

盐胁迫下的 3 代白木香离体根的转录因子表达分析

方泽衡, 李文月, 马新业*, 詹若挺

广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室, 国家中成药工程技术研究中心 南药研发实验室, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 研究 3 代白木香 *Aquilaria sinensis* 离体根在盐胁迫条件下的转录因子表达模式差异, 对响应盐胁迫的各代转录因子家族差异基因的变化规律进行分析。 **方法** 以组织培养的白木香离体根为材料, 采用 Illumina Hiseq4000 双端 PE150 测序方法, 将所有白木香 Unigene 序列与植物转录因子数据库 (PlantTFDB) 进行比对, 对盐胁迫组与对照组间的 3 代差异转录因子进行重点分析。 **结果** 3 代白木香离体根转录组测序片段经 *de novo* 拼接共获得 48 286 条 Unigene 序列, 含有 1 156 个潜在的白木香转录因子, 分布于 54 个转录因子家族。其中 bHLH、ERF、NAC 家族是富集最多的 3 个家族。在第 1、2、3 代盐胁迫白木香根中分别筛选出 290、277、349 个差异表达转录因子, NAC、MYB 以及 WRKY 家族上调表达的差异表达基因 (DEG) 数量随胁迫代数增加而增多, 而 GRAS 家族上调表达的 DEG 数量随胁迫代数增加而减少。3 代共有的差异转录因子有 70 个, 其中 8 个基因的下调表达倍数随胁迫代数增加而递增。 **结论** 盐胁迫对白木香转录因子表达影响主要以下调为主。盐胁迫组与对照组的差异转录因子数量随着盐胁迫代数增加而增加。不同转录因子家族基因受盐胁迫诱导表达情况不同, 一些基因可能参与了胁迫记忆的传递。该研究有助于在整体水平加深了解白木香转录因子表达特性, 为进一步研究白木香胁迫记忆及白木香盐胁迫响应分子机制提供参考。

关键词: 盐胁迫; 白木香; 转录因子; 离体根; 转录组

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)10-2442-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.027

Differential expression of transcription factors in three generations of excised roots of *Aquilaria sinensis* under salt stress

FANG Ze-heng, LI Wen-yue, MA Xin-ye, ZHAN Ruo-ting

Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan of Ministry of Education, Joint Laboratory of National Engineering Research Center for Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicines, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To study the expression patterns and levels of transcription factors (TFs) in three generations of excised roots of *Aquilaria sinensis* under salt stress, and analyze the variation of TFs family genes in each generation in response to salt stress. **Methods** The excised roots of *A. sinensis* were used as experimental material, using highthroughput sequencing technology (Illumina Hiseq4000), all the unigene sequences were compared with the plant transcription factor database (PlantTFDB), and the three generation differential expressed TFs between the treated and the control group were analyzed. **Results** A total of 48 286 Unigenes were obtained by *de novo* splicing from three generation of excised roots of *A. sinensis*, containing 1 156 potential TFs distributed in 54 TF families. Among them, bHLH, ERF, and NAC were the three most enriched families. Totally, 290, 277, and 349 differentially expressed TFs were respectively screened in three successive generations, which were mainly down-regulated. The expression induced by salt stress were different in each TF family, the numbers of up-regulated DEGs increased in NAC, MYB, and WRKY families, and decreased in GRAS family with the increase of stressed generations. There were 70 common TFs differentially expressed in three generations, and the down-regulated expression multiples of eight genes increased with the increase of salt stress generations. **Conclusion** The effect of salt stress on the expression of TFs was mainly down-regulated. The number of differential expressed TFs in the treated and control group increased with the increase of salt stress generations. The expression of different TF family genes was different under salt stress, and some genes might be involved in the transmission

收稿日期: 2018-12-03

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81102764); 广东省教育厅重点提升平台建设项目—岭南中药资源教育部重点实验室 (2014KTSPT016)

作者简介: 方泽衡 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为芳香药用植物资源学。Tel: 13533786814 E-mail: 838499189@qq.com

*通信作者 马新业 (1976—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事中药资源学研究工作。Tel: 15817036306 E-mail: usermxy@163.com

of stressful memory. This study is helpful to understand the expression characteristics of TFs at the whole level and provide a reference for further study on the stressful memories and the molecular mechanism of the salt stress response.

Key words: salt stress; *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg; transcription factors; excised roots; transcriptome

植物由于固着于地面的生长模式,在生命过程中不可避免地会遭受各种各样的胁迫。一些植物在胁迫下所受刺激产生的响应能够跨代遗传,对子代产生影响,这种特性被称为植物的“胁迫记忆(stressful memories)”^[1]。植物当代受到的胁迫能够影响自身后续生长以及子代对胁迫的反应,具有胁迫记忆的植物当再次遭受相同胁迫时,可快速、积极地响应胁迫,提高对胁迫的抗耐性^[2]。由于地质因素及植物固着的生长模式,植物生活环境中土壤成分造成的盐胁迫往往是长期的,几乎不随时间而变化,研究多代盐胁迫对植物生长胁迫记忆的影响具有重要意义。植物的胁迫记忆现象在植物胁迫机制研究、抗逆性改造、新品种培育以及植物药效成分诱导等方面均有很大的研究价值,连续多代胁迫是研究胁迫记忆的重要途径之一。

转录因子(transcription factors, TFs)也称为反式作用因子,是一类能够与真核基因启动子区域 DNA 相互作用,从而激活或抑制下游被调控基因转录的 DNA 结合蛋白^[3],在调控植物生长发育和胁迫应答中起重要作用。近年来,相继从高等植物分离出一系列调控逆境胁迫等相关基因表达的 TFs, DREB/ERF、MYB、NAC、bZIP 和 WRKY 等 TFs 家族在植物逆境基因调控与提高植物对非生物和生物胁迫耐受性方面作用的研究多有进展^[4-6]。徐鹏等^[7]提出 TFs 的丰度可作为胁迫记忆中表观遗传信息跨代传递的载体。Conrath 等^[8]认为植物在遭受胁迫后可能会积累 TFs,从而促进防御基因的转录。

