

纪剑辉, 周颖君, 杨 雯, 等. 水稻 *Dof* 转录因子家族的鉴定与生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1191-1198.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.001

水稻 *Dof* 转录因子家族的鉴定与生物信息学分析

纪剑辉, 周颖君, 杨 雯, 谢 晶, 华 慧, 杨立明

(淮阴师范学院生命科学院/江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室/江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心, 江苏 淮安 223300)

摘要: 为了在全基因组水平上鉴定水稻 *Dof* 转录因子家族基本生物学特征, 本研究对 30 个水稻 *Dof* 转录因子进行了聚类及功能结构域的分析。结合蛋白质氨基酸序列比对结果, 明确了该家族所有基因均具有高度保守的 *Dof* 结构域; 此外, 对水稻、拟南芥、二穗短柄草和高粱中 *Dof* 家族同源基因的聚类分析表明该家族基因在植物中具有高度同源性。利用 MeMe 程序进一步分析了水稻 *Dof* 转录因子家族的基序特征, 结果与聚类分析具有一致性; 通过对染色体复制情况的研究, 明确了部分 *Dof* 基因在水稻本身以及水稻与其他物种之间存在种内和种间的局部染色体复制; 结合生物芯片数据, 进一步研究了水稻 *Dof* 基因在不同组织中的表达, 结果显示部分 *Dof* 基因在叶片或根、茎部位呈现高表达, 部分 *Dof* 基因在生殖器官呈现高表达, 推测这些 *Dof* 基因可能参与这些特定组织的发育。

关键词: 水稻; *Dof* 转录因子家族; 进化分析

中图分类号: S511.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)06-1191-08

Identification and bioinformatics analysis of *Dof* transcription factors family in rice

Ji Jian-hui, ZHOU Ying-jun, YANG Wen, XIE Jing, HUA Hui, YANG Li-ming

(School of Life Sciences, Huaiyin Normal University/Jiangsu Key Laboratory for Eco-agriculture Biotechnology around Hongze Lake/Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture & Environment Protection (JCIC-RMAEP), Huai'an 223300, China)

Abstract: For the genome-wide identification of rice *Dof* transcription factors, the functional domain of 30 rice *Dof* genes were clustered and analysed. Together with the protein sequences alignment, it was confirmed that all *Dof* genes contained the highly conserved domain. Clustering analysis revealed the *Dof* genes were highly homologous in rice and other plants (*Arabidopsis*, *Brachypodium distachyon* and *Sorghum bicolor*). The MEME-defined motif characteristic of *Dof* genes family was in accordance with the results of protein clustering analysis. The existence of the intraspecific and interspecific chromosome replication between rice and other plants was confirmed by chromosome replication analysis. The expression

pattern of rice *Dof* genes in different tissues showed that that some were upregulated in leaves, roots or stems, and some were upregulated in reproductive organs, suggesting that *Dof* genes might play roles in the development of specific organs.

Key words: rice; *Dof* transcription factor; phylogenetic analysis

收稿日期: 2015-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31400169、30900871); 江苏省自然科学基金项目 (BK20140454、BK2011409); 江苏高校品牌专业建设工程项目 (PPZY2015A018); 淮安市科技计划项目 (国际科技合作研究) (HAC2014012); 江苏省高校“青蓝工程”项目

作者简介: 纪剑辉 (1981-), 男, 江苏南通人, 博士, 讲师, 研究方向为水稻分子生物学。 (Tel) 0517-83525993; (E-mail) jijianhui@hytc.edu.cn。周颖君为共同第一作者。

通讯作者: 杨立明, (E-mail) yanglm@hytc.edu.cn

转录因子主要通过与其 5' 端上游特定序列进行专一性结合, 保证目的基因能够在特定时间与

空间表达的蛋白质分子。*Dof* 转录因子家族为锌指蛋白质家族的 1 个亚家族,一般由 200 至 400 个氨基酸组成^[1-2]。此外,*Dof* 转录因子还包含 2 个主要的结构域:1 个位于 N 末端的保守 DNA 结合结构域,另 1 个位于 C 末端的多变调控结构域。位于 N 末端 DNA 结合结构域含有 52 个氨基酸,并且组成 1 个 Zn^{2+} 与 4 个 Cys 残基共价结合的单锌指结构,此单锌指结构中,它能够特异性的结合包含核心序列 5'-T/AAAAG-3' 的顺式作用元件^[1,3]。位于 C 末端的调控结构域从其氨基酸序列上看不具有保守型,这使 *Dof* 转录因子家族的不同基因在植物中表现为功能多样性的一个原因^[4]。植物中第 1 个被鉴定报道的是玉米 *ZmDof1* 转录因子基因^[5]。此后,其他植物中的 *Dof* 基因相继被预测和鉴定出来,如拟南芥全基因组中预测存在 36 个 *Dof* 基因^[6],水稻中存在 30 个 *Dof* 基因^[7],小麦中存在 31 个 *Dof* 基因^[8],大麦中存在 26 个 *Dof* 基因^[9],大豆中存在 79 个 *Dof* 基因^[10],高粱中存在 28 个 *Dof* 基因^[11]。目前研究结果表明 *Dof* 转录因子对植物生长发育过程中多种生物学途径起作用。如 C4 植物玉米的碳代谢调控过程主要通过 *Dof1* 和 *Dof2* 转录因子调控 *PEPC* 基因的表达而起作用^[12];玉米的 *PBF* 及其同源的大麦和小麦 *PBF* 转录因子对于胚乳特异性贮藏蛋白质基因的表达起调控作用^[13];烟草的 *NtBBF1* 基因在顶端分生组织和微管组织中通过响应生长素信号从而实现对原癌基因 *rolB* 的表达调控^[14];大豆的 *GmDof4* 和 *GmDof11* 通过调控脂肪酸生物合成相关基因的表达从而调控大豆种子的油脂含量^[15];拟南芥 *Dof* 家族基因 *OBP1* 受到水杨酸和氧化胁迫等处理后,可以调控植物防御基因的表达^[16];水稻的 *OsDof12* 能够调控 *Hd3a* 和 *OsMADS14* 基因的表达,最终影响水稻的开花时间^[17]。小麦中的 *Dof* 基因在种子发育和生殖生长中起作用^[18]。在拟南芥中,有一些 *Dof* 基因(如 *AtDof2.4*, *AtDof5.8* 和 *AtDof5.6/HCA2*) 被报道为特异性的在一些早期的生长组织中高效表达^[19-20]。

