北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

油松*PtDof*基因家族鉴定与*PtDof*1基因响应低温胁迫的功能分析

马桂影 周成城 曲凯 李伟

Identification of *PtDof* gene family and functional analysis of *PtDof*1 gene in response to low temperature stress in *Pinus tabuliformis*

Ma Guiying, Zhou Chengcheng, Qu Kai, Li Wei

引用本文:
马桂影, 周成城, 曲凯, 李伟. 油松*PtDof*基因家族鉴定与*PtDof*1基因响应低温胁迫的功能分析[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(10):84–95. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250179
Ma Guiying, Zhou Chengcheng, Qu Kai, Li Wei. Identification of *PtDof* gene family and functional analysis of *PtDof*1 gene in response to low temperature stress in *Pinus tabuliformis*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(10):84–95. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250179

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250179

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

油松*SAUR*基因家族鉴定及其干旱胁迫表达模式分析

Identification of *SAUR* gene family in *Pinus tabuliformis* and analysis on its expression patterns under drought stress

北京林业大学学报, 2024, 46(8): 57–67. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230333

山新杨*PdaGLK*1基因在盐胁迫响应中的功能研究

Functional study of *PdaGLK*1 gene in salt stress response of *Populus davidiana* × *Populus alba* var. *pyramidalis*

北京林业大学学报, 2025, 47(7): 11–20. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240440

油松*JAZ*基因家族特征及其与DELLA蛋白互作的功能域鉴定

Characteristics of *JAZ* gene family of *Pinus tabuliformis* and identification of functional domain of its interaction with DELLA protein

北京林业大学学报, 2022, 44(12): 12–22. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220027

‘84K’杨组氨酸激酶基因*PaHK*3*a*的表达及功能分析

Expression and function analysis of histidine kinase gene *PaHK*3*a* of poplar ‘84K’

北京林业大学学报, 2021, 43(2): 46–53. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200070

白桦*BpPAT*1基因的表达模式及耐盐性分析

Expression patterns and salt tolerance analysis of *BpPAT*1 gene in *Betula platyphylla*

北京林业大学学报, 2021, 43(10): 18–27. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200302

紫花苜蓿*MsGOLS*2基因的克隆及功能鉴定

Cloning and functional identification of *MsGOLS*2 gene in *Medicago sativa*

北京林业大学学报, 2025, 47(6): 111–122. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240433

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250179

油松 *PtDof* 基因家族鉴定与 *PtDof*1 基因响应低温胁迫的功能分析

马桂影 周成城 曲 凯 李 伟
（北京林业大学生物科学与技术学院，林木遗传育种全国重点实验室，林木育种与生态修复国家工程研究中心，北京 100083）

摘要:【目的】鉴定并挖掘 *PtDof* 家族基因在低温胁迫中的作用，旨在探究针叶树响应低温胁迫下非 CBF 依赖的冷信号途径，为油松耐寒分子调控机制的解析和抗逆分子育种提供重要依据。**【方法】**通过转录组测序挖掘油松低温过程差异表达基因，鉴定 *PtDof* 家族基因成员并进行生物信息学、系统进化以及表达模式分析，筛选 *PtDof* 家族低温胁迫关键响应基因 *PtDof*1，并对其进行克隆和亚细胞定位。利用农杆菌介导的花序浸染法转化拟南芥，对比分析野生型和过表达 *PtDof*1 拟南芥株系在低温处理后表型和抗氧化酶活性方面的差异，进而探究 *PtDof*1 在植物响应低温胁迫过程中的功能。**【结果】**(1)低温处理后，油松针叶丙二醛含量持续降低，过氧化物酶活性、超氧化物歧化酶活性和脯氨酸含量升高，氧化应激反应生理指标变化明显。(2)转录组数据分析筛选到 19 869 个油松冷胁迫响应的差异表达基因，其中 640 个基因显著上调表达，446 个基因显著下调表达。(3)油松基因组中共筛选鉴定出 30 个 *PtDof* 基因，其在低温响应过程中的表达模式差异显著，其中 *PtDof*1 与冷胁迫显著相关。(4)*PtDof*1 过表达提高了转基因拟南芥的抗寒性，植株氧化应激反应显著升高。**【结论】**油松 *PtDof*1 基因能够响应低温胁迫，可能通过增强抗氧化酶活性来提升植株耐寒性。研究结果证明了油松中存在非 CBF 依赖的冷信号途径，不仅为解析油松 *PtDof*1 功能提供了前期理论基础，也为针叶树抗寒种质资源的遗传改良提供了重要基因资源。

关键词：油松；低温胁迫；*PtDof*1；功能鉴定；非 *CBF* 依赖途径；基因表达；抗逆育种
中图分类号：S791.254 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2025)10−0084−12
引文格式：马桂影，周成城，曲凯，等. 油松 *PtDof* 基因家族鉴定与 *PtDof*1 基因响应低温胁迫的功能分析［J］. 北京林业大学学报，2025，47(10)：84−95. Ma Guiying, Zhou Chengcheng, Qu Kai, et al. Identification of *PtDof* gene family and functional analysis of *PtDof*1 gene in response to low temperature stress in *Pinus tabuliformis*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(10): 84−95.

Identification of *PtDof* gene family and functional analysis of *PtDof*1 gene in response to low temperature stress in *Pinus tabuliformis*

Ma Guiying Zhou Chengcheng Qu Kai Li Wei
(School of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, National Key Laboratory of Forest Genetics and Breeding, National Engineering Research Center of Forest Breeding and Ecological Restoration, Beijing 100083, China)

Abstract: ［**Objective**］This paper identifies and explores the role of *PtDof* family genes under low temperature stress, aiming to explore the non CBF dependent cold signaling pathway of coniferous trees in response to low temperature stress, and provide important basis for the analysis of molecular regulatory mechanism of cold resistance in *Pinus tabuliformis* and stress resistant molecular breeding. ［**Method**］Using transcriptome sequencing to identify differentially expressed genes during the low temperature process in *P.*

