

沙冬青响应非生物胁迫的转录因子基因鉴定与分析

金 曼^{1,2}, 苏彦华^{1,①}

(1. 中国科学院南京土壤研究所 土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏 南京 210008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 以沙冬青 [*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.] 幼苗为实验材料, 对其转录组进行测序, 筛选出质量体积分数 18% 聚乙二醇 6000 模拟干旱胁迫下差异表达的转录因子基因; 在此基础上, 对干旱胁迫下差异表达 bHLH 转录因子的系统进化关系以及干旱胁迫和 100 mmol · L⁻¹ NaCl 胁迫下差异表达 bHLH 基因的表达模式进行分析。结果表明: 沙冬青中存在 49 个转录因子基因家族, 共包含 1 575 个转录因子基因。干旱胁迫下沙冬青地上部有 44 个转录因子基因表达量的差异倍数大于等于 2 倍, 其中 33 个转录因子基因上调表达, 11 个转录因子基因下调表达; 地下部有 57 个转录因子基因表达量的差异倍数大于等于 2 倍, 其中 50 个转录因子基因上调表达, 7 个转录因子基因下调表达。沙冬青响应干旱胁迫的差异表达转录因子基因主要分布于 AP2-EREBP、MYB、WRKY、NAC 和 bHLH 基因家族。沙冬青地上部和地下部表达量上(下)调 2~5、5(含 5)~10(含 10) 及 10 倍以上的差异表达转录因子基因数分别为 28、7 和 9 个, 以及 11、27 和 19 个。聚类分析结果显示: 沙冬青 6 个差异表达 bHLH 基因编码的氨基酸序列与拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] bHLH 基因编码的氨基酸序列有不同程度的相似性。干旱胁迫和 NaCl 胁迫下, 沙冬青 6 个差异表达 bHLH 基因的表达受到不同程度的诱导。本结果为研究非生物胁迫过程中沙冬青调控机制提供了大量的转录因子基因资源。

关键词: 沙冬青; 干旱胁迫; NaCl 胁迫; 转录因子; 表达分析

中图分类号: Q943.2; Q946-33 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2018)01-0001-10

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.01.01

Identification and analysis on transcription factor genes from *Ammopiptanthus mongolicus* in responding to abiotic stress JIN Man^{1,2}, SU Yanhua^{1,①} (1. State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2018, 27(1): 1-10

Abstract: Taking *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. seedlings as experimental materials, its transcriptome was sequenced, the differentially expressed transcription factor genes were selected under simulated drought stress with mass volume fraction of 18% polyethylene glycol 6000. On this basis, phylogenetic relationships of differentially expressed bHLH transcription factors under drought stress, and expression patterns of differentially expressed bHLH genes under drought stress and 100 mmol · L⁻¹ NaCl stress were analyzed. The results show that there are 49 transcription factor gene families from *A. mongolicus*, including 1 575 transcription factor genes. Under drought stress, fold change of expression level of 44 transcription factor genes from above-ground part of *A. mongolicus* is greater than or equal to two times, in which, there are 33 transcription factor genes with up-regulated expression, and 11 transcription factor genes with down-regulated expression; fold change of expression level of 57 transcription factor genes from under-ground part is greater than or equal to two times, in which, there are 50 transcription factor genes with up-regulated expression, and 7 transcription factor genes with down-regulated expression. Differentially expressed transcription factor genes from *A. mongolicus* in responding

收稿日期: 2017-08-21

基金项目: 国家自然科学基金重大研究计划项目(91125028)

作者简介: 金 曼(1989—), 女, 江苏宜兴人, 博士研究生, 主要从事植物逆境分子生物学方面的研究。

①通信作者 E-mail: yhsu@issas.ac.cn

to drought stress are mainly existed in *AP2-EREBP*, *MYB*, *WRKY*, *NAC*, and *bHLH* gene families. Numbers of differentially expressed transcription factor genes from above- and under-ground parts with up-regulated (down-regulated) expression levels of 2–5, 5 (including 5)–10 (including 10) and more than 10 times are 28, 7 and 9, and 11, 27 and 19, respectively. The result of cluster analysis shows that there are similarities with different degrees in amino acid sequences encoded by six differentially expressed *bHLH* genes from *A. mongolicus* and those encoded by *bHLH* genes from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. Under drought stress and NaCl stress, six differentially expressed *bHLH* genes from *A. mongolicus* are induced with different degrees. These results offer resource of abundant transcription factor genes to do research on regulatory mechanism of *A. mongolicus* during process of abiotic stress.

Key words: *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.; drought stress; NaCl stress; transcription factor; expression analysis

沙冬青 [*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.] 隶属于豆科 (Fabaceae) 沙冬青属 (*Ammopiptanthus* Cheng f.), 是中国西北阿拉善荒漠地区特有的常绿阔叶灌木, 也是第三纪残遗物种, 为稀有濒危植物^[1]。沙冬青主要分布区生境严酷, 气候干旱, 年蒸发量为年降水量的 20 多倍; 夏季酷热, 高温可达 35 °C 以上; 冬季严寒, 低温可至 -30 °C ~ -20 °C^[2]。此外, 沙冬青在固定流沙以及防止沙漠化方面有重要作用。鉴于沙冬青具有在严苛环境条件下生存的能力及在生态上的重要地位, 可将其作为植物抗逆研究的重要材料。

目前已经从沙冬青中分离克隆得到多个参与逆境胁迫的抗性相关基因, 这些抗逆相关基因编码的蛋白质可分为 2 大类: 一类为具有保护作用的功能性蛋白质, 主要为与逆境胁迫相关的蛋白质, 如晚期胚胎发育丰富蛋白 AmLEA^[3] 和脱水素蛋白 AmDHN^[4] 等; 与渗透调节物质合成和降解相关的酶类, 如肌醇半乳糖苷合成酶 AmGoS^[5] 和脯氨酸转运体 AmProT^[6] 等; 与植物毒性物质降解、抗氧化防御能力相关的酶类, 如超氧化物歧化酶 AmSOD、谷胱甘肽过氧化物酶 AmGPX 以及抗坏血酸过氧化物酶 AmAPX^[7] 等。另一类为参与逆境条件下信号转导和转录调控相关的蛋白质, 主要包括响应及转导胁迫信号的磷酸酶 AmCBL^[8], 以及与胁迫相关的转录因子 AmDREB^[9] 和 AmMYB^[10] 等。

