

甘蓝型油菜低温诱导下的 bZIP 转录因子挖掘及聚类分析

杜春芳^{1,2}, 刘春晴², 咸拴狮¹, 范建春¹, 胡恺宁², 李萌¹, 涂金星², 傅廷栋²

(¹山西省农业科学院棉花研究所, 运城 044000; ²华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 植物响应低温胁迫的过程是一个复杂的网络过程, 涉及众多转录因子的调控。本文通过对低温胁迫下的甘蓝型油菜转录组数据进行生物信息学分析, 获得 108 个序列编码 bZIP 转录因子。经过序列比对、染色体定位和聚类分析, 发现这些转录因子定位在 19 条染色体上, 在抗寒过程中表现动态变化; 同时发现这些转录因子在 A 亚族、C 亚族、I 亚族、G 亚族、S 亚族中聚集最多, B 亚族和 D 亚族中很少聚集; 取 4 个在所有胁迫阶段皆表现差异的基因进行定量分析, 发现其调控变化与测序分析的变化趋势相同, 不仅证明了测序数据的可靠性, 而且证明甘蓝型油菜 bZIP 转录因子对低温胁迫的响应是一个动态的调控过程。

关键词: 甘蓝型油菜; 低温; bZIP 转录因子; 挖掘; 聚类分析

Mining and Cluster Analysis of Rapeseed bZIP Transcription Factors Induced by Low Temperature

DU Chun-fang^{1,2}, LIU Chun-qing², XIAN Shuan-shi¹, FAN Jian-chun¹,
HU Kai-ning², LI Meng¹, TU Jin-xing², FU Ting-dong²

(¹ Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000;

² College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Plant response to low temperature stress is a complex network process, involving numerous of transcription factors regulation. In this paper, we had found 108 full length cDNA sequences encoding bZIP factors in rapeseed from a transcriptome database bioinformatics analysis under low temperature stress. Through sequence compare, chromosome distribution and cluster analysis, these sequences could be differently distributed on the 19 chromosomes, performing dynamic change in cold resistance process. We also found these transcription factors in A subtribe, C subtribe, I subtribe, G subtribe, S subtribe gathered the most, the subtribe B and D subtribe rarely gathered. Quantitative analysis of the four genes differences performance in all stress stages, we found that the genes regulation had the same trend with the sequencing analysis, not only proved the reliability of the sequencing data, but also proved the dynamic regulation of rapeseed bZIP transcription factors in response to low temperature stress.

Key words: rapeseed; low temperature; bZIP transcription factors; mining; cluster analysis

低温不仅在很大程度上限制植物的种植范围, 同时还会造成减产和品质下降, 严重时甚至绝收, 全球每年因低温伤害造成的农作物损失高达数千亿元, 因此, 植物抗寒性研究及抗寒育种一直是植物学研究领域的热点之一^[1-2]。但植物的抗寒性属于多基因控制性状, 又由于植物对多种环境胁迫的交叉

适应机理而涉及到更多基因互作, 因此不仅需要从分子生物学水平方面进行深入研究, 更要从转录因子及其调控机理上进行研究^[2-3]。

植物体内存在大量的转录因子, 参与植物生长发育中的各种信号途径, 如激素信号、病原菌防御以及环境胁迫的忍耐等, 与植物逆境抗性相关的转录因子

收稿日期: 2015-03-27 修回日期: 2015-04-30 网络出版日期: 2015-12-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151209.0907.014.html>

基金项目: 国家高新技术研究发展项目(2011AA10A104); 山西省农科院育种项目(11YZGC099)

第一作者主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: chunfangdu@163.com

主要有 AP2/EREBP 类、bZIP 类、MYB 类、锌指蛋白 (WRKY) 类和 NAC 类 5 个基因家族^[4]。bZIP 转录因子是真核生物转录因子中分布最广泛、最保守的一类蛋白,在人、动物、植物、微生物和昆虫中均有发现^[5-6]。将植物 bZIP 蛋白碱性区域的氨基酸序列的排列与来自其他真核生物的 bZIP 蛋白相比,发现植物 bZIP 蛋白相互之间的关系更密切,说明它们是 bZIP 蛋白中一个进化上十分古老的亚类^[7]。在目前已经完成测序的植物中,bZIP 类转录因子在总数上占较大比重,且不同物种所含有的 bZIP 转录因子基因家族成员不同^[8],参与种子成熟、花的发育、光信号、病菌防御以及对各种逆境胁迫的响应等多种生物学过程^[9-11]。

油菜是我国唯一的越冬油料作物,抗寒性品种的研究和选育对维护我国食用油安全起着举足轻重的作用^[12]。在油菜抗寒的形态学水平、生理生化水平及分子生物学水平方面都取得了很多有价值的研究成果^[13-17]。但在转录组水平,动态性分析抗寒网络的调控机制研究很少。新一代高通量测序技术的应用,为进一步研究油菜的低温响应机制提供了便利。H. Indeok 等^[18]应用白菜型全基因组数据库资料,对白菜型油菜低温胁迫下的 bZIP 转录因子表达进行了研究。甘蓝型油菜为异源四倍体作物,其低温胁迫下的 bZIP 转录因子表达情况还未见报道。本研究通过低温胁迫下的甘蓝型油菜转录组数据分析,结合已公布的甘蓝型油菜全基因组数据,对低温诱导下的甘蓝型油菜 bZIP 转录因子进行发掘和聚类分析,有效探索油菜响应低温胁迫的调控网络和机制,为抗寒育种提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 植物材料

