

• 农业生物技术 •

## 基因芯片技术筛选转 *SINAC1* 基因拟南芥差异表达基因

于静洋, 李倩倩, 焦杨, 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, 辽宁 大连 116081

于静洋, 李倩倩, 焦杨, 等. 基因芯片技术筛选转 *SINAC1* 基因拟南芥差异表达基因. 生物工程学报, 2017, 33(1): 111-121.  
Yu JY, Li QQ, Jiao Y, et al. Gene chip analysis of differentially expressed genes in transgenic *SINAC1 Arabidopsis*. Chin J Biotech, 2017, 33(1): 111-121.

**摘要:** 研究已表明植物特有的一些 NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) 转录因子可提高植物抗逆性, 利用基因芯片技术筛选转 *SINAC1* 基因拟南芥与野生型拟南芥间差异表达基因, 能够为研究转基因拟南芥非生物胁迫抗性相关基因提供依据。结果显示, 在转 *SINAC1* 基因拟南芥 43 604 个基因中有 3 046 个差异表达 2 倍以上的基因。对差异表达 5 倍以上基因经过 GO 富集度统计学分析表明, 细胞组分相关基因占 33.05%; 分子功能相关基因占 33.95%; 生物学过程相关基因占 33.00%。对差异表达 2 倍以上基因进行 KEGG 信号通路分析, 结果表明有 2 431 个基因涉及到 88 个不同的信号通路。通过筛选获得转基因拟南芥非生物胁迫抗性相关候选基因, 为后续研究 NAC 转录因子的下游基因及其调控网络的构建提供方向和理论支撑。

**关键词:** 差异表达, 转基因, 非生物胁迫抗性, 转录因子, GO 分析, KEGG

## Gene chip analysis of differentially expressed genes in transgenic *SINAC1 Arabidopsis*

Jingyang Yu, Qianqian Li, Yang Jiao, and Qiuli Li

College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, Liaoning, China

**Abstract:** Studies have shown that some plant-specific NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2) transcription factors may increase plants resistance to stress. We screened the genes differentially expressed in transgenic *SINAC1 Arabidopsis* compared to the wild type by cDNA microarray, to provide scientific basis for studying the genes related to abiotic stress responses in

**Received:** June 14, 2016; **Accepted:** September 19, 2016

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31340052), Scientific Research Project of Liaoning Province Education Department (No. L201683655).

**Corresponding author:** Qiuli Li. Tel/Fax: +86-411-85827073; E-mail: skyliqiuli@163.com

国家自然科学基金 (No. 31340052), 辽宁省教育厅科技研究项目 (No. L201683655) 资助。

网络出版时间: 2016-09-26

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160926.1501.003.html>

transgenic *Arabidopsis*. There were 3 046 genes differentially expressed more than twice in the total 43 604 genes of transgenic *SINAC1 Arabidopsis*. Gene ontology analysis was used on genes differentially expressed more than five-fold. Genes relevant to cellular components occupied 33.05%, genes correlated with molecular function accounted for 33.95% and genes pertinent to biological process constituted a 33.00% portion. The genes differentially expressed more than twice were processed through kyoto encyclopedia of genes and genomes pathways enrichment (KEGG) analysis. The total 2 431 genes were involved in 88 different signaling pathways. The screened genes related to abiotic stress responses provide direction and theoretical support for the following research on the downstream genes regulated by NAC and construction of the regulatory networks.

**Keywords:** differential expression, transgenesis, abiotic stress resistance, transcription factor, Gene ontology analysis, KEGG

植物在生长过程中不可避免地会受到生物胁迫(由生物引起,如病菌、虫害等)或非生物胁迫(由一系列过度或不足的物理、化学条件变化所引发的不利于植物生长发育的影响因素,如干旱、高温、冷害、冻害等),它们都能影响植物的生长、发育而降低产量。植物根据特定的环境胁迫进化出多种适应性的分子机制(通过激活或抑制特定靶基因改变其表达量)<sup>[1]</sup>来响应不同的非生物胁迫。植物感知到胁迫后通过信号转导来激活胁迫响应相关基因的表达,参与胁迫应答基因表达调控的核心组件包括激酶、磷酸酶和转录因子(Transcription factor)等<sup>[2]</sup>。转录因子是能够结合在某基因上游特异核苷酸序列上的蛋白质,这些蛋白质能调控其下游基因的转录。WRKY、MYB、bZIP和NAC等多种转录因子都能参与调控植物生长发育并提高植物抗逆性。

Souer等最先在矮牵牛 *Petunia hybrid* V. 中分离出NAC转录因子,命名为NAM<sup>[3]</sup>。1997年Aida等<sup>[4]</sup>报道了NAC(NAM, ATAF1/2和CUC)转录因子的结构域,并命名为NAC。NAC转录因子是具有多种生物学功能的植物特有的转录因子<sup>[5]</sup>,具有参与调控植物发育(胚、茎尖、侧根形成,生长素信号转导和叶片衰老等)<sup>[6-8]</sup>、抵抗生物胁迫<sup>[9]</sup>与非生物胁迫(干旱、高盐、低

