

木薯 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 基因的克隆及其转录活性分析

孟宇红¹ 陈新^{2,3} 马平安^{2,3} 宋羽³ 张圣奎^{2,3} 王文泉^{2,3*}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海口 571101;

2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101;

3. 新疆农业科学院农作物品种资源研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要 为揭示碱性亮氨酸拉链转录因子(Basic leucine zipper, bZIP)家族在木薯块根发育和淀粉积累中的功能。本研究克隆了木薯 bZIP 基因家族 2 个成员 *MebZIP7* 和 *MebZIP9*, 系统分类比较发现它们为 A 亚族, 属于 ABF (ABA-response-element-binding factor) 类基因, 亚细胞定位试验发现它们具有核定位特征。通过实时荧光定量 PCR(qPCR) 分析证明 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 在栽培品种块根和叶片中表达显著高于野生型, 二者均受外源脱落酸 (ABA) 诱导, 在块根中快速增加 10.7 和 6.3 倍, 然后下降; 叶片中均为 4.5 倍, 时间滞后。进而对于其在大田条件下多个栽培品种和野生型不同发育时期块根及叶片中的表达进行分析, 证明 *MebZIP9* 在栽培品种发育不同时期块根和叶片中的转录活性均显著高于野生型, 且块根中更突出; *MebZIP7* 在块根发育早中期高于野生型。说明 ABF 类基因参与木薯 ABA 信号通路且影响块根淀粉积累。

关键词 木薯; 碱性亮氨酸拉链; 基因差异表达; 淀粉积累

中图分类号 S 533

文章编号 1007-4333(2019)02-0028-10

文献标志码 A

Cloning and transcription profiling of two basic leucine zipper genes, *MebZIP7* and *MebZIP9*, in cassava

MENG Yuhong¹, CHEN Xin^{2,3}, MA Pingan^{2,3}, SONG Yu³, ZHANG Shengkui^{2,3}, WANG Wenquan^{2,3*}

(1. College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 571101, China;

2. Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;

3. Institute of Crop Variety Resources, Xinjiang Academy of Agricultural Science, Urumchi 830091, China)

Abstract To investigate the function of basic leucine zipper (bZIP) in cassava root development and starch biosynthesis, two members in bZIP family, *MebZIP7* and *MebZIP9* were cloned and used for a series of expression analysis in cultivars and wild sub-species under different conditions. Phylogenetic tree analysis ascribed the two members into A subfamily of bZIP family, belonged to abscisic acid response element binding factor (ABF). Sub-cell location confirmed that they appeared inside the nuclear of cell, partly identified their transcription factor feature. Q-PCR screening revealed that the expressions of *MebZIP7* and *MebZIP9* were significantly higher in storage root and functional leave of the cultivar than those in wild ancestor W14. And both of them were quickly induced by ABA, with 10.7- and 6.3-fold expression in storage root, equally 4.5-fold in leave of cultivar than wild W14 and reached to the peak after one hour and reduced to the initial level after 24 h. Furthermore, their transcriptional activity in timely developing stages under field condition in 3 cultivars and wild W14 were evaluated. It was shown that the *MebZIP9* was not only in storage root but also in leaves remarkable high expressed in those 3 cultivars than in the wild W14. But the expression level of *MebZIP7* was not significant different except there were higher expressions in storage root of 90

收稿日期: 2018-04-20

基金项目: NSFC-CG 联合基金“木薯全基因组关联分析与分子育种模型”资助(31261140363); 国家木薯产业技术体系品种改良项目(CARS-11-HNww8); 新疆自治区区域合作创新专项(2016E02014)

第一作者: 孟宇红, 硕士研究生, E-mail: hymeng92@163.com

通讯作者: 王文泉, 研究员, 主要从事木薯遗传育种研究, E-mail: wangwenquan@itbb.org.cn

and 150 d of cultivars. This study indicated that the *MebZIPs* were involved in ABA signal transduction, which was related to starch accumulation in cassava.

Keywords cassava (*Manihot esculenta* Crantz); basic leucine zipper; gene different expression; starch accumulation

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)起源于中南美洲亚马逊热带雨林地区, 分属大戟科(*Euphorbiaceae*)木薯属(*Manihot* P. Mill.)多年生植物^[1]。木薯、马铃薯和甘薯并称世界三大薯类作物, 所产淀粉广泛用于食品和工业原料, 是重要的粮食和经济作物^[2]。木薯野生祖先种与栽培种的全基因组分析显示: 木薯栽培种的淀粉合成相关基因转录活性增强^[3], 而木薯块根淀粉积累是一个复杂的生理代谢过程, 会受到内源激素的调控, 研究发现脱落酸(ABA)对木薯块根淀粉积累起促进作用^[4]。其他植物, 如小麦内源激素 ABA 通过调节籽粒中蔗糖-淀粉代谢的关键酶活性, 促进籽粒灌浆^[5], 外源 ABA 处理水稻种子后籽粒千粒重增加, 产量增加^[6]。

碱性亮氨酸拉链(bZIP)是家族成员众多的一类转录因子。bZIP 转录因子有高度保守的 bZIP 区, 由一个碱性区和一个亮氨酸拉链组成^[7]。依据 bZIP 相似的碱性区和附加的保守序列将模式植物拟南芥的 bZIP 基因划分为 10 个亚族, 分别为 A-I 和 S 亚族, 其中 A 亚族与 ABA 相关, 属于脱落酸响应元件结合因子(ABF)^[8]。ABF 可以反式激活在启动子区含有脱落酸响应元件(ABA response element, ABRE)的效应基因, 它的表达受 ABA 和各种胁迫诱导^[9]。ABF 参与 ABA 信号通路, ABA 结合 PYL 后破坏了 SnRK2 蛋白激酶和 PP2C 的相互作用, 进而激活 SnRK2 蛋白激酶使 ABF 磷酸化, 从而调节响应 ABA 信号相关基因的表达^[10-12]。拟南芥 *ABF2* 过表达植株中 *SuSy1* (*Sucrose synthase1*) 的表达水平低于野生型, 高浓度盐处理后 *SuSy1* 在转基因植株中的转录水平高^[13]。