甘蓝型冬油菜材料 L9 耐寒性强,可在 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下安全越冬,为山西省农科院棉花所自选材料,种植在泥炭土、珍珠岩和蛭石以 1:1:1 混合的营养钵中,人工光照培养箱中培养生长,可控条件为:光照 $100 \pm 20\text{ }\mu\text{mol photos m}^{-2}\text{s}^{-1}$,昼夜时间为 16 h / 8 h,温度昼

夜比例为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}/20\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度 $60 \pm 20\%$ 。培养 45 d,待生长良好的油菜幼苗长出 6 片真叶时,挑选生长状态一致的油菜幼苗进行 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温处理。分处理后 2 h、6 h、12 h、24 h 4 个点取样,同期未处理的植株作为对照。每个处理分别取 4 株幼苗的不同部位叶片,迅速放入液氮内冷冻, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱内保存。

1.2 转录因子分析

4 个不同时间处理样品和 1 个未低温胁迫对照用干冰送 Beijing Genomics Institute (Shenzhen),提取 RNA 构建文库后用 Illumina HiSeq-2000 对样品进行测序。测序后,采用短 reads 组装软件 Trinity 做转录组从头组装,将具有一定长度重叠区域 (overlap) 的 reads 连成 Contig,得到两端不能再延长的 unigene 序列^[19]。依据 CDS 分析的蛋白序列,在 <http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/> 上分析寻找转录因子的主要结构域,获得低温胁迫下各时间段之间的 bZIP 转录因子。以拟南芥 bZIP 结构域为参照在甘蓝型油菜基因组数据库、白菜型油菜基因组数据库和甘蓝基因组数据库中进行 BLAST 分析,获得这些转录因子在甘蓝型油菜、白菜型油菜及甘蓝中的同源基因。根据每个转录因子在甘蓝型油菜染色体上的位置用 MapDraw 绘制染色体定位图^[20]。使用 MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>)^[21] 软件通过多重序列比对,利用 Maximum-likelihood 法 (BootStrap 检验 1000 次) 对转录因子进行聚类分析。

1.3 RT-PCR 验证

对每个阶段都出现差异的 bZIP 转录因子,用 primer 5.0 (<http://www.premierbiosoft.com/>) 设计引物,内参为 BnActin,上海生工合成引物,引物设计见表 1。Real-Time PCR 由 CFX96TM Real-Time PCR 检测系统 (Bio-Rad, CA, USA) 进行,采用 MaximaTM SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix 定量试剂盒,每个反应均设置 3 个重复,反应体系共 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。反应程序为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, 40 个循环。定量结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析。

表 1 定量 PCR 引物设计

Table 1 RT-PCR primer design

序列名称	上游引物序列	下游引物序列	用途
Unigene name	Forward sequences(5'-3')	Reverse sequences(5'-3')	Purpose
CL218. Contig15	TGGTCACCGTCGAGCTCAT	CACCAACCACACCAAGATCACT	RT-PCR 分析
CL2922. Contig9	CCACTCAATGATGGCCAACA	ACCTTCTCTCTGCAAACCACAA	RT-PCR 分析
CL4804. Contig3	TCTCTGTGGAAGAAACCTCCTGTA	AATGCCCACTCGGAGTCACT	RT-PCR 分析
CL7631. Contig1	CCCGACCCCGACTAGTGTTA	ACCTACACCCACCGGAAAG	RT-PCR 分析
ActionQ3	TCCATCCATCGTCCACAG	GCATCATCACAAGCATCCTT	内参引物

2 结果与分析

2.1 低温诱导的甘蓝型油菜 bZIP 转录因子发掘

通过高通量测序,过滤无效数据,低温胁迫后各时段的测序深度为 $25.5 \times 10^6 \sim 27.6 \times 10^6$ 个 clean reads,平均读序长度均为 90 bp 以上,总读序长度超过 10 Gb,约覆盖甘蓝型油菜基因组 5 倍。全部数据已提交 NCBI 数据库,登陆号为:DCF_CT0、DCF_CT2、DCF_6、DCF_CT12、DCF_CT24。依据 CDS 分

析的蛋白序列,预测低温胁迫诱导的 bZIP 转录因子,4 个胁迫处理过程共比对得到 108 个甘蓝型油菜 bZIP 转录因子,与 38 个拟南芥基因具有同源性;同时与白菜型油菜和甘蓝的基因组数据库进行比对,发现 CL15048. Contig1 在白菜型油菜中未发现同源基因,CL13823. Contig2、CL13823. Contig1 和 CL13823. Contig3 在甘蓝中未发现同源基因,为甘蓝型油菜低温胁迫下的特有 bZIP 转录因子(表 2)。

