

党仁美, 郑文杰, 丁宁, 闻珊珊. 小麦 *TaHDA19* 基因的克隆及胁迫表达分析 [J]. 植物科学学报, 2019, 37(4): 495~502  
 Dang RM, Zheng WJ, Ding N, Wen SS. Cloning and stress expression analysis of the *TaHDA19* gene in *Triticum aestivum* [J]. Plant Science Journal, 2019, 37(4): 495~502

# 小麦 *TaHDA19* 基因的克隆及胁迫表达分析

党仁美, 郑文杰, 丁宁, 闻珊珊<sup>\*</sup>

(西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 利用基因克隆技术从小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种‘科农 199’中扩增得到一个 RPD3/HDA1 型组蛋白去乙酰化酶基因 *TaHDA19*, 采用生物信息学方法对该基因序列的结构特征进行分析, 并对植株不同组织及不同胁迫条件下该基因的表达量进行检测。结果显示: *TaHDA19* 的开放阅读框长 1560 bp, 共编码 519 个氨基酸; 该基因的氨基酸序列存在组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 家族典型的结构域 Hist-deacetyl1。该基因上游启动子区含有多种响应元件, 如: 光响应元件 I-box 和 G-box, 脱落酸响应元件 ABRE 和低温响应元件 LTR 等。‘科农 199’ *TaHDA19* 基因的表达结果表明: 该基因在根、茎、叶片和幼穗中均有表达, 其中在叶片中表达量最高; 采用脱落酸、氯化钠和 PEG 分别处理植株 0、1、3、6、12、24 h 后, 基因的表达水平出现差异; 在对植株的 12 个生育时期进行 35℃ 和 42℃ 热胁迫处理 1 h 后, 该基因表达量均出现上调。研究结果表明 *TaHDA19* 可能在小麦响应非生物胁迫过程中发挥重要作用。

**关键词:** 小麦; *TaHDA19* 基因; 生物信息学; 基因表达分析

**中图分类号:** Q943.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 2095-0837(2019)04-0495-08

**DOI:** 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.40495

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Cloning and stress expression analysis of the *TaHDA19* gene in *Triticum aestivum*

Dang Ren-Mei, Zheng Wen-Jie, Ding Ning, Wen Shan-Shan<sup>\*</sup>

(College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** A RPD3/HDA1 histone deacetylase gene *TaHDA19* was amplified from the *Triticum aestivum* variety ‘Kenong 199’ by gene cloning techniques and analyzed by bioinformatics. Results showed that gene’s open reading frame (ORF) was 1560 bp in length and encoded 519 amino acids. The amino acid sequence contained the typical domain Hist-deacetyl1. Promoter analysis showed that the gene contained a variety of response elements, such as light response elements I-box and G-box, hormone response element ABRE, and low temperature response element LTR. The gene expression pattern of ‘Kenong 199’ in different tissues and under different stress conditions was analyzed. Results showed that the gene was expressed in roots, stems, leaves, and young spikes, with the highest expression found in leaves. In addition, the gene expression levels were different under ABA, NaCl, and PEG treatment for 0, 1, 3, 6, 12, and 24 h. The gene was up-regulated in the 12 growth stages after heat-stress treatment at 35℃ and 42℃ for 1 h compared with the control.

**Key words:** *Triticum aestivum*; *TaHDA19* gene; Bioinformatics; Gene expression analysis

收稿日期: 2018-12-27, 退修日期: 2019-01-21。

基金项目: 西北农林科技大学唐仲英育种研究所项目。

This work was supported by a grant from the ‘Tang Zhongying’ Breeding Research Institute of Northwest A & F University.

作者简介: 党仁美(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为作物遗传改良与种质创新(E-mail: 1144185326@qq.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: sswen@nwsuaf.edu.cn)。

组蛋白修饰在真核生物基因调控中具有很多形式, 其中对乙酰化的研究开展较早且研究比较透彻<sup>[1]</sup>。组蛋白乙酰化是一种可逆的组蛋白翻译后修饰作用<sup>[2, 3]</sup>, 涉及组蛋白乙酰化转移酶(Histone acetyltransferase, HAT) 和组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC), 他们在染色质结构改变、基因转录的调节、DNA 的复制和修复等方面具有重要作用<sup>[4]</sup>。1996 年, 第一个组蛋白去乙酰化酶基因(HDAC1) 在人类的 T 细胞中被检测到<sup>[5]</sup>, 随后在真菌、动物和植物(如: 玉米 *Zea mays* L.、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L.、水稻 *Oryza sativa* L. 和大麦 *Hordeum vulgare* L. 等) 中均鉴定出 HDAC 基因家族的成员<sup>[6, 7]</sup>。由于与酵母 HDACs 氨基酸序列具有同源性, 植物中的组蛋白去乙酰化酶可以分为 3 个亚家族: RPD3/HDA1、HD2 和 SIR2<sup>[8]</sup>。其中, RPD3/HDA1 家族成员均有典型的 HDAC 结构域(Hist-deacetyl), 其活性的激活需要 Zn<sup>2+</sup> 的辅助<sup>[9]</sup>。有研究利用基因芯片技术, 对拟南芥中 16 个 HDACs 成员在 79 个不同组织中的表达图谱进行了分析, 发现 HDACs 几乎在所有组织中都能表达, 如: 植物的愈伤组织、营养组织、根、花和种子<sup>[10]</sup>。

