

金荞麦 C2H2-ZFP 家族基因分析及 *FdC2H2-2* 在芦丁合成积累中的功能表征

龙 欧¹, 卢 翔^{1,2}, 石亚亮¹, 李光胜^{1,3}, 张凯旋¹, 王俊珍⁴, 周美亮¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ²贵州大学农学院, 贵阳 550025; ³湖南科技大学生命与健康学院, 湘潭 411100;

⁴凉山彝族自治州农业科学研究院, 四川西昌 615000)

摘要: C2H2 锌指蛋白转录因子在植物生长发育、胁迫响应和次生代谢合成调控等方面发挥重要作用。前期研究发现金荞麦根部类黄酮含量高于苦荞麦可能是由于 *FdCHI*, *FdF3H*, *FdDFR* 等与类黄酮生物合成相关的基因家族被扩增。然而, 参与类黄酮生物合成的 C2H2 锌指蛋白转录因子家族基因在金荞麦中如何调控芦丁合成尚未见报道。本研究对金荞麦 *FdC2H2-ZFP* 转录因子进行了全基因组鉴定和表达谱分析。共鉴定出 114 个 *FdC2H2-ZFPs*。在对 RNA-Seq 数据分析基础上, 筛选并克隆 C2H2 锌指蛋白基因 *FdC2H2-2*。该基因具有 3 个典型的 C2H2 锌指结构, 与拟南芥 *AtTREE1*、*AtDAZ3* 同源性较高。qRT-PCR 显示 *FdC2H2-2* 基因的表达显著受茉莉酸诱导。此外, 过表达 *FdC2H2-2* 毛状根中芦丁含量显著高于对照, 且其芦丁合成途径中关键酶基因黄酮醇合成酶(*FLS*)、苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)与类黄酮 3', 5'-羟化酶(*F3'5'H*)表达量显著提高。以上结果表明, 金荞麦 *FdC2H2-2* 基因可能通过激活芦丁生物合成关键酶基因 *FLS*、*PAL* 以及 *F3'5'H* 的表达, 从而正向调控芦丁的积累。本研究为今后解析金荞麦 C2H2 锌指蛋白基因的功能提供参考。

关键词: 金荞麦; C2H2 锌指蛋白; 全基因组鉴定; 系统进化; 基因克隆; 芦丁合成

Analysis of C2H2-ZFP Family Genes and Functional Characterization of *FdC2H2-2* in Rutin Synthesis and Accumulation in Golden Buckwheat

LONG Ou¹, LU Xiang^{1,2}, SHI Ya-liang¹, LI Guang-sheng^{1,3}, ZHANG Kai-xuan¹, WANG Jun-zhen⁴,
ZHOU Mei-liang¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ²College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025; ³College of Life and Health, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411100;

⁴Agricultural Science Research Institute of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Xichang 615000, Sichuan)

Abstract: C2H2 zinc finger protein transcription factor plays an important role in plant growth and development, stress response and regulation of secondary metabolism synthesis. The previous study found that the flavonoid content in the root of fagopybuckwheat was higher than that of Tartary buckwheat, which may be due to the amplification of gene families related to flavonoid biosynthesis, such as *FdCHI*, *FdF3H* and *FdDFR*. However, it has not been reported how the C2H2 zinc finger protein transcription factor family genes involved in flavonoid biosynthesis regulate rutin synthesis in golden buckwheat. In this study, the whole genome of *FdC2H2-*

收稿日期: 2022-12-05 修回日期: 2023-01-19 网络出版日期: 2023-02-02

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221205003>

第一作者研究方向为作物种质资源学, E-mail: 1135271470@qq.com

通信作者: 王俊珍, 研究方向为荞麦、燕麦种质资源、育种和栽培技术, E-mail: wangjunzhen108@163.com

周美亮, 研究方向为作物种质资源学, E-mail: zhouchoumeiliang@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD1001300, 2019YFD1001304); 国家自然科学基金国际(地区)合作与交流项目(32111540258); 湖南省科技厅湖湘高层次人才聚集工程项目(2020RC5031)

Foundation projects: National Key Research and Development Program (2019YFD1001300, 2019YFD1001304); International (Regional) Cooperation and Exchange Program of National Natural Science Foundation of China (32111540258); Hunan High-level Talent Gathering Project of Hunan Department of Science and Technology (2020RC5031)

ZFP transcription factor was identified and its expression profile was analyzed. A total of 114 FdC2H2-ZFPs were identified. Based on the analysis of RNA-Seq data, the C2H2 zinc finger protein gene *FdC2H2-2* was screened and cloned. This gene has three typical C2H2 zinc finger structures, and has high homology with Arabidopsis *AtTREE1* and *AtDAZ3*. qRT-PCR showed that the expression of *FdC2H2-2* gene was significantly induced by jasmonic acid. In addition, the content of rutin in the hairy roots of overexpressing *FdC2H2-2* was significantly higher than that of the control, and the transcriptional expression of flavonol synthetase (*FLS*), phenylalanine aminolyase (*PAL*) and flavonoid 3', 5'-hydroxylase (*F3'5'H*), the key enzyme genes in the rutin synthesis pathway were significantly increased. These results suggest that *FdC2H2-2* gene may positively regulate the accumulation of rutin by activating the expressions of the key enzymes in rutin biosynthesis, such as *FLS*, *PAL* and *F3'5'H*. This study provides reference for the future analysis of C2H2 zinc finger protein gene function of golden buckwheat.

Key words: golden buckwheat; C2H2 zinc finger protein; whole genome identification; system evolution; gene cloning; rutin synthesis

锌指蛋白是植物中最大的转录因子家族之一,根据其保守的 Cys 和 His 基序的数量和位置可分为 9 个亚家族,分别为 C2H2、C3H、C3HC4、C2HC5、C4HC3、C2HC、C4、C6 和 C8^[1-3]。其中,C2H2-ZFP 在锌指蛋白家族中含量最丰富且研究最广泛^[4]。根据 C2H2-ZFP 中锌指的数量和分布,可将其分为单蛋白、三蛋白、多个相邻蛋白以及分离成对的 C2H2-ZFP^[5]。C2H2-ZFP 已被证明具有识别 DNA、结合 RNA、蛋白相互作用和转录调节以及许多其他生物学功能^[3]。迄今为止,已在拟南芥^[6]、水稻^[7]、小麦^[8]和 大豆^[9]等多种植物中克隆获得 C2H2 型锌指蛋白基因,并且通过转基因研究与基因表达分析等,初步明确了该基因的功能。大量研究表明,C2H2 型锌指蛋白基因在植物生长发育、逆境胁迫响应及次生代谢合成调控等过程中发挥重要作用。例如,在玉米中,C2H2-ZFP 基因与玉米产量性状的形成密切相关,参与调控玉米的生长发育^[10]。在番茄中,*SICZFP1* 基因可诱导 COR (cold-regulated) 或冷响应相关基因的表达,进而增加转基因拟南芥和水稻的耐寒性^[11]。在对茶树 C2H2 型锌指蛋白基因家族的功能研究中发现,有几种 C2H2-ZFPs 与儿茶素含量呈显著相关性^[12]。

金荞麦 (*Fagopyrum dibotrys*) 是蓼科荞麦属多年生草本植物,含有大量的类黄酮,特别是黄酮醇(如芦丁),因其具有丰富的药理活性和营养价值倍受人们瞩目。目前,在许多植物中已鉴定出大量参与类黄酮生物合成途径的酶基因,如 *C4H*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*F3'H* 和 *F3'5'H* 以及 *PAL*、*FLS*、*DFR*、*LAR*、*ANS*、*ANR* 和 *UGT* 等^[13-14]。此外,这些酶基因的表达还受 R2R3-MYB、AP2/ERF、bHLH、bZIP 等多种

转录因子调控^[15-18]。对金荞麦和苦荞麦的比较基因组学研究发现,金荞麦中 *FdCHI*、*FdF3H*、*FdDFR* 等参与类黄酮生物合成的基因拷贝数增加,这些酶基因的表达可能是导致金荞麦根部黄酮类化合物积累高于苦荞麦的原因^[19]。然而,参与类黄酮生物合成的 C2H2 锌指蛋白转录因子在金荞麦中却未见报道。因此,鉴定金荞麦 C2H2 锌指蛋白基因并探究其在类黄酮生物合成中的功能和分子调控机制,对今后高黄酮醇金荞麦品种改良具有重要意义。

