

刘金洋, 林 云, 陈景斌, 等. 绿豆 C_3H 和 NBS 转录因子家族成员鉴定及盐胁迫响应分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(5): 1097-1109.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.05.002

绿豆 C_3H 和 NBS 转录因子家族成员鉴定及盐胁迫响应分析

刘金洋, 林 云, 陈景斌, 闫 强, 薛晨晨, 吴然然, 陈 新, 袁星星

(江苏省农业科学院经济作物研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: NBS 和 C_3H 是植物体内 2 个重要的转录因子家族,在调控植物抗病与耐盐方面不可或缺。本研究通过转录组数据分析、qRT-PCR 分析,分别鉴定出 30 个和 289 个绿豆 C_3H 和 NBS 家族成员,2 个基因家族各有 13 个基因受到纯化选择,并且 C_3H 和 NBS 基因家族种内共线性关系均为片段重复。耐盐材料的转录组数据分析结果表明, VrC_3H5 、 VrC_3H7 、 VrC_3H10 和 VrC_3H13 等 4 个基因的表达量在盐胁迫后发生显著改变。 VrC_3H5 、 VrC_3H7 和 VrC_3H13 3 个基因对脱落酸(ABA)处理、氯化钠(NaCl)处理、干旱胁迫都有不同程度的响应, VrC_3H5 在 ABA 处理后基因表达量上调超过了 10 倍。在 NBS 基因中,有 85 个基因在盐胁迫 10 d 和 15 d 后出现显著差异表达,其中 9 个 NBS 基因表达变化值 $|\log_2 FC|$ (FC 为表达倍数变化)大于 2。 $VrNBS20$ 转录因子通过调控 *EVM0022385* 参与绿豆的耐盐功能, $VrNBS20$ 可能是绿豆抗病与耐盐调控网络中的交叉点。本研究结果为绿豆耐盐与抗病研究提供了丰富的基因资源。

关键词: 绿豆; NBS 基因家族; C_3H 基因家族; 盐胁迫; $VrNBS20$ 转录因子

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)05-1097-13

Identification and salt stress response analysis of mungbean C_3H and NBS transcription factor family members

LIU Jin-yang, LIN Yun, CHEN Jing-bin, YAN Qiang, XUE Chen-chen, WU Ran-ran, CHEN Xin, YUAN Xing-xing

(Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory of Efficient Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: NBS and C_3H are two important transcription factor families in plants, which are indispensable in regulating plant disease resistance and salt tolerance. In this study, through transcriptome data analysis and qRT-PCR analysis, 30 and 289 mungbean C_3H and NBS family members were identified, respectively. Thirteen C_3H and 13 NBS genes were purified and selected, and the intraspecific collinearity analysis of C_3H and NBS gene families was fragment duplication. The transcriptome data analysis of salt-tolerant materials showed that the expression levels of VrC_3H5 , VrC_3H7 , VrC_3H10

and VrC_3H13 were significantly changed after salt stress. VrC_3H5 , VrC_3H7 and VrC_3H13 had different degrees of response to abscisic acid (ABA) treatment, sodium chloride (NaCl) treatment and drought stress. The expression of VrC_3H5 was up-regulated by more than 10 times after ABA treatment. A total of 85 NBS genes were significantly differentially expressed after 10 days and 15 days of salt stress, of which nine NBS genes had a change in expression value $|\log_2 FC|$ (FC was the expression fold change) greater than two. $VrNBS20$ was involved in the salt tolerance function of mung bean by regulating *EVM0022385*,

收稿日期: 2022-11-29

基金项目: 科学技术部重点研发政府间国际合作项目(2019YFE0109100); 江苏省一带一路国际合作项目(BZ2022005); 国家食用豆产业技术体系项目(CARS-08-G15); 江苏省种业揭榜挂帅项目[JBG(2021)004]; 国家自然科学基金项目(32200499); 江苏省林业科技创新与推广项目[LYKJ(2021)22]

作者简介: 刘金洋(1988-), 男, 安徽亳州人, 博士, 助理研究员, 主要从事豆类作物分子育种研究。(E-mail) 20200024@jaas.ac.cn

通讯作者: 陈 新, (E-mail) cx@jaas.ac.cn; 袁星星, (E-mail) yxx@jaas.ac.cn

and VrNBS20 may be the intersection point in the disease resistance and salt tolerance regulatory network of mungbean. The results of this study provide abundant genetic resources for the study of salt tolerance and disease resistance of mungbean.

Key words: mungbean; *NBS* gene family; *C₃H* gene family; salt stress; VrNBS20 transcription factor

绿豆 (*Vigna radiata* L.), 属于豆科豇豆属, 含有 22 条染色体^[1]。作为功能性食品原料, 绿豆籽粒富含蛋白质、多种人体必需氨基酸、碳水化合物、膳食纤维及生物活性物质。随着人们生活水平的提高和对健康饮食的需求, 绿豆的高营养价值开始被人们重视, 绿豆的需求量逐渐增大^[2]。然而, 盐胁迫与病害严重制约着温带、亚热带及热带地区绿豆的生产, 尤其以印度、中国、泰国、缅甸和菲律宾等国家为代表。挖掘抗性基因并应用于抗性育种已成为主要农作物抗性育种的主要方法之一。目前, 在挖掘绿豆抗性基因方面的研究还不是很深入, 有关绿豆耐盐相关的全基因组关联分析和遗传定位的研究还很少。转录因子作为植物的内在调控因子, 在植物应对非生物与生物胁迫中具有重要的调控作用。因此, 利用比较基因组学挖掘、鉴定绿豆抗病与盐胁迫响应的转录因子对绿豆的遗传改良至关重要。

NBS (Nucleotide binding site) 和 *C₃H* (CCCH) 是植物体内 2 个重要的转录因子家族, 具有独特的功能和结构, 在调控植物的抗病与耐盐信号转导方面起重要作用^[3-5]。NBS 转录因子家族是植物中大转录因子家族之一, 含有 TIR、NBS 和 LRR 等结构域。NBS 结构域主要介导下游信号转导^[6], LRR 结构域主要介导蛋白质之间的互作。根据转录因子 N 端是否含有 TIR 结构域将其分为两个亚类^[7]。一类为含有 TIR-NBS-LRR 结构域的 TNL 型; 另一类 *R* 基因编码的蛋白质通常被 CC (Coiled-Coil) 替代, 又称 CC-NBS-LRR (CNL) 型^[8]。植物体内 NBS 基因的数量从几十个到上千个不等^[8-10]。同时, NBS 基因组成的不同会导致植物对病原体抗性形成差异^[11]。NBS 基因通常包含各种类型的重复, 这些重复对 NBS 基因的功能有着重要影响^[12]。NBS 转录因子基因已被证明在花生青枯病、大豆花叶病、番茄菟丝子、葡萄霜霉病抗性调控中起着重要作用^[13-17]。NBS 转录因子基因在植物非生物胁迫中的研究还较少, 挖掘具有抗逆和抗病作用的多功能转录因子基因对绿豆的抗病和耐逆育种至关重要。

C₃H 家族转录因子属于锌指蛋白, 包含 1~6 个 CCCH 结构, 主要含有 3 个半胱氨酸和 1 个组氨酸残

基^[18-19]。含有 C-X₇₋₈-C-X₅-C-X₃-H 基序的 *C₃H* 蛋白是最大的一类 *C₃H* 转录因子^[20-21]。*C₃H* 基因家族参与植物发育和逆境适应等过程, 在激素调节下对植物的生长起重要作用。在水稻中, *OsDOS* (*C₃H* 基因) 参与茉莉酸 (JA) 代谢, 过表达该基因能显著延缓叶片衰老^[22]。在拟南芥中, *C₃H14* 和 *C₃H15* 基因能够调节花药发育和雄性育性^[23]。此外, 一些 *C₃H* 锌指蛋白还参与植物的非生物胁迫反应。*ZFP1* 通过维持细胞中离子平衡来调节渗透胁迫, 提高植物的耐盐性。*C₃H* 型锌指蛋白基因 *AtSZF1* 和 *AtSZF2* 能够正向调控拟南芥的耐盐性^[24]。过表达 *C₃H18* 后, 甘薯对干旱和高盐环境的抗性显著增强^[25]。在水稻中, *zfp5* 突变体在盐胁迫和渗透胁迫下, 萌发率、主根长、脯氨酸含量、叶绿素含量及活性氧清除酶的活性显著小于野生型, 而 *ZFP5* 基因过表达株系在盐胁迫和渗透胁迫下, 萌发率、主根长、脯氨酸含量、叶绿素含量及活性氧清除酶的活性显著大于野生型^[26]。

