



木薯 *MeHB2* 转录因子的克隆与表达分析

丁泽红,付莉莉,铁韦韦,颜彦,夏志强,王文泉,胡伟*

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所,海口 571101)

摘要:该研究以木薯(*Manihot esculenta* Crantz)Ku50为实验材料,采用RT-PCR方法从叶片中克隆了1个HD-Zip基因*MeHB2*。*MeHB2*基因含有882 bp的开放阅读框,编码293个氨基酸。蛋白质保守结构预测显示,*MeHB2*编码的蛋白含有Homeodomain、Leu zipper和HD-Zip_N等结构域,属于HD-Zip II成员。进化树分析表明,*MeHB2*与麻疯树、杨树和杞柳中同源基因的亲缘关系较近。实时荧光定量PCR分析表明,低温胁迫、渗透胁迫、ABA和H₂O₂均可诱导*MeHB2*基因的表达,而盐胁迫抑制其表达。此外,*MeHB2*的表达量还受到遮荫胁迫的诱导。研究表明,*MeHB2*在木薯非生物逆境调控中扮演重要角色。

关键词:木薯;HD-Zip;*MeHB2*;克隆;基因表达

中图分类号:Q785; Q786 文献标志码:A

Cloning and Expression of *MeHB2* Transcription Factor in Cassava

DING Zehong, FU Lili, TIE Weiwei, YAN Yan, XIA Zhiqiang, WANG Wenquan, HU Wei*

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China)

Abstract: Cassava cultivar ‘Ku50’ was used as experiment materials in this study. A HD-Zip gene, *MeHB2*, was cloned from leaves of cassava ‘Ku50’ by RT-PCR method. This gene contained 882 bp open reading frame (ORF) encoding 293 amino acids. Protein conserved domain prediction showed that *MeHB2* protein contained several domains such as Homeodomain, Leu zipper and HD-Zip_N, indicating this gene belonged to members of HD-Zip II. Phylogenetic analysis exhibited that *MeHB2* had close genetic relationship with its homologous genes in *Jatropha curcas*, *Populus trichocarpa* and *Salix purpurea*. Quantitative real-time PCR analysis revealed that low temperature, osmotic, ABA and H₂O₂ treatments significantly induced the expression of *MeHB2*, but salt stress depressed its expression. In addition, the expression of *MeHB2* was also induced by shade stress. The results indicated that *MeHB2* plays important roles in abiotic stress regulation in cassava.

Key words: cassava; HD-Zip; *MeHB2*; cloning; gene expression

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是重要的粮食作物,是热带和亚热带地区重要的热能来源作物。同大多数作物一样,干旱胁迫严重地影响了木薯的生长和发育(如生长缓慢、光合作用下降等),导致木薯块根产量严重减少^[1]。此外,随着全球气候和植

物生长环境的恶劣变化,低温、高盐、遮荫(密植)等逆境胁迫也严重地影响了木薯的种植,对木薯生产造成了非常严重的损失^[2-4]。因此,挖掘和鉴定逆境相关重要功能基因,深入研究它们在各种逆境胁迫下的表达变化,对进一步提高木薯抗逆能力具有指

导意义。

HD-Zip 是植物中一类特异的转录因子,含有高度保守的 HD(Homeodomain)结构域和 Leu zipper(Zip)元件。根据 HD-Zip 结合的特异性 DNA 序列和基因结构,HD-Zip 转录因子可以分为 4 个亚类^[5]。4 个亚类的 HD-Zip 蛋白具有各自不同的功能,在植物生长发育、形态建成、生物与非生物胁迫等逆境应答中起着非常重要的调控作用^[6-7]。例如,HD-Zip II 类蛋白与光形态建成及遮荫反应相关。*AtHB2* 是拟南芥 HD-Zip II 家族成员之一,在黑暗生长的黄化苗中,*AtHB2* 高度表达,但红光(R)和远红光(FR)强烈抑制了它的表达^[8]。在绿色植物中,*AtHB2* 的表达量受到低 R:FR 强烈诱导,这会导致植物的避荫响应,表现为茎伸长、叶片减小等^[8-9]。除此之外,HD-Zip II 家族成员还受干旱、高盐、ABA 和冷害等环境的诱导,通过参与激素信号途径来提高植物耐逆性^[10]。目前在拟南芥、水稻、玉米和杨树等许多物种中已鉴定出数十个 HD-Zip 家族成员^[7]。然而,木薯中有关 HD-Zip 基因的研究还很少,这些基因在木薯抗逆胁迫中的响应尚不清楚。

