

桂花 OfABFs 基因克隆和表达分析

洪方蕾^{1,2,3}, 陆 瑶^{1,2,3}, 俞世姣^{1,2,3}, 胡芷诺^{1,2,3}, 缪云峰^{1,2,3}, 钟诗蔚^{1,2,3}, 赵宏波^{1,2,3}

(1. 浙江农林大学 浙江省园林植物种质创新与利用重点实验室, 浙江杭州 311300; 2. 浙江农林大学 南方园林植物种质创新与利用国家林业和草原局重点实验室, 浙江杭州 311300; 3. 浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江杭州 311300)

摘要: 【目的】研究 OfABFs 基因家族成员在桂花‘堰虹桂’*Osmanthus fragrans* ‘Yanhonggui’不同组织和花开放进程中的表达模式, 筛选参与调控花开放的关键成员。【方法】在桂花基因组数据库中筛选出相关 OfABFs 基因序列, 克隆序列全长并对其进行生物信息学分析, 通过荧光定量 PCR 分析 OfABFs 基因在‘堰虹桂’不同组织及花开放进程中的时空表达模式。【结果】筛选得到 5 条 OfABFs 基因序列。生物信息学分析得出: 桂花 OfABFs 蛋白具有亲水性, 较不稳定, 无信号肽段; 预测其蛋白二、三级结构具有相似的特性, 无规则卷曲和 α -螺旋为其结构组成的主要元件; 5 条 OfABFs 转录因子均含有 bZIP 转录因子家族保守结构域。亚细胞定位预测表明: 5 条 OfABFs 编码蛋白均定位在细胞核。荧光定量 PCR 结果表明: *OfragBF1*、*OfragBF2*、*OfragBF3*、*OfragBF4* 和 *OfragBF6* 在桂花中的表达具有组织特异性, 其中 *OfragBF1*、*OfragBF4* 和 *OfragBF6* 在花中有较高表达。*OfragBF1* 在顶壳期被转录激活, 表达显著升高; 铃梗期后表达水平虽呈下降趋势, 但仍保持较高水平。*OfragBF2* 的表达在顶壳期到达峰值, 且相对表达水平明显高于其他时期。*OfragBF3*、*OfragBF4* 和 *OfragBF6* 在花朵衰老期的相对表达量最高。【结论】*OfragBF1*、*OfragBF2* 可能与桂花花开放进程有关, 而 *OfragBF3*、*OfragBF4* 和 *OfragBF6* 参与调控桂花花朵衰老的可能性较大。图 10 表 4 参 32

关键词: 桂花; ABF 转录因子; 表达分析; 花开放

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2023)03-0481-11

Cloning and expression analysis of OfABFs gene in *Osmanthus fragrans*

HONG Fanglei^{1,2,3}, LU Yao^{1,2,3}, YU Shijiao^{1,2,3}, HU Zhinuo^{1,2,3}, MIAO Yunfeng^{1,2,3},
ZHONG Shiwei^{1,2,3}, ZHAO Hongbo^{1,2,3}

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization for Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Germplasm Innovation and Utilization for Southern Garden Plants, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. College of Landscape and Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to explore the expression patterns of OfABF gene family members in different tissues and flower opening process of *Osmanthus fragrans* ‘Yanhonggui’, and screen the key members involved in regulating flower opening. [Method] The related OfABFs gene sequence was screened from the *O. fragrans* genome database for the full-length sequence and bioinformatics analysis. The spatio-temporal expression mode of OfABFs gene in different tissues and flower opening process of *O. fragrans*

收稿日期: 2022-03-31; 修回日期: 2022-07-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32072615); 浙江省农业新品种选育重大专项(2021C02071-1); 国家级大学生创新创业训练计划项目(202010341024)

作者简介: 洪方蕾 (ORCID: 0000-0001-7393-9324), 从事观赏植物遗传育种等研究。E-mail: 944479051@qq.com。

通信作者: 赵宏波 (ORCID: 0000-0003-4714-8240), 教授, 博士, 从事观赏植物遗传育种等研究。

E-mail: zhaohb@zafu.edu.cn

‘Yanhonggui’ were analyzed by fluorescence quantitative PCR. [Result] 5 OfABFs sequences were screened. Bioinformatics analysis showed that *O. fragrans* OfABFs gene family protein was hydrophilic and unstable, and had no signal peptide. It was predicted that the protein secondary and tertiary structure had similar characteristics and irregular curl, and α -spiral was the main component of its structure. The 5 OfABFs transcription factors all contained the conserved domain of bZIP transcription factor family. Subcellular localization prediction showed that 5 OfABFs coding proteins were located in the nucleus. The results of fluorescence quantitative PCR showed that the expressions of *OfABF1*, *OfABF2*, *OfABF3*, *OfABF4* and *OfABF6* were tissue-specific, among which *OfABF1*, *OfABF4* and *OfABF6* were highly expressed in flowers. *OfABF1* was transcriptionally activated in the apical shell stage, and its expression increased significantly. Although the expression level decreased after boll stem stage, it still maintained a high level. The expression of *OfABF2* peaked in the apical shell stage, and the relative expression level was significantly higher than that in other stages. The relative expression levels of *OfABF3*, *OfABF4* and *OfABF6* were the highest in flower senescence stage. [Conclusion] *OfABF1* and *OfABF2* may be related to the blooming process of *O. fragrans*, while *OfABF3*, *OfABF4* and *OfABF6* are more likely to participate in the regulation of *O. fragrans* flower senescence. [Ch, 10 fig. 4 tab. 32 ref.]

Key words: *Osmanthus fragrans*; ABF transcription factor; expression analysis; flower opening

bZIP 转录因子家族是植物中最大、最保守且功能最多样的基因家族之一，广泛参与调节多种生物学过程^[1-2]。ABF (ABRE binding factor) 转录因子属于 bZIP 基因家族的 A 亚族^[3]，特异存在于植物中，ABFs 是 ABA 信号转导途径的关键基因，能够特异识别 ABA 响应元件 (ABA-responsive element, AREB)，并通过与 AREB 结合参与下游响应 ABA 信号靶基因的调控^[4]。月季 *Rosa chinensis* 中 *RhABF2* 基因能够与含有 ABRE 元件的 *RhFer1* 启动子结合，共同调节铁平衡参与调控花瓣衰老过程^[5]；睡莲 *Nymphaea colorata* bZIP 家族 A 亚组的 11 个成员的启动子区域有大量 ABA 响应元件，在 ABA 信号转导中具有重要作用^[6]；菊花 *Chrysanthemum × morifolium* 中锌指蛋白 BBX19 和 ABF3 互作，通过诱导 ABA 响应基因表达来调控菊花的耐旱性^[7]。桂花 *Osmanthus fragrans* 属于木犀科 Oleaceae 木犀属 *Osmanthus* 常绿乔木，是中国传统十大名花之一。温度、湿度是影响桂花花开放的重要因素。为了解 ABFs 转录因子在桂花中的作用，本研究以秋桂品种‘堰虹桂’*O. fragrans* ‘Yanhonggui’为材料，在桂花基因组中筛选出相关 OfABFs 基因序列，通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 分析 OfABFs 基因在‘堰虹桂’不同组织和花开放进程中的时空表达模式，为后续阐明 ABFs 基因家族各成员的生物学功能提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

