

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.54105

甘蔗 CLC 基因家族鉴定与表达分析

杨宗桃^{1,2} 杨 婷^{1,2} 王禹童^{1,2} 艾 静^{1,2} 李燕桦^{1,2} 刘家勇^{1,2}
邓 军^{1,2} 赵 勇^{1,2,*} 张跃彬^{1,2}

¹ 热带作物生物育种全国重点实验室, 云南昆明 650000; ² 云南省农业科学院甘蔗研究所, 云南开远 661699

摘 要: 氯离子通道(chloride channel, CLC)基因家族在植物液泡硝酸盐储存过程中发挥关键作用, 但其在复杂基因组作物甘蔗中尚未被系统鉴定。本研究基于割手密(*Saccharum spontaneum*)基因组数据, 鉴定出 29 个 *SsCLC* 基因, 分布于 21 条染色体上, 可分为 6 个亚族(Group a、Group c、Group d、Group e、Group f 和 Group g)。基因结构和 motif 分析表明该家族成员较为保守。共线性分析显示, *SsCLC* 基因家族主要通过全基因组/片段复制事件扩增, 并受到纯化选择。启动子顺式作用元件分析表明, *SsCLC* 富含激素响应(50.00%)、生长发育(42.86%)及胁迫响应(7.14%)等相关元件。以割手密 82-1 及其 3 个杂交后代为材料, 农艺性状调查显示杂交后代在茎径、叶长、锤度、鲜重和干重上均显著优于亲本; 转录组与 qRT-PCR 分析发现, 75.86% 的 *SsCLC* 基因(22/29)在杂交种根中表达上调。本研究首次系统鉴定了 *SsCLC* 基因家族, 揭示了其在杂交种根中普遍上调的表达模式与优良农艺性状密切相关, 为解析甘蔗“高贵化”过程中的氮素高效利用机制提供了重要基因资源。

关键词: 甘蔗; CLC 基因家族; 转录组学; 表达分析; 氮素

Identification and expression analysis of the CLC gene family in sugarcane

Yang Zong-Tao^{1,2}, Yang Ting^{1,2}, Wang Yu-Tong^{1,2}, Ai Jing^{1,2}, Li Yan-Ye^{1,2}, Liu Jia-Yong^{1,2}, Deng Jun^{1,2}, Zhao Yong^{1,2,*}, and Zhang Yue-Bin^{1,2}

¹ National Key Laboratory for Biological Breeding of Tropical Crops, Kunming 650000, Yunnan, China; ² Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan 661699, Yunnan, China

Abstract: The chloride channel (CLC) gene family plays a crucial role in nitrate storage within plant vacuoles. However, its characteristics remain largely unexplored in the complex genome of sugarcane. In this study, we systematically identified 29 *CLC* genes (*SsCLCs*) from the *Saccharum spontaneum* genome. These *SsCLCs* were distributed across 21 chromosomes and phylogenetically classified into six subgroups (Groups a, c, d, e, f, and g). The gene family exhibited conserved structures and motif compositions. Genomic collinearity analysis indicated that the expansion of *SsCLC* was mainly driven by whole-genome or segmental duplication events under strong purifying selection. Promoter analysis revealed a high abundance of *cis*-acting elements associated with hormone responses (50.00%), growth and development (42.86%), and stress responses (7.14%). Furthermore, in a comparison between *S. spontaneum* Yunnan 82-1 and its three hybrid progenies, the hybrids exhibited significant improvements in key agronomic traits, including stalk diameter, leaf length, brix, fresh weight, and dry weight. Consistently, transcriptome and qRT-PCR analyses showed that 75.86% (22 out of 29) of the *SsCLC* genes were upregulated in the roots of the hybrids. This study presents the first comprehensive genomic characterization of the *SsCLC* gene family and highlights its potential role in improving

本研究由云南省科技厅科技计划农业联合专项(202301BD070001-213), 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-17), 云南种子种业联合实验室项目(202205AR070001-13), 云南省农业科学院科研预研项目(2024KYZX-02)和“兴滇英才支持计划”云岭学者专项(XDYC-YLXZ-2022-0038)资助。

This study was supported by the Yunnan Provincial Department of Science and Technology Science and Technology Plan Agricultural Joint Special Project (202301BD070001-213), the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-17), the Yunnan Seed Industry Joint Laboratory Project (202205AR070001-13), the Pre-research Project of Yunnan Academy of Agricultural Sciences (2024KYZX-02), and the Project of Supporting Talents in Xingdian-Yunling Scholars Special Project (XDYC-YLXZ-2022-0038).

* 通信作者(Corresponding author): 赵勇, E-mail: 18087395132@163.com

第一作者联系方式: E-mail: fafuyangzongtao@163.com

Received (收稿日期): 2025-09-01; Accepted (接受日期): 2025-11-18; Published online (网络出版日期): 2025-12-03.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20251203.1005.002>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

nitrogen use efficiency during sugarcane nobilization through root-specific gene upregulation, thereby offering valuable genetic resources for breeding nitrogen-efficient sugarcane cultivars.

Keywords: sugarcane; CLC gene family; transcriptomics; expression analysis; nitrogen

氮素不仅是影响作物生长发育的关键矿质元素,也是调控代谢平衡的重要信号分子^[1-4]。在甘蔗生产中,氮素对产量及品质具有重要影响^[5]。植物对硝酸盐的吸收与利用依赖于多种转运蛋白,其中氯离子通道蛋白(chloride channel protein, CLC)广泛参与 Cl⁻和 NO₃⁻跨膜运输,维持细胞离子平衡以及各种胁迫响应^[6-10]。CLC 基因已在多种植物基因组中被鉴定并进行功能解析^[10-18],迄今,CLC 基因家族的功能已在拟南芥中得到深入解析。如 *AtCLCa* 作为液泡膜的 NO₃⁻/H⁺反向转运体,直接调控液泡中硝酸盐的积累^[19-21];而其他成员如 *AtCLCg* 与 *AtCLCc* 在盐胁迫下调节氯离子稳态^[22-25]。同时,CLC 基因的功能多样性在玉米、水稻、柑橘、大豆等作物中得到证实^[26-30]。

甘蔗作为全球重要的糖料作物和经济作物,其基因组庞大且高度多倍化,遗传背景极为复杂;SsCLC 基因家族未被系统鉴定,功能更是未知。甘蔗产量的提升与其“高贵化”育种过程中氮素吸收利用效率的改良密切相关^[31-33]。但甘蔗基因组的高度复杂性严重制约了相关基因的挖掘与功能研究,使得我们对调控氮高效利用的分子机制,特别是 CLC 这类关键转运蛋白如何贡献于优良种质的形成,知之甚少。因此,深入开展 CLC 基因功能的研究,对提升甘蔗氮素利用效率具有重要作用。

本研究综合利用生物信息学与生物学方法,首次在甘蔗割手密(*Saccharum spontaneum*)全基因组水平系统鉴定了 CLC 基因家族,解析其进化特征与表达模式。研究进一步以割手密种云南 82-1 及其具有优良农艺性状的杂交后代为材料,通过关联分析 SsCLC 基因在根系中的表达与氮素利用相关的表型,旨在揭示该家族在“高贵化”育种过程中的潜在作用,为后续克隆与验证调控甘蔗氮高效利用的关键基因奠定基础,并为甘蔗高产高糖育种提供新的基因资源。

1 材料与方法

1.1 SsCLC 基因家族鉴定与分析

从数据库 (https://www.life.illinois.edu/ming/downloads/Spontaneum_genome/) 下载甘蔗割手密

(*Saccharum spontaneum* AP85-441)的基因组序列及注释文件^[34]。从 Pfam 蛋白家族数据库 (<https://pfam.xfam.org/>)中下载 CLC 功能结构域的隐马尔科夫模型文件(PF00654)进行筛选分析。此外,利用 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)工具对 Pfam 的结果再次验证,筛选包含完整 CLC 结构域的序列作为 SsCLC 基因家族成员。使用 ExPASy 网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)^[35]进行序列理化性质预测。使用 WoLFPSORT 程序(<https://wolfpsort.hgc.jp/>)^[36]进行亚细胞定位预测。

1.2 SsCLC 基因家族的聚类分析

从 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>)、Ensembl Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>)等数据库下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)和大豆(*Glycine max*)的 CLC 蛋白序列。使用 MEGA6.0 软件中的 ClustalW 进行多序列比对,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。参数设置如下: Bootstrap 重复次数为 1000 次,其余参数为默认。

1.3 基因结构与保守基序

使用在线工具 Multiple-Em-for-Motif-Elicitation (MEME)版本 5.0.5 鉴定 SsCLC 蛋白的保守基序 (<http://meme-suite.org/tools/meme>),采用默认参数^[37],使用 Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)进行基因结构分析预测^[38]。然后使用 TBtools 软件整合可视化系统发育树、保守基序和基因结构结果^[39]。

