

盐碱胁迫下羊草转录因子的转录组分析

董园园¹, 李晓薇¹, 姚娜¹, 刘秀明¹, 陈欢², 李海燕^{1,2}

(1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118;

2. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘要:以羊草为试材,采用罗氏454二代测序方法,研究了羊草转录因子家族在逆境胁迫条件下来自38个家族的243个转录因子表达差异模式,以期揭示WRKY、C3HL、NAC等转录因子家族差异基因数量,探讨羊草的抗逆分子机制。结果表明:羊草转录组测序片段经de novo拼接共获得104 105条Unigene序列,对照含有97个转录因子基因,盐碱处理组含有213个转录因子,其中67个转录因子为2组共表达。差异基因表达分析揭示羊草主要通过WRKY、C3HL、NAC转录因子家族的差异表达调控盐碱适应性。该研究为耐盐碱型作物培育奠定了基础。

关键词:转录组分析;羊草;转录因子;盐碱胁迫;高通量测序

中图分类号:Q 789;S 543⁺.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)07-0115-06

羊草(*Leymus chinensis*)具有产量高、氨基酸含量高、脂肪含量高、逆境耐受能力强等特点,是多年生经济型牧草^[1]。由于羊草在盐碱、干旱、低温等逆境下的生存适应性,近年来在土地保护、生态环境保护、环境适应性等方面受到了广泛关注^[2]。针对羊

草盐碱适应性强的特点,探讨羊草盐碱适应性调控机制,对培育抗盐碱型作物及稳定生态环境具有指导意义。

转录因子在植物生长发育过程、组织分化、营养运输、代谢合成及环境应答等生命过程中起着至关重要的转录调控作用^[3-4],转录因子在细胞内通过调控基因的表达水平参与介导植物产生环境适应的多样性^[5-6]。已有大量研究数据显示,植物在盐碱、干旱、冷冻等非生物胁迫过程中,转录因子与基因上游DNA启动区的6~12个碱基的顺式作用元件结合,激发并传递细胞内信号,进而激活或抑制逆境响应基因表达^[7-8],增强植物的逆境适应性,降低植物在逆境胁迫中可能受到的威胁^[9]。因此,对转录因子种类、表达及功能的研究有助于理解植物逆境调控的分子机制。但是,植物中转录因子种类较多、数量

第一作者简介:董园园(1985-),女,博士,讲师,现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail:yydong@aliyun.com.

责任作者:李海燕(1971-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事抗逆分子生物学等研究工作。E-mail:hyli99@163.com.

基金项目:农业部转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2016ZX08010002);国家自然科学基金资助项目(31271746, 31101091, 31501366);吉林省科技厅资助项目(20140520164JH, 20150623024TC-11);吉林农业大学科研启动基金资助项目(2015018)。

收稿日期:2016-12-15

using *S-RNase* allele PCR amplification, RT-PCR and RACE technology, the *S-RNase* gene of Xinjiang wild almond was studied, in order to further study for the Xinjiang wild almond molecular mechanism of self-incompatibility. The results showed that six new self-incompatibility *S-RNase* genes were successfully cloned from the pistils of the wild almond from five natural populations different individuals sample, which were named *PtS*₁₀ (GeneBank accession number: KJ755352), *PtS*₁₁ (GeneBank accession number: KJ755353), *PtS*₁₂ (GeneBank accession number: KJ755354), *PtS*₁₃ (GeneBank accession number: KJ755355), *PtS*₁₄ (GeneBank accession number: KJ755356) and *PtS*₁₅ (GeneBank accession number: KJ755357); and the six new genes were analyzed by bioinformatics study. These studies provided basic information for the further study of molecular mechanism of self-incompatibility in Xinjiang wild almond.

