

薄荷 *McHD-Zip3* 基因的克隆及其 调控腺毛发育的功能分析

陈泽群, 亓希武^①, 房海灵, 于 旻, 李 莉, 梁呈元^①

[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: 以薄荷 (*Mentha canadensis* Linn.) cDNA 为模版, 克隆获得 1 个 HD-Zip 转录因子基因, 对该基因的组织表达特性以及对转基因烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) 叶片腺毛发育的影响效应进行分析, 并对该基因编码的氨基酸序列的特性及其与其他植物的同源性和亲缘关系以及亚细胞定位和转录激活活性进行研究。结果显示: 该基因被命名为 *McHD-Zip3*, 其编码区 (CDS) 全长 2 226 bp, 编码 741 个氨基酸残基; 该基因编码的氨基酸序列的理论相对分子质量为 81 375.67, 理论等电点为 pI 5.92。 *McHD-Zip3* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 HD-Zip 转录因子的氨基酸序列具有一定的序列相似性, 且均具有保守的 Homeodomain、bZip motif、START domain 和 SAD domain, 其与同科植物一串红 (*Salvia splendens* Ker-Gawl.) 的 SsHD-Zip 转录因子的序列相似度最高 (82.57%)。在系统树上, *McHD-Zip3* 转录因子与其他植物的多个腺毛发育相关的 HD-Zip 转录因子聚为一支, 同属于 HD-Zip IV 亚家族, 其与黄花蒿 (*Artemisia annua* Linn.) 的 AaHD7 转录因子的亲缘关系最近。 *McHD-Zip3* 转录因子定位于细胞核中, 为核定位蛋白, 且具有转录激活活性。 *McHD-Zip3* 基因的相对表达量在薄荷不同组织中差异显著, 其在幼叶和老叶中较高, 但在根和茎中较低; *McHD-Zip3* 转基因烟草叶片的腺毛密度明显高于野生型烟草。研究结果表明: *McHD-Zip3* 基因主要在薄荷叶片中表达, *McHD-Zip3* 转录因子属于 HD-Zip IV 亚家族, 对薄荷腺毛发育具有调控功能。

关键词: 薄荷; *McHD-Zip3* 基因; 表达特性; 亚细胞定位; 转录激活活性; 腺毛发育

中图分类号: Q785; Q943.2; S567.23*5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)03-0001-10

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.03.01

Cloning of *McHD-Zip3* gene of *Mentha canadensis* and function analysis on its regulatory of development of glandular trichomes CHEN Zequn, QI Xiwu^①, FANG Hailing, YU Xu, LI Li, LIANG Chengyuan^① (Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(3): 1-10

Abstract: Taking cDNA of *Mentha canadensis* Linn. as template, a HD-Zip transcription factor gene was cloned, and its tissue expression characteristics and effect on development of glandular trichomes on leaf of transgenic *Nicotiana tabacum* Linn. were analyzed, meanwhile the characteristics of amino acid sequence encoded by this gene, and its homology and genetic relationship with other plants, and subcellular localization and transcriptional activation activity were studied. The results show that this gene is named as *McHD-Zip3*, and its full length of coding sequence (CDS) is 2 226 bp, which encodes 741 amino acid residues; the theoretical relative molecular mass of amino acid sequence encoded by this gene is 81 375.67, and the theoretical isoelectric point is pI 5.92. There are some sequence similarities in amino acid sequence encoded by *McHD-Zip3* gene with those of HD-Zip transcription factors of other plants, and all of them possess conserved Homeodomain, bZip motif, START domain and SAD domain, and its sequence similarity with SsHD-Zip transcription factor of *Salvia splendens* Ker-Gawl. in the same

收稿日期: 2019-12-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31970353); 江苏省植物资源研究与利用重点实验室开放基金资助项目 (JSPKLB201838)

作者简介: 陈泽群 (1993—), 男, 山东聊城人, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源研究。

^①通信作者 E-mail: qixiwu@126.com; liangcy618@aliyun.com

family is the highest (82.57%). On phylogenetic tree, McHD-Zip3 transcription factor and many HD-Zip transcription factors associated with development of glandular trichomes in other plants are clustered into one branch, all of them belong to HD-Zip IV subfamily, and its genetic relationship with AaHD7 transcription factor of *Artemisia annua* Linn. is the closest. McHD-Zip3 transcription factor is a nuclear locating protein localized in cell nucleus, and being with transcriptional activation activity. The relative expression of *McHD-Zip3* gene is significantly different in different tissues of *M. canadensis*, which is relatively high in young leaf and old leaf, but is relatively low in root and stem; the density of glandular trichomes on leaf of *McHD-Zip3* transgenic *N. tabacum* is evidently higher than that of wild type *N. tabacum*. It is suggested that *McHD-Zip3* gene is mainly expressed in leaf of *M. canadensis*, and McHD-Zip3 transcription factor belongs to HD-Zip IV subfamily, which has regulatory function on development of glandular trichomes of *M. canadensis*.

Key words: *Mentha canadensis* Linn.; *McHD-Zip3* gene; expression characteristics; subcellular localization; transcriptional activation activity; development of glandular trichome

薄荷 (*Mentha canadensis* Linn.) 隶属于唇形科 (Lamiaceae) 薄荷属 (*Mentha* Linn.), 为多年生草本植物, 其干燥地上部分可入药, 具有疏散风热和清利头目之效, 可用于治疗风热感冒、口疮和胸胁胀闷等^[1]。薄荷精油是薄荷的主要药用成分, 而腺毛是生成精油的“生物工厂”^[2]。薄荷腺毛为多细胞结构, 可分为分泌型腺毛和非分泌型腺毛 2 类, 前者包括头状腺毛和盾状腺毛, 其中盾状腺毛是薄荷精油合成、分泌和贮存的重要场所^[3-4]。

