

· 研究报告 ·

谷子bZIP转录因子的全基因组鉴定及其在干旱和盐胁迫下的表达分析

刘宝玲¹, 张莉¹, 孙岩², 薛金爱¹, 高昌勇¹, 苑丽霞¹, 王计平¹, 贾小云², 李润植^{1*}

¹山西农业大学分子农业与生物能源研究所, 太谷 030801; ²山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801

摘要 bZIP蛋白是植物转录因子中最大和最保守的一类转录因子, 参与调控植物生长发育等多种生命活动。谷子(*Setaria italica*)是一种重要的C4杂粮作物, 其bZIP基因家族与功能报道较少。利用生物信息学工具, 从谷子全基因组中鉴定出73个SibZIP转录因子, 划分为A、B、C、D、E、G、H、I和X等亚家族。与已测序的禾谷类作物相比, 谷子SibZIP基因家族在进化中发生缩减。在谷子SibZIP蛋白中检测到25种不同的保守氨基酸基序。RNA-seq和定量PCR检测结果表明, 在干旱和盐胁迫条件下, 多数SibZIPs基因不同程度地被诱导表达, 预示着部分SibZIP成员在谷子干旱和盐胁迫响应中起重要作用。共表达关联性分析进一步揭示19个谷子SibZIP转录因子可通过与蛋白激酶或NPR1相关调节蛋白等互作介导谷子胁迫响应。研究结果为全面解析谷子SibZIPs基因结构与生物学功能、抗旱分子机制以及分子育种提供了新信息。

关键词 谷子, SibZIP, 全基因组鉴定, 干旱和盐胁迫, 表达分析

刘宝玲, 张莉, 孙岩, 薛金爱, 高昌勇, 苑丽霞, 王计平, 贾小云, 李润植 (2016). 谷子bZIP转录因子的全基因组鉴定及其在干旱和盐胁迫下的表达分析. 植物学报 51, 473–487.

碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)转录因子是众多转录因子中一类数目最庞大、最保守的基因家族, 遍布动植物等真核生物基因组, 在诸如病原菌入侵、干旱及盐胁迫应答等多种生物和非生物胁迫反应中起重要的调控作用(Lee et al., 2006)。有关bZIP蛋白鉴定及功能分析是众多生物后基因组研究的一个活跃领域。

植物bZIP蛋白具有典型的二聚体结构特征, 其C端有1个碱性氨基酸区, N端有1个亮氨酸拉链(曹红利等, 2012; 朱芸晖等, 2014), 二者构成保守的bZIP结构域。碱性氨基酸区由16–20个保守的氨基酸残基组成, 含有用于细胞核定位的区域和紧随其后用于识别DNA的结构域。亮氨酸拉链区是由2个典型的 α 螺旋构成, 每个 α 螺旋中每隔6个氨基酸残基就有1个亮氨酸(Leu)或者其它疏水性的异亮氨酸、缬氨酸和甲硫氨酸等。具有较强疏水性基团的亮氨酸可使这2个 α 螺旋在bZIP蛋白与DNA结合之前常发生二聚化, 形成同源或异源二聚体(Singh et al., 2002)。能与bZIP转录因子结合的DNA顺式元件包括比较保守的ACGT核

心基序(Lee et al., 2006)、常见的G-box (CACGTG)、C-box (CACGTC)和A-box (TACGTA) (杨颖等, 2009; Baloglu et al., 2014; Jin et al., 2014)。

众多研究表明, 植物bZIP转录因子在种子发育(Izawa et al., 1994; Toh et al., 2012)、花发育(Chuang et al., 1999; Abe et al., 2005; Gibalova et al., 2009; Iven et al., 2010)、碳氮能量代谢以及生物和非生物胁迫反应等生命过程中行使重要的调控功能(Wang et al., 2011), 尤其是生长在逆境中的植物依赖于bZIP转录因子的调控作用, 表现出较强的抗病、抗盐及抗旱等抗逆性。在逆境胁迫条件下, bZIP转录因子参与脱落酸(ABA)应答, 它与相应的ABRE结合因子(ABFs)或ABRE结合蛋白(AREBs)相互作用来调节下游靶基因的转录表达(Guiltinan et al., 1990; Fujita et al., 2005)。迄今为止, 完整的bZIP转录因子家族已在诸多高等植物中被鉴定。例如, 模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)具有75个bZIPs转录因子, 在水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、高粱(*Sorghum bicolor*)、大豆(*Glycine max*)和番茄(*Lycopersicon*

收稿日期: 2015-08-18; 接受日期: 2016-03-25

基金项目: 国家948项目(No.2014-Z39)、山西省煤基重点科技攻关项目(No.FT-2014-01)、山西省回国留学人员科研基金(No.2015-064)和国家自然科学基金(No.31401430, No.31201266, No.31501323)

* 通讯作者。E-mail: rli2001@126.com

persicon esculentum)等基因组中也已分别发现89、125、92、131和70个bZIP转录因子。依据结构特征,这些植物的bZIP蛋白可细分为10个亚族。特别是经研究发现,1/3的大豆GmbZIPs参与调控4种逆境(即ABA、高盐、干旱和低温)中1种以上的胁迫反应(Liao et al., 2008)。另外,在水稻(Schwechheimer et al., 1998)、番茄(Stankovic et al., 2000)和玉米等作物功能基因组研究中均有类似发现。

谷子(*Setaria italica*)是二倍体C4作物,具有耐旱性强、水分利用率高和蒸腾系数低等生物学特性,是发掘抗旱基因和研究作物抗旱分子机制的优异种质资源。特别是谷子全基因组测序(Bennetzen et al., 2012; Zhang et al., 2012)和一些转录组测序的完成(Xu et al., 2013),为其功能基因组学研究提供了良好的数据平台。为系统解析谷子bZIP转录因子家族成员特征及生物学功能,本研究在谷子全基因组范围内对bZIP序列进行鉴定,共得到73个谷子SibZIP转录因子。利用生物信息学工具,对这些SibZIP转录因子家族成员进行分类、系统进化、氨基酸保守域和蛋白功能域分析。结合RNA-seq和qPCR技术检测谷子SibZIP基因在干旱和盐胁迫条件下的表达谱,以期发现一些在植物抗逆性表征中起重要作用的bZIP转录因子及其相关基因,为谷子功能基因组学研究和新品种培育提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

谷子SibZIPs基因组序列、编码序列和蛋白序列来源于Phytozome和PlantTFdb数据库。晋谷21 (*Setaria italica* L. Beauv. 'Jingu 21')种植于山西农业大学农学院实验农场。

1.2 实验方法

1.2.1 SibZIP转录因子序列的获取与鉴定

首先从Phytozome *Setaria italica* v2.1 (Foxtail millet)数据库(<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)和plantTFdb数据库(<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>)下载谷子104条SibZIP转录因子的氨基酸序列,利用Clustal W对所下载的序列进行多序列比对,人工去除27条冗余序列和4条读码框不完整的序列,最后确

定为73条SibZIPs转录因子基因和蛋白序列。为确保所获取的谷子SibZIP转录因子序列的可靠性和有效性,利用在线SMART数据库(Schultz et al., 1998) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和InterPro-Scan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan>)对这些转录因子的氨基酸序列进行保守域检测,确定所得到的SibZIPs转录因子蛋白序列都含有真实的bZIP保守结构域。

1.2.2 SibZIP蛋白序列的比对和系统发育树的构建

利用MEGA 6.0软件对上述73条SibZIPs氨基酸序列进行Clustal W多序列比对,生成.meg格式文件,然后采用邻接法(neighbor joining, NJ)进行聚类分析并构建系统进化树。其中Model设置为p-distance, Bootstrap值设为1 000,其余参数为默认。

1.2.3 干旱和盐胁迫处理及取样

在旱棚内用60 cm × 40 cm × 8 cm的塑料箱装入过筛砂质土壤,选取抗旱性较强的优质晋谷21进行种植。土壤湿度为田间持水量的70%,待幼苗长到三叶一心时,用20%PEG6000溶液倒入土壤中进行处理,分别在处理后0、1、6、12和24小时采集植株的第3片叶作为样品,存于液氮中冷冻备用。以未处理谷子材料作为对照(CK)。同样,选择生长发育表型一致的三叶一心幼苗,每箱浇1 L的500 mmol·L⁻¹ NaCl溶液进行盐胁迫处理,处理6小时,取幼苗植株的第3片叶,将其剪下后放入液氮速冻,并在-80℃冰箱中保存备用。

1.2.4 总RNA抽提、反转录合成cDNA和qRT-PCR

采用Trizol法标准流程提取叶片总RNA,纯度检验合格后用于实验。每份RNA样品取1 μg,按照全式金公司的反转录试剂盒的操作说明进行反转录得到cDNA。以cDNA为模板,进行实时荧光定量PCR,反应在Applied Biosystems Step One Real-time PCR System中进行。10 μL反应体系中包括3 μL cDNA, 5 μL 2 × TransStart Top Green qPCR SuperMix, 0.2 μL Passive Reference Dye I, 0.4 μL基因特异性引物(表1)及1.4 μL ddH₂O。反应程序如下: 95℃30秒; 95℃5秒, 60℃20秒; 40个循环。以谷子18S rRNA基因为内参基因, bZIP基因的相对表达量使用2^{-ΔΔCt}

