

· 研究报告 ·

## 转辽宁碱蓬 *SINAC4* 拟南芥差异表达基因分析

李倩倩, 焦杨, 于静洋, 李秋莉\*

辽宁师范大学生命科学学院/辽宁省植物生物技术重点实验室, 大连 116081

**摘要** 以实验室前期获得的转 *SINAC4* 基因拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和野生型拟南芥为材料, 通过基因芯片技术检测其基因表达谱。结果表明, 与野生型拟南芥相比, 转 *SINAC4* 基因拟南芥中差异表达的基因共有 3 094 个。通过 GO 分析, 发现与非生物胁迫相关的差异基因共有 195 个, 与生长发育相关的差异基因共有 47 个, 其中包含 MYB 和 WRKY 转录因子基因。KEGG 分析表明, 差异表达基因主要涉及植物激素信号转导和油菜素内酯合成等信号通路。进一步选择部分差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 分析, 所得结果与芯片检测结果一致。该研究结果表明, *SINAC4* 可直接或间接地调控多个下游基因的表达, 进而调控植物的生长发育, 提高其抗逆性。

**关键词** 生长发育, 差异表达基因, 基因芯片, NAC, 胁迫

李倩倩, 焦杨, 于静洋, 李秋莉 (2016). 转辽宁碱蓬 *SINAC4* 拟南芥差异表达基因分析. 植物学报 51, 764–773.

植物的生长发育受到各种环境因素的影响, 干旱、高温、冻害和水涝等非生物胁迫影响植物的光合、呼吸和物质代谢等过程。在植物逐渐形成的对非生物胁迫的抵抗和适应中, 抗逆基因的表达起着非常重要的作用。转录因子是基因表达过程中一类重要的调控因子, 其通过与目标基因启动子中特定的顺式作用元件结合, 激活或抑制靶基因的转录表达 (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006)。许多转录因子如 DREB、MYB、WRKY、NAC 和 AP2/ERF 等都可提高植物对非生物胁迫的抗性 (Zhao et al., 2010; Chen et al., 2012; Shingote et al., 2015; Bouaziz et al., 2015)。

NAC 转录因子是植物最大的转录因子家族之一, 其命名源于矮牵牛 (*Petunia hybrida*) NAM 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) ATAF1、ATAF2 以及 CUC2, 在植物中分布广泛 (Souer et al., 1996; Aida et al., 1997)。到目前为止, 在拟南芥中鉴定出的 NAC 转录因子基因有 117 个, 在白杨 (*Populus trichocarpa*)、水稻 (*Oryza sativa*) 和葡萄 (*Vitis vinifera*) 中分别鉴定出 163、151 和 79 个, 在大豆 (*Glycine max*) 和烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中均鉴定出 152 个 NAC 转录因子基因 (李小兰等, 2013)。NAC 转录因子在植物生长发育及胁迫应答中具有重要作用, 已成为当前研究的热点。

NAC 转录因子基因 *SND1* 在拟南芥纤维次生壁的合成中具关键调节作用 (Zhong et al., 2006)。过表达大豆 *GmNAC11* 可增强转基因拟南芥的抗盐性, 过表达大豆 *GmNAC20* 则可增强转基因拟南芥的抗盐性及抗寒性并促进侧根的形成 (Hao et al., 2011)。辽宁碱蓬 (*Suaeda liaotungensis*) *SINAC1* 可以增强转基因拟南芥的干旱、高盐和低温抗性 (Li et al., 2014)。鹰嘴豆 (*Cicer arietinum*) *CarNAC3* 和 *CarNAC6* 基因可以促进转基因杨树 (*Populus alba*) 根与茎的生长, 并可增强其渗透调节能力及抗氧化酶活性 (Movahedi et al., 2015)。芒草 (*Miscanthus lutarioriparius*) *MINAC5* 可以增强转基因拟南芥的抗旱与抗寒能力 (Yang et al., 2015)。目前, 关于 NAC 转录因子的研究主要集中于基因的克隆及功能分析, 对于其调控的下游基因研究较少。*ANAC096* 转录因子可通过调控 *RD29A* 的表达提高转基因拟南芥的干旱和渗透胁迫抗性 (Xu et al., 2013)。*NAC016* 可直接与脱落酸反应元件 *AREB1* 结合抑制 *AREB1* 的转录, 进而参与干旱胁迫响应 (Sakuraba et al., 2015)。

本实验室克隆了辽宁碱蓬 NAC 家族中的 1 个转录因子基因 *SINAC4*, 发现转 *SINAC4* 基因拟南芥在盐、干旱和低温胁迫下较野生型拟南芥存活率明显提高 (宿明星, 2012), 且在种子萌发率、根长、侧根数和角

收稿日期: 2016-01-08; 接受日期: 2016-07-08

基金项目: 国家自然科学基金 (No.31340052)

\* 通讯作者。E-mail: skyliqiuli@163.com

果数等方面皆有明显的优势(数据未发表), 因此认为 *SINAC4* 提高了转基因拟南芥的抗逆性和生长发育能力。本文利用基因芯片技术对转 *SINAC4* 基因拟南芥和野生型拟南芥的基因表达谱进行分析, 旨在发现 *SINAC4* 转录因子调控的相关基因, 以进一步揭示 *SINAC4* 参与植物生长发育及对逆境的防御调控过程。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 野生型 (WT) 为本实验室保存, 转 *SINAC4* 基因拟南芥 (L1) 为实验室筛选获得的转基因纯合株系。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 幼苗培育与取材