本研究对金荞麦和苦荞麦 C2H2-ZFP 转录因子家族进行了全基因组鉴定,并进行系统发育分析、染色体分布和全基因组复制等综合分析。此外,通过比较金荞麦 FdC2H2-ZFPs 在不同组织中的表达模式,克隆了 1 个只在金荞麦花中显著高表达的 C2H2 锌指蛋白基因 *FdC2H2-2* (Fd07G003220),对其进行生物信息学分析,利用 qRT-PCR 分析该基因在茉莉酸处理下的表达模式。为探索该基因在类黄酮代生物合成中的功能,通过农杆菌介导法诱导转基因毛状根,并采用 HPLC 法检测过表达 *FdC2H2-2* 基因毛状根的芦丁含量,同时检测芦丁合成途径中 *C4H*、*F3H*、*PAL*、*FLS* 和 *F3'5'H* 5 个关键酶基因的表达,以期今后探究金荞麦 C2H2-ZFP 基因功能和植物生理作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

螺髻山金荞麦种子、双元载体 pCAMBIA1302、大肠杆菌 DH5 α 感受态和发根农杆菌 A4 感受态菌种均由中国农业科学院作物科学研究所荞麦基因资源创新研究组保存。T 载体试剂盒购于北京艾德

莱生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 金荞麦 *FdC2H2-ZFP* 家族基因的鉴定和系统发育分析 根据 iTAK 软件对金荞麦和苦荞麦基因组转录因子的预测结果,提取 C2H2-ZFP 家族基因,通过 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 网站对所有蛋白序列进行保守结构域验证。利用 MEGA11 软件中的 Clustal W 工具对 114 个金荞麦、45 个拟南芥和 93 个苦荞麦的 C2H2-ZFPs 氨基酸序列进行多序列比对,并利用邻接法(NJ, neighbour-joining) 构建系统发育树,设置 1000 次重复(Bootstrap: 1000)。最后应用 iTOL 在线软件进行美化。

1.2.2 金荞麦 *FdC2H2-ZFP* 家族基因结构及基序组成分析 使用 SMART 和 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 网站对金荞麦 *FdC2H2-ZFP* 基因家族成员的保守结构域进行分析。通过 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 网站进行保守基序(Motif)分析,将识别的 Motif 数量设置为 10。利用 TBtools 可视化外显子/内含子结构,并绘制基因结构及保守基序组图。

1.2.3 金荞麦 *FdC2H2-ZFP* 家族基因染色体分布与基因复制分析 根据金荞麦 *FdC2H2-ZFP* 家族基因的位置信息,以及 *FdC2H2-ZFP* 基因的拷贝数和基因组分布,使用 TBtools 可视化基因染色体分布

和全基因组复制事件并计算非同义替换率 K_a 、同义替换率 K_s 及其比值。

1.2.4 金荞麦 *FdC2H2-ZFP* 家族基因的组织特异性表达 利用金荞麦不同组织(根、地下膨大茎、茎、老叶、幼叶、花)转录组数据^[19],使用 TBtool 软件绘制 *FdC2H2-ZFP* 家族基因的表达量热图。

1.2.5 金荞麦 *FdC2H2-2* 基因的克隆及序列分析 使用 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,南京)提取金荞麦 RNA 并进行反转录。以反转录得到的 cDNA 为模板,利用基因特异性引物进行 PCR 扩增(表 1)。将 PCR 纯化产物连接到 T 载体上,获得 *FdC2H2-2-T* 载体质粒。*FdC2H2-2* 基因的启动子、编码蛋白的理化性质、二级结构以及亚细胞定位预测分别采用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)、ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)、SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/>) 以及 Cell-PLoc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 在线软件完成;信号肽和跨膜结构域分析分别采用 SignalP5.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)和 TMHMM Serverv.2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)完成;同时,通过 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 在线网站进行同源氨基酸序列多重比对分析,并通过 MEGA11.0 采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统进化树。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物名称	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	用途
Primer name	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	Function
C2H2-2-T	ATGGATGAACCTCACAGCTCG	CTAACATGGCGTCACTGCCA	基因克隆
C2H2-2-1302	ACGGGGGACTCTTGACCATGGATGGATGAACCTCACAGCTCGG	AAGTTCTTCTCCTTTACTAGTCTAACATGGCGTCACTGCCA	过表达载体构建
Actin	GAGTTATGAGCTTCCTGATG	CCGCCACTCAACACAATGTT	qRT-PCR 内参
C2H2-2-Q	CTCATGTGGCTATCCGGTGG	CCGACCCGTTCTTGGGTATG	qRT-PCR
C4H-Q	GCGAAGAAGTACGGCGAGAT	CCGACGCATCTTTCTCCAGT	
PAL-Q	AGGGTGGTGCTCTCCAAATG	GGCGATGTAGGAGAGAGGGA	
F3H-Q	GACCAGGTGGACGGAAGAG	CACGATGAATCCGCCCTTCT	
FLS-Q	CACGGTGCTTCTTCAGGACT	CTGGATGCGGACAACACAAC	
F3'5H-Q	CGAAGCTACTTACGGCGGAT	CGTCACCACGTTCAATTGCTG	

1.2.6 *FdC2H2-2* 基因在茉莉酸甲酯处理下的表达模式分析 选取饱满的螺髻山金荞麦种子,浸泡 20 min 后,剥去种皮,用 1% 次氯酸钠溶液消毒 20 min;无菌水清洗多次,用滤纸吸干水分后种于普通 MS 培养基中。于温度 23 ℃、光周期 16 h/8 h、湿度 75%~80% 的条件下培养。取 3 株大小一致、生长健壮的 14 d 苗龄无菌苗置于液体 MS 培养基中,室

温震荡(120 r/min)黑暗预培养 24 h。用 50 μmol/L 茉莉酸甲酯(MeJA)分别处理 0、1、4、12 h 后取样,以二甲基亚砜(DMSO)处理组为对照,其他条件均保持一致。吸干样品水分,液氮速冻后存于-80 ℃冰箱,RNA 提取方法同 1.2.5。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 以金荞麦 *Actin* 作为内参基因,根据金荞麦 *FdC2H2-2* 序列设计荧光定量

引物(表1)。利用7500 Real Time PCR System和Vazyme® Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix荧光定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,南京)进行实时荧光定量PCR,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析计算相对表达量。

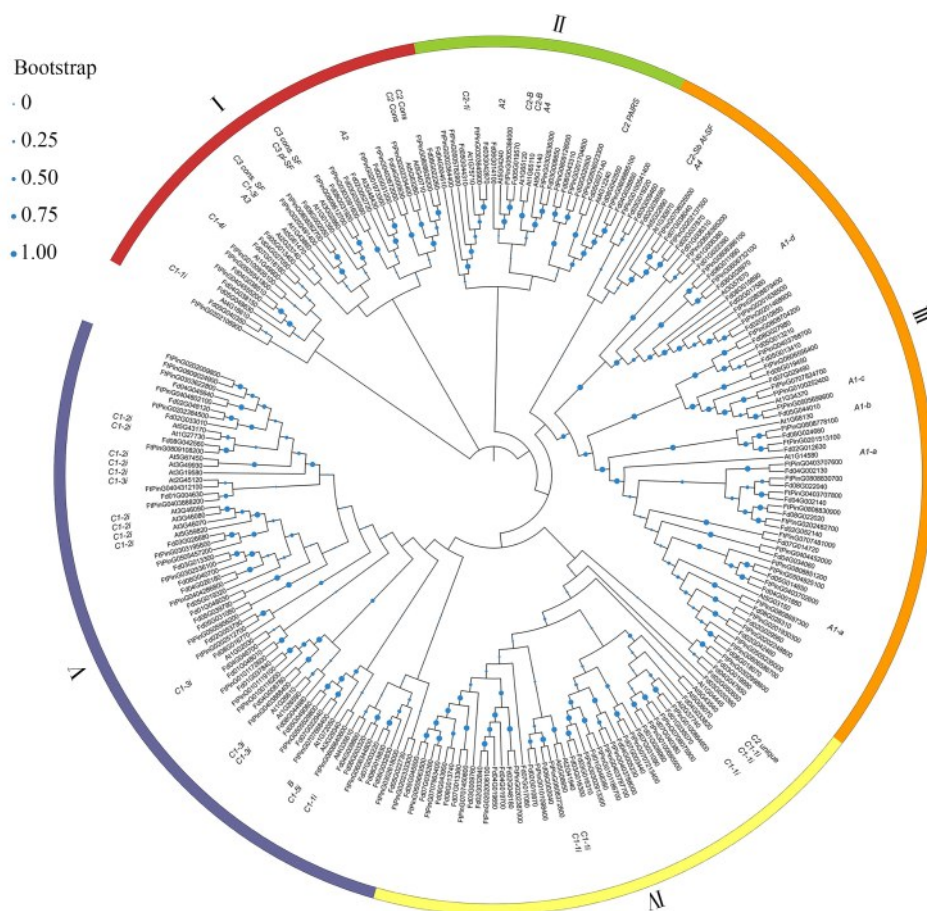
1.2.8 过表达 *FdC2H2-2* 毛状根的诱导及芦丁含量测定 根据 *FdC2H2-2* 基因序列和过表达载体 pCAMBIA1302 图谱设计引物 pCAMBIA1302-FdC2H2-2-F/R(表1)。以 FdC2H2-2-T 质粒为模板,进行PCR扩增。以 NcoI 和 SpeI 酶切扩增产物与 pCAMBIA1302 载体,连接转化后,进行菌液PCR检测与序列比对,得到过表达载体 pCAMBIA1302-FdC2H2-2。将含目的片段的过表达载体 pCAMBIA1302-FdC2H2-2 通过 A4 发根农杆菌介导法,诱导转基因毛状根,具体步骤同谈天斌等^[20]的方法。以 A4 发根农杆菌、空载体 pCAMBIA1302 毛状根为对照,取主根系进行PCR鉴定。利用高效液

