

DOI: 10.11686/cyxb2024257

http://cyxb.magtech.com.cn

左志芳, 李永龙, 魏雨佳, 等. 结缕草 *DREB* 基因家族的鉴定及非生物胁迫下的表达模式分析. 草业学报, 2025, 34(5): 74—88.

ZUO Zhi-fang, LI Yong-long, WEI Yu-jia, et al. Identification of *DREB* genes from *Zoysia japonica* and their transcript profiles in response to abiotic stress. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(5): 74—88.

结缕草 *DREB* 基因家族的鉴定及非生物胁迫下的表达模式分析

左志芳, 李永龙, 魏雨佳, 周生辉, 李岩, 杨国锋*

(青岛农业大学草业学院, 黄河三角洲草地资源与生态国家林业和草原局重点实验室, 青岛市滩涂盐碱地特色植物种质创制与利用重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要: *DREB* 转录因子属于 AP2/ERF 超家族的一个分支, 在植物生长发育以及胁迫应答中发挥至关重要的调控作用。而在我国优良的暖季型草坪草结缕草中关于 *DREB* 家族基因的系统分析目前还未见报道。本研究从结缕草全基因组中共鉴定到 64 个 *ZjDREB* 基因, 编码的氨基酸为 105~984 aa, 分子量为 11.42~107.04 kDa, 理论等电点为 4.09~11.95。系统发育分析显示 *ZjDREB* 基因分为 A₁~A₆ 共 6 组。蛋白序列的保守基序分析表明 motif 1、motif 2 和 motif 3 在所有 *ZjDREB* 蛋白序列中的分布相对保守, 且其中的 61 个 *ZjDREB* 基因在结缕草 14 条染色体上呈不均匀分布。对 *ZjDREB* 基因的共线性分析中共鉴定到 3 个片段重复基因对, 且基因对的非同义替代与同义替代的比值 (K_a/K_s) 均小于 1, 表明其在基因扩张中受纯化选择。顺式作用元件分析显示 *ZjDREB* A₁ 和 A₂ 组基因启动子区域含有多个与植物激素和非生物胁迫相关的作用元件。利用 qRT-PCR 对 A₁ 和 A₂ 组基因在低温、脱落酸、干旱和盐胁迫下的表达模式进行分析, 结果显示 A₁ 组基因在低温和脱落酸胁迫处理后上调表达, 其中 *ZjDREB3* 上调幅度最大; A₂ 组基因在干旱和高盐胁迫后表现出不同的表达模式, 其中 *ZjDREB4* 的上调幅度最大。本研究结果为进一步探究结缕草 *ZjDREB* 基因的功能奠定了基础, 也为结缕草的遗传改良提供了新的线索。

关键词: 结缕草; *DREB* 转录因子; 系统进化; 非生物胁迫; 表达模式

Identification of *DREB* genes from *Zoysia japonica* and their transcript profiles in response to abiotic stress

ZUO Zhi-fang, LI Yong-long, WEI Yu-jia, ZHOU Sheng-hui, LI Yan, YANG Guo-feng*

College of Grassland Science, Qingdao Agricultural University, Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Grassland Resources and Ecology in the Yellow River Delta, Qingdao Key Laboratory of Specialty Plant Germplasm Innovation and Utilization in Saline Soils of Coastal Beach, Qingdao 266109, China

Abstract: *DREB* transcription factors belong to the AP2/ERF superfamily, and play important roles in plant development and stress responses. However, a systematic analysis of *DREB* genes in *Zoysia japonica*, which is a warm-season turfgrass native to China has not been reported. In this study, we identified 64 *ZjDREBs* from *Z. japonica*, encoding polypeptides of 105 to 984 amino acids, with molecular weights ranging from 11.42 to 107.04 kDa and theoretical isoelectric points ranging from 4.09 to 11.95. The phylogenetic analysis of 64 *ZjDREBs* showed that they were divided into six groups from A₁ to A₆. A conserved motif analysis of *ZjDREB* protein sequences

收稿日期: 2024-07-02; 改回日期: 2024-08-22

基金项目: 山东省牧草产业技术体系 (SDAIT-23-01) 资助。

作者简介: 左志芳 (1989—), 女, 河南濮阳人, 讲师, 博士。E-mail: zhifangzuo@qau.edu.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yanggf@qau.edu.cn

revealed that motif1, motif2, and motif3 were relatively highly conserved. Sixty-one *ZjDREBs* were unevenly distributed on 14 chromosomes of *Z. japonica*. By colinearity analysis, we identified three pairs of segmentally duplicated *ZjDREB* genes. The non-synonymous: synonymous (Ka/Ks) was <1 , indicating that this gene family might have been subject to purifying selection during its expansion. Analyses of the promoter regions of *ZjDREBs* in the A_1 and A_2 groups revealed multiple *cis*-acting elements related to plant hormones and abiotic stresses. The expression profiles of *ZjDREB* genes in the A_1 and A_2 groups under cold, abscisic acid (ABA), drought, and salt stress were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The A_1 group genes were up-regulated by cold and ABA treatments, and *ZjDREB3* was significantly up-regulated. The A_2 group genes showed different expression profiles under drought and salt stress, and *ZjDREB4* was significantly up-regulated. Together, these results lay a foundation for further exploration of the functions of *ZjDREB* genes and provide avenues for the genetic improvement of *Z. japonica*.

Key words: *Zoysia japonica*; DREB transcription factor; phylogenetic evolution; abiotic stress; expression profiling

温度(低温、冻害和高温)、干旱和高盐胁迫是影响植物生长发育,降低产能的常见环境因素。近些年,随着全球气候的变化,极端低温冷害事件的出现也变得日趋频繁,使得低温胁迫(cold stress)成为世界上最为严重的灾害之一^[1]。低温不仅能造成植物生长缓慢,还能改变其地理分布。然而,植物通过长期的进化产生了复杂的响应机制来适应低温环境,如通过低温、光照、脱落酸(abscisic acid, ABA)等多种信号机制来协同调节细胞内的活动以维持体内稳态平衡^[2]。在这个过程中,大量低温响应基因被诱导表达,参与保护性物质合成,包括膜稳定性调节的酶类、转运蛋白、脂质和转录因子(transcription factor, TF)等^[3]。

植物转录因子由于位于信号通路的中游,在多种生物胁迫和非生物胁迫调控网络中扮演重要角色,常被作为突破口来深入研究其应答保护机制。脱水响应元件结合蛋白(dehydration responsive element-binding protein, DREB)是一类植物中特有的转录因子,能够特异性地结合下游基因启动子区域的DRE/CRT(dehydration response element/C-repeat)顺式作用元件的核心区域ACCGAC/GCCGAC,因此,DREB又被称作CBF(C-repeat binding factor)转录因子^[4]。DREB是AP2/ERF(APETALA2/ethylene-responsive factor)超家族的一个分支,每个成员都含有一个约60个氨基酸组成的保守AP2结构域^[5],而AP2/ERF超家族根据AP2结合域数目和保守域的特点可分为AP2、RAV、ERF、DREB和Soloist 5个家族^[6]。DREB和ERF家族均只含有1个AP2结构域,主要区别在于AP2结构域的第14和19位氨基酸不同,DREB家族为缬氨酸(valine, V)和谷氨酸(glutamic acid, E),而ERF家族为丙氨酸(alanine, A)和天冬氨酸(aspartic acid, D)^[7-8]。

DREB家族成员根据蛋白的结构特征分为 $A_1 \sim A_6$ 共6组,其中 A_1 和 A_2 组属于典型的DREB蛋白^[9]。 A_1 组成员主要参与低温胁迫应答过程,*AtCBF1*基因是从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆的第一个DREB成员,受低温诱导强烈表达,能够通过调控多个与冷害和脱水作用相关基因的表达来增强植物的耐寒性^[5]。拟南芥中首次报道的 A_2 组成员基因*AtDREB2A*和*AtDREB2B*在叶片和根中受干旱和高盐胁迫诱导表达,且在根中受盐胁迫诱导大量上调表达^[9]。近年来随着全基因组高通量测序技术的发展,多种植物物种的参考基因组序列被公开释放,DREB家族或AP2/ERF超家族成员也从多种物种中被鉴定出来,其中包括水稻(*Oryza sativa*)^[10]、玉米(*Zea mays*)^[11]、小麦(*Triticum aestivum*)^[12]、御谷(*Pennisetum glaucum*)^[13]、藜麦(*Chenopodium quinoa*)^[14]、大豆(*Glycine max*)^[15]、油菜(*Brassica napus*)^[16]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[17]、棉花(*Gossypium* spp.)^[18]、甜菜(*Beta vulgaris*)^[19]、黑麦草(*Lolium perenne*)^[20]、杨梅(*Myrica rubra*)^[21]、火炬松(*Pinus taeda*)^[22]、马松(*Pinus massoniana*)^[23]等物种,但在结缕草(*Zoysia japonica*)中只有少数DREB基因的功能研究被报道,而关于DREB家族基因还未得到系统的分析。

结缕草是一种优良的暖季型草坪草,具有良好的抗旱、耐瘠薄和耐践踏等特性,是建植低养护和环境友好型草种,因此被广泛应用于观赏草坪、运动场草坪、高尔夫球场、水土保持等方面^[24]。由于结缕草喜光照温暖气候,低温等原因诱发的绿期短是影响结缕草观赏性和在北方地区推广应用的一个重要限制因素。近年来,植物基因工程和分子生物学技术发展迅速,能够快速有效地实现多种优良性状的整合,而在结缕草中对优质抗逆基因的挖

