DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20240362

枇杷 HD-Zip I 转录因子家族全基因组鉴定 及表达模式分析

赵 双^{1,2},朱静雯¹,陈甜甜¹,王鹏凯¹,郄红丽²,王化坤²,尤伟忠^{2*}

('苏州农业职业技术学院,江苏苏州 215008; '江苏省太湖常绿果树技术推广中心,江苏苏州 215107)

摘 要:【目的】同源结构域-亮氨酸拉链(HD-Zip)转录因子参与多种植物的非生物胁迫响应过程。然而,在枇杷中, HD-Zip I基因家族尚未被鉴定。【方法】利用生物信息学方法对全基因组范围内枇杷*HD-Zip I*基因家族成员进行鉴定 和综合分析,通过qRT-PCR法分析基因家族成员在枇杷不同组织和干旱胁迫下的表达特征。【结果】在枇杷基因组中 筛选出20个HD-Zip I家族成员。共线性分析结果发现了3对串联复制序列和22对片段复制序列,表明串联复制和片 段复制可能促进了枇杷*HD-Zip I*基因家族的扩张。蛋白序列比对分析表明,所有的HD-Zip I家族成员均具有高度保 守的HD和Zip结构域。系统发育分析表明,枇杷HD-Zip I家族可以分为7个分支。*HD-Zip I*各基因在枇杷不同组织 中的表达模式有所差异。启动子序列分析表明,HD-Zip I家族成员的启动子上含有多个与干旱胁迫和胁迫相关激素 信号响应的顺式作用元件。干旱处理能够诱导*EjHB9、EjHB10、EjHB17、EjHB18和EjHB20*在叶片中的表达显著上 调,预示着这些基因参与枇杷对干旱胁迫的响应。【结论】鉴定出5个受干旱胁迫显著诱导表达的枇杷*HD-Zip I*基因, 为进一步研究*HD-Zip I*基因在响应枇杷干旱胁迫中的分子功能提供理论依据。

关键词:枇杷;HD-ZipI转录因子;全基因组鉴定;表达分析

中图分类号:S667.3 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2024)10-2025-13

Genome-wide identification and expression pattern analysis of HD-Zip I transcription factor family in loquat

ZHAO Shuang^{1, 2}, ZHU Jingwen¹, CHEN Tiantian¹, WANG Pengkai¹, QI Hongli², WANG Huakun², YOU Weizhong^{2*}

(¹Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou, 215008, Jiangsu, China; ²Jiangsu Taihu Evergreen Fruit Tree Technology Promotion Center, Suzhou, 215107, Jiangsu, China)

Abstract: 【Objective】 Homologous structural domain-leucine zip (HD-Zip) transcription factors are involved in a variety of plant abiotic stress response processes. However, the *HD-Zip I* gene family has not been identified in loquat. 【Methods】 A genome-wide identification and analysis of the loquat HD-Zip I transcription factor were carried out using bioinformatic methods for identification. The expression patterns of HD-Zip I family members in different tissues and by various drought treatments were examined by qPCR. 【Results】 A total of 20 putative loquat HD-Zip I family members were identified by searching the Big Seven Stars loquat genome database. The HD-Zip I members were further named EjHB1-EjHB20 according to their positions on 10 different chromosomes. We performed covariance analysis within the loquat genome and found 25 duplicate gene pairs in the HD-Zip I family, including 3 tandem duplicate gene pairs and 22 fragment duplicate gene pairs. The nucleotide sequence identity of the HD-Zip I duplicate pairs ranged from 42.04% to 93.71%, and the Ka/Ks ratios ranged from 0.08

收稿日期:2024-07-11 接受日期:2024-08-03

基金项目:苏州市科技发展计划(农业关键核心技术攻关)指导性项目(SNGD202303);江苏省林业科技创新与推广项目(LYKJ [2020] 28);江苏省种业振兴"揭榜挂帅"项目(JBGS[2021] 019);江苏省高校"青蓝工程"项目(2024);2022年苏州市姑苏人才专项《枇杷新品种(系)的选育与示范》

