

葡萄 Trihelix 转录因子家族生物信息及其基因表达分析

卢世雄, 王 萍, 何红红, 梁国平, 马宗桓, 乔亚丽, 吴玉霞, 陈佰鸿*, 毛 娟*

(甘肃农业大学园艺学院, 兰州 730070)

摘 要: 利用生物信息学分析、预测葡萄 Trihelix 转录因子家族基因的特性与功能, 为葡萄抗逆基因的挖掘和利用提供理论依据。以‘红地球’葡萄 (*Vitis vinifera*) 试管苗为试验材料, 对葡萄 Trihelix 转录因子家族进行理化性质、染色体定位、二级结构预测、亚细胞定位、基因结构分析、motif 以及基因芯片表达分析, 并利用 qRT-PCR 技术分析该家族基因在 $400\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 和 10% PEG 逆境下的表达情况。结果表明, 该转录因子家族在葡萄基因组中总共有 27 个成员, 分布于 11 条染色体上, 其中有 10 个成员集中分布在第 14 号和 17 号染色体上; 氨基酸残基为 175~880 个, 大多数具有疏水性。亚细胞定位分析表明, 该基因家族主要存在于细胞核中。结构域分析显示, 同一亚家族蛋白保守域结构高度相似。基因芯片表达结果显示, 非生物胁迫下, 叶片中 *VvTrihelix6* 在 PEG 处理 24 h 后与对照相比呈显著上调趋势, 当用 NaCl 处理 4 h 和 24 h 后, 与叶片对照相比有下调表达趋势; 用 ABA 处理果实 3 d 后, 该基因在果实中呈下调表达, 处理 10 d 后变化不明显。叶片中 *VvTrihelix19* 转录因子经 PEG、NaCl 和冷胁迫处理 24 h 后明显下调; 果实用 ABA 处理 3 d 和 10 d 后均有明显下调趋势。qRT-PCR 分析表明该转录因子家族所有基因对逆境胁迫具有响应作用, 但是, 不同成员在不同逆境胁迫下的响应程度存在一定的差异。转录因子 *VvTrihelix6* 在 $400\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理下表达量极显著高于对照, 分别是对照的 15 倍和 8 倍; *VvTrihelix19* 只在 10% PEG 胁迫处理后呈显著上调表达。

关键词: 葡萄; 非生物胁迫; 基因家族; 生物信息学分析; 基因表达芯片; qRT-PCR

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 07-1257-13

Bioinformatics Identification and Expression Analysis of Grape Trihelix Transcription Factor Family

LU Shixiong, WANG Ping, HE Honghong, LIANG Guoping, MA Zonghuan, QIAO Yali, WU Yuxia, CHEN Baihong*, and MAO Juan*

(College of Horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The characteristics and functions of grape Trihelix transcription factor family genes were analyzed and predicted by bioinformatics, providing a theoretical basis for the mining and utilization

收稿日期: 2019-01-21; **修回日期:** 2019-06-21

基金项目: 甘肃省委组织部陇原青年创新团队项目 (LQ2018091801); 甘肃省现代水果产业体系项目 (GARS-SG-3); 甘肃省科技重大专项 (18ZD2NA006)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: bhch@gsau.edu.cn, maojuan@gsau.edu.cn)

of grape stress resistant gene. In this study, *Vitis vinifera* was used as the material. Bioinformatics was used to analyze the physicochemical properties, chromosomal localization, secondary structure prediction, subcellular localization, gene structure analysis, motif explores and gene chip expression of grape Trihelix transcription factor family. The qRT-PCR was used to analyze the expression of this family under 400 mmol · L⁻¹ NaCl, 100 mmol · L⁻¹ ABA and 10% PEG stress. The results showed that there were 27 members of the transcription factor family in the grape genome, and distributed on 11 chromosomes, including 10 members concentrated on chromosomes 14 and 17. The amino acid size is mainly between 175 - 880 aa, most is hydrophobic. The subcellular localization analysis indicated that this gene family mainly existed in the nucleus. Domain analysis displayed that the conserved domain structure of the same subfamily was highly similar. Gene chip expression results clearly illuminated that *VvTrihelix6* played up-regulated trend after 24 h PEG treatment compared with the control under abiotic stress, and a down-regulated trend after 4 h and 24 h PEG treatment contrast with the control. Also, after ABA treatment for 3 d, the *VvTrihelix6* was down-regulated in fruits, but the change was not obvious after 10 d. The transcription factor *VvTrihelix19* showed a down regulation trend after 24 h treatment with PEG, salt and cold compare with control, and showed significant down-regulation at 3 d and 10 d under ABA treatment. qRT-PCR showed that all genes in the Trihelix transcription factor family responded to stress. However, the response degree of members of the gene family was different under different stress conditions. The expression of transcription factor *VvTrihelix6* in 400 mmol · L⁻¹ NaCl and 100 mmol · L⁻¹ ABA treatment was significantly higher than the control group, 15 times and 8 times of the control, respectively. *VvTrihelix19* was significantly up-regulated after 10% PEG stress treatment.

Keywords: grape; abiotic stress; gene family; bioinformatics analysis; gene expression microarray; qRT-PCR

2018 年中国的葡萄栽培面积达 83 万 hm²; 但由于栽培土壤盐碱过大、环境温度过低以及干旱等的影响, 葡萄栽培面临更多的困难 (张晓孟, 2017)。因此, 揭示葡萄抗逆分子机理, 筛选抗逆基因, 克隆逆境胁迫相关基因, 对研究葡萄适应逆境胁迫具有重要意义。

转录因子是一类能够与靶基因启动子部位顺式作用元件发生特异性结合的 DNA 蛋白复合体, 调控靶标基因转录 (Riechmann et al., 2000)。在植物中发现的转录因子家族已超过 70 个, 大多数都与植物的生长发育和环境胁迫有直接关系。例如 AP2/EREBP、MYB、WRKY、BHLH/MY 和 BZIP 等转录因子通过与其对应的顺式作用元件相结合, 激活下游一系列信号, 引起相应生理生化反应, 从而提高植物抗逆性 (Xie et al., 2017; 纪晴 等, 2018; Jia et al., 2018; Li et al., 2018; Zhang et al., 2018)。Trihelix 是在植物体中最早发现的转录因子之一, 因其含有 Trihelix 结构域而得名, 其特征为含有 3 个串联的 α -螺旋, 即能形成螺旋—环—螺旋—环—螺旋构象, 一般存在 1 个或 2 个这种串联的结构, 且存在于 Trihelix 蛋白的 N 端或 C 端, 在植物生长发育中扮演重要角色 (宋露露, 2017)。大量研究表明, Trihelix 转录因子家族成员参与植物光形态建成、花器官形态建成、种子离层形成 (Lin et al., 2007; Lampugnani et al., 2012; 纪剑辉 等, 2015), 以及非生物胁迫和生物胁迫响应, 包括冷害、干旱、盐胁迫和病害等 (Park et al., 2004; Xie et al., 2009; Fang et al., 2010; 张梅, 2018)。Trihelix 转录因子家族因功能结构域氨基酸的不同, 可分为 GT-1、GT-2、GT γ 、SH4 和 SIP1 等 5 个亚家族, GT-2 有 2 个 DNA 结合域, 其他亚家族只有 1 个 (Kaplan-Levy et al., 2012)。

Xie 等 (2009) 的研究结果表明, Trihelix 转录因子可根据 DNA 结合区域的数量不同, 分为 GT-1、GT-2 和 GT-3 等 3 类, 只有 GT-2 转录因子有 2 个 DNA 结合域。