将 WT 与 L1 的种子分别用 70% 乙醇和 10% 次氯酸钠表面消毒后, 播种在 MS 培养基中培养, 12 天后移入营养钵中继续培养 (22°C, 16 小时光照/8 小时黑暗, 相对湿度 60%)。3 周后, 剪取 WT 和 L1 植株的幼嫩叶片, 迅速置于液氮中, -80°C 保存、备用。

#### 1.2.2 基因芯片杂交分析

使用 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 试剂盒提取叶片总 RNA, 用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 NanoDrop ND-2000 分光光度计对 RNA 进行检测。使用 Agilent 表达谱芯片配套试剂盒按照标准操作流程对样品总 RNA 中的 mRNA 进行放大和标记, 并用 RNeasy Mini Kit 纯化标记后的 cRNA, 芯片杂交 (65°C, 17 小时) 后, 使用 Gene Expression Wash Buffer Kit 试剂盒进行洗脱, 用 Agilent Microarray Scanner 对芯片结果进行扫描。得到的原始数据使用 GeneSpring Software GX 12.6.1 软件进行归一化处理, 所用算法为 Quantile。

#### 1.2.3 差异表达基因的统计与分析

运用 SAS 在线分析系统对差异表达 2 倍以上的基因进行统计, 并对胁迫相关及生长发育相关且差异表达显著的基因进行功能分析。

#### 1.2.4 GO 功能富集分析

基因本体 (gene ontology, GO) 分析就是将众多的差异表达基因根据功能进行分类分析, 该分析由 3 个相对独立的本体组成, 即细胞组分 (cellular component)、分子功能 (molecular function) 和生物学过程 (biological process)。将差异表达 5 倍以上的基因向 GO 数据库的各个条目映射, 计算出每个条目的基因数目, 应用超几何检验, 与整个基因组背景相比, 筛选出显著富集的 GO 条目。富集词条分别为 response、stress 和 development。

#### 1.2.5 KEGG pathway 富集分析

KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 将基因组信息和高一级的功能信息有机地结合起来, 对基因的功能进行系统化分析, 同时把基因组中的一系列基因用一个细胞内分子相互作用的网络连接起来。将差异表达 5 倍以上的基因进行 KEGG 富集分析, 挑选出显著富集的代谢途径。

#### 1.2.6 实时荧光定量 PCR 验证

选取 6 个差异表达的基因, 根据 GenBank 中的序列设计引物 (表 1), 以 L1 和 WT 的总 RNA 为模板, 采用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行反转录, 使用 SYBR Green II 法进行实时荧光定量 PCR 分析, 以 *Actin 2* 为内参进行数据的标准化处理。实时荧光定量 PCR 仪为 Thermal Cycler Dice Real time TP800 (TaKaRa), 试剂为 SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa)。实验设 3 次重复。

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 总 RNA 的提取及质量鉴定

用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 NanoDrop ND-2000 检测提取的总 RNA, 结果显示, RNA 峰型图和带型图清晰, RIN > 7, 28S/18S > 1.5, 样品完整性较好, 两样本 RNA 的 A260/A280 值接近 2.0, 纯度较好, 浓度分别为 100.6 和 65.2 ng·μL<sup>-1</sup>, 符合表达谱芯片的实验要求。

### 2.2 基因芯片扫描

Agilent Microarray Scanner 扫描结果显示, 芯片杂交

表1 实时荧光定量PCR所用引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time PCR

Gene	GenBank ID	Primer sequence (5'-3')	Amplification size (bp)
<i>Actin2</i>	NM_112764.3	F: CAACCGGTTAGTACATTTTAGGC R: GTAAGGTCACGTCCAGCAAG	193
<i>PIP5K3</i>	NM_128199	F: GTTGCGAGGTGAGTGATACG R: ACAACCATCCGACCACAAAT	134
<i>At2g38240</i>	NM_129381	F: TGTGCGAAAGGCTAACAGAG R: CTGAGGGCATTGTTGGGTAGA	131
<i>WRKY38</i>	NM_122163	F: GGTGGACCGCTTTCAAGTTA R: TGTGGAGGAGGAGAAGAATCC	143
<i>MYB15</i>	NM_001035670	F: AAAACTTGGGCTCCGCTAAT R: GCACCATTTCACTTTACTCCTCA	143
<i>AZF1</i>	NM_126145	F: TTTCAAGTCGTTTGCGTCTG R: CGAGTTCTACGCTGTTGCTG	110
<i>GSTF6</i>	NM_001197964	F: CCAGCTTCCACAGCCACTA R: TACTCACGTTGCGAAGGATG	130

信号清晰且均衡,背景清晰,结果可靠(图1A)。两组数据总体分布趋势如图1B所示,绝大多数的数据点密集分布于 $y=x$ 直线附近的灰色区域中,表明转基因植株和野生型拟南芥中的大部分基因表达差异不明显。少数点分布于灰色区域两侧之外,表明转基因和野生型拟南芥中有少部分的基因表达差异明显。靠近Y轴的数据点表示该基因在L1中上调表达,靠近X轴的数据点则表示该基因在L1中下调表达,靠近程度与表达差异成正比。