作者简介:赵双,女,讲师,博士,研究方向为果树生理生态。E-mail:zhsh812972738@126.com

^{*}通信作者 Author for correspondence. E-mail:1263200645@qq.com

to 0.43. To further investigate the phylogenetic relationships among HD-Zip I family members in different plant species, phylogenetic trees were constructed for HD-Zip I protein sequences in loquat, apple, Arabidopsis thaliana and rice. The HD-Zip I proteins were classified into nine clades, namely α , $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma, \delta, \varepsilon, \varphi 1, \varphi 2$ and ζ . Among them, the $\varphi 1$ and ζ clades contained only the family members of *Arabidop*sis thaliana and rice, respectively, and were not clustered with the HD-Zip I genes of apple and loquat. The members of the loquat HD-Zip I clades clustered closer to the apple homologues and further away from the rice homologues. In addition, loquat, apple, Arabidopsis and rice had the most members in the α clade, followed by the γ clade. Multiple sequence comparison of 20 loquat HD-Zip I proteins using DNAMAN software revealed that all HD-Zip I proteins had HD and Zip conserved structural domains. To further investigate the relationship between loquat HD-Zip I proteins, we constructed a phylogenetic tree of all loquat HD-Zip I protein sequences and analysed their gene structures and motifs. Similar to the results of the phylogenetic analysis described above, the loquat HD-Zip I gene family was divided into seven clades: α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ , δ , ε and $\varphi 2$. Since the intron-exon structure of genes played a crucial role in the evolution of multigene families, we examined the intron-exon structures of 20 loguat HD-Zip I genes to better understand their structural evolution. The γ clade members had one intron, the β 1 clade members had three introns, and the other branch members contained two introns. Combined with phylogenetic analysis, we found that genes in the same branch had similar intron-exon structures, whereas the intron-exon structures of different branches differed. To gain insight into the differences and functions of the loquat HD-Zip I protein, we used the MEME programme to identify its motifs. We identified 10 motifs ranging from 20 to 50 residues in length. All predicted motifs were identified only once in each HD-Zip I protein. Except for motif 1, which was present in all HD-Zip I proteins, the remaining nine motifs were only present in certain branches. Tissue expression analysis showed that HD-Zip I was found in loquat roots, stems, leaves, flowers and fruits. The results showed that EiHB3, EiHB6, EiHB8, EjHB15 and EjHB20 were mainly expressed in leaves, and EjHB16 and EjHB18 were mainly expressed in roots. Most members had high expression levels in stems and low expression levels in fruits. In addition, EjHB11, EjHB12 and EjHB13 were expressed at higher levels in flowers than in other tissues, while other members were also generally expressed at lower levels in flowers. Cis-acting element analysis revealed that most HD-Zip I promoters contained ABRE elements, which were normally involved in ABA-related responses. And HD-Zip I promoters contained drought-inducible elements (MBS), as well as defence and stress-responsive elements (TC-rich repeats). In addition, there were a number of *cis*-elements associated with stress response and stress-related hormone signalling, such as MYB, MYC, SA and MeJA. The HD-Zip I family contained cis- acting elements associated with drought stress. To identify the role of HD-Zip I in the regulation of drought tolerance in loquat, we analysed the expression of 20 HD-Zip I genes under drought stress. It was shown that the expression levels of EjHB9, EjHB10, EjHB17 and EjHB18 in the γ -clade and EjHB20 in the ε -branch significantly increased after drought treatment, whereas EjHB2 and EjHB19 in the β 2-branch were significantly downregulated by drought. [Conclusion] In this study, 20 members of the HD-Zip I transcription factor family were identified from the complete loquat protein sequence, and promoter prediction analysis indicated that they responded to drought stress. Expression analysis after drought treatment also confirmed that loquat HD-Zip I transcription factors may play an important role in drought stress response. The present study may provide a reference for the future analysis of the mechanism of loquat HD-Zip I genes and the development of drought-resistant breeding in loquat.

Key words: Loquat; HD-Zip I transcription factor; Genome-wide identification; Expression analysis

干旱胁迫是最严重的环境限制因素之一,影响 植物的地理分布和生长,极大地限制了作物的产 量^[1]。转录因子(TF)在植物响应逆境胁迫过程中发 挥着重要的调控作用,被认为是作物耐旱性遗传改 良的靶标^[2-3]。同源结构域-亮氨酸拉链(HD-Zip)转 录因子是植物中所特有的,在植物逆境信号转导及 适应中发挥着重要作用[4-6]。所有HD-Zip转录因子 都含有2个结构域,HD同源结构域和Zip结构域,根 据其基因结构和功能可将其分为4个亚家族的。很 多证据表明,HD-Zip I转录因子广泛参与植物对干 旱胁迫的响应^[6-8],在番茄中过表达HD-Zip I转录因 子ATHB7可提高转基因番茄的耐旱性¹⁹;过表达玉 米HD-Zip I基因 ZmHDZ4 和 ZmHDZ10 可降低转基 因水稻的相对电导率(REL)和丙二醛(MDA)含量, 从而提高转基因水稻的抗旱性^[10-11];此外,HD-Zip I 转录因子 ZmHDZ9 通过调控脱落酸和木质素积累 来提高玉米的抗旱性[12]。

枇杷(Eriobotrya japonica)是多年生常绿小乔 木,秋冬开花,初夏成熟,果实酸甜适度,风味独特, 是中国重要的亚热带水果之一[13]。但枇杷根系分布 浅,须根稀少,对水分要求较高,而中国的枇杷园大 多建在灌溉条件差的山坡上,特别容易受干旱危害, 因此,季节性干旱严重影响了枇杷的生长发育、果实 产量和品质[14-16]。目前有关枇杷耐旱性的研究相对 较少,且针对枇杷HD-Zip I转录因子的系统研究更 是鲜见报道。鉴于HD-Zip I转录因子在植物中的重 要意义,笔者在本研究中利用 Jiang 等印发布的大七 星枇杷参考基因组,对枇杷HD-Zip I转录因子家族 的基因结构、蛋白结构域、共线性关系及系统发育进 行分析,并通过qPCR检测该家族成员在不同组织 中及干旱处理下的表达模式,为进一步研究其在干 旱下的生理功能与作用机制奠定基础,从而为开展 枇杷抗旱基因工程育种提供参考。

1 材料和方法

1.1 植物材料及试验处理

试验所用植物材料的生长地点位于江苏省苏州 市苏州农业职业技术学院东山校区(120°40′E,31° 08′N)。干旱处理所用材料来源于江苏省珍稀树种 白沙枇杷种质资源保护与培育长期科研基地的2年 生白玉枇杷嫁接苗。将长势一致且种植在具有相同 质量营养基质的2年生白玉枇杷苗,置于苏州农业 职业技术学院东山校区的玻璃温室中进行干旱处 理。干旱处理开始前,对枇杷植株充分灌溉。浇水 后计为干旱处理第0天,并收集枇杷叶片样品,然后 中止浇水,于处理第3、6、9和12天收集枇杷叶片样 品,并用于枇杷*HD-Zip I*基因干旱处理下的表达分 析。正常浇水的组培生根多年生冠玉枇杷的侧根、 茎、成熟叶片、花和成熟的果实样品用于枇杷HD-Zip I基因组织特异性表达分析。采收的样品用液 氮速冻,储存在-80℃的冰箱,然后用于提取RNA。