本研究从木薯中克隆了 1 个 HD-Zip 基因(*MeHB2*),对其序列进行了初步的生物信息学分析,并在低温、盐、甘露醇、ABA、H₂O₂ 和遮荫等多种非生物逆境胁迫下研究其表达特性,为揭示 HD-Zip 转录因子 *MeHB2* 在木薯逆境调控中的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验所用木薯品种 Ku50 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 材料种植与处理 将木薯种茎切成长度大

约 15 cm 的茎段,挑选芽眼(3~4 个/茎段)且粗细均匀一致的茎段扦插于塑料盆(高 18.8 cm,上直径 18.5 cm,下直径 14.8 cm)中,1 茎段/盆。基质采用营养土与蛭石以 1:1 的体积比进行混合。木薯种植约 10 d 后进行间苗,保留 1 苗/盆。

种植 60 d 后,选取长势一致的木薯幼苗作为供试材料。以不处理的木薯为对照,共设置 5 个处理:(1)用 300 mmol/L 甘露醇和 200 mmol/L NaCl 分别对幼苗进行灌根处理 0、2 和 6 h 以及 3、14、18 和 24 d;(2)用 100 μmol/L ABA 和 10 mmol/L H₂O₂ 分别对幼苗进行喷施或灌根处理 0、2、6、10、24、48 和 72 h;(3)4 ℃ 低温处理木薯 0、2、5、15、48 h 后回复到室温 7 和 14 d。之后对上述所有时间点的木薯叶片进行取样,抽提 RNA,进行 qRT-PCR 分析。

遮荫处理的木薯种植于树荫底下,其对照处理的木薯种植于室外。2 个月后选择长势比较一致的植株,分别提取不同叶片(包括未展开叶、第一片完全展开叶和老叶)的 RNA,进行 qRT-PCR 分析。

1.2.2 RNA 提取与 qRT-PCR 用 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取木薯总 RNA。之后用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas 公司)将总 RNA 反转录成 cDNA,−20 ℃ 储存。用 Primer 6.0 设计引物,由上海生工生物工程股份有限公司合成(表 1)。

用 SYBR Green I 试剂盒(TaKaRa 公司)进行 qRT-PCR,按照操作手册和反应体系在 Mx 3005P 荧光定量 PCR 仪(Stratagene 公司)上进行。每个样品 3 次生物学重复,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量^[11]。

1.2.3 生物信息学分析 用 BLASTP 搜索 Phytozome 数据库获取其他物种与 *MeHB2* 同源性较高的序列;用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 和 GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) 预测开放阅读框;

表 1 本研究中用到的引物
Table 1 Primers used in this study

用途 Purpose	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	PCR 条件 PCR condition
<i>MeHB2</i> qRT-PCR 引物 qRT-PCR primer for <i>MeHB2</i>	qMeHB2-F qMeHB2-R	AATGAATCCACCCACCC TATGTGGATGGGGCAGAGGA	95 ℃ 30 s; 95 ℃ 10 s, 55 ℃ 10 s, 72 ℃ 20 s, 40 个循环 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 10 s, 55 ℃ 10 s, 72 ℃ 20 s, 40 cycles
<i>Actin</i> qRT-PCR 引物 ^[12] qRT-PCR primer for <i>Actin</i> gene	qActin-F qActin-R	TGATGAGTCTGGTCATCCA CCTCCTACGCCAACATCTCA	95 ℃ 30 s; 95 ℃ 10 s, 55 ℃ 10 s, 72 ℃ 20 s, 40 个循环 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 10 s, 55 ℃ 10 s, 72 ℃ 20 s, 40 cycles
<i>MeHB2</i> 基因全长扩增 Full-length amplification of <i>MeHB2</i>	MeHB2-F MeHB2-R	CTCAATCCAACGCCACACCT ACCAAATCACCCCTACACCC	95 ℃ 5 min; 95 ℃ 40 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 2 min, 35 个循环 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 40 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 2 min, 35 cycles