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 为瑞香科(Thymelaeaceae)沉香属 *Aquilaria* L. 常绿乔木,其含树脂心材为传统名贵中药沉香。白木香树体只有在受到损伤、虫咬或腐朽等伤害后才能结香,对白木香进行一定胁迫处理可诱导结香成分^[9],因此有研究者认为白木香结香与胁迫防御反应相关^[10]。20 世纪 70 年代以来,由于沉香被大量采集,白木香野生林遭到严重破坏,资源紧缺。为缓解沉香资源紧张问题,有关沉香主要化学成分^[11-12]、白木香人工结香技术^[13]、白木香组织培养技术^[14]等研究相继开展。在本课题组前期研究建立了一个稳定、高效的白木香离体根液体培养体系^[15],以组织培养的白木香离体根为材料,建立盐胁迫记忆体系^[16-17],探

究白木香盐胁迫下的标志性物质,具有繁殖继代快速、生长环境影响因素单一可控等优点。本实验通过对白木香离体根进行多代盐胁迫处理,利用转录组测序分析转录因子家族表达情况,研究白木香 TFs 表达在连续 3 代盐胁迫中的变化规律。

1 材料

白木香种子采摘自广东省化州市维国沉香种植开发专业合作社,经广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心詹若挺教授鉴定为白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 种子。

2 方法

2.1 白木香离体根培养

以白木香种子经无菌萌发成苗后、采其苗根组织培养而成的均匀离体根^[18]为研究对象。

2.2 3 代盐胁迫处理

将离体根于 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、110 r/min 条件下震荡暗培养,得到生长状态大致均匀的白木香离体侧根,记做第 1 代,添加含 150 mmol/L NaCl 的盐胁迫培养基处理 3 d,记为 N1,空白处理的对照组记为 CK1。每组设置 8 瓶重复,每瓶接种 (25 ± 5) 条根段。每代胁迫处理后随机选取 5 瓶取样(取样时先将离体根置于无菌水中洗去杂质,剪去主根,仅保留侧根,无菌吸水纸吸干水分,迅速置于液氮中保持 2 min,随即置于 -80°C 冰箱保存),剩余 N1、CK1 分别继代培养获得第 2、3 代,相同处理方法获得 N2、CK2 及 N3、CK3^[17]。

2.3 RNA 提取和转录组测序

总 RNA 使用 EASYspin Plus 植物快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)提取。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 完整性,用微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度。测序部分委托广州基迪奥生物科技有限公司完成,样品检验合格后,进行文库构建。

2.4 数据组装和功能注释

利用 Trinity 软件对 clean reads 做 *de novo* 组装,得到 Unigene。将拼接得到的 Unigene 与 Nr 蛋白数据库、Swiss-prot 蛋白数据库、KEGG 数据库和 COG 公共数据库进行 BLASTx (E 值 $< 1 \times 10^{-5}$) 比对分析,得到与数据库相一致的 Unigene 的基因方向和编码区序列。将获得的 Unigene 在核酸数据库 Nt

中做本地 BLASTTn (E 值 $<1 \times 10^{-5}$), 获得的同源性最高的蛋白, 即为该 Unigene 的蛋白功能注释结果。

2.5 差异表达基因筛选

Unigene 的表达丰度采用 RPKM (reads per kb million reads) 表示, 计算公式如下:

$$RPKM = (C \times 10^6) / (N \times L \times 0.001)$$

RPKM 为 Unigene 标准化后的表达量, C 为比对的 Unigene 的 reads 数, N 为比对到所有 Unigene 的总 reads 数, L 为 Unigene 的碱基数

以 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 为条件, 筛选出经盐胁迫处理后的白木香离体根和对照组的差异表达基因, 将每一代各对照组与处理组分为一组进行比较, 得到以下 3 个比对方案: 第 1 代对照组和胁迫组 (CK1-VS-N1)、第 2 代对照组和胁迫组 (CK2-VS-N2)、第 3 代对照组和胁迫组 (CK3-VS-N3) 的差异表达基因。

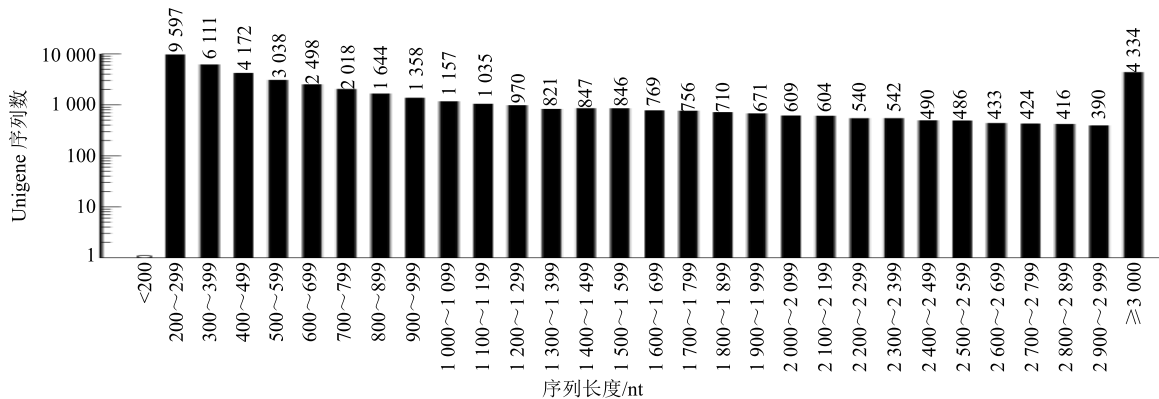


图 1 Unigene 序列长度分布

Fig. 1 Length distribution of Unigene sequences

3.2 差异表达基因分析

以 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 为条件筛选差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG), 在 CK1-VS-N1, CK2-VS-N2, CK3-VS-N3 中分别筛选出 11 422、10 815、11 799 条差异基因。通过分析基因变化趋势发现, 连续 3 代的胁迫组与对照组的差异基因中, 上调基因数持续减少, 而下调的基因数量持续增加 (表 1), 可以看出多代盐胁迫对白木香离体根基因表达趋势的总体影响以下调为主。

3.3 白木香转录组数据库中转录因子家族分类

将所有白木香 Unigene 序列与植物转录因子数据库 (PlantTFDB) 进行比对, 得到 54 个潜在的白木香 TFs 家族共 1 156 个基因 (图 2)。其中, 预测

