

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.004.014

# 桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因的鉴定及表达分析

胡景涛\*, 李彦杰, 段艳艳, 阮宇, 顾欣, 肖国生

(重庆三峡学院生物与食品工程学院, 重庆 万州 404100)

**摘要:** [目的] 研究桑树中 *HD-Zip I* 亚家族成员的进化及结构等特点, 明确该家族基因的器官特异性表达模式, 阐明 ABA 及淹水、盐和脱水处理对桑树 *HD-Zip I* 基因表达水平的影响。[方法] 通过桑树基因组数据库鉴定桑树 *HD-Zip I* 基因, 并进行生物信息学分析; 利用桑树与拟南芥 *HD-Zip I* 蛋白的序列比对结果, 构建系统进化树; 利用桑树 RNA-seq 数据分析桑树 *HD-Zip I* 基因的组织/器官特异性表达谱; 利用 qRT-PCR 分析桑树 *HD-Zip I* 基因在激素及非生物胁迫处理下的表达模式。[结果] 共鉴定出 14 个桑树 *HD-Zip I* 基因, 根据进化关系可进一步将其分为 6 个分枝, 各分枝内的成员具有相似的基因结构及保守基序。RNA-seq 数据分析发现, *MnHD-Zip 2* 和 *MnHD-Zip 6* 在根、枝条、冬芽、雄花和叶片中均呈现高水平表达。激素处理后的基因表达分析发现, *MnHD-Zip 8*、*MnHD-Zip 9*、*MnHD-Zip 11*、*MnHD-Zip 12* 和 *MnHD-Zip 13* 受到 ABA 不同程度的上调诱导, 桑树其余 *HD-Zip I* 基因的表达水平均受到 ABA 不同程度的抑制。非生物胁迫处理表达分析发现, 桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因均受到 3 种非生物胁迫不同程度的诱导表达。[结论] 桑树  $\beta$  分枝成员受到盐和脱水胁迫的显著诱导表达, 且在各种器官中也有较广泛的高表达, 因此, 推测这些基因在桑树生长发育及逆境胁迫中均发挥着重要的调控作用。此外, *MnHD-Zip 8* 和 *MnHD-Zip 12* 受到了盐、淹水及脱水胁迫的显著诱导, 由此推测它们在桑树逆境胁迫响应中具有潜在重要功能。

**关键词:** 桑树; *HD-Zip I* 转录因子; 鉴定; 基因表达分析

**中图分类号:** S718.46

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2022)04-0130-13

作为一种固着生物, 植物的生长发育时刻受到各种外界环境条件的影响。面对各种逆境胁迫, 植物已经进化出包括形态、细胞、分子及生理生化水平在内的复杂调控机制予以应答<sup>[1-3]</sup>。作为一种调节蛋白, 转录因子 (Transcription factors, TFs) 通过调控目的基因的表达在植物生长发育及逆境胁迫响应中发挥着重要作用<sup>[4-5]</sup>。

*HD-Zip* (homeodomain leucine zipper) 蛋白是植物特有的转录因子, 根据结构与功能差异可以进一步将其分为 4 个亚家族 (*HD-Zip I~IV*)<sup>[6]</sup>。植物 *HD-Zip I* 蛋白仅包含 C-端的同源异型结构域 (Homeodomain, HD) 和紧密相连的亮氨酸拉链结

构域 (leucine zipper, LZ), 它们广泛参与植物的生长发育以及非生物胁迫应答等过程<sup>[7]</sup>。研究人员已经对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、番茄 (*Solanum lycopersicum* Mill.)、向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 等植物中的 *HD-Zip I* 蛋白进行了家族成员鉴定及相关基因的功能研究<sup>[8-11]</sup>。拟南芥 *ATHB12* 和 *ATHB7* 都受到 ABA 和干旱胁迫的诱导表达, 且 *ATHB12* 的异源表达可增强转基因酵母对 NaCl 的耐受能力<sup>[12-13]</sup>。水稻 *Oshox22* 基因影响内源 ABA 的合成, 并通过依赖 ABA 的信号转导途径调控水稻的干旱和盐胁迫耐受能力<sup>[14]</sup>。向日葵 *Hahb-4* 基因受

收稿日期: 2021-12-22 修回日期: 2022-02-18

基金项目: 重庆市自然科学基金面上项目 (cstc2020jcyj-msxmX0073); 重庆三峡学院博士引进项目 (2014/09925401); 重庆市渝东北特色生物资源开发利用工程技术研究中心项目 (1209/061800406)

\* 通讯作者: 胡景涛, 博士, 副研究员. 主要研究方向: 植物抗逆生理与分子生物学. E-mail: 20180016@sanxiau.edu.cn

干旱和外源 ABA 的强烈诱导表达,过表达该基因的拟南芥植株对缺水胁迫表现出更强的耐受能力<sup>[4]</sup>。向日葵 *HaHB1* 基因的异源表达可提高拟南芥对低温的耐受能力,并上调转基因株系内抗冻相关基因的表达<sup>[15]</sup>。番茄 *SIHB2* 基因的下调表达则可诱导胁迫相关基因的表达并提高植株对干旱和盐胁迫的耐受能力<sup>[7]</sup>。玉米 *HD-Zip I* 亚家族成员 *Zmhdz10* 的表达受外源 ABA 和盐胁迫的强烈诱导,该基因的过表达可明显提高水稻和拟南芥对干旱和盐胁迫耐受能力<sup>[16]</sup>。综上所述,植物 HD-ZIP I 亚家族蛋白在激素响应及应对非生物胁迫过程中发挥着重要的调控作用。

作为一种重要的经济作物,桑树 (*Morus notabilis* L.) 在我国已有几千年的栽种历史。桑叶可养蚕,桑树皮可作造纸原料,桑果既可鲜食也可以加工成果酒、果汁和果酱,桑树的根、茎、叶和桑果还具备一定的药用价值。此外,桑树对干旱、盐碱及水淹等逆境胁迫具有较强的耐受能力,是木本植物抗逆境研究的优良材料。本研究从基因组水平对桑树 *HD-ZIP I* 亚家族基因进行了鉴定和分析,对家族蛋白的理化性质、进化关系及基因结构等进行了分析。利用 RNA-seq 数据研究了 *HD-ZIP I* 亚家族基因的组织表达模式,通过 qPCR 检测了该家族基因在激素及非生物胁迫处理后的表达情况。为进一步阐明桑树 *HD-ZIP I* 亚家族基因的生物学功能和抗逆基因的挖掘奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 桑树 *HD-Zip I* 亚家族成员的鉴定与分析

从拟南芥基因组数据库 (<https://www.arabidopsis.org/tools/index.jsp>) 获取拟南芥 HD-Zip I 蛋白序列<sup>[17]</sup>,并以此作为查询序列在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 及桑树基因组数据库 (<https://morus.swu.edu.cn/morusdb/>) 进行 Blast 同源搜索,下载桑树 *HD-Zip I* 亚家族的基因及氨基酸序列。所有序列均通过 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)、NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 及 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 数据库进行保守结构域分析。利用 MEME Version 5.4.1 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对蛋白保守基序进行预测,基序数量设为 10,其余参数采用默认值。桑树 HD-Zip I 蛋白的多序列分析

由 ClustalW 及 DNAMAN 9 软件完成,系统进化分析采用邻接法 (Neighbor-joining method, NJ) 由 MEGA 7.0 完成,bootstrap 值设置为 1000<sup>[18]</sup>。蛋白分子量、等电点等均由在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 计算获得<sup>[19]</sup>。蛋白亚细胞定位预测分析在 WoLFPSort (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 网站中进行。基因的内含子与外显子分布由 Tbttool (windows-x64\_1\_068) 软件绘制,并利用 Tbttool 软件从桑树基因组数据中获取 *HD-Zip I* 基因起始密码子 (ATG) 上游 2 000 bp 的启动子序列,在 plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 数据库对启动子区域的顺式作用元件进行预测分析,并用 Tbttool 软件进行可视化<sup>[20]</sup>。

### 1.2 RNA-seq 分析

利用桑树基因组数据库中根、枝条、冬芽、雄花和叶的 RNA-seq 数据,分析桑树 *HD-Zip I* 基因的组织表达模式。相关基因的 RPKM 值经  $\log_2$  转换后,通过 Tbttool 软件绘制热图。