基因组研究表明木薯碱性亮氨酸拉链(*MebZIP*)同样是一个大的转录因子家族^[14], 目前对其研究报道相对较少。本研究针对 bZIP A 亚族基因: *MebZIP7* 和 *MebZIP9*, 通过测定它们在淀粉积累效率不同木薯野生和栽培品种中的转录活性, 以及在外源 ABA 诱导下的表达模式, 分析 *MebZIP* 成员是否参与木薯块根淀粉合成代谢调节, 旨在为深入研究 bZIP 在 ABA 参与木薯块根淀粉调控中的作用提供一些试验依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

试验选用栽培木薯 KU50、SC8、Arg7 和野生亚种 W14 (*Manihot esculenta*. ssp. *flabellifolia*), 3 个栽培种的块根淀粉含量高于野生型。KU50 和 W14 用于木薯全基因组测序。SC8 是中国热带农业科学院培育的代表性品种, 用于 ABA 处理的组培苗。种植在海南澄迈试验基地, 在种植后 90(块根形成期)、180(块根膨大期)和 210 d(块根成熟期)分别取块根及功能叶用于分析。

选择苗龄 45 d, 长势均一的 SC8 组培苗进行 ABA 处理。每个培养瓶中加入 1.0 mL 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABA 溶液, 使其均匀覆盖于培养基表面。分别处理 1、6、12 和 24 h, 取处理后的叶片和块根做后续试验。每个处理 3 次重复和 1 个对照(未经 ABA 处理)。3 个重复的混合样放入液氮中速冻, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

1.2 10 个 *MebZIP* 基因的确定及实时荧光定量表达分析

在转录因子数据库 (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 中搜索到 104 个木薯的 bZIP 转录因子, 结合本实验室已有的木薯转录组数据^[3], 挑选栽培型与野生型块根中相对表达量比值 ≥ 2 的 *MebZIP* 基因, 初步筛选到 10 个 *MebZIP* 基因(表 1)。将初步筛选到的 10 个 *MebZIP* 基因, 根据基因 ID 号依次命名为 *MebZIP1*~*MebZIP10*。

取木薯栽培种 KU50、Arg7、SC8 和野生型 W14 的块根及功能叶, 利用实时定量 PCR(qPCR) 检测 10 个 *MebZIP* 在不同品种和不同组织部位的差异表达。用 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计定量引物并检测引物的特异性, qPCR 引物序列见表 2。使用木薯 Manes.02G137500 作为内参基因^[14]。用 Mx3000P QPCR 仪, 大连宝生物公司的 PowerUpTM SYBRTM Green Master Mix 试剂进行试验。qPCR 程序: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 40 个循环, 溶解曲线 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 并用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法整理分析数据^[15]。

表1 10个 *MebZIP* 在栽培种 KU50 和野生型 W14 块根中的转录本数量及比值Table 1 The transcription and ratio of ten *MebZIP* in the cultivated species KU50 and wild-type W14

基因 Genes ID	KU50 块根 KU50 root	W14 块根 W14 root	KU50/W14 块根 KU50/W14 root	W14/KU50 块根 W14/KU50 root
Manes. 02G061900	44.45	3.94	11.29	0.09
Manes. 05G026700	67.18	6.18	10.86	0.09
Manes. 10G080700	84.63	9.47	8.94	0.11
Manes. 01G249900	44.53	18.26	2.44	0.41
Manes. 05G174500	66.30	29.55	2.24	0.45
Manes. 16G137300	109.01	48.90	2.23	0.45
Manes. 09G000300	84.49	41.38	2.04	0.49
Manes. 18G037900	35.19	19.23	1.83	0.55
Manes. S095900	47.82	224.13	0.21	4.69
Manes. 04G074300	99.96	644.68	0.16	6.45

注: RPKM, 转录本单位代表每百万 reads 中含有单个基因 1 000 碱基长度的 reads 数。

Note: RPKM, reads per kilobase per million mapped reads, which represents per million reads contain reads of one thousand base length of a gene.

表2 10个 *MebZIP* 基因实时定量分析所用引物序列Table 2 Primer sequences of ten *MebZIP* genes for qPCR

基因 ID Gene ID	基因 Gene	上游引物序列(5'-3') Forward primer sequence	下游引物序列(5'-3') Reverse primer sequence
Manes. 01G249900	<i>MebZIP1</i>	GCATGAGCACAGCATTGGAG	TTGATTGTTTCCTCCTCTCCCG
Manes. 02G061900	<i>MebZIP2</i>	TCAGTCTACAGTCATCCTGCCT	AGGTGTTTCTGCTTCCGCAT
Manes. 04G074300	<i>MebZIP3</i>	ATCTCGGATGAGAAAACAGAAGCAT	CAATCTGTGGCTAAGCTCGCT
Manes. 05G026700	<i>MebZIP4</i>	CACTGGGGAGAAGAATGCGA	GTTGTGGAATGCTAGTTACACCTG
Manes. 05G174500	<i>MebZIP5</i>	ACGTGGTAGCCTCCTCTACA	AAATTAGCTCCTCCAGTACCACC
Manes. 09G000300	<i>MebZIP6</i>	ATGGTGGGTCGGGTGTATCT	GTCGGCATTCTCTGACCTCC
Manes. 10G080700	<i>MebZIP7</i>	GTGCAAGGATTGGAGGGTCT	TGTCCTCTACCAAGAAATGACAAGA
Manes. 16G137300	<i>MebZIP8</i>	CTCAAAACATCAGCCCAAGC	TTGCTCTGCTCACAAGGACC
Manes. 18G037900	<i>MebZIP9</i>	AGCATGGTAGCCTCTTCTGGT	CATCTCCCCTAAAGTCTGCTGC
Manes. S095900	<i>MebZIP1</i>	CAGCTTCACAACTCTGGCTCT	GGGTGGTGATATTGATGCTCGT
Manes. 02G061900	内参 Reference	AATGCGCTCCTACAACAAGC	GATCATCCGTAGCAGCCTCT

