLK1L*基因家族成员;该家族成员蛋白二级结构中无规卷曲的占比最

大,蛋白结构较稳定,蛋白质三维结构较保守。顺式作用元件分析结果表明,*CrRLK1L*基因家族中光响应元件数量最多,推测其与光调控密切相关;该家族成员还包含响应茉莉酸甲酯和脱落酸的相关元件,干旱、低温等非生物胁迫响应相关元件占比也较大。由此推测*CrRLK1L*家族可能通过光照和激素响应来调控植物生长并参与植物非生物胁迫响应。

基因表达热图分析结果显示,一部分*SiCrRLK1L*基因具有组织表达特异性,在穗部和根部的表达量较高;*SiCrRLK1L*基因表达水平受逆境胁迫的影响较大;光处理也会影响该家族基因的表达水平,黑暗或红光下该基因家族的表达量更高。对*SiCrRLK1L*家族基因表达模式受非生物胁迫影响的分析结果表明,*SiCrRLK1L7*、*SiCrRLK1L23*、*SiCrRLK1L25*、*SiCrRLK1L27*均受到干旱、低温和高温非生物胁迫诱导,说明这4个基因可能在谷子抵御胁迫中发挥作用。

## 参考文献:

- [1] GALINDO-TRIGO S, GRAY J E, SMITH L M. Conserved roles of CrRLK1L receptor-like kinases in cell expansion and reproduction from algae to angiosperms[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1269.
- [2] JOHNSON K L, INGRAM G C. Sending the right signals: regulating receptor kinase activity[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8(6): 648–656.
- [3] SHIU S H, BLEECKER A B. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(2): 530–543.
- [4] NISSEN K S, WILLATS W G T, MALINOVSKY F G. Understanding CrRLK1L function: cell walls and growth control[J]. *Trends in Plant Science*, 2016, 21(6): 516–527.
- [5] GUO H Q, LI L, YE H X, et al. Three related receptor-like kinases are required for optimal cell elongation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PNAS*, 2009, 106(18): 7648–7653.
- [6] MIYAZAKI S, MURATA T, SAKURAI-OZATO N, et al. *ANXURI* and 2, sister genes to *FERONIA/SIRENE* are male factors for coordinated fertilization[J]. *Current Biology*, 2009, 19(15): 1327–1331.
- [7] BOISSON-DERNIER A, ROY S, KRITSAS K, et al. Disruption of the pollen-expressed *FERONIA* homologs *ANXURI* and *ANXUR2* triggers pollen tube discharge[J]. *Development*, 2009, 136(19): 3279–3288.
- [8] JUAN-MIGUEL ESCOBAR-RESTREPO N H. The *FERONIA* receptor-like kinase mediates male-female interactions during pollen tube reception[J]. *Science*,

- 2007, 317(5838): 656–660.
- [9] KEINATH N F, KIERSZNIOWSKA S, LOREK J, et al. PAMP(pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(50): 39140–39149.
- [10] LIU L T, ZHENG C H, KUANG B, et al. Receptor-like kinase RUPO interacts with potassium transporters to regulate pollen tube growth and integrity in rice[J]. *PLoS Genetics*, 2016, 12(7): e1006085.
- [11] DONG HYE SEO M Y R. Roles of four *Arabidopsis* U-box E3 ubiquitin ligases in negative regulation of abscisic acid-mediated drought stress responses[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(1): 556–568.
- [12] LIAO H D, TANG R J, ZHANG X, et al. FERONIA receptor kinase at the crossroads of hormone signaling and stress responses[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2017, 58(7): 1143–1150.
- [13] JI D C, CHEN T, ZHANG Z Q, et al. Versatile roles of the receptor-like kinase FERONIA in plant growth, development and host-pathogen interaction[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 7881.
- [14] CHEN J, YU F, LIU Y, et al. FERONIA interacts with ABI2-type phosphatases to facilitate signaling cross-talk between abscisic acid and RALF peptide in *Arabidopsis*[J]. *PNAS* 2016, 113(37): E5519–E5527.
- [15] KUO S M, CHEN Y R, YIN S Y, et al. *Waxy* allele diversification in foxtail millet(*Setaria italica*) landraces of Taiwan[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0210025.
- [16] 武懿茂, 樊武哲, 李红英, 等. 谷子抗旱相关蛋白激酶基因家族鉴定及表达分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2020, 40(1): 1–10.
- [17] 杨长耀, 陈岳文, 杨俊枫, 等. 柑橘扩张蛋白(EXP)基因家族的鉴定及其在橙类汁胞膨大中的表达模式[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(5): 27–37.
- [18] 马鑫磊, 许瑞琪, 索晓曼, 等. 谷子III型PRX基因家族全基因组鉴定及干旱胁迫下表达分析[J]. 作物学报, 2022, 48(10): 2517–2532.
- [19] 杨晟, 甘锦鑫, 周涛, 等. 千穗谷GRF转录因子家族的全基因组鉴定及其对赤霉素的响应模式分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2025, 51(5): 10–18.
- [20] YANG R, CHEN M, SUN J C, et al. Genome-wide analysis of LIM family genes in foxtail millet(*Setaria italica* L.) and characterization of the role of SiWLIM2b in drought tolerance[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1303.
- [21] ZHANG D W, YE H X, GUO H Q, et al. Transcription factor HAT1 is phosphorylated by BIN2 kinase and mediates brassinosteroid repressed gene expression in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2014, 77(1): 59–70.
- [22] FENG W, KITA D, PEAUCELLE A, et al. The FERONIA receptor kinase maintains cell-wall integrity during salt stress through Ca<sup>2+</sup> signaling[J]. *Current Biology*, 2018, 28(5): 666–675.e5.
- [23] DONG Q K, ZHANG Z W, LIU Y T, et al. FERONIA regulates auxin-mediated lateral root development and primary root gravitropism[J]. *FEBS Letters*, 2019, 593(1): 97–106.
- [24] FRANCK C M, WESTERMANN J, BOISSON-DERNIER A. Plant malectin-like receptor kinases: from cell wall integrity to immunity and beyond[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2018, 69: 301–328.
- [25] MA W P, LIU X, CHEN K, et al. Genome-wide re-identification and analysis of CrRLK1Ls in tomato[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4): 3142.
- [26] GAWANDE N D, SANKARANARAYANAN S. Genome wide characterization and expression analysis of *CrRLK1L* gene family in wheat unravels their roles in development and stress-specific responses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1345774.
- [27] NGUYEN Q N, LEE Y S, CHO L H, et al. Genome-wide identification and analysis of *Catharanthus roseus* RLK1-like kinases in rice[J]. *Planta*, 2015, 241(3): 603–613.
- [28] LINDNER H, MÜLLER L M, BOISSON-DERNIER A, et al. CrRLK1L receptor-like kinases: not just another brick in the wall[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2012, 15(6): 659–669.
- [29] WANG Z Q, YU T F, SUN G Z, et al. Genome-wide analysis of the *Catharanthus roseus* RLK1-like in soybean and GmCrRLK1L20 responds to drought and salt stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 614909.
- [30] HÉMATY K, HÖFTE H. Novel receptor kinases involved in growth regulation[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(3): 321–328.
- [31] BENSCHOP J J, MOHAMMED S, O'FLAHERTY M, et al. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(7): 1198–1214.
- [32] HUCK N, MOORE J M, FEDERER M, et al. The *Arabidopsis* mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception[J]. *Development*, 2003, 130(10): 2149–2159.
- [33] CHEN X X, DING Y L, YANG Y Q, et al. Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 53–78.

责任编辑: 伍锦花

英文编辑: 张承平