表1 谷子 *SibZIP* 基因实时荧光定量PCR分析所用引物**Table 1** List of primers used in quantitative real-time PCR analysis of *SibZIP* genes of *Setaria italica*

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
18S rRNA	CCACAGATTGAAAACCGCATTA	ACCTCCCACCAGCAGAACC
<i>SibZIP2</i>	ATGGGACAGATGGCGATGG	AAGAGCACGCAGCCGAGA
<i>SibZIP3</i>	ATGAGCTGCATTGGCAACG	CTCCTTGAGATGGTTTCAGTTCCG
<i>SibZIP7</i>	GCCGTCCGACCACAACAG	CCTCTTGACACGCTTGGGA
<i>SibZIP8</i>	CCCCAACAATCTCAGGGAAGG	GAGCGTGTTGTTCTCGTTCTGG
<i>SibZIP21</i>	CCAGTCCTCCTCCTGCTCC	CTCCATCACCAGGTCCTTCTCC
<i>SibZIP24</i>	ACGAGAAGGCCGAGCTGG	TGGTGCTGGTGGTGTGTTG
<i>SibZIP37</i>	TACGCCCGATGGTTAGAAGA	ATCGATCAGCCGTCGTTG
<i>SibZIP45</i>	GTAGCCCCGAGCCCTGACA	AGCTCGCGGTCAAGGTC
<i>SibZIP51</i>	AATCCCTCGGCTAAAA	ACCCACAAAGCATCACAAGG
<i>SibZIP57</i>	GGCATCAGCACAGCCAGT	CCTGTCCTGTCGCTACCTTCA
<i>SibZIP60</i>	CTCAAACCCAGCATTCCA	GCTCATCCTCTGCCATCACC
<i>SibZIP73</i>	AGCGTGGGCAGGGTAAATG	CAGGAGCACCCCAGTAATCTAC

法(Baloglu et al., 2014)进行计算。采用Duncan检验法进行差异显著性分析。

1.2.5 干旱和盐胁迫条件下*SibZIP*表达谱分析

选取上述谷子干旱和盐胁迫处理6小时的叶片以及对照叶片,分别提取高质量的总RNA,构建cDNA文库用于RNA-seq检测。RNA-seq测序和分析由百迈客生物科技有限公司采用Illumina HiSeq 2000平台完成。使用NGSQCToolkit v2.3.3软件去除原始序列中低质量和包含模糊碱基的reads。利用TopHat 2.0.0软件调用bowtie 2将高质量的reads比对到谷子参考序列(*Setaria italica* v2.1)上。以Cufflinks 2.0.0软件对所获得高质量reads进行依赖于谷子基因注释GFF文件的转录组组装,分析谷子干旱和盐处理以及对照样品中所有转录本的表达量,以每百万map上的reads中map到外显子的每千个碱基上的reads数表示(reads per kilobase of exon per million mapped reads, RPKM)。选取73个*SibZIPs*的表达量数据,用MeV 4.8.1软件对谷子*SibZIP*转录因子基因表达数据进行聚类分析并绘制热图(hierarchical clustered heat map)。

2 结果与讨论

2.1 *SibZIPs*转录因子的鉴定

应用HMMER 3.0软件,以bZIP相关结构域为索引序

列,对Phytozome中谷子基因组数据库进行全基因组搜索,共找到104个含有bZIP结构域的候选*SibZIPs*转录因子。利用Clustal W软件对这些谷子*SibZIPs*蛋白序列进行多序列比对,并人工去除27个冗余序列和4个不完整读码框序列。余下的候选*SibZIPs*再经InterProScan数据库和SMART数据库进一步搜索鉴定,最终确认73个*SibZIPs*转录因子中bZIP结构域为真。将这73个非冗余*SibZIPs*转录因子依次编号为*SibZIP1-73*(表2)。谷子*SibZIP*基因数目与模式植物拟南芥*bZIP*基因数目(去冗余之后为75)相近。然而,与禾谷类作物中二倍体水稻(去冗余后为104)相比,谷子*SibZIPs*基因数目减少了31个。玉米*bZIP*基因为125个(Wei et al., 2012),高粱为92个(Wang et al., 2011),大麦为89个(Pourabed et al., 2015)。谷子bZIP基因数目明显少于其它已测序的禾谷类作物,预示着在漫长进化过程中,谷子*bZIP*基因家族出现缩减。

谷子*SibZIP*转录因子家族成员的氨基酸序列平均长度为370 aa。其中*SibZIP51*蛋白序列最长,为645 aa; *SibZIP68*蛋白序列最短,只有70 aa。EXPASy分析表明,谷子*SibZIP*各蛋白的理论等电点为4.69-12.08,分子量介于8.263-68.096 kDa之间(表2)。可见,谷子*SibZIP*转录因子家族各成员理化性质差异较大,其功能多样性可能较丰富。

根据表2中染色体定位数据, *SibZIP*基因在各染

表2 谷子 *SibZIPs* 基因家族成员Table 2 Members of the *SibZIPs* gene family in *Setaria italica*

Gene name	Phytozome identifier	Chromosome location (bp)	Protein length (aa)	Theoretical pI	Molecular weight (Da)	Phylogeny group	NCBI accession No.
<i>SibZIP1</i>	Si000955m	Chr.5: 42034648–42041849	538	6	58030.2	D	XP_004970651
<i>SibZIP2</i>	Si001292m	Chr.5: 39537137–39542647	473	6	51362.5	D	XP_004970302
<i>SibZIP3</i>	Si001731m	Chr.5: 42027056–42028626	399	6	42138.5	A	XP_004970655
<i>SibZIP4</i>	Si001929m	Chr.5: 31392517–31397217	368	9	39273.7	G	XP_004969366
<i>SibZIP5</i>	Si002173m	Chr.5: 39683613–39687077	333	9	36026.4	A	XP_004970325
<i>SibZIP6</i>	Si002192m	Chr.5: 3576665–3581966	330	7	36678.2	D	XP_004967673
<i>SibZIP7</i>	Si002311m	Chr.5: 13207621–13209504	314	6	34130.9	E	XP_004968609
<i>SibZIP8</i>	Si002989m	Chr.5: 10278963–10280748	196	10	20861.9	H	XP_004968380
<i>SibZIP9</i>	Si003247m	Chr.5: 42311957–42314982	147	10	16539.8	A	XP_002458823
<i>SibZIP10</i>	Si003289m	Chr.5: 246101970–24611764	140	9	15506.5	C	XP_004968894
<i>SibZIP11</i>	Si006417m	Chr.4: 33420130–33425120	449	9	48149.5	D	XP_004965885
<i>SibZIP12</i>	Si006667m	Chr.4: 11743965–11745864	379	8	41521.2	D	XP_004966886
<i>SibZIP13</i>	Si006889m	Chr.4: 6541497–4646365	325	9	35254.3	A	XP_004964902
<i>SibZIP14</i>	Si006978m	Chr.4: 33015635–33017728	303	5	32514.6	B	XP_004965858
<i>SibZIP15</i>	Si007043m	Chr.4: 30527846–30530681	285	6	30388.8	C	XP_004965642
<i>SibZIP16</i>	Si007412m	Chr.4: 39706531–39709069	157	9	17268.5	A	XP_004966480
<i>SibZIP17</i>	Si007892m	Chr.4: 12607851–12608351	167	9	18839.9	C	XP_004965226
<i>SibZIP18</i>	Si010177m	Chr.7: 31096934–31105294	427	7	47577	D	XP_004976974
<i>SibZIP19</i>	Si010440m	Chr.7: 32666098–32669917	359	9	39895	E	XP_004977157
<i>SibZIP20</i>	Si010549m	Chr.7: 33666577–33670528	335	6	36005.8	I	XP_004977320
<i>SibZIP21</i>	Si012481m	Chr.7: 34001430–34002276	185	9	19986.3	X	XP_004978331
<i>SibZIP22</i>	Si013904m	Chr.6: 30497939–30500723	390	6	41467.1	A	XP_004973666
<i>SibZIP23</i>	Si013962m	Chr.6: 3422261–3424756	367	7	40266.7	D	XP_004972733
<i>SibZIP24</i>	Si014433m	Chr.6: 31421965–31422818	219	9	23535.9	C	XP_004973757
<i>SibZIP25</i>	Si014523m	Chr.6: 21075712–21078072	175	9	19443.7	C	XP_004973271
<i>SibZIP26</i>	Si014546m	Chr.6: 35057931–35059283	169	9	18500.6	A	XP_004974151
<i>SibZIP27</i>	Si014861m	Chr.6: 34473052–34479032	553	8	60827.5	D	XP_004978700
<i>SibZIP28</i>	Si017618m	Chr.1: 39059405–39061854	357	6	38234.6	A	XP_004954028
<i>SibZIP29</i>	Si017637m	Chr.1: 8783667–8786862	354	5	37572.7	G	XP_004952026
<i>SibZIP30</i>	Si017778m	Chr.1: 6341933–6345399	325	6	34446.2	C	XP_004951739
<i>SibZIP31</i>	Si018161m	Chr.1: 1679857–1681771	252	6	26940.2	E	XP_004951321
<i>SibZIP32</i>	Si018524m	Chr.1: 4311195–4313806	167	10	18441.4	H	XP_004951525
<i>SibZIP33</i>	Si019099m	Chr.1: 5311182–5311658	158	6	18128.3	C	XP_008645357
<i>SibZIP34</i>	Si019656m	Chr.1: 8856565–8857280	101	12	11586.4	C	XP_006362088
<i>SibZIP35</i>	Si019897m	Chr.1: 36896832–36897341	169	8	19639.9	C	XP_004953778
<i>SibZIP36</i>	Si021442m	Chr.3: 20717700–20721220	645	9	68096.2	B	XP_004962093
<i>SibZIP37</i>	Si022106m	Chr.3: 18527822–18531435	431	6	48135.2	D	XP_004961926
<i>SibZIP38</i>	Si022325m	Chr.3: 5860297–5865473	384	7	40757.5	G	XP_004960729
<i>SibZIP39</i>	Si022331m	Chr.3: 48207088–48212169	383	6	41545.1	C	XP_004963102
<i>SibZIP40</i>	Si022388m	Chr.3: 9871788–9876447	373	9	39693.2	G	XP_004961173
<i>SibZIP41</i>	Si022626m	Chr.3: 14850120–14852158	331	8	36509.2	D	XP_004961656
<i>SibZIP42</i>	Si022639m	Chr.3: 15026867–15029429	328	5	35423.8	A	XP_004961686
<i>SibZIP43</i>	Si023448m	Chr.3: 19115835–19117133	170	9	18373.5	A	XP_004961973
<i>SibZIP44</i>	Si023541m	Chr.3: 42857978–42859308	149	7	16621.5	C	XP_004962768
<i>SibZIP45</i>	Si023562m	Chr.3: 3146171–3147458	145	9	15989	C	XP_004960384
<i>SibZIP46</i>	Si024325m	Chr.3: 50281135–50281679	175	11	19023.7	C	XP_004964234