表 2 低温诱导下的甘蓝型油菜 bZIP 转录因子比对

Table 2 Blast date for *BnbZIP* genes in response to cold treatment

基因 ID Gene ID	同源基因 Homologue				拟南芥基因描述 Description of <i>Arabidopsis</i>
	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	白菜型油菜 <i>Brassica campestris</i>	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	
Unigene2576	AT1G06070.1	BnaA08g28440D	Bra030637	Bol023333	AtbZIP69 (DNA binding)
CL14907. Contig1, CL14907. Contig2	AT1G19490.1	BnaC05g15020D	Bra025743	Bol026864	AtbZIP62 (DNA binding)
CL6527. Contig2	AT1G42990.1	BnaA08g04620D	Bra034925	Bol033486	ATBZIP60 (Upon ER stress)
CL95. Contig7, Unigene7919, Unigene7920, CL95. Contig1, CL95. Contig5	AT1G45249.1	BnaC03g22210D	Bra040260	Bol045190	ABF2 (Enhances drought tolerance)
CL33. Contig13, CL33. Contig15, CL33. Contig16, CL33. Contig19, CL33. Contig17, Unigene21684, Unigene21685, Unigene21686	AT1G49720.1	BnaA06g03040D	Bra018800	Bol016788	ABF1 (May mediate transcriptional regulation of ABA responses)
Unigene19681	AT1G75390.1	BnaC06g22430D	Bra003755	Bol039895	AtbZIP44 (Conserved upstream opening reading frame relative to major ORF AT1G75390.1)
Unigene4889	AT2G04038.1	BnaC09g22200D	Bra017359	Bol032575	AtbZIP48 (DNA binding)
Unigene5437	AT2G16770.1	BnaC09g09130D	Bra037290	Bol012703	AtbZIP23 (Adaptation to zinc deficiency)
CL11833. Contig3, CL11833. Contig1, CL11833. Contig2	AT2G18160.1	BnaA07g01890D	Bra037235	Bol012472	AtbZIP2/GBF5 (Encodes a b-ZIP transcription factor)
CL218. Contig11, CL218. Contig19, CL218. Contig22, CL218. Contig9, CL218. Contig15, CL218. Contig16, CL218. Contig14, CL218. Contig6, CL218. Contig8	AT2G31370.5	BnaA05g11370D	Bra018250	Bol004544	POSF21 (Response to xenobiotic stimulus)
CL103. Contig2, CL103. Contig3, CL7631. Contig2	AT2G36270.1	BnaA05g08020D	Bra005287	Bol011719	ABI5 (Response to freezing)
CL15048. Contig1	AT2G40620.1	BnaC08g46880D	#N/A	Bol033465	AtbZIP18 (DNA binding)
Unigene16932	AT2G41070.3	BnaC04g56840D	Bra016953	Bol005146	EEL (Transcription factor homologous to ABI5)
CL13158. Contig1	AT2G42380.1	BnaC04g52770D	Bra004689	Bol004832	AtbZIP34 (Vascular development)
CL7897. Contig2	AT2G42380.2	BnaC03g23710D	Bra000256	Bol001886	AtbZIP34 (Vascular development)
CL6010. Contig5, CL6010. Contig7	AT2G46270.1	BnaC04g01070D	Bra004550	Bol017742	GBF3 (Response to abscisic acid)
CL6010. Contig2, CL6010. Contig3, CL6010. Contig4, CL6010. Contig6	AT2G46270.2	BnaA05g01520D	Bra004550	Bol000879	GBF3 (Response to abscisic acid)

表 2(续)

