

时丕彪, 王德领, 蒋润枝, 等. 藜麦 ZF-HD 转录因子的全基因组鉴定及其对盐胁迫的响应分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(2): 304-312

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.02.003

藜麦 ZF-HD 转录因子的全基因组鉴定及其对盐胁迫的响应分析

时丕彪, 王德领, 蒋润枝, 李斌, 晏军, 方迪, 闫凯旋, 顾闽峰
(盐城市新洋农业试验站, 江苏 盐城 224049)

摘要: 以藜麦的高质量基因组为参考, 对藜麦锌指同源异型结构域(ZF-HD)转录因子基因 *CqZF-HD* 进行全基因组鉴定, 并利用生物信息学方法对其编码的蛋白质理化性质、二级结构、亚细胞定位、保守结构域以及基因结构、系统进化关系进行了分析。同时, 利用前期转录组测序结果分析了 *CqZF-HD* 家族基因在盐胁迫下的表达模式。结果表明, 在藜麦中共鉴定出 21 个 ZF-HD 转录因子, 大部分定位在细胞质, 二级结构以无规则卷曲为主, 氨基酸序列长度 68~284 aa, 相对分子质量 $7.54 \times 10^3 \sim 30.20 \times 10^3$, 理论等电点 6.01~9.54; 每个 ZF-HD 蛋白都含有 ZF 或 HD 保守结构域, 系统进化树将其划分为 5 个亚家族。盐处理下表达分析结果显示, 11 个 *CqZF-HD* 基因响应藜麦盐胁迫, 其中 8 个基因呈上调表达, 3 个基因呈下调表达, 说明 ZF-HD 家族基因在参与藜麦盐胁迫中发挥着不同的作用。

关键词: 藜麦; 锌指同源异型结构域(ZF-HD); 全基因组; 盐胁迫; 基因表达

中图分类号: S512.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)02-0304-08

Genome-wide identification of ZF-HD transcription factors and expression analysis of response to salt stress in quinoa

SHI Pi-biao, WANG De-ling, JIANG Run-zhi, LI Bin, YAN Jun, FANG Di, YAN Kai-xuan, GU Min-feng

(Xinyang Agricultural Experiment Station of Yancheng City, Yancheng 224049, China)

Abstract: Zinc finger-homeodomain (ZF-HD) proteins are plant-specific transcription factors that play important roles in plant growth, development and various stress responses. In this study, the *CqZF-HD* gene was identified at genome-wide level with the high-quality quinoa genome as a reference. The physicochemical properties, secondary structure, subcellular localization and conserved domains of *CqZF-HDs*, phylogenetic relationship and gene structure were analyzed by bioinformatics method. Meanwhile, the expression pattern of *CqZF-HD* family genes under salt stress was also analyzed by preliminary transcriptome sequencing results. The results showed that 21 ZF-HD transcription factors were identified in quinoa, most of which were located in the cytoplasm, the secondary structure was dominated by random coils, amino acid sequence length was 68–

284 aa, relative molecular weight was $7.54 \times 10^3 \sim 30.20 \times 10^3$, and theoretical isoelectric point was 6.01–9.54. All of the ZF-HDs were divided into five subfamilies by phylogenetic tree analysis, and each member contained conserved domains ZF or HD. The expression analysis under salt treatment showed that 11 *CqZF-HDs* responded to salt stress in quinoa, eight genes were up-regulated, and three genes were down-regulated. In conclusion, ZF-HD family genes play different roles in response to salt stress in quinoa.

收稿日期: 2021-07-11

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(19)3116]; 江苏现代农业(蔬菜)产业技术体系(盐城)推广示范基地项目[JATS(2020)205]

作者简介: 时丕彪(1989–), 男, 山东菏泽人, 助理研究员, 主要从事农作物新品种选育及分子育种研究。(E-mail) 1032175660@qq.com

通讯作者: 顾闽峰, (E-mail) ycgmf@126.com

Key words: quinoa; zinc finger-homeodomain (ZF-HD); genome-wide; salt stress; gene expression

锌指同源异型结构域(ZF-HD)蛋白是植物所特有的一类转录因子,在植物生长发育和各种胁迫反应中发挥着重要作用^[1-2]。ZF-HD 转录因子的氨基酸序列中具有保守的 HD 结构域(Homeodomain)和 C2H2 型 ZF 结构域(C2H2-type zinc finger domain)^[3-4]。HD 结构域是一种特征明确的 DNA 结合结构域,通过与 DNA 结合调控靶基因的表达水平,从而参与植物的生长发育^[5]。ZF 结构域广泛存在于调控蛋白中,并与 DNA 结合和蛋白质互作,在植物抵御胁迫反应中起着重要作用^[6-7]。ZF-HD 蛋白通常以一种核心序列 ATTA 与特异性 DNA 序列结合,形成同型二聚体或异型二聚体^[1]。ZF-HD 家族可分为 ZHD 和 MIF(Mini zinc finger)2 个亚家族,其中 MIF 基因编码 ZF-HD 蛋白的 ZF 结构域,并不编码 HD 结构域^[3]。

在黄顶菊中首次发现 ZF-HD 蛋白,可能是编码 C4 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的调控因子^[8]。随后,在拟南芥^[1]、水稻^[9]、番茄^[10]、大白菜^[4]、棉花^[11]和苦荞^[12]等植物中也发现了 ZF-HD 基因,并对其进行了基因家族鉴定及功能分析。拟南芥中有 17 个 ZF-HD 成员,它们作为转录因子,具有独特的生理特性,在花的发育中起着非常重要的作用^[3]。AtZHD1 能够与 ERD1(EARLY RESPONSE TO DEHYDRATION STRESS 1)启动子特异性结合,并且其表达受干旱、盐和脱落酸(ABA)处理诱导,NAC 和 AtZHD1 的过表达增强了拟南芥的耐旱性^[13]。AtHB33 受 ARF2(Auxin response factor2)负调控,是种子萌发和主根生长所必需的^[14]。OsZHD1 和 OsZHD2 通过调控鳞状细胞的数量和排列方式而引起水稻叶片卷曲^[15];OsZHD2 的过表达不仅能促进根的生长,还能增加水稻产量^[16]。干旱、NaCl 和低温处理对番茄 SlZHD18 基因具有明显的诱导作用,而热胁迫对其没有明显诱导作用^[10]。在响应干旱胁迫和高盐胁迫时,葡萄 VvZHD 基因呈上调表达^[17]。因此,ZF-HD 基因不仅在植物的各个生长发育阶段发挥着一定的作用,还参与了植物对盐分等逆境胁迫的响应。