### 2.3 差异表达基因

从L1和WT两个样本中共检测到基因45 220个,差异表达2倍以上的基因有3 094个,其中上调表达的基因有1 578个,下调表达的基因有1 516个,差异基因表达倍数的分级情况见表2。

差异表达基因中上调30倍以上的有25个,其中6个与生长发育和非生物胁迫抗性有关(表3)。*AT2G-38240*编码拟南芥2-氧化戊二酸(2OG)和Fe(II)依赖性氧样蛋白,2OG-Fe(II)蛋白参与赤霉素的生物合成,促进种子的萌发以及器官的成熟等(刘浩,2011),*AT2G38240*基因在L1中上调了264.7倍。*RNS1*基因编码拟南芥核糖核酸酶1,属于T2核糖核酸酶家族,*RNS1*表达量的升高可增强植物的抗损伤胁迫能力(Hillwig et al., 2008),*RNS1*基因在L1中上调了159.8

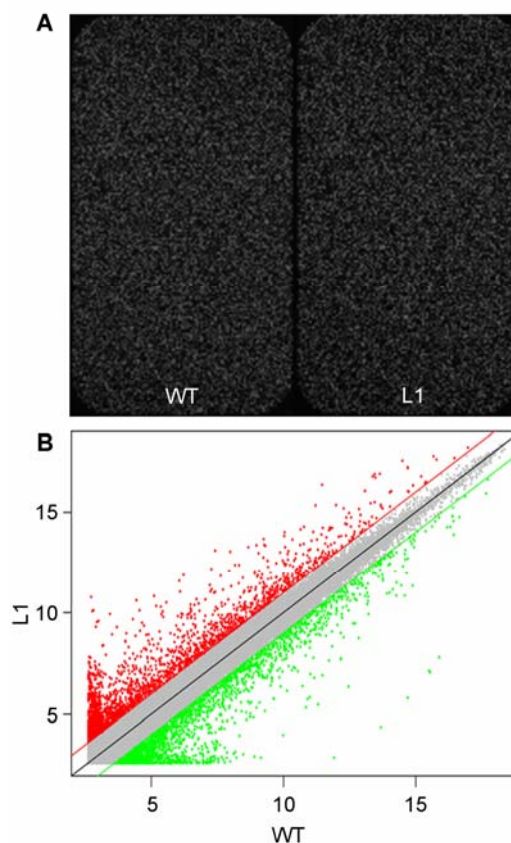


图1 基因芯片扫描结果图(A)和散点图(B)  
WT: 野生型拟南芥; L1: 转*SINAC4*基因拟南芥

Figure 1 Microarray scan result (A) and scatter plot (B)  
WT: Wild type Arabidopsis; L1: *SINAC4*-transgenic Arabidopsis

**表2** 差异表达基因上调和下调倍数的分级分析**Table 2** The grading analysis of up- and down-regulated genes

Fold change (FC)	The number of differentially expressed genes (up-regulated)	The number of differentially expressed genes (down-regulated)
FC≥200	1	5
100<FC≤200	2	0
50<FC≤100	5	3
30<FC≤50	17	10
10<FC≤30	153	123
5<FC≤10	296	233
2<FC≤5	1104	1142
Total	1578	1516

倍。*CYP94B3*是拟南芥细胞色素P450的94家族B亚家族3多肽的mRNA, 可以通过调节植物体内JA-Ile的含量响应植物的损伤胁迫(Kitaoka et al., 2011), *CYP94B3*在L1中上调了159.8倍。*WRKY*转录因子是植物中的一类重要转录因子, *WRKY38*参与了多种逆境胁迫的应答。大麦(*Hordeum vulgare*) *WRKY38*提高了转基因拟南芥和水稻的耐寒及抗旱能力(Marè et al., 2004), *WRKY38*在L1中上调了90.9倍。*DFR*编码二氢黄酮醇4-还原酶, 水稻miR156通过调控其下游基因*DFR*的表达, 提高转基因拟南芥对胁迫的敏感

性, 增强转基因拟南芥的抗胁迫能力(Cui et al., 2014), *DFR*在L1中上调了51.7倍。*NRT2.6*在拟南芥中通过影响ROS的产生来抵抗非生物胁迫(Dechorgnat et al., 2012), *NRT2.6*在L1中上调了37倍。从以上结果可初步推测 *SINAC4*可能通过调控 *AT2G38240*的表达促进转基因拟南芥的生长发育, 并通过调控 *RNS1*、*CYP94B3*、*WRKY38*、*DFR*以及*NRT2.6*基因的表达提高转基因拟南芥的抗逆性。

差异表达基因中下调30倍以上的有22个, 其中2个基因与非生物胁迫抗性有关, 没有检测到与生长发育相关的基因(表4)。*ORA59*是1种AP2/ERF转录因子, 它能够调控*PDF*基因的表达进而影响茉莉酸的信号转导, 茉莉酸能促进植物根的生长, 提高其抗渗透胁迫能力(Pré et al., 2008; Wasternack and Hause, 2013), *ORA59*在L1中下调了35.714倍。*EXPA8*可使株型细胞壁松弛, 细胞膨压增大, *EXPA8*在L1中下调了20.8倍。综上, *SINAC4*可能通过抑制*EXPA8*和*ORA59*的表达进而增强转基因拟南芥的抗逆性。