以浙江农林大学桂花资源圃的桂花品种‘堰虹桂’盆栽植物为材料，选取株龄相同、长势一致的健康植株，分别于起始 1 期(圆珠期前 3 d, B₁)，起始 2 期(圆珠期前 2 d, B₂)，起始 3 期(圆珠期前 1 d, B₃)，圆珠期(S₁)，顶壳期(S₂)，铃梗期(S₃)，初开期(S₄)，盛开期(S₅)，盛开末期(S₆)，衰老期(S₇)共 10 个时期进行取样(图 1)^[8]。同样，取桂花不同组织的样品，包括根、新叶、新枝、老叶、老枝、盛开期的花朵，每个时期样品采集 3 份，液氮速冻后储藏于-80 ℃冰箱。

1.2 方法

1.2.1 桂花 OfABFs 转录因子鉴定及简单克隆 桂花核苷酸序列来源于桂花基因组数据库^[9]，从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 信息资源 (TAIR) 数据库 (<http://www.arabidopsis.org/>) 和 PlantTFDB (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/blast.php>) 数据库中获得拟南芥的 ABFs 氨基酸序列，以此作为查询对象，使用 NCBI-Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在桂花基因组蛋白数据库中进行同源比对，确定桂花中的 ABFs 基



图 1 桂花花开放各时期表型图
Figure 1 Phenotypic of *O. fragrans* in different periods

因序列。利用 NCBI-CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 对 OfABFs 进行保守功能域预测。使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析 OfABFs 蛋白结构域。

RNA 的提取使用 RNA prep Pure Plant Plus Kit 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司], 使用核酸分析仪 (赛默飞世尔科技公司) 对 RNA 的纯度与浓度进行检测, 并用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。使用 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper) 试剂盒 (南京诺维赞生物科技股份公司), 对花开放不同时期的 cDNA 进行合成。

运用 Primer 5.0 进行简单克隆引物设计 (表 1), 以花开放时期的花芽 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (20 μL): 上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL、cDNA 模板 1 μL、GreenTaqMix10 μL 和 ddH₂O 7 μL。PCR 扩增程序: 预变性 95 °C, 3 min; 变性 95 °C, 15 s, 退火温度以各自引物最佳温度为准, 15 s, 延伸 72 °C, 3 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。将 PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的片段回收纯化后与 pMD-18T 载体连接, 连接产物转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞, PCR 初步鉴定阳性克隆后送杭州有康生物科技有限公司测序, 经比对后确定序列。

表 1 桂花 OfABFs 简单克隆引物
Table 1 Primers for Cloning of OfABFs in *O. fragrans*

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp	引物温度/°C
<i>OfABF1</i>	F: ATGGGGAGTAATTGAACTTCAAGAATCCG R: TTACCATGGACCTGTCTGAGTTCTCA	1 557	54
<i>OfABF2</i>	F: ATGGGGTCATACATGAACCTCAAG R: CTACCAAGGTCCCCTCAGCA	1 353	58
<i>OfABF3</i>	F: ATGGGGAGTAATTAACTTCAAGAATTGG R: TTACCATGGCCCTGTCTGTACGTC	1 455	56
<i>OfABF4</i>	F: ATGTGGAGTAATTAACTTCAAGAACATGT R: TCACCATGGCCCCGTTTG	1 572	56
<i>OfABF6</i>	F: ATGAACCTTGGGCCGGACACATCA R: CTACCAAGGTCCGTCAAGCGTCCTTCT	1 329	45

1.2.2 桂花 OfABFs 基因染色体定位分析 利用 TBtools^[10] 从桂花基因组 Gff 文件中提取桂花 OfABFs 基因的染色体位置信息, 通过在线分析工具 TBtools 进行绘图可视化。

1.2.3 桂花 OfABFs 转录因子结构分析 用 DNAMAN 对已筛选的桂花 OfABFs 转录因子进行氨基酸序列比对, 分析其保守结构域和氨基酸序列同源性; 通过在线分析软件 MEME 5.1.0 分析 ABFs 的保守基序 (<http://meme-suite.org/tools/meme>), 并用 TBtools 对其进行绘图和可视化。对桂花 OfABFs 二级结构特征采用在线软件 SOPMA (<https://npsaprabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-sopma.html>) 进行预测分析; 使用在线网站 Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 构建 OfABFs 蛋白的三级结构模型。

1.2.4 桂花 OfABFs 转录因子蛋白理化性质分析及亚细胞定位预测 运用 ExPASy 在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 OfABFs 进行蛋白质、分子量、理论电点、酸碱性等预测分析和编码; 利用 SignalP 4.1 Server 分析桂花 OfABFs 蛋白有无信号肽。亚细胞定位预测通过在线工具 wolfsort (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 完成。

1.2.5 桂花 OfABFs 转录因子系统进化树构建 从美国国家生物信息中心 (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中获取拟南芥、烟草 *Nicotiana tabacum*、水稻 *Oryza sativa*、大麦 *Hordeum vulgare*、小麦 *Triticum aestivum*、番茄 *Solanum lycopersicum*、油橄榄 *Olea europaea* 的 ABFs 氨基酸序列, 使用 MEGA

11.0 软件进行同源聚类，建立系统发育树并选择 Bootstrap (1 000 次) 评估检测系统进化树。

1.2.6 桂花 OfABFs 转录因子的表达分析 利用 Primer Premier 5.0 对 5 个 *OfABFs* 基因进行荧光定量特异性引物设计 (表 2)，桂花 *OfACT* 作为内参基因^[11]，以‘堰虹桂’不同组织及不同花开放时期的花芽 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 扩增。反应体系为 20 μL：cDNA 模板 2 μL，2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL，上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.4 μL，ddH₂O 7.2 μL。RT-qPCR 程序：95 °C 30 s；95 °C 5 s，60 °C 30 s，共 40 个循环；然后以 95 °C 持续 15 s，60 °C 持续 1 min，95 °C 持续 15 s 作为熔解曲线分析程序。每个样品设置 3 次重复。

表 2 桂花 OfABFs 转录因子 RT-qPCR 特异性引物

Table 2 Specific primers for RT-qPCR of OfABFs in *O. fragrans*

基因名称	用于荧光定量的引物序列 (5'→3')	
<i>OfABF1</i>	F: GGAAGGATGGGAGTGTTAGTG	R: TTAGGCTTCAGCCAACTGA
<i>OfABF2</i>	F: TGGTGCAAAAGATGGAAGTGC	R: ATTTGCTGTCCAAGAGGGCTG
<i>OfABF3</i>	F: GAGTATGGTGGCGGGAGAAT	R: GGTAGGCTTCAGCAAACGT
<i>OfABF4</i>	F: TCTGGAGAGAGAGGTGGAATGA	R: CAAACTGGGCATCTTCCCTTAC
<i>OfABF6</i>	F: GAAGGGTAGTGGAGGATCAA	R: ACCACCATAAATTCCACCAAGC