基因 ID Gene ID	同源基因 Homologue				拟南芥基因描述 Description of <i>Arabidopsis</i>
	拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	甘蓝型油菜 <i>Brassica napus</i>	白菜型油菜 <i>Brassica campestris</i>	甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	
CL8472. Contig1, CL8472. Contig2	AT3G17609. 2	BnaA03g34610D	Bra001671	Bol022925	HYH(Involved in phyB signaling pathway)
CL15439. Contig3, CL33. Contig12, CL33. Contig2, CL33. Contig3, CL33. Contig4, CL33. Contig5, CL33. Contig8	AT3G19290. 1	BnaA01g26200D	Bra037533	Bol018082	ABF4(Mediate ABA-dependent stress responses)
CL5639. Contig3, CL5639. Contig4	AT3G51960. 1	BnaA04g05810D	Bra033464	Bol009156	AtbZIP24(Induced by salt stress and promoted salt tolerance)
CL5639. Contig1, CL5639. Contig2	AT3G51960. 2	BnaCnng36700D	Bra033464	Bol009156	AtbZIP24(Induced by salt stress and promoted salt tolerance)
CL14837. Contig4	AT3G54620. 1	BnaA09g34460D	Bra007083	Bol008965	AtbZIP25/BZO2H4bZIP(transcription factor-like protein mRNA)
CL14311. Contig5, CL14300. Contig6, Unigene23797, CL14837. Contig1, CL14837. Contig7, Unigene3816	AT3G54620. 2	BnaA09g26320D	Bra032369	Bol029432	AtbZIP25/BZO2H4(transcription factor-like protein mRNA)
CL13823. Contig2, CL13823. Contig1, CL13823. Contig3	AT3G58120. 1	BnaA09g37270D	Bra003320	#N/A	AtbZIP61(Up-regulated in cold deacclimation)
CL1797. Contig9	AT3G62420. 1	BnaC08g32210D	Bra007679	Bol045695	AtbZIP53(cellular response to starvation)
CL2922. Contig1, CL2922. Contig3, CL2922. Contig4, CL2922. Contig5, CL2922. Contig7, CL2922. Contig8, CL2922. Contig9	AT4G34000. 2	BnaC07g44670D	Bra011485	Bol033853	ABF3/DPBF5(Response to stress and abscisic acid)
CL2922. Contig2	AT4G34000. 3		Bra011485	Bol033853	ABF3/DPBF5(Response to stress and abscisic acid)
CL6102. Contig1, CL6102. Contig2, CL6102. Contig5, CL6102. Contig3, CL6102. Contig4	AT4G34590. 1	BnaA01g02570D	Bra011545	Bol013680	GBF6(Translation is repressed by sucrose)
CL3921. Contig3, Unigene3369, CL3921. Contig2, CL3921. Contig4, CL3921. Contig6, CL3921. Contig7, CL3921. Contig8, Unigene2832	AT4G36730. 1	BnaA08g15400D	Bra011701	Bol028975	GBF1(DNA binding)
CL3921. Contig10	AT4G36730. 2	BnaA01g01100D	Bra011701	Bol028975	GBF1(DNA binding)
CL13653. Contig1, CL13653. Contig2	AT4G37730. 1	BnaC01g01320D	Bra011780	Bol028894	AtbZIP7(DNA binding)
CL14224. Contig1	AT5G15830. 1	BnaA02g02830D	Bra023540	Bol021255	AtbZIP3(Glucose-ABA interaction network)
CL8495. Contig1, CL8495. Contig2, Unigene28301	AT5G24800. 1	BnaA02g32330D	Bra020471	Bol016432	AtbZIP9(Encodes bZIP protein BZO2H2)
CL4804. Contig3, Unigene13700, Unigene13701, Unigene13703	AT5G28770. 1	BnaC07g27440D	Bra010010	Bol016628	BZO2H3(Response to abscisic acid stimulus)
CL4804. Contig4	AT5G28770. 2		Bra010010	Bol016628	BZO2H3(Response to abscisic acid stimulus)
CL4804. Contig1, Unigene13702	AT5G28770. 3	BnaC02g39310D	Bra010010	Bol016628	BZO2H3(Response to abscisic acid stimulus)
CL8100. Contig3	AT5G44080. 1	BnaCnng27030D	Bra033719	Bol012855	GBF4(Sequence-specific DNA binding)
CL5518. Contig1	AT5G49450. 1	BnaA09g03330D	Bra036142	Bol032354	AtbZIP1(Tolerance to salt, osmotic and drought stresses)

2.2 bZIP 家族转录因子在染色体上的分布

将全部 108 个表现 bZIP 家族转录因子的基因序列与已公布的甘蓝型油菜基因组数据进行比对,进一步分析低温诱导下 bZIP 家族在甘蓝型油菜染色体上的分布情况,发现相似度在 90% 的情况下,在 A 基因组上有 189 个位点对上,在 C 基因组上有 202 个位点对上(图 1)。A 组染色体中,染色体 A01 和染色体 A05、A06 响应低温胁迫的 bZIP 转录因子位点最多,分别为 32 个、28 个、28 个;响应最少的为染色体 A07(7 个)和 A02(10 个)。C 组染色体中响应低温胁迫最多的 bZIP 转录因子位点分布在染色体 C07 和 C01,分别为 39 个和 31 个,最少的为染色体 C09(10 个)和 C02(12 个)。进一步分析发现,在低温胁迫过程中,不同胁迫时间后各染色体上的 bZIP 转录因子活性也表现差异,呈现一种动态变化。低温胁迫 2 h 后,染色体 C09 和染色体 A04 上转录因子响应的最多,分别占各自染色体所有转录因子的 40% 和 30.8%;低温胁迫 6 h 后,染色体 C07 和 A06 上响应的 bZIP 转录因子最多,分别占各自染色体上所有响应胁迫的 bZIP 转录因子的 69.2% 和 64.3%;低温胁迫 12 h 后,分别为染色体 C03(82.8%) 和 C04(81.5%);低温胁迫 24 h 后,则为染色体 A04(100%) 和 C06(96.5%)。值得注意的是,染色体 A01、A07、A08 和 C06 在低温胁迫 2 h 后,没有一个 bZIP 转录因子响应胁迫,只在低温胁迫 6 h、12 h 和 24 h 时产生响应。