1.2 RNA提取和cDNA合成

根据制造商的试剂盒说明书,使用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN) 提取枇杷叶片的总 RNA。根据制造商的试剂盒说明书,使用 PrimeScript 第一链 cDNA 合成试剂盒(TaKaRa,日本)反转录合成单链 cDNA。

1.3 枇杷 HD-Zip I家族成员的序列筛选

从 TAIR 网站(http://www.arabidopsis.org/)下载 拟南芥中 HD-Zip I基因序列。拟南芥中的 HD-Zip I 蛋 白 被 用 作 大 七 星 枇 杷 基 因 组 数 据 库 进 行 BLASTP 检索的查询对象。将属于枇杷中 HD-Zip I 基因家族的最佳检索结果提交到保守结构域数据 库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb. cgi)和 SMART(http://smart. emblheidelberg.de/),以 检查 HD-Zip 结构域的存在和完整性。

1.4 枇杷 HD-Zip I 基因序列比对、基因结构和保守基序分析

利用 DNAMAN 软件对枇杷 HD-Zip I家族成员 的氨基酸序列进行多序列比对。利用在线 Gene Structure Display Server (GSDS, http://gsds.cbi.pku. edu.ch)程序构建 HD-Zip I基因家族的外显子-内含 子的结构。利用 MEME 程序(http://meme-suite.org/ tools/meme)预测出枇杷 HD-Zip I蛋白的保守基序 (Motif),最优基序宽度设置为6~50个氨基酸,程序 设置为搜索10个 Motif。

1.5 共线性和系统发育分析

使用 MCScanX 对 HD-Zip I 家族成员进行共线 性分析,并使用 TBtools 对 HD-Zip I 基因的共线性关 系进行可视化^[18-19]。利用 TBtools 软件计算 Ks(同义替 换率)和 Ka(非同义替代率)。使用邻接法在 MEGA 10 版本中构建系统发育树,bootstrap 值 1000。

1.6 启动子中的顺式作用元件分析

为了检测枇杷HD-Zip I基因启动子中可能存在

的顺式作用元件,笔者根据枇杷基因组序列下载基因起始密码子上游2000 bp的序列。利用 Plant CARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/beg/tools/plantcare)预测枇杷 HD-Zip I 基因启动子中潜在的顺式作用元件。

1.7 基因的表达分析

根据枇杷HD-Zip I基因的预测序列设计了特定

引物(表1),用于表达分析。通过荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)方法检测枇杷*HD-Zip I*基因在不同 组织中和干旱处理下的表达情况,所用仪器为:Bio-Rad CFX Opus 96(Bio-Rad),qRT-PCR 的反应体系 和反应程序根据荧光实时定量染料说明书进行设 置。*EjActin*被用作内源对照基因来计算目的基因 的△Ct值^[20]。使用2^{-AACT}方法计算相对表达量^[21]。使

表1	枇杷 HD-Zip I 相对表达实时荧光定量 PCR 引物	
----	-------------------------------	--

Table 1	Real-time fluorescence	quantitative PCR	primers for relative	expression of	HD-Zip I	genes in loquat
		1				8

基因	登录号	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
Gene	Gene ID	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer $(5' - 3')$
EjHB1	EVM0008013	CAGCATCCTCAAAGCCGACTATG	CTTCCTTCACAGAACCATTCCTCTC
EjHB2	EVM0008602	CAGTCACCGCCACCACCTC	AGTCACTGTCCGAAGAGCCATC
EjHB3	EVM0022892	GCTTCTGAACTGGGTCTTGATCC	TCTTCCTCCAACTTCTTGTTCTTCC
EjHB4	EVM0016435	ACTGAAGGCGGAGGTTCTTGTC	TGGCTTCTGCGGCGGTTC
EjHB5	EVM0021510	AGATTCTGAAACTGTGACCAAAGGG	CGGCTCTAACAACGGTGAATGG
EjHB6	EVM0012108	CGGCGTGGCATCGTTTCTAG	CATGTTCAACCTCCTCTTCTTCTCC
EjHB7	EVM0019346	GTGGTGTGCAAGCAAGAGGATG	CGGCTCTAACAACGACGAATGG
EjHB8	EVM0019681	GACAACGATGCTCTCCAATCTCTG	GTTGATGGATTCTGCTGGCTCTC
EjHB9	EVM0031961	CTGCCACTACAAGGAGGAAGAAC	CGACTCAGACTCAAAGATGGACTC
EjHB10	EVM0037466	GACTAGAAGAGGAATTGGAGCAGAG	TGAGGTGTCACAGAGGCATCC
EjHB11	EVM0041212	GAAGAAGATGACGGTAGCGATGAC	TTAGGACCACACCACCAGTTC
EjHB12	EVM0018875	GGAGCAACGGAAGTGAGAACAG	AGGAGGACGGTGGGAAGAGG
EjHB13	EVM0024591	CCTCCACCTTGCTAATTCCTCTTG	GCCGCTTCTTGGTCGTGATG
EjHB14	EVM0033737	GCTCAAATCCCAGGTGGTTTCC	GCTTCTCGTCATCGTGGTCATC
EjHB15	EVM0017591	CAGTCTGACCTTTCCCAAGATGAAG	GCAGGCGTATCGGAGTAATCAAC
EjHB16	EVM0017694	GTCATTGGGTGCTTTGGTCTCC	TGCCTGAAACTCCTTGCTGTAAC
EjHB17	EVM0023669	AGAGGAATTGGAGCAGAGAAGAGTC	GAGGTGTCGCAGAGGCATCC
EjHB18	EVM0026197	TGCCACCGTTTCTGAATCTGATAAG	TCGCAAGGTTTGGTTCATCTTCC
EjHB19	EVM0024132	CGTCCTTGCCGTCGTCATTG	ACTGCTAAAGAAGTTGTGCTCCTC
EjHB20	EVM0022100	GCTAACAAGGCAAGAGGGACAAAC	AGGTGGTGACGCTGGGTTATATTC
Actin	JN004223	GGATTTGCTGGTGATGATGC	CCGTGCTCAATGGGATACTT