相色谱法(HPLC)检测过表达 *FdC2H2-2* 毛状根的芦丁含量,具体测定方法参考范昱等^[21]的方法。每份样品设置3次重复。同时挑选 *C4H*、*PAL*、*F3H*、*FLS* 及 *F3'5'H* 5个芦丁生物合成途径中的关键酶基因进行qRT-PCR检测。qRT-PCR方法同1.2.7,引物序列见表1。

2 结果与分析

2.1 金荞麦、苦荞麦 C2H2-ZFPs 基因家族成员鉴定及系统发育分析

本研究分别从金荞麦和苦荞麦中鉴定出114个、93个C2H2-ZFPs。为进一步明确金荞麦、苦荞麦和拟南芥C2H2-ZFP转录因子间的进化关系,构建了系统进化树。根据拟南芥C2H2-ZFPs基因家族的分类,金荞麦、苦荞麦C2H2-ZFPs家族基因可聚为5个亚组,按照从I到V的顺序进行分类(图1)。FdC2H2-ZFPs在5个亚组上均有分布,其中亚组III



At: 拟南芥; Ft: 苦荞麦; Fd: 金荞麦; 下同; 外圈不同标签代表不同拟南芥 C2H2-ZFPs 基因亚家族名称

At: Arabidopsis; Ft: Tartary buckwheat; Fd: Golden buckwheat; The same as below; Different tags in the outer ring represent different

Arabidopsis C2H2-ZFPs gene subfamily names

图1 拟南芥、苦荞和金荞之间C2H2-ZFP的系统发育树

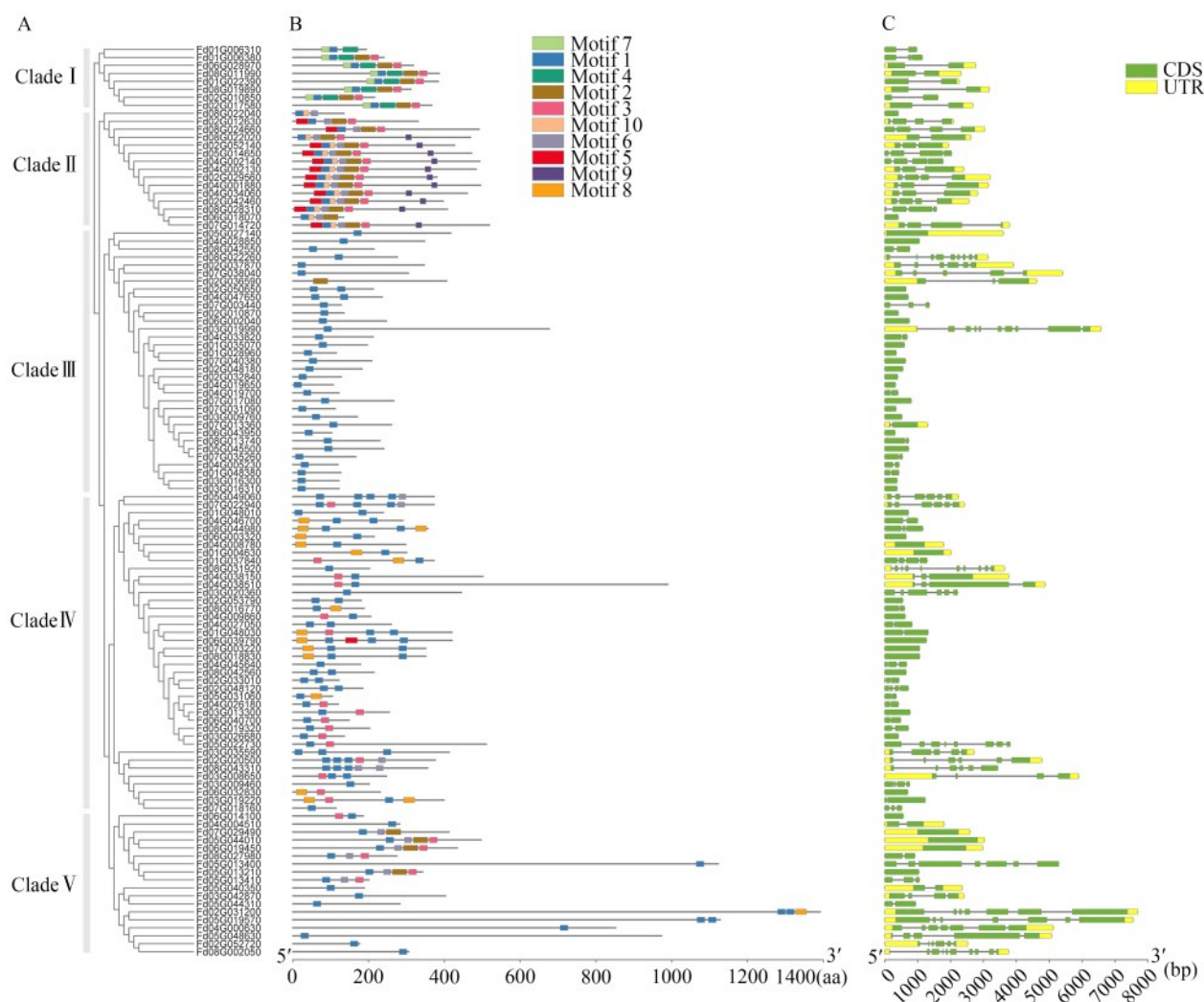
Fig.1 Phylogenetic tree of C2H2-ZFP among *Arabidopsis thaliana*, Tartary Buckwheat and Golden buckwheat

中的成员数目最多,其次为亚组 V,分别包含 34、28 个 FdC2H2-ZFPs。亚组 II 包含成员数量最少,为 11 个 FdC2H2-ZFPs。金荞麦与拟南芥 C2H2 型转录因子在系统进化上的同源关系表明,两者可能在某些生物学过程中发挥相同或相似的作用。

2.2 FdC2H2-ZFPs 的基因结构和基序组成分析

利用 MEGA11 软件构建金荞麦 FdC2H2-ZFPs 系统发育树,以明确金荞麦 FdC2H2-ZFPs 基因间的进化关系,结果如图 2A 所示。为进一步揭示金荞麦 FdC2H2-ZFPs 的多样性,利用 MEME 在线网站在 FdC2H2-ZFPs 中识别了 10 个保守基序,将其依次命

名为 Motif 1~Motif 10。由图 2B 可知,各分支由相似的保守基序构成。此外,Motif 1 几乎分布在所有 FdC2H2-ZFPs 中,该基序含有 Cys-X2-Cys-X12-His-X3-His 典型锌指结构域,且该保守 Motif 包含 QALGGH 植物特异性序列。为了解金荞麦 C2H2-ZFPs 的结构多样性,进一步分析了所有 FdC2H2-ZFPs 的外显子和内含子的结构数量。由图 2C 可知,38 个 (33.3%) FdC2H2-ZFPs 不含内含子,其他 FdC2H2-ZFPs 的内含子数在 1~9 之间。在同一进化树分支中,相邻的 FdC2H2-ZFPs 成员具有相似的内含子数量或外显子长度。



