

牛枝子抗旱候选基因 *LpDREB* 的克隆与 表达及单核苷酸多态性分析*

李 静 袁虎威 李 伟

(北京林业大学 林木育种国家工程实验室 林木花卉遗传育种教育部重点实验室 北京 100083)

摘 要: 牛枝子为胡枝子属中最具耐旱特性的灌木树种,是研究基于单核苷酸多态性(SNP)水平的植物个体间耐旱差异机制的重要材料。以5个种源天然牛枝子为材料,利用染色体步移技术克隆牛枝子抗旱候选基因 *LpDREB* 的全长序列,对 *LpDREB* 基因的结构和系统进化进行分析,研究 *LpDREB* 基因的组织及诱导表达规律,分析 *LpDREB* 基因的 SNP 分布和类型。研究结果表明:克隆的牛枝子 *LpDREB* 基因 cDNA 片段全长为 1 611 bp,具有 957 bp 的开放阅读框,编码 318 个氨基酸,包含 *DREB* 基因所特有的 *DREBP/AP2* 保守区域。*LpDREB* 基因同大豆 *GmDREB3* 基因的进化关系最近,但 2 个基因除保守区域外的其他区域相似性不高。牛枝子 *LpDREB* 基因受干旱胁迫诱导表达,在组织器官中的根部表达量最大,其次为叶片,茎中的表达量最少。在天然牛枝子群体中共检测到 23 个 SNP 位点,其中启动子及 5'端非编码区 4 个,编码区 17 个,3'端非编码区 2 个;23 个 SNP 中,12 个属于转换,11 个属于颠换;编码区内的 17 个 SNPs 位点中,9 个属于同义突变,8 个为非同义突变,同义突变与非同义突变的比值为 1.1。研究结果为基于 SNP 水平的牛枝子抗旱候选基因的关联分析奠定基础。

关键词: 牛枝子; *LpDREB* 基因; 诱导表达; 序列分析; 单核苷酸多态性

中图分类号: S718.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7488(2012)06-0040-07

Isolation, Expression and Single Nucleotide Polymorphisms Analysis of Dehydration Responsive Element Binding Gene (*LpDREB*) in *Lespedeza potaninii*

Li Jing Yuan Huwei Li Wei

(National Engineering Laboratory for Tree Breeding Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and
Ornamental Plants of Ministry of Education Beijing Forestry University Beijing 100083)

Abstract: *Lespedeza potaninii* is one of the most drought tolerant *Lespedeza* species and widely distributed in arid, semi-arid and desert grassland. It is an ideal model plant used for the investigating the individual variation of drought tolerant at single nucleotide polymorphisms (SNP) level. In the present study, the drought tolerant candidate gene *LpDREB* was cloned from five provenances of *L. potaninii* by chromosome walking method. The organ- and inducible-expression patterns of the *LpDREB* gene were also investigated. Furthermore, the gene structure and phylogeny, and SNP type and distribution were characterized. The results indicated that the full length cDNA sequence of *LpDREB* gene was 1 611 bp containing a 957 bp open reading frame (ORF) which encodes a 318 amino acid residues with a highly conserved *DREBP/AP2* domain. Phylogeny analysis revealed that the *LpDREB* gene had a closest evolutionary relationship with soybean *GmDREB3* gene in terms of high similarity in the common conserved region. Expression of the *LpDREB* gene was induced by drought stress and varied in different organs with the highest expression level in roots followed by leaves and stems. In the *L. potaninii* populations, 23 SNPs were detected. Among them four located in promoter and 5' non-coding regions, and 17 were distributed in the coding region, and two in 3' non-coding region. A total of 12 SNPs were in transitions, while 11 SNPs were in transversions. For 17 SNPs in the coding region, 9 were synonymous mutation and 8 were non-synonymous mutations, with a ratio of 1.1. This study paved a foundation for association analysis with drought tolerant candidate genes in *L. potaninii* at SNP level.

Key words: *Lespedeza potaninii*; *LpDREB* gene; inducible expression; sequence analysis; single nucleotide polymorphism

收稿日期: 2011-10-08; 修回日期: 2011-10-28。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30901158)。

* 李伟为通讯作者。

干旱是影响植物生长和发育的重要环境因子之一,它也是一个世界性的社会和经济问题。有关植物耐旱分子机制研究一直是国内外研究的热点领域。许多抗旱基因或抗旱调控因子已被成功克隆(Shinozaki *et al.*, 2007),模式植物中的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)(Bouchabke *et al.*, 2008)和水稻(*Oryza sativa*)(<http://www.Stress-genomics.org>)已经建立了比较完善的抗旱基因调控网络。但是,目前所有关于植物耐旱分子机制的研究都是基于基因水平上的,并没有考虑基因内部的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)所引起的植物个体间、群体间耐旱能力的差异,即同一基因在同一物种的不同个体或群体内存在单核苷酸水平上的差异,这种差异能够影响基因的功能和植物的性状。已有研究表明,SNP是决定不同群体或个体之间表型差异的分子基础(Ingvarsson, 2005; Aulchenko *et al.*, 2007)。