温、高温、高光、ABA)<sup>[10-12]</sup>等功能。在植物响应生物、非生物胁迫过程中,NAC转录因子通过调控多个下游基因的表达提高植物抗逆性。拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. NAC家族中的ANAC019、ANAC055和ANAC072转录因子通过调控MYB2和MYB108转录因子的表达响应胁迫、调节叶片的衰老<sup>[13]</sup>。ANAC096转录因子通过调控 *RD29A* 的表达提高转基因拟南芥干旱和渗透胁迫抗性<sup>[2]</sup>。ChIP-Seq数据显示大豆 *Glycine max* cv. Williams 中有72个基因可能受NAC转录因子调控,RNA-Seq结果表明受NAC转录因子调控的差异表达基因包括脂肪氧化酶基因、果胶甲酯酶抑制剂基因、DEAD/DEAH解旋酶基因等<sup>[14]</sup>。

实验室前期从辽宁碱蓬 *Suaeda liaotungensis* K. 中克隆了 *SINAC1* 基因,通过农杆菌转化法获得了转 *SINAC1* 基因拟南芥,转 *SINAC1* 基因提高了拟南芥在盐、干旱、冷胁迫下的存活率<sup>[15]</sup>,认为转 *SINAC1* 基因拟南芥抗逆性增强。本文以转 *SINAC1* 基因拟南芥为实验材料,通过基因芯片技术筛选其与野生型拟南芥的差异表达基因,希望从差异表达基因中确定NAC转录因子调控的下游基因,进而分析NAC转录因子的调控网络。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

野生型拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 为哥伦比亚生态型 (Columbia-0) (命名为 WT) 和转 *SINAC1* 基因拟南芥 (命名为 L2)。

### 1.2 拟南芥幼苗培养与取材

取适量的 WT 和 L2 种子分别用 70%乙醇浸泡 30 s, ddH<sub>2</sub>O 冲洗 3 遍, 再用 10%次氯酸钠浸泡 5 min, ddH<sub>2</sub>O 冲洗 7 遍。灭菌后的种子分别播种于 MS 培养基中, 置于培养箱中培养 (22 °C, 光照 16 h, 黑暗 8 h), 至 6 片叶子后将其转移至含有蛭石的培养钵中。用清水浇灌幼苗, 每 5 d 浇灌 1 次, 20 d 后取样。分别从 WT 和 L2 拟南芥株系的 3 个植株中取材, 每株取 1 片叶子, 每个株系共取 3 片叶子, 迅速置于液氮中, -80 °C 保存。

### 1.3 芯片实验

采用 TaKaRa RNAiso Plus 试剂盒分别提取 WT 和 L2 叶片总 RNA。NanoDrop ND-2000 分光光度计及 Agilent Bioanalyzer 2100 检测总 RNA 的质量, 对总 RNA 中的 mRNA 进行放大、标记, 用 RNeasy Mini Kit 纯化标记后的 cRNA。按照 Agilent 表达谱芯片配套的杂交标准流程和配套试剂盒进行杂交和洗涤。完成杂交的芯片采用 Agilent Microarray Scanner 进行扫描。用 Feature Extraction software 10.7 读取数据, 最后对质控合格的数据采用 Gene Spring Software 12.6.1 进行归一化处理, 算法为 Quantile。以 Fold change  $\geq 2$  或 Fold change  $\leq 0.5$  为标准筛选差异表达基因。本实验由上海伯豪生物技术有限公司完成, 所用芯片为 Agilent 拟南芥全基因组 4 $\times$ 44K 芯片, 每个样品各做一张芯片。在 Agilent

表达谱芯片实验中, 用 10 次重复探针点信号的 CV 值来计算芯片的稳定性和技术的稳定性, 其质控标准是平均 CV < 10%, 相关系数  $r^2 > 0.95$ 。

### 1.4 聚类分析

对差异表达 2 倍以上基因中的 WRKY、DREB 和 MYB 等转录因子运用 SAS 在线分析系统进行聚类分析, 并用 Tree View 软件来显示聚类结果。

### 1.5 GO 富集分析

对差异表达 5 倍以上基因进行 GO 富集分析, 对细胞组分、分子功能和生物学过程中差异表达基因个数进行统计并绘图。满足  $P < 0.05$  条件的 GO term 定义为在差异表达基因中显著富集的 GO term。

### 1.6 KEGG 富集分析

对差异表达 2 倍以上的基因进行 KEGG 富集分析, 把差异表达显著的基因通路进行富集 (筛选的标准为  $P < 0.05$ ), 统计涉及该通路的差异表达基因的个数、确定通路中的差异基因并对其进行初步分析。

