

DOI: 10.11686/cyxb2025063

http://cyxb.magtech.com.cn

窦苗苗, 姜晓东, 孙慧琼, 等. 藜麦 *CqSGT1* 基因克隆、表达模式与DNA变异分析. 草业学报, 2026, 35(1): 223—240.

DOU Miao-miao, JIANG Xiao-dong, SUN Hui-qiong, *et al.* Cloning, expression profiling and DNA variation analysis of the disease-resistance gene *CqSGT1* in quinoa (*Chenopodium quinoa*). Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(1): 223—240.

## 藜麦 *CqSGT1* 基因克隆、表达模式与DNA变异分析

窦苗苗, 姜晓东, 孙慧琼, 徐宏申, 王锡亮, 杨博慧, 柴文婷, 赵珊珊, 张春来\*

(山西农业大学农学院, 山西 太谷 030801)

**摘要:** 藜麦的生长发育易受逆境胁迫, 影响藜麦产业的发展。SGT1作为Skp1-4的抑制因子, 通过分子伴侣或调控泛素化对植物抗逆反应进行调控, 其中Skp1-4参与调控细胞周期、信号转导和基因表达等生物过程。鉴定藜麦SGT1基因, 明确藜麦SGT1基因对生物及非生物胁迫的应答情况。利用生物信息学方法, 鉴定出藜麦SGT1基因, 并对其理化性质、序列特征、系统发育树、蛋白互作网络及表达模式等方面进行研究。从藜麦基因组鉴定出2个SGT1基因, 分别命名为*CqSGT1a*和*CqSGT1b*, 位于Chr06和Chr07上, 藜麦SGT1蛋白主要富含碱性氨基酸, 亚细胞定位在细胞核, 无信号肽结构, 二级结构以 $\alpha$ -螺旋为主, 属于疏水性蛋白, 无跨膜结构, 具有TPR-SGS-CS结构域。*CqSGT1*启动子区域存在藜麦生长发育和抵御逆境胁迫的光系统和激素等响应元件。*CqSGT1*基因与*BvSGT1*基因亲缘关系最近。qPCR技术分析表明, 藜麦SGT1在花和籽粒中表达量较高, 推测其表达与花和籽粒形成发育有关; 低温初期表达水平上调, 随之被抑制; 水杨酸(SA)正向调控SGT1的表达, 3h时响应最显著。SGT1于2403(抗病材料)中响应霜霉菌感染, 抗病材料中SGT1的表达量于接种后2h显著上调, 后期先降后升, 在24h时的响应最为强烈, 表明SGT1a/b基因在藜麦霜霉病中发挥正调控作用。*CqSGT1*基因具有组织表达特异性, 并且均响应低温、SA胁迫及霜霉菌感染, 在藜麦器官生长发育和抗逆过程中发挥重要作用。

**关键词:** 藜麦; SGT1; 霜霉菌; 生物信息学分析; 基因克隆

### Cloning, expression profiling and DNA variation analysis of the disease-resistance gene *CqSGT1* in quinoa (*Chenopodium quinoa*)

DOU Miao-miao, JIANG Xiao-dong, SUN Hui-qiong, XU Hong-shen, WANG Xi-liang, YANG Bo-hui, CHAI Wen-ting, ZHAO Shan-shan, ZHANG Chun-lai\*

College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

**Abstract:** The growth and development of quinoa (*Chenopodium quinoa*) are negatively affected by adverse conditions, and that restricts the development of the quinoa industry. SGT1 (suppressor of the G2 allele of *Skp1*) participates in the plant stress resistance response by regulating molecular chaperones and ubiquitination. The SGT1 protein inhibits Skp1-4, which are components of ubiquitin ligase complexes that regulating biological processes such as the cell cycle, signal transduction, and gene expression. The aim of this study was to identify quinoa SGT1 genes and determine their transcriptional responses to biotic and abiotic stress conditions. The SGT1 genes of quinoa were identified using bioinformatics-based methods, and their sequence characteristics, phylogenetic relationships, and expression patterns were analyzed. In addition, the physical and chemical properties and protein interaction networks

收稿日期: 2025-03-04; 改回日期: 2025-05-06

基金项目: 山西农大生物育种工程项目(YZGC104), 国家自然科学基金(31971994), 中国科技部中巴援助项目(KY202002002)和山西农谷建设项目(SXNGJSKYZX201702, SXNGJSKYZX201704)资助。

作者简介: 窦苗苗(1998—), 女, 山东菏泽人, 在读硕士。E-mail: 2812448736@qq.com

\* 通信作者 Corresponding author. E-mail: chunlaiz@hotmail.com

of their putative encoded proteins were determined. The quinoa genome was found to contain two *SGT1* genes, *CqSGT1a* and *CqSGT1b*, located on chromosomes 6 and 7. The putative quinoa *SGT1* proteins are rich in basic amino acids, lack signal peptides, and are dominated by  $\alpha$ -helices. They were predicted to localize to the nucleus. Both were predicted to be hydrophobic proteins without transmembrane structures, and both contained the characteristic TPR-SGS-CS domain. The *CqSGT1* promoter regions contained *cis*-acting elements related to light and hormone responsiveness, suggesting that the expression of these genes is tightly regulated during growth, development, and stress responses. The *CqSGT1* genes showed the closest relationship with *BvSGT1* from *Beta vulgaris*. The results of qPCR analyses showed that the highest transcript levels of *SGT1* in quinoa were in the flowers and grains, suggesting that their expression was related to the formation and development of these organs. Under low temperature stress, both *SGT1* genes were initially up-regulated and then down-regulated. Treatment with salicylic acid induced the expression of *SGT1*, and the response was most significant at 3 h after inoculation. *SGT1* responses were seen during downy mildew (*Peronospora variabilis*) infection in the resistant quinoa line 2403. In the resistant line, *SGT1* transcript levels were significantly increased at 2 h after inoculation, then decreased, and then subsequently increased again. The strongest response was at 24 h, indicating that the *SGT1a/b* genes play a positive regulatory role in the response to quinoa downy mildew. Both *CqSGT1* genes showed tissue-specific expression patterns and responded to low temperature, salicylic acid, and downy mildew infection. These results show that *SGT1* plays an important role in the growth and development of quinoa, and in its responses to biotic and abiotic stress.

**Key words:** *Chenopodium quinoa*; *SGT1*; *Peronospora variabilis*; bioinformatics analysis; gene cloning

藜麦(*Chenopodium quinoa*)属于苋科(Amaranthaceae)藜属(*Chenopodium*),一年生双子叶植物,是起源于南美洲安第斯区的古老作物。藜麦籽粒富含蛋白质和人体必需的9种氨基酸,具有预防冠心病、糖尿病发生的抗氧化物质黄酮类<sup>[1]</sup>,种皮富含皂苷,具有杀虫、杀菌等特性<sup>[2]</sup>。藜麦对盐碱、干旱、霜冻等非生物胁迫具有显著耐受性<sup>[3]</sup>,在生物和非生物胁迫面前表现出优异的抗性。它的适应性极强,能够在海拔0~4000 m的多种生态区域生长<sup>[4]</sup>,特别是在土壤贫瘠的边缘地带表现出良好的生长能力<sup>[5]</sup>。然而,藜麦也面临着病虫害的威胁,尤其是藜麦霜霉病(*Peronospora variabilis*),这是一种全球性的严重病害,可导致产量损失高达33%~100%<sup>[6]</sup>。在我国甘肃临夏的二阴气候区,该病的发病率和病情指数最高,分别为83.70%和80.44。在高湿度和多雨的条件下,病情更为严重,可能导致大面积的减产<sup>[7]</sup>。因此,培育具有抗胁迫特性的藜麦品种是防止品质和产量下降的有效策略。

植物进化阶段应对非生物和生物胁迫,需要重要抗胁迫基因参与<sup>[8]</sup>,如SGT1(*SKP1*的G2等位基因抑制因子, suppressor of G2 allele of *SKP1*)、RAR1(MLA12抗性所必需的)及HSP90(热休克蛋白90)等,是抗病信号转导途径的重要元件<sup>[9]</sup>。SGT1在酵母中最初被鉴定为*SKP1*基因G2等位突变的剂量抑制因子,是一种高度保守的真核生物蛋白,广泛存在于动植物中,参与细胞周期调控、植物免疫和抗病反应<sup>[10]</sup>。*SGT1*是能够调控丝粒装配和蛋白泛素化的基因<sup>[11]</sup>。其编码的蛋白可以与SCF(*Skp1*-Cullin-F-box)E3泛素连接酶复合体相互作用,在细胞周期的G1-S和G2-M转换中发挥重要作用<sup>[12]</sup>,是细胞周期正常进行的必要因子。研究发现植物SGT1蛋白一般由5个结构域组成:SGT1(*SGT1 special*)、TPR(tetratricopeptide repeat)、VR1(variable region1)、VR2(variable region2)和CS(CHORD and *SGT1*),VR1与VR2在不同植物中存在着较大的差异<sup>[13]</sup>。HSP90、RAR1和SGT1可以相互作用,它们的相互作用对它们在抗生物胁迫中的功能至关重要<sup>[14]</sup>,SGT1是植物免疫反应的核心调节因子,尤其在核苷酸结合-富亮氨酸重复蛋白(nucleotide-binding leucine-rich repeat, NLR)介导的免疫激活中发挥重要作用。它通过与HSP90和RAR1形成复合体,作为辅助蛋白帮助NLR蛋白的折叠和稳定性调节<sup>[15]</sup>。作为辅分子伴侣,SGS结构域和LRR结构域互作,CS结构域、RAR1中的CHORDII和HSP90发生互作<sup>[8-9,11]</sup>,形成复合体,调整R蛋白的构象,调控蛋白折叠和信号转导。野生花生(*Arachis hypogaea*)*AdSGT1*能够提高转基因花生

对晚斑病的抗性;花生 HSP90-RAR1-SGT1(HRS)复合物通过稳定多种 NLR 蛋白,在植物抗病过程中发挥重要作用<sup>[8,16]</sup>。基因沉默发现伴侣蛋白 SGT1 在番茄(*Solanum lycopersicum*)*Sw-5b* 基因介导番茄斑萎病毒的信号通路中是必需的,而共同伴侣蛋白 RAR1 并非如此<sup>[17]</sup>。*BolSGT1* 基因可能会改善甘蓝(*Brassica oleracea*)对热、冷和盐等非生物胁迫的抗性<sup>[18]</sup>。植物为了抵抗各种病原菌的侵袭,已经进化出各种复杂的防御系统,主要由各种信号转导途径组成的复杂分子网络调控,其中植物激素及其信号转导发挥着重要作用<sup>[19]</sup>。葡萄(*Vitis vinifera*)浆果在防御灰霉病菌中表达上调,*SGT1* 同源基因在超过敏反应中发挥关键作用,尤其是在效应因子触发免疫(ETI)和病原体相关分子模式触发免疫(PAMP-TI 或 PTI)中<sup>[20]</sup>。病原菌侵染植物时,*SGT1* 是过敏性坏死反应(hypersensitive responses, HR)的必需蛋白<sup>[21]</sup>。通过基因沉默、突变体及转基因等试验证明,*SGT1* 能够调控 R 基因介导的过敏反应、功能表达及非宿主抗性<sup>[22]</sup>且对真菌、细菌、病毒等生物胁迫都能够起到抗病反应。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)等模式植物建立了寄生性病源[如白粉病(*Powdery mildew*)、霜霉病]的水杨酸(salicylic acid, SA)途径,抗腐生性病源[如褐斑病(*Cercospora* spp.)、镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)]的乙烯利(ethephon, ETH)和茉莉酸(jasmonic acid, JA)途径,*SGT1*-RAR1 复合体是水杨酸(SA)合成相关基因,SA 介导的抗病信号途径是植物免疫系统的重要组成部分。