2.6 转录因子的鉴定分析

将所有白木香 Unigene 序列与植物转录因子数据库 (PlantTFDB) 进行比对, 鉴定白木香中潜在的转录因子, 分析比较 3 个比对方案中 (CK1-VS-N1、CK2-VS-N2、CK3-VS-N3) 的差异表达转录因子及其代间变化规律。

3 结果与分析

3.1 转录组测序与组装

对白木香 3 代盐胁迫组 (N1、N2、N3) 和对照组 (CK1、CK2、CK3) 离体根转录组测序后, 使用 Trinity 软件对无参转录组数据进行拼接, 用过滤后的 clean reads 进行 *de novo* assembly 组装, 共得到 48 286 条 Unigene, 最长 Unigene 为 16 622, 最短 Unigene 为 201。所有 Unigene 序列的 N_{50} 值为 2 165, 表明转录组组装完整性较高。所获得的 Unigene 序列数量随着测序长度的增加呈逐渐减少的趋势 (图 1), 表明测序样品具有较好的测序质量。

表 1 盐胁迫下 3 代白木香根的差异基因数量

Table 1 Statistics of differentially expressed genes of three generations of excised roots of *A. sinensis* under salt stress

代数组别	上调 DEG/条	下调 DEG/条	总 DEG/条
CK1-VS-N1	7 118	4 304	11 422
CK2-VS-N2	6 298	4 517	10 815
CK3-VS-N3	5 255	6 544	11 799

得到的 TFs 基因数目最多的 10 个家族分别为 bHLH、ERF、NAC、MYB、C2H2、WRKY、MYB_related、bZIP、GRAS 和 B3 家族。对照组 CK1、CK2、CK3 分别注释到 1 106、1 115、1 112 个 TFs, 盐胁迫处理组 N1、N2、N3 分别注释到 1 089、1 115、1 114 个 TFs。

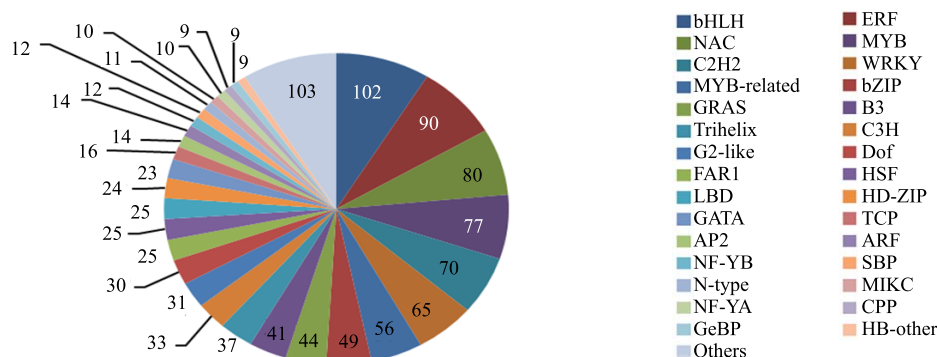


图 2 转录因子在白木香转录组中的家族分布

Fig. 2 Family distribution of TFs in *A. sinensis* transcriptome

3.4 盐胁迫下 3 代白木香根的差异表达 TFs 变化规律与比较分析

分析 3 个比对方案中 3 代根的差异表达 TFs 变化规律, 第 1 代白木香离体根经盐胁迫处理后, CK1-VS-N1 中有 33 个 TFs 家族共 290 个基因的表达表现出显著性差异, 包括 109 个上调表达, 181 个下调表达; 第 2 代离体根经盐胁迫处理后, CK2-VS-N2 中共有 41 个 TFs 家族共 277 个基因的表达表现出显著性差异, 包括 98 个上调表达, 179 个下调表达; 第 3 代离体根经盐胁迫处理后, CK3-VS-N3 中共有 44 个 TFs 家族共 349 个基因的表达表现出显著性差异, 包括 142 个上调表达, 207 个下调表达 (图 3)。CK3-VS-N3 中具有差异表达 TFs 的家族数目最多, 差异表达 TFs 数目同样显著高于 CK1-VS-N1 和 CK2-VS-N2, 可以看出连续 3 代盐胁迫处理使差异表达 TFs 数量增多。3 代白木香的胁迫组与对照组间差异表达 TFs 的上调表达基因数均少于下调表达的基因数量, 表明盐胁迫对白木香 TFs 表达趋势的影响同样以下调为主。

3.5 前 10 个转录因子家族的 3 代 DEG 表达模式分析

选取富集 TFs 数量最多的 10 个家族分析其 3 代差异表达情况, 发现 3 代盐胁迫诱导下的 10 个

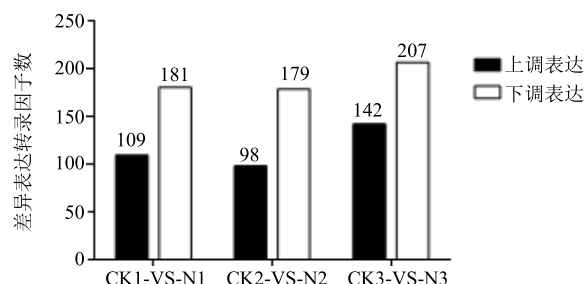


图 3 3 个比较方案中差异表达的上、下调转录因子数目

Fig. 3 Numbers of up- and down-regulated transcription factors differentially expressed in three compared schemes

白木香 TFs 家族的 DEG 表达模式各不相同 (图 4)。在富集 TFs 数量最多的 bHLH 家族中, 3 代间的差异表达 TFs 数量和差异表达模式无显著差异; NAC、MYB 以及 WRKY 3 个家族上调表达的 DEG 数量随胁迫代数增加而增多, 而 GRAS 家族上调表达的 DEG 数量随胁迫代数增加而减少; B3 及 MYB_related 家族下调表达的 DEG 数量随胁迫代数增加而增多, C2H2 家族下调表达的 DEG 数量随胁迫代数增加而减少。从不同表达模式的基因数量看, 各 TFs 家族均以下调表达为主。