### 1.7 实时荧光定量 PCR

为验证基因芯片结果的可靠性, 根据差异表达基因的功能及差异表达倍数, 选择 5 个差异表达基因 (上调表达基因 4 个, 下调表达基因 1 个) 进行实时荧光定量 PCR。根据差异表达基因序列设计并合成引物 (由上海生工生物有限公司完成)。使用 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa) 进行反转录。使用 TaKaRa SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒和 Thermal Cycler Dice Real time (TaKaRa) 进行实时荧光定量 PCR 反应, 以 *Atactin-2* 基因 (NM\_112764)

作为内参基因。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对表达量。每个样品重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 样本总 RNA 提取与质量检测

提取样本叶片总 RNA 并测定吸光度, WT 样本叶片总 RNA 浓度  $100.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , 体积  $15 \mu\text{L}$ , 总量  $1.51 \mu\text{g}$ ,  $A_{260}/A_{280}=1.85$ ,  $28\text{S}/18\text{S}=1.4$ ; L2 样本叶片总 RNA 浓度  $63.6 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , 体积  $15 \mu\text{L}$ , 总量  $0.95 \mu\text{g}$ ,  $A_{260}/A_{280}=1.88$ ,  $28\text{S}/18\text{S}=1.6$ 。样本叶片总 RNA 的  $A_{260}/A_{280}$  吸光度比值均在 1.8 至 2.0 之间; 样本总 RNA 质检图 (图 1) 显示, 各条带清晰完整, 且 28S 和 18S 条带亮度接近 2:1, 说明提取的总 RNA 纯度和完整性均较好, 质量检测合格, 达到后续的芯片实验要求。

### 2.2 芯片质控与扫描

WT 基因芯片  $CV$  值为 7.35%, 检出率为 58.67%; L2 基因芯片  $CV$  值为 6.02%, 检出率为 59.01%。对芯片进行荧光扫描, 扫描图 (图 2) 中杂交信号清晰、均衡且背景清晰, 所以芯片结果真实可靠。

在野生型和转 *SINAC1* 基因拟南芥表达谱比较的线性归一化后的散点图 (图 3) 中,  $X$  轴为 WT 荧光强度值,  $Y$  轴为 L2 荧光强度值, 每个数据点代表芯片上的一个基因点的杂交信号。绝大多数的点密集分布于  $y=x$  直线附近灰色区域中, 表示在 WT 与 L2 之间没有明显的差异, 信号值差异  $\text{Fold Change}=1$ 。落在图形中位线两侧靠近  $Y$  轴的点表明该基因在 L2 中表达上调, 靠近  $X$  轴的点表明该基因在 L2 中表达下调, 信号值差异  $\text{Fold Change}>2$ 。

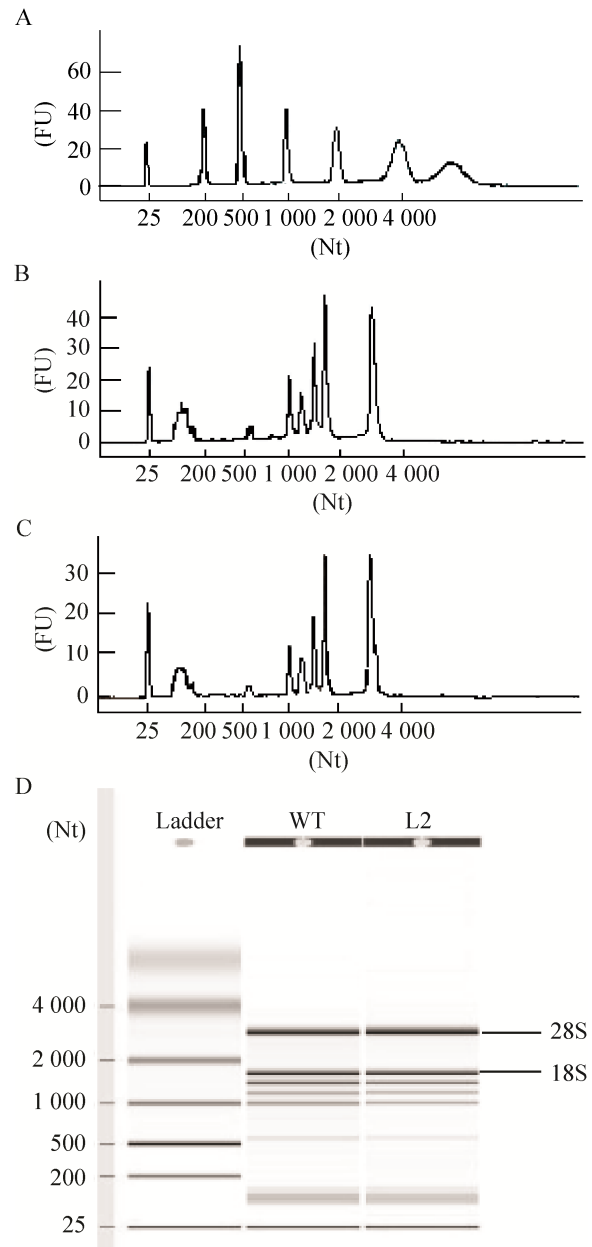


图 1 WT 与 L2 样本总 RNA Agilent Bioanalyzer 2100 质检图

Fig. 1 QC results of total RNA samples of WT and L2 *Arabidopsis* by Agilent Bioanalyzer 2100. Nt: nucleotide. FU: fluorescence value. (A) The fluorescence value of ladder under different nucleotide. (B) The fluorescence value of WT under different nucleotide. (C) The fluorescence value of L2 under different nucleotide. (D) QC results of total RNA samples of WT and L2.