作物的生长发育以及产量会受到干旱、盐碱、极端温度等非生物胁迫因素的影响。过表达甜荞(*Fagopyrum esculentum*)*SGT1* 通过提高过氧化氢酶活性、丙二醛和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量显著提高转基因拟南芥耐盐、耐旱性<sup>[23]</sup>。大豆(*Glycine max*)*SGT1* 与 RAR1 和 HSP90 互作,维持植物渗透稳态,提高了植株的耐旱和耐盐性。近年来,已克隆了包括拟南芥、普通小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)、烟草、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)<sup>[24]</sup>以及花生<sup>[7]</sup>在内的多种作物 *SGT1* 基因,并对其进行了抗性功能的深入分析。此外,藜麦的基因组信息<sup>[25]</sup>以及大量 RNA-Seq 数据的获取,为基因家族的鉴定和应激响应基因的挖掘提供了便利。目前尚不清楚藜麦中的 *SGT1* 是否参与抗胁迫等过程。为了揭示 *SGT1* 在藜麦中的潜在作用,通过转录组学和分子生物学手段,成功克隆了 *CqSGT1* 基因,并对其进行了生物信息学分析。此外,研究还涉及了该基因在抗病材料“2403”和感病材料“74421”中对霜霉病菌侵染的响应表达模式,以及对水杨酸和低温胁迫的响应模式等多方面研究。这些工作为深入研究 *SGT1* 基因的功能提供了理论支持,并为藜麦抗生物和非生物胁迫的研究提供了潜在的候选基因。挖掘和鉴定胁迫响应的基因或基因家族,对于提高作物的抗逆性具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

藜麦种植试验于 2023 年 3—6 月在山西农业大学农学院实践教学基地的温室中进行。日间温度保持在 22~27 °C,夜间温度维持在 15~21 °C,相对湿度控制在 45%~65%,光照强度维持在 30000~80000 lx。选用饱满的藜麦种子,去除杂质后,用清水洗净,接着用 3% 的双氧水浸泡 1 min,再用无菌水冲洗 3 次。将种子在 25 °C 的温水中浸泡 3~4 h 以促进发芽,之后种植于土壤和基质(比例为 1:3)的混合物中。1) 研究中使用了藜麦材料的霜霉病菌感病品系(74421)和抗病品系(2403),通过形态学和分子生物学方法鉴定为 *P. variabilis* 的菌株。将制备的孢子囊悬浮液在 3 h 内喷洒到处于幼苗期至显穗前期的抗感病材料上,覆盖白色透明塑料袋以保持湿度,分别在接种后的 0、2、6、12、24、72 和 96 h 观察并记录叶片状态,并采集叶片进行液氮固定,以备 RNA 提取之用。2) 取藜麦基因型白藜(*Chenopodium album*)、黄藜(*Chenopodium glaucum*)、青白 1 号(*C. quinoa* var. Qingbai No. 1)和青红 1 号(*C. quinoa* var. Qinghong No. 1)花后 10 d 的幼嫩籽粒,进行液氮固定,用于 RNA 提取。3) 取 JQ3、JQ6、Qingheili-8 和 Qingbaili-9 共 4 个藜麦基因型材料,待其长至幼苗期,取新鲜叶片提取高质量基因组 DNA。4) 其他试验藜麦种植于人工气候箱中,温度设定为 24 °C,湿度在 50%~80%,光照强度约为 30000 lx。藜麦生长 2~3 周后,选取根、茎、叶和花进行 SemiRT-PCR 分析,并进行低温(0 °C)以及喷施 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 水杨酸处理。在处理后的 0、3、6、24、48 h 取叶片,进行液氮固定,用于 RNA 提取和 qRT-PCR 分析。每个处理设置 3 个生物学重复。

主要仪器及设备:超纯水机(PWUV,力康生物医疗科技有限公司);PCR 仪、电泳仪、凝胶成像分析仪、荧光定量 PCR 仪(T100 Thermal Cycler、Powerpac Universal、Gel Doc XR+、CFX96 Touch™ Real-Time PCR

Detection System, 美国 Bio-Rad 公司); 高压灭菌锅(GI54DWS, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂); 离心机、超低温冰箱(Centrifuge 5418 R、U410-86, 美国 Eppendorf 公司)。引物合成于生工生物工程(上海)股份有限公司。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 藜麦参考基因组与 SGT1 基因的鉴定及分析** 藜麦全基因组数据从 Phytozome v 12 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/>) 中的 *Chenopodium quinoa* v 1.0 获得, 拟南芥 SGT1 蛋白序列下载于拟南芥全基因组数据库 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>), 甜菜 (*Beta vulgaris*) SGT1 蛋白序列下载于 Phytozome v 12 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/>)。从 Pfam 蛋白家族数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载与 CS domain (PF04969)、Tetratricopeptide repeat (PF13181) 和 SGS domain (PF05002) 结构域对应的隐马尔可夫模型(HMM)文件作为 query, 使用 HMMER v 3.3 (<http://eddylab.org/software/hmmer/hmmer3.3.tar.gz>) 中的 hmmsearch 工具来查找藜麦蛋白数据库中所有可能的 SGT1 蛋白序列, 设置 E 值阈值为  $1e^{-5}$ 。将获取的藜麦 SGT1 基因的氨基酸序列输入 ExPasy 网站 (<http://au.expasy.org/tool.html>), 采用 Compute pI/MW ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) 工具分析, 得到 SGT1 蛋白的多种理化性质。采用 TBtools 软件, 从藜麦参考基因组注释信息中获取藜麦 SGT1 基因染色体位置信息, 进行可视化处理。使用 DNAMAN 对 SGT1 基因进行多序列比对。

**1.2.2 藜麦 SGT1 基因结构分析及其蛋白功能结构域分析** 使用 TBtools 软件分析其基因结构, 可视化结果。Scanprosite 在线工具 (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) 用于其保守模体检索。

**1.2.3 藜麦 SGT1 蛋白二级结构、信号肽预测与亚细胞定位** 使用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 对 SGT1 蛋白的二级结构进行汇总分析; 利用 SignalP-4.1 Server ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) 在线工具, 预测 SGT1 蛋白信号肽。采用 Cell Ploc 2.0 软件 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对 SGT1 进行亚细胞定位。使用在线网站 ne-tphos3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) 预测其磷酸化位点数。

**1.2.4 藜麦 SGT1 蛋白跨膜结构域与三级结构预测** 利用 TMHMM Server v 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对藜麦 SGT1 蛋白跨膜螺旋进行预测; 利用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 对藜麦 SGT1 蛋白进行三级结构预测。

**1.2.5 藜麦 SGT1 蛋白保守基序分析** 利用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 分析藜麦 SGT1 蛋白的保守基序。

**1.2.6 藜麦 SGT1 基因启动子顺式作用元件分析** 提取藜麦 SGT1 起始密码子上游的 2000 bp 序列及藜麦 SGT1 基因标识符, 并将序列转换成大写, 提交到 Plant CARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantca-re/html/>), 采用 TBtools 软件进行启动子区域顺式作用元件的预测。

**1.2.7 藜麦 SGT1 蛋白系统发育分析** 利用 DANMAN 对藜麦、菠菜 (*Spinacia oleracea*)、甜菜 SGT1 的氨基酸序列进行多重比对, 使通过 MEGA 7.0 软件的 NJ 邻接法<sup>[26]</sup> 构建藜麦 SGT1 基因种间进化树, 将进化树的结果复制树文本另存为 nwk 格式, 利用 iTOL (<http://itol.embl.de>) 进行美化。

**1.2.8 RNA 提取及 cDNA 合成** 利用 RNA 提取试剂盒 (MiniBEST Plant RNA Extraction Kit, 购自 TaKaRa 公司) 进行组织样品的总 RNA 提取, 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳, 使用核酸仪 (BioDrop  $\mu$ Lite, 英国剑桥 BioDrop 公司) 检测 RNA 质量和浓度。取 1  $\mu$ g 总 RNA 为模板反转录合成 cDNA [PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time), 购自 TaKaRa 公司], 以进行后续 qPCR 试验。

**1.2.9 CqSGT1 在不同基因型藜麦中的表达分析** 提取白藜、黄藜、青红 1 号和青白 1 号幼嫩籽粒的 RNA, 由百迈客生物技术公司进行 RNA-Seq 测序, 测定 CqSGT1 基因的表达水平, TBtools 软件绘制热图。

**1.2.10 藜麦 SGT1 基因在不同器官中的表达分析** 以藜麦 744 根、茎、叶和花的 cDNA 为模板, CqEF1a 为内参基因<sup>[26]</sup>, 利用半定量 RT-PCR 检测 CqSGT1a/b 在各组织的表达水平。采用 NCBI (primer-blast) 进行基因表达引物设计 (表 1)。PCR 反应体系 25  $\mu$ L: 引物各 1  $\mu$ L, 2 $\times$  Taq PCR Mix 12.5  $\mu$ L (5 U $\cdot\mu$ L<sup>-1</sup>, 购自生工生物公司), cDNA 模板 1  $\mu$ L, 加 ddH<sub>2</sub>O 补齐。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,

目的基因为 28 个循环, *CqEF1 $\alpha$*  为 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测基因的表  
达量。

表 1 PCR 基因分析所用的引物

Table 1 Primers used for gene analysis of PCR

基因名称 Gene name	正向序列 Forward primer (5'→3')	反向序列 Reverse primer (5'→3')	用途 Application
<i>CqSGT1a</i>	ACGGAAAGGAAGTGCCTGTA	GGTGCTTGTGCATTGGTAG	qRT-PCR, SemiRT-PCR
<i>CqSGT1b</i>	TTACCTACGAAAAGGGACCGC	TGCTTGTGCATTGGTAGGCT	qRT-PCR, SemiRT-PCR
<i>CqEF1<math>\alpha</math></i>	GACAAGCGTGTGATCGAGAG	TCGGCCTTAAGTTTGTGCGAG	qRT-PCR, SemiRT-PCR
TI- <i>CqSGT1a/b</i>	ATGGCGACGGATCTCGAGACCAAG	TTAGTATTCCCATTTCTTCATCTC	基因克隆 Gene clone
pCAMBIA1300- <i>CqSGT1a/b</i>	<u>CGCGGATCCA</u> ATGGCGACGGATCTC- GAGACCAAG	<u>CGCGTTCGAC</u> TTAGTATTCCCATTT CTTCATCTC	瞬时表达 Transient expression
M13	GTTGTAAAACGACGGCCAG	CAGGAAACAGCTATGAC	基因克隆和瞬时表达 Gene clone and transient expression

酶切位点用下划线勾出, 保护碱基为酶切位点前的斜体碱基。The underlined part is restriction site, and protection bases are the italicized base before the restriction site.