用熔解曲线确定扩增片段的特异性。

1.8 数据分析

使用 IBM SPSS Statistics 17.0 软件中的单因素 方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)进 行试验数据的统计分析。枇杷 HD-Zip I 在不同组织 中的相对表达量采用 Tukey 多重比较分析法分析 (p<0.05)。

2 结果与分析

2.1 枇杷 HD-Zip I 家族成员鉴定

通过对大七星枇杷基因组数据库的搜索,共鉴 定到20个假定枇杷HD-Zip I家族成员,检测了这些 候选蛋白序列中HD和Zip结合结构域的存在和完 整性,共有20个基因被确认为HD-Zip I家族成员, 并根据HD-Zip I成员在染色体上的位置对其进行命 名(表2)。HD-Zip I蛋白的长度在215~333个氨基 酸(aa)之间,分子质量在24.82~37.50 kDa之间,理 论等电点为4.51~7.93。

2.2 枇杷 HD-Zip I 基因的共线性和系统发育分析

如图1所示, HD-Zip I家族基因在枇杷10条染 色体上随机分布。4个HD-Zip I家族成员位于第3 条染色体上,3个HD-Zip I家族成员位于第16条染 色体上,2个HD-Zip I家族成员位于第7、8、10、11和 13染色体上,1个HD-Zip I家族成员位于第14、15、 和17染色体上。笔者在枇杷基因组内进行了共线 性分析,发现 HD-Zip I家族中存在25个重复基因

		Table 2 Characterist	thes of the HD-Zhp I members	s in loquat		
基因 Gene	登录号 Gene ID	染色体定位 Chromosome location	氨基酸数量 Number of amino acids/aa	分子质量 MW/kDa	等电点 pI	内含子/外显子 Intron/Exon
EjHB1	EVM0008013	LG03:10186645-10187781	274	31.11	6.21	2/3
EjHB2	EVM0008602	LG03:23204370-23206151	329	37.18	5.28	2/3
EjHB3	EVM0022892	LG03:32463730-32465702	215	24.82	6.37	2/3
EjHB4	EVM0016435	LG03:40454690-40456201	324	36.54	4.69	2/3
EjHB5	EVM0021510	LG07:38102798-38104488	327	37.07	4.80	2/3
EjHB6	EVM0012108	LG07:38355270-38356769	281	32.07	6.05	2/3
EjHB7	EVM0019346	LG08:35330188-35331862	333	37.46	4.51	2/3
EjHB8	EVM0019681	LG08:35618390-35619865	286	32.53	6.19	2/3
EjHB9	EVM0031961	LG10:23076229-23077228	242	27.90	4.69	1/2
EjHB10	EVM0037466	LG10:36015001-36015943	233	27.00	5.79	1/2
EjHB11	EVM0041212	LG11:2228092-2231357	332	37.50	4.91	3/4
EjHB12	EVM0018875	LG11:3041533-3043439	303	34.43	6.80	2/3
EjHB13	EVM0024591	LG13:32607861-32609606	304	34.41	6.71	2/3
EjHB14	EVM0033737	LG13:35699824-35702856	332	37.34	4.96	3/4
EjHB15	EVM0017591	LG14:32656733-32658402	324	36.34	4.63	2/3
EjHB16	EVM0017694	LG15:7582830-7583956	275	31.02	5.40	2/3
EjHB17	EVM0023669	LG16:1018672-1019642	236	27.39	5.32	1/2
EjHB18	EVM0026197	LG16:12437868-12438873	243	27.76	4.90	1/2
EjHB19	EVM0024132	LG16:21367039-21368861	329	37.19	4.93	2/3
EjHB20	EVM0022100	LG17:16254559-16255822	231	27.03	7.93	2/3





枇杷中 HD-Zip I 基因的染色体定位和基因复制鉴定。基因对在具有相应颜色的连接线中显示。

Chromosomal localization and gene duplication identified of HD-Zip I genes in loquat. Duplicated gene pairs are exhibited in linked lines with the corresponding color.

> 图 1 染色体定位及同线性分析 Fig. 1 Chromosomal distribution and synteny analyses

对,其中3对串联复制基因和22对片段复制基因(图 1)。HD-Zip I重复对的核苷酸序列一致性在38.11%~ 93.71%之间,Ka/Ks比值在0.08~0.43之间(表3)。 这些结果表明,不同基因之间的差异主要是由纯化 选择驱动的。重复对的Ks值变化范围为0.13~2.30 (表3),表明基因对两两之间的进化速率不同。

