

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230333

毛白杨 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员的鉴定及表达分析

吴江婷¹, 贾辰琳¹, 罗志斌¹, 邓澍荣^{1*}

(1. 林木遗传育种全国重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: [目的] 鉴定毛白杨 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员, 解析 *PtoS1-bZIPs* 基因响应干旱和盐胁迫等非生物逆境的表达模式。[方法] 通过生物信息学方法对 *PtoS1-bZIP* 亚家族进行系统分析, 利用实时荧光定量技术检测该亚家族成员在不同组织中的基因表达特征以及对非生物胁迫的表达响应模式。[结果] 从毛白杨基因组中鉴定出 10 个 *S1-bZIPs* 基因, 分布在 8 条染色体上, 均无内含子结构。系统进化分析表明, *PtoS1-bZIP* 亚家族可分为 3 个分支, 在毛白杨基因组内有 12 对共线性基因。顺式作用元件分析发现 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员的启动子中含有多个光信号、激素与非生物胁迫响应元件。荧光定量结果显示, *PtoS1-bZIP* 亚家族成员的表达具有组织特异性。第一和第二进化分支中的多数成员在 ABA 和干旱处理下表达量上调, 在盐胁迫下表达量下调; 第三进化分支中的成员在 ABA、干旱和盐处理下均表达上调。[结论] 从毛白杨中鉴定出 10 个 *PtoS1-bZIPs* 基因, 聚类为 3 个进化分支, 第一和第二分支中多数 *PtoS1-bZIPs* 成员的表达受干旱胁迫诱导, 而受盐胁迫抑制; 第三分支成员的表达受干旱和盐胁迫诱导。表明毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 不同分支成员可能具有功能分化, 在响应非生物胁迫过程中发挥不同作用, 研究结果为后续解析 *PtoS1-bZIPs* 基因调控杨树抗逆性的分子机制提供了基础。

关键词: 毛白杨; *S1-bZIP*; 基因家族; 基因表达

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2024)x-0001-11

转录因子 (transcription factor, TF) 又称反式作用因子, 可识别并特异性结合靶基因启动子区的相关顺式作用元件, 进而激活或抑制基因表达^[1-3]。在植物的生长发育、形态建成及适应环境变化过程中转录因子起重要调控作用。碱性亮氨酸拉链 (basic region/leucine zipper, bZIP) 转录因子家族是真核生物中分布最广泛、成员种类最多的家族之一。bZIP 主要由位于 N-端的碱性结构域和 C-端的亮氨酸拉链区域组成。碱性结构域由 20 个氨基酸残基组成, 包含核定位信号和一段固定的 N-X7-R/K 基序, 能够特异识别并结合启动子上的顺式元件^[4-5]。亮氨酸拉链区则由 1 个或多个重复

单位组成, 每个重复单位含有 7 或 9 个氨基酸, 最末位一般是亮氨酸, 该区域可以形成两亲性的 α 螺旋结构, 使 bZIP 蛋白单体形成同源或异源二聚体, 从而为 bZIP 蛋白功能多样性提供基础^[6]。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 中共鉴定出 78 个 bZIP 成员, 分为 13 个亚家族^[7]。不同亚家族成员之间的功能存在差异, A 亚族成员主要参与 ABA 信号转导、种子发育和叶片衰老等过程, B 和 K 亚族成员在内质网应激反应中发挥功能, C 亚族成员参与种子萌发和环境胁迫过程, D 亚族成员在病原体防御方面起重要作用, E 和 M 亚族成员负责花粉发育, F 亚族成员是锌缺乏反

收稿日期: 2023-08-30 修回日期: 2024-01-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32371826) 国家级

作者简介: 吴江婷, 博士, 学生。主要研究方向: 林木抗逆分子生理。电话: 13051603726 Email: wujiangting00@126.com

* 通讯作者: 邓澍荣, 博士, 副研究员。主要研究方向: 林木抗逆分子生理。电话: 13811610709 Email: danceon@126.com

应的中心调节因子, G、H 和 J 亚家族成员参与光信号转导, I 亚家族成员主要调控愈伤组织形成和维管发育, S 亚家族成员主要在生长发育和环境适应性中调控碳氮代谢与能量稳态^[8-14]。S 亚家族包含 17 个成员, 是 bZIP 家族中最大的一个亚族, 但其基因功能报道较少, 目前仅对 S1 组的 5 个成员 (*AtbZIP1*、*AtbZIP2*、*AtbZIP11/ATB2*、*AtbZIP44* 和 *AtbZIP53*) 进行了研究。S1 类 bZIP 成员具有独特的无内含子基因结构, 编码小而高度同源的蛋白^[15]。研究表明, S1-bZIPs 能与 C 类 bZIP 蛋白形成异源二聚体, 在蔗糖非发酵-1-相关蛋白激酶 (SUCROSE NON-FERMENTING1 RELATED KINASES1, SnRK1) 介导的细胞内低能量以及低糖水平感应信号途径中起重要调控作用^[16-17]。在低能量条件下, 拟南芥 *AtbZIP2*、*AtbZIP11* 和 *AtbZIP44* 直接激活生长素信号负调控因子 *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 3 (IAA3)* 的转录进而抑制生长素输出载体 *PIN-FORMED (PIN)* 基因的表达, 导致根尖生长素极性运输减弱, 从而抑制根的生长^[18]。在种子发育早期, *AtbZIP44* 高水平表达^[19], 并与 β -甘露聚糖酶 7 (*Endo- β -mannanases 7, MAN7*) 启动子区的 G-box 结合, 正调控种子萌发^[20]。此外, S1-bZIPs 也参与调控植物对非生物胁迫的响应。干旱和盐胁迫下, *AtbZIP1* 表达量显著上调, 增强 *Responsive to dehydration 17 (RD17)*、*RD29A* 和 *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3 (NCED3)* 等胁迫响应基因的表达, 进而提高植株的耐受性^[21]。*AtbZIP53* 受盐胁迫诱导, 激活下游脯氨酸脱氨酶 (*PROLINE DEHYDOGENASE1, ProDH*) 基因的表达, 调节植物体内氨基酸代谢重编程以适应盐胁迫^[22]。同时 C 亚族成员 *AtbZIP10* 可与 *AtbZIP53* 形成异源二聚体, 进一步增强其对 *ProDH* 启动子的结合活性^[23]。