转录因子是一类在转录调控过程中具有十分重要作用的蛋白质, 在植物逆境响应调控网络中起关键作用^[11]。当植物受到逆境胁迫后, 转录因子与下游基因启动子部分特异性结合并对基因的表达进行调控, 进而调节细胞内的逆境应答物质含量以响应逆境胁迫。由于转录因子在转录调控过程中具有不可或

缺的作用, 在对逆境胁迫响应的研究中, 当前的研究热点聚焦于转录因子及其与下游靶基因的识别与调控^[11]。通过转录组测序技术, 可以获得大量的在逆境胁迫下的植物转录本数据, 并为筛选响应逆境胁迫的转录因子, 以及为后续调控机制的研究提供充足的基因资源。

本研究对非生物胁迫处理前后沙冬青幼苗进行转录组测序及分析, 以期为更深入地研究沙冬青响应非生物胁迫的分子机制提供基因资源库, 并为进一步鉴定下游的重要非生物响应基因以及研究其调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

沙冬青种子由甘肃民勤沙生植物园提供。将沙冬青种子用流动的清水冲洗干净后, 挑取大小一致、籽粒饱满的种子用体积分数 70% 乙醇浸泡 30 s, 无菌水清洗 4~5 次后, 在黑暗条件下清水浸泡 1 d, 使种子充分吸胀。将吸胀的沙冬青种子转移到铺满浸润无菌水的吸水纸的灭菌培养皿中, 置于 25 °C 培养箱中遮光萌发催芽。3 d 后, 将发芽后长势基本一致的沙冬青幼苗转移至塑料盒中, 用改良的 1/2 Hoagland 营养液 (pH 5.8) 进行培养^[6], 每隔 2 d 更换 1 次营养液。

对在 1/2 Hoagland 营养液中培养 3 周的沙冬青幼苗进行质量体积分数 18% 聚乙二醇 6000 (PEG 6000) 模拟的干旱胁迫以及 100 mmol · L⁻¹ NaCl 模拟的盐胁迫。分别于胁迫 1、6、12、24 和 48 h 对地上部和地下部的组织取样, 并以胁迫 0 h 的样品为对照, 将样品用液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱中保存。

1.2 转录因子分析及差异表达基因选择

沙冬青转录组数据来源于作者所在实验室前期实验结果。采用 RNAiso Plus 试剂[宝生物工程(大连)有限公司]分别提取正常培养 3 周以及质量体积分数 18% 聚乙二醇 6000 处理 6 h 的沙冬青幼苗地上部和地下部的总 RNA, 构建 cDNA 文库。使用 Illumina HiSeq™ 2000 测序仪(美国 Illumina 公司)对上述样品进行转录组测序, 测序结果经过质量控制过滤去除无效序列, 拼接后得到 44 959 条沙冬青 unigenes 序列, 以 fasta 格式保存。

利用 InterProScan 软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 和 PlnTFDB 3.0 数据库 (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>) 对沙冬青转录组数据中拼接获得的 unigenes 进行转录因子预测。通过 Hmsearch 软件搜寻植物转录因子基因的保守域, 并将具有这些植物转录因子基因保守域的 unigenes 归类到相应的转录因子基因家族中。通过 RPKM (reads per kilobase per million reads) 法计算沙冬青 unigenes 的表达丰度 (RPKM 值), 根据在干旱胁迫处理条件与对照条件下基因的表达丰度计算其表达量的差异^[12]。将表达量差异倍数大于等于 2 倍的转录

因子视为差异表达转录因子。

1.3 总 RNA 提取及荧光定量 PCR

采用 RNAiso Plus 试剂[宝生物工程(大连)有限公司]分别提取经干旱胁迫和 NaCl 胁迫的沙冬青幼苗地上部和地下部的总 RNA, 根据 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]说明书合成第 1 链 cDNA, 用于后续基因定量表达分析。通过 Primer Premier 5 软件设计 6 个在转录组中差异表达的 *AmbHLH* 基因的荧光定量 PCR 引物, 引物序列见表 1, 并以编号为 comp62392 的基因 (*AmeIF1*)^[7] 作为沙冬青的内参基因, 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。根据 SYBR® *Premix Ex Taq*™ 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]说明书, 在 Bio-Rad CFX-96 实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)上进行 qRT-PCR 反应。反应体系总体积 20.0 μ L, 包含 SYBR *Premix Ex Taq* 10.0 μ L、正向引物和反向引物各 0.4 μ L、ddH₂O 稀释 5 倍后的 cDNA 5.0 μ L 及 ddH₂O 4.2 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s、60 $^{\circ}$ C 退火 15 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 40 个循环。每个样品 3 次重复, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_T}法^[13] 计算基因的相对表达量。

表 1 用于沙冬青 *AmbHLH* 基因荧光定量 PCR 扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences used for fluorescence quantitative PCR amplification of *AmbHLH* genes from *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.

基因编号 Gene ID	正向引物序列(5'→3') Sequence of forward primer (5'→3')	反向引物序列(5'→3') Sequence of reverse primer (5'→3')
comp62392(<i>AmeIF1</i>)	CTGACATGCGCCGTAGGAACG	CCCTGCTTATGCCAGTCTTTT
comp55415	TGCAGCATCAAGTGGAGTTC	TCATCAACTGGCAACTACTTCT
comp38040	ATTGCTCAGATGGCGAAGG	ATGTAGCCGTGCGTAGTGTC
comp58250	TGACTTGTCATCATCTGGTTTG	AGGAGGCTTAGCCATAGACAC
comp64918.1	GATTTGCTCGCATCACTGGG	GGAACAGTGTGACACCAGACA
comp64918.2	GCTCATTGACGCCAAATTCT	TGGTCTGCGGGTACAAAACA
comp65919	AAGAGATGGTTCCCGCTTGG	TCTGGAGGGTTTATCCCGCT

2 结果和分析

2.1 干旱胁迫下沙冬青转录因子基因鉴定

对转录组测序拼接的 unigenes 进行转录因子分析, 结果表明: 沙冬青中共有 1 575 个 unigenes (即 1 575 个转录因子基因), 归类到 49 个转录因子基因家族(图 1)。在沙冬青各转录因子基因家族中基因数最多的为 *MYB* 基因家族, 共有 222 个转录因子基因; 之后依次为 *AP2-EREBP* 基因家族(144 个转录