A: FdC2H2-ZFPs 的系统进化分析; B: FdC2H2-ZFPs 的保守基序组成; C: FdC2H2-ZFPs 的外显子/内含子结构

A: Phylogenetic analysis of FdC2H2-ZFPs; B: Conservative motif composition of FdC2H2-ZFPs; C: Exon/intron structure of FdC2H2-ZFPs

图 2 FdC2H2-ZFP 基因的结构和基序组成

Fig.2 Gene structures and motif compositions of FdC2H2-ZFP genes

2.3 FdC2H2-ZFPs 的染色体分布和基因复制事件

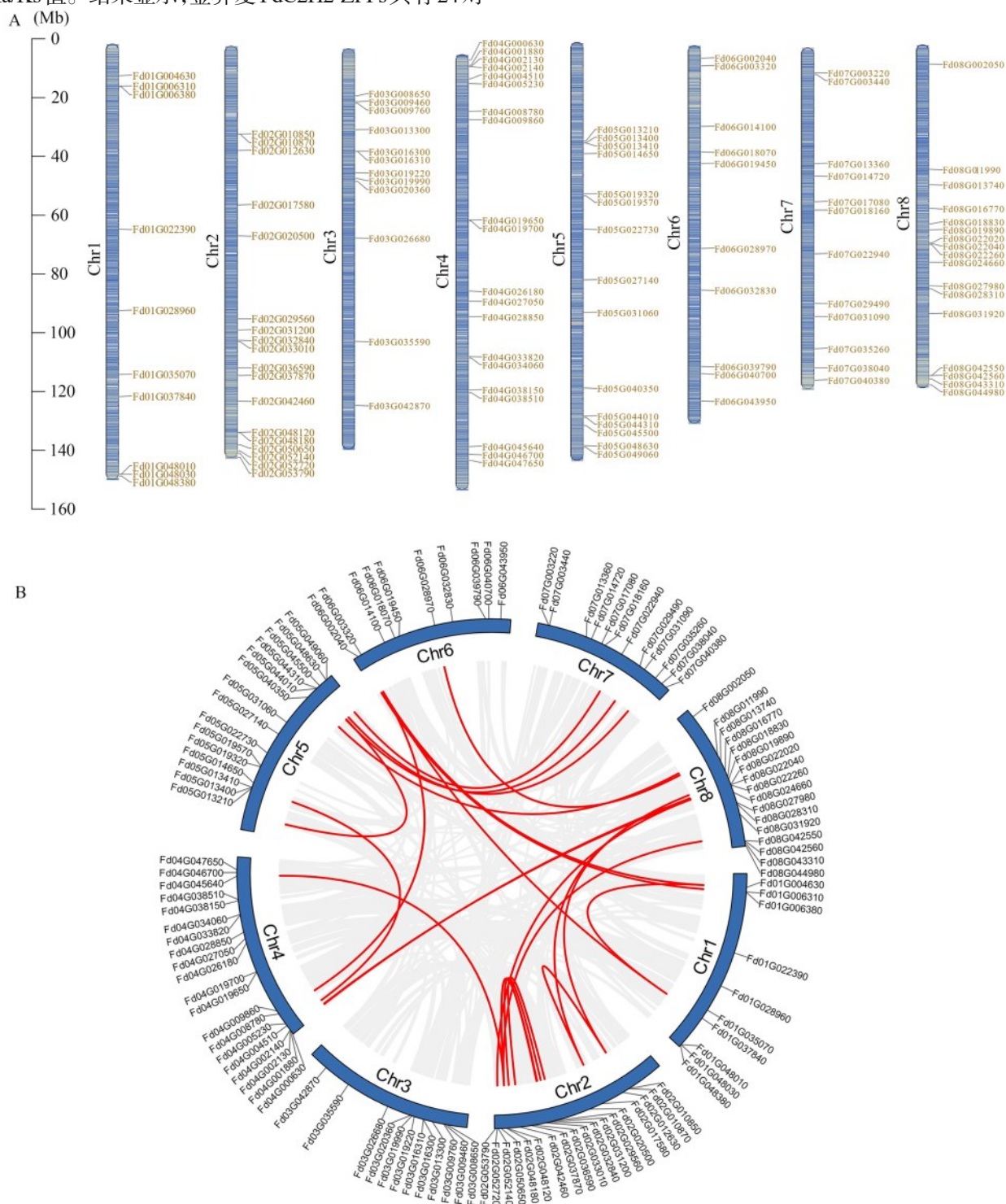
根据金荞麦基因组数据和染色体注释,发现 114 个 FdC2H2-ZFPs 随机分布在金荞麦 8 条染色体

上(图 3A),且在不同染色体上的定位模式不同。其中,4 号染色体上的 FdC2H2-ZFP 基因数量最多,有 20 个,其次为 2 号染色体,有 18 个。此外,1 号和 6 号

染色体上 FdC2H2-ZFP 基因数量相同,均为 10 个; 3 号和 7 号染色体上均含有 12 个 FdC2H2-ZFP 基因。

为了进一步评估基因复制事件的选择压力,本研究计算了非同义替换率(Ka)、同义替换率(Ks)和 Ka/Ks 值。结果显示,金荞麦 FdC2H2-ZFPs 共有 24 对

FdC2H2-ZFP 基因被证实为片段重复(图 3B)。片段重复的 FdC2H2-ZFPs 的 Ka/Ks 值在 0~0.6208 之间(表 2),表明这些共线性基因是在纯化选择下进化的。



A: FdC2H2-ZFPs 的染色体分布; B: 金荞麦 FdC2H2-ZFPs 共线性分析

A: Chromosome distribution of FdC2H2-ZFPs; B: Collinearity analysis of FdC2H2-ZFPs in golden buckwheat

图3 FdC2H2-ZFPs 的染色体分布和基因复制事件

Fig.3 Chromosome distribution and gene replication events in FdC2H2-ZFPs

表2 FdC2H2-ZFP 间共线关系的 Ka/Ks 比值
Table 2 Ka/Ks ratios of the syntenic relationships between FdC2H2-ZFP

编号 Number	基因 1 Gene 1	基因 2 Gene 2	非同义替换率 Ka	同义替换率 Ks	非同义替换率 / 同义替换率 Ka/Ks
1	Fd01G004630	Fd01G037840	0.275133779	0.983226634	0.279827427
2	Fd01G004630	Fd06G003320	0.322453092	0.831799009	0.387657461
3	Fd01G006380	Fd06G002360	0.159733064	0	/
4	Fd01G037840	Fd06G003320	0.451736074	1.585382226	0.284938273
5	Fd02G031200	Fd02G046130	0.190653453	1.392645964	0.136900158
6	Fd02G029560	Fd02G042460	0.154055514	1.727878937	0.089158743
7	Fd02G032840	Fd02G048180	0.498155349	0.802441347	0.620799702
8	Fd02G033010	Fd02G048120	0.268108068	0.952888503	0.281363525
9	Fd02G010850	Fd02G017580	0.088415159	1.278635257	0.069148069
10	Fd02G048120	Fd04G045640	0.342715559	1.559188794	0.219803759
11	Fd02G048120	Fd08G039460	0.307626972	2.227041224	0.13813259
12	Fd02G010850	Fd08G019890	0.086824343	0.802997949	0.108125236
13	Fd02G052140	Fd08G022020	0.182895163	1.653298657	0.110624395
14	Fd02G017580	Fd08G019890	0.168990641	0.776958719	0.217502729
15	Fd04G004510	Fd05G013400	0.551763098	2.007042713	0.274913481
16	Fd04G008780	Fd06G003320	0.507432713	1.347630862	0.376536875
17	Fd04G002130	Fd08G022020	0.265917924	1.739031335	0.15291152
18	Fd04G001880	Fd08G021270	0.302859215	0.860288308	0.352043859
19	Fd05G005020	Fd05G044310	0.242930067	1.433879038	0.169421591
20	Fd05G045500	Fd07G035260	0.157575369	0.703821884	0.223885293
21	Fd05G044010	Fd07G029490	0.234869659	1.429027963	0.164356237
22	Fd05G049060	Fd07G022940	0.193082342	0.959745578	0.201180757
23	Fd05G040350	Fd08G011390	0.663973651	0	/
24	Fd06G028970	Fd08G011990	0.191389144	1.144208133	0.167267771

/表示因同义替换率为零,不计算非同义替换率/同义替换率
/ indicates that the non-synonymous replacement rate/synonymous replacement rate is not calculated because the synonymous replacement rate is zero