转录因子在非生物胁迫调控中具有重要作用, WRKY、MYB、*C₃H* 和 HDZip 型转录因子含有相应的顺式作用元件可以介导 ABA 响应基因的表达, 他们在多种植物盐胁迫逆境下被诱导^[27]。此外, 水稻 ERF1 转录因子能够与 ABA 信号通路下游 *OsABI5* 基因启动子结合, 抑制其表达, 增强水稻种子在盐胁迫下的萌发率^[28]。上述研究结果表明包括转录因子在内的 ABA 合成表达调控基因在植物非生物逆境的响应与适应方面发挥了重要的作用。

目前, 有关绿豆 NBS 和 *C₃H* 基因家族成员组成、序列及进化特征, 与盐胁迫响应相关的 NBS 和 *C₃H* 候选基因还缺乏研究。本研究以江苏省农业科学院经济作物研究所保存的苏绿 1 号为材料, 鉴定绿豆 NBS 和 *C₃H* 基因家族成员, 分析 NBS 和 *C₃H* 基因家族成员碱基序列及进化特征, 并挖掘盐胁迫响应相关的 NBS 和 *C₃H* 候选基因, 为绿豆的抗病与耐盐育种提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料和处理

本研究使用的绿豆品种为江苏省农业科

学院经济作物研究所保存的苏绿1号,将其种植于28℃恒温温室,16 h光期、8 h暗期培养7 d后分别用20%的PEG6000、100 μmol/L的脱落酸(ABA)和100 mmol/L的盐(NaCl)溶液对幼苗进行胁迫处理,以无胁迫为对照,在处理0 h、4 h、12 h、24 h、48 h后随机选取不同处理幼苗5株,取根部组织约0.1 g,进行qRT-PCR分析。

选取2个耐盐材料A1和A3及2个不耐盐材料C1和C2^[29],幼苗出芽后第10 d,分别用100 mmol/L盐溶液处理,盐处理后10 d与15 d取上述材料的叶片用以转录组分析,分析NBS和C₃H家族基因在盐胁迫下表达变化。

1.2 绿豆NBS和C₃H基因家族成员筛选、保守基序和进化树分析

首先,从网站<https://www.arabidopsis.org>和https://www.researchgate.net/publication/347076195_high-quality_genome_assembly_annotation_and_evolutionary_analysis_of_the_mungbean_Vigna_radiata_genome下载拟南芥NBS和C₃H蛋白氨基酸序列和绿豆基因组编码的蛋白质序列,利用NCBI blast软件进行序列比对,设置E-value为 1×10^{-100} ,筛选得到绿豆NBS和C₃H候选基因。其次,利用pfam网站(<http://pfam-legacy.xfam.org>)分析上述候选基因编码蛋白质的保守结构域,去除编码蛋白质中不含C-X₇₋₈-C-X₅-C-X₃-H和TIR、NBS、LRR结构域的候选基因。随后利用MEME软件(<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>)和MEGA7软件,采用Neighbor-Joining法,迭代1 000次,对NBS和C₃H家族基因进行进化树分析,再利用TBtools软件对NBS和C₃H家族基因进行保守基序的聚类分析^[30]。

1.3 NBS和C₃H家族基因染色体定位、启动子和共线性分析

利用TBtools软件的GFF3/GTF Gene Position (Info.) Parse模块获取上述候选基因在染色体上的位置。利用PlantCARE网站分析C₃H基因家族成员上游启动元件(5'上游选2 000 bp),筛选与植物逆境响应相关的元件,并进行可视化作图。根据拟南芥与绿豆NBS和C₃H基因家族成员的序列,分析NBS和C₃H家族物种间共线性特点。同时,采用TBtools软件对绿豆NBS和C₃H家族物

种内共线性特点进行分析,并估算共线性基因的非同义替换率(Ka)和同义替换率(Ks),以Ka/Ks值估测基因家族在进化过程中受到的选择压力。

1.4 绿豆NBS和C₃H基因家族成员在盐胁迫下表达变化分析

使用FlaPure Plant Total RNA Extraction Kit试剂盒(北京金沙生物科技有限公司产品)提取绿豆根部总RNA。使用UnionScript First-strand cDNA Synthesis Mix for qPCR with dsDNase(北京金沙生物科技有限公司产品)反转录合成绿豆cDNA。使用ChamQ SYBR qPCR Master Mix试剂(南京诺唯赞生物股份有限公司产品)及ABI prism 7500 real-time PCR System(Thermo Fisher公司产品,美国)进行qRT-PCR分析。PCR扩增程序为:95℃预变性30 s;95℃变性10 s,60℃退火10 s,40个循环。基因特异性引物设计采用Primer 5软件,使用的内参基因为VrAC-TIN3(Vradi03g00210)^[29],具体引物信息见表1。每个基因表达量检测设置3个重复。

绿豆NBS和C₃H基因家族候选基因相对表达量分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法,采用FPKM(Fragments Per Kilobase per Million)计算方法分析转录组数据^[31]。使用SPSS软件中的t检验法对基因表达水平进行差异显著性分析。

1.5 差异转录因子调控基因的预测

将差异表达显著的C₃H和NBS转录因子氨基酸序列上传至网站<https://www.string-db.org>进行转录因子调控基因预测,设置显著作用值为0.40,分析转录因子显著调控的基因,利用cytoscape软件对结果进行可视化作图。

2 结果与分析

2.1 绿豆C₃H和NBS基因家族成员分布

通过NCBI blast比对及MEME、pfam网站保守基序分析,在绿豆全基因组共筛选得到30个C₃H基因(表2),289个NBS基因。30个C₃H基因主要分布在1号、3号、5号、6号、8号染色体上,10号染色体没有C₃H基因,9号染色体仅有1个C₃H基因EVM0029904.1,1号、3号和8号染色体上分别有5个C₃H基因(图1a)。289个NBS基因主要分布在1号、7号、8号、9号和10号染色体上,4号和6号染色体分别有7个和5个NBS基因(图1b),另有14个NBS基因分布在重叠群上。

表 1 引物列表

Table 1 The list of primers used in the study

引物	序列 (5'→3')	产物大小 (bp)
<i>EVM0017299-F</i>	CCCGAGCAACTAAGGGTGT	170
<i>EVM0017299-R</i>	CGAGTCATCGGAGACATGGG	
<i>EVM0018432-F</i>	TAGCTCGCAGCAAACAATGC	194
<i>EVM0018432-R</i>	GGAACGGTAGGAGACTGCAC	
<i>EVM0019299-F</i>	ATACGCCCGAGCAACTAAGG	188
<i>EVM0019299-R</i>	CAAAGACCCCGAACGAGTCA	
<i>EVM0024653-F</i>	CCGCAAGTTCTCTACTCCG	189
<i>EVM0024653-R</i>	TCGTTGGTGTGAGCGAAGAA	
<i>VrACTIN3-R</i>	TTCCTTATGTTGGGTTTGC	192
<i>VrACTIN3-F</i>	GCTCGTCTACCTCTTTGTG	