## 2.4 GO分析

对上调5倍以上的474个基因进行GO分析, 按照主要功能进行分类。差异表达基因中分子功能相关基因有397个(占34.67%), 细胞组分相关基因有371个(占

**表3** 上调表达30倍以上且与生长发育和非生物胁迫相关的基因**Table 3** The genes related to growth and abiotic stress up-regulated more than 30 folds

Gene	Probe name	Genbank ID	Fold change	Description
<i>AT2G38240</i>	A_84_P13535	NM_129381	264.7097272	<i>Arabidopsis thaliana</i> 2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase-like protein mRNA
<i>RNS1</i>	A_84_P12620	NM_126351	159.8315049	<i>A. thaliana</i> ribonuclease 1 mRNA
<i>CYP94B3</i>	A_84_P10863	NM_114710	159.1771897	<i>A. thaliana</i> cytochrome P450, family 94, subfamily B, polypeptide 3 mRNA
<i>WRKY38</i>	A_84_P11143	NM_122163	90.91724735	<i>A. thaliana</i> putative WRKY transcription factor 38 mRNA
<i>DFR</i>	A_84_P17806	NM_123645	51.68307486	<i>A. thaliana</i> dihydroflavonol-4-reductase mRNA
<i>NRT2.6</i>	A_84_P24087	NM_114375	37.13609723	<i>A. thaliana</i> high affinity nitrate transporter 2.6 mRNA, complete cds

**表4** 下调表达30倍以上且与非生物胁迫相关的基因**Table 4** The genes related to abiotic stress down-regulated more than 30 folds

Gene	Probe name	Genbank ID	Fold change	Description
<i>EXPA8</i>	A_84_P11569	NM_129623	0.033285	<i>Arabidopsis thaliana</i> expansin A8 mRNA, complete cds
<i>ORA59</i>	A_84_P11903	NM_100497	0.028160	<i>A. thaliana</i> ethylene-responsive transcription factor ERF-094 mRNA