腺毛的生长和发育受基因调控, 且关于单细胞表皮毛的起始和发育研究较为深入^[5-6]。从模式植物拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 中已鉴定获得 70 多种与表皮毛相关的突变体, 涉及 30 多个基因, 其中, 由 3 类转录因子构成的复合体 MYB-bHLH-WD40 对单细胞表皮毛的发育具有重要的调控作用^[6]。相对于单细胞表皮毛, 研究者对多细胞表皮毛的发育调控研究尚不全面, 目前报道的调控基因主要包括 2 类: 一类是以金鱼草 (*Antirrhinum majus* Linn.) MYB 家族转录因子 MIXTA 为代表的同源基因^[7-9]; 另一类为同源异型-亮氨酸拉链 (Homeodomain-leucine zipper, HD-Zip) 家族转录因子基因^[10-12]。

HD-Zip 转录因子家族属于 Homeobox 蛋白家族, 是植物中特有的一类转录因子^[13]。HD-Zip 转录因子由 DNA-同源结构域和亮氨酸拉链结构组成, 其中, DNA-同源结构域由 60 个氨基酸残基组成, 主要与 DNA 特异性结合; 亮氨酸拉链结构由 35~42 个氨基酸残基组成, 主要介导蛋白二聚体的形成^[14-16]。HD-Zip 转录因子根据其基因结构和进化关系, 可分为 4 个亚家族, 即 HD-Zip I、HD-Zip II、HD-Zip III

和 HD-Zip IV, 主要参与生物和非生物胁迫响应、细胞分化、生长发育和形态建成等生物过程^[17]。其中 HD-Zip IV 亚家族的基因在植物的表皮细胞中特异表达, 主要参与调控表皮细胞分化、根生长和毛状体形成等^[18]。在 HD-Zip IV 亚家族中, 有多个转录因子能够调控植物腺毛的发育, 例如: 番茄 (*Solanum lycopersicum* Linn.) 的 *woolly* 基因可以调控番茄 Type I 类型腺毛的起始和发育^[19]; 黄花蒿 (*Artemisia annua* Linn.) 的 *AaHDI* 基因可以增加黄花蒿腺毛的密度, 且其 *AaMIXTA1* 和 *AaHD8* 基因还能够形成复合体, 共同调控腺毛的发生和发育^[12, 20]; 黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.) 的 *CsGL3* 基因对瓜体多细胞腺毛的发育有重要的调节作用^[21]。

作为合成精油的重要场所, 腺毛的发育对薄荷精油的合成和积累具有重要作用。为探索 HD-Zip 转录因子在薄荷腺毛发育过程中的功能, 进一步解析其腺毛发育的分子机制, 作者依据前期对薄荷转录组的测序结果^[22], 从薄荷中克隆获得 1 个 HD-Zip IV 亚家族转录因子基因, 对其序列特性、组织表达特性、亚细胞定位和转录激活活性进行分析, 并通过该基因在烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) 中的过表达, 分析其对烟草腺毛发育的影响, 以期对薄荷腺毛发育调控的分子机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试薄荷品种‘68-7’由上海日用化学工业研究所选育, 保存于江苏省中国科学院植物研究所薄荷种质资源圃中。于 2018 年 4 月, 分别选取薄荷植株上

生长状态良好的幼叶、老叶、茎和根,每3株的各组织样品分别混合均匀,共取样3组,记为3个生物学重复。供试样品经液氮速冻后置于-80℃条件下保存、备用。

供试烟草品种‘K326’和本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* Domin)种子由作者所在实验室保存,烟草种子经体积分数75%乙醇表面消毒1min后置于MS培养基上萌发,长至苗高8cm左右时,用于遗传转化;本氏烟草种子直接播种于营养土中,生长1个月用于侵染实验。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取及cDNA第1链的合成 称取薄荷不同组织样品各1g,置于液氮中研磨,采用RNAiso Plus试剂[宝日生物技术(北京)有限公司]提取总RNA,并采用NanoDrop 1000微量紫外分光光度计(美国Thermo Scientific公司)检测总RNA的质量和浓度。取1μg总RNA,用RT6 cDNA Synthesis Kit试剂盒(北京擎科新业生物技术有限公司)进行反转录,获得cDNA,具体的操作过程详见试剂盒使用说明书。

1.2.2 基因克隆 根据前期对薄荷转录组测序结果^[22],用Primer Premier 5软件设计引物(表1),并以上述薄荷cDNA为模板进行PCR扩增。扩增体系总体积25.0μL,包含金牌Mix 22.0μL、模板cDNA 1.0μL、10μmol·L⁻¹上游和下游引物各1.0μL。扩增程序为:98℃预变性5min;98℃变性30s、55℃退火30s、72℃延伸35s,共35个循环;最后于72℃延伸5min。PCR产物用质量体积分数1%琼脂糖凝胶进行电泳分离,切取目标条带,用DNA凝胶回收试剂盒(北京擎科新业生物技术有限公司)纯化回收;连接至pClone007 Blunt Simple Vector载体(北京擎科新业生物技术有限公司),转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞中,挑取阳性克隆,交由北京擎科新业生物技术有限公司测序验证。

1.2.3 生物信息学分析 使用BioEdit软件对克隆获得的*McHD-Zip3*基因序列进行蛋白质编码区预测和氨基酸翻译;使用ExpASy网站(http://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool)预测该基因编码的氨基酸序列的理论相对分子质量和理论等电点;使用NCBI网站BLAST程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对该基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列进行比对搜索;使用SMART网站([\[smart.embl-heidelberg.de/\]\(http://smart.embl-heidelberg.de/\)\)预测该基因编码的氨基酸序列的结构域;使用Clustal X软件对*McHD-Zip3*转录因子与其他植物的HD-Zip转录因子进行多重比对;基于*McHD-Zip3*转录因子和其他植物的HD-Zip IV亚家族转录因子的氨基酸序列,使用MEGA 4.0软件,采用Neighbor-joining\(NJ\)法构建系统树。](http://</p></div><div data-bbox=)

1.2.4 实时荧光定量PCR 根据*McHD-Zip3*基因序列设计用于实时荧光定量PCR(qRT-PCR)的引物,以薄荷肌动蛋白基因*McActin*为内参基因^[22]设计用于qRT-PCR的引物(表1),以薄荷各组织cDNA为模板进行qRT-PCR分析。反应体系总体积20.0μL,包含SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 10.0μL、cDNA模板2.0μL、10μmol·L⁻¹上游和下游引物各0.4μL、去离子水7.2μL。使用qTOWER 2.2荧光定量PCR仪(德国Analytik Jena公司)进行qRT-PCR反应,扩增程序为:98℃预变性1min;98℃变性5s、60℃退火10s、72℃延伸15s,共40个循环;72℃采集荧光信号。使用2^{-ΔΔC_T}法^[23]计算基因的相对表达量,设3个生物学重复。