用 ClustalX 进行序列比对;用 MEGA 5.2 软件构建进化树;用 ExPASy ProtParam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析蛋白质的分子量和等电点;用 CDD 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>)进行保守结构域分析。

2 结果与分析

2.1 *MeHB2* 基因的克隆

根据木薯中与拟南芥 *AtHB2*(AT4G16780.1)高度同源的 cDNA 序列(Manes. 01G084500.1)设计基因特异性引物,以木薯栽培种 Ku50 叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,测序后获得一个长 1 191 bp 的片段(图 1),将该基因命名为 *MeHB2*。它包括 128 bp 的 5'-UTR、181 bp 的 3'-UTR 和 882 bp 的开放阅读框,该序列编码 293 个氨基酸。

Blast 结果表明, *MeHB2* 与 Phytozome 木薯(栽培品种:AM506)数据库中公布的序列相似性高达 99%。它们之间共有 6 个碱基的差异,其中 4 个为非同义突变(图 2)。预测蛋白质的分子量为 32 859.0 Da,

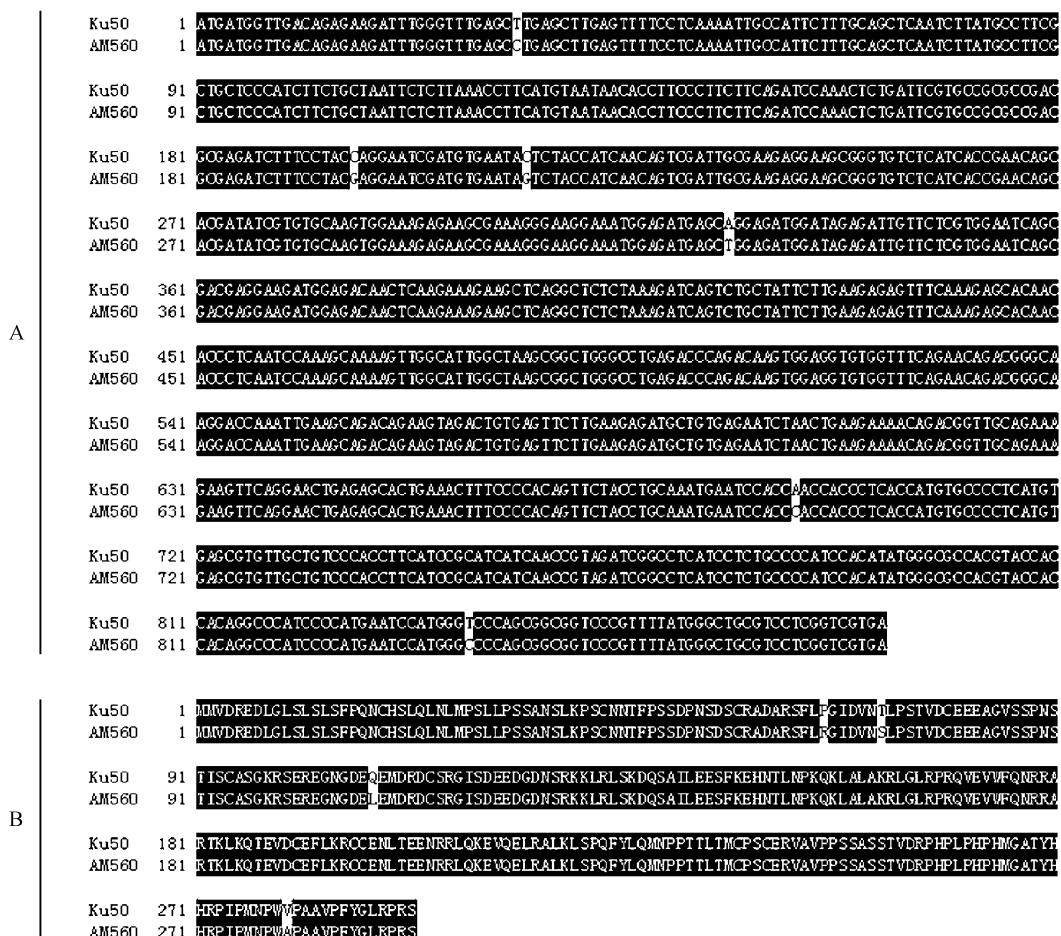


M. DNA marker; 1. PCR扩增产物

图 1 *MeHB2* 基因 PCR 扩增结果

M. DNA marker; 1. Product of PCR