2.3 bZIP 家族转录因子聚类分析

甘蓝型油菜与拟南芥之间亲缘关系较近,参照 M. Jakboj 等^[6]和 G. G. C. Luiz 等^[22]的分类标准,用拟南芥 bZIP 家族的所有转录因子序列(http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/fam_mem.php?family_id=bZIP&sp_id=ATH)对 108 个低温诱导的甘蓝型油菜 bZIP 转录因子进行聚类分析(图 2),发现在 A 亚族、S 亚族、C 亚族、I 亚族和 G 亚族中聚集最多,分别为 40、21、15、13 和 10 个;在 E 亚族、F 亚族、H 亚族中次之,分别为 4、3 和 2 个;B 亚族和 D 亚族中没有聚集。

2.4 低温胁迫下的甘蓝型油菜 bZIP 转录因子调控特性

数据分析发现,低温胁迫时间不同参与的 bZIP 转录因子数量不同,在低温胁迫 2 h 时有 13 个 bZIP 转录因子参与调控,而在低温胁迫 6 h、12 h 和 24 h 时分别有 53、78 和 88 个 bZIP 转录因子参与调控,随着处理时间的增加,转录因子数目也不

断增加(图 3a)。显著增加的时间段在 2~6 h 之间,且各阶段上调转录因子都明显大于下调转录因子。

Venny 分析发现,各时间段之间存在一定的共差异表达 bZIP 转录因子(图 3b),在 Ct0~Ct2 与 Ct0~Ct6 之间,共差异表达的有 10 个,而在 Ct0~Ct6 与 Ct0~Ct12 之间为 47 个,Ct0~Ct12 与 Ct0~Ct24 之间为 64 个,但在各阶段之间都存在共差异的 bZIP 转录因子只有 8 个。Cl218. Contig15 与 Cl218. Contig16、Cl2922. Contig3 与 Cl2922. Contig9、Cl5639. Contig1 与 Cl5639. Contig4 比对到相同的拟南芥基因和甘蓝型油菜基因,是同一基因座编码的不同剪切方式造成的不同转录本,取其中的一个进行引物设计和定量 PCR,结果如图 4 所示,除 Cl218. Contig15 在 Ct0~Ct2 阶段差异程度与转录组调控不同外,其他验证基因在不同胁迫时间的调控趋势均相同,不仅证明了转录组数据的可靠性,而且证明甘蓝型油菜 bZIP 转录因子在响应低温胁迫的过程中呈现动态变化,是一个随着胁迫程度不同而进行不同调控的动态过程。

3 讨论

植物 bZIP 转录因子在植物的生命过程中具有非常重要的作用,在冷害、盐害、干旱等非生物环境胁迫下诱导表达且数量众多^[9-11]。在大豆的 131 个 bZIP 家族成员中,多于三分之一的成员至少参与 ABA、盐、干旱和冷害胁迫响应中的一种防御反应^[23]。白菜型油菜中鉴定出 136 个 bZIP 转录因子,在低温胁迫下显著变化的有 53 个^[18]。本试验通过转录组数据分析,鉴定出 108 个响应低温诱导的甘蓝型油菜 bZIP 转录因子,与 38 个拟南芥基因具有同源性,表现耐寒(AT2G36270.1、AT3G58120.1)、耐旱(AT1G45249.1)、耐盐(AT5G49450.1)等特性,更多的是参与 ABA 响应(AT1G49720.1、AT2G46270.1、AT3G19290.1 等)。植物的抗寒有依赖 ABA 和不依赖 ABA 两种途径,本研究证明在甘蓝型油菜抗寒过程中,存在依赖 ABA 的抗寒途径。将这些 bZIP 转录因子与 Indeok 分析所得的 6 个白菜型油菜应激响应低温胁迫的 bZIP 转录因子进行比较^[18],发现有 4 个 bZIP 转录因子相同,说明甘蓝型油菜和白菜型油菜在低温胁迫调控方面具有较高相似性。