1.3 植物总 RNA 提取及单链 cDNA 的合成

使用 RNA plant Plus Reagent 植物总 RNA 提取试剂, 购于天根(北京)公司。进行木薯总 RNA

的提取。RNA 质量及浓度通过琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检测。使用 Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒

购于宝生物(大连)公司合成单链 cDNA,并用木薯通用 Actin 引物检测第一链 cDNA。RNA 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$,cDNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 10 个木薯 *MebZIP* 与 127 个拟南芥 *AtbZIP* 氨基酸序列比对

在转录因子数据库 (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 中搜索拟南芥 *bZIP* 基因,得到 127 个 *bZIP*。下载拟南芥所有 *bZIP* 基因的氨基酸序列与木薯候选的 10 个 *bZIP* 基因的氨基酸序列经 CLUSTAL W 进行序列比对,之后使用 MEGA 5.0 构建系统进化树。进化树的构建使用 NJ (Neighbor-Joining) 法,并经 1 000 次 Bootstrap 统计检测。

1.5 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 基因的克隆及 *MebZIP*-GFP 载体的构建

从木薯基因组数据库 ([https://phytozome.jgi.](https://phytozome.jgi.doe.gov)

[doe.gov](https://phytozome.jgi.doe.gov)) 中搜索目的基因序列(从 10 个 *MebZIP* 中选择 2 个 *MebZIP*),并用 Primer-BLAST 设计特异性扩增引物,引物序列信息:*MebZIP7* 上游引物(5' TGTTTCATGGTTGTTAGGAATTGGT 3') 和下游引物(5' TCCTTGCACCACACAAATGG 3'); *MebZIP9* 上游引物(5' AAGAACTGAACAGGAACGTCTG 3') 和下游引物(5' CTTCCTTCCACTGCTATACCT 3')。用大连宝生物公司的 Primer STARMax DNA Polymerase,以 KU50 块根 cDNA 为模板进行基因扩增。PCR 程序:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 s,98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s,用 MEGA5.0 进行测序后序列比对。

MebZIP 基因插入 pCAMBIA1302 载体中,所用引物见表 3。通过激光扫描共聚焦显微镜观察 *MebZIP*-GFP 的融合蛋白亚细胞定位。

表 3 构建 *MebZIP*-GFP 载体所用引物

Table 3 Primer sequences for constructing *MebZIP*-GFP plasmid

基因 ID Genes ID	基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward sequence	下游引物(5'-3') Reverse sequence
Manes.10G080700	<i>MebZIP7</i>	ggatccATGCTAATTCTTTGCTCC	gtcgacCCAAGGGCCTG
Manes.18G037900	<i>MebZIP9</i>	ggatccATGGGGACTAATATCAACT	gtcgacCCATGGACCGG

注:小写字母表示酶切位点。

Note:Lowercase letters indicate enzyme cutting sites.

2 结果与分析

2.1 木薯 *MebZIPs* 在木薯栽培种和野生型中具有不同的表达谱

荧光定量表达分析结果,*MebZIP1*~*MebZIP10* 在栽培品种 KU50 块根中的相对表达量均高于野生亚种 W14,表达量比值在 1.4~185.0 倍,其中 *MebZIP9* 最高,*MebZIP1* 最低,*MebZIP7* 达到 2.3 倍,6 个成员如 *MebZIP2*、*MebZIP3*、*MebZIP4*、*MebZIP7*、*MebZIP8* 和 *MebZIP9* 表达差异达到显著和极显著水平(图 1(a))。而在功能叶中,*MebZIP4*、*MebZIP9* 和 *MebZIP10* 在栽培品种的相对表达量高于野生型,相差倍数 >2 (图 1(b))。特别是 *MebZIP9* 在块根和功能叶中的相对表达量栽培品种均显著高于野生型,倍数在 39~185。表明块根淀粉积累效率高的栽培品种块根中存在 *MebZIP* 成员的优势表达,且在功能叶中也有少数成员高表达。

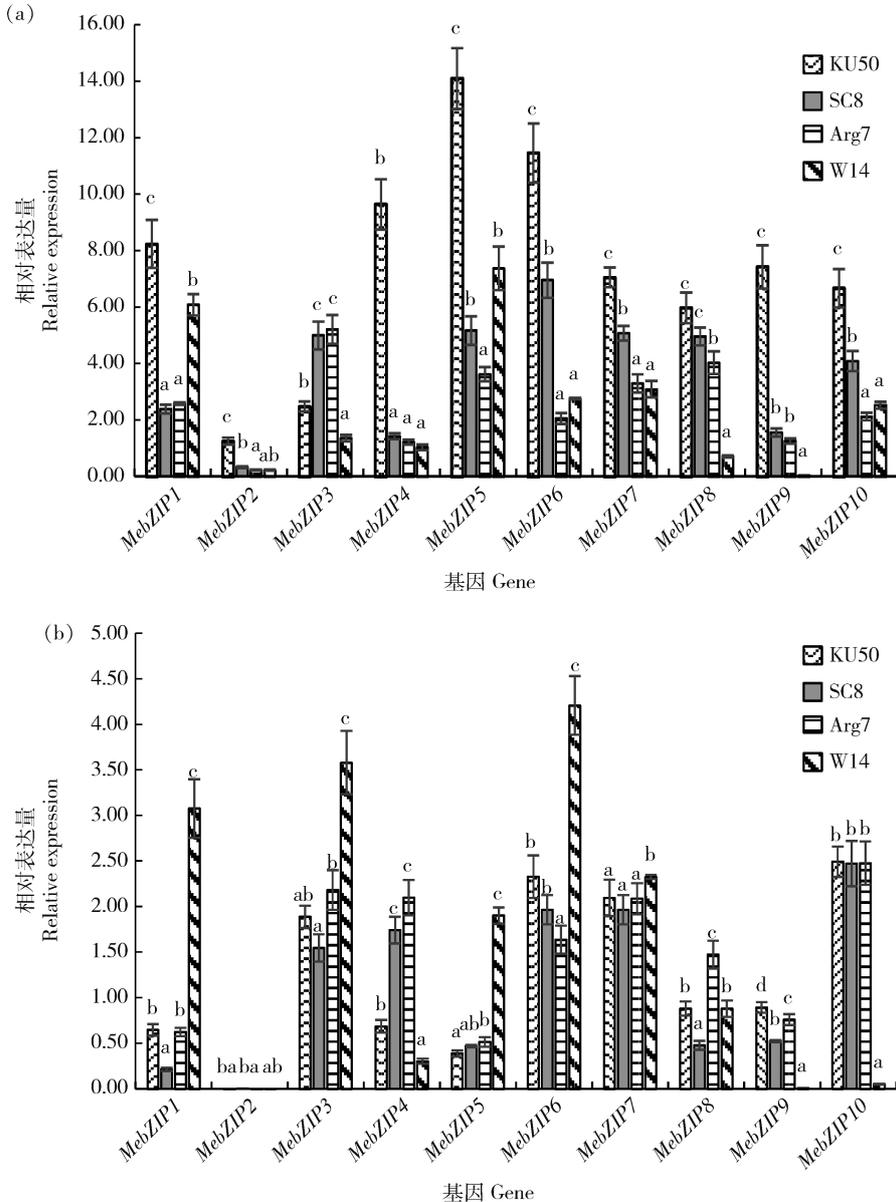
2.2 系统分类表明 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 与 ABA 信号通路相关

