

胡萝卜中 *DcDofD1* 转录因子的克隆及其对非生物逆境胁迫的响应分析

却 枫, 黄 莹, 王 枫, 徐志胜, 王广龙, 熊爱生

(作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部华东地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室/南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: Dof (DNA-binding with one finger) 转录因子是植物特有的一类转录因子, 该类转录因子在植物生长发育过程中起重要作用。本试验以胡萝卜黑田五寸和君川红为试验材料, 分别从中克隆获得 *DcDofD1* 转录因子基因。采用生物信息学方法对 *DcDofD1* 转录因子氨基酸组成、理化性质、进化关系进行了分析。并利用实时定量 PCR 方法对 *DcDofD1* 基因在非生物胁迫下的表达量进行了分析。结果表明, 黑田五寸和君川红中的 *DcDofD1* 转录因子具有明显的单锌指结构, 保守域的氨基酸序列比较保守。进化分析显示, *DcDofD1* 属于 Dof 家族的 D1 亚族。在胡萝卜黑田五寸和君川红中, *DcDofD1* 基因对高温、低温、干旱、盐等非生物胁迫有响应。而不同胡萝卜材料中, *DcDofD1* 基因对非生物逆境响应的强度和速度不同。

关键词: 胡萝卜; Dof 转录因子; 基因克隆; 非生物胁迫; 实时定量 PCR; 基因表达

Cloning and Expression Analysis of a Transcription Factor, *DcDofD1* Related to Abiotic Stress Reaction in Carrot

QUE Feng, HUANG Ying, WANG Feng, XU Zhi-sheng, WANG Guang-long, XIONG Ai-sheng

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/ Ministry of Agriculture Key

Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China/College of

Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: In higher plant, Dof (DNA-binding with one finger) transcription factor is a plant-specific transcription factor, which plays important roles during the growth and development. Here, the genes of *DcDofD1*, which encoding to a Dof transcription factor, were cloned from two carrot varieties ‘Heitianwucun’ and ‘Junchuanhong’, respectively. The sequences of nucleic acid and amino acid, phylogenetic tree, hydrophilicity and hydrophobicity, and molecular modeling were analyzed using bioinformatics method. The results demonstrated that the two *DcDofD1* factors from carrot had single zinc finger, and their amino acid sequences at Dof domain were very conserved. The *DcDofD1* factors from carrot were classified into D1 subfamily of Dof family. The expression profiles of the *DcDofD1* gene under four abiotic stress treatments (cold, heat, high salt, and drought) were analyzed by quantitative real-time PCR in the two carrot varieties ‘Heitianwucun’ and ‘Junchuanhong’. The results of expression profiles showed that *DcDofD1* gene responded to the cold, heat, high salt, and drought stresses in carrot. The results demonstrated that the *DcDofD1* gene involved into interaction with abiotic stress in carrot.

Key words: carrot; Dof transcription factor; gene clone; quantitative real-time PCR; gene expression

高温、低温、干旱、盐碱等逆境会严重影响蔬菜的生长发育、产量、质量, 甚至造成蔬菜植株的死

收稿日期: 2014-09-01 修回日期: 2014-10-28 网络出版日期: 2015-08-011

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150811.1553.002.html>

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-11-0670); 江苏省杰出青年基金项目 (BK20130027); 中国博士后科学基金项目 (2014M551609); 江苏高校优势学科建设项目 (2011PAPD); 江苏省双创计划 (2011JSSC)

第一作者主要从事蔬菜分子生物学研究。E-mail: 2014104080@njau.edu.cn

通信作者: 熊爱生, 研究方向为蔬菜分子生物学。E-mail: xiongaiseng@njau.edu.cn

亡^[1]。植物在进化过程中形成了相应的逆境防御应答机制,这些机制主要由基因控制或调控^[2]。

转录因子也称为反式作用因子,是一种 DNA 结合蛋白。高等植物中,转录因子能与基因启动子区域中顺式作用元件结合,通过与顺式元件和其他蛋白的相互作用来促进或抑制相关基因的表达,从而调节基因的转录、基因表达的程度、基因表达的时空特异性,来应答外界环境的胁迫^[2-3]。Dof (DNA binding with one finger) 蛋白是植物特有的一类转录因子,因为在其 N 末端有一单锌指结构而被命名为 Dof^[4-7]。Dof 蛋白包括位于 N 末端的 Dof 结构域和位于 C 末端的转录调节域,其转录调节域位于不保守的 C 末端造就了其功能的多样性^[7-9]。

E. Cominelli 等^[10]研究表明,拟南芥中 Dof 识别的核心序列元件 AAAG 是 AtMYB60 蛋白正常表达的关键,而 AtMYB60 蛋白能通过保卫细胞中特异表达来调控植物气孔的开闭。马铃薯中 *StDof1* 基因通过识别保卫细胞 K⁺ 流通道蛋白基因 *KST1* 来调控气孔特异基因的表达从而影响气孔运动^[11]。植物中, *Dof* 基因在响应水杨酸信号调控植物防御反应中起作用,豌豆 *PsDof1* 蛋白通过与防御反应基因 *CHS* 的启动子结合来调控植物的防御反应^[12-13]。Dof 转录因子在植物的花期调控中也扮演着重要的角色^[14]。目前,伞形科植物中相关研究报道很少,其中胡萝卜中关于 Dof 的研究还未见报道。

胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 是伞形科胡萝卜属二年生植物,是一种重要的蔬菜作物,其营养丰富,富含蛋白质、碳水化合物、各种维生素以及钙、铁、磷、钠等多种微量元素,在世界上栽培面积很大^[15]。本试验以胡萝卜品种黑田五寸和君川红为试验材料,分别从 2 个品种中克隆获得 *DcDofD1* 基因,并对其进行了详细的生物信息学分析。黑田五寸是来自日本的一个耐热品种,根形为圆柱形;君川红是一个抗寒、抗热、抗病的品种,根形为圆柱形。利用荧光定量 PCR 技术检测了其在 34℃ 高温、4℃ 低温、0.2 mol/L NaCl 高盐和 200 g/L PEG 干旱处理下不同时间段的表达情况,以期为进一步开展胡萝卜 Dof 类转录因子的研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株和质粒

植物材料胡萝卜君川红和黑田五寸于 2014 年 4 月份种植于南京农业大学作物遗传与种质创新国

家重点实验室人工气候室。待长至 2 个月龄时,分别进行高温 (38℃)、低温 (4℃)、高盐 (0.2 mol/L NaCl)、干旱 (200 g/L PEG) 处理。处理 0、1、2、4、8 和 12 h 时,分别取 2 个品种健康成熟的叶片,提取总 RNA,并用 PrimeScript RT reagent Kit (大连 TaKaRa 公司) 将提取的总 RNA 反转录成 cDNA,用于荧光定量 PCR。

本试验所用菌株为大肠杆菌菌株 DH5 α ,由本实验室保存;质粒载体 pMD19-T vector simple、*Ex Taq* 酶、反转录酶 *Mlu* I、DL marker 2000 和 dNTP 荧光定量染料 SYBR Green I 等购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用总 RNA 试剂盒 (Tiagen 公司) 提取总 RNA,利用反转录试剂盒 (大连 TaKaRa 公司) 将提取的总 RNA 反转录成 cDNA。

1.3 胡萝卜 *DcDofD1* 基因的克隆

基于本实验室胡萝卜转录组数据,拼接得到胡萝卜 *DcDofD1* 基因的序列,并设计 1 对引物,正向引物为 *DcDofD1F*: 5'-ATGCAAGACATGCGCATTTTC-3',反向引物为 *DcDofD1R*: 5'-TTATGGGAGGTGGAAATGAAA-3'。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 4min; 94℃ 变性 30s; 54℃ 退火 30s; 72℃ 延伸 1 min; 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物,回收后连接到 pMD19-T 载体克隆,然后提取质粒经 PCR 鉴定后委托南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

1.4 胡萝卜 *DcDofD1* 基因的序列分析

不同植物相关基因和氨基酸序列均来自 NCBI 数据库;多序列比对和蛋白质亲水性/疏水性分析均通过 DNAMAN 软件来完成;利用 MEGA5 构建进化树并生成图形报告^[16];蛋白质基本性质分析使用 <http://www.expasy.org> 网站相关软件完成^[17]。

1.5 实时定量 PCR 反应

荧光定量 PCR 在 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪上完成。采用 SYBR Premix *Ex Taq* 试剂盒 (大连 TaKaRa 公司) 按照操作说明进行实时荧光定量 PCR 操作。相对定量使用参照基因的 $\Delta\Delta C_T$ 法,表达差异等于 $2^{-\Delta\Delta C_T}$, 其中 $\Delta\Delta C_T = (C_{t\text{靶基因}} - C_{t\text{内参}})_{\text{处理组}} - (C_{t\text{靶基因}} - C_{t\text{内参}})_{\text{对照组}}$ 。基因 *DcDofD1* 表达检测的上游引物为: 5'-ACAGATGCAGAGTATCAGGCGT-3', 下游引物为: 5'-TGGGAGGTGGAAATGAAAAGAG-3'。用胡萝卜 *actin* 基因作为内参 (登录号: X17526.1), 上游引物 *DcA15F* 为: 5'-GAGTG-

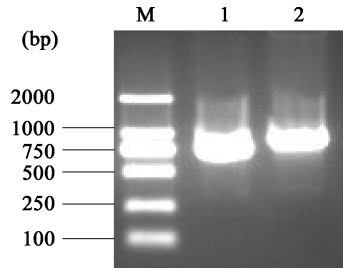
GAGTTACCTGCTGCCTTC-3',下游引物 DcA15R 为: 5'- ATGTAGACGAGGGAACGGAATCAAG -3'。试验进行 3 次重复,对数值进行差异显著水平分析。

2 结果与分析

2.1 胡萝卜 *DcDofD1* 基因的克隆

克隆用的 cDNA 模板分别来自胡萝卜品种黑田五寸和君川红。以 *DcDofD1F* 和 *DcDofD1R* 为上下游引物进行 PCR 扩增,分别获得长约 800 bp 的扩增产物(图 1)。序列测定和分析表明,黑田五寸和君川红都含有 1 个 846 bp 的开放阅读框,编码 281 个氨基酸。2 个品种的 *DcDofD1* 基因在核苷酸水平上有 5 个位点不同,分别在第 506 位 A/G、第 575 位 A/C、第 580 位 A/G、第 612 位 T/A、第 657 位 C/G。

