

核桃 TT1 类转录因子的筛选及干旱响应分析

王 艺¹, 张尚昆¹, 赵 翔¹, 刘玉梅¹, 赵焕元¹, 杨桂燕^{1,2}, 马凯恒^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学 林学院 山阳核桃板栗试验示范站,陕西 杨陵 712100;

2. 西北农林科技大学 林学院 陕西省经济植物资源开发利用重点实验室,陕西 杨陵 712100)

摘要: TT1 基因(*transparent testa 1*)在植物逆境响应中有重要作用。核桃是重要的经济树种,其产量和质量均受环境影响。为进一步探索核桃(*Juglans regia*)抗逆机制,以‘香玲’核桃为试验材料,克隆获得核桃 *JrTT1* 基因,并进行基因表达和生物信息学分析,预测该基因的基本生物功能。结果表明, *JrTT1-1*、*JrTT1-2*、*JrTT1-3* 基因的开放阅读框(OFR)分别为 1 014、1 023、1 029 bp,蛋白分子量分别为 37 763.51、38 492.94、38 136.36 u,含有氨基酸数分别为 337、340、342,理论等电点分别为 7.88、7.19、8.89。与其他物种的同源 TT1 蛋白具有较近的进化关系。且其上游 1 200 bp 启动子中含有多种与干旱逆境响应相关的顺式作用元件。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)发现, *JrTT1-1*、*JrTT1-2*、*JrTT1-3* 基因在 PEG₆₀₀₀ 胁迫下能不同程度地被诱导表达,且在叶和根中的表达趋势不同。表明 *JrTT1* 基因可以响应干旱胁迫诱导,并具有组织表达特异性,推测其在核桃逆境响应中具有一定作用。

关键词:核桃; TT1 基因; 基因表达; 干旱胁迫

中图分类号:S664.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2020)01-0086-08

Identification and Expression of the TT1-like Transcription Factor from *Juglans regia* under Drought Stress

WANG Yi¹, ZHANG Shang-kun¹, ZHAO Xiang¹, LIU Yu-mei¹, ZHAO Huan-yuan¹,
YANG Gui-yan^{1,2}, MA Kai-heng^{1,2*}

(1. Walnut and Chestnut Experimental Station of Shanyang, College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100,

Shaanxi, China; 2. Key Laboratory of Economic Plant Resources Development and Utilization in Shaanxi Province,

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

Abstract: The TT1 gene (*transparent testa 1*) plays an important role in plant stress response. *Juglans regia* is an important economic tree species, and its yield and quality are seriously affected by the environment. In order to further explore the stress resistance mechanism of *J. regia*, a walnut cultivar ‘Xiangling’ was used as experimental material and *JrTT1* gene was identified from walnut transcriptome, then the gene expression and bioinformatics analysis were carried out to predict the basic biological function. The results showed that the open reading frames (OFR) of *JrTT1-1*, *JrTT1-2* and *JrTT1-3* genes were 1 014, 1 023 and 1 029 bp; the molecular weights of the proteins were 37 763.51, 38 492.94 and 38 136.36 u; the amino acids were 337, 340 and 342; the theoretical isoelectric point were 7.88, 7.19, 8.89, respectively. *JrTT1-1*, *JrTT1-2* and *JrTT1-3* shared close evolutionary relationship with the homologous TT1 protein of other species. The upstream 1 200 bp promoter of *JrTT1-1*, *JrTT1-2* and *JrTT1-3* contained a variety of cis-

收稿日期:2019-03-02 修回日期:2019-05-28

基金项目:国家自然科学基金(31800510);中国博士后科学基金特别资助项目(2017T100782);大学生创新创业训练计划项目(201803072)。

作者简介:王 艺,女,本科,研究方向:野生植物资源利用、林产化工。E-mail:Nonowangyi@163.com

* 通信作者:马凯恒,女,硕士,实验师,研究方向:林木遗传育种。E-mail:makaiheng@163.com

acting elements associated with drought stress response. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) showed that *JrTT1-1*, *JrTT1-2* and *JrTT1-3* could be induced to different degrees under PEG₆₀₀₀ stress, and the expression trends in the leaves and roots were different. It indicated that *JrTT1* gene could be induced in response to drought stress and had tissue expression specificity, which was predicted to play a role in walnut stress response.

Key words: *Juglans regia*; TT1 gene; gene expression; drought stress

原花青素(proanthocyanidin, PA)是种皮色素的主要成分,它通过类黄酮-原花青素途径合成,具有抗氧化、抵御紫外线伤害等生理功能^[1]。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,PA合成与聚合的任意一步因突变被阻碍后,种皮均会从野生型的深褐色变为透明种皮(transparent testa, tt)^[2]。目前,拟南芥的TT基因均已被克隆,包括TT1、TT2、TT3、TT4、TT5、TT6、TT7、TT8、TT10、TT16、TT18、TTG1、TTG2和BAN;其中TT1是C2H2-ZFP(WIP型锌指结构)类型的转录因子调控蛋白^[3-6]。M. Sagasser等^[7]证实拟南芥TT1是植物PA积累的调控基因,调控内种皮的细胞分化和PA积累。J. Lian等^[8]研究表明油菜(*Brassica napus*)BnTT1与黄酮类生物合成及种子脂肪酸组成相关。随着研究的深入,发现TT类基因也与逆境响应相关,如,莲花(*Lotus japonicus*)TT2转录因子能与TT8、TTG1等互作抵制环境胁迫^[9]。低温胁迫下,油菜素类固醇增强型表达基因BEE1与G2-类黄酮调节因子GFR通过抑制MYB-bHLH-WD40(MBW)复合物的组成原件TT8、光滑因子GL3和(或)MYB的表达来负调控花青素积累^[10]。欧洲油菜TTG2可通过抑制植物生长素合成基因的表达增强植株对盐胁迫的敏感性^[11]。可见,对植株TT类基因进行抗逆响应机制分析,具有较好的研究潜力。