从转录因子数据库 (<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 中搜索到拟南芥 *bZIP* 127 个,10 个 *MebZIP* 与 *AtbZIP* 的蛋白质序列构建进化树。*bZIP* 转录因子家族总共划分为 10 个亚族,分别为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 S 亚族,而木薯 *MebZIP5*、*MebZIP7* 和 *MebZIP9* 属于 *bZIP* 家族的 A 亚族,*MebZIP2*、*MebZIP3* 和 *MebZIP10* 属于 S 亚族,*MebZIP1* 和 *MebZIP4* 属于 G 亚族,*MebZIP8* 属于 C 亚族,*MebZIP6* 属于 B 亚族(图 2)。A 亚族在 ABA 信号转导中起重要作用,C 亚族可能调控贮藏蛋白在拟南芥胚乳里的表达,G 亚族在光信号转导和种子成熟过程中起作用,S 亚族在蔗糖信号以及响应胁迫中起作用等。系统分类结果证明,*MebZIP7* 和 *MebZIP9* 属于 A 亚族,归于 ABF 类,是 ABA 信号通路成员。

2.3 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 定位于细胞核内

激光共聚焦显微镜下观察 DAPI 染色后的洋葱表皮细胞, *MebZIP7*-GFP 和 *MebZIP9*-GFP 表达的蛋白均定位于细胞核, 在细胞壁及细胞质内无绿色荧光, 而对照试验 CaMV35s::GFP 在整个洋葱表皮细胞都有 GFP 分布(图 3)。据此, 可以确定 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 均具有细胞核定位特征。bZIP 是一个大的转录因子家族, 该试验证明木薯中这 2 个成员属于转录因子功能蛋白。

个洋葱表皮细胞都有 GFP 分布(图 3)。据此, 可以确定 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 均具有细胞核定位特征。bZIP 是一个大的转录因子家族, 该试验证明木薯中这 2 个成员属于转录因子功能蛋白。



KU50, SC8 和 Arg7 是栽培木薯; W14 是野生木薯。

KU50, SC8 and Arg7 are cultivated cassava. W14 is wild cassava.

同组柱形图不同小写字母表示品种间表达差异显著 ($P < 0.05$)

Different letters above the column indicate significant differences in expression between the two varieties of cassava.

图 1 10 个 *MebZIP* 基因在栽培和野生型块根 (a) 与叶片 (b) 中的表达差异

Fig. 1 Tissue-specific expression of ten *MebZIP* genes in root (a) and leaves (b) of cultivated and wild species

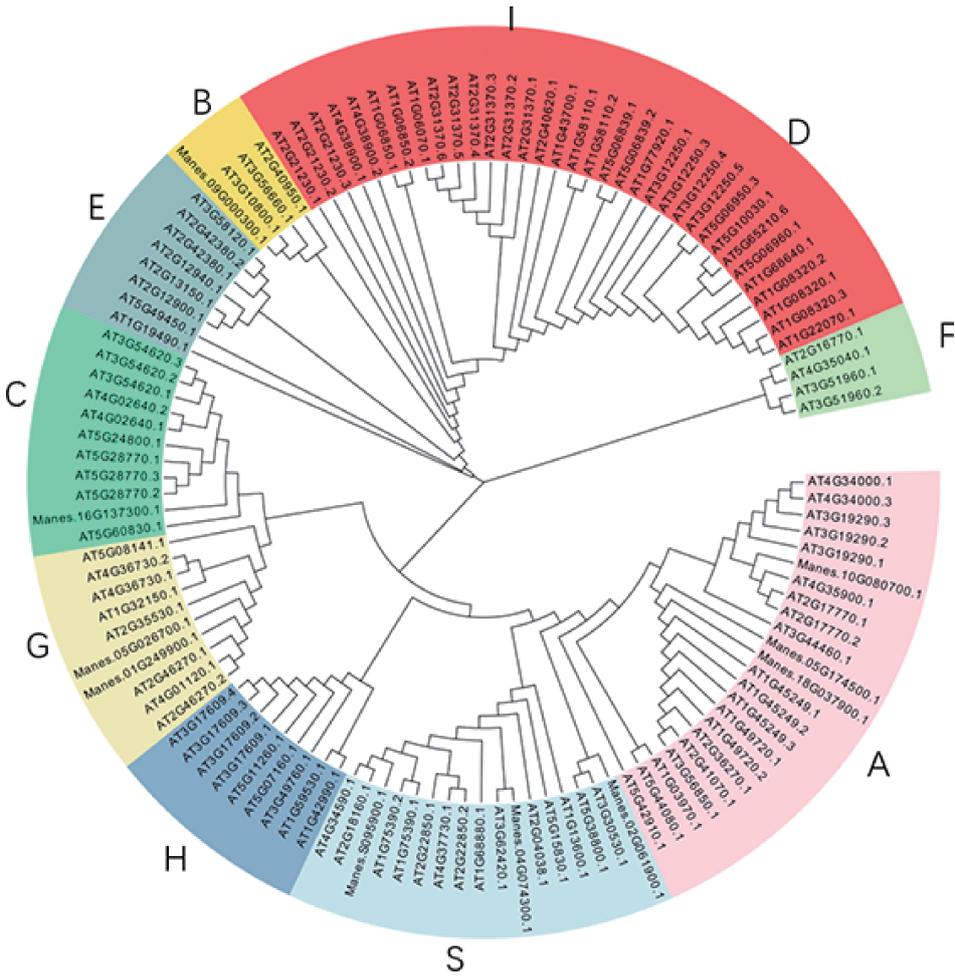
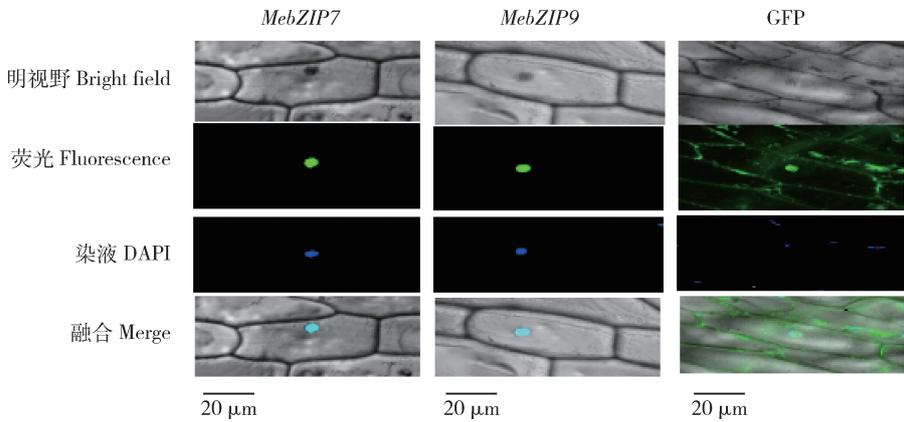