1.4 启动子顺式作用元件分析

通过 TBtools v2.326 软件的 Sequence Toolkit 提取 SsCLC 基因上游 2000 bp 序列作为启动子,在 PlantCARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[40]进行启动子顺式作用元件预测,然后用 TBtools v2.326 软件中的 HeatMap 进行可视化。

1.5 SsCLC 基因染色体定位及共线性分析

从基因组注释文件中获取 SsCLC 基因的染色体位置信息,并用 TBtools 作图。使用 MCScanX 软件分析 SsCLC 基因家族的复制事件^[39]。利用 TBtools

中的 Advanced Circos 功能绘制种内共线性图。为分析物种间同源关系,从 Ensembl Plants 数据库下载水稻、玉米和高粱的基因组数据,并使用 TBtools 中的 One Step MCScanX 功能进行共线性分析,参数设置为默认参数^[41]。

1.6 基于转录组的基因表达谱分析

基于课题组构建的割手密种云南 82-1 及与其具有血缘关系的杂交种 N1、N2、N3 的根样本的转录组数据,分析 *SsCLC* 基因在不同甘蔗品种中的表达模式。转录组数据参照割手密基因组^[34]进行注释。利用 Ttools v2.326 软件的 HeatMap 实现基因表达谱数据的可视化。

1.7 总 RNA 提取和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)分析

使用 TRIzol (Invitrogen)试剂分别提取割手密种云南 82-1 及与其具有血缘关系的杂交种 N1、N2、N3 材料的根部总 RNA,使用 Evo-MLV 反转录试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,中国),参照其说明书,将 RNA 反转录成 cDNA。根据甘蔗 *SsCLC* 基因序列,设计特异性实时荧光定量 PCR 引物(附表 1),以供试材料的 cDNA 为模板,以 25S *rRNA* (附表 1)为内参基因^[42],使用 SYBR Green PCR Master Mix Kit (南京诺唯赞生物科技股份有限公司,中国)试剂盒,参照其说明书配制反应体系。使用 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司,美国)进行 PCR 扩增,反应程序为 50℃ 2 min; 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。每个样品设置 3 次重复。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 算法进行基因表达水平分析^[43],使用 R 软件对基因表达差异进行显著性分析。

1.8 农艺性状调查

在相同田间管理条件下,测定割手密种云南 82-1 及其杂交种 N1、N2、N3 的株高、茎径、叶长、叶片数、锤度以及根、叶、全株的鲜重和干重等农艺性状。每个品种测量 8 株,数据以平均值表示,并用 R 软件进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *SsCLC* 基因家族的聚类分析

基于割手密基因组数据,共鉴定到 29 个非冗余的 *SsCLC* 成员。通过构建 *SsCLC* 与水稻(*Oryza sativa*)^[17]、小麦(*Triticum aestivum* L.)^[15]、拟南芥(*Arabidopsis*

thaliana)^[24]、大豆(*Glycine max*)^[15]中 *CLC* 成员的系统进化树(图 1),将 29 个 *SsCLC* 蛋白划分为 6 个亚族,分别为 Group a (3 个, 10.34%)、Group c (8 个, 27.59%)、Group d (4 个, 13.79%)、Group e (2 个, 6.90%)、Group f (7 个, 24.14%)和 Group g (5 个, 17.24%)。值得注意的是,Group c 和 Group f 的成员数量在割手密中出现了显著扩张,而 Group b 未在割手密中鉴定出成员(图 1)。

2.2 *SsCLC* 基因家族的基本特征

从割手密基因组中共鉴定到 29 个非冗余的 *SsCLC* 家族成员(图 1)。对其编码蛋白的理化性质分析表明(附表 2),其氨基酸长度在 352~1240 aa 之间,分子量在 36.98~132.22 kD 之间,理论等电点(isoelectric point, pI)在 5.91~9.65 之间。不稳定指数分析显示,大多数蛋白为稳定蛋白(不稳定指数 < 40),而 Group e 和 Group f 的部分成员(如 *SsCLC*-e1, e2, f1, f6, f7)为不稳定蛋白(不稳定指数 > 40)。除 *SsCLC*-f7 为亲水性蛋白外,其余 28 个成员均为疏水性蛋白。亚细胞定位预测显示,绝大多数 *SsCLC* 蛋白定位于质膜,其中 *SsCLC*-e2、*SsCLC*-f1、*SsCLC*-f6 和 *SsCLC*-f7 还被预测可能同时定位于叶绿体或线粒体中。

2.3 *SsCLC* 基因的染色体定位

从割手密 AP85-441 基因组数据库检索鉴定出 *SsCLC* 基因的染色体分布信息,并用 TBtools 软件对结果进行可视化处理。*SsCLC* 基因分布于 21 条染色体上。定位于 Chr. 4A 染色体上的 *SsCLCs* 基因最多,共有 3 个;定位于 Chr. 1A、Chr. 3B、Chr. 4B、Chr. 5B/C/D 染色体上的 *SsCLC* 基因各有 2 个;而定位于 Chr. 1B/C、Chr. 3A、Chr. 3D、Chr. 4C/D、Chr. 5A、Chr. 6A/B/C/D、Chr. 8B/C/D 染色体上 *SsCLC* 基因仅有 1 个(图 2)。

2.4 基因结构与蛋白保守基序

基因结构与保守结构域分析显示, *SsCLC* 蛋白均包含 1 个高度保守的 Motif 3 (图 3)。Group a、Group c、Group d、Group e、Group g 的成员均包含 4~5 个 Motif, 而 Group f 的成员 Motif 组成差异较大,其中 *SsCLC*-f1、f6、f7 仅包含 Motif 3。基因结构分析显示, *SsCLC* 基因的内含子数量变异较大,介于 0~22 个之间。同一亚族内的基因结构通常相似,而不同亚族间差异明显,例如,Group d 的 *SsCLC*-d3 含有 22 个内含子,而 Group f 的 *SsCLC*-f1 则无内含子(图 3)。

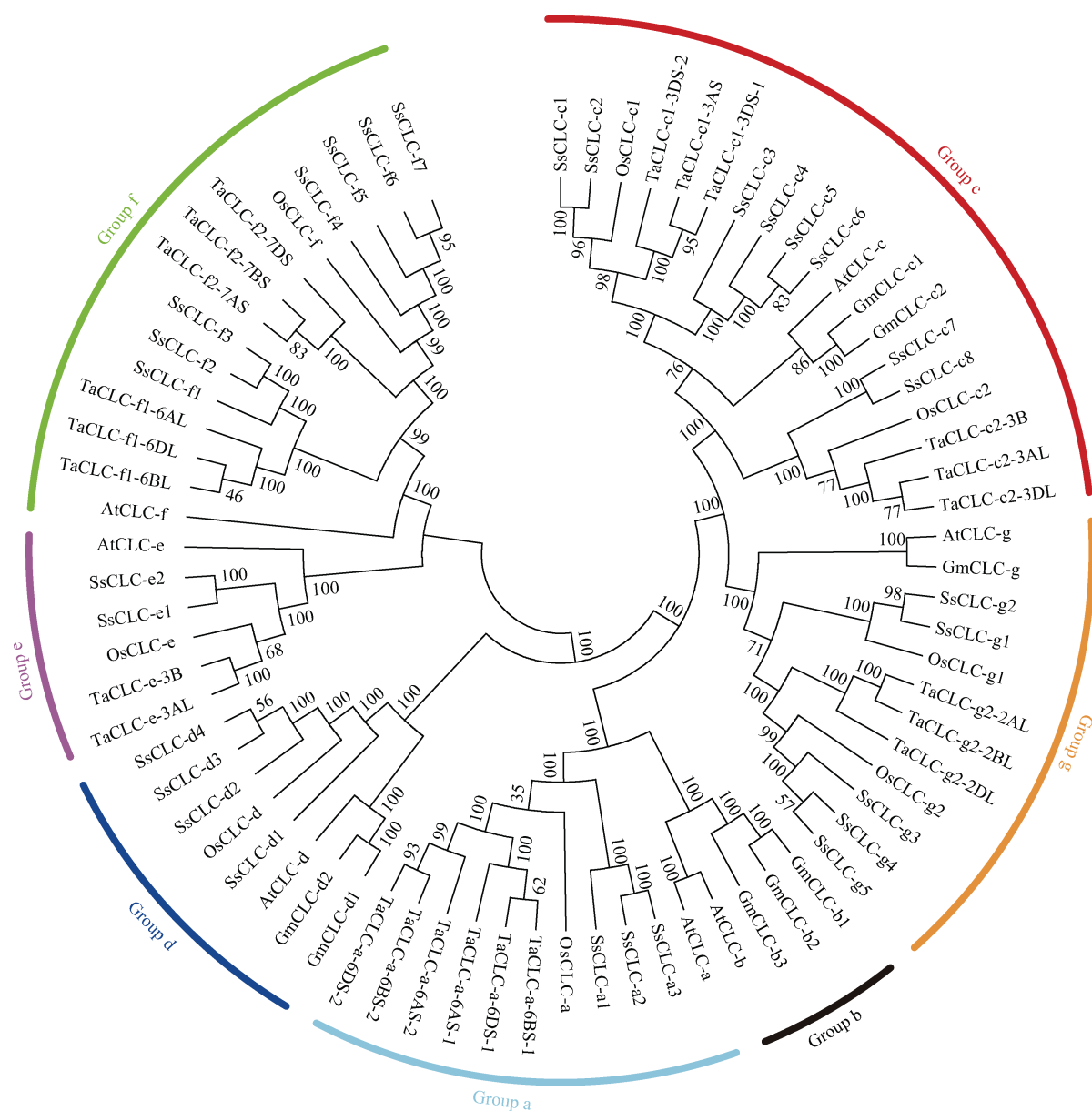


图1 水稻、小麦、拟南芥、大豆与 *SsCLC* 蛋白的系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of CLC proteins in *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* L., *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, and *Saccharum spontaneum*