掘以及抗逆分子机理的研究还较少。研究表明,多个 *DREB* 的 A_1 组基因参与植物低温胁迫响应过程^[4,25-27], A_2 组成员在植物的抗旱和耐盐性方面发挥重要作用^[4,28], 而结缕草中的 A_1 和 A_2 组基因与非生物胁迫的关系还未得到研究。因此,本研究借助生物信息学手段,在结缕草基因组中共筛选和鉴定到 64 个 *DREB* 家族成员,并对其系统发育关系和结构特征进行描述。另外,对典型的 *DREB* 家族基因 A_1 组和 A_2 组在低温、ABA、干旱和高盐胁迫下的表达模式进行了分析,为进一步深入探究 *ZjDREB* 转录因子的生物学功能以及创制结缕草抗逆新种质奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料及培养条件

试验用植物材料为结缕草品种“Zenith”。种子于 2023 年 12 月萌发于 MS 固体培养基 (phytotechnology, M519)。成分如下:硝酸铵 $1650 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 硼酸 $6.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 无水氯化钙 $332.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 六水氯化钴 $0.025 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 五水硫酸铜 $0.025 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 乙二胺四乙酸二钠二水合物 $37.26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 七水硫酸亚铁 $27.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 硫酸镁 $180.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 硫酸锰 $16.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 钼酸钠二水合物 $0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 碘化钾 $0.83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 硝酸钾 $1900 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 磷酸二氢钾 $170 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 七水硫酸锌 $8.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 甘氨酸 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 肌醇 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 烟酸 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 盐酸吡哆醇 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 盐酸硫胺素 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 16 h 光照/8 h 黑暗条件下的 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 2 个月。低温胁迫处理时,取长势均一的 5 棵幼苗置于装有 5 mL 无菌水的 15 mL 塑料管中,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 低温培养箱中培养,每个处理时间点 3 个重复。ABA 胁迫处理采用 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ABA,干旱胁迫处理采用 20% 聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG 6000),高盐胁迫处理采用 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl,置于上述 15 mL 塑料管中,于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养。在 0、1 和 24 h 分别收集叶片组织,并立即在液氮中速冻,储存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 实验室超低温冰箱以备后续提取 RNA。

1.2 *ZjDREB* 基因家族的鉴定

结缕草全基因组数据从结缕草数据库 (Zoysia genome database: <https://zoysia.kazusa.or.jp/>) 下载。从 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 网站下载 AP2 保守结构域的隐马尔科夫模型 (PF00847),以 $E < 1e^{-5}$ 为标准,使用 HMM 3.0 软件在结缕草蛋白质数据库中搜索能够匹配该模型的蛋白质序列。由于 AP2 转录因子超家族中 ERF 和 DREB 家族均只含一个 AP2 保守结构域,将 HMM 搜索后符合条件的蛋白序列在 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 中分析所含保守结构域并去除 ERF 和 DREB 家族以外的成员。通过 DNAMAN (v 9.0) 多序列比对,根据 ERF 和 DREB 家族 AP2 结构域中第 14 和 19 位保守氨基酸的不同,最终得到结缕草中的 DREB 家族成员。对筛选到的符合条件的 DREB 蛋白序列通过网站 ExPASy-Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/) 预测 *ZjDREB* 的蛋白质长度 (protein length)、分子量 (molecular weight, MW) 和理论等电点 (isoelectric point, pI)。

1.3 *ZjDREB* 基因家族的多序列比对和系统发育分析

从 TAIR 数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 AtDREB 蛋白质序列。使用 ClustalW 软件以默认参数对结缕草和拟南芥 DREB 蛋白序列进行比对。比对之后,利用 MEGA 7.0 软件,采用邻接法 (neighbor-joining) 构建系统发育树,校验参数 Bootstrap 重复 1000 次。依据已知的拟南芥 AtDREB 的分类对结缕草 *ZjDREB* 进行分类。

1.4 *ZjDREB* 基因结构和蛋白质保守基序分析

参考结缕草基因组注释信息获得 *ZjDREB* 的基因组序列和 CDS 序列,外显子-内含子结构模式图通过 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) 进行可视化分析^[29]。利用在线分析网站 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>)^[30] 对 *ZjDREB* 蛋白质序列的保守基序进行分析,参数设置如下:1) 最大基序数量为 10; 2) 保守基序长度为 2~600 个氨基酸; 3) 其他参数为默认。最后使用 TBTools 软件对结缕草 *ZjDREB* 基因结构和保守基序结合进化树进行可视化^[31]。

1.5 *ZjDREB* 基因的染色体定位和共线性分析

参考结缕草基因组注释信息获得 *ZjDREB* 基因在染色体上的起始位置,利用 MapChart 进行染色体定位^[32]。根据 *ZjDREB* 基因两两之间的 BLASTN 比对结果,使用 MCScanX 软件在默认参数下分析全基因组中的串联重

复和片段重复特征^[33]。利用 Circos 0.67 软件可视化 *ZjDREB* 的片段重复基因对^[34], 并使用 TBTools 软件的“Simple Ka/Ks Calculator”计算重复基因对的非同义替代与同义替代的比值 (non-synonymous to synonymous ratio, Ka/Ks)。

1.6 *ZjDREB* A₁和 A₂组基因保守结构域序列及启动子顺式作用元件分析

将 *ZjDREB* 蛋白 A₁和 A₂组的 AP2 结构域序列导入 DNAMAN(v 9.0)进行序列比对。同时,从结缕草基因组序列文件中提取 *ZjDREB* A₁和 A₂组基因 3.0 kb 上游区域序列,在 Plant CARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)网站对启动子中的顺式作用元件进行预测。

1.7 *ZjDREB* A₁和 A₂组基因表达模式分析

将胁迫处理后的结缕草叶片组织用液氮充分研磨,使用 FastPure® Universal Plant Total RNA Isolation Kit (诺唯赞)提取植物总 RNA,并用 Nanodrop 2000(美国)测定总 RNA 浓度。分别取 2 μg RNA 用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(Takara)反转录合成 cDNA。qRT-PCR 反应程序参考 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (诺唯赞)荧光定量预混试剂说明书进行。反应总体积 10 μL 如下: 2×ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 5 μL、正反向引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.5 μL(表 1)、cDNA 模板(50 ng·μL⁻¹)2 μL、RNase-free ddH₂O 2

表 1 结缕草 *ZjDREB* 基因的 qRT-PCR 引物

Table 1 qRT-PCR primers for *ZjDREBs* of *Z. japonica* used in this study

名称 Name	寡核苷酸 Oligonucleotides (5'–3')	组 Group	用途 Purpose
ZjDREB3-r-F	AAGGGGCTGAGGGTGAGTA	A ₁	用于 <i>ZjDREB</i> A ₁ 组基因的 qRT-PCR 分析 For the qRT-PCR of <i>ZjDREB</i> A ₁ group genes
ZjDREB3-r-R	GATGCGGGACTTCTTGTTG	A ₁	
ZjDREB12-r-F	GTCCGATCAAGGAGGAGATG	A ₁	
ZjDREB12-r-R	GAAGGTGCCAAGCCAGAG	A ₁	
ZjDREB19-r-F	AATGCCGGACCTGTTTTCTA	A ₁	
ZjDREB19-r-R	TAGCTCCAGAGCCTGACCTC	A ₁	
ZjDREB25-r-F	ACCTGCTTTCTAGCGAGACG	A ₁	
ZjDREB25-r-R	GCTCCAAAGCTTGACCTCAC	A ₁	
ZjDREB35-r-F	GAGTACGCCACCGTCATGT	A ₁	
ZjDREB35-r-R	GATGCGGGATTTCTTGTTG	A ₁	
ZjDREB1-r-F	GCACGAACCCAAGATGAAAT	A ₂	用于 <i>ZjDREB</i> A ₂ 组基因的 qRT-PCR 分析 For the qRT-PCR of <i>ZjDREB</i> A ₂ group genes
ZjDREB1-r-R	GCCACCTTCATTGGTTCTGT	A ₂	
ZjDREB4-r-F	GGCTGCAGGAGATCAAGAAC	A ₂	
ZjDREB4-r-R	CTGGAAGCACGATATTGACG	A ₂	
ZjDREB9-r-F	AAGTTCTGCTGATGCCACCT	A ₂	
ZjDREB9-r-R	ATGTGGATGCTTCCCAAATC	A ₂	
ZjDREB11-r-F	AGGGAGTTCTTGACGAGAT	A ₂	
ZjDREB11-r-R	GGCAAGTAGCTCCCAAACCTG	A ₂	
ZjDREB13-r-F	TGAATTCTGGAGCGGAGTCT	A ₂	
ZjDREB13-r-R	GTCAGCTTCCATCATGCTCA	A ₂	
ZjDREB21-r-F	CAAGGGCTGCATGAAGGG	A ₂	
ZjDREB21-r-R	ATCTCGGGACCCACTTG	A ₂	
ZjDREB24-r-F	ATGAAGGGCAAGGGCGG	A ₂	
ZjDREB24-r-R	GACCCACTTGCCCCAGG	A ₂	
ZjACT-F	AAGCCAACAGGGAGAAAAT	—	结缕草内参基因
ZjACT-R	GATAGCATGGGGAAGTGCAT	—	Inner reference gene of <i>Z. japonica</i>

—: 结缕草内参基因不在分组内 The inner reference gene of *Z. japonica* is not included in the group.