核桃(*Juglans regia*)是我国经济林产业的支柱之一,分布广泛,但同其他植株一样,其产量和质量受外界环境因子的影响较大^[12]。近年来,全球气候变化剧烈,极端天气等环境因子严重制约了核桃的生长及产量^[13]。目前,国内外学者对核桃的研究主要集中在核桃果实品质分析、品种选育等方面,对其科学管理则有所欠缺^[14]。核桃科学管理是促进核桃产业体质增效的有效保障,其基础是对核桃逆境适应机制的把握,而至此,有关核桃适应机制的研究报道较少,对核桃如何响应逆境的机理还不明确,特别是有关逆境响应的基因资源挖掘匮乏,导致无法有效掌握核桃的逆境适应分子机制^[12-14]。因此,筛选鉴定核桃的逆境响应相关基因,有利于为充分了解核桃的逆境适应机制打下基础,进而促进核桃的科学管理,推进核桃产业的有效发展。从核桃中

克隆获得若干TT1基因(命名为*JrTT1*),通过分析启动子预测其功能,分析在逆境下的表达水平,推测其干旱响应的潜力,为核桃抗旱响应研究提供候选基因。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

2018年6月选取培养于温室(温度22℃~24℃,光照14/10 h,湿度65%~75%)的2年生‘香玲’核桃田间嫁接苗(接穗和砧木均为‘香玲’,植株高约80 cm)用作研究材料。植株种植于花盆(25 cm×25 cm),处理时放置于托盘中,用20%PEG₆₀₀₀浇灌根部(浇灌后处理液流至托盘中保持植株处于处理状态)进行处理,每托盘使用2.5 L处理液;处理0、3、6、12、24、72、120 h分别混合收集叶和根用液氮速冻后于-80℃冰箱保存备用。0 h为对照。每个处理重复3次,每次重复包括6棵植株。

1.2 JrTT1基因的筛选鉴定

以“TRANSPARENT TESTA 1”(简写为TT1)为关键词在‘香玲’核桃转录组(数据未发表)的‘unigene.blast.cds.fasta’文件里直接查找序列,获得4条TT1基因。用ORF finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)确定TT1基因开放读码框(ORF),有3条具有完整ORF,选择这3条基因进行后续分析,命名为*JrTT1-1*、*JrTT1-2*、*JrTT1-3*。利用Expasy ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对确认的*JrTT1-1*、*JrTT1-2*、*JrTT1-3*基因序列特征进行分析。用CDD(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测其保守结构域。利用BLASTP(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行序列同源性搜索;利用Clustal 3.0软件对不同物种的TT1蛋白进行多序列比对和进化分析。利用Expasy中Swiss Model程序同源建模,推测该蛋白的三维结构模型。

1.3 JrTT1基因启动子及其元件分析

在NCBI数据库中基于*JrTT1-1*、*JrTT1-2*、*JrTT1-3*序列筛选鉴定其上游启动子。选取基因序列起始密码子上游1 200 bp的DNA序列作为基

表 1 研究所用引物

Table 1 The primers used in the current study

引物名称	正向引物	反向引物
18S rRNA	5'-GGTCAATCTTCTCGTCCCTT-3'	5'-TCGCATTTCGCTACGTTCTT-3'
JrTT1-1-DL	5'-GATCCTCCATTCAAAGAGT-3'	5'-AGAGATCAACATAGAGCC-3'
JrTT1-2-DL	5'-AGCTGGACAGATCAGAAG-3'	5'-GGATCCAGTACTGTCCT-3'
JrTT1-3-DL	5'-CGTTGATCAGGAGATCAC-3'	GCAAGCGACGTTGAAGCT-3'

因启动子,使用 PLACE (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=newplace>) 分析启动子中含有的顺式作用元件,并进行分类。总结相同元件及逆境响应相关元件。

1.4 JrTT1 基因的表达分析

各处理时间点的根或叶样品的总 RNA 采用 CTAB 方法提取^[12-13],并经 DNA 消化酶处理后采用 PrimeScriptTM RT reagent Kit(CWBIO, 康为世纪,中国)反转录为 cDNA,稀释 10 倍后用作实时荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR)的模板。18S rRNA (HE574850) 为内参基因^[12-13]。qRT-PCR 使用 SYBR Green Real time PCR Master mix(CWBIO) 进行。JrTT1 定量引物为 DL-F 和 DL-R(表 1)。定量反应仪器为 Applied Biosystems 生产的 Step OneTM Real-Time PCR System。反应程序为:94℃ 预变性 30 s;94℃ 变性 12 s,60℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 45 s,45 个循环;81℃ 读板 1 s,每个样品重复 3 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对定量结果进行相对分析^[15],所有表达值均做了以 2 为底的对数(log2)转化。所有