结合拟南芥中 S1-bZIPs 基因的研究发现, S1-bZIPs 广泛参与调控植物体内能量稳态适应非生物胁迫。然而, 目前对本植物 S1-bZIPs 成员的系统性鉴定和响应胁迫的表达模式研究还比较缺乏。杨树是重要的造林树种和工业用材树种^[24]。随着毛果杨 (*Populus trichocarpa* (Torr. & Gray))^[25]、新疆杨 (*Populus alba* var. *pyramidalis* Bunge)^[26]、84K 杨 (*Populus alba* × *P. glandulosa* Hyun)^[27]

和毛白杨 (*Populus tomentosa* Carrière)^[28] 等杨树全基因组测序的完成以及多种杨树的遗传转化体系日益完善, 杨树已成为林木基因工程的模式物种。本研究以毛白杨为对象, 利用生物信息技术从全基因组水平鉴定 S1 类 bZIP 家族成员, 分析 *PtoS1-bZIPs* 的基因结构、系统进化等特征, 明确 *PtoS1-bZIPs* 基因的组织表达以及对非生物胁迫的响应模式, 为后续解析 *PtoS1-bZIPs* 基因的生物学功能及其调控植物抗逆性的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 毛白杨 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员鉴定

从拟南芥基因组网站 (<https://www.arabidopsis.org/>) 中下载 *AtS1-bZIP* 亚家族基因编码的氨基酸序列, 通过 BLASTP 和 hmmsearch 程序对毛白杨基因组数据库进行搜索, 鉴定筛选出 10 个毛白杨 *PtoS1-bZIP* 候选基因。利用 NCBI 毛白杨基因组数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_018804465.1/) 查找候选基因的染色体位置信息。通过 Expasy ProtParam tool 网站 (<https://www.expasy.org/>) 获得 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员的基本理化信息。利用在线网站 (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测 *PtoS1-bZIPs* 蛋白的亚细胞定位。

1.2 毛白杨 *PtoS1-bZIP* 亚家族系统进化树构建

使用 Clustal 软件将毛白杨 (*Populus tomentosa*)、毛果杨 (*P. trichocarpa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 的 S1-bZIPs 氨基酸序列进行多重序列比对。在 MEGA7 软件中, 通过邻接法将比对的序列构建进化树, 在 Evoview (<https://www.evolgenius.info/>) 网站中进行美化。

1.3 毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 基因结构和保守基序分析

通过 GSDS 网站 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析杨树 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员的基因结构。利用 MEME 网站 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 预测 *PtoS1-bZIPs* 的蛋白保守基序。

1.4 毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 染色体定位及共线性分析

基于毛白杨基因注释文件, 使用 Ttools 软件

绘制 *PtoS1-bZIPs* 的染色体定位图。利用 MCSanX 对毛白杨种内及毛白杨与拟南芥、水稻种间的 *S1-bZIPs* 基因进行共线性分析, 并通过 TBtools 对分析结果进行可视化展示。

1.5 毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 顺式作用元件分析

从毛白杨基因组中提取 *PtoS1-bZIPs* 基因上游 2000 bp 序列作为启动子, 通过 PlantCARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 预测顺式作用元件, 并利用 Excel 筛选和统计各基因的响应类元件。

1.6 毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 基因组织表达模式分析

毛白杨无性系材料来源于中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室。在含有 WPM 培养

基的组培瓶里生长 1 个月后, 移栽至温室中 (昼夜温度: 25 °C/18 °C, 相对湿度: 50%~60%, 光照时间: 16 h) 培养 3 个月, 选择长势一致的植株, 收集每个植株的叶、皮、形成层、木质部和根组织, 每次取材进行三次生物学重复。通过 CTAB 法提取各个组织的 RNA, 利用 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara, Dalian, China) 试剂盒合成 cDNA, 根据 *PtoS1-bZIPs* 基因序列设计特异引物 (表 1), 进行实时荧光定量 qRT-PCR 分析。每个组织使用三次生物学重复以及四次技术重复。以 *PtoUBQ10* 为内参基因, 利用 $2^{-\Delta CT}$ 法计算相对表达量。

表 1 *PtoS1-bZIPs* 基因 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers for quantitative real-time PCR of *PtoS1-bZIP* genes

基因名称 Gene names	上游引物(5'→3') Forward primers (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primers (5'→3')
<i>PtobZIP55</i>	AGGCCGATAACTCAATCTTG	CATTAAGATGCTTGAATCTCC
<i>PtobZIP21</i>	GCGTACTTGAGTGTTGAGG	ATTGAAGGTGATCGAGTCTC
<i>PtobZIP27</i>	GAGATCCTGACAAGGATGA	TAGTCGCAGAAACAGAGGC
<i>PtobZIP44</i>	CGAAGCTGAGAACTCTATCC	CAAAAGCACCAGTAGTGGG
<i>PtobZIP6</i>	GTCACAACACAGCACTTCTT	GCACTAGTTTGGAGATCCTC
<i>PtobZIP33</i>	CCATCAATGTCACAACACAGC	ATCAGGGAGATCCTCGTGATG
<i>PtobZIP63</i>	TCAGGCTCTGAAATTGACCCA	AACTTTGTTGTCTGATTGAGAG
<i>PtobZIP49</i>	ATCAGTTCTGACGTTGATGCG	TGTTCTGTGATTGAGAGC
<i>PtobZIP15</i>	GGTCGTTGAACTCTGTGTTGC	TTGAAACATATCAGCAGATGCC
<i>PtobZIP75</i>	TGTGGAATTGACTGAGAGGC	AATAGGCTGACTGAACACG
<i>PtoUBQ10</i>	GTTGATTTTGCTGGGAAGC	GATCTTGGCCTTCACTTGT