2.2 C_3H 和 *NBS* 基因家族进化树及保守结构分析

C_3H 和 *NBS* 基因家族进化树分析结果显示, C_3H 家族分为 3 个分支(图 2a), 位于同一分支的基因具有较高的同源性和保守型。 C_3H 基因家族不同分支保守基序差异性较大, 分支 I 9 个基因, 含有 2 种保守基序(基序 1 和基序 2); 分支 II 7 个基因, 含有保守基序 4; 分支 III 14 个基因, 含有保守基序 3(图 2b、图 2c)。*NBS* 基因家族分为两个分支, 分支 I 含有成员数为 155; 分支 II 含有成员数为 134(图 3)。两分支保守基序差异性较小。虽然 *NBS* 基因家族所含的保守结构相似, 但是这些基因的碱基序列长度差异性较大。在位于 11 条染色体上的 275 个基因中, 分支 I 基因的平均长度为 3 381.5 bp, 分支 II 基因的平均长度为 4 070.9 bp, 分支 I 和分支 II 成员在基因碱基序列长度方面差异较大, 说明 *NBS* 基因家族的功能多样性。

C_3H 基因家族成员上游 2 000 bp 碱基序列除了具有光响应、逆境和无氧响应元件外, 还具有多种植物激素(茉莉酸甲酯、赤霉素、水杨酸及 ABA 等)响应元件(图 2d)。其中有 12 个 C_3H 基因的启动子区域存在 ABA 响应元件, 14 个 C_3H 基因启动子区域存在茉莉酸甲酯响应元件, 12 个 C_3H 基因的启动子区域存在赤霉素响应元件, 14 个 C_3H 基因启动子区域存在干旱胁迫响应元件 [MBS (CAACTG)]。这些结果说明 C_3H 基因家族与植物的生长发育以及响应逆境有关, 这种特征在其他植物中亦有体现^[24]。

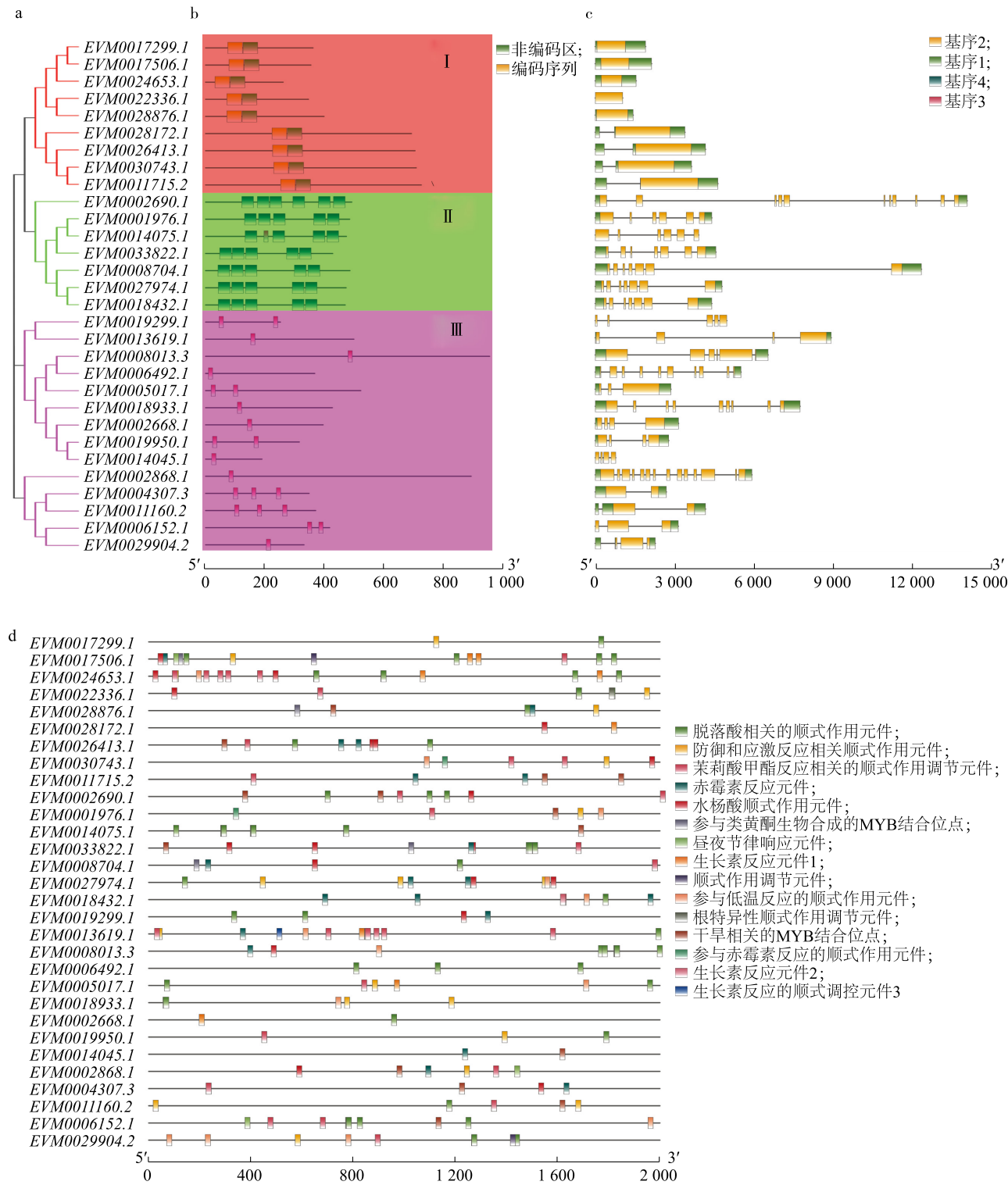
表 2 苏绿 1 号 C_3H 基因家族成员及其编码的氨基酸序列长度Table 2 C_3H gene family members and the length of their encoded amino acids

基因	所在染色体	编码区大小 (bp)	编码的氨基酸序列长度 (aa)
<i>VrC₃H1</i> (<i>EVM0005017.1</i>)	1 号	5 808	1 936
<i>VrC₃H2</i> (<i>EVM0004307.1</i>)	1 号	10 477	3 492
<i>VrC₃H3</i> (<i>EVM0001976.1</i>)	1 号	4 408	1 469
<i>VrC₃H4</i> (<i>EVM0011160.2</i>)	1 号	1 736	578
<i>VrC₃H5</i> (<i>EVM0017299.1</i>)	1 号	2 631	877
<i>VrC₃H6</i> (<i>EVM0019950.1</i>)	2 号	740	246
<i>VrC₃H7</i> (<i>EVM0019299.1</i>)	2 号	578	192
<i>VrC₃H8</i> (<i>EVM0006152.1</i>)	3 号	2 085	695
<i>VrC₃H9</i> (<i>EVM0027974.1</i>)	3 号	3 564	1 188
<i>VrC₃H10</i> (<i>EVM0018432.1</i>)	3 号	428	143
<i>VrC₃H11</i> (<i>EVM0026413.1</i>)	3 号	4 132	1 377
<i>VrC₃H12</i> (<i>EVM0014045.1</i>)	3 号	2 551	850
<i>VrC₃H13</i> (<i>EVM0024653.1</i>)	4 号	1 588	529
<i>VrC₃H14</i> (<i>EVM0014075.1</i>)	4 号	1 416	372
<i>VrC₃H15</i> (<i>EVM0002668.1</i>)	5 号	605	202
<i>VrC₃H16</i> (<i>EVM0028172.1</i>)	5 号	923	308
<i>VrC₃H17</i> (<i>EVM0033822.1</i>)	5 号	6 073	2 024
<i>VrC₃H18</i> (<i>EVM0008013.3</i>)	6 号	545	182
<i>VrC₃H19</i> (<i>EVM0008704.1</i>)	6 号	1 583	528
<i>VrC₃H20</i> (<i>EVM0013619.1</i>)	6 号	788	263
<i>VrC₃H21</i> (<i>EVM0018933.1</i>)	7 号	3 231	1 077
<i>VrC₃H22</i> (<i>EVM0017506.1</i>)	7 号	2 662	887
<i>VrC₃H23</i> (<i>EVM0030743.1</i>)	8 号	2 023	674
<i>VrC₃H24</i> (<i>EVM0002690.1</i>)	8 号	303	101
<i>VrC₃H25</i> (<i>EVM0022336.1</i>)	8 号	1 147	382
<i>VrC₃H26</i> (<i>EVM0002868.1</i>)	8 号	968	323
<i>VrC₃H27</i> (<i>EVM0006492.1</i>)	8 号	4 063	1 354
<i>VrC₃H28</i> (<i>EVM0029904.1</i>)	9 号	3 285	1 095
<i>VrC₃H29</i> (<i>EVM0011715.1</i>)	11 号	1 165	388
<i>VrC₃H30</i> (<i>EVM0028876.1</i>)	11 号	5 057	1 686

