

陆地棉 bZIP 转录因子响应非生物胁迫表达谱分析

李月, 许朋斐, 刘超, 代培红, 葛杰, 曲延英, 刘晓东

(新疆农业大学农学院/农业生物技术重点实验室, 乌鲁木齐 830052)

摘要: 低温、干旱和高盐是影响棉花生长发育和产量的重要限制因素。bZIP 转录因子在植物非生物胁迫反应中起重要作用。本研究利用生物信息学的方法从陆地棉中鉴定了 24 个 bZIP 转录因子基因, 命名为 *GhbZIP1* ~ *GhbZIP24*。系统进化树分析表明, 这 24 个家族成员主要聚集在 A、B、C、D、E、G、I、S 这 8 类亚家族。通过 RT-PCR 的方法分析了棉花 (*Gossypium hirsutum* L.) *GhbZIPs* 基因在高盐 (200 mmol/L NaCl)、干旱、4 °C 低温等非生物胁迫处理下的表达模式。结果表明, 19 个基因响应高盐胁迫, 11 个基因对干旱胁迫有应答反应, 15 个基因有冷胁迫应答。此外, 有 4 个基因 (*GhbZIP4*、*GhbZIP7*、*GhbZIP21* 和 *GhbZIP23*) 在 3 种处理下均有应答反应。以上研究结果表明, *GhbZIPs* 在陆地棉的非生物胁迫适应过程中可能具有重要的作用。本研究为进一步探索棉花 bZIP 转录因子在抗逆反应中的重要作用和利用基因操作手段提高棉花抗逆性提供了重要信息。

关键词: 棉花; bZIP 转录因子; 非生物胁迫; RT-PCR; 表达分析

Expression Profiling of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) bZIP Genes Responsive to Abiotic Stresses

LI Yue, XU Peng-fei, LIU Chao, DAI Pei-hong, GE Jie, QU Yan-ying, LIU Xiao-dong

(Key Lab of Agricultural Biological Technology/Department of Agronomy/Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052)

Abstract: Low temperature, drought and salinity are major abiotic stresses that influence survival, productivity of cotton. bZIP transcription factor genes play significant roles in the response to abiotic stresses. In this study, twenty-four bZIP genes, named as *GhbZIP1*-*GhbZIP24*, were identified in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by bioinformatic approach. Phylogenetic analysis revealed that the isolated cotton bZIPs genes could be classified into 8 groups: A, B, C, D, E, G, I, S. Semi-quantitative RT-PCR were employed to reveal the expression profiling of 24 *GhbZIPs* under different abiotic stresses (200 mmol/L NaCl, drought, 4 °C) treatments. The results showed that the expression of 19 *GhbZIP* genes and 11 *GhbZIP* genes were up-or down-regulated by salinity and drought stresses respectively. 15 *GhbZIP* genes were up-or down-regulated by cold treatments. Moreover, four genes including *GhbZIP4*, *GhbZIP7*, *GhbZIP21* and *GhbZIP23* were response to all above treatments. The results suggested that *GhbZIPs* might play important roles in upland cotton adaptation to abiotic stress. Taken together, our data provided valuable information for further exploring the roles of the cotton bZIPs genes in response to stress and will eventually lead to the development of genetically manipulated cotton varieties with improved stress tolerance.

Key words: cotton; bZIP transcription factor; abiotic stress; RT-PCR; expression

低温、干旱和高盐等非生物胁迫是影响植物生长发育、导致作物减产的主要因素。植物作为固着生物,不能趋利避害,为了克服这些不利的环境因

素,其体内进化形成了一套复杂的调控机制,涉及生理、生化和与胁迫信号感知、信号传导和基因表达相关的分子调控过程,最终通过代谢调控阻止细胞发

收稿日期: 2015-06-09 修回日期: 2015-08-01 网络出版日期: 2016-04-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160406.1115.006.html>

基金项目: 国家“863”计划 (2012AA101108-05); 国家自然科学基金 (31470289); 新疆农业大学校前期课题资助 (XJAU201311)

第一作者研究方向为作物分子生物学。E-mail: liyue6905@126.com

通信作者: 刘晓东, 主要从事棉花分子育种。E-mail: xiaodongliu75@aliyun.com

生损伤^[1]。转录因子是非生物胁迫信号转导途径中的重要组成成分。由于其在提高植物逆境胁迫耐受性方面具有重要作用,转录因子已成为植物耐逆性基因工程改良的关键目的基因。已有研究表明在植物中存在至少 64 个转录因子家族^[2],其中,NAC、C2H2 锌指蛋白、bZIP 和 WRKY 转录因子家族是研究最多而且广泛参与非生物胁迫的几个大家族^[3-5]。