表2 (续) Table 2 (continued)

Gene name	Phytozome identifier	Chromosome location (bp)	Protein length (aa)	Theoretical pI	Molecular weight (Da)	Phylogeny group	NCBI accession No.
<i>SibZIP47</i>	Si026421m	Chr.8: 2241219–2245356	418	6	45444.7	D	XP_004978700
<i>SibZIP48</i>	Si026452m	Chr.8: 2350696–2353211	403	7	42267.1	X	XP_004978712
<i>SibZIP49</i>	Si026561m	Chr.8: 12073275–12076909	357	9	39171.5	E	XP_004979095
<i>SibZIP50</i>	Si026605m	Chr.8: 3317921–3321817	336	7	35850.7	I	XP_004978752
<i>SibZIP51</i>	Si029351m	Chr.2: 46950969–46953724	571	6	60447.1	B	XP_004958502
<i>SibZIP52</i>	Si029606m	Chr.2: 35632657–35640776	497	7	55157.1	D	XP_004957190
<i>SibZIP53</i>	Si029966m	Chr.2: 24028261–24036295	417	8	46056.5	D	XP_004956460
<i>SibZIP54</i>	Si029970m	Chr.2: 4745736–4748783	416	5	45187.2	C	XP_004955660
<i>SibZIP55</i>	Si030114m	Chr.2: 33169494–33171523	390	9	41890.8	A	XP_004957010
<i>SibZIP56</i>	Si030123m	Chr.2: 7037626–7041762	389	7	39918.8	G	XP_004955801
<i>SibZIP57</i>	Si030182m	Chr.2: 37345091–37349203	378	6	40638.3	I	XP_004957354
<i>SibZIP58</i>	Si030224m	Chr.2: 48343483–48348262	371	6	39761.6	I	XP_004958698
<i>SibZIP59</i>	Si031077m	Chr.2: 38684243–38685591	216	9	22457.3	A	XP_004957504
<i>SibZIP60</i>	Si031238m	Chr.2: 34573960–34574626	181	7	20285.7	C	XP_004957101
<i>SibZIP61</i>	Si031353m	Chr.2: 25296856–25298971	159	9	17806.8	C	XP_004956521
<i>SibZIP62</i>	Si032429m	Chr.2: 1879467–1880494	315	10	33579.7	C	XP_004958923
<i>SibZIP63</i>	Si032507m	Chr.2: 37624846–37627738	482	10	50744.7	I	XP_002460540
<i>SibZIP64</i>	Si035062m	Chr.9: 3209713–3215709	541	5	56605	C	XP_004981429
<i>SibZIP65</i>	Si035841m	Chr.9: 57321111–57323641	423	6	45305.5	I	XP_004985885
<i>SibZIP66</i>	Si036380m	Chr.9: 47061608–47065486	353	6	38129.3	I	XP_004984459
<i>SibZIP67</i>	Si036527m	Chr.9: 47985071–47991293	335	9	37389.2	D	XP_004984573
<i>SibZIP68</i>	Si038381m	Chr.9: 47741259–47744465	70	10	8263.2	A	XP_004987020
<i>SibZIP69</i>	Si039367m	Chr.9: 2420394–2422861	344	6	36158.7	G	XP_004981331
<i>SibZIP70</i>	Si039558m	Chr.9: 9034726–9035118	131	12	14050	C	XP_004986317
<i>SibZIP71</i>	Si039566m	Chr.9: 40545110–40547482	375	8	40649.5	I	XP_004983840
<i>SibZIP72</i>	Si039895m	Chr.9: 48442410–48442913	167	10	18179	C	XP_004987029
<i>SibZIP73</i>	Si040286m	Chr.9: 51600068–51604903	381	9	40899.1	G	XP_004985055

色体间分布不平衡, 其中第2号染色体*SibZIP*基因数目最多, 占总数的18%; 第7和第8号染色体上基因数目最少, 约占5%。在玉米(Wei et al., 2012)、水稻(Nijhawan et al., 2008)和葡萄(*Vitis vinifera*) (Liu et al., 2014)中*bZIP*基因家族也都有类似的染色体间分布不平衡的规律。

2.2 SibZIPs的分类与系统发育分析

利用MEGA 6.0软件分析73个谷子*SibZIPs*转录因子系统进化关系, 采用邻接法构建系统发育树。用于此项分析的参照序列为11个具典型特征的拟南芥*AtbZIP*转录因子, 包括GroupA (*AtbZIP12*)、GroupB (*AtbZIP17*)、GroupC (*AtbZIP9*)、GroupD (*AtbZIP20*)、GroupE (*AtbZIP34*)、GroupF (*AtbZIP19*)、GroupG (*AtbZIP41*)、GroupH (*AtbZIP56*)、GroupI

(*AtbZIP59*)、GroupS (*AtbZIP2*)和GroupU (*AtbZIP62*) (Jakoby et al., 2002)。根据拟南芥*AtbZIP*转录因子的分类标准, 将谷子73个*SibZIPs*转录因子家族成员分为9个亚家族, 即A、B、C、D、E、G、H、I和X (图1)。这9个亚家族各自所包含的*SibZIP*基因数目分别为13、3、20、14、4、7、2、8和2。谷子中没有一个*SibZIP*转录因子与拟南芥F族的*AtbZIP19*聚在一起, 即谷子*SibZIP*转录因子缺失F亚家族, 可能该亚家族的基因在谷子基因组进化或人工驯化过程中发生了丢失。从保守域和系统发育分析看, 属于C亚族的拟南芥*AtbZIP9*与谷子C亚族的*SibZIP15*、35、54、64和39聚在一起, 这些*bZIP*成员除具有C亚族共有的motif 1和motif 5外, 还具有独特的motif 11。属于S亚族的拟南芥*AtbZIP2*由于具有motif 1和motif 5而与谷子C亚族其它成员聚在一起。另外, 谷子的*Sib-*