本试验利用生物信息学的方法获取和鉴定了水稻、拟南芥、二穗短柄草以及高粱的 *Dof* 基因序列,并对其同源基因进行了聚类分析,从而探索其可能存在的进化规律。另外,通过分析水稻 *Dof* 基因在不同组织中的表达情况,从而为进一步揭示 *Dof* 转录因子的生物学功能提供线索。

1 材料与方法

1.1 *Dof* 转录因子家族的数据收集与分析

利用 Pfam 数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk/>),以拟南芥 *Dof* 同源蛋白质检索 *Dof* 家族蛋白质特征结构域^[21],标号为 PF02701。随后从水稻 TIGR 基因组数据库下载水稻全基因组序列,其次利用 HMMER3 程序(<http://hmmer.janelia.org/>)以 PF02701 隐马可夫模型对水稻全基因组序列搜索含有 Trihelix 结构域特征的序列($E \leq 10^{-10}$ 被认为是候选蛋白质)。最后利用 SMART 在线程序检测候选蛋白质序列,去除不含 *Dof* 结构域特征的序列^[22]。利用 TFDB 数据库(<http://planttfdb.cbi.edu.cn/index.php,v3.0>)^[23] 获得拟南芥、玉米、二穗短柄草和高粱的 Trihelix 基因序列。

1.2 水稻 *Dof* 转录因子家族保守基序的鉴定和分析

为了分析水稻 *Dof* 转录因子家族的蛋白质结构特征,利用 MEME 在线程序(<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>)^[24] 对候选水稻 *Dof* 转录因子的基序进行了分析,相关参数设置为:(1)基序重复的数量为 any;(2)基序的长度为 6~200;(3)基序的数量设置为 10。

1.3 多序列联配、蛋白质保守序列比对和系统进化树的构建

利用 Cluster 3.0 程序对候选水稻 *Dof* 转录因子保守区域氨基酸进行多序列联配分析^[25]。利用 WebLogo 程序图示化候选水稻 *Dof* 转录因子保守区域氨基酸的保守性^[26],之后序列联对比对结果通过 Mega5 程序(<http://www.megasoftware.net/>)^[27] 进行分析,采用邻接法(Neighbor-Joining Method, NJ)生成水稻 *Dof* 转录因子保守区域的系统进化树,进化树校验参数 Bootstrap 设为 1 000 次重复,以同样的方法对水稻、拟南芥、二穗短柄草、玉米和高粱中 *Dof* 转录因子家族进行进化树分析。

1.4 不同物种中 *Dof* 基因家族所在染色体区段复制分析

利用植物基因组复制数据库 PGDD(<http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/>)^[28] 对候选水稻 *Dof* 基因所在染色体区段的复制进行分析。*Dof* 基因在水稻染色体上的复制情况通过 MapInspect(<http://www.dpw.wau.nl/pv/pub/MapComp/>) 软件进行

构建;水稻与二穗短柄草,水稻与高粱之间 *Dof* 基因所在区段染色体的复制情况通过 Circos (<http://circos.ca/>) 软件进行构建^[29]。