碱性亮氨酸拉链蛋白(bZIP)是最大而且功能最多多样化的转录因子家族之一,存在于所有的真核细胞中,从酿酒酵母的 17 个 bZIP 基因到人类 56 个 bZIP 基因。bZIP 蛋白以其家族成员保守的 bZIP 结构域而命名,该结构域总长度为 60~80 个氨基酸残基,由高度保守的 DNA 结合碱性区域和多元化的亮氨酸拉链二聚化区域组成。碱性区域由 16 个氨基酸残基组成,这一序列区最显著的特点是有一个不变的 N-x7-R/K 基序,该区域负责结合 DNA 顺式作用元件和核定位信号功能,位于 bZIP 结构域的 N 端。亮氨酸拉链的二聚化区域保守型较低,该区域一般由 7 个或 9 个氨基酸残基组成一个重复单位,该重复单位的第 7(9)位由亮氨酸和疏水性氨基酸(Ile, Val, Phe 或者 Met)组成。植物 bZIP 蛋白专一结合核心序列为 ACGT 回文结构的顺式作用元件,如 G-box(CACGTG)、C-box(GACGTC)、ABRE 和 A-box(ACGTA)^[6]。目前已经在多种植物中鉴定出 bZIP 转录因子基因,拟南芥中有 75 个^[7]、水稻 89 个^[8]、高粱 92 个^[3]、大豆 131 个^[9]、玉米 125 个^[10]、黄瓜 64 个^[11]、葡萄 55 个^[12]。bZIP 蛋白除广泛参与植物多种发育过程外,也广泛参与非生物胁迫适应。如在小麦中克隆的受 PEG、盐、低温和 ABA 处理诱导表达的 *TabZIP60* 基因,增强了该基因过表达拟南芥植株对干旱、高盐和冷冻的抗性^[13]。水稻 *OsbZIP71* 基因受干旱和 ABA 诱导,但受盐抑制,转 *OsbZIP71* 基因过表达的水稻对干旱和高盐的抗性显著增强^[14]。除此之外在水稻中克隆出多个受逆境胁迫诱导的 bZIP 转录因子基因,如 *OsABF2*^[15]、*OsbZIP16*^[16] 和 *OsbZIP52*^[17], 均能显著提高转基因植物对逆境胁迫的耐受性。除水稻和小麦外,在其他作物如玉米^[18]、番茄^[19] 和 大豆^[20] 等作物中克隆到的一些与胁迫相关 bZIP 转录因子基因,也显著增强了转基因植物的非生物胁迫抗性。研究表明 bZIP 转录因子基因也参与棉花的非生物胁迫应答反应。X. Zhang 等^[21] 在陆地棉中检测到 1 个 bZIP 基因对盐响应;而 U. L. Rodriguez 等^[22] 则通过陆地棉

芯片表达谱方法检测到有 4 个 bZIP 类基因受盐胁迫下调。J. X. Jiang 等^[23] 利用 PCR 方法,从陆地棉中克隆了 1 个与棉纤维伸长过程中基因表达调控有关的 bZIP 基因,A. Mittal 等^[24] 将拟南芥 *AtRAV2* 和 bZIP 基因 *AtABI5* 转化棉花,增强了转基因棉花的抗旱性,然而较系统地研究棉花 bZIP 基因在干旱、高盐、低温等非生物逆境胁迫下的应答表达模式还未见报道。

新疆棉花生产在保障我国棉花产业稳定发展中具有重要的地位,但新疆棉花生产常遭受干旱、盐碱和低温等非生物逆境危害,对棉花的生长、产量以及纤维品质影响很大,造成巨大的经济损失。鉴定参与逆境胁迫相关的 bZIP 转录因子基因对于改善作物的抗逆性具有重要意义。因此,本研究基于 Cotton Transcription Factor Database 公共数据库中 bZIP 转录因子 EST 序列,筛选出所有与拟南芥参与非生物胁迫的 bZIP 转录因子高度同源的 24 个基因,以抗旱性较强的陆地棉品种 KK1543 为材料,正常生长幼苗经高盐、干旱和低温胁迫处理,采用半定量 RT-PCR 方法,对这 24 个 bZIP 转录因子基因在 3 种非生物胁迫处理下基因的表达谱进行分析,全面认识棉花 bZIP 转录因子与非生物胁迫的关系,为进一步鉴定和克隆逆境应答关键基因,揭示棉花抗逆分子机制和利用基因工程培育抗逆棉花新品种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料培养与处理

选取抗旱性较强的陆地棉品种 KK1543 为试验材料,该材料由新疆农业大学农学院作物遗传育种室提供。选取生长一致 15 d 苗龄的棉苗,将根部的蛭石经流水小心冲干净,快速置于吸水纸上吸干,分别进行高盐 200 mmol/L NaCl、干旱、4 ℃ 低温处理。高盐处理:将棉苗的根部浸入 200 mmol/L NaCl 溶液中;干旱处理:将苗置于干净的滤纸上,在相对湿度 45%、连续光照条件下进行自然干旱处理;冷处理:棉苗置于盛有水(已预冷到 4 ℃)的大烧杯中,放置于 4 ℃ 培养箱,持续光照。干旱、NaCl 处理的植株在 25 ± 2 ℃ 培养箱,连续光照条件下生长,低温处理的植株放置在 4 ℃ 光照培养箱中处理。上述各处理,均分别于 0h、1h、3h、6h 和 12h 采集真叶叶片,迅速置于液氮,用于总 RNA 提取。

1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的制备

采用改良的 CTAB 法^[25] 提取棉花不同胁迫处

理时间的叶片总 RNA,按照 TaKaRa(公司)RNase-Free DNase I 试剂盒方法消化基因组 DNA 污染,按照 Promega(公司)M-MLV 反转录试剂盒操作说明合成单链 cDNA,于-20 °C 保存,用于基因胁迫表达特征分析。

1.3 EST 序列分析及引物合成

根据 Plant Transcription Factor Database(PTFD, <http://planttfdb.cbi.edu.cn>)^[26] 数据库中棉花 bZIP 转录因子 EST 序列,设计基因特异性引物,并以转录因子编号为基础,对 24 个 bZIP 转录因子基因的 ESTs 进行命名(表 1)。

