

# 马铃薯通用应激蛋白 *StUSP* 基因家族的 鉴定及逆境表达模式分析

王泽民<sup>1,2</sup>, 田 渺<sup>2</sup>, 侯乐乐<sup>2</sup>, 晋 昕<sup>1,2</sup>,  
张国栋<sup>3</sup>, 杨江伟<sup>1,2</sup>, 张 宁<sup>1,2</sup>, 司怀军<sup>1,2</sup>

(1. 甘肃农业大学干旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学生命科学技术学院,  
甘肃 兰州 730070; 3. 忻州师范学院生物系, 山西 忻州 034099)

**摘 要:**在全基因组和转录组水平系统鉴定马铃薯 *USP* 通用应激蛋白基因家族, 并对该家族成员的基本特征及其在不同逆境胁迫下的表达模式进行分析。同时以马铃薯干旱耐受型品种‘陇薯 10 号’(L)和干旱敏感型品种‘大西洋’(D)为试验材料, 利用高通量测序全面分析 *StUSP* 家族成员在干旱胁迫下的表达特性, 筛选干旱胁迫关键差异表达基因。结果表明:马铃薯基因组中共有 42 个基因编码含有 USP 结构域的蛋白质, 在 11 条染色体上不对称分布, 且主要分布在 1~6 号染色体上。绝大多数 *StUSPs* 含有多个内含子。胁迫表达分析显示 *StUSPs* 能够响应多种非生物胁迫, 且在干旱耐受性不同的马铃薯品种中差异表达。同时, 利用 qRT-PCR 分析了 12 个成员干旱胁迫下表达模式, 除 *StUSP12*、*StUSP22* 下调表达外, 其余 10 个基因均正响应干旱胁迫。

**关键词:**马铃薯; *USP* 基因家族; 鉴定; 逆境; 干旱胁迫; 表达模式

**中图分类号:**S532; Q945.78 **文献标志码:**A

## Identification and stress response analysis of universal stress proteins *StUSP* gene family in potato

WANG Zemin<sup>1,2</sup>, TIAN Miao<sup>2</sup>, HOU Lele<sup>2</sup>, JIN Xin<sup>1,2</sup>, ZHANG Guodong<sup>3</sup>,  
YANG Jiangwei<sup>1,2</sup>, ZHANG Ning<sup>1,2</sup>, SI Huaijun<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Aridland Crop Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;  
2. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;  
3. Department of Biology, Xinzhou Teachers University, Xinzhou, Shanxi 034099, China)

**Abstract:** In this study, the potato *USP* genes were examined and identified at the genomic and transcriptome levels, as well as the fundamental characteristics of the members of this gene family. High-throughput sequencing was used to screen key differentially expressed genes under drought stress and conduct a comprehensive analysis of the expression characteristics of *StUSP* family members under drought stress using the drought-tolerant cultivar ‘Long 10’ (L) and the drought-sensitive cultivar ‘Atlantic’ (D) as experimental materials. The results revealed that there were 42 genes encoding proteins containing USP domains in potato. These genes were asymmetrically distributed on 11 chromosomes, with most of them located on chromosomes 1 to 6. And multiple introns were present in most *StUSPs*. According to expression analysis, *StUSPs* might respond to a variety of abiotic stresses and were differentially expressed in potato germplasm with different drought tolerance. At the same time, qRT-PCR was used to analyze the expression patterns of 12 members under drought stress. Except *StUSP12* and *StUSP22* were downregulated, the other 10 genes were all positively responding to drought stress.

**Keywords:** potato; *USP* gene family; identification; adversity; drought stress; expression mode

收稿日期:2023-04-24

修回日期:2023-08-30

**基金项目:**甘肃农业大学科技创新基金-公招博士科研启动基金(GAU-KYQD-2019-06);甘肃省科技厅青年科技基金(22JR5RA882, 21JR7RA844);国家自然科学基金(32260518);干旱生境作物学国家重点实验室开放基金(GSCS-2022-03)

**作者简介:**王泽民(1988-),男,甘肃武威人,博士,讲师,主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail:wangzem@gsau.edu.cn

**通信作者:**司怀军(1971-),男,甘肃兰州人,教授,博士生导师,主要从事马铃薯遗传育种研究。E-mail:hjsi@gsau.edu.cn

非生物胁迫是严重制约经济作物产量和质量的因素之一。植物固着生长的特性决定了其无法主动规避各类胁迫,因此需要有快速、高效的非生物胁迫响应机制来应对干旱、盐、极端温度和氧化胁迫等,以提高自身生存能力。为此,植物进化形成了一套复杂的调控机制,其中包括受体感知信号,通过激活应激反应基因将外部信号转导到下游效应器,这些效应蛋白介导了一系列形态和生理改变,帮助植物更好地适应胁迫环境。通用应激蛋白(Universal stress proteins, USP)家族即上述效应蛋白之一,该家族成员有包含 130~160 个氨基酸残基的保守结构域、蛋白激酶样结构域(或 PK 样结构域)、<sup>tr</sup>PK 样结构域或 U-box 结构域等<sup>[1-2]</sup>。USP 家族最早在大肠杆菌(*Escherichia coli* K-12 strain W3110)中被发现,后表明其广泛存在于细菌、古生菌、真菌、原生生物、植物和动物中<sup>[2-4]</sup>,且与所有的胁迫响应均相关,可以参与抵抗多种非生物与生物胁迫<sup>[2,5-7]</sup>。

植物对非生物胁迫反应的本质是一系列的生理和生理适应,主要依赖于胁迫相关基因的调控表达<sup>[8]</sup>。研究发现,在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中通用胁迫蛋白 AtUSP 同时定位于细胞核和细胞质,其作为 RNA 分子伴侣显著增强了植株的耐冷性<sup>[9]</sup>。进一步研究显示,在冷休克条件下 AtUSP 可作为 RNA 分子伴侣影响 RNA 代谢而发挥作用,如导致 RNA 的错误折叠和二级结构的改变<sup>[10]</sup>。拟南芥 USP 蛋白 HRU1 通过与诱导活性氧 ROS 产生的蛋白质——GTPase ROP2 和 NADPH 氧化酶 RbohD 相互作用,在低氧胁迫下调节 ROS 水平维持内稳态<sup>[11]</sup>。丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.) *SmUSPs* 的表达受茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)以及脱水胁迫的上调诱导<sup>[12]</sup>。在棉花(*Gossypium herbaceum* L.)中,*GhUSP1* 和 *GhUSP2* 被证实能够响应盐胁迫<sup>[13]</sup>。番茄(*Solanum lycopersicum* L.)中 USP 蛋白 SIRd2 是一种在植物中形成同源二聚体的 ATP 结合蛋白, SICIPK6 在细胞质中和 SIRd2 相互作用形成复合体,进而磷酸化 SIRd2;与野生型番茄相比,在 *SIRd2* 过表达植株中瞬时表达 *SICIPK6* 可显著减少 ROS 积累。可见, SIRd2 作为 SICIPK6 的相互作用分子和磷酸化靶标,可在功能上调节 SICIPK6 介导的 ROS 生成,从而调节植株的胁迫响应<sup>[14]</sup>。

生物钟与植物适应日常环境波动以及能量的生产和消耗能力有关。研究人员通过转录组分析,从 7 个绿色植物属(*Glycine*, *Hordeum*, *Manihot*, *Medicago*, *Oryza*, *Pinus* and *Triticum*)中鉴定出了 32 个干

旱胁迫响应 *USPs*<sup>[15]</sup>。有报道称拟南芥通用应激蛋白(USP, At3g53990)在核时钟基因的昼夜调节中起重要作用,拟南芥 USP 敲除突变系表现出 CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1(CCA1)昼夜节律振幅显著降低,而 USP 在其自身启动子控制下的表达能够恢复 CCA1 基因的昼夜节律,表明 USP 可通过调节拟南芥中心时钟基因 CCA1 和 TOC1 的表达而调控昼夜节律<sup>[6]</sup>。同时,两个拟南芥 USP (At3g62550 和 At3g53990)被证实在干旱条件下表达量显著增强<sup>[16]</sup>。过表达 *AtUSP* (At3g53990)显著增强了转基因植株对氧化胁迫和高温胁迫的耐受性,而在 *Atusp* (SALK\_146059)突变系中则观察到对上述胁迫表现出高敏感性<sup>[17]</sup>。*AtUSP* (At3g53390) 基因的表达量在盐胁迫、渗透胁迫和机械伤害下均显著上调表达<sup>[15]</sup>,表明植物 *USPs* 可能在多重胁迫条件下发挥调节功能。