表 3 枇杷 HD-Zip I 家族中鉴定的基因对 Table 3 HD-Zip I duplicates identified in loguat

重复对 Duplicate pair	一致性 Identity/%	非同义 替代率 Ka	同义替 换率 Ks	非同义替代 率/同义替换率 Ka/Ks
EjHB1/EjHB16	87.64	0.05	0.22	0.24
EjHB2/EjHB19	88.18	0.05	0.35	0.15
EjHB4/EjHB5	49.40	0.34	2.02	0.17
EjHB4/EjHB7	50.15	0.34	2.16	0.16
EjHB4/EjHB15	90.43	0.05	0.16	0.32
EjHB5/EjHB7	87.69	0.05	0.25	0.19
EjHB5/EjHB15	50.60	0.33	1.98	0.17
EjHB6/EjHB8	93.71	0.02	0.23	0.08
EjHB6/EjHB12	53.70	0.25	2.18	0.12
EjHB6/EjHB13	53.99	0.25	1.91	0.13
EjHB7/EjHB15	51.03	0.33	2.22	0.15
EjHB8/EjHB12	53.33	0.26	2.25	0.11
EjHB8/EjHB13	51.58	0.25	2.02	0.13
EjHB9/EjHB10	38.11	0.47	2.30	0.20
EjHB9/EjHB17	38.27	0.46	1.47	0.31
EjHB9/EjHB18	87.24	0.06	0.13	0.43
EjHB10/EjHB17	86.44	0.06	0.26	0.22
EjHB10/EjHB18	40.65	0.46	2.26	0.20
EjHB11/EjHB14	89.55	0.04	0.19	0.24
EjHB12/EjHB13	93.11	0.03	0.20	0.13
<i>EjHB17/EjHB18</i>	42.04	0.46	2.17	0.21

为了进一步研究不同植物物种中HD-Zip I家族 成员之间的系统发育关系,对枇杷、苹果、拟南芥和 水稻中的HD-Zip I蛋白序列构建了系统发育树(图 2)。HD-Zip I蛋白被分为9个分支,分别是α,β1,β 2,γ,δ,ε,φ1,φ2和ζ,其中φ1分支和ζ分支分别只含 有拟南芥和水稻的家族成员,与苹果、枇杷的HD-Zip I基因不聚在一起。枇杷HD-Zip I各分支成员 与苹果的同系物聚集更近,与水稻的同系物相距较 远。另外,枇杷、苹果、拟南芥和水稻在α分支的成 员最多,其次是γ分支。

2.3 枇杷HD-Zip I蛋白的多重序列比对、基因结构和 Motif 分析

如图3所示,使用DNAMAN软件对枇杷20个

HD-Zip I蛋白进行多重序列比对,发现所有的HD-Zip I 蛋白都具有HD和Zip 保守结构域。为了进一 步研究枇杷HD-Zip I蛋白之间的关系,构建了所有 枇杷HD-Zip I蛋白序列的系统发育树,并分析了他 们的基因结构和Motif(图4)。与上述系统发育分析 的结果相似,枇杷HD-Zip I基因家族被分为7个分 支: α , β 1, β 2, γ , δ , ε 和 φ 2(图4-A)。由于基因的内含 子-外显子结构在多基因家族的进化中起至关重要 的作用^[22],笔者研究了20个枇杷HD-Zip I基因的内 含子-外显子结构,以更好地了解其结构进化。y分 支成员有1个内含子,β1分支成员有3个内含子,其 他分支成员含有2个内含子(图4-B)。结合系统进 化分析,笔者发现同一分支的基因具有相似的内含 子-外显子结构,而不同分支的内含子-外显子结构 存在差异。这一结果表明,基因结构是枇杷HD-Zip I 家族基因进化的重要组成部分。

为了深入了解枇杷 HD-Zip I 蛋白的差异和功能,笔者对其 Motif 进行了鉴定。笔者鉴定了10个 Motif,宽度从20到50个残基不等(表4)。所有预测的 Motif 在每个 HD-Zip I 蛋白中仅识别一次(图4-C)。除 Motif 1 在所有 HD-Zip I 蛋白中都存在外,其余9个 Motif 只存在于特定的分支中。例如,Motif 4 只存在于 α 分支中,Motif 10 只存在于 β 1 分支中。这与枇杷 HD-Zip I 蛋白的系统发育一致,表明来自同一分支的 HD-Zip I 具有相似的氨基酸序列和相似的 Motif,暗示他们也具有相似的功能。

2.4 枇杷 HD-Zip I家族成员在不同组织中的表达

为了研究HD-Zip I家族成员在枇杷不同组织中的表达模式,对HD-Zip I 在枇杷根、茎、叶、花和果实中的表达进行分析。结果表明,EjHB3、EjHB6、 EjHB8、EjHB15和EjHB20主要在叶中表达,EjHB9、 EjHB16和EjHB18主要在根中表达。多数成员在茎中具有较高的表达水平,在果实中具有较低的表达水平,在果实中具有较低的表达水平。此外,EjHB10、EjHB11、EjHB12、EjHB13、 EjHB14和EjHB17在花中的表达量高于其他组织, 而其他成员在花中的表达量也普遍较低(图5)。

2.5 枇杷 HD-Zip I 家族成员启动子分析和在干旱 处理下的表达分析

启动子顺式调控元件对调控基因表达具有重要 意义。通过 PlantCARE 数据库(图 6)鉴定了 HD-Zip I 启动子中推定的顺式元件(从假定翻译起始位 点上游<2 kb),并鉴定了与胁迫和激素反应相关的



图 2 枇杷、苹果、拟南芥和水稻中 HD-Zip I 蛋白系统发育分析 Fig. 2 Phylogenetic analysis of HD-Zip I protein in loquat, apple, *Arabidopsis* and rice



绿色框和红色框分别代表 HD 结构域和 Zip 结构域的特征序列。 HD domain and Zip domain are indicated by green box and red box, respectively.

图 3 HD-Zip I 蛋白序列比对 Fig. 3 Multiple sequence alignment of the HD-Zip I protein



A. 使用 MEGA10 软件构建枇杷 HD-Zip I 成员的系统发育树。B. HD-Zip I 基因的结构。C. 通过 MEME 分析枇杷 HD-Zip I 蛋白序列的 10 个 Motif。

A. Phylogenetic analysis of loquat HD-Zip I members. B. The structure of the HD-Zip I genes. C. Analysis with MEME to investigate 10 conserved motifs of loquat HD-Zip I protein.