1.2.5 亚细胞定位 根据植物表达载体p35SGK-GFP以及*McHD-Zip3*基因序列设计引物(表1),使用同源重组试剂盒Trelief[™] SoSoo Cloning Kit(北京擎科新业生物技术有限公司),并采用同源重组的方法^[24]将*McHD-Zip3*基因的编码序列与绿色荧光蛋白(GFP)的编码序列融合,构建用于亚细胞定位的重组载体p35SGK-McHD-Zip3-GFP(其中*McHD-Zip3*基因不包含终止密码子);将重组载体和对照载体p35SGK-GFP分别转化农杆菌EHA105感受态细胞,之后挑取单克隆在YEB液体培养基中培养至OD₆₀₀达到约0.6;收集菌体重悬后分别侵染本氏烟草叶片,培养2d后,使用LSM710型激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司)观察本氏烟草叶片中的荧光信号并拍照记录。

1.2.6 转录激活检测 使用酵母细胞分析*McHD-Zip3*转录因子的转录激活活性,根据DNA-BD载体pGBKT7和*McHD-Zip3*基因序列设计引物(表1),使用同源重组试剂盒Trelief[™] SoSoo Cloning Kit(北京擎科新业生物技术有限公司)构建重组载体pGBKT7-McHD-Zip3。用重组载体和空载体pGBKT7(对照)分别转化酵母AH109感受态细胞,并在SD/-Trp培养基上进行筛选,之后分别在SD/-Trp和SD/-Trp/-His/-Ade(+3AT)培养基上培养,4d后观察其生长

表 1 用于薄荷 *McHD-Zip3* 基因克隆和功能研究的引物及其序列Table 1 Primers and their sequences used for cloning and function study of *McHD-Zip3* gene of *Mentha canadensis* Linn.

引物 Primer	序列(5'→3') ¹⁾ Sequence (5'→3') ¹⁾	用途 Application
McHD-Zip3-F	ATGGAGAATCTTGGAGAGATGG	基因克隆 Gene cloning
McHD-Zip3-R	TCAGTTGCATTGAAGCCCAG	
qMcHD-Zip3-F	CCACCTGGCATCGTCTT	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
qMcHD-Zip3-R	GCTGCTCTGGCTCACAT	
qMcActin-F	CCAGGAATTGCTGATAGGATGAG	实时荧光定量 PCR Real-time quantitative PCR
qMcActin-R	GCGCCACCACCTTAATCTTC	
McHD-Zip3-SL-F	<u>TGGAGAGGACAGGGTACCATGGAGAATCTTGGAGAGATGG</u>	亚细胞定位 Subcellular localization
McHD-Zip3-SL-R	<u>CTTGCTCACCATGGATCCCCTTGCATTGAAGCCCAGCT</u>	
McHD-Zip3-TA-F	<u>GAGGAGGACCTGCATATGATGGAGAATCTTGGAGAGATGG</u>	转录激活检测 Transcriptional activation detection
McHD-Zip3-TA-R	<u>ACGGATCCCCGGAATTCTCAGTTGCATTGAAGCCCAG</u>	
McHD-Zip3-OE-F	CGGGATCCATGGAGAATCTTGGAGAGATGG	烟草细胞的遗传转化 Genetic transformation of <i>Nicotiana tabacum</i> cell
McHD-Zip3-OE-R	ACGGCTCGACTCAGTTGCATTGAAGCCCAG	

¹⁾ 下划线字母表示同源臂碱基,斜体字母表示酶切位点 The underlined letters represent the bases of homologous arm, and the italic letters represent the restriction sites.

状况。采用含有 β -半乳糖苷酶的菌落印迹法^[25] 进行 *LacZ* 活性检测,有转录激活作用的酵母菌株会激活 *LacZ* 基因并产生 β -半乳糖苷酶,分解 X-Gal 产生 5-溴-4-氯靛蓝,酵母细胞被染为蓝色。

1.2.7 *McHD-Zip3* 基因过表达烟草 根据植物表达载体 p35SGK 和 *McHD-Zip3* 基因序列设计引物(表 1),利用双酶切(选择 *Bam*H I 和 *Sal* I)的方法将 *McHD-Zip3* 基因编码序列插入植物表达载体 p35SGK 中,构建用于遗传转化的重组载体 p35SGK-*McHD-Zip3*。将重组载体转化农杆菌 EHA105 感受态细胞,之后挑取单克隆在 YEB 液体培养基中培养至 OD₆₀₀ 达到约 0.6,收集菌体后用 MS 盐溶液重悬,用叶盘转化法^[26] 转化烟草叶片。利用抗生素、GUS 染色和分子检测筛选阳性植株移栽至花盆中,待烟草植株开花结实后收集种子,与野生型烟草同时播种,观察植株生长过程中叶片表面腺毛的变化;待烟草幼苗长至 4 枚叶片时,用质量体积分数 1% 盐基品蓝染料对叶片表皮腺毛进行染色,然后置于 Nikon ECLIPSE50i 显微镜(日本 Nikon 公司)和 Nikon SMZ1000 体视显微镜(日本 Nikon 公司)下观察烟草叶片腺毛发育状况。

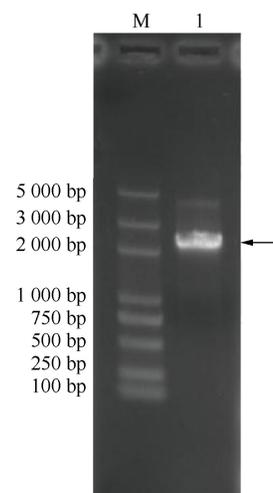
2 结果和分析

2.1 *McHD-Zip3* 基因的克隆和生物信息学分析

对 *McHD-Zip3* 基因的 PCR 扩增结果见图 1,该

基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列见图 2。分析结果显示:以薄荷 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得 1 条长度约 2 200 bp 的条带(图 1),经过测序验证和分析,将该基因命名为 *McHD-Zip3*。该基因编码区(CDS)全长 2 226 bp,其编码的氨基酸序列有 741 个氨基酸残基(图 2)。另外,该基因编码的氨基酸序列的理论相对分子质量为 81 375.67,理论等电点为 pI 5.92。