2.3 绿豆和拟南芥 C_3H 与 *NBS* 基因家族之间共线性分析

绿豆和拟南芥 C_3H 、*NBS* 基因家族共线性分析结果显示, 绿豆 C_3H 基因家族和 *NBS* 基因家族分别有 18 个基因和 7 个基因与拟南芥基因具有共线性(图 4a、图 4b)。这说明 C_3H 基因家族在基因序列上具有较高的保守性, 而 *NBS* 基因家族在基因序列上差异性较大, 表明其功能可能具有多样性。





a: *C₃H*基因家族系统进化树,不同的颜色表示不同的基因家族分支。b: *C₃H*基因家族基因结构;c: *C₃H*基因家族 pfam 结构;d: *C₃H*基因家族顺式作用元件。

图 2 绿豆 *C₃H* 基因家族进化树和 *C₃H* 基因家族基因结构及顺式作用元件

Fig.2 Phylogenetic tree of mungbean *C₃H* gene family and gene structure and *cis*-acting elements of *C₃H* gene family

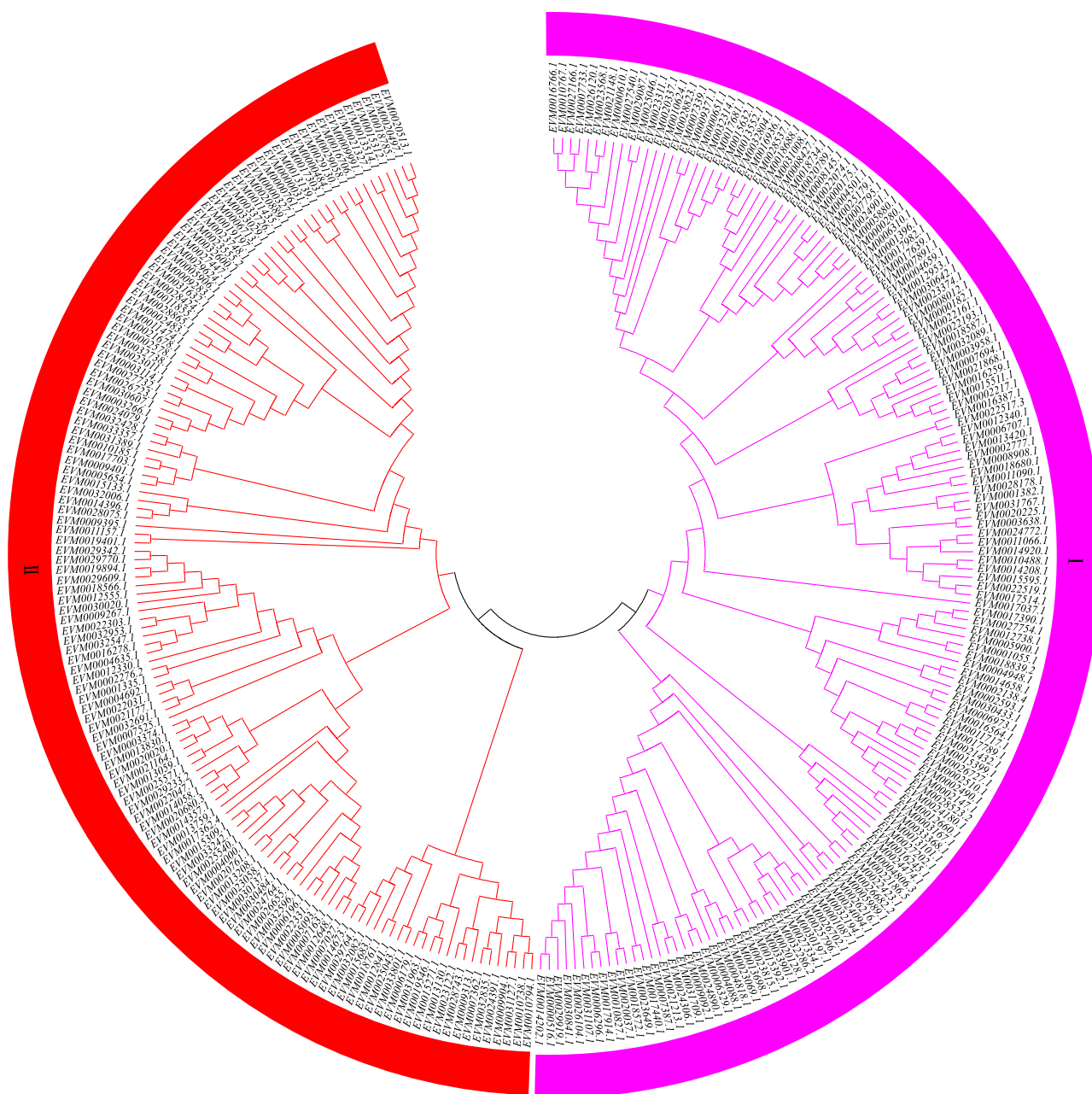


图3 绿豆 NBS 基因家族进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of mungbean NBS gene family

基因组内的共线性分析结果表明,分别有 13 个 C_3H 基因和 13 个 NBS 基因存在共线性(图 4c、图 4d)。 C_3H 共线性基因占有所有成员的 43.3%; NBS 共线性基因仅占有所有成员的 4.5%,即 NBS 基因组内部共线性较差。上述的共线性关系均为片段重复(表 3),并且这些基因共线性关系的 Ka/Ks 值(非同义替换率/同义替换率)均小于 1,说明他们均受到纯化选择。

2.4 C_3H 和 NBS 家族基因盐胁迫下表达特性分析

有 85 个 NBS 基因在盐处理 10 d 后存在显著差异表达,占总家族成员的 29.41%; 141 个 NBS 基因在盐处理 15 d 后存在显著差异表达,占总家族成员的 48.79%; 有 85 个基因在盐处理 10 d 和 15 d 后均出现显著差异表达。在这 85 个差异表达基因中,有 59 个基因的 $|\log_2 FC|$ 值(FC 为差异倍数)大于 0.5(图 5A),其中 46 个基因的表达上调,13 个基因的表达下调。此外, $VrN-$

BS20 (EVM0031127.1)、VrNBS134 (EVM0032953.1)、VrNBS135 (EVM0022303.1)、VrNBS196 (EVM0032738.1)、VrNBS167 (EVM0033726.1)、VrNBS173 (EVM0033029.1)、VrNBS213 (EVM0000182.1)、VrNBS208 (EVM0007891.1) 和 VrNBS223 (EVM0033901.1) 等 9 个基因表达变化幅度较大 ($|\log_2 FC| > 2$)。C₃H 基因家族中有 4 个 C₃H 基因在盐处