1.4 棉花 bZIP 基因的半定量 RT-PCR

根据 24 个 *GhbZIP* 的 EST 序列设计特异性引物(表 1),以棉花 *GhACT2*(基因登录号:AY305724.1)作为 RT-PCR 内参基因(ACT2F: 5'-CGTACAACAGG-TATTGTGCTGG-3', ACT2R: 5'-GAAATCCACATC TGCTGG AAGGTG-3')。棉花 bZIP 基因家族不同成

员 ESTs 的 RT-PCR 引物见表 1。RT-PCR 反应体系为 20 μ L,包括 1 μ L cDNA、正反向引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L、2 μ L 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})、0.5 μ L dNTPs(10 mmol/Leach)和 0.5 μ L Taq DNA 聚合酶(全式金公司),用灭菌超纯水补至 20 μ L。在 Eppendorf PCR 仪上进行,反应条件为 94 °C 5 min;98 °C 30 s,55 ~ 60 °C 30 s,72 °C 30 s,27 ~ 33 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Imaging Densitometer(Bio-Rad)中的 Imaging Lab 软件进行拍照分析。

1.5 进化树分析和序列比对

对棉花 24 个 bZIP 家族成员的进化关系进行分析。用 Clustal X 进行系统进化树分析,采用邻接法(NJ, neighbor-joining)构建系统发生树,对分支的可靠性评价采用靴带分析(Bootstrap, 1000),通过上述系统的分析研究,用 MEGA5 对系统树进行作图。由 DNAMAN 软件完成多重序列比对分析。

表 1 棉花 *GhbZIP* 的特异性引物序列及扩增条件

Table 1 Specific primer sequences and PCR parameters of *GhbZIP* cDNA fragments amplification

基因 Gene	转录因子编号 TF ID	上游引物 Forward primer(5'-3')	下游引物 Reverse primer(5'-3')	退火温度(°C) Anneal temperature	循环数 Cycles
<i>GhbZIP1</i>	Ghi000682	CAGGCATCTGGAAGACACC	GCAAGCCAGAGGGAACATA	58	32
<i>GhbZIP2</i>	Ghi000771	AGGTATTGTGAGGGAAGATAT	CTATTCTTTGAAATCACATCT	58	32
<i>GhbZIP3</i>	Ghi000856	GAGTAGCCGACTGAACTGAC	AATGCTTCCATCCCTTGTG	58	32
<i>GhbZIP4</i>	Ghi000928	GATGAAAGGCTTTGATGGC	GAAGGGTTCCTAAGCTCCA	58	33
<i>GhbZIP5</i>	Ghi001139	TGGCGATCCCATCGTTGAT	CTTCGCTGCTGCGGCTGT	58	33
<i>GhbZIP6</i>	Ghi002556	CGGGATTTCCTTCACTGCT	GCTGTGCATATTTCCGGGTG	58	32
<i>GhbZIP7</i>	Ghi002780	TGAAACAACGGAGAATG	AGAAATATCTGCGAGTGCA	58	33
<i>GhbZIP8</i>	Ghi002871	AAGCATAGGGCATGGGATT	CTTCTGCTCAAGGTATTT	58	32
<i>GhbZIP9</i>	Ghi003712	ATCCGTAGCCTTTCTGTTGA	CATAGCCTGTAGCCGTAGTTT	58	32
<i>GhbZIP10</i>	Ghi004197	CTTCCGATCCGACCACCTC	TTCTCTCTCTTCCGCTCA	58	32
<i>GhbZIP11</i>	Ghi004828	GGCGGATTTATGCTTGTGAT	CACTCTTTCCGGACCTCTT	58	32
<i>GhbZIP12</i>	Ghi006041	TAGTAGCGGCGCGATGTG	TGGGCAGTATTGGCAGGGT	60	27
<i>GhbZIP13</i>	Ghi009936	GGCAAAGTCTAACCAAGTCG	TCTCTGTGCGTGTCCAAG	58	32
<i>GhbZIP14</i>	Ghi012042	GGACGGATCAAAGTAGATGG	GTGTCCGAGTTGAGCGTTT	58	32
<i>GhbZIP15</i>	Ghi012613	GCACCGTCTGACCAATCA	TTCCCATCAAAGCGAATG	58	32
<i>GhbZIP16</i>	Ghi012799	AGGCAGCAAACCTTAGGAG	AAGCTGTTAGCAGGTGAT	58	32
<i>GhbZIP17</i>	Ghi013185	GAGTTTATGCCATCCTGC	TTTCTCTTTCCCGTTTC	58	33
<i>GhbZIP18</i>	Ghi013702	TACTAGCGGCGCGATGTG	TGGGCAGTATTGGCAGGGT	60	27
<i>GhbZIP19</i>	Ghi015347	CAGGGAATAAGTAATGGTCTGA	GTCTGGGTTCTTCTGATGC	60	27
<i>GhbZIP20</i>	Ghi015481	CGGCGAGTTCCTCCGATTC	CCCGCTTATGTCTTCCACC	58	32
<i>GhbZIP21</i>	Ghi016917	CCGAGAATCAGCGAGAAGG	AAGGCACATTGAAAGGGTT	58	32
<i>GhbZIP22</i>	Ghi019104	ATCCAACAGGAATCAGCA	CCACCACAATCACCGCCAC	58	32
<i>GhbZIP23</i>	Ghi019760	CCAACAGGAATCAGCAAG	CACAATCACCGCCACCATC	58	32
<i>GhbZIP24</i>	Ghi019793	CCAGCGAGTTCTTCTGATTC	GGGCATACCCACTGACTTCT	58	32