在拟南芥、水稻、玉米等植物中, RPD3/HDA1 型 HDACs 参与了盐、干旱、抗冻和病原微生物等各种反应<sup>[11]</sup>。在拟南芥中, RPD3/HDA1 型乙酰化酶 *AtHDA6* 及其同源物 *AtHDA19* 参与了 ABA 调节的响应, 这是应答盐胁迫所必需的<sup>[12]</sup>。*AtHDA9* 可调节多种抗逆基因的组蛋白乙酰化水平, 且在盐和干旱胁迫中起负调控作用<sup>[13]</sup>。在水稻中, RPD3/HDA1 家族成员 *OsHDA705* 在 ABA 和非生物胁迫反应中起重要作用<sup>[14]</sup>。此外, 对花生(*Arachis hypogaea* L.) *AhHDA1* 的研究发现, 该基因编码的 RPD3/HDA1 型组蛋白去乙酰化酶对 PEG 诱导的渗透胁迫和 ABA 胁迫起上调作用<sup>[15]</sup>。

目前, 拟南芥、水稻、玉米等植物中的 RPD3/HDA1 型基因与非生物胁迫相关的研究已开展较多, 而在小麦中开展较少。Liu 等<sup>[16]</sup> 对小麦在热、干旱和干热共同胁迫下的转录表达谱进行了鉴定, 发现 RPD3/HDA1 型 HDACs 基因的表达存在差异。本研究在此基础上, 挑选了一个表达差异显著的基因(Ensembl plant 数据库登录号: TRIAE\_CS42\_U\_TGACv1\_641553\_AA2097870.1), 以基

因转化效率较高的小麦品种‘科农 199’为实验材料, 通过基因克隆技术扩增出该基因; 运用生物信息学方法, 对其序列特征、蛋白质的理化性质、保守结构域、系统进化关系及启动子顺式元件进行初步分析; 并利用实时荧光定量法, 分析了该基因在小麦不同组织(根、茎、叶、幼穗)以及不同逆境胁迫下的表达模式, 以期为深入了解 HDACs 基因在小麦逆境胁迫中的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

以小麦品种‘科农 199’为实验材料。将种子消毒后腹沟朝下置于培养皿, 放入温度为 25℃, 光照 14 h/黑暗 10 h, 相对湿度为 60% 的恒温培养箱中培养。出苗后, 一部分在恒温培养箱中继续水培; 另一部分移栽到方形小盆(基质:蛭石 = 3 : 1), 放入 4℃冰柜春化 24 d, 春化结束后再移栽到方形大盆, 放入西北农林科技大学温室中培养, 条件为: 25℃光照 14 h / 20℃黑暗 10 h。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 处理方法

参照刘燕等<sup>[17]</sup>的方法对小麦苗进行胁迫处理, 在小麦三叶期进行干旱(20% 的 PEG6000)、NaCl(200 mmol/L)、ABA(100 μmol/L) 处理, 处理时间为 0(CK)、1、3、6、12、24 h。参照田文等<sup>[18]</sup>的方法, 经春化后生长在温室的部分小麦, 分别在出苗 3 d、三叶期、分蘖期、起身期、拔节期、拔节后期、孕穗期、抽穗期、开花期、灌浆早期、灌浆期、灌浆后期, 这 12 个生长时期进行热胁迫处理。处理方法为: 将整株小麦放入恒温培养箱分别用 35℃ 和 42℃ 处理 1 h, 处理后将叶片放入液氮中, 研磨提取 RNA 后反转录成 cDNA, 保存在 -20℃ 备用。

分别剪取小麦抽穗期的根、茎、叶和幼穗组织, 放入 -80℃ 保存, 用于检测各组织的基因表达量。

#### 1.2.2 *TaHDA19* 基因的扩增

以‘科农 199’cDNA 为模板, 采用 Primers 5.0 软件设计引物(kF 和 kR)(表 1), 扩增基因 CDS 序列。扩增产物经回收、转化后送测序。测序结果利用 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 Ensembl plant (<http://plants.ensembl.org> <http://www.plantscience.cn>)。

表1 引物信息  
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	产物长度(bp) Product length
kF	ATGGACCCTCCTCGGC	1560
kR	ATCATGGCTCTGGTAGATGG	
qF	CAGCTCTGCCAGACCTACG	237
qR	AATTCCCTCAACTCCATCAC	
Actin-F	TAGATGCAGTAAAGAACCTGAC	84
Actin-R	GCGTGGAGAAGAAGGATC	

org/index.html)数据库, 进行序列验证。使用在线工具 GSDS2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>)绘制结构图。

### 1.2.3 TaHDA19基因生物信息学分析

采用 ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 在线工具分析 TaHDA19 基因编码蛋白的理化性质 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ; 利用 NLS Mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)) 在线工具预测核定位信号 (NLS); WoLF Psort ([www.genscript.com/wolf-psort.html](http://www.genscript.com/wolf-psort.html)) 进行亚细胞定位预测; 蛋白保守结构域利用在线软件 Conserved domain database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 进行预测。应用 NCBI-BlastP 在线网站获得与该基因蛋白同源的 3 个不同物种氨基酸序列, 采用 DNAMAN 8 软件进行多序列比对, 参数设为  $E < 1e-5$ 。采用 MEGA6.0 软件的邻接法 (Bootstrap = 1000), 构建系统进化树。基因上游启动子区顺式元件的分析采用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)。

### 1.2.4 TaHDA19基因的表达模式

以‘科农 199’不同组织及不同胁迫处理后植株的 cDNA 为模板, 设计该基因的 qRT-PCR 特异性引物 (qF 和 qR)(表 1), 以小麦  $\beta$ -actin 基因为内参; 使用 Roche480 荧光定量 PCR 仪 (德国), 进行 qRT-PCR 扩增。共设置 3 个生物学和 3 个技术重复, 相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算。采用 Excel 2007 软件进行数据分析及作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 目标基因获得及序列分析