1.7 毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 基因响应激素和非生物胁迫分析

材料为生长 1 个月的毛白杨组培苗, 选择长势一致的植株平均分为四组, 转移至 1/4 Hoagland 营养液中在人工气候室 (昼夜温度: 25 °C/18 °C, 相对湿度: 50%~60%, 光照时间: 16 h) 进行水培, 处理组分别进行 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 和 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 处理, 以及用 10% PEG6000 处理来模拟干旱胁迫, 以未处理的毛白杨为对照组, 每组设置三个生物学重复。对处理 24 h 后植株顶端向下第 3、4 片功能叶进行取样, 通过 CTAB 法提取 RNA, 反转录为 cDNA 进行 qRT-PCR 分析, 引物序列见表 1。每个处理使用三次生物学重复以

及四次技术重复。以 *PtoUBQ10* 为内参基因, 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对表达量分析。

2 结果与分析

2.1 毛白杨 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员分析

通过生物信息学方法, 鉴定出毛白杨 *bZIP* 基因家族包含 86 个成员, 分为 12 个亚家族。按照基因在染色体上的位置顺序, 将其依次命名为 *PtobZIP1*~*PtobZIP86*。利用拟南芥 *AtS1-bZIPs* 基因在毛白杨基因组数据库中进行比对, 筛选到 10 个 *PtoS1-bZIPs* 基因。*PtoS1-bZIP* 亚家族成员基因的基本信息分析表明, 各基因所编码的氨基酸序列长度在 139~165 aa 之间, 分子量分布在

15.78~18.71 kDa 之间, 等电点介于 6.05~9.66 之间。通过对 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员进行亚

细胞定位预测发现, 所有蛋白均定位在细胞核中 (表 2)。

表 2 *PtoS1-bZIP* 亚家族基因特征分析

Table 2 Characteristics analysis of *PtoS1-bZIP* subfamily genes in *P. × tomentosa*

基因名称 Gene names	基因号 Gene ID	染色体 Chr	内含子 Introns	外显子 Exons	氨基酸数目 AA	分子量 MW (kDa)	等电点 PI	亚细胞定位 Subcellular location
<i>PtobZIP55</i>	KAG6762870.1	9	0	1	156	17.30	8.09	Nucleus
<i>PtobZIP21</i>	KAG6777875.1	4	0	1	156	17.44	8.10	Nucleus
<i>PtobZIP27</i>	KAG6773901.1	5	0	1	163	18.25	6.59	Nucleus
<i>PtobZIP44</i>	KAG6766766.1	7	0	1	165	18.71	6.20	Nucleus
<i>PtobZIP6</i>	KAG6785745.1	2	0	1	157	17.90	6.18	Nucleus
<i>PtobZIP33</i>	KAG6774655.1	5	0	1	159	18.32	6.05	Nucleus
<i>PtobZIP63</i>	KAG6757882.1	10	0	1	144	16.51	9.66	Nucleus
<i>PtobZIP49</i>	KAG6764077.1	8	0	1	144	16.46	9.36	Nucleus
<i>PtobZIP15</i>	KAG6787046.1	2	0	1	145	16.50	8.88	Nucleus
<i>PtobZIP75</i>	KAG6749792.1	14	0	1	139	15.78	7.84	Nucleus

2.2 毛白杨 *PtoS1-bZIP* 亚家族系统进化分析

为分析 *PtoS1-bZIPs* 基因的进化关系, 将毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 基因与毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*) 中的 *S1-bZIPs* 基因进行序列比对, 构建系统进化树。结果显示, 上述 *S1-bZIPs* 基因可分为 3 个进化分支, 其中第一分支包

含的 *PtoS1-bZIPs* 基因数量最多, 包括 *PtobZIP55*、*PtobZIP21*、*PtobZIP27*、*PtobZIP44*、*PtobZIP6* 和 *PtobZIP33*, 与拟南芥 *AtbZIP2*、*AtbZIP11* 和 *AtbZIP44* 亲缘关系较近; 第二分支包括 *PtobZIP15* 和 *PtobZIP75*, 与 *AtbZIP53* 同源性较高; 第三分支包括 *PtobZIP63* 和 *PtobZIP49*, 与 *AtbZIP1* 亲缘关系密切 (图 1)。