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是世界上仅次于水稻和小麦的第三大非谷类主要作物,也是我国第四大主粮<sup>[18-19]</sup>。由于气候变化,马铃薯的生产种植环节频繁受各种生物和非生物胁迫的影响。因此,逆境胁迫响应基因的挖掘与应用在马铃薯抗逆分子育种方面前景巨大。USP 蛋白家族在植物非生物胁迫响应中的重要作用已在多种植物中得到验证,但其在马铃薯中的具体功能尚未被深入研究。本研究在全基因组水平挖掘分析了马铃薯 USP 基因家族的数量、结构、染色体位置和系统发育等;为探究其在马铃薯胁迫响应中的重要作用,进一步解析 *StUSPs* 基因在不同激素处理和胁迫条件下的表达差异,并通过高通量测序对干旱耐受型和干旱敏感型马铃薯品种中 *StUSPs* 的表达差异进行分析,为研究马铃薯 *StUSPs* 基因的功能提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试马铃薯品种为‘陇薯 10 号’(L, 干旱耐受型)和‘大西洋’(D, 干旱敏感型)<sup>[20]</sup>。将大小一致的马铃薯原种种植在由营养土、珍珠岩、蛭石(比例 3 : 1 : 1)构成基质的花盆(盆高 30 cm, 内径 20 cm)中,置于温室中培养,自然光照射,温度(25±2)℃。发芽后,用完全营养液给植株浇水、施肥,每周 1 次。温室继续培养 25 d 后,选择生长整齐一致的植物材料进行干旱处理。在最后一次浇水日,不浇施完全营养液,并持续干旱处理 5 d。收取顶部 3~5 片叶,液氮速冻后-80℃保存,用于转录组测序和实时荧光定量实验(qRT-PCR)。试验设 3 个重复,每个重

复 10 株。

选取健壮且生长一致的马铃薯‘大西洋’盆栽植株进行干旱胁迫处理。设置 4 个取样点,其中对照组(CK)的土壤含水量保持在 75%~80%,干旱胁迫组分为 D1(土壤含水量 55%~60%)、D2(土壤含水量 35%~40%)和 D3(土壤含水量 15%~20%)共 3 组,使用 TDR-300 传感器(Spectrum R, Aurora, Illinois, USA)每天 2 次(10:00 和 16:00)监测土壤含水量。处理完成后,采集植株顶部第 3~5 片叶,置于液氮中速冻后-80℃保存备用,用于 qRT-PCR 分析马铃薯 *StUSP* 在干旱胁迫下的表达模式,试验设 3 次生物学重复。

## 1.2 试验设计

**1.2.1 基因家族鉴定及进化分析** 利用马铃薯数据库 PGSC(<http://spudb.uga.edu/>)下载 *StUSP* 相关数据,并构建本地数据库。同时,在 NCBI 中下载已注册的拟南芥 *USP* 基因,结合 Pfam 蛋白家族数据库(<http://xfam.rog/>)中的隐马尔科夫模型(HMM,  $e\text{-value} < 0.01$ ; PF00582),利用 BLAST( $e\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$ )在全基因组水平比对鉴定马铃薯 *USP* 家族候选成员。将搜索到的候选蛋白提交到 NCBI-CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb>)进行结构域比对分析,搜索保守结构域,最终确定马铃薯 *USP* 家族成员。

**1.2.2 基因结构和氨基酸保守结构分析** 基于文献方法,对马铃薯 *StUSPs* 基因结构进行分析<sup>[21]</sup>。通过 MEGA7.0 软件中的 Align By Muscle 程序对拟南芥 *AtUSP* 和筛选鉴定到的马铃薯 *StUSP* 家族成员的蛋白序列进行多序列比对,并用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,校验参数 Bootstrap 设置为 1 000。

**1.2.3 家族成员染色体位置分析** 参照王泽民等<sup>[21]</sup>方法从马铃薯基因组注释文件 DM\_1-3\_516\_R44\_potato.v6.1.hc\_gene\_models([http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/dm\\_v6\\_1\\_download.shtml](http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/dm_v6_1_download.shtml))中提取 *StUSP* 家族成员在染色体上的位置信息。运用 TBtools(v1.0986)软件绘制马铃薯 *USP* 基因在染色体上的分布图并对其进行共线性分析。

**1.2.4 家族成员启动子区顺式作用元件分析** 通过马铃薯基因组数据库(<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc>)提取马铃薯 *StUSPs* 基因启动子区域序列信息,将序列信息提交到 PlantCARE 数据库(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/>),搜索分析转录起始位点(ATG)上游 1.0 kb 区域内的顺式作用调控元件。

**1.2.5 马铃薯 *USP* 家族表达分析** 从马铃薯数据库 PGSC(<http://spudb.uga.edu/>)中分别获取马铃薯 *StUSPs* 基因在不同胁迫条件下的 RNA-Seq 数据,对马铃薯 *StUSPs* 在非生物胁迫、生物胁迫及激素处理下的表达模式进行分析。

利用转录组测序和 qRT-PCR 对两个抗旱性不同品种的马铃薯 *StUSPs* 进行干旱胁迫响应分析。测序方法及数据处理如下:以马铃薯 mRNA 为模板,用 6 碱基随机引物和逆转录酶合成 cDNA 第一链和第二链。文库构建完成后,采用 PCR 扩增进行文库片段富集,使文库大小保持为 450 bp;通过 Agilent 2100 Bioanalyzer 进行文库质检。将含有不同 Index 序列的文库根据有效浓度和所需数据量按比例进行混合,然后将混合文库浓度稀释为 2 nM,通过碱变性获得单链文库。基于 Illumina HiSeq 测序平台,采用第二代测序技术(Next-generation sequencing, NGS)对文库进行双末端(Paired-end, PE)测序(派森诺,南京)。对每个样品上机测序后生成 FASTQ 的原始数据分别进行统计,包括碱基识别准确率 99%以上碱基所占百分比的 Q20 和准确率 99.9%以上的 Q30 等指标。数据过滤:采用 Cutadapt 去除 3 端接头序列;去除平均质量分数低于 Q20 的 Reads。使用软件 HISAT2(<http://ceb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)将过滤后的 Reads 比对到马铃薯参考基因组(DM\_1-3\_516\_R44\_potato\_genome\_assembly.v6.1.fa)计算相关基因表达量。

为进一步分析干旱胁迫下马铃薯 *StUSPs* 表达模式,采用 SYBR Green qPCR KIT(全式金,中国)试剂盒,使用 Light Cycler 96 荧光定量 PCR 仪(罗氏,瑞士)进行 qRT-PCR。反应总体积 20  $\mu\text{L}$ ,其中 10  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SYBR Green Premix, 0.8  $\mu\text{L}$  引物(正向和反向引物), 1  $\mu\text{L}$  (100 ng) cDNA 模板及 8.2  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。反应程序如下:94℃, 30 s, 随后 94℃, 5 s 和 60℃, 30 s, 共 40 个循环。试验设 3 个生物重复和 3 个技术重复,内参基因为 *StEF1 $\alpha$* ,并用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 法计算基因的相对表达量。

## 1.3 数据处理

采用 SPSS 20.0 进行显著性差异分析。试验分 3 个生物重复和 3 个技术重复,数据为共计 3 个重复的平均值 $\pm$ SE。

# 2 结果与分析

## 2.1 马铃薯 *StUSP* 家族的鉴定及进化分析

利用 HMM( $e\text{-value} < 0.01$ )、BLAST( $e\text{-value} < 1 \times 10^{-5}$ )比对筛选和 CDD 结构域比对相结合的方法,