### 1.3 桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因逆境胁迫表达分析

1.3.1 材料处理及取样 桑树品种育 711 扦插苗于 25 °C 温室条件下 (光照 16 h, 黑暗 8 h) 生长 45 d 后,选取长势一致的单株进行处理。将 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  脱落酸 (ABA) 溶液均匀喷施于幼苗叶面进行激素处理,用 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaCl 对树苗进行盐处理,拔出幼苗并洗掉根上的泥土置于室温进行脱水处理,淹水至树苗地上部分 5 cm 处作淹水处理,以正常浇水树苗为对照 (CK)。对以上各处理的材料于处理后 0、3、6、12、24 h 摘取相同发育时期的叶片,利用液氮冷冻后置于 -80 °C 冰箱备用,每个时间点设置 3 次重复,每次重复取 3 株树苗叶片。

1.3.2 qRT-PCR 分析 RNAiso plus (TaKaRa) 用于材料总 RNA 提取, M-MLV 反转录酶 (Promega) 试剂盒用于合成 cDNA。利用 Primer Premier 5 软件设计特异性定量分析引物,以 *ACTIN* 基因作为内标基因 (表 1)。定量 PCR 体系 (10  $\mu\text{L}$ ) 中包含 qPCR Mix (2  $\times$  GoTaq<sup>®</sup>, 5.0  $\mu\text{L}$ )、引物混合物 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 0.5  $\mu\text{L}$ )、模板 cDNA (1.0  $\mu\text{L}$ )、Rnase-free H<sub>2</sub>O (3.5  $\mu\text{L}$ )。在 eppendorf 荧光定量仪上进行定量分析 (95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 40 次循环), 3 次技术重复,采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  公式计算基因相对表达量,

表 1 桑树 *HD-Zip I* 基因 qRT-PCR 分析引物Table 1 Primers used in qRT-PCR analysis of *HD-Zip I* genes in mulberry

基因名称 Gene Name	引物序列 (5'-3') Primer sequence	产物大小/bp Product length
<i>MnHD-Zip 1</i>	F:TTGACGGAGAACTTCAGGCTAA R:TGAAAGTAGGAGTCACCGCTGTC	209
<i>MnHD-Zip 2</i>	F:TCAGAGGGTGAGGTCTCCAAG R:GATTGGTCGGCTTCAAACACA	161
<i>MnHD-Zip 3</i>	F:CAGGCAGGTTGCTATTTGGTTT R:ATTTTCTCGCCCTCCTTCGT	208
<i>MnHD-Zip 4</i>	F:TGAAAAATAGAGAGCCAACGGAGT R:TGGAAAGAGAGGTCTGCTTGTGAT	176
<i>MnHD-Zip 5</i>	F:GTGTTTGAGCCAGAGCAGTCG R:TCGCACACGGGTATCATAAC	127
<i>MnHD-Zip 6</i>	F:GCCCTAATGTCCGTCTGCC R:CCGCTTCTCCACACATCC	121
<i>MnHD-Zip 7</i>	F:GGCTTGAAGTTGAAGGATACGG R:GACATCCCATTAGCCCAAGTG	142
<i>MnHD-Zip 8</i>	F:TGGCTTCCCAGTTCGAGTCA R:CCAATGTCGTTTTCCAATCCC	166
<i>MnHD-Zip 9</i>	F:AGAAATGCCGTCTTGAATCCG R:ATCCTTCAGACACCACCCCAA	183
<i>MnHD-Zip 10</i>	F:CCTCGTCAGATTGCTGTTTGG R:GTAACCGCCCGTTGACACTT	198
<i>MnHD-Zip 11</i>	F:GCTAACAAAGGACCAAGTCAGGC R:GGCATTTCGCTCAAGCCTCACCTG	205
<i>MnHD-Zip 12</i>	F:TAGGAAAAGACGCTGAAGTTGTAGA R:TCAAGACAAGAACTCCCACCACT	140
<i>MnHD-Zip 13</i>	F:TGAACAAGGCTCAACAGATGC R:ATCATCCACGGCTGACACTG	101
<i>MnHD-Zip 14</i>	F:ATCCTTCCAACCACCTTCC R:TCCAGCGAGCCCTCTTGT	136
<i>ACTIN</i>	F:CCAAGTCATCACAATCGGAGC R:TACCAGGGAACATAGTTGAACCAC	191

使用 Origin 9.0 绘制柱形图。

## 2 结果与分析

### 2.1 桑树 *HD-Zip I* 亚家族成员的序列获取及鉴定

经保守结构域分析并排除冗余序列后, 共获得 14 个桑树 *HD-Zip I* 成员, 分别命名为 *MnHD-Zip 1*~*MnHD-Zip 14* (表 2)。从表 2 可以看出: 桑树 *HD-Zip I* 蛋白的氨基酸数及其分子量变化较大, 分别介于 173~351 aa 和 19927.40~39913.22; 等电点 *pI* 则介于 4.54~8.88, 弱酸性蛋白偏多。平均亲水性值则位于 -1.040~-0.657 之间。蛋白亚细胞定位结果表明, 桑树 *HD-Zip I* 蛋白主要定位于细胞核。*HD-Zip I* 亚家族蛋白的不同特点及成员间的差异可能预示着该亚家族转录因子在桑树生长发育过程中发挥着不同的调控作用。

### 2.2 桑树 *HD-Zip I* 亚家族成员的多序列比对及进化关系分析

蛋白多序列比对结果发现, 桑树 *HD-Zip I* 亚家族成员均含有 *HD-Zip* 家族转录因子的保守结构域 *HD* (*Homeomain*) 和 *LZ* (*leucine zipper*)。其中, *HD* 结构域的序列高度保守, *LZ* 结构域的氨基酸残基则相对多变 (图 1)。

为分析桑树 *HD-Zip I* 亚家族成员的进化关系, 利用 MEGA 7.0 软件构建了拟南芥和桑

树该家族蛋白的进化树。参考拟南芥该家族成员的进化关系, 将桑树 *HD-Zip I* 亚家族成员分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\phi$  6 个分枝, 其中, *MnHD-Zip 3* 和 *MnHD-Zip 4* 属于  $\alpha$  分枝, *MnHD-Zip 5*、*MnHD-Zip 2*、*MnHD-Zip 1*、*MnHD-Zip 7* 和 *MnHD-Zip 6* 属于  $\beta$  分枝, *MnHD-Zip 8*、*MnHD-Zip 12* 和 *MnHD-Zip 14* 属于  $\gamma$  分枝, *MnHD-Zip 11* 和 *MnHD-Zip 13* 属于  $\phi$  分枝, *MnHD-Zip 10* 和 *MnHD-Zip 9* 分别属于  $\epsilon$  和  $\delta$  分枝 (图 2)。

### 2.3 桑树 *HD-Zip I* 家族基因结构及蛋白基序分析

蛋白 motif 分析结果表明: 桑树 *HD-Zip I* 亚家族蛋白检测出的 10 个基序中, motif 1 和 motif 2 为该家族蛋白共有基序, 进一步序列分析发现, motif 1 主要参与构成桑树 *MnHD-Zip I* 蛋白的 *Homeomain* 结构域, motif 2 则是 *leucine zipper* 结构域的主要组成部分。桑树 *HD-Zip I* 家族内各成员所含有的 motif 种类及数量存在较大差异, 如 *MnHD-Zip 3* 和 *MnHD-Zip 4* 共检测出 7 个基序, *MnHD-Zip 14* 仅发现 2 个基序; 同一进化分枝内各转录因子所含有的基序种类及数量则表现出较高的相似性, 如  $\alpha$  分枝的 2 个成员均含有 7 个相同的 motif,  $\phi$  分枝成员均含有 motif 1、motif 2 和 motif 3 (图 3A)。

通过比较 *MnHD-Zip I* 基因的 mRNA 和基因

表 2 桑树 *HD-Zip I* 家族基因及其编码蛋白信息  
Table 2 The detailed information of *HD-Zip I* members of mulberry