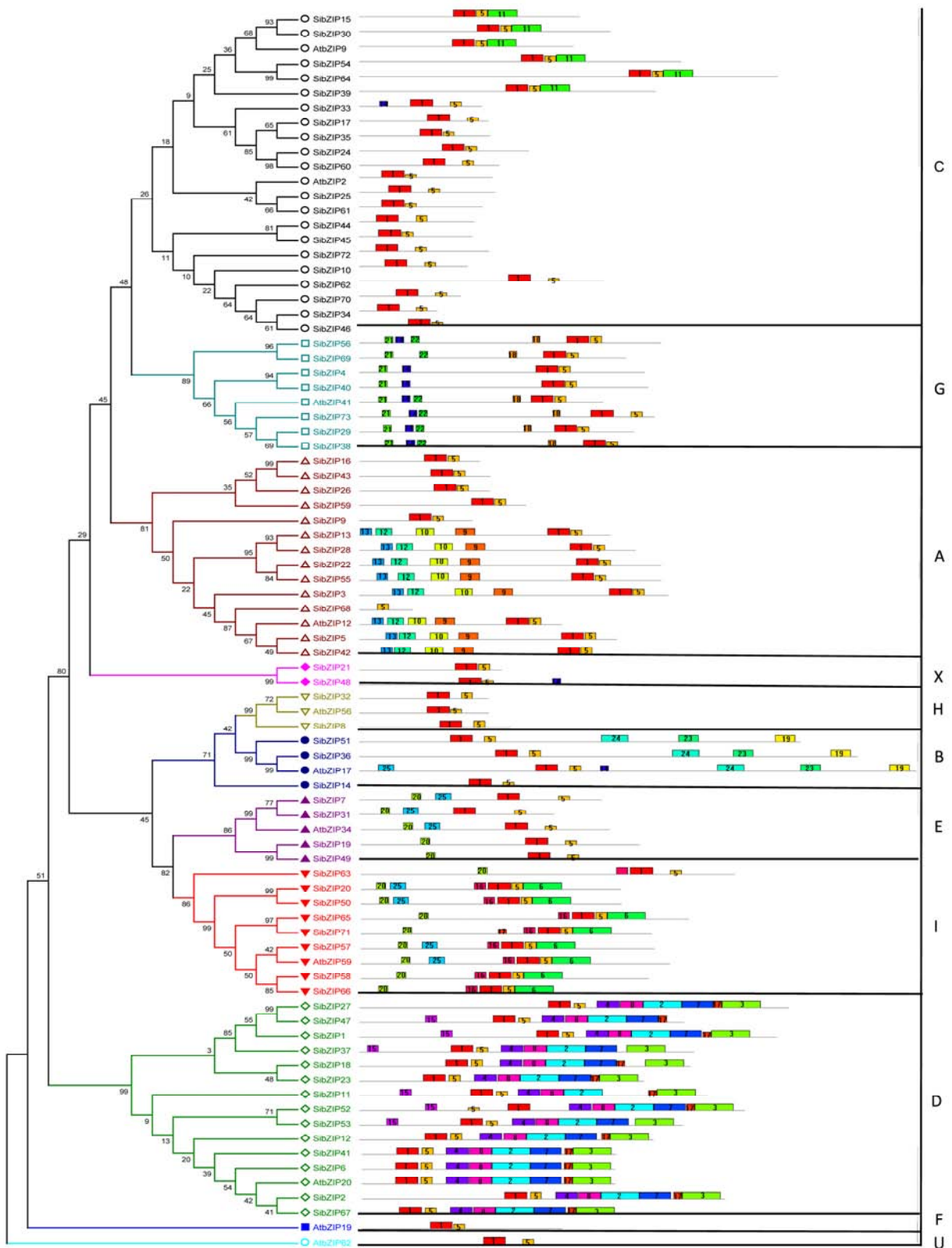


图1 谷子73条SibZIPs蛋白序列的MEME保守基序分析及系统发育树

Figure 1 The MEME conserved motifs analysis and phylogenetic tree of 73 SibZIPs protein sequences of *Setaria italica*

ZIP21和SibZIP48单独聚在一起, 没有与任何拟南芥典型的AtbZIP成员聚合, 组成一新亚家族, 命名为X亚族。谷子出现这一新bZIP亚家族的进化因素及机理还有待研究。

以拟南芥bZIP转录因子家族分组系统为参考, 基于bZIP与DNA结合的专一性、自身碱性区和拉链结构域的特殊性及氨基酸基序的保守性, 已有研究对水稻、大豆、番茄和蓖麻(*Ricinus communis*)等物种的bZIP转录因子家族作了类似的分类分析。Jakoby等(2002)根据拟南芥保守域数目及与bZIP结构域的位置关系, 将75个AtbZIPs分为A-I及S共10个亚家族。Liao等(2008)据此并结合大豆bZIP基因内含子数目及位置等结构特征, 将大豆基因组的131个GmbZIPs转录因子分为10个亚家族。以此模式, 番茄的70个SibZIPs转录因子被划分为14个亚族, 即A-L和S族, 再加一个独特的X亚族(朱芸晔等, 2014)。Nijhawan等(2008)依据保守域和DNA结合域将水稻的89个OsbZIPs转录因子划分为11个亚类(I-XI)。Jin等(2014)根据基因结构、DNA结合域、保守域和进化关系将蓖麻的49个RcbZIPs分为I-XI类11个亚家族。

各植物bZIP家族分组及亚家族名称编排方式不尽相同, 不同物种间亚家族的结构特征具有保守性。例如, 拟南芥D亚族和水稻第III亚族的保守域均已被识别并结合相应DNA的TGA序列。谷子单独聚为新X亚家族的SibZIP21和SibZIP48的序列特征与水稻和蓖麻的XI亚族有相似的DNA结合域。

2.3 SibZIP蛋白氨基酸序列保守域分析

bZIP转录因子蛋白包含很多保守序列, 这些保守序列可能与DNA分子上某些部位相结合, 或者在激活bZIP基因进行特殊表达的过程中起重要作用。为了识别谷子SibZIP家族成员的潜在保守域, 利用在线保守域序列分析软件MEME, 对谷子73个SibZIP蛋白保守域进行预测性分析。从谷子SibZIP中检测到25个不同的保守基序(图1)。位于同一进化支(亚家族)的各个SibZIP蛋白含有保守基序的类别及其位置大体一致, 不同进化支的SibZIP蛋白保守基序种类及其位置差异较大(图1)。Motif 1 ([EP][KR]RL[RK]R[MLK][AL]SNRESA[RA][RK]SR[LA]RK[QK]AY[IL]EELE)是bZIP结构域, 所有谷子SibZIPs都含有该结构域。Motif 7是亮氨酸拉链区N端延伸的一部分, 与保守基序1紧

密相连。Motif 5 (A[AL][AM]FD[MLV]EYARW[LQ][ED][ED][HQ][NS][KR][HQR][MI]AELR[AG]A[LV][QN]AH)、Motif 6 ([QA]Q[SL][SR][DQ][AQ][AL][EN] [ED]AL[SK]Q[GE][MVL][EQ][RA]L[KQ]Q[SA]L[AG][EDQ]JT[LV]A[ASG][GS])、Motif 1 (HRR[SA] [RH]S [DE][SV][AFV][AF][RGL][FL])和Motif 18 ([NT]LN[IM]G[MV]D[YL]W)主要存在于D亚族SibZIP蛋白, 然而Motif 2 (DVFH[LV][LI][ST]G[MV]W[KA][TS]PAER [CF]FLW[LMI]GGFR[PS]SE[LV][LI]K[LV]L[AL]P[QH][LV][ED]PLTEQQL[VL]G[IV]CN)和Motif 15 ([QR][PR][PQ]TL[NE]IFPS[QW]PM[HR][HV])主要存在于G亚族SibZIP蛋白。

上述有关谷子SibZIP蛋白保守域的分析显示, bZIP转录因子蛋白除了含有典型的bZIP结构域外, 还有其它保守基序, 这些保守基序可能与蛋白功能位点有关, 也可能参与转录调控或转录后修饰。谷子Motif 9 (RQPTLGEMLTLE[ED]FLV[RK]AGVVRE[DGN][MP])和蓖麻Motif 5 (A[AL][AM]FD[MLV]EYARW [LQ][ED][ED][HQ][NS][KR][HQR][MI]AELR[AG]A[LV][QN]AH)有着相同的基序TLE[ED], 这个区域有可能是酪蛋白激酶II (CKII)的磷酸化位点(Jin et al., 2014)。仅存在于谷子G亚族的Motif 22 ([NS]HQMLSH)富含脯氨酸(Pro), 可能在转录活化和蛋白互作中起作用(杨颖等, 2009)。Motif 23 (G[GS]GGGGGA)富含甘氨酸(Gly), 这种结构域在拟南芥、蓖麻和水稻中不存在, 有可能对谷子亮氨酸拉链结构起特殊作用, 参与非生物胁迫应答, 如干旱、高盐和冷胁迫等(张水军等, 2010)。同样, 对黄瓜(*Cucumis sativus*) 64条CsbZIPs序列保守域的鉴定发现有12个不同的保守域(比谷子少一半), 除了最基本的亮氨酸拉链区, 还有结合TGA区和CAMP应答元件结合蛋白区(Baloglu et al., 2014)。对模式植物的研究显示, 不同的bZIP保守域以各自特殊的方式参与不同类型的生物反应(Corrêa et al., 2008)。例如, 拟南芥结合TGA结构域能够结合DNA序列5'-TGACG-3'区, 对其下游起着转录激活作用(Johnson et al., 2003); 而其ABREs保守域则参与干旱、盐及ABA处理的生化反应(Uno et al., 2000)。小麦(*Triticum aestivum*) bZIP基因HBP-1结构域能够结合DNA的ACGT核心, 起转录激活作用。在谷子SibZIP基因家族中被鉴定的这25个保守基序的具体功能还有待进一步验证。

2.4 干旱和盐胁迫条件下SibZIP基因表达谱分析
 为解析谷子SibZIPs成员的生物学功能，特别是在应对干旱和盐胁迫反应中的作用，我们应用Illumina HiSeq 2000平台对谷子干旱和盐胁迫以及对照样品