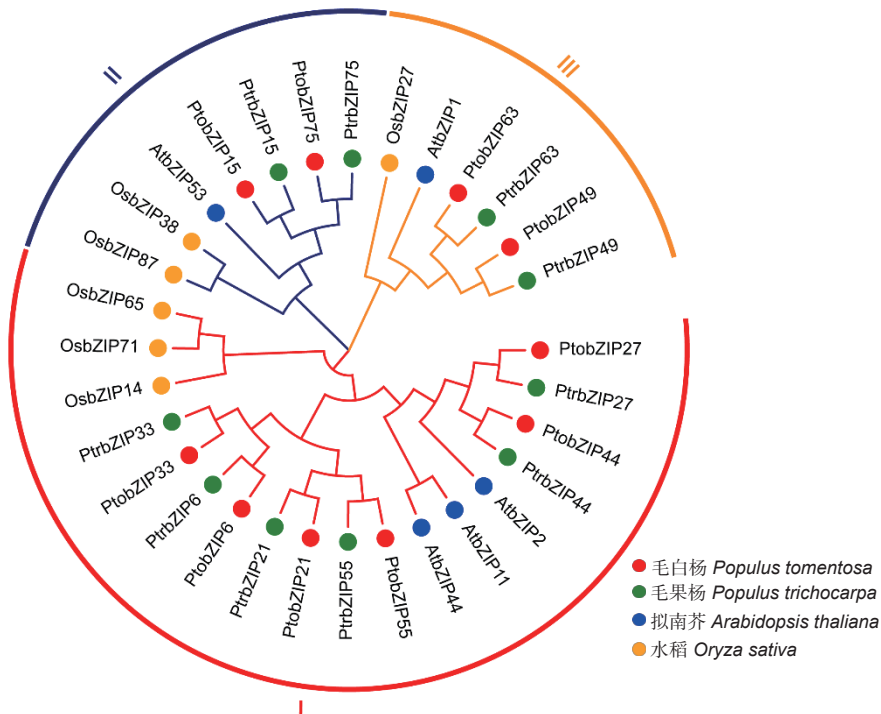


图 1 毛白杨 (*Pto*)、毛果杨 (*Ptr*)、拟南芥 (*At*) 和水稻 (*Os*) *S1-bZIP* 亚家族成员的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *S1-bZIP* subfamilies in *P. tomentosa* (*Pto*), *P. trichocarpa* (*Ptr*), *A. thaliana* (*At*) and *O. sativa* (*Os*)

2.3 毛白杨 *PtoS1-bZIP* 亚家族基因结构以及保守基序分析

为进一步分析 *PtoS1-bZIPs* 基因的序列特征, 对其进行基因结构及保守基序分析, 结果如图 2 所示, 所有 *PtoS1-bZIPs* 成员均无内含子结构。利用在线软件 MEME 预测 *PtoS1-bZIPs* 的蛋白保守基序, 共鉴定得到 10 个保守基序。分析发现, 所有 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员的 N-端中均含有 motif 1、2、4 这 3 种保守基序, 且保守基序分布一致, 长度也较为接近。而各成员在 C-端的保守基序存在差异, 在第一个进化分支中, *PtobZIP55*

和 *PtobZIP21* 蛋白的 C-端含有 motif 3 和 motif 6, *PtobZIP27* 和 *PtobZIP44* 含有 motif 5 和 motif 10, *PtobZIP6* 和 *PtobZIP33* 含有 motif 3、motif 7 和 motif 9。在第二个分支中, *PtobZIP15* 蛋白的 C-端含有 motif 3 和 motif 8, *PtobZIP75* 则含有 motif 5 和 motif 8。在第三个分支中, *PtobZIP63* 和 *PtobZIP49* 蛋白的 C-端只含有一个蛋白基序 motif 5。同一进化分支内 *PtoS1-bZIPs* 含有相似的保守基序, 表明其可能具有相似的功能。不同分支中各蛋白 C-端保守基序的差异暗示其基因功能可能出现分化。

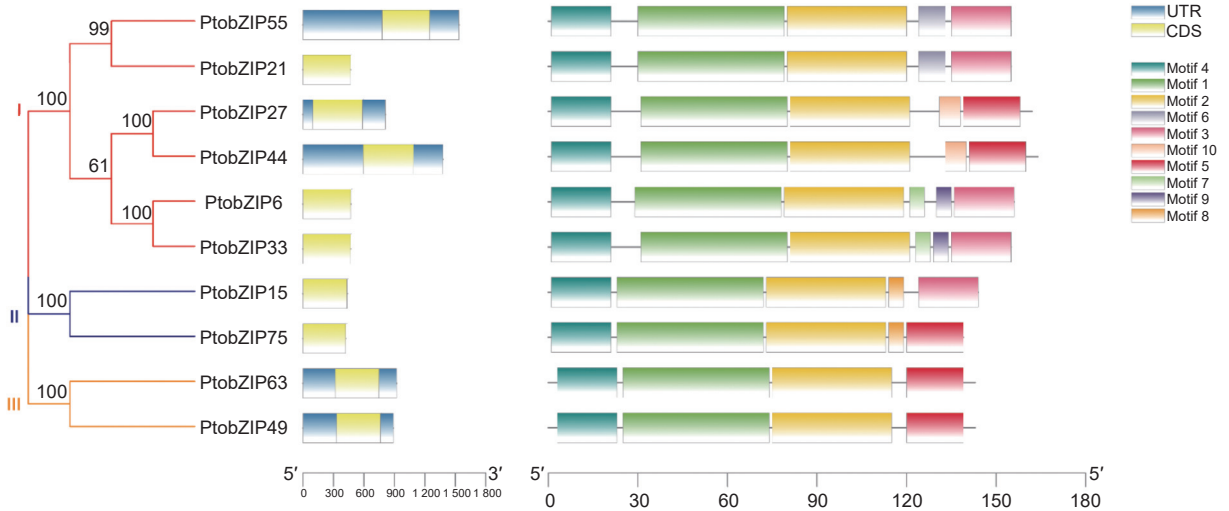


图 2 *PtoS1-bZIPs* 基因结构与保守基序分析

Fig. 2 The gene structures and protein conserved motifs of *PtoS1-bZIP* genes

2.4 毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 基因染色体定位及共线性分析

染色体定位结果表明, *PtoS1-bZIP* 亚家族中的 10 个成员差异分布于毛白杨 19 条染色体中的 8 条, 分别位于 2、4、5、7、8、9、10、14 号染色体上, 其中 2 和 5 号染色体各有 2 个基因分布, 其余 6 条染色体上各包含 1 个基因 (图 3A)。为了分析 *PtoS1-bZIPs* 在毛白杨基因组中的复制事件, 对其进行种内共线性分析。结果显示, 在 10 个 *PtoS1-bZIPs* 基因中共存在 12 对共线性关系 (图 3B)。第二个进化分支内的 *PtobZIP15* 和 *PtobZIP75* 以及第三个进化分支内的 *PtobZIP63* 和 *PtobZIP49* 分别互为 1 对共线性基因, 而第一个分支内的 6 个 *PtobZIPs* 基因之间出现一个基因同时和多个基因存在共线性关系的情况, 说明这些基因在进化过程中发生了扩张事件。为进一步探