Fig. 1 PCR amplification result of *MeHB2*



A. Nucleotide sequence; B. Protein sequence

Fig. 2 Sequence alignment of *MeHB2*

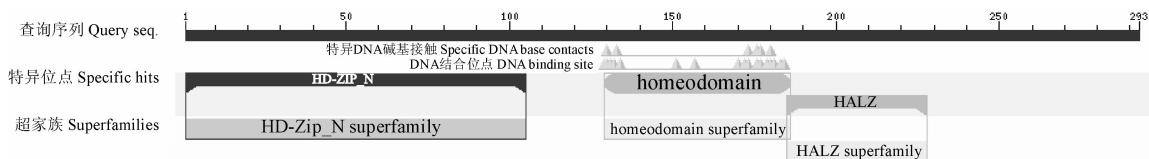
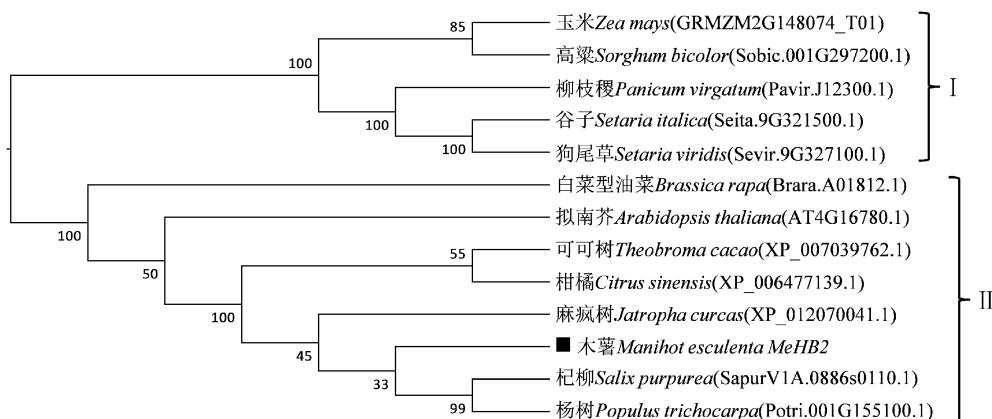


图 3 *MeHB2* 蛋白质结构域分析
Fig. 3 Protein domain analysis of *MeHB2*



图中各分支处数值表示重复 1 000 次 Bootstrap 值,括号内为氨基酸登录号

图 4 *MeHB2* 与其他 HB2 基因的进化树分析

The number at each node represents the Bootstrap value derived from 1 000 replicates, and the accession number of each sequence is given in the bracket

Fig. 4 Phylogenetic analysis of *MeHB2* and other HB2 genes

理论等电点为 7.54。蛋白质保守结构预测显示, *MeHB2* 编码的蛋白含有 Homeodomain(cd000086) 和 Leu zipper(smart00340) 结构域, 表明克隆到的 *MeHB2* 基因属于 HD-Zip 家族。此外, 在 N 端还发现了 HD-Zip_N(pfam04618) 结构域(图 3), 进一步表明 *MeHB2* 属于 HD-Zip II 成员。