1.5 水稻 *Dof* 基因在不同组织表达水平分析

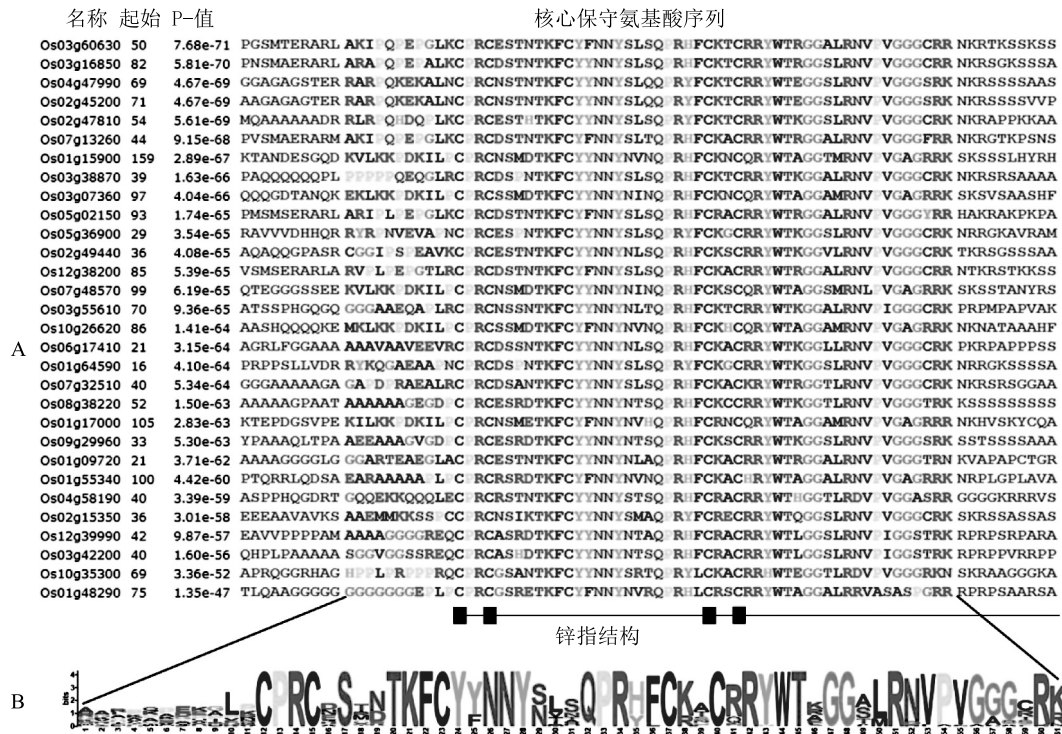
利用水稻 Ricexpro 在线芯片数据 (<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/data-set.html>) 分析水稻 *Dof* 基因在不同组织部位的表达情况。这些组织部位包括水稻的叶片、叶鞘、根、茎、穗、花药、雌蕊、外稃、内稃、胚珠、胚和胚乳。样本包含三组重复,采用的是 Agilent 在线表达谱芯片分析系统 (Agilent one-color (Cy3) microarray-based gene analysis system)。所有这些 *Dof* 基因在水稻不同组织中的表达水平通过 Cluster 3.0 程序对其进行层次聚类分析,再通过

TreeView 软件 (<http://jtreeview.sourceforge.net/>) 对其结果进行 Heatmap 图示^[30]。

2 结果与分析

2.1 水稻 *Dof* 转录因子家族的鉴定

利用 Pfam 程序和 SMART 数据库,我们鉴定到 30 个含有 *Dof* 典型结构域的水稻转录因子,随后我们利用 Clustal X 程序对这些 *Dof* 转录因子的 *Dof* 结构域氨基酸序列进行多序列比对 (图 1A),通过图 1A 可以明显看出这 30 个 *Dof* 转录因子均含有一个明显的锌指结构,且锌指结构内均含有保守的 4 个 Cys (图 1B)。



A: Clustal X 程序对候选水稻 *Dof* 转录因子氨基酸多序列比对分析结果; B: WebLogo 程序图示化水稻 *Dof* 家族蛋白质保守区域氨基酸的保守性分析结果。

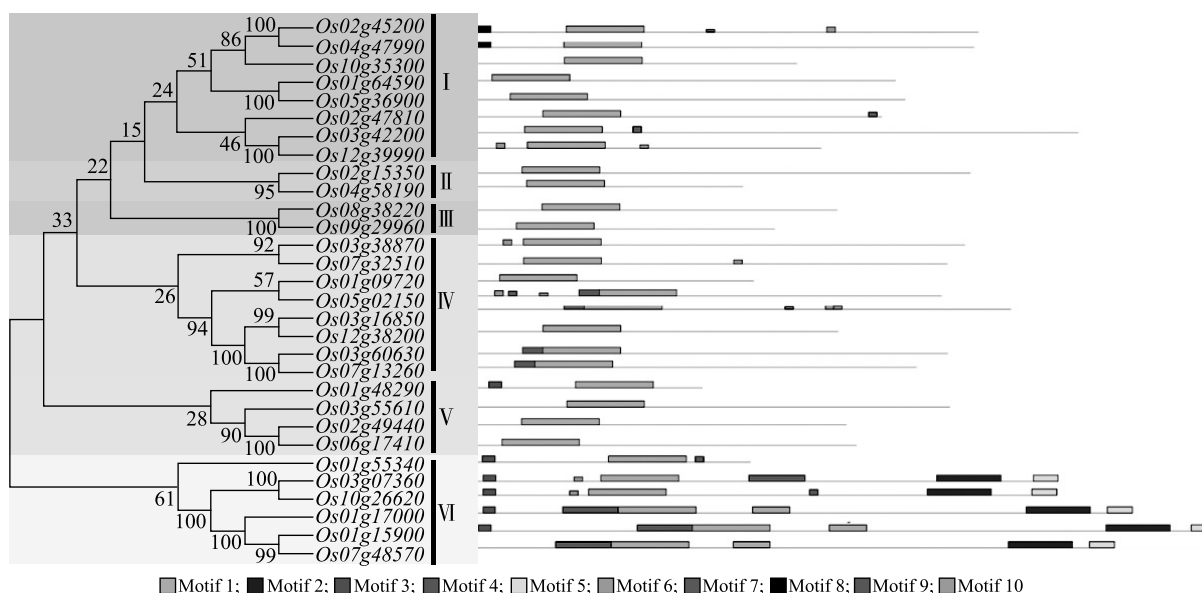
图 1 *Dof* 结构域在水稻中的保守性分析

Fig.1 The conservation analysis of *Dof* domain in rice

2.2 *Dof* 转录因子家族的进化

我们通过 Cluster 3.0 程序对水稻 *Dof* 结构域进行多序列比对,然后运用 Mega5 软件对 *Dof* 的保守区域进行进化分析 (图 2)。从图 2 可以看出,虽然水稻中的 *Dof* 基因具有较高的同源性,但其仍然可以明显的区分出差异性,我们初步将其分成 6 个亚