进行了高通量RNA-seq分析。用MeV 4.8.1软件对谷子73个SibZIP转录因子基因表达数据进行聚类分析并绘制了热图(图2)。与对照相比，干旱胁迫处理样品中接近1/2的SibZIP转录因子基因表达发生变化，其

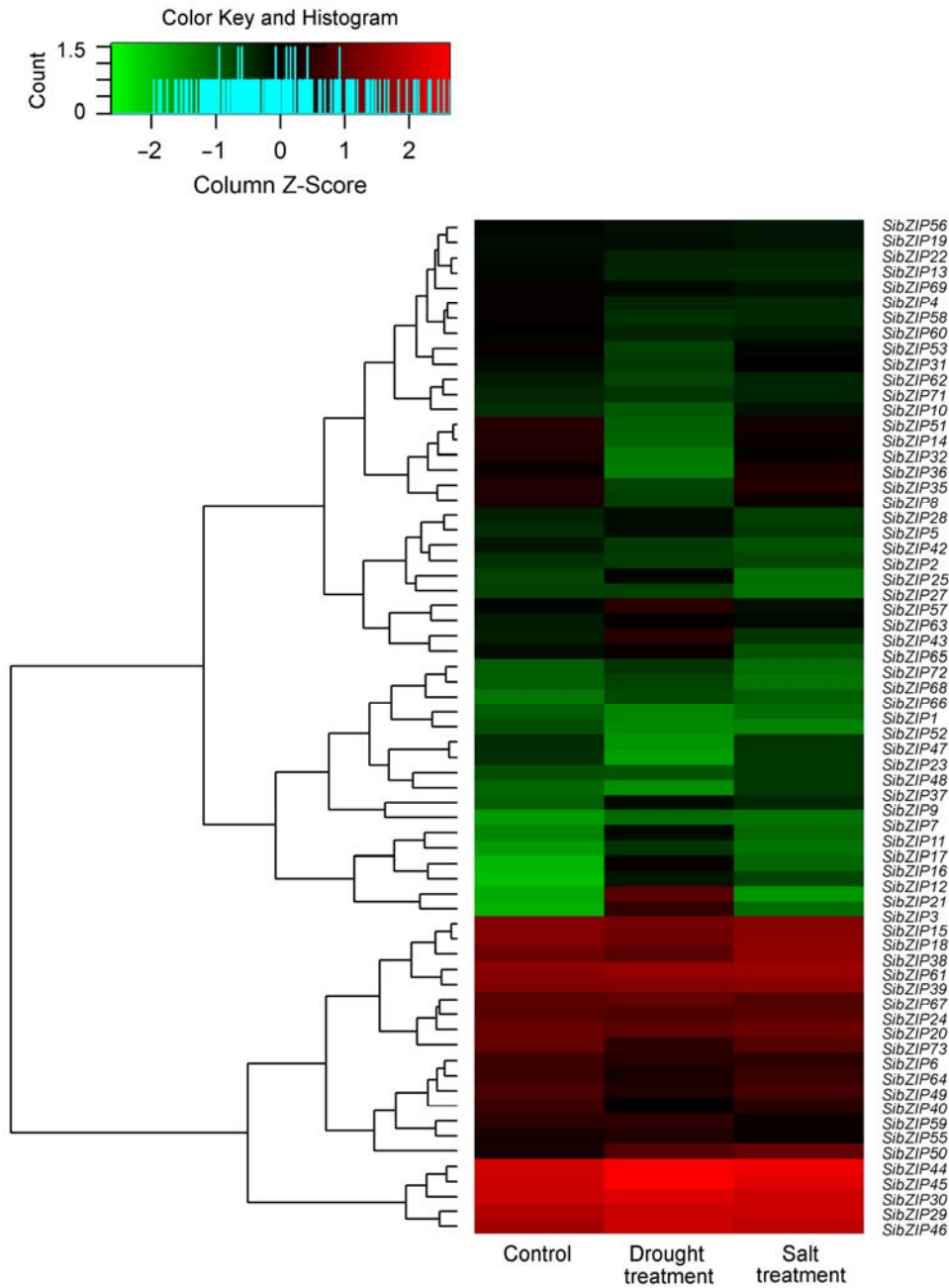


图2 干旱和盐胁迫下谷子SibZIP基因的表达谱
 红色和绿色长方形分别代表高和低水平的SibZIP转录因子基因表达情况。表达差异大于1.5倍视为显著差异($P < 0.05$)。

Figure 2 Expression profiles of 73 SibZIP genes in *Setaria italica* leaves under drought and salt stresses
 Blocks with colors indicate upregulated (red) and downregulated (green) transcript accumulation of SibZIPs relative to the control. The expression level changed more than 1.5 folds is considered as significant difference ($P < 0.05$).

13个(*SibZIP63*、*43*、*3*、*15*、*61*、*45*、*59*、*55*、*50*、*39*、*46*、*21*和*57*)显著上调表达, 17个(*SibZIP53*、*31*、*62*、*10*、*51*、*54*、*32*、*36*、*35*、*8*、*42*、*37*、*23*、*27*、*1*、*52*和*47*)显著下调表达。同样, 盐胁迫诱导约1/3的*SibZIP*转录因子基因表达发生改变, 其中上调表达8个(*SibZIP35*、*73*、*64*、*49*、*50*、*39*、*38*和*24*), 下调表达9个(*SibZIP28*、*42*、*25*、*65*、*68*、*72*、*23*、*27*和*52*)。 *SibZIP50*和*SibZIP39*在2种胁迫下均上调表达, *SibZIP42*、*SibZIP23*、*SibZIP27*和*SibZIP52*则在2种条件下均下调表达。这预示着此类受胁迫诱导且表达量发生明显变化的*SibZIPs*参与调控谷子抵御干旱和盐胁迫反应。

近年来, 已有不少研究者从拟南芥、玉米和水稻等植物中分离得到参与抵抗逆境胁迫的*bZIP*基因, 并证明*bZIP*转录因子在调控植物逆境胁迫应答中行使重要功能。拟南芥*AtbZIP1*可以结合ABRE元件以调节植物对ABA处理的敏感程度和下游ABA相应基因的表达, 从而参与植物的ABA信号转导通路, 提高植物的抗逆性(Fujita et al., 2005)。在拟南芥中过表达玉米*ZmbZIP72*, 可提高转基因拟南芥对干旱和高盐的耐受能力, 说明玉米*ZmbZIP72*能使作物在高盐干旱环境中获得抗性(Ying et al., 2012)。Xiang等(2008)从水稻基因组中鉴定出*OsbZIP23*, 并进行了功能验证。过表达*OsbZIP23*基因可显著提高水稻植株的抗旱性、耐盐性和对ABA的敏感性。应用T-DNA插入法将*OsbZIP23*基因敲除, 则突变体水稻幼苗的耐盐性、抗旱性和对ABA的敏感性降低。进一步将*OsbZIP23*重新导入该基因敲除的水稻突变体, 则水稻幼苗的上述胁迫抗性恢复。显然, *OsbZIP23*在调控水稻耐旱和耐高盐等逆境过程中起着关键作用。有关葡萄的研究显示, 在经受各种非生物胁迫如干旱、盐渍和寒冷后, 葡萄*VvbZIP23*基因开始大量表达(Liu et al., 2014), 说明*VvbZIP23*基因也参与非生物胁迫反应。在番茄*bZIP*研究中, 干旱胁迫下*SibZIP19*基因也有较高的表达量(朱芸晔等, 2014)。

将上述参与植物逆境胁迫应答反应的*bZIP*转录因子基因(*ZmbZIP72*、*OsbZIP23*、*VvbZIP23*和*SibZIP19*)与本研究鉴定的谷子*SibZIPs*进行序列比对和聚类分析, 结果显示, 与上述*bZIP*转录因子基因同源性较高的谷子*SibZIPs*分别是*SibZIP55*、*SibZIP50*、*SibZIP39*和*SibZIP46*, 预示着这些*SibZIPs*

很可能具有相似的功能。事实上, 这几个谷子*SibZIP*基因均在干旱或盐胁迫下高表达(图2), 显示它们在谷子抵御干旱和盐胁迫反应中行使重要功能。下一步需要分析这些*SibZIPs*的逆境胁迫表达谱和进行转基因等功能互补实验来解析其生物学功能。

2.5 干旱胁迫条件下*SibZIP*基因表达的qPCR检测

为验证上述应用RNA-seq获得的干旱和盐胁迫下73个谷子*SibZIP*转录因子基因表达模式的准确性, 我们分别从各个亚家族中随机挑选1或2个*SibZIP*基因为靶标, 采用荧光实时定量PCR检测这些*SibZIP*基因的表达模式。我们选择分析12个*SibZIPs*在20%PEG 6000模拟干旱胁迫处理1、6、12和24小时后的表达情况(图3A-L)。这些*SibZIPs*基因包括GroupA (*SibZIP3*)、GroupB (*SibZIP51*)、GroupC (*SibZIP24*、*SibZIP45*和*SibZIP60*)、GroupD (*SibZIP2*和*SibZIP37*)、GroupE (*SibZIP7*)、GroupG (*SibZIP73*)、GroupH (*SibZIP8*)、GroupI (*SibZIP57*)和GroupX (*SibZIP21*)。