理 10 d 后存在显著差异表达, 占总家族成员的 13.33%。9 个 C₃H 基因在盐处理 15 d 后存在显著差异表达 (图 5B), 占总家族成员的 40.00%。其中, VrC₃H5 (EVM0017299.1)、VrC₃H7 (EVM0019299.1)、VrC₃H10 (EVM0018432.1) 和 VrC₃H13 (EVM0024653.1) 4 个基因表达水平变化幅度较大。

表 3 C₃H 和 NBS 基因家族成员的 Ka、Ks 和 Ka/Ks 分析

Table 3 Ka, Ks and Ka/Ks statistics of C₃H and NBS gene family members

基因家族	共线性基因	复制类型	非同义替换率 (Ka)	同义替换率 (Ks)	Ka/Ks	选择压力
C ₃ H	EVM0016018.1 与 EVM0027974.1	片段重复	0.340 177 931	1.283 001 984	0.265 142 171	纯化选择
	EVM0001976.1 与 EVM0014075.1	片段重复	0.218 197 452	0.663 140 759	0.329 036 406	纯化选择
	EVM0016018.1 与 EVM0008704.1	片段重复	0.160 376 807	0.610 994 131	0.262 485 021	纯化选择
	EVM0017299.1 与 EVM0017506.1	片段重复	0.142 389 392	1.340 306 715	0.106 236 424	纯化选择
	EVM0019299.1 与 EVM0000005.1	片段重复	0.152 923 098	1.046 830 934	0.146 081 944	纯化选择
	EVM0027974.1 与 EVM0008704.1	片段重复	0.365 802 176	1.505 969 208	0.242 901 498	纯化选择
	EVM0026413.1 与 EVM0030743.1	片段重复	0.230 559 432	2.091 080 181	0.110 258 533	纯化选择
	EVM0028172.1 与 EVM0004787.1	片段重复	0.336 025 751	1.459 785 553	0.230 188 435	纯化选择
	EVM0022336.1 与 EVM0028876.1	片段重复	0.223 404 268	1.245 031 505	0.179 436 638	纯化选择
	EVM0030743.1 与 EVM0011715.2	片段重复	0.138 123 715	1.001 891 573	0.137 862 938	纯化选择
NBS	EVM0003167.1 与 EVM0027202.1	片段重复	0.644 832 862	2.503 405 493	0.257 582 267	纯化选择
	EVM0023748.1 与 EVM0019197.1	片段重复	0.077 871 488	0.096 199 991	0.809 474 995	纯化选择
	EVM0008012.1 与 EVM0012953.1	片段重复	0.121 134 178	0.263 372 855	0.459 934 181	纯化选择
	EVM0007891.1 与 EVM0030642.1	片段重复	0.154 162 968	0.325 053 358	0.474 269 728	纯化选择
	EVM0002276.2 与 EVM0032691.1	片段重复	0.513 300 413	1.349 353 990	0.380 404 562	纯化选择
	EVM0019401.1 与 EVM0011157.1	片段重复	0.350 334 120	1.259 009 638	0.278 261 667	纯化选择
	EVM0008524.1 与 EVM0032286.2	片段重复	0.491 068 975	1.335 459 106	0.367 715 471	纯化选择
	EVM0013130.1 与 EVM0027202.1	片段重复	0.971 730 972	NaN	NaN	纯化选择

NaN: 序列分歧度太大。

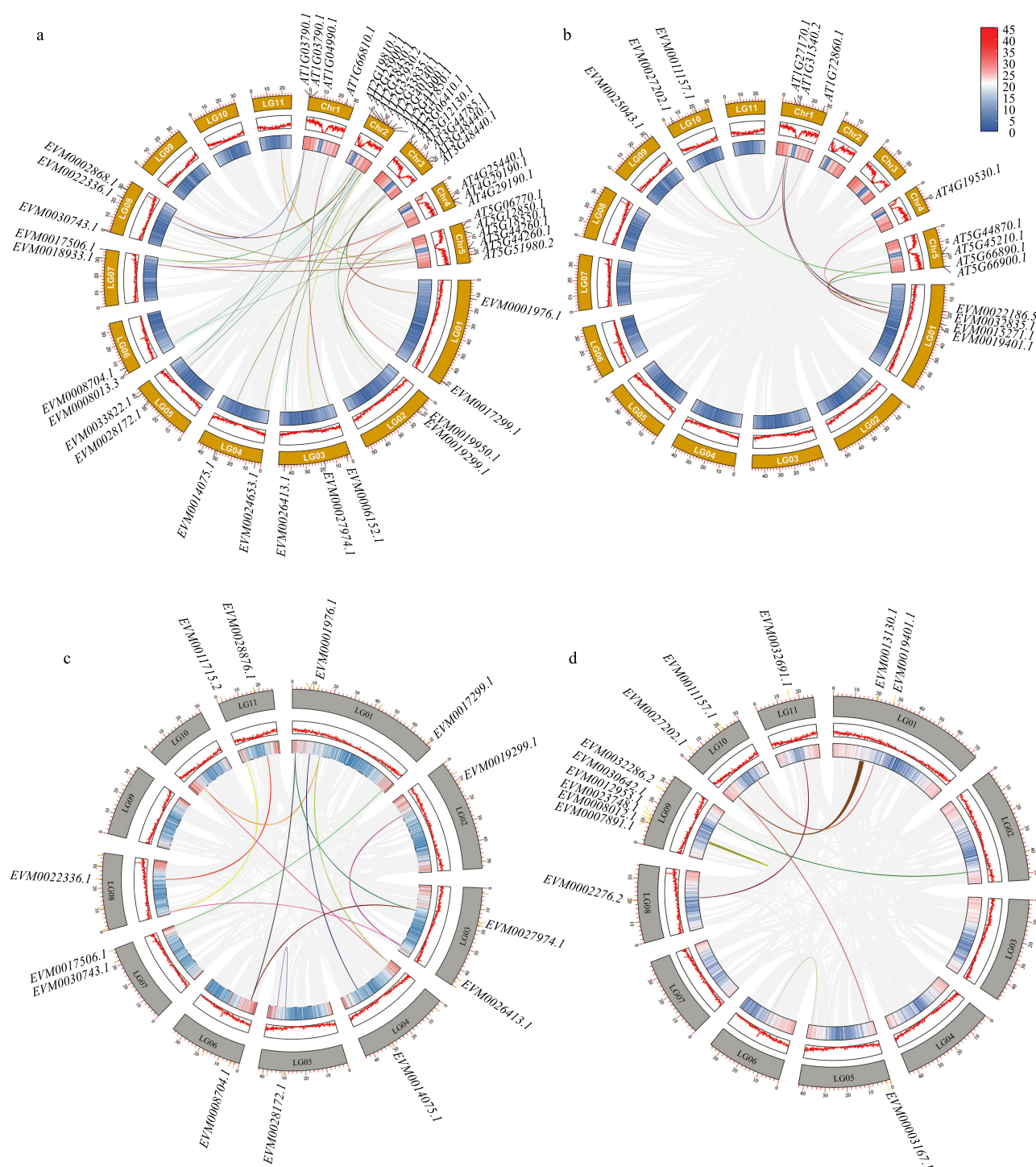
4 个表达水平差异较大的 C₃H 基因 VrC₃H5、VrC₃H7、VrC₃H10 和 VrC₃H13 在 ABA、NaCl、PEG6000 处理后的相对表达量变化如图 5C 所示。VrC₃H5、VrC₃H7 和 VrC₃H13 3 个基因对 ABA、NaCl、PEG6000 处理有不同程度的响应。VrC₃H5 对 ABA 响应较为明显, 处理 4 h 后达到最高值, 其表达量变化超过 10 倍, 之后出现下降。VrC₃H7 在 ABA 处理后 4 h 表达量达到最高值, 之后出现下降; 在 NaCl、PEG6000 处理后 VrC₃H7 表达量下降显著。VrC₃H13 在 ABA 处理后的 4 h 表达量达到最高值, 之后大幅下降, 48 h 后表达量恢复正常。