基因名称 Gene Name	登录号 Gene ID	蛋白长度/aa Protein length	分子量/kDa Molecular weight	等电点 PI	亲水性值 Hydropathicity	亚细胞定位 Subcellular localization
<i>MnHD-Zip 1</i>	L484_008420	281	31634.93	4.70	-0.817	nucl: 14
<i>MnHD-Zip 2</i>	L484_010105	325	36528.92	4.68	-0.839	nucl: 14
<i>MnHD-Zip 3</i>	L484_027159	326	36766.68	6.54	-0.982	nucl: 13.5, cyto_nucl: 7.5
<i>MnHD-Zip 4</i>	L484_021122	328	37377.30	6.42	-1.020	nucl: 13.5, cyto_nucl: 7.5
<i>MnHD-Zip 5</i>	L484_021079	292	33207.53	4.54	-0.922	nucl: 13, pero: 1
<i>MnHD-Zip 6</i>	L484_019806	342	39104.85	5.03	-0.997	nucl: 13.5, cyto_nucl: 7.5
<i>MnHD-Zip 7</i>	L484_012750	351	39913.22	4.94	-0.945	nucl: 13, pero: 1
<i>MnHD-Zip 8</i>	L484_001654	219	25604.55	6.66	-1.029	nucl: 14
<i>MnHD-Zip 9</i>	L484_009043	209	24036.19	6.93	-0.820	nucl: 14
<i>MnHD-Zip 10</i>	L484_002276	205	23523.59	8.53	-0.888	nucl: 14
<i>MnHD-Zip 11</i>	L484_012158	197	23221.98	6.66	-0.990	nucl: 14
<i>MnHD-Zip 12</i>	L484_015344	192	21891.73	8.88	-0.718	nucl: 14
<i>MnHD-Zip 13</i>	L484_010529	173	19927.40	7.89	-0.657	nucl: 14
<i>MnHD-Zip 14</i>	L484_023454	182	20630.97	6.78	-1.040	nucl: 14

注: nucl: 细胞核; cyto: 细胞质; pero: 过氧化物酶体。  
Notes: nucl: nucleus; cyto: cytosol; pero: peroxisome.

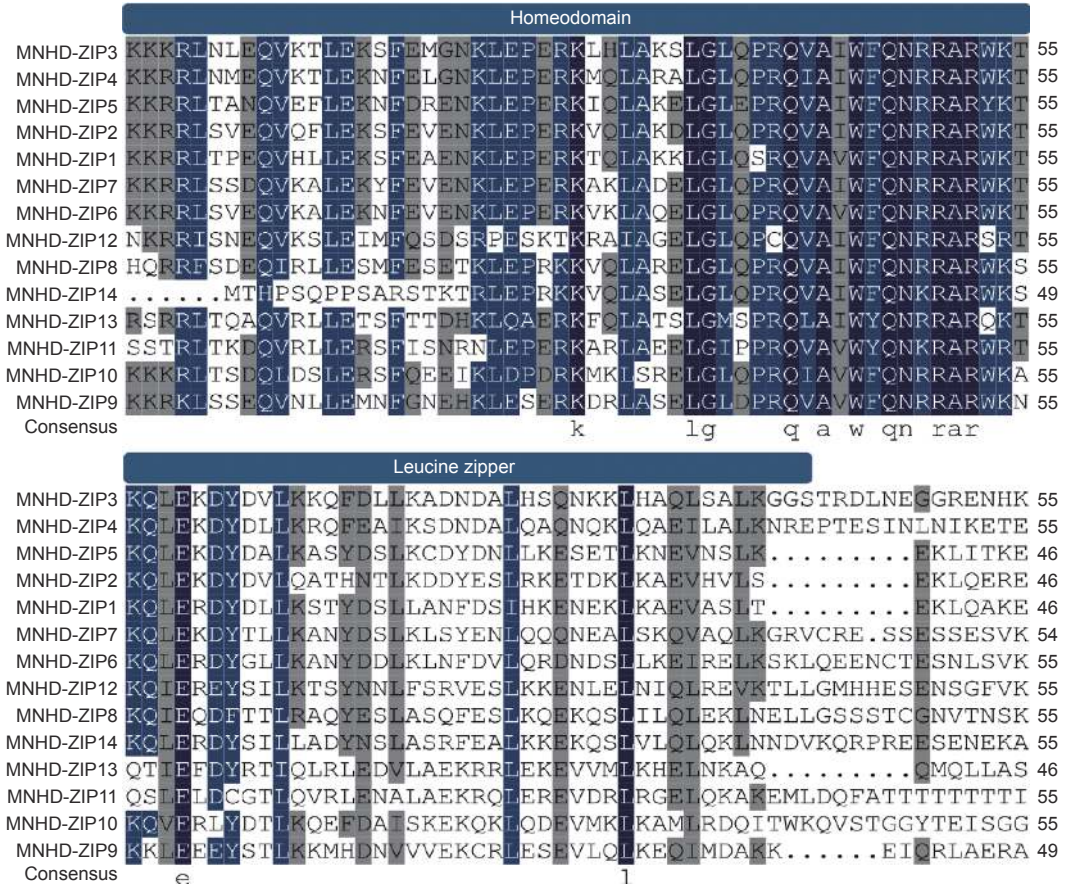


图 1 桑树 *HD-Zip I* 蛋白 Homeodomain 及 leucine zipper 结构域多序列比对

Fig. 1 Multiple sequence alignments of Homeodomain and leucine zipper domains

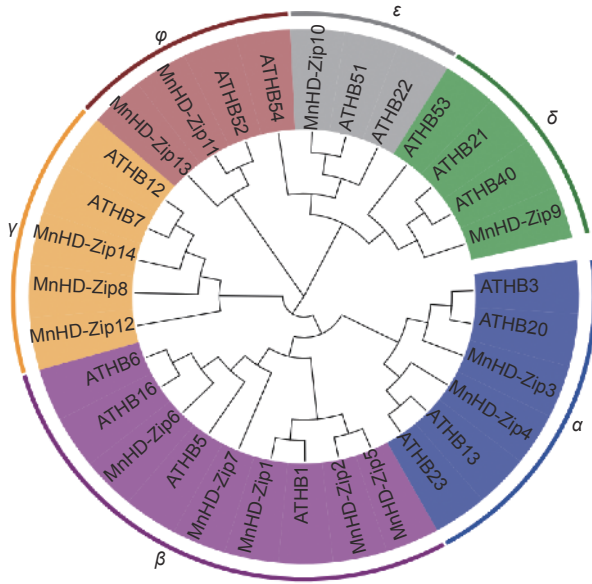


图 2 桑树与拟南芥 HD-Zip I 家族的系统进化分析  
 Fig. 2 Phylogenetic analysis of HD-Zip I family in mulberry and Arabidopsis

组序列，获得该家族基因的外显子/内含子结构（图 3B）。从图 3B 可以看出：桑树 HD-Zip I 家族成员中，同一进化分枝成员具有相似的外显子/内含子数量及分布规律，其中，β 分枝的 *MnHD-Zip 1* 基因独具 4 个外显子，该分枝的其余成员则

均只含有 3 个外显子；α 和 δ 分枝的所有成员都含有 3 个外显子；γ 分枝成员中，*MnHD-Zip 14* 基因有 3 个外显子，其余两个成员同 ε 分枝成员都只含有 2 个外显子；φ 分枝成员的外显子数量最少，均只含有 1 个外显子。

2.4 桑树 HD-Zip I 家族基因的启动子元件分析

为了进一步明确桑树 HD-Zip I 家族基因启动子区域的相关顺式作用元件，探索该家族基因对激素及逆境的响应机制，利用 PlantCARE 对该家族基因的启动子进行了分析，结果（表 3）表明：桑树 14 个 HD-Zip I 基因的启动子区检测出参与激素及非生物胁迫响应的顺式作用元件共计 11 种。其中，激素响应元件 6 种，即 ABRE（ABA 响应元件）、P-box（赤霉素响应元件）、TCA-element（水杨酸响应元件）、CGTCA-motif（茉莉酸响应元件）、TGACG-motif（茉莉酸响应元件）和 AuxRR-core（生长素响应元件）；非生物胁迫响应元件 5 种，即 TC-rich repeats（防御和胁迫响应元件）、LTR（低温胁迫响应元件）、ARE（厌氧诱导元件）、MBS（干旱诱导的 MYB 结合位点）及 WUN-motif（损伤反应元件）。