牛枝子(*Lespedeza potaninii*)是胡枝子属(*Lespedeza*)中最具抗旱能力的一个种,它能在年降水量不足150 mm的干旱地区生长,广泛分布于荒漠、草原及草原化荒漠地带,是新疆、内蒙古、宁夏荒漠草原上的优势灌木种(李新荣, 1997)。与胡枝子属其他种一样,牛枝子还处于自然分布状态,由于天然隔离或生态环境的适应性,种源间、个体间的抗旱能力存在着丰富的变异(骈瑞琪等, 2005)。这种广泛存在的差异为研究基于SNP层次的本植物个体、群体间的耐旱机制提供了极为重要的材料。

DREB(dehydration responsive element binding)是一类与逆境胁迫相关的转录因子,它能够识别并结合于与逆境胁迫应答有关的基因启动子区域中的DRE顺式作用元件上,启动下游抗逆基因的表达,从而在转录水平上调控多个抗逆基因,在诱导一系列抗非生物胁迫基因和提高植物抗逆性方面起着重要的作用(Agarwal *et al.*, 2006)。目前已经在拟南芥(Haake *et al.*, 2002)、大豆(*Glycine max*)(Li *et al.*, 2005)、玉米(*Zea mays*)(Saleh *et al.*, 2006)、水稻(Wang *et al.*, 2008)等植物中克隆得到了*DREB*基因。已有研究表明,*DREB*基因在植物的抗旱过程中起重要作用,是重要的抗旱转录调控因子。因此,*DREB*基因是研究基于SNP水平的牛枝子个体间抗旱差异机制的重要候选基因之一。本研究以不同种源天然牛枝子为材料,克隆了*LpDREB*基因,分析了该基因的结构和系统进化,研究了*LpDREB*基因在干旱胁迫下组织和诱导表达规律,并进行了该基因的单核苷酸多态性分析。研究结果

为牛枝子抗旱候选基因筛选、抗旱候选基因SNP发掘、基于SNP的牛枝子个体间耐旱机制差异,及以基因为标记的林木分子标记辅助育种研究提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验材料牛枝子种子分别由宁夏银川市、宁夏盐池县、内蒙古呼和浩特市、内蒙古磴口县、甘肃平凉市提供,共5个种源。将饱满种子放于65℃热水中浸泡24 h,催芽后在25℃人工气候箱中培养。染色体步移文库构建所用DNA由试验材料中的单株牛枝子提取。SNP检测群体由试验材料中300株牛枝子个体组成。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA、RNA提取及cDNA合成 SNP检测所用模板DNA由300株牛枝子个体采集的叶片等量混合,通过CTAB法(Murray *et al.*, 1980)提取获得。总RNA提取按照北京天恩泽基因有限公司提供的Column Plant RNAout 2.0试剂盒完成,cDNA合成利用promega公司的Reverse Transcription System完成。

1.2.2 染色体步移文库构建 选用Dra I, EcoR V, Hae III, Pvu II, Rsa I, Ssp I, Stu I, Sca I 8种限制性内切酶,对基因组DNA进行酶切。纯化回收后,按照GenomeWalker™ Kits User Manual连接接头([http://WWW.Clontech.Com/products/listing.asp\[DB\]](http://WWW.Clontech.Com/products/listing.asp[DB]))。

1.2.3 引物设计和PCR反应体系 根据NCBI中已注册的DREB氨基酸序列同源区域设计简并引物*LpDREBF1*: 5'-CCTCCRAARCCVACRAARCT-3'; *LpDREBR1*: 5'-CGRAAGTTTRAGCCKKGCRAADTC-3'。根据克隆得到的序列片段设计起始PCR和第2次PCR的特异引物(gene specific primer GSP)(表1),接头引物为AP1: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'; AP2: 5'-ACTATAGGGCACCCTGGT-3'。根据*LpDREB*基因的核苷酸序列设计用于扩增cDNA序列的引物(*LpDREBF2*: 5'-AGCCTTTTCAGAAACG

表1 染色体步移引物

Tab. 1 Primers used for chromosome walking	
引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
GSP1 (1)	GCTTCGGTCTCTCGGAGCTCTAT
GSP2 (1)	TCTTATTTCCGCTACCCACTTTCCC
GSP1 (2)	CTCTCGGACTGTACTTTTGCTGA
GSP2 (2)	AGCCTCAGTGGCAAGGGGATT

AGAT-3'; *LpDREBR2*: 5'-AGATCCGGCTAAACAC AATAGA-3') 及用于 SNPs 检测的特异引物(表 2)。

表 2 SNPs 检测引物

Tab. 2 Primers used for SNPs detection

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
SNP-F1	GTAAGAAGATTCCTCGAAAGCCAGG
SNP-R1	GTCCAGATCATAACATTAACAGCC
SNP-F2	TCTCCCTAACTTTTACTCAAACACC
SNP-R2	AGGCAGAGGGATGATTATACAAGAT
SNP-F3	GGAGAATACAAACCTCTTCATTCT
SNP-R3	CTATTGTGCATGTTAGCCGGATCT