μL 。qRT-PCR 仪型号为 CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad, 美国), 反应程序如下: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, ($95\text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s) 40 个循环。基因的相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 公式计算^[35], 每个样品进行 2~3 次技术重复。

1.8 数据处理与统计分析

运用 Excel 2016 进行数据统计, 并利用 GraphPad Prism 9.0 数据处理系统进行数据分析并制作图表。

2 结果与分析

2.1 结缕草 *ZjDREB* 基因家族的鉴定

通过 HMM 软件的初步搜索, 从结缕草基因组蛋白序列文件中共搜索到 222 个匹配 AP2 结构域隐马尔科夫模型且 $E < 1e^{-5}$ 的蛋白质序列。根据蛋白质序列中 AP2 保守结构域的个数、保守区域第 14 和 19 位氨基酸以及与模式物种拟南芥 AP2/ERF 家族蛋白序列的系统发育分析, 最终确定其中的 64 条序列属于 *DREB* 基因家族。根据鉴定所得的 *DREB* 基因期望值 (expectation value, E-value), 将其相应命名为 *ZjDREB1*~*ZjDREB64* (表 2)。对 64 个基因编码的蛋白质长度、分子量大小和等电点预测等信息进行分析, 结果显示 *ZjDREB* 蛋白质序列长度为 105~984 个氨基酸, 分子量 (MW) 为 11.42~107.04 kDa, 理论等电点 (pI) 为 4.09~11.95 (表 2)。

表 2 结缕草 *DREB* 家族基因基本信息

Table 2 Basic information of *DREB* family genes in *Z. japonica*

基因号 Gene ID	基因名称 Gene name	期望值 E-value	蛋白质长度 Protein length (aa)	分子量 MW (kDa)	等电点 pI	组 Group	染色体 Chromosome
Zjn_sc00016.1.g00280.1.sm.mkhc	<i>ZjDREB1</i>	$2.90e^{-15}$	338	37.29	4.58	A ₂	Chr18
Zjn_sc00091.1.g00300.1.sm.mk	<i>ZjDREB2</i>	$3.30e^{-15}$	282	29.35	6.02	A ₆	Chr13
Zjn_sc00141.1.g00460.1.sm.mk	<i>ZjDREB3</i>	$3.80e^{-15}$	216	23.53	4.52	A ₁	Zjn_sc00141.1
Zjn_sc00003.1.g10920.1.am.mk	<i>ZjDREB4</i>	$4.10e^{-15}$	500	53.29	10.24	A ₂	Chr02
Zjn_sc00015.1.g00570.1.sm.mk	<i>ZjDREB5</i>	$4.80e^{-15}$	287	30.25	6.03	A ₆	Chr14
Zjn_sc00056.1.g04220.1.am.mk	<i>ZjDREB6</i>	$5.50e^{-15}$	428	45.60	8.34	A ₄	Chr11
Zjn_sc00004.1.g06540.1.am.mk	<i>ZjDREB7</i>	$6.40e^{-15}$	375	40.02	8.43	A ₄	Chr12
Zjn_sc00022.1.g06610.1.am.mk	<i>ZjDREB8</i>	$7.40e^{-15}$	256	27.32	4.92	A ₄	Chr08
Zjn_sc00005.1.g05270.1.sm.mkhc	<i>ZjDREB9</i>	$7.60e^{-15}$	257	28.87	5.49	A ₂	Chr06
Zjn_sc00007.1.g10280.1.am.mk	<i>ZjDREB10</i>	$7.80e^{-15}$	285	29.80	4.45	A ₄	Chr07
Zjn_sc00002.1.g12900.1.sm.mk	<i>ZjDREB11</i>	$7.90e^{-15}$	311	33.08	6.42	A ₂	Chr01
Zjn_sc00050.1.g01870.1.am.mk	<i>ZjDREB12</i>	$8.30e^{-15}$	317	34.00	4.19	A ₁	Chr20
Zjn_sc00098.1.g00890.1.sm.mkhc	<i>ZjDREB13</i>	$9.60e^{-15}$	337	36.46	4.47	A ₂	Zjn_sc00098.1
Zjn_sc00003.1.g09710.1.sm.mk	<i>ZjDREB14</i>	$1.50e^{-14}$	199	21.34	7.16	A ₆	Chr02
Zjn_sc00007.1.g04460.1.am.mk	<i>ZjDREB15</i>	$4.00e^{-14}$	330	35.52	6.97	A ₆	Chr07
Zjn_sc00022.1.g00980.1.am.mk	<i>ZjDREB16</i>	$4.30e^{-14}$	340	36.38	6.80	A ₆	Chr08
Zjn_sc00022.1.g06640.1.am.mk	<i>ZjDREB17</i>	$6.00e^{-14}$	361	38.67	9.00	A ₄	Chr08
Zjn_sc00047.1.g02470.1.sm.mk	<i>ZjDREB18</i>	$6.70e^{-14}$	205	21.63	4.65	A ₄	Chr08
Zjn_sc00007.1.g09230.1.am.mk	<i>ZjDREB19</i>	$7.00e^{-14}$	326	35.41	8.74	A ₁	Chr07
Zjn_sc00045.1.g00300.1.am.mk	<i>ZjDREB20</i>	$7.70e^{-14}$	242	25.19	4.57	A ₄	Chr07
Zjn_sc00078.1.g03540.1.am.mk	<i>ZjDREB21</i>	$7.90e^{-14}$	236	25.61	7.32	A ₂	Chr13
Zjn_sc00032.1.g00670.1.am.mk	<i>ZjDREB22</i>	$7.90e^{-14}$	281	30.91	8.88	A ₆	Chr08
Zjn_sc00007.1.g10310.1.sm.mk	<i>ZjDREB23</i>	$9.00e^{-14}$	263	27.37	6.24	A ₄	Chr07
Zjn_sc00015.1.g08330.1.am.mk	<i>ZjDREB24</i>	$9.50e^{-14}$	267	29.18	8.42	A ₂	Chr14
Zjn_sc00022.1.g05590.1.am.mk	<i>ZjDREB25</i>	$9.60e^{-14}$	440	47.01	8.98	A ₁	Chr08

续表 Continued Table

基因号 Gene ID	基因名称 Gene name	期望值 E-value	蛋白质长度 Protein length (aa)	分子量 MW (kDa)	等电点 pI	组 Group	染色体 Chromosome
Zjn_sc00056.1.g04250.1.am.mk	<i>ZjDREB26</i>	1.00e ⁻¹³	273	29.35	8.11	A ₄	Chr11
Zjn_sc00053.1.g02230.1.am.mk	<i>ZjDREB27</i>	1.20e ⁻¹³	984	107.04	11.22	A ₄	Zjn_sc00053.1
Zjn_sc00022.1.g06600.1.am.mk	<i>ZjDREB28</i>	1.40e ⁻¹³	475	50.95	8.41	A ₄	Chr08
Zjn_sc00012.1.g01050.1.am.mk	<i>ZjDREB29</i>	1.50e ⁻¹³	259	28.55	10.16	A ₆	Chr17
Zjn_sc00018.1.g05900.1.am.mk	<i>ZjDREB30</i>	1.60e ⁻¹³	293	31.03	6.25	A ₆	Chr20
Zjn_sc00007.1.g11280.1.sm.mk	<i>ZjDREB31</i>	1.60e ⁻¹³	286	30.57	6.52	A ₆	Chr07
Zjn_sc00002.1.g16790.1.am.mk	<i>ZjDREB32</i>	1.80e ⁻¹³	105	11.42	10.14	A ₄	Chr01
Zjn_sc00027.1.g01240.1.am.mk	<i>ZjDREB33</i>	2.70e ⁻¹³	373	40.79	10.62	A ₆	Chr18
Zjn_sc00016.1.g00480.1.am.mk	<i>ZjDREB34</i>	3.90e ⁻¹³	296	31.65	11.73	A ₃	Chr18
Zjn_sc00067.1.g01840.1.am.mk	<i>ZjDREB35</i>	4.00e ⁻¹³	245	26.85	7.53	A ₁	Chr19
Zjn_sc00069.1.g03570.1.am.mk	<i>ZjDREB36</i>	6.10e ⁻¹³	603	66.31	8.24	A ₄	Chr20
Zjn_sc00022.1.g07750.1.am.mk	<i>ZjDREB37</i>	7.30e ⁻¹³	654	70.65	10.01	A ₆	Chr08
Zjn_sc00004.1.g01090.1.sm.mk	<i>ZjDREB38</i>	1.10e ⁻¹²	213	23.44	5.60	A ₅	Chr19
Zjn_sc00043.1.g03350.1.am.mk	<i>ZjDREB39</i>	1.10e ⁻¹²	225	24.22	6.54	A ₄	Chr05
Zjn_sc00143.1.g00970.1.am.mk	<i>ZjDREB40</i>	1.10e ⁻¹²	593	63.86	10.35	A ₆	Chr19
Zjn_sc00004.1.g05180.1.am.mk	<i>ZjDREB41</i>	2.40e ⁻¹²	562	59.14	10.76	A ₆	Chr12
Zjn_sc00049.1.g04190.1.am.mk	<i>ZjDREB42</i>	2.90e ⁻¹²	550	59.72	10.30	A ₆	Chr20
Zjn_sc00056.1.g02990.1.sm.mk	<i>ZjDREB43</i>	3.70e ⁻¹²	430	45.93	9.52	A ₆	Chr11
Zjn_sc00056.1.g04230.1.am.mk	<i>ZjDREB44</i>	4.20e ⁻¹²	240	25.55	4.67	A ₄	Chr11
Zjn_sc00045.1.g01190.1.am.mk	<i>ZjDREB45</i>	6.60e ⁻¹²	216	23.56	9.88	A ₆	Chr07
Zjn_sc00049.1.g01960.1.sm.mk	<i>ZjDREB46</i>	6.70e ⁻¹²	169	18.24	6.80	A ₆	Chr20
Zjn_sc00004.1.g01940.1.am.mk	<i>ZjDREB47</i>	7.80e ⁻¹²	164	17.89	6.78	A ₆	Chr19
Zjn_sc00002.1.g07220.1.am.mk	<i>ZjDREB48</i>	8.70e ⁻¹²	239	24.73	5.68	A ₅	Chr01
Zjn_sc00003.1.g05800.1.sm.mk	<i>ZjDREB49</i>	1.20e ⁻¹¹	233	24.33	7.01	A ₅	Chr02
Zjn_sc00008.1.g05900.1.am.mk	<i>ZjDREB50</i>	1.80e ⁻¹¹	404	43.84	9.18	A ₆	Chr19
Zjn_sc00007.1.g03660.1.sm.mk	<i>ZjDREB51</i>	2.70e ⁻¹¹	239	25.28	4.84	A ₅	Chr07
Zjn_sc00023.1.g04740.1.sm.mk	<i>ZjDREB52</i>	5.50e ⁻¹¹	234	25.45	10.28	A ₅	Chr11
Zjn_sc00069.1.g02080.1.am.mk	<i>ZjDREB53</i>	6.00e ⁻¹¹	516	56.67	10.48	A ₆	Chr20
Zjn_sc00004.1.g02760.1.am.mk	<i>ZjDREB54</i>	6.30e ⁻¹¹	716	76.32	11.95	A ₅	Chr19
Zjn_sc00049.1.g03550.1.sm.mk	<i>ZjDREB55</i>	3.10e ⁻¹⁰	230	23.86	4.09	A ₅	Chr20
Zjn_sc00004.1.g00470.1.sm.mkhc	<i>ZjDREB56</i>	6.90e ⁻¹⁰	585	64.46	9.36	A ₅	Chr19
Zjn_sc00066.1.g02740.1.am.mk	<i>ZjDREB57</i>	7.10e ⁻¹⁰	242	26.02	6.68	A ₅	Chr08
Zjn_sc00022.1.g05620.1.am.mk	<i>ZjDREB58</i>	1.10e ⁻⁰⁹	422	45.15	9.13	A ₄	Chr08
Zjn_sc00009.1.g04230.1.am.mk	<i>ZjDREB59</i>	1.50e ⁻⁰⁹	270	29.90	10.70	A ₅	Chr05
Zjn_sc00007.1.g09250.1.sm.mk	<i>ZjDREB60</i>	1.60e ⁻⁰⁹	237	24.53	4.68	A ₄	Chr07
Zjn_sc00007.1.g02920.1.sm.mk	<i>ZjDREB61</i>	1.70e ⁻⁰⁹	209	22.48	4.78	A ₅	Chr07
Zjn_sc00004.1.g07680.1.am.mk	<i>ZjDREB62</i>	2.00e ⁻⁰⁹	247	25.82	9.15	A ₄	Chr12
Zjn_sc00034.1.g04900.1.sm.mk	<i>ZjDREB63</i>	8.30e ⁻⁰⁹	181	18.98	8.53	A ₅	Chr06
Zjn_sc00025.1.g02120.1.am.mk	<i>ZjDREB64</i>	8.60e ⁻⁰⁷	398	42.36	8.35	A ₅	Chr18