数据使用 SPSS 软件分析。样品变异性使用标准偏差表示,不同处理时间点之间的差异用 Tukey 进行多重比较,显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 JrTT1 基因全长 cDNA 序列分析

通过查找核桃转录组获得 4 条 TT1 基因,根据 ORF 分析发现其中 3 条具有完整 ORF,JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3。其 ORF 分别长 1 014、1 023、1 029 bp,拟推导的蛋白分子量分别为 37 763.51、38 492.94、38 136.36 u,含有氨基酸数分别为 337、340、342,理论等电点分别为 7.88、7.19、8.89。保守结构域预测发现 3 个 TT1 基因均含有 2 个 C2H2-Zn finger 结构域(图 1)。经 NCBI 同源搜索获得相似蛋白,并进行进化分析,发现 JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3 与其他物种的同源 TT1 蛋白具有较近的进化关系(图 2)。多序列比对发现 JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3 具有较高的相似性(图 3)。通过 Swiss Model 同源建模,推测的 JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3 蛋白三维结构(图 4)。

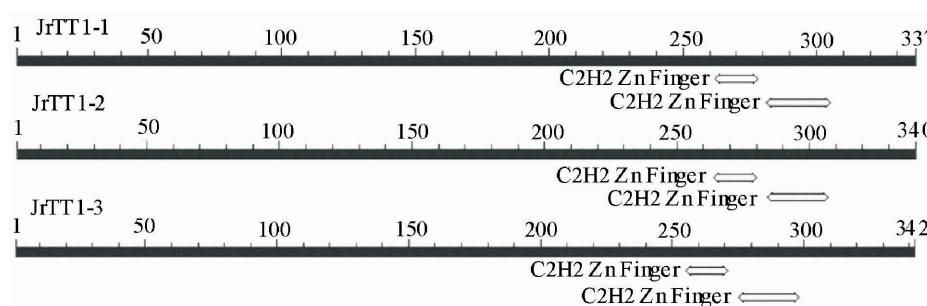


图 1 JrTT1 蛋白的保守结构域分布

Fig. 1 The distribution of the conserved domain of JrTT1 proteins

2.2 JrTT1 基因启动子分析

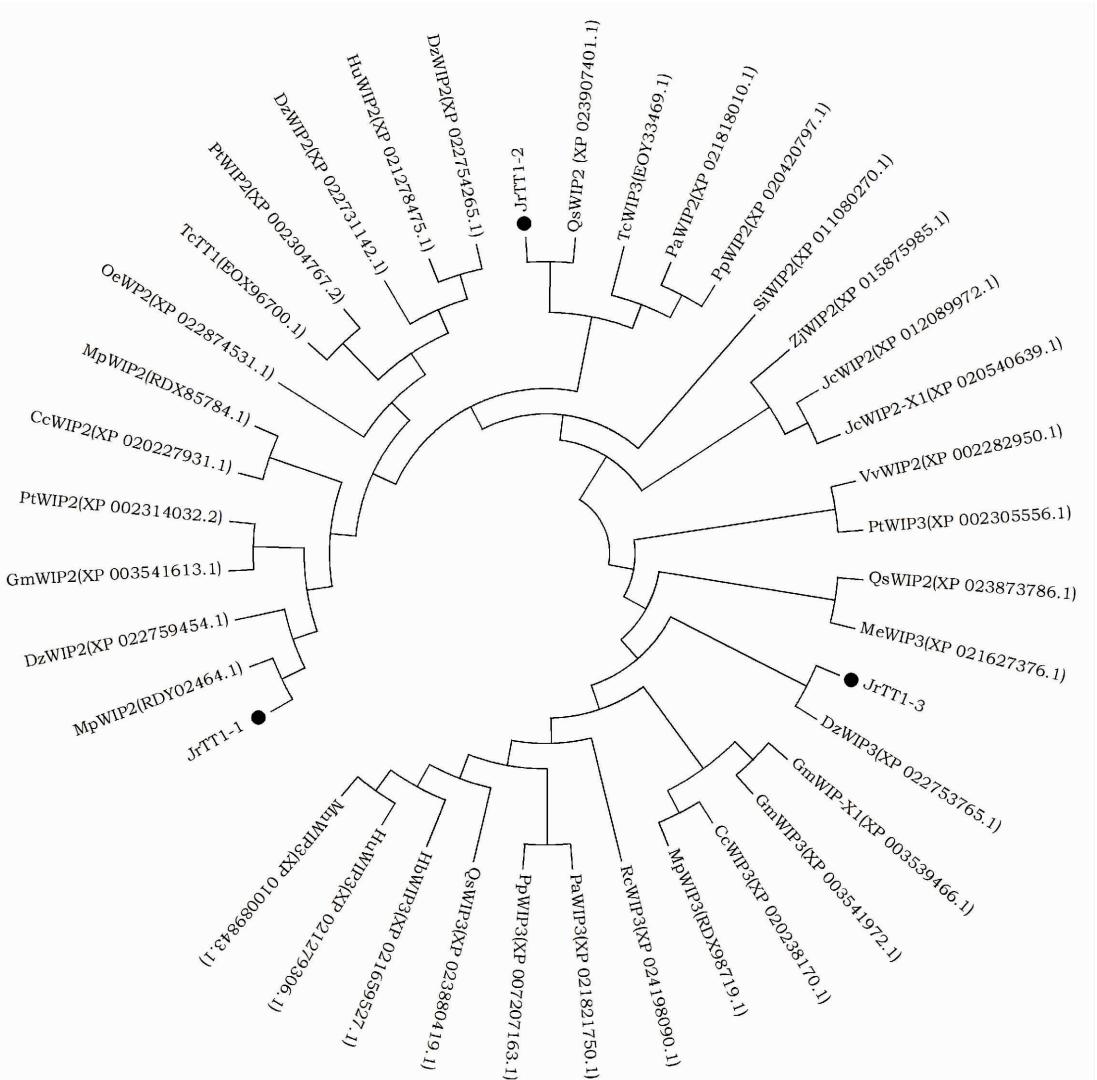
以 JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3 基因在 NCBI 数据库中的核桃基因组进行同源搜索,发现其分别与 XR_001997888.1、XM_018951920.1、XM_018958308.1 一致。使用 PLACE 分析这些基因启动子的顺式作用元件,发现 JrTT1 启动子包含多个与干旱响应及相关的顺式作用元件,如 DRE、CBF、ABRE、WRKY、MYB、MYC 等(表 2)。