2.4 FdC2H2-ZFPs 基因家族组织表达模式

在金荞麦不同组织转录组数据中共检测到 104 个 FdC2H2-ZFPs,利用 TBtools 可视化这些基因的表达模式。结果发现 104 个 FdC2H2-ZFPs 聚为 6 个分支。其中,A 亚组共包含 17 个基因,且在 6 个组织中的表达谱各不相同。B 亚组包括 14 个基因,在地下膨大茎和根中均有高表达。此外,C、D、E 和 F 亚群分别在茎、花、老叶和根组织中表达量较高。*FdC2H2-2*(Fd07G003220)只在金荞麦的花中特异性表达,推测该基因可能参与调控花的生长发育(图4)。

2.5 FdC2H2-2 基因的克隆与序列分析

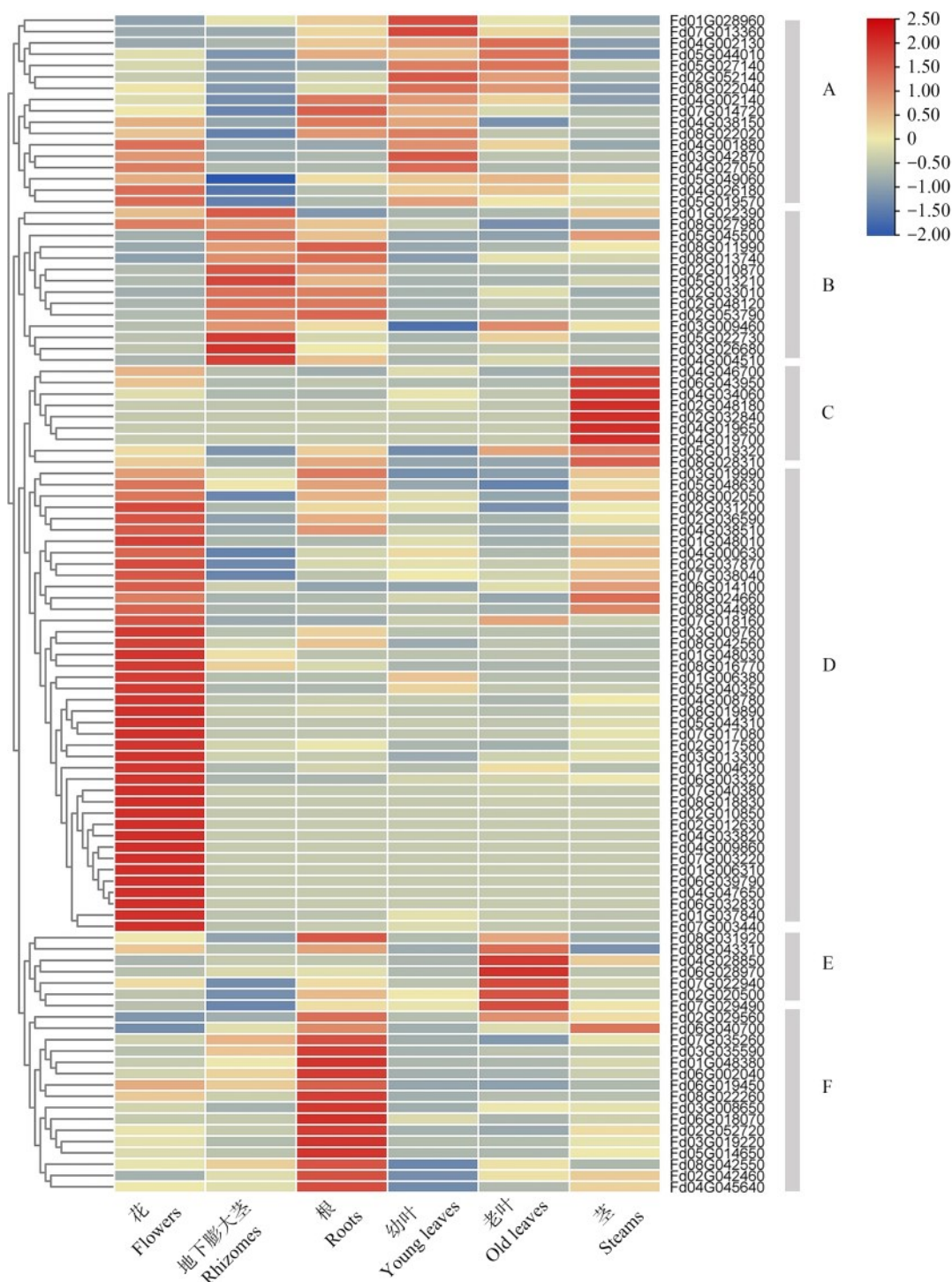
为探究 FdC2H2-ZFPs 在类黄酮生物合成途径中的功能,筛选并克隆了 *FdC2H2-2* 基因,该基因全

长 1056 bp,PCR 扩增结果见图 5A。该蛋白由 351 个氨基酸组成,分子式为 C₁₇₀₈H₂₆₅₅N₅₀₁O₅₃₀S₁₉,蛋白分子质量为 39.29705 kD,理论等电点为 8.63。其原子总数为 5413,脂肪指数为 53.56,不稳定性指数为 45.03,为不稳定蛋白。亚细胞定位预测为核蛋白。且无信号肽与跨膜结构。利用 NCBI 在线网站进行 Blastp 搜寻并下载同源蛋白序列,使用 MEGA 软件构建进化树。结果显示金荞麦 *FdC2H2-2* 与拟南芥 *AtTREE1*、*AtDAZ3* 亲缘关系较近(图 5B)。*FdC2H2-2* 蛋白 α 螺旋有 79 个氨基酸,占 22.51%;无规则卷曲 225 个氨基酸,占 64.10%;延伸链 34 个氨基酸,占 9.69%;β 转角 13 个氨基酸,占 3.70%(图 5C)。该蛋白含有 3 个 C2H2 锌指结构,分别位于 31~53 位、90~

112位和279~301位(图5D)。

启动子分析结果表明, *FdC2H2-2* 基因启动子序列中除了含有大量 TATA-box、CAAT-box 基本元件外, 还包含多种与非生物胁迫及激素响应相关的顺式作用元件。其中, 激素响应顺式作用元件包括

1个脱落酸响应元件、1个茉莉酸甲酯响应元件、1个水杨酸响应元件; 非生物胁迫响应顺式作用元件包括2个低温响应元件、2个厌氧诱导元件、1个干旱相关的 MYB 转录因子结合位点、2个光响应元件以及2个与光响应相关的 MYB 结合位点(图5E)。



红色和浅蓝色分别表示基因表达水平高和低
Red and light blue indicate high and low gene expression levels, respectively