收稿日期: 2025−05−19 **修回日期:** 2025−09−26
基金项目: 国家林业和草原局揭榜挂帅项目(202401-07)。
第一作者: 马桂影。主要研究方向：森林遗传与树木改良。Email：srmaxiaohan@163.com 地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。
责任作者: 李伟，教授。主要研究方向：针叶树遗传改良。Email：bjfuliwei@bjfu.edu.cn 地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn；http://journal.bjfu.edu.cn

tabuliformis, we identified the members of *PtDof* family genes and conducted bioinformatics analysis, phylogenetic analysis, and expression pattern analysis, screened the key response gene *PtDof*1 to low temperature stress in *PtDof* family, and cloned and subcellular localized it. Using agrobacterium mediated inflorescence infiltration method to transform *Arabidopsis thaliana*, the differences in phenotype and antioxidant enzyme activity between wild-type and overexpressing *PtDof*1 arabidopsis lines after low temperature treatment were compared and analyzed, and the function of *PtDof*1 in plant response to low temperature stress was explored. [**Result**] (1)After low temperature treatment, the content of malondialdehyde in needles continued to decrease, while POD activity, SOD activity, and proline content increased. (2) A total of 19 869 differentially expressed genes, including 640 significantly up-regulated genes and 446 significantly down-regulated genes were found in the seedlings of *P. tabuliformis* at low temperature. (3) A total of 30 *Dof* genes were identified, and the gene expression patterns in response to low temperature were significantly different, *PtDof*1 was significantly associated with cold stress. (4) Heterologous transformation showed that the overexpression of *PtDof*1 improved cold resistance of transgenic *Arabidopsis thaliana*, and the oxidative stress response was significantly increased. [**Conclusion**] The *PtDof*1 gene in *P. tabuliformis* can respond to low temperature stress and may enhance plant cold tolerance by enhancing antioxidant enzyme activity. The research results have demonstrated the existence of non CBF dependent cold signaling pathways in *P. tabuliformis*, which not only provides a preliminary theoretical basis for analyzing the function of *PtDof*1 in *P. tabuliformis*, but also provides important genetic resources for genetic improvement of cold resistant germplasm resources in conifers.

Key words: *Pinus tabuliformis*; low temperature stress; *PtDof*1; functional qualification; non-*CBF*-dependent pathway; gene expression; stress-tolerant breeding

低温是影响林木分布和扩展的关键环境因子之一。为了感知和适应低温胁迫，林木已经进化出一系列有效的抗寒调节机制，在生理适应策略、分子调控网络、形态与物候适应等方面发生了应对低温的适应性进化[1−2]。在已解析的低温信号调控网络中，CBF(C-repeat binding factor)依赖途径研究较为广泛，其主要通过 *CBF-COR/ICE*1 等关键模块快速响应冷胁迫[3]。近年来，随着组学技术的开发与普及，非 CBF 依赖的冷信号途径逐渐受到关注，bZIP、GRAS 等众多转录因子被发掘和鉴定[4−5]。其中，Dof(DNA bing with one finger)转录因子被证实在林木低温适应过程中扮演重要角色。针叶树广泛存在于北半球高寒地区，是研究低温适应机制的理想材料，然而目前关于针叶树 Dof 转录因子参与低温胁迫响应还未见相关研究报道。

Dof 转录因子家族是植物中特有的转录因子家族之一，最初在玉米(*Zea mays*)中被发现[6]。与其他锌指蛋白不同，Dof 转录因子只含有 1 个 Cys2/Cys2 锌指结构域(ZF)，能特异性识别目的基因的上游核心序列 5′-(T/A/AAAG)-3′[7−8]。Dof 蛋白的 C 端区域包含 1 个非保守结构域，该结构域可以与多种转录因子(如 MYB、bZIP、WRKY 等)发生互作，从而在不同表达水平上发挥调控作用[9−10]。研究表明，植物 Dof 蛋白参与多种非生物胁迫过程，值得注意的是，Dof 蛋白能显著提高植物在低温环境下的生存能力。过表达水稻(*Oryza sativa*)冷响应基因 *OsDof*1 可以提高植株在低温下的耐受性[11]。在欧洲油菜(*Brassica napus*)中，低温可显著激活 *BnCDF*1 的表达，进而提高植物的耐寒性[12]。葡萄(*Vitis vinifera*) *VaDof*17*d* 能诱导半乳糖核苷酶和棉子糖合成酶编码基因的上调表达来提高耐冷性[13]。过表达 *GhDof*1 基因的棉花(*Gossypium hirsutum*)株系比野生型株系具有更高的抗寒性[14]。霍山石斛(*Dendrobium huoshanensis*)*DhDof*5 可通过与 *DhPMM* 启动子结合，提高多糖合成途径相关基因的表达水平，从而诱导多糖的累积来抵御低温胁迫[15]。综上所述，*Dof* 基因家族成员在低温胁迫响应过程中扮演着关键角色。在针叶树中 Dof 转录因子家族研究较少，仅在火炬松(*Pinus taeda*)中鉴定到 8 个 *Dof* 基因，但是并未对其生物学功能进行解析[16]。目前已报道的针叶树全基因组，如挪威云杉(*Picea abies*)、油松(*Pinus tabuliformis*)等，均未鉴定到冷信号调控网络中的 *CBF* 基因，表明针叶树很可能依靠非 CBF 依赖途径来抵御低温胁迫[17−18]。因此，解析非 CBF 依赖途径中关键转录因子 Dof 在低温下的功能对于解析针叶树冷响应调控机制具有重要意义。

油松是松科(Pinaceae)常绿乔木，主要分布在中国三北地区的 14 个省市自治区，是中国北方地区重

要的生态兼用材树种，具有重要的经济价值和生态价值。油松自然分布的最北端位于大兴安岭南端的黄岗梁，该地区海拔 2 000 m 左右，极端低温在−30 ℃以下，是探究木本植物低温适应机制的理想材料，但目前关于 *Dof* 在油松低温胁迫响应过程中的作用机制尚不清楚。因此，本研究以内蒙古克什克腾旗的天然沙地油松为研究对象，拟基于全基因组和低温胁迫转录组数据，对 *Dof* 基因家族进行鉴定、生信分析、系统进化分析、亚细胞定位以及低温下的表达模式分析，旨在挖掘响应低温胁迫的关键 *Dof* 基因，并通过异源转化拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）解析 *Dof* 基因在低温响应过程中的功能，研究结果将为揭示油松耐寒分子调控机制奠定基础，为针叶树低温胁迫响应的非 CBF 依赖途径提供新证据，并为针叶树抗寒遗传改良提供重要的基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