将 *McHD-Zip3* 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 网站上用 BLAST 程序进行序列比对,获得其同源基

M: DNA marker; 1: *McHD-Zip3*.图 1 薄荷 *McHD-Zip3* 基因的 PCR 扩增结果Fig. 1 PCR amplification result of *McHD-Zip3* gene of *Mentha canadensis* Linn.

```

1 ATGGAGAACTCTGGAGAGATGGGCTTCTAGGGGAAAGTTTGTATAGTGGCTTAATAGTGTAGAACGAGGGAGGATGAACTTGAGAGTAGGCTGGCAGT
M E N L G E M G L L G E S F D S G L I G R T R E D E L E S R S G S
100 GATAACTCGAAGTGGATCAGGAGATGATGAGAATGCCACTCGTAATAAATCATCCAAAGGAAAAAGAAATACCATAGGCACACTGCATTCCAAATT
D N F E G G S G D D E N A T R N K S S K R K K K Y H R H T A F Q I
199 CAAGAGCTGAAGTCTTTCAAGGATAATCCACATCCCGATGAGAAGCCGAGGTTGAACTTGGGAAGAGATTGACCTTGGAGGGGAGGCAGGTCAA
Q E L E A S F K D N P H P D E K A R L E L G K R L S L E G R Q V K
298 TTTTGGTTTCAGAATAGAAGAACTCAAATGAAGACTCAATTAGAGGCCACGAAAATTCAATTCTAAAACAAGAAATGACAAGCTCCGCATGAGAAC
F W F Q N R R T Q M K T Q L E R H E N S I L K Q E N D K L R I E N
397 ATCGCCATGAAAGATGCGATGAGGAGCCCGATTGTGAGAAATGTGGCAGTCCACCATTCTTGGAGAAGTACCCATAGAGCAGCACCATTCTCATGATC
I A M K D A M R S P I C E N C G S P A I L G E V P I E Q H H L M I
496 GAGAATGCAAGGCTGAAGGATGAACTCGGCCGACTTACCACCTAGCAGAGAAAATTTTGGGCAGGAGCAATGGCTCCCTTCCCTCAATTAATGAGCAAC
E N A R L K D E L G R L H H L A E K F L G R S N G S F P Q L M S N
595 TCAAGTCTGGATCTTCTATGGGAAGAAAATGGATTAGTGGTCTGAACTCTATGATTCTGGGATTCCTTTAGGACTCGATTTTGGCAATAGGATGTC
S S L D L S M G R N G F S G L N S M D S G I P L G L D F G N R M S
694 AATGCTTTTCTGTTATGCGAATGGGGCTGCCTTGAACATGATGAACTTCAAGCGCACCTTTTGACAAGTCTTTGTTCCAGACTTGCATTGCTTGC
N A F P V M P P N G A A L N M M N F S A P F D K S L F L E L A I A
793 GGAATGAATGAGCTGATGAAGCTAGCCAGCTCGATAGCCCTTTTGGTTGAGAAATTTGGAAGGAAATGGAGAATCGTTGAATCTTGAGAGTATGGG
G M N E L M K L A Q L D S P L W F R N L E G N G E S L N L E E Y G
892 AAGATGTTCTCTCCCTGCATTTGGCGTAAGGCCGAGCCATTTTGTAACTGAAGCAACAAGAGCTACTTGTAAATATAATGATAAATAGCATTCACTTGTG
K M F S P C I G V R P S H F V T E A T R A T C N I M I N S I S L V
991 GAGGCGTGTGACTCGAAGCAATGGATAGAATTGTTCCCATGGAATGTAGGGAGTGCCTCAACTCTTGACATTATATCTCCTGGAATGGCTGGAAGT
E A L M D S K Q W I E L F P W N V G S A S T L D I I S P G M A G S
1 090 AAAAAATGGCACACTACAATGATGCAAGCCGAGTTTCAAATTCCTTACCAGTGTTCCTACGCGCCAAAATGAAGTTCATTCGTTTCTGCAACAGCAT
K N G T L Q L M Q A E F Q I P S P M V P T R Q M K F I R F C K Q H
1 189 GGAGAGGATATGTTGGTGTGTTGACATCTCAGTCGATCTTACGCAAGATATACTGGGAATGTGGCTGTCAATGCGGTAGCTTCCCTCAGGT
G E D M W A V V D I S V D T L L Q S I T G N V A V N C R R L P S G
1 288 TGCATGTGAGAGAAATGCCAATGGCAATTCAAAGGTGACCTGGATGAGCAGACTGAAATACGACGAGAGCATTGTCCATCACTCATATCGCAGATTA
C I V R E M P N G N S K V T W I E H T E Y D E S I V H H S Y R T L
1 387 GTCAGGACTGGAATCGCCTTTGGCGTCAAAAATGGCTTCCAATTCCAAAGCAATGCGAATTTTCTTCCATGTCGTCCTCCCTCCCTCCCT
V R T G I A F G A Q K W L S N L Q R Q C E L F S S I M S S P A S P
1 486 AGTGATCATTGACACTGTCTCTAGTGGCAAGAAGAGTATCGTAAAGCTGGCACAACGAATGACTCGTGGCTTCTGTTCCGGCATTGCTCGACTGTG
S D H S A L S P S G K K S I V K L A Q R M T R G F C S G I C S T V
1 585 GAAGAGTGGGAGTGGTCCAGGATGTCGACAATACGAAGCTGATGACATGCAAAAAGCTCCGGCAATTCGGGCGTGCCACCTGGCATCGTCTTGGAGTGG
E E W E V V Q D V D N T K L M T C K S S G N S G V P P G I V L S A
1 684 TCAACGACCATCTGGATCCCGTATTGCCAAAACAGCTACTCAAATCTTACAGAATGAGAAAATAGGAGTCACTGGGATGCTTGTCTCAGGACGGG
S T T I W I P V L P N Q L L K F L Q N E K T R S H W D V L S Q D G
1 783 CCCATGCTATCCATGCTCGTATTCCCAAGGCCAGGATCTCGACAACAACATTTGATTCCTCAAACAAGTCTCCCTTGGATGCGAGCCAGAGCAAC
P M L S M L R I P K G Q D L D N N I S I L Q T S A P L D A S Q S N
1 882 GTGTTAATCTTCAAGAAACTTGGGAGAGCGCTGAGTCTGTTGTTGTTCCAGTTCAGTTCGGGCTGCGAATGAAATGATGATGATGATGATGATGATGATG
V L I L Q E T C G D A S G S L V V H A A V P A A E M N M V M N G G
1 981 GATTCCTCAAACGTACCCATTTTACCCTCCGATTCGCTATCTTCCGATGTTTCTCAGATTATGCAAGCCTGAGAGTGGCAACGAAGGAGGAGGG
D S S N V P I L P S G F A I F P D C F S D S C K P E S G N E G G G
2 080 AGCAGCGGCTCGTTGCTCACTATAGGGTTTCAGATTCTCGTGAAGCAATTTGCCCGCGGCGCAGCTAATGAGTCCGTCACACTGTGAAATCGCTC
S S G L T I G F I L V S N L P A A Q L T M E S V N T V K S L
2 179 ATCGCTCGTACGCATCAAGGTATCAAGCTGGGCTTCAATGCAACTGA
I A R T H Q G I K A G L Q C N *