在马铃薯基因组中共鉴定出 42 个 *StUSP* 成员。除 6 个成员 (*StUSP20*、*StUSP22*、*StUSP30*、*StUSP31*、*StUSP32*、*StUSP41*) 外,其余 *StUSPs* 的登录号均可在 GenBank 中获得。马铃薯的 42 个 *StUSPs* 基因长度间存在较大差异,从 474 bp (*StUSP3* 和 *StUSP25*) 到 3 150 bp (*StUSP40*) 不等 (表 1)。为研究马铃薯 USP 家族的进化关系,将拟南芥 (26 个) 和马铃薯 (42 个) USP 家族成员构建系统进化树 (图 1, 见 38 页), 42 个 *StUSP* 分别属于 Group A ~ E 5 个亚族。其中, B 组成员最多 (13 个), E 组最少 (5 个)。

表 1 马铃薯 *USP* 家族成员特征  
Table 1 Features of *USP* gene family in *S. tuberosome*

| 基因号<br>Gene ID     | 基因名<br>Gene symbol | 分组<br>Group | 染色体位置<br>Chromosome | 起始<br>Start | 终止<br>End | 基因长度<br>Gene<br>length/bp | 蛋白长度<br>Protein<br>length/ aa | NCBI 收录号<br>NCBI accession |
|--------------------|--------------------|-------------|---------------------|-------------|-----------|---------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Soltu.DM.01G017420 | <i>StUSP1</i>      | D           | 01                  | 44489166    | 44491869  | 540                       | 179                           | XP_006337956.1             |
| Soltu.DM.01G019780 | <i>StUSP2</i>      | A           | 01                  | 53967414    | 53970008  | 492                       | 163                           | XP_006358203.1             |
| Soltu.DM.01G021810 | <i>StUSP3</i>      | D           | 01                  | 59495091    | 59494261  | 474                       | 157                           | XP_006342804.1             |
| Soltu.DM.01G026130 | <i>StUSP4</i>      | B           | 01                  | 65754162    | 65749604  | 2154                      | 717                           | XP_006345367.1             |
| Soltu.DM.01G040130 | <i>StUSP5</i>      | D           | 01                  | 78757303    | 78759305  | 501                       | 166                           | XP_006344751.1             |
| Soltu.DM.01G049500 | <i>StUSP6</i>      | A           | 01                  | 86330862    | 86328110  | 534                       | 177                           | XP_006365114.1             |
| Soltu.DM.02G018930 | <i>StUSP7</i>      | A           | 02                  | 33219573    | 33224897  | 744                       | 247                           | XP_006347162.1             |
| Soltu.DM.03G002430 | <i>StUSP8</i>      | A           | 03                  | 2330078     | 2334900   | 777                       | 258                           | XP_006343270.1             |
| Soltu.DM.03G025970 | <i>StUSP9</i>      | E           | 03                  | 50968580    | 50970965  | 705                       | 234                           | XP_006344461.1             |
| Soltu.DM.03G028950 | <i>StUSP10</i>     | C           | 03                  | 53457057    | 53454835  | 708                       | 235                           | XP_006345100.1             |
| Soltu.DM.03G034380 | <i>StUSP11</i>     | B           | 03                  | 57828152    | 57824617  | 615                       | 204                           | XP_006341712.1             |
| Soltu.DM.04G008980 | <i>StUSP12</i>     | A           | 04                  | 9262450     | 9264318   | 489                       | 162                           | XP_006346765.1             |
| Soltu.DM.04G018750 | <i>StUSP13</i>     | E           | 04                  | 42389416    | 42385297  | 2067                      | 688                           | XP_006340592.2             |
| Soltu.DM.04G024310 | <i>StUSP14</i>     | B           | 04                  | 54051231    | 54051231  | 2310                      | 769                           | XP_006357335.1             |
| Soltu.DM.04G030800 | <i>StUSP15</i>     | D           | 04                  | 62272862    | 62266191  | 513                       | 170                           | XP_006338073.1             |
| Soltu.DM.05G001100 | <i>StUSP16</i>     | C           | 05                  | 872099      | 873805    | 738                       | 245                           | XP_006348660.1             |
| Soltu.DM.05G019200 | <i>StUSP17</i>     | E           | 05                  | 46797685    | 46793172  | 2478                      | 825                           | XP_006360651.1             |
| Soltu.DM.05G024660 | <i>StUSP18</i>     | D           | 05                  | 53169573    | 53171498  | 477                       | 158                           | XP_015160107.1             |
| Soltu.DM.06G000530 | <i>StUSP19</i>     | D           | 06                  | 878325      | 875760    | 486                       | 161                           | XP_006355801.1             |
| Soltu.DM.06G007810 | <i>StUSP20</i>     | E           | 06                  | 20845053    | 20848387  | 1881                      | 626                           | -                          |
| Soltu.DM.06G017460 | <i>StUSP21</i>     | C           | 06                  | 43716801    | 43718721  | 684                       | 227                           | XP_006363894.1             |
| Soltu.DM.06G022440 | <i>StUSP22</i>     | E           | 06                  | 48878621    | 48884155  | 2487                      | 828                           | -                          |
| Soltu.DM.06G025240 | <i>StUSP23</i>     | B           | 06                  | 51186289    | 51182267  | 630                       | 209                           | XP_006354735.1             |
| Soltu.DM.06G025420 | <i>StUSP24</i>     | C           | 06                  | 51335008    | 51333471  | 708                       | 235                           | XP_006354747.1             |
| Soltu.DM.06G035070 | <i>StUSP25</i>     | D           | 06                  | 58981537    | 58982860  | 474                       | 157                           | XP_006352812.1             |
| Soltu.DM.07G012050 | <i>StUSP26</i>     | E           | 07                  | 38832455    | 38838642  | 2238                      | 745                           | XP_006342325.1             |
| Soltu.DM.07G018720 | <i>StUSP27</i>     | A           | 07                  | 49139287    | 49137141  | 651                       | 216                           | XP_015170385.1             |
| Soltu.DM.07G024980 | <i>StUSP28</i>     | A           | 07                  | 54717452    | 54721048  | 729                       | 242                           | XP_006360120.1             |
| Soltu.DM.08G002510 | <i>StUSP29</i>     | E           | 08                  | 3162854     | 3159667   | 1131                      | 376                           | KAH0647169.1               |
| Soltu.DM.08G002570 | <i>StUSP30</i>     | E           | 08                  | 3183050     | 3180521   | 660                       | 219                           | -                          |
| Soltu.DM.08G002600 | <i>StUSP31</i>     | E           | 08                  | 3203322     | 3200785   | 669                       | 222                           | -                          |
| Soltu.DM.08G002630 | <i>StUSP32</i>     | E           | 08                  | 3223576     | 3221116   | 735                       | 244                           | -                          |
| Soltu.DM.08G018620 | <i>StUSP33</i>     | E           | 08                  | 47372697    | 47367903  | 2304                      | 767                           | KAH0648300.1               |
| Soltu.DM.09G001230 | <i>StUSP34</i>     | A           | 09                  | 901132      | 902724    | 495                       | 164                           | XP_006357577.1             |
| Soltu.DM.09G001240 | <i>StUSP35</i>     | A           | 09                  | 903727      | 905401    | 495                       | 164                           | XP_006357578.1             |
| Soltu.DM.09G001250 | <i>StUSP36</i>     | A           | 09                  | 909392      | 910889    | 489                       | 162                           | XP_006357579.2             |
| Soltu.DM.10G002120 | <i>StUSP37</i>     | A           | 10                  | 1607236     | 1604133   | 765                       | 264                           | XP_006362926.1             |
| Soltu.DM.10G020050 | <i>StUSP38</i>     | A           | 10                  | 51665050    | 51666654  | 501                       | 166                           | XP_006349538.1             |
| Soltu.DM.12G001400 | <i>StUSP39</i>     | D           | 12                  | 1242189     | 1244324   | 483                       | 160                           | XP_015165209.1             |
| Soltu.DM.12G004370 | <i>StUSP40</i>     | E           | 12                  | 3492373     | 3508322   | 3150                      | 1049                          | XP_006342500.1             |
| Soltu.DM.12G016460 | <i>StUSP41</i>     | A           | 12                  | 31825583    | 31816376  | 564                       | 187                           | -                          |
| Soltu.DM.12G025940 | <i>StUSP42</i>     | E           | 12                  | 55940971    | 55945965  | 2283                      | 760                           | XP_015166861.1             |

注：“-”表示无对应的 NCBI 收录号。      Note: “-” indicates no NCBI accession.