2.3 JrTT1 基因响应干旱胁迫的表达

qRT-PCR 结果显示,JrTT1 基因能被 PEG₆₀₀₀ 胁迫明显诱导,且在多数时间点下表达差异显著(图 5)。在根中,与对照组相比,JrTT1-1 基因表达量随时间的延长呈“V”型变化,在胁迫 120 h(5.37) 表达量达到最高水平,12 h(1.41) 表达量最低;JrTT1-2 基因的表达量随时间延长呈直线增长,在 120 h(4.73) 增长至最高表达量;不同的是,JrTT1-

3基因的表达量随时间变化呈“倒V”型,在24 h(3.56)达到最高。在叶中,JrTT1-1基因表达量在前6 h呈上升趋势,并在6 h(6.20)达到最大,随后变为直线下降趋势;JrTT1-2基因在胁迫时间为

24 h(5.71)表达量达到最高,整体表达情况呈“倒V”趋势,最低点在3 h处;JrTT1-3基因与前两者相比有不同的表达特点,表达趋势呈“V”型,在胁迫3 h处最大,24 h(0.92)最低。



Jr:核桃(*Juglans regia*) ;Dz:榴莲(*Durio zibethinus*) ;Gm:大豆(*Glycine max*) ;Pt:毛果杨(*Populus trichocarpa*) ;Cc:木豆(*Cajanus cajan*) ;Mp:藜豆(*Mucuna pruriens*) ;Oe:橄榄(*Olea europaea* var. *sylvestris*) ;Tc:可可(*Theobroma cacao*) ;Hu:黑毛黄耆(*Herrania umbratrica*) ;Qs:栎(*Quercus suber*) ;Pa:李(*Prunus avium*) ;Pp:桃(*P. persica*) ;Si:胡麻(*Sesamum indicum*) ;Zj:枣(*Ziziphus jujuba*) ;Jc:麻风树(*Jatropha curcas*) ;Vv:葡萄(*Vitis vinifera*) ;Me:木薯(*Manihot esculenta*) ;Rc:蓖麻(*Ricinus communis*) ;Hb:橡胶(*Hevea brasiliensis*) ;Mn:桑树(*Morus notabilis*)。

图2 JrTT1与其他物种相似蛋白的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of JrTT1 and other species-like proteins

3 结论与讨论

3.1 结论

核桃TT1类基因JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3的上游1 200 bp启动子序列中包含丰富的与逆境响应相关的顺式作用元件,如ABRE、CBF、DRE、MYB等,这可有效的预知JrTT1与逆境响应相关。在不同时间的干旱处理后,JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3基因在核桃的根和叶中均能被不同程度

的诱导表达,表明JrTT1对干旱胁迫具有积极响应,并具有时序性。同时,JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3基因在根和叶中的表达模式具有区别,表明JrTT1响应干旱胁迫具有组织特异性。3个基因在根和叶及不同时间点的表达水平也具有差异,表明不同的JrTT1响应干旱胁迫的能力具有差异性。根据这些结果可推测JrTT1基因可作为核桃干旱胁迫响应的重要候选基因。

表 2 JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3 启动子中的干旱响应相关顺式作用元件
Table 2 The drought response related cis-elements in JrTT1-1, JrTT1-2, JrTT1-3 promoter