2 结果与分析

2.1 桂花 OfABFs 转录因子鉴定及克隆

通过对桂花基因组数据分析，得到 5 条 *OfABFs* 基因序列，依次命名为 *OfABF1*、*OfABF2*、*OfABF3*、*OfABF4*、*OfABF6*。用‘堰虹桂’花开放时期的花芽(混样) cDNA 为模板进行 PCR 扩增 (图 2)。结果显示：*OfABFs* 的开放阅读框 (ORF) 长度为 1329~1572 bp，编码 442~523 个氨基酸；其中基因 *OfABF4* 氨基酸序列最长，编码 523 个氨基酸；基因 *OfABF6* 的氨基酸序列最短，编码 442 个氨基酸。

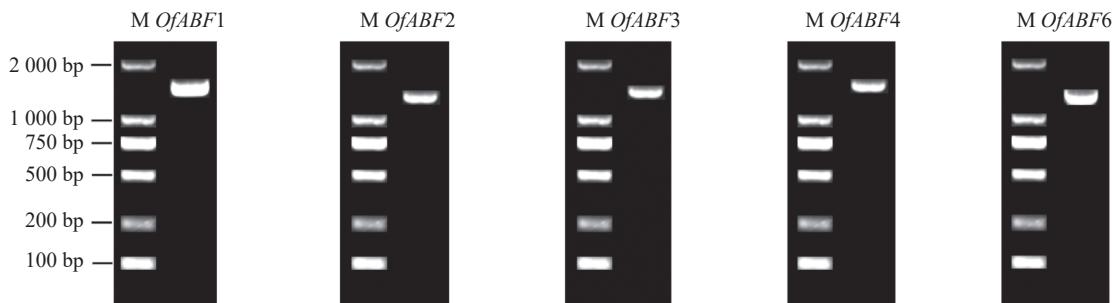


图 2 桂花 OfABFs 基因片段 PCR 扩增
Figure 2 PCR amplification of OfABFs of *O. fragrans*

2.2 桂花 OfABFs 基因家族染色体定位分析

根据‘堰虹桂’基因组 Gff 文件定位 5 个 *OfABFs* 基因。结果显示：5 个桂花 *OfABFs* 基因分布在 5 条染色体上，且各个基因在染色体上分布的数量相等，1 号、6 号、11 号、12 号和 22 号染色体上各分布 1 个 *OfABF* 基因 (图 3)。

2.3 桂花 OfABFs 转录因子结构分析

利用 SMART 在线分析软件对桂花 *OfABFs* 进行功能结构域预测。结果显示：5 个桂花 ABFs 均含有 BRLZ 结构域 (图 4)。BRLZ 结构域是 bZIP 家族特有的保守域，由碱性区和亮氨酸拉链区组成，能够识别特定的 DNA 序列，以二聚体形式发挥功能^[12]。通过 DNAMAN 软件，将 *OfABFs* 氨基酸序列进行比对 (图 5)。结果显示：*OfABF3* 和 *OfABF4* 同源性最高，*OfABF1* 和 *OfABF6* 同源性最低；5 个 C 端均含有能被激酶识别的保守序列 RXXS/T。

对桂花 ABFs 氨基酸序列进行保守基序分析发现 (图 6)：OfABFs 蛋白结构域中含有 10 个蛋白基序 (Motif 1~Motif 10)，其中 Motif 7 在除 *OfABF4* 外的 4 个蛋白中均被鉴定到，Motif 8 在除 *OfABF6* 外的

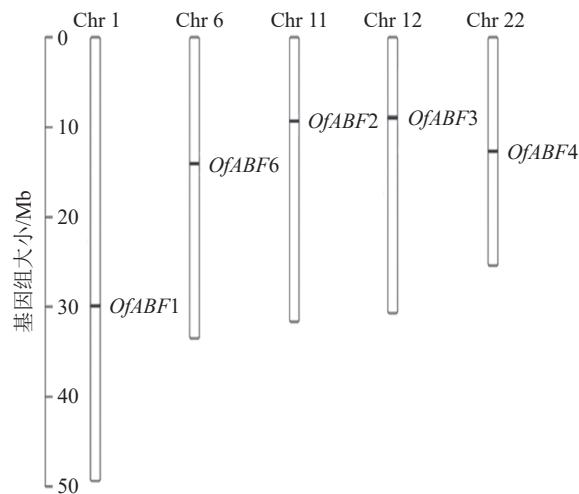


图 3 桂花 OfABFs 基因家族染色体定位分析

Figure 3 Chromosome location analysis of OfABFs genes in *O. fragrans*

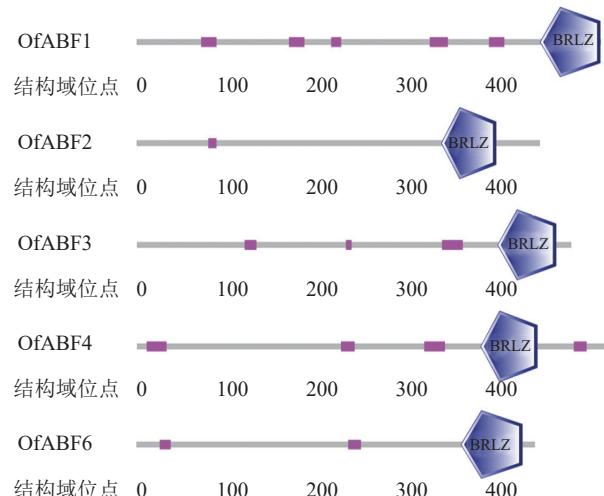
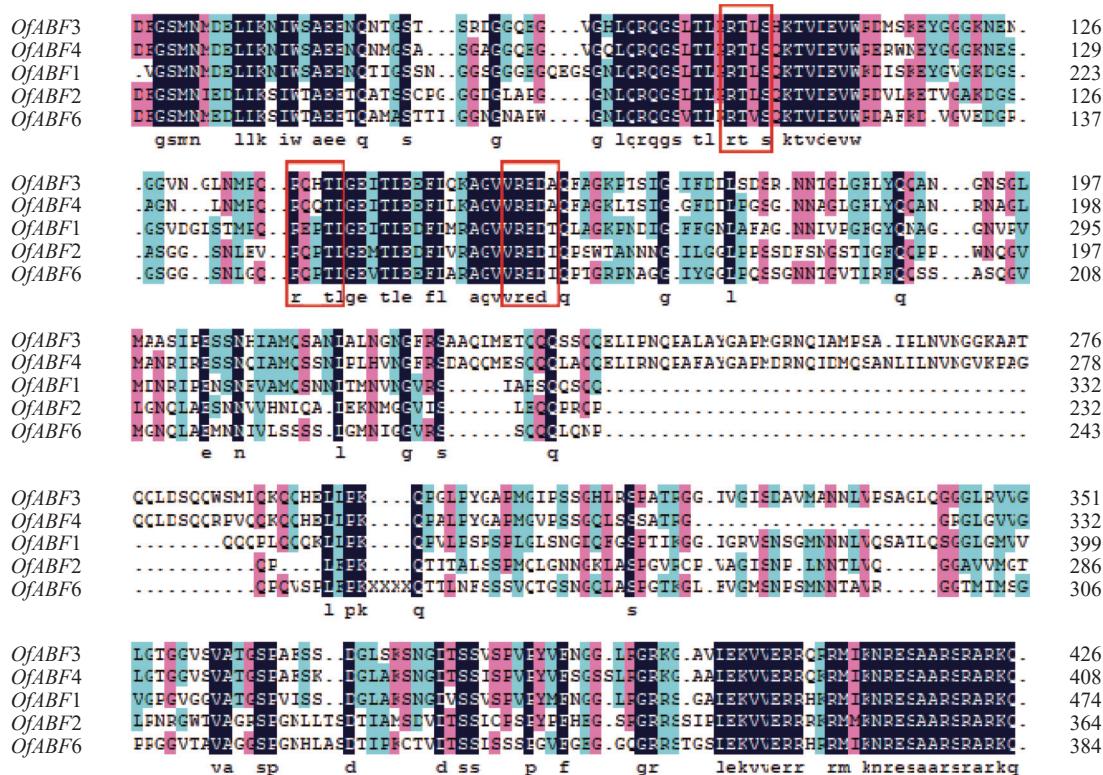