2 结果与分析

2.1 棉花 *GhbZIP* 基因编码的氨基酸序列比对

用 SMART 在线软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对棉花 24 个 bZIP 蛋白结构域的氨基酸序列进行预测,用 DNAMAN 软件对预测到的氨基酸序列进行多重序列比对分析。结果表明,棉花 bZIP

蛋白结构域由 60 多个氨基酸残基组成,由 DNA 结合碱性区域和亮氨酸拉链组成,碱性区域含 1 个不变的 N-x7-R/K 基序,亮氨酸拉链的二聚化区域由 7 个氨基酸残基组成一个重复单位,该重复单位的第 7 位多为亮氨酸(L),少数由甲硫氨酸(M)和异亮氨酸(I)组成,这与 bZIP 转录因子结构域的特点相符合(图 1)。

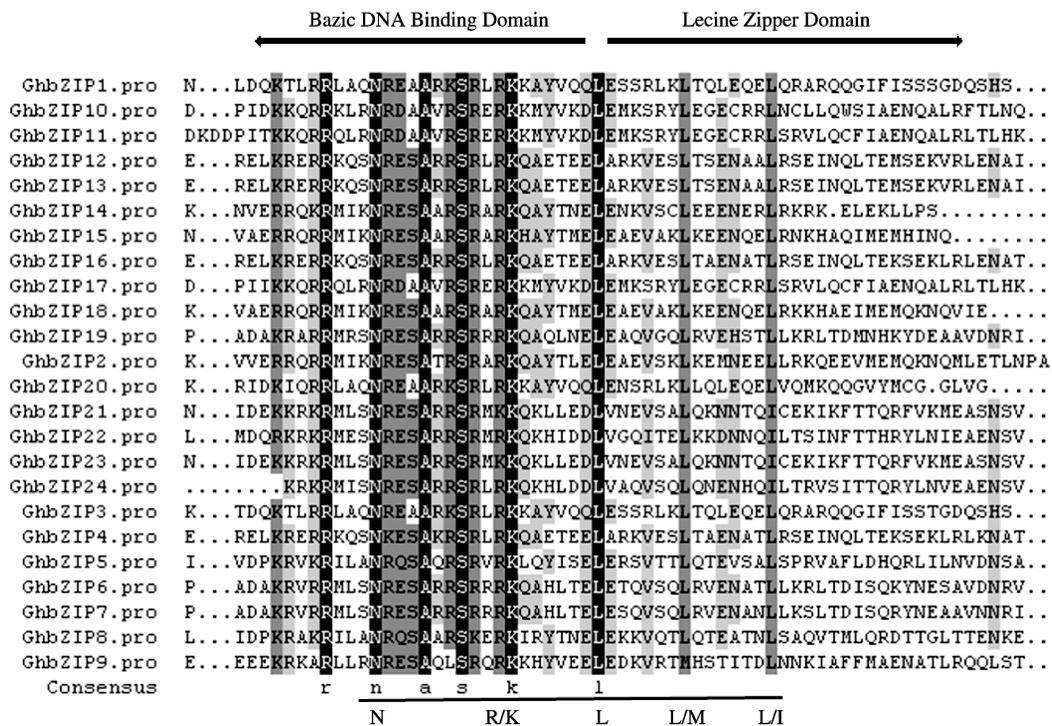


图 1 不同 bZIP 转录因子 DNA 结合域氨基酸序列比较

Fig. 1 Multiple alignments of the amino acid sequences in the conserved domain of various bZIP transcription factors

2.2 棉花 *GhbZIP* 蛋白的进化树分析

M. Jakoby 等^[7]根据 bZIP 转录因子碱性氨基酸区域的保守型,利用 MEME 软件,将拟南芥 75 个 bZIP 转录因子分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I、S 共 10 个亚家族。为了确定棉花 bZIP 蛋白的进化聚类关系,本研究分别从拟南芥 10 个亚家族中各选取几个成员与棉花 24 个转录因子进行系统进化树分析。其中 A 亚家族有 AtABF1 (At1g49720)、AtABF2 (At1g45249)、AtbZIP12 (At2g41070); B 亚家族有 AtbZIP17 (At2g40950)、AtbZIP28 (At3g10800); C 亚家族有 AtbZIP9 (At5g24800)、AtbZIP10 (At4g02640); D 亚家族有 AtbZIP22 (At1g22070)、AtbZIP26 (At5g06960); E 亚家族有 AtbZIP61 (At3g58120)、AtbZIP34 (At2g42380); F 亚家族有 AtbZIP19 (At4g35040)、AtbZIP23 (At2g16770); G 亚家族有 AtbZIP41

(At4g36730)、AtbZIP54 (At4g01120); H 亚家族有 AtbZIP56 (At5g11260)、AtbZIP64 (At3g17609); I 亚家族有 AtbZIP18 (At2g40620)、AtbZIP29 (At4g38900); S 亚家族有 AtbZIP2 (At2g18160)、AtbZIP11 (At4g34590)。结果表明,这 24 个成员主要聚集在 A、B、C、D、E、G、I、S 这 8 个亚家族,在 F、H 亚类中没有,其中 A、G、S 类最多,有 4 个成员,B、C、D 中各有 3 个,在 I、E 中各 1 个(图 2)。