不同分组的颜色标识如下: 分组 a (青色), 分组 b (黑色), 分组 c (红色), 分组 d (蓝色), 分组 e (紫色), 分组 f (绿色), 分组 g (棕色)。

Groups are represented by the following colors: Group a (cyan), Group b (black), Group c (red), Group d (blue), Group e (purple), Group f (green), and Group g (brown).

2.5 启动子顺式作用元件分析

对 *SsCLC* 基因启动子区 2000 bp 序列的分析发现, 共鉴定到 14 类与非生物胁迫、激素响应及生长发育相关的顺式作用元件(图 4)。其中, 激素响应元件占比最高(50.00%), 尤其以茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)响应元件(CGTCA-motif, TGACG-motif, 96.55%)和脱落酸(abscisic acid, ABA)响应元件(abscisic acid-responsive element, ABRE, 86.21%)

最为普遍。其次为生长发育及组织特异性表达元件(42.86%), 如光响应元件(G-box, 93.10%)和分生组织表达相关元件(CAT-box, 68.97%)。胁迫响应元件占比最少(7.14%), 包括厌氧诱导、防御与应激响应等元件(图 4)。

2.6 *SsCLC* 基因的复制类型与共线性分析

基因家族通过全基因组复制事件、片段复制、串联重复而进化, 同时也伴随基因家族的扩增^[44]。

复制类型分析表明, 58.63%的 *SsCLC* 基因复制类型为全基因组复制/片段复制(whole-genome duplication/segmental, WGD/Segmental), 30.03%的 *SsCLC*

基因的复制类型为分散重复(dispersed); 10.34%的 *SsCLC* 基因的复制类型为非重复基因(singleton), 而串联重复(tandem)和近端重复(proximal)复制类型没

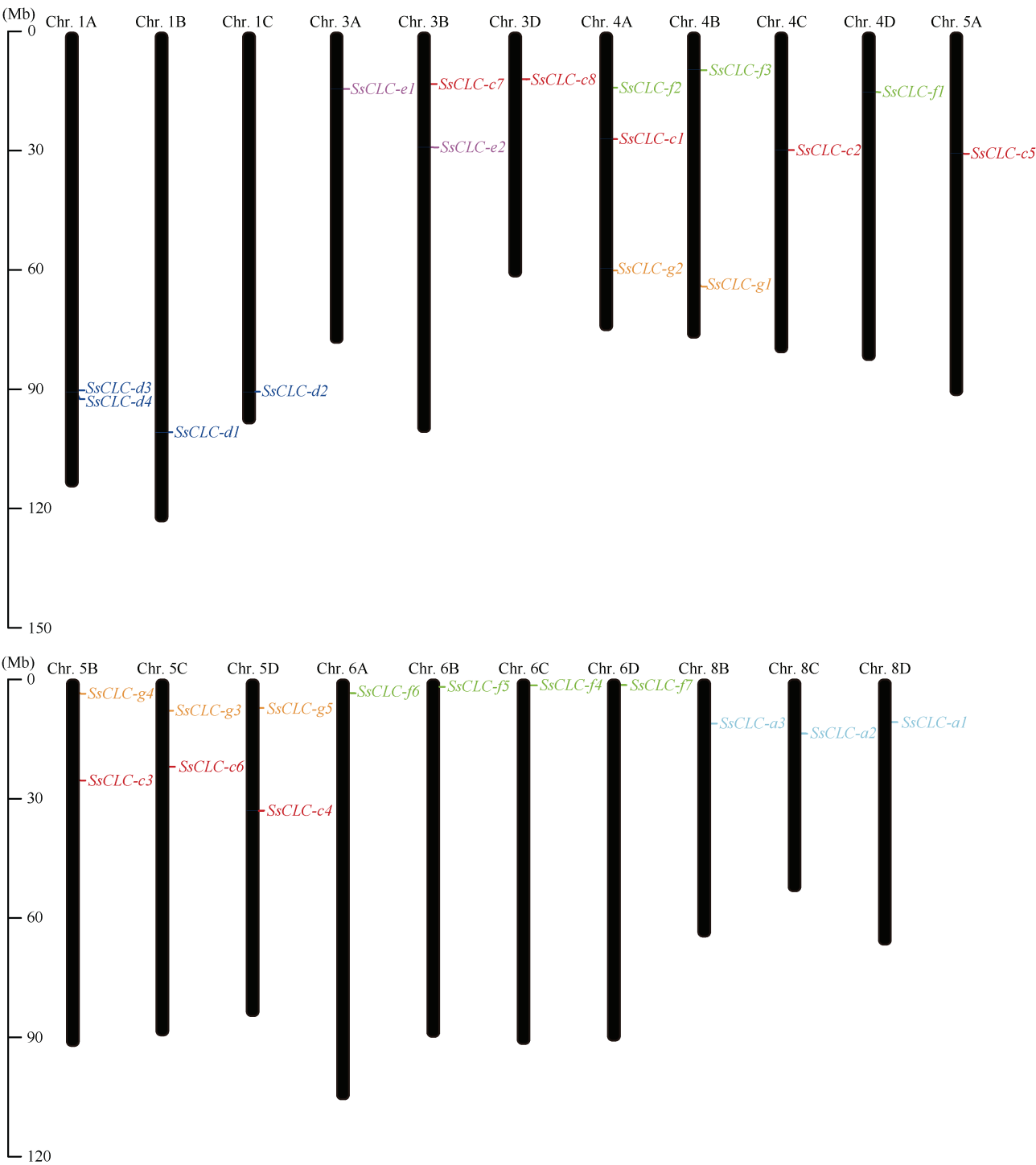


图 2 *SsCLC* 基因的染色体定位

Fig. 2 Chromosomal distribution of *SsCLC* genes

不同分组的颜色标识如下: 分组 a (青色), 分组 c (红色), 分组 d (蓝色), 分组 e (紫色), 分组 f (绿色), 分组 g (棕色)。
Groups are represented by the following colors: Group a (cyan), Group c (red), Group d (blue), Group e (purple), Group f (green), and Group g (brown).