```

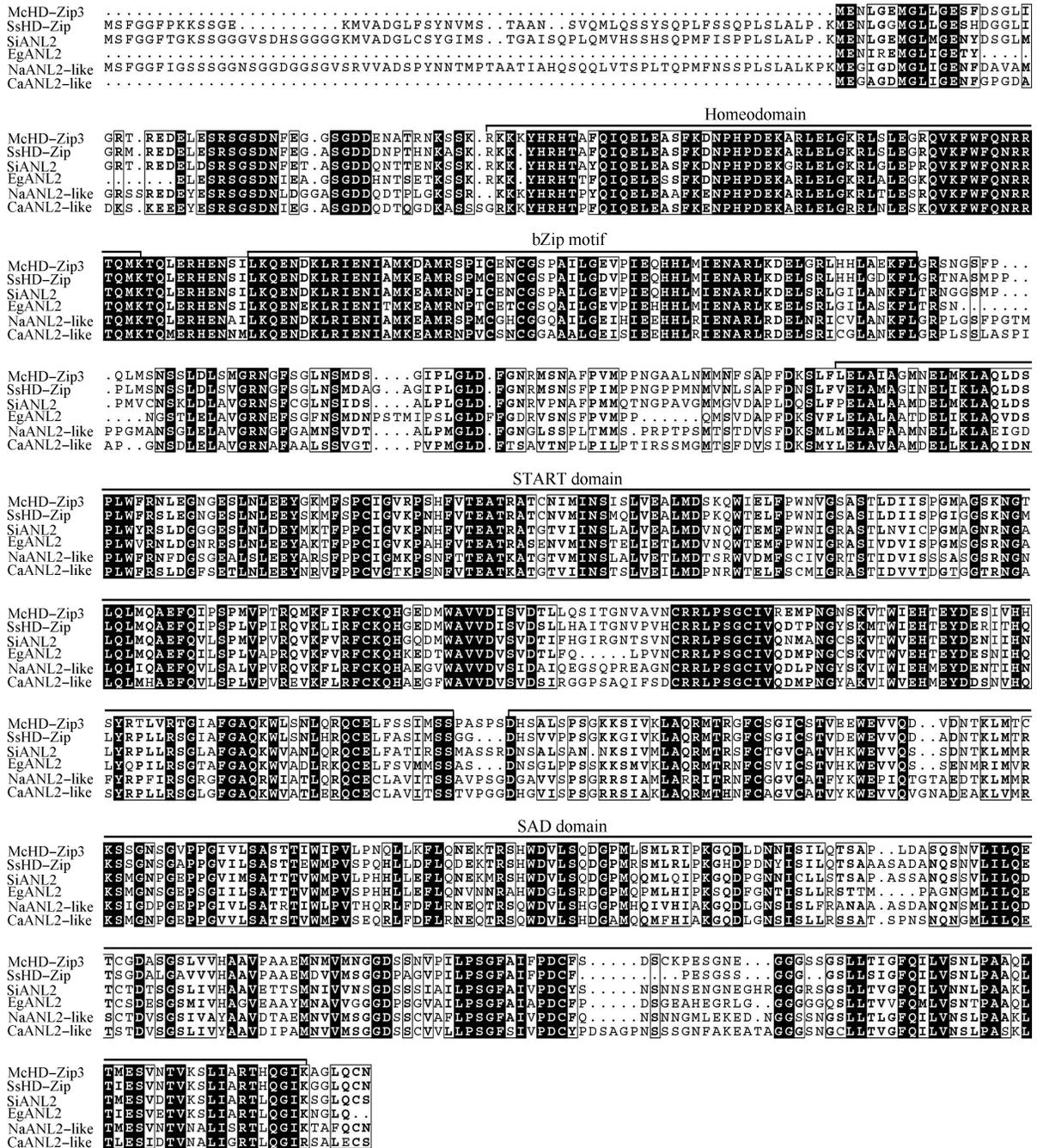
* : 终止密码子 Stop codon.