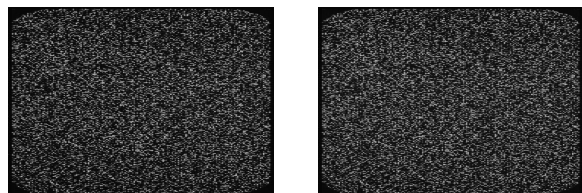


图2 WT(左)与L2(右)基因芯片扫描图

Fig. 2 The results of gene chip scanning of WT (left) and L2 (right) *Arabidopsis*.

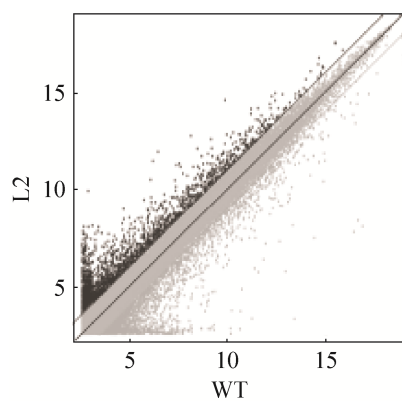


图3 WT与L2芯片数据散点图

Fig. 3 Scatter plot of cluster expression between WT and L2.

### 2.3 差异表达基因统计

在转 *SINAC1* 基因拟南芥 43 604 个基因中检测到 3 046 个基因差异表达 2 倍以上, 上调与下调 2 倍以上基因的详细分布情况见表 1。其中, 9 个基因上调 30 倍以上 (表 2), 4 个基因下调 300 倍以上 (表 3)。

表1 转 *SINAC1* 基因拟南芥差异表达基因上调、下调倍数分布个数表

Table 1 The number of genes up-regulated and down-regulated in transgenic *SINAC1 Arabidopsis* from twice to the most compared to WT

Fold change	Up-regulated gene number	Down-regulated gene number
2<FC≤5	1 213	1 063
5<FC≤10	245	255
10<FC≤30	87	133
30<FC≤50	8	20
50<FC≤100	0	10
100<FC≤300	1	7
300<FC	0	4
Total	1 554	1 492
	3 046	

表2 转 *SINAC1* 基因拟南芥差异表达上调 30 倍以上基因

Table 2 The genes up-regulated more than 30 times in transgenic *SINAC1 Arabidopsis* compared to WT

Gene symbol	Probe name	Fold change	GenBank Accession No.	Description
<i>AT2G14247</i>	A_84_P564098	130.82	NM_201723	<i>Arabidopsis</i> uncharacterized protein mRNA
<i>AT2G30766</i>	A_84_P758588	44.70	NM_001124947	<i>Arabidopsis</i> uncharacterized protein mRNA
<i>CXXS2</i>	A_84_P804145	41.96	NM_129642	<i>Arabidopsis</i> thioredoxin-like protein CXXS2 mRNA
<i>AT3G16670</i>	A_84_P193394	38.62	NM_112540	<i>Arabidopsis</i> pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein mRNA
<i>ABI4</i>	A_84_P23876	36.68	NM_129580	<i>Arabidopsis</i> ethylene-responsive transcription factor ABI4 mRNA
<i>AT1G47395</i>	A_84_P549811	35.45	NM_179449	<i>Arabidopsis</i> uncharacterized protein mRNA
<i>SCRL24</i>	A_84_P723202	33.36	NM_001036699	<i>Arabidopsis</i> SCR-like 24 mRNA
<i>AT4G28780</i>	A_84_P13857	32.33	NM_119022	<i>Arabidopsis</i> GDSL esterase/lipase mRNA
<i>bZIP5</i>	A_84_P17486	31.72	NM_114836	<i>Arabidopsis</i> basic leucine-zipper 5 mRNA

表 3 转 *SINAC1* 基因拟南芥差异表达下调 300 倍以上基因Table 3 The genes down-regulated more than 300 times in transgenic *SINAC1 Arabidopsis* compared to WT

Gene symbol	Probe name	Fold change	GenBank Accession No.	Description
<i>VSP1</i>	A_84_P97476	9.25E-4	NM_122387	<i>Arabidopsis</i> acid phosphatase VSP1 mRNA
<i>VSP2</i>	A_84_P808818	2.21E-3	NM_001036860	<i>Arabidopsis</i> acid phosphatase VSP2 mRNA
<i>AT4G11320</i>	A_84_P20420	2.49E-3	NM_117203	<i>Arabidopsis</i> putative cysteine proteinase mRNA
<i>LTP3</i>	A_84_P20704	3.19E-3	NM_125323	<i>Arabidopsis</i> non-specific lipid-transfer protein 3 mRNA