2.2 *MeHB2* 基因进化树分析

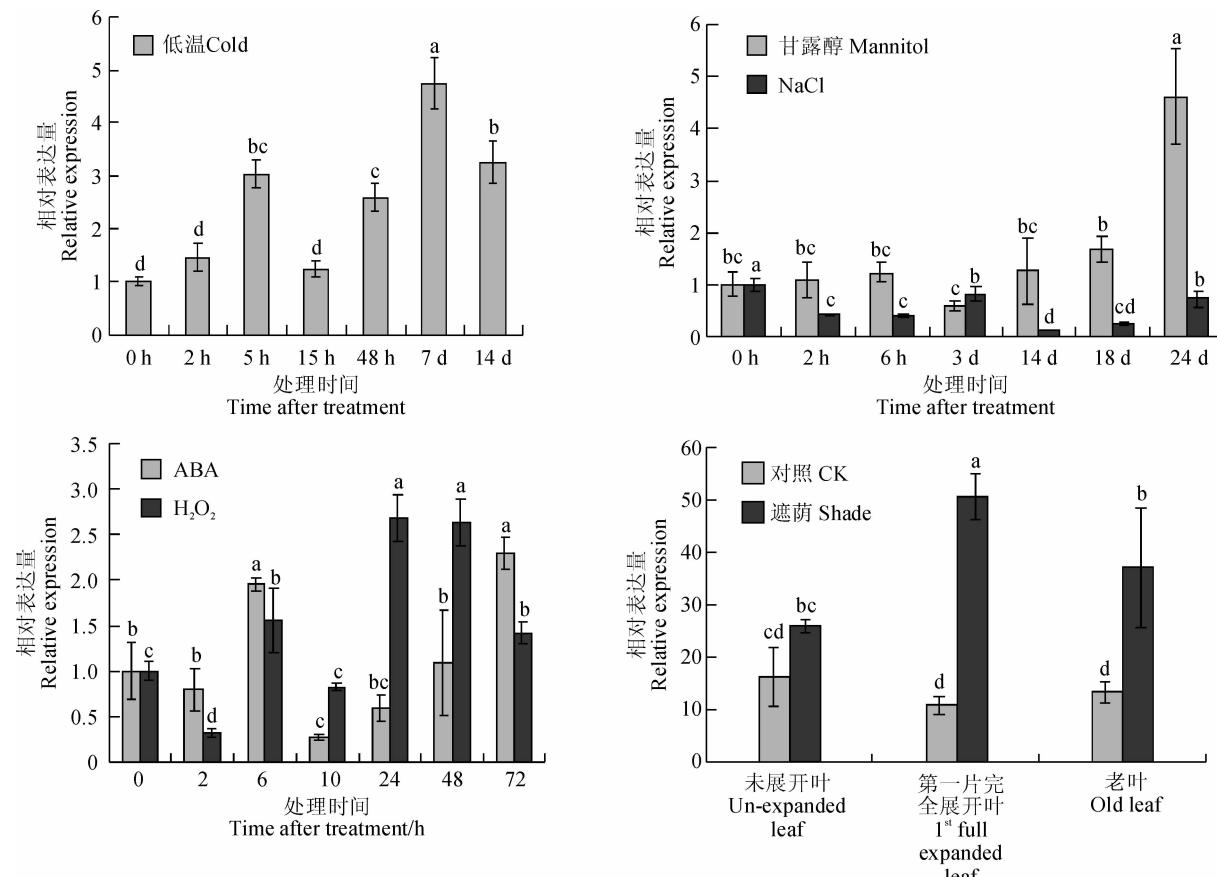
利用 MEGA5.2 软件对 *MeHB2* 与来自其他物种的同源性较高的氨基酸序列进行比对, 构建系统进化树(图 4)。结果表明, 这些序列大致上可以聚类为 2 组: 第 I 组以 C₄ 物种为代表, 包括谷子、狗尾草、柳枝稷、玉米和高粱; 第 II 组包括白菜型油菜、拟南芥、可可树、柑橘、麻疯树、木薯、杨树和杞柳。其中木薯与麻疯树(XP_012070041.1)、杨树(Potri.001G155100.1)和杞柳(SapurV1A.0886s0110.1)的亲缘关系较近, 氨基酸序列相似度分别达到 84%、78.5% 和 77.5%。

