植物资源与环境学报, 2024, 33(1): 35-46, 58 Journal of Plant Resources and Environment

## 薄荷 McZFP1 基因克隆及表达分析

郑晓薇,柏杨,元希武,于 盱,房海灵,李 莉,刘冬梅,梁呈元<sup>①</sup> [江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园)江苏省植物资源研究与利用重点实验室,江苏南京 210014]

**摘要:**根据前期茉莉酸甲酯处理的薄荷(*Mentha canadensis* Linn.)转录组数据分析结果,从薄荷中克隆到 *McZFP1*, 并进行了基因和蛋白质特性、组织表达、非生物胁迫处理下的表达、亚细胞定位以及转录自激活活性分析。结果显示:薄荷 *McZFP1*的开放阅读框长度为 558 bp,编码 185 个氨基酸。McZFP1 具亲水性,无跨膜结构域,属于不稳定 蛋白,包含 C2H2 保守结构域,含有 13 个丝氨酸、3 个酪氨酸和 3 个苏氨酸的磷酸化位点。进化树分析结果表明 McZFP1 与一串红(*Salvia splendens* Ker-Gawler)SsZFP7 的亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 结果表明:*McZFP1* 在 薄荷不定根、茎、根状茎、幼叶、成熟叶和花中均有表达,在根状茎中的相对表达量最高,且受 150 mmol・L<sup>-1</sup> NaCl、 300 mmol・L<sup>-1</sup>甘露醇、200 μmol・L<sup>-1</sup>脱落酸和 200 μmol・L<sup>-1</sup>茉莉酸甲酯处理诱导表达。McZFP1 定位于细胞核, 无转录自激活活性。综上所述,薄荷 *McZFP1* 在不同组织中存在表达差异,参与调节激素和非生物胁迫响应过程。

关键词: 薄荷; 锌指蛋白(ZFP)转录因子; 生物信息学; 亚细胞定位; 表达

中图分类号: Q785; Q943.2; S567.23<sup>+</sup>5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2024)01-0035-12 DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2024.01.04

**Gene cloning and expression analysis on** *McZFP1* **in** *Mentha canadensis* ZHENG Xiaowei, BAI Yang, QI Xiwu, YU Xu, FANG Hailing, LI Li, LIU Dongmei, LIANG Chengyuan<sup>①</sup> [Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China], J. Plant Resour. & Environ., 2024, **33**(1): 35–46, 58

Abstract: Based on the previous analysis result of transcriptome data of *Mentha canadensis* Linn. treated by methyl jasmonate, *McZFP1* was cloned from *M. canadensis*, and analyses on gene and protein characteristics, tissue expression, expression under abiotic stress treatments, subcellular localization, and transcriptional self-activating activity were performed. The results show that the open reading frame of *McZFP1* in *M. canadensis* is 558 bp in length, encoding 185 amino acids. McZFP1 is hydrophilic, has no transmembrane domain, is of unstable protein, contains a C2H2 conserved domain, and possesses phosphorylation sites of 13 serine, 3 tyrosine, and 3 threonine. The phylogenetic tree analysis result shows that McZFP1 is most closely related to SsZFP7 in *Salvia splendens* Ker-Gawler. The result of realtime fluorescent quantitative PCR shows that *McZFP1* is expressed in adventitious root, stem, rhizome, young leaf, mature leaf, and flower of *M. canadensis*, its relative expression is the highest in rhizome, and its expression is induced by 150 mmol  $\cdot L^{-1}$  NaCl, 300 mmol  $\cdot L^{-1}$  mannitol, 200  $\mu$ mol  $\cdot L^{-1}$ abscisic acid, and 200  $\mu$ mol  $\cdot L^{-1}$  methyl jasmonate treatments. McZFP1 is localized in cell nucleus, and has no transcriptional self-activating activity. In conclusion, there are differences in expression of *McZFP1* among different tissues of *M. canadensis*, and *McZFP1* is involved in regulation of hormone and abiotic stress response processes.

收稿日期: 2023-08-03

**基金项目**:国家自然科学基金项目(31970353; 32100313);江苏省自然科学基金项目(BK20210164);江苏省植物资源研究与利用重点实验室开放基金项目(JSPKLB202029)

作者简介:郑晓薇(1998—),女,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事薄荷基因功能方面的研究。

<sup>&</sup>lt;sup>①</sup>通信作者 E-mail: liangcy618@ cnbg.net

引用格式:郑晓薇,柏 杨, 元希武,等. 薄荷 McZFP1 基因克隆及表达分析[J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(1): 35-46, 58.

Key words: Mentha canadensis Linn.; zinc finger protein (ZFP) transcription factor; bioinformatics; subcellular localization; expression

薄荷(Mentha canadensis Linn.)隶属于唇形科 (Lamiaceae)薄荷属(Mentha Linn.),为常见的药用草 本植物,其地上部分干燥后可入药,主要归肺经和肝 经,具有疏风散热、清利头目和疏肝行气等功效,主治 风热感冒和风温初起等症状<sup>[1]</sup>。薄荷的茎和叶均密 布腺毛,是产生、分泌及贮存薄荷精油的重要部 位<sup>[2-3]</sup>。薄荷精油是其主要药用成分<sup>[4]</sup>,具有抑菌、 抗菌和保鲜等作用,也可作为重要香料在食品和日用 化工等领域广泛应用<sup>[5]</sup>。

土壤盐碱化、干旱、高温、冷害以及洪涝等非生物 胁迫会限制植物生长,降低作物产量。薄荷属植物在 生长过程中易受到盐、干旱和高温等胁迫的影响,这 不仅危害其正常的生长发育,还会导致精油产量的严 重下降,甚至明显改变精油成分[6-8]。薄荷对盐渍化 土壤有一定的适应性,但过量的盐分不利于其正常生 长,甚至导致植株死亡<sup>[9]</sup>。在盐胁迫下,辣薄荷 (Mentha × piperita Linn.)精油合成代谢反应中的基因 表达和酶活性等均受到抑制,导致精油产量显著下 降<sup>[10]</sup>。干旱胁迫会严重抑制辣薄荷的生长发育,降 低精油产量,并影响精油成分的丰富程度<sup>[11]</sup>。严重 的渗透胁迫会抑制辣薄荷叶片气体交换,改变植物细 胞结构特征,造成细胞水平上的损害,并降低辣薄荷 精油的含量和质量[12]。此外,在一定温度范围内,薄 荷属植物精油产量随着温度的升高而降低,其主要成 分薄荷醇含量显著降低,但胡薄荷酮含量升高[8]。 为了应对非生物胁迫,植物进化出复杂的调控机制, 主要通过激活或抑制一系列转录因子的表达来调 节[13-15]。目前已发现一些转录因子参与了植物对非 生物胁迫的生理反应,主要包括脱水应答元件结合因  $\neq$  (dehydration-responsive element binding factor, DREB)、乙烯应答元件结合因子(ethylene-responsive element binding factor, ERF)、V-Myb 禽成髓细胞瘤病 毒癌基因同源物 (V-Myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog, MYB)、碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)和锌指蛋白(zinc finger protein, ZFP)等<sup>[14-19]</sup>。