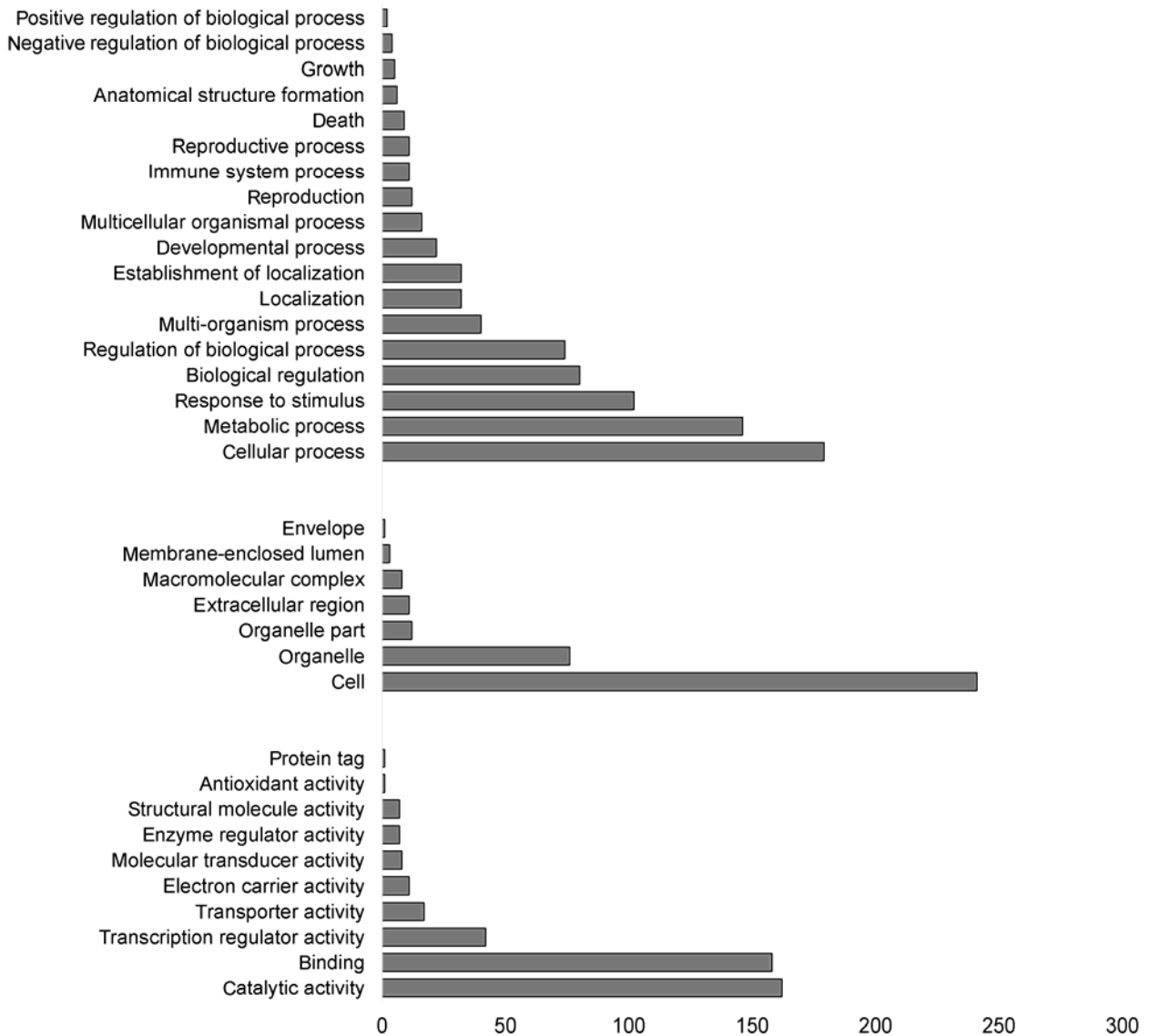


图2 上调表达5倍以上基因的GO (基因本体)注释

Figure 2 The GO (gene ontology) analysis of genes up-regulated more than 5 folds

32.40%), 生物学过程相关基因有377个(占32.93%)。分子功能主要涉及催化活性、结合和转录调控活性等; 细胞组分主要涉及细胞和细胞器成分等; 生物学过程主要涉及细胞进程、代谢过程、应激反应、生物调节和发育过程等(图2)。对下调5倍以上的374个基因进行GO分析后, 发现下调基因没有明显的GO富集词条。

上调表达的基因在生物学过程的富集词条主要

有胁迫应答和生长发育, 其中与非生物胁迫相关的基因共计195个(表5)。AZF1通过抑制其下游其它转录因子的表达, 来提高拟南芥对低温和高盐胁迫的抗性(Sakamoto et al., 2004), AZF1在L1中的表达上调了19倍。SHD编码1种HSP90样蛋白, 响应盐、冷和镉离子胁迫, 并参与调节分生组织的生长。拟南芥中定位于叶绿体的HSP90.5对叶绿体的形成以及胚胎发育至关重要(Song et al., 2009; Feng et al., 2013),

**表5** GO (基因本体)注释中与非生物胁迫相关的部分差异基因**Table 5** The GO (gene ontology) analysis of differentially expressed genes associated with abiotic stress

GO ID	GO item	Hit	Representative gene	Enrichment test P-value	Q-value
GO:0033554	Cellular response to stress	2	<i>RNS1</i> and <i>AT3G50210</i>	0.91	0.7771
GO:0006970	Response to osmotic stress	6	<i>MYB15</i> , <i>ABR1</i> , <i>SHD</i> and <i>AZF1</i>	0.7284	0.7771
GO:0006979	Response to oxidative stress	6	<i>TT4</i> , <i>ATGSTF6</i> and <i>WRKY28</i>	0.3190	0.5439
GO:0006952	Defense response	46	<i>AtRLP</i> and <i>WRKY</i>	0.0	0.0
GO:0009408	Response to heat	4	<i>BIP3</i> and <i>AT1G53540</i>	0.1918	0.4325
GO:0009409	Response to cold	2	<i>BGL2</i> and <i>AZF1</i>	0.9603	0.7771
GO:0009414	Response to water deprivation	6	<i>LTP4</i> and <i>ATDR4</i>	0.1206	0.3513
GO:0009611	Response to wounding	12	<i>TAT3</i> and <i>BSMT1</i>	0	8.0E-4
GO:0042594	Response to starvation	2	<i>RNS1</i>	0.3422	0.5439
GO:0009266	Response to temperature stimulus	6	<i>BIP3</i> and <i>AZF1</i>	0.7124	0.769
GO:0009314	Response to radiation	3	<i>TT4</i> and <i>4CL3</i>	0.9914	0.7771
GO:0009725	Response to hormone stimulus	15	<i>ATMPK11</i> and <i>GEA6</i>	0.2636	0.4937
GO:0009415	Response to water	6	<i>ATDR4</i> and <i>SHN1</i>	0.1385	0.3645
GO:0009753	Response to jasmonic acid stimulus	13	<i>RNS1</i> and <i>TAT3</i>	0	1.0E-4
GO:0009636	Response to toxin	4	<i>ATGSTF6</i>	0.0301	0.155
GO:0009751	Response to salicylic acid stimulus	14	<i>WRKY38</i> and <i>WAK1</i>	0	0
GO:0010033	Response to organic substance	8	<i>MYB15</i> and <i>ZAT7</i>	0.0169	0.1208
GO:0010035	Response to inorganic substance	5	<i>MYB15</i> and <i>NIT2</i>	0.9111	0.7771
GO:0042493	Response to drug	1	<i>AT2G04050</i>	0.6524	0.7484

**表6** GO (基因本体)注释中与生长发育相关的差异基因**Table 6** The GO (gene ontology) analysis of differentially expressed genes associated with growth and development

GO ID	GO item	Hit	Representative gene	Enrichment test P-value	Q-value
GO:0003006	Reproductive developmental process	5	<i>STY2</i> and <i>NGA4</i>	0.9942	0.7771
GO:0048869	Cellular developmental process	7	<i>PIP5K3</i> and <i>BST1</i>	0.2704	0.4964
GO:0048868	Pollen tube development	1	<i>RIC4</i>	0.6983	0.7679
GO:0007275	Gametophyte development	2	<i>4CL3</i>	0.7720	0.7771
GO:0009791	Post-embryonic development	5	<i>TTG2</i> and <i>NGA4</i>	0.9992	0.7771
GO:0048731	System development	9	<i>LRP1</i>	0.7099	0.7690
GO:0009908	Flower development	3	<i>STY2</i> and <i>KNAT2</i>	0.8246	0.7771
GO:0010154	Fruit development	2	<i>GEA6</i> and <i>TTG2</i>	0.9943	0.7771
GO:0048469	Cell maturation	2	<i>PIP5K3</i>	0.1526	0.3814
GO:0009888	Tissue development	5	<i>BST1</i>	0.4588	0.6220
GO:0010214	Seed coat development	1	<i>TTG2</i>	0.1413	0.3645
GO:0048827	Phyllome development	2	<i>TT8</i>	0.8260	0.7771
GO:0051094	Positive regulation of developmental process	1	<i>AT2G31880</i>	0.5484	0.6759