## 2.4 聚类分析

在差异表达 2 倍以上基因中,通过关键词“WRKY”、“DREB”和“MYB”等检索出 61 个转录因子 (22 个 WRKY、5 个 bZIP、1 个 DREB、4 个 ERF、21 个 MYB、2 个 MYC、6 个 RAP) 进行层级聚类分析。层级聚类分析图 (图 4) 中黑色代表该基因在两个样本中表达水平没有变化,左上和右下的深色区域代表升高,右上和左下的浅色区域代表降低;颜色的深浅程度代表基因表达水平升高或降低的程度,可明显看出深色、浅色形成显著的 4 大块,说明两组形成了明显的聚类群。层级聚类分析显示,基因表达存在着明显的聚类。

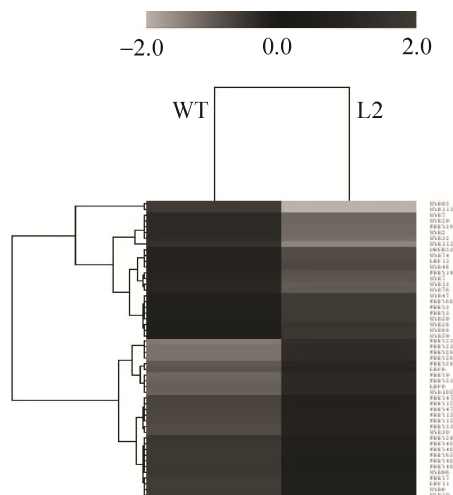


图 4 61 个差异表达转录因子聚类热图

Fig. 4 The cluster heatmap of 61 differential expression transcription factors.

## 2.5 GO 富集分析

对转 *SINAC1* 基因拟南芥差异表达 5 倍以上的基因 (770 个) 进行 GO 富集分析,按主要的功能分类,细胞组分 (GO: 0005575 cellular component) 相关基因 586 个,占 33.05%;分子功能 (GO: 0003674 molecular function) 相关基因 602 个,占 33.95%;生物学过程 (GO: 0008150 biological process) 相关基因 585 个,占 33.00%。细胞组分主要涉及细胞、细胞成分和细胞器等;分子功能主要涉及参与催化活性、结合和转录调节活性等;生物学过程主要涉及细胞过程、新陈代谢和响应刺激等 (图 5)。细胞组分相关基因经富集统计差异不显著 ( $P>0.05$ )。分子功能相关基因中,238 个差异表达基因具有催化活性相关功能 (GO: 0003824 catalytic activity),富集统计差异极显著 ( $P=0.0017$ );62 个差异表达基因具有转录调节活性相关功能 (GO: 0030528 transcription regulator activity),富集统计差异显著 ( $P=0.0132$ );14 个差异表达基因具有酶调节活性功能 (GO: 0030234 enzyme regulator activity),富集统计差异显著 ( $P=0.0342$ )。生物学过程相关基因中,142 个差异表达基因响应刺激 (GO: 0050896 response to stimulus),富集统计差异极显著 ( $P=0$ );43 个差异表达基因参与多个生物学过程 (GO: 0051704 multi-organism process),富集统计差异极显著 ( $P=0$ )。