图 2 构建 10 个 *MebZIP* 系统发育树

Fig. 2 Constructing phylogenetic tree of ten *MebZIPs*



绿色, GFP 是绿色荧光蛋白, 激光共聚焦显微镜下发出绿色荧光; 蓝色, DAPI 染液染色, 激光共聚焦显微镜下发出蓝色荧光。标尺: 20 μm

Green, GFP are green fluorescent proteins, which emit green fluorescence under laser confocal microscopy; Blue, DAPI dye staining and emits blue fluorescence under laser confocal microscopy. Bar: 20 μm

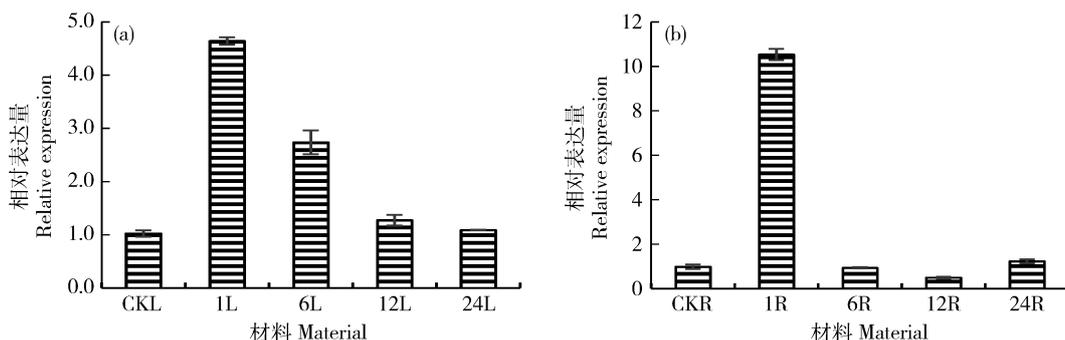
图 3 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 在洋葱表面亚细胞定位

Fig. 3 *MebZIP7* and *MebZIP9* locate in the nucleus of onion surface cell

2.4 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 受外源 ABA 诱导上调表达

ABA 处理木薯后 1 h, *MebZIP7* 被强烈诱导表达且相对表达量达到峰值, 此时根中和叶片的相对表达量分别是对照的 10.7 和 4.5 倍; *MebZIP7* 的相对表达量随处理时间的增加而逐渐降低, 24 h 时与初始水平一致(图 4)。 *MebZIP9* 同样被 ABA 诱导上调, 1 h 根中的相对表达量达到峰值, 是对照的

6.3 倍; 在叶片中的相对表达量在 6 h 达到最高, 是对照的 4.5 倍; *MebZIP9* 在 ABA 处理下的相对表达量先升高后下降, 24 h 根中的相对表达量低于初始水平(图 5)。 尽管在幼苗培养条件下与自然生长发育条件有很大差异, 仍然可以捕捉到木薯根和叶片中 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 受到外源 ABA 信号诱导而增强表达, 说明 2 个 bZIP 成员确实参与 ABA 信号途径。



1L 和 1R: 叶片, 块根 ABA 处理 1 h; 6L 和 6R: 叶片, 块根 ABA 处理 6 h; 12L 和 12R: 叶片, 块根 ABA 处理 12 h; 24L 和 24R: 叶片, 块根 ABA 处理 24 h。下同。

1L and 1R, leaf and root are treated by ABA for 1 h; 6L and 6R, leaf and root are treated by ABA for 6 h; 12L and 12R, leaf and root are treated by ABA for 12 h; 24L and 24R, leaf and root are treated by ABA for 24 h. The same below.