实验结果显示, 在干旱胁迫下, 12个*SibZIP*基因时序表达谱分为3种情况, 即上调表达、降低表达和表达量基本不变。这与RNA-seq数据基本一致。在PEG6000干旱胁迫处理后, *SibZIP3*、*SibZIP7*、*SibZIP21*、*SibZIP45*、*SibZIP57*和*SibZIP60*表达量逐渐上升, 特别是在处理12小时, 表达量达峰值, 随后表达量降低。与这6个*SibZIP*基因表达量逐渐上升不同, *SibZIP8*、*SibZIP37*和*SibZIP51*表达量在干旱胁迫1小时迅速升高至峰值, 然后开始急剧下降。显然, 这些上调表达的*SibZIP*基因在调控谷子干旱应答反应中行使重要功能。研究显示, 与*SibZIP51*同属B亚族的*AtbZIP17*基因转入野生型拟南芥能够明显增强植株的耐盐性, 也间接增加了植株的抗旱性(Liu et al., 2008)。

与上述9个*SibZIPs*相反, *SibZIP73*的表达在干旱胁迫开始之时就受到抑制, 且随着胁迫时间的延长, 表达量逐渐降低。另外, *SibZIP2*和*SibZIP24*的表达量在干旱胁迫过程中没有显著变化。有关拟南芥、番茄和葡萄等物种*bZIP*的表达研究也显示, 胁迫处理未引起部分*bZIP*转录因子表达量的变化。这些在胁迫反应中表达量变化不大的*SibZIP*转录因子可能属于组成型表达, 不容易受环境条件的影响。它们类似于

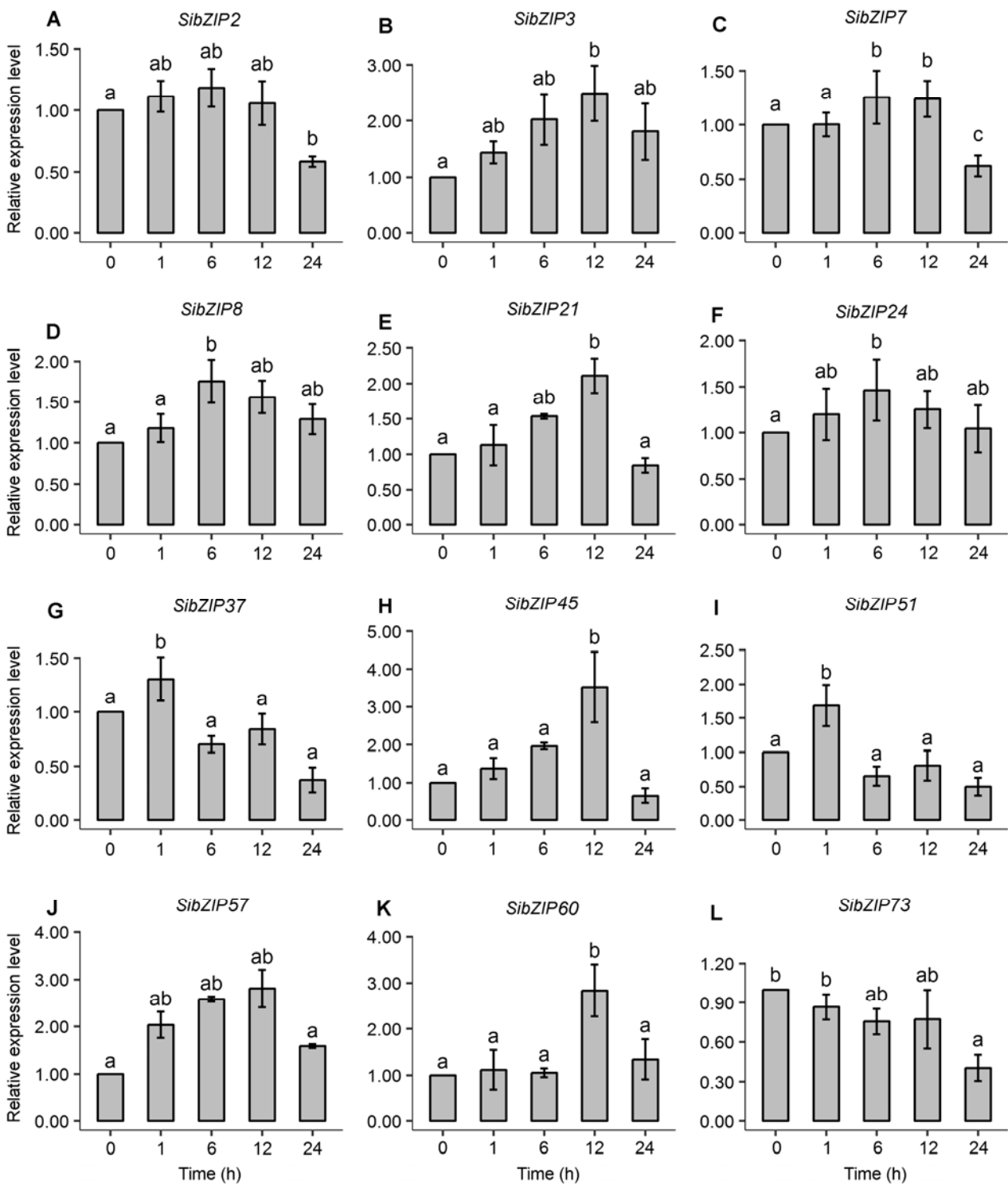


图3 12个*SibZIP*基因在谷子幼苗叶片中的实时荧光定量PCR表达
不同字母代表Duncan检验法样品间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 3 Expression analysis of 12 *SibZIP* genes in leaves of *Setaria italica* seedlings using real-time quantitative RT-PCR
The different letters indicate significant difference ($P < 0.05$) among samples by Duncan's test.

管家基因, 在生物生长发育及代谢调控中发挥基础作用。

2.6 SibZIP基因启动子顺式元件及SibZIP共表达关联分析

为进一步解析谷子SibZIP转录因子家族成员在植物抵御逆境胁迫中的作用, 我们对上述12个谷子SibZIP基因的启动子区域进行顺式元件分析。所检测到的DNA顺式元件主要有ABRE (ABA响应元件)和MBS (MYB结合位点)。这表明一些SibZIP转录因子家族成员受ABA信号调控(如SibZIP3和SibZIP24), 或其它转录因子(如MYB)调控(如SibZIP21和SibZIP-73)。据文献(Jakoby et al., 2002; 杨颖等, 2009)报道, bZIP蛋白A亚族多数成员启动子区含有ABRE元件, 且该亚族主要参与抗旱、抗寒和抗盐等抗逆反应。这与本研究检测的SibZIP3含有3个ABRE元件及在干旱诱导时上调表达相一致(图2)。典型的B亚族成员AtbZIP17参与抗盐反应(Liu et al., 2008)。本研究检测的B亚族成员SibZIP51 (含有2个MYB结合位点元件)响应干旱胁迫而迅速上调表达(图3I)。部分C亚族成员参与植物逆境胁迫响应, 如SibZIP24 (含有2个ABRE元件)受盐胁迫诱导上调表达(图2), 但在干旱胁迫反应过程中表达量变化不大(图3F)。需要指出的是, C亚族成员SibZIP45启动子区未检测到ABRE和MBS元件, 但该转录因子受干旱胁迫诱导显著上调表达(图2)。这与以前认为具备ABRE元件是ABA调控胁迫反应的基本条件的观点相矛盾。Uno等(2000)发现无典型ABRE核心序列的转录因子也可参与调控逆境胁迫反应, 推断除了ABRE-bZIP调控系统外植物很可能还存在另一条不依赖ABA的逆境应答基因表达途径。本文SibZIP45可能属于此类转录因子参与胁迫抗性调控, 这正是转录因子调控相关生理生化过程具体机制复杂性的体现。

植物抵御胁迫响应常涉及多个转录因子调控, 同类转录因子也可能协同参与胁迫响应的调控。为检测73个SibZIP转录因子是否可相互关联(或与其它调控蛋白互作)参与谷子胁迫响应, 我们选择Setaria italica v2.1数据库中编码蛋白在胁迫条件下的表达数据, 应用String功能蛋白互作网站(<http://stringdb.org/>)对谷子SibZIP蛋白间相互关联以及与其它蛋白互作进行鉴定。参数设置为默认, 除去没有关联性的

蛋白后, 获得功能上有相互作用的蛋白, 绘制蛋白互作关联示意图(图4)。

本研究共检测到24个谷子蛋白在逆境胁迫抗性中具有相互关联性, 其中19个蛋白为本研究鉴定的谷子SibZIP转录因子, 另外5个蛋白分别为SRK2D相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Serine/threonine-protein Kinase SRK2D-related, Si036309m)、SF160-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Si036283m)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶SAPK3 (Si036531m)、NPR1相关的SF66-调控蛋白(SF66-regulatory protein NPR1-related, Si000814m)和KOG0512-胚胎球蛋白诱导因子(KOG0512-Fetal globin-inducing factor, Si000-647m)。共表达分析显示这5种蛋白可能通过与SibZIP转录因子互作在谷子抗逆胁迫反应中行使枢纽作用(图4, 绿框显示)。