油松种子采自内蒙古克什克腾旗白音敖包天然沙地油松母树林，播种前进行春化处理（在 4 ℃ 的冰箱中放置 3 d）用于后续播种。先将水苔用水浸湿，把种子均匀撒在水苔上，然后放置在人工光照气候箱内进行萌发培养，培养条件为温度 22 ℃，光照周期为 16 h 光照和 8 h 黑暗，期间注意观察种子状态并及时补水。拟南芥种子为哥伦比亚型，由本实验室繁殖和保存。

1.2 研究方法

1.2.1 油松幼苗低温处理及生长指标测定

培养至大部分油松种子萌发并自动脱落种壳后，将长势基本一致的幼苗移栽到直径为 6 cm 的小花盆中。生长 2 个月后选取长势一致、生长状况良好的幼苗分别放置于 4 ℃（低温处理组）和 22 ℃（对照处理组）长日照恒温培养箱中培养，每隔 7 d 记录生长状态并进行丙二醛（malondialdehyde，MDA）含量、脯氨酸（proline，Pro）含量、过氧化物酶（peroxidase，POD）活性及超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性等生理指标测定。其中 MDA 含量、Pro 含量、POD 活性及 SOD 活性使用索莱宝（Solarbio）生物公司的相应试剂盒进行测定，每个处理做 3 次重复。处理前 1 d 记为试验第 0 d，每隔 7 d 取 1 次针叶部位样，共取 8 次，每次处理组和对照组分别选取 12 株作为生物学重复，每次取样后用液氮速冻后立即放入−80 ℃ 保存，用于后续实验。

1.2.2 油松幼苗低温处理下转录组差异表达基因分析

分别取低温处理第 0 d、第 1 周、第 3 周、第 7 周处理组和对照组油松幼苗针叶，均设置 3 个生物学重复进行转录组测序。以油松全基因组序列[18]作为参考，利用 Hisat2（version2.0.9）将 clean reads 比对到参考基因组，使用 Kallisto 软件估算转录本的丰度，用于后续的差异分析。然后使用 kallisto 软件对转录组的 clean reads 进行定量分析，并使用 R 包 sleuth 进行差异表达分析，利用生信分析软件 TBtools 制作差异表达基因热图；使用在线网站微生信（https://www.bioinformatics.com.cn/?keywords）绘制火山图。将所有差异基因根据差异倍数（fold change，FC）进行排序，筛选出差异显著（$|\log_2 FC| \geqslant 2$，$P \leqslant 0.05$）的基因。

1.2.3 *PtDof* 基因家族鉴定与分析

1.2.3.1 *PtDof* 基因家族鉴定

从 TAIR 拟南芥信息资源数据库（https://www.arabidopsis.org/）检索并获取已知的拟南芥 *Dof* 基因家族（*AtDof*，*AtCDF*，*AtOBP*）的蛋白序列信息。然后在 CPIR 油松信息数据库（http://www.ehbio.com/CperProject/front/#/）中下载油松全基因组参考序列，用于后续鉴定油松 Dof 转录因子家族成员。使用 TBtools 软件基于拟南芥 Dof 蛋白序列对油松全基因组序列进行同源序列搜索，获得候选油松 *Dof* 基因家族的蛋白序列。使用 NCBI 的 Conserved Domain Search Service 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/StrucTure/cdd/wrpsb.cgi）进行保守结构域预测，过滤掉无典型结构域和重复的序列，最终确定 *PtDof* 基因家族成员。

1.2.3.2 *PtDof* 基因家族保守基序和染色体定位分析

使用 MEME 在线网站（https://meme-suite.org/meme/tools/meme）对 PtDof 家族蛋白的保守基序（motif）进行分析（获取的最大 motif 数为 10），并结合保守结构域作图。使用 TBtools 软件对 *PtDof* 基因家族所有成员进行染色体定位并作图。

1.2.3.3 *PtDof* 基因家族启动子预测分析

使用 TBtools 软件提取 *PtDof* 基因转录起始位点上游 2 000 bp 的启动子序列，利用在线网站 PlantCARE program（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）进行启动子预测。

1.2.3.4 *PtDof* 基因家族系统进化分析

在 NCBI 网站下载毛果杨（*Populus trichocarpa*）*Dof* 基因家族蛋白序列，利用 MAGA11.0 分析软件对比油松、毛果杨和拟南芥 *Dof* 基因家族蛋白序列，并进行手动矫正。采用邻接法构建系统发育进化树，设置 bootstrap 值为 1 000，其他参数默认。并使用在线工具 iTOL（https://itol.embl.de/）对进化树进行美化。

1.2.3.5　*PtDof* 基因家族在低温胁迫下的表达模式

从油松低温胁迫下转录组数据（数据为本课题组测得，暂未公开发表）中提取 *Dof* 基因家族的表达量，使用 TBtools 软件对 TPM（transcription per kilobase million）值取对数进行均一化处理，并制作转录组数据热图，选择表达量差异显著的 *Dof* 基因家族成员进行后续的功能验证。

1.2.4　油松 *PtDof*1 基因克隆与亚细胞定位

利用 Takara 官网在线设计 *PtDof*1 基因的无缝克隆引物（表 1），于生工生物公司（上海）进行合成。以油松 cDNA 为模板进行基因克隆，使用 PCR 仪对目的基因进行扩增，用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行检测后送至睿博生物公司测序，将测序正确的菌液用含有 Kana（50 μg/mL）抗性的 LB 培养液进行扩繁，并使用试剂盒提取质粒。