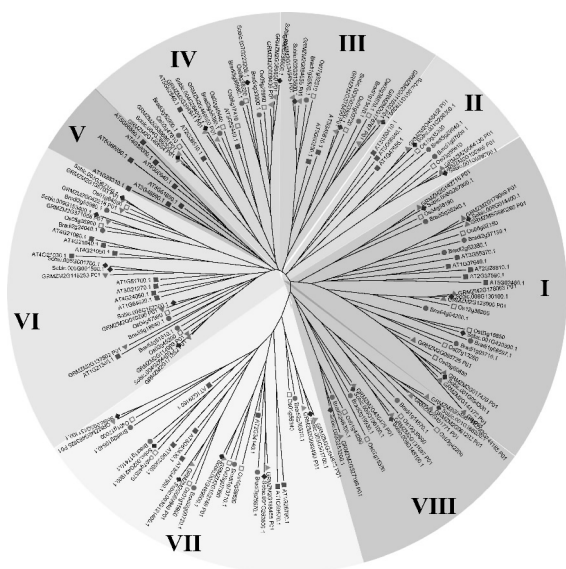
家族 (自举值 $\leq 50\%$)。为了更好地分析水稻和其他植物 *Dof* 转录因子进化上的关系,我们又对水稻、拟南芥、二穗短柄草、玉米和高粱中的 *Dof* 转录因子进行了进化分析 (图 3),并初步将这 5 个物种中的 *Dof* 转录因子按照其亲缘关系远近分成 8 个分支。整体来看,每一个分支提示其可能在物种演化过程



左:水稻 *Dof* 转录因子进化分析;右:MEME 程序对水稻 *Dof* 转录因子的基序分析。I ~ VI 为根据水稻 *Dof* 基因进化分析结果划分的 5 个亚家族的编号;Motif 1~10 为 10 个不同基序。

图 2 水稻 *Dof* 转录因子进化及水稻 *Dof* 转录因子的基序

Fig.2 The phylogenetic tree of the *Dof* transcription factor family and the MEME-defined motifs of rice *Dof* family



实心方框代表拟南芥,空心方框代表水稻,实心圆代表二穗短柄草,三角代表玉米,菱形代表高粱。I ~ VIII 为根据 5 个物种 *Dof* 基因进化分析结果划分的 8 个亚家族。

图 3 水稻、拟南芥、二穗短柄草、玉米和高粱中 *Dof* 转录因子的比较进化树

Fig.3 Comparative phylogenetic tree of *Dof* family constructed using the neighbor-joining method in rice, *Arabidopsis*, *Sorghum*, maize and *Brochypodium distachyon*

中具有更高的序列相似性。此外,除了第 V 家族均为拟南芥基因外,每一个物种在另外 7 个分支上都存在相关基因。

2.3 水稻 *Dof* 转录因子家族蛋白质氨基酸基序

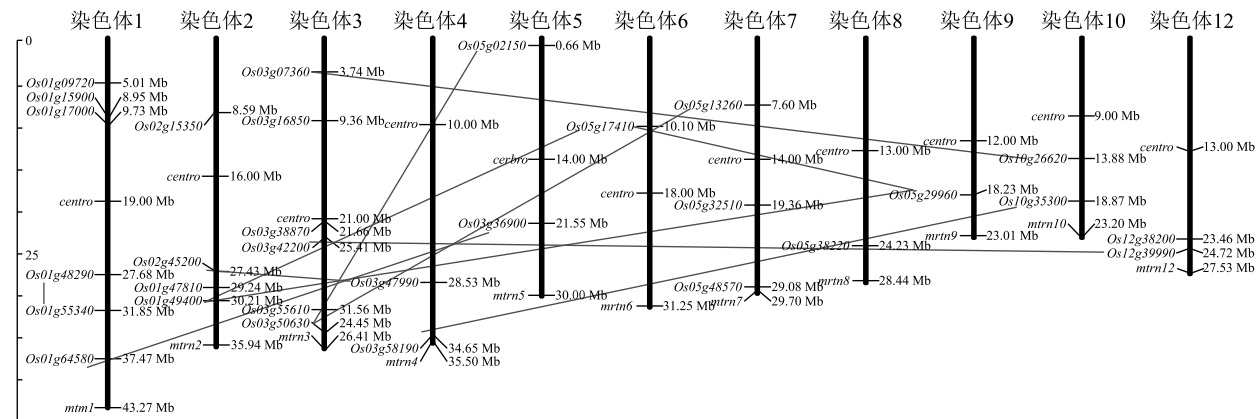
我们利用 MeMe 在线程序对水稻 *Dof* 转录因子家族的蛋白质氨基酸基序进行了分析,结果显示水稻 *Dof* 转录因子除了均含有 *Dof* 典型保守基序 Motif1 之外,还含有其他一些相对保守的基序。从图 2 我们可以看出第 VI 亚家族 *Os01g15900*、*Os07g48570*、*Os01g17000*、*Os03g07360* 和 *Os10g26620* 这 5 个基因编码的蛋白质氨基酸序列的 C 端均含有 Motif2 和 5 两个基序,而后 3 个基因 *Os01g15900*、*Os07g48570*、*Os01g17000* 编码的蛋白质在序列中部还含有 Motif10 基序,以及在核心保守基序 Motif1 的左侧紧连 Motif9,因此推测这 3 个基因相对亲缘关系更加靠近。在第 IV 亚家族中,部分转录因子在 Motif1 的左侧含有 Motif4 基序,但这一基序并没有在 IV 亚家族所有转录因子中出现。