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶是细胞信号转导系统纵横交错的网络中一类极为重要的具调控作用的酶。这类酶催化从ATP转移出磷酸并共价结合到特定底物蛋白质分子中某些丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的羟基上, 从而改变蛋白质及酶的构象和活性, 进而激活或抑制下游基因的表达, 开启抵御胁迫表型的建成。已有研究表明, 3种主效bZIP转录因子AREB1、AREB2和ABF3能被SNF1相关蛋白激酶SRK2D磷酸化, 进而激活植物依赖于ABA信号途径的抵御干旱和缺水胁迫级联反应(Yoshida et al., 2010)。本研究显示3个蛋白激酶(Si036283m、Si036309m和Si036531m)与8个SibZIP (SibZIP3、5、9、13、22、28、42和55)的表达显著关联, 预示着谷子也可能具有这种蛋白激酶-bZIP蛋白磷酸化调控抗逆反应的途径, 然而它们介导谷子产生抗逆反应的机制有待深入研究。

NPR1相关的调控蛋白在植物抗病反应中行使重要功能。本研究揭示NPR1相关的SF66-调控蛋白(Si000814m)的表达与高达10种谷子SibZIPs (SibZIP1、6、11、12、18、37、41、47、52和53)表达高度关联。这说明NPR1相关的SF66-调控蛋白可与谷子SibZIP广泛互作, 从而调控谷子抵御生物和非生物胁迫响应。该蛋白与SibZIP互作而参与调控谷子抗病虫及非生物逆境反应的机制亦需进一步研究。KOG0512-胚胎球蛋白诱导因子(Si000647m)参与植物抗逆反应报道较少。本研究检测到该蛋白仅与谷子SibZIP2互作, 未来需鉴定KOG0512-胚胎球蛋

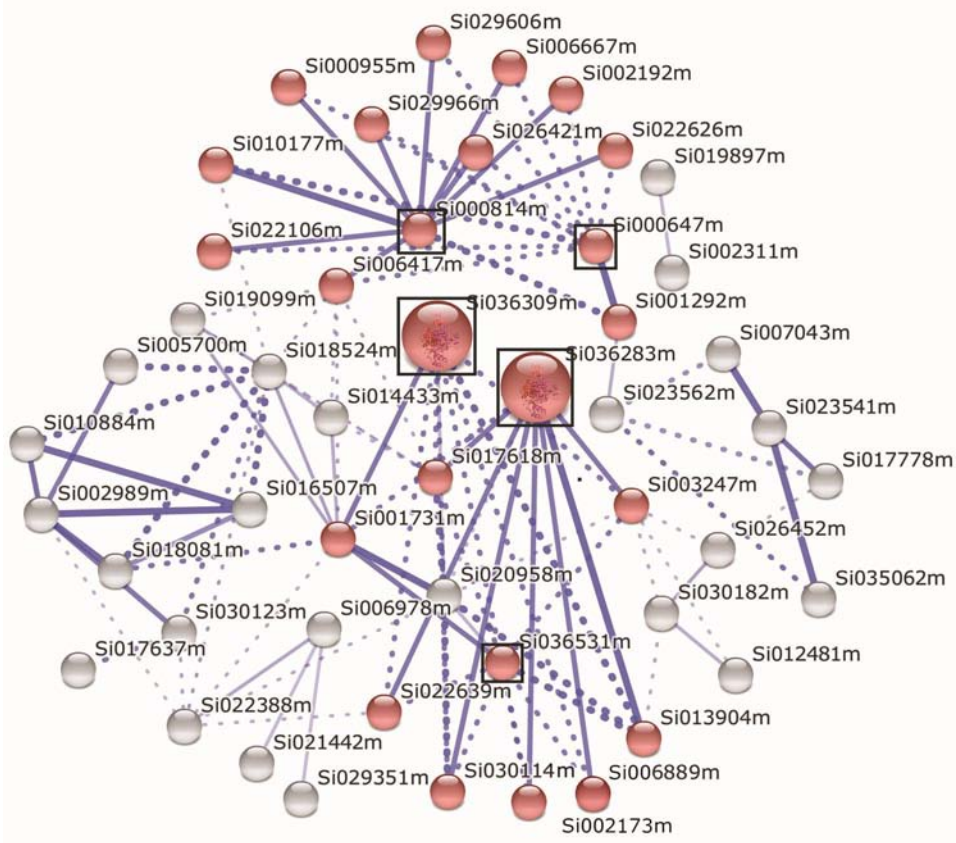


图4 胁迫条件下谷子*SibZIP*基因家族共表达关联性

逆境胁迫下谷子编码蛋白基因的表达数据来自*Setaria italica* v2.1数据库。利用String功能蛋白互作网站(<http://string-db.org/>)相关工具对谷子*SibZIP*转录因子基因共表达关联性进行分析。红色标记为参与逆境反应相关蛋白基因。圆圈大小表示该蛋白功能重要与否,体积越大表示在胁迫相关代谢通路中越重要。蓝色实线表示蛋白之间显著关联,线越粗表示蛋白之间关联度越紧密。蓝色虚线表示蛋白之间可能具有相互作用。对应于谷子蛋白(红色圆球代表)编号的各*SibZIP*成员名称见表2。Si036309m: SRK2D相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; Si036283m: SF160-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; Si036531m: 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶SAPK3; Si000814m: NPR1相关的SF66-调控蛋白; Si000647m: KOG0512-胚胎球蛋白诱导因子

Figure 4 Correlation analysis of co-expression of *Setaria italica* *SibZIP* genes under stressed conditions

The expression data of the protein coding genes in foxtail millet under stressed conditions were derived from *Setaria italica* v2.1 database. Bioinformatics tools in String Functional Protein Interaction website (<http://string-db.org/>) were employed for correlation analysis of co-expression of *SibZIP* genes. Red circle represents *SibZIP* genes and the related genes involved in regulation network responsible for stress responses. The size of circle indicates the significance of the protein with bigger size having more importance in the related pathway. Blue solid line shows correlation between the related proteins with thicker line meaning stronger correlation. Blue dotted line shows possible interaction between the related proteins. The corresponding *SibZIP* protein name for each foxtail millet protein (red color circle representative) are list in Table 2. Si036309m: serine/threonine-protein kinase SRK2D-related; Si036283m: SF160-serine/threonine-protein kinase; Si036531m: serine/threonine-protein kinase SAPK3; Si000814m: SF66-regulatory protein NPR1-related; Si000647m: KOG0512-fetal globin-inducing factor

白诱导因子与谷子*SibZIP2*互作及其参与调控谷子抗逆性表达的具体方式。

我们已检测到19种*SibZIP*蛋白间可能的明显相互关联性。所检测到的参与谷子胁迫响应调控网络的

19个*SibZIP* 转录因子中的8个为A亚族成员(*SibZIP*3、5、9、13、22、28、42和55)。这与本实验检测的和前人报道的A亚族*bZIP*成员主要参与植物抗逆胁迫反应的结论一致。另外,已有报道*bZIP*家族中的

D亚族成员与植物抗氧化和病菌防御相关。本研究谷子蛋白表达关联性分析亦显示有7个D亚族成员(SibZIP1、11、12、18、37、52和53)参与谷子胁迫反应调控。总之, SibZIP转录因子启动子区顺式元件分析以及胁迫条件下相关蛋白表达关联性分析进一步表明, SibZIP转录因子在谷子胁迫调控网络中起重要作用。

2.7 讨论

本研究应用生物信息学分析工具, 从谷子全基因组序列中鉴定获得73个完整的SibZIP转录因子(SibZIP1-73), 其在染色体上的分布具有成簇结构和不均一性, 成员间理化性质差异较大。序列比对及系统进化分析将谷子SibZIP转录因子家族成员划分为A、B、C、D、E、G、H、I和X等9个亚家族。与拟南芥AtbZIP家族相比, 谷子SibZIPs缺失了F家族, 而谷子SibZIP21和SibZIP48组成新的X亚家族。与其它已测序的禾谷类植物bZIP家族相比, 谷子SibZIP基因家族有所缩减。bZIP蛋白保守基序分析表明, 谷子SibZIP的保守基序多达25个, 各亚家族具有特异的保守基序组成和分布。谷子SibZIP蛋白保守域较复杂, 预示着SibZIP转录因子可能具有生物学功能多样性和可塑性。RNA-seq和qPCR表达谱分析以及共表达关联分析和启动子顺式元件鉴定均揭示, 许多谷子SibZIP转录因子基因参与干旱或盐胁迫应答反应的调控。SibZIP既可通过依赖于ABA信号途径或非依赖于ABA信号途径, 亦可通过与具有调控作用的蛋白(如蛋白激酶、NPR1相关蛋白)互作而介导调控谷子抵御胁迫反应。本研究结果提供了完整的谷子SibZIP转录因子家族成员及其序列特征以及相应的表达信息, 可为进一步全面解析SibZIP转录因子各成员的生物学功能及作用机制和谷子抗逆育种提供参考。

参考文献

曹红利, 岳川, 王新超, 杨亚军 (2012). bZIP转录因子与植物抗逆性研究进展. 南方农业学报 **43**, 1094-1100.