有研究表明, 用病原体胁迫处理拟南芥 30 min 后, *AtGT-3b* 基因在拟南芥叶片中呈上调表达 (Park et al., 2004)。Xie 等 (2010) 将大豆 *GmGT2A* 和 *GmGT2B* 转入拟南芥中后, 转基因植株对高盐、干旱和低温呈现明显抗性, 并且 *GmGT2B* 明显降低了植物对外源 ABA 的敏感性。*OsGTγ-1* 在水稻中过量表达, 提高了水稻对盐胁迫的抗性 (罗成科 等, 2015)。该家族基因 *GTL1* 转入拟南芥, 转基因植株抗旱性明显提高 (Chan et al., 2010)。Xi 等 (2012) 研究表明, 当拟南芥受到冷害、盐胁迫以及 ABA 胁迫时, 基因 *AtGT2L* 在植物体内呈现上调表达趋势。

目前, Trihelix 转录因子已经在水稻 (*Oryza sativa*)、大豆 (*Glycine max*)、玉米 (*Zea mays*)、菠菜 (*Spinacia oleracea*) 和拟南芥 (*Arabidopsis*) 等多种植物中发现 (Nagano, 2000; Gao et al., 2009; Weselake et al., 2009; Lorca et al., 2014; Qin et al., 2014; O'Brien et al., 2015)。但在葡萄中对该基因的研究鲜有报道, 因此, 研究 Trihelix 转录因子家族在葡萄基因组中的功能, 筛选出抗逆基因, 可为葡萄的遗传改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 with 处理

试验于 2018 年 9—10 月在甘肃农业大学园艺学院实验室进行。以 ‘红地球’ 葡萄 (*Vitis vinifera*) 试管苗为试验材料, 继代培养 30 d 后, 挑选生长健壮一致且无污染的组培苗, 分别继代培养到含 10% PEG、100 mmol · L⁻¹ ABA 和 200 mmol · L⁻¹ NaCl 和以加入清水的 MS 培养基中进行胁迫处理, 每个处理设置 3 个生物学重复, 1 瓶试管苗为 1 个生物学重复, 处理时长均为 24 h。

1.2 Trihelix 转录因子家族序列数据获得

从拟南芥基因组数据库 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥 Trihelix 转录因子的氨基酸序列; 从水稻基因组网 RGAP (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) 获得水稻的氨基酸序列。将已获得的拟南芥和稻的氨基酸序列输入葡萄基因组数据库中, 利用氨基酸序列进行同源比对, 除去片段小于 100 bp 的序列, 共搜索得到 27 个葡萄 Trihelix 基因, 分别下载基因的全长、CDS 序列、氨基酸序列以及 cDNA 序列。

1.3 葡萄 Trihelix 转录因子家族理化性质、基因定位和进化分析

利用 ExPASy 数据库 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 中的 ProtParam 工具对蛋白质的理论等电点、氨基酸大小、分子量、不稳定指数、亲水性等基本信息进行分析。利用 Maplnspect 软件分析基因在染色体上的位置; 利用 ClustalX 对拟南芥、水稻和葡萄的氨基酸序列进行多重比对; 使用 MEGA5.0 软件构建 Trihelix 转录因子家族系统发育树, 对构建的系统进化树进行自检 (bootstrap), 重复设定为默认值 1 000、Complete deletion 处理缺失数据、P-distancce 模型, 对葡萄 Trihelix 基因进行分类。

1.4 葡萄 Trihelix 转录因子家族二级结构和亚细胞定位预测

运用 Predict Protein (<https://www.predictprotein.org/signin#>) 在线分析蛋白质二级结构; 利用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 在线亚细胞定位预测葡萄 Trihelix 基因家族。

1.5 葡萄 Trihelix 转录因子家族保守基序、基因结构、染色体定位及多序列比对分析

利用 MEME (<http://meme-suite.org/>) 在线程序分析葡萄 Trihelix 转录因子家族保守基序, 预测基序的数量设置为 20 个; 在线软件 GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 进行基因结构分析; 使用 DNAMAN 进行结构域序列多重比对。

1.6 葡萄 Trihelix 转录因子家族基因芯片表达模式分析

利用 PLExdb 软件 (<http://www.plexdb.org/index.php>) 进行葡萄 Trihelix 转录因子家族 RNASeq 数据获得, 以核酸为探针搜索出相似度最高 Affymetrix Gene Chip 16K 基因 ID, 登录号分别为 GSE31662 和 GSE31594, 两组数据处理材料均来自于酿酒葡萄‘赤霞珠’(Cabernet Sauvignon), 但 ABA (GSE31662) 处理是以软化的青绿色葡萄果皮为试验材料, 盐、聚乙二醇 (PEG)、冷害以叶片为试验材料。然后利用检索到的 ID 在 Excel 中分别提取各转录因子家族基因在盐、聚乙二醇 (PEG)、冷害以及 ABA 胁迫下的 RNA-Seq 数据, 再对数据进行 ln 函数转换。最后使用 Heml 1.0.3.7 软件进行电子表达热图制作。

1.7 RNA 提取、cDNA 合成和实时荧光定量 PCR 分析

采用 CTAB 法提取葡萄试管苗不同处理的叶片总 RNA。利用生工生物工程 (上海) 股份有限公司在线软件设计引物 (表 1), 并由该公司合成。cDNA 合成用 Prime Script RT reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa)。反转录产物在 -20 °C 下保存备用。

表 1 葡萄 Trihelix 转录因子家族表达分析的实时荧光定量引物

Table 1 Real-time fluorescence quantitative primers for the expression analysis of grape Trihelix transcription factor family

基因 Gene	上游引物 (5' - 3') Forward primer	下游引物 (5' - 3') Reverse primer
<i>VvTrihelix1</i>	AGGCTTGGAAGAGACAGGAGATGG	CGGAACGCGGGTGGTAATTGG
<i>VvTrihelix2</i>	CTGATGGTTGAACAGGCGTGGAG	TGGTGAGGAGGACATCTCGCTTC
<i>VvTrihelix3</i>	AGGCTGGAGAAGGCTGCTACC	GCTGGACCTGTTGTCCACCGATG
<i>VvTrihelix4</i>	GATATGCTGATGGACGCCGATGG	TGGAGGTGCTGACGCTGAGG
<i>VvTrihelix5</i>	TGTCCGCTCCTGCTCGCAAG	TTCACGGTAGGCGTCGATGAGG
<i>VvTrihelix6</i>	GGCGACCGTCCAATAACCAACC	GCCGCTTGCTCGTCGTAGATAAG
<i>VvTrihelix7</i>	TCTGACGTGTACGGCCTGACC	TAGCAGCAGCAGCAGAAGCAAC
<i>VvTrihelix8</i>	CCTAATCTCGCCGTTGAACTCTCC	CTGCAACCGATAGTTGAGCCTGAG
<i>VvTrihelix9</i>	ACCACACGATGCTTATGGCTTGAC	TCCTCAACACCTCAGACACAGTCC
<i>VvTrihelix10</i>	TCACCGCCGACGAGTCCCTTC	ACAATCGCCTGAGCCAATTCCTTC
<i>VvTrihelix11</i>	GCCGCTGCCTCAGTTCTGAAC	GTGCCTTCGCCGATGGTGTC
<i>VvTrihelix12</i>	ACGACCAACTGTCTTGCTCCATTG	AGCTCTGCCACCTCTCCAATCC
<i>VvTrihelix13</i>	ACCTGTCGGAGAAGGCTCGTC	ATCTGCTGCTGCTGCTGTTGAG
<i>VvTrihelix14</i>	AAGACATCCACCAGAGCAACCTTG	GGCATCAACCACTAGGAAGTCGAG
<i>VvTrihelix15</i>	CCATCATCACCACCGAATCTCAC	TGGCATTGGAAGTAGGCACAACAG
<i>VvTrihelix16</i>	GGAAGATTGCTGGAGCGATGTCG	GTCGATACGGTCTTGCACTGGAC
<i>VvTrihelix17</i>	CCTCAGACCAGTTCACCAATTGCG	ACCACCACCACCACCACTACC
<i>VvTrihelix18</i>	TTCCACCTCTTCTCAACCTCCTC	GTGCTCTCGCTTCTCTATGGCTTC
<i>VvTrihelix29</i>	GCATCAGCCAGTCACAGCATCC	TCGCCAATCAAGCCATCCTTCAAG
<i>VvTrihelix20</i>	ACAACGATGGAGGCAAGAACTTGG	GCAGCAGCACCACCGAGATTG
<i>VvTrihelix21</i>	CGGCAACGACGATTACAGCAATTC	CGTCTCCTCCTGCTCTGTACTC
<i>VvTrihelix22</i>	TCGGTGCTGATTGACGCTTGG	CCTCACGGCTGCTCACAATATCC
<i>VvTrihelix23</i>	ACAACGGCCACAGTCAGAATCAG	CTCCATCTCCACCTTCTTCATCGC
<i>VvTrihelix24</i>	GGCTATGAGCGAAGTGCAATGAGG	CTTGCTGTGCTCGGTGGTCTTG
<i>VvTrihelix25</i>	GGTTCCGCCGCAATCGTCAG	AGCTGAGCCGTTAGGTTAGCAATG
<i>VvTrihelix26</i>	TGAAGGAGCGGAGCAAGAATGC	GCCTGCCACTAGCTTCGACTG
<i>VvTrihelix27</i>	GAGGCAGAGAAGCAGAAGCAGATG	GACCTCTTGGCTCGCTTGATCTTC
<i>GAPDH</i>	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	CCACAGACTTCATCGGTGACA