**1.2.11 藜麦 *SGT1* 在霜霉病诱导下的表达分析** 荧光定量 RT-qPCR 试验及数据处理采用 Bio-radCFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪进行基因表达检测。

**1.2.12 藜麦 *SGT1* 基因的克隆** 以受到霜霉病菌侵染的藜麦“2403”样本 24 h 后的 cDNA 作为模板, 参考藜麦基因组数据库 (<https://phytozome>) 中的 *CqSGT1* 基因序列, 利用 NCBI (primer-blast) 设计了特异性引物 (表 1)。进行 PCR 扩增, 并使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

**1.2.13 *CqSGT1* 的 DNA 变异分析** 对 JQ3、JQ6、Qingheili-8 和 Qingbaili-9 的高质量基因组 DNA, 利用 Illumina 建库, 进行二代 DNA 重测序, 覆盖度约 8 $\times$ , 选 *Chenopodium quinoa* v 1.0 为参考基因组, 用 BMKcloud.com 平台进行 *CqSGT1* 的 DNA 变异分析。

**1.2.14 藜麦 *SGT1* 蛋白互作分析** 通过 DANMAN 同源序列比对, 发现藜麦与同为苋科的菠菜亲缘关系更近, 以菠菜 SoSGT1 (XP\_021839743.1) 为参考, 采用 STRING11.5 (<https://version-11-5.string-db.org/>) 在线网站进行互作蛋白网络分析, 置信度设置为 0.40。

### 1.3 数据分析

每个样品 3 次生物学重复, 运用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法<sup>[26]</sup> 计算各样品表达量, 目的基因的相对表达量归一化使用 *LuEF1 $\alpha$*  的表达量。利用 SPSS 19.0 进行数据处理与统计分析, 利用 Excel 绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 藜麦 *SGT1* 基因基本信息及染色体定位

根据筛选结果, 运用 SMART (<http://smart.embl.de/>) 和 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 数据库进一步验证筛选结果中是否具有 *SGT1* 结构域组成, 去除有错误、短小 (<100 aa) 和没有 *SGT1* 结构域的蛋白质序列, 鉴定出 2 个 *CqSGT1* 基因 (命名为 *CqSGT1a*、*CqSGT1b*)。 *CqSGT1* 基因分布 (表 2 和图 1) 在 Chr06<sup>[25]</sup> 和 Chr07 两条染色体上。

通过不稳定系数分析, 确定 *CqSGT1* 为稳定的蛋白; 脂溶系数越高, 表明流动性越好, 而 *CqSGT1* 蛋白的脂溶系数均小于 90, 这说明蛋白的流动性相对较弱; *CqSGT1* 的亲水性平均值均为负值, 表明其为疏水性蛋白, 且等电点均小于 7, 显示出其偏酸性的特征 (表 2)。

表2 藜麦中SGT1基因的基本信息

Table 2 Basic information of SGT1 family genes in *C. quinoa*

基因名称 Gene name	基因号 Gene ID	染色体位置 Chromosome location	氨基酸长度 Length of amino acids (aa)	分子量 Molecular weight (Da)	等电点 Isoelectric point (pI)	不稳定系数 Instability coefficient	脂溶系数 Liposolubility coefficient	亲水性均值 Grand average of hydropathicity
<i>CqSGT1a</i>	AUR62021095	Chr06	358	39906.09	5.18	36.21	75.03	-0.515
<i>CqSGT1b</i>	AUR62031443	Chr07	358	39890.07	5.42	34.77	73.66	-0.563

通过查另一个较为完整参考基因组,发现*CqSGT1a*位于*Cq-06*: 11054436~11058832。By checking another more complete reference genome, it was found that *CqSGT1a* is located at *Cq-06*: 11054436-11058832.

## 2.2 藜麦SGT1基因结构及蛋白功能分析

*CqSGT1*基因同时包含5'-UTR和3'-UTR(非编码区, non-coding region); *CqSGT1a*和*CqSGT1b*的外显子数量均保持在10个(图2a); 尽管5'端的基因结构相同, 但*CqSGT1b*在3'端的非编码区长度和数量与*CqSGT1a*存在差异, 这暗示了其在进化过程中可能经历了适应性变异。由于外显子与内含子接头区存在一段高度保守的序列, 这使得*CqSGT1*基因具有较多的保守序列。*CqSGT1a*和*CqSGT1b*编码的蛋白含有5个保守结构域(图2b), 分别位于2~35, 36~69, 70~103, 157~236和267~358残基位置, N端包含3个连续的四肽重复序列区域结构域(tetratricopeptide repeat-region domain, TPR), 中间为半胱氨酸和组氨酸富集结构域与SGT1蛋白结构域(CHORD and SGT1 domain, CS), C端为甘氨酸-丝氨酸重复结构域(glycine-serine repeat domain, SGS)。*CqSGT1a*和*CqSGT1b*的同源序列同一性达到

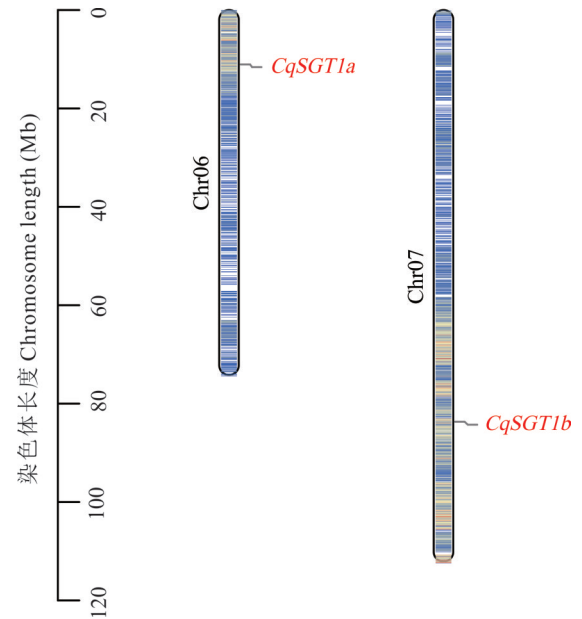


图1 SGT1基因在藜麦不同染色体上的分布

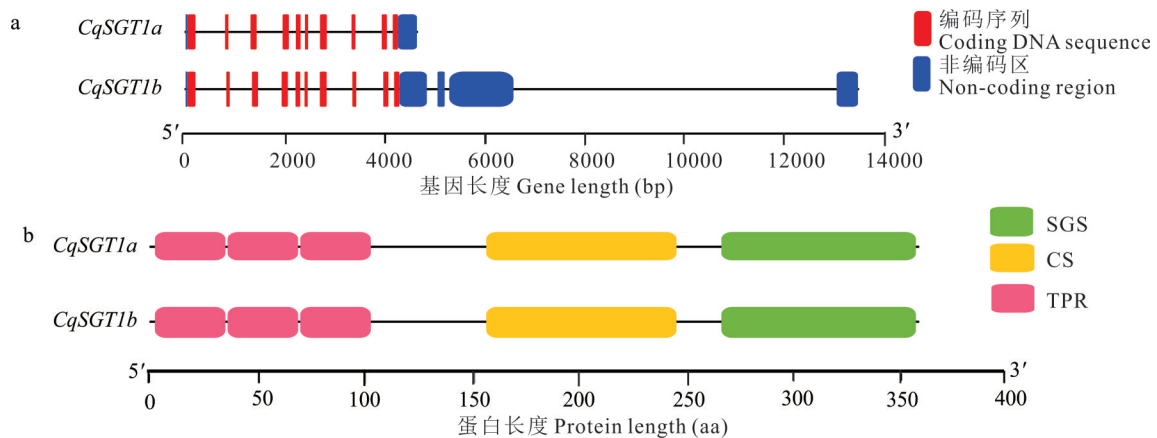
Fig. 1 Distribution of the SGT1 genes on different *C. quinoa* chromosomes

图2 藜麦SGT1基因结构及蛋白功能分析

Fig. 2 Analysis of the gene structure and protein function of SGT1 in *C. quinoa*

a: 藜麦SGT1基因结构 Gene structures of SGT1 genes in *C. quinoa*; b: 藜麦SGT1蛋白的保守结构域 Conservative domain of SGT1 proteins in *C. quinoa*. TPR: 四肽重复序列区域结构域 Tetratricopeptide repeat-sequenceregion domain; CS: 半胱氨酸和组氨酸富集结构域与SGT1蛋白结构域 CHORD and SGT1 domain; SGS: 甘氨酸-丝氨酸重复结构域 Glycine-serine repeat domain. 下同 The same below.

96.93%, 这种高度相似性表明它们可能具有相似的三维结构和酶活性, 因此在某些基本功能上可能非常相似。

### 2.3 藜麦 SGT1 蛋白二级结构、信号肽预测、亚细胞定位分析与磷酸化位点分析

藜麦 SGT1 蛋白的二级结构预测(表 3): 二级结构中含有  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、延伸链和无规则卷曲, 主要由  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲构成(二者所占二级结构总量的比例大于 80%), 是 CqSGT1 蛋白的大量结构元件, 有利于形成蛋白质的特殊结构构象, 延伸链和  $\beta$ -转角则散布在整个蛋白质中。亚细胞定位初步预测 CqSGT1a 和 CqSGT1b 主要在细胞核; CqSGT1 蛋白均不含信号肽(表 4)。NetPhos 3.1 磷酸化位点分析发现(表 4), SGT1a/b 含有的丝氨酸位点最多(16/17 个), 苏氨酸位点数量次之(11/12 个), 酪氨酸数量最少(6 个), 推测该蛋白主要为丝氨酸磷酸化调节控制, 其次是苏氨酸磷酸化调节控制。

### 2.4 藜麦 SGT1 蛋白跨膜结构域与三级结构预测

对藜麦 CqSGT1 蛋白进行三级结构预测(图 3a, b), 发现 CqSGT1a/b 的空间结构具有明显的相似性。通过跨膜结构域分析(图 3c, d), 观察到 CqSGT1 缺乏跨膜区域, 表明其全部结构均位于细胞膜外。预测表明, 该蛋白可能是一个功能蛋白, 仅在合成位置发挥作用, 而不具备运输功能。此外, CqSGT1 在 N 端具有相似的跨膜结构域, 且构成这些跨膜结构域的氨基酸数量与位置基本相同。

### 2.5 藜麦 SGT1 蛋白保守基序分析

对藜麦 SGT1 氨基酸序列进行基序分析(图 4), 结果表明: CqSGT1 共识别出 9 个保守基序(motif 1 至 motif 9)。CqSGT1a 和 CqSGT1b 蛋白序列均包含了 motif 1 至 motif 9, 并且氨基酸的排列位置保持一致。这表明 CqSGT1 的基序具有高度的保守性, 进一步推测这些基序(motif 1 至 motif 9)可能对 CqSGT1 在植物生长发育及免疫反应中的功能产生影响。

### 2.6 藜麦 SGT1 基因启动子区域顺式作用元件分析

通过运用 Plant Care 工具对 CqSGT1 启动子区域进行顺式作用元件分析, 发现除了保守元件 CAAT-box 和 TATA-box 之外, 藜麦 CqSGT1 基因的启动子还包含众多与逆境胁迫响应相关的元件(表 5)。生物胁迫元件主要包括水杨酸响应元件(TCA-element)和赤霉素响应元件(P-box), 表明 CqSGT1 基因在特定信号通路中扮演关键角色, 揭示了该基因在植物生长发育及病原体防御方面的重要调控作用。非生物胁迫响应元件则包含了厌氧诱导调节元件(ARE)、MYB 结合位点参与类黄酮生物合成基因的调控元件(MBSI)、参与玉米醇溶蛋白代谢调控元件(O<sub>2</sub>-site)以及参与昼夜节律调控元件(Circadian), 这些都表明 CqSGT1 基因在抵御环境胁迫反应中发挥着至关重要的作用。此外, CqSGT1 基因还含有 3~8 种参与光响应的元件, 这些元件调控着藜麦生长发育过程的多样性功能。然而, CqSGT1a 和 CqSGT1b 的主要顺式作用元件存在差异, 这也暗示了它们在生物学过程中的特异性发展。

### 2.7 藜麦 SGT1 蛋白系统发育分析

通过同源比对搜索, 获得 19 条与 CqSGT1 同源的序列, 基于不同物种 SGT1 氨基酸序列, 采用邻接法构建系统进化树(图 5a)。SGT1 蛋白被分为 4 个主要类群(I、II、III 和 IV), 其中, 藜麦的 SGT1 聚类到同一亚组 II 中, 且在此基础上聚类到同一分支, 藜麦 CqSGT1 与苋科甜菜 BvSGT1(KMT16147.1 和 XP\_010671588.2)、菠菜 SoSGT1(XP\_021839743.1)和籽粒苋 AhSGT1(XP\_057527231.1)序列一致性较高, 亲缘关系较近, 在功能上可能也具有相似性。对 4 个物种的蛋白序列进行比对分析(图 5b), 得到同源率为 90.61%, 均具有 3 个保守性高的 TPR(2~103)、CS(157~246)和 SGS(267~358)结构域序列, 分布在 104~156 和 247~266 残基及周围区域。