桑树 HD-Zip I 家族基因启动子区顺式作用元

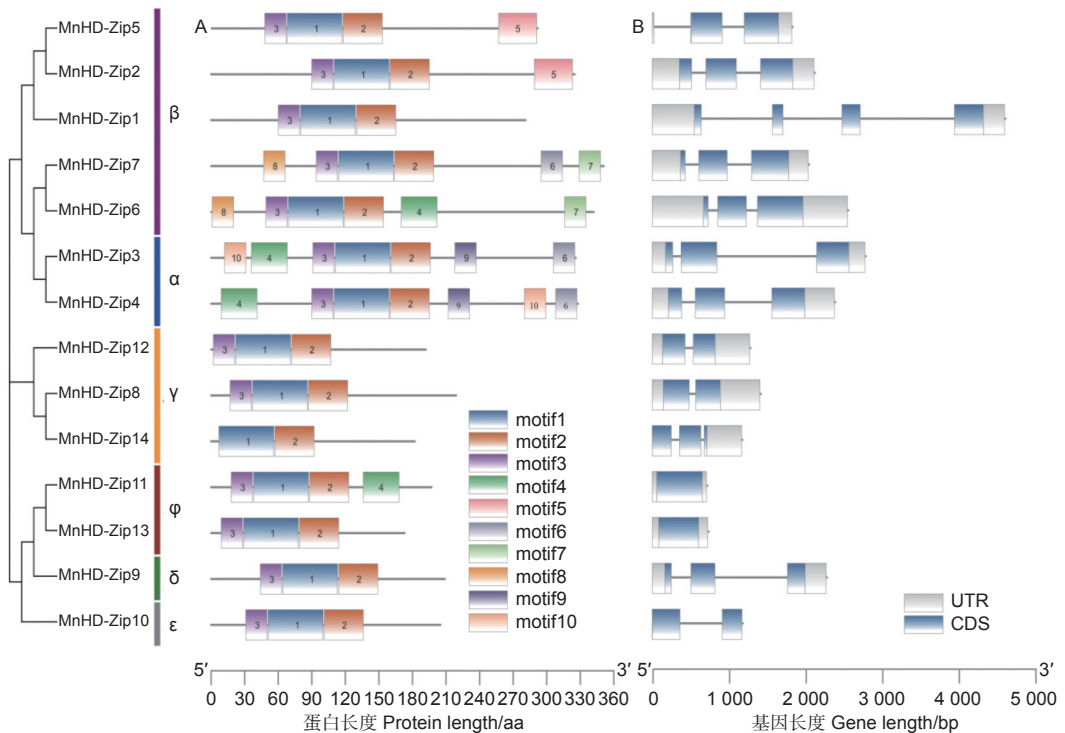


图 3 桑树 HD-Zip I 家族蛋白保守基序 (A) 及基因结构 (B) 分析

Fig. 3 Analysis of conserved motifs (A) and exon-intron organization (B) of *MnHD-Zip I* genes

表3 桑树 *HD-Zip I* 家族基因启动子区顺式作用元件分析Table 3 Analysis of cis acting elements in *HD-Zip I* gene's promoter region

分枝 Clades	基因名 Gene name	激素响应元件 Phytohormone response element						非生物胁迫响应元件 Abiotic stress response element				
		ABRE	P-box	TCA-element	CGTCA-motif	TGACG-motif	AuxRR-core	TC-rich repeats	LTR	ARE	MBS	WUN-motif
β	<i>MnHD-Zip 5</i>	2	0	0	0	1	0	2	0	4	1	1
	<i>MnHD-Zip 2</i>	1	0	2	1	1	1	0	1	2	0	0
	<i>MnHD-Zip 1</i>	3	0	1	4	4	0	0	0	1	2	0
	<i>MnHD-Zip 7</i>	1	0	1	0	0	0	3	0	5	1	0
	<i>MnHD-Zip 6</i>	0	0	0	2	2	0	0	0	4	0	1
α	<i>MnHD-Zip 3</i>	1	1	1	3	3	0	0	0	2	0	0
	<i>MnHD-Zip 4</i>	3	0	0	1	1	0	0	1	1	2	0
γ	<i>MnHD-Zip 12</i>	8	0	0	1	1	0	0	0	2	0	1
	<i>MnHD-Zip 8</i>	2	1	3	0	0	0	0	1	2	0	2
	<i>MnHD-Zip 14</i>	1	0	0	3	3	0	0	2	0	0	2
φ	<i>MnHD-Zip 11</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1
	<i>MnHD-Zip 13</i>	2	1	4	2	2	0	1	2	1	0	0
δ	<i>MnHD-Zip 9</i>	4	2	2	4	4	0	0	0	2	0	0
ε	<i>MnHD-Zip 10</i>	2	0	2	2	2	0	0	0	0	1	0

件的数量和种类存在明显差异, 但不同分枝成员的元件分布则具有一定的相似性, 如 β 分枝成员启动子均不含有 P-box 元件, γ 和 φ 分枝成员的启动子区都没有 MBS 元件。从数量上看, *MnHD-Zip 9* 基因启动子区拥有的元件数最多 (18 个), *MnHD-Zip 2*、*MnHD-Zip 4*、*MnHD-Zip 6* 和 *MnHD-Zip 10* 的启动子所含元件最少 (9 个)。从顺式作用元件的种类看, ABRE 元件数量最多, 除 *MnHD-Zip 6* 外的 13 个 *MnHD-Zip I* 基因启动子区共含有 36 个 ABRE; ARE 元件次之, 在 12 个 *MnHD-Zip I* 基因启动子区中共有 31 个; AuxRR-core 元件最少, 仅在 *MnHD-Zip 2* 基因启动子区中出现 1 次。以上结果表明, *MnHD-Zip I* 基因启动子区的顺式作用元件在数量和种类方面存在明显差异, 预示该家族基因可能在激素及非生物胁迫响应中具有不同的生物学功能。

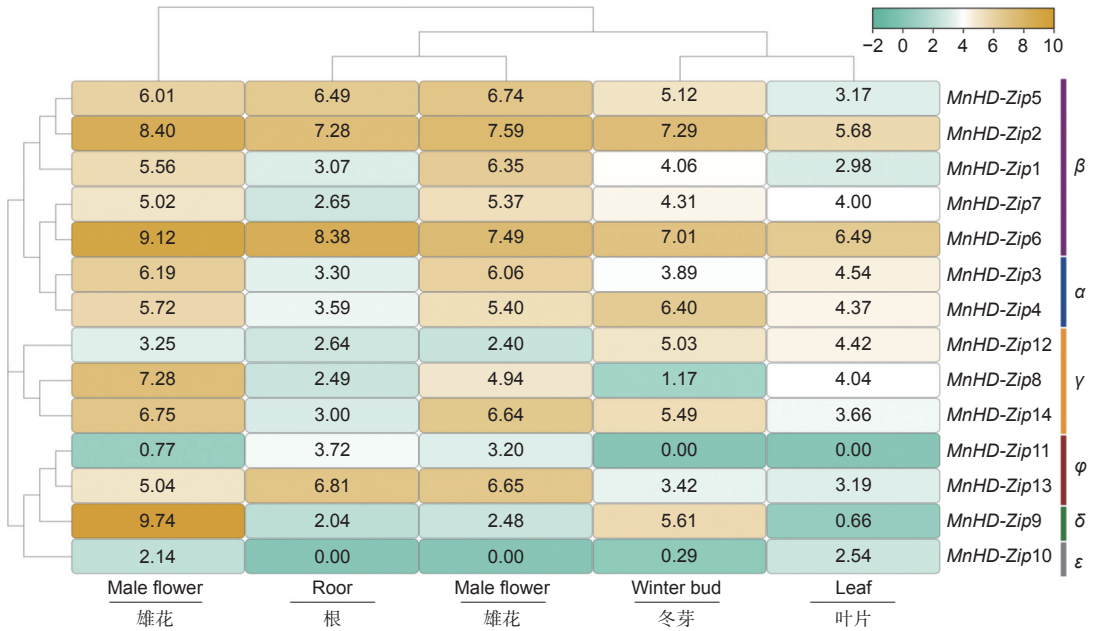
### 2.5 桑树 *HD-Zip I* 家族基因的组织表达模式分析

为了解桑树 *HD-Zip I* 家族基因的组织表达模式, 对桑树基因组数据库中根、枝条、冬芽、雄花和叶片的转录组数据进行分析, 结果 (图 4) 表明: 从组织特异性方面看, 大部分桑树 *HD-Zip I* 家族基因在雄花和枝条中的表达量相对较高, 根和叶片中大部分基因的表达量则相对较低; 从进化分枝方面看, 同一分枝基因具有相似的组织特异性表