实时荧光定量 PCR (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR): 应用 Light Cycler 96 实时定量 PCR 仪, 用设计的引物进行 PCR 扩增, 以葡萄 *GAPDH* 作为该反应的内参基因, 扩增总反应体系为 20 μ L, 分别含 3 μ L cDNA, 上、下游引物各 0.8 μ L, SYBR MIX 10 μ L, 5.4 μ L ddH₂O, 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环。试验 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 葡萄 Trihelix 转录因子家族理化性质分析

利用拟南芥和水稻基因, 经葡萄基因组网同源搜索, 总共得到 27 个葡萄 Trihelix 基因, 对克隆出的葡萄 Trihelix 家族基因分别命名为 *VvTrihelix1* ~ *VvTrihelix27*。由表 2 分析可知, 葡萄 Trihelix 转录因子家族氨基酸残基为 175 ~ 880 个, *VvTrihelix9* 序列最长, 含 880 个氨基酸残基, *VvTrihelix19* 最短, 只含有 175 个氨基酸残基; 相对分子量集中在 19 728.04 ~ 98 002.1 bp; 等电点 pI 位于 4.71 ~ 9.62 之间; 以 *VvTrihelix3* 的稳定性最低, 为 23.35, *VvTrihelix2* 稳定性最高, 为 65.57; 脂肪指数介于 49.78 ~ 101.72 之间; 该转录因子家族大多具有疏水性, 只有 *VvTrihelix7* 具有亲水性 (表 2)。该转录因子家族主要分布于 01、02、04、08、09、10、12、13、14、17、18 号染色体上, 其中 14 和 17 号染色体分布最多, 均含有 5 个; *VvTrihelix5*、*VvTrihelix6* 和 *VvTrihelix21* 基因分布未知 (图 1)。

表 2 葡萄 Trihelix 基因家族信息及理化性质
Table 2 Information and physicochemical properties of grape Trihelix gene family

基因 Gene	基因 ID Gene ID	氨基酸残基数 Amino acid residue number	相对分子质量/bp Molecular weight	等电点 pI	不稳定指数 Instability index	脂肪指数 Aliphatic index	亲水性 Hydrophaticity
<i>VvTrihelix1</i>	GSVIVT00000450001	610	66 689.88	9.09	61.62	60.52	- 0.738
<i>VvTrihelix2</i>	GSVIVT00007624001	267	32 412.39	7.01	65.57	49.78	- 1.424
<i>VvTrihelix3</i>	GSVIVT00009717001	317	34 640.67	6.62	23.35	85.46	- 0.141
<i>VvTrihelix4</i>	GSVIVT00009719001	315	36 408.71	6.04	54.05	66.57	- 0.880
<i>VvTrihelix5</i>	GSVIVT00010721001	393	44 044.97	9.20	45.51	61.04	- 0.706
<i>VvTrihelix6</i>	GSVIVT00010959001	416	47 500.10	5.40	65.37	68.27	- 0.908
<i>VvTrihelix7</i>	GSVIVT00017824001	604	66 353.64	8.90	33.33	93.64	0.103
<i>VvTrihelix8</i>	GSVIVT00017917001	859	97 648.31	5.52	40.50	101.72	- 0.112
<i>VvTrihelix9</i>	GSVIVT00017918001	880	98 002.10	8.93	42.53	88.50	- 0.329
<i>VvTrihelix10</i>	GSVIVT00018738001	272	30 675.95	9.01	56.04	68.90	- 0.744
<i>VvTrihelix11</i>	GSVIVT00020569001	283	30 725.17	8.77	38.29	101.06	- 0.010
<i>VvTrihelix12</i>	GSVIVT00020570001	337	36 557.77	7.71	26.35	87.95	- 0.133
<i>VvTrihelix13</i>	GSVIVT00020571001	378	42 762.93	6.14	45.82	68.65	- 0.758
<i>VvTrihelix14</i>	GSVIVT00020572001	318	33 740.60	4.71	39.43	87.36	- 0.022
<i>VvTrihelix15</i>	GSVIVT00021664001	561	64 145.52	6.59	55.64	55.90	- 0.972
<i>VvTrihelix16</i>	GSVIVT00029331001	259	29 403.29	9.62	46.72	64.09	- 0.917
<i>VvTrihelix17</i>	GSVIVT00031144001	568	64 183.43	6.17	64.05	57.57	- 0.939
<i>VvTrihelix18</i>	GSVIVT00031772001	545	60 934.99	5.78	58.97	56.44	- 1.004
<i>VvTrihelix19</i>	GSVIVT00031773001	175	19 728.04	8.29	64.15	83.49	- 0.243
<i>VvTrihelix20</i>	GSVIVT00032270001	494	55 498.93	5.35	51.16	58.50	- 1.118
<i>VvTrihelix21</i>	GSVIVT00033872001	282	32 353.82	9.35	57.40	61.24	- 0.857
<i>VvTrihelix22</i>	GSVIVT00034030001	350	38 990.44	9.60	58.15	59.43	- 1.019
<i>VvTrihelix23</i>	GSVIVT00034901001	510	57 905.24	5.06	64.73	57.02	- 1.059
<i>VvTrihelix24</i>	GSVIVT00034998001	461	53 553.69	5.92	54.60	55.90	- 1.045
<i>VvTrihelix25</i>	GSVIVT00035100001	207	23 413.70	4.77	30.49	92.27	- 0.172
<i>VvTrihelix26</i>	GSVIVT00035101001	370	42 649.72	5.85	59.79	61.43	- 0.926
<i>VvTrihelix27</i>	GSVIVT00035872001	282	31 998.05	8.70	61.13	62.06	- 0.848