藜麦是一种新型全营养作物,也是未来最具潜力的农作物之一。然而,关于藜麦 ZF-HD 基因的研究至今尚未见报道。随着藜麦基因组的公布^[18],使得在全基因组范围内分析藜麦 ZF-HD 基因家族成

为可能。本研究以现有的藜麦基因组信息为基础,借助生物信息学手段对藜麦 ZF-HD 基因家族进行全基因组鉴定,并对其基因结构、系统进化关系以及 ZF-HD 蛋白的理化性质和保守结构域等进行分析,同时利用转录组数据探究其在盐胁迫下的表达情况,为进一步解析 ZF-HD 基因家族与藜麦耐盐性的关系及其抗性遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 藜麦 ZF-HD 基因家族的鉴定和藜麦 ZF-HD 蛋白理化性质分析

从植物转录因子数据库 PlantTFDB(<http://planttfdb.gao-lab.org/>)下载拟南芥 AtZF-HD 转录因子的氨基酸序列,并在藜麦基因组数据库 Chenopodium quinoa v1.0(https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Cquinoa_er)进行 Blastp 比对,设置 E-value 为 1×10^{-5} 。在 Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)和 CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)上在线分析候选 CqZF-HD 蛋白的保守结构域,去除编码不完整蛋白质和不含 ZF 或 HD 结构域的蛋白质,最终得到藜麦 ZF-HD 转录因子家族所有成员。利用 ExPasy 网站(<http://au.expasy.org/tool.html>)分析藜麦 ZF-HD 蛋白家族的氨基酸序列长度、相对分子质量和理论等电点。

1.2 藜麦 ZF-HD 蛋白的二级结构和亚细胞定位

利用在线网站 GORIV(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)分析藜麦 ZF-HD 蛋白的二级结构特征。使用 PSORT(<http://psort1.hgc.jp/form.html>)对 ZF-HD 蛋白进行亚细胞定位预测。

1.3 藜麦 ZF-HD 基因家族的基因结构和藜麦 ZF-HD 蛋白保守结构域分析

根据藜麦 ZF-HD 基因的基因组序列和编码序列,确定基因的外显子和内含子起止位置,并利用在线软件 GSDS 2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制基因结构图。经 CDD 分析得到藜麦 ZF-HD 蛋白保守结构域的氨基酸序列起始位点,利用 IBS 1.0 软件^[19]将保守结构域位置进行可视化显示,再使用 ClustalX 2.0 软件^[20]对保守结构域氨基酸序列进行多重比对。

1.4 ZF-HD 基因家族的系统进化分析

利用 MEGA 5.0^[21] 内置软件 ClustalW 对藜麦 (21 个) 和拟南芥 (17 个) ZF-HD 蛋白的氨基酸序列进行多重比对, 再利用 MEGA 5.0 软件对比对结果进行系统进化关系分析, 用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建无根进化树, bootstrap 重复次数设置为 1 000 次。

1.5 盐胁迫下藜麦 ZF-HD 基因的表达分析

利用本课题组已经完成的藜麦高通量测序转录组数据, 分析藜麦 ZF-HD 基因家族在盐胁迫下的表达模式。用 3% 的双氧水对供试藜麦品种 37TES 的种子进行表面消毒 1 min, 然后用无菌水将种子冲洗干净, 在光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗的 28 °C 恒温光照培养箱进行发芽试验。培养 7 d 后, 将长势一致的幼苗转移到 Hoagland 营养液^[22] 中进行水培, 继续培养 28 d。然后进行 300 mmol/L NaCl 处理, 分别在 0 h、0.5 h、2.0 h 和 24.0 h 时取根部, 用于转录组测序和 qRT-PCR 验证, 每个处理设 3 次重复。藜麦 ZF-HD 基因家族成员的转录组表达量经 \log_2^x 均一化处理, 使用 HemI 软件^[23] 绘制盐胁迫下转录组基因表达图谱。

2 结果与分析

2.1 藜麦 ZF-HD 基因家族的全基因组鉴定与特征分析

以拟南芥 *AtZF-HD* 基因编码的蛋白质氨基酸序列为查询对象, 在藜麦全基因组数据库进行 Blastp 比对, 得到 23 个具有编码 ZF 或 HD 结构域的 *CqZF-HD* 基因, 其中有 2 个 *CqZF-HD* 编码不完整蛋白质, 最终鉴定出 21 个藜麦 ZF-HD 基因家族成员, 分布在 16 条 scaffold 上 (表 1)。理化性质分析结果表明, 不同 ZF-HD 蛋白氨基酸序列的长度差异较大, 其中 AUR62021438 最小, 为 68 aa, AUR62019007 最大, 为 284 aa。除 AUR62027182 和 AUR62044191 因蛋白质氨基酸序列含有几个连续未定义的氨基酸而无法计算其相对分子质量和等电点 (*pI*) 外, 其余 19 个 ZF-HD 蛋白的相对分子质量为 $7.54 \times 10^3 \sim 30.20 \times 10^3$, *pI* 为 6.01~9.54。*pI* 小于 7 的只有 AUR62021438 (6.68) 和 AUR62039796 (6.01), 为酸性蛋白质, 其他 ZF-HD 的 *pI* 均大于 7, 为碱性蛋白质。

表 1 藜麦 ZF-HD 基因家族的基本信息

Table 1 Basic information of ZF-HD gene family in quinoa

基因	亚家族	Scaffold 位置 (bp) 及基因方向	蛋白质氨基酸序列长度 (aa)	相对分子质量 ($\times 10^3$)	等电点 (<i>pI</i>)
AUR62004062	ZHD II	C_Quinoa_2370: 8067613~8068503 (-)	267	30.27	9.05
AUR62027182	ZHD I	C_Quinoa_2924: 264977~276132 (-)	270	-	-
AUR62000606	ZHD III	C_Quinoa_2088: 6516446~6517180 (-)	244	27.68	8.39
AUR62019007	ZHD I	C_Quinoa_3876: 1629352~1630995 (+)	284	30.20	9.39
AUR62027848	ZHD I	C_Quinoa_3784: 2466914~2473244 (+)	258	27.30	9.14
AUR62007575	ZHD II	C_Quinoa_2646: 624822~625682 (-)	257	28.97	9.17
AUR62021682	MIF	C_Quinoa_1675: 2345088~2345357 (-)	89	9.75	8.78
AUR62008414	MIF	C_Quinoa_3422: 4274960~4275232 (+)	90	9.86	8.78
AUR62044191	ZHD I	C_Quinoa_3699: 21725~22294 (-)	165	-	-
AUR62039798	MIF	C_Quinoa_1828: 2063935~2064237 (-)	100	10.86	8.97
AUR62034423	MIF	C_Quinoa_2742: 2093400~2093702 (-)	100	10.65	8.72
AUR62023917	MIF	C_Quinoa_3389: 758436~758732 (-)	98	10.72	8.34
AUR62038329	MIF	C_Quinoa_2169: 1620988~1626840 (-)	118	13.22	9.54
AUR62034421	MIF	C_Quinoa_2742: 2071762~2072013 (-)	83	9.19	7.66
AUR62039797	MIF	C_Quinoa_1828: 1985331~1985600 (-)	89	9.90	8.68
AUR62021437	MIF	C_Quinoa_2862: 2057866~2058111 (-)	81	8.94	8.93
AUR62010925	MIF	C_Quinoa_3799: 844034~844264 (-)	76	8.94	8.93
AUR62021438	MIF	C_Quinoa_2862: 2059440~2059646 (-)	68	7.54	6.68
AUR62039796	ZHD IV	C_Quinoa_1828: 1852396~1852746 (+)	116	12.56	6.01
AUR62028772	ZHD IV	C_Quinoa_2837: 79514~80763 (+)	153	16.27	9.18
AUR62010926	MIF	C_Quinoa_3799: 845579~845788 (-)	69	7.80	8.67

-: 因蛋白质氨基酸序列含有几个连续未定义的氨基酸而无法计算其相对分子质量和等电点 (*pI*)。

2.2 藜麦 ZF-HD 蛋白的二级结构和亚细胞定位预测

藜麦 ZF-HD 基因编码的蛋白质二级结构主要包括 α -螺旋、延伸链和无规则卷曲,均不含 β -折叠,其中 AUR62021682、AUR62008414、AUR62021438、AUR62039796、AUR62028772 和 AUR62010926 也没有 α -螺旋结构(表 2)。大部分 ZF-HD 成员的二级结构成分中,无规则卷曲占比最高,其次是延伸链, α -螺旋占比相对较少。亚细胞定位预测结果显示,14 个 ZF-HD 成员定位于细胞质,3 个成员定位于细胞核,3 个成员定位于线粒体基质,1 个成员定位于叶绿体基质,说明它们可能调控着植物不同的生物学过程。

表 2 藜麦 ZF-HD 蛋白的二级结构和亚细胞定位
Table 2 Secondary structure characteristics and subcellular localization of ZF-HD proteins in quinoa

ZF-HD 蛋白	α -螺旋 占比 (%)	延伸链 占比 (%)	无规则卷曲 占比 (%)	亚细胞 定位
AUR62004062	20.97	18.35	60.67	细胞质
AUR62027182	17.78	32.22	50.00	细胞质
AUR62000606	30.33	18.03	51.64	细胞核
AUR62019007	23.59	15.49	60.92	细胞核
AUR62027848	18.99	16.67	64.34	细胞核
AUR62007575	24.12	15.95	59.92	细胞质
AUR62021682	0	40.45	59.55	细胞质
AUR62008414	0	43.33	56.67	细胞质
AUR62044191	7.88	30.91	61.21	细胞质
AUR62039798	14.00	29.00	57.00	细胞质
AUR62034423	16.00	21.00	63.00	叶绿体基质
AUR62023917	13.27	32.65	54.08	线粒体基质
AUR62038329	31.36	22.88	45.76	线粒体基质
AUR62034421	6.02	28.92	65.06	细胞质
AUR62039797	5.62	31.46	62.92	线粒体基质
AUR62021437	18.52	27.16	54.32	细胞质
AUR62010925	6.58	32.89	60.53	细胞质
AUR62021438	0	44.12	55.88	细胞质
AUR62039796	0	33.62	66.38	细胞质
AUR62028772	0	33.62	66.38	细胞质
AUR62010926	0	37.68	62.32	细胞质

2.3 ZF-HD 基因家族的系统进化关系分析

为更好地了解藜麦 ZF-HD 基因家族成员之间

的同源性关系,将 17 个拟南芥 *AtZF-HD* 基因与 21 个藜麦 *CqZF-HD* 基因编码的蛋白质氨基酸序列进行多重比对并构建系统进化树(图 1)。聚类分析结果显示,38 个 ZF-HD 转录因子可以划分为 5 个亚家族:MIF、ZHD I、ZHD II、ZHD III 和 ZHD IV,位于不同亚家族的蛋白质可能发挥着不同的生物学作用。藜麦的 ZF-HD 基因在 MIF 亚家族数目较多,为 12 个,在 ZHD I 存在 4 个,在 ZHD II 和 ZHD IV 均含 2 个,在 ZHD III 只存在 1 个,即 AUR62000606。藜麦的 AUR62007575 和 AUR62004062 与拟南芥的 AT2G18350 和 AT1G75240 处于同一分支,说明它们的亲缘关系较近,可能具有类似的功能。

2.4 藜麦 ZF-HD 基因结构特征分析

基因结构分析结果表明,藜麦 ZF-HD 基因家族的基因结构比较简单,均不含非翻译区,但不同成员间也存在一定差异(图 2)。其中,13 个基因只有 1 个外显子,没有内含子;7 个基因具有 2 个外显子和 1 个内含子;1 个基因(AUR62027182)具有 4 个外显子和 3 个内含子。AUR62019007 和 AUR62027848 同属 ZHD I 亚家族,有着相同的基因结构和相似的 CDS 长度,但因内含子长度差别较大使其基因全长存在显著差异。

为进一步研究藜麦 ZF-HD 蛋白的特征区域,在 CDD 网站上对其进行保守结构域分析,结果表明 21 个 ZF-HD 蛋白均含有 ZF 或 HD 结构域,但这 2 个结构域在各个亚家族成员的分布有所不同(图 3)。MIF 亚家族所有成员 HD 结构域缺失,均只含有 1 个 ZF 结构域,并且同源基因对编码蛋白质的氨基酸数量和结构域位置都具有较高的相似性;ZHD I 亚家族中除 AUR62044191 只含有 1 个 ZF 结构域外,其他 3 个成员都含有 ZF 和 HD 结构域;ZHD II 和 ZHD III 的成员都含有 ZF 和 HD 结构域;ZHD IV 的 2 个成员的保守结构域均位于蛋白质的 N 端,AUR62039796 只含有 1 个 HD 结构域,而 AUR62028772 只含有 1 个 ZF 结构域。

对藜麦 ZF-HD 蛋白保守结构域氨基酸序列进行多重比对,发现 ZF 结构域由 31~55 个氨基酸组成,HD 结构域由 31~58 个氨基酸组成,并且它们都有多个保守的氨基酸位点,HD 结构域在藜麦 ZF-HD 家族中的保守性比 ZF 结构域更强(图 4)。保守区域可能通过与其他 DNA 结合或互作,从而导致 ZF-HD 转录因子的功能多样性。

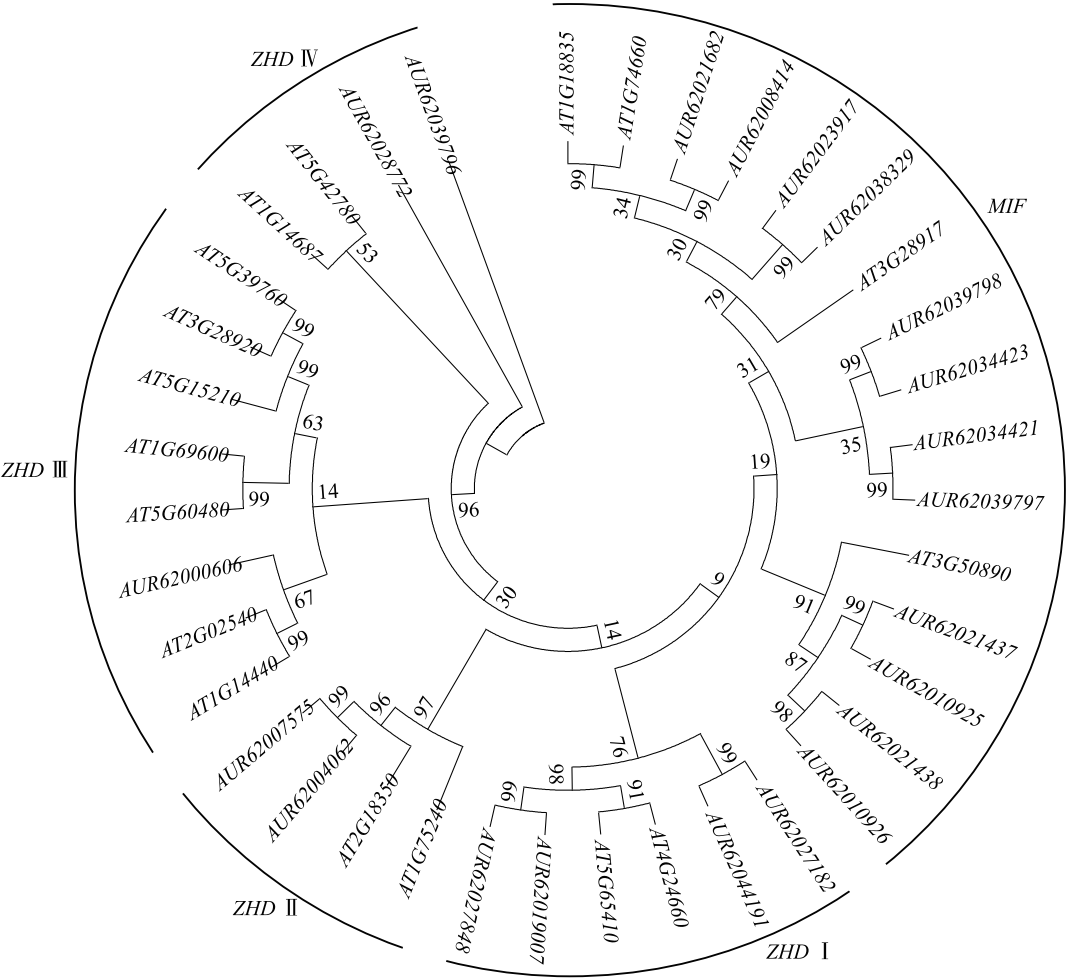


图 1 藜麦和拟南芥 ZF-HD 基因家族系统进化树
Fig.1 Phylogenetic tree of ZF-HD gene family in quinoa and Arabidopsis

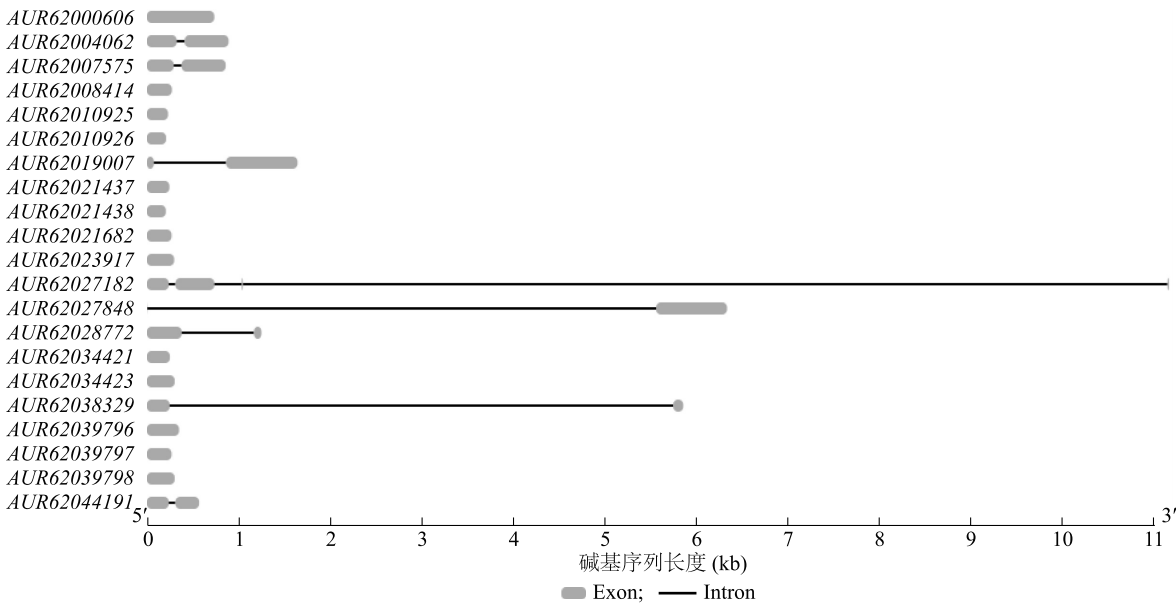


图 2 藜麦 ZF-HD 基因结构
Fig.2 Gene structure of ZF-HD in quinoa

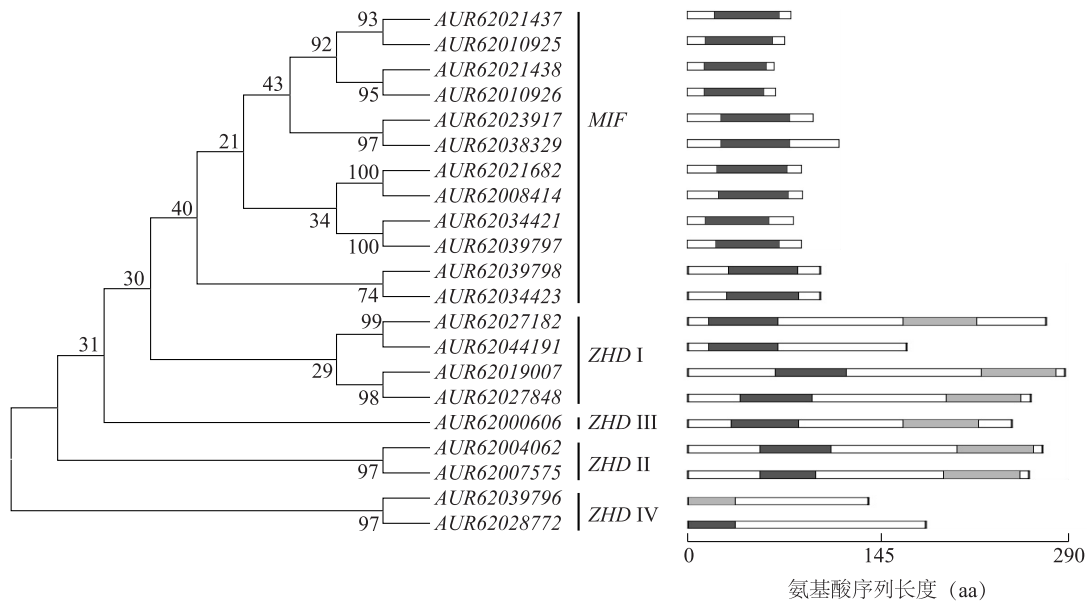


图3 藜麦 ZF-HD 基因进化树及其编码的蛋白质保守结构域

Fig.3 Phylogenetic tree of ZF-HD gene and conserved domains of the encoded protein in quinoa

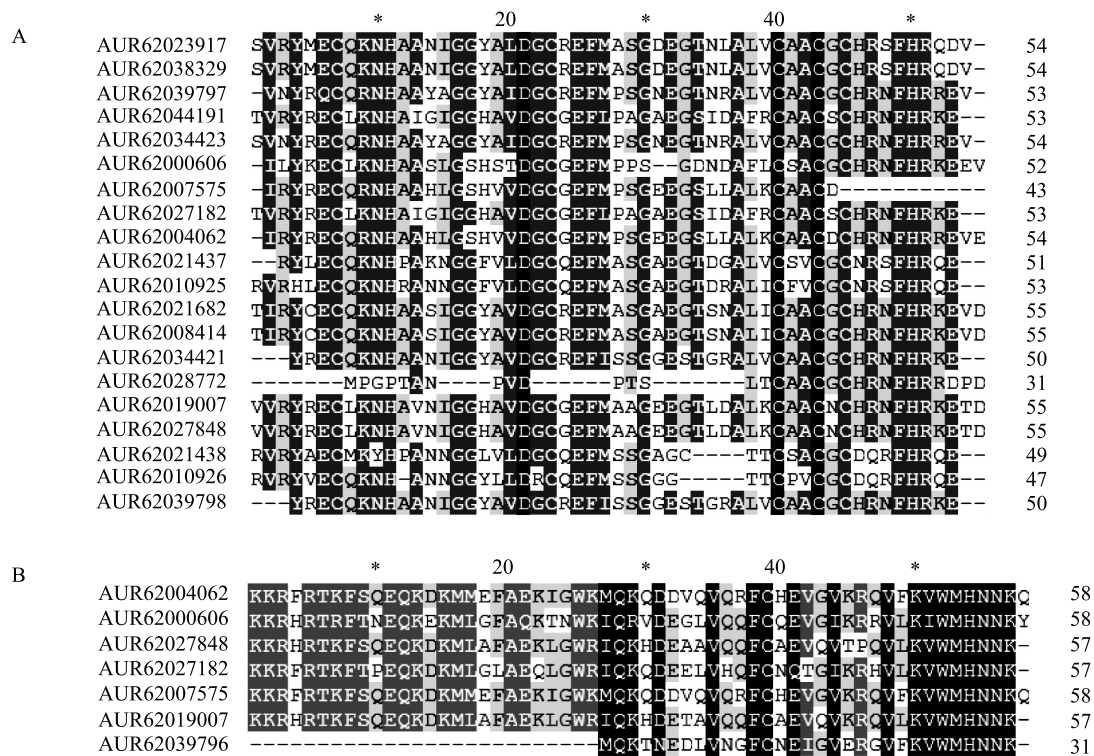


图4 藜麦 ZF-HD 蛋白 ZF 结构域 (A) 和 HD 结构域 (B) 的氨基酸序列比对

Fig.4 Amino acid sequence alignment of ZF domain (A) and HD domain (B) of quinoa ZF-HD proteins

2.5 藜麦 ZF-HD 家族基因在盐胁迫下的表达模式分析

为挖掘藜麦耐盐相关 ZF-HD 基因,提供藜麦耐盐遗传改良基因资源,利用课题组前期完成的转录组数据,对 ZF-HD 家族基因在盐胁迫下的表达模式进行分

析。结果如图 5 所示,藜麦 ZF-HD 家族基因在盐胁迫处理后的表达模式存在差异,其中 10 个基因表达量未发生变化,即不参与对盐胁迫的响应,11 个基因表达量在不同处理时间发生不同程度的变化。与对照(0 h)相比,AUR62027848、AUR62008414 和 AUR62028772 基因

在各个时间点都呈上调表达,而 *AUR62004062*、*AUR62000606* 和 *AUR62023917* 则呈下调表达。盐胁迫 0.5 h 时, *AUR62019007* 和 *AUR62007575* 的表达量上调至最高值,在 2.0 h 和 24.0 h 时表达量有所下降并明显低于对照,说明这 2 个基因可能迅速响应早期盐胁迫。盐胁迫下 *AUR62021682* 的表达量呈先降低后升高再降低的趋势,在 2.0 h 时达到最高峰; *AUR62039798* 和

AUR62039796 的表达量呈先降低后上升的趋势,在 24.0 h 达到最大值。为验证转录组数据的可靠性,课题组已对用于测序的样品进行了 qRT-PCR 分析(图 6),结果表明两者具有很强的相关性($R^2=0.7973$),证明 RNA-seq 表达数据是可靠的^[24]。同时, *ZF-HD* 家族基因在盐胁迫下呈现出的不同表达模式也说明它们在藜麦盐响应过程中可能发挥着不同的作用。

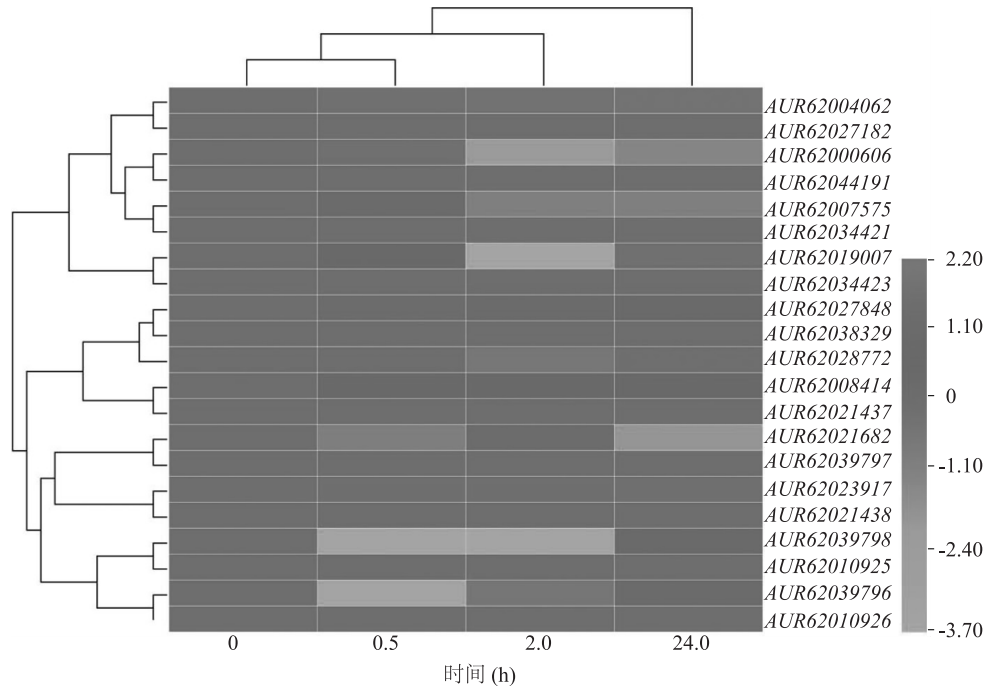


图 5 藜麦 *ZF-HD* 家族基因在不同盐胁迫时间下的表达模式

Fig.5 Expression pattern of *ZF-HD* family genes under different salt stress time in quinoa

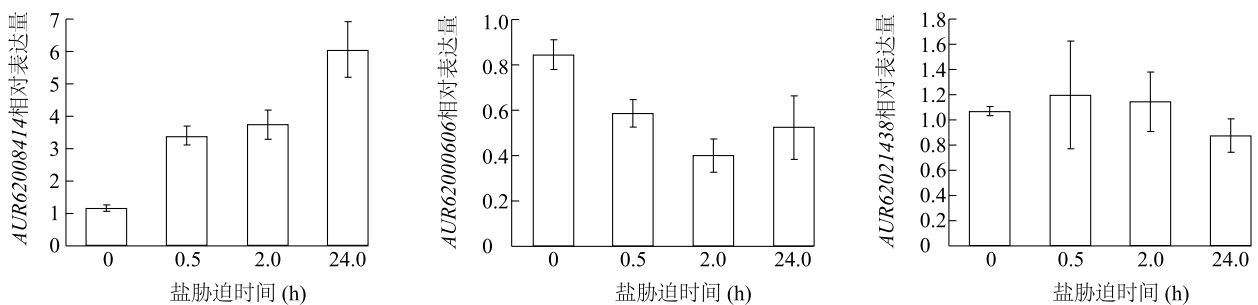


图 6 3 个藜麦 *ZF-HD* 基因在盐胁迫下的表达

Fig.6 Expression of three *ZF-HD* genes in quinoa under salt stress

3 讨论

土壤盐分是干旱半干旱地区现代农业的主要非生物胁迫之一,严重影响种子萌发、植物生长发育和作物产量^[25-26]。据统计,约有 8×10^8 hm^2 的土地(占世界土地总面积的 6.5%)受到盐胁迫的危害^[27]。为了

适应盐胁迫,植物进化出了一系列的响应机制来提高其耐盐性,包括复杂的生理特性、代谢和信号通路以及分子调控网络等。随着植物基因组测序的完成及全基因组数据库的公布,越来越多的耐盐基因被挖掘出来,其中鉴定和分析植物基因家族就是挖掘关键功能基因的一种有效手段。植物特异性 *ZF-HD* 基因编

码一个转录因子家族,该家族存在于陆生植物的主要类群中,包括维管植物和非维管植物,但在原核生物、绿藻和真菌中没有发现。*ZF-HD* 基因家族参与多种过程,包括植物发育和生理过程,以及对生物胁迫和非生物胁迫的抗性。目前,在拟南芥、水稻、玉米和棉花等多种植物中均已鉴定出 *ZF-HD* 基因家族,但关于藜麦 *ZF-HD* 基因家族的研究至今尚未见报道。在本研究中,我们鉴定并分析了藜麦 *ZF-HD* 基因的全基因组及其在盐胁迫反应中的表达。

在藜麦 *ZF-HD* 基因家族中共鉴定出 21 个成员,其数量要多于模式植物拟南芥(17)和水稻(15),可能是因为基因组复制事件导致了异源四倍体物种藜麦 *ZF-HD* 基因的扩增。21 个 *ZF-HD* 基因不均匀地分布在藜麦 16 条 scaffold 上,其编码蛋白质的氨基酸数量和相对分子质量存在差异,并以碱性蛋白质居多。基因外显子和内含子结构的差异主要有 3 种机制,即外显子或内含子的获得或丢失,外显子化或假外显子化和插入或缺失^[28-29]。藜麦所有 *ZF-HD* 成员中,13 个基因没有内含子,7 个基因只有 1 个内含子,1 个基因具有 3 个内含子,这种差异可能是上述 3 种机制参与所致。有研究结果表明,植物基因内含子的数量越少,其对外界环境的适应性越强^[30]。将拟南芥和藜麦的 *ZF-HD* 蛋白构建系统进化树,38 个 *ZF-HD* 转录因子划分为 5 个亚家族,2 种植物 *ZF-HD* 在每个亚家族均有分布,说明基因复制是植物基因组进化中基因家族扩增的主要驱动力。藜麦 *ZF-HD* 蛋白在结构上与其他物种是相似的,含有 ZF 和 HD 结构域,但在亚家族分布上也有不同之处,比如与拟南芥^[1]和小麦^[2]等植物相比,藜麦的 MIF 亚家族成员同样只含有 ZF 结构域,而 ZHD 亚家族并非都同时含有 ZF 和 HD 结构域。氨基酸序列分析结果显示,藜麦 ZF 和 HD 结构域都具有高度保守性,并且 HD 结构域的保守性更强一些,结构域中保守区域可能通过与其他 DNA 结合或互作,从而导致 *ZF-HD* 转录因子的功能多样性。二级结构和亚细胞定位分析结果显示,大部分 *ZF-HD* 成员中无规则卷曲占比最高,其次是延伸链, α -螺旋占比相对较少,其中 3 对同源基因不含 α -螺旋;14 个 *ZF-HD* 属于胞质蛋白,分别有 3 个成员定位于细胞核和线粒体基质,1 个定位于叶绿体基质,说明它们在参与藜麦生物学过程中可能发挥着不同的作用。

植物以一种复杂的方式响应盐胁迫,涉及许多基

因、蛋白质以及代谢和信号通路的协同功能与相互作用^[31-32]。基因表达调控是植物应对和适应盐胁迫的关键现象之一^[33-35]。相关研究结果表明,*ZF-HD* 在植物耐盐胁迫中扮演着重要的角色^[10, 17]。本研究利用课题组已经完成藜麦在 300 mmol/L NaCl 处理下不同时间点的高通量测序转录组数据,分析了所有 *ZF-HD* 基因在响应盐胁迫的表达模式,发现 10 个成员不参与响应盐胁迫,另外 11 个成员的表达量在不同处理时间呈现出不同变化,说明它们在藜麦响应盐胁迫过程中发挥着不同的作用。*AUR62027848*、*AUR62008414* 和 *AUR62028772* 基因在盐处理 0.5~24.0 h 时表达量受到明显诱导,这些基因可能在藜麦抵抗盐胁迫过程中发挥着重要的作用。而 *AUR62004062*、*AUR62000606* 和 *AUR62023917* 为盐敏感基因,盐胁迫明显抑制了其表达。*AUR62019007* 和 *AUR62007575* 在盐胁迫 0.5 h 时表达量较高,在胁迫后期显著下降,说明这 2 个基因可在早期迅速响应盐胁迫,可能直接受到盐胁迫信号的诱导。关于 *ZF-HD* 在藜麦抵抗盐胁迫中的功能及作用机理仍需要借助遗传转化手段进行验证。