达。β 分枝的 5 个成员中, *MnHD-Zip 2* 和 *MnHD-Zip 6* 在根、枝条、冬芽、雄花和叶片中均呈现高水平表达, *MnHD-Zip 5* 在除叶片外的器官/组织中也有较高水平的表达, 预示该分枝内的基因在桑树的不同组织/器官生长发育调控中发挥着重要作用。α 分枝中 2 个成员的组织/器官特异性表达呈现高度的一致性, 均在雄花和枝条中高水平表达; γ 分枝中, *MnHD-Zip 8* 和 *MnHD-Zip 14* 在雄花和枝条中的转录水平也都较高, 说明 α 和 γ 分枝的 4 个基因在桑树雄花发育及枝条生长方面具有潜在调控功能。此外, φ 分枝的 *MnHD-Zip 13* 基因分别在雄花、根、枝条和 δ 分枝的 *MnHD-Zip 9* 基因分别在雄花、冬芽中也有较高水平的表达, 暗示它们也在桑树相应组织/器官的生长发育中发挥着重要调控作用。

### 2.6 激素处理下的基因表达分析

为了分析桑树 *HD-Zip I* 家族基因对激素的响应情况, 对桑树苗进行了 ABA 处理, 以正常浇水桑树苗为对照, 利用 qRT-PCR 技术分别检测了处理 0、3、6、12、24 h 后叶片中 *MnHD-Zip I* 基因的转录水平, 结果 (图 5) 表明: 多数桑树 *HD-Zip I* 基因并未受到 ABA 的上调诱导, 甚至很多基因的转录水平被 ABA 所抑制。β 分枝中, *MnHD-Zip 1*、*MnHD-Zip 2* 与 *MnHD-Zip 5* 的表达模式相

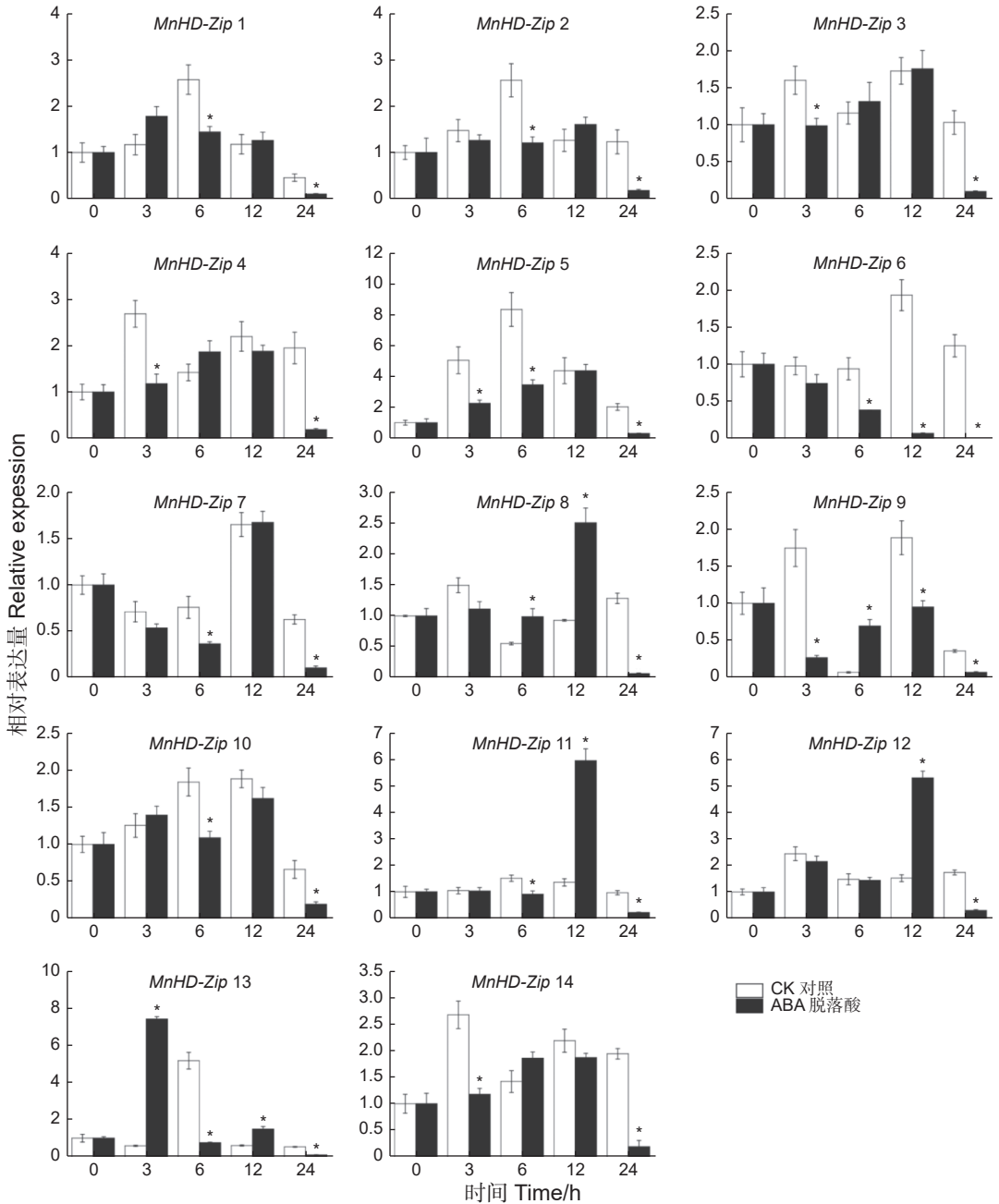
图 4 桑树 *HD-Zip I* 家族基因的器官特异性表达Fig. 4 Organ specific expression analysis of *MnHD-Zip I* genes

似, *MnHD-Zip 6* 和 *MnHD-Zip 7* 则呈现另一种相似的表达趋势; 但 ABA 处理后,  $\beta$  分枝中所有基因的表达水平都受到不同程度的抑制。 $\alpha$  分枝的 *MnHD-Zip 3* 和 *MnHD-Zip 4* 基因也具有相似的表达模式, 且其转录都在 3、24 h 时间点被 ABA 显著抑制。 $\gamma$  分枝中, *MnHD-Zip 8* 和 *MnHD-Zip 12* 的转录水平在处理 12 h 后均达到对照的 2 倍以上, 但到 24 h 后, 它们的表达水平又显著低于对照; *MnHD-Zip 14* 基因的表达则在 3、24 h 时间点受到 ABA 的显著抑制。 $\phi$  分枝中, *MnHD-Zip 11* 基因的表达水平在 12 h 被显著上调, 随后快速下降并显著低于对照; *MnHD-Zip 13* 则在处理 3 h 时便受到 ABA 的快速上调诱导, 随后开始降低直至显著低于对照。*MnHD-Zip 9* 基因仅在处理 6 h 时被显著上调诱导, 3、12、24 h 则均被显著抑制。*MnHD-Zip 10* 基因的表达在 6、24 h 也受到 ABA 的抑制。

## 2.7 非生物胁迫处理下的基因表达分析

为分析非生物胁迫对桑树 *HD-Zip I* 家族基因表达的影响, 对桑树苗进行了淹水、盐及脱水处理, 以正常浇水桑树苗为对照, 利用 qRT-PCR 技术分别检测了处理 0、3、6、12、24 h 后叶片中 *MnHD-Zip I* 基因的转录水平, 结果 (图 6) 表明: 桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因均受到 3 种非生物胁迫不同程度的诱导表达, 且多数基因的表达水平在处

理后 12 h 上升至峰值。 $\beta$  分枝的 5 个成员中, *MnHD-Zip 1* 基因的转录水平在脱水胁迫处理后 3~24 h 的几个时间点均被显著诱导上调; 在盐处理后 12 h, 该基因的表达被诱导上调约 14 倍; *MnHD-Zip 5* 和 *MnHD-Zip 2* 基因转录水平的变化趋势与 *MnHD-Zip 1* 较相似, 且这 2 个基因在盐处理后 12 h 的表达水平均有 10 倍以上的上调; *MnHD-Zip 6* 和 *MnHD-Zip 7* 表达水平的变化呈另一种相似的趋势, 且都在盐处理后 12 h 出现 2 倍以上的上调表达。 $\alpha$  分枝的 *MnHD-Zip 3* 和 *MnHD-Zip 4* 基因的表达水平都只在盐处理后 12 h 有 2 倍以上的上调; 处理后 24 h, 2 个基因的表达水平又同时下调至 CK 以下。 $\gamma$  分枝中, *MnHD-Zip 8* 基因在盐和脱水胁迫处理后 6~24 h, 其表达水平都出现 2 倍以上的上调诱导, 在淹水胁迫 3 h 时也显著上调诱导; *MnHD-Zip 12* 基因在淹水、盐和脱水处理后 6、12 h 也被显著诱导上调表达; *MnHD-Zip 14* 在盐处理后 12 h 显著上调, 在处理 3、24 h 该基因的表达同时受到 3 种非生物胁迫不同程度的下调诱导。 $\phi$  分枝中, *MnHD-Zip 11* 在盐胁迫下全程上调诱导表达, 淹水处理后 12 h 该基因的表达量也显著高于对照; *MnHD-Zip 13* 基因在盐处理后 12 h 被显著诱导上调。*MnHD-Zip 9* 基因在脱水胁迫处理后 3~24 h 表达水平均显著诱导上调。*MnHD-Zip 10* 仅在盐处理后 12 h 受到



注: 星号表示处理后的样品和未处理样品中基因表达水平的差异显著性 ( $p < 0.05$ )。下同。

Note: The asterisks indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the treated and untreated seedlings. The same below.