顺式作用元件	起点方向/bp			序列	特性
	JrTT1-1	JrTT1-2	JrTT1-3		
ABRELATERD1	585(—)	385(+)		ACGTG	ABRE/ABA 相关
ABREMOTIFAOSO-SEM		384(+)		TACGTGTC	
CBFHV	624(—)	201(+)	904(+)	RYCGAC	DREB/干旱响应
DRE2COREZMRAB17	624(—)		904(+)	ACCGAC	DREB/干旱响应
DRECRTCOREAT	624(—)	201(+)	904(+)	RCCGAC	
	21(+)/222(+)/ 77(+)/90(—)/108	285(+)/353(+)/ (—)/152(—)/215	66(+)/81(+)/132 (+)/213(+)/227		
	(+)/344(+)/393	369(—)/473(—)/ (+)/344(+)/393	(+)/462(—)/468		
	(—)/530(—)/573	479(—)/494(—)/ (—)/530(—)/573	(—)/498(—)/505		
	(+)/726(—)/774	577(—)/594(—)/ (+)/726(—)/774	(—)/815(—)/835		
DOFCOREZM	(—)/791(—)/809	617(—)/666(—)/ (—)/791(—)/809	(+)/842(+)/852	AAAG	Dof 识别/逆境响应 相关
	(—)/816(—)/852	702(—)/708(—)/ (—)/816(—)/852	(+)/856(+)/860		
	(—)/865(—)/872	785(—)/809(—)/ (—)/865(—)/872	(+)/864(+)/881		
	(—)/879(—)/975	818(—)/838(—)/ (—)/879(—)/975	(+)/891(+)/910		
	(—)/995(—)	855(—)/895(+)/ (—)/995(—)	(—)/934(—)/945		
		909(—)/915(—)/ 919(—)/974(+)	(+)		
MYB2AT		128(—)		TAACTG	MYB 识别/逆境响 应相关
MYB1AT			897(+)/916(+)	WAACCA	
MYB2CONSENSUSAT	610(+)/739(+)	128(—)/534(—)	398(—)	YAACKG	
MYBCORE	610(—)/626(+)/ 739(—)	128(+)/534(+)	398(+)	CNGTTR	
MYBCOREATCYCB1	740(+)	650(—)	249(+)/256(—)/ 375(+)/398(—)	AACGG	
MYBPLANT	627(—)		898(+)	MACCWAMC	
MYBPZM	627(—)	235(—)		CCWACC	
MYCATERD1	139(+)			CATGTG	MYC 识别/干旱等 逆境响应相关
MYCATRD22	139(—)			CACATG	S000407
	139(—)/139(+)/ 234(—)/234(+)/ 565(—)/565(+)/ 610(—)/610(+)/ 619(—)/619(+)	26(—)/26(+)/226 (—)/226(+)/534 (—)/534(+)/745 (—)/745(+)/773 (—)/773(+)/887 (—)/887(+)	86(—)/86(+)/483 (—)/483(+)/522 (—)/522(+)/755 (—)/755(+)/962 (—)/962(+)	CANNTG	
MYCCONSENSUSAT	221(+)/223(—)/ 225(+)/227(—)	301(—)/303(+)/ 305(—)/513(—)	/	CATGCA	ABRE/ABA 相关
RYREPEATBNNAPA	221(+)/222(—)/ 225(+)/226(—)	300(—)/303(+)/ 304(—)	/	CATGCAT	
RYREPEATGMGY2	221(+)/222(—)/ 225(+)/226(—)	300(—)/303(+)/ 304(—)	/	CATGCAY	
RYREPEATLEGUMIN-BOX	221(+)/222(—)/ 225(+)/226(—)	300(—)/303(+)/ 304(—)	/	CATGCATG	
RYREPEATVFLEB4	221(—)/221(+)/ 225(—)/225(+)	303(—)/303(+)	/	CATGCATG	
WBOXATNPR1	28(—)/555(+)/ 848(+)	/	478(+)/534(—)	TTGAC	WRKY 识别/PR 响 应/逆境响应
	136(—)/286(+)/ 349(—)/354(+)/ 759(+)/849(+)	312(+)/733(—)	777(—)	TGACT	
WBOXHVIS01	758(+)	196(—)/311(+)	/	CTGACY	
WBOXNTCHN48	136(—)/286(+)/ 349(—)/354(+)/ 759(+)/849(+)	196(—)/312(+)/ 567(—)/733(—)	479(+)/777(—)	TGACY	
WBOXNTERF3	28(—)/137(—)/ 232(—)/286(+)/ 350(—)/354(+)/ 556(+)/759(+)/ 849(+)	197(—)/312(+)/ 568(—)/734(—)	111(—)/152(+)/ 479(+)/534(—)/ 778(—)/807(—)	TGAC	
WRKY71OS					