进一步分析发现,这些 bZIP 转录因子不同密度地定位在甘蓝型油菜的 19 条染色体上,其中 A 基因组上有 189 个位点,C 基因组上有 202 个位点,远

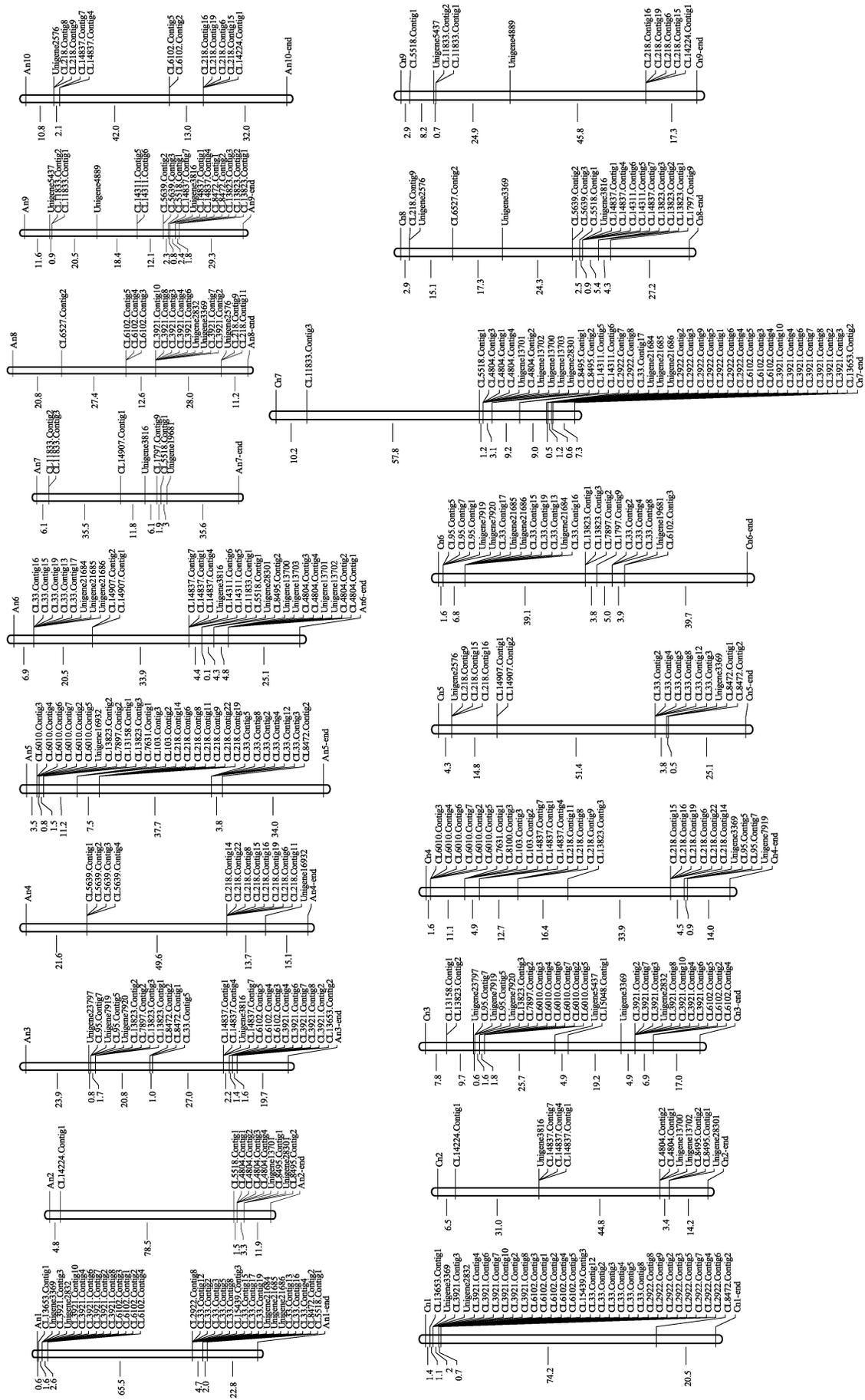


图 1 甘蓝型油菜低温胁迫下的 bZIP 家族转录因子在染色体上的分布
 Fig. 1 Distribution on the chromosomes of rapeseed bZIP transcription factors under cold stress