## 2.2 马铃薯 *StUSPs* 基因结构、染色体及古多倍化

基因家族的进化中,外显子与内含子(外显子-内含子)结构变化起着非常重要的作用。利用 GSDS(Gene structure display server 2.0)对 42 个马铃薯 *StUSP* 基因的外显子-内含子等结构进行了分析。由图 2A 可知,除 3 个 *StUSP* 基因(*StUSP7/27/28*)只含 1 个外显子之外,其余 *StUSPs* 均包含多个外显子,Group D 亚族成员 *StUSP40* 的外显子数目最多(14 个)。还有 14 个家族成员不包含 UTR 区。

除 11 号染色体外,其余 11 条染色体上均有 *StUSP* 基因分布(图 3,表 1),主要分布在 1~6 号染色体上,其中 6 号和 1 号染色体上的 *StUSP* 基因较多,分别为 7 个和 6 个;其次是 3~5 号和 12 号染色体上各有 4 个,2 号染色体只有 1 个(*StUSP7*)。*StUSP* 基因的重复分析结果显示,有 17 个 *StUSP* 基因参与了 14 个片段重复事件,且这些基因均存在于 Group A~E 5 个亚族中。除片段重复外,发现 4 次串联重复事件,包含 9 个 *StUSP* 成员,其中 *StUSP39* 参与了 2 个串联复制事件。4 个成员同时参与了片段复制和串联复制(图 3)。以上结果表明,片段复制可能在马铃薯 *USP* 基因家族的扩张中起主导作用。

## 2.3 马铃薯 *StUSPs* 的蛋白质结构和保守基序

使用 MEME(Multiple expectation-maximization for motif elicitation)对马铃薯 42 个 *USP* 蛋白进行 Motif 分析,鉴定到 5 个具有独特系统发育分布的保守基序(图 2B)。*StUSP* 蛋白的基序数为 2~5 个,基序长度为 15~50 个氨基酸。绝大多数 *StUSP* 包含 3 个 Motif 基序(Motif 1、2、5),而 *StUSP11*、*StUSP21* 和 *StUSP23* 仅含有 Motif 1 和 Motif 2。相比之下,所有 36 个 *StUSP* 均包含 2 个 Motif(Motif 1 和 Motif 2),其中 7 个 *StUSP* 成员(*StUSP42*、*StUSP22*、*StUSP40*、*StUSP20*、*StUSP13*、*StUSP17*、*StUSP33*)包含了全部 5 个 Motif(图 1、图 2B),而这 7 个 *StUSP* 蛋白均属于 E 亚族。

## 2.4 马铃薯 *StUSPs* 启动子区顺式作用元件分析

为深入了解 *StUSP* 潜在的调控机制(与胁迫响应和激素相关),使用 PlantCARE 分别对每个 *StUSP* 基因转录起始位点(ATG)上游 1 000 bp 的序列中的顺式作用元件进行检测。如图 4 所示,除基本基因表达控制元件(如 CAAT 和 TATA)外,根据功能将胁迫响应和激素相关的顺式作用元件分为 9 组。多种与激素(脱落酸 ABA、茉莉酸甲酯 MeJA、赤霉素 GA、水杨酸 SA 和生长素 IAA)响应相关的顺式作用元素被发现;ABA 和 MeJA 经常参与植物对胁

迫的防御,而参与 ABA 和 MeJA 响应的元件被发现存在于大多数 *StUSPs* 的启动子区,暗示这些基因可能同植物胁迫响应相关。脱水响应元件(DRE)和参与干旱诱导(MBS)元件的 MYB 转录因子结合位点等多个干旱响应元件也被发现存在于多个 *StUSPs* 的启动子区序列中;其他非生物胁迫响应元件,如 TC-rich 重复序列 MYC 转录因子也存在于 *StUSPs* 基因启动子中。

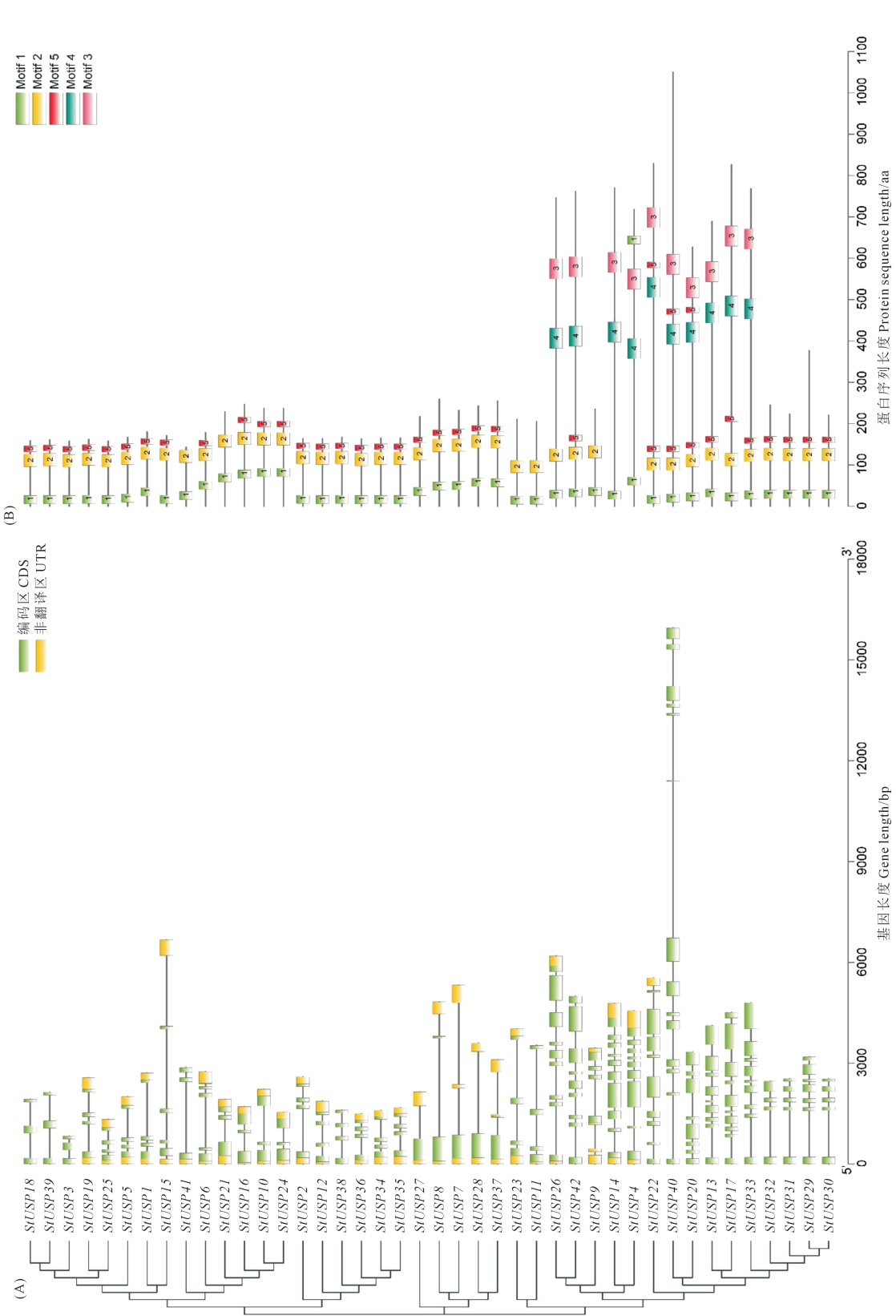
## 2.5 马铃薯 *StUSPs* 胁迫响应表达分析

### 2.5.1 马铃薯 *StUSPs* 响应非生物/生物胁迫及激素处理表达分析

为进一步了解马铃薯 *StUSPs* 基因在非生物胁迫响应中的潜在功能,对其在非生物胁迫(盐胁迫,150 mM NaCl;高温,35℃;甘露醇,260 μM 处理 24 h)下的表达模式进行了分析。由图 4 可知,大多数 *StUSPs* 基因均可响应非生物胁迫,其中响应高温胁迫的成员数目较多。在盐(Salt)胁迫和热(Heat)胁迫下,分别有 13 个(*StUSP2/4/7/9/10/12/16/17/21/22/23/29/35*)和 5 个(*StUSP2/4/10/23/34*)基因上调表达较显著。部分 *StUSPs* 在盐胁迫和高温胁迫中表现出相反的表达模式,如 *StUSP7* 和 *StUSP29* 在盐胁迫中上调表达而在热胁迫下表达量降低(图 5,见 39 页)。在不同激素处理(50 μM ABA、50 μM GA<sub>3</sub>、10 μM IAA 和 10 μM BAP, 24 h)下,许多 *StUSP* 基因的表达量也呈现出差异变化。整体而言,*StUSPs* 对 ABA 的响应较明显,9 个 *StUSPs*(*StUSP1/6/9/11/23/24/27/28/29*)在 ABA 处理下上调表达较显著。此外,部分 *StUSP* 基因能够同时响应激素和非生物胁迫。在生物胁迫响应中 *StUSPs* 的表达量也呈现差异变化,例如马铃薯晚疫病病菌侵染叶片时,*StUSP28*、*StUSP34*、*StUSP37* 的表达量上调,其余基因成员表达量下调或者不变。综上所述,马铃薯 *StUSPs* 基因能够响应不同的逆境胁迫和激素处理,可能在马铃薯生长发育及胁迫响应中发挥重要作用。