图 2 薄荷 *McHD-Zip3* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence of *McHD-Zip3* gene of *Mentha canadensis* Linn. and its encoding amino acid sequence

因序列, 并进行多重序列比对, 结果见图 3。结果显示: *McHD-Zip3* 基因编码的氨基酸序列与一串红 (*Salvia splendens* Ker-Gawl.) 的 *SsHD-Zip* 基因 (TEY86230.1)、芝麻 (*Sesamum indicum* Linn.) 的 *SiANL2* 基因 (XP_011076208.1)、猴面花 (*Erythranthe guttata* Fisch. ex DC.) 的 *EgANL2* 基因 (XP_012852238.1)、渐狭叶烟草 (*Nicotiana attenuata* Torrey ex S. Watson) 的 *NaANL2-like* 基因 (XP_019251816.1) 和小粒咖啡 (*Coffea arabica* Linn.) 的 *CaANL2-like* 基

因 (XP_027110364.1) 编码的氨基酸序列具有一定的序列相似性, 且 *McHD-Zip3* 转录因子与一串红 *SsHD-Zip* 转录因子的序列相似度最高, 为 82.57%。这些基因所编码的 *HD-Zip* 转录因子的氨基酸序列都具有保守的 Homeodomain、bZip motif、START domain 和 SAD domain, 均为 *HD-Zip IV* 亚家族转录因子共有的结构域和基序, *McHD-Zip3* 转录因子与其他植物 *HD-Zip* 转录因子的结构域序列较为保守, 表明他们可能具有类似的功能。

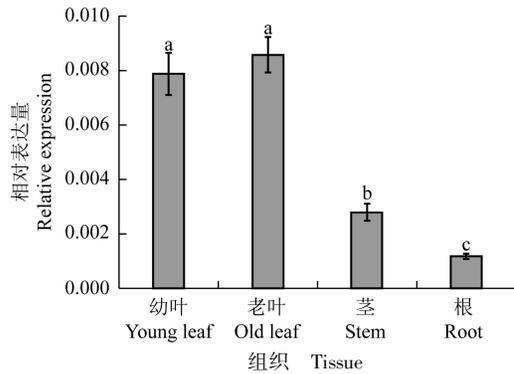


Mc: 薄荷 *Mentha canadensis* Linn.; Ss: 一串红 *Salvia splendens* Ker-Gawl.; Si: 芝麻 *Sesamum indicum* Linn.; Eg: 猴面花 *Erythranthe guttata* Fisch. ex DC.; Na: 渐狭叶烟草 *Nicotiana attenuata* Torrey ex S. Watson; Ca: 小粒咖啡 *Coffea arabica* Linn.

图 3 薄荷 *McHD-Zip3* 基因编码的氨基酸序列与其他植物 HD-Zip 转录因子氨基酸序列的多重比对结果
 Fig. 3 Multiple alignment result of amino acid sequence encoded by *McHD-Zip3* gene of *Mentha canadensis* Linn. with that of HD-Zip transcription factor of other plants

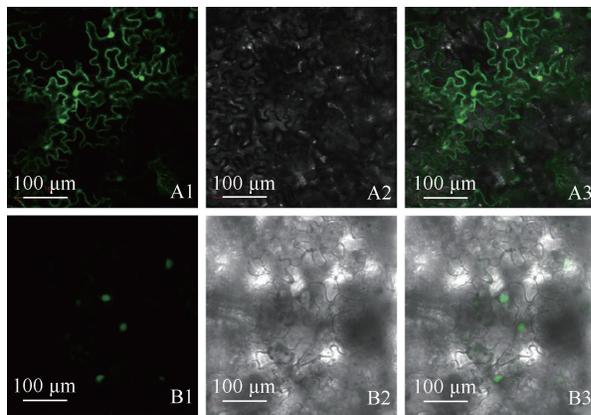
对 *McHD-Zip3* 基因编码的氨基酸序列与其他植物的腺毛发育相关 HD-Zip 转录因子的氨基酸序列进行系统发育分析。结果(图 4)表明:*McHD-Zip3* 基因编码的氨基酸序列与黄花蒿的 AaHD1^[12]

(KU744599)、AaHD7^[12] (KU744600) 和 AaHD8^[20] (KX465135), 以及番茄 Slwoolly^[27] (JF518780)、黄瓜 CsGL3^[21] (XP_004134971.1) 和甜瓜 (*Cucumis melo* Linn.) CmGL^[11] (XP_008439968.1) 等与植物腺毛发



不同的小写字母表示在 0.05 水平上差异显著 Different lowercases indicate the significant difference at 0.05 level.

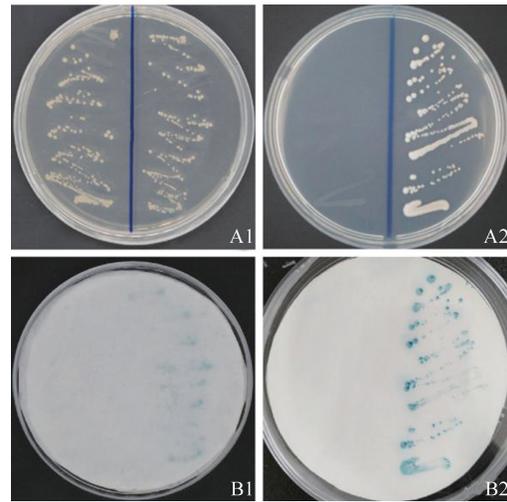
图 5 薄荷不同组织中 *McHD-Zip3* 基因的相对表达量比较
Fig. 5 Comparison on relative expression of *McHD-Zip3* gene in different tissues of *Mentha canadensis* Linn.



A: 转化对照载体 (35S:GFP) 的表皮细胞 The epidermal cells of transformed control vector (35S:GFP); B: 转化重组载体 (35S:McHD-Zip3-GFP) 的表皮细胞 The epidermal cells of transformed recombinant vector (35S:McHD-Zip3-GFP). 1: 绿色荧光视野 Green fluorescence field; 2: 明视野 Bright field; 3: 重合视野 Merged field.