图 5 桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因激素处理后的差异表达分析

Fig. 5 Temporal differential expression of *MnHD-Zip I* genes under ABA

显著的上调诱导, 在非生物胁迫处理后 3、6 h, 其表达量显著低于 CK。

### 3 讨论

自桑树基因组测序工作完成以来<sup>[21-22]</sup>, PHR、bHLH、Trihelix、bZIP、MYB、ERF 等家族的转录因子已进行过相关的分析与研究<sup>[23-25]</sup>, 但桑树

*HD-Zip I* 亚家族成员的系统鉴定及其对淹水等非生物胁迫及激素响应的研究还未见报道。本研究通过系统进化分析、基因结构分析、顺式作用元件预测、基因的组织/器官特异性表达分析、ABA 和淹水等非生物胁迫诱导后的转录水平检测等, 对桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因进行了鉴定和研究。通过全基因组分析, 本研究共鉴定到 14 个桑树 *HD-Zip I* 亚



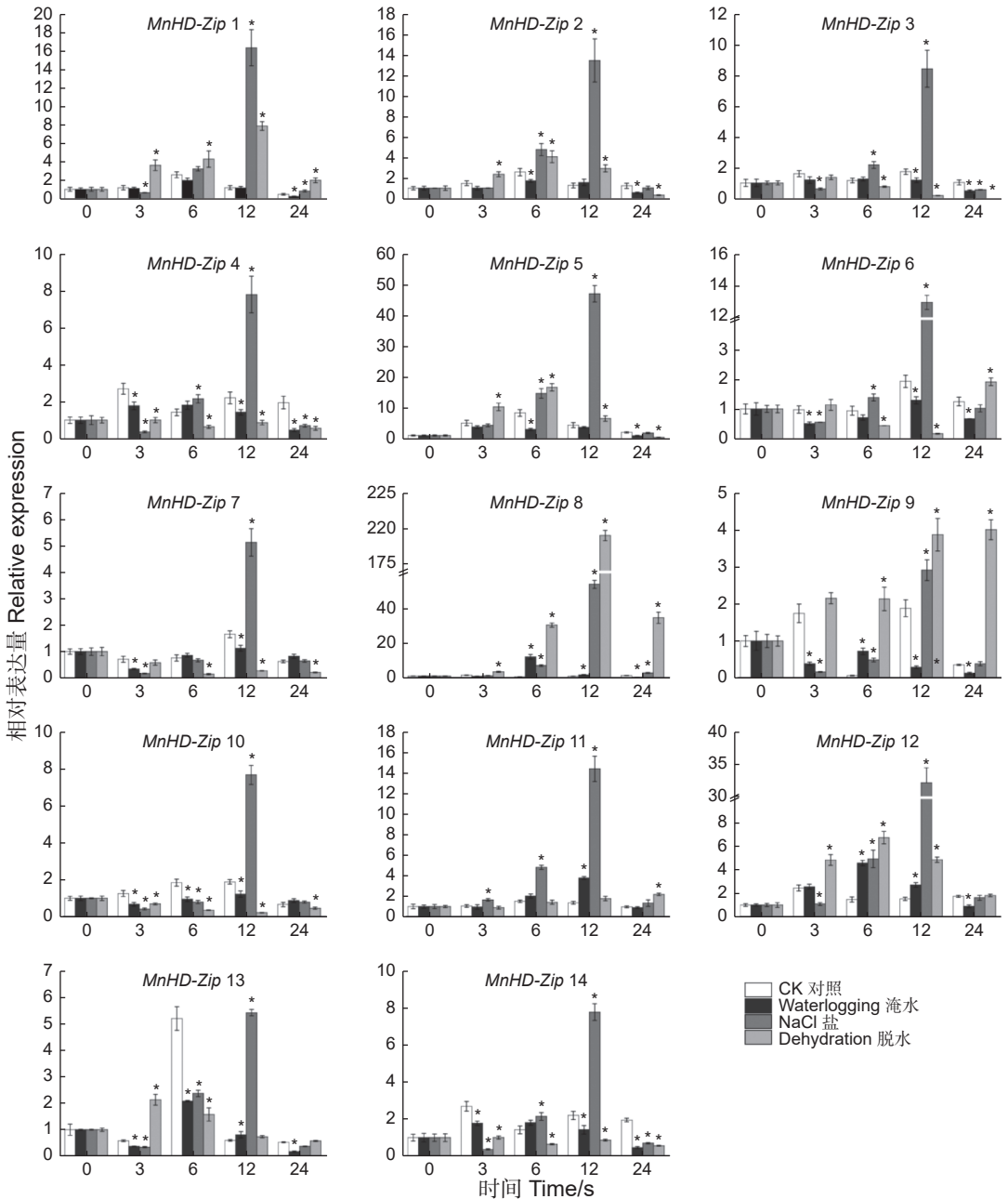


图 6 桑树 *HD-Zip I* 家族基因胁迫处理后的差异表达分析

Fig. 6 Temporal differential expression of *MnHD-Zip I* genes under abiotic stresses

家族基因, 与拟南芥、水稻和玉米 (*Zea mays* L.) 中同一亚家族基因的数量相似, 但明显少于苹果 (*Malus pumila* Mill.) 和杨树 (*Populus* L.) [8-9, 26-28]。

根据氨基酸序列的相似性, 桑树 *HD-Zip I* 亚家族蛋白可进一步被分为 6 个分枝, 这一研究结果同拟南芥、水稻、玉米的研究结果相似 [8-9, 26]。从成员分布看, 桑树 *HD-Zip I* 亚家族中,  $\beta$  分枝有 5 个成员,  $\gamma$  分枝有 3 个成员,  $\alpha$  和  $\varphi$  分枝各有 2 个成员,  $\delta$  和  $\varepsilon$  分枝各 1 有个成员。可见, 桑树该亚家族成员相对集中在  $\beta$  分枝, 而  $\delta$  和  $\varepsilon$  分枝成

员数偏少, 这与拟南芥中各分枝成员相对均衡的分布规律不尽一致 [8]。

桑树 *HD-Zip I* 亚家族蛋白含有多个基序, 其中, 家族成员共有基序 motif 1 和 motif 2 分别参与构成该家族蛋白的 Homeomain 结构域和 leucine zipper 结构域, 说明 motif 1、motif 2 为桑树 *HD-Zip I* 亚家族蛋白的特征性基序。此外, 同一分枝的成员在所具有的基序种类及数量方面具有高度的相似性。家族基因结构分析也得出类似的结论, 即桑树 *HD-Zip I* 亚家族中属于同一分枝的基因具有

高度相似的外显子/内含子数量及分布规律,这一分析结果进一步印证了桑树 *HD-Zip I* 亚家族蛋白进化树分枝关系的可靠性。

基因启动子区域中的不同顺式作用元件通常暗示该基因具备对相应激素或者胁迫诱导的响应能力<sup>[29]</sup>。研究发现,桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因的启动子区存在多种参与激素及非生物胁迫响应的顺式作用元件,如 *ABRE* (ABA 响应元件)、*MBS* (干旱诱导的 *MYB* 结合位点) 及 *WUN-motif* (损伤反应元件) 等,这些元件的大量存在表明桑树 *HD-Zip I* 基因在激素及非生物胁迫响应及相关的生长调控方面发挥着潜在的重要作用。后续基因表达分析发现,桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因的表达都受到激素和非生物胁迫不同程度的诱导,这一结果很好地证实了上述顺式作用元件分析所得出的结论。