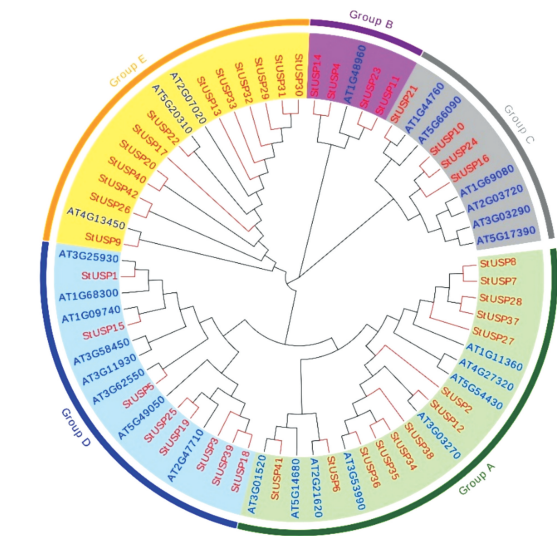
### 2.5.2 不同抗旱性马铃薯品种中 *StUSPs* 在干旱胁迫下的表达分析

为深入了解马铃薯 *StUSP* 在干旱胁迫响应中的重要作用,选择干旱耐受型品种‘陇薯 10 号’(L)和干旱敏感型品种‘大西洋’(D)两个干旱胁迫耐受性不同的品种作为材料进行马铃薯 *USP* 基因干旱胁迫表达分析。对于干旱胁迫处理下两个品种植株进行转录组测序(图 6A,见 40 页),结果表明,干旱胁迫导致 *StUSPs* 表达谱发生显著变化。为验证 RNA-seq 数据,使用 qRT-PCR 检测了参与干旱胁迫响应的 6 个差异表达 *StUSPs*,qRT-PCR 结果与 RNA-seq 数据一致。同时两个耐旱性



注: (A) 马铃薯 *USP* 基因的外显子/内含子结构。绿色方框代表外显子, 黑色线条代表内含子, 黄色方框代表保守基序的分布。不同颜色方框代表不同的 Motif。Note: (A) Exon/intron structure of potato 42 *StUSP* genes. Green boxes represent exons, black lines represent introns, and yellow boxes represent conserved motifs (UTRs); (B) Distribution of conserved motifs in *StUSP* proteins. Each motif is indicated by a number in a colored box. Motif 1: IAAVADKSKSKYKALWDN; Motif 2: VYDGDAREKICEAVERLHLVLMGSRGYGA; Motif 3: TQYRMTSAAAGTCYIDPEYQQTGMLGTGSDIYSLGIMLLQJITARPPMGL; Motif 4: RYTIIEIEVATDYFNSKKIGEGYGPVYKGYLDHTPVAIKVLRPDAAQ; Motif 5: LGSVSDYCVHHAICP.

图 2 马铃薯 *StUSP*s 基因结构和蛋白结构  
Fig.2 Characterization of potato *StUSP*s genes and proteins

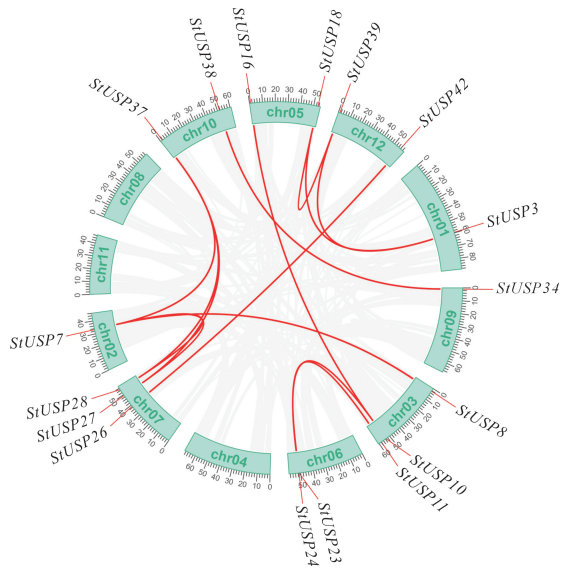


注:利用 MEGA7 中 42 个 StUSP 和 26 个 AtUSP 蛋白的氨基酸序列,通过 Clustal W 生成无根树。亚族由不同颜色区分。

Note: The unrooted tree was generated by Clustal W in MEGA7 using the conserved amino acid sequences of the 42 StUSP and 26 At-USP proteins. USP groups are distinguished by different colors.

图 1 马铃薯 USP 系统发育分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of the USP in potato

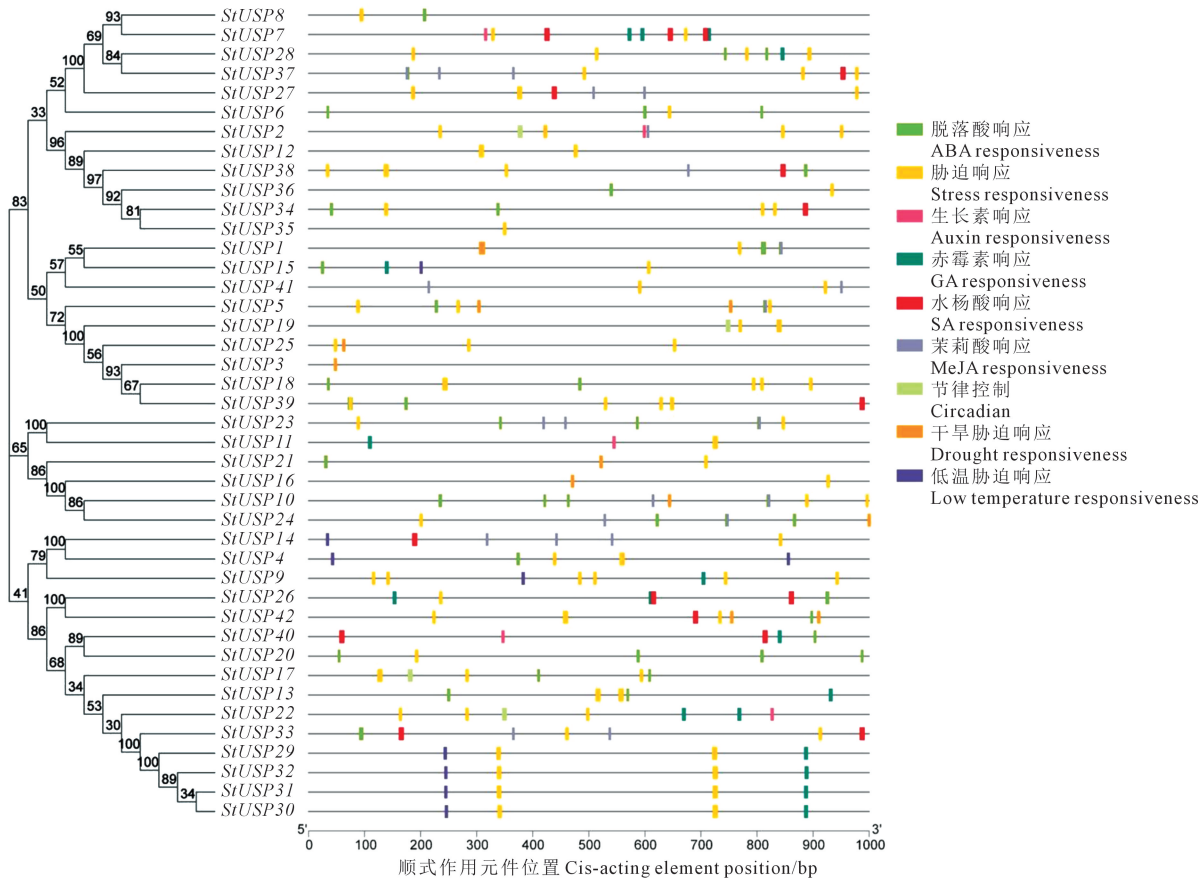


注:红色曲线表示马铃薯 USP 基因之间的复制关系。chr01 ~chr12 指 1~12 号染色体。

Note: Red curves denote the details of duplication between potato USP genes. chr01 ~chr12 refers to chromosomes 1~12.