染色体步移 PCR 中,第 1 轮 PCR 反应体系为 20 μ L,以 AP1 和 GSP1 为引物,构建的 8 个染色体步移文库为模板。第 2 轮 PCR 反应体系为 50 μ L,以 AP2 和 GSP2 为引物,以第 1 轮 PCR 的反应产物为模板([http://www.clontech.com/products/listing.asp\[DB\]](http://www.clontech.com/products/listing.asp[DB]))。用于 SNP 检测的基因组 PCR 体系为 20 μ L,35 个循环(李伟等,2007)。

1.2.4 PCR 产物测序及结构分析 将 PCR 扩增获得的目的片段纯化回收,连接转化,经菌落 PCR 后筛选阳性克隆测序。利用 DNAMAN 和 DNASTAR (Lasergene, USA) 软件进行序列编辑,应用 softberry 中 FGESH 功能推导出氨基酸序列,进行序列结构分析,利用 BioXM2.6 软件估算蛋白质的分子质量和等电点,用 Phylip 和 MEGA4.0 软件构建 *LpDREB* 基因的进化树。

1.2.5 牛枝子干旱胁迫处理 根据高琼等(2005)对胡枝子属耐旱性差异的研究,确定干旱胁迫试验体系,取苗龄 5 个月的牛枝子盆栽苗 3 株,自然干旱处理(10 天)作为试验组。对照组则为相同苗龄的牛枝子盆栽苗 3 株置于人工气候培养箱中进行正常光照培养。分别采集上述对照及处理后植株的根、茎及叶组织,置于液氮中冻存备用。

1.2.6 *LpDREB* 基因组织及诱导表达 根据 *LpDREB* 基因序列设计 Realtime PCR 引物 *LpDREBRTF*: 5'-AGACTCCCGAAGAACCGAACCAG-3'; *LpDREBRTR*: 5'-CGGAGTTTGTAAAGCGGCTTTC-3', 扩增长度约为 95 bp。以肌动蛋白基因 *Actin* 作为内参,引物序列 *ActF*: 5'-GTGACGTTGATATCA GGAAGCAC-3'; *ActR*: 5'-AAGATAGAGCCACCAA TCCAGAC-3'。RT-PCR 反应按照杨帆等(2010)描述的方法进行,利用该基因相对表达量分析其表达模式。

1.2.7 *LpDREB* 基因的 SNPs 分析 利用 MEGA4.0 和 DNAsp 软件对 *LpDREB* 基因的 50 个序列进行比

对分析,查找 *LpDREB* 基因内位于 5'非编码区、编码区和 3'非编码区的 SNPs 位点,分析基因序列位于编码区中 SNPs 位点的同义突变和非同义突变的碱基变异情况及对相应氨基酸的影响。

2 结果与分析

2.1 牛枝子 *LpDREB* 基因序列分析

以基因组 DNA 为模板,利用简并引物 *LpDREBF1* 和 *LpDREBR1* 进行 PCR 扩增,PCR 产物测序后得到 1 条 193 bp 的序列。通过 Blastp 同源性分析,该片段同大豆 *GmDREB3* (序列号 DQ055133) 相似性达到 85%,并且含有 *DREB* 基因特有的 DREBP/AP2 保守区,由此判断该片段属于 *DREB* 基因,命名为 *LpDREB*。根据 *LpDREB* 基因部分核苷酸序列设计染色体步移引物(表 1),以 8 个酶切文库为模板,进行巢式 PCR,分别获得了长度为 737 bp 和 812 bp 的 2 条序列,利用 SegMan 软件将 3 条序列拼接,拼接后序列长度为 1 930 bp。通过 softberry 软件推导出该序列的起始密码子 ATG 位于 286 bp,终止密码子 TGA 位于 1 242 bp。利用引物 *LpDREBF2* 和 *LpDREBR2*,以提取的牛枝子总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,PCR 扩增得到 cDNA 序列片段。序列分析结果表明,*LpDREB* 基因 cDNA 片段全长 1 611 bp,包含了 285 bp 的 5' UTR 区,957 bp 的 ORF 区及 369 bp 的 3' UTR 区,可编码长度为 318 个氨基酸残基的蛋白质(基因注册号为 JF900594),AP2/ERF 保守区域位于 677~856 bp 的碱基范围内。cDNA 序列同基因组 DNA 序列进行比对,结果表明该基因内部没有内含子。利用软件 BioXM2.6 估算蛋白质的分子质量为 35.43 ku,等电点为 6.87。