研究表明, *HD-Zip I* 亚家族基因的表达具有组织和器官特异性,通常受到包括干旱、极端温度及渗透胁迫等外界环境因素的影响<sup>[6]</sup>。作为一类植物转录因子, *HD-Zip I* 蛋白广泛参与了植物的生长发育以及非生物胁迫应答等生命过程,包括花序发育及开花时间调节、侧根发育调控、抗逆境胁迫调节等<sup>[15-16, 30-32]</sup>。本研究对 14 个桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因在根、枝条、冬芽、雄花和叶片中的转录水平进行了分析,结果发现, *MnHD-Zip I* 基因在所检测的 5 个组织中均有不同程度的表达。从组织特异性上看,该家族基因主要在雄花及枝条中有相对较高的表达量,大部分基因在根和叶片中的表达量则相对偏低,这与柑橘 (*Citrus sinensis* cv. *Valencia*) *HD-Zip I* 基因主要在叶片和花中高表达的结果不太一致<sup>[33]</sup>。但桑树 *HD-Zip I* 基因是否具有与水稻 *HD-Zip I* 家族基因相同的花发育调控功能还需后续实验进一步验证<sup>[34]</sup>。从进化树分枝看,处于同一进化分枝内的基因具有相似的组织/器官表达特异性,其中,  $\beta$  分枝的成员在多数组织/器官中都呈现高水平表达,暗示该分枝成员在桑树生长发育中具有潜在重要功能;同时,这一结果与黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 的研究结果较吻合<sup>[35]</sup>。

激素及非生物胁迫处理后的表达模式分析结果表明, ABA 处理对除 *MnHD-Zip 8*、*MnHD-Zip 9*、*MnHD-Zip 11-13* 外的桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因的表达没有显著上调诱导作用,不少成员甚至出现下调诱导,如  $\beta$  分枝及  $\alpha$  分枝的所有基因均在

处理后 24 h 受到明显下调诱导,这一结果与拟南芥、黄瓜、水稻、向日葵和玉米中该家族基因的研究结果不同<sup>[4, 8, 16, 35-38]</sup>。研究发现,与 *MnHD-Zip 8* 同属  $\gamma$  分枝的荔枝 *LcHB2* 基因受到乙烯处理的上调诱导,且该基因在果实离区高水平表达。*LcHB2* 蛋白可与 *LcCEL2* 和 *LcCEL8* 基因启动子区的顺式元件结合并激活这 2 个基因的表达,从而促进果实脱落<sup>[39]</sup>。棉花  $\gamma$  分枝蛋白 *GhHB12* 则可通过抑制下游 *GhFT*、*GhFUL* 和 *GhSOC1* 基因的表达起到调控棉花开花时间的作用<sup>[40]</sup>。*MnHD-Zip 8* 基因也受到 ABA 的诱导表达,且其在桑树花器官中也呈现高水平表达,推测 *MnHD-Zip 8* 基因可能也在桑树花器官发育中发挥相应的重要功能。植物 *HD-Zip I* 亚家族  $\beta$  分枝的基因中,拟南芥 *ATHB1* 和 *ATHB16* 分别在叶片细胞的发育及株高、花序发育方面具有重要调控功能<sup>[41-42]</sup>,番茄 *LeHB-1* 基因则参与调控花发育及果实成熟调控<sup>[10]</sup>,说明  $\beta$  分枝成员在植物中发挥着多方面的发育调控功能。本研究结果表明,桑树中  $\beta$  分枝成员受到盐和脱水胁迫的显著诱导表达,且在各种器官中也有较广泛的高表达,因此,推测这些基因在桑树生长发育及逆境胁迫中均有潜在的调控作用。 $\gamma$  分枝中, *Oshox22* 基因的沉默转基因株系具有较高的干旱和盐胁迫耐受能力<sup>[14]</sup>,向日葵 *Hahb-4* 基因过表达株系也对缺水胁迫表现出更强的耐受能力<sup>[4, 11, 43]</sup>,说明该分支成员在植物非生物胁迫调控中发挥着重要作用。本研究中,桑树  $\gamma$  分枝基因 *MnHD-Zip 8* 和 *MnHD-Zip 12* 受到盐、淹水及脱水胁迫的显著诱导,由此推测,它们在桑树应对上述逆境胁迫中具有潜在重要功能。总体看,桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因受到淹水、盐和脱水处理的诱导表达,其中,盐和淹水处理的诱导作用最明显。盐和脱水处理后,大部分 *MnHD-Zip I* 基因的表达水平随时间的推移呈逐步升高后再降低的趋势,且多数基因在处理 12 h 时达到峰值,出现这一现象的原因可能与基因表达的节律性存在一定联系<sup>[40]</sup>。

## 4 结论

本研究从桑树基因组数据库中鉴定出 14 个 *HD-Zip I* 亚家族基因,这些基因可进一步被划分为 6 个进化分枝。基因结构及蛋白保守基序分析结果表明,同一进化分枝内的桑树 *HD-Zip I* 成员具有结构方面的相似性。RNA-seq 数据分析发现, *MnHD-Zip 2* 和 *MnHD-Zip 6* 基因在根、枝条、冬

芽、雄花和叶片中均呈现高水平表达, *MnHD-Zip5*、*MnHD-Zip1* 和 *MnHD-Zip 7* 也在多数器官中具有较高的表达水平。激素处理后的基因表达分析发现, 除 *MnHD-Zip 8*、*MnHD-Zip 9*、*MnHD-Zip 11*、*MnHD-Zip 12* 和 *MnHD-Zip 13* 外, 其余 *MnHD-Zip I* 基因的表达水平均受到 ABA 不同程度的抑制。非生物胁迫处理后的基因表达分析发现, 桑树 *HD-Zip I* 亚家族基因均受到 3 种非生物胁迫不同程度的诱导表达, 其中,  $\gamma$  分枝基因 *MnHD-Zip 8* 受到盐和脱水胁迫诱导后大幅度上调表达, *MnHD-Zip 12* 也受到盐胁迫的强烈上调诱导。综合以上结果推测,  $\beta$  分枝中的所有基因在桑树生长发育及逆境胁迫中均有潜在的重要调控作用,  $\gamma$  分枝成员 *MnHD-Zip 8* 和 *MnHD-Zip 12* 则在桑树逆境胁迫响应中具有潜在重要功能。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Acosta-Motos J R, Ortuño M F, Bernal-Vicente A *et al.* Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms[J]. *Agronomy*, 2017, 7(1): 18.
- [ 2 ] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. *Annu. Rev Plant Biol*, 2006, 57(1): 781-803.
- [ 3 ] Ohama N, Sato H, Shinozaki K *et al.* Transcriptional regulatory network of plant heat stress response[J]. *Trends in plant science*, 2017, 22(1): 53-65.
- [ 4 ] Dezar C A, Gago G M, González D H, *et al.* Hahb-4, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants[J]. *Transgenic research*, 2005, 14(4): 429-440.
- [ 5 ] Riechmann J, Heard J, Martin, G, *et al.* *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes[J]. *Science*, 2000, 290(5499): 2105-2110.
- [ 6 ] Ariel F D, Manavella P A, Dezar C A, *et al.* The true story of the HD-Zip family[J]. *Trends in Plant science*, 2007, 12(9): 419-426.
- [ 7 ] Hu J, Chen G, Yin W, *et al.* Silencing of *SIHB2* improves drought, salt stress tolerance, and induces stress-related gene expression in tomato[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2017, 36(3): 578-589.
- [ 8 ] Henriksson E, Olsson A S, Johannesson H, *et al.* Homeodomain leucine zipper class I genes in *Arabidopsis*. Expression patterns and phylogenetic relationships[J]. *Plant physiology*, 2005, 139(1): 509-518.
- [ 9 ] Agalou A, Purwantomo S, Övernäs E, *et al.* A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members[J]. *Plant molecular biology*, 2008, 66(1-2): 87-103.
- [10] Lin Z, Hong Y, Yin M, *et al.* A tomato HD - Zip homeobox protein, LeHB - 1, plays an important role in floral organogenesis and ripening[J]. *The Plant Journal*, 2008, 55(2): 301-310.
- [11] Manavella P A, Arce A L, Dezar C A, *et al.* Cross - talk between ethylene and drought signalling pathways is mediated by the sunflower Hahb - 4 transcription factor[J]. *The Plant Journal*, 2006, 48(1): 125-137.
- [12] Olsson A, Engström P, Söderman E. The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in *Arabidopsis*[J]. *Plant molecular biology*, 2004, 55(5): 663-677.
- [13] Shin D, Koo Y D, Lee J, *et al.* Athb-12, a homeobox-leucine zipper domain protein from *Arabidopsis thaliana*, increases salt tolerance in yeast by regulating sodium exclusion[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004, 323(2): 534-540.
- [14] Zhang S, Haider I, Kohlen W, *et al.* Function of the HD-Zip I gene Oshox22 in ABA-mediated drought and salt tolerances in rice[J]. *Plant molecular biology*, 2012, 80(6): 571-585.
- [15] Cabello J V, Arce A L, Chan R L. The homologous HD - Zip I transcription factors HaHB1 and AtHB13 confer cold tolerance via the induction of pathogenesis - related and glucanase proteins[J]. *The Plant Journal*, 2012, 69(1): 141-153.
- [16] Zhao Y, Ma Q, Jin X, *et al.* A novel maize homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) I gene, Zmhdz10, positively regulates drought and salt tolerance in both rice and *Arabidopsis*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55(6): 1142-1156.
- [17] Khanna R, Kronmiller B, Maszle D R, *et al.* The *Arabidopsis* B-box zinc finger family[J]. *The Plant Cell*, 2009, 21(11): 3416-3420.
- [18] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular biology and evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [19] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, *et al.* ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis[J]. *Nucleic acids research*, 2003, 31(13): 3784-3788.
- [20] Chen C, 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.
- [21] He N, Zhang C, Qi X, *et al.* Draft genome sequence of the mulberry tree *Morus notabilis*[J]. *Nature communications*, 2013, 4(1): 1-9.
- [22] Jiao F, Luo R, Dai X, *et al.* Chromosome-level reference genome and population genomic analysis provide insights into the evolution and improvement of domesticated mulberry (*Morus alba*)[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(7): 1001-1012.
- [23] 韩利红, 刘 潮, 刘学林, 等. 桑树PHR家族基因的鉴定及生物信