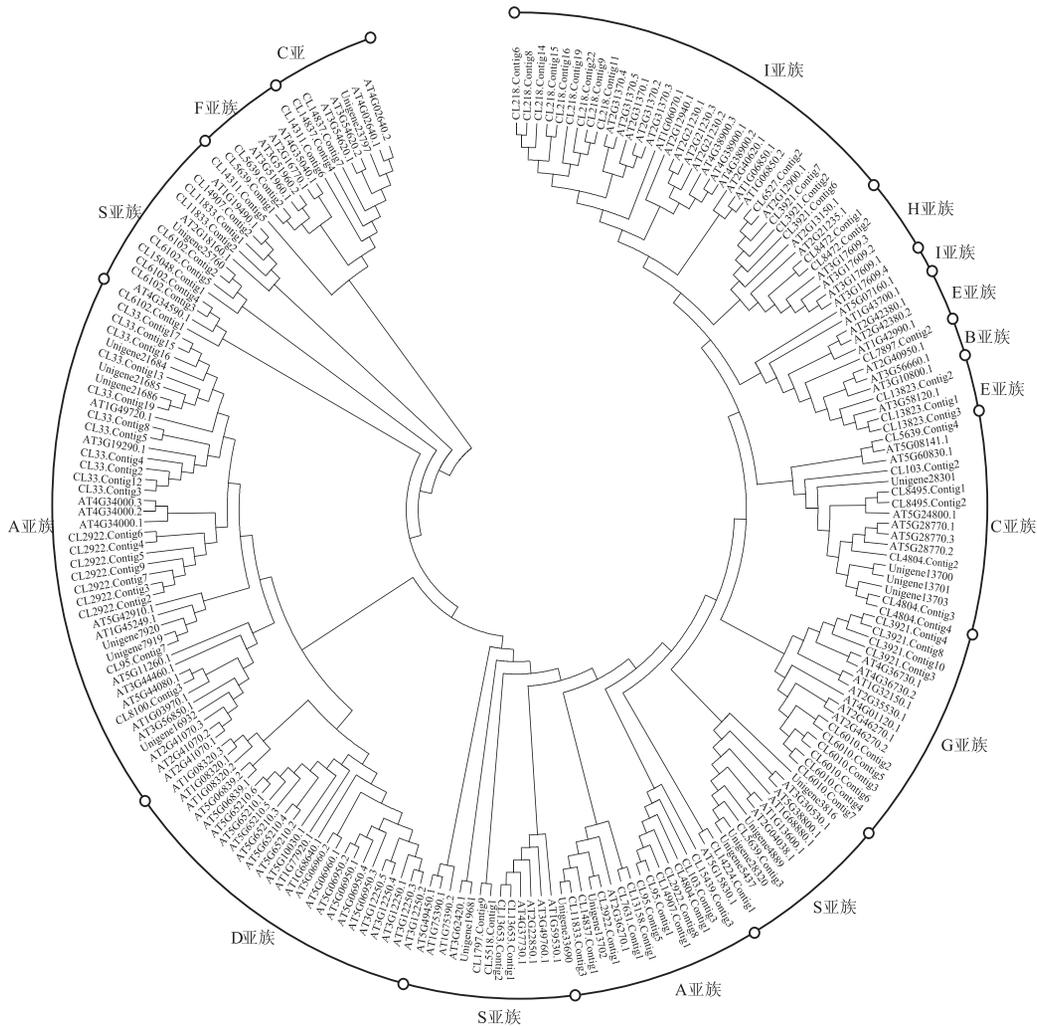


图2 油菜低温胁迫下的 bZIP 转录因子聚类分析

Fig.2 Cluster analysis of the rapeseed bZIP transcription factors under cold stress

高于所预测的 108 个 bZIP 转录因子数目,主要原因是一些家族序列在染色体上表现直系同源,几乎所有基因均表现旁系同源,既在 A 染色体上获得定位,又在 C 染色体上获得定位。如 CL218. contig15 (AT2G31370, PosF21) 既在 A4、A10 获得定位,又在 C4、C5、C9 获得定位,这一现象的出现和甘蓝型油菜的进化过程有关,是多倍化结果的体现。在白菜型 bZIP 转录因子的研究中也出现类似情况^[18,24]。这个规律的揭示对多倍体遗传和进化研究具有重要的理论价值,对育种具有重要的指导意义。

M. Jakoby 等^[6]根据 bZIP 转录因子基因碱性结构域以及其他保守的结构域,将拟南芥的 bZIP 类转录因子基因家族成员分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 S 类 10 个亚家族。A 亚族主要参与 ABA 和逆境胁迫的调控表达;C 亚族在种子发育和逆境胁迫中起作用;D 亚族在抗氧化和病菌防御方面起重要作用;

E 亚族与 I 亚族在亮氨酸拉链结构上相似性很高,但目前功能研究较少;G 亚族在光信号转导和种子成熟过程中起作用;H 亚族在光合作用过程起关键作用;I 亚族参与 GA 代谢;S 亚族参与逆境胁迫和糖类信号代谢,而 B 亚族和 F 亚族报道很少。本研究发掘的 bZIP 转录因子通过聚类分析,在 A 亚族、C 亚族、S 亚族中聚集最多,而在 B 亚族和 D 亚族中没有聚集,与本试验的处理方式有关,也与 bZIP 转录因子对逆境的调控特性相符合,有利于进一步探索甘蓝型油菜低温胁迫下的调控机制。而在 G 亚族和 I 亚族聚集的 bZIP 转录因子,前人报道的并不多,还需要进行深入研究。

在 8 个各胁迫阶段持续差异表达的 bZIP 转录因子中,CL2922. Contig3 和 CL2922. Contig9 为同一基因座编码的转录本,比对到拟南芥 bZIP 转录因子 ABF3。CL7631. Contig1 比对到拟南芥 bZIP 转录因