MW: Molecular weight; pI: Isoelectric point; E-value: Expectation value; Chr: 染色体 Chromosome.

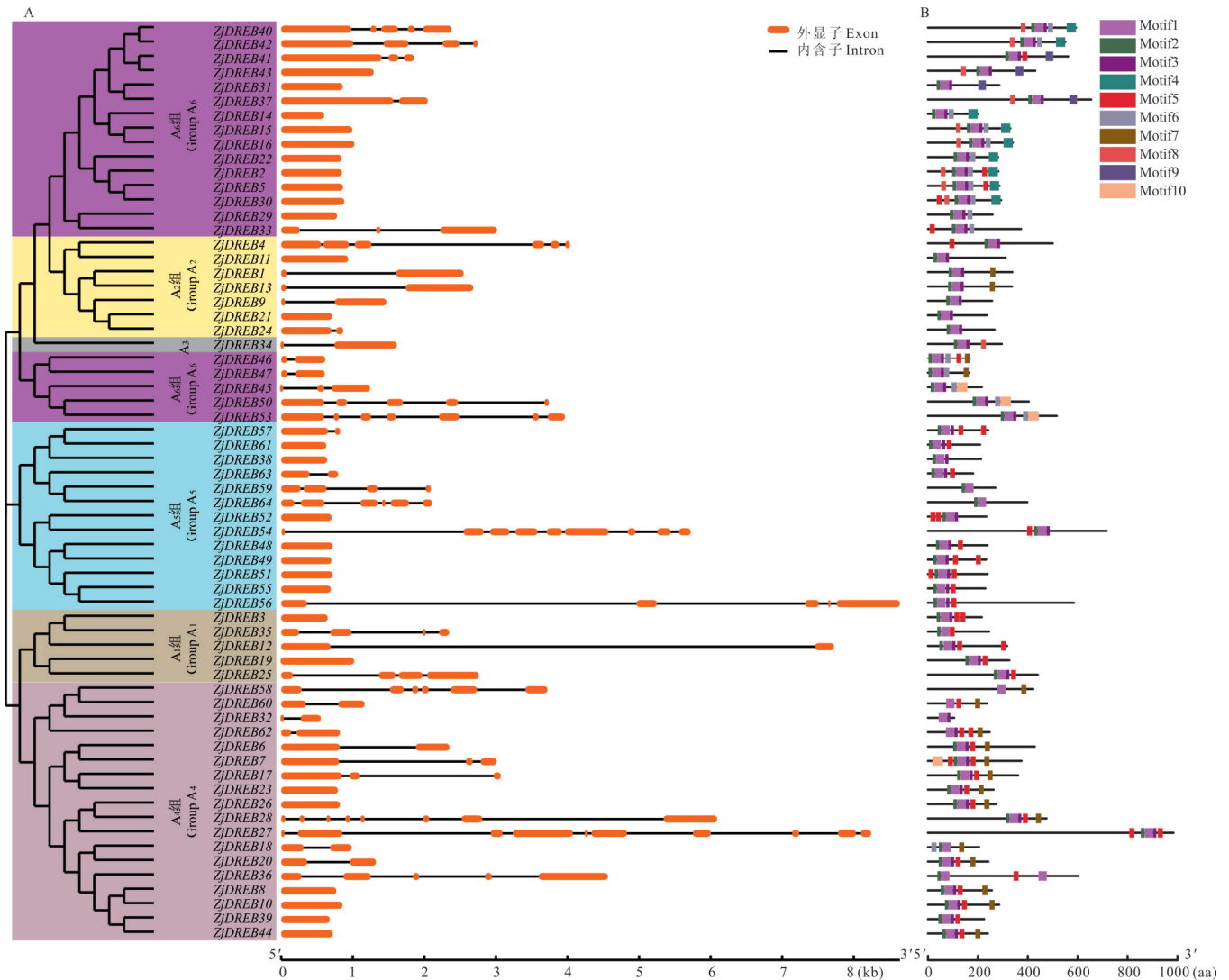


图 2 结缕草 *ZjDREB* 基因家族系统发育树、结构域和保守基序分析

Fig. 2 Phylogenetic tree, structural domain and conserved motif analysis of *ZjDREB* genes family in *Z. japonica*

A: *ZjDREB* 基因结构 Gene structure of *ZjDREBs*; B: *ZjDREB* 基因保守基序 Conserved motif of *ZjDREBs*.

分析显示,结缕草基因组上存在大片段复制(图 4),而对于 *ZjDREB* 基因来说,共鉴定到 3 个片段重复(segmental duplication, SD)基因对(图 4),分别为位于 7 和 8 号染色体上的 *ZjDREB15/ZjDREB16*, *ZjDREB57/ZjDREB61*, 和位于 19 和 20 号染色体上的 *ZjDREB46/ZjDREB47*(表 3)。另外,还发现每对重复基因都聚集在同一个组中,比如 *ZjDREB15/ZjDREB16*, *ZjDREB46/ZjDREB47* 属于 A₆ 组(图 1), *ZjDREB57/ZjDREB61* 属于 A₅ 组(图 1),产生这种现象的原因很可能是基因加倍。上述基因对的 K_a/K_s 均小于 1,表明 *ZjDREB* 家族基因的 3 个片段重复基因对在基因扩张中受纯化选择(表 3)。

2.5 结缕草 *ZjDREB* A₁ 和 A₂ 组基因 AP2 保守结构域及启动子区顺式作用元件分析

由于 DREB A₁ 和 A₂ 组属于典型的 DREB 蛋白质,且与植物的非生物胁迫密切相关。因此对 A₁ 和 A₂ 组蛋白质的 AP2 结构域进行了多重序列比对分析。本研究发现结缕草 A₁ 和 A₂ 组中的第 14 位氨基酸是绝对保守的缬氨酸(V),而第 19 位的氨基酸在各自组内相对保守,只有 A₁ 组中的 *ZjDREB12* 为缬氨酸(V),其余均为谷氨酸(图 5A)。另外,在 A₁ 组中,有核定位信号(nuclear localization signal, NLS)序列“PKR/KP/RAGRTKFR/KETRHP”位于 AP2 结构域的上游,DSAW 基序位于 AP2 结构域的下游。在 A₂ 组中,所有结缕草 *ZjDREB* 蛋白的 AP2 结构域上游均含有序列为“K/RGKGGPxN”的 CMIV-1 结构域和 PKK 样的 NLS 序列(图 5B)。