图 3 马铃薯 USP 基因的复制分析

Fig.3 Chromosome duplication analysis of potato USP genes



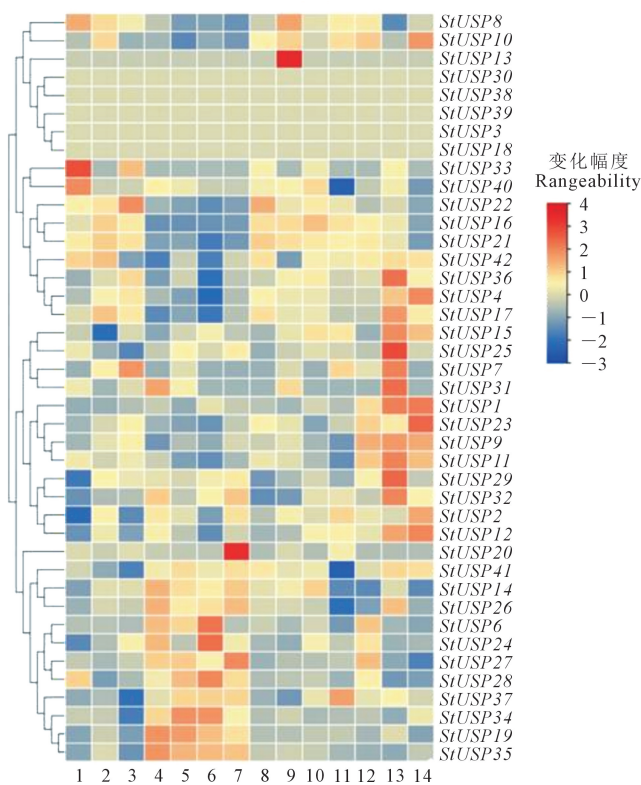
注:所有确定的顺式作用元件被分为 9 组(用不同的颜色表示)。

Note: All identified cis-acting elements were divided into 9 groups (indicated by different colors).

图 4 StUSP 基因启动子中激素和胁迫响应相关的顺式元件示意图

Fig.4 Schematic representation of hormone and stress response cis-elements detected in StUSP gene promoters





注:1.盐胁迫、甘露醇处理对照;2.盐胁迫(150 mM NaCl, 24 h); 3.甘露醇模拟干旱胁迫(260  $\mu$ M, 24 h);4.生物胁迫对照;5.马铃薯晚疫病侵染(24 h);6.  $\beta$ -氨基丁酸处理(24 h);7.苯并噻二唑处理(24 h);8.生长素、赤霉素、苄基氨基嘌呤、脱落酸等激素处理对照;9.生长素处理(10  $\mu$ M, 24 h);10.赤霉素处理(50  $\mu$ M, 24 h);11. 苄基氨基嘌呤处理(10  $\mu$ M, 24 h);12. 脱落酸处理(50  $\mu$ M, 24 h); 13.高温胁迫对照;14. 高温胁迫(35 $^{\circ}$ C, 24 h)。

Note: 1. Control of salt and mannitol; 2. Salt stress(150 mM NaCl, 24 h); 3. Mannitol (260  $\mu$ M, 24 h); 4. Control of biotic stress; 5. *P. infestans* infected (24 h); 6.  $\beta$ -aminobutyric acid treated (24 h); 7. Benzo-2,1,3-thiadiazole treated (24 h); 8. Control of IAA, GA<sub>3</sub>, BAP, ABA treated; 9. IAA treated (10  $\mu$ M, 24 h); 10. GA<sub>3</sub> treated (50  $\mu$ M, 24 h); 11. BAP treated (10  $\mu$ M, 24 h); 12. ABA treated (50  $\mu$ M, 24 h); 13. Control of high temperature stress; 14. High temperature stress (35 $^{\circ}$ C, 24 h)。

图 5 马铃薯 *StUSP* 家族基因在不同胁迫及激素处理下的表达分析

Fig.5 Expression profiles of the *StUSP* family genes at multiple treatments in potato

不同的品种中马铃薯 *StUSP* 基因的表达量存在显著差异,如 *StUSP6* 和 *StUSP34* 在干旱敏感型品种中上调表达,却在干旱耐受型品种中下调表达,而 *StUSP11* 则相反(图 6B)。以上结果表明,*StUSPs* 可能在马铃薯干旱胁迫响应中发挥着重要调控作用。

2.5.3 马铃薯 *StUSPs* 干旱胁迫下的表达模式分析 根据 RNA-Seq 数据筛选出了干旱胁迫下表达量显著变化(变化超过 2 倍)的 12 个马铃薯 *StUSP* 成员 (*StUSP1*、*StUSP5*、*StUSP6*、*StUSP12*、*StUSP20*、

*StUSP21*、*StUSP22*、*StUSP24*、*StUSP27*、*StUSP34*、*StUSP35*、*StUSP42*) ,利用 qRT-PCR 进一步分析上述基因在干旱胁迫下的表达模式。由图 7 可知,其中 6 个基因呈现先上升后下降的表达模式,除 *StUSP5* 最高表达量出现在土壤水分含量为 55%~60%(D1 处理)时,其余基因均在 D2 处理(土壤含水量 35%~40%)达到峰值。随干旱程度的加重,基因表达量出现了不同程度下降;当土壤水分含量为 15%~20%(D3 处理),大部分基因的表达量回落到与 CK 相同水平,甚至低于 CK。*StUSP42* 的表达量变化不同于其他基因,其呈现出先下降后上升的变化趋势,最终回落到与 CK 中基本一致的水平。值得注意的是,4 个基因(*StUSP24*、*StUSP27*、*StUSP34*、*StUSP35*)的表达量在干旱胁迫中呈持续上升的趋势,且上升倍数较大(图 7B)。此外, *StUSP12* 和 *StUSP22* 的表达模式与上述基因完全相反,随干旱胁迫的加重表现为持续下降的趋势,其和 CK 表达量的差异均达到显著水平(图 7C)。

### 3 讨论

*USP* 基因家族在植物生长发育以及对非生物胁迫的应答中起着至关重要的作用。拟南芥(26 个)<sup>[22]</sup>、葡萄(*Vitis vinifera*, 21 个)<sup>[4]</sup>及长春花(*Catharanthus roseus*, 24 个)<sup>[1]</sup>中的 *USP* 基因家族均已被鉴定,关于马铃薯 *USP* 基因家族的研究尚未见报道。本研究系统分析了 *USP* 基因家族及其在马铃薯中的表达,从马铃薯全基因组中鉴定出 42 个 *USP* 基因,与其他已报道的物种相比,马铃薯中的 *USP* 基因数目偏多,说明 *StUSP* 基因在进化过程中经历了基因扩张。马铃薯 *StUSP* 基因中 40% 的成员存在着串联重复与片段重复,这可能与加倍事件有关,这种基因组加倍导致了 *StUSP* 基因家族的扩张分化。本研究中大多数基因至少存在一种激素响应元件,如 ABA 响应元件说明该基因广泛参与植物 ABA 调控的胁迫响应。*StUSP* 家族包含特异 UspA 保守结构域,此现象在拟南芥<sup>[22]</sup>和葡萄<sup>[4]</sup>中也有报道。在长春花中检测到 24 个 USP 蛋白,除包含 USP 保守结构域外,同时还包含蛋白激酶样结构域(或 PK 样结构域)、<sup>Y</sup>PK 样结构域和/或 U-box 结构域等<sup>[1-2]</sup>。本研究中,马铃薯 11 个家族成员同样含有不同数量的除 USP 结构域以外的其他结构域。