2.3 非生物胁迫下的表达谱分析

2.3.1 盐胁迫诱导 bZIP 基因表达谱的分析 利用半定量 RT-PCR 技术,对 24 个 bZIP 基因在盐胁迫下的表达模式进行分析(图 3)。除了 *GhbZIP1*、*GhbZIP3*、*GhbZIP6*、*GhbZIP8* 和 *GhbZIP24* 这 5 个基因对盐胁迫没有应答外(图 3-B,表 2),其他 19 个基因对盐胁迫刺激都有不同程度的应答(图 3-A)。其中

6个基因 (*GhbZIP2*、*GhbZIP4*、*GhbZIP13*、*GhbZIP14*、*GhbZIP17*、*GhbZIP18*) 的表达谱相同,即在 0 h 表达量比 1 h 高,在 3 h 表达量最高,之后表达量逐渐下降,和 1 h 的表达量相近。5 个基因 (*GhbZIP11*、*GhbZIP19*、*GhbZIP20*、*GhbZIP22*、*GhbZIP23*) 在 1 h 和 6 h 出现 2 个表达低峰。2 个基因 (*GhbZIP7*、*GhbZIP15*) 在 3 h 表达量最高,6 h 和 12 h 两个时间

点的表达量比 0 h 和 1 h 高。值得注意的是 *GhbZIP10*、*GhbZIP12*、*GhbZIP16* 这 3 个基因的表达量是随着盐胁迫处理时间的延长,其表达量逐渐增强。相反,只有 *GhbZIP5* 在没有盐胁迫处理下有较高的表达量,随着处理时间的延长,其表达量开始逐渐下降,到 12 h 最低,其他 2 个基因 (*GhbZIP9*、*GhbZIP21*) 对盐胁迫仅有微弱响应。

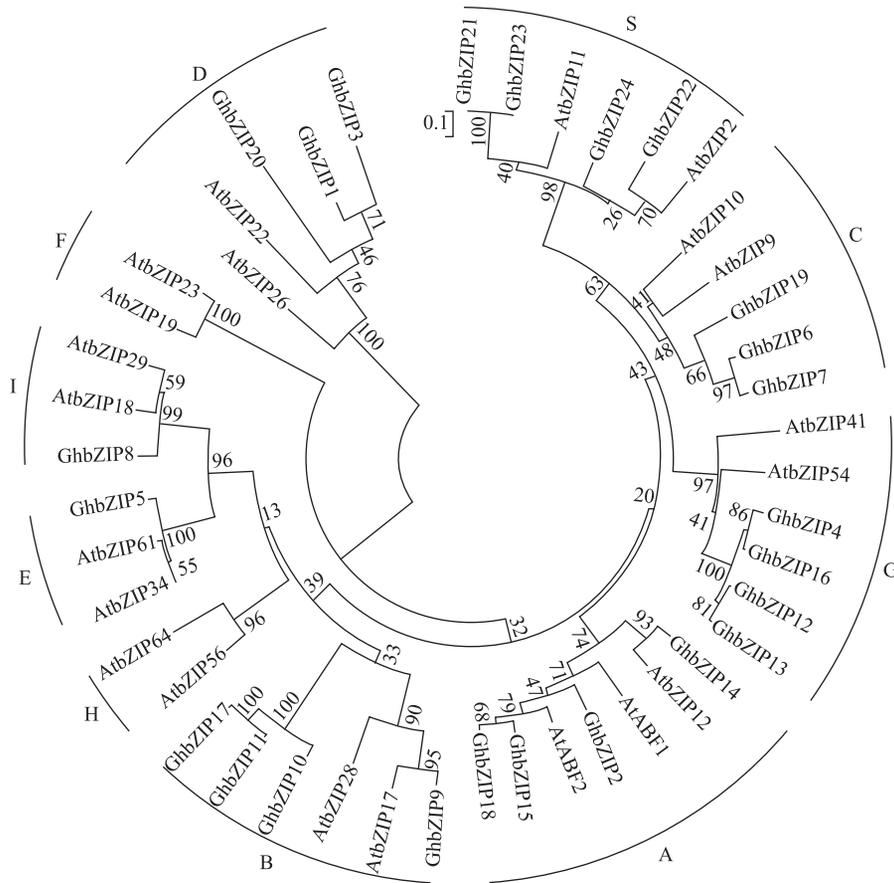
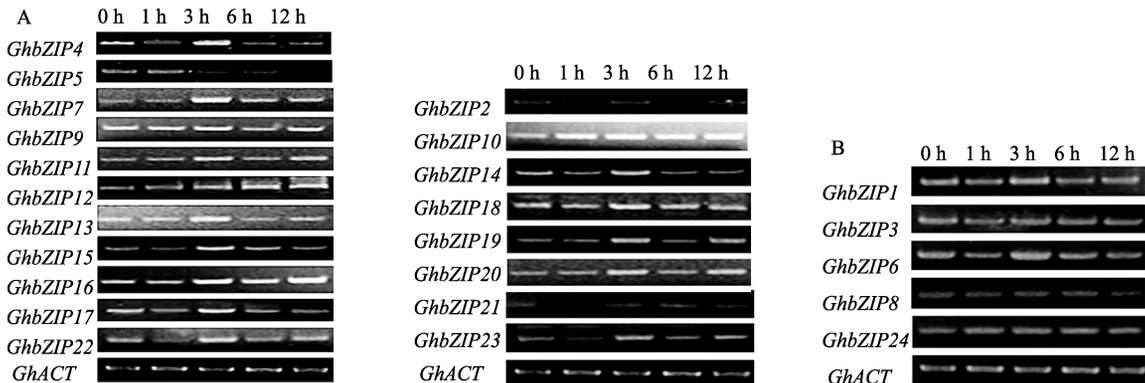