因子基因)、*bHLH* 基因家族(114 个转录因子基因)、*DBP* 基因家族(106 个转录因子基因)、*NAC* 基因家族(82 个转录因子基因)和 *WRKY* 基因家族(79 个转录因子基因)。

2.2 干旱胁迫下沙冬青差异表达转录因子基因分析

干旱胁迫下沙冬青地上部共有 44 个转录因子基因差异表达, 其中, 33 个转录因子基因上调表达, 11 个转录因子基因下调表达; 地下部共有 57 个转录因子基因差异表达, 其中, 50 个转录因子基因上调表达, 7 个转录因子基因下调表达(表 2)。*NAC* 基因家

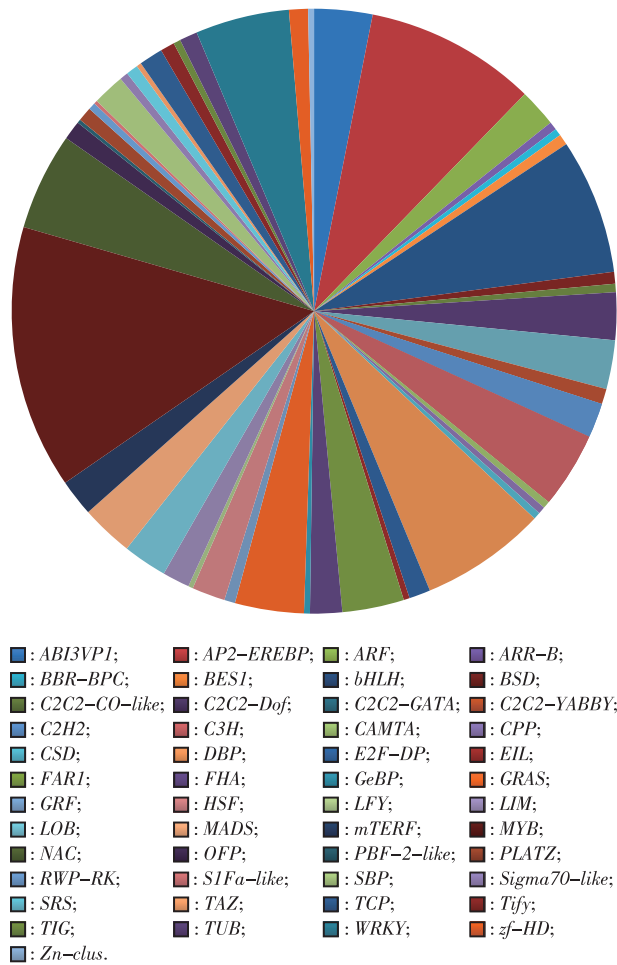


图 1 沙冬青转录因子基因家族分类
Fig. 1 Classification of transcription factor gene families from *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.

族中差异表达转录因子基因的数量最多,地上部和地下部分别有 8 和 9 个差异表达转录因子基因;之后依次为 *AP2-EREBP* 基因家族(地上部和地下部分别有 6 和 9 个差异表达转录因子基因)、*MYB* 基因家族(地上部和地下部均有 7 个差异表达转录因子基因)和 *WRKY* 基因家族(地上部和地下部分别有 7 和 2 个差异表达转录因子基因)。

干旱胁迫下沙冬青差异表达转录因子基因表达量差异倍数的分布情况见图 2。由图 2 可以看出:干旱胁迫下沙冬青差异表达转录因子基因在地上部和地下部的表达模式不同,地上部表达量的差异倍数为 2~5 倍的转录因子基因最多,而地下部表达量的差异倍数为 5(含 5)~10(含 10)倍的转录因子基因最多。在地上部,表达量的差异倍数在 10(含 10)倍以内的转录因子基因有 35 个,占地上部差异表达转录因子

表 2 干旱胁迫下沙冬青地上部和地下部差异表达转录因子基因分析¹⁾

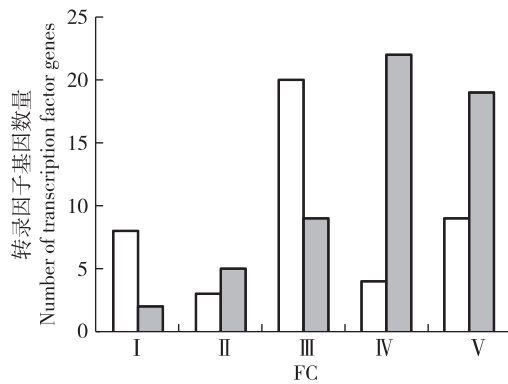
Table 2 Analyses on differentially expressed transcription factor genes from above- and under-ground parts of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. under drought stress¹⁾

转录因子基因家族 Transcription factor gene family	地上部 Above-ground part		地下部 Under-ground part	
	N _U	N _D	N _U	N _D
<i>NAC</i>	8	0	9	0
<i>AP2-EREBP</i>	3	3	9	0
<i>MYB</i>	6	1	7	0
<i>WRKY</i>	7	0	1	1
<i>DBP</i>	3	0	5	0
<i>bHLH</i>	1	0	3	2
<i>GRAS</i>	0	1	3	0
<i>HSF</i>	2	0	2	0
<i>C2C2-GATA</i>	0	2	0	1
<i>C3H</i>	1	1	1	0
<i>OFP</i>	1	0	1	0
<i>C2C2-YABBY</i>	0	1	0	0
<i>CPP</i>	0	1	0	0
<i>mTERF</i>	0	1	0	0
<i>SBP</i>	1	0	0	0
<i>ABI3VP1</i>	0	0	2	0
<i>C2C2-Dof</i>	0	0	1	1
<i>LOB</i>	0	0	2	0
<i>MADS</i>	0	0	1	1
<i>LIM</i>	0	0	0	1
<i>Sigma70-like</i>	0	0	1	0
<i>TCP</i>	0	0	1	0
<i>zf-HD</i>	0	0	1	0
合计 Total	33	11	50	7

¹⁾ N_U: 上调差异表达转录因子基因数 Number of up-regulated differentially expressed transcription factor genes; N_D: 下调差异表达转录因子基因数 Number of down-regulated differentially expressed transcription factor genes.