表 3 藜麦中 SGT1 蛋白的二级结构

Table 3 Secondary structures of SGT1 proteins in *C. quinoa* (%)

蛋白质名称 Protein name	$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -helix	延伸链 Extended strand	$\beta$ -转角 $\beta$ -turn	无规则卷曲 Random coil
CqSGT1a	41.62	13.41	4.19	40.78
CqSGT1b	45.81	12.57	3.63	37.99

表 4 藜麦 CqSGT1 蛋白的信号肽、亚细胞定位预测和磷酸化位点

Table 4 Signal peptid, subcellular localization prediction and phosphorylation sites of CqSGT1 proteins in *C. quinoa*

蛋白质名称 Protein name	信号肽 Signal peptide	亚细胞定位 Subcellular localization	磷酸化位点 Phosphorylation sites		
			丝氨酸 Serine	苏氨酸 Threonine	酪氨酸 Tyrosine
CqSGT1a	无 Nothing	细胞核 Nucleus	16	11	6
CqSGT1b	无 Nothing	细胞核 Nucleus	17	12	6

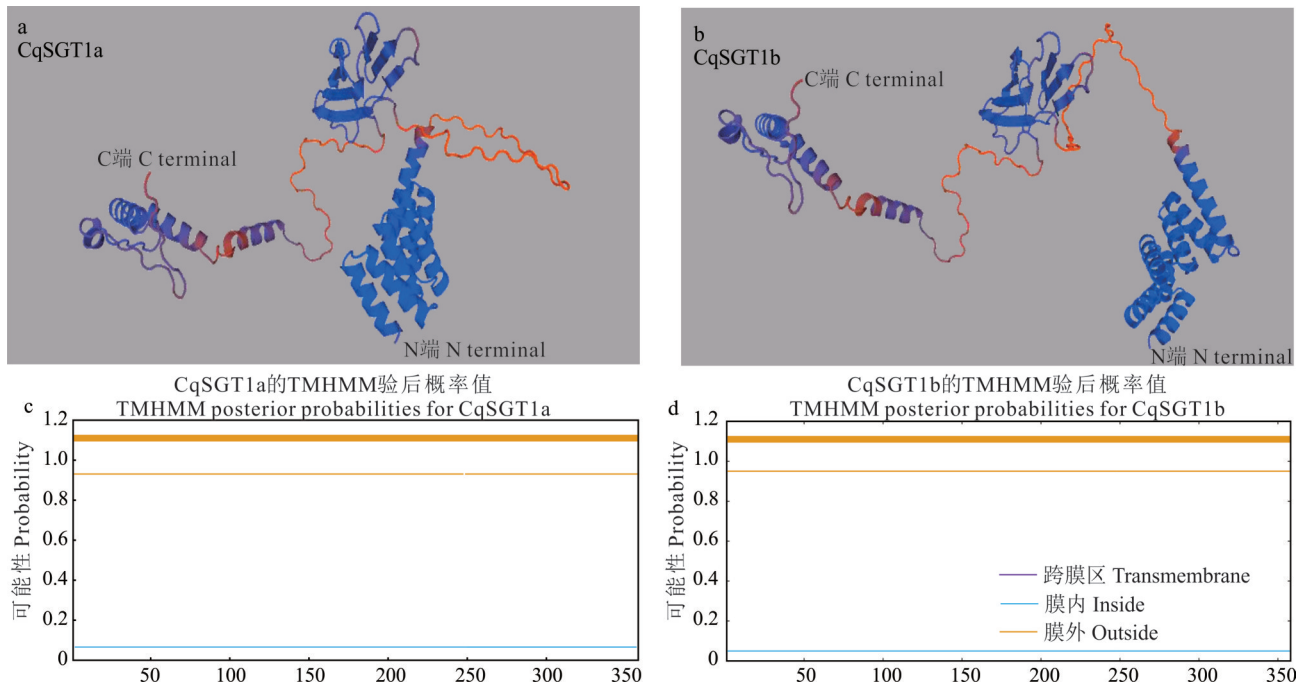


图3 藜麦中SGT1蛋白的三级结构及跨膜螺旋结构域

Fig. 3 Tertiary structure and transmembrane helix domain of SGT1 proteins in *C. quinoa*

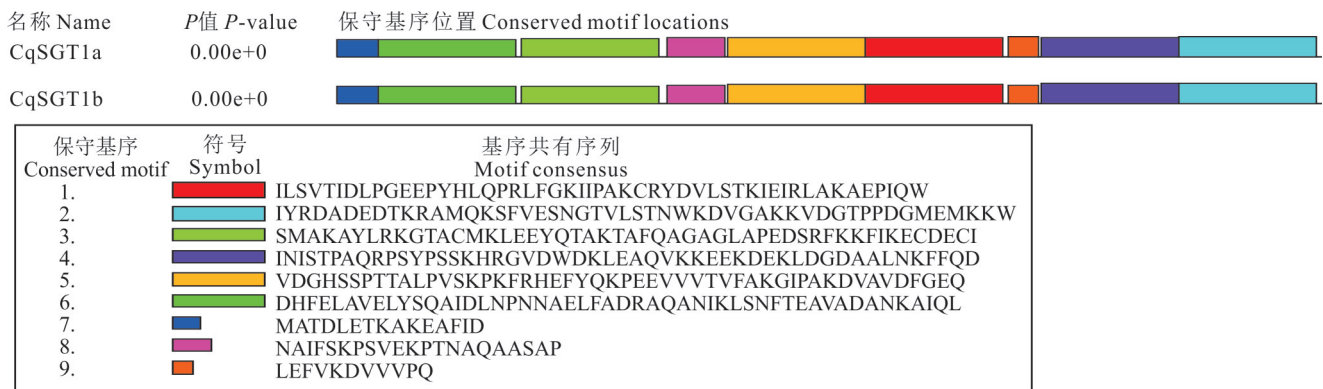


图4 藜麦中SGT1蛋白的保守基序

Fig. 4 Conserved motifs of SGT1 proteins in *C. quinoa*

2.8 藜麦SGT1的克隆及序列比对

以霜霉病菌侵染 24 h 的藜麦“2403”的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增得到序列为 1077 bp 的目的基因,共编码 358 个氨基酸。进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,得到的条带大小与数据库中的一致(图 6a)。将上述 PCR 产物纯化后与 pCAMBIA1300-MCS 载体连接、转化和培养后,进行菌液 PCR 扩增,扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果显示(图 6b),用 M13 和特异性引物进行 PCR 扩增时,pCAMBIA1300-CqSGT1 扩增产物大小在 1000~2000 bp,扩增产物与理论值 1157 和 1090 bp 相符,无非特异性条带。pCAMBIA1300-CqSGT1 重组质粒测序结果显示,基因序列均为 1077 bp,序列比对结果表明,与参考序列 CqSGT1(Phytozome, 登录号:AUR62021095)有一个碱基不同(图 6c)。

2.9 藜麦SGT1基因在不同器官中的表达分析

通过半定量 PCR 分析,观察到 CqSGT1 基因在不同器官(包括茎、幼叶、老叶、根和花)中的表达情况(图 7)。CqSGT1a 和 CqSGT1b 呈现出不同的表达模式,它们在所有检测的器官中均有表达,显示出组织特异性的表达特征。此外,这两个基因成员之间的条带亮度存在明显差异。而内参基因(CqEF1α)在各器官中的扩增丰度保持

表 5 藜麦中 *SGT1* 基因的顺式作用元件Table 5 *Cis-acting elements of SGT1 genes in C. quinoa*

元件名称 Element name	核心序列 Core sequence	元件功能 Element function	数量 Quantity	
			<i>CqSGT1a</i>	<i>CqSGT1b</i>
chs-CMA1a	TTACTTAA	部分光响应元件 Part of light responsive element	1	—
3-AF1 binding site	TAAGAGAGGAA	光响应元件 Light responsive element	1	—
HD-Zip 3	GTAAT(G/C)ATTAC	蛋白质结合位点 Protein binding site	1	—
ARE	AAACCA	厌氧诱导必不可少的顺式作用调节元件 <i>Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction</i>	4	1
GT1-motif	GGTTAA	光响应元件 Light responsive element	2	—
Box 4	ATTAAT	参与光响应的部分保守 DNA 模块 Part of conserved DNA module involved in light responsiveness	3	4
G-box	CACGAC	参与光反应的顺式作用调节元件 <i>Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness</i>	1	—
GA-motif	ATAGATAA	部分光响应元件 Part of light responsive element	1	—
TCT-motif	TCTTAC	部分光响应元件 Part of light responsive element	1	—
P-box	CCTTTTG	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element	2	2
Gap-box	CAAATGAA(A/G)A	光响应元件 Light responsive element	1	—
TCA-element	CCATCTTTTT	参与水杨酸反应的顺式作用调节元件 <i>Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness</i>	1	—
ATCT-motif	AATCTAATCC	参与光响应的部分保守 DNA 模块 Part of conserved DNA module involved in light responsiveness	1	—
TATA-box	AATCTAATCC	转录起始 -30 核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start	64	53
MBSI	AAAAAAC(G/C)GTTA	MYB 结合位点参与类黄酮生物合成基因的调控元件 MYB-binding site as a regulatory element involved in the control of flavonoid biosynthetic genes	—	1
CAAT-box	CAAAT	启动子和增强子区域调控元件 Promoter and enhancer region regulatory elements	—	12
TCT-motif	TCTTAC	部分光响应元件 Part of light responsive element	—	2
O <sub>2</sub> -site	GTTGACGTGA	参与玉米醇溶蛋白代谢调控的顺式调节元件 <i>Cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation</i>	—	1
MRE	AACCTAA	MYB 结合位点(参与光响应) MYB binding site involved in light responsiveness	—	1
Circadian	AACCTAA	参与昼夜节律控制的顺式作用调节元件 <i>Cis-acting regulatory element involved in circadian control</i>	—	1

—: 无调控元件 The absence of regulatory element.