图 2 棉花 bZIP 蛋白家族系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic relationships of cotton bZIP proteins



A: 响应盐胁迫的基因; B: 不响应盐胁迫的基因, 下同

A: Induced by salt stress, B: Non-response to salt stress, the same as below

图 3 盐胁迫处理下棉花 *GhbZIPs* 的表达分析

Fig. 3 Expression alteration of *GhbZIPs* gene under NaCl stress

2.3.2 干旱诱导 bZIP 基因表达谱的分析 对 24 个 bZIP 基因在大气干旱条件下的表达特性进行了分析。有 11 个基因的表达受干旱胁迫的影响(图 4-A), 13 个基因(*GhbZIP1*、*GhbZIP3*、*GhbZIP6*、*GhbZIP9*、*GhbZIP10*、*GhbZIP11*、*GhbZIP12*、*GhbZIP13*、*GhbZIP14*、*GhbZIP15*、*GhbZIP16*、*GhbZIP18* 和 *GhbZIP20*) 不受干旱胁迫诱导表达(图 4-B, 表 2)。在响应干旱胁迫应答的基因中, 4 个基因(*GhbZIP2*、*GhbZIP4*、*GhbZIP19*、*GhbZIP24*) 随着

处理时间的延长, 表达量逐渐增加, 尤其是 *GhbZIP4* 基因, 在 12 h 的表达量大幅增加。而 *GhbZIP8*、*GhbZIP23* 和 *GhbZIP17* 表达与此相反, 随着处理时间延长, 表达量下降, 在 12 h 下降到最低。*GhbZIP5*、*GhbZIP7*、*GhbZIP21* 和 *GhbZIP22* 基因表达趋势相同, 即先升高后下降的趋势, 但他们达到最高表达量的峰值点不一致, *GhbZIP5* 基因的峰值点是 1 h, *GhbZIP7* 是 3 h 和 6 h, *GhbZIP21* 是 3 h, *GhbZIP22* 是 6 h。

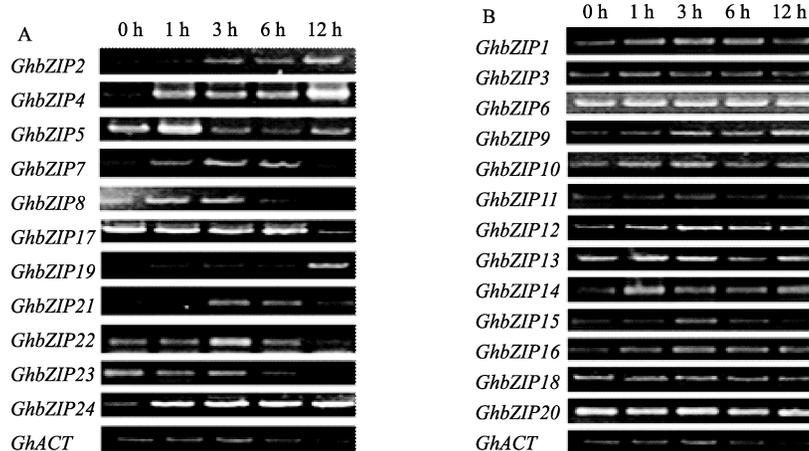


图 4 干旱胁迫处理下棉花 *GhbZIPs* 的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *GhbZIPs* gene under drought stress

2.3.3 低温诱导 bZIP 基因表达谱的分析 低温 (4 °C) 胁迫后, 对 24 个 bZIP 基因的表达规律进行了分析(图 5), 发现有 15 个基因不响应冷胁迫应答(图 5-B), 仅有 9 个基因(*GhbZIP7*、*GhbZIP8*、*GhbZIP13*、*GhbZIP14*、*GhbZIP15*、*GhbZIP16*、*GhbZIP19*、*GhbZIP21* 和 *GhbZIP23*) 受低温胁迫的影响(图

5-A, 表 2)。*GhbZIP16* 基因在 3 h 和 6 h 表达量升高, 之后下降, 呈现先升高后下降的趋势。其余响应低温胁迫的基因, 除了 *GhbZIP19* 为正向诱导表达外, 其余 6 个基因的表达均受到抑制, 以 *GhbZIP7*、*GhbZIP8*、*GhbZIP14* 和 *GhbZIP15* 基因的抑制最为明显, 在 12 h 的表达几乎被完全抑制。

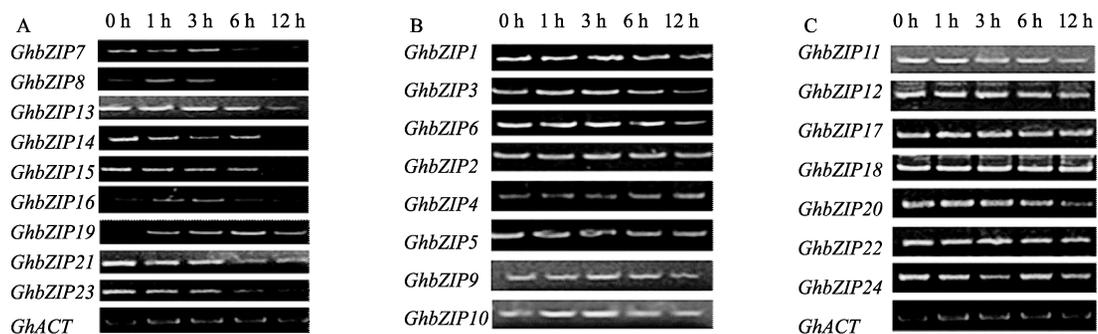


图 5 低温胁迫处理下棉花 *GhbZIPs* 的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *GhbZIPs* gene under cold stress