锌指蛋白是一类在植物基因转录中发挥重要调 控作用的 DNA 结合蛋白,其结构域中的半胱氨酸 (Cys)和组氨酸(His)残基与 Zn<sup>2+</sup>配位形成稳定的

"手指"状结构,该结构通过与 DNA 特异性结合,直 接调节靶基因的表达<sup>[20-21]</sup>。根据锌指蛋白中 Cys 和 His 残基数目和顺序的不同,可将锌指蛋白转录因子 家族分为 C2H2、C8、C6、C3HC4、C2HC、C2HC5、C4、 C4HC3 和 CCCH 9 大类<sup>[22]</sup>。C2H2 型锌指蛋白转录 因子家族是目前研究最为深入的家族之一,其含有植 物特有的 QALGGH 保守序列,可与其他转录因子家 族结合,或协同各类植物信号激素共同发挥作用,调 控植物的多个生物学过程,包括营养生长、生殖发育、 光调节形态建成、逆境响应和激素信号转导等[20-24]。 目前已有许多研究报道了 ZFP 参与调控植物的非生 物胁迫反应。例如:拟南芥 [Arabidopsis thaliana (Linn.) Heynh.] C2H2 型锌指蛋白转录因子基因 AtZFP3 的过表达诱导了胁迫相关基因 KIN1、RD22、 RD29B 和 AtP5CS1 的表达,增强了植物对盐胁迫和 渗透胁迫的耐受性,而拟南芥 如3 突变体对盐胁迫的 耐受性则显著降低<sup>[25]</sup>。在烟草(Nicotiana tabacum Linn.)和水稻(Oryza sativa Linn.)中,过表达水稻基 因 OsZFP182 可增强植株的抗盐性; 过表达 OsZFP252 的转基因水稻植株中游离脯氨酸和可溶性 糖含量升高,胁迫防御基因的表达量增加,比野生型 有更高的盐和干旱胁迫耐受能力[26-27],[28]65-70。

目前,有关薄荷锌指蛋白转录因子基因的研究尚 未见报道。通过分析作者所在课题组茉莉酸甲酯处 理的薄荷转录组数据,克隆获得1个锌指蛋白转录因 子基因 Unigene0033253,根据其蛋白质序列分析了结 构特征、理化性质及系统进化关系,并分析了该基因 编码蛋白的亚细胞定位和转录自激活活性,继而检测 该基因在薄荷不同组织以及 NaCl、甘露醇、脱落酸和 茉莉酸甲酯处理后的表达变化,以期为进一步研究该 薄荷基因的生物学功能提供研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试薄荷生长于江苏省中国科学院植物研究所 资源圃(东经118°49′50″、北纬32°03′33″)。于2022 年8月上旬,从长势基本一致的3株野生型薄荷(约 5个月株龄)上分别采集不定根、茎、根状茎、幼叶、成 熟叶和花(盛花期),即为3个生物学重复。所采集的样品迅速用液氮速冻后保存于-80℃冰箱,待用<sup>[29]</sup>。另取长势基本一致的薄荷茎尖于透明玻璃瓶中水培生根,约2~3 d换1次水,置于温度25℃、光照度30000 k、光照时间16h·d<sup>-1</sup>的植物培养室中培养14 d,然后分别进行高盐(150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl)<sup>[10]</sup>、干旱(300 mmol·L<sup>-1</sup>甘露醇)<sup>[30]</sup>、200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>脱落酸<sup>[30]</sup>和200  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>茉莉酸甲酯<sup>[31]</sup>水培处理。每处理3株,即为3个生物学重复。分别于处理0、2、4、8、12和24h对其幼叶和不定根取样,液氮速冻后,提取RNA。

供试本氏烟草(Nicotiana benthamiana Domin)和 拟南芥[哥伦比亚生态型(Col-0)]种子均由作者所 在实验室保存。将本氏烟草种子播撒于泥炭土-蛭 石(体积比1:1)混合基质(南京寿德生物科技有限 公司)中,生长1个月后用于瞬时表达实验;拟南芥种 子在 MS 培养基上生长1周后移栽至泥炭土-蛭石 (体积比1:1)混合基质中,生长2个月后用于侵染 实验。

### 1.2 主要试剂

Eastep<sup>®</sup> Super 总 RNA 提取试剂盒(上海普洛麦 格生物产品有限公司);两步法 RT-qPCR(去基因组) 试剂盒、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 和 平末端/TA 兼容性入门克隆试剂盒(南京诺唯赞生 物科技股份有限公司);2×GS AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix(北京金沙生物科技有限公司);NaCl、 甘露醇、MES monohydrate、SanPrep Column DNA Gel Extraction Kit, SanPrep Column Plasmid Mini - Preps Kit、乙酰丁香酮、卡那霉素和大观霉素[生工生物工 程(上海)股份有限公司];限制性内切酶 Xho I 和 EcoR I (美国 New England Biolabs 公司);大肠杆菌 感受态 DH5α、根癌农杆菌感受态 GV3101、酵母感受 态 Y2H Gold(北京擎科生物科技股份有限公司);酵 母基础培养基 Minimal SD Base(上海诺宁生物科技 有限公司);氨基酸缺失混合物 DO Supplement - Trp 和 DO Supplement -Ade/-Trp/-His(上海懋康生物科 技有限公司);脱落酸(上海如吉生物科技发展有限 公司);茉莉酸甲酯(上海麦克林生化科技股份有限 公司); Murashige & Skoog (MS) Basal Medium with Vitamins(美国 Phyto Technology Laboratorise 公司); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染液、X-α-gal 和 表面活性剂 L-77(北京酷来搏科技有限公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 基因克隆及载体构建 薄荷幼叶总 RNA 提取 按照 RNA 提取试剂盒说明书操作,检测质量后根据 反转录试剂盒说明书合成第1链 cDNA。根据作者 所在课题组已有的茉莉酸甲酯处理的薄荷转录组数 据(NCBI 登录号 SRP132644) 中检索到的 cDNA 序 列,设计特异性引物 Unigene0033253 - SF 和 Unigene0033253-SR(表1)。以得到的薄荷幼叶 cDNA 为模板, PCR 扩增 Unigene0033253 全长基因。 PCR 反应体系总体积 50 µL,包含 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 µL\_2×Phanta Max Buffer 25 μL、dNTP Mix 1 μL、上游和下游引物各 2 μL、 cDNA 1 µL 以及 ddH,O 18 µL。PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃变性 30 s、54 ℃退火 30 s、72 ℃延 伸 50 s,35 个循环;72 ℃复性 7 min。4 ℃保存。PCR 产物经质量体积分数1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用 DNA 胶回收试剂盒将目的片段回收,连接到作 者所在实验室通用载体 pCE2 TA/Blunt-Zero 上, 37 ℃金属浴反应 5 min,加入大肠杆菌感受态 DH5α 并混匀,冰浴 30 min,42 ℃水浴热激 45 s,加入 LB 液 体培养基,于160 r · min<sup>-1</sup>摇床中培养1 h 后均匀涂 布于含 50 μg·mL<sup>-1</sup>卡那霉素的固体培养基上,然后 置于 37 ℃培养箱过夜培养;挑选单菌落,PCR 验证 后得到阳性克隆,交由生工生物工程(上海)股份有 限公司测序。