2.4 水稻 *Dof* 基因的染色体复制

在物种进化过程中,不单只有 1 个基因在不同物种之间存在亲缘关系,在一定的染色体区段上,同样存在进化上的复制关系。为了研究这种染色体区

段的进化,我们通过 PGDD 数据库及 MapInspect 软件来分析水稻 30 个 *Dof* 转录因子是否在水稻自身存在某些染色体区段的复制。从图 4 可以看出,水稻 *Dof* 基因分布在除 11 号染色体之外的其他所有染色体上面,其中 1 号和 3 号染色体分布最多,分别有 6 个 *Dof* 基因,6、8 和 9 号染色体上分布最少,各有 1 个 *Dof* 基因。此外,我们也发现,这 30 个 *Dof* 基因在染色体上的分布也存在聚集现象,如在 1 号染色体的 9 Mb、2 号染色体的 29 Mb、3 号染色体的 22 Mb 和 32 Mb、12 号染色体的 23 Mb 位置都存在 2 个或 2 个以上基因集中分布的现象。另外,从表 1 也可以看出,具有大量基因所在的染色体复制区域

有 6 个,少量基因所在染色体复制区域有 5 个。除了 8 号染色体上的 *Os08g38220* 基因不存在跟其他染色体的复制,其他染色体均有 *Dof* 基因存在跟其他染色体的复制情况。*Os01g48290* 和 *Os01g55340* 2 个基因在 1 号染色体长臂上存在染色体复制,但这种复制的区段并不是很大,从我们的检测结果看仅仅只有 10 个基因在该区段存在同源性。此外,*Os03g60630* 分别与 *Os07g13260*、*Os05g02150* 2 个基因的区段存在复制情况,但两者的复制情况并不完全相同,*Os03g60630* 与 *Os07g13260* 具有 100 个基因区段复制,而 *Os03g60630* 与 *Os05g02150* 在相关区段则仅有 8 个基因复制(表 1)。



斜直线;基因组进化中同源基因复制事件。

图 4 水稻 *Dof* 基因在染色体上的复制

Fig.4 Chromosomal locations, region duplications, and predicted clusters of rice *Dof* genes

2.5 *Dof* 基因在水稻和高粱以及水稻和二穗短柄草之间染色体复制

由于水稻、高粱和二穗短柄草作为单子叶中较具代表性的作物且相互间具有较高的亲缘性,因此我们利用生物信息学方法对水稻、高粱和二穗短柄草之间的染色体复制情况进行了分析。结果表明,在水稻中有 22 个 *Dof* 基因 (*Os01g09720*、*Os02g15350*、*Os03g16850*、*Os03g38870*、*Os04g58190*、*Os07g32510*、*Os09g29960* 和 *Os12g39990* 除外)与二穗短柄草中的 *Dof* 基因具有线性同源性(图 5A);25 个 *Dof* 基因(*Os01g09720*、*Os02g15350*、*Os03g38870*、*Os06g17410* 和 *Os07g32510* 除外)与高粱中 *Dof* 基因具有线性同源性(图 5B)。推测这些基因在进化过程中经历复制、重排和缺失,导致一些同源基因的丢失。

2.6 *Dof* 基因在水稻不同组织中的表达

为了分析水稻 *Dof* 基因在不同组织的表达情

况,我们利用 RiceXPro 数据库(<http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/data-set.html>)下载水稻 *Dof* 基因的表达数据。数据显示 *Dof* 基因的表达几乎涉及整个植物的生长过程,我们首先将这些数据进行汇总,然后通过构建 Heatmap 图综合分析了这些 *Dof* 基因在水稻中的表达情况,并用 Cluster 和 Treeview 程序加以图示化(图 6)。结合 Cluster 的结果,我们将 27 个基因的表达聚类分成 6 个不同的亚区,不同的亚区提示其具有相似或者相近的表达谱。从 Heatmap 图可以看出,位于 VI 亚区的 *Os10g26620*、*Os06g17410*、*Os05g02150* 3 个基因主要在叶片和叶鞘的不同时期具有较高的表达量,提示其可能主要参与叶片的发育过程;位于 V 亚区的 *Os04g47990*、*Os02g45200*、*Os07g32510*、*Os03g60630* 4 个基因主要在根和茎的组织中具有较高的表达;III 亚区的 *Os08g38220*、*Os05g36900*、*Os10g35300*、*Os04g58990*、*Os01g64590*

表 1 水稻 *Dof* 基因在染色体上的复制分析
Table 1 Duplicated *Dof* genes in rice chromosomes

基因 1	基因 2	染色体区段 复制大小/ 基因数量	Ka	Ks	Ka/Ks
<i>Os01g48290</i>	<i>Os01g55340</i>	Small/10	0.61	0.64	0.95
<i>Os01g64590</i>	<i>Os05g36900</i>	Large/432	0.34	0.53	0.64
<i>Os02g45200</i>	<i>Os04g47990</i>	Large/341	0.21	0.56	0.38
<i>Os02g49440</i>	<i>Os09g29960</i>	Small/10	0.61	0.79	0.77
<i>Os02g49440</i>	<i>Os06g17410</i>	Large/163	0.35	0.58	0.60
<i>Os03g07360</i>	<i>Os10g26620</i>	Large/91	0.38	1.25	0.30
<i>Os03g60630</i>	<i>Os07g13260</i>	Large/100	0.28	0.70	0.40
<i>Os03g60630</i>	<i>Os05g02150</i>	Small/8	0.57	0.65	0.88
<i>Os04g58190</i>	<i>Os10g35300</i>	Small/6	0.73	0.87	0.84
<i>Os06g17410</i>	<i>Os09g29960</i>	Small/9	0.70	1.00	0.70
<i>Os12g39990</i>	<i>Os03g42200</i>	Large/81	0.04	0.12	0.33