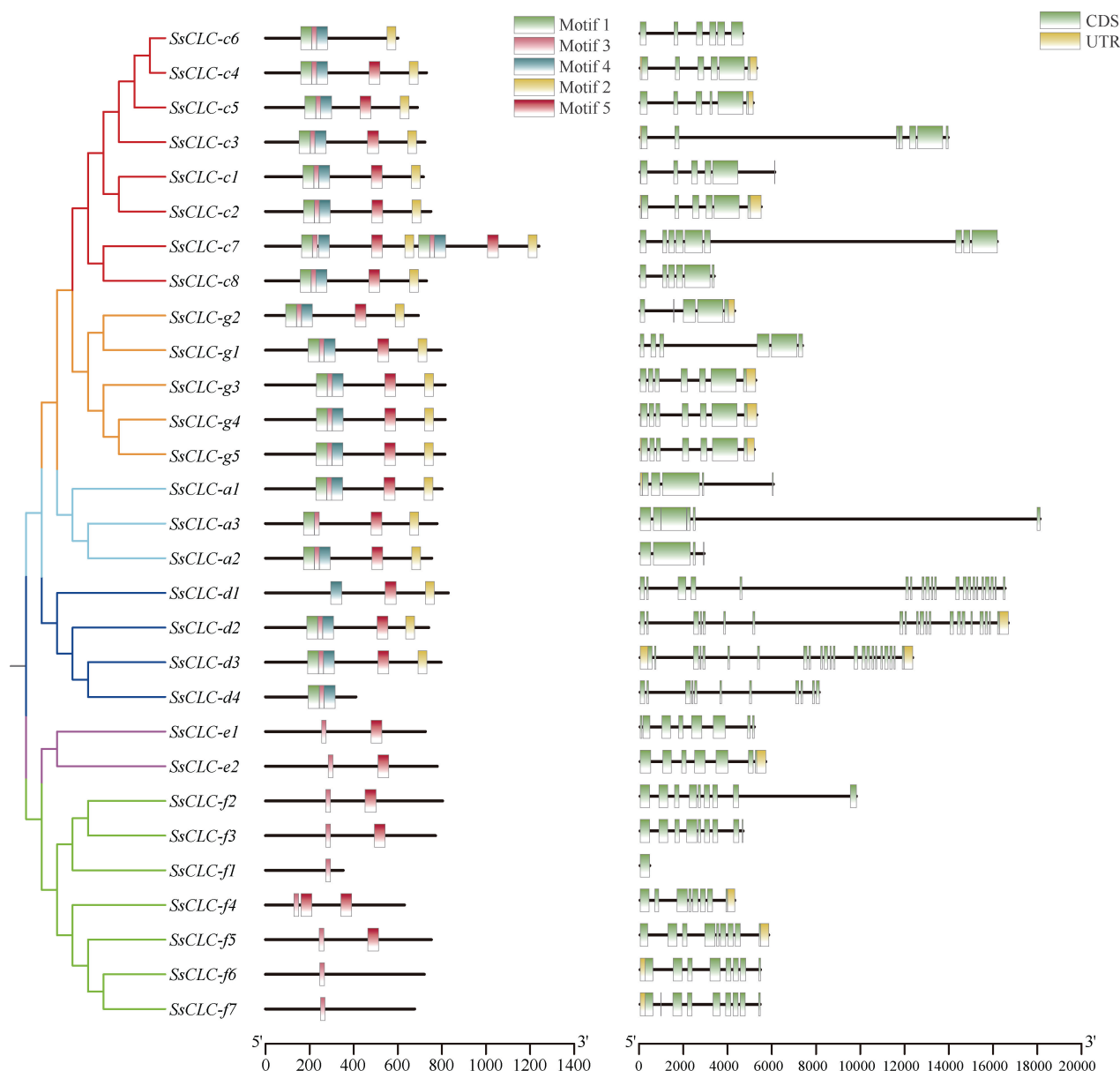


图 3 *SsCLC* 基因的保守基序与基因结构

Fig. 3 Conserved motifs and gene structures of *SsCLC* genes

左侧为 *SsCLC* 基因家族成员进化树, 各分组由不同颜色的线条表示, 分别为分组 a (青色), 分组 c (红色), 分组 d (蓝色), 分组 e (紫色), 分组 f (绿色), 分组 g (棕色); CDS: 编码序列; UTR: 非编码区。

The phylogenetic tree of *SsCLC* gene family members is depicted on the left, where colored lines represent different groups: Group a (cyan), Group c (red), Group d (blue), Group e (purple), Group f (green), and Group g (brown); CDS: coding sequence; UTR: non coding region.

有出现在 *SsCLC* 基因中(图 5-A)。所有基因对的 K_a/K_s 均小于 1 (图 5-B)。共线性分析在割手密种内鉴定出 10 对 *SsCLC* 基因对。其中 Group a、Group c、Group d、Group f 和 Group g 分别有 1 对、2 对、1 对、5 对和 1 对同源 *SsCLC* 基因对(图 5-C)。在割手密与水稻、玉米、高粱之间分别鉴定出 21、26 和 32 对共线性基因对(图 6)。

2.7 杂交后代农艺性状分析

对割手密亲本云南 82-1 及其杂交后代 N1、N2、

N3 的农艺性状调查发现, 杂交种在茎径、叶长、锤度、单株总鲜重、根鲜重及其干重等性状上均显著高于亲本(图 7)。然而, 云南 82-1、N1、N2、N3 的株高和叶片数性状无显著差异(图 7-B, E)。

2.8 *SsCLC* 基因在根中的表达分析

基于根转录组数据的表达热图显示, 75.86% 的 *SsCLC* 基因(22/29)在杂交种根中的表达水平高于亲本。其中, *SsCLC-c3*、*SsCLC-c5*、*SsCLC-c6*、*SsCLC-d4*、*SsCLC-g4*、*SsCLC-g5*、*SsCLC-f6* 和

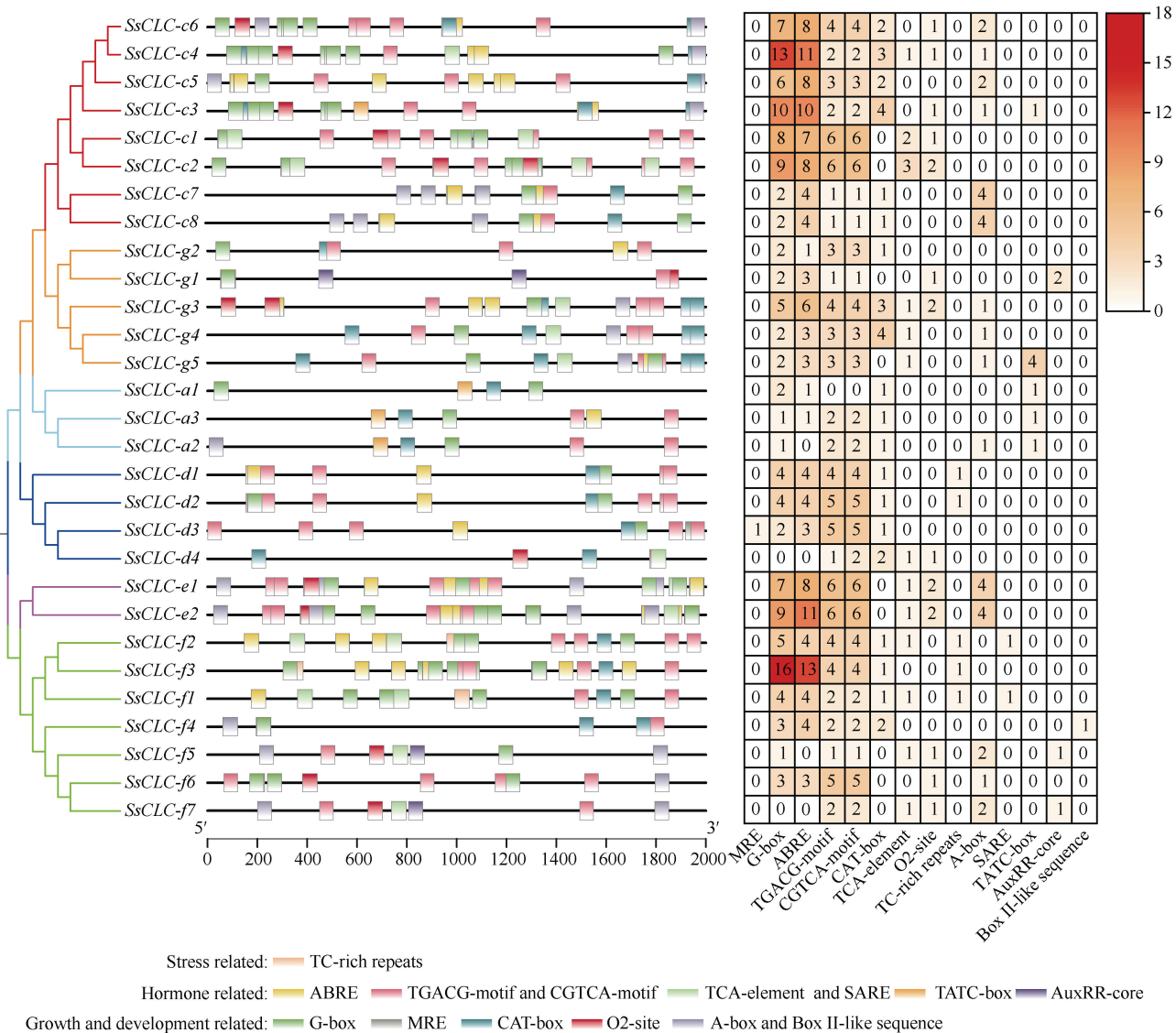
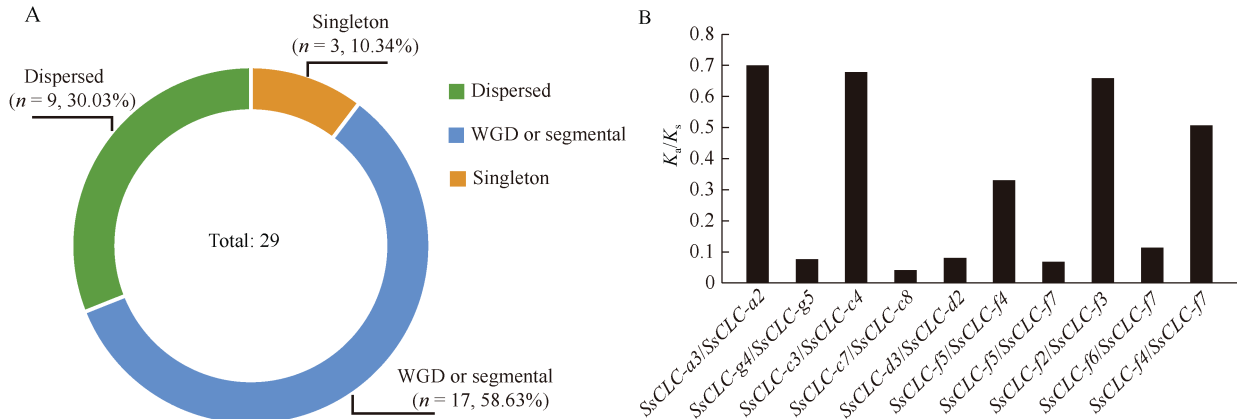