图4 *FdC2H2-ZFP* 在不同组织中的表达谱

Fig.4 Expression profile of *FdC2H2-ZFP* in different tissues

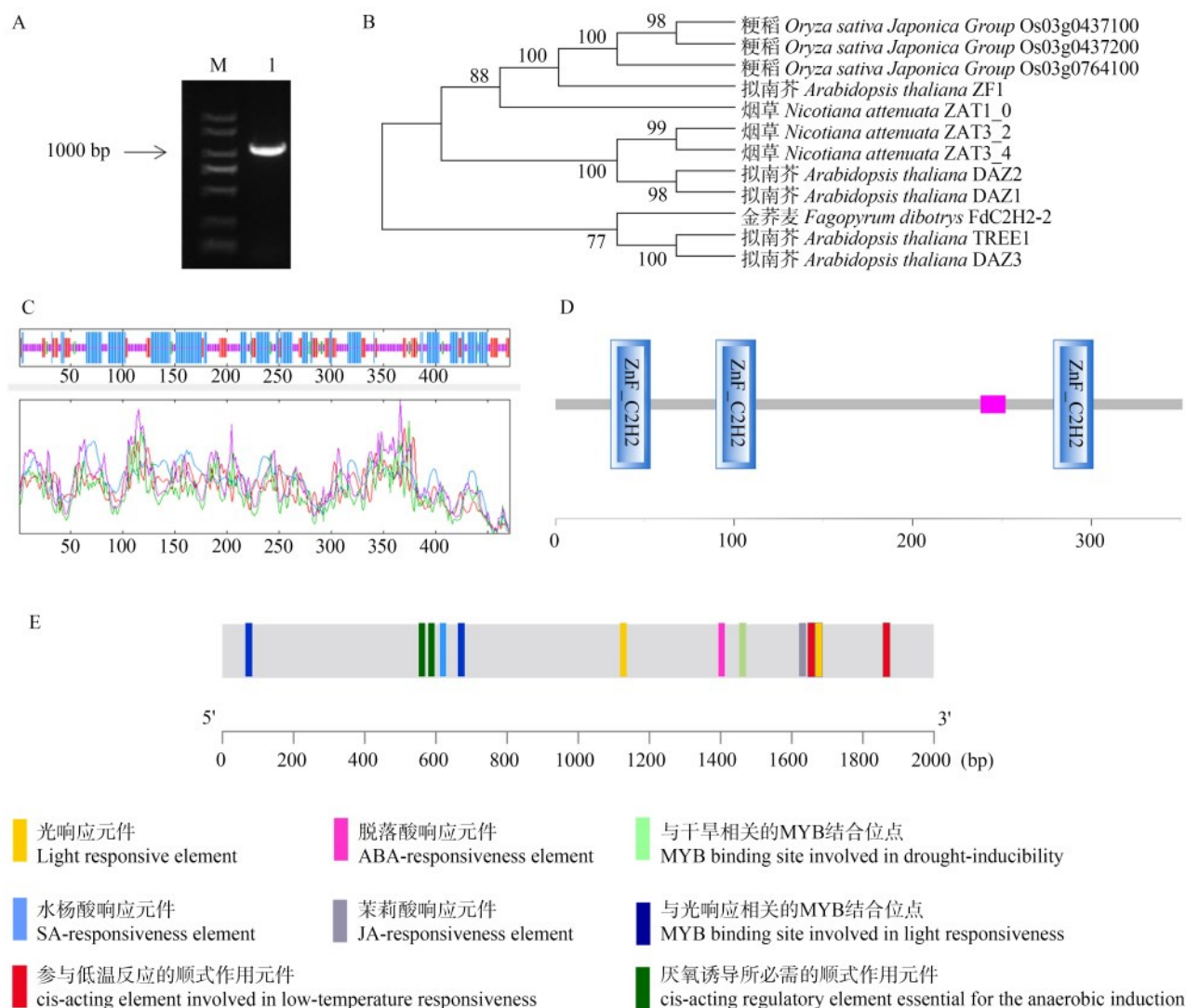
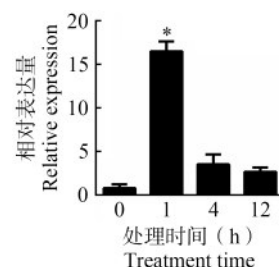


图 5 金荞麦 *FdC2H2-2* 基因的克隆与序列分析

Fig.5 Cloning and sequence analysis of *FdC2H2-2* gene in golden buckwheat

2.6 *FdC2H2-2* 基因在茉莉酸处理下的表达分析

对 *FdC2H2-2* 基因的启动子进行分析,发现该基因启动子上有响应茉莉酸的顺式作用元件(图 5E)。使用 50 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理 14 d 无菌苗,分析该基因在 MeJA 胁迫处理下表达模式。qRT-PCR 结果显示, *FdC2H2-2* 基因的表达量在受到茉莉酸甲酯诱导后呈现先上升后下降的趋势,在 1 h 显著达到最高,4 h 后有所下降(图 6)。以上表明,金荞麦在对茉莉酸信号的应答反应过程中会影响 *FdC2H2-2* 基因的表达。



*表示与对照相比达到显著水平($P < 0.05$);下同

* indicates the significant difference compared with the control ($P < 0.05$); The same as below

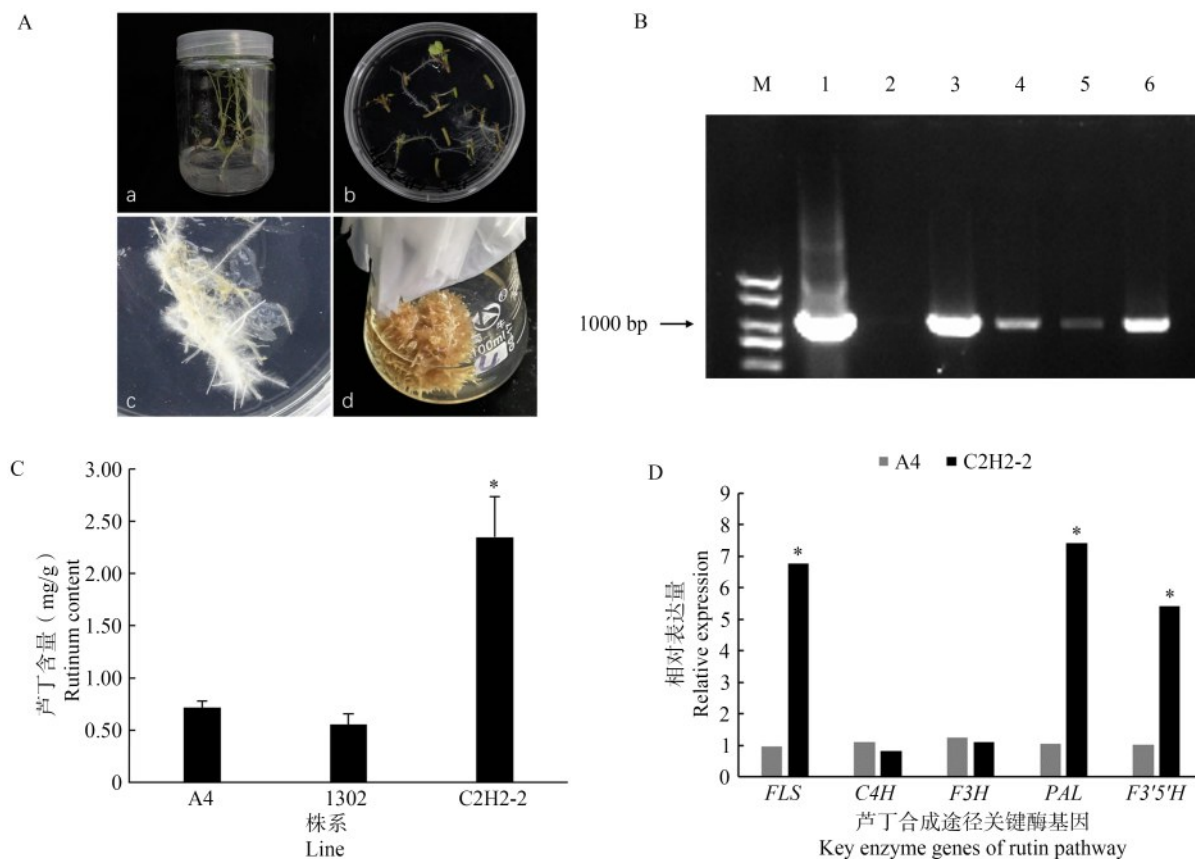
图 6 MeJA 诱导下 *FdC2H2-2* 基因的表达情况

Fig.6 Expression of *FdC2H2-2* gene induced by MeJA

2.7 过表达 *FdC2H2-2* 基因对毛状根芦丁积累的影响

通过农杆菌介导法进行了野生型(A4)、转 pCAMBIA1302 空载体(A4-1302)和转 pCAMBIA1302-

FdC2H2-2(A4-1302-*FdC2H2-2*)毛状根的诱导,以探索 *FdC2H2-2* 在类黄酮生物合成途径中的作用,其诱导过程如图 7A。利用 PCR 分子鉴定筛选转基因毛状根阳性根系,结果如图 7B 所示。



A: 金荞麦毛状根的诱导过程; a: 培养 14 d 的金荞麦无菌苗; b: 农杆菌侵染后 10 d 的毛状根; c: 继代培养 14 d 的毛状根; d: MS 液体培养基中培养 14 d 的毛状根; B: 转基因根系的鉴定; M: DL 2000 DNA 标记; 1: pCAMBIA1302-*FdC2H2-2* 质粒(阳性对照); 2: A4 金荞麦根系(阴性对照); 3~6: 转 pCAMBIA1302-*FdC2H2-2* 阳性毛状根根系; C: 芦丁含量的测定; D: 芦丁合成途径关键酶基因的表达

A: Induction process of hairy roots of golden buckwheat; a: Cultured for 14 days of buckwheat seedlings without fungus; b: Hairy roots 10 days after *Agrobacterium* infection; c: Hairy roots cultured for 14 days subculture; d: Hairy roots cultured for 14 days in MS liquid medium; B: Identification of transgenic roots; M: DL 2000 DNA marker; 1: pCAMBIA1302-*FdC2H2-2* plasmid (positive control); 2: A4 golden buckwheat root (negative control); 3~6: pCAMBIA1302-*FdC2H2-2* positive hairy roots; C: Determination of rutin content; D: Expression of key enzyme genes in rutin synthesis pathway