图 4 桂花 OfABFs 功能结构域分析

Figure 4 Functional domains of OfABFs in *O. fragrans*



红色方框为激酶识别位点。

图 5 桂花 OfABFs 转录因子氨基酸序列比对

Figure 5 Sequence alignment of OfABFs transcription factor in *O. fragrans*

4个蛋白中均被鉴定到，其余8个Motif高度保守，是OfABFs核心结构域的组成部分。

桂花OfABFs蛋白的二级结构预测表明：桂花OfABFs蛋白的二级结构均含有 α -螺旋、 β -折叠、延伸链、无规则卷曲，不同结构占比从大到小依次为无规则卷曲、 α -螺旋、延伸链、 β -折叠。其中， β -折叠占比最小，均在5%以下；延伸链占比为10%~13%； α -螺旋和无规则卷曲占二级结构总量的83%，为OfABFs蛋白二级结构的主要构成元件(表3)。

桂花OfABFs蛋白三级结构分析显示(图7)：OfABFs蛋白三级结构均含丰富的 α -螺旋和无规则卷曲，这与其二级结构预测结果一致。含无规则卷曲较多的蛋白稳定性要低于含 α -螺旋、 β -折叠多的蛋白，在OfABFs蛋白中无规则卷曲比例均高于50%，为不稳定蛋白，这与其理化性质分析预测结果一致(表3)。

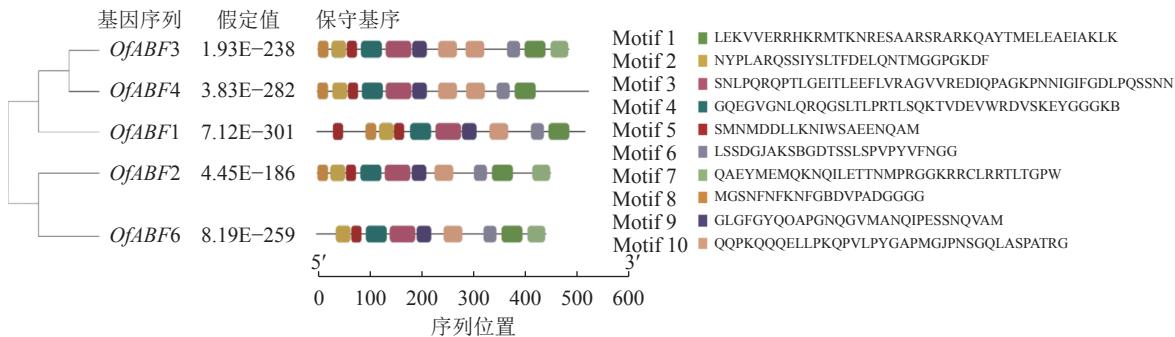


图 6 桂花 OfABFs 蛋白质保守结构域

Figure 6 Conserved motifs OfABFs proteins in *O. fragrans*

表 3 桂花 OfABFs 蛋白二级结构分析

Table 3 Secondary structure analysis of protein OfABFs in *O. fragrans*

基因名称	α -螺旋/%	β -折叠/%	延伸/%	无规则卷曲/%	基因名称	α -螺旋/%	β -折叠/%	延伸/%	无规则卷曲/%
<i>OfABF1</i>	27.80	4.05	13.32	54.83	<i>OfABF4</i>	28.49	4.78	11.85	54.88
<i>OfABF2</i>	28.67	1.78	12.22	57.33	<i>OfABF6</i>	31.67	3.17	10.86	54.30
<i>OfABF3</i>	30.99	3.10	11.16	54.75					

2.4 桂花 OfABFs 转录因子蛋白理化性质分析及亚细胞定位预测

对桂花 ABFs 家族蛋白理化性质的分析结果表明：桂花氨基酸长度为 450~523 个，相对分子质量为 25.7~56.2 kDa，理论等电点为 4.77~10.03，编码氨基酸序列最长的是 *OfABF4*，其相对分子质量最大，为 56.2 kDa；编码氨基酸序列最短的是 *OfABF2*，其相对分子质量也最小，为 25.6 kDa。5 个 *OfABFs* 基因成员的不稳定系数为 46.76~54.43。如果将不稳定系数>40 的蛋白判断为不稳定蛋白，那么 5 个基因的蛋白不稳定系数均高于 40，均为不稳定蛋白。桂花 ABFs 蛋白脂溶性系数为 65.29~78.07，亲水性总平均系数为 -0.659~ -0.482，均小于 0，为亲水性蛋白。信号肽分析结果显示：桂花 ABFs 编码蛋白均不含有信号肽，表明桂花 ABFs 家族蛋白均非分泌蛋白。亚细胞定位预测发现（表 4）：5 个编码蛋白均定位在细胞核，这与其作为转录因子的生物学功能相吻合。