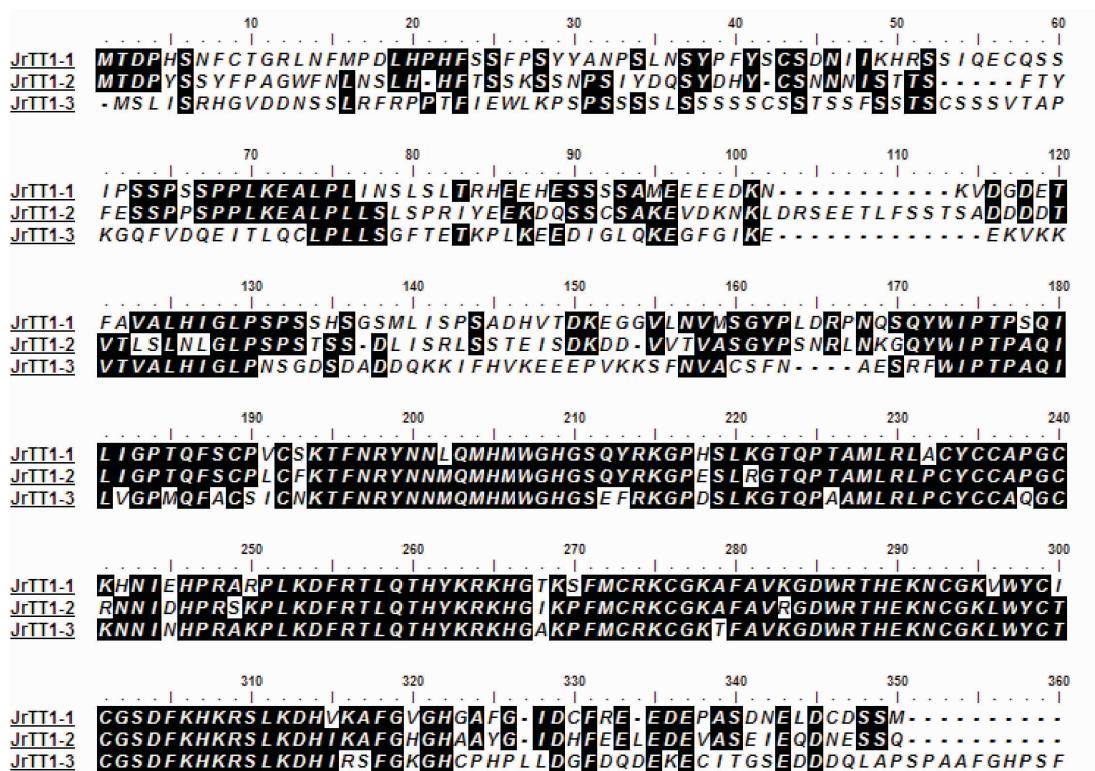


图3 JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3的多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of JrTT1-1, JrTT1-2, JrTT1-3

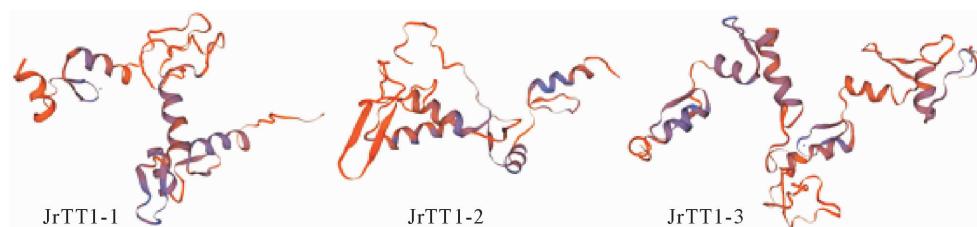


图4 JrTT1-1、JrTT1-2、JrTT1-3蛋白三维结构预测模型

Fig. 4 Three-dimensional structure prediction models of JrTT1-1, JrTT1-2, JrTT1-3 Protein

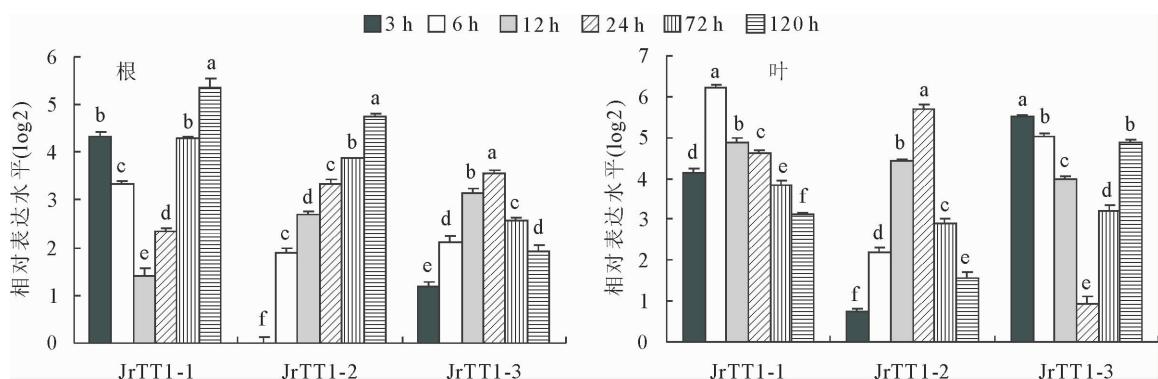
注:小写字母为方差分析两两比较结果($P < 0.05$)。

图5 JrTT1基因在干旱胁迫下的表达水平(相对表达值表示为相对于内参基因相对于0 h的表达值)

Fig. 5 The transcription of JrTT1s exposed to drought, relative expression values are expressed relative to the expression value of the internal reference gene and relative to 0 h