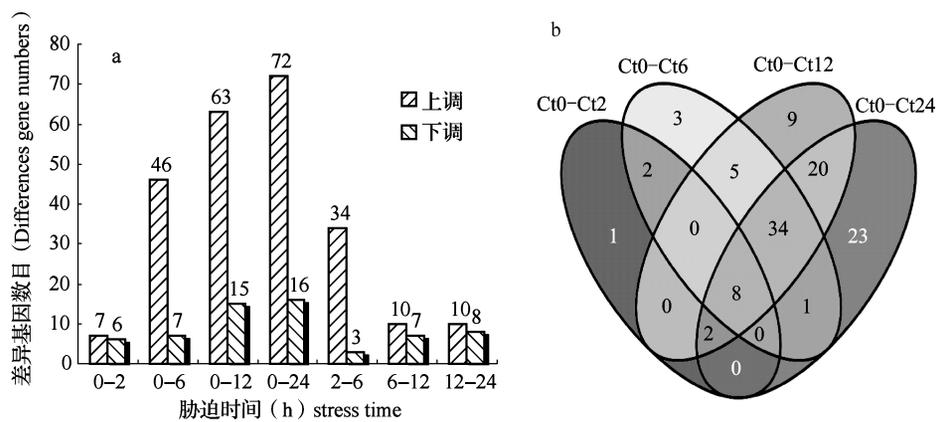


图3 各阶段差异 bZIP 转录因子

Fig. 3 The bZIP transcription factors of different phases

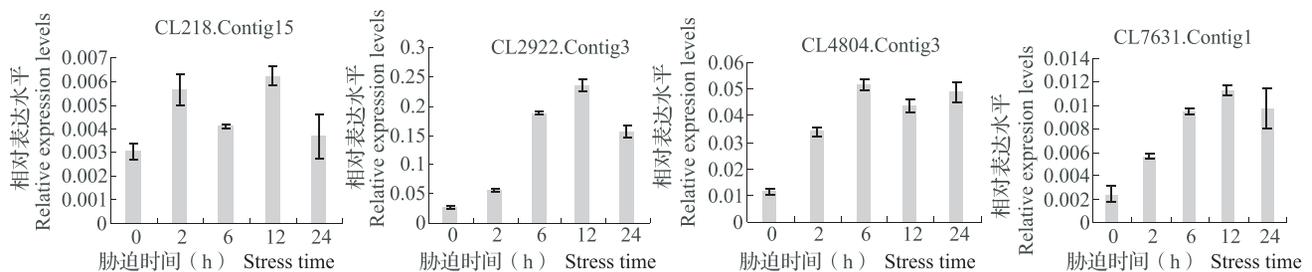


图4 bZIP 转录因子 RT-PCR 验证

Fig. 4 Validation of bZIP transcription factors by RT-PCR

子 ABI5。ABF3 与 ABI5 都属于 A 亚族,在胁迫信号调控网络中的作用已进行了一定的研究。H. Choi 等^[25]首次克隆到拟南芥的 ABF/AREB bZIP 类转录因子,其成员 ABF3 主要参与 ABA、高盐、低温、热、氧化胁迫应答反应^[26-28]。ABI5 对 ABA 信号和胁迫反应起着关键的调控作用,在拟南芥幼苗中,ABA 诱导 ABI5 稳定表达的同时对其磷酸化状态进行修饰^[29-31]。M. Zou 等^[32]研究水稻 bZIP 基因 *OsABI5* 发现,低温 4℃ 及干旱、高盐和 ABA 胁迫都可诱导其表达。本研究发现,CL2922. Contig9 和 CL7631. Contig1 在低温胁迫过程中均上调表达,2 h、6 h 和 12 h 时表达量持续上升,而在低温处理 24 h 时表达量有所下调,表明植物在应对外界环境胁迫时,逐步调整它们的转录组,以实现瞬时或持续的、早期或晚期基因的表达,是一个动态的过程。

bZIP 转录因子家族的许多成员具有多种抗逆功能,可以调控抗逆相关基因的表达,提高植物的抗逆性^[33-34]。本研究通过转录组数据分析,首次发掘低温诱导表达的甘蓝型油菜 bZIP 转录因子,并对其类型和分布进行研究,有效探索了甘蓝型油菜响应低温胁迫的 bZIP 转录因子调控网络及机制,为油菜抗寒

育种研究和选育提供了理论支持,也为进一步研究多倍体植物的抗逆转录调控研究提供了参考和借鉴。

参考文献

- [1] Torsell B, Johansson N O. Investigations on oil turnips and oil rape, IX, chemical composition in different organs of the wintering stage of the plants [J]. Acta Agric Scand, 1962, 12: 189-198
- [2] Anna K B, Daniel L, Andreas D Z, et al. Insights from the cold transcriptome of *Physcomitrella patens*: global specialization pattern of conserved transcriptional regulators and identification of orphan genes involved in cold acclimation [J]. New Phytol, 2015, 205: 869-881
- [3] Pankaj B, Naresh D J, Simon R, et al. Genome-scale cold stress response regulatory networks in ten *Arabidopsis thaliana* ecotypes [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 722
- [4] Taishi U, Miki F, Yasunari F, et al. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future [J]. Curr Opin Biotechnol, 2006, 17: 113-122
- [5] 朱芸晔, 薛冰, 王安全, 等. 番茄 bZIP 转录因子家族的生物信息学分析 [J]. 应用与环境生物学报, 2014, 20(5): 767-774
- [6] Jakboy M, Weisshaar B, Drgce-laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends Plant Sci, 2002, 7(3): 106-111
- [7] Johnson P F. Identification of C/EBP basic region residues involved in DNA sequence recognition and half-site spacing preference [J]. Mol Cell Biol, 1993, 13: 6919-6930
- [8] 张计育, 渠慎春, 郭忠仁, 等. 植物 bZIP 转录因子的生物学功能 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(5): 1066-1075
- [9] Yaez M, Caceres S, Orellana S, et al. An abiotic stress-responsive bZIP transcription factor from wild and cultivated tomatoes regulates stress-related genes [J]. Plant Cell Rep, 2009, 28:

