

周旭旭, 刘金洋, 陈 新, 等. 绿豆 *Alfin1-like* 基因家族的鉴定与干旱胁迫下的表达分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(5): 1179-1187.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.05.004

绿豆 *Alfin1-like* 基因家族的鉴定与干旱胁迫下的表达分析

周旭旭^{1,2}, 刘金洋², 陈 新², 薛晨晨², 陈景斌², 林 云², 闫 强², 吴然然²,
朱月林¹, 袁星星²

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏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: *Alfin1-like* (AL) 转录因子家族在对非生物胁迫的反应中具有重要调控作用。为了探究绿豆[*Vigna radiata* (L.) Wilczek] AL 基因家族成员在干旱胁迫下的表达情况, 本研究在前期以苏绿 1 号为试验材料完成全基因组测序和盐胁迫下转录组测序的基础上, 采用同源比对的方法鉴定绿豆 AL 转录因子 (VrAL) 家族基因, 分析其生物学特性; 用 1/2 浓度 Hoagland 营养液培养绿豆幼苗, 对照组 (CK) 无聚乙二醇 (PEG 6000), 处理组含有 20% PEG 6000, 采用 qRT-PCR 方法探索 VrAL 基因家族成员在干旱胁迫下基因表达的差异。结果表明: (1) 共鉴定到 10 个 VrAL 基因, 根据其在染色体上的位置依次命名为 VrAL1 ~ VrAL10, 其编码区长度范围为 717 ~ 765 bp。 (2) 10 个 VrAL 基因均含有 4 个内含子和 5 个外显子, 其中 8 个 VrAL 基因的启动子区域存在抗逆和植物激素响应元件。 (3) qRT-PCR 分析结果表明, 处理组根中 VrAL1、VrAL5、VrAL7 和 VrAL9 上调表达, 叶中 VrAL8、VrAL9 和 VrAL10 上调表达, 它们在绿豆对干旱胁迫响应中发挥了重要的作用。

关键词: 绿豆; *Alfin1-like* 基因家族; 干旱胁迫

中图分类号: S522 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)05-1179-09

Identification of *Alfin1-like* gene family in *Vigna radiata* (L.) Wilczek and its expression analysis under drought stress

ZHOU Xu-xu^{1,2}, LIU Jin-yang², CHEN Xin², XUE Chen-chen², CHEN Jing-bin², LIN Yun²,
YAN Qiang², WU Ran-ran², ZHU Yue-lin¹, YUAN Xing-xing²

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory of Efficient Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: *Alfin1 like* (AL) transcription factor family plays an important regulatory role in response to abiotic

收稿日期: 2022-02-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2020YFD1000800, 2020YFD1000805);
国家自然科学基金项目 (31871696); 国家现代农业产业技术
体系-食用豆项目 (CARS-08); 江苏省自然科学基金项目
(BK20200282); 江苏高校优势学科建设工程项目 (PAPD)

作者简介: 周旭旭 (1996-), 男, 河南郑州人, 硕士研究生, 从事豆类
作物分子育种研究。

通讯作者: 朱月林, (E-mail) ylzhu@njau.edu.cn; 袁星星, (E-mail) yxx
@jaas.ac.cn

stress. To explore the expression pattern of AL gene family members of *Vigna radiata* (L.) Wilczek under drought stress, the VrAL transcription factor family genes of mung bean were identified by homologous alignment and their biological characteristics were analyzed, based on our previous work of whole genome sequencing and transcriptome sequencing of the mung bean material Sulv No.1 under salt stress. Mung bean seedlings were cultured with 1/2 concentration of Hoagland nutrient solution, the control (CK)

did not contain polyethylene glycol 6000 (PEG6000) and the treatment group contained 20% PEG6000. The expression differences of *VrAL* gene family members under drought stress were detected by qRT-PCR. The results showed that, a total of ten *VrAL* genes were identified and named as *VrAL1*-*VrAL10* according to their positions on the chromosomes, and the lengths of their coding regions ranged from 717 bp to 765 bp. The above ten *VrAL* genes all contained four introns and five exons, of which eight *VrAL* genes contained stress resistant and phytohormone response elements in their promoter regions. Results of qRT-PCR analysis showed that under the PEG 6000 conditions the expression levels of *VrAL1*, *VrAL5*, *VrAL7* and *VrAL9* in roots were up-regulated, and *VrAL8*, *VrAL9* and *VrAL10* in leaves were up-regulated. The up-regulated *VrAL* genes may play important roles in responses to drought stresses of mung bean.

Key words: *Vigna radiata* (L.) Wilczek; *Alfin1*-like gene family; drought stress

Alfin1-like 蛋白家族是 PHD 蛋白家族中的 1 个亚家族,其 N 端有 1 个 Alfin 结构域,C 端有 1 个保守的 PHD-finger 结构域。*Alfin1*-like 基因只存在于植物中,其在进化上也是非常保守的,具有 4 个内含子和 5 个外显子^[1]。Alfin1-like 蛋白与植物的耐盐性有很大关系。第一个 Alfin1 蛋白是从苜蓿中分离出来的^[2],过表达 *Alfin1* 基因可以增强植物的耐盐性^[3]。在其他作物中,Alfin1-like 蛋白在应对盐胁迫、干旱胁迫等逆境中都有很重要的调节作用,比如过表达大豆中 *GmPHD2* (1 种编码 Alfin1 的基因) 的拟南芥表现出耐盐性^[4]。在鹰嘴豆的干旱胁迫分析中,发现 1 个 *Alfin1*-like 转录因子在干旱胁迫下,上调表达,该转录因子可能与抗旱相关^[5]。

绿豆是亚洲重要的豆类作物,也是中国重要的小杂粮作物。绿豆富含蛋白质、维生素、矿物质和碳水化合物,是一种优质的膳食原料^[6]。本课题组前期以苏绿 1 号为试验材料完成了全基因组测序和盐胁迫下的转录组测序,在获得的基因组及转录组数据中均能检测到 *Alfin1*-like 基因家族的 10 个成员。因此,本研究首先在全基因组水平上,通过比较基因组学分析对 *VrAL* (绿豆 *Alfin1*-like) 基因进行鉴定,并对其家族成员启动子及基因复制进行分析,研究绿豆中该基因家族的复制特征。其次,用含有 20% PEG6000 (聚乙二醇 6000) 的 Hoagland 营养液处理绿豆幼苗,采用 qRT-PCR 探究 *VrAL* 基因家族对 PEG 模拟干旱的响应特点。旨在探索 *VrAL* 基因家族成员在干旱胁迫下基因表达的差异性。

1 材料与方法

1.1 材料的处理与获得

试验材料为绿豆 [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] 苏绿 1 号,在江苏省农业科学院经济作物研究所温室内以蛭石为基质进行穴盘育苗,每盘培育 50 株幼

苗,共 2 个穴盘,用 1/2 浓度的 Hoagland 营养液^[7]进行底面吸肥,每 2 d 更换 1 次营养液。

播种后 10 d,第 1 对真叶充分展开后,参照曹志敏等^[8]的方法,在 1 个穴盘的营养液中添加 20% 的 PEG6000 模拟干旱胁迫;对照组穴盘的营养液中不添加 PEG6000。参照谢敏等^[9]的方法,在绿豆幼苗被胁迫 0 h、12 h、24 h、36 h 时分别在处理组和对照组随机取样 5 株,取叶片和根部组织各 0.1 g 保存于液氮中,为 qRT-PCR 分析备用。

1.2 全基因组 *VrAL* 家族成员鉴定

基因家族成员鉴定遵循以下步骤:①使用 7 条拟南芥 AL 蛋白序列和绿豆蛋白质数据库进行本地 BLAST 搜索,*E* 值设置为 1×10^{-10} ,获得绿豆 AL 家族候选序列,拟南芥和绿豆蛋白质数据从 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载^[10]。②将 AL 家族候选序列在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上进行 Pfam 检测,去除不含 Alfin1-like 结构域的序列。③将获得的 AL 家族序列与本课题组之前完成的苏绿 1 号全基因组测序数据进行比较以确认所获得序列的准确性。④将 10 条 *VrAL* 家族蛋白质序列上传到在线网站 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分析 *VrAL* 家族蛋白质的理化性质^[11],用在线网站 Cell-PLoc (<http://www.cs-bio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 进行亚细胞定位预测^[12]。

1.3 *VrAL* 基因结构及进化分析

使用 TBtools 工具^[13]进行基因结构分析并进行可视化操作。利用在线网站 (Phytozome doe.gov) 获得水稻、大豆、玉米的基因数据,从中挑选出用拟南芥 AL 基因家族注释的基因,并获得其氨基酸序列。再用 Clustal W 对拟南芥、水稻、大豆、玉米、绿豆 AL 家族的蛋白质序列进行序列比对。最后,在 MEGA 7.0 中用邻接 (Neighbor-joining) 法构建系统进化树,

Bootstrap 设置为1 000次,其他设置选择默认参数。

1.4 *VrAL* 基因家族的染色体定位、启动子及基因复制分析

利用 TBtools 工具从绿豆基因组中 *VrAL* 基因家族 5'端上游各选2 000 bp,使用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站对基因家族成员进行启动子分析^[14]。从预测结果筛选出与植物激素响应及逆境响应相关的元件,并用 TBtools 工具将其可视化。为了进一步分析基因重复事件,本研究拟分析非同义替换率(K_a)和同义替换率(K_s),估算各旁系之间的 K_a/K_s 比值,以检测该基因家族在进化中受到的选择压力。

1.5 *VrAL* 家族蛋白质的多序列比对及互作蛋白质预测

利用 DNAMAN 对绿豆 10 个 *AL* 家族蛋白质进行多序列比对^[9],并将绿豆 10 条 *AL* 蛋白的氨基酸序列上传至在线网站 string (<https://www.string-db.org/>) 进行互作蛋白质预测,Network type 设置为 full STRING, Required score 设置为 medium confidence

(0.400)。

1.6 PEG 模拟干旱胁迫下 *VrAL* 家族的 qRT-PCR 分析

利用植物 RNA 提取试剂盒[DP419,天根生化科技(北京)有限公司产品]来提取总 RNA。使用植物反转录试剂盒(TSK302M,南京擎科生物科技有限公司产品)进行反转录。用内参基因检验反转录合成的 cDNA 第一条链的完整性。使用 NCBI Primer designing tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 在线设计 *VrAL* 基因家族的 qRT-PCR 特异性引物,并用 TBtools-primer check 检查引物的特异性。引物信息见表 1。以反转录的 cDNA 为模板,使用荧光定量试剂盒(TSE201,南京擎科生物科技有限公司产品)进行 qRT-PCR 分析。每个样品进行 5 次生物学重复和 3 次技术重复。利用 *VrAL* 基因的循环数阈值(C_t)减去内参基因的 C_t ,得到 ΔC_t 后,用 $2^{-\Delta C_t}$ 法计算相对表达量^[15],使用 SPSS 统计软件对基因表达水平进行 Duncan's 检验, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

表 1 *VrAL* 基因家族及内参基因荧光定量引物

Table 1 Quantitative real-time PCR primers for *VrAL* gene family and reference gene

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')	扩增产物大小(bp)
<i>VrAL1</i>	GGAGAAGTCAACAGACCGCA	TCTCTCCGTGTTCTCTCTCT	136
<i>VrAL2</i>	CGGGACTGGGTATGCTTTGT	TGCCAACAAACAGCCTCGAAT	156
<i>VrAL3</i>	ATGCTCATGTTGCTGACGCT	TCTGAGCCTTCGCAGGAGTA	101
<i>VrAL4</i>	CGAGGATTTCAAGGGCGGAA	TTAATGCCCAGGACAGGCTC	188
<i>VrAL5</i>	CTCGTACGCTCGAAGAGGTC	CGGGATCACACTGCTGCTAG	104
<i>VrAL6</i>	ATGTGGTGCTTGCGGTGATA	TGTTACTGCAGCTAGGGCAC	148
<i>VrAL7</i>	TTTTGGAGCCAGATTTCGGGT	CTGGAGCTCGTTGTGCCTTA	184
<i>VrAL8</i>	GGATTACACCGCCCGAAGAA	CTGGCAAAGTCACCTCCCAA	139
<i>VrAL9</i>	ATTCATGGCTGCTTGCACTG	ATCATGGCTCCATCGATGCTT	189
<i>VrAL10</i>	CGAAGTTTGCTGCGGATGAG	CCCATGGAACCACTCTCAC	136
<i>Tubulin</i>	TTCTTTATGGTTGGGTTTGC	GCTCGTCTACCTCCTTTGTG	192

2 结果和分析

2.1 *VrAL* 蛋白家族成员的生化特性

经过 BLAST 比对和挑选,绿豆全基因组中共鉴定到 10 个 *AL* 基因。根据它们在染色体上的分布,依次命名为 *VrAL1* ~ *VrAL10*。绿豆 *VrAL* 基因的编码区

(Coding sequence, CDS) 位于 717 (*VrAL8*) ~ 765 bp (*VrAL3*),编码的氨基酸序列长度为239~255 aa,相对分子质量为 27 000~28 800,理论等电点为 4.91 (*VrAL2*) ~ 6.24 (*VrAL9*)。亲水性预测结果表明,*VrAL* 蛋白均为亲水性蛋白质(表 2)。*VrAL* 蛋白亚细胞定位预测结果表明,*VrAL* 蛋白均定位在细胞核。

表 2 绿豆 *AL* 基因家族成员及其编码蛋白质的生化特性Table 2 Biochemical characteristics of *VrAL* gene family members and their encoded proteins

基因	苏绿 1 号测序基因 ID	基因 ID	染色体	编码区大小 (bp)	氨基酸长度 (aa)	蛋白质相对 分子质量	理论等电点	亲水性值
<i>VrAL1</i>	EVM0002357	106760813	染色体 5	741	247	28 100	5.24	-0.701
<i>VrAL2</i>	EVM0018513	106761220	染色体 5	762	254	28 500	4.91	-0.541
<i>VrAL3</i>	EVM0010532	106762711	染色体 5	765	255	28 600	5.72	-0.724
<i>VrAL4</i>	EVM0005488	106761898	染色体 5	750	250	28 300	5.10	-0.662
<i>VrAL5</i>	EVM0023136	106765200	染色体 6	753	251	28 400	5.08	-0.712
<i>VrAL6</i>	EVM0033251	106768283	染色体 7	756	252	28 400	5.15	-0.690
<i>VrAL7</i>	EVM0028859	106774284	染色体 9	759	253	28 800	5.32	-0.768
<i>VrAL8</i>	EVM0016362	106774169	染色体 9	717	239	27 000	5.41	-0.674
<i>VrAL9</i>	EVM0019470	106776977	染色体 11	732	244	27 300	6.24	-0.378
<i>VrAL10</i>	EVM0003660	106779044	待定	720	240	27 100	5.48	-0.669

2.2 *VrAL* 保守结构域、基因结构及进化树分析

从进化树可以看出,10 个 *VrAL* 基因分出 3 个分支,*VrAL1*、*VrAL6*、*VrAL7*、*VrAL3* 基因属于第一个分支,*VrAL10*、*VrAL8*、*VrAL5*、*VrAL4*、*VrAL9* 属于第二个分支,*VrAL2* 单独在最后一个分支上;从进化树上可以看出,*VrAL* 基因家族的进化过程中存在基因复制事件,*VrAL* 基因家族共存在 5 个基因对,包括 8 个基因 (*VrAL1*/*VrAL6*、*VrAL1*/*VrAL7*、*VrAL5*/*VrAL8*、*VrAL5*/*VrAL10*、*VrAL4*/*VrAL9*) (图 1a)。10 个 *VrAL* 蛋白都含有 Alfin1-like 蛋白结构域 (pfam12165) 和 PHD 蛋白结构域 (pfam00628) (图 1b)。基因结构分析结果表明,10 个 *VrAL* 基因比较保守,都含有 4 个内含子和 5 个外显子 (图 1c),这与拟南芥中 *AL* 基因结构相同^[16]。

利用拟南芥 (7 个)、大豆 (16 个)、玉米 (17 个)、水稻 (8 个) 及绿豆 (10 个) *AL* 蛋白全长序列构建系统进化树 (图 2)。根据进化关系,这 58 个 *AL* 蛋白可分为 3 类,*VrAL* 在 3 类中都有分布。

2.3 *VrAL* 基因的顺式作用元件、染色体定位及复制分析

从 PlantCARE 在线网站中预测 *VrAL* 基因家族成员上游 2 000 bp 序列,这些序列除了具有光响应、逆境响应和无氧响应元件外还具有多种植物激素 (茉莉酸甲酯、生长素、水杨酸、脱落酸等) 响应元件 (图 3)。其中 *VrAL1*、*VrAL2*、*VrAL4*、*VrAL6*、*VrAL8* 的启动子区域存在脱落酸响应元件,*VrAL2*、*VrAL3*、

VrAL4、*VrAL6*、*VrAL9* 的启动子区域存在茉莉酸甲酯响应元件,*VrAL2*、*VrAL4*、*VrAL6*、*VrAL9* 的启动子区域存在干旱胁迫响应元件,*VrAL4*、*VrAL6*、*VrAL7*、*VrAL8* 的启动子区域存在逆境响应元件,*VrAL3*、*VrAL7*、*VrAL9* 的启动子区域存在 SA 响应元件,*VrAL2*、*VrAL6*、*VrAL7* 的启动子区域存在生长素响应元件。*AL* 基因家族在其他物种中被报道主要与植物的生长发育以及抗逆境胁迫有关,这与 *VrAL* 基因家族的启动子作用元件的分析结果也是一致的。

9 个 *VrAL* 基因定位在 5 条染色体上,*VrAL1*、*VrAL2*、*VrAL3*、*VrAL4* 定位在第 5 条染色体上,*VrAL5* 定位在第 6 条染色体上,*VrAL6* 定位在第 7 条染色体上,*VrAL7*、*VrAL8* 定位在第 9 条染色体上,*VrAL9* 定位在第 11 条染色体上,*VrAL10* 暂时不确定定位在几号染色体上 (表 2)。绿豆种内的 *AL* 基因家族共线性分析结果表明,10 个 *VrAL* 基因存在 5 个基因对,分别是 *VrAL1*/*VrAL6*、*VrAL1*/*VrAL7*、*VrAL5*/*VrAL8*、*VrAL5*/*VrAL10*、*VrAL4*/*VrAL9* (图 4)。Ka/Ks 的计算结果显示,除了 *VrAL4*/*VrAL9* 由于序列差异过大无法计算 Ka/Ks 外,其他同源基因对 *VrAL1*/*VrAL6*、*VrAL1*/*VrAL7*、*VrAL5*/*VrAL8*、*VrAL5*/*VrAL10* 的 Ka/Ks 值都小于 0.20 (表 3)。上述结果表明,重复的 *VrAL* 基因在进化过程中受到纯化选择^[17]。片段复制是 *VrAL* 基因家族进化的主要方式,在 *VrAL* 基因家族进化中起重要作用,这与大豆 *AL* 家族中的研究结果一致^[4]。

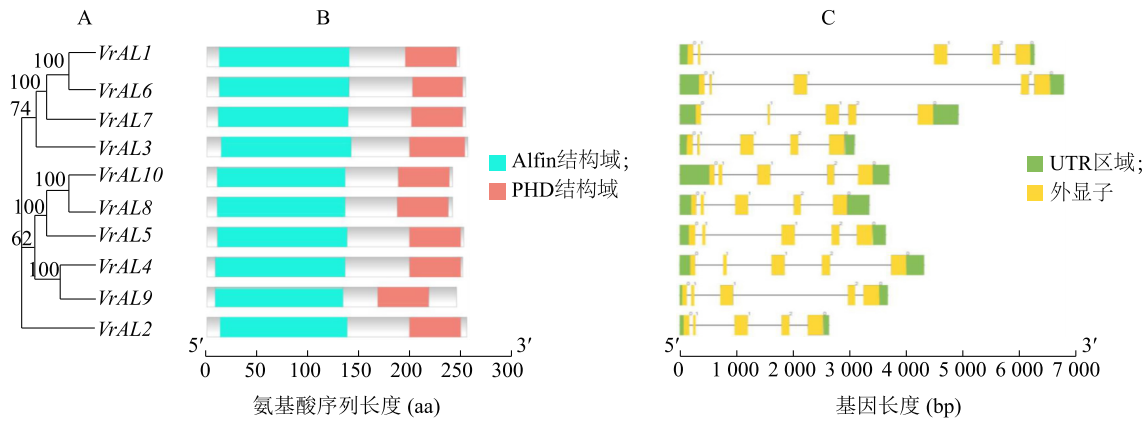


图1 VrAL 基因家族系统进化树 (A)、对应的 Pfam 结构 (B) 及基因结构 (C)

Fig.1 Phylogenetic tree (A), Pfam structure (B) and gene structure (C) of VrAL gene family

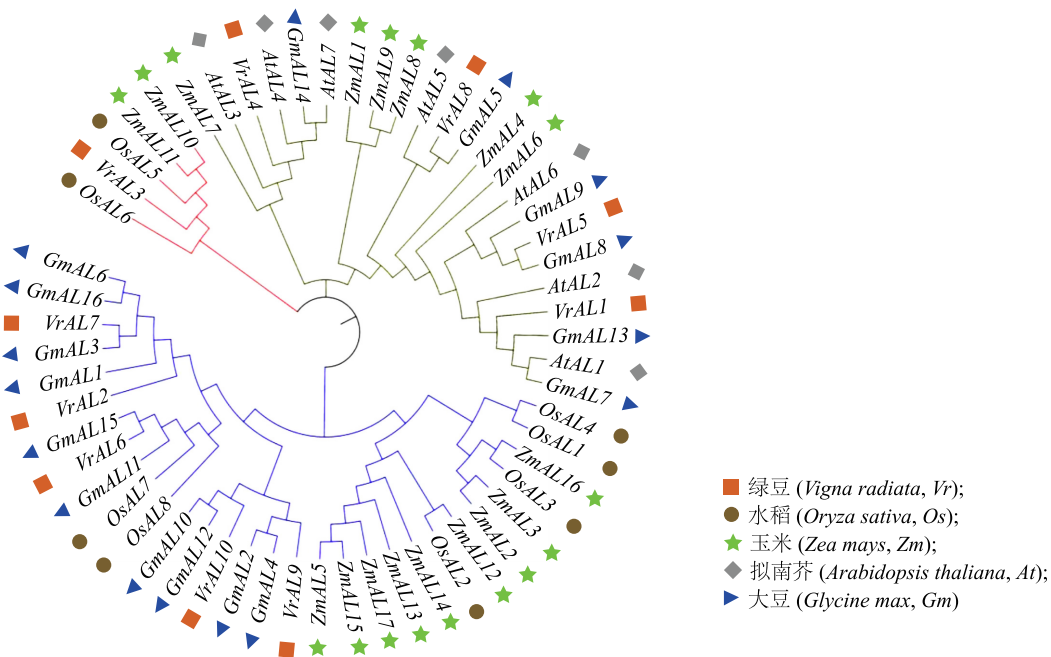
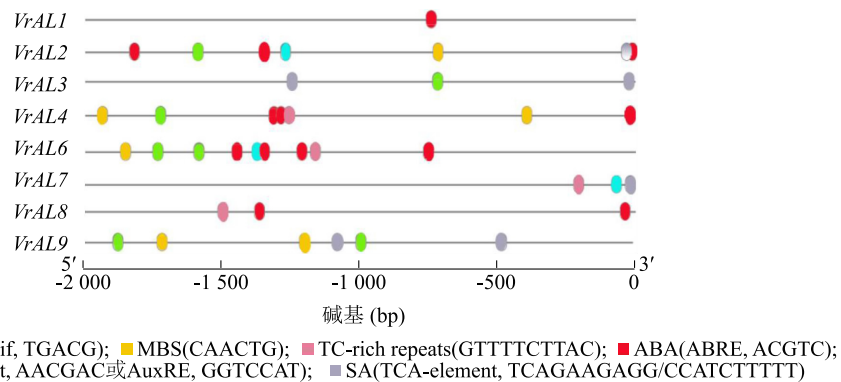


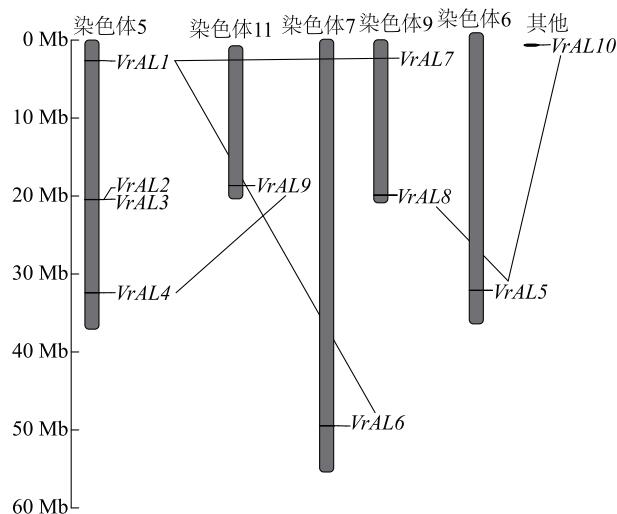
图2 绿豆、拟南芥、大豆、玉米及水稻 AL 基因家族系统进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of AL gene families from *Vigna radiata*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Zea mays* and *Oryza sativa*

MeJA: 茉莉酸甲酯响应元件; MBS: 干旱胁迫响应元件; TC: 逆境响应元件; ABA: 脱落酸响应元件; Auxin: 生长素响应元件; SA: 水杨酸响应元件。

图3 VrAL 基因家族上游的顺式作用元件

Fig.3 Cis-acting elements in upstream of VrAL gene family



片段复制的基因用直线连接。

图 4 VrAL 基因家族在染色体上的位置

Fig.4 Position of VrAL gene family in the chromosome

表 3 VrAL 基因家族同源基因对的 Ka/Ks

Table 3 Ka/Ks values for homologous gene pairs of VrAL gene family

同源基因对	Ka	Ks	Ka/Ks
VrAL1/VrAL6	0.214	2.04	0.104
VrAL1/VrAL7	0.106	3.09	0.034
VrAL5/VrAL8	0.258	1.87	0.130
VrAL5/VrAL10	0.259	2.23	0.116

Ka:非同义替换率;Ks:同义替换率。

2.4 VrAL 家族蛋白质的多序列比对及其互作蛋白预测

10 个 VrAL 蛋白的多序列比对结果如图 5 所示,其中 N 端含有 1 个长约 130 个氨基酸的 Alfin 结构域(pfam12165),C 端含有 1 个长约 50 个氨基酸的 PHD 结构域(pfam00628)。其中加粗实线框为 PHD 结构域中的酪氨酸,10 个 VrAL 蛋白中只有 VrAL2 在该位点不是酪氨酸。利用蛋白质互作预测在线网站 String 预测绿豆中与 AL 蛋白互作的蛋白质,其功能注释主要有 E3 泛素蛋白连接酶 DRIP2 及其亚体、组蛋白赖氨酸 N-甲基转移酶 ASHR3、ATP 合成相关的酶、普通的应激 A 蛋白、DEAD-box ATP 依赖性 RNA 解旋酶 5 等。

2.5 VrAL 基因家族在 PEG 模拟干旱条件下的 qRT-PCR 分析

如图 6 所示,在 20%PEG 培养条件下,绿豆根中有 4 个 VrAL 的相对表达量比对照组显著或极显

著增加,分别是 VrAL1(图 6A)、VrAL5(图 6B)、VrAL7(图 6C)、VrAL9(图 6D)。VrAL1 在用 20%PEG 培养 12 h 后相对表达量开始升高,24 h 时相对表达量达到所选取时间段的最高值,约为同时间对照组的 7 倍,36 h 时相对表达量下降,大约是同时间对照组的 2 倍。VrAL5 和 VrAL7 在处理组中的相对表达量一直处于增长的趋势,在 36 h 时的相对表达量约是对照组的 3 倍。VrAL9 在用 20%PEG 培育 12 h 时,相对表达量达到所选时间段中的最高值,是同时间段对照组的 3 倍,之后开始下降。VrAL2、VrAL3、VrAL4、VrAL6、VrAL8 和 VrAL10 在根部处理组中的表达和对照组无明显差异。

如图 7 所示,在绿豆叶片中有 3 个 VrAL 在用 20%PEG 培育后上调表达,分别是 VrAL8(图 7A)、VrAL9(图 7B)和 VrAL10(图 7C)。VrAL8 和 VrAL9 都是在用 20%PEG 培养 12 h 后相对表达量达到最高值,分别约是对照组的 2.2 倍和 4.2 倍,之后相对表达量开始下降。VrAL10 在用 20%PEG 培养 12 h 后相对表达量开始上升,到 36 h 达到最高值,约是对照组的 3 倍。其他 7 个基因的相对表达量和对照组无明显差异。

3 讨论

3.1 生物信息学预测 VrAL 基因家族功能

本研究从绿豆基因组中鉴定出 10 个 AL 成员,这些成员的结构非常相似。与其他物种(拟南芥、大豆、玉米、水稻)的 AL 基因结构也非常相似,暗示 AL 基因家族在植物界是非常保守的。AL 蛋白家族通常作为一种转录因子。VrAL 蛋白的亚细胞定位预测结果显示其全部定位在细胞核,预测 VrAL 蛋白是作为一种转录因子发挥作用。顺式作用元件分析结果显示,大多数 VrAL 启动子序列中含有逆境和激素响应元件,预测 VrAL 在绿豆抗非生物胁迫中发挥重要作用。

从植物进化的关系上来看,植物中都存在 AL 基因,从低等植物莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)到高等植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、苜蓿(*Medicago sativa* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]、玉米(*Zea mays* L.)、毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)、葡萄(*Vitis vinifera* L.)、榆钱菠菜(*Atriplex hortensis* L.)和大白菜(*Brassica rapa* L.)中都有报道^[4,18-20]。通过多序列

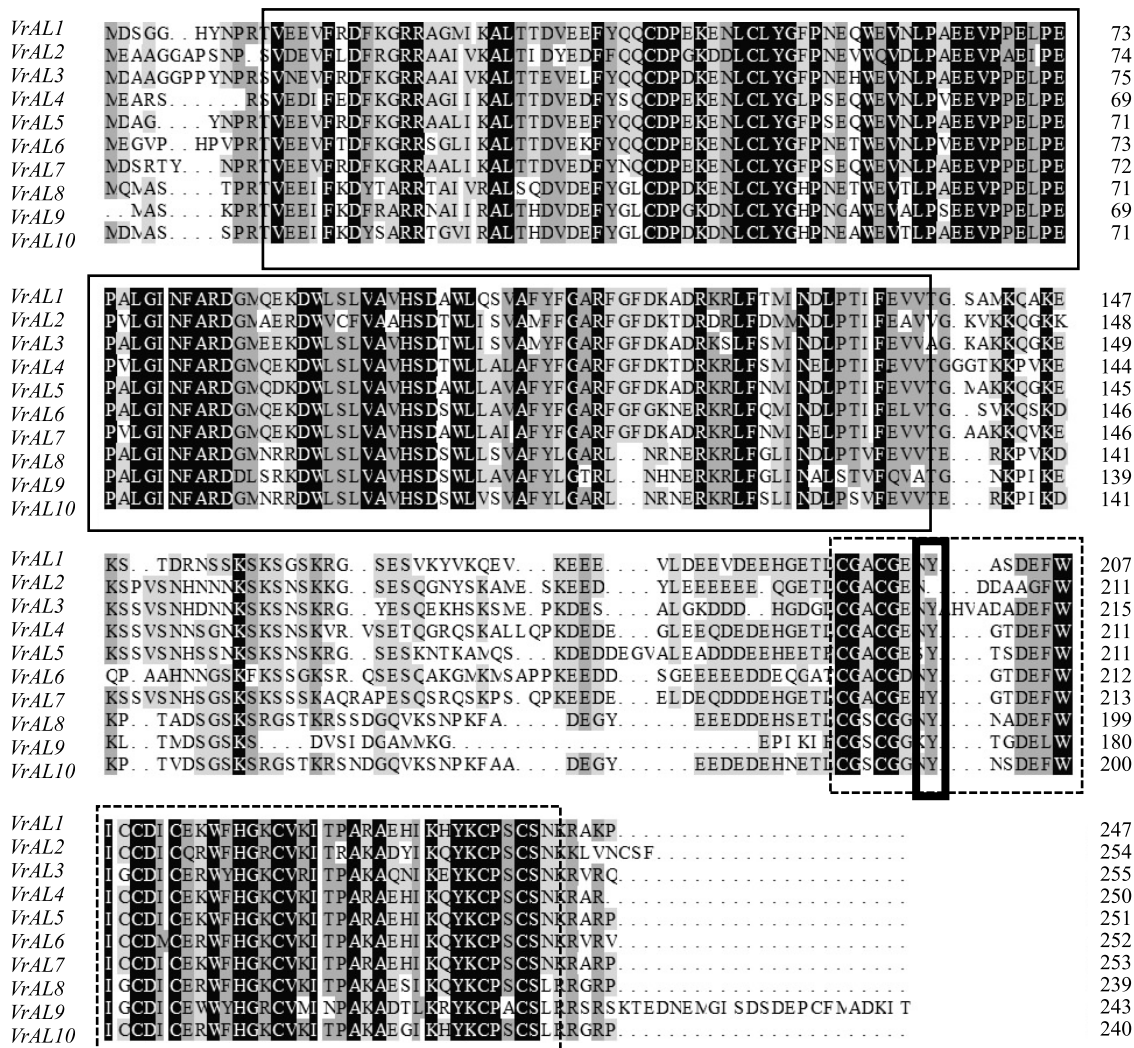


图 5 VrAL 基因家族编码的蛋白质多序列比对结果

Fig.5 Multiple alignment of proteins encoded by VrAL family members

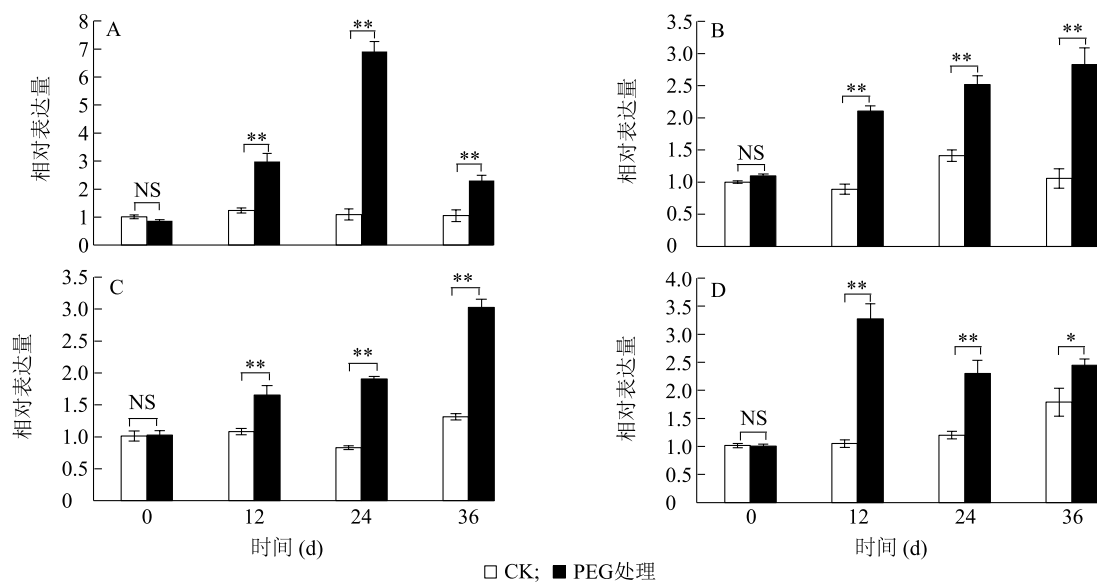
比对和系统发育树分析发现, *VrAL* 家族中有 3 组同源基因, *VrAL1*、*VrAL6*、*VrAL7* 属于一组, *VrAL5*、*VrAL8*、*VrAL10* 属于一组, *VrAL4* 和 *VrAL9* 属于一组。这 3 组基因在进化过程中存在片段复制现象。通过蛋白质互作预测也发现与 *VrAL* 家族蛋白质互作的蛋白质主要有 E3 泛素蛋白连接酶 *DRIP2* 及其亚体、组蛋白赖氨酸 *N*-甲基转移酶 *ASHR3*、ATP 合成相关的酶、普通的应激 A 蛋白、DEAD-box ATP 依赖性 RNA 解旋酶 5 等, 表明 *VrAL* 家族基因在调控绿豆生长发育过程中起着不可忽视的作用。

拟南芥 AL 蛋白具有与活性组蛋白标记 H3K4me3/2 和顺式作用元件 GNGGTG/GTGGNG 结合的能力, 表明 AL 家族作为一种转录因子可能主

要通过结合 DNA 来抑制其他基因的转录来起作用。AL 蛋白与 H3K4me3/2 结合能力的有无通常与 AL 蛋白 C 末端 PHD 结构中的酪氨酸密切相关。拟南芥中的 7 个 AL 蛋白中只有 AL3 的 PHD 结构中不含有酪氨酸, 组蛋白肽下拉试验结果也证明 AL3 确实不能与 H3K4me3/2 结合^[21]。在 *VrAL* 蛋白的多序列比对中发现, *VrAL2* 蛋白的 PHD 结构域不含酪氨酸, 预测 *VrAL2* 蛋白可能没有与 H3K4me3/2 结合的能力。

3.2 VrAL 基因参与干旱胁迫的响应

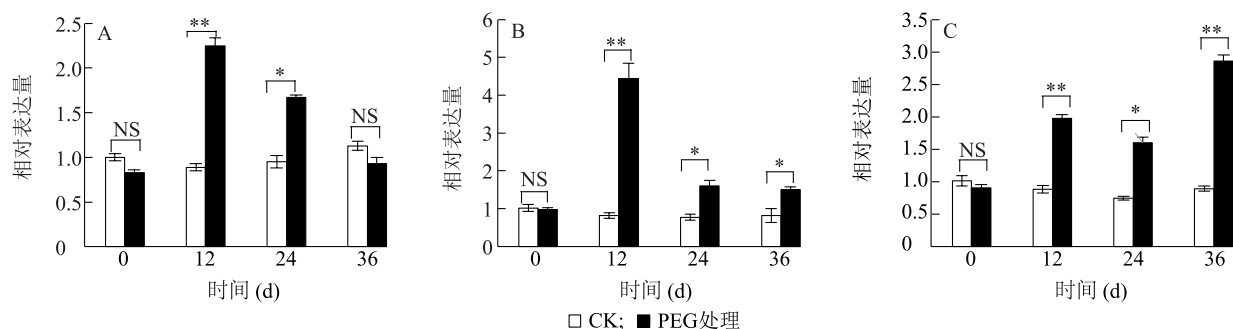
AL 基因家族是 *PHD* 基因家族中的一个亚家族, 但是只存在于植物的 *PHD* 家族中。AL 转录因子家族, 在植物的生长发育以及抵抗逆境胁迫中起



A、B、C、D 分别表示根部 4 个基因 *VrAL1*、*VrAL5*、*VrAL7*、*VrAL9* 的 qRT-PCR 分析。* 表示用 *t* 测验在 0.05 水平差异显著, ** 表示用 *t* 测验在 0.01 水平差异显著, NS 表示两组间无显著差异 ($P>0.05$)。

图 6 20%PEG 胁迫下绿豆根部 4 个 AL 基因的 qRT-PCR 分析

Fig.6 qRT-PCR analysis of four AL genes in the roots of mung bean under 20%PEG stress



A、B、C 分别表示叶片 3 个基因 *VrAL8*、*VrAL9* 和 *VrAL10* 的 qRT-PCR 分析。* 表示用 *t* 测验在 0.05 水平差异显著, ** 表示用 *t* 测验在 0.01 水平差异显著, NS 表示两组间无显著差异 ($P>0.05$)。

图 7 20%PEG 胁迫下绿豆叶片中 3 个 AL 基因的 qRT-PCR 分析

Fig.7 qRT-PCR analysis of three AL genes in the leaves of mung bean under 20%PEG stress

重要作用。苜蓿中 Alfin1 蛋白可以调节 *MsPRP2* 基因的表达,该基因编码一种富含脯氨酸的细胞壁蛋白质,并积极调节植物的耐盐性和抗旱性^[3,22-23]。在拟南芥中,AtAL5 蛋白可与 8 个目标基因 (*SHMT7*、*bZIP50*、*CAX1*、*TAC1*、*FAO*、*OFE*、*NAC075* 和 *WRKY11*) 的启动子结合并抑制其转录,其中 5 个基因 (*TAC1*、*SHMT7*、*FAO*、*OFE* 和 *CAX1*) 的敲除突变体均表现出对盐、干旱和冷冻胁迫的耐受性增强^[24],AtAL6 控制多个下游基因的表达,包括 *ETC1*、*NPC4*、*SQD2* 和 *PS2*,以促进缺磷条件下的根毛伸长^[25]。在榆树中发现 *AhAL1* 结合 *GRF7*、*DREB1C*

和几个与 ABA 相关的编码基因的启动子区域,并下调其表达;在 *AhAL1* 转基因植物中 *DREB2A*、*DREB1A* 和 3 个 *ABF* 基因的表达量增加^[26]。在对耐旱和干旱胁迫敏感的水稻的转录组比较中也发现,部分 AL 基因响应干旱胁迫^[27]。在对鹰嘴豆的干旱胁迫分析中也发现 1 个对干旱响应表达上调非常明显的 AL 转录因子^[5]。但是绿豆中的 AL 家族还没有相关的研究报道。在本试验中,PEG 模拟的干旱胁迫下,绿豆根部和叶片中 *VrAL1*、*VrAL5*、*VrAL7*、*VrAL8*、*VrAL9* 和 *VrAL10* 上调表达。推测 *VrAL1*、*VrAL5*、*VrAL7*、*VrAL8*、*VrAL9*、*VrAL10* 的上调表达和绿

豆抵抗干旱胁迫有关,具体的调控网络还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] YU S, JIE G, YANG F, et al. Molecular evolutionary analysis of the alfin-like protein family in *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, and *Thellungiella halophila* [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e66838.
- [2] BASTOLA D R, PETHE V V, WINICOV I. Alfin1, a novel zinc-finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt-inducible *MsPRP2* gene [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 38(6): 1123-1135.
- [3] WINICOV I, BASTOLA D R. Transgenic overexpression of the transcription factor alfin1 enhances expression of the endogenous *MsPRP2* gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants [J]. Plant Physiology, 1999, 120(2): 473-480.
- [4] WEI W, HUANG J, HAO Y J, et al. Soybean GmPHD-type transcription regulators improve stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. PLoS One, 2009, 4(9): e7209.
- [5] MOLINA C, ROTTER B, HORRES R, et al. SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots [J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 553-553.
- [6] KANG Y J, KIM S K, KIM M Y, et al. Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species [J]. Nature Communications, 2014, 5: 5443.
- [7] 戴必胜,杨敏,陈秀虎. 霍格兰溶液培养对水仙生长发育的影响 [J]. 武汉植物学研究, 2006(5): 485-488.
- [8] 曹志敏,张志肖,侯东生,等. PEG-6000 溶液胁迫下绿豆萌发期抗旱性的鉴定与评价 [J]. 河北农业科学, 2015, 19(3): 27-31.
- [9] 谢敏,王萍,何红红,等. 葡萄 Alfin-like 转录因子家族的鉴定和表达分析 [J]. 西北植物学报, 2020, 40(9): 1467-1474.
- [10] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, et al. BLAST+: architecture and applications [J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 421.
- [11] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112: 531-552.
- [12] CHOU K C, SHEN H B. Cell-PLoc: a package of web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms [J]. Nature Protocols, 2007, 3(2): 153-162.
- [13] CHEN C J, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [14] LESCOT M, DeHAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(1): 325-327.
- [15] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [16] 冯英,刘庆坡,薛庆中. 水稻与拟南芥 PHD-finger 蛋白的系统分析 [J]. 遗传学报, 2004, 31(11): 1284-1293.
- [17] WANG Q Q, LIU J Y, YU W, et al. Systematic analysis of the maize PHD-finger gene family reveals a subfamily involved in abiotic stress response [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(10): 23517-23544.
- [18] XIONG Y Q, LIU T Y, TIAN C Q, et al. Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots [J]. Plant Molecular Biology, 2005, 59(1): 191-203.
- [19] QU L J, ZHU Y X. Transcription factor families in *Arabidopsis*: major progress and outstanding issues for future research [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(5): 544-549.
- [20] KAYUM M A, PARK J I, AHMED N U, et al. Characterization and stress-induced expression analysis of alfin-like transcription factors in *Brassica rapa* [J]. Molecular Genetics & Genomics, 2015, 290(4): 1299-1311.
- [21] LEE W Y, LEE D, CHUNG W I, et al. *Arabidopsis* ING and alfin1-like protein families localize to the nucleus and bind to H3K4me3/2 via plant homeodomain fingers [J]. Plant Journal, 2010, 58(3): 511-524.
- [22] WINICOV I. Alfin1 transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa [J]. Planta, 2000, 210(3): 416-422.
- [23] WINICOV I, VALLIYODAN B, HOOBER L X K. The *MsPRP2* promoter enables strong heterologous gene expression in a root-specific manner and is enhanced by overexpression of *Alfin1* [J]. Planta, 2004, 219(6): 925-935.
- [24] WEI W, ZHANG Y Q, TAO J, et al. The Alfin-like homeodomain finger protein AL5 suppresses multiple negative factors to confer abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2015, 81(6): 871-883.
- [25] CHANDRIKA N P, SUNDARAVELPANDIAN K, YU S M, et al. ALFIN-LIKE 6 is involved in root hair elongation during phosphate deficiency in *Arabidopsis* [J]. New Phytologist, 2013, 8(3): 709-720.
- [26] TAO J J, WEI W, PAN W J, et al. An alfin-like gene from *Atriplex hortensis* enhances salt and drought tolerance and abscisic acid response in transgenic *Arabidopsis* [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 2707.
- [27] MOUMENI A, SATOH K, KONDOH H, et al. Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought-tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress [J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 1-17.

(责任编辑:陈海霞)