上述核苷酸位点导致其编码的氨基酸有 5 个位点不同,分别为第 169 位 N/S、第 192 位 N/T、第 194 位 A/T、第 204 位 H/Q、第 219 位 D/E 的不同,具体位置见图 2。



M:Marker, 1: *DcDofD1* gene from Heitianwucun, 2: *DcDofD1* gene from Junchuanhong

图 1 胡萝卜 *DcDofD1* 基因克隆图谱

Fig. 1 PCR amplification of *DcDofD1* gene from carrot

1	ATGCAAGACATGCGCATTTTCAACACGGCATCGATCGGAGACTCCGACCAACGGCGCATCAACACCAGCAA	1	ATGCAAGACATGCGCATTTTCAACACGGCATCGATCGGAGACTCCGACCAACGGCGCATCAACACCAGCAA
	M Q D M R I F N T G I D R R L R T N A A I N H Q Q		M Q D M R I F N T G I D R R L R T N A A I N H Q Q
76	GCGCTTAAATGTCGGGATCGGAATCACTCAACAAAATTTCTGTACTACAATAATTACAATCTTGTCAAGCT	76	GCGCTTAAATGTCGGGATCGGAATCACTCAACAAAATTTCTGTACTACAATAATTACAATCTTGTCAAGCT
	A L K C P R C E S L N T K F C Y Y N N Y N L A Q P		A L K C P R C E S L N T K F C Y Y N N Y N L A Q P
151	CGTTTCTACTGTAAGCGCTGTCGGGTTACTGGACTAAAGCGGTTCTCTCGTAATGTTCTGTGGAGCGGT	151	CGTTTCTACTGTAAGCGCTGTCGGGTTACTGGACTAAAGCGGTTCTCTCGTAATGTTCTGTGGAGCGGT
	R F Y C K A C R R Y W T K G G V L R N V P V G G G		R F Y C K A C R R Y W T K G G V L R N V P V G G G
226	ATTGCAAGGCTAAGCGGTGTCGAAAAATAAAATAATTTCACGGCTGATCAGGCTGATGCTGAAAAATCA	226	ATTGCAAGGCTAAGCGGTGTCGAAAAATAAAATAATTTCACGGCTGATCAGGCTGATGCTGAAAAATCA
	I R K A K R S S K N K K L I S T A D Q A D A E K S		I R K A K R S S K N K K L I S T A D Q A D A E K S
301	GCTGAGTCAATTCTAGTAGTGAGAGGTCTAGTCTACCGGACTACAGAGGTGTTTCTGCACCAAGCACAAATG	301	GCTGAGTCAATTCTAGTAGTGAGAGGTCTAGTCTACCGGACTACAGAGGTGTTTCTGCACCAAGCACAAATG
	A E S N S S S E R S S L T A T T E V V S A P S T M		A E S N S S S E R S S L T A T T E V V S A P S T M
376	AGTTGTCGCCGAATCTGTTAGTTTTCGATACCAACTATCAGTTTCTCTGTCGCTCAGGTTAATGAA	376	AGTTGTCGCCGAATCTGTTAGTTTTCGATACCAACTATCAGTTTCTCTGTCGCTCAGGTTAATGAA
	S S C P N L F S F A T D T N S S Q F P V P Q V N E		S S C P N L F S F A T D T N S S Q F P V P Q V N E
451	CCTGCTCAATCAGCAAAATTTTCATGATCCAGACAGTCTGGATCGATGTTTATGATATTTGGACAGTTCACA	451	CCTGCTCAATCAGCAAAATTTTCATGATCCAGACAGTCTGGATCGATGTTTATGATATTTGGACAGTTCACA
	P G F N Q Q N F I D P D S A G S M F N D I G Q F T		P G F N Q Q N F I D P D S A G S M F S D I G Q F T
526	GAAATCATGGCTGTCGACGACTGATCTAGGTTTAGCAATTGCGGATTCACGCTTCAGATCGGGGAACAG	526	GAAATCATGGCTGTCGACGACTGATCTAGGTTTAGCAATTGCGGATTCACGCTTCAGATCGGGGAACAG
	E I M A S S T T D L G F S I A D N S A F R S G N Q		E I M A S S T T D L G F S I A D T S I F R S G N Q
601	AACGATGATCAATGTGCAACAGATGACAGTATCAGCGGTGTGAATTATTTAGAGAGACAACTCGGATGAG	601	AACGATGATCAATGTGCAACAGATGACAGTATCAGCGGTGTGAATTATTTAGAGAGACAACTCGGATGAG
	N D D H V Q Q M Q S I R R C E L Y L D E T T R I E		N D D Q V Q Q M Q S I R R C E L Y L E E T T R I E
676	TCTAAGGAATCTGATACCAAGATGAGCAACGATGGACTTACGCTGGAATGGCGTGTGATGATCAAGAAAT	676	TCTAAGGAATCTGATACCAAGATGAGCAACGATGGACTTACGCTGGAATGGCGTGTGATGATCAAGAAAT
	S K E S D T K M S N D G L T D V E W R V D D Q E I		S K E S D T K M S N D G L T D V E W R V D D Q E I
751	TATGATTAAACAGGGAACGTGATGAAGCTACTGAGTCAAAATCAGTGGCTGATCATATAGTACCACTCT	751	TATGATTAAACAGGGAACGTGATGAAGCTACTGAGTCAAAATCAGTGGCTGATCATATAGTACCACTCT
	Y D L T G N V D E A Y W S Q N Q W P D H H S D H S		Y D L T G N V D E A Y W S Q N Q W P D H H S D H S
826	TTTCATTCCACCTCCCATAA	826	TTTCATTCCACCTCCCATAA
	F H F H L P *		F H F H L P *