2.3 *MeHB2* 表达模式分析

为了研究 *MeHB2* 基因对各种非生物胁迫的响应, 我们利用 qRT-PCR 方法检测了其在木薯叶片

中的表达量(图 5)。在低温胁迫处理下, *MeHB2* 的表达量在 2 h 有轻微上升, 5 h 达到显著水平, 之后在 15 h 轻微下降, 在回复室温 7 d 后达到最高水平。在甘露醇处理后 2 h ~ 18 d, *MeHB2* 的表达量无明显变化, 但在 24 d 显著增强。在 NaCl 处理下, *MeHB2* 的表达量均显著下降了, 其中以 14 和 18 d 最为明显, 分别下降了 86.8% 和 74.6%。在 ABA 处理下, *MeHB2* 的表达量在 2 h 无明显变化, 6 h 显著增强, 之后在 10 h 下降, 直至 72 h 表达水平最高。在 H₂O₂ 处理下, *MeHB2* 的表达量在 2 h 显著下降, 在 6 h 显著增强, 之后再稍微下降, 在 24 ~ 48 h 达到最高表达水平。这些结果充分表明, 在低温、渗透胁迫、ABA 和 H₂O₂ 处理条件下, *MeHB2* 基因的表达水平被显著诱导, 而盐胁迫强烈地抑制 *MeHB2* 基因的表达。

另外, 检测了 *MeHB2* 基因对遮荫处理的响应(图 5)。与对照相比, 遮荫处理后 *MeHB2* 在未展开叶中的表达量有轻微上升, 但在第一片完全展开叶和老叶中均显著地上升, 说明 *MeHB2* 的表达量还受到遮荫处理的诱导。



数据用“均值±标准偏差”表示,不同小写字母表示相同处理下不同时间点(或组织)之间差异显著($P<0.05$)

图 5 *MeHB2* 在不同胁迫下的表达模式

Data are shown as mean ± standard deviation, and different lowercase letters represent significant difference among different time points (or tissues) under the same treatment ($P<0.05$)

Fig. 5 Expression patterns of *MeHB2* gene under different stress treatments

3 讨 论

HD-Zip 是植物中一类重要的转录因子,在植物生长发育、形态建成、生物与非生物胁迫等逆境应答中起着非常重要的调控作用^[6-7]。HD-Zip 转录因子是一个庞大的基因家族,在拟南芥、水稻、玉米和杨树等物种中报道存在 33~63 个 HD-Zip 成员^[7]。与模式植物相比,木薯基因型高度杂合,其基础理论研究还相对薄弱。目前木薯中 HD-Zip 家族成员的数目尚不清楚,木薯中有关 HD-Zip 家族基因的报道也十分有限^[12]。在本研究中,我们克隆了一个木薯 HD-Zip 基因(*MeHB2*)的全长 cDNA 序列。蛋白质结构域预测表明,*MeHB2* 含有 HD-Zip 家族保守结构域,如 Homeodomain 和 Leu zipper 结构域等。从基因结构上看,*MeHB2* 与拟南芥 *AtHB2* 一样^[6],也属于 HD-Zip II 家族成员。聚类分析表明,它与麻疯树、杨树和杞柳的同源基因的相似性较高。

AtHB2 是第一个在绿色植物中被发现的受

R : FR 诱导的基因^[8]。*AtHB2* 反义和超表达植株分别表现出比野生型较短和较长的下胚轴,呈现典型的避荫反应表型^[8]。本研究从木薯中克隆了 *AtHB2* 的同源基因 *MeHB2*,并研究了该基因在遮荫处理下的表达量变化。如预期的那样,*MeHB2* 的表达量在遮荫处理(低 R; FR)下被强烈诱导了。而且,这种趋势在成熟的叶片中更加明显,与拟南芥中报道的 *AtHB2* 表达模式较为相似^[13]。