究 *S1-bZIPs* 在不同植物间的进化关系, 对毛白杨, 拟南芥和水稻的 *S1-bZIPs* 基因进行种间共线性分析。结果显示, 毛白杨与水稻之间仅有 4 组基因存在共线性关系, 而毛白杨与拟南芥之间具有 20 组基因存在共线性关系 (图 3C)。其中大多数 *PtoS1-bZIPs* 基因与拟南芥之间至少存在 2 个共线性基因对, 表明毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 基因与拟南芥之间的亲缘关系更近, 推测这些基因可能从共同祖先的基因组中进化而来。

2.5 毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 基因顺式作用元件分析

为了预测 *PtoS1-bZIPs* 基因的生物学功能, 对 *PtoS1-bZIPs* 基因上游 2 000 bp 启动子区域的顺式作用元件进行分析。结果表明, 发挥功能的顺式作用元件主要分为 4 类: 植物生长发育类响应元件, 激素响应类元件, 光响应元件以及生物与非生物胁迫类响应元件 (图 4)。其中, 生长发育类响

响应元件 ethylene response element (ERE) 是含量较多的激素类响应元件, Box 4 和 G-box 元件在光响应元件中所占比例较高, MYB 和 MYC 作为响应生物与非生物胁迫的重要功能元件, 是 *PtoS1-bZIPs* 成员中包含最多的顺式作用元件。此外, 还有干旱响应元件 MYB binding site involved in drought-inducibility (MBS)、厌氧诱导响应元件 antioxidant response element (ARE) 等广泛存在于 *PtoS1-bZIPs* 启动子区域。以上结果表明, *PtoS1-bZIPs* 基因可能在光响应、激素信号转导及环境因子胁迫中发挥重要作用。

2.6 毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 基因组织表达特异性分析

基因在植物不同组织中的表达特异性与其基因功能相关。为探究毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 的功能, 利用 qRT-PCR 对毛白杨各个组织中的 *S1-bZIPs* 表达量进行研究 (图 5)。结果表明, 在第一个进化分支中, *PtobZIP55* 在木质部中有较高的表达丰度, *PtobZIP21*、*PtobZIP6* 和 *PtobZIP33* 在叶中表达量较高, 而 *PtobZIP27* 和 *PtobZIP44* 在根中的表达水平较高。在第二个进化分支中, *PtobZIP15* 和 *PtobZIP75* 主要在叶中表现出较高的表达丰度。虽然 *PtobZIP63* 和 *PtobZIP49* 同属第三个进化分支, 但其表达模式有显著差异,

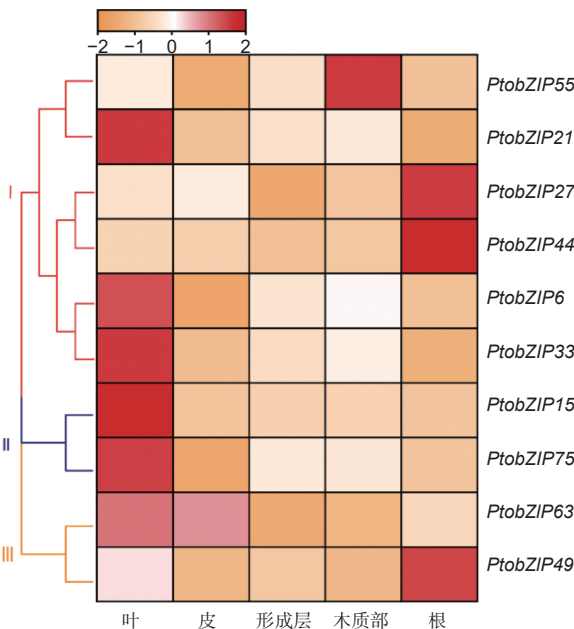


图 5 *PtoS1-bZIPs* 基因在不同组织中的表达模式

Fig. 5 The expression patterns of *PtoS1-bZIP* genes in different tissues

PtobZIP63 在叶和皮中有较高的表达, 而 *PtobZIP49* 则在根中的表达量最高。 *PtoS1-bZIPs* 基因在不同组织中的差异表达表明该亚家族成员可能存在功能上的差异。

2.7 毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 基因响应激素和非生物胁迫分析

为进一步探究 *PtoS1-bZIPs* 基因在激素及非生物胁迫处理下的表达特征, 分别对毛白杨进行脱落酸 (ABA)、盐 (NaCl) 和干旱 (PEG6000) 处理, 利用 qRT-PCR 分析 *PtoS1-bZIPs* 基因在不同处理下的表达变化 (图 6)。结果显示, 经脱落酸处理后, 第一进化分支的 *PtobZIP55*、*PtobZIP21*、*PtobZIP27* 和 *PtobZIP44* 以及第三进化分支的 *PtobZIP63* 和 *PtobZIP49* 表达量上调, 其中 *PtobZIP63* 上调最明显, 为对照组的 4.1 倍。盐胁迫下, 第一进化分支中的 *PtobZIP21*、*PtobZIP27*、*PtobZIP44*、*PtobZIP6* 和 *PtobZIP33* 以及第二进化分支中的 *PtobZIP15* 下调表达, 而第三进化分支的 *PtobZIP63* 和 *PtobZIP49* 上调表达, 其中 *PtobZIP27* 的表达量下调最显著, 为对照组的 0.2 倍, *PtobZIP63* 的表达量上调最明显, 为对照组的 4.9 倍。干旱胁迫下, 第一进化分支的 *PtobZIP55*、*PtobZIP21* 和 *PtobZIP27*, 第二进化分支的 *PtobZIP15* 以及第三进化分支的 *PtobZIP63* 和 *PtobZIP49* 表达量上调, 其中, *PtobZIP55* 的上调表达倍数最高, 为对照组的 6 倍。以上结果表明, *PtoS1-bZIPs* 家族成员在脱落酸、盐和干旱处理下呈现不同的表达特征, 推测其在响应非生物胁迫中发挥不同作用。