1.3.2 生物信息学分析 利用 NCBI 的 Open Reading Frame Finder 在线程序(https://www.ncbi.nlm.nih. gov/orffinder/)分析 McZFP1 cDNA 序列的开放阅读 框;利用 Protparam 在线工具( https://web.expasy.org/ protparam/)分析 McZFP1 的理化性质,包括理论相对 分子质量、氨基酸组成、蛋白质稳定性以及理论等电 点等相关参数;利用 DNAMAN 软件比对分析 McZFP1 及其同源蛋白的氨基酸序列;利用 MEGA 11.0软件,采用最大似然(maximum likelihood)法构建 McZFP1 及其同源蛋白的系统进化树。利用在线软 件 SOPMA ( https:// npsa-prabi. ibcp. fr/cgi-bin/npsa\_ automat.pl? page=npsa\_sopma.html)分析 McZFP1 的 二级结构;通过 ProtScale 网站(https://web.expasy. org/protscale/)分析氨基酸的亲水性和疏水性;通过 SMART 网站(http://smart.embl-heidelberg.de/)分析 McZFP1 的功能结构域;利用 TMHMM 在线软件 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)分析

McZFP1 是否具有跨膜性; 通过 NetPhos-3.1 网站 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/)预测 McZFP1 的磷酸化位点<sup>[32]</sup>。

1.3.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析 根据 McZFP1 cDNA 序列设计 qRT-PCR 引物 McZFP1-qF 和 McZFP1-qR,内参基因 McActin 的引物为 McActinqF 和 McActin-qR(表1)。按照实时荧光定量 PCR 试剂盒的说明书对薄荷不同组织以及不同处理下幼 叶和不定根中 McZFP1 的表达量进行分析。PCR 反 应体系总体积 20  $\mu$ L,包含上游和下游引物各 1  $\mu$ L、 2×GS AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix 10  $\mu$ L、cDNA 1  $\mu$ L 及 ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。使用 BIO-RAD CFX-Opus 96 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)进行 PCR 反 应,反应程序:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 10 s、60 °C 退火及延伸共 30 s,40 个循环;72 °C 采集荧光信号。 每个样品 3 个技术重复。采用 2<sup>-ΔΔCT</sup>法<sup>[33]</sup>计算相对 表达量。

1.3.4 载体构建 构建 35S: *McZFP1*-GFP 和 pGBKT7-*McZFP1*(BD-*McZFP1*)2种表达载体,分别 用于分析 McZFP1的亚细胞定位和转录自激活活性。 *pHellsgate*-GFP 载体经限制性内切酶 *Xho* I 酶切后, 回收获得其线性化载体,使用引物 *McZFP1*-GFP-F 和 *McZFP1*-GFP-R(表1)扩增目的片段,利用同源 重组技术构建 35S: *McZFP1*-GFP 表达载体。 pGBKT7载体经限制性内切酶 *EcoR* I 酶切后,获得 其线性化载体,使用引物 BD-*McZFP1*-F 和 BD-*McZFP1*-R 扩增片段,利用同源重组方法构建 pGBKT7-*McZFP1*(BD-*McZFP1*)表达载体。目的片 段的扩增、回收、连接目的载体、转化大肠杆菌以及单 菌落验证等步骤同"1.3.1"。

表1 用于薄荷 McZFP1 基因克隆和功能研究的引物及其序列 Table 1 Primers used for gene cloning and functional studies of McZFP1 in Mentha canadensis Linn. and their sequences

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
Unigene0033253-SF	ATGCATATGGAGGCACCA
$Unigene0033253{-}\mathrm{SR}$	CTTGTCTCTCAAACTCTGA
McZFP1-qF	CCATCAGAACGCCCACAGAA
McZFP1-qR	GGACCCCAACATTCGGCTTA
McActin-qF	GCTCCAAGGGCTGTGTTCC
McActin-qR	TCTTTCTGTCCCATGCCAAC
McZFP1-GFP-F	TTTGGAGAGGACACGCTCGAGATGCATATGGAGGCACCA
McZFP1-GFP-R	GCTCACCATGAATTCCTCGAGGAGTTTGAGAGACAAGTC
BD-McZFP1-F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGCATATGGAGGCACCA
BD- <i>McZFP1</i> -R	${\tt TCGACGGATCCCCGGGAATTCTCAGAGTTTGAGAGACAAG}$
AtActin2-qF	GACCTTGCTGGACGTGACCTTAC
AtActin2-qR	GTAGTCAACAGCAACAAAGGAGAGC

亚细胞定位 利用在线工具 CELLO2GO 1.3.5 (http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/) 预测 McZFP1 的亚细胞定位<sup>[32]</sup>。通过根癌农杆菌介导的烟草叶片 瞬时表达技术<sup>[34]</sup>确定 McZFP1 蛋白在细胞中的分布 情况。转化测序正确的 35S: McZFP1-GFP 质粒至根 癌农杆菌感受态 GV3101,经抗性筛选及菌落 PCR 验 证后,将阳性单菌落接种于含 50 mg · L<sup>-1</sup>利福平和 50 mg · L<sup>-1</sup>大观霉素的 LB 液体培养基中,28 ℃恒温 摇床培养至菌液 OD<sub>600</sub> 值为 1.0, 于 4 ℃、5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,收集菌体,用配制好的侵染液 〔包含 10 mmol · L<sup>-1</sup> 2-(N-吗啉代)乙烷磺酸一水、 10 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>和 200 µmol · L<sup>-1</sup>乙酰丁香酮, pH 5.6]重悬至 OD600值约 1.0。使用注射器将菌液注 射到生长状态好的本氏烟草叶片背面,暗培养3d 后,取适当大小的叶片组织,用稀释 50~100 倍的 4′, 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染液染色1~2h后, 使用 Zeiss 激光扫描共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司) 分别在波长 488 和 405 nm 激发光及明场下观察并 拍照。

1.3.6 转录自激活活性验证 按照产品说明书分别 转化 pGBKT7-McZFP1(BD-McZFP1)、pGBKT7 空质 粒(BD-plasmid)及pGBKT7-AtSIZ1(BD-AtSIZ1)质 粒至酵母感受态 Y2H Gold 中。将转化产物分别涂布 于 SD/-Trp 固体培养基中,28 ℃培养 3~4 d 后,挑选 单菌落,PCR 验证后得到阳性单克隆 BD-McZFP1、 BD-plasmid 和 BD-AtSIZ1,分别用 SD/-Trp 液体培 养基摇菌至 OD600 值约 1.0,将不同酵母菌液梯度稀释 10、100 和 1 000 倍后,分别在 SD/-Trp 和 SD/-Ade/ -Trp/-His 固体培养基上进行点斑验证, BD-AtSIZ1 作为阳性对照, BD-plasmid 作为空质粒对照。培养 基置于28 ℃恒温培养箱中培养 2~3 d,观察并拍照。 1.3.7 拟南芥的遗传转化及筛选鉴定 拟南芥遗传 转化采用蘸花法[35]。将"1.3.5"中的阳性农杆菌接 种于含 50 mg · L<sup>-1</sup>利福平和 50 mg · L<sup>-1</sup>大观霉素的 50 mL LB 液体培养基中,在 28 ℃恒温摇床过夜培养 至菌液 OD<sub>600</sub> 值约 1.8; 于 4 ℃、5 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 收集菌体后用 50 mL 重悬液(含 2.5 g 蔗糖和 20 μL表面活性剂 L-77, ddH<sub>2</sub>O 定容至 50 mL) 重悬。 将植株的花序在侵染液中浸泡1~2 min 后拿出,除去 多余菌液,放入温度 23 ℃、光照度 30 000 lx、光照时 间 14 h · d<sup>-1</sup>的光照培养箱中生长 7 d 后再次侵染,待 果荚成熟后收集成熟种子。将氯气灭菌后的种子播