一致,表明其可用于校正 *CqSGT1* 的表达差异。*CqSGT1a* 和 *CqSGT1b* 基因在花中的表达量达到峰值;*CqSGT1a* 在茎和根部的表达量也相对较高,而在幼嫩叶片中的表达量较低。相对地,*CqSGT1b* 在茎部的表达量较高,但在幼嫩叶片和根部的表达量较低;两者在老叶片中几乎不表达。据此推测,*CqSGT1* 基因可能在花器官的发育、花朵的开放与闭合等关键过程中发挥作用。此外,由于 *CqSGT1a* 在根部的表达量超过了 *CqSGT1b*,可以进一步推测 *CqSGT1a* 可能也参与了根部的发育过程。

## 2.10 藜麦 *SGT1* 基因在不同基因型藜麦中的表达分析

*CqSGT1* 在不同基因型藜麦的花后 10 d 幼嫩籽粒中的表达水平存在差异(图 8)。*CqSGT1a* 在 4 种基因型的藜麦籽粒中的表达水平明显高于 *CqSGT1b*,且在黄藜中的表达量最高。这表明 *CqSGT1* 基因可能直接或间接影响了藜麦籽粒相关性状的形成与调控。面对逆境胁迫时,不同基因型的籽粒内部防御反应强度各异。*CqSGT1a* 在藜麦籽粒中的高表达量可能预示着更特定或更优良的特性;相对地,*CqSGT1b* 较低的表达量可能意味着较弱或不同的特性表现。

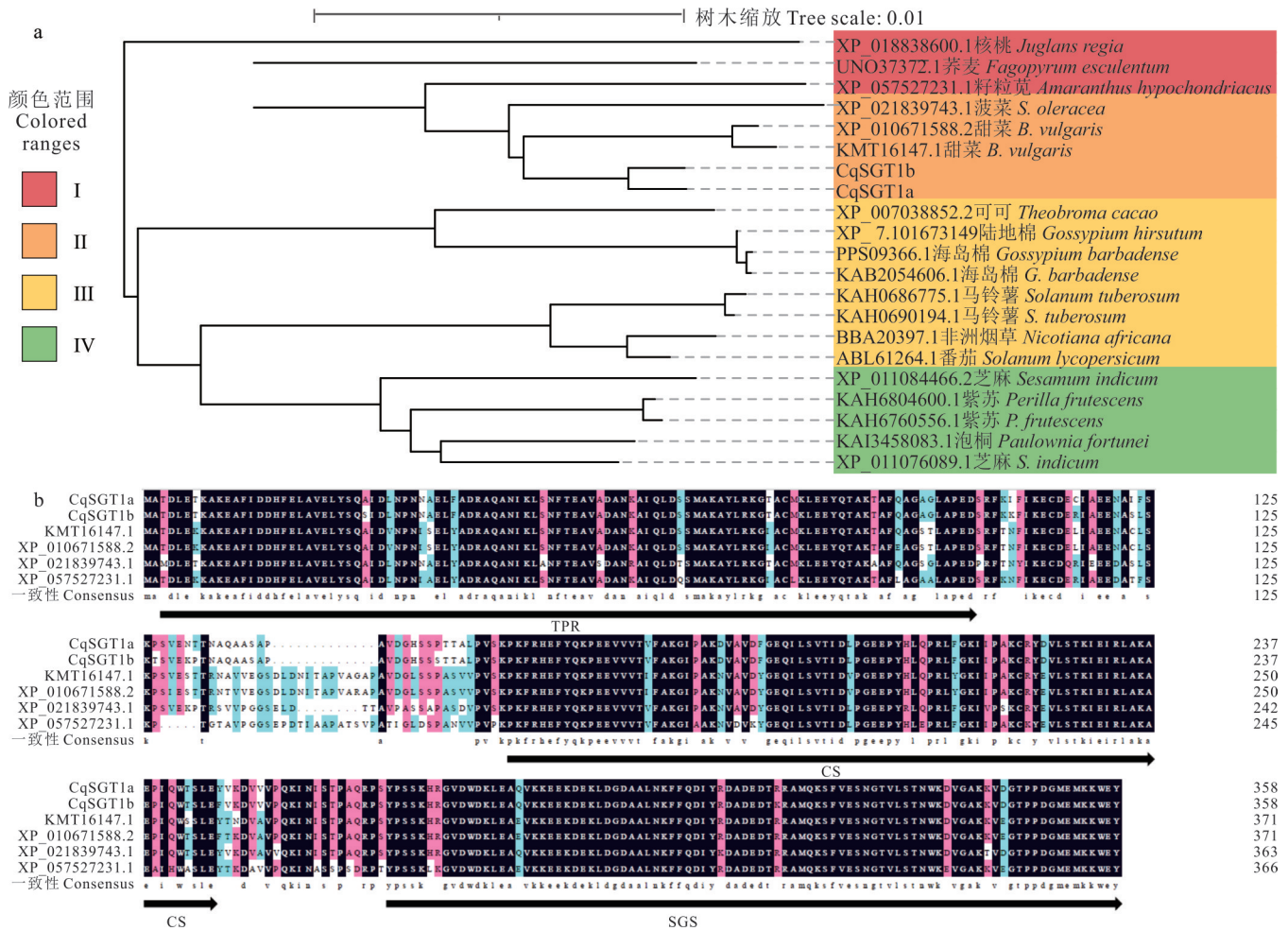


图5 藜麦SGT1蛋白系统发育分析及氨基酸序列比对

Fig. 5 Phylogenetic analysis and amino acid sequence alignment of SGT1 in *C. quinoa*

a: CqSGT1和其他物种的系统发育分析 Phylogenetic analysis of CqSGT1 and other species; b: CqSGT1与甜菜、菠菜和籽粒苋的氨基酸序列比对 Amino acids alignment among CqSGT1 and *B. vulgaris*, *S. oleracea* and *A. hypochondriacus*.

2.11 qRT-PCR分析藜麦SGT1低温和外施激素响应模式

为了深入研究藜麦CqSGT1基因的特性及其功能,本研究采用qRT-PCR技术对在低温(0℃)和水杨酸(SA)胁迫下的藜麦幼苗叶片进行了分析。结果表明,水杨酸处理下,CqSGT1a/b的表达量均显著上调,在3h达到峰值,分别是对照的4.84和6.31倍,之后逐渐降低但整体上高于对照(图9)。低温处理后,藜麦SGT1a/b基因的表达量均呈先上升后下降的趋势,分别在处理6和3h后达到峰值,分别是对照的1.31和1.43倍。结果表明,CqSGT1极可能在抵御短时间低温胁迫发挥作用,水杨酸正向调控SGT1的表达,且不同基因的表达量存在差异,揭示该基因在响应逆境胁迫的过程中存在一定的作用。

2.12 藜麦SGT1基因响应霜霉病侵染的表达模式分析

观察藜麦抗病材料(2403)和感病材料(74421)接种霜霉菌后的感染状况(图10),并结合CqSGT1基因的表达情况(图11),发现CqSGT1基因在抗病材料中的表达量显著高于感病材料,这表明该基因的表达与藜麦对霜霉病的抗性紧密相关,其表达水平的差异可能是决定藜麦抗霜霉病能力的关键因素。在74421材料中,CqSGT1基因的表达较低,藜麦缺乏有效的防御能力以抵御霜霉菌,病菌能够轻易侵入并在叶片上定殖、扩展;接种霜霉菌后2~24h内,叶片正面出现不规则的淡黄色病斑,病斑与健康组织界限分明;到了96h,病斑进一步扩大,叶背面出现稀疏的淡灰色霉层;之后观察到试验区74421显示有黄化病斑至孢子形成的迹象。而在2403材料接种霜霉菌后观察到的表型变化显示,CqSGT1基因高表达,藜麦启动了一系列防御机制,导致叶片上未

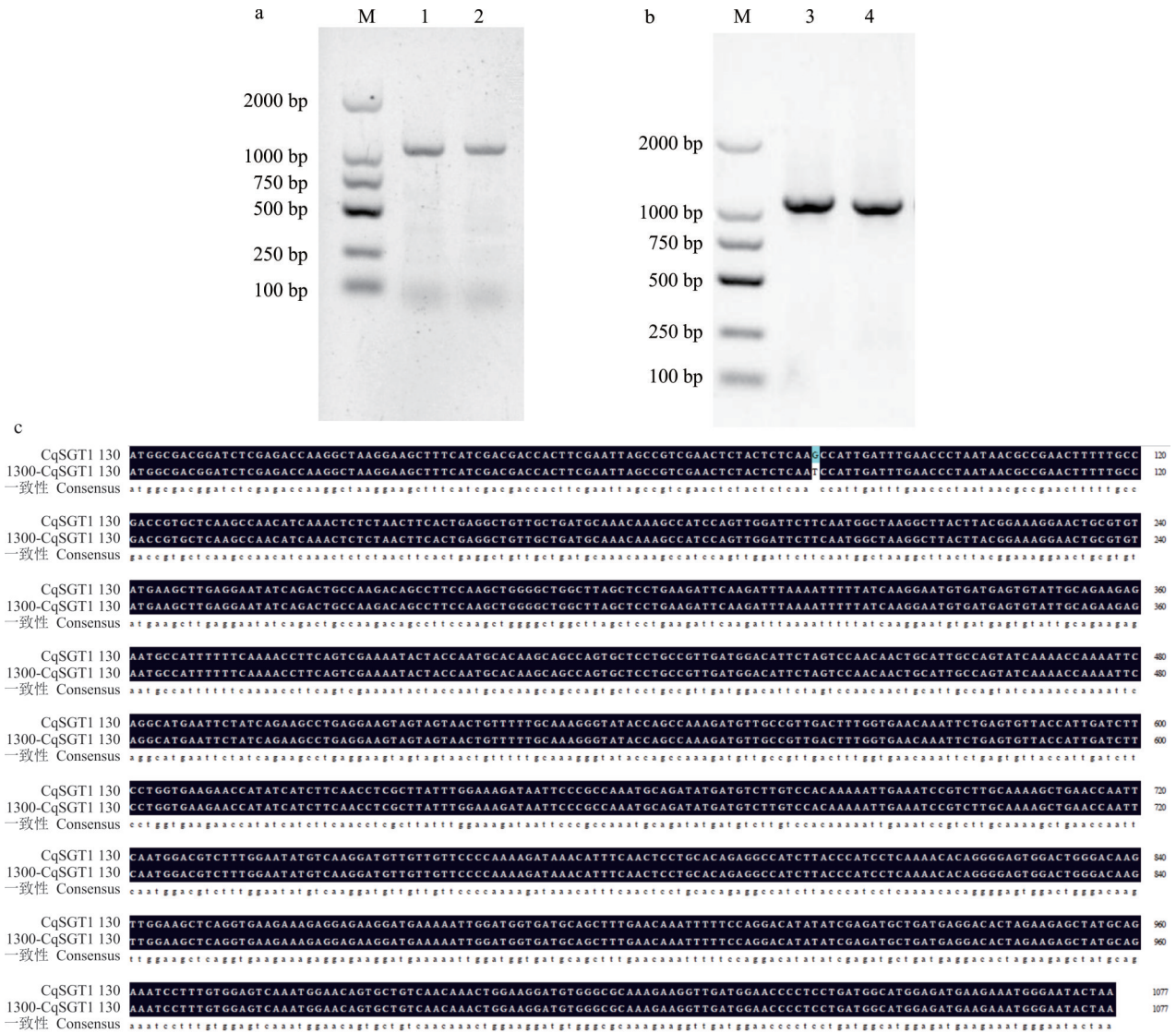


图 6 藜麦 SGT1 基因的 PCR 扩增及序列比对

Fig. 6 PCR amplification and sequence alignment of the SGT1 gene in *C. quinoa*

a: 2403-*CqSGT1* 扩增结果 Amplification results of 2403-*CqSGT1* gene; b: pCAMBIA1300-*CqSGT1* 的菌液 PCR 结果 PCR results of bacteria that contain the plasmid pCAMBIA1300-*CqSGT1*. M: DNA 标准分子量 DNA Maker; 1: *CqSGT1a* 的 PCR 结果 The PCR results for *CqSGT1a*; 2: *CqSGT1b* 的 PCR 结果 The PCR results for *CqSGT1b*; 3: pCAMBIA1300-*CqSGT1* 的 M13 引物 PCR 扩增 PCR amplification of M13 primers for pCAMBIA1300-*CqSGT1*; 4: pCAMBIA1300-*CqSGT1* 的特异性引物 PCR 扩增 PCR amplification of specific primers for pCAMBIA1300-*CqSGT1*. 下同 The same below.