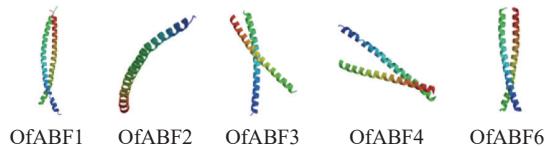


图 7 桂花 OfABFs 蛋白三级结构预测

Figure 7 Prediction of tertiary structure of the OfABFs protein in *O. fragrans*

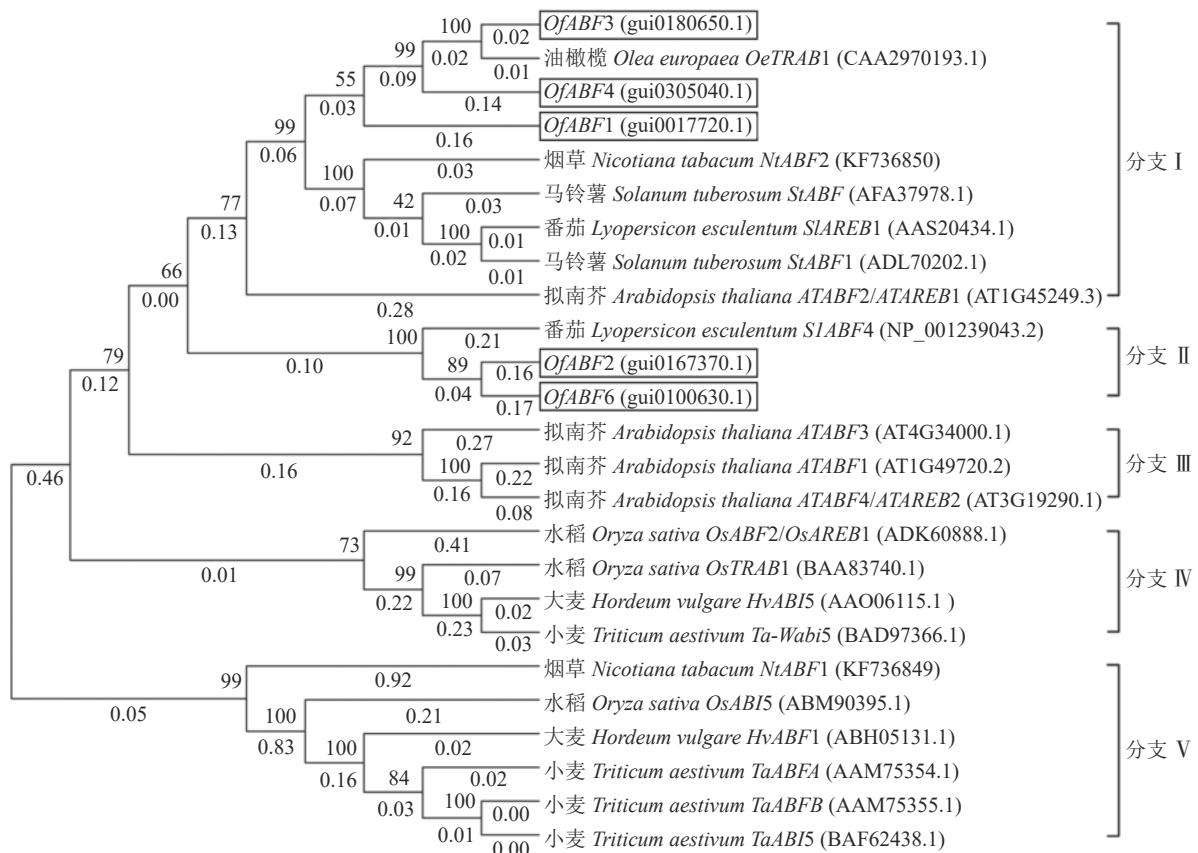
表 4 桂花 OfABFs 蛋白理化性质分析

Table 4 Physicochemical properties of OfABFs proteins of *O. fragrans*

基因名称	序列名称	氨基酸长度/个	相对分子量/kDa	等电点	酸性氨基酸/个	碱性氨基酸/个	不稳定系数	脂溶性系数	亲水性平均系数	亚细胞定位预测	信号肽
<i>OfABF1</i>	gui0017720.1	518	55.6	9.24	49	56	46.76	78.07	-0.482	细胞核	无
<i>OfABF2</i>	gui0167370.1	450	25.7	4.77	25	16	46.95	71.04	-0.536	细胞核	无
<i>OfABF3</i>	gui0180650.1	484	51.9	9.35	43	50	52.80	67.77	-0.615	细胞核	无
<i>OfABF4</i>	gui0305040.1	523	56.2	5.38	60	52	50.61	68.66	-0.659	细胞核	无
<i>OfABF6</i>	gui0100630.1	442	46.8	10.03	35	50	54.43	65.29	-0.593	细胞核	无

2.5 桂花 OfABFs 转录因子多序列比对和进化分析

构建系统进化树进一步研究 OfABFs 的进化关系，结果表明（图 8）：8 个物种的 25 条氨基酸序列可分为 5 个分支（分支 I~V），其中 OfABFs 分布在 2 个分支中。*OfABF1*、*OfABF3* 和 *OfABF4* 均分布在分支 I，该分支包括油橄榄 *OeTRAB1*、烟草 *NtABF2*、马铃薯 *Solanum tuberosum StABF*、马铃薯 *StABF1*、番茄 *SlAREB1* 和拟南芥 *AtABF2*，说明 *OfABF1*、*OfABF3* 和 *OfABF4* 在进化过程中与这些物种亲缘关系较近；*OfABF2* 和 *OfABF6* 与番茄 *SlABF4* 聚为分支 II。



横线上方整数表示新的基因复制和享有的共同祖先的生物体的歧异点数。横线下方的小数表示该节点的 bootstrap 值。

图 8 桂花 OfABFs 与各物种 ABFs 转录因子进化分析

Figure 8 Studies on the relationship between *O. fragrans* OfABFs and the evolution of ABFs transcription factors in different species

2.6 桂花 OfABFs 转录因子在不同组织和花开放时期的表达分析

利用荧光定量分析 5 个基因在根、嫩枝、老枝、新叶、老叶等不同组织中的表达情况。定量结果(图 9)显示: *OfABF1* 在花中表达量最高, 在老叶和新叶中表达没有显著差异, 在新枝和老枝中相对表达量最低; *OfABF2* 在老叶中表达最高, 其次为新叶, 在花中表达略高于枝; *OfABF3* 在叶中表达水平相对其他组织高, 在花和枝中表达较低; *OfABF4* 在花中相对表达量最高, 其次是新叶和老叶, 老枝中表达量最低, *OfABF6* 的相对表达量在花中最高, 在其他组织中的表达量均较低。*OfABF1*、*OfABF4*、*OfABF6* 在所有组织中均有表达, 但在花中的相对表达水平最高, 尤其是 *OfABF6*。

由图 10 可见: 起始 1 期(B₁)到起始 3 期(B₃)花芽芽体肥大并延伸。圆珠期(S₁)到盛开末期(S₆)为花开放时期, *OfABF1* 在顶壳期(S₂)被转录激活, 表达显著升高, 铃梗期(S₃)后表达水平虽呈下降趋势, 但仍保持较高水平; *OfABF2* 在起始 1 期(B₁)到圆珠期(S₁)时期几乎不表达, 在顶壳期(S₂)的表达量到达峰值, 且相对表达水平显著高于其他时期; *OfABF3* 和 *OfABF4* 在花朵衰老期(S₇)的相对表达量最高, 在盛开末期(S₆)的表达量其次, 圆珠期(S₁)至盛开期(S₅)表达趋势变化不显著; *OfABF6* 的相对表达量在花朵衰老期(S₇)最高。由此说明: *OfABF1* 和 *OfABF2* 可能与桂花花开放进程有关, *OfABF3*、*OfABF4* 和 *OfABF6* 可能参与桂花花衰老的调控。