图 6 薄荷 *McHD-Zip3* 转录因子在本氏烟草表皮细胞中的亚细胞定位结果
Fig. 6 Subcellular localization result of *McHD-Zip3* transcription factor of *Mentha canadensis* Linn. in epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* Domin

2.3.2 转录激活活性 利用酵母系统检测 *McHD-Zip3* 转录因子的转录激活活性, 结果见图 7。结果显示: 转化重组载体 pGBKT7-*McHD-Zip3* 的酵母细胞能在 SD/-Trp 一缺培养基和 SD/-Trp/-His/-Ade 三缺培养基上生长, 均能使酵母细胞呈现出蓝色; 而转化空载体 pGBKT7(对照) 的酵母细胞只能在 SD/-Trp 一缺培养基上生长, 不能使酵母细胞呈现蓝色, 表明 *McHD-Zip3* 转录因子具有转录激活活性。

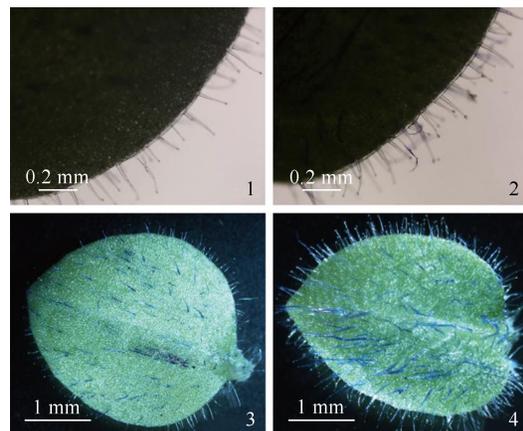


A: 酵母细胞生长情况 Growing of yeast cells; B: *LacZ* 活性检测 Activity detection of *LacZ*. 1: SD/-Trp 培养基 Culture medium of SD/-Trp; 2: SD/-Trp/-His/-Ade 培养基 Culture medium of SD/-Trp/-His/-Ade. 培养皿左半边和右半边分别为转化空载体 pGBKT7(对照) 和重组载体 pGBKT7-*McHD-Zip3* 的酵母细胞 The left half and right half of culture dish are yeast cells transformed the empty vector pGBKT7 (the control) and the recombinant vector pGBKT7-*McHD-Zip3*, respectively.

图 7 薄荷 *McHD-Zip3* 转录因子的转录激活活性分析结果
Fig. 7 Analysis result of transactivation activity of *McHD-Zip3* transcription factor of *Mentha canadensis* Linn.

2.4 *McHD-Zip3* 转基因烟草的腺毛发育状况

野生型烟草与 *McHD-Zip3* 转基因烟草的叶片腺毛发育状况比较结果见图 8。结果显示: 与野生型烟



1, 3: 野生型植株的叶片 Leaf of wild type individual; 2, 4: *McHD-Zip3* 转基因植株的叶片 Leaf of *McHD-Zip3* transgenic individual.

图 8 野生型烟草与 *McHD-Zip3* 转基因烟草的叶片腺毛发育状况比较
Fig. 8 Comparison on development of glandular trichomes on leaf between wild type *Nicotiana tabacum* Linn. and *McHD-Zip3* transgenic *N. tabacum*

草相比, *McHD-Zip3* 转基因烟草叶片的腺毛密度明显增加,说明 *McHD-Zip3* 基因能够在烟草叶片表皮细胞中过表达,具有促进烟草腺毛发育的功能。

3 讨论和结论

HD-Zip 转录因子是植物中特有的一类转录因子,不同亚家族的保守结构域有所不同,其中 HD-Zip I 亚家族含有保守的 Homeodomain 和 bZip motif^[28]; HD-Zip II 亚家族除含有保守的 Homeodomain 和 bZip motif 外,其 C 端还含有 1 个 CPSCE motif^[29]; HD-Zip III 亚家族含有 Homeodomain、bZip motif、START domain、SAD domain 以及 C 端的 MEKHLA motif^[30]; HD-Zip IV 亚家族与 HD-Zip III 亚家族类似,但其 C 端缺少 MEKHLA motif^[31]。作者从薄荷中克隆获得 1 个 HD-Zip 转录因子编码基因 *McHD-Zip3*,该基因编码的氨基酸序列含有 Homeodomain、bZip motif、START domain 和 SAD domain,符合 HD-Zip IV 亚家族的特征,其中,Homeodomain 参与 DNA 的结合,而 bZip motif 参与蛋白质二聚体的形成^[17]。研究表明:*McHD-Zip3* 转录因子具有转录激活活性,但 HD-Zip IV 亚家族行使转录激活功能的结构域仍存在争议。相关研究表明:在玉米 (*Zea mays* Linn.) 的 HD-Zip IV 亚家族转录因子 OCL1 中,其 START domain N 端的 85 个氨基酸是其转录激活活性的关键位点,但是完整的 START domain 不具有转录激活活性^[32]。因此,START domain 可能同时具有转录激活和抑制激活的功能,而 HD-Zip IV 亚家族转录因子的转录激活活性可能是多个结构域共同作用的结果。

HD-Zip IV 亚家族基因可在植物表皮细胞中表达,对表皮细胞的分化有重要的调控作用。本研究结果表明:*McHD-Zip3* 基因在薄荷的嫩叶和老叶中表达水平均较高,说明该基因可能主要在叶片中行使功能。HD-Zip IV 亚家族转录因子是已知调控多细胞腺毛发育的最重要的一类转录因子。在黄花蒿中,响应茉莉酸信号的 HD-Zip IV 亚家族转录因子 AaHD1 能够促进腺毛发生并显著增加叶片表皮腺毛密度^[12],且多个 HD-Zip IV 亚家族转录因子存在级联调控,如 AaHD8 通过形成蛋白复合体正向调控 AaHD1^[20],而 AaHD1 又能够调控 AaHD7^[12],通过级联反应共同调控腺毛发育。在前述的系统树上, *McHD-Zip3* 基因编码的氨基酸序列与多种植物的腺

毛发育相关 HD-Zip 转录因子聚为一支,其与黄花蒿 AaHD7 转录因子的亲缘关系最近,且后者能够促进腺毛发育^[12],而薄荷腺毛与黄花蒿腺毛的结构与功能类似,均为分泌型多细胞腺毛,表明 *McHD-Zip3* 转录因子可能对薄荷腺毛发育具有类似功能。将 *McHD-Zip3* 基因转入烟草叶片后,该基因能够在烟草叶片中过表达,且烟草叶片的腺毛密度明显增加,说明 *McHD-Zip3* 转录因子与其他植物的腺毛发育相关的 HD-Zip IV 亚家族转录因子具有类似功能。