3.6 3 代白木香根的转录因子差异表达基因比较分析

在 CK1-VS-N1 中, 受盐胁迫诱导表达的 290

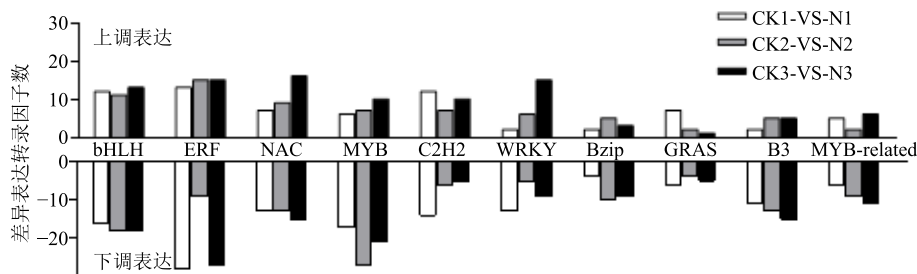


图 4 盐胁迫下前 10 个转录因子家族差异表达的上、下调转录因子数目

Fig. 4 Numbers of up- and down-regulated transcription factors differentially expressed in top 10 TFs families under salt stress

个差异表达 TFs, 有 194 个在后代 (CK2-VS-N2, CK3-VS-N3) 中仍保持差异表达, 而只在第 1 代中差异表达的 TFs 有 96 个 (图 5), 隶属于 29 个家族, 富集数目最多的前 5 个家族分别为 C2H2、ERF、GRAS、bHLH 和 NAC (13、9、9、8、7); CK2-VS-N2 中, 受盐胁迫诱导表达的 277 个差异表达 TFs, 有 194 个在其他代中同样保持差异表达, 只在第 2 代中差异表达的 TFs 有 83 个, 隶属于 27 个家族, 富集数目最多的前 5 个家族为 MYB, bHLH, bZIP, NAC 和 ERF (12、8、6、6、5); CK3-VS-N3 中, 受盐胁迫诱导表达的 349 个差异表达 TFs 中, 有 216 个在其他代中同样保持差异表达, 只在第 3 代中差异表达的 TFs 有 133 个, 隶属于 34 个家族, 富集数目最多的前 5 个家族为 bHLH、WRKY、NAC、MYB 和 ERF (14、13、12、10、8)。NAC 和 ERF 家族在各代中被特异诱导表达的基因数目均较多, WRKY 家族被特异诱导表达的基因数目在前 2 代较低, 在第 3 代激增 (4、2、13)。

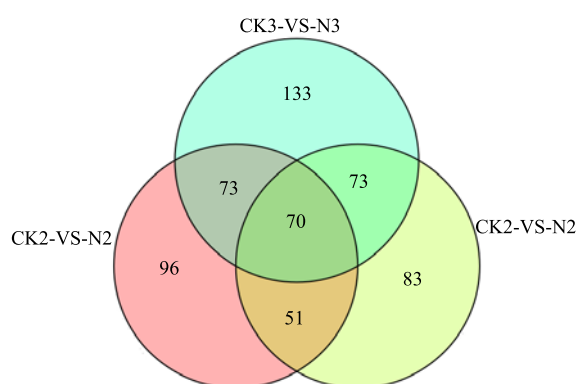


图 5 3 代差异表达转录因子韦恩图

Fig. 5 Venn diagram of transcription factors differentially expressed in three generations

3 代共有的差异表达转录因子数有 70 个 (图 5), 分布于 22 个 TFs 家族, 以 ERF、bHLH、B3 和 MYB (9、8、6、6) 4 个家族富集数量最多 (表 2)。70 个 3 代共有差异表达 TFs 的相对表达量同样以下调为主, 在第 1 代下调表达的基因有 50 个, 第 2 代下调表达的基因有 41 个, 第 3 代下调表达的基因有 48 个; 在 3 代中全部表现出上调表达的基因仅 12 个, 其中 WOX 家族的基因在 3 代中均表现为上调表达 (表 2)。在第 1 代上调表达 $\log_2FC$ 值最高的 6 个基因在 3 代中全部表现出上调表达 [Unigene0020933 (bHLH)、Unigene0015987 (C2H2)、Unigene0016607 (B3)、Unigene0031459 (WOX)、

Unigene0040676 (ERF)、Unigene0031455 (WOX)]。其中 Unigene0040676 (ERF) 上调表达 $\log_2FC$ 值第 1、2 代相近, 第 3 代第 1、2 代的 4 倍, 被预测为 ERF062-like 乙烯响应转录因子。70 个基因中被预测为乙烯响应转录因子的共有 9 个基因, 其中 8 个隶属于 ERF 家族, 1 个属于 AP2 家族。仅在第 1 代下调表达, 第 2、3 代上调表达的基因有 6 个 [Unigene0038094 (ERF)、Unigene0011437 (AP2)、Unigene0028105 (DBB)、Unigene0020062 (WRKY)、Unigene0005341 (ERF)、Unigene0020064 (WRKY)]。在 3 代持续下调表达的基因中, Unigene0044600 (C2H2)、Unigene0016964 (NAC)、Unigene0002712 (EIL)、Unigene0036765 (ZF-HD)、Unigene0016718 (bZIP)、Unigene0010888 (MYB)、Unigene0019323 (NF-YA) 和 Unigene0004126 (ERF) 的下调表达倍数随代数增加而递增, 其中 Unigene0044600 (C2H2) 第 3 代的差异表达倍数是第 1 代的 5 倍。

4 讨论

植物由于固着的生长模式, 在生命过程中不可避免地会遭受各种各样的生物胁迫与非生物胁迫^[18]。一些植物在胁迫下可产生胁迫记忆, 促使子代能够更主动、高效地应答胁迫, 提高对胁迫的抗耐性。随着分子生物信息技术的发展, 各组学测序技术被应用于植物胁迫记忆遗传的研究。Ou 等^[19]对经历 3 代 Hg^{2+} 胁迫的水稻进行 DNA 甲基化模式分析, 发现 Hg^{2+} 胁迫诱导的 DNA 甲基化修饰模式可以以一定比例稳定遗传给子代, 遗传了该甲基化修饰模式的子代对胁迫具有抗耐性。Bilichak 等^[20]对芜菁 *Brassica rapa* var. *trilocularis* (Roxb.) Kitam. 进行高温胁迫并研究胁迫记忆在子代的传递, 推测 miR168 和 braAGO1 在植物中参与了胁迫诱导的跨代遗传。李文月^[17]研究结果显示, 经历连续 3 代盐胁迫处理的白木香离体根, 其胁迫后脯氨酸含量随胁迫代数增加而增高, 是具有胁迫记忆现象的表现。