图 4 *SsCLC* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 4 Analysis of cis-acting elements in the promoters of *SsCLC* genes

左侧为 *SsCLC* 基因家族成员进化树，各分组由不同颜色的线条表示，分别为分组 a (青色)，分组 c (红色)，分组 d (蓝色)，分组 e (紫色)，分组 f (绿色)，分组 g (棕色)。
The phylogenetic tree of *SsCLC* gene family members is depicted on the left, where colored lines represent different groups: Group a (cyan), Group c (red), Group d (blue), Group e (purple), Group f (green), and Group g (brown).



(图 5)

C

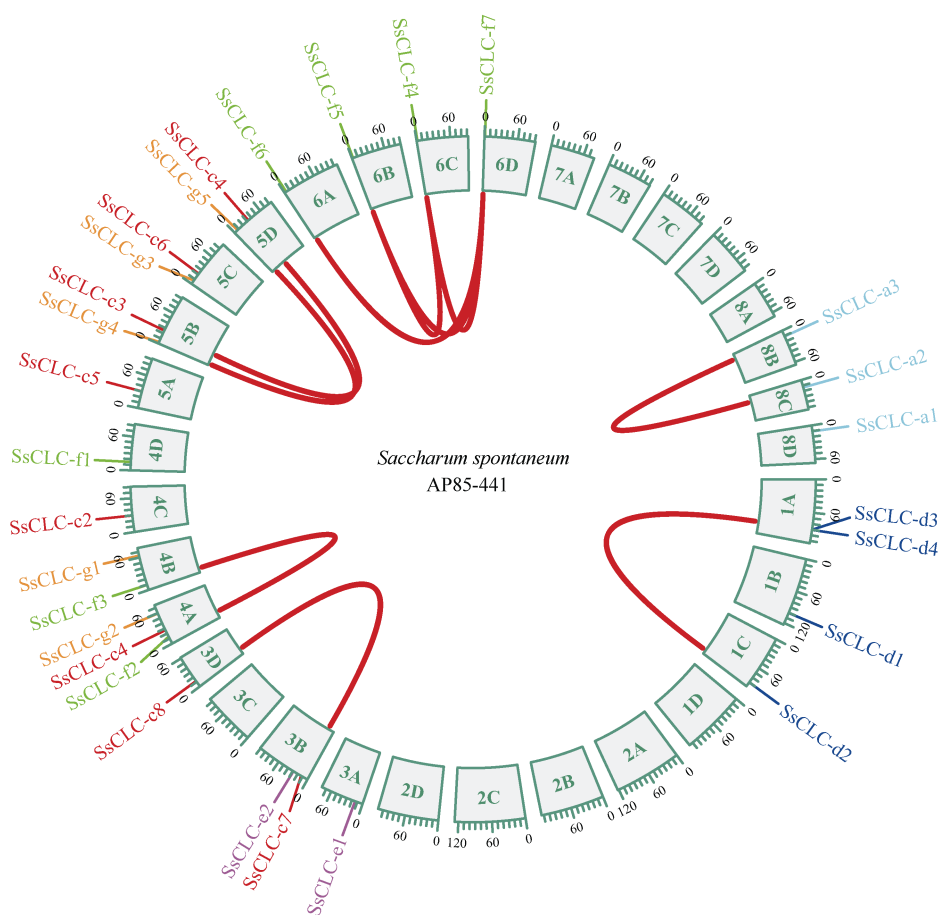
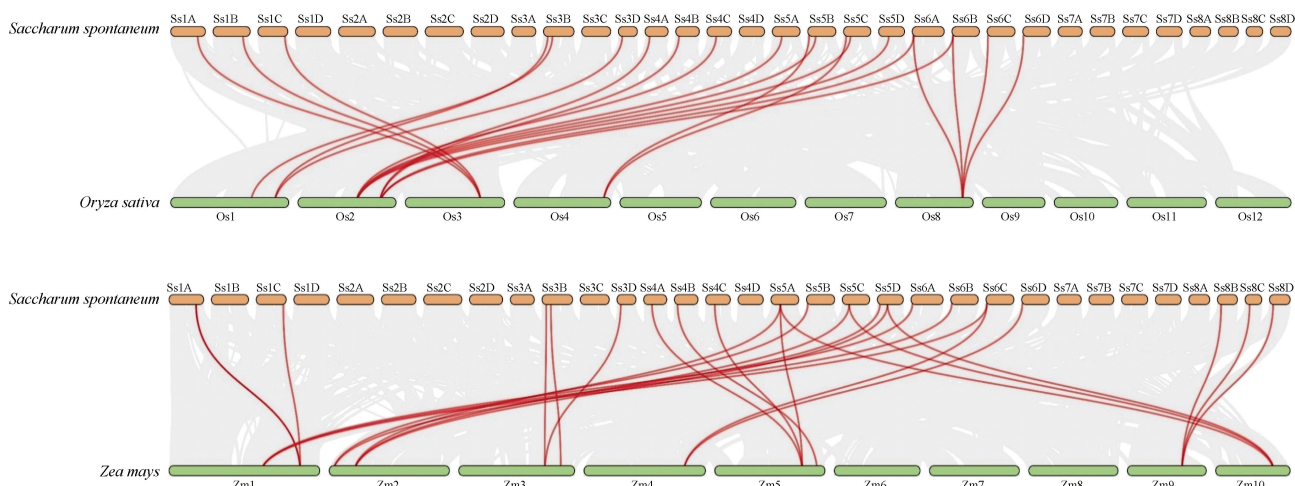
图 5 *SsCLC* 基因的复制类型、 K_a/K_s 及共线性分析**Fig. 5 Duplication types, K_a/K_s , and collinearity analysis of *SsCLC* genes**

图 A 中, n 表示各复制类型的基因数目, 百分比为其在 *SsCLC* 基因家族中的占比。图 C 中的红色线条指示共线性基因对, 而不同颜色的字体则代表不同的进化分组: 分组 a (青色), 分组 c (红色), 分组 d (蓝色), 分组 e (紫色), 分组 f (绿色), 分组 g (棕色)。

In Figure A, n indicates the number of genes for each duplication type, and the percentage represents its proportion within the *SsCLC* gene family. In Figure C, the red lines connect collinear gene pairs, while the differently colored fonts represent distinct evolutionary groups: Group a (cyan), Group c (red), Group d (blue), Group e (purple), Group f (green), and Group g (brown).



(图 6)

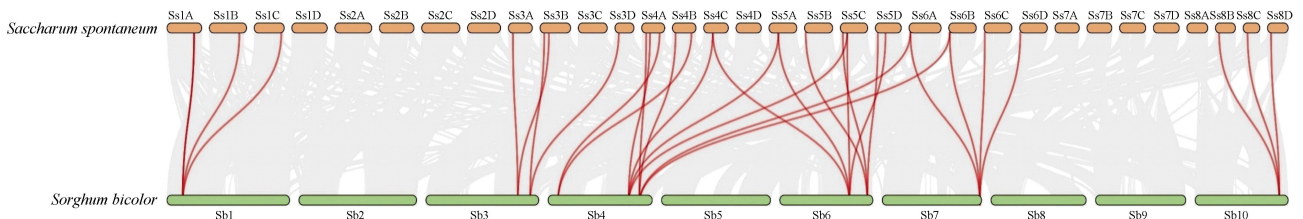


图 6 甘蔗与水稻、玉米、高粱 *CLC* 基因的共线性分析

Fig. 6 Synteny analysis of *CLC* genes between sugarcane and *Oryza sativa*, *Zea mays*, and *Sorghum bicolor*

图中染色体命名如下: Ss1A、Os1、Zm1 和 Sb1 分别指代割手密 1A 染色体、水稻 1 号染色体、玉米 1 号染色体和高粱 1 号染色体。其他染色体缩写均依此规则生成。

Chromosome labels are as follows: Ss1A represents chromosome 1A of *Saccharum spontaneum*, Os1 represents chromosome 1 of *Oryza sativa*, Zm1 represents chromosome 1 of *Zea mays*, and Sb1 represents chromosome 1 of *Sorghum bicolor*. All other chromosome abbreviations follow the same naming principle.