杨颖, 高世庆, 唐益苗, 冶晓芳, 王永波, 刘美英, 赵昌平 (2009). 植物bZIP转录因子的研究进展. 麦类作物学报 **29**, 730-737.

张水军, 曾千春, 卢秀萍, 李文正 (2010). 植物富含甘氨酸蛋白的研究进展. 中国农学通报 **26**(4), 54-58.

朱芸晔, 薛冰, 王安全, 王文杰, 周昂, 黄胜雄, 刘永胜 (2014). 番茄bZIP转录因子家族的生物信息学分析. 应用与环境生物学报 (5), 767-774.

Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T (2005). FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* **309**, 1052-1056.

Baloglu MC, Eldem V, Hajyzadeh M, Unver T (2014). Genome-wide analysis of the bZIP transcription factors in cucumber. *PLoS One* **9**, e96014.

Bennetzen JL, Schmutz J, Wang H, Percifield R, Hawkins J, Pontaroli AC, Estep M, Feng L, Vaughn JN, Greenwood J, Jenkins J, Barry K, Lindquist E, Hellsten U, Deshpande S, Wang X, Wu X, Mitros T, Triplett J, Yang X, Ye CY, Mauro-Herrera M, Wang L, Li P, Sharma M, Sharma R, Ronald PC, Panaud O, Kellogg EA, Brutnell TP, Doust AN, Tuskan GA, Rokhsar D, Devos KM (2012). Reference genome sequence of the model plant *Setaria*. *Nat Biotechnol* **30**, 555-561.

Chuang CF, Running MP, Williams RW, Meyerowitz EM (1999). The *PERIANTHIA* gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Devel* **13**, 334-344.

Corrêa LG, Riaño-Pachón DM, Schrago CG, Dos Santos RV, Mueller-Roeber B, Vincentz M (2008). The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS One* **3**, e2944.

Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 3470-3488.

Gibbalová A, Renák D, Matczuk K, Dupl'áková N, Cháb D, Twell D, Honys D (2009). *AtbZIP34* is required for *Arabidopsis* pollen wall patterning and the control of several metabolic pathways in developing pollen. *Plant Mol Biol* **70**, 581-601.

Guiltinan MJ, Marcotte WR Jr, Quatrano RS (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250**, 267-271.

Iven T, Strathmann A, Böttner S, Zwafink T, Heinekamp T, Guivarc'h A, Roitsch T, Dröge-Laser W (2010). Homo- and heterodimers of tobacco bZIP proteins counteract as positive or negative regulators of transcription during pollen

- development. *Plant J Cell Mol Biol* **63**, 155–166.
- Izawa T, Foster R, Nakajima M, Shimamoto K, Chua NH** (1994). The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development. *Plant Cell* **6**, 1277–1287.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carabajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F, BZIPRG** (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **7**, 106–111.
- Jin Z, Xu W, Liu A** (2014). Genomic surveys and expression analysis of *bZIP* gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.). *Planta* **239**, 299–312.
- Johnson C, Boden E, Arias J** (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 1846–1858.
- Lee SC, Choi HW, Hwang IS, Choi DS, Hwang BK** (2006). Functional roles of the pepper pathogen-induced bZIP transcription factor, CABZIP1, in enhanced resistance to pathogen infection and environmental stresses. *Planta* **224**, 1209–1225.
- Liao Y, Zou HF, Wei W, Hao YJ, Tian AG, Huang J, Liu YF, Zhang JS, Chen SY** (2008). Soybean *GmbZIP44*, *GmbZIP62* and *GmbZIP78* genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic Arabidopsis. *Planta* **228**, 225–240.
- Liu J, Chen N, Chen F, Cai B, Dal Santo S, Tornielli GB, Pezzotti M, Cheng ZM** (2014). Genome-wide analysis and expression profile of the bZIP transcription factor gene family in grapevine (*Vitis vinifera*). *BMC Genomics* **15**, 281.
- Liu JX, Srivastava R, Howell SH** (2008). Stress-induced expression of an activated form of *AtbZIP17* provides protection from salt stress in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **31**, 1735–1743.
- Nijhawan A, Jain M, Tyagi AK, Khurana JP** (2008). Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant Physiol* **146**, 333–350.
- Pourabed E, Ghane Golmohamadi F, Soleymani Monfared P, Razavi SM, Shobbar ZS** (2015). Basic leucine zipper family in barley: genome-wide characterization of members and expression analysis. *Mol Biotechnol* **57**, 12–26.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5857–5864.
- Schwechheimer C, Zourelidou M, Bevan MW** (1998). Plant transcription factor studies. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 127–150.
- Singh K, Foley RC, Oñate-Sánchez L** (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 430–436.
- Stanković B, Vian A, Henry-Vian C, Davies E** (2000). Molecular cloning and characterization of a tomato cDNA encoding a systemically wound-inducible bZIP DNA-binding protein. *Planta* **212**, 60–66.
- Toh S, McCourt P, Tsuchiya Y** (2012). HY5 is involved in strigolactone-dependent seed germination in Arabidopsis. *Plant Signal Behavior* **7**, 556–558.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000). Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 11632–11637.
- Wang J, Zhou J, Zhang B, Vanitha J, Ramachandran S, Jiang SY** (2011). Genome-wide expansion and expression divergence of the basic leucine zipper transcription factors in higher plants with an emphasis on sorghum. *J Integr Plant Biol* **53**, 212–231.
- Wei K, Chen J, Wang Y, Chen Y, Chen S, Lin Y, Pan S, Zhong X, Xie D** (2012). Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize. *DNA Res* **19**, 463–476.
- Xiang Y, Tang N, Du H, Ye H, Xiong L** (2008). Characterization of *OsbZIP23* as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiol* **148**, 1938–1952.
- Xu J, Li Y, Ma X, Ding J, Wang K, Wang S, Tian Y, Zhang H, Zhu XG** (2013). Whole transcriptome analysis using next-generation sequencing of model species *Setaria viridis* to support C4 photosynthesis research. *Plant Mol Biol* **83**, 77–87.
- Ying S, Zhang DF, Fu J, Shi YS, Song YC, Wang TY, Li Y** (2012). Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, *ZmbZIP72*, confers drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Planta* **235**, 253–266.
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J* **61**, 672–685.

Zhang G, Liu X, Quan Z, Cheng S, Xu X, Pan S, Xie M, Zeng P, Yue Z, Wang W, Tao Y, Bian C, Han C, Xia Q, Peng X, Cao R, Yang X, Zhan D, Hu J, Zhang Y, Li H, Li H, Li N, Wang J, Wang C, Wang R, Guo T, Cai Y, Liu C,

Xiang H, Shi Q, Huang P, Chen Q, Li Y, Wang J, Zhao Z, Wang J (2012). Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential. *Nat Biotechnol* **30**, 549–554.

Genome-wide Characterization of bZIP Transcription Factors in Foxtail Millet and Their Expression Profiles in Response to Drought and Salt Stresses

Baoling Liu¹, Li Zhang¹, Yan Sun², Jinai Xue¹, Changyong Gao¹, Lixia Yuan¹, Jiping Wang¹
Xiaoyun Jia², Runzhi Li^{1*}

¹Institute of Molecular Agriculture & Bioenergy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China; ²Department of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

Abstract The bZIP protein family is one of the largest and most conserved transcription factor families regulating multiple physiology processes in plants. Foxtail millet (*Setaria italica*) is an important C4 cereal crop with increased resistance to drought stress. However, little is known about bZIP family members and their functions in this crop. In the present study, we identified and characterized 73 SibZIP transcription factors in foxtail millet genome by using bioinformatics. These SibZIPs are classified into 9 groups, including A, B, C, D, E, G, H, I and X subfamilies. Compared to the sequenced cereal crops, the foxtail millet bZIP family underwent contraction in evolution. In all, 25 conserved motifs were detected among SibZIPs. RNA-seq and qPCR analysis revealed that a number of *SibZIPs* are induced to change expression levels in response to drought and salt stresses, which suggests that they have important functions in the foxtail millet response to stress. Moreover, correlation analysis of co-expression of the protein coding genes under various stress conditions demonstrates that a set of 19 SibZIPs may mediate the regulation network controlling stress responses by cooperating with some protein kinases or NPR1-related regulatory protein in foxtail millet. Our results could provide new valuable information for comprehensively understanding SibZIP protein structure and their biological functions, the molecular mechanism of drought response, and stress resistance breeding in foxtail millet and related crops.

Key words foxtail millet, *SibZIP*, genome-wide characterization, drought and salt stresses, expression analysis

Liu BL, Zhang L, Sun Y, Xue JA, Gao CY, Yuan LX, Wang JP, Jia XY, Li RZ (2016). Genome-wide characterization of bZIP transcription factors in foxtail millet and their expression profiles in response to drought and salt stresses. *Chin Bull Bot* **51**, 473–487.

* Author for correspondence. E-mail: rli2001@126.com