君川红 Junchuanhong

黑田五寸 Heitianwucun

图 2 君川红和黑田五寸 *DcDofD1* 基因及其编码氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide acid and deduced amino acid sequences of *DcDofD1* gene from Junchuanhong and Heitianwucun

2.2 胡萝卜 *DcDofD1* 转录因子氨基酸亲水性/疏水性分析

对 2 个品种中的 *DcDofD1* 转录因子氨基酸亲水性/疏水性进行分析对比,发现这 2 个品种中都是亲水性氨基酸占多数,两者之间差异很小。说明该蛋白总体属于亲水性蛋白。以君川红的 *DcDofD1* 转录因子氨基酸亲水性/疏水性为例进行分析。君川红中 *DcDofD1* 转录因子的第 79 位的丙氨酸亲水性最强,第 227 位的赖氨酸亲水性和第 229 位的丝氨酸的亲水性相差不大,都只略低于位于第 79 位的丙氨酸;疏水性最强的位点是位于第 187 位的苯丙氨酸(图 3)。通过比较可以看出,胡萝卜 *DcDofD1* 转录因子中亲水区域多于疏水区域,其氨基酸序列可能属于亲水性蛋白。

2.3 胡萝卜中 *DcDofD1* 转录因子氨基酸序列的结构域分析

本试验使用 Blast-Conserved-Domains-Search 对胡萝卜的 *DcDofD1* 转录因子进行了结构域分析,分析结果表明胡萝卜的 *DcDofD1* 转录因子具有 Zf-Dof 保守域,如图 4 所示。

2.4 胡萝卜 *DcDofD1* 转录因子进化分析

为了进一步研究胡萝卜 *DcDofD1* 转录因子与 Dof 家族相关转录因子的进化关系,本试验选取了拟南芥和水稻的 Dof 家族中的一些转录因子与胡萝卜的 *DcDofD1* 转录因子进行同源进化比对,构建了相应的进化树(图 5)。从图中可以明显看出 Dof 家族可以分为 A、B1、B2、C1、C2、C2.1、C3、D1、D2 9 个亚族,本试验所克隆的胡萝卜 *DcDofD1* 转录因子

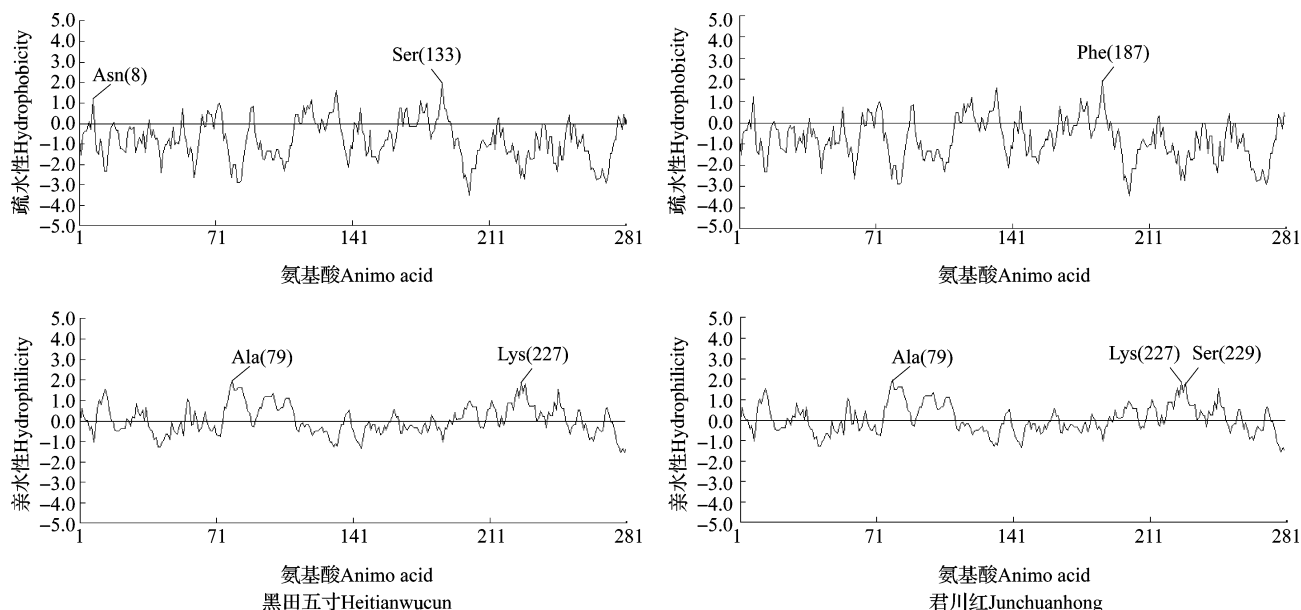


图3 黑田五寸和君川红 DcDofD1 转录因子氨基酸序列的亲水性和疏水性

Fig. 3 Predicted hydrophilicity and hydrophobicity of deduced amino acid sequence of DcDofD1 from Junchuanhong and Heitianwucun