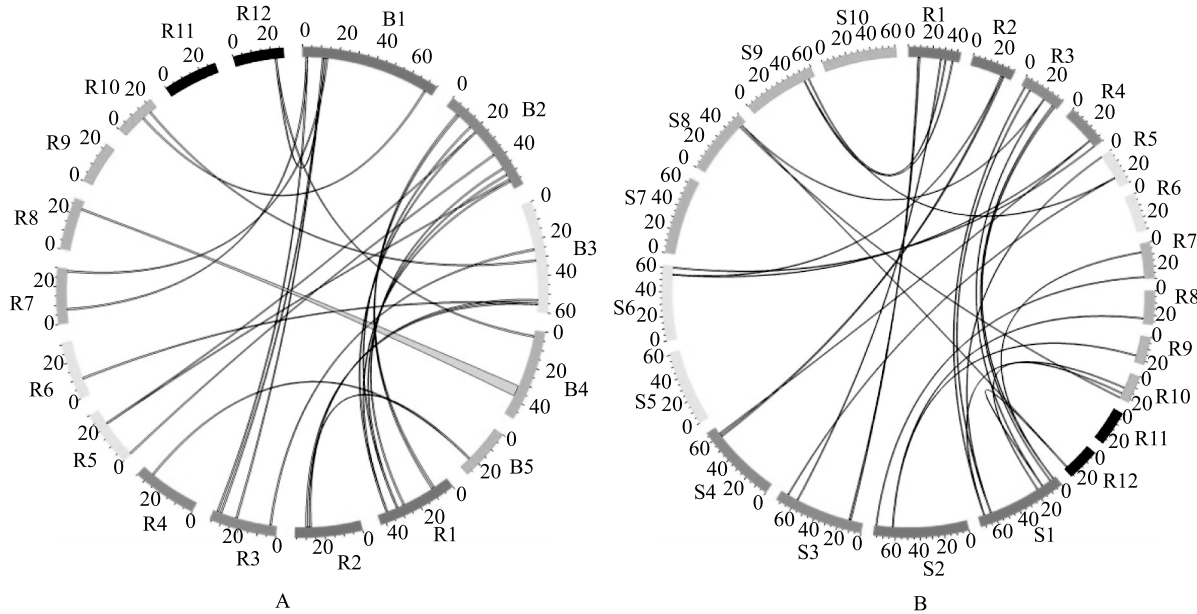
Ks:同义突变频率;Ka:非同义突变频率;Ka/Ks:非同义突变率与同义突变率的比值;

5 个基因的表达则主要集中于根部以及花器官组织中(花药、雌蕊、外稃、内稃、胚珠);II 亚区的 *Os03g-55610*、*Os03g42200*、*Os12g38200*、*Os05g02150*、*Os0-2g47810*、*Os01g55340* 6 个基因则分别在穗、雌蕊、胚中具有高表达,但是在花药中的表达却并不高,这提示他们的功能可能与雌配子的发育相关。

3 讨论

本研究通过对水稻 *Dof* 转录因子全基因组分析,共获得了 30 个具有明显保守 *Dof* 结构域特征的基因,通过对这 30 个 *Dof* 基因编码的蛋白质氨基酸序列的分析,我们发现 *Dof* 基因存在保守结构域特征,且这些结构域的特征与 *Dof* 转录因子家族的分类具有一致性。此外,我们结合水稻内部以及水稻和其他物种之间的染色体复制情况,对 *Dof* 基因的进化规律做了进一步的分析。在基因进化过程中,基因复制是基因家族扩张过程中的重要事件,复制的基因能够为新基因的产生和功能分化提供物质前提,因此,研究基因复制以及局部染色体的复制能够帮助研究者更好地认识基因和物种的进化。本试验中我们对水稻内部以及水稻和其他物种之间的基因线性同源关系进行了分析,结果显示在水稻内部以及水稻和其他物种之间均存在着大量的同源基因,但水稻中也有少数 *Dof* 基因与其他物种不存在线性同源关系,依此我们推测 *Dof* 在进化过程中通过复制得到了扩增,但有少量基因在进化过程中发生了选择性缺失。