3 讨论

近年来, 对于 *S1-bZIP* 亚家族成员的研究主要集中在模式植物拟南芥中, 而对木本植物 *S1-bZIPs* 成员的系统性鉴定及响应胁迫的表达模式研究较少。本研究以毛白杨为对象, 从全基因组水平对 *PtoS1-bZIP* 亚家族进行了系统的生物信息学分析, 共鉴定得到 10 个 *S1-bZIPs* 基因。进化分析显示, *PtoS1-bZIPs* 蛋白可分为 3 个进化支, 每个进化支中均包含单子叶植物水稻、双子叶植物拟南芥和毛果杨的 *S1-bZIPs* 氨基酸序列, 说明该基因家族在单、双子叶植物分化之前就已形成。保守基序分析显示, *PtoS1-bZIP* 亚家族各成员在序列的

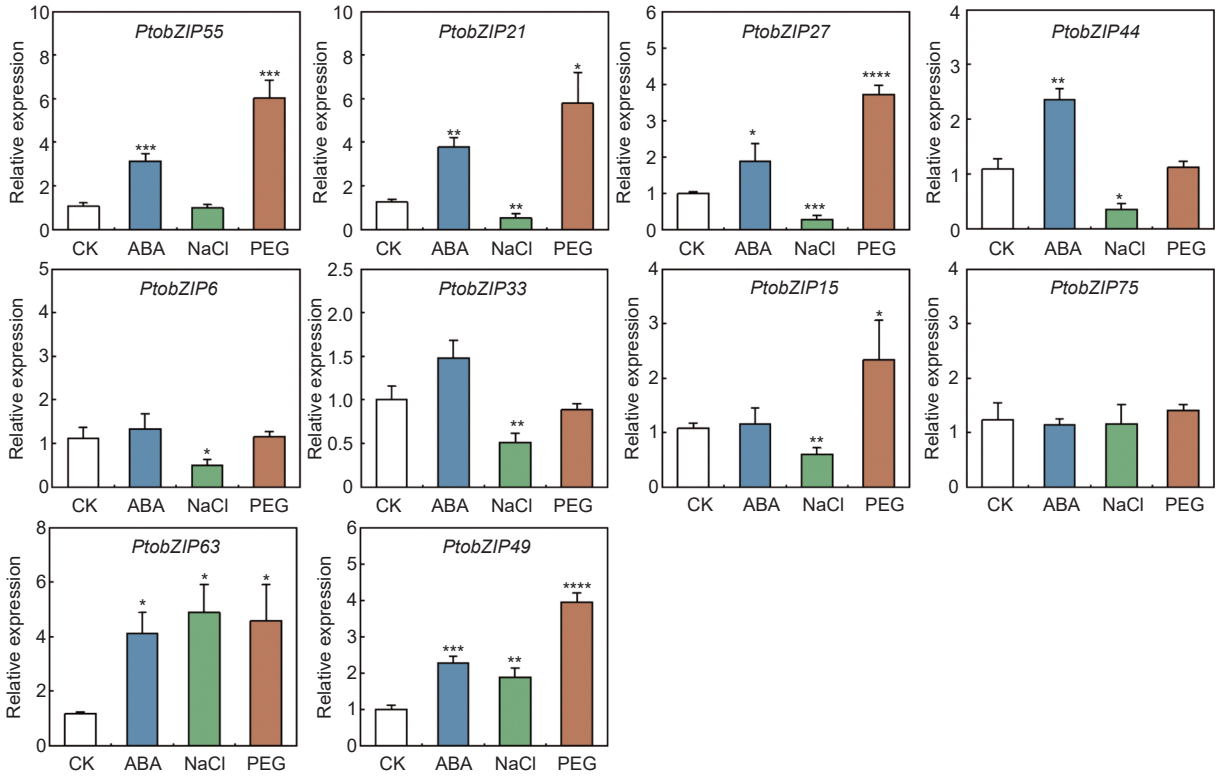


图 6 脱落酸 (ABA)、盐 (NaCl) 及干旱 (PEG6000) 胁迫下 *PtoS1-bZIPs* 基因在叶片中的表达水平
Fig. 6 The expression levels of *PtoS1-bZIPs* genes in leaves under ABA, NaCl and PEG6000 treatment

N-端具有相同的保守基序, 然而, 不同进化分支内的 *bZIP* 蛋白在 C-端所含有的保守基序存在较大差异, 这可能会导致不同分支中 *S1-bZIPs* 基因功能出现差异。基因复制分为串联复制和片段复制两种形式, 有助于基因家族扩张促进新基因产生和功能分化^[29-30]。在 *PtoS1-bZIP* 亚家族成员中共检测到 12 个片段复制基因对, 未发现串联重复, 说明片段复制事件对于 *PtoS1-bZIPs* 成员的进化和扩增具有重要作用。另外, 种间共线性分析发现毛白杨与拟南芥之间的共线性关系对最多, 表明毛白杨与拟南芥的 *S1-bZIPs* 基因可能是由相同祖先进化而来。*PtobZIP55* 和 *PtobZIP21* 在毛白杨基因组内以及与拟南芥之间存在的共线性关系对最多, 暗示这两个基因在进化过程中发挥关键作用。

基因在不同组织中的表达特异性与其功能密切相关, 10 个 *PtoS1-bZIPs* 基因在各个组织中的表达水平存在明显差异, 暗示其基因功能可能不同。启动子区的顺式作用元件在基因表达过程中起重要调控作用, *PtoS1-bZIP* 家族成员含有多个与光、激素及非生物胁迫响应相关元件, 其中, MYB 和 MYC 顺式作用元件所占比例最高, 而 MYB 和 MYC 元件能够应答 ABA 介导的干旱、盐等非生物