基因总数的 79.5%。其中,表达量上(下)调 2~5 倍的转录因子基因有 23 个,占地上部差异表达转录因子基因总数的 52.3%;表达量上(下)调 5(含 5)~10(含 10)倍的转录因子基因有 12 个,占地上部差异表达转录因子基因总数的 27.3%。表达量的差异倍数在 10 倍以上的转录因子基因有 9 个,占地上部差异表达转录因子基因总数的 20.5%。

在地下部,表达量的差异倍数在 10(含 10)倍以内的转录因子基因有 38 个,占地下部差异表达转录因子基因总数的 66.7%。其中,表达量上(下)调 2~5 倍的转录因子基因有 14 个,占地下部差异表达转录因子基因总数的 24.6%;表达量上(下)调 5(含 5)~10(含 10)倍的转录因子基因有 24 个,占地下部



□: 地上部 Above-ground part; ■: 地下部 Under-ground part. FC: 差异倍数 Fold change. I: $-10 \leq FC \leq -5$; II: $-5 < FC < -2$; III: $2 < FC < 5$; IV: $5 \leq FC \leq 10$; V: $FC > 10$. 负数表示基因下调表达, 正数表示基因上调表达 The negative numbers mean down-regulated expression of genes, and the positive numbers mean up-regulated expression of genes.

图 2 干旱胁迫下沙冬青差异表达转录因子基因表达量的差异倍数分布

Fig. 2 Distribution of fold change of expression level of differentially expressed transcription factor genes from *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. under drought stress

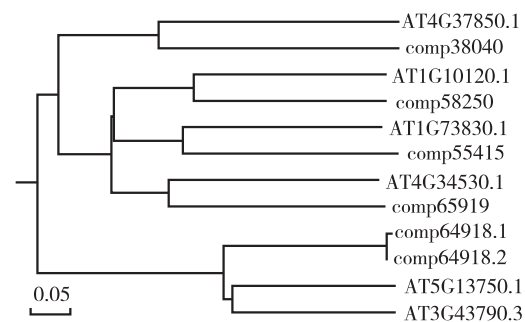
差异表达转录因子基因总数的 42.1%。表达量的差异倍数在 10 倍以上的转录因子基因有 19 个, 占地下部差异表达转录因子基因总数的 33.3%。

2.3 干旱胁迫下沙冬青差异表达 bHLH 转录因子的系统进化分析

bHLH 类转录因子是植物体内一类重要的转录因子家族, 在植物响应逆境胁迫过程中起着重要的调控作用。对沙冬青转录组数据的分析结果显示: 沙冬青中存在 114 个 bHLH 基因, 当受到干旱胁迫后, 表达量的差异倍数大于等于 2 倍的 bHLH 基因有 6 个。在转录组数据中对这 6 个 bHLH 基因进行搜索, 获得各基因序列开放阅读框的全长, 这 6 个 bHLH 基因在转录组中的编号分别为 comp64918.1、comp64918.2、comp55415、comp58250、comp65919 和 comp38040。利用 NCBI 的 BLASTp 软件对这 6 个 bHLH 基因编码的氨基酸序列进行同源性比对, 分析结果表明: 这 6 个 bHLH 基因编码的氨基酸序列与拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] bHLH 基因编码的氨基酸序列有不同程度的相似性。

对沙冬青中 6 个差异表达 bHLH 基因和拟南芥 bHLH 基因编码的氨基酸序列进行聚类分析(图 3)。结果显示: 沙冬青中编号为 comp55415 的基因编码的氨基酸序列与拟南芥中编号为 AT1G73830.1 的基因 (*BEE3*, *BR enhanced expression 3*) 编码的氨基酸序列

的相似度为 46%, 编号为 comp38040 的基因编码的氨基酸序列与编号为 AT4G37850.1 的基因编码的氨基酸序列的相似度为 41%, 编号为 comp58250 的基因编码的氨基酸序列与编号为 AT1G10120.1 的基因编码的氨基酸序列的相似度为 42%, 编号为 comp64918.1 和 comp64918.2 的基因编码的氨基酸序列与编号为 AT3G43790.3 的基因 (*ZIFL2*, *zinc induced facilitator-like 2*) 和编号为 AT5G13750.1 的基因 (*ZIFL1*, *zinc induced facilitator-like 1*) 编码的氨基酸序列的相似度较高, 相似度分别为 54% 和 59%, 编号为 comp65919 的基因编码的氨基酸序列与编号为 AT4G34530.1 的基因 (*CIB1*, *cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix 1*) 编码的氨基酸序列的相似度可达 55%。



AT4G37850.1, AT1G10120.1, AT1G73830.1, AT4G34530.1, AT5G13750.1, AT3G43790.3: 拟南芥 bHLH 基因的编号 ID of bHLH genes from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; comp64918.1, comp64918.2, comp55415, comp58250, comp65919, comp38040: 沙冬青 bHLH 基因的编号 ID of bHLH genes from *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.

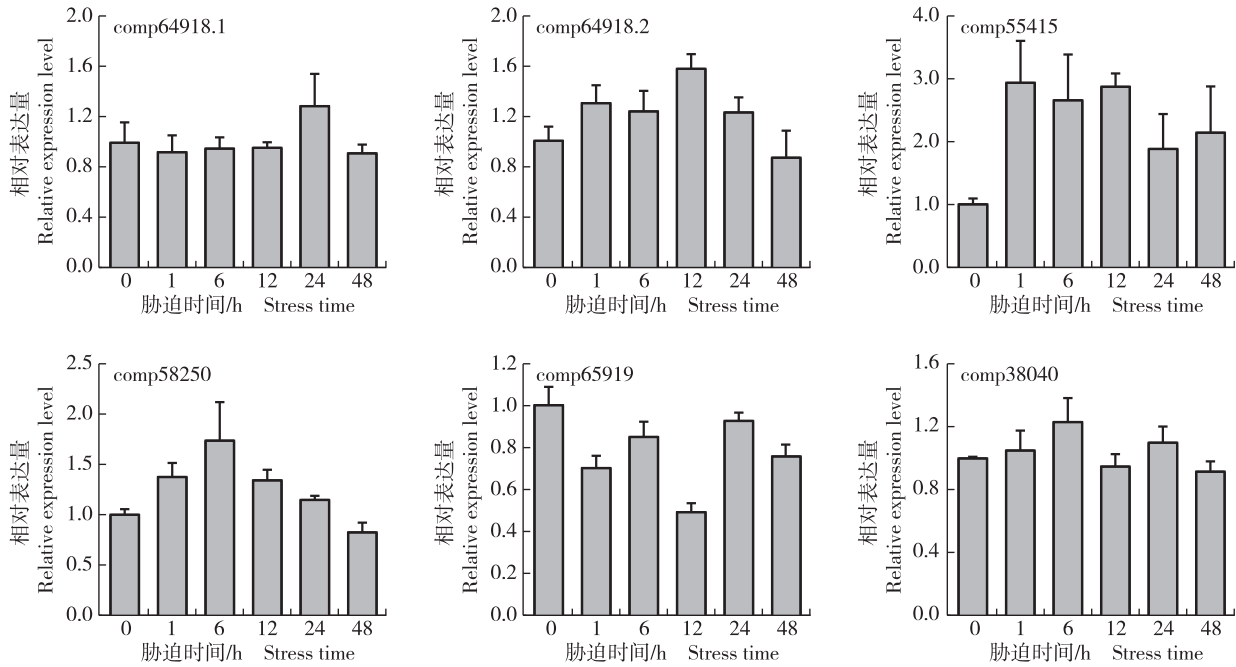
图 3 干旱胁迫下沙冬青差异表达 bHLH 基因和拟南芥 bHLH 基因编码的氨基酸序列的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis on amino acid sequences encoded by differentially expressed bHLH genes from *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. under drought stress and bHLH genes from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