3 讨论

由于全球耕地面积减少, 粮棉争地矛盾加剧, 使得棉花在贫瘠土壤种植量增加, 由于这些土壤盐渍化和缺水问题严重, 因此培育抗旱耐盐碱的棉花品

种已是棉花育种的迫切需要^[27]。通过挖掘耐逆境选基因, 利用转基因工程手段培育多重抗性的棉花新品种是一种有效的策略。逆境相关转录因子是逆境信号传导途径的终端因子, 能激活下游一系列耐逆境功能基因的表达, 在抗逆反应中发挥重要作用。

表2 *GhbZIP* 基因在非生物胁迫下的表达Table 2 *GhbZIP* genes expression patterns under abiotic stresses

基因 Gene	盐 Salt	干旱 Drought	冷 Cold
<i>GhbZIP1</i>	n. c.	n. c.	n. c.
<i>GhbZIP2</i>	+	++	n. c.
<i>GhbZIP3</i>	n. c.	n. c.	n. c.
<i>GhbZIP4</i>	++	++	n. c.
<i>GhbZIP5</i>	-	-	n. c.
<i>GhbZIP6</i>	n. c.	n. c.	n. c.
<i>GhbZIP7</i>	++	+	-
<i>GhbZIP8</i>	n. c.	-	-
<i>GhbZIP9</i>	++	n. c.	n. c.
<i>GhbZIP10</i>	+	n. c.	n. c.
<i>GhbZIP11</i>	+	n. c.	n. c.
<i>GhbZIP12</i>	+	n. c.	n. c.
<i>GhbZIP13</i>	+	n. c.	-
<i>GhbZIP14</i>	+	n. c.	-
<i>GhbZIP15</i>	+	n. c.	-
<i>GhbZIP16</i>	++	n. c.	+
<i>GhbZIP17</i>	++	-	n. c.
<i>GhbZIP18</i>	+	n. c.	n. c.
<i>GhbZIP19</i>	+	++	+
<i>GhbZIP20</i>	+	n. c.	n. c.
<i>GhbZIP21</i>	+	+	-
<i>GhbZIP22</i>	+	+	n. c.
<i>GhbZIP23</i>	+	-	-
<i>GhbZIP24</i>	n. c.	++	n. c.

n. c. :基因表达没有显著性变化; + :基因表达有微弱诱导; ++ :基因表达强烈诱导;- :基因表达受抑制

n. c. :No significant alteration in gene expression, + :Moderate induction of gene expression, ++ :Strong induction of gene expression, - :Reduction of gene expression

bZIP 转录因子是植物中最大的基因家族之一,在植物抗逆活动中扮演重要角色。研究发现一种或多种逆境胁迫诱导表达的 bZIP 转录因子基因,在植物中过量表达后,绝大多数都能增强植物的抗逆性^[13,28-29]。然而其功能研究多集中在拟南芥、水稻、玉米、番茄和大豆等植物,棉花中 bZIP 参与逆境胁迫适应的研究报道甚少,只有少数几个受逆境诱导的 bZIP 转录因子出现在盐胁迫表达谱结果中^[21-22]。鉴于上述 bZIP 转录因子在其他植物非生物胁迫中的重要作用,本研究系统地分析了棉花 bZIP 转录因子的逆境响应表达模式,以期筛选出与

逆境相关的棉花 bZIP 转录因子。棉花基因组测序已经完成,预测的 bZIP 转录因子基因至少 96 个^[30],全面分析棉花 bZIP 转录因子基因的逆境表达谱,在技术上实现难度较高。而棉花与拟南芥同属于双子叶植物,亲缘关系相对比较近。因此本研究参考了拟南芥的研究结果,筛选出 24 个与拟南芥参与非生物胁迫的 bZIP 转录因子同源的棉花 bZIP 转录因子基因,分析了它们在高盐、干旱和低温下的表达模式。结果显示其中有 3 个基因 (*GhbZIP7*、*GhbZIP15* 和 *GhbZIP16*) 明显受盐胁迫诱导表达(图 3);6 个基因 (*GhbZIP2*、*GhbZIP4*、*GhbZIP7*、*GhbZIP19*、*GhbZIP21* 和 *GhbZIP24*) 显著受干旱胁迫诱导表达(图 4);而有 2 个基因 (*GhbZIP8* 和 *GhbZIP19*) 受冷胁迫诱导表达(图 5),表明这些转录因子可能都参与了棉花对逆境的适应性,在棉花抵御不同非生物逆境因子胁迫中发挥着不同的生物学功能,可以作为抗逆功能验证和棉花抗逆遗传改良的候选目的基因。然而在组成型表达这些抗逆转录因子基因时,往往会导致植物其他一些重要农艺性状受到严重抑制^[31]。虽然利用逆境诱导型启动子可以有效减少这些负面影响,但是筛选抗逆且不抑制其他农艺性状的基因仍然是作物抗逆遗传改良的最佳选择,辣椒 CaBZ1 就是这类基因。以上棉花中受逆境诱导表达的转录因子基因为后续进一步验证其功能以及为棉花品种抗逆性改良提供目的基因奠定基础。