图 7 过表达 *FdC2H2-2* 基因促进芦丁的合成积累

Fig.7 Overexpression of *FdC2H2-2* gene promotes the synthesis and accumulation of rutin

分别选择 3 株生长状态一致的野生型 A4、1302 空载体和 *FdC2H2-2-1302* 过表达毛状根转基因株系进行芦丁含量的测定。结果显示,在过表达 *FdC2H2-2-1302* 毛状根株系中芦丁含量显著高于对照组 A4,其芦丁含量高达 2.35 mg/g(图 7C)。表明 *FdC2H2-2* 基因可能参与芦丁的生物合成。qRT-PCR 结果显示,在过表达毛状根中 *FLS*、*PAL* 与 *F3'5'H* 酶基因的表达量显著升高,而 *C4H*、*F3H* 酶基因的表达量无显著上调或是下调(图 7D)。以上表明 *FdC2H2-2* 基因可能是通过提高芦丁合成途径关键

酶基因 *FLS*、*PAL* 和 *F3'5'H* 的表达来促进金荞麦芦丁的合成积累。

3 讨论

大量研究表明,C2H2 型锌指蛋白转录因子参与调控植物次生代谢物的合成积累。在拟南芥中,*AtZAT6* 的表达正向调节花青素和总黄酮浓度^[22]。在苹果愈伤组织中过表达 *MdZAT5*,发现花青素生物合成相关基因的表达显著增加,该基因正向调节花青素积累^[23]。柿果 *DkZF6* 基因通过抑制原花青

素合成途径中的结构基因 *DkANR*、*DkF3'5'H* 和 *DKCHS* 的活性来降低柿果中原花青素的含量^[24]。目前,关于金荞麦 C2H2 锌指蛋白基因在类黄酮生物合成调控上的研究少有报道。本研究在金荞麦、苦荞麦基因组中分别鉴定出 114、93 个 C2H2-ZFP 基因成员,与苦荞麦相比,金荞麦中 C2H2-ZFP 基因数目明显较多,说明 C2H2 锌指蛋白转录因子家族在金荞麦中发生了扩张。系统进化树结果显示:*FdC2H2-ZFPs* 可分为 5 个亚组,并且处于同一分支的基因往往具有相似的功能。研究表明,拟南芥 C1 亚群与植物生长发育过程和应激反应有关,亚群 C2 的许多成员参与染色质重塑过程,而亚群 C3 的成员参与 RNA 代谢过程^[25]。染色体定位分析显示:*FdC2H2-ZFPs* 随机分布在金荞麦的 8 条染色体上,说明 C2H2 锌指蛋白基因具有广泛的作用。*FdC2H2-ZFPs* 不同组织表达谱表明, *FdC2H2-2* 在花中特异性表达,推测该基因可能调控花的生长发育。但其是否在花的生长发育过程中发挥作用还有待进一步研究。

本研究克隆了 1 个在花中特异高表达的 C2H2 型锌指蛋白基因 *FdC2H2-2*。该基因全长为 1056 bp,编码 351 个氨基酸,亚细胞定位预测为核蛋白。通过蛋白结构域分析发现 *FdC2H2-2* 含有 3 个典型的 C2H2 锌指结构。系统进化树显示 *FdC2H2-2* 与拟南芥 *AtTREE1*、*AtDAZ3* 亲缘关系较近,且这两个基因与 EIN3 相互作用,参与响应乙烯抑制芽生长的分子机制^[26]。研究证明许多植物激素参与调控 C2H2 型锌指蛋白基因的表达。例如,在烟草中, *PtZPT2-1* 的表达受 ABA 胁迫的强烈诱导,过表达 *PtZPT2* 能提高转基因烟草的耐寒、耐旱和耐盐性^[27]。茉莉酸甲酯 (MeJA) 能诱导苹果 C2H2 型锌指蛋白基因 *MdZAT10* 的表达,从而加速茉莉酸甲酯诱导的叶片衰老^[28]。拟南芥 *AtZAT6* 通过激活 SA 相关基因的表达,参与调控拟南芥逆境胁迫响应^[29]。在对辣椒 C2H2 锌指蛋白转录因子的研究中发现,茉莉酸甲酯处理能显著诱导辣椒 C2H2 锌指蛋白基因 (CaZFs),且可能在防御信号转导中发挥作用^[30]。对 *FdC2H2-2* 进行启动子分析发现该基因具有脱落酸 (ABRE)、茉莉酸 (CGTCA-motif)、水杨酸 (TCA-element) 等多种激素相关元件。由此推测 *FdC2H2-2* 基因的表达可能受植物激素的调节。有趣的是,在本研究中发现 *FdC2H2-2* 在 MeJA 处理 1 h 后其表达量被显著诱导表达,这与前人研究结果相似,表明 *FdC2H2-2* 是 1 个受植物激素 MeJA 诱导的 C2H2 型

锌指蛋白转录因子。

另有研究发现,黄酮类化合物的生物合成由多种植物激素介导,其中茉莉酸 (JA) 诱导多种转录因子,参与黄酮类化合物生物合成途径相关基因的表达^[31]。MeJA 参与芦丁的生物合成途径,它可以在蛋白或转录水平调控芦丁合成通路中的转录因子或关键酶^[15]。作为 JA 与黄酮类生物合成基因之间的桥梁,许多转录因子被发现被 JA 激活,包括 MYB、ERF、WRKY 和 bHLH 转录因子^[32]。在本研究中茉莉酸甲酯诱导 *FdC2H2-2* 转录因子的表达,猜测可能参与黄酮类化合物生物合成基因的调控。据报道参与芦丁生物合成途径中的关键酶基因主要包括苯丙氨酸解氨酶 (*PAL*)、肉桂酸-4-羟化酶 (*C4H*)、4-香豆酸-辅酶 a 连接酶 (*4CL*) 和查尔酮合成酶 (*CHS*)、查尔酮异构酶 (*CHI*)、黄酮-3-羟化酶 (*F3H*) 与类黄酮-3'-羟化酶 (*F3'H*)、类黄酮 3',5'-羟化酶 (*F3'5'H*)、黄酮醇合成酶 (*FLS*) 以及类黄酮 3-O-葡萄糖基转移酶 (*UFGT*)、类黄酮醇-3-O-葡萄糖苷-1-鼠李糖基转移酶 (*RT*) 等^[33-34]。为进一步研究 C2H2 锌指蛋白基因是否参与调控金荞麦类黄酮的合成积累,通过农杆菌介导法诱导过表达 *FdC2H2-2* 毛状根,并检测其芦丁含量及关键酶基因的表达。结果显示转基因毛状根的芦丁含量显著高于对照,并且芦丁合成途径关键酶基因 *FLS*、*PAL* 与 *F3'5'H* 表达量显著提高。综上表明 *FdC2H2-2* 基因受茉莉酸诱导并通过激活芦丁生物合成关键酶基因 *FLS*、*PAL* 与 *F3'5'H* 的表达来促进芦丁的合成积累。

4 结论

本研究对金荞麦 C2H2 锌指蛋白转录因子家族进行了全基因组鉴定和分析,共鉴定出 114 个 *FdC2H2-ZFPs*。并利用不同组织转录组数据筛选并克隆出 1 个在金荞麦花中显著高表达的 *FdC2H2-2* 基因。通过分析 *FdC2H2-2* 在 MeJA 诱导下的表达模式,结果发现其被显著诱导表达。此外,在金荞麦毛状根中过表达 *FdC2H2-2* 基因,发现其芦丁含量显著高于对照,且芦丁生物合成关键酶基因 *FLS*、*PAL* 和 *F3'5'H* 的表达显著提高。表明 *FdC2H2-2* 与金荞麦中芦丁的合成积累呈正相关,其通过激活芦丁生物合成关键酶基因 *FLS*、*PAL* 和 *F3'5'H* 的表达,从而正向调控芦丁的生物合成。