图 4 *MebZIP7* 受 ABA 诱导在叶片 (a) 和块根 (b) 中的表达分析

Fig. 4 The expression profiles of *MebZIP7* induced by ABA in leaf (a) and storage root (b)

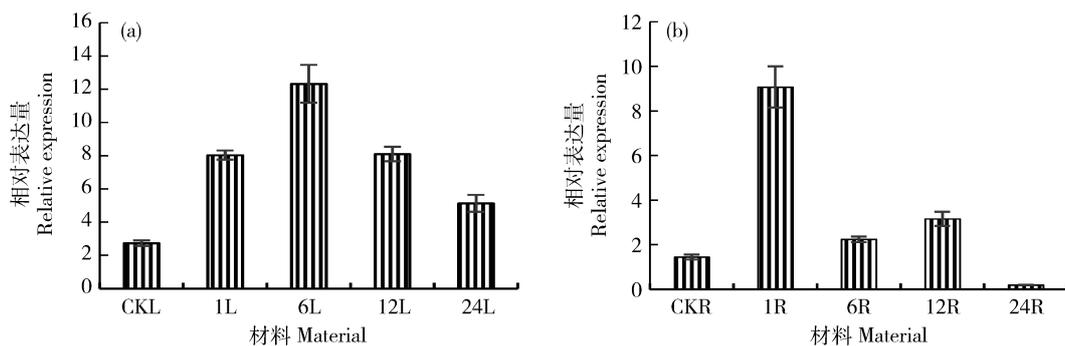


图 5 *MebZIP9* 受 ABA 诱导在叶片 (a) 和块根 (b) 中的表达分析

Fig. 5 Expression profiles of *MebZIP9* induced by ABA in leaf (a) and storage root (b)

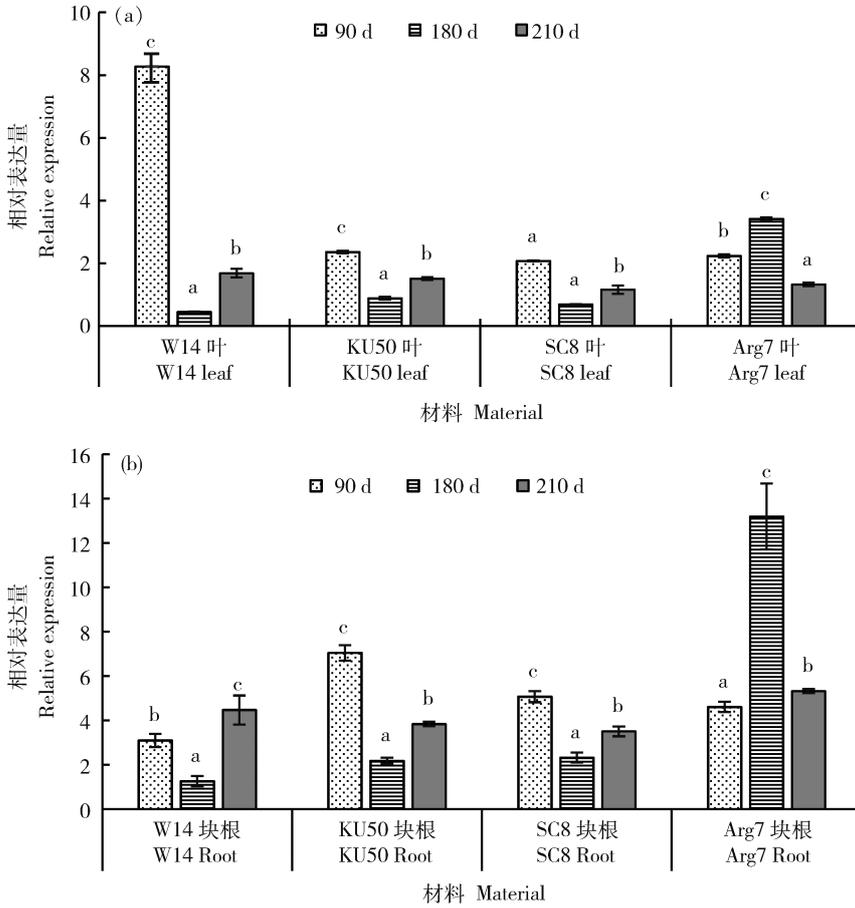
2.5 *MebZIP9* 在栽培木薯中的转录活性高于野生型

对于另一个基因 *MebZIP7* 在栽培品种和野生型不同发育时期块根及叶片中均有表达, 表达差异不能够明确区别。如在块根发育 90 d, 180 d 时 KU50、SC8 和 Arg7 中表达量高于 W14, 而在 210 d 时差异不明显; 叶片中, 90 d 时 W14 的表达量高于几个栽培品种, 其他时间点表达量差异不显著(图 6)。 *MebZIP9* 在栽培与野生型的块根和叶片中表

现出完全不同的表达模式。在野生型 W14 整个生长期的块根和叶片中相对表达量均很低, 而在不同木薯栽培品种不同发育时期的块根和叶片中均保持较高表达量, 块根中表达量更高一些。其表达量总体有前期高后期下降的趋势, 如在 KU50 块根形成期相对表达量最高, 在块根膨大期和块根成熟期的相对表达量相同, 最高值与最低值相差 2 倍; 在 SC8 块根形成期和块根膨大期的表达量相近, 是块根成

熟期的 1.4 倍；在 Arg7 块根膨大期相对表达量高，是块根形成期和成熟期的 3.6 倍（图 7）。此外，

MebZIP7 比 *MebZIP9* 在块根和叶片发育不同时期整体表达量更高。



同组不同小写字母表示表达量差异显著 ($P < 0.05$) 系指每组材料间表达差异显著性。下同。

The marked in the figure refers to the significance of difference in expression quantity between each group of materials. The same below.