4 结 论

本研究对藜麦 *ZF-HD* 转录因子进行了全基因组鉴定,共获得 21 个家族成员,划分为 5 个亚家族,都具有典型的 ZF 或 HD 保守结构域。21 个 *ZF-HD* 基因在盐胁迫处理下呈现出不同的表达模式,推测不同 *ZF-HD* 家族基因在藜麦响应盐胁迫过程中可能发挥着不同的作用。

参考文献:

- [1] TAN Q K, IRISH V F. The Arabidopsis zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development [J]. *Plant Physiology*, 2006, 140: 1095-1108.
- [2] LIU H, YANG Y, ZHANG L S. Zinc finger-homeodomain transcriptional factors (ZF-HDs) in wheat (*Triticum aestivum* L.): identification, evolution, expression analysis and response to abiotic stresses [J]. *Plants*, 2021, 10: 593.
- [3] HU W, DEPAMPHILIS C W, MA H. Phylogenetic analysis of the plant-specific zinc finger-homeobox and mini zinc finger gene families [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50: 1031-1045.
- [4] WANG W, WU P, LI Y, et al. Genome-wide analysis and expression patterns of ZF-HD transcription factors under different developmental tissues and abiotic stresses in Chinese cabbage [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291: 1451-1464.

- [5] BHATTACHARJEE A, GHANGAL R, GARG R, et al. Genome-wide analysis of homeobox gene family in legumes: Identification, gene duplication and expression profiling [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0119198.
- [6] KRISHNA S S, MAJUMDAR I, GRISHIN N V. Structural classification of zinc fingers: Survey and summary [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 532-550.
- [7] MACKAY J P, CROSSLEY M. Zinc fingers are sticking together [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1998, 23: 1-4.
- [8] WINDHOVEL A, HEIN I, DABROWA R, et al. Characterization of a novel class of plant homeodomain proteins that bind to the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Flaveria trinervia* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45: 201-214.
- [9] JØRGENSEN J E, GRØNLUND M, PALLISGAARD N, et al. A new class of plant homeobox genes is expressed in specific regions of determinate symbiotic root nodules [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40: 65-77.
- [10] KHATUN K, NATH U K, ROBIN A, et al. Genome-wide analysis and expression profiling of zinc finger homeodomain (ZHD) family genes reveal likely roles in organ development and stress responses in tomato [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18: 695.
- [11] ABDULLAH M, CHENG X, CAO Y, et al. Zinc finger-homeodomain transcriptional factors (ZHDs) in upland cotton (*Gossypium hirsutum*): Genome-wide identification and expression analysis in fiber development [J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 357.
- [12] LIU M, WANG X, SUN W, et al. Genome-wide investigation of the ZF-HD gene family in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) [J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19: 248.
- [13] TRAN L S, NAKASHIMA K, SAKUMA Y, et al. Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the *ERD1* gene in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2007, 49: 46-63.
- [14] WANG L, HUA D, HE J, et al. *Auxin Response Factor2* (*ARF2*) and its regulated homeodomain gene *HB33* mediate abscisic acid response in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7: e1002172.
- [15] XU Y, WANG Y, LONG Q, et al. Overexpression of *OszHD1*, a zinc finger homeodomain class homeobox transcription factor, induces abaxially curled and drooping leaf in rice [J]. *Planta*, 2014, 239: 803-816.
- [16] YOON J, CHO L H, YANG W, et al. Homeobox transcription factor *OszHD2* promotes root meristem activity in rice by inducing ethylene biosynthesis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(18): 5348-5364.
- [17] WANG H, YIN X, LI X, et al. Genome-wide identification, evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) zinc finger-homeodomain gene family [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15: 5730-5748.
- [18] JARVIS D E, HO Y S, LIGHTFOOT D J, et al. The genome of *Chenopodium quinoa* [J]. *Nature*, 2017, 542: 307-312.
- [19] LIU W, XIE Y, MA J, et al. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(20): 3359-3361.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] HU L, LI H, CHEN L, et al. RNA-seq for gene identification and transcript profiling in relation to root growth of bermudagrass (*Cynodon dactylon*) under salinity stress [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 575.
- [23] DENG W, WANG Y, LIU Z, et al. HemI: a toolkit for illustrating heatmaps [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e111988.
- [24] SHI P, GU M. Transcriptome analysis and differential gene expression profiling of two contrasting quinoa genotypes in response to salt stress [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20: 568.
- [25] HANIN M, EBEL C, NGOM M, et al. New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1787.
- [26] JULKOWSKA M M, KOEVOETS I T, MOL S, et al. Genetic components of root architecture remodeling in response to salt stress [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(12): 3198-3213.
- [27] ROZEMA J, FLOWERS T. Crops for a salinized world [J]. *Science*, 2008, 322: 1478-1480.
- [28] GUIXIA X, CHUNCE G, HONGYAN S, et al. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(4): 1187-1192.
- [29] FILIZ E, TOMBULOĞLU H. Genome-wide distribution of superoxide dismutase (SOD) gene families in *Sorghum bicolor* [J]. *Turkish Journal of Biology*, 2015, 39(1): 49-59.
- [30] JIN Z, CHANDRASEKARAN U, LIU A. Genome-wide analysis of the Dof transcription factors in castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. *Genes & Genomics*, 2014, 36(4): 527-537.
- [31] ZHU J K. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124: 941-948.
- [32] APSE M P, BLUMWALD E. Engineering salt tolerance in plants [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13: 146-150.
- [33] 梁国旺, 李增强, 周步进, 等. 红麻谷胱甘肽还原酶基因 (*HcGR*)的克隆及盐胁迫下表达分析[J]. *南方农业学报*, 2020, 51(10): 2412-2419.
- [34] 张恒, 刘晓婷, 陈嵩, 等. 盐胁迫下三倍体小黑杨杂种无性系叶片蛋白质差异表达分析[J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2020, 44(2): 59-66.
- [35] JAMIL A, RIZA S, ASHRAF M, et al. Gene expression profiling of plants under salt stress [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2011, 30: 435-458.

(责任编辑:张震林)