参考文献

- [1] Iuchi S. Three classes of C2H2 zinc finger proteins. Cellular

- and Molecular Life Sciences CMLS, 2001, 58:625-635
- [2] Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. The zinc finger network of plants. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2008, 65:1150-1160
 - [3] Han G, Lu C, Guo J, Qiao Z, Sui N, Qiu N, Wang B. C2H2 zinc finger proteins: Master regulators of abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11:115
 - [4] Laity J H, Lee B M, Wright P E. Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11:39-46
 - [5] Wang K, Ding Y, Cai C, Chen Z, Zhu C. The role of C2H2 zinc finger proteins in plant responses to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 2019, 165:690-700
 - [6] Liu Y T, Shi Q H, Cao H J, Ma Q B, Nian H, Zhang X X. Heterologous expression of a glycine soja C2H2 zinc finger gene improves aluminum tolerance in arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8):2754
 - [7] Li W, Zhu Z, Chern M, Yin J, Yang C, Ran L, Cheng M, He M, Wang K, Wang J, Zhou X, Zhu X, Chen Z, Wang J, Zhao W, Ma B, Qin P, Chen W, Wang Y, Liu J, Wang W, Wu X, Li P, Wang J, Zhu L, Li S, Chen X. A natural allele of a transcription factor in rice confers broad-spectrum blast resistance. *Cell*, 2017, 170(1):114-126
 - [8] Sun B, Zhao Y, Shi S, Yang M, Xiao K. TaZFP1, a C2H2 type-ZFP gene of *T. aestivum*, mediates salt stress tolerance of plants by modulating diverse stress-defensive physiological processes. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2019, 136:127-142
 - [9] Zhang D, Tong J, Xu Z, Wei P, Xu L, Wan Q, Huang Y, He X, Yang J, Shao H, Ma H. Soybean C2H2-type zinc finger protein GmZFP3 with conserved QALGGH motif negatively regulates drought responses in transgenic arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7:325
 - [10] Li J, Zhang L, Yuan Y, Wang Q, Elbaiomy R G, Zhou W, Wu H, Soaud S A, Abbas M, Chen B, Zhao D, El-Sappah A H. In silico functional prediction and expression analysis of C2H2 zinc-finger family transcription factor revealed regulatory role of ZmZFP126 in maize growth. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12:770427
 - [11] Zhang X, Guo X P, Lei C L, Cheng Z J, Lin Q B, Wang J L, Wu F Q, Wang J, Wan J M. Overexpression of SICZFP1, a novel TFIIIA-type zinc finger protein from tomato, confers enhanced cold tolerance in transgenic Arabidopsis and rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2011, 29:185-196
 - [12] Zhang S, Liu J, Zhong G, Wang B. Genome-wide identification and expression patterns of the C2H2-Zinc Finger gene family related to stress responses and catechins accumulation in *Camellia sinensis* [L.] O. Kuntze. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8):4197
 - [13] Liu W, Feng Y, Yu S, Fan Z, Li X, Li J, Yin H. The flavonoid biosynthesis network in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23):12824
 - [14] Yonekura-Sakakibara K, Higashi Y, Nakabayashi R. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:943
 - [15] Zhang K, Logacheva M D, Meng Y, Hu J, Wan D, Li L, Janovská D, Wang Z, Georgiev M I, Yu Z, Yang F, Yan M, Zhou M. Jasmonate-responsive MYB factors spatially repress rutin biosynthesis in *Fagopyrum tataricum*. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(8):1955-1966
 - [16] Zhao R, Song X, Yang N, Chen L, Xiang L, Liu X Q, Zhao K. Expression of the subgroup IIIb bHLH transcription factor CpbHLH1 from *Chimonanthus praecox* (L.) in transgenic model plants inhibits anthocyanin accumulation. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(7):891-907
 - [17] Zhao C, Liu X, Gong Q, Cao J, Shen W, Yin X, Grierson D, Zhang B, Xu C, Li X, Chen K, Sun C. Three AP2/ERF family members modulate flavonoid synthesis by regulating type IV chalcone isomerase in citrus. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(4):671-688
 - [18] Han H, Xu F, Li Y, Yu L, Fu M, Liao Y, Yang X, Zhang W, Ye J. Genome-wide characterization of bZIP gene family identifies potential members involved in flavonoids biosynthesis in *Ginkgo biloba* L. *Scientific Reports*, 2021, 11(1):23420
 - [19] He M, He Y, Zhang K, Lu X, Zhang X, Gao B, Fan Y, Zhao H, Jha R, Huda M N, Tang Y, Wang J, Yang W, Yan M, Cheng J, Ruan J, Dulloo E, Zhang Z, Georgiev M I, Chapman M A, Zhou M. Comparison of buckwheat genomes reveals the genetic basis of metabolomic divergence and ecotype differentiation. *New Phytologist*, 2022, 235(5):1927-1943
 - [20] 谈天斌, 卢晓玲, 张凯旋, 丁梦琦, 廖志勇, 周美亮. TrMYB308 基因的克隆及在苦荞毛状根中的功能分析. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(6):1542-1553
 - Tan T B, Lu X L, Zhang K X, Ding M Q, Liao Z Y, Zhou M L. Cloning and functional analysis of TrMYB308 gene in hairy roots of Tartary buckwheat. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(6):1542-1553
 - [21] 范昱, 王红力, 何凤, 赖弟利, 王佳俊, 宋月, 向达兵. 后熟对苦荞子粒营养品质的影响. *作物杂志*, 2018(1):96-101
 - Fan Y, Wang H L, He F, Lai D L, Wang J J, Song Y, Xiang D B. Effects of post-ripening on grain nutritional quality of Tartary buckwheat. *Crop Journal*, 2018(1):96-101
 - [22] Shi H, Liu G, Wei Y, Chan Z. The zinc-finger transcription factor ZAT6 is essential for hydrogen peroxide induction of anthocyanin synthesis in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 2018, 97(1-2):165-176
 - [23] Wang D R, Yang K, Wang X, Lin X L, Rui L, Liu H F, Liu D D, You C X. Overexpression of MdZAT5, an C2H2-Type zinc finger protein, regulates anthocyanin accumulation and salt stress response in apple calli and *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3):1897
 - [24] 罗曼. C2H2 型锌指蛋白 DkZF6 在柿原花青素生物合成中的功能解析. 武汉: 华中农业大学, 2021
 - Luo M. Functional analysis of C2H2 zinc finger protein DkZF6

- in persimmon proanthocyanidin biosynthesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021
- [25] Xie M, Sun J, Gong D, Kong Y. The roles of Arabidopsis C1-2i subclass of C2H2-type zinc-finger transcription factors. *Genes (Basel)*, 2019, 10(9):653
- [26] Wang L, Ko E E, Tran J, Qiao H. TREE1-EIN3-mediated transcriptional repression inhibits shoot growth in response to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(46):29178-29189
- [27] Liu D, Yang L, Luo M, Wu Q, Liu S, Liu Y. Molecular cloning and characterization of PtrZPT2-1, a ZPT2 family gene encoding a Cys2/His2-type zinc finger protein from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) that enhances plant tolerance to multiple abiotic stresses. *Plant Science*, 2017, 263:66-78
- [28] Yang K, An J P, Li C Y, Shen X N, Liu Y J, Wang D R, Ji X L, Hao Y J, You C X. The apple C2H2-type zinc finger transcription factor MdZAT10 positively regulates JA-induced leaf senescence by interacting with MdbT2. *Horticulture Research*, 2021, 8(1):159
- [29] Shi H, Wang X, Ye T, Chen F, Deng J, Yang P, Zhang Y, Chan Z. The Cys2/His2-type zinc finger transcription factor ZAT6 modulates biotic and abiotic stress responses by activating salicylic acid-related genes and CBFs in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2014, 165(3):1367-1379
- [30] Sharma R, Mahanty B, Mishra R, Joshi R K. Genome wide identification and expression analysis of pepper C2H2 zinc finger transcription factors in response to anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. *3 Biotech*, 2021, 11(3):118
- [31] Ding M, He Y, Zhang K, Li J, Shi Y, Zhao M, Meng Y, Georgiev M I, Zhou M. JA-induced FtBPM3 accumulation promotes FtERF-EAR3 degradation and rutin biosynthesis in Tartary buckwheat. *The Plant Journal*, 2022, 111(2):323-334
- [32] Zhou M, Memelink J. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(4):441-449
- [33] Gao J, Wang T, Liu M, Liu J, Zhang Z. Transcriptome analysis of filling stage seeds among three buckwheat species with emphasis on rutin accumulation. *PLoS ONE*, 2017, 12(12):e0189672
- [34] Yao Y, Sun L, Wu W, Wang S, Xiao X, Hu M, Li C, Zhao H, Chen H, Wu Q. Genome-wide investigation of major enzyme-encoding genes in the flavonoid metabolic pathway in Tartary Buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Journal of Molecular Evolution*, 2021, 89(4-5):269-286