图 4 HD-Zip I 成员的系统发育树、基因结构和蛋白保守序列元件

Fig. 4 Phylogenetic tree, gene structure and protein motif analysis of HD-Zip I members

		r r
保守基序 Motif	宽度 Width	氨基酸序列 The amino acid sequences
1	50	LEKSFEVENKLEPERKVQLAKELGLQPRQVAIWFQNRRARWKTKQLERDY
2	41	DVLKANYDALKABYDSLQKENQKLKAZVQKLKDKLGSEEEG
3	20	DEGEQVPEKKRRLTAEQVKA
4	25	DLQCQKIDQMIKDEGLCNMFNGIDD
5	29	LVKVEEQSFFSTDEACNFFSDEQAPSLHW
6	32	VSKVAAVVSKQEDASSGKSDIFDSDSPHYTDG
7	41	MMAFPPCHSFMFQNHEDPDLHLANSSCPPQHFNGGGMPFMM
8	28	SDALESLFLNNPSSSFLGSRSMVSFEDV
9	21	FFPTNFHLQYPHDHDDHQPPT
10	29	SDRHENNDDLGLEISRTPATDSPPPSNNH

表 4 HD-Zip I 蛋白保守基序及其氨基酸序列 Table 4 Conserved motifs and amino acid sequences in HD-Zip I proteins

顺式作用元件。大多数HD-ZipI启动子含有ABRE 元件,该元件通常参与ABA相关的反应。启动子中 还含有干旱诱导元件(MBS)、防御和胁迫响应元件 (TC-rich repeats)。此外,还有许多顺式元件与胁迫 和胁迫相关激素信号的响应有关,如MYB、MYC、 SA、MeJA。MBS和ABRE等干旱响应相关顺式元 件的存在,表明HD-ZipI可能在枇杷干旱胁迫响应 中发挥重要作用。

HD-Zip I家族包含与干旱胁迫相关的顺式作用 元件。为了鉴定HD-Zip I在枇杷抗旱性调控中发挥 的作用,笔者分析了干旱胁迫下20个HD-Zip I基因 的表达情况(图7)。研究表明,干旱处理后,γ分支 的 *EjHB9、EjHB10、EjHB17、EjHB18* 和 ε 分支的 *EjHB20*的表达水平大幅度升高,β2分支的*EjHB2*和



图 5 枇杷 HD-Zip I基因在不同组织中的表达分析 Fig. 5 Expression analysis of different tissues of HD-Zip I genes in loquat



图 6 枇杷 HD-Zip I基因启动子的顺式作用元件预测 Fig. 6 Prediction of *cis*-acting elements of HD-Zip I genes promoter in loquat



图 7 枇杷 HD-Zip I 基因对干旱胁迫响应的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of drought stress response of HD-Zip I genes in loquat

EjHB19受干旱影响显著下调。

3 讨 论

HD-Zip I家族的鉴定和全基因组分析已经在各种物种中进行,并且HD-Zip I基因的数量在物种间差异显著。在番茄^[23]、梨^[24]、葡萄^[25]、毛竹^[26]、木薯^[27]、水稻^[28]和小麦^[29]中分别鉴定出22、18、11、17、23、14和20个HD-Zip I基因。笔者在本研究中对枇杷中的HD-Zip I基因进行了全基因组普查,共鉴定出20个HD-Zip I家族基因,包括7个分支。与拟南芥等其他植物相比,HD-Zip I家族成员在枇杷中较为丰富。

串联复制和片段复制是基因家族扩张的主要机制。基因复制事件在不同物种中产生了许多旁系同源基因对,因此在基因家族的快速扩张和进化中发挥了重要作用^[30]。本研究结果表明,片段重复是枇杷HD-Zip I家族扩张的主要方式。此外,22对HD-Zip I重复对的Ka/Ks比值表明,枇杷HD-Zip I基因家族在进化过程中主要经历了纯化选择。

研究表明,拟南芥中的*HD-Zip I*基因被划分为 8个分支(α , β I, β 2, γ , δ , ε , φ I 和 φ 2)^[28],在水稻、玉 米、大豆和小麦中还含有 ζ 分支^[28-29]。在本研究中, 系统发育分析表明,枇杷的20个HD-Zip I蛋白被分 为7个分支,不含有 φ I 和 ζ 分支,表明枇杷在进化过 程中失去了这两个分支的成员。相同的分支拥有相 似的内含子-外显子组织结构。结合系统发育树,内 含子-外显子结构分析使笔者能够进一步区分属于 不同分支的基因。但保守基序分析发现, β 2和 φ 2分 支中的成员的保守基序存在一定差异。

植物通过诱导胁迫相关基因表达来适应环境胁 迫,如干旱,许多 HD-Zip I家族基因的表达已被证明 受干旱胁迫调控,并在干旱胁迫响应中扮演重要的 角色^[31]。笔者对枇杷 HD-Zip I家族基因的启动子顺 式作用元件的分析发现,枇杷 HD-Zip I基因的启动 子中含有多个与干旱胁迫相关的顺式作用元件,因 此笔者研究了枇杷 HD-Zip I基因在干旱胁迫响应中 的表达模式。结果表明,大多数枇杷 HD-Zip I基因 响应干旱胁迫,且γ分支成员在干旱胁迫下被强烈 诱导,这一结果与拟南芥、小麦、桑树和苹果中该家 族基因的研究结果相同^[32-34]。研究发现,HD-Zip I转 录因子γ分支成员 AtHB12 受干旱胁迫诱导表达^[32], 且 AtHB12 过表达增强了转基因拟南芥对干旱胁迫 的耐受性^[35]。HD-Zip I转录因子γ分支成员*MdHB-7* 和*MdHB7-like* 通过调节苹果的气孔密度提高了转 基因苹果植株对干旱的适应性和水分利用效 率^[36-37]。这表明该分支的成员可能在干旱胁迫响应 中发挥重要作用。