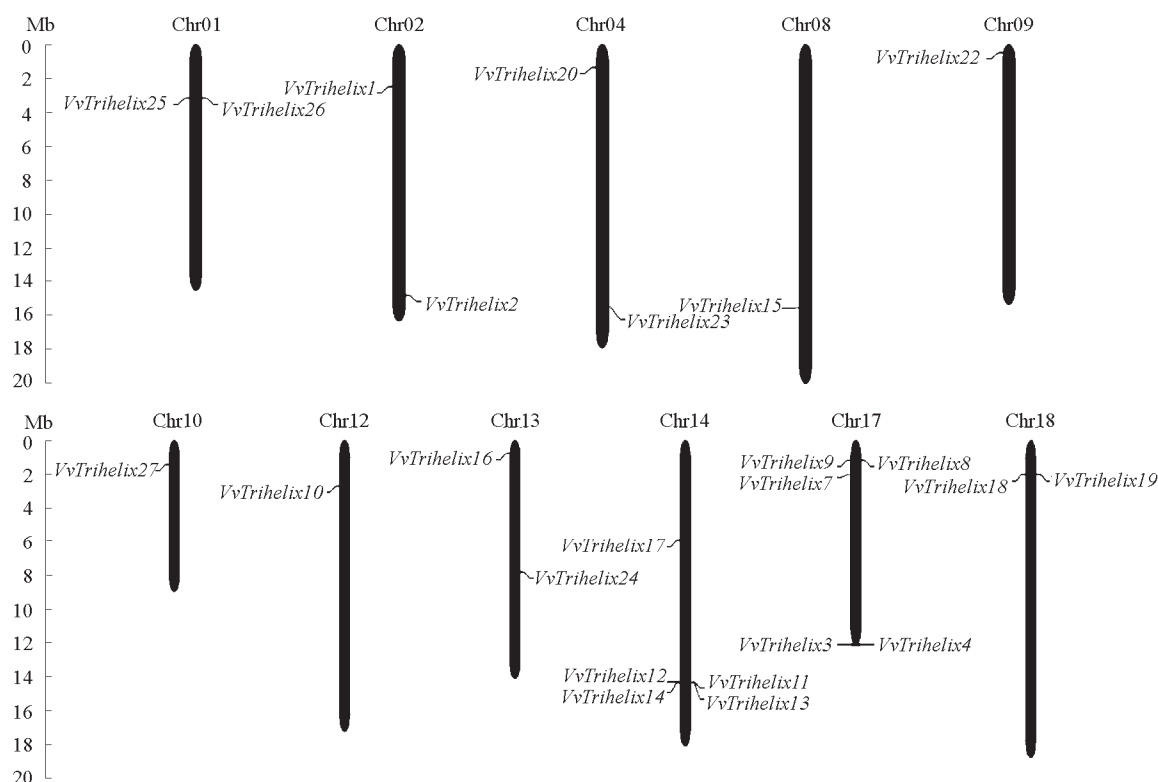


图 1 葡萄 Trihelix 转录因子家族染色体定位

Fig. 1 Chromosome mapping of the grape Trihelix transcription factor family

2.2 葡萄 Trihelix 转录因子家族进化分析

利用 MEGA5.0 构建系统发育树,结果如图 2 所示,葡萄 Trihelix 转录因子家族可分为 5 个亚族,第 I 亚族有 9 个转录因子,分别为 VvTrihelix1、VvTrihelix2、VvTrihelix6、VvTrihelix15、VvTrihelix17、VvTrihelix18、VvTrihelix20、VvTrihelix23、VvTrihelix24; 第 II 亚族有 4 个转录因子,分别是 VvTrihelix4、VvTrihelix13、VvTrihelix11 和 VvTrihelix26; 第 III 亚族有 6 个,为 VvTrihelix5、VvTrihelix10、VvTrihelix16、VvTrihelix21、VvTrihelix22 和 VvTrihelix27; 第 IV 亚族最少,分别为 VvTrihelix8、VvTrihelix19 和 VvTrihelix25; 第 V 亚族有 5 个,分别是 VvTrihelix3、VvTrihelix7、VvTrihelix9、VvTrihelix12 和 VvTrihelix14。

2.3 葡萄 Trihelix 转录因子家族蛋白质二级结构预测和亚细胞定位分析

蛋白质二级结构预测分析结果表明,葡萄 Trihelix 基因家族编码的蛋白质二级结构都具有 α -螺旋 (24.61%~71.71%) 和不规则卷曲 (22.97%~67.94%) 结构,且含量相对较高;由此可认为该 α -螺旋与该转录因子家族参与构成三螺旋结构相关。有 15 个基因编码的蛋白质二级结构不含 β -转角,分别为 VvTrihelix1、VvTrihelix、VvTrihelix5、VvTrihelix6、VvTrihelix10、VvTrihelix15、VvTrihelix16、VvTrihelix17、VvTrihelix18、VvTrihelix20、VvTrihelix21、VvTrihelix22、VvTrihelix23、VvTrihelix24 和 VvTrihelix27。



Fig. 2 Evolution analysis of the grape Trihelix transcription factor family

个基因表达。

2.4 葡萄 Trihelix 转录因子家族保守域结构特征分析

位点氨基酸的堆叠高度为该氨基酸的保守程度，堆叠中相对频率用单一氨基酸的高度表示。27 个转录因子家族中，最长保守序列有 50 个氨基酸残基，最短序列有 15 个氨基酸。转录因子 VvTrihelix7、VvTrihelix8、VvTrihelix11、VvTrihelix14、VvTrihelix19、VvTrihelix25 均不含有氨基酸保守结构域；因此，氨基酸保守结构域分析不含第Ⅳ亚族。转录因子 C 端由 3 种基序组成，分别为 motif2、motif5 和 motif9，其中 motif2 在转录因子中最多，含有 2XW28XW9X 氨基酸保守结构域，存在于第Ⅰ亚族和第Ⅲ亚家族中，此类保守结构域是 Trihelix 转录因子家族典型的螺旋—环—螺旋结构，且含有 X6LX16LX14 的亮氨酸拉链式保守结构，氨基酸残基 Trp (W) -3、Trp (W) -32 在序列中高度保守；N 端由 6 种基序组成，包括 motif6、motif8、motif13、motif14、motif16 和 motif18，其中 motif6 在基因中最多，主要存在于第Ⅰ亚族和第Ⅲ亚家族中，该氨基酸保守域结构含半胱氨酸残基和大量的赖氨酸残基在序列中高度保守；motif8 主要存在于第Ⅲ亚家族中，motif16 和 motif18 主要存在于第