撒在卡那霉素抗性的 1/2 MS 固体培养基上进行生长 筛选,挑选具有抗性的拟南芥幼苗,初步鉴定为阳性 苗。将阳性拟南芥幼苗栽植于营养土中生长,采用 CTAB 法<sup>[36]</sup>提取其莲座叶的 DNA,利用 RNA 提取试 剂盒提取其莲座叶的 RNA 并反转录为 cDNA,将二者 分别作为模板,引物为 McZFP1-GFP-F 和 McZFP1-GFP-R,进行 PCR 检测,内参引物为 AtActin2-qF 和 AtActin2-qR,反应体系与运行程序同"1.3.1"。PCR 产物使用质量体积分数 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检 测。以 McZFP1-qF 和 McZFP1-qR 为鉴定引物, McActin-qF 和 McActin-qR 为内参引物(表 1),对野 生型拟南芥以及转基因阳性苗中 McZFP1 的表达水 平进行实时荧光定量 PCR 分析。PCR 反应体系、运 行程序及计算方法同"1.3.3"。

### 1.4 数据处理和统计分析

利用 IBM SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析, 数据为 3 次重复的具有标准差的平均值。通过单因 素方差分析(one-way ANOVA)和邓肯检验进行显著 性分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 薄荷 McZFP1 基因克隆及系统进化树构建

以薄荷幼叶 cDNA 为扩增模板扩增目的基因 Unigene0033253,其 PCR 扩增产物的电泳结果见图 1, 该基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列见图 2。 结果显示:PCR 扩增获得 1 条长度约 550 bp 的条带, 该基因开放阅读框长度为 558 bp,编码 185 个氨基 酸。与拟南芥 C2H2 型锌指蛋白转录因子的进化关 系分析结果(图3)表明:该蛋白与拟南芥 AtZFP1 的 相似性最高,故将 Unigene0033253 命名为 McZFP1。

### 2.2 薄荷 McZFP1 结构分析

对薄荷 McZFP1 进行生物信息学分析,结果显示:McZFP1 的分子式为  $C_{920}H_{1452}N_{292}O_{266}S_9$ ,理论相对分子质量为 21 147.99,不稳定指数为 64.89,属于不稳定蛋白,脂肪指数为 61.73,理论等电点为 pI 9.77;该蛋白的总平均亲水指数(GRAVY)为-0.878,且大多数肽链处于 0.0 以下的区域(亲水区)(图 4-A),预测其为亲水性蛋白。功能结构域分析结果(图 4-B)显示:McZFP1 具有典型的 ZFP 家族保守结构域。二级结构预测结果(图 4-C)显示:McZFP1 的二级结构预测结果(图 4-C)显示:McZFP1 的二级结构预测结果(图 4-E)显示:McZFP1 的二级结构预测结果(图 4-E)显示:CFP1 的二级结构预测结果(图 4-E)显示:在阈值大于 0.5 的条件下,McZFP1 有 19 个磷酸化位点,包括 13 个丝氨酸、3 个酪氨酸和 3 个苏氨酸的磷酸化位点。



M: DL2000 DNA marker; 1: McZFP1.

\*:终止密码子 Termination codon.

图 1 薄荷 McZFP1 PCR 扩增产物的电泳结果 Fig. 1 Electrophoresis result of PCR amplification product of McZFP1 in Mentha canadensis Linn.

 <sup>1</sup> ATGCATATGGAGGCACCAAATTTAGAAAAGAACCCAATTATTCCCCATCATTATCATGCTTCAAATACTCAACTGCTGTGGAAGAAGAA

 M
 H
 M
 E
 A
 P
 N
 L
 E
 K
 E
 P
 N
 Y
 S
 P
 S
 L
 S
 T
 A
 V
 E
 E
 E

 91
 GGTGCTCACTACATTCAAAAACAAGACAAGTTCAATCACAGATTTCAAGCCAAGATTTGAAGGTAAATAAGCAATCGAAGAAACTGAA
 G
 A
 H
 Y
 I
 Q
 K
 Q
 D
 K
 F
 N
 R
 S
 S
 Q
 D
 K
 K
 S
 E
 E
 E

 91
 GGTGCTCACTACATTCAAAACAAGACAAGTTCAATCACAGAGATTTCAACAGGCAAGGTCCACGAGGGTAAATAAGCAATCGAAGAAACGAAGAACGT
 G
 A
 H
 Y
 I
 Q
 K
 F
 N
 H
 R
 F
 S
 S
 Q
 D
 L
 K
 V
 N
 K
 Q
 S
 K
 K
 S
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 E
 <td

LSLKL\*



分支上的数值为进化分支长度(仅标出大于或等于 0.1 的数值),代表遗传变异度 The values on the branches are evolutionary branch lengths (only values greater than or equal to 0.1 are showed) and represent the genetic variability. 括号中编号为 Tair 登录号 Nos. in the brackets are accession numbers in Tair.





A: McZFP1 的亲水性和疏水性 Hydrophilicity and hydrophobicity of McZFP1; B: McZFP1 的功能结构域 Functional domain of McZFP1; C: McZFP1 的二级结构 Secondary structure of McZFP1; D: McZFP1 的跨膜结构域 Transmembrane domain of McZFP1; E: McZFP1 的磷酸化位点 Phosphorylation site of McZFP1.

图 4 薄荷 McZFP1 的生物信息学分析结果 Fig. 4 Bioinformatics analysis result of McZFP1 in Mentha canadensis Linn.

# 2.3 薄荷 McZFP1 的氨基酸序列同源性分析及系统 进化树构建

薄荷 McZFP1 与其他 10 种植物同源蛋白的氨基 酸序列比对和系统进化树见图 5。结果显示:薄荷 McZFP1 及其他 10 种植物同源蛋白的氨基酸序列均 具有一段 QALGGH 保守序列,是典型的锌指蛋白转 录因子。薄荷 McZFP1 与一串红(Salvia splendens Ker-Gawler)同源蛋白 SsZFP7(NCBI 登录号 XP\_ 042063591.1)最先聚在一起,说明二者的亲缘关系 最近。



括号中编号为 NCBI 登录号 Nos. in the brackets are accession numbers in NCBI.