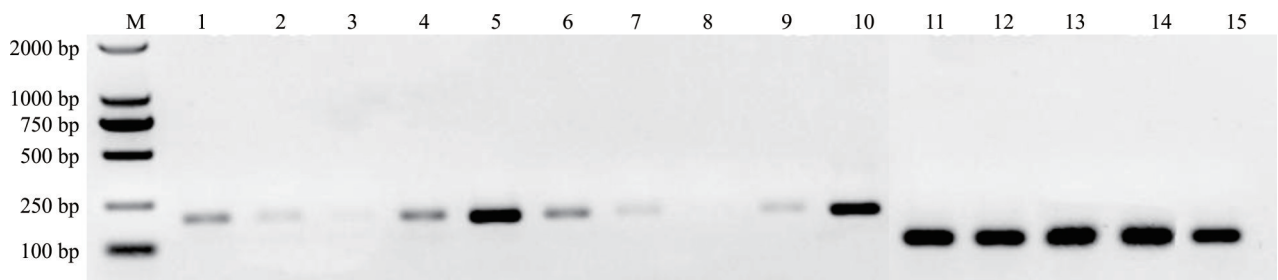


图 7 *CqSGT1* 基因在藜麦不同器官中的表达

Fig. 7 Expression of *CqSGT1* genes in different organs of *C. quinoa*

1~5, 6~10 和 11~15 表示 *CqSGT1a*, *CqSGT1b* 和 *CqEF1a* 分别在茎、幼叶、老叶、根和花的半定量 RT-PCR 结果。1-5, 6-10 and 11-15 represent semi RT-PCR results of *CqSGT1a*, *CqSGT1b* and *CqEF1a* in stem, young leaves, old leaves, roots and flowers, respectively.

形成明显的病斑或病斑数量极少、面积很小,并无发病迹象;整体生长状态与未接种病菌的健康植株相似,有效地保持了植株的生理代谢和生长发育。

通过qRT-PCR技术分析了接种霜霉病菌后不同时间点(0、2、6、12、24、72和96 h)藜麦中*CqSGT1*基因的相对表达量变化(图11)。研究选取了这7个时间点来观察*SGT1*基因的表达趋势。与感病材料相比,2403在接种后2、12和24 h时*CqSGT1a*基因的表达量分别是对照组的4.06、5.43和6.13倍;而*CqSGT1b*基因在接种后2、6和24 h的表达量分别是对照组的4.06、2.82和4.82倍。这表明*CqSGT1a*和*CqSGT1b*基因在霜霉病菌侵染下显著上调表达,并且在接种后

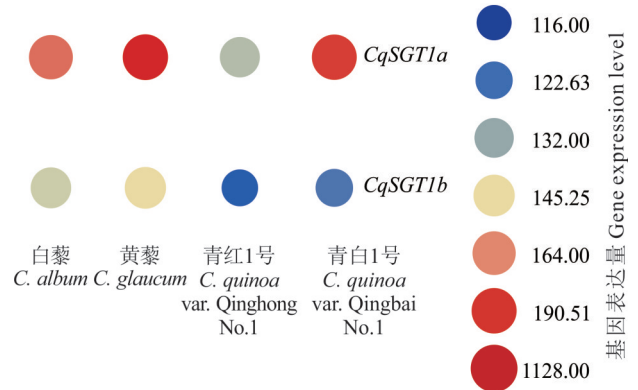


图8 *CqSGT1*基因在白藜、黄藜、青白1号、青红1号的花后幼嫩籽粒中的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of the *CqSGT1* genes in the young seeds of *C. album*, *C. glaucum*, *C. quinoa* var. Qinghong No. 1, and *C. quinoa* var. Qingbai No. 1 after flowering

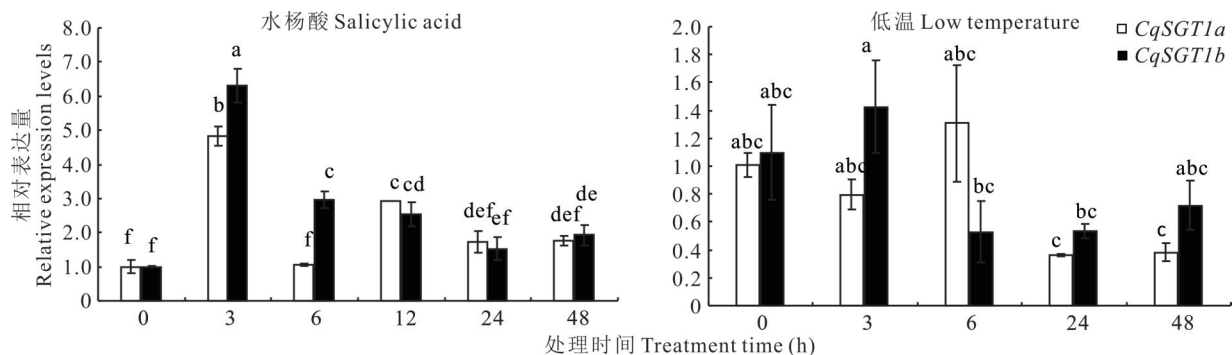


图9 水杨酸和低温胁迫下*CqSGT1*基因的表达模式

Fig. 9 Expression pattern of *CqSGT1* genes under SA and low temperature stress

不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). The same below.

2 h表达水平即显著提高( $P < 0.05$ ),在24 h达到峰值。此外,表达量在中后期出现了两次波动。这些结果揭示了*CqSGT1a/b*基因在藜麦对霜霉病的反应中扮演了正向调控的角色。

*SGT1/RAR1*复合物作为水杨酸(SA)介导的抗病信号途径的关键调控蛋白,在植物的抗病反应中扮演着至关重要的角色。在藜麦接种霜霉病菌后,*SGT1*的表达量出现了显著的变化。

### 2.13 藜麦*SGT1*基因的自然等位变异

对4种基因型藜麦的Illumina全基因组重测序检测到8处InDel和SNP变异位点,*CqSGT1a*在4种基因型藜麦的34577463位点处发生非编码核苷酸缺失,注释为内含子效应;*CqSGT1b*发生3处内含子InDel变异,4处非编码区InDel变异,其中在Chr07:83675475位点处发生编码核苷酸插入,注释为上游效应;在Chr07:83679830位点处发生非移码突变,在Chr07:83677523、83679761位点处分别发生非编码核苷酸缺失和插入,注释为内含子效应;在Chr07:83689890位点处发生非移码突变,在Chr07:83690874、83691319位点处发生编码核苷酸插入,注释为下游效应(表6)。因此,*CqSGT1*的InDel变异不影响阅读框改变,但非编码区上有调控遗传信息表达的启动子、增强子和终止子等核酸序列的改变,这些元件位于编码区上下游对基因表达进行精细调控。

### 2.14 藜麦*SGT1*蛋白互作分析

通过STRING数据库的菠菜关联模型,搜索了与*CqSGT1*蛋白相互作用的其他蛋白质信息,并构建了蛋白互作网络(图12)。全基因组的蛋白互作分析揭示,SOVF\_083090(XP\_021839743)占据核心位置(红色节点),其与藜麦*SGT1*蛋白的相似度高达86%,并含有TPR-SGS-CS保守结构域。GO富集和KEGG通路等分析表明(由

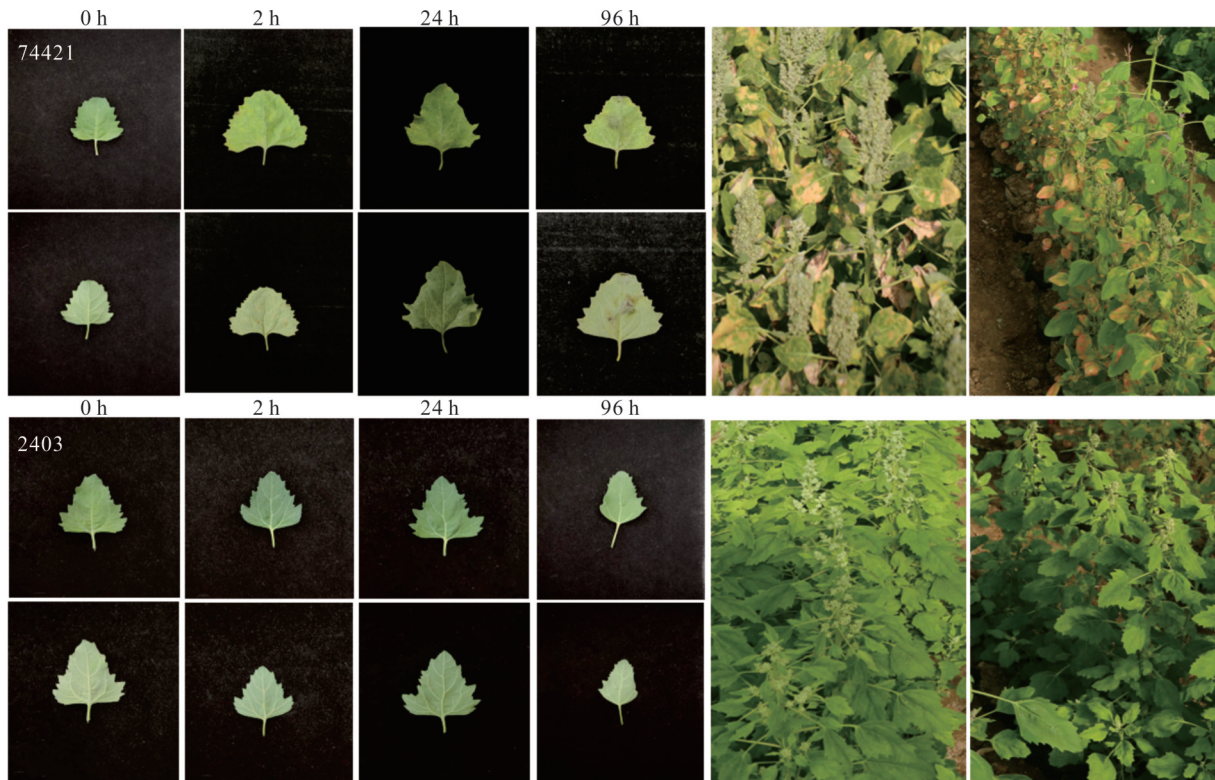


图 10 藜麦材料 2403 和 74421 感染霜霉病菌情况

Fig. 10 The infection status of *C. quinoa* materials 2403 and 74421 with downy mildew fungus

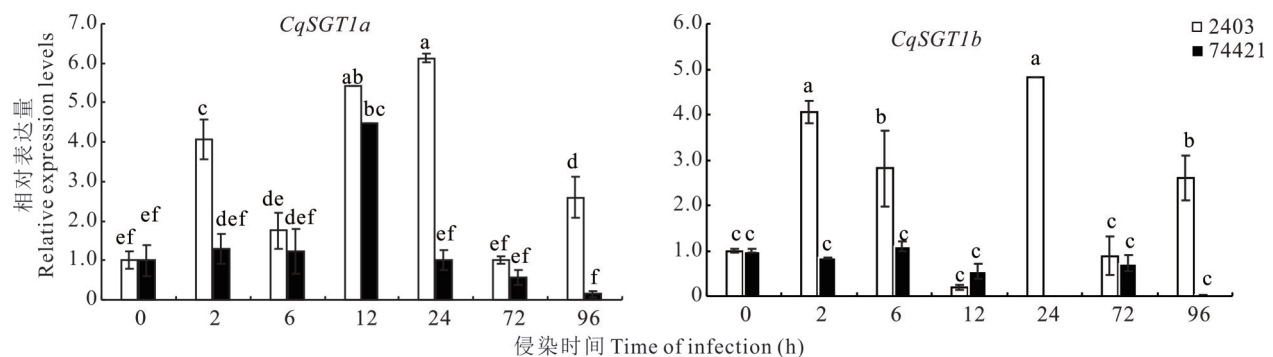


图 11 *CqSGT1a* 和 *CqSGT1b* 在霜霉病菌侵染下的表达模式

Fig. 11 Expression patterns of *CqSGT1a* and *CqSGT1b* under downy mildew infection