为探究 PtDof1 在植物细胞中的作用位置，将 PtDof1 与 GFP（绿色荧光）标签融合，并利用 CaMV35S 启动子驱动基因过表达。利用质粒回收试剂盒回收 pBI121-eGFP 质粒，将构建好的表达载体 p35S:: PtDof1-eGFP 转化到 GV3101 农杆菌感受态细胞中。挑选生长状况良好的烟草（*Nicotiana tabacum*）植株，使用 1 mL 注射器在叶片背面注射适量侵染液，每株烟草选取 2 ~ 3 片叶片。处理过的烟草植株先在黑暗条件下培养 12 h 后，转移至长日照（16 h 光照/8 h 黑暗）条件下继续培养 48 h。利用荧光显微镜，观察并拍摄记录实验结果。

1.2.5　异源转化拟南芥

利用 DNA 连接酶将克隆出的目的基因连接到线性化的 PBI121 载体上，将目的质粒转入 DH5α 大肠感受态中。利用含有卡那霉素抗性的 LB 培养基进行筛选并测序，将测序结果正确的大肠杆菌进行扩繁并提取质粒。把过表达载体转入 GV3101 农杆菌中，用含有卡那霉素和利福平的 LB 培养液进行扩繁，并配制侵染液。选择长势好且花苞数量多的拟南芥植株进行侵染，侵染前 48 h 保证幼苗水分充足，侵染时先剪掉全部果荚，利用沾花法侵染拟南芥，将侵染后的小苗黑暗培养 24 h 后放在长日照（16 h 光照/8 h 黑暗）环境中继续生长，成熟后收集种子。

将消毒后的种子播种到含有 Kana 抗性的 1/2MS 固体培养基上，10 d 后将正常生长的幼苗移栽至土壤中继续培养。培养 4 周后提取拟南芥叶片 DNA 进行 PCR 鉴定，收集阳性植株的成熟种子，连续筛选至 T3 代获得阳性纯合株系，利用半定量检测法测定不同拟南芥株系中目的基因的表达量。

将野生型（WT）与 *PtDof*1 过表达株系（OE1、OE2 和 OE3）在 22 ℃ 下培养 2 周后，放入低温培养箱中 4 ℃ 冷驯化 24 h，后−15 ℃ 低温处理 1 h，然后转移至 22 ℃ 环境中进行恢复培养 48 h，观察并拍照记录低温处理前后植株表型变化，计算叶片枯萎率，并测量 POD、SOD 和 CAT 活性等生理指标。以低温处理前作为对照组，从表型和生理水平两个维度探究低温处理对拟南芥植株的影响。

1.3　数据分析

使用 Excel 工作表对实验数据进行整理分析，采用 Graphpad Prism8.0 软件绘图，并通过 *t* 检验对数据进行显著性分析。

2　结果与分析

2.1　低温胁迫下油松幼苗表型和生理指标变化

对油松幼苗进行持续低温处理，与对照组相比，低温处理的油松受到了一定程度上的损伤，处理第 5 周时幼苗顶芽颜色发生变化，随着时间延长，不断向基部扩展，至第 7 周时整株幼苗变为紫红色（图 1）。测定其生理指标发现：低温处理后油松幼苗丙二醛含量下降，表明膜脂过氧化程度不断加剧，细胞膜受到连续性损伤；POD 和 SOD 的活性显著增强，低温处理激活了油松体内过氧化酶系统以抵抗胁迫；脯氨酸含量也显著升高，说明油松通过调节细胞内渗透物质，维持胞内渗透压的相对平衡（图 2）。总之，油松受到低温胁迫后，体内氧化应激反应生理指标变化明显，在生理水平上表现出一定的适应机制。

2.2　油松幼苗低温处理下转录组差异表达基因分析

将低温处理后与处理前的转录组数据比对分析，基因差异表达分析（图 3A）显示，低温处理组和对照组间共涉及 19 868 个基因，其中差异表达基因 2 419 个，包括 1 397 个上调表达基因（红色）和 1 022 个下调表达基因（蓝色），其余均为非差异表达基因（灰色）。差异表达基因主要包括 *NAC*、*AP*2、*C2H*2、*Dof*、*MYB* 等多种与非生物胁迫响应相关的转录因子，这些转录因子家族的基因大部分出现上调。其中

表 1　*PtDof*1 无缝克隆引物序列

Tab. 1　*PtDof*1 seamless cloning primer sequence

引物名称	引物序列（5′—3′）
*PtDof*1-eGFP-F	GGACTCTAGAGGATCCATGTCGAAGGATTGCGTGG
*PtDof*1-eGFP-R	GTACCCCCGGGGATCCGCTGCTCTCATGGAAGGATAACG

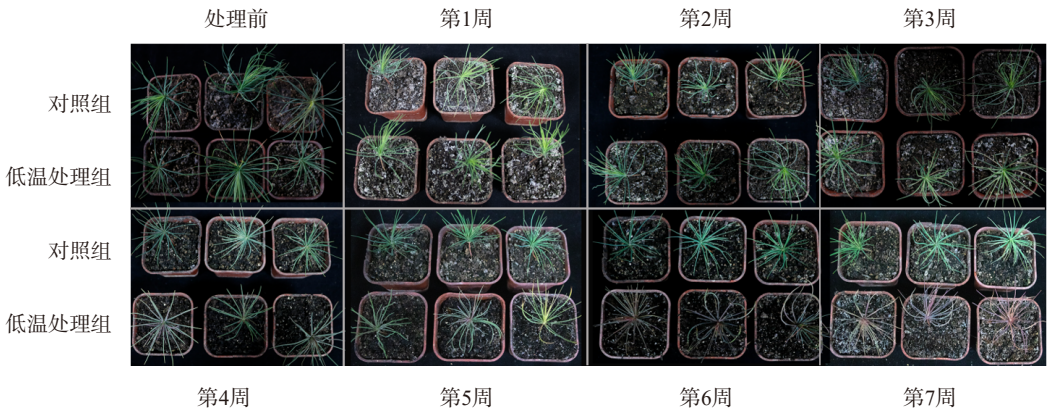


图 1 低温处理期间油松幼苗表型变化

Fig. 1 Phenotypic changes of *P. tabuliformis* seedlings during low temperature treatment

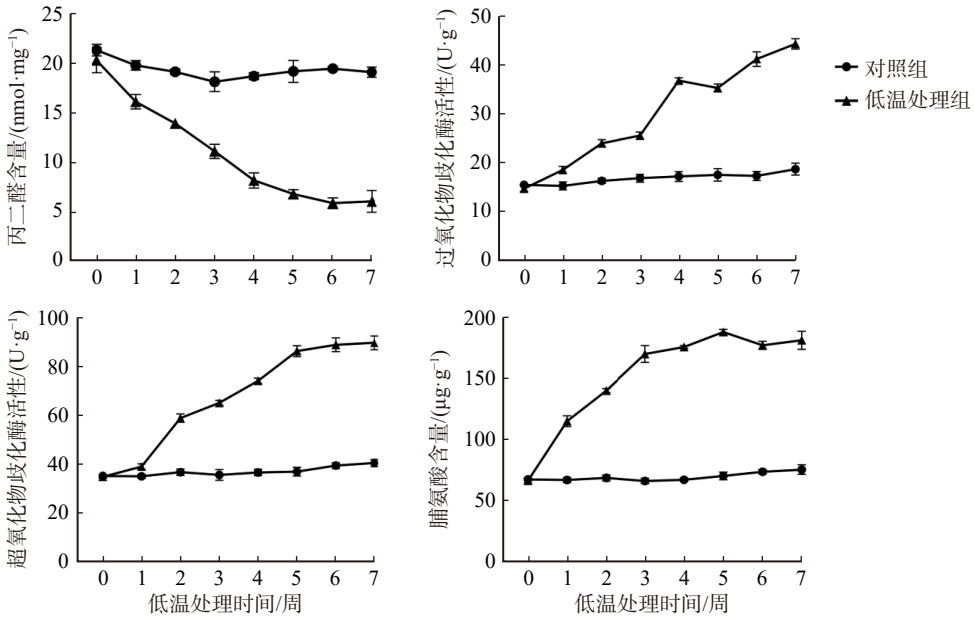


图 2 低温处理期间油松幼苗生理指标测定

Fig. 2 Measurement of physiological indexes of *P. tabuliformis* seedlings during low temperature treatment

NAC(11 个)、*Dof*(2 个)、*HB*(2 个)、*C2H2*(2 个)等转录因子家族的差异表达基因出现特异性上调表达，且 *Dof* 转录因子家族的两个基因(*PtDof*1 和 *PtDof*2)变化倍数高达 4 倍(图 3B)。推测 *PtDof* 基因可能在油松低温响应过程中发挥重要作用，因而，对 *PtDof* 基因家族进行后续进一步的鉴定与分析。

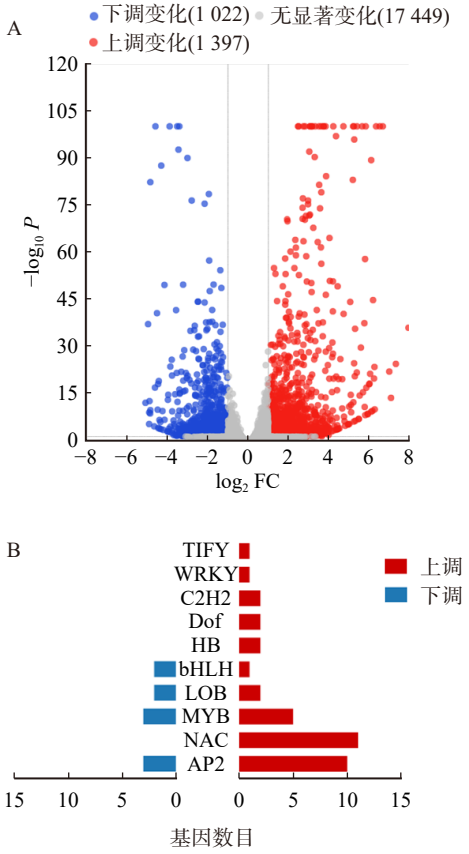
2.3 *PtDof* 基因家族成员的鉴定、序列结构和染色体定位分析

在油松中共鉴定出 30 个 *PtDof* 基因，分别命名为 *PtDof*1 ~ *PtDof*8，*PtDof*10 ~ *PtDof*15，*PtOBP*1 ~ *PtOBP*16。在 *PtDof* 基因家族中鉴定并注释到 10 个 motif，其中 motif 1 存在于所有 *PtDof* 基因成员，推测 motif 1 为 *PtDof* 基因家族的必要基序；除 *PtDof*10(InsA superfamily)和 *PtDof*11 以外，*PtDof* 基因家族成员均含有典型的 zf-Dof 保守结构域(图 4A)。

对 *PtDof* 家族基因进行染色体定位预测，发现 27 个基因被定位到 9 条染色体上，分布基因数目最多(5 个)的是 8 号染色体，此外在 4 号和 9 号染色体上各发现一对串联复制基因，表明串联复制事件参与了 *PtDof* 基因家族的扩张(图 4B)。

2.4 *PtDof* 基因家族启动子预测分析

为深入了解 *PtDof* 基因家族的表达调控机制，本研究对 30 个 *PtDof* 基因成员的上游 2 000 bp 启动子区域进行了系统的顺式作用元件预测分析。结果显示：启动子区域包含多种响应元件，如与植物激素信号响应有关的调控元件，包括 ABRE(参与脱落酸反应)、TGACG-motif(参与茉莉酸甲酯反应)、P-box(赤霉素响应)等作用元件。同时鉴定到多种与环境胁迫应答有关的作用元件，如 TC-rich repeats(响应外界胁迫)、MBS motif CAACTG(响应干旱胁迫)、LTR motif CCGAAA(响应低温胁迫)等(图 5)。这



A 为差异表达基因火山图；B 为差异变化转录因子数目统计。FC 为差异倍数。

图 3　低温胁迫下油松转录组差异表达基因

Fig. 3　Differentially expressed genes in the transcriptome of *P. tabuliformis* under low temperature stress

进一步为 *PtDof* 基因参与响应低温胁迫提供了证据。

2.5　*PtDof* 基因家族鉴定及系统进化分析

利用油松、毛果杨和拟南芥的 *Dof* 基因家族蛋白序列，构建系统发育进化树。结果发现：油松 PtDof1、PtDof2、PtDof3、PtDof4 和 PtDof11 聚类在一个分支上，与毛果杨的 Potri.013G066700、Potri.019G040700 及拟南芥的 At3G47500、At5G62430、At5G39660 的亲缘关系最近(图 6)。

2.6　*PtDof* 基因家族低温响应的表达模式

为了进一步挖掘 *PtDof* 基因家族响应低温的关键基因，利用低温胁迫下转录组数据中的 *Dof* 基因家族的表达量，使用 TB tools 制作热图。结果(图 7)发现：油松 30 个 *PtDof* 基因分为 8 类(C1～C8)，C1 在低温处理期间表达量不断升高，并在末期表达量最高；C4 在低温处理初期表达量达到最高，随后表达量不断降低；C8 在低温处理期间表达量先升高后下降，第 3 周达到峰值；其余 5 类在低温处理期间表达量均呈现下降趋势。*PtDof*1、*PtDof*4、*PtOBP*9 和 *PtOBP*15 这 4 个基因在低温处理下表达量的变化更为显著，*PtOBP*15 表达量持续降低，*PtDof*1、*PtDof*4 和 *PtOBP*9 在低温胁迫初期表达量显著升高，其中 *PtDof*1 的表达量变化最为显著(图 7)。因此，选择 *PtDof*1 基因进行后续功能验证研究。

2.7　油松 PtDof1 蛋白亚细胞定位

为鉴定 PtDof1 的表达位置，采用烟草瞬时转化法将 PtDof1-GFP 和 35S-GFP 分别转入烟草叶片表皮细胞中观察。结果显示，含有 35S-GFP 蛋白组合的烟草细胞在激发荧光下，细胞膜、细胞核均可观察到绿色荧光信号，含有 PtDof1-GFP 蛋白组合的烟草细胞内，仅细胞核可观察到荧光信号(图 8)。这表明 PtDof1 定位在细胞核，表明 *PtDof*1 基因仅在细胞核内表达并发挥作用。

2.8　转基因拟南芥的筛选与鉴定

经 PCR 鉴定获得了 8 株 *PtDof*1 过表达的阳性转基因拟南芥植株，然后对其进行了 DNA 水平的 PCR 鉴定，发现基因长度与预期相符；半定量检测发现，相较于野生型，*PtDof*1 在各阳性植株中均高表达(图 9)。连续筛选鉴定至 T3 代，获得纯合植株，选取 3 个纯合株系(OE1、OE2 和 OE3)进行后续功能验证分析。

2.9　转基因拟南芥抗寒性分析

低温处理后 WT 植株大部分叶片萎蔫甚至死亡，叶片枯萎率高达 90% 左右；而过表达植株只有少部分变黄枯萎，叶片枯萎率均低于 60%(图 10)。这表明相较于野生型，*PtDof*1 过表达植株抵抗低温胁迫的能力更强，推测 *PtDof*1 在提高拟南芥对低温胁迫的耐受能力方面发挥了重要作用。

低温处理前后各株系相关生理指标结果(图 11)显示：在低温处理前，各株系不存在显著差异；低温处理后，两种株系 CAT、SOD 和 POD 3 种酶活指标均有所升高，但过表达株系的升高程度显著高于 WT 植株。推测 *PtDof*1 过表达可以增强氧化应激反应以提高拟南芥植株的抗氧化酶活性，从而减轻低温对植株的损伤。

3　讨　　论

作为中国本土树种，油松根系发达，具有很强的耐寒性和耐旱性，是中国北方地区主要的防风固沙和水土保持树种，在改善生态环境方面发挥着重要作用。然而，随着全球气候的变化，极端低温天气发生的频率和强度显著增加，低温胁迫成为限制林木生长发育的关键因素。近年来，由于极端低温引发的林木冻害及其次生性病虫害，对植物生态系统的稳定性造成了严重影响。因此，深入探究油松对低温胁迫的响应机制，不仅有助于阐明针叶树对环境适应性的策略，还能为优良抗寒品种定向分子设计选育提供理论依据，对维持北方森林生态系统的稳

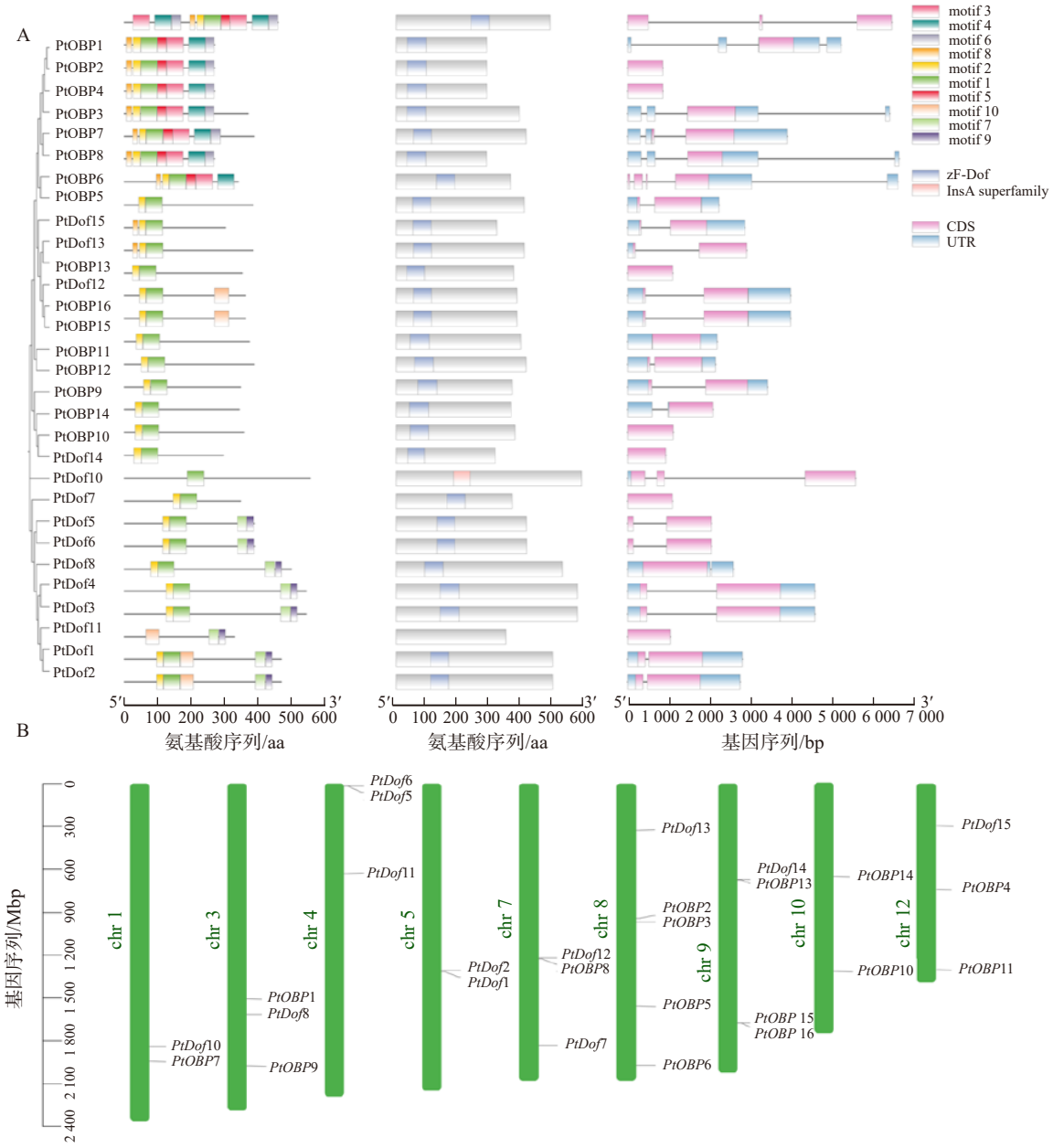


图 4 *PtDof* 基因家族序列结构(A)和染色体定位分析(B)

Fig. 4 Sequence structure (A) and chromosome localization (B) of *PtDof* gene family

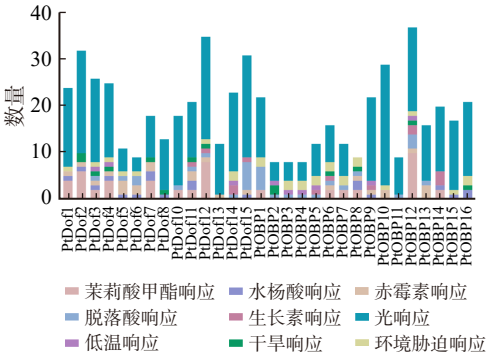


图 5 *PtDof* 基因家族启动子顺式作用元件预测分析

Fig. 5 Predictive analysis of *PtDof* gene family promoter cis-elements

定性具有重要的实践意义。

活性氧在植物逆境胁迫响应中扮演着重要角色：一方面作为重要的信号分子参与胁迫响应，另一方面过量积累又会造成氧化损伤[19]。SOD、POD 和 CAT 在抗氧化系统中协同作用，是植物应对低温胁迫的重要防御机制[20]。当环境条件不利时，油松针叶内抗氧化酶活性的大幅度上调可避免活性氧对膜的损伤。然而，不同植物中发挥主要作用的氧化酶存在差异。本研究中低温胁迫下油松针叶内 POD 和 SOD 酶活性持续升高，其中 SOD 氧化还原反应更为剧烈，表明针叶树可能以 SOD 反应为主，而小叶黄杨(*Buxus sinica* var. *parvifolia*)等阔叶树在低温下可能以 POD 反应为主[21]。此外，MDA 的含量可以反映细胞膜受损伤的程度，然而不同树种对环境压力的敏感性不同，这导致其在面对胁迫时 MDA 含