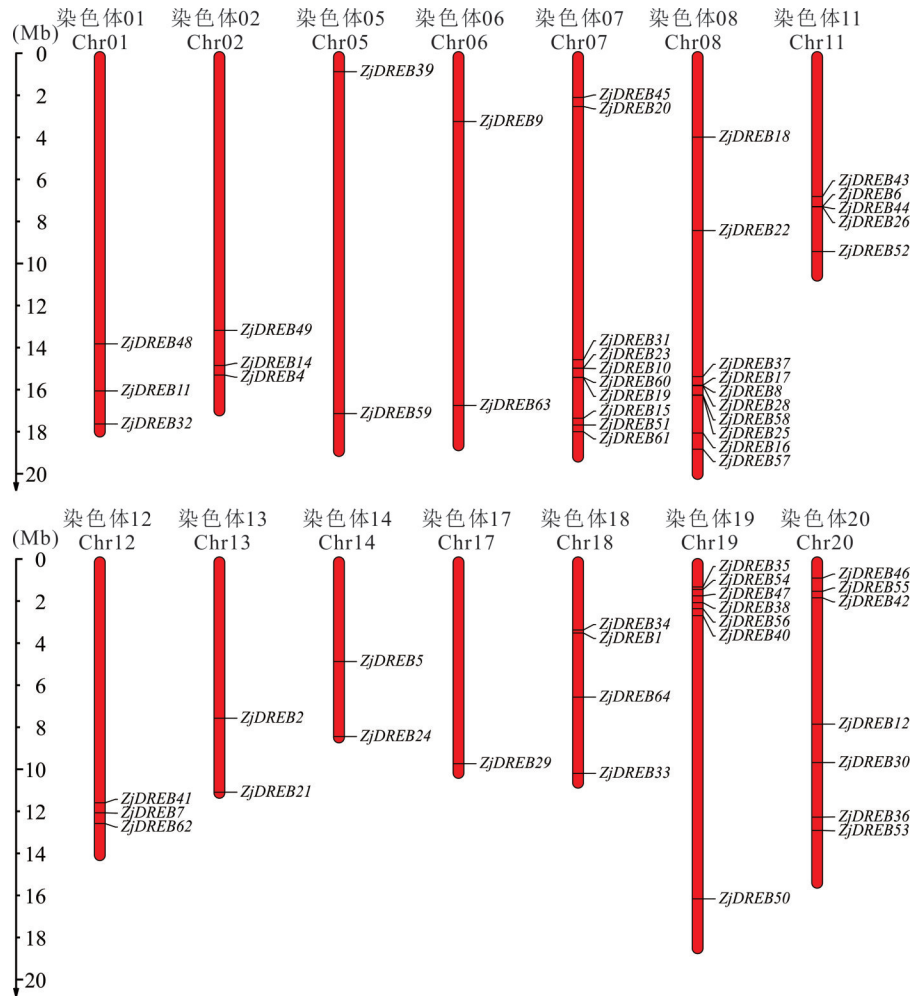


图3 结缕草 *ZjDREB* 基因家族的染色体定位

Fig. 3 Chromosome location of *ZjDREB* genes family in *Z. japonica*

使用 Plant CARE 数据库对结缕草 *ZjDREB* A₁ 和 A₂ 组基因启动子区域的顺式作用元件进行分析, 结果表明 A₁ 和 A₂ 组基因启动子区域均包含一个或多个与植物激素和非生物胁迫响应相关的顺式作用元件。在 A₁ 组中包括与茉莉酸甲酯 MeJA 响应相关的作用元件 (CGTCA-motif 和 TGACG-motif), 与脱落酸 (ABA) 响应相关的作用元件 ABRE, 与赤霉素 (gibberellin, GA) 响应相关的作用元件 GARE-motif, 与光胁迫响应相关的作用元件 (G-box 和 ATC-motif), 与低温胁迫响应相关的作用元件 LTR, 与干旱胁迫响应相关的作用元件 MBS, 与逆境胁迫响应相关的作用元件 TC-rich, 以及能够被多种转录因子结合的 MYB 和 MYC 作用元件 (图 5A)。在 A₂ 组中除 TC-rich 外, 其他作用元件均含有, 另外还有参与光胁迫响应相关的 MYB 作用元件 (MRE) 和黄酮类生物合成的 MYB 作用元件 (MBSI) (图 5B)。

2.6 低温和高盐胁迫处理下 A₁ 和 A₂ 组基因的表达模式分析

为分别研究 *ZjDREB* A₁ 组基因在低温和 ABA、A₂ 组基因在干旱和高盐胁迫下的响应, 对 2 月龄结缕草幼苗分别进行低温 (4 °C)、ABA (200 mg·L⁻¹)、干旱 (20% PEG-6000) 和高盐 (200 mmol·L⁻¹ NaCl) 胁迫处理, 并于处理之后的 0、1 和 24 h 用 qRT-PCR 的方法检测 *ZjDREB* 基因 A₁ 和 A₂ 组的表达情况。结果显示, A₁ 组基因在低温和 ABA 诱导后上调表达, 其中 *ZjDREB3* 上调幅度最大, 在低温下第 1 h 时平均上调 12.7 倍, ABA 为 65.2 倍 (图 6A)。A₂ 组基因在干旱诱导后除 *ZjDREB9* 外, 均上调表达, 其中 *ZjDREB4* 上调幅度最大, 第 1 h 时平均上调 38.3 倍, 而 *ZjDREB9* 在第 1 h 时平均下调 0.8 倍 (图 6B)。盐胁迫处理下, 只有 *ZjDREB11* 先经过轻微下调后上升, *ZjDREB1*、*ZjDREB4*、*ZjDREB9*、*ZjDREB13*、*ZjDREB21* 和 *ZjDREB24* 均表现出上调趋势, 其中 *ZjDREB4* 的上调幅度最大, 第 24 h 时平均上调 158.7 倍 (图 6B)。以上分析结果表明了结缕草 *ZjDREB* 家族 A₁ 和 A₂ 组基因在响应非生物胁迫应答中的潜在作用。

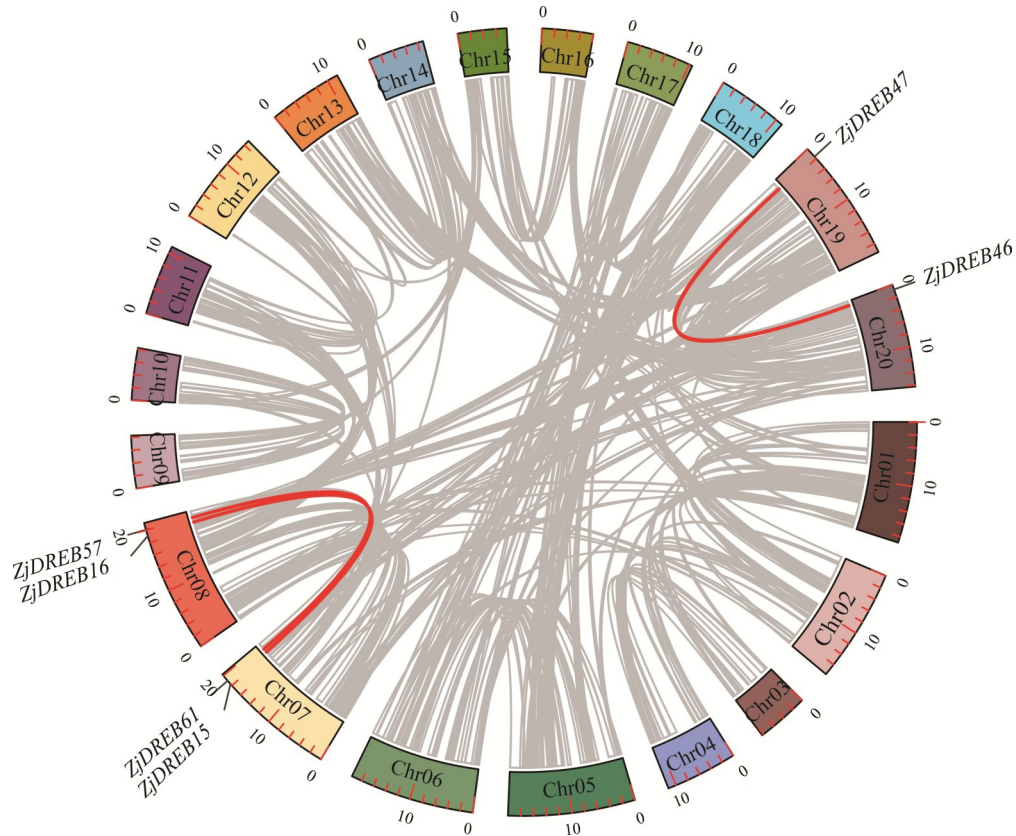


图 4 结缕草 *ZjDREB* 家族基因的片段重复基因对

Fig. 4 Segmental duplication gene pairs of *ZjDREB* family genes in *Z. japonica*

灰线表示基因组中的共线性区块 The grey lines represented syntenic blocks in *Z. japonica* genome; 红线表示 *ZjDREBs* 的片段重复基因对 The red lines indicated the collinear gene pairs of *ZjDREBs*.