II 亚族和第 V 亚族中（图 3），由此可见 VvTrihelix 在不同亚族中，保守结构域有很大差异。

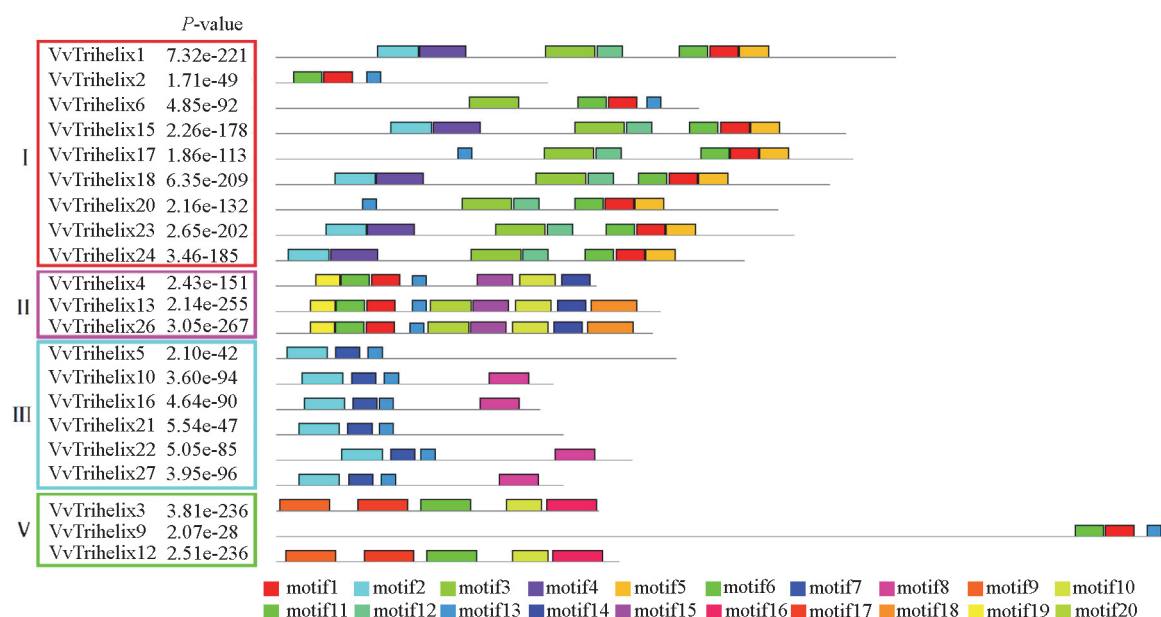


图 3 葡萄 Trihelix 转录因子家族氨基酸保守结构域分析

Fig. 3 Analysis of amino acid conserved domain of Trihelix transcription factor family in *Vitis vinifera*

2.5 葡萄 Trihelix 转录因子家族基因结构分析

对 Trihelix 转录因子的 27 个成员进行基因结构分析，结果如图 4 所示。所有基因长度均大于 1 kb；

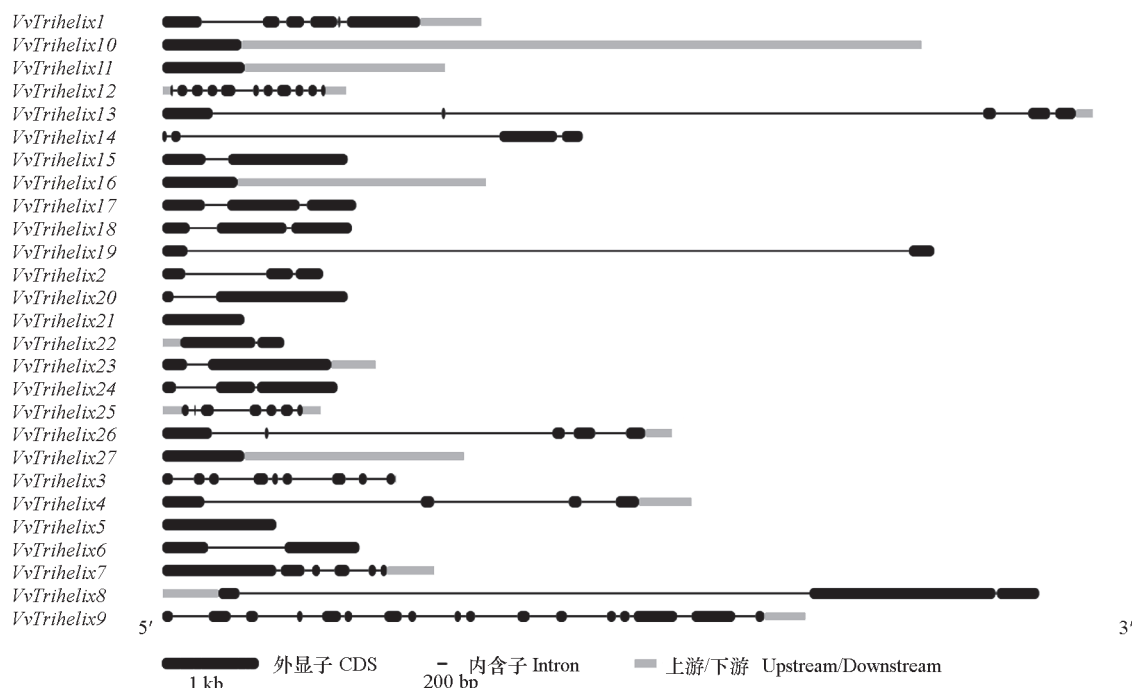


图 4 葡萄 Trihelix 转录因子家族基因结构分析

Fig. 4 Gene structure analysis of Trihelix transcription factor family in *Vitis vinifera*

VvTrihelix4、*VvTrihelix8*、*VvTrihelix9*、*VvTrihelix10*、*VvTrihelix13*、*VvTrihelix14*、*VvTrihelix19* 和 *VvTrihelix26* 相对较长, 最长超过 17 kb, *VvTrihelix10*、*VvTrihelix11*、*VvTrihelix16*、*VvTrihelix21*、*VvTrihelix27* 不含内含子, *VvTrihelix2*、*VvTrihelix3*、*VvTrihelix5*、*VvTrihelix6*、*VvTrihelix14*、*VvTrihelix15*、*VvTrihelix17*、*VvTrihelix18*、*VvTrihelix19*、*VvTrihelix20*、*VvTrihelix21* 和 *VvTrihelix24* 无基因上/下游结构, 内含子、外显子和上/下游结构都具有的只有 *VvTrihelix12* 和 *VvTrihelix25*, 且基因结构基本相似。外显子在 1~17 之间, 其中 *VvTrihelix9* 最多, 有 17 个; *VvTrihelix5*、*VvTrihelix10*、*VvTrihelix11*、*VvTrihelix16*、*VvTrihelix21* 和 *VvTrihelix27* 最少, 都只有 1 个。

2.6 葡萄 Trihelix 转录因子家族基因芯片表达分析

基因芯片表达分析结果(图 5)显示, 葡萄浆果经 ABA 处理 3 和 10 d 后, *VvTrihelix1*、*VvTrihelix3*、*VvTrihelix4*、*VvTrihelix9*、*VvTrihelix17*、*VvTrihelix22*、*VvTrihelix24* 和 *VvTrihelix27* 相比对照均呈现下调表达; 而 *VvTrihelix2*、*VvTrihelix5*、*VvTrihelix10* 和 *VvTrihelix13* 呈明显上调表达。