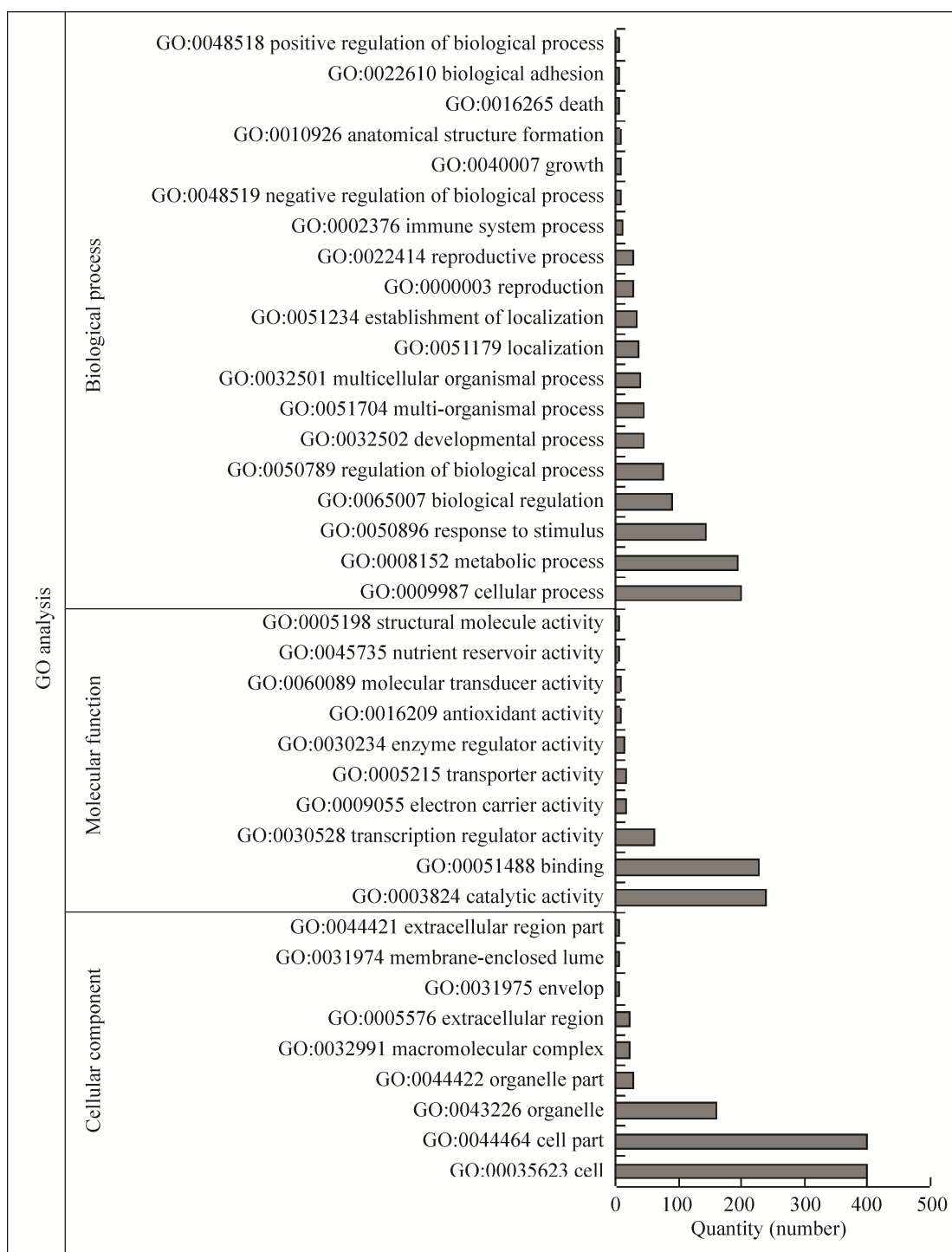


图 5 差异表达基因 GO 分析图

Fig. 5 GO analysis graph of differentially expressed genes.

## 2.6 KEGG 信号通路分析

对 3 046 个差异表达基因进行 KEGG 信号通路分析, 这些基因涉及到 88 个富集但差异显著性不同的信号通路, 其中差异极显著 ( $P<0.01$ ) 的信号通路有 7 个 (表 4), 差异显著 ( $0.01<P<0.05$ ) 的信号通路有 8 个。

## 2.7 实时荧光定量 PCR 验证差异表达基因

为了验证基因芯片结果的可靠性, 本研究挑选了 5 个差异表达基因 (上调表达基因 4 个, 下调表达基因 1 个) 进行实时荧光定量 PCR 验证, 结果显示, 虽然各基因的表达倍数在基因芯片和实时荧光定量 PCR 中不同, 但是总体趋势相同 (表 5),

表 4 差异表达基因 KEGG 富集分析 ( $P<0.01$ )

Table 4 KEGG analysis of differentially expressed genes ( $P<0.01$ )

Pathway name	Total	Hits	P-value	Q-value	Representative differentially expressed genes
Plant hormone signal transduction	232	40	0.0	3.0E-4	<i>ARR15, PYL6, PAN, IAA19, MYC2, TCH4</i>
Plant-pathogen interaction	148	27	1.0E-4	0.0023	<i>CAM2, CPK24, MSS3, MYC2, TCH2, WRKY22</i>
Phenylalanine metabolism	92	19	2.0E-4	0.0045	<i>4CL3, AT2G34060, HPA1, PAL2, PRX33</i>
Phenylpropanoid biosynthesis	109	19	0.0013	0.0178	<i>4CL3, AT5G51890, HCT, PAL2, PRX33, PRXR1</i>
DNA replication	45	11	0.0014	0.0178	<i>DPB2, ICU2, PCNA1, POLA2, POLD3, RPA2</i>
Lysine biosynthesis	19	6	0.0061	0.0656	<i>AT3G57560, ALDH7B4, AT2G44040, AT3G14390</i>
Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	67	12	0.0078	0.0721	<i>HCT, PAD3, CYP91A2, BT2, CYP71B12, CYP81F2</i>

表 5 实时荧光定量 PCR 与基因芯片的基因表达比较

Table 5 The comparison of gene expression level between *qRT-PCR* and gene chip

Gene symbol	GenBank Accession No.	Sequence of primers (5'-3')	Product length (bp)	Fold change gene chip	Fold change <i>qRT-PCR</i>
<i>Actin2</i>	NM_112764	F: CAACCGGTTAGTACATTTTAGGC R: GTAAGGTCACGTCCAGCAAG	193		
<i>WRKY22</i>	NM_116355	F: AAGCCACAGAACCAGAAACG R: TTGGGTGAAGAAACGAACCT	116	6.80	8.39±0.55
<i>AT5G51890</i>	NM_124568	F: ATTTACGAGCCAACGAGAC R: CCACCTGAGAGCGTAACCAT	119	4.82	4.15±0.56
<i>bHLH100</i>	NM_129689	F: CACCGACCAAACAGTAAGTCA R: TCAAGACATTCCCAAACGAA	140	19.94	11.77±0.43
<i>MYB96</i>	NM_125641	F: CCGCAACGATTAGCTTTTGT R: GGCCCTTTCTTCACTCCAAT	108	2.17	4.32±0.60
<i>VSP1</i>	NM_122387	F: ATCCGTTCCAGGGCTCAT R: GCAGTTGGGGTAGTTGATGG	103	9.25E-4	2.91E-2±0.01