2.4 干旱胁迫和 NaCl 胁迫下沙冬青差异表达 bHLH 基因的表达模式

通过荧光定量 PCR 对干旱胁迫和 NaCl 胁迫下沙冬青地上部和地下部 6 个差异表达 bHLH 基因的表达模式进行分析, 结果分别见图 4 至图 7。

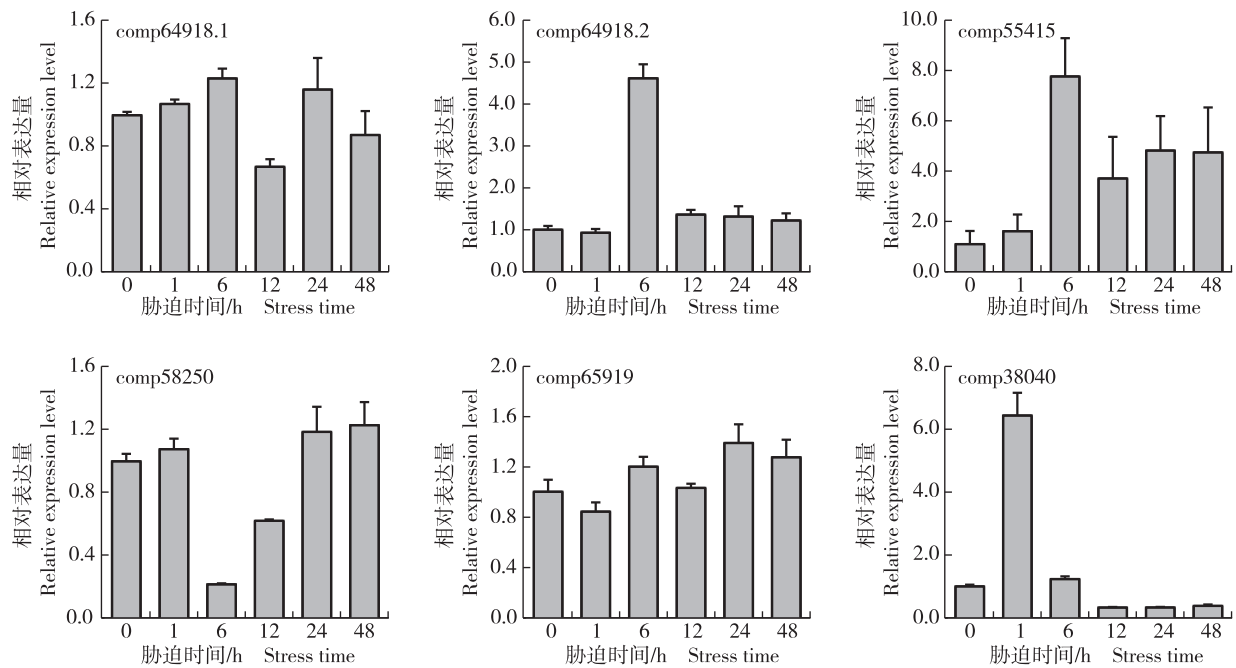
由图 4 可以看出: 随着干旱胁迫时间的延长, 沙冬青地上部差异表达 bHLH 基因的相对表达量略有波动, 除编号为 comp55415 的基因的相对表达量在干旱胁迫 1 h 明显提高外, 其他 5 个差异表达 bHLH 基因的相对表达量总体上低于 2.0。



comp64918. 1, comp64918. 2, comp55415, comp58250, comp65919, comp38040; 基因编号 Gene ID.

图 4 干旱胁迫下沙冬青地上部差异表达 *bHLH* 基因的表达模式

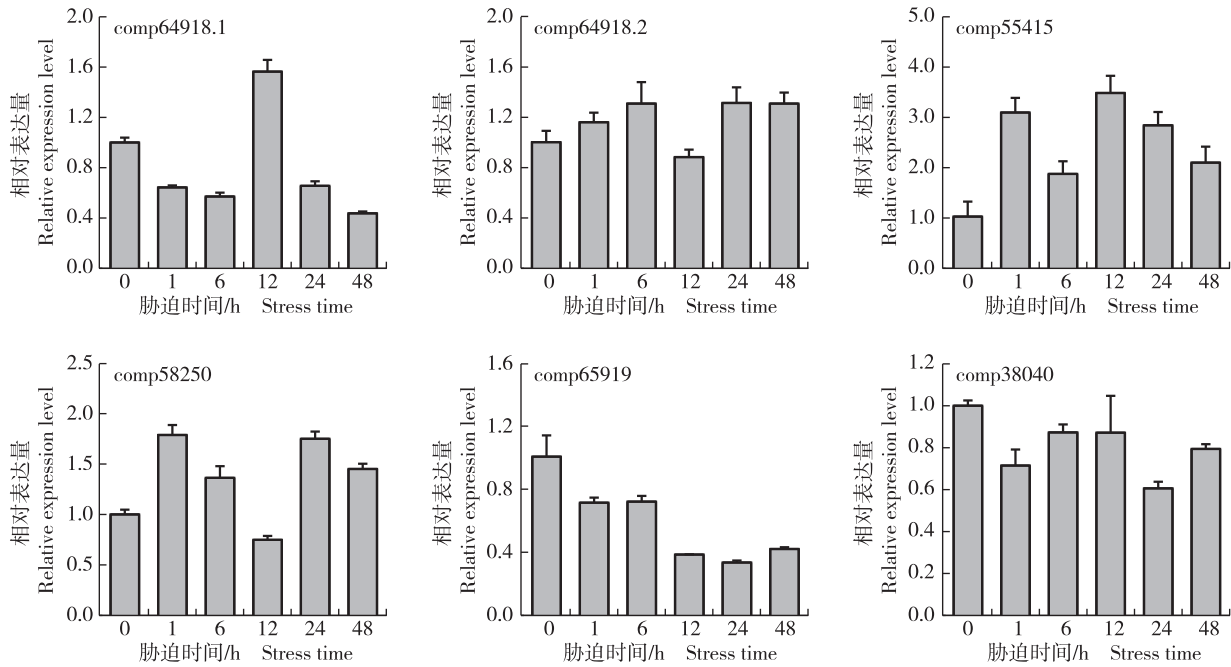
Fig. 4 Expression pattern of differentially expressed *bHLH* genes from above-ground part of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. under drought stress