胁迫逆境因子^[31-32], 表明 *PtoS1-bZIPs* 可能在逆境响应中发挥重要作用。本研究对毛白杨进行 ABA、盐和干旱处理, 分析 *PtoS1-bZIPs* 的表达特征。第一和第二进化分支中的大部分基因在 ABA 和干旱处理下上调表达, 在盐处理下显著下调, 第三个进化分支中的基因在胁迫和 ABA 处理下均显著上调。结合基因结构分析发现, 所有 *PtoS1-bZIPs* 成员都没有内含子结构, 而缺失内含子的基因能有效减少转录后加工过程, 可帮助植物在非生物胁迫下快速转录及翻译^[33], 推测 *PtoS1-bZIPs* 可能在调控植物抗逆性方面发挥重要功能。在盐和干旱胁迫处理下, 第一和第二分支有少部分 *S1-bZIPs* 成员表达无显著变化, 推测这些基因可能为毛白杨在进化过程中产生的冗余 *S1-bZIPs* 基因。*S1-bZIPs* 是调控能量代谢的关键因子, 在持续黑暗条件下, *AtS1-bZIPs* 通过激活参与支链氨基酸、脯氨酸以及酪氨酸降解途径中相关酶基因的表达来维持细胞内能量稳态^[16, 34-35]。拟南芥中研究表明, *AtS1-bZIPs* 可与 C 亚族成员形成异源二聚体, 调控碳水化合物和氨基酸代谢重编程以适应盐胁迫^[22]。在番茄中, *SibZIP1* 通过上调与 ABA 生物合成以及信号转导相关基因的表达来提

高耐盐性和抗旱性^[36]。本研究发现, *PtoS1-bZIP* 亚家族第三分支的 *PtobZIP63* 和 *PtobZIP49* 与 *S1bZIP1* 同源性较高, 并且在盐和干旱处理下表达量均显著上调, 推测 *PtobZIP63* 和 *PtobZIP49* 可能在盐和干旱胁迫下发挥重要功能。*PtoS1-bZIP* 亚家族第一分支和第二分支中的大部分基因受干旱诱导, 受盐胁迫抑制, 说明毛白杨 *PtoS1-bZIPs* 不同分支中的成员之间可能具有功能分化。*PtoS1-bZIP* 亚家族各分支中关键成员在调控杨树抗逆性中的分子功能还需进一步研究。

4 结论

本研究对毛白杨 *PtoS1-bZIP* 亚家族进行了系统的生物信息学分析, 共鉴定获得 10 个 *S1-bZIPs* 基因, 分布在 8 条染色体上, 均无内含子结构。系统进化分析发现 *PtoS1-bZIPs* 可分为 3 个分支, 不同成员的基因表达具有组织特异性。第一和第二分支中多数 *PtoS1-bZIPs* 成员的表达受干旱胁迫诱导, 而受盐胁迫抑制, 第三分支成员在干旱和盐胁迫处理下均上调表达, 说明 *PtoS1-bZIP* 亚家族不同分支中的成员具有功能分化。本研究结果可为后续 *PtoS1-bZIPs* 的生物学功能及其调控植物抗逆性的分子机制研究提供基础。

参考文献:

- [1] 樊松乐, 王纪坤, 覃碧, 等. 植物转录因子研究方法及应用[J]. 分子植物育种, 2017, 17(15): 5003-5009.
- [2] NG D W K, ABEYSINGHE J K, KAMALI M. Regulating the regulators: the control of transcription factors in plant defense signaling[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(12): 3737.
- [3] SINGH K B, FOLEY R C, OÑATE-SÁNCHEZ L. Transcription factors in plant defense and stress responses[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(5): 430-436.
- [4] LANDSCHULZ W H, JOHNSON P F, MCKNIGHT S L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins[J]. Science, 1988, 240(4860): 1759-1764.
- [5] JAKOBY M, WEISSHAAR B, DRÖGE-LASER W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(3): 106-111.
- [6] SCHÜTZE K, HARTER K, CHABAN C. Post-translational regulation of plant bZIP factors[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(5): 247-255.
- [7] DRÖGE-LASER W, SNOEK B L, SNEL B, et al. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family—an update[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2018, 45: 36-49.
- [8] BANERJEE A, ROYCHOUDHURY A. Abscisic-acid-dependent basic leucine zipper (bZIP) transcription factors in plant abiotic stress[J]. Protoplasma, 2017, 254(1): 3-16.
- [9] HOWELL S H. Endoplasmic reticulum stress responses in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64(1): 477-499.
- [10] FU Z Q, DONG X. Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64(1): 839-863.
- [11] SHEN H S, CAO K M, WANG X P. A conserved proline residue in the leucine zipper region of AtbZIP34 and AtbZIP61 in *Arabidopsis thaliana* interferes with the formation of homodimer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 362(2): 425-430.
- [12] INABA S, KURATA R, KOBAYASHI M, et al. Identification of putative target genes of bZIP19, a transcription factor essential for *Arabidopsis* adaptation to Zn deficiency in roots[J]. The Plant Journal, 2015, 84(2): 323-334.
- [13] XU C Y, CAO H F, ZHANG Q Q, et al. Control of auxin-induced callus formation by bZIP59-LBD complex in *Arabidopsis* regeneration[J]. Nature Plants, 2018, 4(2): 108-115.
- [14] DRÖGE-LASER W, WEISTE C. The C/S1 bZIP network: a regulatory hub orchestrating plant energy homeostasis[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(5): 422-433.
- [15] YAMASHITA Y, TAKAMATSU S, GLASBRENNER M, et al. Sucrose sensing through nascent peptide-mediated ribosome stalling at the stop codon of *Arabidopsis* bZIP11 uORF2[J]. FEBS Letters, 2017, 591(9): 1266-1277.
- [16] PEDROTTI L, WEISTE C, NÄGELE T, et al. Snf1-RELATED KINASE1-controlled C/S(1)-bZIP signaling activates alternative mitochondrial metabolic pathways to ensure plant survival in extended darkness[J]. The Plant Cell, 2018, 30(2): 495-509.
- [17] WANG H, ZHANG Y T, NORRIS A, et al. S1-bZIP Transcription factors play important roles in the regulation of fruit quality and stress response[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 802802.
- [18] WEISTE C, PEDROTTI L, SELVANAYAGAM J, et al. The *Arabidopsis* bZIP11 transcription factor links low-energy signalling to auxin-mediated control of primary root growth[J]. PLOS Genetics, 2017, 13(2): e1006607.
- [19] WELTMEIER F, RAHMANI F, EHLERT A, et al. Expression patterns within the *Arabidopsis* C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development[J]. Plant Molecular Biology, 2008, 69(1-2): 107-119.
- [20] IGLESIAS-FERNÁNDEZ R, BARRERO-SICILIA C, CARRILLO-BARRAL N, et al. *Arabidopsis thaliana* bZIP44: a transcription