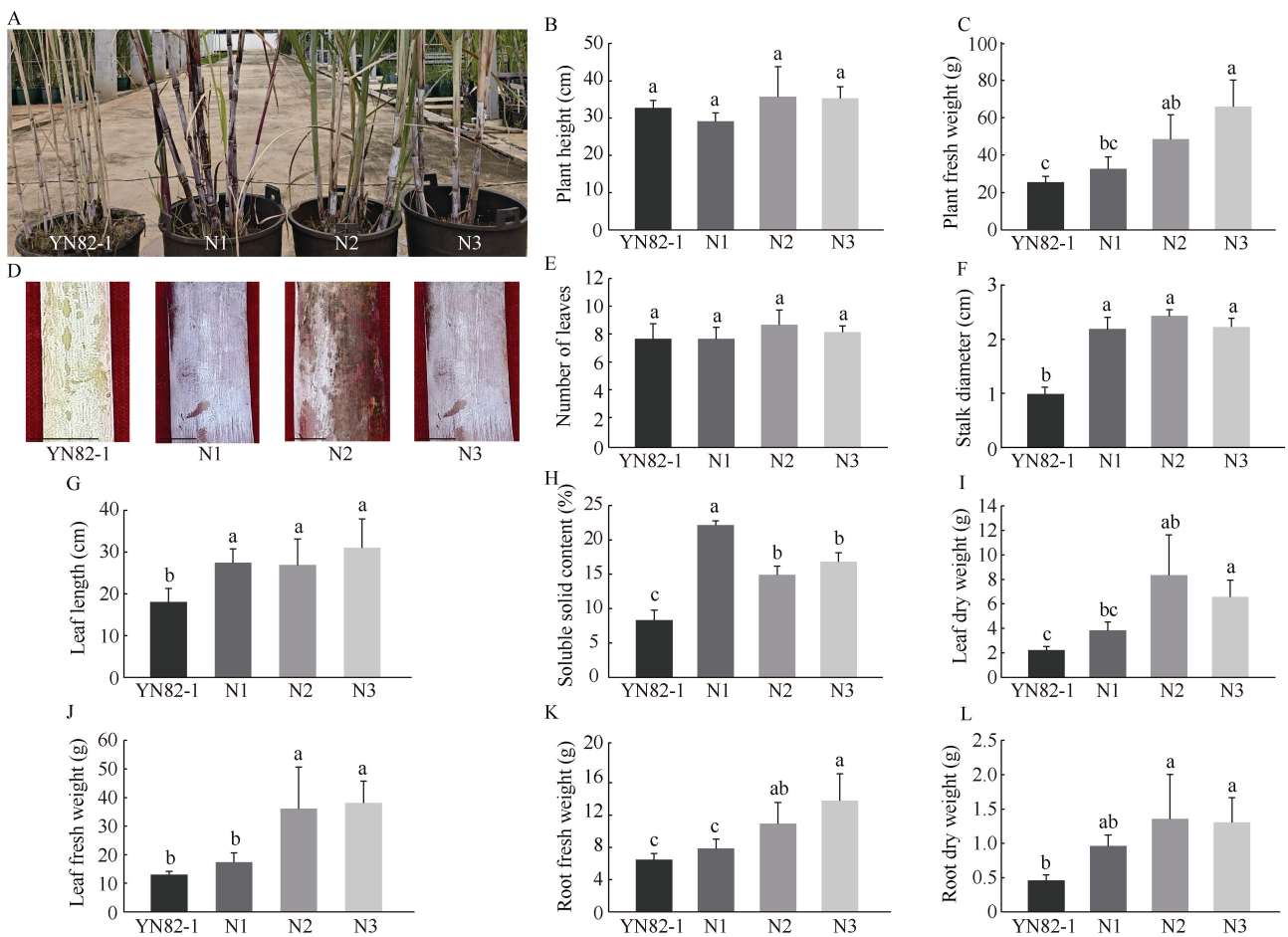


图 7 割手密种云南 82-1 及其杂交种农艺性状比较

Fig. 7 Comparison of agronomic traits between *S. spontaneum* Yunnan 82-1 and its hybrids

YN82-1 表示割手密种云南 82-1。N1、N2、N3 分别指以 YN82-1 为亲本, 通过多代杂交培育出的 3 个独立后代品系。误差线为每组处理的标准误差 ($n = 3$)。柱上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平显著性差异。

YN82-1 represents the *Saccharum spontaneum* clone Yunnan 82-1. N1, N2, and N3 refer to three independent descendant lines developed through multiple generations of hybridization using YN82-1 as the parental line. Error bars represent the standard error of each treatment group ($n = 3$). Bars with different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

SsCLC-f7 在 3 个杂交种中均一致上调表达(图 8)。qRT-PCR 验证结果与转录组趋势一致, 并进一步揭示在杂交种 N3 中 79.31% (23/29) 的基因表达量显著上调(图 9)。例如, Group a 中的 *SsCLC-a3* 在杂交种

N3 中的表达量是亲本的 30 倍以上(图 9-A); Group c 和 Group d 中的大部分成员在杂交种中表达上调(图 9-B, C); Group e 的 2 个成员仅在杂交种 N3 中显著上调(图 9-E)。

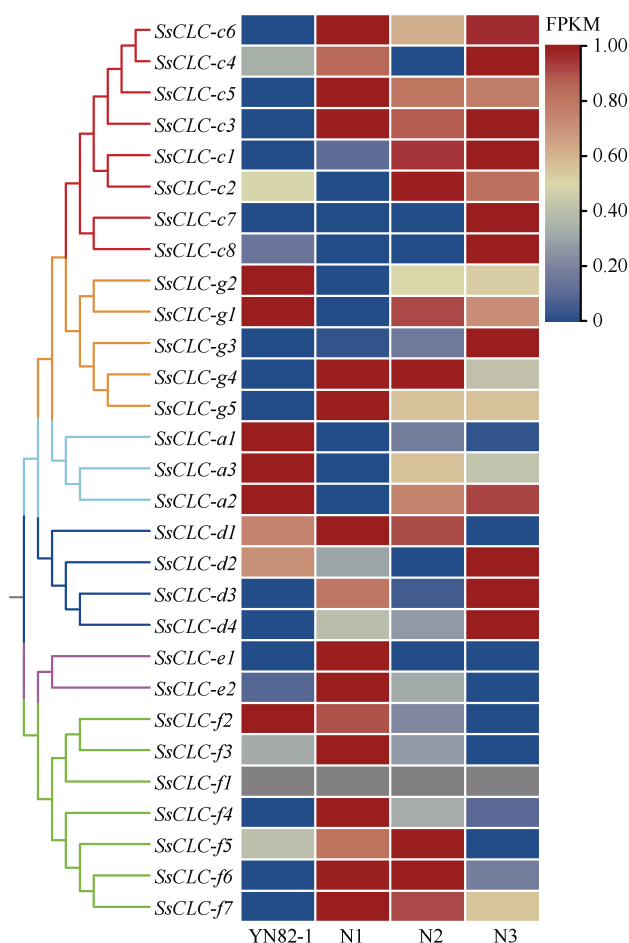


图8 基于转录组的 *SsCLC* 基因在根中的表达热图

Fig. 8 Heatmap of *SsCLC* genes expression in roots based on transcriptome data

左侧为 *SsCLC* 基因家族成员进化树, 不同颜色代表不同分组, 青色、红色、蓝色、紫色、绿色和棕色线条分别代表分组 a、分组 c、分组 d、分组 e、分组 f 和分组 g; FPKM 表示 0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00, 由蓝变红, 数值越大, 颜色越红, 表明表达量越高。

The left panel depicts the phylogenetic tree of the *SsCLC* gene family. The clades are differentiated by colored lines: cyan, red, blue, purple, green, and brown correspond to Group a, Group c, Group d, Group e, Group f, and Group g, respectively. FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) values of 0, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, and 1.00 are represented by a color gradient from blue to red, with deeper red indicating higher expression levels.