通过 PCR 扩增, 本研究在约 1500 bp 处获得与预期片段大小相似的一条基因片段 (图 1: A)。

序列分析结果表明, 该基因序列全长 1560 bp, 共编码 519 个氨基酸。基因的结构图显示 (图 1: B), 该基因含有 7 个外显子和 6 个内含子, 以及长 255 bp 的 3'UTR 和 94 bp 的 5'UTR。

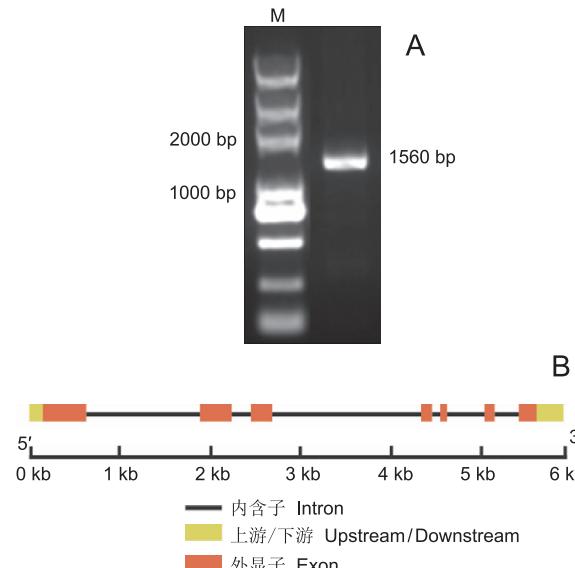


图 1 TaHDA19 的 PCR 扩增产物(A)及基因结构(B)

Fig. 1 PCR product (A) and gene structure (B) of TaHDA19

### 2.2 基因序列的生物信息学分析

#### 2.2.1 蛋白理化性质、结构域及亚细胞定位分析

蛋白理化性质分析结果表明, 该基因编码蛋白分子量为 5.81 kD, 等电点  $pI$  为 5.13, 蛋白的稳定系数为 38.40, 较为稳定; 疏水性平均系数为 -0.613, 为亲水性蛋白。保守结构域分析及细胞定位预测结果显示, 在氨基酸序列的第 42 和第 331 位间具有 1 个 HDAC 家族结构域“Hist-deacetyl1”, 9 个活性位点和 3 个  $Zn^{2+}$  结合位点, 这是调控基因转录、组蛋白发挥去乙酰化作用的重要区域和位点。在氨基酸序列的第 19 ~ 49 位有 1 个核定位信号区域, 且该蛋白被定位在细胞核中。

#### 2.2.2 同源蛋白序列比对和系统进化分析

序列比对结果显示, TaHDA19 氨基酸序列与粗山羊草 (*Aegilops tauschii* Coss.) (AethHDA19: XP\_020174442.1)、拟南芥 (AtHDA19: AT4G38130、AtHDA7: AT5G35600、AtHDA9: AT3G44680、AtHDA10: AT3G44660、AtHDA17: AT3G44490) 和大麦 (HvHDA19: BAJ88380.1) 的同源氨基酸序列相似性较高。其中, 与粗山羊草 AethHDA19 和大麦 HvHDA19 氨基酸序列的一致性为 97%; 与拟