2.5 差异转录因子调控基因及其互作

在显著作用值 > 0.4 时, 有 2 个 C₃H 差异转录因子调

控基因。其中, VrC₃H5 调控 EVM0001847、EVM0020938 和 EVM0032843 基因, 且 EVM0001847、EVM0020938 和 EVM0032843 这 3 个基因之间存在显著互作关系 (图 6A); VrC₃H7 调控 EVM0019967、EVM0006240、EVM0021757 和 EVM0031747 基因, 其中 EVM0031747 与 EVM0021757、EVM0019967 与 EVM0006240 存在显著互作关系 (图 6B); NBS 家族中仅有 VrNBS20 调控 EVM0022385 基因, 而 EVM0022385 与另外 9 个基因存在显著互作关系 (图 6C)。

在 C₃H 转录因子调控的 7 个基因中, EVM0001847、EVM0032843 和 EVM0021757 在盐处理后出现显著差异表达 (图 6D)。其中, EVM0001847 基因表达量极显著上调。NBS 转录因



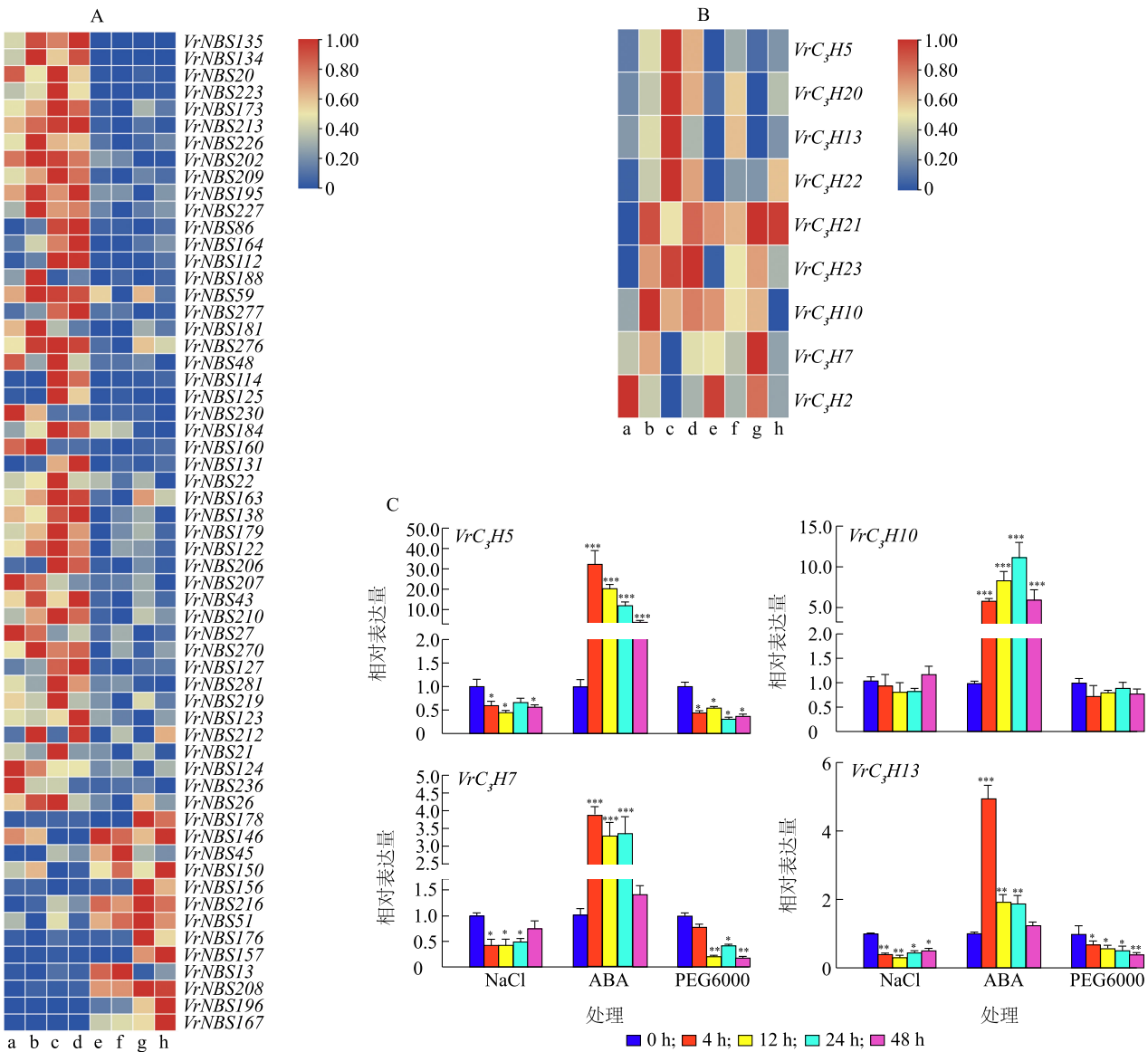
a: 绿豆C₃H家族基因与拟南芥C₃H家族基因间共线性分析; b: 绿豆 NBS 家族基因与拟南芥 NBS 家族基因间共线性分析; c: 绿豆C₃H家族基因内共线性分析; d: 绿豆 NBS 家族基因内共线性分析。LG01、LG02、LG03……分别为绿豆染色体 1、染色体 2、染色体 3……; chr1、chr2、chr3、chr4、chr5 分别为拟南芥染色体 1、染色体 2、染色体 3、染色体 4、染色体 5。

图 4 C₃H和 NBS 家族基因共线性分析

Fig.4 Collinearity analysis of C₃H and NBS family genes

子调控的基因仅 *EVM0022385*, 但有 5 个基因在盐处理后与 *EVM0022385* 一样出现显著差异表达。

其中 *EVM0009188* 基因表达量极显著上调 (图 6D)。



A:盐胁迫下 *NBS* 家族基因差异表达特性分析。B:盐胁迫下 *C₃H* 家族基因差异表达特性分析。C: NaCl、ABA (脱落酸) 和干旱 (20% PEG6000) 胁迫下绿豆 *VrC₃H5*、*VrC₃H10*、*VrC₃H7* 和 *VrC₃H13* 的相对表达量。a: C1-T1; b: C1-T2; c: C2-T1; d: C2-T2; e: A1-T1; f: A1-T2; g: A3-T1; h: A3-T2 (A1 和 A3: 两个耐盐材料; C1 和 C2: 两个不耐盐材料。T1 和 T2 分别表示盐胁迫处理后的第 10 d 和 15 d)。*、**、*** 分别表示与 0 h 相比, 在 0.050、0.010 和 0.001 水平差异显著。

图 5 盐胁迫下 *C₃H* 和 *NBS* 家族差异表达基因热图及 4 个 *C₃H* 基因在 NaCl、ABA (脱落酸) 和干旱 (20% PEG6000) 逆境胁迫下的相对表达量