3 讨论

合理施用氮肥是提高甘蔗产量的关键农艺措施, 而氮肥利用效率低下是制约甘蔗产业可持续发展的核心问题^[1-3]。挖掘甘蔗氮素高效利用的关键基因并解析其功能, 对甘蔗遗传改良具有重要意义。目前, 甘蔗氮素转运蛋白研究主要集中于 NRT 和 AMT 家族^[3,45-47], 而负责液泡硝酸盐储存的 *CLC* 基因在甘蔗中的研究仍较少。本研究在甘蔗割手密

种中鉴定到 29 个 *CLC* 家族成员, 其数量远多于二倍体模式植物拟南芥^[23] (7 个) 和水稻^[15] (8 个)。这与甘蔗复杂的多倍体基因组背景相吻合^[34]。系统进化分析将其分为 6 个亚族, 其中, Group c 和 Group f 的成员数量表现出显著扩张(图 1), 推测其可能在甘蔗中演化出更复杂的硝酸盐转运与调控功能。共线性和基因复制事件分析进一步表明, *SsCLC* 基因家族扩增主要源于全基因组/片段复制(WGD / Segmental)事件, 所有复制基因对均受到纯化选择($K_a/K_s < 1$) (图 5-B)。说明 *SsCLC* 基因家族在进化过程中受到强烈的纯化选择, 从而保留了重要的生物学功能。启动子顺式作用元件分析发现, *SsCLC* 启动子区域富含茉莉酸甲酯、脱落酸等激素响应元件以及光响应元件, 暗示其表达可能受到激素与光周期的双重调控, 进而协同调控甘蔗的氮素吸收, 生长发育及逆境适应。

作物杂交育种常常通过整合亲本优良等位基因, 实现产量与养分效率的协同提升。在甘蔗“高贵化”育种过程中, 杂交后代往往表现出显著的生物量与糖分优势, 但其背后氮素高效利用的分子机制尚不明确^[31-33]。本研究通过比较割手密亲本云南 82-1 及其 3 个杂交后代(N1、N2、N3)的农艺性状, 发现杂交种在茎径、叶长、锤度、单株鲜重与干重等指标上均显著优于亲本, 表明杂交种在生长势与物质积累方面具有明显优势。为进一步解析其氮高效利用的分子基础, 本研究聚焦于根系中 *SsCLC* 基因的表达模式。转录组与 qRT-PCR 分析结果显示, 绝大多数 *SsCLC* (75.86%~79.31%) 基因在根系中的表达上调(图 8 和图 9)。其中, Group c 和 Group f 中多个扩张基因(如 *SsCLC-c3*、*SsCLC-c5*、*SsCLC-c6*、*SsCLC-f6*、*SsCLC-f7* 等)在 3 个杂交种中均一致上调表达。这一表达模式与杂交种优良农艺性状密切相关, 暗示 *SsCLC* 基因可能作为关键调控模块, 协同促进了杂交种根系中硝酸盐的储存与转运。已有研究表明, 液泡膜定位的 *CLC* 蛋白(如 *AtCLCa*)通过介导 NO_3^-/H^+ 交换, 调控液泡硝酸盐积累, 从而维持细胞质氮稳态并为植物生长提供持续氮源^[19-21]。本研究中, 杂交种根系中多个 *SsCLC* 基因的上调表达, 可能增强了硝酸盐向液泡的转运与储存能力, 既避免了细胞质中氮信号过载引发的反馈抑制, 又为甘蔗快速生长提供了稳定的氮素供应, 最终实现生物量与糖分积累的同步提升。

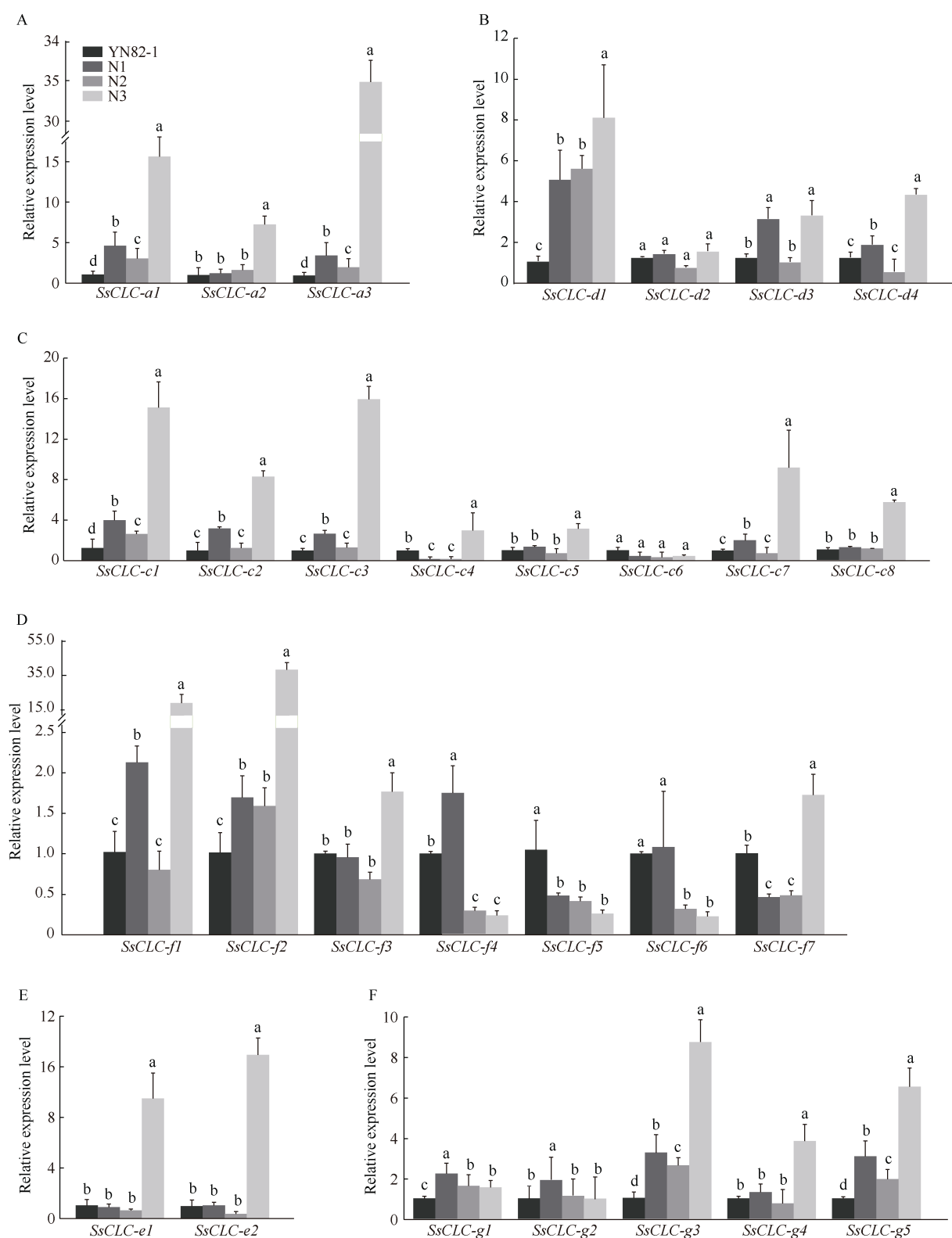


图 9 qRT-PCR 验证 *SsCLC* 基因在根中的相对表达量

Fig. 9 Relative expression levels of *SsCLC* genes in roots validated by qRT-PCR

缩写同图 7。误差线为每组处理的标准误差 ($n = 3$)。柱上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平显著性差异。

Abbreviations are the same as those given in Fig. 7. Error bars represent the standard error of each treatment group ($n = 3$). Bars with different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

4 结论

从甘蔗割手密基因组中鉴定到 29 个 CLC 基因家族成员, 该家族可分为 6 个亚族, 其在进化上保守, 主要通过 WGD/片段复制扩增并受纯化选择。本研究发现, Group c 和 Group f 亚族在割手密中发生了显著扩张, 且该家族成员尤其是这些扩张基因, 在具有优良农艺性状的杂交种根系中普遍上调表达。SsCLC 基因启动子区富含激素、光和胁迫响应元件, 暗示其功能多样。杂交种甘蔗在生物量和锤度上均显著优于割手密亲本。转录组和 qRT-PCR 分析表明, 绝大多数 SsCLC 基因在杂交种根中显著上调表达。综合结果表明, SsCLC 基因可能在杂交种根系氮素吸收、储存与利用中发挥重要作用, 其高效表达是甘蔗“高贵化”过程中氮效率提升的重要分子基础之一。后续研究可进一步利用基因编辑技术(如 CRISPR/Cas9)创制割手密中扩张显著的 Group c 或 Group f 关键基因的突变体, 或在水稻、拟南芥等模式植物中异源超量表达这些候选基因, 直接验证其在调控氮素吸收、分配及耐低氮胁迫中的生物学功能。本研究为深入解析甘蔗氮代谢机制及育种改良提供了重要的候选基因。

附表 请见网络版: 1) 本刊网站 <http://zwxb.chinacrops.org/>; 2) 中国知网 <http://www.cnki.net/>; 3) 万方数据 <http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx>。