图 5 薄荷 McZFP1 与其他植物同源蛋白的氨基酸序列比对(A)和系统进化树(B) Fig. 5 Amino acid sequence alignment (A) and phylogenetic tree (B) of McZFP1 in *Mentha canadensis* Linn. with homologous proteins in other plants

## 2.4 薄荷 McZFP1 的表达模式分析

薄荷 McZFP1 在不同组织以及不同非生物胁迫 下幼叶和不定根中的表达水平见图 6。结果显示:薄 荷 McZFP1 在其不定根、茎、根状茎、幼叶、成熟叶和 花中均有表达,其中,在根状茎中的相对表达量最高, 显著高于其他组织;在不定根和幼叶中的相对表达量 也较高;在茎、成熟叶和花中的相对表达量较低。

在 150 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 处理下, 薄荷幼叶中 McZFP1 的相对表达量随着处理时间的延长总体呈 "升高—降低—升高"的变化趋势,其中,处理 2 和 12 h McZFP1 的相对表达量与处理 0 h 差异不显著;处 理 4 和 8 h 的 McZFP1 相对表达量分别显著高于和 低于处理 0 h;处理 24 h *McZFP1* 的相对表达量升至 最高,为处理 0 h 的 2.7 倍。薄荷不定根中 *McZFP1* 的相对表达量在处理 0、2、4、8、12 h 差异不显著,在 处理 24 h 急剧升高,其相对表达量为处理 0 h 的 125.3 倍。

在 300 mmol · L<sup>-1</sup>甘露醇处理下,薄荷幼叶中 McZFP1 的相对表达量随着处理时间的延长总体呈 "升高—降低—升高—降低"的变化趋势,其中,处理 2 和 8 h McZFP1 的相对表达量与处理 0 h 差异不显 著;处理 4 h McZFP1 的相对表达量达到峰值,为处理 0h的6.7倍;处理12和24h*McZFP1*的相对表达量显著高于处理0h。薄荷不定根中*McZFP1*的相对表达量随着处理时间的延长总体呈先升高后降低的变化趋势,其中,处理2、4和12h*McZFP1*的相对表达量高于处理0h,但差异不显著;处理8和24h*McZFP1*的相对表达量显著高于处理0h,且在处理8h达到峰值,为处理0h的14.9倍。

在 200 μmol · L<sup>-1</sup> 脱落酸处理下,薄荷幼叶中 McZFP1 的相对表达量随着处理时间的延长总体呈 先升高后降低的变化趋势,处理 2~24 h McZFP1 的



AR: 不定根 Adventitious root; S: 茎 Stem; R: 根状茎 Rhizome; YL: 幼叶 Young leaf; ML: 成熟叶 Mature leaf; F: 花 Flower. M: 甘露醇 Mannitol; ABA: 脱落酸 Abscisic acid; MeJA: 茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate. 同一图中不同小写字母表示差异显著(P<0.05) Different lowercases in the same graph indicate the significant (P<0.05) differences.



相对表达量均显著高于处理0h,其中,处理8h达到 峰值,为处理0h的6.4倍。薄荷不定根中*McZFP1* 的相对表达量随着处理时间的延长呈先升高后降低 的变化趋势,其中,处理2和4h*McZFP1*的相对表达 量与处理0h差异不显著,处理8、12和24h*McZFP1* 的相对表达量显著高于处理0h,且在处理12h达到 峰值,为处理0h的10.2倍。

在 200 μmol · L<sup>-1</sup>茉莉酸甲酯处理下,处理 2~ 24 h 薄荷幼叶中 McZFP1 的相对表达量均显著高于 处理 0 h。薄荷不定根中 McZFP1 的相对表达量随着 处理时间的延长呈先升高后降低的变化趋势,其中, 处理 2、4 和 8 h McZFP1 的相对表达量显著高于处理 0 h,且在处理 8 h 达到峰值,为处理 0 h 的 29.2 倍;处 理 12 和 24 h McZFP1 的相对表达量与处理 0 h 差异 不显著。

## 2.5 薄荷 McZFP1 的亚细胞定位分析

利用在线工具 CELLO2GO 预测薄荷 McZFP1 的 亚细胞定位,该蛋白定位于细胞核的数值(2.773)远 大于定位于细胞内其他部位的数值(0.005~1.471), 预测 McZFP1 可能定位于细胞核。进一步构建 McZFP1 与绿色荧光蛋白(GFP)的融合表达载体,并 利用农杆菌介导的本氏烟草叶片瞬时表达分析其亚 细胞定位。荧光信号检测结果(图7)显示:McZFP1-



McZFP1-GFP: McZFP1 与绿色荧光蛋白的融合蛋白 Merged protein of McZFP1 with green fluorescent protein; DAPI: 4',6-二脒基-2-苯基吲哚4',6-diamidino-2-phenylindole; M: 叠加视野 Merged field.

#### 图 7 薄荷 McZFP1 的亚细胞定位

Fig. 7 Subcellular localization of McZFP1 in *Mentha canadensis* Linn.

GFP 融合蛋白与细胞核指示染料 4′,6-二脒基-2-苯 基吲哚(DAPI)的定位标记基本一致,说明了 McZFP1 是定位于细胞核的蛋白质。

### 2.6 薄荷 McZFP1 的转录自激活活性分析

转录自激活验证实验结果(图 8)表明:转 pGBKT7 空质粒(BD-plasmid)、pGBKT7-McZFP1 (BD-McZFP1)及pGBKT7-AtSIZ1(BD-AtSIZ1)的酵 母均可以在 SD/-Trp 固体培养基上正常生长;转 BD-plasmid 和 BD-McZFP1 的酵母均不能在 SD/ -Ade/-Trp/-His 固体培养基上生长,而转 BD-AtSIZ1 的酵母则能正常生长,表明 McZFP1 不具有转录自激 活活性。



1,1/10,1/100,1/1 000:分别表示酵母菌液不稀释以及稀释 10、100 和 1 000 倍 Indicating that the yeast solution is not diluted and diluted 10, 100, and 1 000 times, respectively. BD-plasmid:转pGBKT7 空质粒的酵母 Yeast transformed with pGBKT7 empty plasmid; BD-McZFP1:转pGBKT7-McZFP1 的酵母 Yeast transformed with pGBKT7-McZFP1; BD-AtSIZ1:转pGBKT7-AtSIZ1 的酵母 Yeast transformed with pGBKT7-AtSIZ1.

图 8 薄荷 McZFP1 的转录自激活活性验证 Fig. 8 Verification of transcriptional self-activating activity of McZFP1 in Mentha canadensis Linn.

### 2.7 过表达 McZFP1 转基因拟南芥的获得及鉴定

35S:McZFP1-GFP转基因拟南芥阳性苗的鉴定 结果见图 9。结果显示:初步鉴定叶片绿色健康、根 系生长良好的拟南芥幼苗为转基因阳性苗,命名为 OE1和OE2。以拟南芥植株 DNA为模板,从 DNA水 平对转基因拟南芥阳性苗进行 PCR鉴定,同时以拟 南芥植株 RNA反转录产物为模板,利用 RT-PCR 技 术鉴定转基因阳性苗,鉴定结果显示:得到的 2 个转



M: DL2000 DNA marker; 1: 35S:McZFP1-GFP-OE1; 2: 35S:McZFP1-GFP-OE2; 3: 野生型 Wild type; At: 拟南芥 Arabidopsis thaliana (Linn.) Heynh. 图 D 中不同小写字母表示差异显著(P<0.05) Different lowercases in the graph D indicate the significant (P<0.05) differences.