3 讨论

ABF 转录因子在模式植物拟南芥、烟草以及园艺作物中的研究较多。ABFs 已在拟南芥、烟草、杨树 *Populus* 中被鉴定^[12~15]。LI 等^[16]对 29 种陆地植物中的 95 种 ABFs 蛋白长度、分子量进行分析, 发现 ABF 的氨基酸长度为 254~485 个; 分子量为 27.81~52.95 kDa。目前, 关于桂花 OfABFs 的研究较少, 通过鉴定与分析桂花 OfABF 转录因子, 可进一步了解桂花 OfABFs 的生物学功能及其表达分析。

OfABFs 蛋白的二级结构组成与烟草、睡莲、野菊 *Chrysanthemum indicum*、蓝莓 *Vaccinium*

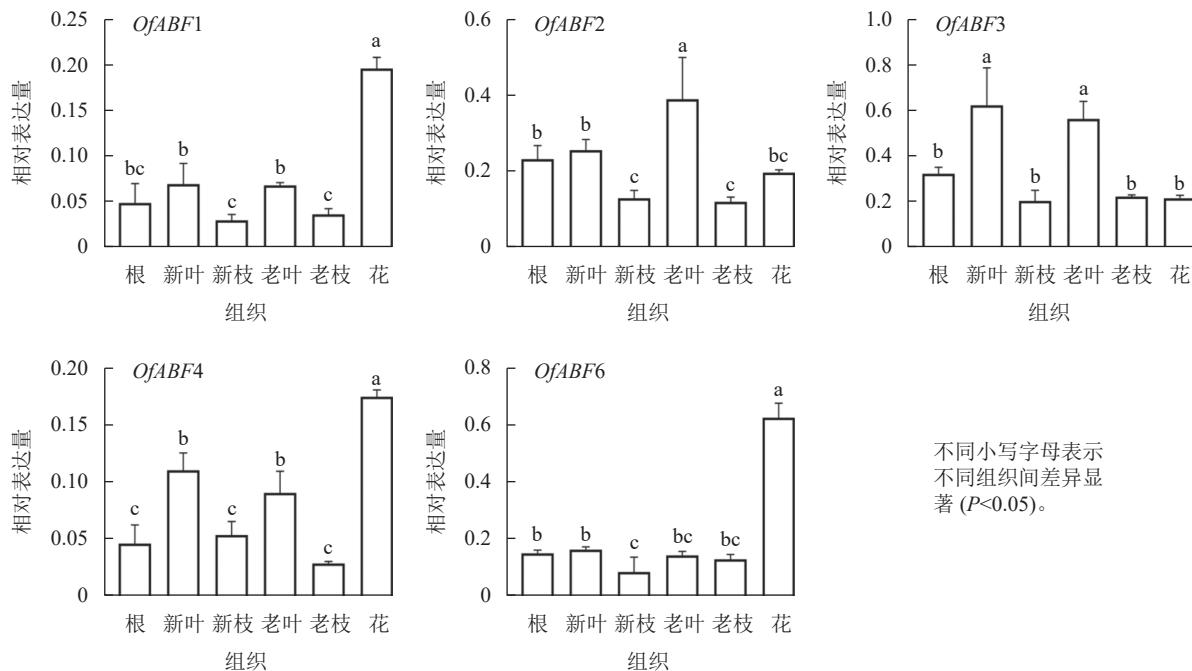


图9 5个OfABFs基因在不同组织的表达结果

Figure 9 Expression results of 5 OfABFs genes in different tissues

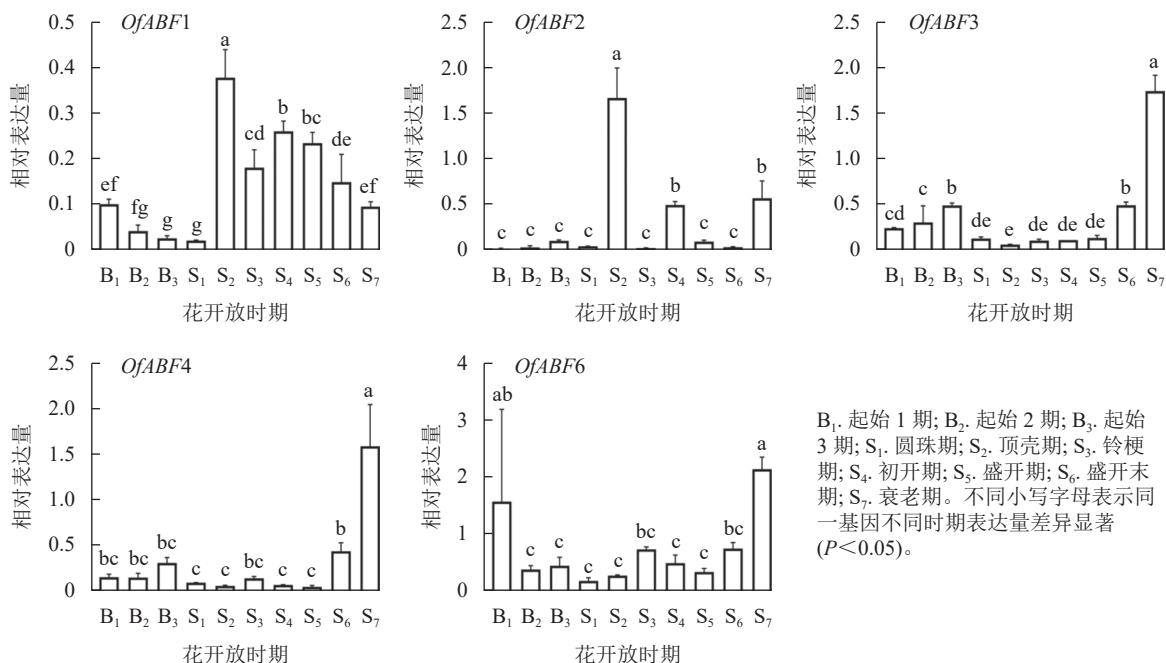


图10 5个OfABFs基因在花开放时期的表达结果

Figure 10 Express an results of 5 OfABFs genes in different flower opening periods

corymbosum、大豆 *Glycine max*^[6, 17-20] 等其他物种中的结构相类似，均以 α -螺旋和无规则卷曲为主要构成元件，少量 β -折叠和延伸链散布于整个多肽链中。说明在基因变异和进化时，虽然基因外显子的数量上发生变化，但仍具有其保守性，这与杨颖等^[2]的研究结果基本一致。基于蛋白行使特定功能依赖其三维结构，本研究使用蛋白三级结构预测软件 SWISS-MODEL 同源模拟桂花 OfABFs 蛋白三级结构，结果显示：*OfABF2* 与烟草^[15] 中的同源蛋白质 NtABF1、NtABF2 三级结构类似，除 *OfABF2* 蛋白外，其余成员蛋白三级结构在空间结构上相似度较高，进一步说明 ABF 蛋白在进化上较保守，具有对植物生长发育的重要功能。序列比对结果显示：5 个 OfABFs 的 C 端均具有 bZIP 转录因子特有的 BRLZ 结构域，且含有保守序列 RXXS/T，推测 OfABFs 转录因子可通过被磷酸化激活，从而结合下游基因启动子区域的