TFs 是通过各种信号转导途径调节植物生长发育和适应逆境胁迫的关键信号传递因子。随着生物测序技术飞速发展, 各大 TFs 家族的结构功能框架在拟南芥、花生、棉花、茶树等多种植物中被鉴定与研究, 目前已经证实 bZIP、bHLH、AP2/ERF、MYB、NAC、WRKY 和 C2H2 等 TFs 家族成员参与了植物对盐胁迫的应答反应。本研究通过 Illumina Hiseq4000 双端 PE150 测序获得盐胁迫 3

表 2 白木香 3 代共有的差异表达转录因子

Table 2 Differentially expressed TFs overlapped in three generations of excised roots of *A. sinensis*

TFs 家族	基因编号	名称	相对表达量 (N/CK)			类型
			CK1-VS-N1	CK2-VS-N2	CK3-VS-N3	
AP2	Unigene0045515	PLT2	-1.955 00	-1.286 470	-1.256 170	AP2 domain-containing transcription factor (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0046767	WRI1	-1.143 200	-1.001 660	-1.565 790	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor WRI1 (<i>Eucalyptus grandis</i>)
	Unigene0011437	WRI1	-2.600 230	4.319 741	1.159 202	Integrase-type DNA-binding superfamily protein (<i>Theobroma cacao</i>)
B3	Unigene0016524	—	-1.895 250	-2.405 720	-1.063 920	PREDICTED: AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor RAV2-like (<i>Populus euphratica</i>)
	Unigene0016607	ARF14	4.365 982	1.328 342	5.911 886	PREDICTED: AP2/ERF and B3 domain-containing transcription repressor RAV2-like (<i>Populus euphratica</i>)
	Unigene0022661	ARF14	-1.411 770	-2.274 750	-1.716 980	PREDICTED: B3 domain-containing transcription factor NGA2-like [<i>Gossypium raimondii</i>]
	Unigene0022928	ARF11	-1.083 300	3.051 719	-1.945 060	PREDICTED: B3 domain-containing transcription factor NGA4-like (<i>Populus euphratica</i>)
	Unigene0007497	Os02g0764100	-1.346 140	-4.057 410	-1.891 410	PREDICTED: B3 domain-containing protein Os02g0764100-like (<i>Jatropha curcas</i>)
	Unigene0046668	Os02g0764100	-5.633 540	1.725 556	-2.488 480	PREDICTED: B3 domain-containing transcription factor NGA4-like (<i>Populus euphratica</i>)
bHLH	Unigene0031373	BHLH62	-1.400 440	-1.059 660	-1.510 870	PREDICTED: transcription factor bHLH78-like isoform X2 (<i>Citrus sinensis</i>)
	Unigene0041724	BHLH120	-1.885 300	-2.099 760	-2.005 460	PREDICTED: transcription factor bHLH126-like (<i>Gossypium raimondii</i>)
	Unigene0020933	UNE12	9.465 702	7.844 026	8.718 818	PREDICTED: transcription factor UNE12-like, partial (<i>Brassica rapa</i>)
	Unigene0004080	BHLH74	-2.333 160	1.228 941	-1.634 670	PREDICTED: transcription factor bHLH74 (<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>)
	Unigene0005947	BHLH87	2.051 357	-1.443 370	2.575 897	PREDICTED: transcription factor bHLH87 (<i>Populus euphratica</i>)
	Unigene0015701	HEC1	1.960 700	-1.507 860	1.010 180	PREDICTED: transcription factor HEC1 (<i>Vitis vinifera</i>)
	Unigene0029143	BHLH95	1.726 765	-2.308 350	-1.186 850	Transcription factor bHLH95-like protein (<i>Gossypium arboreum</i>)
	Unigene0031377	BHLH62	-3.284 320	-1.502 680	-2.421 540	PREDICTED: transcription factor bHLH62-like (<i>Tarenaya hassleriana</i>)
bZIP	Unigene0016718	HYH	-1.469 250	-1.687 370	-3.636 950	PREDICTED: transcription factor HY5-like isoform X3 (<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>Vesca</i>)
	Unigene0005413	DPBF4	-3.238 010	1.149 249	-1.096 520	PREDICTED: ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 3 (<i>Nelumbo nucifera</i>)
	Unigene0021449	OBF1	-1.672 400	1.312 226	-1.996 800	basic leucine-zipper 44 (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0040737	BZIP43	1.048 062	-1.107 930	-1.586 760	basic leucine-zipper 42 (<i>Theobroma cacao</i>)
C2H2	Unigene0015987	SGR5	7.472 217	8.667 230	8.685 450	zinc finger family protein (<i>Populus trichocarpa</i>)
	Unigene0044600	KNU	-2.291 050	-2.635 550	-10.837 300	PREDICTED: zinc finger protein KNUCKLES-like (<i>Gossypium raimondii</i>)
	Unigene0008960	STOP1	1.342 400	1.221 144	1.263 974	PREDICTED: protein SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1-like (<i>Gossypium raimondii</i>)
DBB	Unigene0028105	COL2	-2.433 420	2.511 143	1.592 984	CONSTANS-like 1 protein (<i>Gossypium arboreum</i>)
Dof	Unigene0008124	DOF3.6	1.824 656	1.740 671	2.855 590	PREDICTED: dof zinc finger protein DOF3.6-like isoform X2 (<i>Gossypium raimondii</i>)
EIL	Unigene0002712	EIL5	-1.942 580	-2.443 790	-6.858 450	PREDICTED: ETHYLENE INSENSITIVE 3-like 5 protein (<i>Prunus mume</i>)
ERF	Unigene0025975	ERF091	-1.724 580	1.009 314	-1.412 070	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF091-like (<i>Malus domestica</i>)
	Unigene0039383	RAP2-11	1.636 056	1.793 130	8.332 260	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ESR2-like (<i>Jatropha curcas</i>)
	Unigene0005341	ERF098	-1.708 400	1.655 615	2.428 042	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF098-like (<i>Populus euphratica</i>)
	Unigene0004126	ERF12	-1.012 410	-1.064 480	-2.465 400	ERF domain protein 12 (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0014653	RAP2-11	-1.872 780	-1.705 800	-2.412 770	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor RAP2-11 (<i>Vitis vinifera</i>)