comp64918. 1, comp64918. 2, comp55415, comp58250, comp65919, comp38040; 基因编号 Gene ID.

图 5 干旱胁迫下沙冬青地下部差异表达 *bHLH* 基因的表达模式

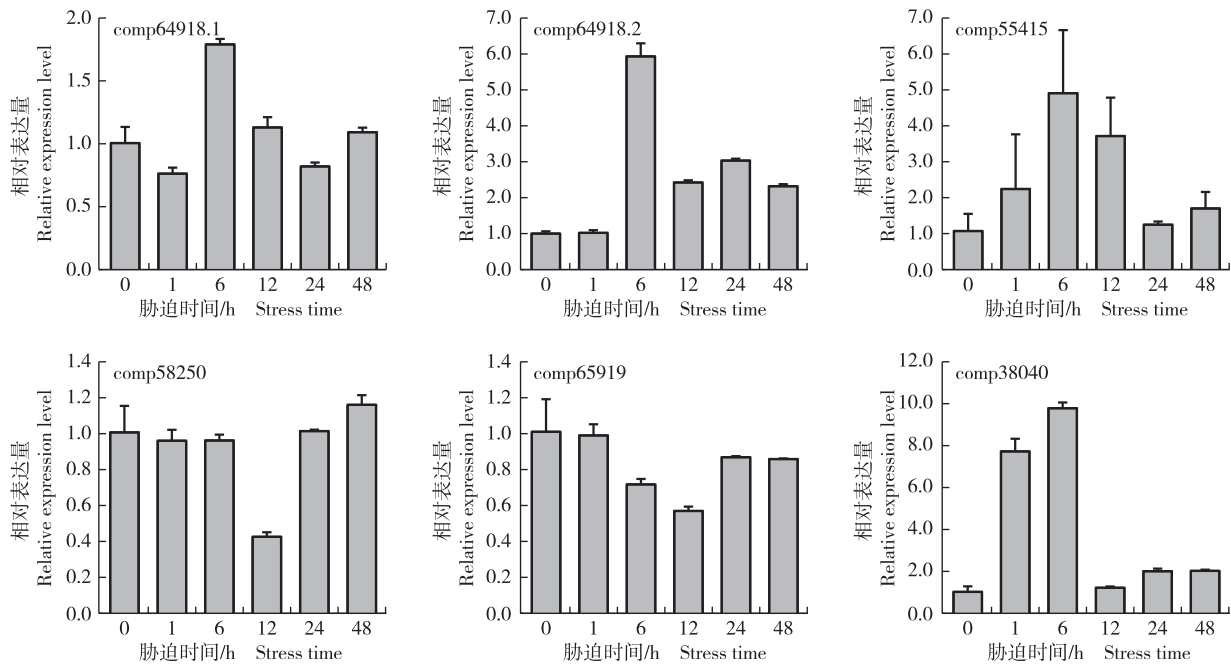
Fig. 5 Expression pattern of differentially expressed *bHLH* genes from under-ground part of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. under drought stress



comp64918. 1, comp64918. 2, comp55415, comp58250, comp65919, comp38040: 基因编号 Gene ID.

图 6 NaCl 胁迫下沙冬青地上部差异表达 *bHLH* 基因的表达模式

Fig. 6 Expression pattern of differentially expressed *bHLH* genes from above-ground part of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. under NaCl stress



comp64918. 1, comp64918. 2, comp55415, comp58250, comp65919, comp38040: 基因编号 Gene ID.

图 7 NaCl 胁迫下沙冬青地下部差异表达 *bHLH* 基因的表达模式

Fig. 7 Expression pattern of differentially expressed *bHLH* genes from under-ground part of *Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f. under NaCl stress

由图5可以看出:随着干旱胁迫时间的延长,沙冬青地下部编号为 comp58250 和 comp65919 的基因的相对表达量呈先降低后升高的趋势,在干旱胁迫处理后期,这2个基因的相对表达量略高于对照;编号为 comp64918.1、comp64918.2 和 comp55415 的基因的相对表达量总体上高于对照;而编号为 comp38040 的基因的相对表达量在干旱胁迫处理前期高于对照,在干旱胁迫处理后期低于对照。此外,编号为 comp64918.1、comp64918.2 和 comp55415 的基因的相对表达量在干旱胁迫6 h 达到峰值,编号为 comp38040 的基因的相对表达量在干旱胁迫1 h 达到峰值。

由图6可以看出:随着 NaCl 胁迫时间的延长,沙冬青地上部编号为 comp65919 和 comp38040 的基因的相对表达量略有下降;编号为 comp64918.2、comp55415 和 comp58250 的基因的相对表达量总体上升高;而编号为 comp64918.1 的基因的相对表达量在 NaCl 胁迫12 h 高于对照并达到峰值,在其他胁迫时间则低于对照。

由图7可以看出:随着 NaCl 胁迫时间的延长,沙冬青地下部编号为 comp64918.1、comp64918.2、comp55415 和 comp38040 的基因的相对表达量呈先升高后降低的趋势,均在 NaCl 胁迫6 h 达到峰值;编号为 comp58250 和 comp65919 的基因的相对表达量无显著变化,均在 NaCl 胁迫12 h 降至最低。