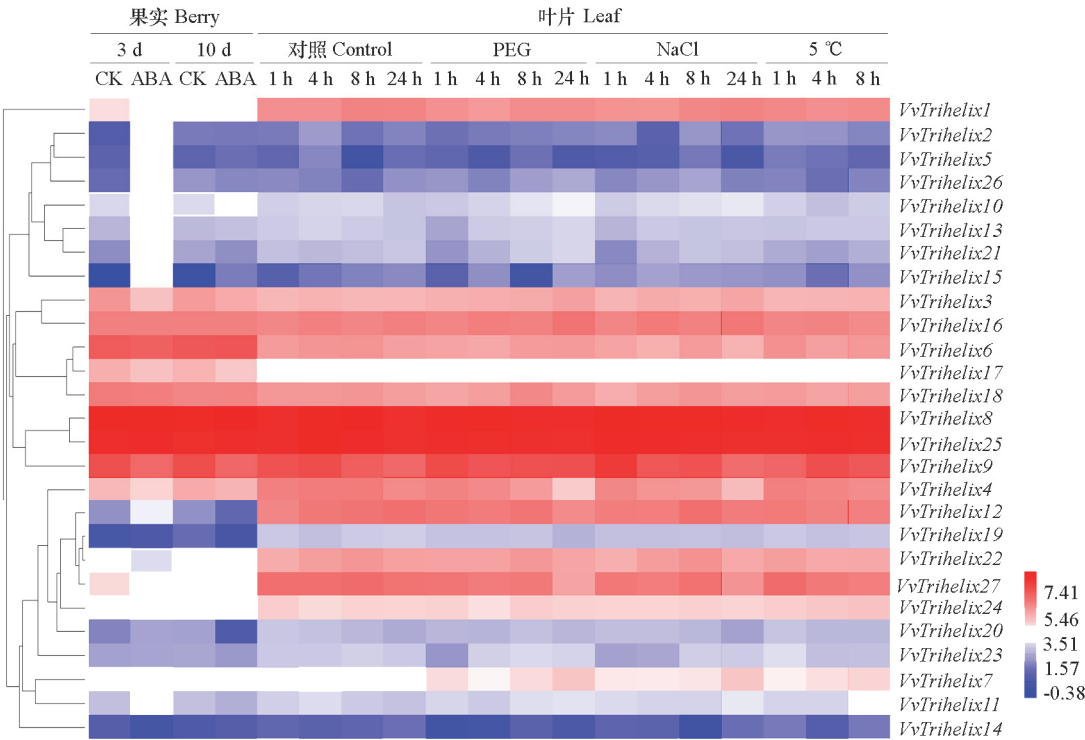


图 5 葡萄 Trihelix 基因表达谱
蓝色表示基因表达弱, 白色表示基因表达居中, 红色表示基因表达最强。
Fig. 5 Expression profile of Trihelix gene in *Vitis vinifera*
Blue indicates weak gene expression, white indicates medium gene expression, and red indicates strongest gene expression.

当用 PEG 处理 24 h 后, 葡萄叶片中 *VvTrihelix7*、*VvTrihelix10* 和 *VvTrihelix11* 基因的表达量明显高于对照, 而 *VvTrihelix4*、*VvTrihelix5*、*VvTrihelix12*、*VvTrihelix14*、*VvTrihelix19* 和 *VvTrihelix27* 的表达量明显下调; 盐胁迫处理 24 h 后, *VvTrihelix7* 和 *VvTrihelix11* 的表达量明显上调表达, *VvTrihelix4*、*VvTrihelix6*、*VvTrihelix20* 和 *VvTrihelix27* 则呈现下调表达。当低温胁迫处理材料 8 h 后, 叶片中的 *VvTrihelix20* 和 *VvTrihelix21* 明显下调, *VvTrihelix5*、*VvTrihelix7* 和 *VvTrihelix11* 呈上调趋势。*VvTrihelix8* 和 *VvTrihelix25* 在任何胁迫下表达量均不明显。但是, 随着逆境胁迫时间的延长,

表达量呈现不同的水平, 如 *VvTrihelix6* 在 ABA 处理葡萄果实 3 d 后表达量呈下调趋势, 10 d 后变化不明显; 而盐处理 4 h, 叶片中 *VvTrihelix6* 下调, 8 h 后变化不明显, 24 h 后明显下调表达; 在 PEG 处理 24 h 后明显上调。 *VvTrihelix20* 随各胁迫处理时间的延长呈显著下调表达的趋势。

2.7 葡萄 Trihelix 基因家族 qRT-PCR 分析

对葡萄 Trihelix 转录因子家族的 27 个成员进行实时荧光定量分析, 结果 (图 6) 表明, 各处理间均呈现不同的表达量。

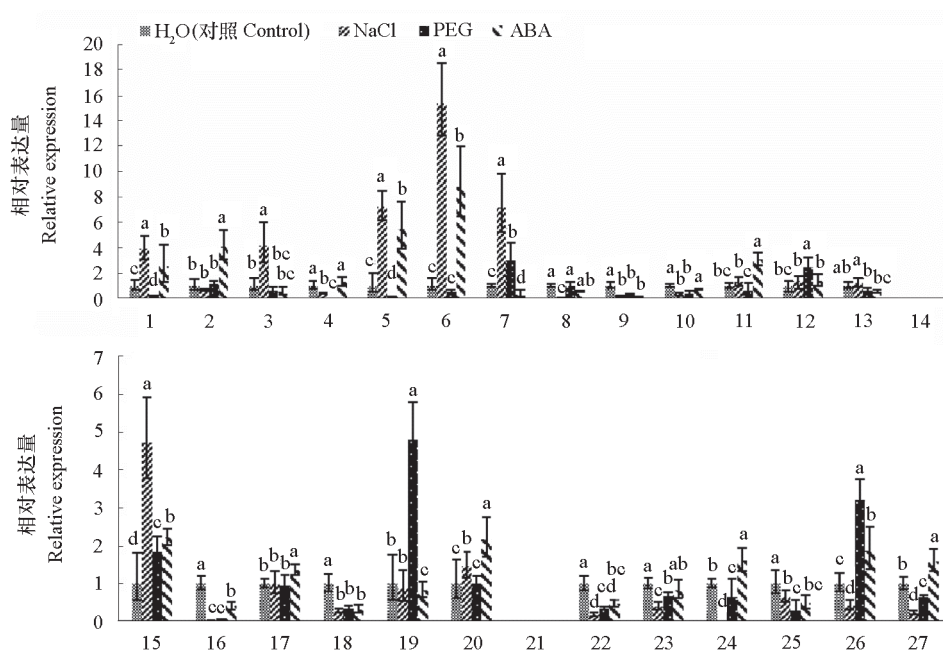


图 6 葡萄 Trihelix 转录因子家族荧光定量表达分析

Fig. 6 Fluorescence quantitative expression analysis of Trihelix transcription factor family in *Vitis vinifera*
1 - 27: *VvTrihelix1* - *VvTrihelix27*.

用 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、10% PEG 和 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理葡萄试管苗 24 h 后, *VvTrihelix15* 在 3 种逆境胁迫下与对照相比均呈显著上调趋势。 *VvTrihelix1*、*VvTrihelix3*、*VvTrihelix5*、*VvTrihelix6*、*VvTrihelix7* 和 *VvTrihelix20* 在 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫下呈显著上调表达, 其中 *VvTrihelix6* 的表达量是对照的 15 倍。在 10% PEG 胁迫下, *VvTrihelix7*、*VvTrihelix12*、*VvTrihelix19* 和 *VvTrihelix26* 显著上调表达, *VvTrihelix19* 的表达量最高, 是对照的 5 倍, 呈极显著差异。当该转录因子家族在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 胁迫处理后, *VvTrihelix1*、*VvTrihelix2*、*VvTrihelix5*、*VvTrihelix6*、*VvTrihelix7*、*VvTrihelix11*、*VvTrihelix17*、*VvTrihelix20*、*VvTrihelix24*、*VvTrihelix26* 和 *VvTrihelix27* 显著上调表达, 其中 *VvTrihelix6* 的表达量是对照的 8 倍。进化树分析发现, 第 I 亚族属于 GT-2 亚族, 第 III 亚族属于 SIP1 亚族, GT-2 亚族的 *VvTrihelix1*、*VvTrihelix2*、*VvTrihelix6*、*VvTrihelix15*、*VvTrihelix17*、*VvTrihelix20* 和 *VvTrihelix24* 在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 胁迫下显著上调表达。SIP1 亚族的 *VvTrihelix5*、*VvTrihelix10*、*VvTrihelix16*、*VvTrihelix21*、*VvTrihelix22* 和 *VvTrihelix27* 在 10% PEG 胁迫下呈显著下调趋势; *VvTrihelix14* 和 *VvTrihelix21* 在 3 种胁迫下均未检测到转录因子的表达。