综合分析结果表明:薄荷中存在 HD-Zip 转录因子编码基因 *McHD-Zip3*,其编码的氨基酸序列具有 HD-Zip IV 亚家族转录因子的保守结构域,定位于细胞核中,并且具有转录激活活性,是一个典型的转录激活子。*McHD-Zip3* 基因在薄荷的嫩叶和老叶的表达量均较高,具有调控腺毛发育的功能。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 377.
- [2] TISSIER A. Glandular trichomes: what comes after expressed sequence tags? [J]. *The Plant Journal*, 2012, 70: 51-68.
- [3] 黄建成, 董忠民, 胡正海. 薄荷腺毛的形态结构和发育的研究 [J]. *植物学报*, 1986, 28(4): 437-440.
- [4] 阎先喜, 胡正海. 薄荷盾状腺毛分泌过程的超微结构研究 [J]. *西北植物学报*, 1998, 18(2): 256-261.
- [5] PATTANAİK S, PATRA B, SINGH S, et al. An overview of the gene regulatory network controlling trichome development in the model plant, *Arabidopsis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 259.
- [6] NGUYEN C T, TRAN G-B, NGUYEN N H. The MYB-bHLH-WDR interferers (MBWi) epigenetically suppress the MBW's targets [J]. *Biology of the Cell*, 2019, 111(11): 284-291.
- [7] PEREZ-RODRIGUEZ M, JAFFE F W, BUTELLI E, et al. Development of three different cell types is associated with the activity of a specific MYB transcription factor in the ventral petal of *Antirrhinum majus* flowers [J]. *Development*, 2005, 132(2): 359-370.
- [8] GLOVER B J, PEREZ-RODRIGUEZ M, MARTIN C. Development of several epidermal cell types can be specified by the same MYB-related plant transcription factor [J]. *Development*, 1998, 125(17): 3497-3508.
- [9] SHI P, FU X, SHEN Q, et al. The roles of *AaMIXTA1* in regulating the initiation of glandular trichomes and cuticle biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytologist*, 2018, 217(1): 261-276.
- [10] PAN Y, BO K, CHENG Z, et al. The loss-of-function *GLABROUS 3* mutation in cucumber is due to LTR-retrotransposon insertion in a class IV HD-ZIP transcription factor gene *CsGL3* that is epistatic

- over *CsGLI*[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15: 302–317.
- [11] ZHU H, SUN X, ZHANG Q, et al. *GLABROUS* (*CmGL*) encodes a HD-ZIP IV transcription factor playing roles in multicellular trichome initiation in melon[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131: 569–579.
- [12] YAN T, CHEN M, SHEN Q, et al. HOMEODOMAIN PROTEIN 1 is required for jasmonate-mediated glandular trichome initiation in *Artemisia annua*[J]. New Phytologist, 2017, 213: 1145–1155.
- [13] RUBERTI I, SESSA G, LUCCHETTI S, et al. A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif [J]. The EMBO Journal, 1991, 10: 1787–1791.
- [14] ARIEL F, DIET A, VERDENAUD M, et al. Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1[J]. The Plant Cell, 2010, 22: 2171–2183.
- [15] SHCHERBAN A B. *HD-Zip* genes and their role in plant adaptation to environmental factors[J]. Russian Journal of Genetics, 2019, 55(1): 1–9.
- [16] JOHANNESSON H, WANG Y, ENGSTRÖM P. DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors *in vitro*[J]. Plant Molecular Biology, 2001, 45: 63–73.
- [17] ARIEL F D, MANAVELLA P A, DEZAR C A, et al. The true story of the HD-Zip family[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12: 419–426.
- [18] CHEW W, HRMOVA M, LOPATO S. Role of homeodomain leucine zipper (HD-Zip) IV transcription factors in plant development and plant protection from deleterious environmental factors[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14: 8122–8147.
- [19] YANG C, LI H, ZHANG J, et al. A regulatory gene induces trichome formation and embryo lethality in tomato[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(29): 11836–11841.
- [20] YAN T, LI L, XIE L, et al. A novel HD-ZIP IV/MIXTA complex promotes glandular trichome initiation and cuticle development in *Artemisia annua*[J]. New Phytologist, 2018, 218(2): 567–578.
- [21] CUI J-Y, MIAO H, DING L-H, et al. A new glabrous gene (*csgl3*) identified in trichome development in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. PLOS ONE, 2016, 11(2): e0148422.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] SHARAN S K, THOMASON L C, KUZNETSOV S G, et al. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering[J]. Nature Protocols, 2009, 4(2): 206–223.
- [25] YAO L, JIANG Y, LU X, et al. A R2R3-MYB transcription factor from *Lablab purpureus* induced by drought increases tolerance to abiotic stress in *Arabidopsis*[J]. Molecular Biology Reports, 2016, 43: 1089–1100.
- [26] SPARKES I A, RUNIONS J, KEARNS A, et al. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants [J]. Nature Protocols, 2006, 1(4): 2019–2025.
- [27] YANG C, LI H, ZHANG J, et al. Fine-mapping of the *woolly* gene controlling multicellular trichome formation and embryonic development in tomato [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 123: 625–633.
- [28] HENRIKSSON E, OLSSON A S B, JOHANNESSON H, et al. Homeodomain leucine zipper Class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships [J]. Plant Physiology, 2005, 139: 509–518.
- [29] CIARRELLI A R, CIOLFI A, SALVUCCI S, et al. The *Arabidopsis* Homeodomain-leucine Zipper II gene family: diversity and redundancy [J]. Plant Molecular Biology, 2008, 68: 465–478.
- [30] PRIGGE M J, OTSUGA D, ALONSO J M, et al. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development[J]. The Plant Cell, 2005, 17: 61–76.
- [31] NAKAMURA M, KATSUMATA H, ABE M, et al. Characterization of the class IV homeodomain-leucine zipper gene family in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2006, 141: 1363–1375.
- [32] DEPÈGE-FARGEIX N, JAVELLE M, CHAMBRIER P, et al. Functional characterization of the HD-ZIP IV transcription factor OCL1 from maize[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(1): 293–305.

(责任编辑:郭严冬)