A: 35S:McZFP1-GFP 转基因拟南芥 T<sub>0</sub>代阳性苗 Transgenic 35S:McZFP1-GFP T<sub>0</sub> generation positive seedlings of Arabidopsis thaliana (Linn.) Heynh.; B: 转基因拟南芥 DNA 水平鉴定 Identification of transgenic A. thaliana at the DNA level; C: RT-PCR 技术检测 McZFP1 基因表达 Detection of McZFP1 gene expression by RT-PCR; D: qRT-PCR 检测 McZFP1 在转基因植株中的表达水平 Detection of McZFP1 expression level in transgenic plants by qRT-PCR.

图 9 35S: McZFP1-GFP 转基因拟南芥阳性苗的鉴定 Fig. 9 Identification of transgenic 35S: McZFP1-GFP positive seedlings of Arabidopsis thaliana (Linn.) Heynh.

基因苗确定为阳性苗。利用实时荧光定量 PCR 技术 检测转基因植株中 McZFP1 的相对表达量,结果表明 所获得的 OE1 和 OE2 是 McZFP1 转基因阳性苗。

## 3 讨论和结论

盐和干旱等非生物胁迫因子会使植物代谢水平 降低,生长发育受到抑制,甚至可能对植物造成不可 逆的损害,严重时可能导致植物死亡<sup>[37]</sup>。薄荷受到 高盐和干旱胁迫后,其精油的产量会受到抑制,精油 成分也会受到影响,从而影响生产加工。逆境胁迫 下,转录因子通过调控一系列抗逆基因的表达,提高 植物的抗逆性<sup>[38]</sup>。C2H2型锌指蛋白类转录因子是 植物体内分布最广泛且在许多生理生化反应中具有 关键调控作用的一类转录因子,其成员在植物的生长 发育以及应对环境胁迫中发挥着重要作用<sup>[39]</sup>。

本研究从薄荷中克隆了 1 个 C2H2 型锌指蛋白 转录因子基因 *McZFP1*。McZFP1 具有 C2H2 保守结 构域,与许多锌指蛋白转录因子具有较高的同源性, 该蛋白定位于细胞核,表明 McZFP1 是典型的锌指蛋 白转录因子,其功能可能类似于已报道的 C2H2 型锌 指蛋白类转录因子,在植物的生长发育以及应对环境 胁迫中具有潜在的作用,如营养生长、生殖发育、光调 节形态建成、逆境响应和激素信号转导 等<sup>[20-27],[28]18-25</sup>。此外,*McZFP1*在薄荷的不定根、茎、 根状茎、幼叶、成熟叶和花中均有表达,在根状茎中相 对表达量最高,在不定根和幼叶中相对表达量也较 高,在茎、花和成熟叶中相对表达量较低,暗示该基因 可能主要在根状茎和不定根的发育或者行使相关功 能中发挥作用。

ZFP 亚家族在植物发育与抗逆中发挥着重要的 调控作用<sup>[40]</sup>。拟南芥 AtZFP1 正调控表皮毛发 育[41],并在植株顶端包括顶端分生组织以及发育中 的叶和维管系统中高表达,可能参与茎顶端发育<sup>[42]</sup>。 近年来,在一些药用植物中也报道了 ZFP 参与植物 抵抗逆境胁迫。沙蒿(Artemisia desertorum Spreng.)锌 指蛋白转录因子基因 AdZFP1 的转录本在一定程度 上受外源脱落酸以及盐、低温、高温、干旱胁迫的诱 导,在烟草中过表达 AdZFP1 可显著提高植株的耐旱 性<sup>[43]</sup>。人参(Panax ginseng C. A. Meyer) PgZFP 基 因家族中 PgZFP31、PgZFP78 - 01、PgZFP38 和 PgZFP39-01 在受到盐胁迫时表达量显著升高,推测 其可能在人参对盐胁迫的响应中发挥着重要作 用<sup>[44]</sup>。本研究中,薄荷幼叶和不定根中 McZFP1 的 相对表达量在 150 mmol · L<sup>-1</sup> NaCl 和 300 mmol · L<sup>-1</sup> 甘露醇处理 24 h 内存在显著变化,说明其响应高盐 和干旱胁迫。脱落酸作为一种重要的胁迫激素,参与 植物对盐和干旱等非生物胁迫的响应<sup>[45]</sup>。拟南芥 AtZFP3 及其同源基因 AtZFP1、AtZFP4、AtZFP6 和 AtZFP7 均是脱落酸响应的负调控因子, 拟南芥中过 表达AtZFP3 导致种子对脱落酸的敏感性降低,而 zfp3/zfp4 双突变体对脱落酸的敏感性增强<sup>[46]</sup>。拟南 芥 AtZFP3 通过调控脱落酸信号途径中的 RESPONSIVE TO ABSCISIC ACID18 (RAB18) 和 ABSCISIC ACID-INSENSITIVE4(ABI4)等基因的表达 来负调控脱落酸信号途径,进而调控拟南芥种子萌 发,影响其营养和生殖生长。马铃薯(Solanum tuberosum Linn.) StZFP1 受脱落酸诱导表达,在拟南 芥rd29A 启动子的驱动下, StZFP1 在转基因烟草中 的异位表达提高了烟草对盐和干旱胁迫的耐受性,表 明 StZFP1 可能通过脱落酸依赖性途径参与调控马铃 薯对盐和干旱胁迫的反应<sup>[19]</sup>。茉莉酸甲酯作为一种 新型的植物生长调节剂,与植物的抗逆性密切相关, 可以通过保护植物的光合系统、提高抗氧化酶活性和 提高渗透调节物质含量等方式缓解植物受到的逆境 伤害<sup>[47-51]</sup>。水稻 OsWRKY76 和 OsbHLH148 直接与 OsDREB1E 启动子结合,激活 OsDREB1E 的表达以响 应干旱胁迫,OsHLH148 介导的茉莉酸信号途径正调 控水稻的耐旱性<sup>[52]</sup>。苹果(Malus domestica Mill.)中 C2H2型锌指蛋白转录因子基因 MdZAT10 受茉莉酸 甲酯诱导表达,调控苹果叶片对干旱胁迫的响应,同 时加速茉莉酸诱导的叶片衰老过程[53-54]。本研究 中,200 µmol · L<sup>-1</sup>脱落酸和 200 µmol · L<sup>-1</sup>茉莉酸甲 酯处理可诱导薄荷幼叶和不定根中 McZFP1 的表达, 推测 McZFP1 可能通过介导脱落酸信号和茉莉酸信 号调控薄荷对盐和干旱等非生物胁迫的应答。

综上所述,本研究成功克隆了薄荷 McZFP1,并 对其进行了生物信息学分析。McZFP1 定位于细胞 核但不具备转录自激活活性,该基因在薄荷植物体内 的组织中广泛表达,在根状茎和不定根中的表达水平 较高,受盐和干旱胁迫诱导表达显著,并响应脱落酸 信号和茉莉酸信号。此外,筛选并获得了 McZFP1 转 基因拟南芥 T<sub>0</sub> 代阳性苗及其种子,这将有助于进一 步深入研究 McZFP1 的功能。本研究结果为薄荷 McZFP1 的后续功能验证以及培育优质的耐盐、耐旱 薄荷品种提供了基础。

### 参考文献:

- [1] 孙文豪,杨 扬,陈 恒,等.薄荷有效成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药, 2023, 55(5): 78-82.
- [2] 蒋 征,王 红,吴啟南,等.药用植物腺毛研究进展[J].中 草药,2016,47(22):4118-4126.
- [3] 陈泽群, 亓希武, 房海灵, 等. 薄荷 McHD-Zip3 基因的克隆及其 调控腺毛发育的功能分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29
  (3): 1-10.
- [4] TISSIER A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? [J]. The Plant Journal, 2012, 70(1): 51-68.
- [5] SAQIB S, ULLAH F, NAEEM M, et al. Mentha: nutritional and

health attributes to treat various ailments including cardiovascular diseases[J]. Molecules, 2022, 27(19): 6728.