3.2 讨论

核桃从‘香玲’核桃中克隆获得3条TT1基因，

经进化分析发现其与榴莲、大豆、毛果杨、木薯等的WIP家族基因具有较近的亲缘关系。分析启动子

顺式作用元件能有效预测基因功能及其可能调控机制^[14]。于是对 *JrTT1-1*、*JrTT1-2*、*JrTT1-3* 启动子进行分析,发现它们除了含有 DRE、CBF 干旱响应元件外,还含有大量其他逆境响应相关的元件,如 ABRE 识别的 RYREPEATBNNAPA、RYREPEATGMGY2、RYREPEATLEGUMINBOX、RYREPEATVFLEB4, Dof 识别的 DOFCOREZM 元件, MYB 识别的 MYBCORE、MYB2CONSENSUSAT、MYBCOREATCYCB1, MYC 识别的 MYC CONSENSUSAT, WRKY 识别的 WBOXHVISO1、WBOXNTERF3、WRKY71OS(表 2)。研究表明,ABRE、Dof、MYB、MYC、WRKY 等转录因子均具有调控干旱响应的潜力^[16-20]。因此可预测 *JrTT1-1*、*JrTT1-2*、*JrTT1-3* 可能通过启动子调控响应干旱胁迫。

进而对 *JrTT1-1*、*JrTT1-2*、*JrTT1-3* 在干旱胁迫下的表达水平进行分析,发现 3 个基因都能被干旱处理不同程度的诱导,且体现了根和叶的表达差异性(图 5)。这与其他诸多的抗旱响应基因具有相似性。如核桃 *JrWRKY2*、*JrWRKY7* 等基因在干旱胁迫后的不同时间点具有不同的诱导表达,在根和叶中的表达模式不同;且进一步证实 *JrWRKY2*、*JrWRKY7* 能改善干旱胁迫下的植株的抗逆能力^[14]。核桃 *JrGSTTau1* 能响应干旱胁迫,转基因拟南芥相对 WT 其抗旱性得到改善,且这种干旱受上游调控因子 *JrDREB2A*、*JrMYC2*、*JrMYB44*、*JrDof1* 和 *JrWRKY7* 调控^[12]。核桃 *JrVHAG1* 基因在干旱胁迫下的表达也体现了时间和组织特异性^[21]。因此,可以推测 *JrTT1* 具有调控干旱胁迫响应的潜力,*JrTT1* 可以作为核桃抗逆机制研究、逆境适应机制分析的重要候选基因。

参考文献:

- [1] 马丽娟,冯瑜,江丽萍,等. pFGC5941 的改造及芸薹属透明种皮 1 基因(TT1)家族 RNA 干扰载体构建[J]. 农业生物技术学报,2010,18(6):1189-1196.
MA L J, FENG Y, JIANG L P, et al. Modification of pFGC5941 and construction of RNAi vector of *Brassica* transparent testa 1 gene (TT1) family[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2010, 18(6): 1189-1196. (In Chinese)
- [2] MISYURA M, COLASANTI J, ROTHSTEIN S. J. Physiological and genetic analysis of *Arabidopsis thaliana* anthocyanin biosynthesis mutants under chronic adverse environmental conditions[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(1): 229-240.
- [3] DEBEAUJON I, LEON-KLOOSTERZIEL K M, KOORNNEEF M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2000, 122(2): 403-414.
- [4] POURCEL L, ROUTABOUL J M, CHEYNIER V, et al. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(1): 29-36.
- [5] WINKEL-SHIRLEY B. FLAVONOID BIOSYNTHESIS. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology [J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 485-93.
- [6] APPELHAGEN I, LU G H, HUEP G, et al. Transparent testa1 interacts with R2R3-MYB factors and affects early and late steps of flavonoid biosynthesis in the endothelium of *Arabidopsis thaliana* seeds[J]. The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology, 2011, 67(3): 406-19.
- [7] SAGASSER M, LU G H, HAHLBROCK K, et al. *A. thaliana* TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins[J]. Genes & Development, 2002, 16(1): 138-49.
- [8] LIAN J, LU X, YIN N, et al. Silencing of BnTT1 family genes affects seed flavonoid biosynthesis and alters seed fatty acid composition in *Brassica napus*[J]. Plant Science, 2017, 254: 32-47.
- [9] YOSHIDA K, IWASAKA R, KANEKO T, et al. Functional differentiation of *Lotus japonicus* TT2s, R2R3-MYB transcription factors comprising a multigene family[J]. Plant & Cell Physiology, 2008, 49(2): 157-69.
- [10] PETRIDIS A, DOLL S, NICHELMANN L, et al. *Arabidopsis thaliana* G2-LIKE FLAVONOID REGULATOR and BRASSINOSTEROID ENHANCED EXPRESSION1 are low-temperature regulators of flavonoid accumulation[J]. The New Phytologist, 2016, 211(3): 912-25.
- [11] LI Q, YIN M, LI Y, et al. Expression of *Brassica napus* TTG2, a regulator of trichome development, increases plant sensitivity to salt stress by suppressing the expression of auxin biosynthesis genes[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(19): 5821-5836.
- [12] YANG G, CHEN S, LI D, et al. Multiple transcriptional regulation of walnut *JrGSTTau1* gene in response to osmotic stress[J]. Physiologia Plantarum, 2018.
- [13] YANG G, XU Z, PENG S, et al. In planta characterization of a tau class glutathione S-transferase gene from *Juglans regia* (*JrGSTTau1*) involved in chilling tolerance[J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(3): 681-692.
- [14] YANG G, ZHANG W, LIU Z, et al. Both *JrWRKY2* and *JrWRKY7* of *Juglans regia* mediate responses to abiotic stresses and abscisic acid through formation of homodimers and interaction[J]. Plant Biology (Stuttgart, Germany), 2017, 19(2): 268-278.
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [16] YIN X, CUI Y, WANG M, et al. Overexpression of a novel MYB-related transcription factor, *OsMYB1*, confers improved drought tolerance and decreased ABA sensitivity in rice[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2017, 490(4): 1355-1361.
- [17] HUANG C, ZHOU J, JIE Y, et al. A ramie bZIP transcription