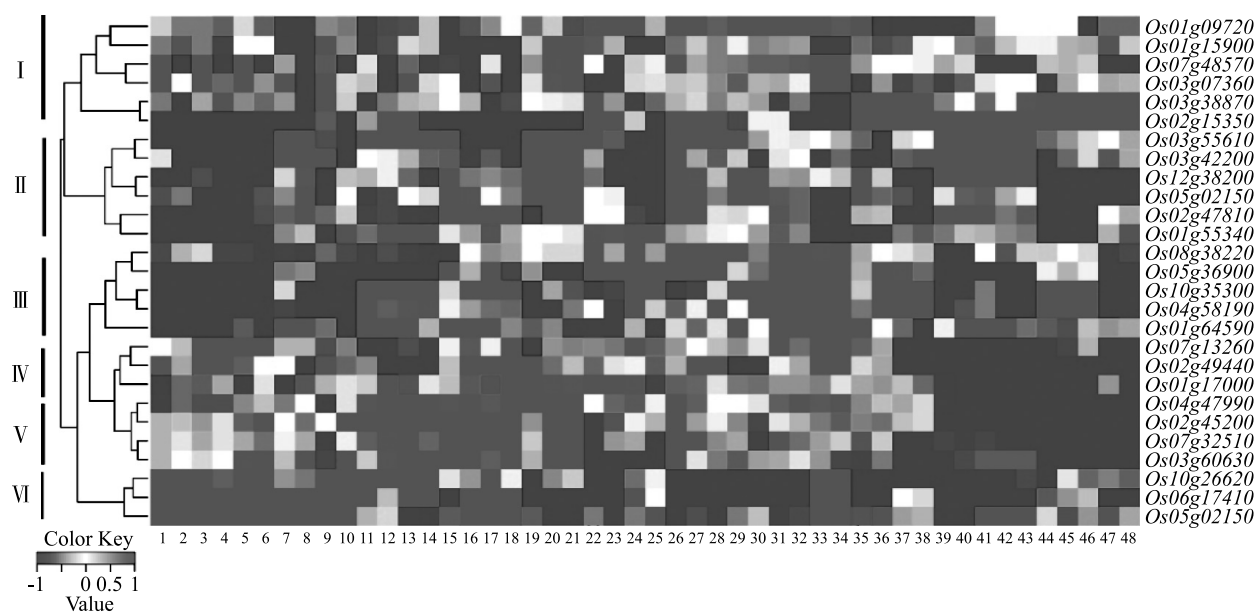
目前在水稻中只有 3 个 *Dof* 基因被克隆和分析,第 1 个是 *Os03g07360* (*OsDof12*)^[17,31],该基因过表达后,在长日照条件下通过调控 *Hd3a* 和 *OsMADS14* 的



A: *Dof* 基因在水稻和二穗短柄草基因组中染色体线性复制。B: *Dof* 基因在水稻和高粱基因组中的染色体线性复制。R1~R12:水稻染色体; B1~B5:二穗短柄草染色体;S1~S10:高粱染色体。黑色连线:发生复制的 *Dof* 基因。

图 5 *Dof* 基因在水稻和二穗短柄草及水稻和高粱间的染色体线性复制

Fig.5 The chromosome synteny and replication of *Dof* genes in rice and *Brachypodium distachyon*, and in rice and sorghum



1: 27 d 叶片; 2: 28 d 叶片; 3: 76 d 叶片; 4: 77 d 叶片; 5: 125 d 旗叶; 6: 126 d 旗叶; 7: 27 d 叶鞘; 8: 28 d 叶鞘; 9: 76 d 叶鞘; 10: 77 d 叶鞘; 11: 27 d 根部; 12: 28 d 根部; 13: 76 d 根部; 14: 77 d 根部; 15: 26 d 茎部组织; 16: 27 d 茎部组织; 17: 76 d 茎部组织; 18: 77 d 茎部组织; 19: 花序长 (0.6~1.0 mm); 20: 花序长 (3.0~4.0 mm); 21: 花序长 (5.0~10.0 mm); 22: 花药长 (0.3~0.6 mm); 23: 花药长 (0.7~1.0 mm); 24: 花药长 (1.2~1.5 mm); 25: 花药长 (1.6~2.0 mm); 26: 雌蕊 (穗长 5~10 cm); 27: 雌蕊 (穗长 10~14 cm); 28: 雌蕊 (穗长 14~18 cm); 29: 外稃 (小花长 1.5~2.0 mm); 30: 内稃 (小花 1.5~2.0 mm); 31: 外稃 (小花长 4.5~5.0 mm); 32: 内稃 (小花长 4.5~5.0 mm); 33: 外稃 (小花长 7.0 mm); 34: 内稃 (小花长 7.0 mm); 35: 子房 (开花后 1 d); 36: 子房 (开花后 3 d); 37: 子房 (开花后 5 d); 38: 子房 (开花后 7 d); 39: 胚 (开花后 7 d); 40: 胚 (开花后 10 d); 41: 胚 (开花后 14 d); 42: 胚 (开花后 28 d); 43: 胚 (开花后 42 d); 44: 胚乳 (开花后 7 d); 45: 胚乳 (开花后 10 d); 46: 胚乳 (开花后 14 d); 47: 胚乳 (开花后 28 d); 48: 胚乳 (开花后 42 d)。红色: 基因表达强度最高; 白色: 基因表达强度居中; 蓝色: 基因表达强度最低。

图 6 *Dof* 基因在水稻不同组织不同时间的表达 Heatmap 图分析

Fig.6 Heatmap representation and hierarchical clustering of rice *Dof* transcription factor genes in different rice tissues

表达水平来促进水稻的开花。在我们的研究中,通过表达谱分析可以看出,位于表达谱 I 亚区的 *Os03g07360* 基因在花序 (0.6~1.0 cm; 3.0~4.0 cm)、外稃 (小花 7.0 mm)、内稃 (小花 7.0 mm) 以及雌蕊 (穗长 10.0~14.0 cm) 中高表达,表明其可能与花器官发育相关,但我们发现,该基因在不同长度的花药组织中均没有高表达,因此推断该基因可能并不影响雄配子体的发育。第 2 个报道的基因是 *Os03g38870* (*OsDof3*)^[32-33],该基因被认为参与种子发育的调控过程,它的表达主要集中于发芽的种子,并且通过赤霉素信号途径在水稻种子萌发过程起作用。从本研究图 6 可以发现该基因在子房、胚和胚乳中均呈现出高表达。第 3 个基因是 *Os08g38220* (*OsDof25*)^[34],研究者通过在拟南芥中过度表达 *OsDof25* 基因,发现其能够改变碳氮代谢,从而增加了氨基酸的浓度,此外,该基因还被发现能够提高氨的转运蛋白 (*AtAMT1.1* and *AtAMT2.1*) 的表达水平以及抑制硝酸盐转运蛋白 (*AtNRT2.1*) 的表达。从本研究