- [6] HOSSEINI S J, TAHMASEBI-SARVESTANI Z, PIRDASHTI H, et al. Investigation of yield, phytochemical composition, and photosynthetic pigments in different mint ecotypes under salinity stress[J]. Food Science and Nutrition, 2021, 9(5): 2620-2643.
- [7] OSTADI A, JAVANMARD A, AMANI MACHIANI M, et al. Optimizing antioxidant activity and phytochemical properties of peppermint (*Mentha piperita* L.) by integrative application of biofertilizer and stress-modulating nanoparticles under drought stress conditions[J]. Plants, 2022, 12(1): 151.
- [8] HEYDERI M, ZANFARDINO A, TALEEI A, et al. Effect of heat stress on yield, monoterpene content and antibacterial activity of essential oils of *Mentha × piperita* var. Mitcham and *Mentha arvensis* var. *piperascens*[J]. Molecules, 2018, 23(8): 1903.
- [9] 韦祎旸. 盐胁迫对几种药用植物生长发育和生理生化特性的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2015: 13-16.
- [10] LI Z, WANG W, LI G, et al. MAPK-mediated regulation of growth and essential oil composition in a salt-tolerant peppermint (*Mentha piperita* L.) under NaCl stress[J]. Protoplasma, 2016, 253(6): 1541-1556.
- [11] RAHIMI Y, TALEEI A, RANJBAR M. Changes in the expression of key genes involved in the biosynthesis of menthol and menthofuran in *Mentha piperita* L. under drought stress [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2017, 39(9): 203.
- [12] BUFALO J, RODRIGUES T M, DE ALMEIDA L F R, et al. PEG-induced osmotic stress in *Mentha* × *piperita* L.: structural features and metabolic responses [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 105: 174-184.
- [13] ZHU J K. Abiotic stress signaling and responses in plants [J]. Cell, 2016, 167(2): 313-324.
- [14] ZHANG H, ZHU J, GONG Z, et al. Abiotic stress responses in plants[J]. Nature Reviews. Genetics, 2022, 23(2): 104-119.
- [15] ZHANG Y, XIA P. The DREB transcription factor, a biomacromolecule, responds to abiotic stress by regulating the expression of stress-related genes [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 243: 125231.
- [16] WU Y, LI X, ZHANG J, et al. ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses [J].
  Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1042084.
- [17] WANG X, NIU Y, ZHENG Y. Multiple functions of MYB transcription factors in abiotic stress responses [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 6125.
- [18] MOON S J, HAN S Y, KIM D Y, et al. Ectopic expression of a hot pepper bZIP-like transcription factor in potato enhances drought tolerance without decreasing tuber yield [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 89(4/5): 421-431.
- [19] TIAN Z D, ZHANG Y, LIU J, et al. Novel potato C2H2-type zinc finger protein gene, *StZFP1*, which responds to biotic and abiotic stress, plays a role in salt tolerance[J]. Plant Biology, 2010, 12

(5): 689-697.

- [20] LIU Y, KHAN A R, GAN Y. C2H2 zinc finger proteins response to abiotic stress in plants [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(5): 2730.
- [21] 岳远志, 贾园园, 刘博雅, 等. 刚毛柽柳 *ThZFP3* 基因的克隆 及表达特征分析[J]. 植物生理学报, 2022, 58(5): 919-928.
- [22] HAN G, LU C, GUO J, et al. C2H2 zinc finger proteins: master regulators of abiotic stress responses in plants[J]. Frontier in Plant Science, 2020, 11: 115.
- [23] HAN G, LI Y, QIAO Z, et al. Advances in the regulation of epidermal cell development by C2H2 zinc finger proteins in plants
  [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 754512.
- [24] HUANG Y, DU L, WANG M, et al. Multifaceted roles of zinc finger proteins in regulating various agronomic traits in rice [J].
  Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 974396.
- [25] ZHANG A, LIU D, HUA C, et al. The Arabidopsis gene zinc finger protein 3 (ZFP3) is involved in salt stress and osmotic stress response[J]. PLoS ONE, 2017, 11(12): e0168367.
- [26] HUANG J, YANG X, WANG M M, et al. A novel rice C2H2-type zinc finger protein lacking DLN-box/EAR-motif plays a role in salt tolerance [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2007, 1769(4): 220-227.
- [27] XU D Q, HUANG J, GUO S Q, et al. Over expression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (Oryza sativa L.) [J]. FEBS Letters, 2008, 582(7): 1037-1043.
- [28] 杨 霞.两个水稻金属离子转运体基因和两个水稻锌指蛋白基因的克隆与功能研究[D].南京:南京农业大学,2007.
- [29] QI X, CHEN Z, YU X, et al. Characterisation of the Mentha canadensis R2R3-MYB transcription factor gene McMIXTA and its involvement in peltate glandular trichome development [J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1): 219.
- [30] BAI Y, ZHANG T, ZHENG X, et al. Overexpression of a WRKY transcription factor McWRKY57-like from *Mentha canadensis* L. enhances drought tolerance in transgenic Arabidopsis [J]. BMC Plant Biology, 2023, 23(1): 216.
- [31] QI X, FANG H, YU X, et al. Transcriptome analysis of JA signal transduction, transcription factors, and monoterpene biosynthesis pathway in response to methyl jasmonate elicitation in *Mentha canadensis* L. [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(8): 2364.
- [32] 张 婷,柏 杨, 元希武,等. 薄荷 MhWRKY57 基因克隆及响应茉莉酸信号的表达分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2022, 46(6): 279-287.
- [33] LI X, WANG Y, LI J, et al. qPCRtools: an R package for qPCR data processing and visualization[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 1002704.
- [34] ZHANG H, DING Y, YANG K, et al. An insight of *Betula* platyphylla SWEET gene family through genome-wide identification, expression profiling and function analysis of

*BpSWEET1c* under cold stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(17): 13626.