- factor *BnbZIP2* is involved in drought, salt, and heavy metal stress response[J]. *DNA and Cell Biology*, 2016, 35(12): 776-786.
- [18] 刘杜玲, 张博勇, 彭少兵, 等. 氮磷钾配方施肥对核桃产量和品质指标的影响[J]. 西北林学院学报, 2018, 33(6): 113-117.
LIU D L, ZHANG B Y, PENG S B, et al. Effects of nitrogen, phosphorus and potassium formula fertilizers on the yield and quality of walnut fruit[J]. *Journal of Northwest Forestry Univsercity*, 2018, 33(6): 113-117. (in Chinese)
- [19] LI C, YUE J, WU X, et al. An ABA-responsive DRE-binding protein gene from *Setaria italica*, *SiARDP*, the target gene of *SiAREB*, plays a critical role under drought stress[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(18): 5415-27.
- [20] ZANG D, WANG L, ZHANG Y, et al. ThDof1. 4 and ThZFP1 constitute a transcriptional regulatory cascade involved in salt or osmotic stress in *Tamarix hispida*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, 94(4-5): 495-507.
- [21] XU Z, ZHAO Y, GE Y, et al. Characterization of a vacuolar H⁺-ATPase G subunit gene from *Juglans regia* (*JrVHAG1*) involved in mannitol-induced osmotic stress tolerance[J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(3): 407-418.

(上接第 85 页)

- [21] ŠNAJDR J, VALÁŠKOVÁ V, MERHAUTOVÁ V, et al. Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(9): 2068-2075.
- [22] 张仕艳, 原海红, 陆梅, 等. 滇西北不同利用类型土壤酶活性及其与理化性质与微生物的关系[J]. 亚热带水土保持, 2010, 22(2): 13-16.
ZHANG S Y, YUAN H H, LU M, et al. The soil enzyme activities of different land use types and the relationships between the soil enzyme activities and physical-chemical properties or microorganism in mountainous area of northwest Yunnan Province[J]. *Subtropical Soil and Water Conservation*, 2010, 22(2): 13-16. (in Chinese)
- [23] 杨万勤, 钟章成, 陶建平, 等. 缙云山森林土壤酶活性与植物多样性的关系[J]. 林业科学, 2001, 37(4): 124-128.
YANG W Q, ZHONG Z Z, TANG J P, et al. Study on relationships between soil enzymic activities and plant species diversity in forest ecosystem of MT. Jinyun[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2001, 37(4): 124-128. (in Chinese)
- [24] SALAZAR S, SÁNCHEZ L E, ALVAREZ J, et al. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices[J]. *Ecological Engineering*, 2011, 37(8): 1123-1131.
- [25] FANSLER S J, SMITH J L, BOLTON H, et al. Distribution of two C cycle enzymes in soil aggregates of a prairie chronosequence[J]. *Biology & Fertility of Soils*, 2005, 42(1): 17-23.
- [26] XIAO Y, HUANG Z, LU X. Changes of soil labile organic carbon fractions and their relation to soil microbial characteristics in four typical wetlands of Sanjiang Plain, northeast China[J]. *Ecological Engineering*, 2015, 82: 381-389.
- [27] 万忠梅, 宋长春. 三江平原小叶章湿地土壤酶活性的季节动态[J]. 生态环境学报, 2010, 19(5): 1215-1220.
WAN Z M, SONG C C. Seasonal dynamics of soil enzyme activities under *Calamagrostis angustifolia* marsh in the Sanjiang Plain[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2010, 19(5): 1215-1220. (in Chinese)
- [28] WALDROP M P, FIRESTONE M K. Response of microbial community composition and function to soil climate change [J]. *Microbial Ecology*, 2006, 52(4): 716-724.
- [29] TIMOTHY M, BOWLES, VERONICA ACOSTA-MARTÍNEZ, et al. Soil enzyme activities, microbial communities, and carbon and nitrogen availability in organic agroecosystems across an intensively-managed agricultural landscape[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 68: 252-262.
- [30] ALBIACH R, CANET R, POMARES F, et al. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 75(1): 43-48.