4 结 论

首次从枇杷全基因组中鉴定了HD-Zip I转录因 子,启动子预测分析表明HD-Zip I转录因子响应干 旱胁迫。对HD-Zip I家族基因在干旱处理后的表达 进行了分析,结果表明,EjHB9、EjHB10、EjHB17、 EjHB18和EjHB20在干旱胁迫下表达量均显著上 调,因此推测这些基因可能在干旱胁迫响应中发挥 重要作用。

参考文献 References:

- [1] QIN T, TIAN Q Z, WANG G F, XIONG L M. LOWER TEM-PERATURE 1 enhances ABA responses and plant drought tolerance by modulating the stability and localization of C2-domain ABA-related proteins in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant, 2019, 12(9):1243-1258.
- [2] CENTURY K, REUBER T L, RATCLIFFE O J. Regulating the regulators: The future prospects for transcription- factor- based agricultural biotechnology products[J]. Plant Physiology, 2008, 147(1):20-29.
- [3] MAO H D, LI S M, WANG Z X, CHENG X X, LI F F, MEI F M, CHEN N, KANG Z S. Regulatory changes in TaSNAC8-6A are associated with drought tolerance in wheat seedlings[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(4): 1078-1092.
- [4] SCHENA M, DAVIS R W. HD-Zip proteins: Members of an Arabidopsis homeodomain protein superfamily[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(9): 3894-3898.
- [5] ARIEL F D, MANAVELLA P A, DEZAR C A, CHAN R L. The true story of the HD-Zip family[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(9):419-426.
- [6] GONG S H, DING Y F, HU S S, DING L H, CHEN Z X, ZHU
 C. The role of HD-Zip class I transcription factors in plant response to abiotic stresses[J]. Physiologia Plantarum, 2019, 167 (4):516-525.
- [7] 郝陆洋,张晓静,高晨曦,张登峰,李永祥,李春辉,宋燕春,石 云素,王天宇,刘旭洋,黎裕.玉米 HD-Zip 转录因子基因 Zmhdz6 的克隆与功能分析[J]. 植物遗传资源学报,2022,23(3): 823-831.

HAO Luyang, ZHANG Xiaojing, GAO Chenxi, ZHANG Dengfeng, LI Yongxiang, LI Chunhui, SONG Yanchun, SHI Yunsu, WANG Tianyu, LIU Xuyang, LI Yu. Cloning and functional analysis of HD-Zip transcription factor gene *Zmhdz6* in maize[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(3):823-831.

[8] 胡景涛,李彦杰,段艳艳,阮宇,顾欣,肖国生.桑树 HD-Zip I亚 家族基因的鉴定及表达分析[J].林业科学研究,2022,35(4): 130-142.

HU Jingtao, LI Yanjie, DUAN Yanyan, RUAN Yu, GU Xin, XIAO Guosheng. Identification and expression analysis of the *HD- Zip I* subfamily genes in mulberry[J]. Forest Research, 2022,35(4):130-142.

- [9] MISHRA K B, IANNACONE R, PETROZZA A, MISHRA A, ARMENTANO N, LA VECCHIA G, TRTÍLEK M, CELLINI F, NEDBAL L. Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission[J]. Plant Science, 2012, 182: 79-86.
- [10] ZHAO Y, MA Q, JIN X L, PENG X J, LIU J Y, DENG L, YAN H W, SHENG L, JIANG H Y, CHENG B J. A novel maize homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) I gene, *Zmhdz*10, positively regulates drought and salt tolerance in both rice and *Arabidopsis*[J]. Plant & Cell Physiology, 2014, 55(6): 1142-1156.
- [11] WU J D, ZHOU W, GONG X F, CHENG B J. Expression of ZmHDZ4, a maize homeodomain-leucine zipper I gene, confers tolerance to drought stress in transgenic rice[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(4):845-853.
- [12] JIAO P, JIANG Z Z, MIAO M, WEI X T, WANG C L, LIU S Y, GUAN S Y, MA Y Y. *Zmhdz*9, an HD-Zip transcription factor, promotes drought stress resistance in maize by modulating ABA and lignin accumulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 258:128849.
- [13] 赵双,尤伟忠,黄颖宏,郄红丽.基于主成分分析综合评价 23 个白沙枇杷品种果实品质[J].中国南方果树,2023,52(6):114-118.

ZHAO Shuang, YOU Weizhong, HUANG Yinghong, QIE Hongli. Comprehensive evaluation of fruit quality of 23 white flesh loquats based on principal component analysis[J]. South China Fruits, 2023, 52(6): 114-118.

 [14] 罗华建,刘星辉.干旱对枇杷生长的影响[J].中国南方果树, 2004,33(3):26-27.
 LUO Huajian, LIU Xinghui. The impact of drought on loquat

growth[J]. South China Fruits,2004,33(3):26-27.

 [15] 王剑毛,郭亚端,刘进平,王一迪,张燕.干旱胁迫对"早钟6
 号"枇杷幼苗生长及生理特性的影响[J].中国南方果树, 2018,47(6):34-38.

WANG Jianmao, GUO Yaduan, LIU Jinping, WANG Yidi, ZHANG Yan. The effects of drought stress on the growth and physiological characteristics of "Zaozhong 6" loquat seedlings[J]. South China Fruits, 2018, 47(6): 34-38.