续表 2

TFs 家族	基因编号	名称	相对表达量 (N/CK)			类型
			CK1-VS-N1	CK2-VS-N2	CK3-VS-N3	
G2-like	Unigene0040676	ERF062	2.399 123	2.231 255	8.954 487	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF062-like (<i>Gossypium arboreum</i>)
	Unigene0004154	ERF022	-4.453 270	-1.749 060	-4.032 660	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF022-like (<i>Gossypium raimondii</i>)
	Unigene0040660	ERF024	-3.864 910	2.665 566	-1.583 190	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF024-like (<i>Gossypium raimondii</i>)
	Unigene0038094	ERF024	-3.152 100	1.859 810	1.558 127	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF024 (<i>Jatropha curcas</i>)
	Unigene0008809	PHL1	-1.620 550	-1.016 220	1.004 665	Homeodomain-like superfamily protein isoform 2, partial (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0034969	ARR2	-1.384 430	1.594 949	-1.553 720	PREDICTED: two-component response regulator ARR2 isoform X2 (<i>Cucumis sativus</i>)
GATA	Unigene0018337	APL	1.277 289	1.243 964	1.639 889	Homeodomain-like superfamily protein isoform 2 (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0013008	GATA4	-1.876 830	-1.770 680	-1.891 800	PREDICTED: GATA transcription factor 4 (<i>Jatropha curcas</i>)
GRAS	Unigene0011904	SHR	1.353 589	1.061 257	1.814 566	GRAS family transcription factor (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0030558	RGL1	-2.321 430	-2.025 830	-5.570 850	PREDICTED: DELLA protein GAI1-like (<i>Citrus sinensis</i>)
HD-ZIP	Unigene0014294	HOX3	-1.361 030	-1.111 150	-1.720 320	Homeobox-leucine zipper protein HOX3 (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0005162	ATHB-16	-1.076 290	-2.790 030	-2.233 340	Homeobox-leucine zipper ATHB-6-like protein (<i>Gossypium arboreum</i>)
	Unigene0008834	ATHB-21	-2.298 230	-1.642 560	-2.172 700	PREDICTED: homeobox-leucine zipper protein ATHB-40-like (<i>Gossypium raimondii</i>)
LBD	Unigene0036541	LBD16	-2.645 060	-3.561 930	-3.163 800	Lateral organ boundaries-domain 16 (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0037813	LBD16	-2.206 780	-2.322 290	-2.093 350	Lateral organ boundaries-domain 16 (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0010809	LBD1	1.154 615	-4.366 800	-3.103 100	PREDICTED: LOB domain-containing protein 1-like (<i>Gossypium raimondii</i>)
	Unigene0018743	LBD38	1.537 371	-1.446 660	-1.014 550	PREDICTED: LOB domain-containing protein 39-like (<i>Populus euphratica</i>)
MIKC	Unigene0012309	SOC1	-4.863 570	1.056 961	-2.352 630	AGAMOUS-like 20 isoform 2 (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0006154	SVP	-1.519 090	-1.080 050	-1.416 160	PREDICTED: MADS-box protein JOINTLESS (<i>Populus euphratica</i>)
MYB	Unigene0000928	MYB4	-1.777 720	-1.032 910	-2.914 430	PREDICTED: myb-related protein Myb4 isoform X1 (<i>Glycine max</i>)
	Unigene0010888	MYB39	-1.327 580	-2.167 420	-3.377 550	PREDICTED: transcription factor RAX2 (<i>Pyrus × bretschneideri</i>)
	Unigene0043768	P	-1.451 750	-1.844 570	-1.986 830	MYB-like DNA-binding domain protein (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0044620	MYB46	1.927 175	1.262 103	1.157 295	Myb domain protein 83 (<i>Theobroma cacao</i>)
MYB	Unigene0000162	MYB108	-3.086 580	-1.880 950	-1.758 550	PREDICTED: transcription factor MYB108 (<i>Vitis vinifera</i>)
	Unigene0035183	MYB306	2.144 479	-1.596 920	4.352 963	transcription factor MYB12 (<i>Glycine max</i>)
	Unigene0016551	DIVARICATA	1.365 299	-1.491 440	-1.102 130	Duplicated homeodomain-like superfamily protein (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0016964	NAC100	-1.970 900	-2.310 650	-3.080 360	NAC domain containing protein 80 (<i>Theobroma cacao</i>)
NAC	Unigene0009255	FEZ	-2.230 040	-2.068 400	-1.276 150	NAC domain containing protein 36 (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0009256	FEZ	-1.766 290	-1.800 290	-1.561 230	NAC domain containing protein 36 (<i>Theobroma cacao</i>)
	Unigene0003829	ONAC010	-2.292 920	1.712 599	-1.254 250	PREDICTED: NAC transcription factor 25-like (<i>Gossypium raimondii</i>)
	Unigene0019323	NFYA8	-1.056 060	-3.196 070	-4.848 420	PREDICTED: nuclear transcription factor Y subunit A-3-like (<i>Populus euphratica</i>)
NF-YA	Unigene0000518	NFYA1	-1.467 660	-2.478 030	-1.971 730	PREDICTED: nuclear transcription factor Y subunit A-1-like (<i>Gossypium raimondii</i>)
	Unigene0031459	WOX1	4.180 546	1.430 876	3.224 170	PREDICTED: WUSCHEL-related homeobox 6 (<i>Gossypium raimondii</i>)
WOX	Unigene0031455	WOX1	2.156 263	2.046 480	2.233 908	PREDICTED: WUSCHEL-related homeobox 6 (<i>Gossypium raimondii</i>)
	Unigene0020064	WRKY75	-1.118 390	2.507 171	1.086 862	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 75 (<i>Pyrus × bretschneideri</i>)
WRKY	Unigene0010193	WRKY22	-1.821 540	1.473 285	-1.086 310	WRKY transcription factor 57 (<i>Gossypium hirsutum</i>)
	Unigene0020062	WRKY75	-2.328 330	2.196 917	1.985 872	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 75 (<i>Setaria italica</i>)
ZF-HD	Unigene0036765	MIF1	-1.539 260	-2.134 090	-2.625 410	PREDICTED: mini zinc finger protein 3 (<i>Jatropha curcas</i>)