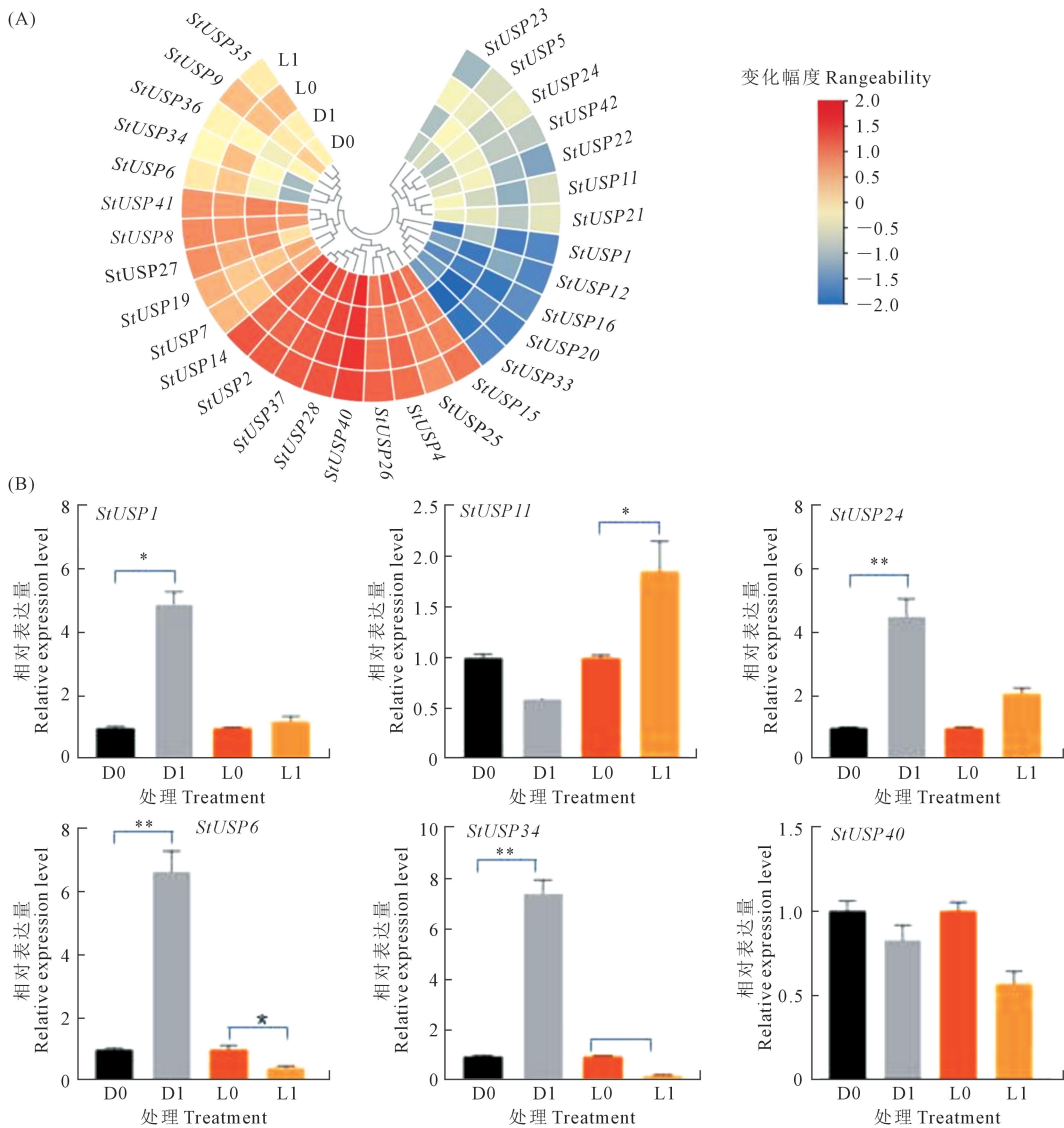
拟南芥 *USP* 基因(*AtUSP*)表现出对 ABA 和各种非生物胁迫(热、脱水、盐、渗透和冷胁迫)的响应诱导<sup>[10]</sup>。王慧梅等<sup>[23]</sup>利用抑制性消减杂交技术构建了干旱胁迫下黄槿(*Cortex phellodendri*)幼苗的消

减文库,然后对获得的 EST 序列分析发现 *USP* 基因具有较高的表达丰度。本研究中同样发现 ABA 响应元件和 DRE 干旱响应元件等胁迫响应元件广泛存在于 *StUSP* 启动子序列中。同时,激素和干旱胁迫处理下基因表达量分析结果显示,大部分 *StUSPs* 对 ABA 响应明显,且在抗旱性不同的马铃薯品种中差异表达。这与拟南芥 *AtUSP* 启动子中广泛存在对植物激素和非生物胁迫有响应的顺式元件 (ABRE、ERE、DRE 和 HSE 等) 结果相一致<sup>[10]</sup>。此外,本研究发现位于 8 号染色体的 *StUSP29~32* 共 4 个基因的启动子几乎在相同位置含有相同数量的

胁迫相关元件和低温响应元件 LTR 顺式作用元件,但未发现其在干旱胁迫下差异表达。温度胁迫转录组结果显示,除 *StUSP30* 除外,其余成员在高温胁迫下均下调表达,可能作为基因簇在响应温度胁迫时发挥作用。

4 结 论

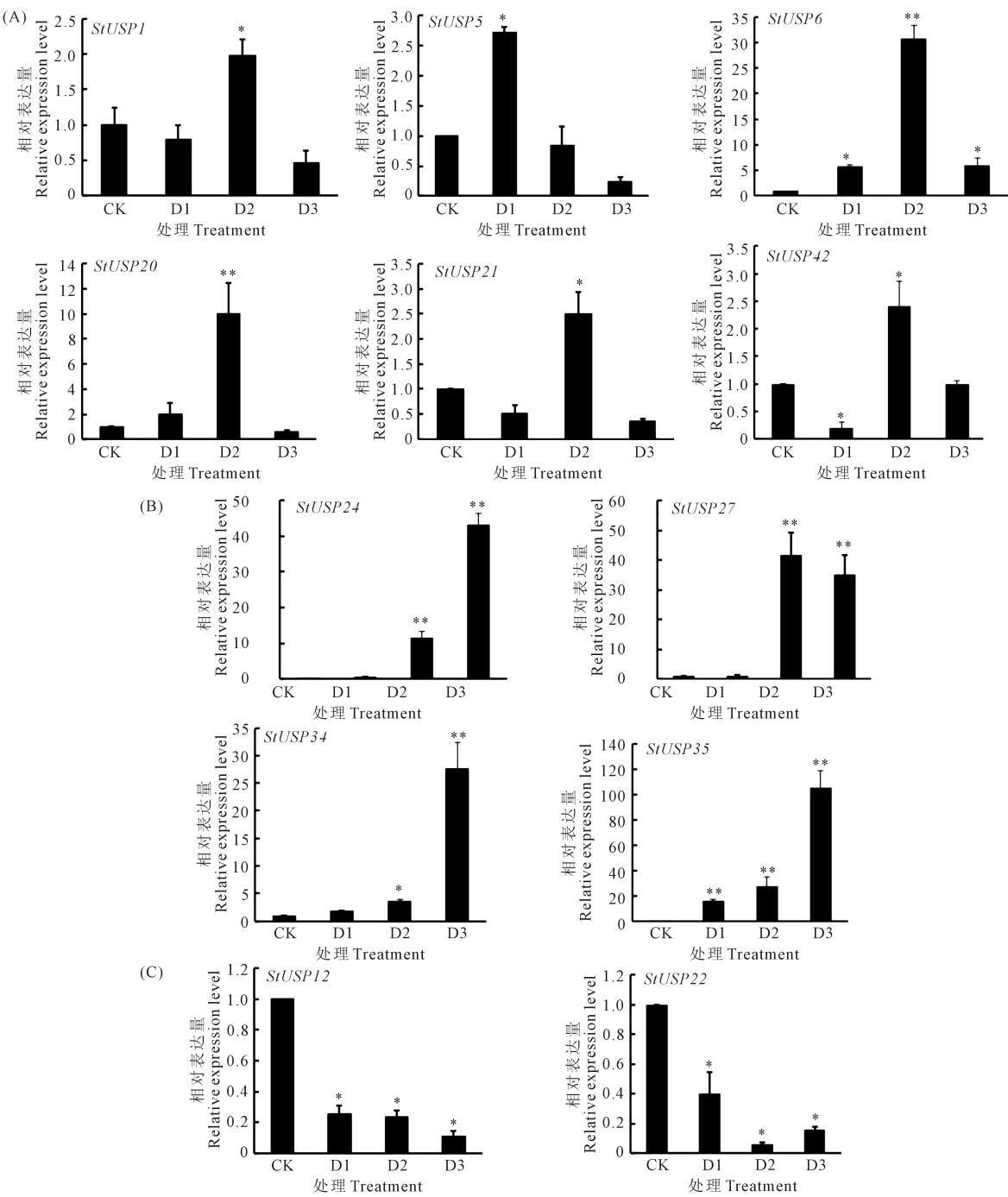
马铃薯中有 42 个 *StUSPs* 家族成员,在 11 条染色体上不均匀分布。对基因结构、保守基序和蛋白结构的分析表明 *USP* 保守性较高,同时鉴定出 4 个基因重复事件和 14 对同源基因 (图 3)。*StUSPs* 基