2.2 牛枝子 *DREB* 蛋白质氨基酸序列同源性及其系统进化分析

将 *LpDREB* 推导的蛋白质氨基酸序列同其他植物 *DREB* 蛋白质序列进行同源性比较(图 1)。由图 1 可知,该基因编码的氨基酸序列同大豆 *GmDREB3*、柠条锦鸡儿 (*Caragana korshinskii*) *CkDREB2*、毛果杨 (*Populus trichocarpa*) *PtDREB19*、玉米 *ZmDBP2*、水稻 (*Oryza sativa*) *OsDBF2* 的蛋白质序列具有较高的同源性,分别为 84%、91%、76%、76%、92%。*DREB* 蛋白均包含 1 个高度保守的 DNA 结合区域,即 APETALA2/乙烯响应因子 (AP2/ERF) 区域 (Riechmann *et al.*, 1998),从图 1 可以看出,*LpDREB* 基因的氨基酸序列也含有高度保守的 AP2/ERF 区域。



图1 DREB 蛋白质氨基酸序列比较

Fig. 1 Comparison of the deduced amino acid sequence of DREB

CkDREB2: 柠条锦鸡儿 *Caragana korshinskii*; GmDREB3: 大豆 *Glycine max*; OsDBF2: 水稻 *Oryza sativa*; PtDREB19: 毛果杨 *Populus trichocarpa*; ZmDBP2: 玉米 *Zea mays*; LpDREB: 牛枝子 *Lespedeza potaninii*. 方框内氨基酸序列表示 DREB 蛋白中 AP2/ERF 保守区域。Amino acids in the square frame represent the AP2/ERF domain of DREB proteins.

为了分析 *LpDREB* 基因同其他植物 DREB 基因的系统进化关系, 构建了 *LpDREB* 基因同大豆 *GmDREB3*、柠条锦鸡儿 *CkDREB2*、毛果杨 *PtDREB19*、玉米 *ZmDBP2*、水稻 *OsDBF2* 基因的 DREB 蛋白的系统进化树(图2)。由图2可以看出, DREB 蛋白由极点向2个方向发生了进化, 分别为双子叶植物和单子叶植物。双子叶植物中, 牛枝子 *LpDREB* 基因和大豆 *GmDREB3* 基因的进化关系最近, 属于 DREB 基因亚族 A-5 组(Chen *et al.*, 2009)。

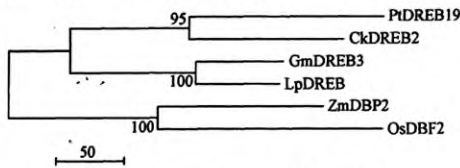


图2 DREB 蛋白的系统进化树

Fig. 2 The phylogenetic tree of DREB proteins

2.3 *LpDREB* 基因的组织及干旱胁迫诱导表达

利用荧光定量 PCR 技术检测了 *LpDREB* 基因在牛枝子各组织及干旱胁迫条件下的表达情况。由图3可知, 正常条件下, *LpDREB* 基因在牛枝子的

根、茎、叶组织中均有表达, 但表达模式不同, 根部表达丰度最高, 而茎和叶部表达量次之。干旱胁迫处理后, *LpDREB* 基因在不同组织中的转录水平与对照组相比均有不同程度的上调, t 检验结果表明根部表达差异最大, 达到了显著差异水平($P < 0.05$)。 *LpDREB* 基因在牛枝子的根部表达量高于茎和叶, 且干旱胁迫处理后表达水平差异显著, 这与牛枝子生活的地理环境有关, 本试验的种子材料来源于干

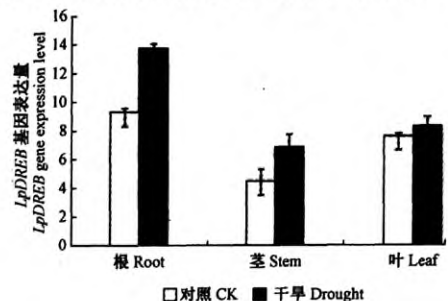


图3 *LpDREB* 基因的组织及干旱胁迫诱导表达
Fig. 3 Expression profile of *LpDREB* in roots, stems and leaves induced by drought stress

早的沙漠地区,气候条件及土壤条件使植物的根系朝向更有利于抗胁迫的方向发展。

2.4 *LpDREB* 基因的 SNPs 分析

设计了 3 对用于 SNP 检测的特异引物(表 2),模板为 300 株牛枝子个体混合 DNA,PCR 产物长度分别为 625 bp,545 bp 和 744 bp,序列之间有 80 ~ 100 bp 重复区域。挑选 50 个阳性克隆测序,将得到的基因序列进行单核苷酸多态性分析(表 3)。由表

3 可知,长度为 1 611 bp 的序列中共有 SNPs 位点 23 个,发生频率为 1/70,其中 5'非翻译区、外显子和 3'非翻译区的 SNPs 位点分别为 4,17,2 个,频率为 1/71,1/56,1/185。对 *LpDREB* 基因中的 23 个 SNPs 位点进行变异类型统计(表 4),结果显示,23 个 SNPs 位点中 12 个属于转换,分别包括 3 个 A↔G 和 9 个 T↔C,11 个颠换分别包括 2 个 A↔T,5 个 G↔C 和 4 个 G↔T,转换与颠换的比值为 1.09(<2.0)。