图 6 *MebZIP7* 在木薯栽培型及野生型叶片 (a) 和块根 (b) 中的差异表达

Fig. 6 Spatio-temporal expression profiles of *MebZIP7* in leaf (a) and root (b) of four cassava varieties

3 讨论

3.1 木薯 bZIP 成员在块根中有优势表达，可能与其淀粉积累效率有关

MebZIP9 在栽培木薯块根中的转录活性显著高于野生型，*MebZIP9* 在同一木薯同时期块根和叶片中的表达水平低于 *MebZIP7*。

MebZIP7 在栽培种块根形成期 (90 d) 和块根膨大期 (180 d) 块根中的相对表达量都显著地高于野生型，*MebZIP9* 在栽培种整个生长期块根中的相对表达量都显著的高于野生型，特别是 *MebZIP9* 在 W14 块根中几乎不表达。栽培木薯淀粉含量显著高于野生型^[3]，木薯栽培品种淀粉含量 (干重) 为

28%~32%，野生型 W14 淀粉含量是 3%~5%。综上所述，推测 *MebZIP7* 和 *MebZIP9* 可能参与木薯块根淀粉合成。现有研究发现：bZIP 可以调节淀粉合成，例如，水稻 C 亚族的 *OsZIP58* 在胚乳中高表达，其蛋白可直接与 6 个淀粉合成相关基因 (*OsAGPL3*, *Wx*, *OsSSIIa*, *SBE1*, *OsBEIIb* 和 *ISA2*) 的启动子区结合并调控它们的表达活性，是水稻籽粒中淀粉合成的重要调节因子^[16]。玉米 I 亚族的 *ZmZIP91* 可与玉米淀粉合成相关基因启动子的 ACTCAT 元件结合，进而调节玉米淀粉相关基因的表达^[17]。据此推测 *MebZIP* 可能调节木薯块根淀粉合成相关基因的表达或淀粉合成酶的活性。

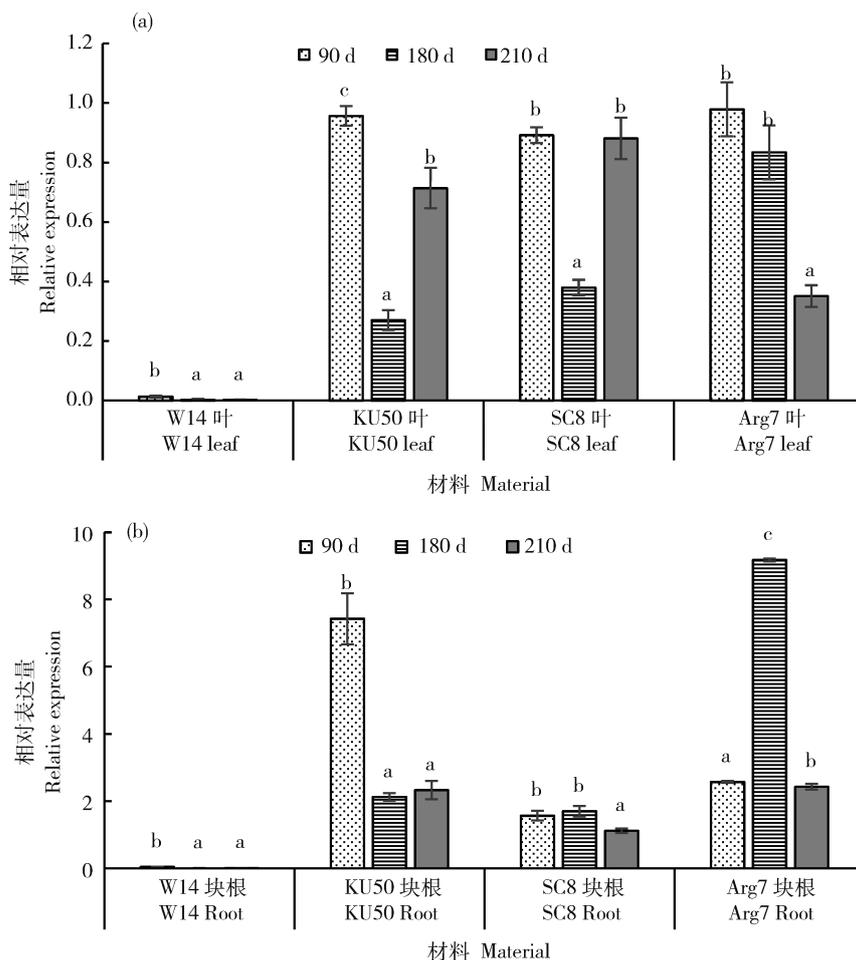


图7 *MebZIP9* 在木薯栽培品型及野生型叶片(a)和块根(b)中的差异表达

Fig. 7 Spatio-temporal expression profiles of *MebZIP9* in leaf (a) and root (b) of four cassava varieties

3.2 木薯 bZIP 成员受外源 ABA 诱导表达

高浓度的 ABA 抑制水稻籽粒灌浆期淀粉合成基因的表达和淀粉合成酶的酶活,导致籽粒充实率降低^[18],而适中浓度 ABA 能增强水稻籽粒灌浆期 SuSy 的活性^[19]。拟南芥叶片中 β -淀粉酶 1 (BAM1)和 α -淀粉酶 3 (AMY3)受 ABA 诱导表达,导致 BAM1 酶活提高,叶片淀粉含量降低^[20]。*MebZIP7* 和 *MebZIP9* 受 ABA 诱导表达,原因可能是:一方面,*MebZIP7*、*MebZIP9* 是 ABF (ABRE), ABF 是 ABA 信号通路中的成员^[21-22],ABA 结合 PYL 后破坏了 SnRK2 蛋白激酶和 PP2C 的相互作用,进而激活 SnRK2 蛋白激酶使 ABF 磷酸化,即 ABF (*MebZIP7* 和 *MebZIP9*)表达量增加,从而调节响应 ABA 信号相关基因的表达。另一方面相关文献报道^[13-14]bZIP 响应各种非生物胁迫,植物做出一系列抵抗外源 ABA 胁迫的机制,响应 ABA 的相关基因转录活性增强,因而与其上游启动子结合的

MebZIP 转录因子的表达量增高。综上推测栽培木薯中 *MebZIP* 受适量 ABA 诱导高表达并与淀粉合成相关基因的启动子区结合,调节块根淀粉合成。

此外,转录因子在植物里的表达水平很低^[23],本研究选用管家基因 *Manes. 02G061900*^[14],其在木薯各组织部位及胁迫处理后的表达水平都很稳定,而且比常用的木薯 *Actin* 基因 *Manes. 12G150500* 低 1.3 倍,使用 *Manes. 02G061900* 做内参基因,便于对表达量低的转录因子进行分析。*MebZIP7* 和 *MebZIP9* 在栽培木薯块根中的表达水平显著高于野生型且受 ABA 诱导表达,为后续分析 *MebZIP* 在沟通 ABA 信号通路和块根淀粉合成途径中的作用提供有效借鉴。