- [35] ALI I, SALAH K B H, SHER H, et al. Drought stress enhances the efficiency of floral dip method of Agrobacterium-mediated transformation in *Arabidopsis thaliana* [J]. Brazilian Journal of Biology, 2022, 84: e259326.
- [36] ABDEL-LATIF A, OSMAN G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize [J]. Plant Methods, 2017, 13(1): 1.
- [37] GONG Z, XIONG L, SHI H, et al. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency [J]. Science China. Life Sciences, 2020, 63(5): 635-674.
- [38] BAILLO E H, KIMOTHO R N, ZHANG Z, et al. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement[J]. Genes, 2019, 10(10): 771.
- [39] 钟婵娟, 彭伟业, 王 冰, 等. 植物逆境响应相关的 C2H2 型 锌指蛋白研究进展[J]. 植物生理学报, 2020, 56(11): 2356-2366.
- [40] 张 佳, 刘俊芳, 赵婷婷, 等. 植物 C2H2 型锌指蛋白研究进 展[J]. 分子植物育种, 2018, 16(2): 427-433.
- [41] ZHANG A, LIU Y, YU C, et al. Zinc finger protein 1 (ZFP1) is involved in trichome initiation in Arabidopsis thaliana [J]. Agriculture, 2020, 10(12): 645.
- [42] CHRISPEELS H E, OETTINGER H, JANVIER N, et al. AtZFP1, encoding Arabidopsis thaliana C2H2 zinc-finger protein
  1, is expressed downstream of photomorphogenic activation [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(2): 279-290.
- [43] YANG X, SUN C, HU Y, et al. Molecular cloning and characterization of a gene encoding RING zinc finger ankyrin protein from drought-tolerant Artemisia desertorum [J]. Journal of Biosciences, 2008, 33(1): 103-112.
- [44] JIANG Y, LIU L, PAN Z, et al. Genome-wide analysis of the C2H2 zinc finger protein gene family and its response to salt stress in ginseng, *Panax ginseng* Meyer [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 10165.
- [45] DERKSEN H, RAMPITSCH C, DAAYF F. Signaling cross-talk in plant disease resistance[J]. Plant Science, 2013, 207: 79-87.
- [46] JOSEPH M P, PAPDI C, KOZMA-BOGNÁR L, et al. The Arabidopsis ZINC FINGER PROTEIN3 interferes with abscisic acid and light signaling in seed germination and plant development[J]. Plant Physiology, 2014, 165(3): 1203-1220.
- [47] ZHANG H, ZHANG Q, ZHAI H, et al. Transcript profile analysis reveals important roles of jasmonic acid signalling pathway in the response of sweet potato to salt stress [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40819.
- [48] FATMA M, IQBAL N, SEHAR Z, et al. Methyl jasmonate protects the PS II system by maintaining the stability of chloroplast D1 protein and accelerating enzymatic antioxidants in heat-stressed wheat plants[J]. Antioxidants, 2021, 10(8): 1216. (下转第 58 页 Continued on page 58)

\*\*\*\*\*\*\*\*

induction and beyond [J]. Annals of Botany, 2014, 114(7): 1459-1470.

- [31] 杨金荣,崔婉宁,张 瑜,等.基于转录组数据的半夏 AP2/ ERF 基因家族鉴定及逆境响应分析[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(5):176-184.
- [32] YUE P, JIANG Z, SUN Q, et al. Jasmonate activates a CsMPK6-CsMYC2 module that regulates the expression of β-citraurin biosynthetic genes and fruit coloration in orange (*Citrus sinensis*) [J]. The Plant Cell, 2023, 35(4): 1167–1185.
- [33] LIU Y, DU M, DENG L, et al. MYC2 regulates the termination of jasmonate signaling via an autoregulatory negative feedback loop
  [J]. The Plant Cell, 2019, 31(1): 106–127.
- [34] ALI A, PARDO J M, YUN D J. Desensitization of ABA-signaling: the swing from activation to degradation [J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 379.
- [35] FUJITA Y, FUJITA M, SATOH R, et al. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2005, 17(12): 3470-3488.
- [36] JIA Y, BAI Z, PEI T, et al. The protein kinase SmSnRK2.6 positively regulates phenolic acid biosynthesis in Salvia miltiorrhiza by interacting with SmAREB1 [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1384.
- [37] XU Z, WANG F, MA Y, et al. Transcription factor SIAREB1 is involved in the antioxidant regulation under saline-alkaline stress in tomato[J]. Antioxidants, 2022, 11(9): 1673.
- [38] FENG C Z, CHEN Y, WANG C, et al. Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination

and early seedling development [J]. The Plant Journal, 2014, 80 (4): 654-668.

- [39] MITTAL A, GAMPALA S S L, RITCHIE G L, et al. Related to ABA-Insensitive3 (ABI3)/Viviparous1 and AtABI5 transcription factor co-expression in cotton enhances drought stress adaptation [J]. Plant Biotechnology Journal, 2014, 12(5): 578-589.
- [40] LIN Z, LI Y, WANG Y, et al. Initiation and amplification of SnRK2 activation in abscisic acid signaling [J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2456.
- [41] NAKASHIMA K, FUJITA Y, KANAMORI N, et al. Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/ SnRK2.6/OST1 and SRK21/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy[J]. Plant and Cell Physiology, 2009, 50(7): 1345-1363.
- [42] YANG X, GAVYA S L, ZHOU Z, et al. Abscisic acid regulates stomatal production by imprinting a SnRK2 kinase-mediated phosphocode on the master regulator SPEECHLESS [J]. Science Advances, 2022, 8(40): eadd2063.
- [43] JIA M, LI X, WANG W, et al. SnRK2 subfamily I protein kinases regulate ethylene biosynthesis by phosphorylating HB transcription factors to induce ACO1 expression in apple[J]. New Phytologist, 2022, 234(4): 1262-1277.
- [44] WANG P, XUE L, BATELLI G, et al. Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(27): 11205-11210.

(责任编辑:张明霞)

### (上接第46页 Continued from page 46)

- [49] KAYA C, UGURLAR F, ASHRAF M, et al. Methyl jasmonate and sodium nitroprusside jointly alleviate cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants by modifying nitrogen metabolism, cadmium detoxification, and AsA-GSH cycle [J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 654780.
- [50] CUI H, YANG F, LI Y. Exogenous methyl jasmonate enhances lipid production in *Isochrysis galbana* under nitrogen deprivation and high light[J]. Algal Research, 2021, 58: 102406.
- [51] REPKINA N, IGNATENKO A, HOLOPSTSEVA E, et al. Exogenous methyl jasmonate improves cold tolerance with parallel induction of two cold-regulated (*COR*) genes expression in

Triticum aestivum L.[J]. Plants, 2021, 10(7): 1421.

- [52] ZHANG M, ZHAO R, HUANG K, et al. OsWRKY76 positively regulates drought stress via OsbHLH148-mediated jasmonate signaling in rice[J]. Front in Plant Science, 2023, 14: 1168723.
- [53] 杨 阔. 苹果 C2H2 型锌指蛋白 MdZAT10 调控叶片衰老和干 旱胁迫的机理研究[D]. 泰安:山东农业大学, 2021:47-81.
- [54] YANG K, AN J P, LI C Y, et al. The apple C2H2-type zinc finger transcription factor MdZAT10 positively regulates JA-induced leaf senescence by interacting with MdBT2[J]. Horticulture Research, 2021, 8(1): 159.

(责任编辑:张明霞)