表 3 *LpDREB* 基因内 SNPs 数量及分布

Tab. 3 Number and distribution of SNPs in *LpDREB*

<i>LpDREB</i>	总数 Total	5'非翻译区 5' UTR	外显子 Exon	3'非翻译区 3' UTR
序列长度 Length/bp	1 611	285	957	369
SNP 数量 Quantity of SNP	23	4	17	2
SNP 频率 Frequency of SNP	1/70	1/71	1/56	1/185

表 4 *LpDREB* 基因内 SNPs 变异类型

Tab. 4 The substitution type of SNPs in *LpDREB*

基因 Gene	SNP 数量 Quantity of SNP	替换类型 Substitution type					
		转换 Transitions		颠换 Transversions			
		A↔G	T↔C	A↔C	A↔T	G↔C	G↔T
<i>LpDREB</i>	23	3	9	0	2	5	4

2.5 SNPs 引起的氨基酸变异类型

为了检测 *LpDREB* 基因编码区内核苷酸的改变对氨基酸序列是否产生了影响,对 *LpDREB* 基因编码区内的 17 个 SNPs 位点进行了同义突变、非同义突变的分析(表 5)。由表 5 可知:17 个 SNPs 位点中 9 个为同义突变,它们都位于密码子的第 3 个核苷酸上;非同义突变为 8 个,其中错义突变 8 个,无义突变 0 个;同义突变与非同义突变的比值为 1.1(>1)。在 8 个非同义突变中,有 3 个位于密码子的第 1 个核苷酸上,其密码子由原来的 CTC,GCT,CTT 分别转变为 GTC,ACT 和 GTT,氨基酸由原来的亮氨酸(Leu)、丙氨酸(Gla)和亮氨酸(Leu)分别转变为缬氨酸(Val)、苏氨酸(Thr)和

缬氨酸(Val);2 个位于密码子的第 2 个核苷酸上,其密码子由原来的 AAT 和 CTC 转变为 AGT 和 CCC,氨基酸由原来的天冬酰胺(Asn)和亮氨酸(Leu)转变为丝氨酸(Ser)和脯氨酸(Pro);3 个位于密码子的第 3 个核苷酸上,其密码子由原来的 CAT,TTG 和 CAC 转变为 CAA,TTC 和 CAG,氨基酸由原来的组氨酸(His)、亮氨酸(Leu)和组氨酸(His)转变为谷氨酰胺(Gln)、苯丙氨酸(Phe)和谷氨酰胺(Gln)。结果表明,*LpDREB* 基因编码区内存在着丰富的 SNPs,而且近 50% 的 SNPs 导致了氨基酸的改变,这一结果为基于 SNP 水平的牛枝子个体间耐旱机制差异的研究奠定了重要的基础。

表 5 牛枝子 *LpDREB* 基因编码区内 SNPs 的突变类型

Tab. 5 Mutation types of amino acid caused by SNPs in coding regions of *LpDREB*

基因 Gene	编码区长度 Length of coding region/bp	同义突变 Synonymous mutation	非同义突变 Non-synonymous mutation		同义突变/非同义突变 Synonymous mutation/Non-synonymous mutation
			错义突变 Missense mutation	无义突变 Nonsense mutation	
<i>LpDREB</i>	957	9	8	0	1.1

3 结论与讨论

DREB 转录因子在植物抗逆反应中扮演着重要的角色(Liu *et al.*, 1998; Agarwal *et al.*, 2006),迄今为止,尚没有关于 *LpDREB* 基因调控机制的相关报道。目前关于 *DREB* 基因亚族的研究主要集中在

A-1 和 A-2 2 个较大的组中(Liu *et al.*, 1998; Nakashima *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2003a),对于其他成员特点及功能的研究却很少。对 A-5 组成员比如 *PpDBF1*, *GmDREB2* 和 *GhDBF1* (Huang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007)的研究指出,A-5 组同 A-1 组成员都是比较重要的基因资源,

这些基因对提高植物抗逆性具有一定的作用。本研究通过染色体步移技术从牛枝子中分离得到 *LpDREB* 基因序列全长,进化分析表明 *LpDREB* 基因同大豆中的 *GmDREB3* 基因(Chen *et al.*, 2009)进化关系最近,同属于 A-5 组。牛枝子 DREB 蛋白质氨基酸序列同大豆 DREB 蛋白质氨基酸序列同源性分析结果显示,2 个物种的 DREBP/AP2 保守区域具有高度的相似性,而除保守区域的其他区域片段相似性比较低(图 1),可能是由于牛枝子 *LpDREB* 基因同大豆 *GmDREB* 基因亲缘关系较远,也可能是由于同一种基因在不同物种中的进化速率不同引起的。在对 MYB 蛋白家族(Dias *et al.*, 2003)、bHLH 蛋白家族(Atchley *et al.*, 1994)及大豆的 DREB 蛋白家族(Chen *et al.*, 2009)的研究中都出现过相似的结果。