网站 String11.5: <https://version-11-5.string-db.org/> 搜索得到), 该蛋白通过位于“内质网腔/细胞核周围细胞质区域”的 Hsp70/Hsp90 等分子伴侣 (IPR037196、IPR020575 等保守域, CL4218/4336/4338/4237/4240) 完成“蛋白折叠、去折叠蛋白结合、ATP 依赖的蛋白稳定 (GO:0006457、GO:0050821、GO:0051082、GO:0016887、GO:0005524)”, 并触发“热应激反应 (GO:0009408、GO:0034605)”; 与此同时还参与“内质网蛋白加工 (soe04141)”, 在植物中还与“植物-病原体互作 (soe04626)”交叉; 该网络可通过上调“白细胞介素-4 与-13” (Interleukin-4 and Interleukin-13, IL-4/IL-13) 信号 (MAP-6785807、MAP-449147)”, 参与“信号转导 (MAP-162582)”过程。

### 3 讨论

逆境胁迫严重威胁粮食安全, 深入解析植物逆境响应机制对于作物育种有着重要意义<sup>[27]</sup>。SGT1 作为信号转导元件在植物胁迫应答方面发挥重要作用, 其主要参与植物抗病信号转导、蛋白质加工受体调节以应对胁迫环境<sup>[27]</sup>。

本研究利用生物信息学手段,从藜麦全基因组数据库中共鉴定出2个SGT1基因成员,分布在Chr06和Chr07染色体上,靠近端粒,虽然SGT1基因未有明显扩张但也增强了藜麦对外界复杂多变环境的适应能力,为深入研究SGT1藜麦抵御反应和调节生长发育奠定基础。CqSGT1的翻译产物长度为358aa,基因结构、保守基序分析等保守性强,和花生SGT1基因有相似之处<sup>[28]</sup>。系统进化和保守结构域分析发现,该基因均具有1个CS、1个SGS和3个TPR结构,排列和长度十分保守,与苋科SGT1s蛋白的系统分类相一致,与同源物种菠菜进行蛋白互作分析时发现SGT1主要作为辅分子伴侣,与RAR1/HSP90形成三元复合体参与过敏性坏死(HR)反应<sup>[15]</sup>,与酵母双杂试验结果一致<sup>[29]</sup>,玉米(*Zea mays*)也如此<sup>[30]</sup>。SGT1在植物抗病过程中发挥正向调控作用,能够调节植物对多种病原体的免疫反应<sup>[31]</sup>。TaSGT1与Pst效应物PstSIE1互作,在小麦早期感染条锈菌阶段上调,参与抑制小麦防御<sup>[32]</sup>。VIGS沉默小麦SGT1基因后,由HSP90、SGT1和RAR1参与调控Lr21介导的小麦抗叶锈病抗性降低,抑制幼苗生长<sup>[33]</sup>;将OsSGT1基因敲除和超表达后,对稻曲病、稻瘟病和白叶枯病的抗性显著减弱和增强,表明OsSGT1广谱正调控水稻的抗病性<sup>[11]</sup>。SGT1-NSL1相互作用,干扰NPR1的核质运输,负调控水杨酸介导的防御<sup>[34]</sup>。RipAW和RipAWC177A在拟南芥中触发的免疫反应需要SGT1<sup>[35]</sup>。SGT1蛋白在响应外界胁迫和霜霉菌菌侵染的变化下,突出了SGT1在调节植物生理过程和防御反应方面的时空特征。本研究对藜麦中2个CqSGT1基因的非生物胁迫和霜霉菌菌侵染的表达模式进行了探究。SGT1作为稳定蛋白复合物的共同伴侣,在侵染早期病菌信号识别和抗病信号转导过程中发挥关键作用,qPCR技术分析发现霜霉菌菌侵染早期CqSGT1在抗病材料的相对表达量高于感病材料,推测两基因共同作用于一种调节方式,与烟草、拟南芥等模式作物一样,SGT1是SA

表6 藜麦品系间CqSGT1s的DNA变异  
Table 6 DNA variation of CqSGT1s among C. quinoa lines

基因 Gene	染色体位置 Chromosome location	Ref	Alt	JQ3	JQ6	Qingheili-8	Qingbaili-9	影响Effect(其他 突变系Other mutant lines)	改变的密码子 The changed codon
CqSGT1a	Chr06:34577463	GA	G	GA, GA	GA, GA	GA, GA	G, G	内含子Intron	GTa/Gat
CqSGT1b	Chr07:83675475	A	AT	N	A, AT	A, AT	N	上游Upstream	aAt/aAT
CqSGT1b	Chr07:83677523	A	AC	AC, AC	AC, AC	AC, AC	AC, AC	内含子Intron	aAc/aAC
CqSGT1b	Chr07:83679761	CA	C	C, C	C, C	C, C	CA, C	内含子Intron	cCA/cCa
CqSGT1b	Chr07:83679830	TTTGTT- GTTGTTG	T	TTTGTTGTTGTTG, TTTGTTGTTGTTG	N	TTTGTTGTT-	TTTGTTGTT- GTTG, T	内含子Intron	cTTTGTTGTTGTTGT/cTt
CqSGT1b	Chr07:83689890	A	ATAGCTGGCA-	A, A	A, ATAGCTG-	A, ATAGCTG-	A, ATAGCTGGCA	下游Downstream	aAt/aATAGCTGGCA-
			CAAACGGT-	CAAACGGT-	GCACAAACG-	GCACAAACG-	CAAACGGT-		CAAACGGTGCCTTGTt
			GCCTTGT	GCCTTGT	GTGCCCTTGT	GTGCCCTTGT	GCCTTGT		
CqSGT1b	Chr07:83690874	A	AT	AT, AT	A, A	A, A	N	下游Downstream	tAt/tAT
CqSGT1b	Chr07:83691319	G	GA	GA, GA	GA, GA	GA, GA	GA, GA	下游Downstream	acGaaa/acGAaa

Ref: 该位点在染色体上的位置; Alt: 该位点在测序数据中异于基因组的碱基类型; This site is different from the base type of the genome in the sequencing data; JQ3: JQ3中InDel变异位点的基因型 Genotype of the InDel variant site in JQ3; JQ6: JQ6中InDel变异位点的基因型 Genotype of the InDel variant site in JQ6; Qingheili-8: 青黑藜-8中InDel变异位点的基因型 Genotype of the InDel variant site in Qingheili-8; Qingbaili-9: 青白藜-9中InDel变异位点的基因型 Genotype of the InDel variant site in Qingbaili-9; Upstream: 转录起始位点上游1 kb的区域 1 kb region upstream of the transcription start site; Downstream: 转录终止位点下游2 kb的区域 2 kb region downstream of the transcription stop site.

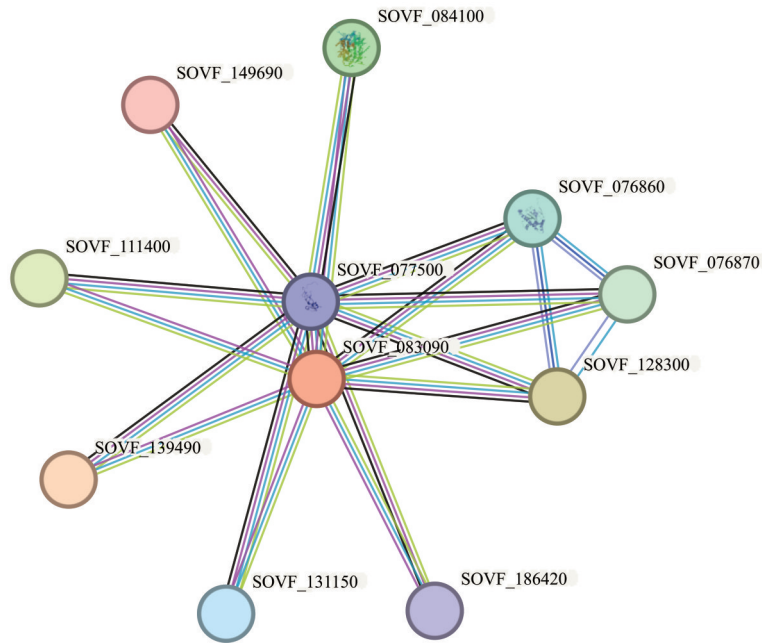


图 12 CqSGT1s 蛋白互作网络

Fig. 12 CqSGT1s protein interaction network

介导抗病途径中的重要调控蛋白,在植物抗病反应和系统获得抗性中发挥重要作用,其在藜麦与霜霉病菌互作过程中表达变化明显<sup>[36]</sup>。*CqSGT1a/b*在霜霉病菌侵染下不同的响应转录模式暗示 *SGT1a/b* 基因对藜麦霜霉病菌侵染的防御功能可能存在差异,推测 *CqSGT1a* 较 *CqSGT1b* 在抵御霜霉病过程中有优势。在接种霜霉病菌后,抗病材料 2403 未表现出任何感病迹象;而感病材料 74421 的病情严重程度则从淡黄色病斑发展至形成灰色霉层,与 *CqSGT1* 表达情况一致。*SGT1* 作为植物防卫反应信号的重要组件,在模式植物中通过基因沉默、突变体和转基因等试验也证明了 *SGT1* 与植物 R 基因介导的功能表达、超敏反应和非宿主抗性都有密切关系<sup>[10]</sup>,*SGT1* 基因的超表达会增强植株的某些抗病能力,超表达南瓜 (*Cucurbita moschata*) 的 *CmSGT1* 基因可以增强转基因烟草对白粉病 (powdery mildew) 的抗性<sup>[37]</sup>。同时 *SGT1* 也在植物调控非胁迫应答方面起着信号诱导功能<sup>[38]</sup>,受到亚细胞定位、应激条件的影响<sup>[39-41]</sup>。通过研究藜麦 *SGT1* 基因在低温和水杨酸 (SA) 胁迫条件下的表达模式,发现 *SGT1a/b* 在低温胁迫初期表达量上升,但随后受到抑制,整体表达水平低于平均值。而在水杨酸胁迫下,*CqSGT1* 的表达受到正向调控,早期显著增加,并在后期不同时间点表现出波动,这与 *CqSGT1* 响应霜霉病菌侵染的表达模式相似。据此推测,*CqSGT1* 可能作为正调控因子,通过调节 SA 信号通路中调控蛋白的富集来影响藜麦的生长发育和抗病反应相关基因的表达。在高粱 (*Sorghum bicolor*) 中,*SbSGT1* 的表达在不同胁迫条件下有所不同,SA 处理能够促进 *SbSGT1* 的表达,而生长素则在转录和翻译水平上抑制 *SbSGT1* 的表达<sup>[42]</sup>。拟南芥中 *SGT1* 与 HSP90 相互作用,促进了生长素 (indole-3-acetic acid, IAA)、茉莉酸 (JA) 等植物激素的生物合成与信号转导,从而增强了拟南芥的抗旱和抗盐能力<sup>[43-44]</sup>。在大豆中,*SGT1/RAR1/HSP90* 复合体的形成通过介导应激防御信号,调节植物体内的渗透平衡,从而增强了大豆的耐旱性和耐盐性<sup>[32]</sup>。通过过表达水稻 *OsSGT1* 基因,种子的萌发性能得到了显著提升。这一过程涉及对 *OsABI5* 的调节,并通过靶向 *OsAPX1*,介导了褪黑素 (melatonin, Mel) 对铬 (chromium, Cr) 胁迫下种子萌发的刺激效应,进而影响了水稻的抗氧化能力和耐逆性<sup>[43]</sup>。拟南芥 *HSC70/SGT1* 基因通过协同作用可减轻  $\gamma$  射线以及高盐胁迫造成的损伤<sup>[32]</sup>。藜麦 *CqSGT1* 基因展现了显著的组织特异性表达,其中 *CqSGT1a* 和 *CqSGT1b* 的表达模式相似,均以花中的表达量为最高,表明两基因可能在花的发育和生殖过程中发挥重要作用;茎、根次之,说明它们可能在茎和根的生长和功能中也具有重要作用;其中 *CqSGT1a* 在根中的高表达量明显高于 *CqSGT1b*,暗示两基因在根部的功能可能存在差异,*CqSGT1a* 可能在根部的某些特定功能中发挥更重要的作用。*CqSGT1a* 和 *CqSGT1b* 在 4 种基因型藜麦籽粒的表达上也表现出显著的差异,说明不同