注:(A)两个品种 *StUSP* 差异表达基因的 RNA-Seq 数据;(B)差异表达 *StUSPs* 基因的 qRT-PCR 验证。D0、L0 为对照,D1、L1 为干旱处理后 5 d。\*: $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$  (Student's *t* 检验)。  
Note: (A) RNA-Seq data of differentially expressed *StUSP* genes in two cultivars; (B) The qRT-PCR validation of differentially expressed *StUSP* genes. D0 and L0 is control, D1 and L1 is five days after drought treatment. \*:  $P<0.05$  and \*\*:  $P<0.01$  (Student's *t* test).

图 6 *StUSP* 差异表达基因在两个不同抗旱性品种中的表达分析

Fig.6 Expression patterns of differentially expressed *StUSP* genes in two cultivars



注:(A)~(C)为干旱胁迫处理下 *StUSP* 的不同表达模式。\*: $P<0.05$ ; \*\*: $P<0.01$ 。  
Note:(A)~(C) are different expression patterns of *StUSP* under drought stress. \*: $P<0.05$ ; \*\*: $P<0.01$ 。

图 7 马铃薯 *StUSP* 干旱胁迫下的表达模式

Fig.7 Expression patterns of *StUSPs* in potato under drought stress

因启动子含有潜在的激素反应和胁迫响应相关顺式作用元件,表明 *StUSP* 可能参与多种激素和胁迫响应途径。*StUSP* 基因在抗旱性相反的两个品种差异表达,可能在马铃薯干旱胁迫响应中发挥重要作用。

参考文献:

[1] BAHIELDIN A, ATEF A, SHOKRY A M, et al. Structural identification of putative USPs in *Catharanthus roseus*[J]. Comptes Rendus Biologies, 2015, 338(10): 643-649.

[2] ARABIA S, SAMI A A, AKHTER S, et al. Comprehensive *in silico* characterization of universal stress proteins in rice (*Oryza sativa* L.) with insight into their stress-specific transcriptional modulation[J].

- Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 712607.
- [3] KVINT K, NACHIN L, DIEZ A, et al. The bacterial universal stress protein; function and regulation[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(2): 140-145.
  - [4] CUI X Y, ZHANG P Y, HU Y F, et al. Genome-wide analysis of the universal stress protein A gene family in *Vitis* and expression in response to abiotic stress [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 165: 57-70.
  - [5] LOUKEHAICH R, WANG T T, OUYANG B, et al. SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 (15): 5593-5606.
  - [6] PHAN K A T, PAENG S K, CHAE H B, et al. Universal stress protein regulates the circadian rhythm of central oscillator genes in *Arabidopsis*[J]. FEBS Letters, 2022, 596(15): 1871-1880.
  - [7] HEERMANN R, WEBER A, MAYER B, et al. The universal stress protein UspC scaffolds the KdpD/KdpE signaling cascade of *Escherichia coli* under salt stress[J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 386(1): 134-148.
  - [8] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants[J]. Cell, 2016, 167(2): 313-324.
  - [9] MELENCION S M B, CHI Y H, PHAM T T, et al. RNA chaperone function of a universal stress protein in *Arabidopsis* confers enhanced cold stress tolerance in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(12): 2546.
  - [10] BHURIA M, GOEL P, KUMAR S, et al. The promoter of AtUSP is co-regulated by phytohormones and abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 1957.
  - [11] GONZALI S, LORETI E, CARDARELLI F, et al. Universal stress protein HRU1 mediates ROS homeostasis under anoxia[J]. Nature Plants, 2015, 1: 15151.
  - [12] 邝静, 生华, 武玉翠, 等. 丹参普遍胁迫蛋白基因 (*SmUSP*) 的克隆及表达模式分析[J]. 植物生理学报, 2013, 49(4): 362-368.  
KUANG J, SHENG H, WU Y C, et al. Cloning and expression analysis of universal stress protein gene (*SmUSP*) from *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. Plant Physiology Journal, 2013, 49 (4): 362-368.
  - [13] MERKOUROPOULOS G, TSAFTARIS A S. Differential expression of *Gossypium hirsutum* USP-related genes, GhUSP1 and GhUSP2, during development and upon salt stress[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31(6): 1539-1547.
  - [14] GUTIÉRREZ-BELTRÁN E, PERSONAT J M, DE LA TORRE F, et al. A Universal stress protein involved in oxidative stress is a phosphorylation target for protein kinase CIPK6 [J]. Plant Physiology, 2017, 173(1): 836-852.
  - [15] ISOKPEHI R D, SIMMONS SS, COHLY H H P, et al. Identification of drought-responsive universal stress proteins in viridiplantae [J]. Bioinformatics and Biology Insights, 2011, 5: 41-58.
  - [16] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(2): 221-227.
  - [17] JUNG Y J, MELENCION S M B, LEE E S, et al. Universal stress protein exhibits aredox-dependent chaperone function in *Arabidopsis* and enhances plant tolerance to heat shock and oxidative stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 1141.
  - [18] 谢从华, 柳俊. 中国马铃薯从济荒作物到主粮之变迁[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(4): 8-15.  
XIE C H, LIU J. Transition of potato from a famine relief crop to staple food in China[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021, 40(4): 8-15.
  - [19] 屈冬玉, 谢开云, 金黎平, 等. 中国马铃薯产业发展与食物安全[J]. 中国农业科学, 2005, 38(2): 358-362.  
QU D Y, XIE K Y, JIN L P, et al. Development of potato industry and food security in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38 (2): 358-362.
  - [20] 余斌, 杨宏羽, 王丽, 等. 马铃薯冠气温差变化特性与耐旱性的关系[J]. 作物学报, 2018, 44(7): 1086-1094.  
YU B, YANG H Y, WANG L, et al. Relationship between potato canopy-air temperature difference and drought tolerance[J]. Acta Agronomica Sinica, 2018, 44(7): 1086-1094.
  - [21] WANG Z M, WANG Y, TONG Q, et al. Transcriptomic analysis of grapevine *D* of transcription factor gene family in response to cold stress and functional analyses of the *VaDof17d* gene [J]. Planta, 2021, 253(2): 55.
  - [22] KERK D, BULGRIEN J, SMITH D W, et al. Arabidopsis proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria [J]. Plant Physiology, 2003, 131(3): 1209-1219.
  - [23] 王慧梅, 王延兵, 祖元刚, 等. 干旱胁迫下黄颡幼苗 cDNA 消减文库的构建和分析[J]. 生物工程学报, 2008, 24(2): 198-202.  
WANG H M, WANG Y B, ZU Y G, et al. Construction and analysis of subtractive cDNA library of *Phellodendron amurense* under drought stress[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(2): 198-202.