因此基因芯片的结果可靠。

### 3 讨论

在植物生长发育和响应生物及非生物胁迫过程中, 转录因子起着重要作用, 通过调控多个下游基因的表达提高植物抗逆性。转 *SINAC1* 基因拟南芥 3 046 个差异表达 2 倍以上基因中共筛选到 61 个转录因子。植物中的 MYB 转录因子参与植物体内的众多生理反应, 能调控植物的生长发育, 诱导植物参与非生物胁迫的应答。NAC 转录因子 ANAC019 和 ANAC055 通过调控 *MYB2*、*MYB21*、*MYB108*、*MYB112* 和 *MYB116* 的表达提高拟南芥抗逆性<sup>[13]</sup>, 推测 *SINAC1* 可能通过调控 *MYB6* (上调 2.37 倍)、*MYB30* (上调 3.23 倍)、*MYB96* (上调 2.17 倍) 和 *MYB105* (上调 4.57 倍) 等 MYB 转录因子基因的表达提高转基因拟南芥抗逆性。WRKY 是植物特有的转录因子之一, 具有参与植物生长发育、生物和非生物胁迫响应和激素信号转导等多种生物学功能, 拟南芥 WRKY57 转录因子参与调控外源植物激素茉莉酸和生长素所介导的植物叶片衰老信号途径之间的交叉调控通路<sup>[16]</sup>, 在转 *SINAC1* 基因拟南芥中, *SINAC1* 调控 *WRKY22* (上调 6.80 倍)、*WRKY28* (上调 6.04 倍)、*WRKY53* (上调 6.02 倍) 和 *WRKY56* (上调 6.04 倍) 等的表达, 共同调控拟南芥生长的抗逆性。

碱性亮氨酸拉链 (Basic region leucine zipper motif, bZIP) 类转录因子普遍存在于动植物及微生物中, 参与植物生长、种子成熟、衰老等生物学过程, 能提高植物抵抗各种不良环境 (病原体入侵、高温、冷害、高盐等) 的能力<sup>[17-18]</sup>, 推测 *SINAC1* 通过调控 *bZIP5* (上调 31.72 倍) 等

bZIP 类转录因子基因的表达提高转基因拟南芥抗逆性。植物营养贮存蛋白质 (Vegetative storage proteins, VSP) 是植物防御相关的重要蛋白之一, 在拟南芥中发现 VSP1 和 VSP2 两种, 受机械创伤、茉莉酸、昆虫的咬食和渗透胁迫等诱导<sup>[19-20]</sup>。在转 *SINAC1* 基因拟南芥中, *VSP1* 和 *VSP2* 基因分别下调表达 1081.32、452.33 倍, 有可能会降低转基因拟南芥防御能力。

KEGG 富集分析表明, 植物激素信号转导、植物病原体相互作用、苯丙氨酸代谢、DNA 复制等 7 个信号通路富集度极显著。植物激素具有参与调控种子萌发、细胞分裂、组织和器官建成、开花与结实等作用<sup>[21]</sup>, 不同种类植物激素间相互作用对植物的生长发育至关重要。MYC2 是 bHLH (Basic-helix-loop-helix) 转录因子家族成员, 参与调控茉莉酸信号通路与其他植物激素 (脱落酸、水杨酸、赤霉素和生长素) 间的交叉对话, MYC2 还调节茉莉酸介导的虫害和病原体防御反应<sup>[22]</sup>。MYC2 参与植物激素信号转导通路, *SINAC1* 可能通过调控 *MYC2* (上调 2.26 倍) 的表达影响植物激素信号转导通路, 影响转基因拟南芥的抗逆性。MYC2 参与植物病原体相互作用通路, *SINAC1* 可能通过调控 *MYC2* 的表达影响植物病原体相互作用通路, 增强转基因拟南芥的抗病性。*SINAC1* 与 ANAC062 和 ANAC091 同属于 TIP 亚家族<sup>[23]</sup>, ANAC062、ANAC091 能提高拟南芥抗病性<sup>[24-26]</sup>, 推测 *SINAC1* 可能具有抗病功能。

目前关于 NAC 调控网络的研究报道较少, 本文以转 *SINAC1* 基因和野生型拟南芥为实验材料, 利用基因芯片技术筛选出与胁迫相关的差异表达基因、转录因子及相关的代谢通路。