参考文献

- [1] Ma L F, Zhang J M, Huang G Q, et al. Molecular characterization of cotton C-repeat/dehydration-responsive element binding factor genes that are involved in response to cold stress [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41 (7) : 4369-4379
- [2] Perez-Rodriguez P, Riano-Pachon D M, Correa L G, et al. PlnT-FDB: updated content and new features of the plant transcription factor database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38 : 822-827
- [3] Wang J Z, Zhou J X, Zhang B L, et al. Genome-wide expansion and expression divergence of the basic leucine zipper transcription factors in higher plants with an emphasis on Sorghum [J]. *J Integr Plant Biol*, 2011, 53 (3) : 212-231
- [4] Okay S, Derelli E, Unver T. Transcriptome-wide identification of bread wheat WRKY transcription factors in response to drought stress [J]. *Mol Genet Genomics*, 2014, 289 (5) : 765-781
- [5] Mao X G, Chen S S, Li A, et al. Novel NAC transcription factor TaNAC67 confers enhanced multi-abiotic stress tolerances in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (1) : 1-15
- [6] Landschulz W H, Johnson P F, McKnight S L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins [J]. *Science*, 1998, 240 (4860) : 1759-1764
- [7] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7 (3) : 106-111
- [8] Nijhawan A, Jain M, Tyagi A K, et al. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146 (2) : 330-350

- [9] Liao Y, Zou H F, Wei W, et al. Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2008, 228(2): 225-240
- [10] Wei K, Chen J, Wang Y, et al. Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize [J]. *DNA Res*, 2012, 19(6): 463-476
- [11] Baloglu M C, Eldem V, Hajizadeh M, et al. Genome-wide analysis of the bZIP transcription factors in cucumber [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e96014
- [12] Liu J Y, Chen N N, Chen F, et al. Genome-wide analysis and expression profile of the bZIP transcription factor gene family in grapevine (*Vitis vinifera*) [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1-13
- [13] Zhang L, Zhang L, Xia C, et al. A novel wheat bZIP transcription factor, TabZIP60, confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Physiol Plant*, 2015, 153(4): 538-554
- [14] Liu C, Mao B, Ou S, et al. OsbZIP71, a bZIP transcription factor, confers salinity and drought tolerance in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2014, 84(1-2): 19-36
- [15] Hossain M A, Cho J, Han M, et al. The ABRE-binding bZIP transcription factor OsABF2 is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice [J]. *J Plant Physiol*, 2010, 167(17): 1512-1520
- [16] Chen H, Chen W, Zhou J, et al. Basic leucine zipper transcription factor OsbZIP16 positively regulates drought resistance in rice [J]. *Plant Sci*, 2012, 193-194: 8-17
- [17] Liu C, Wu Y, Wang X. bZIP transcription factor OsbZIP52/RIS-BZ5: a potential negative regulator of cold and drought stress response in rice [J]. *Planta*, 2012, 235(6): 1157-1169
- [18] Ying S, Zhang D F, Fu J, et al. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2012, 235(2): 253-266
- [19] Hsieh T H, Li C W, Su R C, et al. A tomato bZIP transcription factor, SlAREB, is involved in water deficit and salt stress response [J]. *Planta*, 2010, 231(6): 1459-1473
- [20] Gao S Q, Chen M, Xu Z S, et al. The soybean *GmbZIP1* transcription factor enhances multiple abiotic stress tolerances in transgenic plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 75(6): 537-553
- [21] Zhang X, Zhen J B, Li Z H, et al. Expression profile of early responsive genes under salt stress in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29(3): 626-637
- [22] Rodriguez U L, Highbie S M, Stewart J M, et al. Identification of salt responsive genes using comparative microarray analysis in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Sci*, 2011, 180(3): 461-469
- [23] Jiang J X, Guo W Z, Zhang T Z. Cloning and expression analysis of a bZIP cDNA in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Acta Genet Sin*, 2004, 31(6): 616-621
- [24] Mittal A, Gampala S S, 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 Biotechnol J*, 2014, 12(5): 578-589
- [25] 胡根海, 喻树迅. 利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA [J]. *棉花学报*, 2007, 19(1): 69-70
- [26] Guo A Y, Chen X, Gao G, et al. PlantTFDB: A comprehensive plant transcription factor database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 966-969
- [27] Ragauskas A J, Williams C K, Davison B H, et al. The path forward for biofuels and biomaterials [J]. *Science*, 2006, 311(5760): 484-489
- [28] Zhou T, Yang X, Wang L, et al. GhTZF1 regulates drought stress responses and delays leaf senescence by inhibiting reactive oxygen species accumulation in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2014, 85(1-2): 163-177
- [29] Shi W, Hao L, Li J, et al. The *Gossypium hirsutum* WRKY gene *GhWRKY39-1* promotes pathogen infection defense responses and mediates salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(3): 483-498
- [30] Ma L F, Zhang J M, Huang G Q, et al. Molecular characterization of Cotton C-repeat/dehydration-responsive element binding factor genes that are involved in response to cold stress [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(7): 4369-4379
- [31] Li F, Fan G, Lu C, et al. Genome sequence of cultivated upland cotton (*Gossypium hirsutum* TM-1) provides insights into genome evolution [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(5): 524-530