表 3 结缕草 *DREB* 家族基因的片段重复基因对

Table 3 Segmental duplication gene pairs of *ZjDREB* family genes in *Z. japonica*

基因组位置 Location on genome				基因组位置 Location on genome				非同义替代/同义替代 Ka/Ks
基因 Gene	染色体 Chromosome	起始位置 Start	终止位置 End	基因 Gene	染色体 Chromosome	起始位置 Start	终止位置 End	
<i>ZjDREB15</i>	Chr07	18308254	18309246	<i>ZjDREB16</i>	Chr08	19055071	19056093	0.1684
<i>ZjDREB46</i>	Chr20	804556	804638	<i>ZjDREB47</i>	Chr19	1618296	1618378	0.4207
<i>ZjDREB57</i>	Chr08	19874486	19875140	<i>ZjDREB61</i>	Chr07	18982769	18983398	0.2172

Ka/Ks: Synonymous to synonymous ratio.

3 讨论

大量研究表明, *DREB* 家族是植物 AP2/ERF 转录因子超家族中的重要成员^[6,9], 通过直接或间接调节下游靶基因的表达来间接参与非生物胁迫应答, 并在逆境条件下提高植物的耐受性。自 Stockinger 等^[5]首次从拟南芥中分离出 *AtCBF1* 基因以来, 越来越多的 *DREB* 基因从不同物种中被鉴定出来并进行了功能研究^[36]。在结缕草中, 仅有少数 *ZjDREB* 基因的功能被报道^[37-41], 而对 *ZjDREB* 家族基因的系统解析还未得到深入研究。本研究中, 基于结缕草的全基因组序列, 共鉴定出 64 个 *ZjDREB* 基因, 与双子叶拟南芥 (57 个)^[9]、大豆 (73 个)^[15] 和单子叶水稻 (57 个)^[42] 等植物相近。并对其系统进化、结构特性、保守基序、染色体定位、共线性、典型 *ZjDREB* 基因 A_1 和 A_2 组启动子顺式元件和非生物胁迫下的表达模式进行了深入探讨。

依据拟南芥中 *DREB* 的分类方法对 64 个 *ZjDREB* 基因进行分类, 共划分为 6 组 ($A_1=5, A_2=7, A_3=1, A_4=$

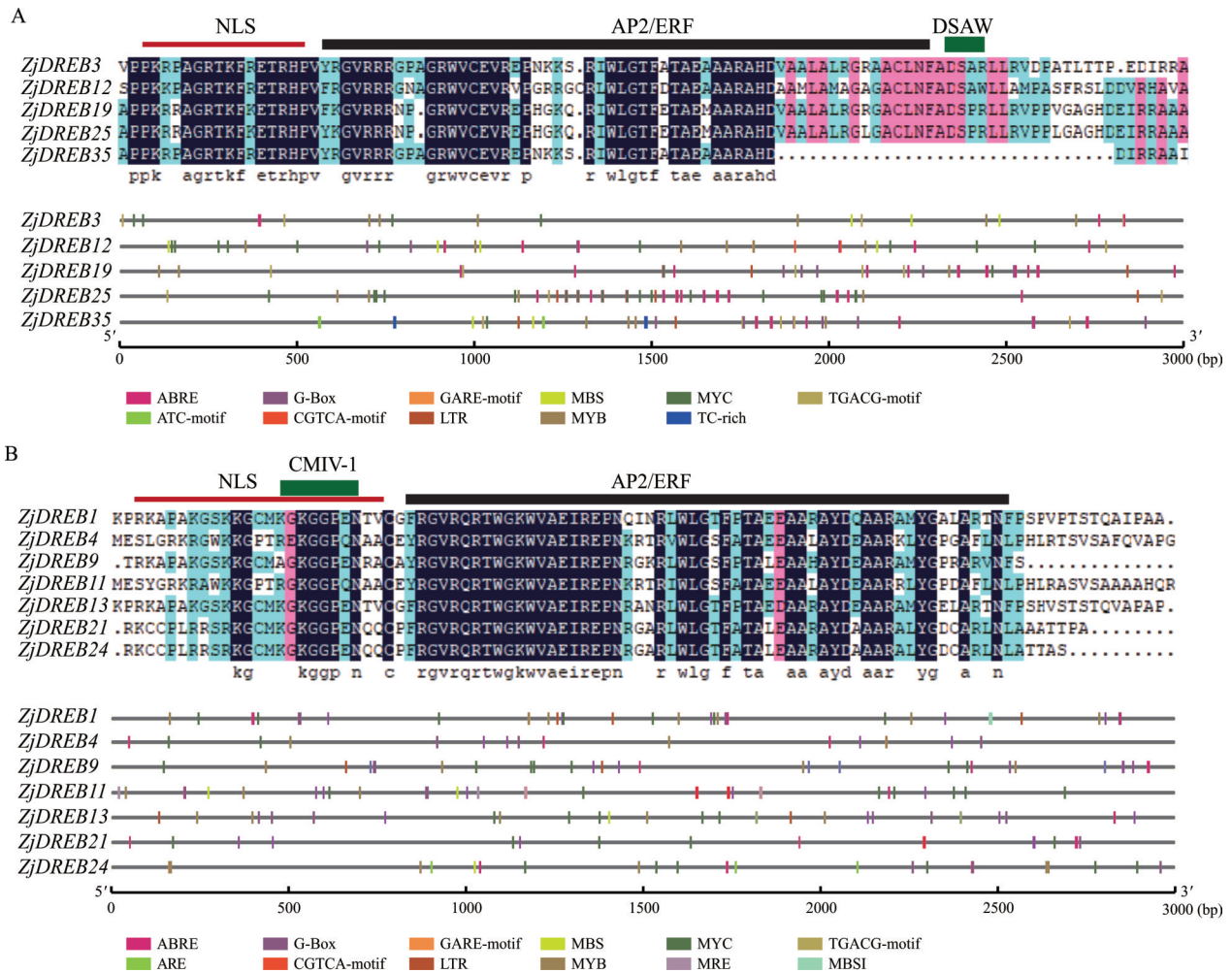


图5 结缕草 *ZjDREB* A₁和 A₂组 AP2结构域多序列比对及启动子区域的顺式作用元件

Fig. 5 Multiple sequence alignment of *ZjDREB* AP2 domain and the *cis*-acting elements among the promoter regions in A₁ and A₂ group genes in *Z. japonica*

A: A₁组 AP2结构域及启动子顺式作用元件 The AP2 domain and the *cis*-acting elements of *ZjDREBs* in A₁ group; B: A₂组 AP2结构域及启动子顺式作用元件 The AP2 domain and the *cis*-acting elements of *ZjDREBs* in A₂ group. NLS: 核定位信号 Nuclear localization signal; AP2/ERF: AP2/ERF 结构域 AP2/ERF domain; DSAW: DSAW 基序 DSAW motif; CMIV-1: CMIV-1 结构域 CMIV-1 domain; ABRE: 脱落酸响应相关作用元件 *Cis*-acting element involved in the abscisic acid (ABA) responsiveness; G-box: 光胁迫响应相关作用元件 *Cis*-acting regulatory element involved in light responsiveness; GARE-motif: 赤霉素响应相关作用元件 Gibberellin (GA)-responsive element; MBS: 参与干旱诱导的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in drought-inducibility; MYC: MYC 结合位点 MYC binding site; TGACG-motif: 茉莉酸甲酯响应相关作用元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the methyl jasmonate (MeJA)-responsiveness; ARE: 厌氧诱导所必需的顺式作用调节元件 *Cis*-acting regulatory element essential for the anaerobic induction; CGTCA-motif: 茉莉酸甲酯响应相关作用元件 *Cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness; LTR: 低温胁迫响应相关作用元件 *Cis*-acting element involved in low-temperature responsiveness; MYB: MYB 结合位点 MYB binding site; TC-rich: 逆境胁迫响应相关的作用元件 *Cis*-acting element involved in defense and stress responsiveness; MRE: 参与光胁迫响应相关的 MYB 作用元件 MYB binding site involved in light responsiveness; MBSI: 黄酮类生物合成的 MYB 作用元件 MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation.

18, A₅=13, A₆=20), 各组所包含的基因数量与拟南芥^[9](A₁=6, A₂=8, A₃=1, A₄=16, A₅=16, A₆=10)、水稻^[42](A₁=10, A₂=6, A₃=5, A₄=12, A₅=15, A₆=9)相当, 成员数量最少的均为 A₃组, 说明结缕草 *ZjDREB* 家族基因在进化过程中没有发生大规模的基因丢失现象。有趣的是结缕草 A₆组所包含的基因数量最多, 与拟南芥和水稻的 A₄组所包含基因数量最多的结果不同, 说明结缕草 A₆组在进化过程中发生了基因扩张现象, 这可能是由于片段重复造成的。在对结缕草 *ZjDREB* 基因的共线性分析中, 共鉴定到 3 对片段重复基因, 其中 *ZjDREB15*/*ZjDREB16*, *ZjDREB46*/*ZjDREB47* 均属于 A₆组, 这也直接证明了片段重复在结缕草 *ZjDREB* 家族基因的扩张中发挥了主要作用。