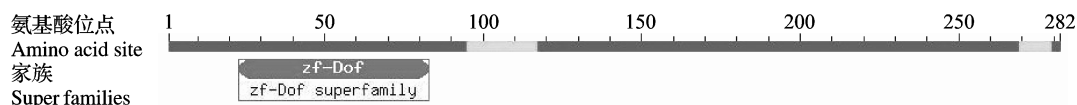


图4 胡萝卜 DcDofD1 转录因子保守域预测

Fig. 4 Prediction of the conserved domain of DcDofD1 transcription factor

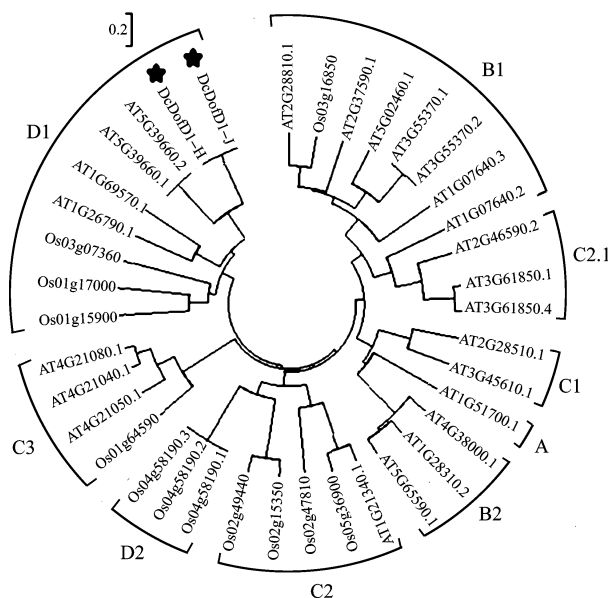


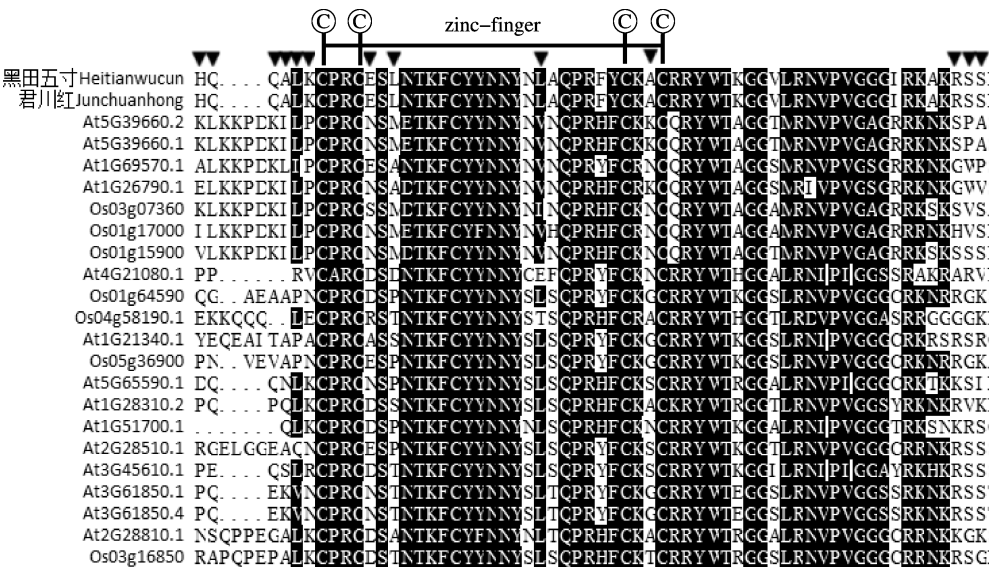
图5 胡萝卜 DcDofD1 转录因子进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of DcDofD1 transcription factor in carrot

与拟南芥的 AT5G39660.2、AT5G39660.1、AT1G69570.1、AT1G26790.1, 水稻的 OS03g07360、OS01g17000、OS01g15900 同属于 D1 亚族, 与拟南芥中的 AT5G39660.2 和 AT5G39660.1 进化关系较近。

2.5 胡萝卜 DcDofD1 转录因子氨基酸序列比对及理化性质分析

根据 2.4 所得出的结果, 选取拟南芥和水稻不同亚族的部分转录因子与胡萝卜 DcDofD1 转录因子进行氨基酸序列比对并进行对应的理化性质分析。多序列比对结果见图 6, 结果表明本试验所克隆的胡萝卜 DcDofD1 转录因子具有 Dof 转录因子特有的单锌指结构, 其氨基酸序列在 Zf-Dof 结构域的保守性较好。在保守域中, 具有与拟南芥和水稻同样的 13 个活性位点。对 D1 亚族中的拟南芥和水稻的转录因子及本试验所克隆基因的氨基酸组成成分和理化性质进行分析, 结果见表 1。这些转录因子的氨基酸残基数从 281 到 551 不等, 差异较大; 理论相对分子质量差异也较大; 酸性氨基酸所占比例明显高于碱性氨基酸所占比例; 脂肪族氨基酸所占比例平均达到 80% 以上, 明显高于芳香族氨基酸所占比例。



‘▼’所示为 13 个活性位点,以‘At’开头的基因属于拟南芥,以‘Os’开头的基因属于水稻

The ‘▼’marks 13 active bonding sites,genes start with ‘At’ belong to *Arabidopsis*,while start with ‘Os’ belong to rice

图 6 胡萝卜 *DcDofD1* 转录因子与其他物种 *Dof* 转录因子氨基酸序列比对

Fig. 6 Alignment of amino acids of *DcDofD1* transcription factor from carrot and other plants

表 1 胡萝卜 *DcDofD1* 转录因子蛋白氨基酸组成成分及理化性质分析

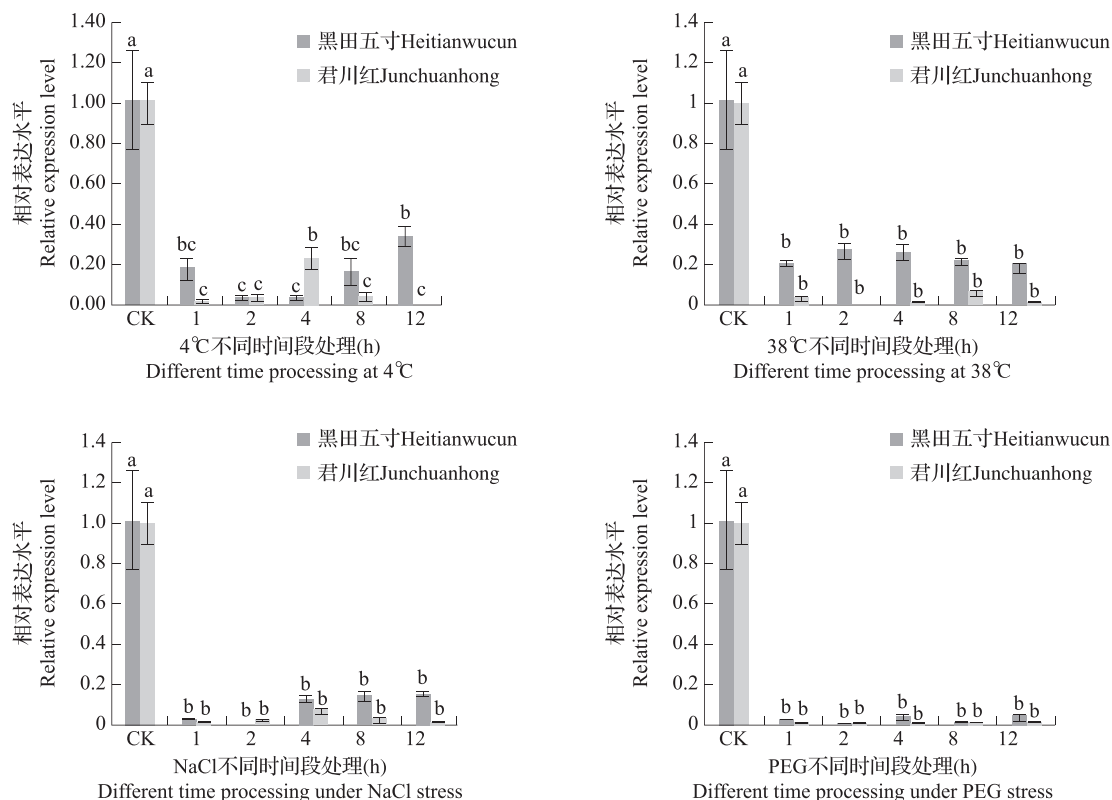
Table 1 The composition and physical and chemical characterization of amino acid sequencesof *DcDofD1* transcription factors

物种 Plant	转录因子 Transcription factors	氨基酸残基数 No. of amino acids	理论相对分子质量 Theoretical relative molecular mass	理论等电点 Theoretical PI	碱性氨基酸	酸性氨基酸	芳香族氨基酸	脂肪族氨基酸
					比例 (%) Ratio of basic amino acid	比例 (%) Ratio of acid amino acid	比例 (%) Ratio of aromatics amino acid	比例 (%) Ratio of aliphatic amino acid
黑田五寸	<i>DcDofD1</i>	281	31780.0	5.382	12	26	9	85
君川红	<i>DcDofD1</i>	281	31790.0	5.621	13	27	9	84
拟南芥	At5G39660.1	457	49810.0	4.939	12	22	7	84
	At1G69570.1	399	44010.0	8.824	13	21	8	84
	At1G26790.1	396	44750.0	7.281	12	21	9	81
	Os03g07360	440	47010.0	7.802	13	20	6	84
水稻	Os01g17000	490	52770.0	7.026	11	20	5	82
	Os01g15900	551	59980.0	4.717	12	24	6	84

2.6 胡萝卜 *DcDofD1* 基因在不同逆境下的表达

为了进一步分析胡萝卜 *DcDofD1* 基因在非生物逆境胁迫下的响应情况,本试验对所选的 2 个胡萝卜品种黑田五寸、君川红进行了低温(4℃)、高温(38℃)、高盐(0.2 mol/L NaCl)、干旱(200 g/L PEG)4 种非生物逆境处理,结果如图 7 所示。该基因在 2 个品种中的表达全都明显低于其在对照中的表达,PEG 处理条件下尤为明显。4℃低温处理时,黑田五寸中 *DcDofD1* 基因随处理时间的延长,其表达趋势与君川红相反,黑田五寸是高-低-高的趋势,而君川红是低-高-低的趋势;38℃高温处理时,黑田五寸中的 *DcDofD1* 表达量随时间的变化

较小,君川红中的 *DcDofD1* 的表达量很小,在处理 2 h 的表达量几乎检测不到;0.2 mol/L NaCl 处理时,2 个品种的 *DcDofD1* 的表达量都很低,但在 4 h 及之后的时间段,黑田五寸中 *DcDofD1* 的表达量要明显高于君川红;200 g/L PEG 处理时,2 个品种的 *DcDofD1* 的表达量相近,且都明显低于对照。实时荧光定量结果显示,不同非生物胁迫处理下, *DcDofD1* 基因在黑田五寸和君川红的表达量都明显低于对照,胡萝卜中 *DcDofD1* 基因对非生物胁迫是有应答的。不同胡萝卜材料中, *DcDofD1* 基因表达量不同,表明该 *DcDofD1* 基因对不同非生物逆境的应答是有差异的。



a, b, c 表示在 0.05 水平上的差异显著性

a, b, and c indicate significant difference at 0.05 level

图 7 胡萝卜 *DcDofDI* 基因在不同逆境以及不同时间段处理的表达

Fig. 7 Expression profiles of the *DcDofDI* gene under different abiotic stress treatments in carrot

3 讨论

逆境是各种对植物生长发育不利环境因素的统称。逆境对作物生长的影响很大,是限制作物生产的重要因素之一。高温、低温、干旱、盐碱等胁迫是作物生产中最常遇到的非生物逆境,对作物生长发育的影响很大。例如高温胁迫下,植物的光合速率降低,叶片会出现萎蔫、脱落、变干、变脆的现象^[18];干旱胁迫下,植物体内自由基产生和消除的平衡会被打破,引起细胞伤害,影响光合作用,最终影响作物的产量^[19];低温胁迫下,植物各项生理活动都会出现减缓或停止,还可能造成膜系统受损^[20];高盐胁迫下,会产生渗透胁迫,还会造成离子毒害,使植物生长受到抑制^[21]。

Dof 转录因子是植物中特有的转录因子,在植物生长过程中扮演重要角色,广泛参与植物的碳氮代谢调节^[22-23]、光周期调控^[24]、花发育^[25-26]、种子萌发^[27-28]。在高等植物中,Dof 家族转录因子同样也参与植物对逆境胁迫的响应^[2]。已有研究证明,次生代谢物在植物抵御逆境中扮演重要的角色。类

黄酮和水杨酸在植物抵御逆境时都发挥很重要的作用,糖基化的类黄酮物质能帮助植物抵御紫外线的伤害,而水杨酸在植物进行防御反应时作为信号分子存在^[7]。研究证实,拟南芥中 Dof 蛋白对类黄酮的积累起到调控作用^[29],此外在拟南芥中还发现 3 个 Dof 基因能响应水杨酸信号^[30]。

Z. S. Xu 等^[31]在胡萝卜基因组范围分析转录因子,发现胡萝卜转录因子家族众多,有 AP2/ERF、NAC、Dof 等转录因子家族。黄蔚等^[32]研究发现胡萝卜 AP2/ERF 家族的 2 个转录因子 DcERF-B1-1 和 DcERF-B1-2 对高温、低温、干旱、盐这 4 种逆境胁迫有响应,且同属于 AP2/ERF 家族的 2 个转录因子对非生物逆境胁迫的响应强度存在明显的差异。本试验对 2 个胡萝卜材料黑田五寸和君川红分别进行了高温、低温、干旱、盐 4 种逆境胁迫处理。实时荧光定量的结果显示,*DcDofDI* 转录因子基因对逆境有应答,逆境处理下的表达量都显著低于对照。黑田五寸和君川红中都有响应,但在低温处理时,两者的响应速度不同,表达量变化趋势完全相反,可能是 2 种胡萝卜材料对低温的抵抗能力不同造成的。

在其他逆境处理下,虽然总体表达情况相似,但在响应时间和强度上有差异。已有研究证实,高等植物中,不同的转录因子家族和同一家族转录因子不同成员之间对非生物胁迫存在相互调控的关系^[33-34]。胡萝卜中转录因子参与逆境调控也是一个复杂的网络,是一个整体的调控体系^[35]。胡萝卜材料的不同很可能造成同一家族内不同转录因子成员,或是不同转录因子家族对逆境响应强度和速度出现差异。本研究证实了胡萝卜中 *DcDofD1* 转录因子基因对非生物逆境胁迫有响应,且不同的胡萝卜材料中响应有差异, *DcDofD1* 基因在胡萝卜对非生物逆境的抵御中可能起重要作用。