3 讨论

Trihelix 是转录因子中一个较小的家族, Qin 等 (2014) 对 11 个物种、319 个 Trihelix 转录因子采用 JTT 氨基酸替代模型将该基因家族分为 5 个亚家族; 本试验中共获得葡萄 27 个转录因子, 对其进行进化分析发现, 葡萄 Trihelix 转录因子家族同样分为 5 个亚家族。该转录因子最早被发现是在豌豆细胞核中 (Green et al., 1987); 李月等 (2015) 将棉花 GT-2 亚家族转录因子基因 *GhGT-2* 进行亚细胞定位, 发现该基因主要定位于细胞核中; 同时, 有研究表明, 当该转录因子家族基因进入到细胞核中时, 才会激活下游信号, 促进基因的调控与表达 (Imagawa et al., 2000)。本试验中对葡萄 Trihelix 转录因子家族进行亚细胞定位, 发现该转录因子家族多数基因在细胞核中进行表达, 推测该转录因子家族对葡萄细胞核内信号转导同样具有重要作用。

MEME 在线软件分析水稻 Trihelix 转录因子家族的保守基序聚类分析结果具有较高的一致性, 且含有保守性较高的色氨酸残基 (纪剑辉 等, 2015)。本研究中转录因子 C 端由 3 种 motif 组成, 分别为 motif2、motif5 和 motif9, 其中 motif2 在转录因子中最多, 含有 2XW28XW9X 色氨酸保守结构域, 这与纪剑辉等 (2015) 的研究结果基本相似; Trihelix 家族的每个亚族都有其不同的结构域, GT-2 亚族结构域特点最为明显, 其含有两个 Trihelix 保守结构域, 而其他亚族只含有 1 个 (Kaplan-Levy et al., 2012)。本研究中发现第 I 亚族与 GT-2 亚族为同一亚族, 该亚族各基因同样也含有两个保守结构域, 分别为 motif1 和 motif6; 但在其他亚族同样含有 3 个或 6 个相同的结构域, 这与 Kaplan-Levy 等 (2012) 的研究结果存在差异。

近几年研究发现, Trihelix 转录因子在抵抗病害、冷害、干旱以及生物胁迫中同样具有重要作用 (Nagano, 2000; Mira et al., 2004; Barr et al., 2012; Wang et al., 2014)。*BnSIP1-1* 是 SIP1 亚家族中的 1 个基因, 它在植株中的过表达能明显提高转基因油菜的耐盐性 (Luo et al., 2017)。本研究中 *VvTrihelix5* 属于 SIP1 亚族, 在 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 胁迫处理 24 h 后, 叶片中该基因的表达量呈明显上调趋势。Yu 等 (2018) 将 *ShClGT* 转录因子转入番茄中, 发现能明显提高番茄对非生物胁迫的耐受能力, 尤其降低了番茄对 ABA 的敏感程度。*GhGT-2* 和 *GhGT30* 是位于 GT-2 亚家族的两个基因, 将其分别转入棉花和陆地棉中, 用 ABA 进行非生物胁迫处理, 结果表明, 随着时间的增长, 该基因的表达量呈现上升趋势 (李月 等, 2013, 2015)。Xi 等 (2012) 将转录因子 *AtGT2L* 转入拟南芥中, 转基因植株增强了对冷害和盐胁迫的耐受性。在大豆幼苗进行不同盐胁迫和干旱胁迫处理, 发现 GT-2 亚家族基因 *GmGT-2A* 和 *GmGT-2B* 转录因子在叶片中的表达量呈明显上调趋势 (Xie et al., 2009)。本研究的结果表明, GT-2 亚族基因 *VvTrihelix1* 和 *VvTrihelix6* 在受到 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 胁迫下基因表达量呈明显上调表达。*VvTrihelix6* 表达上调结果最为明显, 表达量分别是对照的 15 倍和 8 倍。

另外, GT-2 亚族中大多数基因在 NaCl 和 ABA 胁迫下呈上调表达, 猜测 GT-2 亚家族中的基因对盐和 ABA 胁迫具有正调控作用。这与李月等 (2013, 2015)、Xi 等 (2012) 和 Xie 等 (2009) 的研究结果基本一致。基因芯片表达结果显示, 葡萄果实在 ABA 处理 3 d 后, *VvTrihelix6* 表达量呈下调表达, 10 d 后变化不明显。用盐处理葡萄植株 4 h 和 24 h 后, 叶片中 *VvTrihelix6* 表达量下调; PEG 处理 24 h 后上调。这与本试验 qRT-PCR 研究结果存在较大差异, 可能与品种、盐和培养基种类, 以及糖浓度等多种因素有关; 例如, 本试验处理材料为‘红地球’, 而基因芯片数据中的处理材料为‘赤霞珠’; ABA 处理以叶片为试验材料, 而芯片数据以果实为试验材料。第 IV 亚族基因 *VvTrihelix19* 在 10% PEG 胁迫下与对照相比呈现明显上调表达, 因此, 可推测该基因与干旱胁迫有密切关系。