*SHD*在L1中的表达上调了5.7倍。*ATGSTF2*响应胁迫,并调控植物防御相关化合物的结合与运输(Dixon et al., 2011),*ATGSTF6*与其属于同一个亚家族,*ATGSTF6*在L1中的表达上调了5.8倍。*ATPMEPCRB*在植物抵御冷和冻害过程中起重要作用,过表达同亚

家族的*AtPME41*基因,发现其可依赖BR信号转导途径提高转基因拟南芥抵御低温胁迫的能力(Qu et al., 2011),*ATPMEPCRB*在L1中的表达上调了5.5倍。对胁迫相关差异基因的GO分析表明,*SINAC4*可通过调控*AZF1*、*ATGSTF2*和*ATPMEPCRB*的表达提高转基

表7 差异表达基因的KEGG分析

Table 7 KEGG analysis of differentially expressed genes

Name	Number	Percent (%)	P-value	Q-value
Plant hormone signal transduction	232	16.38	0	0
Plant-pathogen interaction	148	22.97	0	0
Flavonoid biosynthesis	19	31.58	3.0E-4	0.0074
Brassinosteroid biosynthesis	7	42.86	0.0038	0.1198
Indole alkaloid biosynthesis	7	42.86	0.0053	0.0652
Arginine and proline metabolism	66	15.15	0.0069	0.0652
Phosphatidylinositol signaling system- <i>Arabidopsis thaliana</i>	49	16.33	0.0013	0.0235

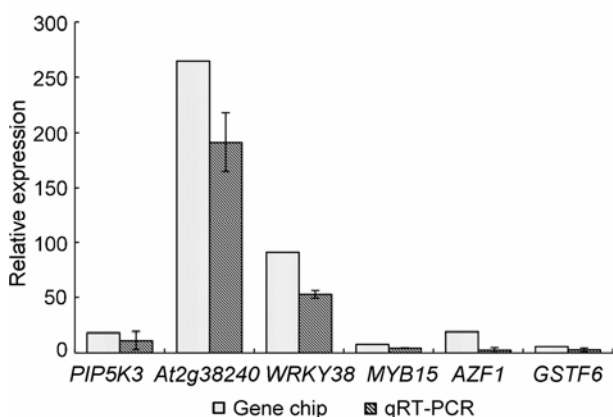


图3 基因芯片与实时荧光定量PCR结果的比对

Figure 3 The comparisons on results of gene chip and qRT-PCR

因拟南芥对胁迫的抗性。同时在GO结果中我们还发现了MYB和WRKY转录因子家族成员, MYB可调节植物的生长、代谢并具有调控植物抵抗非生物胁迫的能力(Li and Fan, 2015)。MYB15响应盐胁迫及乙烯、生长素和茉莉酸的刺激。过表达MYB15可增强ABA生物合成信号相关基因的表达进而提高拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性(Ding et al., 2009), MYB15在L1中的表达上调了7.8倍。WRKY是应对生物和非生物胁迫、衰老、种子休眠和萌发等过程的关键调控因子(Rushton et al., 2012)。WRKY28可以增强拟南芥抗盐、干旱及氧化胁迫的能力(Babitha et al., 2013), WRKY28在L1中的表达上调了11倍。SINAC4可能通过调控MYB和WRKY类转录因子基因的表达提高转基因拟南芥的抗逆性。

另外, 从表6可以看出, GO分析中与生长发育相

关的差异表达基因共有45个, STY2可促进拟南芥柱头的发育, 并影响拟南芥雌蕊形成过程中的维管组织发育(Kuusk et al., 2002), STY2在L1中的表达上调了5.8倍。PIP5K3在根皮层、表皮细胞和根毛中表达, 并参与根毛的形成(Stenzel et al., 2008), PIP5K3在L1中的表达上调了17.9倍。BST1的别名为DER (deformed root hairs), 它能促进根毛细胞的分化, 影响根毛不同阶段的形态发育(Ringli et al., 2005), BST1在L1中的表达上调了6倍。对生长发育相关差异基因的GO分析表明, SINAC4可能通过调控STY2、PIP5K3和BST1的表达进而促进转基因拟南芥的生长发育。

## 2.5 KEGG pathway富集分析

对差异表达两倍以上基因进行KEGG pathway富集分析, 发现共涉及90个信号通路, 主要富集在植物激素信号转导、植物病原体互作、黄酮类化合物生物合成、油菜素内酯合成、吲哚生物碱合成、精氨酸和脯氨酸代谢及磷脂酰肌醇信号系统(表7)。