3 讨 论

转录因子在植物响应逆境胁迫的过程中起重要的调控作用,通过调控下游功能基因的表达,从而显著增强植物对逆境的耐受能力。沙冬青是一种古老的沙漠植物,在逆境胁迫条件下具有很强的抗逆能力,是挖掘植物抗逆相关基因的优质物种。本研究的转录组测序结果显示:干旱胁迫下沙冬青 *NAC*、*AP2-EREBP*、*MYB*、*WRKY* 和 *bHLH* 基因家族的差异表达基因数较多,说明这些基因在响应干旱胁迫的过程中起到重要作用。

在质量体积分数18%聚乙二醇6000模拟的干旱胁迫条件下处理6 h,沙冬青中数个包含 *NAC* 和 *MYB* 结构域的转录因子基因差异表达。大量研究结果表明:*NAC* 转录因子家族成员参与植物的生长发育、衰老及次生壁合成等生物过程,在逆境应答响应

过程中具有重要功能^[14-15]。*MYB* 转录因子家族成员对植物的生长发育、次级代谢和激素信号转导以及在响应生物和非生物胁迫过程中均发挥重要的调控作用^[16-17]。本研究结果表明:沙冬青在受到干旱胁迫后,其地上部和地下部分别有8和9个 *NAC* 基因表达量上调,以及6和7个 *MYB* 基因表达量上调。这2类转录因子家族基因在沙冬青受到干旱胁迫后响应强烈,说明其参与了沙冬青干旱胁迫响应的调控过程。

AP2-EREBP 是植物特有的一类转录因子家族,可分为 *AP2* 和 *EREBP* 2个亚家族^[18]。*AP2-EREBP* 转录因子家族成员参与植物逆境响应过程的调控,进而提高植物对逆境的耐受能力^[19]。本研究认为,沙冬青地上部有6个 *AP2-EREBP* 基因在受到干旱胁迫后差异表达,表达量上调和下调的转录因子基因各有3个;地下部有9个 *AP2-EREBP* 基因表达量上调。*AP2-EREBP* 转录因子家族不同基因在干旱胁迫下呈现不同的上调或下调表达模式,表明该转录因子家族中不同成员在干旱胁迫响应过程中的调控方式存在差异。

本研究中,沙冬青地上部有7个 *WRKY* 基因表达量上调,地下部有2个 *WRKY* 基因差异表达,表达量上调和下调的 *WRKY* 基因各1个,说明 *WRKY* 转录因子家族在沙冬青干旱胁迫响应过程中起到重要作用。通常,一个 *WRKY* 基因能够响应多种胁迫条件,进而对不同的生理过程进行正调控或负调控^[20]。研究表明:在 *Nicotiana benthamiana* Domin 中过表达 *GhWRKY17* 基因可增强 *N. benthamiana* 对干旱和高盐胁迫的耐受能力^[21],但是在水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 中过表达 *OsWRKY45* 基因则导致水稻对盐胁迫更为敏感^[22]。

bHLH 转录因子家族具有典型的碱性螺旋-环-螺旋结构域,其不仅参与了植物体内一系列的生长发育调控过程^[23-25],而且在植物响应干旱^[26-27]、高盐^[28-29]、脱落酸^[30]、低温^[31]、缺铁^[32] 和低磷^[33] 等非生物胁迫过程中也发挥着重要作用。本研究结果显示:沙冬青 *bHLH* 转录因子家族中有114个基因,其中有6个 *bHLH* 基因在干旱胁迫处理下表达量的差异倍数大于等于2倍。这6个 *bHLH* 基因不仅在干旱胁迫下差异表达,而且在 NaCl 胁迫下的表达也受到不同程度的诱导。将沙冬青6个 *bHLH* 基因(编号分别为 comp64918.1、comp64918.2、comp55415、

comp58250、comp65919 和 comp38040) 和拟南芥 *bHLH* 基因编码的氨基酸序列进行聚类分析, 结果显示: 根据氨基酸序列的相似度, 编号为 comp55415 的基因编码的氨基酸序列与拟南芥中编号为 AT1G73830.1 的基因 (*BEE3*) 编码的氨基酸序列最为相似, 而编号为 AT1G73830.1 的基因对应的转录因子调控植物的生长发育, 促进下胚轴的伸长^[34]。此外, 编号为 comp58250 的基因编码的氨基酸序列与拟南芥中编号为 AT1G10120.1 的基因编码的氨基酸序列的相似度为 42%, 编号为 comp65919 的基因编码的氨基酸序列与拟南芥中编号为 AT4G34530.1 的基因 (*CIB1*) 编码的氨基酸序列的相似度为 55%。拟南芥中编号为 AT1G10120.1 和 AT4G34530.1 的基因对应的转录因子均参与蓝光信号响应过程, 调控花周期开放^[35-36]。而与编号为 comp38040 的基因对应的转录因子最为相似的拟南芥中编号为 AT4G37850.1 的基因对应的转录因子参与乙烯和生长素的响应过程^[37], 从而调控逆境胁迫的响应。编号为 comp64918.1 和 comp64918.2 的基因编码的氨基酸序列与拟南芥中编号为 AT3G43790.3 的基因 (*ZIFL2*) 和编号为 AT5G13750.1 的基因 (*ZIFL1*) 编码的氨基酸序列的相似度最高, 编号为 AT3G43790.3 和 AT5G13750.1 的基因与拟南芥体内钾离子的平衡相关, 参与调节气孔运动, 从而增强拟南芥的抗旱性能^[38-39]。

本研究结果可为沙冬青干旱胁迫调控机制研究提供庞大的转录因子基因资源, 然而, 大多数转录因子基因在干旱胁迫响应中的功能还未明确, 其调控的下游基因及其结合位点, 以及对下游靶基因的调控机制尚不清楚, 仍需进一步深入研究。

4 结 论

对沙冬青转录组的分析结果表明: 沙冬青中存在 49 个转录因子基因家族, 共有 1 575 个转录因子基因。当受到质量体积分数 18% 聚乙二醇 6000 模拟的干旱胁迫处理 6 h 后, 沙冬青地上部有 44 个转录因子基因差异表达, 地下部有 57 个转录因子基因差异表达。*bHLH* 基因家族中 6 个差异表达的转录因子基因对干旱胁迫以及 NaCl 胁迫有不同程度的响应, 说明其在逆境胁迫调控网络中具有重要作用。

参考文献:

- [1] 张党权, 宋志丹, 田哗林, 等. 抗逆模式灌木沙冬青的研究进展 [J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(2): 16-22.
- [2] LI W R, FENG J C, JIANG T R, et al. Seasonal changes in photosynthetic characteristics of *Ammopiptanthus mongolicus* [J]. 植物学报, 1999, 41(2): 190-193.
- [3] LIU R, LIU M, LIU J, et al. Heterologous expression of a *Ammopiptanthus mongolicus* late embryogenesis abundant protein gene (*AmLEA*) enhances *Escherichia coli* viability under cold and heat stress [J]. Plant Growth Regulation, 2010, 60: 163-168.
- [4] SUN J, NIE L, SUN G, et al. Cloning and characterization of dehydrin gene from *Ammopiptanthus mongolicus* [J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40: 2281-2291.
- [5] SONG J, LIU J, WENG M, et al. Cloning of galactinol synthase gene from *Ammopiptanthus mongolicus* and its expression in transgenic *Photinia serrulata* plants [J]. Gene, 2013, 513: 118-127.
- [6] 岳光振, 金 曼, 李俊林, 等. 沙冬青脯氨酸转运体基因的克隆及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(5): 106-112.
- [7] SHI J, LIU M, SHI J, et al. Reference gene selection for qPCR in *Ammopiptanthus mongolicus* under abiotic stresses and expression analysis of seven ROS-scavenging enzyme genes [J]. Plant Cell Reports, 2012, 31: 1245-1254.
- [8] CHEN J H, SUN Y, SUN F, et al. Tobacco plants ectopically expressing the *Ammopiptanthus mongolicus AmCBL1* gene display enhanced tolerance to multiple abiotic stresses [J]. Plant Growth Regulation, 2011, 63: 259-269.
- [9] 李章磊, 高 飞, 曹玉震, 等. 蒙古沙冬青 *AmDREB2.1* 基因的克隆及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(3): 108-114.
- [10] 肖自华, 高 飞, 孙会改, 等. 蒙古沙冬青 *AmMYB4-like* 基因的克隆与表达分析 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(5): 108-116.
- [11] 马 进, 郑 钢, 裴翠明, 等. 南方型紫花苜蓿根系盐胁迫应答转录因子鉴定与分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2016, 33(2): 201-208.
- [12] MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nature Methods, 2008, 5: 621-628.
- [13] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [14] PURANIK S, SAHU P P, SRIVASTAVA P S, et al. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance [J]. Trends in Plant Science, 2012, 17: 369-381.
- [15] NAKASHIMA K, TAKASAKI H, MIZOI J, et al. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1819: 97-103.
- [16] COMINELLI E, TONELLI C. A new role for plant R2R3-MYB transcription factors in cell cycle regulation [J]. Cell Research, 2009, 19: 1231-1232.

- [17] ALLAN A C, HELLENS R P, LAING W A. MYB transcription factors that colour our fruit[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13: 99–102.
- [18] 王庆灵, 刘文鑫, 赵嘉平. 山海关杨 PdERF-18 转录因子的表达特征分析[J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31(5): 716–723.
- [19] HUSSAIN S S, KAYANI M A, AMJAD M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants[J]. Biotechnology Progress, 2011, 27: 297–306.
- [20] CHEN L, SONG Y, LI S, et al. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1819: 120–128.
- [21] YAN H, JIA H, CHEN X, et al. The cotton WRKY transcription factor GhWRKY17 functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production [J]. Plant and Cell Physiology, 2014, 55: 2060–2076.
- [22] TAO Z, KOU Y, LIU H, et al. *OsWRKY45* alleles play different roles in abscisic acid signalling and salt stress tolerance but similar roles in drought and cold tolerance in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62: 4863–4874.
- [23] NESI N, DEBEAUJON I, JOND C, et al. The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques[J]. The Plant Cell, 2000, 12: 1863–1878.
- [24] GROSZMANN M, PAICU T, SMYTH D R. Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2008, 55: 40–52.
- [25] FUJISAWA M, NAKANO T, SHIMA Y, et al. A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening[J]. The Plant Cell, 2013, 25: 371–386.
- [26] KIRIBUCHI K, JIKUMARU Y, KAKU H, et al. Involvement of the basic helix-loop-helix transcription factor RERJ1 in wounding and drought stress responses in rice plants [J]. Bioscience Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69: 1042–1044.
- [27] SEO J S, JOO J, KIM M J, et al. OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice [J]. The Plant Journal, 2011, 65: 907–921.
- [28] ZHOU J, LI F, WANG J L, et al. Basic helix-loop-helix transcription factor from wild rice (*OrbHLH2*) improves tolerance to salt- and osmotic stress in *Arabidopsis* [J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166: 1296–1306.
- [29] 陈李森, 沙爱华, 张婵娟, 等. 一个大豆脱水胁迫响应的 bHLH 类转录因子的克隆及功能分析[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(6): 630–636.
- [30] ABE H, URAO T, ITO T, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling[J]. The Plant Cell, 2003, 15: 63–78.
- [31] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRAR S, et al. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*[J]. Gene and Development, 2003, 17: 1043–1054.
- [32] ZHANG J, LIU B, LI M, et al. The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2015, 27: 787–805.
- [33] YI K, WU Z, ZHOU J, et al. *OsPTF1*, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice [J]. Plant Physiology, 2005, 138: 2087–2096.
- [34] CIFUENTES-ESQUIVEL N, BOU-TORRENT J, GALSTYAN A, et al. The bHLH proteins BEE and BIM positively modulate the shade avoidance syndrome in *Arabidopsis* seedlings[J]. The Plant Journal, 2013, 75: 989–1002.
- [35] LIU Y, LI X, LI K, et al. Multiple bHLH proteins form heterodimers to mediate CRY2-dependent regulation of flowering-time in *Arabidopsis*[J]. PLoS Genetics, 2013, 9: e1003861.
- [36] LIU H T, WANG Q, LIU Y, et al. *Arabidopsis* CRY2 and ZTL mediate blue-light regulation of the transcription factor CIB1 by distinct mechanisms [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110: 17582–17587.
- [37] STEPANOVA A N, YUN J, LIKHACHEVA A V, et al. Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots [J]. The Plant Cell, 2007, 19: 2169–2185.
- [38] REMY E, CABRITO T R, BATISTA R A, et al. The major facilitator superfamily transporter ZIFL2 modulates cesium and potassium homeostasis in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology, 2015, 56: 148–162.
- [39] REMY E, CABRITO T R, BASTER P, et al. A major facilitator superfamily transporter plays a dual role in polar auxin transport and drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2013, 25: 901–926.

(责任编辑: 张明霞)