References

- Barr M S, Willmann M R, Jenik P D. 2012. Is there a role for Trihelix transcription factors in embryo maturation? *Plant Signaling Behavior*, 7 (2): 205 - 209.
- Chan Y Y, Pence H E, Jin J B, Miura K, Gosney M J, Hasegawa P M, Mickelbart M V. 2010. The *Arabidopsis* GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of SDD1. *The Plant Cell*, 22 (12): 4128 - 4141.
- Fang Y J, Xie K B, Hou X, Hu H H, Xiong L Z. 2010. Systematic analysis of GT factor family of rice reveals a novel subfamily involved in stress responses. *Molecular Genetics and Genomics*, 283 (2): 157 - 169.
- Gao M J, Lydiate D J, Li X, Lui H, Gjetvaj B, Hegedus D D, Rozwadowski K. 2009. Repression of seed maturation genes by a trihelix transcriptional repressor in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Cell*, 21(1): 54 - 71.
- Green P J, Kay S A, Chua N H. 1987. Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3a* gene. *EMBO Journal*, 6 (9): 2543 - 2549.
- Imagawa M, Sakaue R, Tanabe A, Osada S, Nishihara T. 2000. Two nuclear localization signals are required for nuclear transcription factors 1-A. *FEBS Letters*, 484 (2): 118 - 124.
- Ji Jian-hui, Zhou Ying-jun, Wu He-he, Yang Li-ming. 2015. Whole genome analysis and functional prediction of rice Trihelix transcription factor family. *Genetics*, 37 (12): 1228 - 1241. (in Chinese)
- 纪剑辉, 周颖君, 吴贺贺, 杨立明. 2015. 水稻 Trihelix 转录因子家族全基因组分析及功能预测. *遗传*, 37 (12): 1228 - 1241.
- Ji Qing, Zhou Fan, Zhou jun, Wang Da-wei, Hu Men-Hao, Li Dan, Shen Bing-qi, Deng Lang, Gao Xiao-yu, Du Zong-yi. 2018. Full genome identification and bioinformatics analysis of jujube AP2/EREBP transcription factors. *Genomics and Applied Biology*, 37 (7): 2983 - 2997. (in Chinese)
- 纪 晴, 周 凡, 周 军, 王大玮, 胡孟豪, 李 丹, 沈兵琪, 邓 浪, 高晓宇, 杜宗义. 2018. 枣 AP2/EREBP 转录因子的全基因组鉴定及生物信息学分析. *基因组学与应用生物学*, 37 (7): 2983 - 2997.
- Jia N, Liu J Q, Sun Y F, Tan P H, Cao H, Xie Y Y, Wen B T, Gu T Y, Liu J M, Li M M, Huang Y T, Lu J, Jin N, Sun L C, Xin F J, Fan B. 2018. *Citrus sinensis* MYB transcription factors CsMYB330 and CsMYB308 regulate fruit juice sac lignification through fine-tuning expression of the *Cs4CL1* gene. *Plant Science*, DOI: 10.1016/j.plantsci.2018.10.006.
- Kaplan-Levy R N, Brewer P B, Quon T, Smyth D R. 2012. The Trihelix family of transcription factors-light, stress and development. *Trends in Plant Science*, 17 (3): 163 - 171.
- Lampugnani E R, Kilinc A, Smyth D R. 2012. Petal loss is a boundary gene that inhibits growth between developing sepals in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 71 (5): 724 - 735.
- Li L, Gao W W, Qi P, Zhou B, Kong Q H, Ying Y H, Shou H X. 2018. Two soybean bHLH factors regulate response to iron deficiency. *Journal of Integrative Plant Biology*, 7: 607 - 622.
- Li Yue, Liu Xiao-dong, Xie Zong-ming, Dong Yong-mei, Wu Dong-mei, Chen Shou-yi. 2015. Cloning and functional analysis of cotton GhGT-2 transcription factors. *Scientia Agricultura Sinica*, 48 (24): 4872 - 4884. (in Chinese)
- 李 月, 刘晓东, 谢宗铭, 董永梅, 武冬梅, 陈受宜. 2015. 棉花 GhGT-2 转录因子的克隆及其功能分析. *中国农业科学*, 48 (24): 4872 - 4884.
- Li Yue, Sun Jie, Chen Shou-yi, Xie Zong-ming. 2013. Cloning and transcriptional function analysis of cotton transcription factor *GhGT30* gene. *Acta Agronomica Sinica*, 39 (4): 1 - 10. (in Chinese)
- 李 月, 孙 杰, 陈受宜, 谢宗铭. 2013. 棉花转录因子 *GhGT30* 基因的克隆及转录功能分析. *作物学报*, 39 (4): 1 - 10.
- Lin Z W, Griffith M E, Li X R, Zhu Z F, Tan L B, Fu Y C, Zhang W X, Wang X K, Xie D X, Sun C Q. 2007. Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 226 (1): 11 - 20.
- Lorca C M, Potschin M, Zentgraf U. 2014. BZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers in Plant Science*, 169: 169 - 183.
- Luo Cheng-ke, Xiao Guo-ju, Li Qian. 2015. Research advance of transcription factors related to stress resistance in rice. *Guihaia*, (6): 942 - 955. (in Chinese)

- 罗成科, 肖国举, 李 茜. 2015. 水稻逆境相关转录因子研究进展. 广西植物, (6): 942 - 955.
- Luo J, Tang S, Mei F, Peng X, Li J, Li X, Yan X, Zeng X, Liu F, Wu Y, Wu G. 2017. *BnSIP1-1*, a Trihelix family gene, mediates abiotic stress tolerance and ABA signaling in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science*, 8: e71136.
- Mira A, Virginie D, Li Y F, Zhou D X. 2004. Analysis of GT-3a identifies a distinct subgroup of trihelix DNA-binding transcription factors in *Arabidopsis*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 562 (1 - 3): 147 - 154.
- Nagano Y. 2000. Several features of the GT factor trihelix domain resemble those of the MYB DNA-binding domain. *Plant Physiology*, 124 (2): 491 - 493.
- O'Brien M, Kaplan-Levy R N, Quon T, Sappl P G, Smyth D R. 2015. PETAL LOSS, a Trihelix transcription factor that represses growth in *Arabidopsis thaliana*, binds the energy-sensing SnRK1 kinase AKIN10. *Journal of Experimental Botany*, 66 (9): 2475 - 2485.
- Park H C, Kim M L, Kang Y H, Jeon J M, Yoo J H, Kim M C, Park C Y, Jeong J C, Moon B C, Lee J H, Yoon H W, Lee S H, Chung W S, Lim C O, Lee S Y, Hong J C, Cho M J. 2004. Pathogen and NaCl induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1 like transcription factor. *Plant Physiology*, 135 (4): 2150 - 2161.
- Qin Y, Ma X, Yu G H, Wang Q, Wang L, Kong L G, Kim W, Wang H W. 2014. Evolutionary history of Trihelix family and their functional diversification. *DNA Research*, 21 (5): 499 - 510.
- Riechmann J L, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe O J, Samaha R R, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang J Z, Ghandehari D, Sherman B K, Yu G. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290 (5499): 2105 - 2110.
- Song Lu-lu. 2017. Functional identification and regulatory mechanism analysis of tomato stress response gene *ShGT-1* [M. D Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 宋露露. 2017. 番茄逆境响应基因 *ShGT-1* 的功能鉴定及调控机制解析[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Wang X H, Li Q T, Chen H W, Zhang W K, Ma B. 2014. Trihelix transcription factor GT-4 mediates salt tolerance via interaction with TEM2 in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 14 (1): 339.
- Weselake R J, Taylor D C, Rahman M H, Shah S, Laroche A, McVetty P B, Harwood J. 2009. Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotechnology Advances*, 27 (6): 866 - 878.
- Xi J, Qiu Y, Du L, Poovaiah B W. 2012. Plant-specific Trihelix transcription factor *AtGT2L* interacts with calcium/calmodulin and responds to cold and salt stresses. *Plant Science*, 185 - 186 (4): 274 - 280.
- Xie C M, Zhang G, Zhang Y M, Song X G, Guo H Y, Chen X Y, Fang R X. 2017. *SRWD1*, a novel target gene of DELLA and WRKY proteins, participates in the development and immune response of rice (*Oryza sativa* L.). *Science Bulletin*, 62 (24): 1639 - 1648.
- Xie K, Fang Y, Hou X, Hu H, Xiong L. 2010. Systematic analysis of GT factor family of rice reveals a novel subfamily involved in stress responses. *Molecular Genetics and Genomics*, 283 (2): 157 - 169.
- Xie Z M, Zou H F, Lei G, Wei W, Zhou Q Y, Niu C F, Liao Y, Tian A G, Ma B, Zhang W K, Zhang J S, Chen S Y. 2009. Soybean Trihelix transcription factors GmGT-2A and GmGT-2B improve plant tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 4 (9): e6898.
- Yu C Y, Song L L, Song J W, Bo O, Guo L J, Shang L L, Wang T T, Li H X, Zhang J H, Ye Z B. 2018. *ShCIGT*, a Trihelix family gene, mediates cold and drought tolerance by interacting with SnRK1 in tomato. *Plant Science*, 270: 140 - 149.
- Zhang Mei. 2008. Research progress of transcription factors related to plant stress. *Modern Agricultural Science and Technology*, 491 (21): 99. (in Chinese)
- 张 梅. 2008. 植物逆境胁迫相关转录因子研究进展. 现代农业科技, 491 (21): 99.
- Zhang Xiao-meng. 2017. Identification of cucumber tomato NAC transcription factor and preliminary analysis of its function in stress response and fruit development [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 张晓孟. 2017. 黄瓜番茄 NAC 转录因子鉴定及在逆境应答和果实发育中的功能初步分析[博士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Zhang Y, Xu Z C, Ji A J, Luo H M, Song J Y. 2018. Genomic survey of bZIP transcription factor genes related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8 (2): 295 - 305.
- Zhou D. 1999. Regulation mechanism of plant gene transcription by GT-element and GT-factors. *Trends Plant Science*, 4 (6): 210 - 214.