ABRE 元件, 调控相关下游胁迫响应基因^[20–21]。

系统发育结果显示: 桂花 ABFs 基因家族成员全部分布在以双子叶植物油橄榄、番茄、马铃薯、烟草为主的分支 I 和分支 II 中, 无家族成员分布在以单子叶植物小麦、大麦、水稻等为主的分支 III、分支 IV 和分支 V 中。由此推测, 桂花 ABFs 与双子叶植物亲缘关系较近, 与单子叶植物的亲缘关系较远。表明在进化过程中, ABF 在种属间是高度保守的。

根据亲缘关系推测桂花 OfABFs 基因功能, 如在分支 I 中, *OlfABF1*、*OlfABF3*、*OlfABF4* 与马铃薯 *StABF*、番茄 *SlAREB1*、烟草 *NtABF2*、拟南芥 *AtAREB1* 亲缘性较高。在对环境的胁迫应答过程中, 番茄 *SlAREB1* 的过表达可增加物种干旱和盐胁迫耐受性^[22], 诱导有机酸积累的变化并参与其合成的基因编码酶的表达^[23]; 烟草 *NtABF2* 与拟南芥 *AtAREB1* 响应非生物胁迫, 前者通过与胁迫响应基因启动子区的 ABRE 元件结合相关基因的转录^[16, 23–24], 后者受 ABA 含量等渗透胁迫诱导, 作为关键基因参与 ABA 信号调控通路以增强物种抗旱性^[25], 显著提高 ABA 依赖性逆境响应基因的表达水平^[25–28]; 在分支 II 中, *OlfABF2*、*OlfABF6* 与番茄 *SlABF4* 同源性较高, 且 *SlABF4* 作为 ABA 响应因子, ABA 通过其对 SICOL4 产生负调控作用, 使其与下游乙烯通路相关的基因互作^[29], 调控乙烯的合成和信号转导进而调控番茄果实的成熟进程^[29–30]。由此推测: 桂花 OfABFs 可以作为 ABA 响应因子, 参与 ABA 信号转导, 影响植物整个生长发育过程^[31]。牡丹 *Paeonia suffruticosa* 切花保鲜的研究发现: ABA 以诱导乙烯大量合成的方式间接加速牡丹切花的衰老^[32]。还有研究发现: 在月季花瓣衰老过程中内源 ABA 含量迅速上升, 促进 *RhABF2* 的表达量上调, 从而推测 *RhABF2* 在月季花瓣衰老过程中发挥调节作用^[7]。在桂花中 *OlfABF3*、*OlfABF4* 和 *OlfABF5* 的相对表达量在衰老期急剧上升, 推测在桂花花瓣衰老过程中内源 ABA 含量上升, *OlfABF3*、*OlfABF4* 和 *OlfABF5* 可能参与调节桂花花瓣的衰老。推测 OfABFs 基因响应内源 ABA, 参与桂花衰老的可能性较大。5 个 OfABFs 基因在桂花中的功能值得进一步探讨。

4 结论

以桂花品种‘堰虹桂’为材料, 在基因组数据库中筛选出相关 5 条 *OlfABFs* 基因序列。生物信息学分析得出: 桂花 ABFs 蛋白具有亲水性, 较不稳定, 无信号肽段。其蛋白二、三级结构预测具有相似特性, 无规则卷曲和 α -螺旋为其结构组成的主要元件; 5 条 *OlfABFs* 基因序列均含有 bZIP 转录因子家族保守结构域; 亚细胞定位预测表明: 5 条 OfABFs 编码蛋白均定位在细胞核。荧光定量 PCR 结果表明: *OlfABF1*、*OlfABF2*、*OlfABF3*、*OlfABF4* 和 *OlfABF6* 在桂花中的表达具有组织特异性, 其中 *OlfABF1*、*OlfABF4* 和 *OlfABF6* 在花中表达较高。*OlfABF1* 在顶壳期 (S_2) 被转录激活, 表达显著升高, 铃梗期 (S_3) 后表达水平虽呈下降趋势, 但仍保持较高水平; *OlfABF2* 在顶壳期 (S_2) 表达量达到峰值, 且相对表达水平显著高于其他时期; *OlfABF3*、*OlfABF4* 和 *OlfABF6* 在花朵衰老期 (S_7) 的相对表达量最高。推测 *OlfABF1*、*OlfABF2* 可能与桂花花开放进程有关, 而 *OlfABF3*、*OlfABF4* 和 *OlfABF6* 响应 ABA 参与调控花朵衰老的可能性较大。

5 参考文献

- [1] 刘金义. 葡萄bZIP转录因子家族的全基因组鉴定、表达分析及 *VvbZIP45/VvbZIP08*(AREB/ABF类)基因的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- LIU Jinyi. *Genome-wide Identification, Expression Analysis of bZIP Transcription Factor Family and Functional Characterization of *VvbZIP45/VvbZIP08*(AREB/ABF) Gene in Grapevine(*Vitis vinifera* spp.)* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014.
- [2] 杨颖, 高世庆, 唐益苗, 等. 植物bZIP转录因子的研究进展[J]. 麦类作物学报, 2009, 29(4): 730–737.
- YANG Yin, GAO Shiqing, TANG Yimiao, et al. Advance of bZIP transcription factors in plants [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2009, 29(4): 730–737.
- [3] 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, 47(3): 211–217.
- HONG Lan, LIU Xu, LI Ling. AREB/ABF transcription factors and their involvement in ABA signal transduction [J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(3): 211–217.