目前关于 *DREB* 基因在逆境胁迫下诱导表达的研究很多,*DREB1A/CBF3* (A-1) 基因被低温诱导表达,而不能被干旱或者高盐诱导,*DREB2A* (A-2) 基因能被干旱和高盐诱导表达,却不能低温诱导。A-1 和 A-2 组的基因不依赖 ABA 信号转导途径(Liu *et al.*, 1998), *TINY2* (A-4), *GhDBP1* (A-5), *GmDREB2* (A-5) 及 *ZmDBF1* (A-6) 都是能被胁迫诱导表达的基因,同时它们是 ABA 依赖型的(Wei *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Kizis *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007)。但是关于植物特定组织诱导表达的研究却很少。曾有研究报道,盐处理后,榆钱菠菜(*Atriplex hortensis*)的 *AhDREB1* 基因(Shen *et al.*, 2003b)在根部被诱导表达,在茎和叶中却不能被诱导表达。逆境胁迫下,大豆中的 *GmDREBa* 和 *GmDREBb* 基因在根、茎、叶中都能被诱导表达,而 *GmDREBc* 基因只能在根部被高度诱导表达(Li *et al.*, 2005)。荧光定量 PCR 结果表明,*LpDREB* 基因在成熟牛枝子的根、茎、叶中具有不同的表达水平,其中根部的表达量最高。干旱胁迫处理后,牛枝子根、茎和叶中 *LpDREB* 基因均被诱导,表达水平呈上升趋势,并且根部达到显著差异水平,这一结果说明牛枝子根部对逆境胁迫的应答响应优于茎和叶。这种结果是比较合理的,因为同茎和叶相比,根部能够较早地响应来自土壤中的胁迫,诱导大量基因表达启动抗逆调控网络,从而使植物适应不良环境继续生存下去。研究植物特定组织诱导表达机制对林木育种具有重要的意义。

在植物基因组中,SNP 被认为是最丰富的且能够稳定遗传的新一代分子标记(Rafalski *et al.*, 2002)。对 *LpDREB* 基因进行 SNPs 检测,该基因非

编码区有 SNPs 位点 6 个,编码区有 17 个,非编码区 SNPs 位点的数量少于编码区,这一结果同前人对人类(Bensen *et al.*, 2003)、大豆(Zhu *et al.*, 2003)和玉米(Ching *et al.*, 2002)的研究结果相反,可能是非编码区未被完全获得,样本量较少或者 *LpDREB* 基因同其他基因相比具有自身的特点,比如热点突变区域多分布在编码区等。23 个 SNPs 位点中转换 12 个,颠换 11 个,比值为 1.09 (<2),同大豆 *DREB* 基因中 SNPs 位点转换与颠换的比例 1:1 相似(Zhu *et al.*, 2003),出现这一结果的原因可能是 SNPs 位点个数较少或者样本量较少。编码区的 17 个 SNPs 位点中,9 个为同义突变,其中只有 1 个位于该基因的保守区域内,说明 *LpDREB* 基因的 DREBP/AP2 区域在生物进化过程中是高度保守的;8 个为错义突变,错义突变的 SNPs 位点导致了氨基酸的改变,这些氨基酸的改变是否引起基因功能的改变,需要进行下一步的表型与基因型的关联分析。牛枝子 *LpDREB* 基因 SNPs 同义突变与非同义突变的比值为 1.1,可能是由于 *LpDREB* 基因受到负向选择压力的作用。

综上所述,牛枝子 *LpDREB* 基因受干旱胁迫被诱导表达,该基因是牛枝子抗旱的重要候选基因。牛枝子 *LpDREB* 基因与大豆 *GmDREB3* 基因亲缘关系最近,同其他物种的 DREB 蛋白质氨基酸序列比较,除保守区域外其余序列片段相似性较低。牛枝子 *LpDREB* 基因中有丰富的 SNPs 位点,这些位点既存在于编码区内,也存在于非编码区内,同时有部分 SNPs 位点导致了氨基酸种类的改变。牛枝子 *LpDREB* 基因的诱导表达特性及大量存在的 SNPs 位点为阐释牛枝子个体间抗旱机制差异提供了重要的分子基础,也为今后林木抗旱基因筛选、抗旱基因的研究及以基因为标记的分子标记辅助选择育种提供了新的思路。

参 考 文 献

- 高 琼,陈晓阳,杜金友,等. 2005. 不同种和种源胡枝子的耐旱性差异研究. 北华大学学报:自然科学版, 6(3): 257-260.
- 李 伟,李 慧,陈晓阳,等. 2007. 利用染色体步移 PCR 检测辐射松的单核苷酸多态性. 西北植物学报, 27(8): 1571-1576.
- 李新荣. 1997. 毛乌素沙地灌木资源区系特征及其保护对策. 自然资源学报, 12(1): 146-152.
- 靳瑞琪,陈晓阳,赵 杨. 2005. 胡枝子属植物的遗传育种研究进展. 西部林业科学, 34(4): 105-110.
- 杨 帆,丁 菲,杜天真. 2010. 盐胁迫下构树 DREB 转录因子基因表达的实时荧光定量 PCR 分析. 林业科学, 46(4): 146-150.
- Agarwal P K, Agarwal P, Reddy M K, *et al.* 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants.