SINAC1 通过调控这些相关基因的表达提高转基因拟南芥的抗逆性。

## REFERENCES

- [1] Wang ZY, Dane F. NAC (NAM/ATAF/CUC) transcription factors in different stresses and their signaling pathway. *Acta Physiol Plant*, 2013, 35(5): 1397–1408.
- [2] Xu ZY, Kim SY, Hyeon DY, et al. The *Arabidopsis* NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses. *Plant Cell*, 2013, 25(11): 4708–4724.
- [3] Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, et al. 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*, 1996, 85(2): 159–170.
- [4] Aida M, Ishida T, Fukaki H, et al. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the *cup-shaped cotyledon* mutant. *Plant Cell*, 1997, 9(6): 841–857.
- [5] Riechmann JL, Heard J, Martin G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 2000, 290(5499): 2105–2110.
- [6] Takasaki H, Maruyama K, Takahashi F, et al. SNAC-As, stress-responsive NAC transcription factors, mediate ABA-inducible leaf senescence. *Plant J*, 2015, 84(6): 1114–1123.
- [7] He X, Qu BY, Li WJ, et al. The nitrate-inducible NAC transcription factor TaNAC2-5A controls nitrate response and increases wheat yield. *Plant Physiol*, 2015, 169(3): 1991–2005.
- [8] Ning YQ, Ma ZY, Huang HW, et al. Two novel NAC transcription factors regulate gene expression and flowering time by associating with the histone demethylase JM14. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(3): 1469–1484.
- [9] Wang FT, Lin RM, Feng J, et al. TaNAC1 acts as a negative regulator of stripe rust resistance in wheat, enhances susceptibility to *Pseudomonas syringae*, and promotes lateral root development in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 108–124.
- [10] Sakuraba Y, Kim YS, Han SH, et al. The *Arabidopsis* transcription factor NAC016 promotes drought stress responses by repressing *AREB1* transcription through a trifurcate feed-forward regulatory loop involving NAP. *Plant Cell*, 2015, 27(6): 1771–1787.
- [11] Sakuraba Y, Piao W, Lim JH, et al. Rice ONAC106 inhibits leaf senescence and increases salt tolerance and tiller angle. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56(12): 2325–2339.
- [12] Yang X, Hu YX, Li XL, et al. Molecular characterization and function analysis of *SINAC2* in *Suaeda liaotungensis* K. *Gene*, 2014, 543(2): 190–197.
- [13] Hickman R, Hill C, Penfold CA, et al. A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in *Arabidopsis* leaves. *Plant J*, 2013, 75(1): 26–39.
- [14] Shamimuzzaman M, Vodkin L. Genome-wide identification of binding sites for NAC and YABBY transcription factors and co-regulated genes during soybean seedling development by ChIP-Seq and RNA-Seq. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 477–493.
- [15] Li XL, Yang X, Hu YX, et al. A novel NAC transcription factor from *Suaeda liaotungensis* K. enhanced transgenic *Arabidopsis* drought, salt, and cold stress tolerance. *Plant Cell Rep*, 2014, 33(5): 767–778.
- [16] Jiang YJ, Liang G, Yang SZ, et al. *Arabidopsis* WRKY57 functions as a node of convergence for jasmonic acid- and auxin-mediated signaling in jasmonic acid-induced leaf senescence. *Plant Cell*, 2014, 26(1): 230–245.
- [17] Nijhawan A, Jain M, Tyagi AK, et al. Genomic survey and gene expression analysis of the basic leucine zipper transcription factor family in rice. *Plant Physiol*, 2008, 146(2): 333–350.
- [18] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, et al. bZIP

- transcription factors in *Arabidopsis*. Trends Plant Sci, 2002, 7(3): 106–111.
- [19] Berqer S, Mitchell-Olds T, Stotz HU. Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*. Physiol Plant, 2002, 114(1): 85–91.
- [20] Liu Y, Ahn JE, Datta S, et al. *Arabidopsis* vegetative storage protein is an anti-insect acid phosphatase. Plant Physiol, 2005, 139(3): 1545–1556.
- [21] Waadt R, Hsu PK, Schroeder JI. Abscisic acid and other plant hormones: methods to visualize distribution and signaling. Bioessays, 2015, 37(12): 1338–1349.
- [22] Kazan K, Manners JM. MYC2: the master in action. Mol Plant, 2013, 6(3): 686–703.
- [23] Ooka H, Satoh K, Doi K, et al. Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. DNA Res, 2003, 10(6): 239–247.
- [24] Truman W, de Zabala MT, Grant M. Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcription networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. Plant J, 2006, 46(1): 14–33.
- [25] Yang ZT, Lu SJ, Wang MJ, et al. A plasma membrane-tethered transcription factor, NAC062/ANAC062/NTL6, mediates the unfolded protein response in *Arabidopsis*. Plant J, 2014, 79(6): 1033–1043.
- [26] Ren T, Qu F, Morris TJ. *HRT* gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. Plant Cell, 2000, 12(10): 1917–1926.

(本文责编 郝丽芳)