参考文献 References

[1] Jansson C, Westerbergh A, Zhang J, Hu X, Sun C. *Cassava*, a

- potential biofuel crop in the People's Republic of China[J]. *Applied Energy*, 2009, 86(S1): S95-S99
- [2] 王文泉, 叶剑秋, 李开绵, 朱文丽. 我国木薯酒精生产现状及其产业发展关键技术—广西, 海南木薯考察报告[J]. 热带农业科学, 2006, 26(4): 44-49
Wang W Q, Ye J Q, Li K M, Zhu W L. The current situation of cassava ethanol production in China and the key technology of the industrial developmental report in Guangxi and Hainan[J]. *Chinese Journal of Tropical Agricultural Science*, 2006, 26(4): 44-49 (in Chinese)
- [3] Wang W Q, Feng B X, Xiao J F, Xia Z Q, Zhou X C, Li P H, Zhang W X, Wang Y, Zhang P, Luo M C, Zou M L, Frank M Y, Wu J J, Cheng M L, Liao W B, Maya Bonde, Rebecca L N, Rubini M K, Liu H, Pan K, Hu S, Wu G J, Zhang S, Wu Z C, Augusto B L, Kirsten J, Nanna H P M. *Cassava* genome from a wild ancestor to cultivated varieties[J]. *Nature Communications*, 2014, 5(5): 5110
- [4] 杨鑫, 罗兴录, 覃宏宇, 祝建坤, 邓思, 樊吴静, 王海苗, 刘兴淋, 陈会鲜, 吴海宁. 木薯内源激素含量与块根淀粉积累关系研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 158-164
Yang X, Luo X L, Qin H Y, Zhu J K, Deng S, Fan W J, Wang H M, Liu X L, Chen H X, Wu H N. Study on the relationship between endogenous hormone content and root starch accumulation in cassava[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(33): 158-164 (in Chinese)
- [5] 匡勇, 夏石头, 匡逢春. 脱落酸(ABA)对植物生长发育的促进效应[J]. 湖南农业科学, 2009, 1(1): 33-36
Kuang Y, Xia S T, Kuang F C. The effect of abscisic acid on plant growth and development[J]. *Hunan Agricultural Science*, 2009, 1(1): 33-36
- [6] 李智念. 外源 ABA(脱落酸)对水稻产量和品质的调控研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2003
Li Z N. The regulation of rice yield and quality by abscisic acid[D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2003 (in Chinese)
- [7] Hurst H C. Transcription factors. 1: bZIP proteins[J]. *Protein Profile*, 1994, 1(2): 123
- [8] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroi T, Parcy F. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(3): 106-111
- [9] Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim S Y. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(3): 1723-1730
- [10] Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors[J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1064-1068
- [11] Melcher K, Ng L M, Zhou X E, Soon F F, Xu Y, Park S Y, J J, Weiner, FuJ H, Chinnusamy V, Kovach A, Li J, Wang Y, Li J C F, Peterson, Jensen D R, Yong E L, Volkman B F, Cutler S R, Zhu J K, and Xu H E. A Gate-Latch-Lock mechanism for hormone signaling by abscisic acid receptors[J]. *Nature*, 2009, 462(7273): 602-608
- [12] 洪岚, 刘旭, 李玲. 植物 AREB/ABF 转录因子及其参与的 ABA 信号转导[J]. 植物生理学报, 2011, 5(3): 211-217
Hong L, Li X, Li L. AREB/ABF transcription factor associated ABA signal transduction[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011(3): 211-217 (in Chinese)
- [13] Kim S, Kang J Y, Cho D I, Park J H, Kim S Y. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance[J]. *Plant Journal*, 2004, 40(1): 75
- [14] Hu W, Yang H, Yan Y, Wei Y, Tie W, Ding Z, Zuo J, Peng M, Li K. Genome-wide characterization and analysis of bZIP transcription factor gene family related to abiotic stress in cassava[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 14-17
- [15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [16] Wang J C, Xu H, Zhu Y, Liu Q Q, Cai X L. OsbZIP58, a basic leucine zipper transcription factor, regulates starch biosynthesis in rice endosperm[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(11): 3453-3466
- [17] Chen J, Yi Q, Cao Y, Wei B, Zheng L, Xiao Q, Xie Y, Gu Y, Li Y, Huang H, Wang Y, Hou X, Long T, Zhang J, Liu H, Liu Y, Yu G, Huang Y. ZmbZIP91 regulates expression of starch synthesis-related genes by binding to ACTCAT elements in their promoters[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(5): 1327-1338
- [18] Zhu G, Ye N, Yang J, Peng X, Zhang J. Regulation of expression of starch synthesis genes by ethylene and ABA in relation to the development of rice inferior and superior spikelets[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(11): 3907-3916
- [19] Tang T, Xie H, Wang Y, Lu B, Liang J. The effect of sucrose and abscisic acid interaction on sucrose synthase and its relationship to grain filling of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(9): 2641-2652
- [20] Thalmann M, Pazmino D, Seung D, Horrer D, Nigro A, Meier T, Kolling K, Pfeifhofer H W, Zeeman S C, Santella D. Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants[J]. *Plant Cell*, 2016, 28(8): 1860-1878
- [21] Yoshida T, Mogami J and Yamaguchishinozaki K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2014, 21(21): 133-139
- [22] Fujita Y, Yoshida T, Yamaguchishinozaki K. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 2013, 147(1): 15-27
- [23] Moon S J, Han S Y, Kim D Y, Yoon I S, Shin D, Byun M O, Kwon H B, Kim B G. Ectopic expression of a hot pepper bZIP-like transcription factor in potato enhances drought tolerance without decreasing tuber yield[J]. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89(4-5): 421-31