研究表明,HD-Zip II 基因受到干旱、高盐等多种逆境胁迫的调控。如在拟南芥中,*HAT2* 和 *HAT22* 的表达量受干旱诱导上调^[14];在水稻中,*OsHOX11*、*OsHOX19* 和 *OsHOX27* 的表达量在干旱条件下上调或下调^[10];在复苏植物车前草(*C. plantagineum*)中,*CpHB2* 基因在根中的表达量受到水分和 ABA 诱导^[15]。本研究中 qRT-PCR 分析表明,*MeHB2* 的表达量受到低温、甘露醇、ABA 和 H₂O₂ 诱导,但受到盐胁迫处理抑制,说明该基因在多种非生物逆境胁迫条件下参与基因表达调控,可

以作为木薯抗性育种较为重要的候选基因。这些研究结果将有助于了解 HD-Zip 转录因子 MeHB2 在

木薯逆境调控中的作用,为进一步研究和解析 HD-Zip 家族其他成员的功能提供参考。

参考文献:

- [1] OKOGBENIN E, SETTER T L, FERGUSON M, et al. Phenotypic approaches to drought in cassava: review[J]. *Frontiers in Physiology*, 2013, 4: 93.
- [2] SANTA B A, DOS R S, COSTA C N, et al. Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response [J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, 41(3): 1 787-1 797.
- [3] HILLOCKS R J, THRESH J, BELLOTTI A. Cassava: Biology, Production and Utilization[M]. New York: CABI Publishing, 2002: 17-66.
- [4] 卢赛清, 盘 欢, 马崇熙, 等. 2008 年广西木薯低温冻害情况及应对措施[J]. 广西热带农业, 2009,(1): 21-22.
LU S Q, PAN H, MA C X, et al. Freezing situation of cassava and emergency response at Guangxi in 2008[J]. *Guangxi Tropical Agriculture*, 2009,(1): 21-22.
- [5] ARIEL F D, MANAVELLA P A, DEZAR C A, et al. The true story of the HD-Zip family[J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(9): 419-426.
- [6] 秦永芳, 李登弟, 李学宝. 植物 HD-Zip 转录因子研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(4): 514-520.
QIN Y F, LI D D, LI X B. Progress in HD-Zip transcription factors of plant[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2009, 31(4): 514-520.
- [7] 王 宏, 李刚波, 张大勇, 等. 植物 HD-Zip 转录因子的生物学功能[J]. 遗传, 2013, 35(10): 1 179-1 188.
WANG H, LI G B, ZHANG D Y, et al. Biological functions of HD-Zip transcription factors[J]. *Hereditas*, 2013, 35(10): 1 179-1 188.
- [8] STEINDLER C, CARABELLI M, BORELLO U, et al. Phytochrome A, phytochrome B and other phytochrome(s) regulate ATHB2 gene expression in etiolated and green *Arabidopsis* plants[J]. *Plant, Cell & Environment*, 1997, 20(6): 759-763.
- [9] CARABELLI M, MORELLI G, WHITELAM G, et al. Twilight-zone and canopy shade induction of the *Athb-2* homeobox gene in green plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(8): 3 530-3 535.
- [10] AGALOU A, PURWANTOMO S, ÖVERN S E, et al. A genome-wide survey of HD-Zip genes in rice and analysis of drought-responsive family members[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66(1-2): 87-103.
- [11] 胡 伟, 颜 彦, 韦运谢, 等. 小麦 TaNAC5 基因克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2014, 34(12): 2 394-2 398.
HU W, YAN Y, WEI Y X, et al. Clone and expression of *TaNAC5* gene in wheat[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2014, 34(12): 2 394-2 398.
- [12] XU J, DUAN X, YANG J, et al. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1 517-1 528.
- [13] CIARBELLI A R, CIOLFI A, SALVUCCI S, et al. The *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper II gene family: diversity and redundancy[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 68(4/5): 465-478.
- [14] HUANG D, WU W, ABRAMS S R, et al. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(11): 2 991-3 007.
- [15] DENG X, PHILLIPS J, MEIJER A H, et al. Characterization of five novel dehydration-responsive homeodomain leucine zipper genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 49(6): 601-610.

(编辑:宋亚珍)