References

- [1] Yang Y Y, Gao S W, Jiang Y, et al. The physiological and agronomic responses to nitrogen dosage in different sugarcane varieties. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 406.
- [2] Liu Y L, Duan X L, Zhao X D, et al. Diverse nitrogen signals activate convergent ROP2-TOR signaling in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2021, 56: 1283–1295.
- [3] Hui Q L, Song T, Yang D T, et al. Identification and characterization of key genes for nitrogen utilization from *Saccharum spontaneum* sub-genome in modern sugarcane cultivar. *Int J Mol Sci*, 2025, 26: 226.
- [4] Wang Y Y, Cheng Y H, Chen K E, et al. Nitrate transport, signaling, and use efficiency. *Annu Rev Plant Biol*, 2018, 69: 85–122.
- [5] Bell M J, Garside A, Halpin N V, et al. Interactions between rotation breaks, tillage and N management on sugarcane grown at Bundaberg and Ingham. In: Bruce R C, eds. 32nd Conference of the Australian Society of Sugar Cane Technologists. Bundaberg, Qld., Australia Australian Society of Sugar Cane Technologists, 2010. pp 119–139.
- [6] Park E, Campbell E B, MacKinnon R. Structure of a CLC chloride ion channel by cryo-electron microscopy. *Nature*, 2017, 541: 500–505.
- [7] Sun H J, Shen L L, Qin Y X, et al. CLC-Nt1 affects *Potato Virus Y* infection via regulation of endoplasmic reticulum luminal Ph. *New Phytol*, 2018, 220: 539–552.
- [8] Wei Q J, Liu Y Z, Zhou G F, et al. Overexpression of CsCLC, a chloride channel gene from poncirus trifoliata, enhances salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31: 1548–1557.
- [9] Wang S, Su S Z, Wu Y, et al. Overexpression of maize chloride channel gene ZmCLC-d in *Arabidopsis thaliana* improved its stress resistance. *Biol Plant*, 2015, 59: 55–64.
- [10] Liu X, Pi B Y, Pu J W, et al. Genome-wide analysis of chloride channel-encoding gene family members and identification of CLC genes that respond to Cl⁻/salt stress in upland cotton. *Mol Biol Rep*, 2020, 47: 9361–9371.
- [11] Xing A Q, Ma Y C, Wu Z C, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the CLC superfamily genes in tea plants (*Camellia sinensis*). *Funct Integr Genomics*, 2020, 20: 497–508.
- [12] Lurin C, Geelen D, Barbier-Brygoo H, et al. Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel. *Plant Cell*, 1996, 8: 701–711.
- [13] Hechenberger M, Schwappach B, Fischer W N, et al. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J Biol Chem*, 1996, 271: 33632–33638.
- [14] Zhou G A, Qiu L J. Identification and functional analysis on abiotic stress response of soybean Cl⁻ channel gene GmCLCn1. *Agric Sci China*, 2010, 9: 199–206.
- [15] Mao P J, Run Y H, Wang H H, et al. Genome-wide identification and functional characterization of the chloride channel TaCLC gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front Genet*, 2022, 13: 846795.
- [16] Ma J, Li S, Zaman S, et al. CLC gene family in *Solanum lycopersicum*: genome-wide identification, expression, and evolutionary analysis of tomato in response to salinity and Cd stress. *Front Plant Sci*, 2025, 16: 1547723.
- [17] von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Dynowski M, et al. CLC-b-mediated NO₃⁻/H⁺ exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51: 960–968.
- [18] Zifarelli G, Pusch M. CLC transport proteins in plants. *FEBS Lett*, 2010, 584: 2122–2127.
- [19] Wege S, Jossier M, Filleur S, et al. The proline 160 in the selectivity filter of the *Arabidopsis* NO₃⁻/H⁺ exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta. *Plant J*, 2010, 63: 861–869.
- [20] De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, et al. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, 2006, 442: 939–942.
- [21] Hodin J, Lind C, Marmagne A, et al. Proton exchange by the vacuolar nitrate transporter CLCa is required for plant growth and nitrogen use efficiency. *Plant Cell*, 2023, 35: 318–335.
- [22] Jossier M, Kroniewicz L, Dalmas F, et al. The *Arabidopsis* vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance. *Plant J*, 2010, 64: 563–576.
- [23] Guo W, Zuo Z L, Cheng X, et al. The chloride channel family

- gene *CLCd* negatively regulates pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2014, 65: 1205–1215.
- [24] Marmagne A, Vinauger-Douard M, Monachello D, et al. Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *J Exp Bot*, 2007, 58: 3385–3393.
- [25] Nguyen C T, Agorio A, Jossier M, et al. Characterization of the chloride channel-like, AtCLCg, involved in chloride tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57: 764–775.
- [26] 曾廷儒, 张静, 张登峰, 等. 玉米 *ZmCLCa* 基因克隆及其对氮素吸收的功能验证. *植物遗传资源学报*, 2017, 18: 112–116.
- Zeng T R, Zhang J, Zhang D F, et al. Cloning of *ZmCLCa* gene in maize and its functional characterization of nitrogen absorption. *J Plant Genet Resour*, 2017, 18: 112–116 (in Chinese with English abstract).
- [27] Nakamura A, Fukuda A, Sakai S, et al. Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol*, 2006, 47: 32–42.
- [28] Song J F, Han M Y, Zhu X Y, et al. MhCLC-c1, a Cl channel c homolog from *Malus hupehensis*, alleviates NaCl-induced cell death by inhibiting intracellular Cl⁻ accumulation. *BMC Plant Biol*, 2023, 23: 306.
- [29] Wei Q J, Gu Q Q, Wang N N, et al. Molecular cloning and characterization of the chloride channel gene family in trifoliate orange. *Biol Plant*, 2015, 59: 645–653.
- [30] Wei P P, Wang L C, Liu A L, et al. GmCLC1 confers enhanced salt tolerance through regulating chloride accumulation in soybean. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1082.
- [31] 周慧文, 陆桂军, 吴建明, 等. 中国甘蔗种业发展研究进展. *广西科学*, 2023, 30(3): 421–433.
- Zhou H W, Lu G J, Wu J M, et al. Research progress of sugarcane seed industry in China. *Guangxi Sci*, 2023, 30(3): 421–433 (in Chinese with English abstract).
- [32] Lu G L, Liu P R, Wu Q B, et al. Sugarcane breeding: a fantastic past and promising future driven by technology and methods. *Front Plant Sci*, 2024, 15: 1375934.
- [33] Zhan J, Zhou Y F, Yang L S, et al. Low ammonium and high nitrate input improves nitrogen use efficiency and growth in sugarcane through coordinated reprogramming of nitrogen and carbon metabolism. *Plant Physiol Biochem*, 2025, 229: 110354.
- [34] Zhang J S, Zhang X T, Tang H B, et al. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. *Nat Genet*, 2018, 50: 1565–1573.
- [35] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31: 3784–3788.
- [36] Chou K C, Shen H B. Cell-PLoc: a package of web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Nat Protoc*, 2008, 3: 153–162.
- [37] Bailey T L, Boden M, Buske F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: W202–W208.
- [38] Hu B, Jin J P, Guo A Y, et al. GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 2015, 31: 1296–1297.
- [39] Chen C J, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol Plant*, 2020, 13: 1194–1202.
- [40] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 325–327.
- [41] Wang Y P, Tang H B, Debarry J D, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: e49.
- [42] 阙友雄, 许莉萍, 徐景升, 等. 甘蔗基因表达定量 PCR 分析中内参基因的选择. *热带作物学报*, 2009, 30: 274–278.
- Que Y X, Xu L P, Xu J S, et al. Selection of control genes in real-time qPCR analysis of gene expression in sugarcane. *Chin J Trop Crops*, 2009, 30: 274–278 (in Chinese with English abstract).
- [43] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [44] Wang P P, Moore B M, Panchy N L, et al. Factors influencing gene family size variation among related species in a plant family, Solanaceae. *Genome Biol Evol*, 2018, 10: 2596–2613.
- [45] Wang J, Li Y X, Zhu F, et al. Genome-wide analysis of nitrate transporter (NRT/NPF) family in sugarcane *Saccharum spontaneum* L. *Trop Plant Biol*, 2019, 12: 133–149.
- [46] 李旭娟, 李纯佳, 田春艳, 等. 甘蔗硝酸盐转运蛋白 1/肽转运蛋白家族 6.4 基因(*ScNPF6.4*)克隆及其调控分蘖功能分析. *作物学报*, 2024, 50: 2131–2142.
- Li X J, Li C J, Tian C Y, et al. Identification of nitrate transporter protein 1/peptide transporter protein family 6.4 gene (*ScNPF6.4*) and functional analysis of its regulation of tillering in sugarcane. *Acta Agron Sin*, 2024, 50: 2131–2142 (in Chinese with English abstract).
- [47] Wu Z L, Gao X N, Zhang N N, et al. Genome-wide identification and transcriptional analysis of ammonium transporters in *Saccharum*. *Genomics*, 2021, 113: 1671–1680.