图 6 可以发现该基因在花药、雌蕊、外稃和内稃中均呈现出高表达。我们认为基因的表达模式与基因的功能有着密切的关系,相关基因的表达芯片数据能为水稻 *Dof* 转录因子进一步的功能验证提供线索。

参考文献:

- [1] YANAGISAWA S, SCHMIDT R J. Diversity and similarity among recognition sequences of *Dof* transcription factors [J]. *The Plant Journal*, 1999, 17(2): 209-214.
- [2] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, et al. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. *Science*, 2000, 290(5499): 2105-2110.
- [3] YANAGISAWA S. A novel DNA-binding domain that may form a single zinc finger motif [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(17): 3403-3410.
- [4] YANAGISAWA S. *Dof* DNA-binding domains of plant transcription factors contribute to multiple protein-protein interactions [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 250(2): 403-410.
- [5] YANAGISAWA S, IZUI K. Molecular cloning of two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993,

- 268(21):16028-16036.
- [6] YANAGISAWA S. The *Dof* family of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(12):555-560.
 - [7] LIJAVETZKY D, CARBONERO P, VICENTE-CARBAJOSA J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and *Arabidopsis* *Dof* gene families[J]. BMC Evolutionary Biology, 2003, 3:17.
 - [8] SHAW L M, MCINTYRE C L, GRESSHOFF P M, et al. Members of the *Dof* transcription factor family in *Triticum aestivum* are associated with light-mediated gene regulation[J]. Functional & Integrative Genomics, 2009, 9(4):485-498.
 - [9] MORENO-RISUENO M A, MARTINEZ M, VICENTE-CARBAJOSA J, et al. The family of *Dof* transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 277(4):379-390.
 - [10] GUO Y, QIU L J. Genome-wide analysis of the *Dof* transcription factor gene family reveals soybean-specific duplicable and functional characteristics[J]. PLoS One, 2013, 8(9):e76809.
 - [11] KUSHWAHA H, GUPTA S, SINGH V K, et al. Genome wide identification of *Dof* transcription factor gene family in sorghum and its comparative phylogenetic analysis with rice and *Arabidopsis* [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(8):5037-5053.
 - [12] YANAGISAWA S. *Dof1* and *Dof2* transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize [J]. The Plant Journal, 2000, 21(3):281-288.
 - [13] VICENTE-CARBAJOSA J, MOOSE S P, PARSONS R L, et al. A maize zinc-finger protein binds the prolamins box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(14):7685-7690.
 - [14] BAUMANN K, DE PAOLIS A, COSTANTINO P, et al. The DNA binding site of the *Dof* protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants [J]. The Plant Cell, 1999, 11(3):323-333.
 - [15] WANG H W, ZHANG B, HAO Y J, et al. The soybean *Dof*-type transcription factor genes, *GmDof4* and *GmDof11*, enhance lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants [J]. The Plant Journal, 2007, 52(4):716-729.
 - [16] CHEN W, CHAO G, SINGH K B. The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites[J]. The Plant Journal, 1996, 10(6):955-966.
 - [17] LI D, YANG C, LI X, et al. Functional characterization of rice *OsDof12* [J]. Planta, 2009, 229(6):1159-1169.
 - [18] DONG G, NI Z, YAO Y, et al. Wheat *Dof* transcription factor WPBF interacts with TaQM and activates transcription of an alpha-glucanase gene during wheat seed development[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(1):73-84.
 - [19] GUO Y, QIN G, GU H, et al. *Dof5.6/HCA2*, a *Dof* transcription factor gene, regulates interfascicular cambium formation and vascular tissue development in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2009, 21(11):3518-3534.
 - [20] KONISHI M, YANAGISAWA S. Sequential activation of two *Dof* transcription factor gene promoters during vascular development in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2007, 45(8):623-629.
 - [21] FINN R D, BATEMAN A, CLEMENTS J, et al. Pfam: the protein families database [J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42:222-230.
 - [22] LETUNIC I, DOERKS T, BORK P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(D1):302-305.
 - [23] JIN J, ZHANG H, KONG L, et al. PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(Database issue):1182-1187.
 - [24] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37:202-208.
 - [25] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIK F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24):4876-4882.
 - [26] CROOKS G E, HON G, CHANDONIA J M, et al. WebLogo: a sequence logo generator [J]. Genome Research, 2004, 14(6):1188-1190.
 - [27] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10):2731-2739.
 - [28] LEE T H, TANG H, WANG X, et al. PGDD: a database of gene and genome duplication in plants [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41:1152-1158.
 - [29] KRZYWINSKI M, SCHEIN J, BIROL I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics [J]. Genome Research, 2009, 19(9):1639-1645.
 - [30] EISEN M B, SPELLMAN P T, BROWN P O, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(25):14863-14868.
 - [31] LI D, YANG C, LI X, et al. Sense and antisense *OsDof12* transcripts in rice [J]. BMC Molecular Biology, 2008, 9:80.
 - [32] WASHIO K. Identification of *Dof* proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1520(1):54-62.
 - [33] WASHIO K. Functional dissections between GAMYB and *Dof* transcription factors suggest a role for protein-protein associations in the gibberellin-mediated expression of the *RAMY1A* gene in the rice aleurone [J]. Plant Physiology, 2003, 133(2):850-863.
 - [34] SANTOS L A, DE SOUZA S R, FERNANDES M S. *OsDof25* expression alters carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis* under high N-supply [J]. Plant Biotechnology Reports, 2012, 6(4):327-337.