南芥 AthHDA19 一致性为 76%。这些物种都含有 HDACs 家族的保守结构域“Hist-deacetyl1”，具有

蛋白发挥功能作用的活性位点、 $Zn^{2+}$ 结合位点及 NLS 序列(图 2)。

AetHDA19	MDFSSAGAGGNSLPSVG	[DQGQRRVCYFYDSEVGNYIYGQGHFMKBE]	RMTHSILAQCLGLDQMCAVIRFENPDRDLCR	80
HvHDA19	MEPSSAGAGGNSLPSVG	[DGQRRVCYFYDPEVGNYIYGQGHFMKBE]	RMTHSILAQCLGLDQMCAVIRFENPDRDLCR	80
TaHDA19	MDFSSAGAGGNSLPSVG	[DGQRRVCYFYDSEVGNYIYGQGHFMKBE]	RMTHSILAQCLGLDQMCAVIRFENPDRDLCR	80
AtHDA19	.....MDTGGNSLIAS.G	.....MRSDKISFYFDGVGSEVIFGPNHEPMKBE	.....RMTAHLAHMQLQHMCAVIRFENPDRDLCR	74
AtHDA9	.....	.....MAS.LIDDGGERRVSWFYEPMICGDYVYGVNCPTKEQF	.....CMTHNLILAGLHSKMEVYRHKWYPIEMAQ	62
AtHDA7	.....	.....	.....FVTIHNILSMLNRHRHEINHEDLDASDFEK	67
AtHDA10	.....	.....	.....	0
AtHDA17	.....	.....	.....	0
Consensus	.....	.....	.....	.....
AetHDA19	FHADDYISFLRSVTIETQQDQIRA...	.....LKFIVGEE.....DCPFDGILYSFQTYAGASVGGAVKLNGLDIAINWS.GGLH	.....	153
HvHDA19	FHADDYISFLRSVTIETQQDQIRA...	.....LKFIVGEE.....DCPFDGILYSFQTYAGASVGGAVKLNGLDIAINWS.GGLH	.....	153
TaHDA19	FHADDYISFLRSVTIETQQDQIRA...	.....LKFIVGEE.....DCPFDGILYSFQTYAGASVGGAVKLNGLDIAINWS.GGLH	.....	153
AtHDA19	FHADDYVSFLRSVTIETQQDQIRQ...	.....LKFIVGEE.....DCPFDGILYSFQTYAGGSVGGSVKLNGLDIAINWAGGLH	.....	148
AtHDA9	FHSPDVEELQRINPENQNLFPNE...	.....MARYNLGE.....DCPFDLFEFQLYRGGTIDAARRLNKICDIAINWAGGLH	.....	136
AtHDA7	FHSLEYINFLKSVTIETQQDQIRQ...	.....RAYAGGSISAAAKLNRPQEADIAINWAGGMH	.....	147
AtHDA10	.....	.....	.....	0
AtHDA17	.....	.....	.....	0
Consensus	.....	.....	.....	.....
AetHDA19	HAKKCEASFCVNVNIVLAILELLPHHQFVLYVDIDIHHDGVEEAFTIDTFVMIVSFHFGDY.FPGTGDVDRIGHSKG	.....	.....	232
HvHDA19	HAKKCEASFCVNVNIVLAILELLPHHQFVLYVDIDIHHDGVEEAFTIDTFVMIVSFHFGDY.FPGTGDVDRIGHSKG	.....	.....	232
TaHDA19	HAKKCEASFCVNVNIVLAILELLPHHQFVLYVDIDIHHDGVEEAFTIDTFVMIVSFHFGDY.FPGTGDVDRIGHSKG	.....	.....	232
AtHDA19	HAKKCEASFCVNVNIVLAILELLPHHQFVLYVDIDIHHDGVEEAFTIDTFVMIVSFHFGDY.FPGTGDVDRIGHSKG	.....	.....	227
AtHDA9	HAKKCDASFCVNVNIVLAILELLPHHQFVLYIDIDVHHGDVEEAFTIDTFVMIVSFHFGDY.FPGTGHIQDIFYGS	.....	.....	216
AtHDA7	FVHDKASGFGVNVNIVLAILELLPSFKFVLYIEGFPHGDEVEEAFKDIDTFVMIVSFHFGD.....IGDISDYSEGKG	.....	.....	222
AtHDA10	.....	.....	.....	0
AtHDA17	.....	.....	.....	0
Consensus	.....	.....	.....	.....
AetHDA19	KYNSLNVPIDDGIDIDEYQSLEIKPIMAKVMEVFQEGAVVIQCGADSLSGRLGDNLSI	.....FHGAECVKYMRSFNVPLLLLG	.....	312
HvHDA19	KYNSLNVPIDDGIDIDEYQSLEIKPIMAKVMEVFQEGAVVIQCGADSLSGRLGDNLSI	.....FHGAECVKYMRSFNVPLLLLG	.....	312
TaHDA19	KYNSLNVPIDDGIDIDEYQSLEIKPIMAKVMEVFQEGAVVIQCGADSLSGRLGDNLSI	.....FHGAECVKYMRSFNVPLLLLG	.....	312
AtHDA19	KYNSLNVPIDDGIDIDEYQSLEIKPIMAKVMEVFQEGAVVIQCGADSLSGRLGDNLSI	.....FHGAECVKYMRSFNVPLLLLG	.....	307
AtHDA9	KFAIAINVEIKDGIDIDESEFNRLFTIISKVVYIYEQFQAVVIQCGADSLARSGRLGDNLSI	.....FHGAECVKFMRMSFNVPLLLLG	.....	296
AtHDA7	QYNSLNAPIKDGIDIDEFSLRGLEIPVHRAIMEIYEPEVIVLQCGADSLAGPFGTENLNSI	.....FHGAECVKFMRMSFNVPLLLLG	.....	302
AtHDA10	.....	.....	.....	28
AtHDA17	.....	.....	.....	28
Consensus	.....	.....	f gh c	.....
AetHDA19	GGYTIRNVARCWCYETGVAILGQEIEDKMFVNEYYPYFGFIYTIHVAPSNMENKTRYELDNRITKLNDISKIRHAESV	.....	.....	392
HvHDA19	GGYTIRNVARCWCYETGVAILGQEIEDKMFVNEYYPYFGFIYTIHVAPSNMENKTRYELDNRITKLNDISKIRHAESV	.....	.....	392
TaHDA19	GGYTIRNVARCWCYETGVAILGQEIEDKMFVNEYYPYFGFIYTIHVAPSNMENKTRYELDNRITKLNDISKIRHAESV	.....	.....	392
AtHDA19	GGYTIRNVARCWCYETGVAILGQEIEDKMFVNEYYPYFGFIYTIHVAPSNMENKTRYELDNRITKLNDISKIRHAESV	.....	.....	387
AtHDA9	GGGYTIRNVARCVTVETIGILIDTEIPNEIPENDYIKYFAEDFSIKIPEGHHIENINTKSYISSIVQIENIRYIQHAPSV	.....	.....	376
AtHDA7	GGGYTENVARCNCYETIAANGQIDNDIPEGDYMKYKRFEDYKILHILFTNQNINTRDLIDITMRETLIAQLSIVMHAESV	.....	.....	382
AtHDA10	TGILLDTDEIPNEIP.....ENDYIKYFAEDFSIKIPEGHHIENINTKSYISSIVQIENIRYIQHAPSV	.....	.....	92
AtHDA17	GGGYTENVARCNCYETIAANGQIDNDIPEGDYMKYKRFEDYKILHILFTNQNINTRDLIDITMRETLIAQLSIVMHAESV	.....	.....	108
Consensus	g	y yf pd l	n n	1 1 hapsv
AetHDA19	QFQERPPDTEFFEPDCEBEDQEBRHDCHSDMELYHTPLIEDSARRSTIQQTRVRESAGAEETKQDGSFVTGEHRGSEP	.....	.....	472
HvHDA19	QFQERPPDTEFFEPDCEBEDQEBRHDGPDSMDEMHDYHTPLIEDSARRSTIQQTRVRESAGAEETKQDGSFVTGEHRGSEP	.....	.....	472
TaHDA19	QFQERPPDTEFFEPDCEBEDQEBRHDCHSDMELYHTPLIEDSARRSTIQQTRVRESAGAEETKQDGSFVTGEHRGSEP	.....	.....	472
AtHDA19	PFQERPPDTEFFEPDCEBEDQEBRHDCHSDMELYHTPLIEDSARRSTIQQTRVRESAGAEETKQDGSFVTGEHRGSEP	.....	.....	457
AtHDA9	QMCIVPPDIFYIIFDFDDEQNEFVFRD.QR.....	.....EVREAREVEPITKQDGLKGIMERGKGCE	.....	426
AtHDA7	PFQDTPSSQATEAAEV..DMEKRND..PRI	.....	.....	409
AtHDA10	QMCIVPPDIFYIIFDFDDEQNEFVFRD.QR.....	.....RDHQIQRDDEYFEGDNNDAS.....	.....	142
AtHDA17	QMCIVPPDIFYIIFDFDDEQNEFVFRD.QR.....	.....RDHQIQRDDEYFEGDNNDAS.....	.....	158
Consensus	q p	e	r d	.....
AetHDA19	MAEDISPSKQAHCVANAMAVDDEPGNVKTESGSSTKLFDPPAIYQK	.....	.....	518
HvHDA19	MAEDIGPSKQAH..DANAMAVDDEPGNVKTESGSSSKLFDPPAIYQK	.....	.....	517
TaHDA19	MAEDIGPSKQAHCVANAMAVDDEPGNVKTESGSSTKLFDPPAIYQK	.....	.....	518
AtHDA19	VEVDE..SGSTKV.TGVNEVGEEAVKMEEGTNKGAEQAFFPK	.....	.....	500
AtHDA9	.....	.....	.....	426
AtHDA7	.....	.....	.....	409
AtHDA10	.....	.....	.....	142
AtHDA17	.....	.....	.....	158
Consensus	.....	.....	.....	.....

横线表示保守结构域，方框为 NLS 序列，圆圈和三角形分别代表  $Zn^{2+}$  结合位点和活性位点。

Horizontal line represents conservative domain, square box represents NLS sequence, circles and triangles represent zinc ion binding sites and active sites, respectively.

图2 TaHDA19与其他物种同源氨基酸序列的比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of TaHDA19 and HDACs from other species

© Plant Science Journal <http://www.plantscience.cn>

系统进化分析结果表明, ‘科农 199’与粗山羊草和大麦处于同一分支, 说明他们的亲缘关系较近; 与双子叶植物拟南芥处于另一分支, 亲缘关系较远(图 3)。

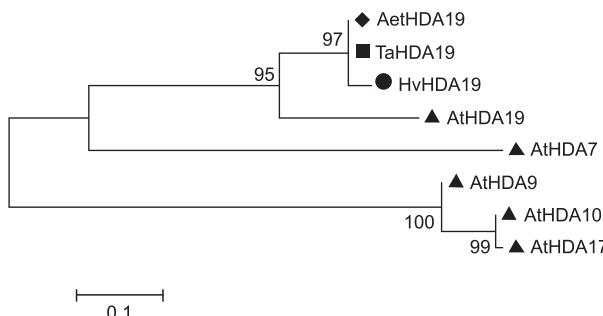


图 3 TaHDA19 蛋白序列的系统进化分析  
Fig. 3 Phylogenetic analysis of the TaHDA19 protein sequence

### 2.2.3 TaHDA19 启动子顺式作用元件分析

基因启动子顺式作用元件分析结果显示(表 2), 该基因中有功能的元件主要有光响应元件 I-box、G-box 和 GT1-motif; 激素响应元件水杨酸(TCA-element)和脱落酸(ABRE); 低温响应元件(LTR)以及参与生理周期调控顺式作用元件(Circadian)。

### 2.3 TaHDA19 基因的表达分析

#### 2.3.1 TaHDA19 在不同组织中的表达

本研究选取‘科农 199’的根、茎、叶和幼穗组织, 进行 TaHDA19 基因的表达量分析, 结果显示(图 4), TaHDA19 在所有组织均有表达, 在叶片中表达量最高, 叶片和幼穗中的表达量高于根和茎, 表明 TaHDA19 在叶片中发挥重要作用。

#### 2.3.2 TaHDA19 在不同胁迫处理下的表达

小麦在生长后期, 尤其是在灌浆期, 经常会遭受各种不良环境的影响, 如: 干旱、高温、高盐等导致其产量减少。为了探究 TaHDA19 对不同胁迫的响应情况, 本研究将苗期的植株进行干旱、盐和ABA 胁迫处理; 进一步对植株划分 12 个生育时期, 并在不同生育时期进行了 35℃ 和 42℃ 高温处理, 用于基因表达量的检测。结果显示: ABA 胁迫下(图 4: A), 基因的表达量与对照相比呈先升高后降低再升高的变化趋势, 在处理 1 h 和 24 h 后的表达量达到最高, 为对照的 1.5 倍; 在处理 3、6、12 h 后表达量与对照相比差别不明显。NaCl 处理下(图 4: B), 该基因表达量的变化与ABA 处理相似, 但在处理 6 h 时表达量低于对照。干旱胁迫下(图 4: C), 基因表达量呈先降低再升高的趋势, 在处理 3 h 时降到最低; 在 24 h 时达到最高, 为对照的 2.5 倍。以上结果说明, TaHDA19 对干旱、盐和ABA 胁迫均有响应, 表达量均在处理 24 h 后呈上升趋势, 表明该基因在植物抗逆性方面可能发挥重要作用。

此外, TaHDA19 耐热性实验结果显示(图 4: E), 在 35℃ 胁迫下, 与对照相比, 该基因的表达量除灌浆后期外, 其余时期表达量均上调。在三叶期、分蘖期、起身、拔节后期明显上升, 在起身期时达到最大值, 为对照的 4.5 倍, 开花期之后表达量逐渐下降。在 42℃ 胁迫下, 该基因表达量在拔节后期、灌浆期、灌浆后期明显上升, 在拔节后期达到最大值, 为对照的 6 倍。表明小麦在灌浆期对高温胁迫更为敏感。

表 2 TaHDA19 启动子的顺式作用元件  
Table 2 Analysis of cis-acting elements of TaHDA19 promoter

元件 Element	特征序列 Sequence	功能描述 Function description	数目 Number
ABRE	ACGTG	脱落酸反应顺式作用元件	2
ARE	AAACCA	厌氧诱导必要的顺式作用元件	2
I-box	AGATAAGG	部分光响应元件	2
G-box	TACGTG	光响应相关顺式作用元件	2
GT1-motif	GGTAA	光响应元件	1
LTR	CCGAAA	低温响应的顺式作用元件	1
MRE	AACCTAA	光响应的 MYB 结合位点	1
Circadian	CAAAGATATC	参与生理周期调控顺式作用元件	1
TCA-element	CCATCTTTT	水杨酸响应相关的顺式作用元件	1

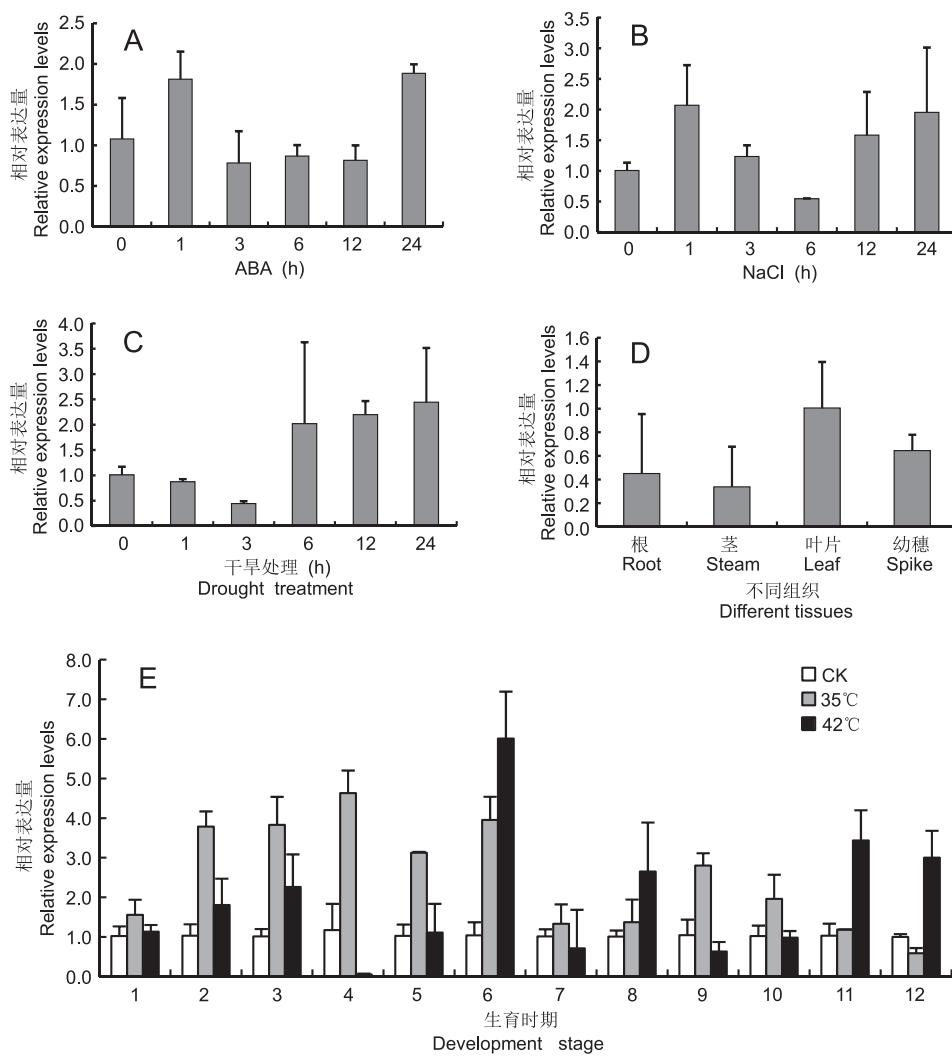


图 E 中 1 ~ 12 依次代表：出苗 3 d、三叶期、分蘖期、起身期、拔节期、拔节后期、孕穗期、抽穗期、开花期、灌浆早期、灌浆期、灌浆后期。

1 ~ 12 in Fig. E represent the 12 growth periods including 3 d emergence, trefoil stage, tillering, erecting, jointing, late jointing, booting, heading, flowering, early grain filling, filling, and late grain filling.

图 4 小麦 TaHDA19 在 ABA、盐、干旱、不同组织和高温胁迫下的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of *TaHDA19* under ABA, salt, drought, different tissues and high temperature stress in *Triticum aestivum*

### 3 讨论

小麦是我国重要的粮食作物，但在其灌浆、结实等阶段会遭受干旱、高温等不利环境的影响，因此对小麦抗逆基因的发掘和防御逆境胁迫机理的研究显得尤为重要。小麦中与胁迫相关的 DREB 和 HSP 等转录因子家族已得到广泛的研究，他们通过与基因启动子区顺式作用元件相结合来激活或抑制基因的表达<sup>[19]</sup>。Kim 等<sup>[20]</sup>的研究已经证实，*AtHDA19*可以通过与 WRKY 转录因子的相互作用调节植物的基础反应。1996 年，洛克菲勒大学

Allis 团队首先鉴定出第一个组蛋白乙酰化转移酶<sup>[21]</sup>，同时哈佛大学 Schreiber 团队也发现哺乳动物的 HDACs 具有抑制转录的作用<sup>[22]</sup>，从此对组蛋白修饰基因表达的研究迅速成为生命科学的前沿与热点之一。目前，HDACs 基因在拟南芥、水稻、玉米和大麦等植物中已有报道，证实该酶可以在植物种子的发育<sup>[23]</sup>、花的形成<sup>[24]</sup>、细胞的增殖<sup>[25]</sup>等生长发育阶段以及在干旱<sup>[26]</sup>、盐<sup>[27]</sup>等非生物胁迫中起重要的调节作用。

进化树分支节点数值的大小可以衡量物种的进化历程。本研究的系统发育分析结果表明，

*TaHDA19* 基因编码蛋白与粗山羊草(DD)和大麦氨基酸序列具有97%的相似性。普通小麦是异源六倍体(AABBDD),由乌拉尔图小麦(*T. urartu* Thum. ex Gandil., AA)、拟斯卑尔脱山羊草(*A. speloides* Tausch., BB)和粗山羊草(*A. tauschii* Coss., DD)经两次天然远缘杂交,并随着染色体加倍进化形成<sup>[28]</sup>。本研究发现小麦与粗山羊草的亲缘关系较近,映证了普通小麦的进化历程。

有关HDACs的研究在小麦中报道较少。本研究基于Liu等<sup>[16]</sup>在热胁迫下小麦品种‘中国春’的转录组数据,筛选到一个对干旱和热胁迫表达水平具有明显差异的小麦组蛋白去乙酰化酶家族基因*TaHDA19*。序列分析结果表明,该基因编码蛋白具有9处保守的组氨酸活性位点和一段核定位信号(NLS)。据报道,在HADC1中,通过突变氨基酸序列中保守的组氨酸残基可以影响其对基因去乙酰化的活性<sup>[29]</sup>,说明组氨酸在HDACs发挥调控基因功能方面具有重要作用。顺式作用元件分析结果显示,该基因含有与光信号传导有关的I-box、G-box和GT1-motif元件。有研究发现,*AthHD19*可以和一种组蛋白乙酰基转移酶GCN5拮抗调控光介导过程,表明该基因可能参与光对植物生长过程的调控<sup>[30]</sup>;而水杨酸(TCA-element)和脱落酸(ABRE)等激素响应元件,可以调节植物激素信号通路中的基因表达;此外,低温响应元件(LTR),在植物应对不良环境时发挥积极地调控作用。

据报道,*AthHD19*在拟南芥的生长发育阶段和逆境胁迫响应中表达水平显著上升,在种子萌发、抽薹抽阶段以及应对冷胁迫过程中均可诱导该基因的高表达<sup>[31]</sup>。花生幼苗干旱胁迫处理0.5 h后,其转录表达谱中有2个组蛋白去乙酰化酶基因(comp65848\_c0和comp66763\_c0)表达量明显上调<sup>[32]</sup>。本研究对*TaHDA19*基因在不同组织的表达情况分析后发现,其在植株根、茎、叶和幼穗中均有表达,在叶片中表达量最高,表明该基因在叶片发育过程中具有重要的调节功能。小麦经胁迫处理后,荧光定量实验结果表明该基因对多种逆境胁迫均有响应,但基因表达量的变化规律不一致。这表明在小麦中*TaHDA19*基因对胁迫的响应模式不一样,既可以在不同胁迫下发挥功能,又可以在同一胁迫下的不同阶段发挥功能。

本研究发现,两种热胁迫处理1 h后,与对照相比,*TaHDA19*基因表达量基本上调,但在灌浆期和灌浆后期,小麦植株经42℃处理后,叶片中基因的表达量高于35℃处理后的表达量,这表明小麦在灌浆期对高温比较敏感。另外,在小麦苗期35℃胁迫后,基因的表达量明显高于42℃,而在小麦生长后期,42℃处理后的表达量高于35℃,这一结果可能跟小麦在进化过程中不断适应环境温度的变化有关。在实际生产中,小麦生长后期可能比苗期更容易遭受高温的胁迫,这对于提高小麦的抗逆、产量增加具有重要意义。因此,在后期进行*TaHDA19*的功能验证时,需要通过小麦转基因体系内的表达来验证该基因的耐热胁迫响应,以深入了解其在小麦耐热胁迫机制中所起的作用。

## 参考文献:

- [1] Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, 51(5): 786–794.
- [2] Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription [J]. *Nature*, 2007, 447(7143): 407–412.
- [3] Waterborg JH. Plant histone acetylation: In the beginning epigenetic control of cellular and developmental processes in plants [J]. *BBA-Gene Regul Mech*, 2011, 1809(8): 353–359.
- [4] Bertos NR, Wang AH, Yang X. Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation [J]. *Biochem Cell Biol*, 2001, 79(3): 243–252.
- [5] Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3 [J]. *Science*, 1996, 272(5260): 408–411.
- [6] Gregoretti I, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis [J]. *J Mol Biol*, 2004, 338(1): 17–31.
- [7] Demetriou K, Kapazoglou A, Tondelli A, Francia E, Stanca MA, et al. Epigenetic chromatin modifiers in barley: I. Cloning, mapping and expression analysis of the plant specific HD2 family of histone deacetylases from barley, during seed development and after hormonal treatment [J]. *Physiol Plantarum*, 2010, 136(3): 358–368.
- [8] Pandey R, Müller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, et al. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among

- multicellular eukaryotes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(23): 5036–5055.
- [9] Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention [J]. *Oncogene*, 2007, 26(37): 5310–5318.
- [10] Hollender C, Liu Z. Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development [J]. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50(7): 875–885.
- [11] Ma X, Lü S, Zhang C, Yang C. Histone deacetylases and their functions in plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(4): 465–478.
- [12] Chen LT, Luo M, Wang YY, Wu K. Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase *HDA6* in ABA and salt stress response [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(12): 3345–3353.
- [13] Zheng Y, Ding Y, Sun X, Xie S, Wang D, et al. Histone deacetylase *HDA9* negatively regulates salt and drought stress responsiveness in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(6): 1703–1713.
- [14] Zhao J, Li M, Gu D, Liu X, Zhang J, et al. Involvement of rice histone deacetylase *HDA705* in seed germination and in response to ABA and abiotic stresses [J]. *Biochem Biophys Res Co*, 2016, 470(2): 439–444.
- [15] Su LC, Deng B, Liu S, Li LM, Hu B, et al. Isolation and characterization of an osmotic stress and ABA induced histone deacetylase in *Arachis hypogaea* [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6(5): 512–522.
- [16] Liu Z, Xin M, Qin J, Peng H, Ni Z, et al. Temporal transcriptome profiling reveals expression partitioning of homologous genes contributing to heat and drought acclimation in wheat (*Triticum aestivum* Linn.) [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15(1): 1–20.
- [17] 刘燕, 赵毅, 吕千, 张丽, 李立群, 李学军. 小麦 *TaHTAS-5A* 基因的克隆、表达分析及亚细胞定位 [J]. 麦类作物学报, 2018, 38(10): 1137–1145.
- Liu Y, Zhao Y, Lü Q, Zhang L, Li LQ, Li XJ, et al. Cloning, expression analysis and subcellular localization of wheat *TaHTAS-5A* gene [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38(10): 1137–1145.
- [18] 田文, 郭启平, 李梓彭, 丁宁, 张珊, 闻珊珊. 普通小麦 DREB 基因家族的全基因组鉴定及热胁迫下的表达模式分析 [J]. 麦类作物学报, 2018, 38(10): 1146–1156.
- Tian W, Guo QP, Li ZZ, Ding N, Zhang S, Wen SS. Genome-wide identification and expression analysis under heat stress of the DREB transcription factor family in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38(10): 1146–1156.
- [19] Pabo CO, Sauer RT. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition [J]. *Annu Rev Biochem*, 1992, 61(61): 1053–1095.
- [20] Kim KC, Lai Z, Fan B, Chen Z. *Arabidopsis WRKY38* and *WRKY62* transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(9): 2357–2371.
- [21] Ranalli T. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation [J]. *Cell*, 1996, 84(6): 843–851.
- [22] Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p [J]. *Science*, 1996, 272(5260): 408–411.
- [23] Wu K, Tian L, Malik K, Brown D, Miki B. Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2000, 22(1): 9–17.
- [24] Chen L, Limin H, Caiguo X, Yu Z, Dao XZ. Altered levels of histone deacetylase *OsHDT1* affect differential gene expression patterns in hybrid rice [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): 21789–21800.
- [25] Nelissen H, Fleury D, Bruno L, Robles P, de Veylder L, et al. The elongata mutants identify a functional elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(21): 7754–7759.
- [26] Sridha S, Wu K. Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2006, 46(1): 124–133.
- [27] Luo M, Wang YY, Liu X, Yang SG, Liu Q, et al. HD2C interacts with *HDA6* and is involved in ABA and salt stress response in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(8): 3297–3306.
- [28] Feldman M, Levy AA. Allopolyploidy—a shaping force in the evolution of wheat genomes [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 109(1–3): 250–258.
- [29] Hassig CA, Tong JK, Fleischer TC, Owa T, Grable PG, et al. A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7): 3519–3524.
- [30] Benhamed M, Bertrand C, Servet C, Zhou DX. *Arabidopsis* GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(11): 2893–2903.
- [31] Yu CW, Alinsug MV, Wu KQ. Phylogenetic analysis, subcellular localization, and expression patterns of RPD3/HDA1 family histone deacetylases in plants [J]. *BMC Plant Biol*, 2009, 9(1): 37–51.
- [32] Li X, Lu J, Liu S, Liu X, Lin YY, Li L. Identification of rapidly induced genes in the response of peanut (*Arachis hypogaea*) to water deficit and abscisic acid [J]. *BMC Biotechnol*, 2014, 14(1): 58–66.

(责任编辑: 周媛)