代白木香离体根的转录组数据,数据经过与脯氨酸生物合成相关基因、糖类合成和降解相关基因、色酮类生物合成相关基因及其他目的基因的 qRT-PCR 实验验证^[17],证明了该转录组数据的可靠性。对盐胁迫 3 代白木香离体根 TFs 的表达模式进行分析,得到 48 286 条 Unigene 序列,包含 54 个潜在的白木香 TFs 家族共 1 156 个基因,预测得到的 TFs 基因数目最多的 10 个家族分别为 bHLH、ERF、NAC、MYB、C2H2、WRKY、MYB_related、bZIP、GRAS 和 B3 家族。

NAC 是植物特有的最大的转录调控因子家族之一,在植物体内具有多重角色,参与干旱和高盐等非生物胁迫响应,能在逆境胁迫下诱导表达,并诱导其他胁迫相关基因的表达,其过表达能明显提高植株抗逆能力。在拟南芥和水稻中,过度表达胁迫应答的 NAC (SNAC) 基因的转基因植株对胁迫表现出更好的耐旱性^[21]。在高盐、干旱、低温胁迫下,紫花苜蓿 MsNAC1 基因表达量呈现先上调后下调趋势^[22]。在本研究中,白木香 NAC 家族是预测得到的 TFs 数目最多的前三的家族之一,3 代受盐胁迫诱导差异表达基因数为 20、22、31,其中上调表达的 TFs 数量同样呈递增趋势(7、9、16),说明 NAC 对白木香的盐胁迫应答起到重要调控作用,随着胁迫代数的增加,越来越多的 NAC 转录因子参与到盐胁迫的响应与调控,李伟等^[23]用在线 ProtParam 程序预测 NAC 蛋白的理化性质,结果显示非生物逆境胁迫相关 NAC 蛋白主要含有亮氨酸、甘氨酸和脯氨酸这 3 种非极性氨基酸。脯氨酸是植物在逆境胁迫下积累的一种有机渗透物质,被认为与植物的抗逆性呈正相关,耐性植株中脯氨酸含量普遍高于胁迫敏感型植株^[24]。李文月^[17]研究结果表明,白木香离体根中脯氨酸含量随着盐胁迫代数增加而增加,并通过 qRT-PCR 验证了脯氨酸合成通路中的关键基因 P5CSB 可作为盐胁迫下白木香根胁迫记忆现象的标志性基因^[17],推测 NAC 家族 TFs 对白木香脯氨酸的积累及耐盐性具有调控作用。

MYB 转录因子通过 ABA 信号途径参与耐盐抗旱调控,与植物中的其他信号转导途径存在不同程度的交叉^[25],在植物生理生化过程中一般起正调控作用,在响应植物逆境胁迫时,MYB 基因表达量越高,其抗逆能力也增强^[26]。在本研究中,白木香 MYB 家族也是受盐胁迫诱导差异表达基因数量较

多的家族之一,且上调表达的差异表达 TFs 数量随代数增加而增多(6、7、10),这些上调表达的 MYB 转录因子对白木香 3 代抗盐能力的调节起一定的增强作用。WRKY 转录因子是在早期防御应答基因的调控中起着重要作用的一个家族,WRKY 基因过表达同样能增强植物的抗逆能力,在拟南芥中过表达 WRKY25 和 WRKY33 后,其耐盐性和 ABA 敏感性增强^[6]。在本研究中,白木香根盐胁迫后上调表达的 WRKY 转录因子随胁迫代数增加显著增多(2、6、15),推测在子代显著增多的上调表达 TFs 积极参加了子代对盐胁迫的抗耐能力的调控与盐胁迫记忆的形成。

在 3 代白木香根的 TFs 差异表达基因比较分析中,共有 70 个 3 代共有的差异表达基因,其相对表达量同样以下调表达为主,3 代中持续上调表达的基因仅 12 个,其中 WOX 家族的基因在 3 代中均表现为上调表达。WOX 家族基因在植物胚的形成、干细胞稳定性和器官的形成等发育关键时期发挥重要作用,以促进细胞分裂或阻止未成熟细胞提前分化^[27]。WOX 基因的表达同样可受非生物胁迫影响,如水稻在干旱胁迫 12 h 下,几乎所有 WOX 基因表达水平均有明显的提升,OsWOX3 和 OsWOX5 基因在盐胁迫下被诱导表达^[28]。在 3 代盐胁迫中均上调表达的 2 个基因注释为 WOX1,其表达部位在侧生器官原基^[29],推测其参与器官横向发育以抵抗白木香根的盐胁迫。第 1 代上调表达 log₂FC 值最高的前 6 个基因在 3 代中全部表现出上调表达。ERF 家族的 Unigene0040676 上调表达 log₂FC 值在第 1、2 代相近,到第 3 代增至为第 1、2 代的 4 倍,说明通过连续 3 代胁迫触发了该基因更高的表达。ERF 家族也是植物在抗逆调控方面有重要作用的 TFs 家族之一,通过多方面的转录调控参与植物的生长和抗逆性。在茶树 *Camellia sinensis* L. 中,高温胁迫使 Cs047-ERF-B3 基因表达量持续升高^[29]。在白木香根转录组中共预测得到 90 个 ERF 家族成员,是富集 TFs 数量排名第 2 的家族。

在 3 代持续下调表达的基因中,有 8 个基因 [Unigene0044600 (C2H2), Unigene0016964 (NAC), Unigene0002712 (EIL), Unigene0036765 (ZF-HD), Unigene0016718 (bZIP), Unigene0010888 (MYB), Unigene0019323 (NF-YA) 和 Unigene0004126 (ERF)] 的下调表达倍数随代数增加而递增,暗示了多代胁迫对部分基因表达的调控作用有叠加效