[16] WANG D, CHEN Q Y, CHEN W W, GUO Q G, XIA Y, WANG S M, JING D L, LIANG G L. Physiological and transcription analyses reveal the regulatory mechanism of melatonin in inducing drought resistance in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) seedlings[J]. Environmental and Experimental Botany, 2021, 181:104291.

- [17] JIANG S, AN H S, XU F J, ZHANG X Y. Chromosome-level genome assembly and annotation of the loquat (*Eriobotrya japonica*) genome[J]. GigaScience, 2020, 9(3): giaa015.
- [18] WANG Y P, TANG H B, DEBARRY J D, TAN X, LI J P, WANG X Y, LEE T H, JIN H Z, MARLER B, GUO H, KISS-INGER J C, PATERSON A H. MCScanX: A toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e49.
- [19] ZHAO S, GAO H B, LUO J W, WANG H B, DONG Q L, WANG Y P, YANG K Y, MAO K, MA F W. Genome-wide analysis of the light-harvesting chlorophyll a/b-binding gene family in apple (*Malus domestica*) and functional characterization of MdLhcb4.3, which confers tolerance to drought and osmotic stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 154: 517-529.
- [20] 李晓颖,徐红霞,陈俊伟. 枇杷 WRKY 转录因子鉴定与表达 分析[J]. 园艺学报,2019,46(5):939-954.
 LI Xiaoying, XU Hongxia, CHEN Junwei. Identification and expression analysis of WRKY transcription factors in *Eriobotrya japonica*[J]. Acta Horticulturae Sinica,2019,46(5):939-954.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [22] XU G X, GUO C C, SHAN H Y, KONG H Z. 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.
- [23] ZHANG Z Z, CHEN X L, GUAN X, LIU Y, CHEN H Y, WANG T T, MOUEKOUBA L D O, LI J F, WANG A X. A genome- wide survey of homeodomain-leucine zipper genes and analysis of cold-responsive HD-Zip I members' expression in tomato[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 78 (8):1337-1349.
- [24] WANG H, LIN J, LI X G, CHANG Y H. Genome-wide identification of pear *HD-Zip* gene family and expression patterns under stress induced by drought, salinity, and pathogen[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(9): 189.
- [25] JIANG H Y, JIN J, LIU H, DONG Q, YAN H W, GAN D F, ZHANG W, ZHU S W. Genome-wide analysis of *HD-Zip* genes in grape (*Vitis vinifera*)[J]. Tree Genetics & Genomes, 2014, 11 (1):827.
- [26] CHEN D M, CHEN Z, WU M, WANG Y, WANG Y J, YAN H W, XIANG Y. Genome-wide identification and expression analysis of the *HD-zip* gene family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2017, 36(2): 323-337.
- [27] DING Z H, FU L L, YAN Y, TIE W W, XIA Z Q, WANG W Q, PENG M, HU W, ZHANG J M. Genome-wide characterization

and expression profiling of HD-Zip gene family related to abiotic stress in cassava[J]. PLoS One,2017,12(3):e0173043.

- [28] AGALOU A, PURWANTOMO S, OVERNÄS E, JOHANNES-SON H, ZHU X Y, ESTIATI A, DE KAM R J, ENGSTRÖM P, SLAMET-LOEDIN I H, ZHU Z, WANG M, XIONG L Z, MEI-JER A H, OUWERKERK P B F. 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.
- [29] YUE H, SHU D T, WANG M, XING G W, ZHAN H S, DU X H, SONG W N, NIE X J. Genome-wide identification and expression analysis of the *HD-Zip* gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Genes, 2018, 9(2): 70.
- [30] CANNON S B, MITRA A, BAUMGARTEN A, YOUNG N D, MAY G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology, 2004, 4:10.
- [31] 关淑艳,魏小童,焦鹏,蒋振忠,曲静,刘思言,马义勇.HD-Zip I转录因子在植物非生物胁迫中的研究进展[J].吉林农业大学 学报,2022,44(2):127-134.

GUAN Shuyan, WEI Xiaotong, JIAO Peng, JIANG Zhenzhong, QU Jing, LIU Siyan, MA Yiyong. HD-Zip I transcription factors in plant abiotic stress[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2022,44(2):127-134.

[32] RÉ D A, CAPELLA M, BONAVENTURE G, CHAN R L. Arabidopsis AtHB7 and AtHB12 evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress[J]. BMC Plant Biology,2014,14:150.

- [33] HARRIS J C, SORNARAJ P, TAYLOR M, BAZANOVA N, BAUMANN U, LOVELL B, LANGRIDGE P, LOPATO S, HR-MOVA M. Molecular interactions of the γ-clade homeodomainleucine zipper class I transcription factors during the wheat response to water deficit[J]. Plant Molecular Biology, 2016, 90(4/ 5):435-452.
- [34] ZHAO S, GAO H B, JIA X M, WANG H B, KE M, MA F W. The HD-Zip I transcription factor MdHB-7 regulates drought tolerance in transgenic apple (*Malus domestica*)[J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 180:104246.
- [35] ROMANI F, RIBONE P A, CAPELLA M, MIGUEL V N, CHAN R L. A matter of quantity: Common features in the drought response of transgenic plants overexpressing HD-Zip I transcription factors[J]. Plant Science, 2016, 251:139-154.
- [36] ZHAO S, GAO H B, JIA X M, WEI J T, MAO K, MA F W. Md-HB-7 regulates water use efficiency in transgenic apple (Malus domestica) under long-term moderate water deficit[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12:740492.
- [37] ZHAO S, GAO H B, JIA X M, ZHOU K, WANG H B, MAO K, MA F W. MdHB7-like confers drought tolerance and improves water-use efficiency through modulating stomatal density in apple (*Malus domestica*) [J]. Scientia Horticulturae, 2022, 294: 110758.