Keywords: *Prunus tenella*; natural population; self-incompatibility; *S-RNase* gene; clone and identification

庞大。GEO 基因表达综合数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 目前收录了 65 个植物物种的转录因子及相关作用位点信息, 其中约 2 300 个转录因子基因信息来自于拟南芥, 占所收录转录因子信息量的 46%, 其次是水稻约占 13%。随着对转录因子研究的深入, 已知转录因子在植物逆境适应性调控中的功能越来越广泛。转录因子 ERF 是植物中一个多基因家族, LEE 等^[10] 研究发现水稻中超表达转录因子 ERF71 引起植物的干旱耐受性改变。GUO 等^[11] 研究发现桦木中转录因子 MYB46 与植物的逆境压力响应有关。WRKY 是植物中最大的转录因子家族之一, PHUKAN 等^[12] 研究发现 WRKY 具有调控转录激活和转录抑制双重作用, 结合并启动调控的靶点类型较多, 包括 MAP 激酶、14-3-3 蛋白、钙调蛋白、组蛋白脱乙酰基酶及多种逆境调控因子, 参与植物的逆境响应过程。此外, ZONG 等^[13] 研究指出 ZIP 转录因子与水稻的干旱耐受有关。但是, 转录因子基因家族数量较多, 调控功能广泛, 单一的转录因子研究难以全面和有效的挖掘转录因子家族的调控功能。

该研究拟利用盐碱胁迫下羊草转录组数据分析, 一方面通过基因组、注释及基因表达差异分析等生物信息学方法, 利用同源比对注释羊草的转录因子; 另一方面通过转录因子的差异表达, 结合羊草的脯氨酸含量和 SOD 活性变化, 揭示其在羊草逆境响应中的分子调控功能。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“吉生 4 号”羊草种子吉生羊草羊种站提供。

1.2 试验方法

种子培养 72 h 萌芽后转入 1×Hoagland 水培培养基中于人工气候室中 25℃ 条件下光培养 15 h, 23℃ 暗培养 9 h, 相对湿度 75%, 昼夜交替培养至 1 月龄, 在 1×Hoagland 培养基中添加 100 mmol·L⁻¹ NaCl/200 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ (pH 8.0), 使用该盐碱胁迫条件分别培养羊草 0、24、48、72 h。统一收取羊草新鲜叶片组织样本, 液氮冷冻后于 -80℃ 低温保存。

1.3 项目测定

1.3.1 羊草叶片生理活性指标的测定 盐碱胁迫下不同处理时间的羊草叶片组织分别使用脯氨酸及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (南京建成生物, 中国) 提取新鲜叶片总蛋白质, 根据

试剂说明书操作, UV-Vis 紫外分光光度计 (岛津, 日本) 分析样品显色反应的 OD 值。

1.3.2 总 RNA 提取、cDNA 合成及转录组测序

将不同处理羊草组织样本在液氮内充分研磨, 取 100 mg 植物材料分装于 1.5 mL 离心管内, 加入 1 mL Trizol (Invitrogen, 美国) 试剂, 涡旋震荡混匀后, 室温下静置 5 min, 再加入 200 μL 氯仿, 剧烈震荡, 4℃ 离心后取上清, 加入 500 μL 异丙醇, 离心去上清, 加入 1 mL 75% 乙醇轻轻洗涤沉淀, 4℃ 风干后用 DEPC 水溶解。Nano Drop 2000 超微量分光光度计 (赛默飞, 美国) 测定 260 nm 下总 RNA 的浓度, 2 100 电泳分析仪 (Agilent, 美国) 估测总 RNA 完整性。olyAT-tract 试剂盒 (凯捷, 德国) 分离 mRNA 后, 使用 MMLV (Takara, 日本) 逆转录酶反转录合成 cDNA 第一链, DNA 聚合酶 I (Takara, 日本) 及 RNaseH 酶催化合成 cDNA 第二链。cDNA 产物经 Reasy RNA 清试剂盒 (凯捷, 德国) 纯化。空白对照样本及 48 h 盐碱胁迫材料, 每样本取 10 μg cDNA 加测序接头进行连接反应, 使用罗氏 GS-FLX 测序仪进行转录组测序。所有操作按照说明书进行。

1.3.3 转录组测序数据分析 原始数据使用 Seqclean (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/software>) 软件及 LUGY 软件^[14] 过滤原始数据, 去除污染序列、接头序列、低质量数据后最终获得高质量序列片段数据。使用 MirnaEst 软件^[15] 将测序高质量序列片段组装成 Unigene 序列。通过 blastx 将 unigene 序列和蛋白数据库 Nr、Swiss-Prot、KEGG 及 COG 数据库中的转录因子信息进行同源比对, 参数选取为 E-value<0.000 01, 得到与提交 Unigene 具有最高序列相似性的转录因子, 得到该 Unigene 的转录因子功能注释信息。每个 Unigene 序列对应的原始测序片段比上文库中总测序片段, 按照公式计算后, 进行 Unigene 表达水平的标准化转换。差异倍数大于 2 倍或小于 1/2, 且 P<0.05 认为是差异表达基因。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 分析 随机选择差异表达的转录因子, Primer 3.0 在线软件 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 设计引物序列。反应体系使用 SYBR Premix ExTaq (Takara, 日本) 试剂盒配置, 扩增反应使用 Storage MX3000 荧光定量扩增仪 (Agilent, USA)。荧光定量反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 20 s, 40 个循环, 以 18S rRNA 为内参。

1.4 数据分析

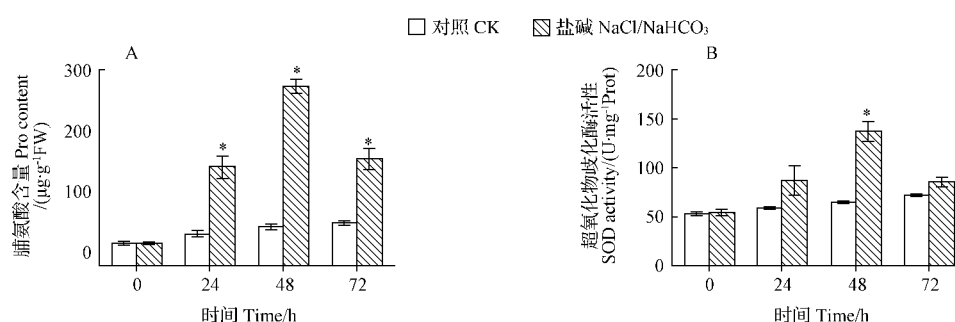
脯氨酸及 SOD 标准品显色反应,根据 OD 值绘制标准曲线并计算羊草不同处理叶片脯氨酸含量及 SOD 活性变化,生物学重复 3 次取平均值,使用 Excel 2007 软件整理数据和作图;实时荧光定量 PCR 结果根据 Ct 值,使用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达差异变化并使用 Excel 2007 软件并作图。

2 结果与分析

2.1 盐碱胁迫下羊草生理指标的变化

脯氨酸含量和 SOD 活性变化反映植物逆境胁迫下生理反应^[16-17]。由图 1 可以看出,在 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl/ $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 (pH 8.0) 胁迫处理

后,设置 24、48、72 h 时间点,羊草脯氨酸含量和 SOD 活性均呈现先升高后降低的变化趋势,与对照相比,脯氨酸平均含量在 48 h 由 $34.8\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{ FW}$ 升高到 $257.3\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{ FW}$,上升幅度达 739%,且差异显著,SOD 活性在盐碱胁迫 48 h 后与对照相比由 $51.8\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 上升到 $119.9\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$,上升幅度达 231%,上升变化差异显著。其次,脯氨酸含量和 SOD 活性在盐碱胁迫 24 h 和 72 h 后与对照比较也发生了变化,但与 48 h 时间点比较,趋势变化不明显。由脯氨酸含量和 SOD 活性的变化可以看出,羊草在盐碱胁迫后 48 h 生理活性变化较为显著,以该处理条件用于后续转录组测序研究。



注: * 表示处理与对照在 0.05 水平差异显著。

Note: * mean significant difference between treatment and control at 0.05 level.

图 1 盐碱胁迫下羊草生理活性指标变化

Fig. 1 Changes of physiological activities of *L. chinensis* under NaCl/NaHCO₃ treatment

2.2 盐碱胁迫下羊草响应转录因子的分类及表达

羊草空白对照和 $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl/ $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO_3 (pH 8.0) 48 h 盐碱处理组样品 RNA,分别经罗氏 454 转录组测序并分析,最终拼接获得 104 105 条 Unigene 序列,经过 Nr 数据库比对共注释到 243 个转录因子,隶属于 38 个转录因子家族。其中空白对照共注释到 28 个家族 97 个转录因子,盐碱处理组共注释到 31 个家族 213 个转录

因子。其中有 67 个转录因子在空白对照和盐碱处理组中均检测到表达,分别有 30 个和 146 个转录因子属空白对照和盐碱处理特异表达的转录因子(图 2)。2 个样本全部注释获得的 243 个转录因子中 138 个转录因子发生了差异表达($P < 0.05$, 倍数变化 > 2 倍),其中 87 个转录因子为上调表达,另外 51 个转录因子下调表达,表达倍数浮动变化为 13.38~−3.00 倍。最显著表达变化的 20 个上调和 20 个下调的转录因子基因参见表 1。

对差异表达的羊草转录因子进行基因注释得到表达差异上调最显著的转录因子家族分别为 WRKY 家族、C3HL 家族、TaHDZip 家族、NAC 家族、HOX 家族等。表达差异下调最显著的转录因子家族分别为 WRKY 家族、C3HL 家族、NAC 家族、HOX 家族、MYB 家族(图 3)。对比空白对照,WRKY 家族在盐碱处理组中发生显著上调的转录因子共 16 个,下调的转录因子共 12 个,是表达变化幅度最大且转录因子数量最多的一个家族。WRKY 家族、C3HL 家族、NAC 家族、MYB 家族是研究羊草

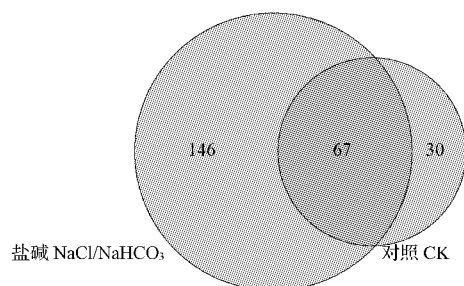


图 2 羊草转录因子对照和盐碱处理下的韦恩图分类

Fig. 2 Venn diagram of *L. chinensis* under control and NaCl/NaHCO₃ treatment

表 1 羊草转录因子家族表达差异显著性

Table 1 Annotation of transcription factor differently expressed in *L. chinensis* transcriptome

基因号	基因长度	表达差异	表达类型	P 值	转录因子家族
Gene ID	Length/bp	Fold change	Expressed type	P value	Transcription factor
GW_rep_c96824	479	13.38	up	0.000 593 22	C3HL
GW_rep_c16839	1 647	13.30	up	0.000 593 89	NAC
GW_rep_c57879	568	13.30	up	0.000 593 89	DRFL1b
GW_rep_c13208	815	13.27	up	0.000 594 31	TaHDZip
GW_rep_c56264	496	13.10	up	0.000 595 00	C3HL
GW_rep_c63146	761	13.06	up	0.000 597 93	TaHDZip
GW_rep_c8104	660	13.03	up	0.000 626 02	AP2
GW_rep_c69963	483	13.03	up	0.000 626 02	C3HL
GW_rep_c55318	434	12.38	up	0.000 646 34	C3HL
GW_rep_c59071	648	12.38	up	0.000 646 34	乙烯应答因子
GW_rep_c74383	707	12.38	up	0.000 646 34	zipper protein HOX
GW_rep_c97715	449	12.32	up	0.000 679 12	AP2
GW_rep_c80530	1 073	12.30	up	0.000 679 12	WRKY
GW_rep_c59654	461	12.21	up	7.55E-05	C3HL
GW_rep_c69398	691	12.15	up	9.24E-06	C3HL
GW_rep_c71157	463	11.92	up	0.000 731 93	C3HL
GW_rep_c57416	745	11.78	up	0.000 816 86	DRFL1b
GW_rep_c18371	600	11.78	up	0.000 816 86	MADS-box
GW_rep_c85882	861	11.69	up	0.000 953 20	NAC
GW_rep_c11216	828	11.69	up	0.000 953 20	NAC
GW_rep_c17134	801	-3.00	down	0.003 657 74	MADS-box
GW_rep_c66216	471	-3.00	down	0.003 657 74	MYB
GW_rep_c28206	810	-3.00	down	0.003 657 74	MYB
GW_rep_c21871	803	-3.00	down	0.003 657 74	NAC
GW_rep_c13035	565	-3.00	down	0.003 657 74	NAC
GW_c20025	563	-2.94	down	4.84E-07	PHD finger
GW_c19080	517	-2.94	down	4.84E-07	类转录因子
GW_rep_c54544	802	-2.91	down	5.95E-05	zipper protein HOX
GW_rep_c56067	651	-2.91	down	5.95E-05	AP3
GW_rep_c32097	885	-2.91	down	5.95E-05	WRKY
GW_rep_c81929	355	-2.81	down	0.000 131 60	WRKY
GW_rep_c85758	565	-2.81	down	0.000 131 60	WRKY
GW_c12702	596	-2.81	down	0.000 131 60	WRKY
GW_rep_c17466	1 802	-2.81	down	0.000 131 60	AP4
GW_rep_c71496	531	-2.81	down	0.000 131 60	C3HL
GW_c40903	693	-2.81	down	0.000 131 60	X1
GW_rep_c76913	786	-2.81	down	0.000 131 60	zipper protein HOX
GW_rep_c7366	740	-2.81	down	0.000 131 60	S-II
GW_rep_c10406	744	-2.71	down	0.008 203 42	WRKY
GW_c8057	1 695	-2.71	down	0.008 203 42	WRKY

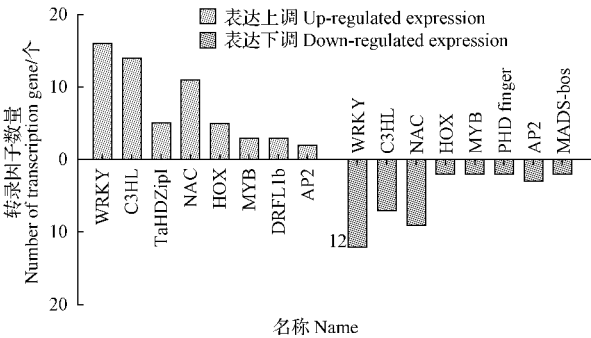


图 3 差异表达的转录因子家族名称及基因数量

Fig. 3 Different expressed transcription family name and gene numbers

盐碱胁迫响应机制中调控基因功能最广,参与代谢通路调控最多的转录因子家族。

2.3 盐碱胁迫下羊草定量 PCR

在 WRKY、C3HL、NAC 转录因子家族中随机选择差异表达变化的 12 个转录因子,利用荧光定量 PCR 方法进行空白样本和盐碱处理样本组织的差异表达分析验证,设定泛素蛋白连接酶 UBC 为内参基因,引物序列见表 2。图 4 结果表明,转录因子表达差异变化与转录组测序结果的差异变化不吻合,但表达趋势变化趋于一致,统计相关性系数 R^2 为 0.956 5,说明了转录组数据结果中表达差异分析的可信度。

表 2

荧光定量引物序列

Table 2

Primer sequences of validated genes

基因 Gene ID	转录因子家族 Transcription factor family	正向引物(5'-3') Forward primer	反向引物(5'-3') Reverse primer
GW_rep_c59654	C3HL	GCGTGTCTCAAGATCTTCTCTC	TGACAACAAACCATGGCTCG
GW_rep_c69398	C3HL	GGCGTCTCAAGATCTTCTCTC	CCACTACTGGCACCCTACA
GW_rep_c85882	NAC	ATGGTACTTCTTCTCCCCGC	CTGTGTCATGATCCAGTTGG
GW_rep_c11216	NAC	CTCTAGGGCTCTCACCCTG	ACTACCCCTCCGTTCTCTACT
GW_rep_c78444	WRKY	TGCCCTGTCAAGAAGAAGGT	TTGATGGAGAAGGAGCACG
GW_rep_c59533	WRKY	GGACACACTAGCTACGGGAG	ACGGGGTTACTACAAGTGCA
GW_rep_c50431	WRKY	GACATGTGTAGCTCGGCTG	CTCCTGTCTCTTTCTTCTGC
GW_rep_c26094	WRKY	TTGAGTACTACTGTGCTCCCG	TGGACGCCTAACAGAAGTCC
GW_rep_c21871	NAC	TGACGACAACCTCCACCTCA	CAGTGATGTCATGGTCTG
GW_rep_c13035	NAC	ACAGGGAGATCTTCAAGCCC	TTGAACACCTTGCACACCAC
GW_rep_c96693	C3HL	GCGTGTCTCAAGATCTTCTCTC	CGATTACACCGAGGACCAGA
GW_rep_c83991	C3HL	CATCAGCAGCCTCCCTATCA	ATGCTTCAGGAGGTCAAGAA
UBC		GGGAAAGGATTACAGATTGA	CTCAATCTCGTGTGGCTGAA

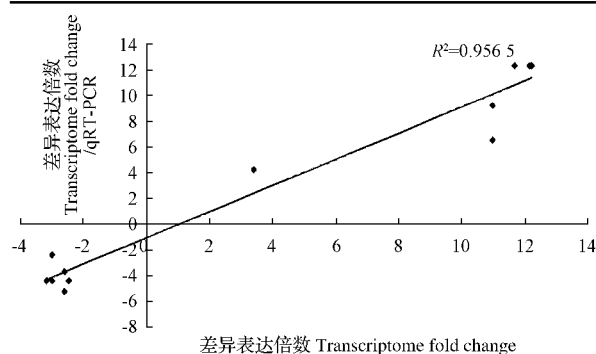


图 4 差异表达转录因子的 qRT-PCR 验证

Fig. 4 Validation of different expressed transcription factors by qRT-PCR

3 讨论

羊草在盐碱胁迫条件下,叶片中的脯氨酸含量和 SOD 活性随着胁迫时间的延长出现了先升高后降低的趋势,并且在 48 h 内出现峰值,推测羊草可能是通过调节脯氨酸含量和 SOD 活性的变化来提高对盐碱逆境的适应性^[18]。为研究羊草植物盐碱逆境胁迫的适应性和分子调控机制,该研究借助高通量测序技术挖掘羊草盐碱胁迫中差异变化的转录因子。大规模的转录组测序方法可以有效挖掘数量庞大的转录因子种类及表达变化。但是羊草属于非模式植物,不同于拟南芥、水稻、玉米、烟草等基因组已知物种,因此对转录因子的组装及注释的准确度要求更高,该研究使用的罗氏 454 GS-FLX 转录组测序方法能够提供较长的片段读长^[19],利于未知基因的组装拼接及注释,为羊草逆境胁迫分子机制的研究提供了有效方法和技术支持。研究基于转录因子的注释与表达分析,发现了大量表达上调及表达下调的转录因子家族,推测其表达差异与羊草的逆境适

应性相关。该研究发现 WRKY 转录因子家族是羊草逆境胁迫过程中表达差异变化和数量变化最多的转录因子家族之一,GUO 等^[20]、YU 等^[21]研究报道 WRKY 参与盐胁迫、干旱及水分刺激应答^[22]。该研究中,WRKY 是羊草盐碱胁迫适应性调控中的关键因子,调节基因表达水平及转录活性,推测可能调控 SOD 等氧化还原酶基因的转录表达。此外,AP2 是转录因子家族家族成员较多,在羊草的盐碱胁迫中出现不同倍数的上调和表达下调,PARK 等^[23]研究指出 AP2/DREB 转录因子家族与植物花期调节、干旱等逆境胁迫有关,暗示了 AP2 类转录因子在羊草盐碱胁迫响应中可能发挥的调控作用。C3HL、MYB 转录因子家族还参与了植物的组织分化及次生代谢合成调控过程,参与的分子功能较为广泛,推测与脯氨酸类渗透物质的合成调控有关。关于上述研究中差异表达显著的转录因子在羊草中的调控作用及靶向 DNA 转录调控区还有待进一步深入研究。

4 结论

该研究结果表明,在 100 mmol · L⁻¹ NaCl/200 mmol · L⁻¹ NaHCO₃ 盐碱处理羊草 48 h 条件下,羊草脯氨酸含量和 SOD 活性变化最明显,并经转录组测序获得 104 105 条转录组序列,使用 BLASTX 软件比对 Nr 数据库,鉴定到来自 38 个转录因子家族的 243 个转录因子。通过转录因子注释及基因表达差异分析获得了 WRKY、C3HL、MYB 等转录因子家族整体数量及表达变化差异显著,揭示在羊草叶片的盐碱胁迫调控中,WRKY、C3HL、MYB 转录因子家族的差异表达介导了羊草的盐碱胁迫适应性这一分子过程。

参考文献

- [1] 蔺吉祥,张兆军,李晓宇,等. 羊草早期幼苗在盐碱生境下生长与生理适应性的研究[J]. 中国草地学报,2011,33(6):64-69.
- [2] LIN J, WANG Y, QI M, et al. Optimum harvest maturity for *Leymus chinensis* seed[J]. Biol Open, 2016(5):720-725.
- [3] FARQUHARSON K L. A Domain in the bHLH transcription factor DYT1 is critical for anther development[J]. Plant Cell, 2016(28): 997-998.
- [4] ZHANG C, LIU J, ZHAO T, et al. A drought-inducible transcription factor delays reproductive timing in rice[J]. Plant Physiol, 2016, 171:334-343.
- [5] SHAN C M, SHANGGUAN X X, ZHAO B, et al. Control of cotton fibre elongation by a homeodomain transcription factor GhHOX3 [J]. Nat Commun, 2014(5):5519.
- [6] SAGAR R C, THORNTON M, HERD A, et al. Transvaginal repair of recurrent pouch-vaginal fistula[J]. Colorectal Dis, 2014(16): 440-442.
- [7] FRANCO-ZORRILLA J M, SOLANO R. Identification of plant transcription factor target sequences[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860:21-30.
- [8] HAN X, KUMAR D, CHEN H, et al. Transcription factor-mediated cell-to-cell signalling in plants[J]. J Exp Bot, 2014, 65:1737-1749.
- [9] MARINO D, FROIDURE S, CANONNE J, et al. Arabidopsis ubiquitin ligase MIEL1 mediates degradation of the transcription factor MYB30 weakening plant defence[J]. Nat Commun, 2013(4):1476.
- [10] LEE D K, JUNG H, JANG G, et al. Overexpression of the OsERF71 transcription factor alters rice root structure and drought resistance[J]. Plant Physiol, 2016, 172:575-588.
- [11] GUO H, WANG Y, WANG L, et al. Expression of the MYB transcription factor gene *BplMYB46* affects abiotic stress tolerance and secondary cell wall deposition in betula platyphylla[J]. Plant Biotechnol J, 2016(6):1-15.
- [12] PHUKAN U J, JEENA G S, SHUKLA R K. WRKY transcription factors; molecular regulation and stress responses in plants[J]. Front Plant Sci, 2016(7):760.
- [13] ZONG W, TANG N, YANG J, et al. Feedback regulation of ABA signaling and biosynthesis by a bZIP transcription factor targets drought resistance related genes[J]. Plant Physiol, 2016, 171:2810-2825.
- [14] LI S, CHOU H H. LUCY2: an interactive DNA sequence quality trimming and vector removal tool[J]. Bioinformatics, 2004(20): 2865-2866.
- [15] CHEVREUX B, PFISTERER T, DRESCHER B, et al. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs[J]. Genome Res, 2004(14): 1147-1159.
- [16] 耶兴元, 何晖, 张燕, 等. 脯氨酸对高温胁迫下猕猴桃苗抗热性相关生理指标的影响[J]. 山东农业科学, 2010(5): 44-46.
- [17] 邓荏明, 熊格生, 袁小玲, 等. 棉花不同耐高温品系的 SOD, POD, CAT 活性和 MDA 含量差异及其对盛花期高温胁迫的响应[J]. 棉花学报, 2010(22): 242-247.
- [18] 乔枫, 耿贵工, 陈志. 混合盐碱处理下蚕豆叶片生理指标的变化[J]. 干旱地区农业研究, 2013, 31(3): 162-165.
- [19] ALAGNA F, D'AGOSTINO N, TORCHIA L, et al. Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development[J]. BMC Genomics, 2009(10):399.
- [20] GUO S, ZHENG Y, JOUNG J G, et al. Transcriptome sequencing and comparative analysis of cucumber flowers with different sex types[J]. BMC Genomics, 2010(11):384.
- [21] YU Y, WANG N, HU R, et al. Genome-wide identification of soybean WRKY transcription factors in response to salt stress[J]. Springerplus, 2016(5):920.
- [22] DIAS L P, de OLIVEIRA - BUSATTO L A, BODANESE - ZANETTINI M H. The differential expression of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) WRKY genes in response to water deficit[J]. Plant Physiol Biochem, 2016, 107:288-300.
- [23] PARK C S, GO Y S, SUH M C. Cuticular wax biosynthesis is positively regulated by WRINKLED4, an AP2/ERF-type transcription factor, in *Arabidopsis* stems[J]. Plant J, 2016, 88(2):257-270.

Transcription Factor Identification and Analysis in *Leymus chinensis* TranscriptomeDONG Yuanyuan¹, LI Xiaowei¹, YAO Na¹, LIU Xiuming¹, CHEN Huan², LI Haiyan^{1,2}

(1. Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel. plays an important role in protection of natural environment, Roche-454 massive parallel pyrosequencing technology was employed to identify transcription factor, and gene expression in the saline-alkaline stress response of *L. chinensis*. The results indicated that a total of 104 105 Unigenes were obtained. 243 transcription factors belong to 38 transcription factor family were obtained by BLASTx according to Nr database. Among them, 97 TFs were obtained in control sample, 213 TFs were obtained in saline-alkaline stress sample and 67 TFs were co-expressed in both samples. Compared with control, 138 TFs were differently expressed. Data analysis revealed that different expressed WRKY, C3HL, NAC induced saline-alkali response in leaves of *L. chinensis*. The basis for further exploring molecular response mechanism to saline-alkali stress in *Leymus chinensis* was established.

Keywords: transcriptome; *Leymus chinensis*; transcription factor; saline-alkaline stress; high-sequencing