应, 其中 Unigene0044600 (C2H2) 第 3 代的差异表达倍数是第 1 代的 5 倍, 推测这些基因参与了白木香盐胁迫的应答与胁迫记忆的传递。有 6 个基因 [Unigene0038094 (ERF)、Unigene0011437 (AP2)、Unigene0028105 (DBB)、Unigene0020062 (WRKY)、Unigene0005341 (ERF)、Unigene0020064 (WRKY)] 仅在第 1 代下调表达, 第 2、3 代上调表达, 说明多代胁迫对部分基因的调控作用不同于单代胁迫, 其在子代对胁迫的响应与亲代产生差别, 这些基因可能参与了对盐胁迫的应答, 但是否参与植物盐胁迫记忆的传递, 其他 TFs 家族是否也存在参与胁迫记忆传递的相关基因, 以及这些基因是通过什么信号转导途径起作用的, 有待进一步研究。

转录因子调控植物分子抗逆及胁迫记忆机制是一个极其复杂的动态网络。此研究有利于帮助了解白木香转录因子应答盐胁迫的表达情况变化, 加深白木香面对胁迫应答机制的认识。

参考文献

- [1] Bruce T J A, Matthes M C, Napier J A, *et al.* Stressful “memories” of plants evidence and possible mechanisms [J]. *Plant Sci*, 2007, 173(6): 603-608.
- [2] Kinoshita T, Seki M. Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55(11): 1859-1863.
- [3] Jin J, He K, Tang X, *et al.* An *Arabidopsis* transcriptional regulatory map reveals distinct functional and evolutionary features of novel transcription factors [J]. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(7): 1767-1773.
- [4] Ligia E, Devi H S, Grosser J W, *et al.* Potential use of the DREB-ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plants [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2018, 132(1): 1-25.
- [5] Ambawat S, Sharma P, Yadav N R, *et al.* MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: An overview [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2013, 19(3): 307-321.
- [6] Jiang Y, Deyholos M K. Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 91-105.
- [7] 徐 鹏, 于文强. 表观遗传信息的跨代传递 [J]. 科学通报, 2016, 61(32): 3405-3412.
- [8] Conrath U, Beckers G J M, Flors V, *et al.* Priming: Getting ready for battle [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19(10): 1062-1071.
- [9] Wang X, Gao B, Liu X, *et al.* Salinity stress induces the production of 2-(2-phenylethyl) chromones and regulates novel classes of responsive genes involved in signal transduction in *Aquilaria sinensis* calli [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 119(16): 1-20.
- [10] 张 争, 杨 云, 魏建和, 等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 156-159.
- [11] 李红念, 梅全喜, 林焕泽. 沉香的化学成分、药理作用和临床应用研究进展 [J]. 中国药房, 2011, 22(35): 3349-3351.
- [12] 李 薇, 梅文莉, 左文健. 白木香的化学成分与生物活性研究进展 [J]. 热带亚热带植物学报, 2014, 22(2): 201-212.
- [13] Yang J L, Dong W H, Kong F D, *et al.* Characterization and analysis of 2-(2-phenylethyl)-chromone derivatives from agarwood (*Aquilaria crassna*) by artificial holing for different times [J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 1-15.
- [14] 林 妃, 李敬阳, 黄冬梅, 等. 白木香组织培养技术及植株再生的研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(6): 1296-1299.
- [15] 周 亦. 白木香离体根培养条件优化及 2-(2-苯乙基)色酮类物质诱导 [D]. 广州: 广州中医药大学药物分析学, 2017.
- [16] 李文月. 白木香离体根盐胁迫记忆体系的建立和转录组初步分析 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [17] 李文月, 潘晓琪, 马新业, 等. 氯化钠对白木香离体根生长、生理和化学成分的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(4): 502-507.
- [18] Molinier J, Ries G, Zipfel C, *et al.* Transgenerational memory of stress in plant [J]. *Nature*, 2006, 442(31): 1046-1049.
- [19] Ou X, Zhang Y, Xu C, *et al.* Transgenerational inheritance of modified DNA methylation patterns and enhanced tolerance induced by heavy metal stress in rice [J]. *PLoS One*, 2012, 9(7): e41143.
- [20] Bilichak A, Illynskyy Y, Wóycicki R, *et al.* The elucidation of stress memory inheritance in *Brassica rapa* plants [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6(5): 1-17.
- [21] Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, *et al.* NAC transcription factors in plant abiotic stress responses [J]. *Bioch Bio Bioenerget*, 2012, 1819(2): 97-103.
- [22] 申玉华, 徐振军, 杨晓坡, 等. 紫花苜蓿 NAC 转录因子 MsNAC1 基因的克隆、生物信息学分析及非生物逆境胁迫下的表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(6): 1312-1319.
- [23] 李 伟, 韩 蕾, 钱永强, 等. 非生物逆境胁迫相关 NAC 转录因子的生物信息学分析 [J]. 西北植物学报,

- 2012, 32(3): 454-464.
- [24] Ashraf M, Foolad M R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance [J]. *Envir Exper Bot*, 2007, 59(2): 206-216.
- [25] 乔 孟, 于延冲, 向凤宁. 拟南芥 R2R3-MYB 类转录因子在环境胁迫中的作用 [J]. 生命科学, 2009, 21(1): 145-150.
- [26] 牛义岭, 姜秀明, 许向阳. 植物转录因子 MYB 基因家族的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(8): 2050-2059.
- [27] 王俞程, 何瑞萍, 彭献军, 等. WOX 转录因子家族研究进展 [J]. 草业科学, 2015, 32(5): 760-769.
- [28] Cheng S, Huang Y, Zhu N, *et al.* The rice WUSCHEL related homeobor genes are involved in reproductive organ development, hormone signaling and abiotic stress response [J]. *Gene*, 2014, 549(2): 266-274.
- [29] Wu Z, Li X, Liu Z, *et al.* Transcriptome-based discovery of AP2/ERF transcription factors related to temperature stress in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Funct Integr Genomics*, 2015, 15(6): 741-752.