植物激素信号转导在细胞分裂与伸长、组织与器官分化、开花与结实、成熟与衰老、休眠与萌发等方面调控植物的生长、发育和分化(Waadt et al., 2015)。Reitman和Frankel (1957)的研究显示, 黄酮类化合物以氢键的形式与细胞膜结合, 保护细胞膜上的不饱和键, 使其远离自由基, 防止脂质过氧化。黄酮类化合物可清除植物体内的氧自由基, 增强植物的抗氧化性。油菜素内酯可改善植物的生理代谢, 并调节植物的许多生理过程(赵毓橘, 1995)。Sairam (1994)的研究发现, 油菜素内酯能够增加生长在干旱条件下小麦(*Triticum aestivum*)的叶面积、叶绿素含量和可溶性蛋白含量, 油菜素内酯合成可增强植物的抗旱性。

*SINAC4*通过调控植物激素信号转导等途径中基因的表达, 进而调控植物在逆境条件下的生长发育。

## 2.6 实时荧光定量PCR分析

为了验证基因芯片结果的可靠性, 选取6个基因(*PI-P5K3*、*AT2G38240*、*WRKY38*、*MYB15*、*AZF1*和*GSTF6*)进行实时荧光定量PCR分析。结果显示, 尽管实时荧光定量PCR与基因芯片两种方法得到的基因表达差异倍数有所不同, 但表达趋势基本一致(图3), 表明基因芯片所得结果可靠。

目前, 关于NAC调控网络的研究报道较少, 本文以转基因和野生型拟南芥为实验材料, 运用基因芯片技术寻找*SINAC4*调控的下游基因及相关代谢途径, 发现*SINAC4*对植物抵抗非生物胁迫的调节机制非常复杂, 既包括对基因的调控, 也包括对转录因子的调控。后续我们将从中选择部分基因和转录因子进行实验验证及进一步的功能研究, 以期探索*SINAC4*的调控网络提供理论依据。

## 参考文献

- 李小兰, 胡玉鑫, 杨星, 于晓东, 李秋莉 (2013). 非生物胁迫相关NAC转录因子的结构及功能. *植物生理学报* **49**, 1009–1017.
- 刘浩 (2011). 拟南芥一个20G-Fe(II)氧化还原酶在GA合成及其与ABA互作的功能分析. 博士论文. 开封: 河南大学. pp. 29–46.
- 宿明星 (2012). 辽宁碱蓬*SINAC4*、*SINAC10*转录因子基因克隆及功能分析. 硕士论文. 大连: 辽宁师范大学. pp. 45–54.
- 赵毓橘 (1995). 油菜素内酯研究进展. *植物学通报* **12**, 30–34.
- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M (1997). Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell* **9**, 841–857.
- Babitha KC, Ramu SV, Pruthvi V, Mahesh P, Nataraja KN, Udayakumar M (2013). Co-expression of *AtbHLH17* and *AtWRKY28* confers resistance to abiotic stress in Arabidopsis. *Transgenic Res* **22**, 327–341.
- Bouaziz D, Charfeddine M, Jbir R, Saidi MN (2015). Identification and functional characterization of ten *AP2/ERF* genes in potato. *Plant Cell* **123**, 155–172.
- Chen LG, Song Y, Li SJ, Zhang LP, Zhou CS, Yu DQ (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 120–128.
- Cui LG, Shan JX, Shi M, Gao JP, Lin HX (2014). The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J* **80**, 1108–1117.
- Dechorgnat J, Patrit O, Krapp A, Fagard M, Daniel-Vedele F (2012). Characterization of the *Nrt2.6* gene in *Arabidopsis thaliana*: a link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS One* **7**, e42491.
- Ding Z, Li S, An X, Liu X, Qin H, Wang D (2009). Transgenic expression of *MYB15* confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Genet Genomics* **36**, 17–29.
- Dixon DP, Sellars JD, Edwards R (2011). The Arabidopsis phi class glutathione transferase AtGSTF2: binding and regulation by biologically active heterocyclic ligands. *Biochem J* **438**, 63–70.
- Feng JJ, Fan PX, Jiang P, Lv SL, Chen XY, Li YX (2013). Chloroplast-targeted Hsp90 plays essential roles in plastid development and embryogenesis in Arabidopsis possibly linking with VIPP1. *Physiol Plant* **150**, 292–307.
- Hao YJ, Wei W, Song QX, Chen HW, Zhang YQ, Wang F, Zou HF, Lei G, Tian AG, Zhang WK, Ma B, Zhang JS, Chen SY (2011). Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *Plant J* **68**, 302–313.
- Hillwig MS, Lebrasseur ND, Green PJ, Macintosh GC (2008). Impact of transcriptional, ABA-dependent, and ABA-independent pathways on wounding regulation of *RNS1* expression. *Mol Genet Genomics* **280**, 249–261.
- Kitaoka N, Matsubara T, Sato M, Takahashi K, Wakuta S, Kawaide H, Matsui H, Nabeta K, Matsuura H (2011). Arabidopsis *CYP94B3* encodes jasmonyl-L-isoleucine 12-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of jasmonate. *Plant Cell Physiol* **52**, 1757–1765.
- Kuusik S, Sohlberg JJ, Long JA, Fridborg I, Sundberg E (2002). *STY1* and *STY2* promote the formation of apical tissues during Arabidopsis gynoecium development. *Development* **129**, 4707–4717.
- Li CN, Fan LM (2015). MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environ Exp Bot* **114**, 80–91.
- Li XL, Yang X, Hu YX, Yu XD, Li QL (2014). A novel NAC transcription factor from *Suaeda liaotungensis* K. enhanced transgenic Arabidopsis drought, salt, and cold stress tolerance. *Plant Cell Rep* **33**, 767–778.