- Plant Cell Reports, 25(12): 126–1274.
- Atchley W, Fitch W, Bronner-Fraser M. 1994. Molecular evolution of the MyoD family of transcription factors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 91(24): 11522–11526.
- Aulchenko Y S, de Koning D J, Haley C. 2007. Genome wide rapid association using mixed model and regression: a fast and simple method for genome wide pedigree-based quantitative trait loci association analysis. Genetics, 177(1): 577–585.
- Bensen J T, Langefeld C D, Hawkins G A, et al. 2003. Nucleotide variation, haplotype structure, and association with end-stage renal disease of the human interleukin-1 gene cluster. Genomics, 82(2): 194–217.
- Bouchabke O, Chang F, Simon M, et al. 2008. Natural variation in *Arabidopsis thaliana* as a tool for highlighting differential drought responses. PLoS one, 3(2): e1705.
- Chen Ming, Xu Zhaoshi, Xia Lanqin, et al. 2009. Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *GmDREB3*, in soybean (*Glycine max* L.). Journal of Experimental Botany, 60(1): 121–135.
- Chen Ming, Wang Qiaoyan, Cheng Xianguo, et al. 2007. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. Biochemical Biophysical Research Communications, 353(2): 299–305.
- Ching A, Caldwell K S, Jung M, et al. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. BMC Genetics, 3: 19.
- Dias A P, Braun E L, McMullen M D, et al. 2003. Recently duplicated maize *R2R3* *Myb* genes provide evidence for distinct mechanisms of evolutionary divergence after duplication. Plant Physiology, 131(2): 610–620.
- Haake V, Cook D, Riechmann J L, et al. 2002. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 130(2): 639–648.
- Huang Bo, Liu Jinyuan. 2006. A cotton dehydration responsive element binding protein functions as a transcriptional repressor of DRE-mediated gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications, 343(4): 1023–1031.
- Ingvasson P K. 2005. Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen (*Populus tremula* L., Salicaceae). Genetics, 169(2): 945–953.
- Kizis D, Pages M. 2002. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. The Plant Journal, 30(6): 679–689.
- Li Xueping, Tian Aiguo, Luo Guangzuo, et al. 2005. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. Theoretical and Applied Genetics, 110(8): 1355–1362.
- Liu Ning, Zhong Naiqin, Wang Guiling, et al. 2007. Cloning and functional characterization of *PpDBF1* gene encoding a DRE-binding transcription factor from *Physcomitrella patens*. Planta, 226(4): 827–838.
- Liu Qiang, Kasuga M, Sakuma Y, et al. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. Plant Cell, 10(8): 1391–1406.
- Murray M G, Thompson W R. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8(19): 4321–4325.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants. Plant Physiology, 126(1): 62–71.
- Rafalski A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. Current Opinion in Plant Biology, 5(2): 94–100.
- Riechmann J L, Meyerowitz E M. 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors. Journal of Biological Chemistry, 273(6): 633–646.
- Saleh A, Lumberras V, Lopez C, et al. 2006. Maize DBF1-interactor protein 1 containing an R3H domain is a potential regulator of DBF1 activity in stress responses. The Plant Journal, 46(5): 747–757.
- Shen Y G, Zhang W K, He S J, et al. 2003a. An EREBP/AP2 type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. Theoretical and Applied Genetics, 106(5): 923–930.
- Shen Y G, Zhang W K, Yan D Q, et al. 2003b. Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis*. Theoretical and Applied Genetics, 107(1): 155–161.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal of Experimental Botany, 58(2): 221–227.
- Wang Qinyun, Guan Yucheng, Wu Yaorong, et al. 2008. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. Plant Molecular Biology, 67(6): 589–602.
- Wei Gang, Pan Yi, Lei Juan, et al. 2005. Molecular cloning, phylogenetic analysis, expressional profiling and in vitro studies of TINY2 from *Arabidopsis thaliana*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 38(4): 440–446.
- Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, et al. 2003. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. Genetics, 163(3): 1123–1134.

(责任编辑 徐 红)

分析

作者: [李静](#), [袁虎威](#), [李伟](#), [Li Jing](#), [Yuan Huwei](#), [Li Wei](#)
作者单位: [北京林业大学 林木育种国家工程实验室 林木花卉遗传育种教育部重点实验室 北京 100083](#)
刊名: [林业科学](#) 
英文刊名: [Scientia Silvae Sinicae](#)
年, 卷(期): 2012, 48 (6)
被引用次数: 1次

参考文献(32条)