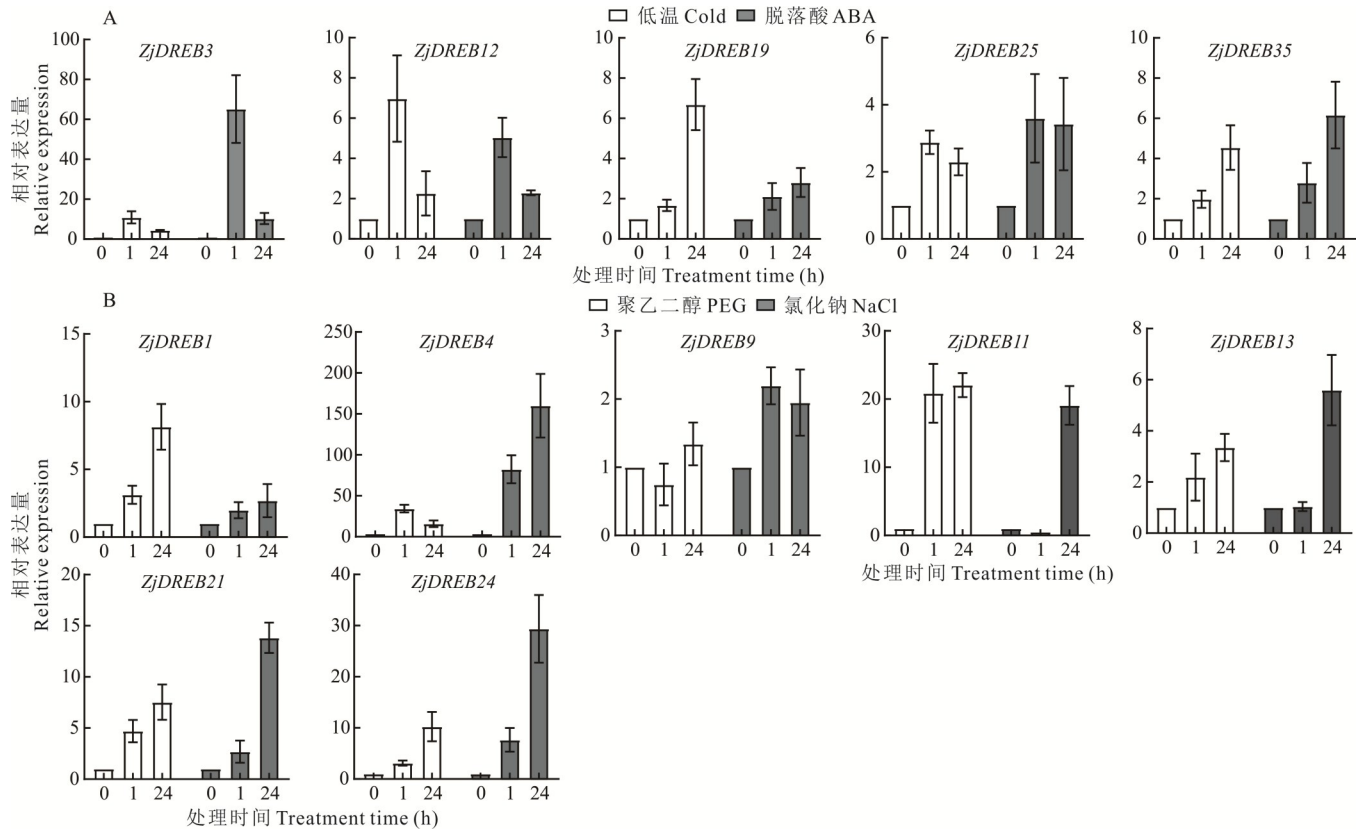


图6 结缕草 *ZjDREB* A₁和A₂组基因在低温、脱落酸、干旱和高盐胁迫下的表达模式分析

Fig. 6 Expression profiling of *ZjDREB* A₁ and A₂ group genes under cold, ABA, drought and high salt stress treatment

A: 结缕草 *ZjDREB* A₁组基因在低温(4 °C)和脱落酸(200 mg·L⁻¹)胁迫下的表达模式分析 Expression profiling of *ZjDREB* A₁ group genes under cold (4 °C) and ABA (200 mg·L⁻¹) stress treatment; B: 结缕草 *ZjDREB* A₂组基因在干旱(20% PEG-6000)和高盐(200 mmol·L⁻¹ NaCl)胁迫下的表达模式分析 Expression profiling of *ZjDREB* A₂ group genes under drought (20% PEG-6000) and high salt (200 mmol·L⁻¹ NaCl) stress treatment.

基因结构分析显示 *ZjDREB* 家族基因中 27 个基因没有内含子, 其中 A₃ 组 *ZjDREB54* 包含的内含子数量最多, 为 8 个。在 A₁ 和 A₂ 组中, *ZjDREB1*、*ZjDREB9*、*ZjDREB12*、*ZjDREB13* 和 *ZjDREB24* 均只含有一个内含子, 而 *ZjDREB11*、*ZjDREB19* 和 *ZjDREB21* 缺乏内含子。这与 *DREB* 家族基因在多个物种中少内含子的特征一致, 如欧李 (*Cerasus humilis*)^[43], 文冠果 (*Xanthoceras sorbifolium*)^[44], 马铃薯^[17] 和玉米^[11] 等。有研究显示内含子数量与基因响应胁迫应答的速度有关, 内含子的存在能够引起选择性剪切, 增加了基因从转录到翻译所需要的时间, 以至于延迟了调节反应^[45]。这也说明 *ZjDREB* 家族基因可能在结缕草胁迫应答的早期发挥重要作用。从 *ZjDREB* 家族基因蛋白序列鉴定到的 10 个保守基序中, motif1、motif2 和 motif3 在所有蛋白序列中的分布相对保守, 为 AP2 保守结构域的组成部分。另外, 同一组内的成员往往具有相似的基序组成, 例如 motif4 和 motif9 只分布在 A₃ 组中, 这也说明相同组内的 *ZjDREB* 基因在功能上相似, 而在不同组之间具有功能特异性。

由于 A₁ 和 A₂ 组为典型的 *DREB* 蛋白, A₁ 组也被称为 *DREB1s*, A₂ 组也被称为 *DREB2s*^[11,46]。因此, 对结缕草 *ZjDREB* 转录因子 A₁ 和 A₂ 组成员的 AP2 结构域、非生物胁迫下的表达模式以及启动子区域的顺式作用元件进行了进一步分析。对 A₁ 和 A₂ 组成员 AP2 结构域的序列分析中发现, 第 14 位的缬氨酸(V)是保守的, 而第 19 位的氨基酸在 A₁ 组中的 *ZjDREB12* 为缬氨酸(V), 而非谷氨酸(E), 说明该位点氨基酸的保守性并不是绝对的, 这与拟南芥和辣椒 (*Capsicum annuum*) 中关于 *DREB* 保守结构域中第 14 和 19 位氨基酸的保守性研究一致^[9,47]。研究表明, *DREB* 转录因子 A₁ 组成员参与低温胁迫应答, 如拟南芥的 *AtCBF1*, 水稻 *DREB1A/CBF3*、*DREB1B/CBF1* 和 *DREB1C/CBF2* 等在低温胁迫下均能被快速诱导表达^[26,48]。A₂ 组成员主要与植物的抗旱和耐盐性有关, 如拟南芥的 *AtDREB2A*、*AtDREB2B* 受脱水和高盐胁迫诱导表达^[9]。对结缕草 *ZjDREB* A₁ 和 A₂ 组基因的启动子分析显示, A₁ 和 A₂ 组含有多个与植物激素、光、低温和干旱等逆境响应相关的作用元件, 表明 A₁ 和 A₂ 组基因在结缕

草胁迫信号传导和应答过程中发挥重要调控作用。

在低温、脱落酸、干旱和盐胁迫处理后,部分 *ZjDREB* A₁和 A₂基因明显被诱导表达,说明其在结缕草幼苗期的胁迫应答中发挥关键作用。其中, A₁组基因 *ZjDREB3*受低温诱导上调幅度最大,且启动子区域未检测到低温胁迫的 LTR 元件,这一结果与文冠果中部分低温诱导表达基因的结果相同^[44],这可能与 *ZjDREB3*无内含子的基因结构以及胁迫处理的时间点有关。另外, A₁组基因受外源施加的 ABA 诱导表达,这与水稻^[49]和番茄(*Solanum lycopersicum*)^[50]等物种中关于 *DREB* 基因的结果相同。A₂组基因在干旱和高盐胁迫处理下,表达量发生变化。其中 *ZjDREB9*受干旱胁迫诱导先下降后上升,而在高盐胁迫诱导下先上升后下降, Wang 等^[40]早期用 3'和 5' RACE 的方法克隆得到该基因,并命名为 *ZjDREB1*,发现该基因在 3 种不同的结缕草品系(“Meyer”“Palisades”和“Lanyin 3”)中受低温诱导上调表达,表明该基因可能在结缕草的非生物胁迫耐受性中发挥重要调节作用。

4 结论

本研究基于结缕草基因组数据,对 *ZjDREB* 转录因子家族基因进行了系统的筛选与鉴定,共鉴定到 64 个 *ZjDREB* 基因。系统进化分析将其分为 A₁~A₆共 6 组,其中 61 个基因不均匀地分布在 20 条染色体中的 14 条上。保守基序 motif1、motif2 和 motif3 在所有 *ZjDREB* 蛋白序列中的分布相对保守,而在所有 *ZjDREB* 基因中,未鉴定到串联重复基因,共有 3 对由于片段重复引起的重复基因。*ZjDREB* A₁和 A₂组基因在结缕草的低温、ABA、干旱和高盐胁迫下的表达模式分析显示, A₁和 A₂组基因广泛参与结缕草的低温、脱落酸、干旱和高盐胁迫响应过程。本研究结果为进一步探索 *ZjDREB* 基因的功能奠定了基础,也为结缕草抗非生物胁迫新品种的创制提供了候选基因。

参考文献 References:

- [1] Zhang X Y, Yang S H, Ding Y L, *et al.* Molecular mechanism of cold signal perception and transduction in plants. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(11): 28–35.
张晓燕, 杨淑华, 丁杨林, 等. 植物感知和传递低温信号的分子机制. *生物技术通报*, 2023, 39(11): 28–35.
- [2] Lee Z, Lim J A, Harikrishna J A, *et al.* Regulation of plant responses to temperature stress: a key factor in food security and for mitigating effects of climate change. *International Journal of Plant Production*, 2024, 18(2): 141–159.
- [3] Zhang H M, Zhu J H, Gong Z Z, *et al.* Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 2022, 23(2): 104–119.
- [4] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1998, 10(8): 1391–1406.
- [5] Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, 94(3): 1035–1040.
- [6] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, *et al.* Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411–432.
- [7] Xue G P. Characterisation of the DNA-binding profile of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(15): e77.
- [8] Sharma M K, Kumar R, Solanke A U, *et al.* Identification, phylogeny, and transcript profiling of *ERF* family genes during development and abiotic stress treatments in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 284(6): 455–475.
- [9] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 290(3): 998–1009.
- [10] Jadhao K, Samal K, Pradhan S, *et al.* Studies on molecular characterization of *DREB* gene in Indica rice (*Oryza sativa* L.). *Hereditary Genetics*, 2014, 3(3): 1–12.
- [11] Liu S X, Wang X L, Wang H W, *et al.* Genome-wide analysis of *ZmDREB* genes and their association with natural variation in drought tolerance at seedling stage of *Zea mays* L. *PLoS Genetics*, 2013, 9(9): e1003790.
- [12] Niu X, Luo T L, Zhao H Y, *et al.* Identification of wheat *DREB* genes and functional characterization of *TaDREB3* in response

- to abiotic stresses. *Gene*, 2020, 740: 144514.
- [13] Xu L, Lan Y, Lin M H, *et al.* Genome-wide identification and transcriptional analysis of *AP2/ERF* gene family in pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(5): 2470.
- [14] Fu W. Genome-wide identification and characterization of the *AP2/ERF* gene family in quinoa (*Chenopodium quinoa*) and their expression profiling during abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2024, 43(4): 1118–1136.
- [15] Zhou Y X, Zhou W, Liu H, *et al.* Genome-wide analysis of the soybean *DREB* gene family: Identification, genomic organization and expression profiles in response to drought stress. *Plant Breeding*, 2020, 139(6): 1158–1167.
- [16] Ghorbani R, Zakipour Z, Alemzadeh A, *et al.* Genome-wide analysis of AP2/ERF transcription factors family in *Brassica napus*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2020, 26(7): 1463–1476.
- [17] Mushtaq N, Munir F, Gul A, *et al.* Genome-wide analysis, identification, evolution and genomic organization of *dehydration responsive element-binding (DREB)* gene family in *Solanum tuberosum*. *PeerJ*, 2021, 9: e11647.
- [18] Su J C, Song S L, Wang Y T, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of DREB family genes in cotton. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 169.
- [19] Qiu W J, Li H Y, Song Y, *et al.* Genome wide analysis of *DREB* genes in sugar beet and their potential functions in response to drought stress. *Sugar Tech*, 2024, 26(5): 1306–1322.
- [20] Wang W L, Sun T X, Fang Z F, *et al.* Genome-wide identification of DREB1 transcription factors in perennial ryegrass and functional profiling of LpDREB1H2 in response to cold stress. *Physiologia Plantarum*, 2024, 176(1): e14210.
- [21] Liu Y M, Cai L Q, Zhu J L, *et al.* Genome-wide identification, structural characterization and expression profiling of AP2/ERF gene family in bayberry (*Myrica rubra*). (2024-04-29) [2024-07-01]. <https://www.researchsquare.com/article/rs-4318206/v1>.
- [22] Ye P Q, Che X L, Liu Y, *et al.* Genome-wide identification and characterization of the AP2/ERF gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *PeerJ*, 2024, 12: e17388.
- [23] Zhu P H, Chen Y, Zhang J F, *et al.* Identification, classification, and characterization of AP2/ERF superfamily genes in Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.). *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 5441.
- [24] He X, Duan H L, Luo L J, *et al.* Morphological characteristics variations of germplasm resources in *Zoysia* Willd. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(13): 4364–4376.
何潇, 段宏利, 罗丽娟, 等. 结缕草属种质资源形态特征变异. *分子植物育种*, 2024, 22(13): 4364–4376.
- [25] Gilmour S J, Zarka D G, Stockinger E J, *et al.* Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *The Plant Journal*, 1998, 16(4): 433–442.
- [26] Donde R, Gupta M K, Gouda G, *et al.* Computational characterization of structural and functional roles of DREB1A, DREB1B and DREB1C in enhancing cold tolerance in rice plant. *Amino Acids*, 2019, 51(5): 839–853.
- [27] Moon S J, Min M K, Kim J A, *et al.* Ectopic expression of *OsDREB1G*, a member of the *OsDREB1* subfamily, confers cold stress tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 297.
- [28] Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, *et al.* Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant Journal*, 2007, 50(1): 54–69.
- [29] Hu B, Jin J P, Guo A Y, *et al.* GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 2015, 31(8): 1296–1297.
- [30] Bailey T L, Boden M, Buske F A, *et al.* MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: W202–W208.
- [31] Chen C J, Wu Y, Li J W, *et al.* TBtools-II: A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining. *Molecular Plant*, 2023, 16(11): 1733–1742.
- [32] Voorrips R. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 2002, 93(1): 77–78.
- [33] Wang Y P, Tang H B, DeBarry J D, *et al.* MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(7): e49.
- [34] Krzywinski M, Schein J, Birol I, *et al.* Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Research*, 2009, 19(9): 1639–1645.
- [35] Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.

- [36] Liu K, Li G J, Yang Q, *et al.* Research progress in DREB/CBF transcription factor involved in responses in plant to abiotic stress. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(5): 201–214.
刘坤, 李国婧, 杨杞, 等. 参与植物非生物逆境响应的 DREB/CBF 转录因子研究进展. *生物技术通报*, 2022, 38(5): 201–214.
- [37] Feng W Q, Ma L P, Jiang X X, *et al.* Cloning and expression analysis of a transcription factor gene *ZjDREB1.2* from *Zoysia*. *Northern Horticulture*, 2018(18): 75–85.
冯婉倩, 马礼鹏, 蒋笑笑, 等. 结缕草转录因子基因 *ZjDREB1.2* 的克隆及胁迫下的表达分析. *北方园艺*, 2018(18): 75–85.
- [38] Feng X W, Cai H W. Cloning of zoysiagrass *CBF* gene and validation of cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(9): 1572–1578.
冯勋伟, 才宏伟. 结缕草 *CBF* 基因的同源克隆及其转基因拟南芥的抗寒性验证. *作物学报*, 2014, 40(9): 1572–1578.
- [39] Ke X, Nong J X, Shi D L, *et al.* Cloning and expression profile of *DREB2.2* gene from *Zoysia japonica* var. *pallida* cv *Jiaodong*. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(1): 115–123.
可祥, 农钧琇, 石大林, 等. 日本结缕草 ‘胶东青’ *DREB2.2* 基因克隆及表达模式研究. *生物技术通报*, 2016, 32(1): 115–123.
- [40] Wang Z, Zhang F, Xuan J, *et al.* Isolation and expression profiles of the *ZjDREB1* gene encoding a DRE-binding transcription factor from zoysiagrass (*Zoysia japonica*). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2012, 87(1): 77–83.
- [41] Li J, Wu Q, Zhang L J, *et al.* Cloning and expression profiles of a transcription factor gene *ZjDREB4.1* in *Zoysia japonica* under adversity. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(2): 80–88.
李京, 吴奇, 张琳婕, 等. 结缕草转录因子基因 *ZjDREB4.1* 克隆和逆境表达模式. *生物技术通报*, 2017, 33(2): 80–88.
- [42] Sharoni A M, Nuruzzaman M, Satoh K, *et al.* Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(2): 344–360.
- [43] Wang Z W, Yang Y W, Wang P F, *et al.* Identification and analysis of *DREB* gene family in *Cerasus humilis*. *Plant Physiology Journal*, 2020, 56(3): 413–422.
汪泽文, 杨依维, 王鹏飞, 等. 欧李 *DREB* 基因家族的鉴定与分析. *植物生理学报*, 2020, 56(3): 413–422.
- [44] Lu X, Gou Y F, Li X Y, *et al.* Identification and abiotic stress expression analysis of *DREB* transcription factor family in yellowhorn. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(15): 4948–4961.
陆昕, 苟亚夫, 李显玉, 等. 文冠果 *DREB* 转录因子家族鉴定及非生物胁迫表达分析. *分子植物育种*, 2023, 21(15): 4948–4961.
- [45] Jeffares D C, Penkett C J, Bähler J. Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends in Genetics*, 2008, 24(8): 375–378.
- [46] Li Z, Wang G, Liu X H, *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of *DREB* genes in *Saccharum spontaneum*. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 456.
- [47] Zheng J Q, Wang W W, Mei Y, *et al.* Identification of *DREB* transcription factor in pepper and expression analysis of *DREB* gene under waterlogging stresses. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 39(1): 148–159.
郑佳秋, 王薇薇, 梅焱, 等. 辣椒 *DREB* 转录因子鉴定及其在涝害胁迫下的表达分析. *江苏农业学报*, 2023, 39(1): 148–159.
- [48] Jaglo-Ottosen K R, Gilmour S J, Zarka D G, *et al.* *Arabidopsis CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 1998, 280(5360): 104–106.
- [49] Zhao L F, Hu Y B, Chong K, *et al.* *ARAG1*, an ABA-responsive *DREB* gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice. *Annals of Botany*, 2010, 105(3): 401–409.
- [50] Upadhyay R K, Gupta A, Soni D, *et al.* Ectopic expression of a tomato *DREB* gene affects several ABA processes and influences plant growth and root architecture in an age-dependent manner. *Journal of Plant Physiology*, 2017, 214: 97–107.