- Marè C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia A, Stanca AM, Cattivelli L** (2004). Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Mol Biol* **55**, 399–416.
- Movahedi A, Zhang JX, Yin TM, Qiang ZG** (2015). Functional analysis of two orthologous NAC genes, *CarNAC3*, and *CarNAC6* from *Cicer arietinum*, involved in abiotic stresses in poplar. *Plant Mol Biol Rep* **33**, 1539–1551.
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CM, Memelink J** (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* **147**, 1347–1357.
- Qu T, Liu R, Wang W, An L, Chen T, Liu G, Zhao ZG** (2011). Brassinosteroids regulate pectin methylesterase activity and *AtPME41* expression in *Arabidopsis* under chilling stress. *Cryobiology* **63**(2), 111–117.
- Reitman S, Frankel S** (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* **28**, 56–63.
- Ringli C, Baumberger N, Keller B** (2005). The *Arabidopsis* root hair mutants *der2-der9* are affected at different stages of root hair development. *Plant Cell Physiol* **46**, 1046–1053.
- Rushton DL, Tripathi P, Rabara RC, Lin J, Ringler P, Boken AK, Langum TJ, Smidt L, Boomsma DD, Emme NJ, Chen XF, Finer JJ, Shen QXJ, Rushton PJ** (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signaling. *Plant Biotechnol J* **10**, 2–11.
- Sairam RK** (1994). Effect of homobor as sinolide application on plangmet abolismand grain yield under irrigated and moisture stress conditions of two wheat varieties. *Plant Growth Regul* **14**, 173–181.
- Sakamoto H, Maruyama K, Sakuma Y, Meshi T, Iwabuchi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2004). *Arabidopsis* Cys2/His2-type zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiol* **136**, 2734–2746.
- Sakuraba Y, Kim YS, Han SH, Lee BD, Paek NC** (2015). The *Arabidopsis* transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing *AREB1* transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP. *Plant Cell* **27**, 1771–1787.
- Shingote PR, Kawar PG, Pagariya MC, Kuhikar RS, Thorat AS, Babu KH** (2015). SoMYB18, a sugarcane MYB transcription factor improves salt and dehydration tolerance in tobacco. *Acta Physiol Plant* **37**, 1–12.
- Song HM, Fan PX, Li YX** (2009). Overexpression of organelar and cytosolic *AtHSP90* in *Arabidopsis thaliana* impaires plant tolerance to oxidative stress. *Plant Mol Biol Rep* **27**, 342–349.
- Souer E, van Houwelingen AV, Kloos D, Mol J, Koes R** (1996). The *no apical meristem* gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* **85**, 159–170.
- Stenzel I, Ischebeck T, König S, Holubowska A, Sporysz M, Hause B, Heilmann I** (2008). The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**, 124–141.
- Waadt R, Hsu PK, Schroeder JI** (2015). Abscisic acid and other plant hormones: methods to visualize distribution and signaling. *Bioessays* **37**, 1338–1349.
- Wasternack C, Hause B** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann Bot* **111**, 1021–1058.
- Xu ZY, Kim SY, Hyeon DY, Kim DH, Dong T, Park Y** (2013). The *Arabidopsis* NAC transcription factor ANAC-096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses. *Plant Cell* **25**, 4708–4724.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 781–803.
- Yang XW, Wang XY, Ji L, Yi ZL, Fu CX, Ran JC, Hu RB, Zhou GK** (2015). Overexpression of a *Miscanthus lutaripariis* NAC gene *MINAC5* confers enhanced drought and cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* **34**, 943–958.
- Zhao LF, Hu YB, Chong K** (2010). *ARAG1*, an ABA-responsive DREB gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice. *Ann Bot* **105**, 401–409.
- Zhong R, Demura T, Ye ZH** (2006). SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 3158–3170.

## Analysis of Differentially Expressed Genes in *Suaeda liaotungensis* *NAC4* (*SINAC4*)-transgenic Arabidopsis

Qianqian Li, Yang Jiao, Jingyang Yu, Qiuli Li\*

College of Life Sciences, Liaoning Normal University/Key Laboratory of Plant Biotechnology of Liaoning Province, Dalian 116081, China

**Abstract** Microarray assay was used for gene expression profiling of *Suaeda liaotungensis* *NAC4* (*SINAC4*)-transgenic Arabidopsis and the wild type. *SINAC4*-transgenic Arabidopsis showed 3 094 differentially expressed genes as compared with the wild type. Gene ontology analysis revealed 195 differentially expressed genes related to abiotic stress and 47 related to growth and development, including MYB and WRKY transcription factor genes. KEGG analysis revealed the differentially expressed genes involved in 90 signaling pathways. The main signaling pathways were plant hormone signal transduction and brassinosteroid synthesis. The differential expression of selected genes was validated by qRT-PCR. *SINAC4* regulated the expression of downstream genes directly and indirectly, functioning in plant growth and development and abiotic stress tolerance.

**Key words** growth and development, differentially expressed gene, gene chip, *NAC*, stress

**Li QQ, Jiao Y, Yu JY, Li QL** (2016). Analysis of differentially expressed genes in *Suaeda liaotungensis* *NAC4* (*SINAC4*)-transgenic Arabidopsis. *Chin Bull Bot* **51**, 764–773.

---

\* Author for correspondence. E-mail: skyliqiuli@163.com