参考文献

- [1] 陈秀晨,熊冬金. 植物抗性研究进展[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(9): 2253-2256
- [2] Chen W, Provart N J, Glazebrook J, et al. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 559-574
- [3] Latchman D S. Transcription factors: an overview[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(12): 1305-1312
- [4] Kushwaha H, Gupta S, Singh V K, et al. Genome wide identification of Dof transcription factor gene family in sorghum and its comparative phylogenetic analysis with rice and *Arabidopsis*[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(8): 5037-5053
- [5] Noguero M, Atif R M, Ochatt S, et al. The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants[J]. *Plant Sci*, 2013, 209: 32-45
- [6] Shaw L M, McIntyre C L, Gresshoff P M, et al. Members of the Dof transcription factor family in *Triticum aestivum* are associated with light-mediated gene regulation[J]. *Funct Integr Genomic*, 2009, 9(4): 485-498
- [7] 蔡晓峰,张余洋,张俊红,等. 植物 Dof 基因家族功能研究进展[J]. 植物生理学报, 2013, 49(1): 1-12
- [8] Yanagisawa S. The Dof family of plant transcription factors[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(12): 555-560
- [9] Rueda-López M, García-Gutiérrez A, Cánovas F M, et al. The family of Dof transcription factors in pine[J]. *Trees*, 2013, 27(6): 1547-1557
- [10] Cominelli E, Galbiati M, Albertini A, et al. DOF-binding sites additively contribute to guard cell-specificity of *AtMYB60* promoter[J]. *BMC Plant Biol*, 2011, 11(1): 162
- [11] Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression[J]. *Plant J*, 2001, 28(4): 455-464
- [12] Kang H G, Singh K B. Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects[J]. *Plant J*, 2000, 21(4): 329-339
- [13] 關光,丸谷瑞理,稻垣善茂,等. Possible involvement of AAAG motif and PsDof1 in elicitor-induced gene expression in pea[J]. 岡山大学農学部学術報告, 2003, 92(1): 21-26
- [14] Yang J, Yang M F, Wang D, et al. JcDof1, a Dof transcription factor gene, is associated with the light-mediated circadian clock in *Jatropha curcas*[J]. *Physiol Plantarum*, 2010, 139(3): 324-334
- [15] 章镇. 园艺学各论[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(10): 2731-2739
- [17] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, et al. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(13): 3784-3788
- [18] 陈秀晨,朱启升,王士梅. 水稻耐热性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(30): 13068-13070
- [19] 毕黎明,刘伟丽,李杨瑞. 甘蔗抗旱性研究进展与展望[J]. 广西农业科学, 2006, 37(5): 522-527
- [20] Seo P J, Park M J, Park C M. Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: mechanisms and functions[J]. *Planta*, 2013, 237(6): 1415-1424
- [21] 王少峡,王振英,彭永康. DREB 转录因子及其在植物抗逆中的作用[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(1): 7-13
- [22] Tanaka M, Takahata Y, Nakayama H, et al. Altered carbohydrate metabolism in the storage roots of sweetpotato plants overexpressing the *SRF1* gene, which encodes a Dof zinc finger transcription factor[J]. *Planta*, 2009, 230(4): 737-746
- [23] Kumar R, Taware R, Gaur V S, et al. Influence of nitrogen on the expression of TaDof1 transcription factor in wheat and its relationship with photo synthetic and ammonium assimilating efficiency[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(8): 2209-2220
- [24] Li D, Yang C, Li X, et al. Functional characterization of rice OsDof12[J]. *Planta*, 2009, 229(6): 1159-1169
- [25] Chen X, Wang D, Liu C, et al. Maize transcription factor Zmdof1 involves in the regulation of *Zm401* gene[J]. *Plant Growth Regul*, 2012, 66(3): 271-284
- [26] Wei P C, Tan F, Gao X Q, et al. Overexpression of AtDOF4. 7, an *Arabidopsis* DOF family transcription factor, induces floral organ abscission deficiency in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(3): 1031-1045
- [27] Rueda-Romero P, Barrero-Sicilia C, Gómez-Cadenas A, et al. *Arabidopsis thaliana* DOF6 negatively affects germination in non-after-ripened seeds and interacts with TCP14[J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(5): 1937-1949
- [28] Moreno-isueno M À, Díaz I, Carrillo L, et al. The HvDOF19 transcription factor mediates the abscisic acid-dependent repression of hydrolase genes in germinating barley aleurone[J]. *Plant J*, 2007, 51(3): 352-365
- [29] Skirycz A, Jozefczuk S, Stobiecki M, et al. Transcription factor-AtDOF4; 2 affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. *New Phytol*, 2007, 175(3): 425-438
- [30] Kang H G, Singh K B. Characterization of salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects[J]. *Plant J*, 2000, 21(4): 329-339
- [31] Xu Z S, Tan H W, Wang F, et al. CarrotDB: a genomic and transcriptomic database for carrot[J]. *Database*, 2014, 96: 1-8
- [32] 黄蔚,王枫,谭国飞. 胡萝卜 AP2/ERF-B1 亚族两个转录因子基因的克隆及其非生物胁迫响应[J]. 植物生理学报, 2014, 50(8): 1184-1194
- [33] Zhao T J, Sun S, Liu Y, et al. Regulating the drought-responsive element(DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in *Brassica napus*[J]. *J Biol Chem*, 281(16): 10752-10759
- [34] Zhuang J, Jiang H H, Wang F, et al. Rice OsAP23, functioning as an AP2/ERF transcription factor, reduces salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31: 1336-1345
- [35] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. *Plant Biol*, 2006, 57: 781-803