- 息学分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(18): 5991-5999.
- [24] 惠甜, 沈兵琪, 王连春, 等. 桑树bHLH转录因子家族全基因组鉴定与分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(17): 5624-5637.
- [25] 周宏, 李荣芳, 陈丹丹, 等. 桑树Trihelix转录因子家族研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(2): 874-880.
- [26] Zhao Y, Zhou Y, Jiang H, *et al.* Systematic analysis of sequences and expression patterns of drought-responsive members of the HD-Zip gene family in maize[J]. PLoS ONE, 2011, 6(12): e28488.
- [27] Mukherjee K, Brocchieri L, Bürglin T R. A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes[J]. Molecular biology and evolution, 2009, 26(12): 2775-2794.
- [28] Li R, Ge H, Dai Y, *et al.* Genomewide analysis of homeobox gene family in apple (*Malus domestica* Borkh.) and their response to abiotic stress[J]. Journal of genetics, 2019, 98(1): 1-11.
- [29] Bhalothia P, Sangwan C, Alok A, *et al.* PP2C-like promoter and its deletion variants are induced by ABA but not by MeJA and SA in *Arabidopsis thaliana*[J]. Frontiers in plant science, 2016, 7: 547.
- [30] Son O, Hur Y-S, Kim Y K, *et al.* ATHB12, an ABA-inducible homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) protein of *Arabidopsis*, negatively regulates the growth of the inflorescence stem by decreasing the expression of a gibberellin 20-oxidase gene[J]. Plant and Cell Physiology, 2010, 51(9): 1537-1547.
- [31] Re D A, Dezar C A, Chan R L, *et al.* Nicotiana attenuata NaHD20 plays a role in leaf ABA accumulation during water stress, benzylacetone emission from flowers, and the timing of bolting and flower transitions[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(1): 155-166.
- [32] Ariel F, Diet A, Verdenaud M, *et al.* Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1[J]. The Plant Cell, 2010, 22(7): 2171-2183.
- [33] Ge X X, Liu Z, Wu X M, *et al.* Genome-wide identification, classification and analysis of HD-ZIP gene family in citrus, and its potential roles in somatic embryogenesis regulation[J]. Gene, 2015, 574(1): 61-68.
- [34] Shao J, Haider I, Xiong L, *et al.* Functional analysis of the HD-Zip transcription factor genes Oshox12 and Oshox14 in rice[J]. PLoS ONE, 2018, 13(7): e0199248.
- [35] Liu W, Fu R, Li Q, *et al.* Genome-wide identification and expression profile of homeodomain-leucine zipper Class I gene family in *Cucumis sativus*[J]. Gene, 2013, 531(2): 279-287.
- [36] Hjellström, M. Drought stress signal transduction by the HD-ZIP transcription factors ATHB6 and ATHB7[D]. Sweden: Universitatis Upsaliensis, 2002: 1-50.
- [37] Huang X, Duan M, Liao J, *et al.* OsSL11, a homeodomain containing transcription activator, involves abscisic acid related stress response in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 1-9.
- [38] Skinner D J, Gasser C S. Expression-based discovery of candidate ovule development regulators through transcriptional profiling of ovule mutants[J]. BMC plant biology, 2009, 9(1): 1-20.
- [39] Li C, Zhao M, Ma X, *et al.* The HD-Zip transcription factor LcHB2 regulates litchi fruit abscission through the activation of two cellulase genes[J]. Journal of experimental botany, 2019, 70(19): 5189-5203.
- [40] He X, Wang T, Zheng X, *et al.* The cotton HD-Zip transcription factor GhHB12 regulates flowering time and plant architecture via the GhmiR157-GhSPL pathway[J]. Communications biology, 2018, 1(1): 1-8.
- [41] Aoyama T, Dong C H, Wu Y, *et al.* Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco[J]. The Plant Cell, 1995, 7(11): 1773-1785.
- [42] Wang Y. The role of the homeobox gene ATHB16 in development regulation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Acta Universitatis Upsaliensis, 2001.
- [43] Manavella P A, Dezar C A, Bonaventure G, *et al.* HAHB4, a sunflower HD-Zip protein, integrates signals from the jasmonic acid and ethylene pathways during wounding and biotic stress responses[J]. The Plant Journal, 2008, 56(3): 376-388.

# Identification and Expression Analysis of the *HD-Zip I* Subfamily Genes in Mulberry

HU Jing-tao, LI Ya-njie, DUAN Yan-yan, RUAN Yu, GU Xin, XIAO Guo-sheng

(College of Biology and Food Engineering, Chongqing Three Gorges University, Wanzhou 404100, Chongqing, China)

**Abstract:** [Objective] The aims of this study were to investigate the gene structure and phylogenetic of the mulberry (*Morus alba* L.) *HD-Zip I* subfamily members, clarify the tissue-specific expression of these genes in different organs, and reveal the expression level of the family genes under ABA and abiotic stress.

[Method] Identification of putative *HD-Zip I* subfamily genes from MorusDB and bioinformatics analysis were performed. The evolutionary tree was constructed based on the multiple sequence alignment of the Arabidopsis and mulberry. RNA-seq data was used to analyze the tissue-specific expression of mulberry *HD-Zip I* genes. The transcription level of the family genes under hormone and abiotic stress was detected by qRT-PCR.

[Result] A total of 14 *HD-Zip I* genes were identified in the mulberry genome. These members could be divided into six classes by phylogenetic tree. Members in the same class were similar in the gene structure and protein motifs. The expression level of both *MnHD-Zip 2* and *MnHD-Zip 6* were high in root, branch, winter bud, male flower, and leaf according to the RNA-seq data. All the *MnHD-Zip I* gene except *MnHD-Zip 8*, *MnHD-Zip 9*, *MnHD-Zip 11*, *MnHD-Zip 12*, and *MnHD-Zip 13* were inhibited by ABA. The result of qRT-PCR showed that all the mulberry *HD-Zip I* genes could be induced by the abiotic stresses.

[Conclusion] The  $\beta$  clades genes that were highly expressed in most of the organs were observably induced by the NaCl and dehydration. These results indicates that genes from the  $\beta$  clades of *MnHD-Zip I* play important roles in the development and stress response. In addition, *MnHD-Zip 8* and *MnHD-Zip 12* were dramatically up regulated by waterlogging, NaCl and dehydration, which indicates that these genes have essential roles in stress regulation of mulberry.

**Keywords:** Mulberry; *HD-Zip I* transcription factor; identification; gene expression analysis

(责任编辑: 张 研)