- [4] CHOI H I, HONG J H, HA J O, et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**(3): 1723 – 1730.
- [5] 刘计涛. 月季铁蛋白基因RhFer1参与花瓣失水胁迫耐性和衰老进程的功能分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
LIU Jitao. *Functional Analysis of Rh Ferritin Involved in Dehydration Tolerance and Senescence of Cut Rose Flowers* [D]. Beijing: China Agricultural University, 2018.
- [6] 叶方婷, 潘鑫峰, 毛志君, 等. 睡莲转录因子bZIP家族的分子进化以及功能分析[J]. *中国农业科学*, 2021, **54**(21): 4694 – 4708.
YE Fangting, PAN Xinfeng, MAO Zhijun, et al. Molecular evolution and function analysis of bZIP family in *Nymphaea colorata* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, **54**(21): 4694 – 4708.
- [7] XU Yanjie, ZHAO Xin, PALINUER A, et al. A zinc finger protein BBX19 interacts with ABF3 to negatively affect drought tolerance in chrysanthemum [J]. *Plant Journal*, 2020, **103**(5): 1783 – 1795.
- [8] 王英, 张超, 付建新, 等. 桂花花芽分化和花开放研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2016, **33**(2): 340 – 347.
WANG Ying, ZHANG Chao, FU Jianxin, et al. Progresses on flower bud differentiation and flower opening in *Osmanthus fragrans* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2016, **33**(2): 340 – 347.
- [9] MOU Wangshu, LI Dongdong, LUO Zisheng, et al. SIAREB1 transcriptional activation of NOR is involved in abscisic acid-modulated ethylene biosynthesis during tomato fruit ripening [J]. *Plant Science*, 2018, **276**: 239 – 249.
- [10] CHEN Chengjie, CHEN Hao, ZHANG Yi, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, **13**(8): 1194 – 1202.
- [11] 付建新, 张超, 王艺光, 等. 桂花组织基因表达中荧光定量PCR内参基因的筛选[J]. *浙江农林大学学报*, 2016, **33**(5): 727 – 733.
FU Jianxin, ZHANG Chao, WANG Yiguang, et al. Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) normalization in the gene expression of sweet osmanthus tissues [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2016, **33**(5): 727 – 733.
- [12] JAKOBY M, WEISCHAAR B, DRÖGE-LASER W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, **7**(3): 106 – 111.
- [13] JI Lexiang, WANG Jia, YE Meixia, et al. Identification and characterization of the populus AREB/ABF subfamily [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, **55**(2): 177 – 186.
- [14] FUJITA Y, YOSHIDA T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI 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.
- [15] 杨玲, 吴玉乾, 谢晓东, 等. 烟草ABF转录因子基因的克隆与生物信息学分析[J]. *烟草科技*, 2014(6): 73 – 81, 92.
YANG Ling, WU Yuqian, XIE Xiaodong, et al. Clone and bioinformatics analysis of ABF transcription factor gene from *Nicotiana tabacum* [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2014(6): 73 – 81, 92.
- [16] LI Fangfang, MEI Fangming, ZHANG Yifang, et al. Genome-wide analysis of the AREB/ABF gene lineage in land plants and functional analysis of *TaABF3* in *Arabidopsis* [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2020, **20**[2022-02-25]. doi: 10.1186/s12870-020-02783-9.
- [17] 杨玲. 烟草ABF转录因子基因的克隆及功能分析[D]. 重庆: 重庆大学, 2014.
YANG Ling. *Cloning and Functional Analysis of ABF Transcription Factor Gene in Nicotiana tabacum* [D]. Chongqing: Chongqing University, 2014.
- [18] 刘贺, 黄沁梅, 刘颖婕, 等. 野菊bZIP转录因子全基因组鉴定及生物信息学分析[J]. *分子植物育种*, 2022, **20**(14): 4586 – 4600.
LIU He, HUANG Qinmei, LIU Yingjie, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of *Chrysanthemum indicum* bZIP transcription factor family [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, **20**(14): 4586 – 4600.
- [19] 李天杰, 吴颖, 高龙飞, 等. 蓝莓ABF转录因子VcABF2基因的克隆与表达分析[J/OL]. *分子植物育种*, 2021-11-20[2022-02-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20211117.1020.004.html>.
LI Tianjie, WU Ying, GAO Longfei, et al. Cloning and expression analysis of ABF transcription factor gene *VcABF2* in blueberry [J/OL]. *Mol Plant Breed*, 2021-11-20[2022-02-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20211117.1020.004.html>.

- [20] 林延慧, 唐力琼, 徐靖, 等. 大豆响应涝害bZIP基因Glyma04g04170的生物信息学分析及互作蛋白预测[J]. 大豆科学, 2020, **39**(5): 728–731.
LIN Yanhui, TANG Liqiong, XU Jing, et al. Bioinformatics analysis and interacting protein prediction of soybean bZIP gene glyma04g04170 in response to submergence stress [J]. *Soybean Science*, 2020, **39**(5): 728–731.
- [21] 熊孟连, 戴星, 简燕, 等. 脱落酸依赖的与非依赖的信号途径的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, **39**(12): 5796–5802.
XIONG Menglian, DAI Xing, JIAN Yan, et al. Advances in the study of abscisic acid-dependent and non-dependent signaling pathways [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, **39**(12): 5796–5802.
- [22] ORELLANA S, YAÑEZ M, ESPINOZA A, et al. The transcription factor SLAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2010, **33**(12): 2191–2208.
- [23] BASTÍAS A, LÓPEZ-CLIMENT M, VALCÁRCEL M, et al. Modulation of organic acids and sugar content in tomato fruits by an abscisic acid-regulated transcription factor [J]. *Physiologia Plantarum*, 2011, **141**(3): 215–226.
- [24] 胡鹏伟, 何朝勇, 洪岚, 等. AREB/ABF转录因子响应胁迫信号的网络调控[J]. 植物生理学报, 2013, **49**(6): 540–544.
HU Pengwei, HE Chaoyong, HONG Lan, et al. Internet regulation of AREB transcription factors responded stress signal [J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, **49**(6): 540–544.
- [25] 涂明星. 葡萄转录因子VlbZIP30抗旱功能及其调控机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
TU Mingxing. *Drought Resistance Function and Regulation Mechanism Analysis of Grapevine Transcription Factor VlbZIP30 Gene*[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2021.
- [26] YANG Xiulian, YUE Yuanzheng, LI Haiyan, et al. The chromosome-level quality genome provides insights into the evolution of the biosynthesis genes for aroma compounds of *Osmanthus fragrans*[J/OL]. *Horticulture Research*, 2018, **5**: 72[2022-02-25]. doi: 10.1038/s41438-018-0108-0.
- [27] LI Qi, ZHAO Haixia, WANG Xiaoli, et al. Tartary buckwheat transcription factor FtbZIP5, regulated by FtSnRK2.6, can improve salt/drought resistance in transgenic *Arabidopsis*[J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(3): 1123[2022-02-25]. doi: 10.3390/ijms21031123.
- [28] ZHAO Biyan, HU Yufeng, LI Juanjuan, et al. BnaABF2, a bZIP transcription factor from rapeseed (*Brassica napus* L.), enhances drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J/OL]. *Botanical Studies*, 2016, **57**: 12[2022-02-25]. doi: 10.1186/s40529-016-0127-9.
- [29] MOU Wangshu, LI Dongdong, BU Jianwen, et al. Comprehensive analysis of ABA effects on ethylene biosynthesis and signaling during tomato fruit ripening[J]. *PLoS One*, 2016, **11**(4): e0154072[2022-02-25]. doi: 10.1371/journal. pone. 0154072.
- [30] 牟望舒. 脱落酸及脱落酸-乙烯互作调控番茄果实成熟的效应与机理[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
MOU Wangshu. *The Roles and Mechanism of Abscisic Acid and Abscisic Acid-ethylene Crosstalk in the Regulation of Tomato Fruit Ripening*[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [31] 魏明, 王含, 李成浩. 毛果杨PtAREB9基因启动子的克隆与功能初步分析[J]. 植物生理学报, 2015, **51**(11): 1927–1932.
WEI Ming, WANG Han, LI Chenghao, et al. Cloning and functional identification of promoter region of PtAREB9 from *Populus trichocarpa* [J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, **51**(11): 1927–1932.
- [32] 崔院院, 郭先锋, 邢树堂, 等. 脱落酸在牡丹切花衰老中的作用[J]. 中国农学通报, 2015, **31**(22): 136–141.
CUI Yuanyuan, GUO Xianfeng, XING Shutang, et al. Role of abscisic acid in senescence of tree peony cut flower [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, **31**(22): 136–141.