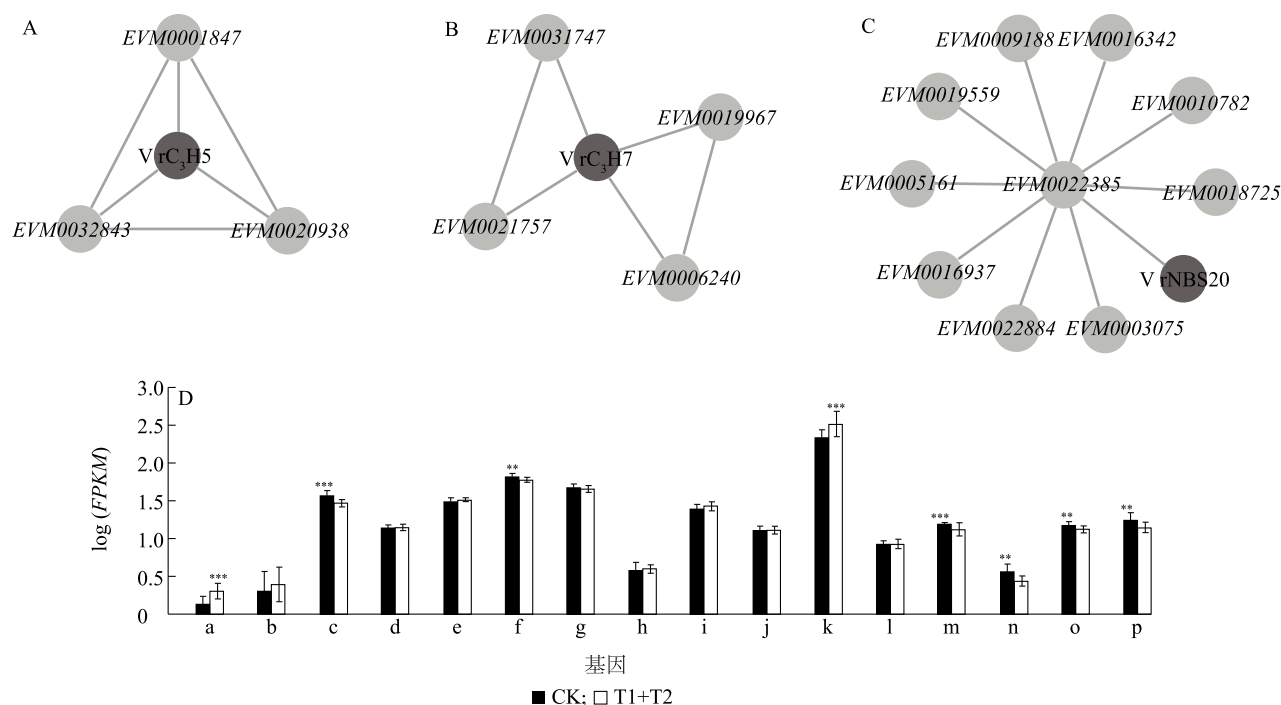
Fig.5 Heat map analysis of differentially expressed genes in the *C₃H* and *NBS* families under salt stress, and the relative expression levels of four *C₃H* genes under NaCl, abscisic acid (ABA) and drought (20% PEG6000) treatments

3 讨论与结论

3.1 *VrC₃H5*、*VrC₃H7* 和 *VrC₃H10* 基因参与干旱胁迫的响应

从低等植物莱茵衣藻到高等植物拟南芥、水稻、

玉米等都普遍存在 *C₃H* 基因^[32-34]。*C₃H* 型锌指蛋白在调节植物发育和胁迫响应中起着重要作用。过表达水稻 *OsC₃H38* 基因能显著提高转基因水稻的耐盐性, 改善水稻的生理指标^[32]; 盐胁迫会引起拟南芥 *AtZFP1* 的表达量上调, 过表达 *AtZFP1* 基因能显



A、B:分别为 VrC₃H5 和 VrC₃H7 转录因子调控的基因及其互作;C 为 VrNBS20 转录因子调控的基因及其互作;D 为与 VrC₃H5、VrC₃H7 和 VrNBS20 转录因子调控的基因及其互作基因在盐处理后的表达水平。a: EVM0001847; b: EVM0020938; c: EVM0032843; d: EVM0019967; e: EVM0006240; f: EVM0021757; g: EVM0031747; h: EVM0022884; i: EVM0016342; j: EVM0003075; k: EVM0009188; l: EVM0005161; m: EVM0016937; n: EVM0010782; o: EVM0018725; p: EVM0019559。CK: 对照组; T1+T2: 盐处理后 10 d 和 15 d 处理组。*、**、*** 分别表示差异达 0.050、0.010 和 0.001 显著水平。

图 6 绿豆 C₃H 和 NBS 转录因子与其互作基因的差异表达分析

Fig.6 Differential expression analysis of genes interacted with C₃H and NBS in mungbean

著提高 NaCl 处理下拟南芥的发芽率和出苗率^[24]。在植物应对盐胁迫的代谢过程中, C₃H 等转录因子发挥着重要的调节功能^[35], 挖掘绿豆耐盐相关的 C₃H 基因对绿豆的耐盐遗传改良至关重要。植物主要通过 ABA 信号途径应对外界盐胁迫^[36-38], 例如, 在拟南芥中发现盐胁迫诱导的类胡萝卜素合成, 能够提供丰富的 ABA 前体以确保 ABA 合成, 增强植株的耐盐性^[35]。水稻细胞壁纤维素合酶类蛋白 OsCSLD4 可以增强水稻 ABA 合成基因的表达, 提高水稻耐盐性^[39]。

本研究通过序列比对和系统发育树分析, 发现 30 个 C₃H 家族成员可划分成 3 个亚家族, 同一亚家族的基序分布模式基本一致, 如 I 亚家族都具有相同的 3 个基序, 不同亚家族之间基序数量差异较大。这 3 个亚家族基因在进化过程中均存在片段复制现象, 并且均受到纯化选择。C₃H 家族成员启动子区域均存在干旱胁迫响应元件。

在耐盐转录组数据分析中, 发现 VrC₃H5、

VrC₃H7、VrC₃H10 和 VrC₃H13 4 个基因变化幅度较大, 同时在盐处理 15 d 后仍存在显著差异表达。这 4 个基因对盐处理较敏感, 可能是与盐胁迫响应相关的候选基因。

在候选基因的 qRT-PCR 分析中, VrC₃H5 在 ABA 处理后的 4 h 后表达量达到最高值, 表达量变化超过 10 倍。VrC₃H7 在 ABA 处理后的 4 h 后表达量达到最高值, 是对照组的 3 倍。VrC₃H10 在 ABA 处理后的 24 h 后表达量达到最高值, 是对照组的 11 倍, 之后出现下降。在 PEG6000 和 NaCl 处理后 VrC₃H5、VrC₃H7 和 VrC₃H13 3 个基因的表达量均出现下降, 而 VrC₃H10 基因的相对表达量没有显著变化。

转录因子调控基因分析结果表明 VrC₃H5 和 VrC₃H7 参与了耐盐调控网络。VrC₃H5、VrC₃H7 和 VrC₃H10 基因对盐胁迫的响应情况和转录组分析的结果较为一致, 表明盐胁迫影响了这些基因的表达。

3.2 绿豆 VrNBS20 可能同时具有抗病和耐盐功能

NBS 基因家族在大豆花叶病、葡萄霜霉病、小麦

叶锈病等植物病害的抗性调控中具有重要作用^[40]。*NBS* 基因是否还参与耐盐调控值得探索。

为了挖掘盐胁迫响应的 *NBS* 基因,研究发现有 85 个 *NBS* 基因在盐处理 10 d 和 15 d 后均出现显著差异表达。在这 85 个差异表达基因中,有 59 个基因盐处理后 15 d 表达变化值 $|\log_2 FC| > 0.5$; 9 个 *NBS* 基因盐处理后 15 d 表达变化值 $|\log_2 FC| > 2.0$ 。对这些基因的抗病性能还需要进一步分析。

在候选基因的互作网络分析中仅发现 1 个 *NBS* 转录因子 (*VrNBS20*) 调控 *EVM0022385* 基因。同时,*VrNBS20* 的功能注释为抗烟草花叶病毒蛋白 N, 而与其同源的拟南芥 *AT5G17680* 基因编码的蛋白质对 flg22 病原菌具有免疫应答作用^[41]。与 *EVM0022385* 互作的 10 个基因中有 5 个基因在盐处理后出现显著差异表达。这 5 个基因中 *EVM0009188* 的表达量在盐处理后出现显著上调, 其他 4 个基因表达量显著下调。说明,*VrNBS20* 可能不仅具有抗病的活性,同时还参与绿豆的耐盐调控。

参考文献:

- [1] KANG Y J, KIM S K, KIM M Y, et al. Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species [J]. *Nat Commun*, 2014, 11(5): 5443-5452.
- [2] 李瑞国,郭少英,王怀远. 绿豆萌发期蛋白质和维生素 C 含量及营养价值[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(4): 4-12.
- [3] 王天一,王应祥,尤辰江. 植物 PHD 结构域蛋白的结构与功能特性[J]. 遗传, 2021, 43(4): 323-339.
- [4] TAMELING W I, ELZINGA S D, DARMIN P S, et al. The tomato *R* gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(11): 2929-2939.
- [5] REBOLEDO G, AGORIO A, PONCE DE LEON I. Moss transcription factors regulating development and defense responses to stress [J]. *J Exp Bot*, 2022, 73(13): 4546-4561.
- [6] ZHNAG Y M, CHEN M, SUN L, et al. Genome-wide identification and evolutionary analysis of *NBS-LRR* genes from *dioscorea rotundata* [J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 484-495.
- [7] EITAS T K, DANGL J L. NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13(4): 472-477.
- [8] 汪结明,江海洋,赵 阳,等. 玉米自交系 B73 全基因组 *NBS* 类型抗病基因分析[J]. 作物学报, 2009, 35(3): 5-10.
- [9] 刘云飞,万红建,李志邈,等. 植物 *NBS-LRR* 抗病基因的结构、功能、进化起源及其应用[J]. 分子植物育种, 2014, 12(2): 377-389.
- [10] ANDERSEN E J, LINDSEY L E, NEPAL M P. Genome-wide identification of disease resistance genes (*R* Genes) in wheat [J/OR]. Cold Spring Harbor Laboratory, 2020. Doi: 10.401/2020.07.18.210286.
- [11] JUPE F. The potato *NB LRR* gene family. Determination, characterisation and utilisation for rapid identification of novel disease resistance genes [D]. Norwich, England; University of East Anglia, 2012.
- [12] LEISTER D. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance gene [J]. *Trends in Genetics* Tigr, 2004, 20(3): 116-122.
- [13] ZHANG C, CHEN H, CAI T, et al. Overexpression of a novel peanut *NBS-LRR* gene *AhRRS5* enhances disease resistance to *Ralstonia solanacearum* in tobacco [J]. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(1): 39-55.
- [14] DIAO P, SUN H, BAO Z, et al. Expression of an antiviral gene *GmRUN1* from soybean is regulated via Intron-mediated enhancement (IME) [J]. *Viruses*, 2021, 13(10): 2032-2046.
- [15] JHU M Y, FARHI M, WANG L, et al. Heinz-resistant tomato cultivars exhibit a lignin-based resistance to field dodder (*Cuscuta campestris*) parasitism [J]. *Plant Physiology*, 2022, 189(1): 129-151.
- [16] QU J, DRY I, LIU L, et al. Transcriptional profiling reveals multiple defense responses in downy mildew-resistant transgenic grapevine expressing a TIR-NBS-LRR gene located at the MrRUN1/MrRPV1 locus [J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1): 161-173.
- [17] TENTE E, EREFUL N, RODRIGUEZ A C, et al. Reprogramming of the wheat transcriptome in response to infection with *claviceps purpurea*, the causal agent of ergot [J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 316-336.
- [18] WANG D, GUO Y, WU C, et al. Genome-wide analysis of CCCH zinc finger family in *Arabidopsis* and rice [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 44-64.
- [19] DANIELS B R, PERKINS E M, DOBROWSKY T M, et al. Asymmetric enrichment of *PIE-1* in the *Caenorhabditis elegans* zygote mediated by binary counterdiffusion [J]. *Journal of Cell Biology*, 2009, 184(4): 473-479.
- [20] 皮博艺,阮 颖,黄 勇. 植物串联 CCCH 锌指蛋白 RR-TZF 家族研究进展及生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(7): 2171-2177.
- [21] 蒋 明,刘青娥,章燕如,等. 青花菜 *C₃H* 型锌指蛋白基因 *BoCCCH2* 的克隆与表达[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2016, 42(2): 143-149.
- [22] KONG Z, LI M, YANG W, et al. A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1376-1388.
- [23] CHAI G H, KONG Y Z, ZHU M, et al. *Arabidopsis* C3H14 and C3H15 have overlapping roles in the regulation of secondary wall

- thickening and anther development. [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(9):2595-2609.
- [24] SUN J, JIANG H, XU Y, et al. The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis* [J]. Plant and Cell Physiology, 2007, 48(8): 1148-1158.
- [25] ZHANG H, GAO X, ZHI Y, et al. A non-tandem CCCH-type zinc-finger protein, IbC3H18, functions as a nuclear transcriptional activator and enhances abiotic stress tolerance in sweet potato [J]. New Phytologist, 2019, 223(4):1918-1936.
- [26] 刘冬冬. 锌指蛋白 GIS 和 ZFP5 响应非生物胁迫的分子机理研究[D].杭州:浙江大学, 2019.
- [27] HOANG X L T, NHI D N H, THU N B A, et al. Transcription factors and their roles in signal transduction in plants under abiotic stresses [J]. Current Genomics, 2017, 18(6): 483-497.
- [28] LI Y, ZHOU J, LI Z, et al. Salt and ABA response ERF1 improves seed germination and salt tolerance by repressing ABA signaling in rice [J]. Plant Physiology, 2022, 189(2): 1110-1127.
- [29] LIU J, XUE C, LIN Y, et al. Genetic analysis and identification of *VrFRO8*, a salt tolerance-related gene in mungbean [J]. Gene, 2022, 836:146658-146670.
- [30] MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq [J]. Nat Methods, 2008, 5(7): 621-628.
- [31] LI S, LIU J, XUE C, et al. Identification and functional characterization of WRKY, PHD and MYB three salt stress responsive gene families in mungbean (*Vigna radiata* L.) [J]. Genes (Basel), 2023, 14(2): 463-481.
- [32] 潘晓雪, 蒋晓英, 胡明瑜, 等. 水稻 *OscCCH* 基因家族的组织表达谱及胁迫诱导表达特征研究 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(9):2239-2249.
- [33] 吴学闯, 曹新有, 陈 明, 等. 大豆 C3HC4 型 RING 锌指蛋白基因 *GmRZFPI* 克隆与表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3):343-348.
- [34] 郭 栋, 宋雅菲, 张佳阔, 等. 玉米 *CCCH* 基因家族鉴定及分析 [J]. 中国农业科技导报, 2019, 21(8): 19-27.
- [35] RUIZ-SOLA M A, ARBONA V, GOMEZ-CADENAS A, et al. A root specific induction of carotenoid biosynthesis contributes to ABA production upon salt stress in *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90765.
- [36] BARRERO J M, RODRIGUEZ P L, QUESADA V, et al. Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of *NCED3*, *AAO3* and *ABAI* in response to salt stress [J]. Plant, Cell and Environment, 2006, 29(10): 2000-2008.
- [37] NAKASHIMA K, SHINWARI Z K, SAKUMA Y, et al. Organization and expression of two *Arabidopsis* *DREB2* genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(4): 657-665.
- [38] GONG Z, XIONG L, SHI H, et al. Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency [J]. Science China (Life Sciences), 2020, 63(5): 635-674.
- [39] ZHAO H, LI Z, WANG Y, et al. Cellulose synthase-like protein OsCSLD4 plays an important role in the response of rice to salt stress by mediating abscisic acid biosynthesis to regulate osmotic stress tolerance [J]. Plant Biotechnol J, 2022, 20(3): 468-484.
- [40] 兰冬雪, 汤丽影, 李 佳, 等. 禾本科植物 *NBS-LRR* 类抗病基因结构、功能和进化研究进展 [J]. 中国农学通报, 2019, 35(15):124-127.
- [41] NAVARRO L, ZIPFEL C, ROWLAND O, et al. The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis [J]. Plant Physiology, 2004, 135(2): 1113-1128.

(责任编辑:石春林)