基因型的藜麦可能具有不同的基因调控机制,导致这些基因在不同品种中的表达水平不同;特别均是在“黄藜”品种中表达量最高,可能协同作用,共同促进“黄藜”籽粒的优良品质(如营养成分、抗逆性等)形成;*CqSGT1a*的表达量显著高于*CqSGT1b*,表明*CqSGT1a*在籽粒的生长、发育、营养积累或抗逆性方面具有更关键的功能。这些讨论暗示了*CqSGT1*基因可能在藜麦的生殖器官形成和生长发育过程中扮演重要角色<sup>[2]</sup>,其中*CqSGT1a*似乎在这一过程中起着更为关键的作用。至于藜麦中*SGT1*在抵御霜霉病胁迫时所展现的抗病机制,目前尚不明确。未来的研究可以通过基因编辑或过表达等技术手段,进一步阐明*CqSGT1*的生物学功能以及在霜霉病菌感染下的调控机制,以提高藜麦的适应性和竞争力。

#### 4 结论

在藜麦基因组中共鉴定出2个*SGT1*基因,基因结构和保守基序高度保守,功能相似。*CqSGT1*在多处InDel变异位点发现核苷酸缺失和插入,未发生阅读框改变。*CqSGT1*表现出组织表达特异性,*CqSGT1a*在花和籽粒的生长发育过程中发挥重要作用,*CqSGT1b*则主要参与花的形成。*CqSGT1*能够响应低温、水杨酸胁迫和霜霉病菌诱导表达。

**致谢:**感谢山西农业大学植物保护学院李新风教授、谢宇杰和薛婧同学在试验材料方面给予的大力支持,田间采集感染霜霉病的藜麦叶片并收集菌粉,为本研究的顺利开展提供了重要帮助。

#### 参考文献 References:

- [1] Gómez-Caravaca A M, Iafelice G, Verardo V, *et al.* Influence of pearling process on phenolic and saponin content in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Food Chemistry*, 2014, 15(157): 174–178.
- [2] Jiang X D, Li X F, Hao Y P, *et al.* Gene cloning and express of squalene synthase and  $\beta$ -amyryn synthase from *Chenopodium quinoa*. *Soils*, 2018, 50(6): 1214–1221.  
姜晓东, 李新风, 郝艳平, 等. 藜麦 $\beta$ -香树酯醇合酶和鲨烯合酶基因的克隆与表达. *土壤*, 2018, 50(6): 1214–1221.
- [3] Jarvis D E, Ho Y S, Lightfoot D J, *et al.* The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature*, 2017, 542(7641): 307–312.
- [4] Bazile D, Fuentes F, Mujica A. Historical perspectives and domestication//Bhargava A. *Quinoa: botany, production and uses*. Wallingford: Centre for Agriculture and Bioscience International, 2013: 16–35.
- [5] Hinojosa L, González J A, Barrios-Masias F H, *et al.* Quinoa abiotic stress responses: a review. *Plants*, 2018, 7(4): 106.
- [6] Wang C. Study on resistance evaluation of quinoa germplasms to downy mildew and its resistance mechanisms. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2023.  
王昶. 藜麦种质对霜霉病的抗性评价及其抗病机理研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2023.
- [7] Wang C, Li M Q, Yang F R, *et al.* Diseases investigation and pathogen identification of quinoa downy mildew in Gansu Province. *Journal of Nuclear Agriculture*, 2023(3): 503–512.  
王昶, 李敏权, 杨发荣, 等. 甘肃藜麦霜霉病调查及其病原菌鉴定. *核农学报*, 2023(3): 503–512.
- [8] Yuan C L, Li C J, Zhao X B, *et al.* Genome-wide identification and characterization of HSP90-RAR1-SGT1-Complex members from *Arachis* genomes and their responses to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 689669.
- [9] Kitagawa K, Skowrya D, Elledge S J, *et al.* *SGT1* encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Molecular Cell*, 1999, 4(1): 21–33.
- [10] Wang K, Zhang Z Y. Progress in studying the function of *SGT1* in plant disease resistance response. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2008, 9(1): 115–118.  
王凯, 张增燕. *SGT1*在植物抗病反应中的功能研究进展. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(1): 115–118.
- [11] Zhang D L, Yang X X, Wen Z Y, *et al.* Proximate profiling reveals a conserved SGT1-NSL1 signaling module that activates NLR-mediated immunity. *Molecular Plant*, 2024, 17(9): 1369–1391.
- [12] Azevedo C, Sadanandom A, Kitagawa K, *et al.* The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science*, 2002, 295(5562): 2073–2076.
- [13] Wang K, Uppalapati S R, Zhu X H, *et al.* SGT1 positively regulates the process of plant cell death during both compatible and incompatible plant-pathogen interactions. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(5): 597–611.

- [14] Makoto I, Ohnishi K, Hikichi Y, *et al.* Molecular chaperons and co-chaperons, Hsp90, RAR1, and SGT1 negatively regulate bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Signaling & Behavior*, 2015, 10: e970410.
- [15] Kumar D, Kirt P B. Pathogen-induced SGT1 of *Arachis diogeni* induces cell death and enhanced disease resistance in tobacco and peanut. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13: 73–84.
- [16] Yu G, Xian L, Zhuang H Y, *et al.* SGT1 is not required for plant LRR-RLK-mediated immunity. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(1): 145–150.
- [17] Chen Z Q, Wu Q, Tong C, *et al.* Characterization of the roles of SGT1/RAR1, EDS1/NDR1, NPR1, and NRC/ADR1/NRG1 in *Sw-5b*-mediated resistance to tomato spotted wilt virus. *Viruses*, 2021, 13(8): 1447.
- [18] Shanmugam A, Thamilarasan S K, Park J I, *et al.* Characterization and abiotic stress-responsive expression analysis of *SGT1* genes in *Brassica oleracea*. *Genome*, 2016, 59: 243–251.
- [19] Berens M L, Berry H M, Mine A, *et al.* Evolution of hormone signaling networks in plant defense. *Annual Review of Phytopathology*, 2017, 55(1): 401–425.
- [20] Váczy K Z, Otto M, Gomba-Tóth A, *et al.* *Botrytis cinerea* causes different plant responses in grape (*Vitis vinifera*) berries during noble and grey rot: diverse metabolism versus simple defence. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1433161.
- [21] Yu G, Xian L, Xue H, *et al.* A bacterial effector protein prevents MAPK-mediated phosphorylation of SGT1 to suppress plant immunity. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(9): e1008933.
- [22] Peart J R, Lu R, Sadanandom A, *et al.* Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(16): 10865–10869.
- [23] Zhu X D, Yang L F, Chen Y Y, *et al.* Biological functional analysis of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) *FeSGT1* gene in enhancing drought stress resistance. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(6): 1573–1583.  
朱旭东, 杨兰锋, 陈媛媛, 等. 甜荞 *FeSGT1* 基因克隆及抗旱功能解析. *作物学报*, 2023, 49(6): 1573–1583.
- [24] Agarwal G, Garg V, Kudapa H, *et al.* Genome-wide dissection of AP2/ERF and HSP90 gene families in five legumes and expression profiles in chickpea and pigeonpea. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14: 1563–1577.
- [25] Zou C S, Chen A J, Xiao L H, *et al.* A high-quality genome assembly of quinoa provides insights into the molecular basis of salt bladder-based salinity tolerance and the exceptional nutritional value. *Cell Research*, 2017, 27(11): 1327–1340.
- [26] Xie Y J, Xue J, Jiang X D, *et al.* Screening of reference genes in *Chenopodium quinoa* under *Peronospora variabilis* stress and verification of their stability. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2024, 53(2): 191–198.  
解宇洁, 薛婧, 姜晓东, 等. 霜霉病菌胁迫下藜麦内参基因的筛选及其稳定性验证. *福建农林大学(自然科学版)*, 2024, 53(2): 191–198.
- [27] Koua A P, Oyiga B C, Baig M M, *et al.* Breeding driven enrichment of genetic variation for key yield components and grain starch content under drought stress in winter wheat. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 684205.
- [28] Meldau S, Baldwin I T, Wu J Q. For security and stability: SGT1 in plant defense and development. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(10): 1479–1482.
- [29] Holt B F, Belkhadir Y, Dangl J L. Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science*, 2005, 309(5736): 929–932.
- [30] Muskett P, Parker J. Role of *SGT1* in the regulation of plant R gene signaling. *Microbes and Infection*, 2003, 5(11): 969–976.
- [31] Chen X Y, Li X B, Duan Y H, *et al.* A secreted fungal subtilase interferes with rice immunity via degradation of suppressor of G2 allele of *skp1*. *Plant Physiology*, 2022, 190(2): 1474–1489.
- [32] Wang Y Q, Liu C, Du Y Y, *et al.* A stripe rust fungal effector PstSIE1 targets TaSGT1 to facilitate pathogen infection. *The Plant Journal*, 2022, 112(6): 1413–1428.
- [33] Steven S R, Huang L, Brandt A S, *et al.* Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the *Lr21*-mediated leaf rust resistance pathway. *Plant Physiology*, 2005, 138(4): 2165–2173.
- [34] Li X B. Functional characterization of subtilisin-like protease family genes in *Ustilagoidea virens*. Changsha: Central China Agricultural University, 2022.  
李夏冰. 稻曲菌枯草杆菌蛋白酶家族基因功能研究. 长沙: 华中农业大学, 2022.

- [35] Ouyang X, Chen J L, Sun Z M, *et al.* Ubiquitin E3 ligase activity of *Ralstonia solanacearum* effector RipAW is not essential for induction of plant defense in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1201444.
- [36] Zhang C L, Xu D C, Jiang X C. Improvement of disease resistance of sugar beet by molecular breeding. *China Beet & Sugar*, 2008(2): 23–26.  
张春来, 徐德昌, 姜孝成. 分子育种提高甜菜抗病性. *中国甜菜糖业*, 2008(2): 23–26.
- [37] Guo W L, Chen B H, Guo Y Y, *et al.* Improved powdery mildew resistance of transgenic *Nicotiana benthamiana* overexpressing the *Cucurbita moschata* *CmSGT1* gene. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 955.
- [38] Forner-Giner M Á, Rodríguez-Gamir J, Primo-Millo E, *et al.* Hydraulic and chemical responses of citrus seedlings to drought and osmotic stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2011, 30(3): 353–366.
- [39] Luna C M, Pastori G M, Driscoll S, *et al.* Drought controls on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and *CAT* gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(411): 417–423.
- [40] Baczek-Kwinta R, Filek W, Grzesiak S, *et al.* The effect of soil drought and rehydration on growth and antioxidative activity in flag leaves of triticale. *Biologia Plantarum*, 2006, 50(1): 55–60.
- [41] Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, *et al.* Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(15): 4197–4220.
- [42] Jiang J M, Chen J T, Luo L, *et al.* Expression analysis reveals that sorghum disease resistance protein SbSGT1 is regulated by auxin. *Biology*, 2022, 11(1): 67.
- [43] Li R Q, Zheng W Y, Yang R F, *et al.* OsSGT1 promotes melatonin-ameliorated seed tolerance to chromium stress by affecting the OsABI5-OsAPX1 transcriptional module in rice. *The Plant Journal*, 2022, 112(1): 151–171.
- [44] Noël L D, Cagna G, Stuttmann J, *et al.* Interaction between SGT1 and cytosolic/nuclear HSC70 chaperons regulates *Arabidopsis* immune responses. *Plant Cell*, 2007, 19(12): 4061–4076.