- factor affecting seed germination and expression of the mannase-encoding gene *AtMAN7*[J]. *The Plant Journal*, 2013, 74(5): 767-780.
- [21] SUN X L, LI Y, CAI H, *et al.* The *Arabidopsis* AtbZIP1 transcription factor is a positive regulator of plant tolerance to salt, osmotic and drought stresses[J]. *Journal of Plant Research*, 2011, 125(3): 429-438.
- [22] WELTMEIER F, EHLERT A, MAYER C S, *et al.* Combinatorial control of *Arabidopsis* proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors[J]. *The EMBO Journal*, 2006, 25(13): 3133-3143.
- [23] HARTMANN L, PEDROTTI L, WEISTE C, *et al.* Crosstalk between two bZIP signaling pathways orchestrates salt-induced metabolic reprogramming in *Arabidopsis* roots[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(8): 2244-2260.
- [24] 王瑞文, 郭 赞, 周忠诚. 杨树育种研究进展[J]. *湖北林业科技*, 2016, 45 (6): 33-35 + 80.
- [25] TUSKAN G A, DIFAZIO S, JANSSON S, *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1596-1604.
- [26] MA J C, WAN D S, DUAN B B, *et al.* Genome sequence and genetic transformation of a widely distributed and cultivated poplar[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(2): 451-460.
- [27] QIU D Y, BAI S L, MA J C, *et al.* The genome of *Populus alba* × *Populus tremula* var. *glandulosa* clone 84K[J]. *DNA Research*, 2019, 26(5): 423-431.
- [28] AN X M, GAO K, CHEN Z, *et al.* High quality haplotype-resolved genome assemblies of *Populus tomentosa* Carr., a stabilized interspecific hybrid species widespread in Asia[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2021, 22(2): 786-802.
- [29] GU Z L, STEINMETZ L M, GU X, *et al.* Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations[J]. *Nature*, 2003, 421(6918): 63-66.
- [30] LYNCH M, CONERY J S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes[J]. *Science*, 2000, 290(5494): 1151-1155.
- [31] ABE H, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO T, *et al.* Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression[J]. *The Plant cell*, 1997, 9(10): 1859-1868.
- [32] ABE H, URAO T, ITO T, *et al.* *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(1): 63-78.
- [33] JEFFARES D C, PENKETT C J, BÄHLER J. Rapidly regulated genes are intron poor[J]. *Trends in Genetics*, 2008, 24(8): 375-378.
- [34] HANSON J, HANSEN M, WIESE A, *et al.* The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *ASPARAGINE SYNTHETASE1* and *PROLINE DEHYDROGENASE2*[J]. *The Plant Journal*, 2007, 53(6): 935-949.
- [35] MA J, HANSEN M, LUNDGREN K, *et al.* The sucrose-regulated *Arabidopsis* transcription factor bZIP11 reprograms metabolism and regulates trehalose metabolism[J]. *New Phytologist*, 2011, 191(3): 733-745.
- [36] ZHU M K, MENG X Q, CAI J, *et al.* Basic leucine zipper transcription factor SlbZIP1 mediates salt and drought stress tolerance in tomato[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 83.

Identification and Expression Analysis of *PtoS1-bZIP* Subfamily in *Populus tomentosa*

WU Jiang-ting¹, JIA Chen-lin¹, LUO Zhi-bin¹, DENG Shu-rong¹

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] To identify *S1-bZIP* subfamily members in *Populus tomentosa* and analyze the expression profiles of *PtoS1-bZIP* genes in different tissues in response to abiotic stress. [Method] Members of *PtoS1-bZIP* subfamily were systematically analyzed using bioinformatic approaches. Real-time PCR was performed to explore the expression patterns of *PtoS1-bZIP* genes in different tissues, as well as under different hormonal or abiotic stress treatment. [Result] A total of ten intron-lacking *PtoS1-bZIP* genes were identified in the genome of *Populus tomentosa*, which were distributed to eight distinct chromosomes. According to phylogenetic analysis, *PtoS1-bZIP* subfamily members were divided into three sub-clades, designated as Clades I to III. 12 pairs of fragment replicates were identified in the genome of *Populus tomentosa*. Cis-acting element prediction showed that the promoter regions of *PtoS1-bZIP* genes were rich of various regulatory elements involving light, hormone or abiotic stress response. qRT-PCR analysis revealed that the members of *PtoS1-bZIP* subfamily were specifically expressed across different tissues. The majority of *PtoS1-bZIP* genes in the first and second clades were upregulated under ABA and drought treatments, while expression levels were downregulated under salt treatment. In contrast, all of the *PtoS1-bZIP* members in the third clades were upregulated under ABA, drought, and salt treatments. [Conclusion] In the genome of *Populus tomentosa*, ten *PtoS1-bZIP* genes are identified and divided into three clades. The expression of major *PtoS1-bZIP* genes in the first and second clades were induced by drought stress and inhibited by salt stress. The expression of members in the third clades were induced by both drought and salt stress. It indicates that different clades of *PtoS1-bZIP* genes may have functional differentiation, which play different roles in response to abiotic stresses. Our results lay a foundation for further investigation of the biological functions of *PtoS1-bZIP* genes and their molecular mechanisms involved in regulating stress resistance of poplars.

Keywords: *Populus tomentosa*; *S1-bZIP*; gene family; gene expression

(责任编辑: 张 研)