1. [高琼, 陈晓阳, 杜金友, 李伟, 郝霞](#) [不同种和种源胡枝子的耐旱性差异研究](#)[期刊论文]-[北华大学学报 \(自然科学版\)](#) 2005 (3)
2. [李伟, 李慧, 陈晓阳, WU Harry](#) [利用染色体步移PCR检测辐射松的单核苷酸多态性](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#) 2007 (8)
3. [李新荣](#) [毛乌素沙地灌木资源区系特征及其保护对策](#)[期刊论文]-[自然资源学报](#) 1997 (2)
4. [骈瑞琪, 陈晓阳, 赵杨, 胡冬南, 陈佳](#) [胡枝子属植物的遗传育种研究进展](#)[期刊论文]-[西部林业科学](#) 2005 (4)
5. [杨帆, 丁菲, 杜天真](#) [盐胁迫下构树DREB转录因子基因表达的实时荧光定量PCR分析](#)[期刊论文]-[林业科学](#) 2010 (4)
6. [Agarwal P K; Agarwal P; Reddy M K](#) [Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants](#) 2006 (12)
7. [Atchley W; Fitch W; Bronner-Fraser M](#) [Molecular evolution of the MyoD family of transcription factors](#) 1994 (24)
8. [Aulchenko Y S; de Koning D J; Haley C](#) [Genome wide rapid association using mixed model and regression: a fast and simple method for genome wide pedigree-based quantitative trait loci association analysis](#) 2007 (01)
9. [Bensen J T; Langefeld C D; Hawkins G A](#) [Nucleotide variation, haplotype structure, and association with end-stage renal disease of the human interleukin-1 gene cluster](#) 2003 (02)
10. [Bouchabke O; Chang F; Simon M](#) [Natural variation in Arabidopsis thaliana as a tool for highlighting differential drought responses](#) 2008 (02)
11. [Chen Ming; Xu Zhaoshi; Xia Lanqin](#) [Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, GmDREB3, in soybean \(Glycine max L.\)](#) 2009 (01)
12. [Chen Ming; Wang Qiaoyan; Cheng Xianguo](#) [GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants](#) 2007 (02)
13. [Ching A; Caldwell K S; Jung M](#) [SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines](#) 2002
14. [Dias A P; Braun E L; McMullen M D](#) [Recently duplicated maize R2R3 Myb genes provide evidence for distinct mechanisms of evolutionary divergence after duplication](#) 2003 (02)
15. [Haake V; Cook D; Riechmann J L](#) [Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis](#) 2002 (02)
16. [Huang Bo; Liu Jinyuan](#) [A cotton dehydration responsive element binding protein functions as a transcriptional repressor of DRE-mediated gene expression](#) 2006 (04)

17. [Ingvarsson P K](#) [Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen\(Populus tremulo L,Salicaceae\)](#) 2005(02)
18. [Kizis D;Pages M](#) [Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway](#) 2002(06)
19. [Li Xueping;Tian Aiguo;Luo Guangzuo](#) [Soybean DREbinding transcription factors that are responsive to abiotic stresses](#) 2005(08)
20. [Liu Ning;Zhong Naiqin;Wang Guiling](#) [Cloning and functional-characterization of PpDBFI gene encoding a DRE-binding transcription factor from Physcomitrella patens](#) 2007(04)
21. [Liu Qiang;Kasuga M;Sakuma Y](#) [Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain sparate two cellular signal transduction pathways in drought and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis](#) 1998(08)
22. [Murray M G;Thompson W R](#) [Rapid isolation of high molecular weight plant DNA](#) 1980(19)
23. [Nakeshima K;Yamaguchi-Shinozaki K](#) [Regulons involved in osmotic stress-responsive and cold stress-responsive gene expression in plants](#) 2006(01)
24. [Rafalski A](#) [Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics](#) 2002(02)
25. [Riechmann J L;Meyerowitz E M](#) [The AP2/EREBP family of plant transcription factors](#) 1998(06)
26. [Saleh A;Lumbreras V;Lopez C](#) [Maize DBF1-interactor protein I containing an R3H domain is a potential regulator of DBF1 activity in stress responses](#) 2006(05)
27. [Shen Y G;Zhang W K;He S J](#) [An EREBP/AP2 type protein in Triticum aeattivum was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress](#) 2003(05)
28. [Shen Y G;Zhang W K;Yan D Q](#) [Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte Atriplex hortensis](#) 2003(01)
29. [Shinozaki K;Yamaguchi-Shinozaki K](#) [Gene networks involved in drought stress response and tolerance](#) 2007(02)
30. [Wang Qiuyun;Guan Yucheng;Wu Yaorong](#) [Overexpression of a rice OsDREB1 F gene increases salt, drought and low temperature tolerance in both Arabidopsis and rice](#) 2008(06)
31. [Wei Gang;Pan Yi;Lei Juan](#) [Molecular cloning, phylogenetic analysis, expressional prowling and in vitro studies of TINY2 fom Arabidopsis thaliana](#) 2005(04)
32. [Zhu Y L;Song Q J;Hyten D L](#) [Single-nucleotide polymorphisms in soybean](#) 2003(03)

引证文献(1条)

1. [徐丽,陈新,张力思,魏海蓉,刘庆忠](#) [核桃JrCBF基因的克隆与表达和单核苷酸多态性分析](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2014(02)

引用本文格式: [李静.袁虎威.李伟.Li Jing.Yuan Huwei.Li Wei](#) [牛枝子抗旱候选基因LpDREB的克隆与表达及单核苷酸多态性分析](#)[期刊论文]-[林业科学](#) 2012(6)