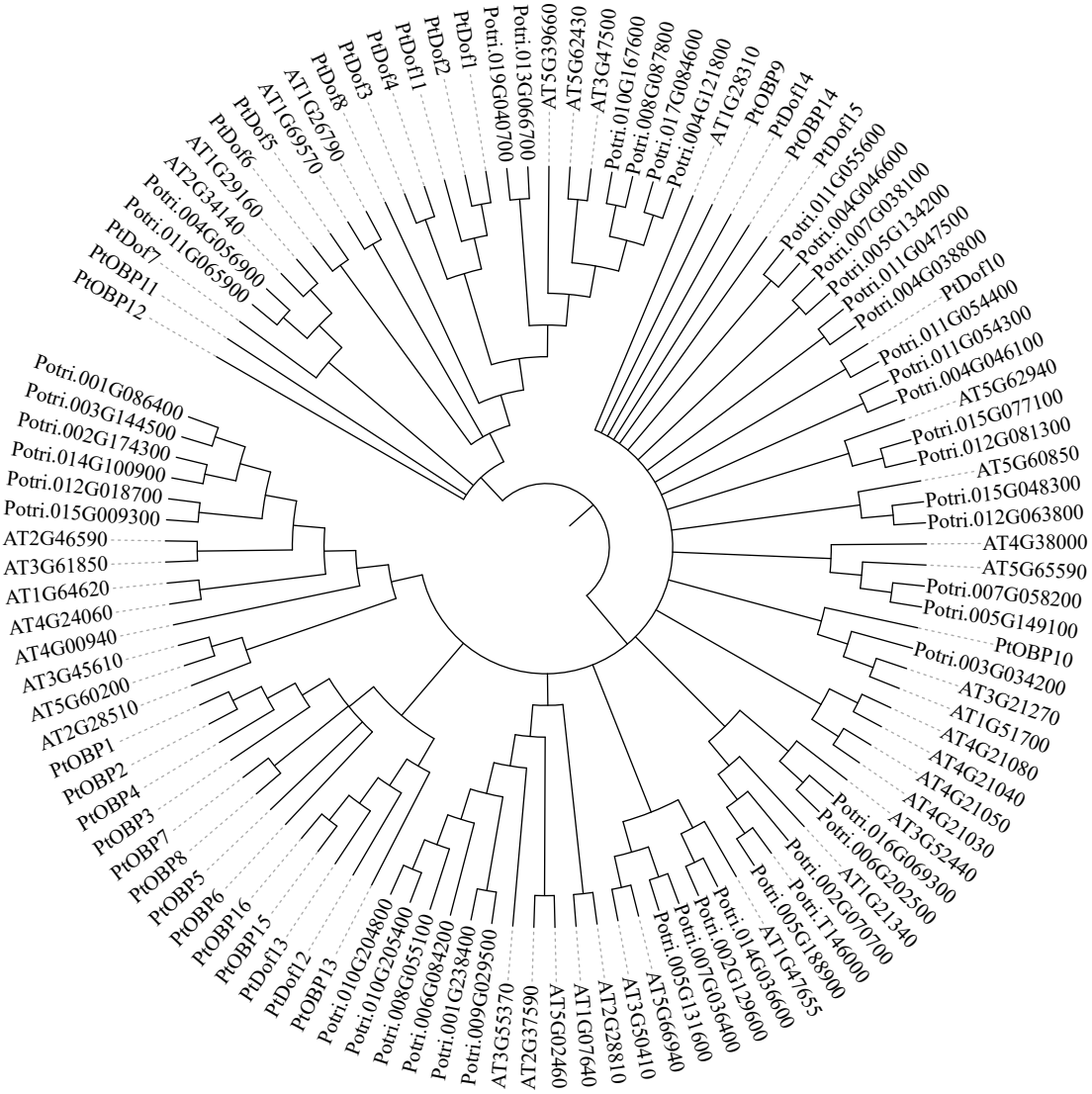


图 6　油松与拟南芥、毛果杨 Dof 蛋白系统进化分析

Fig. 6　Phylogenetic analysis of Dof protein in *P. tabuliformis*, *Arabidopsis thaliana* and *Populus trichocarpa*

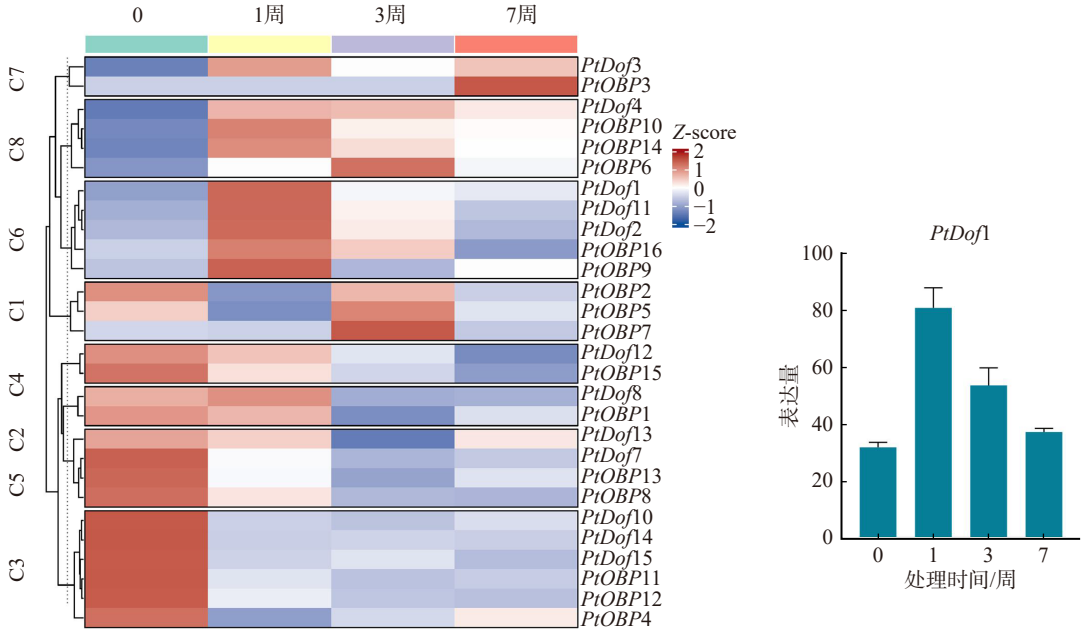


图 7　基于转录组数据的 *PtDof* 基因表达模式分析

Fig. 7　Analysis of *PtDof* gene expression patterns based on transcriptomic data

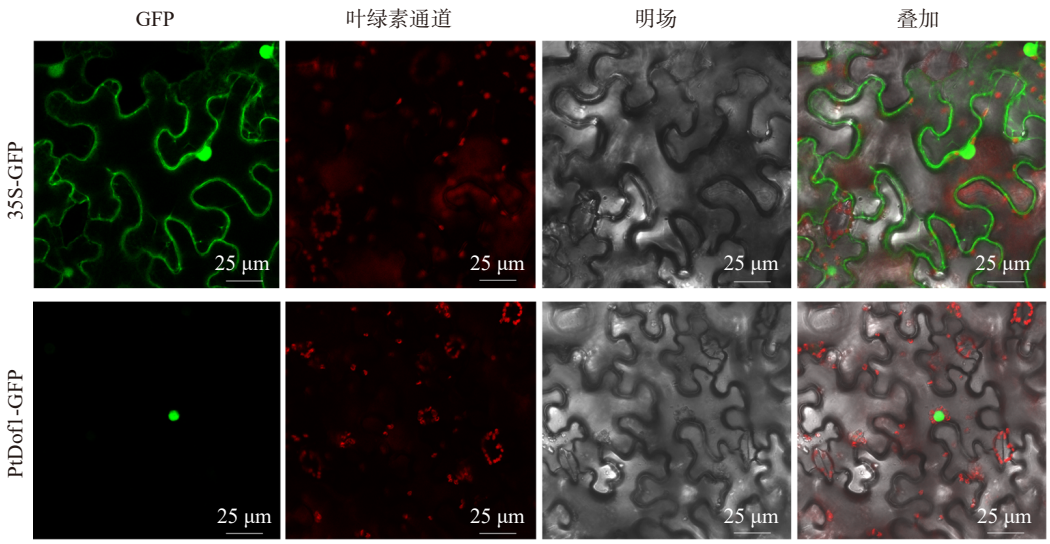
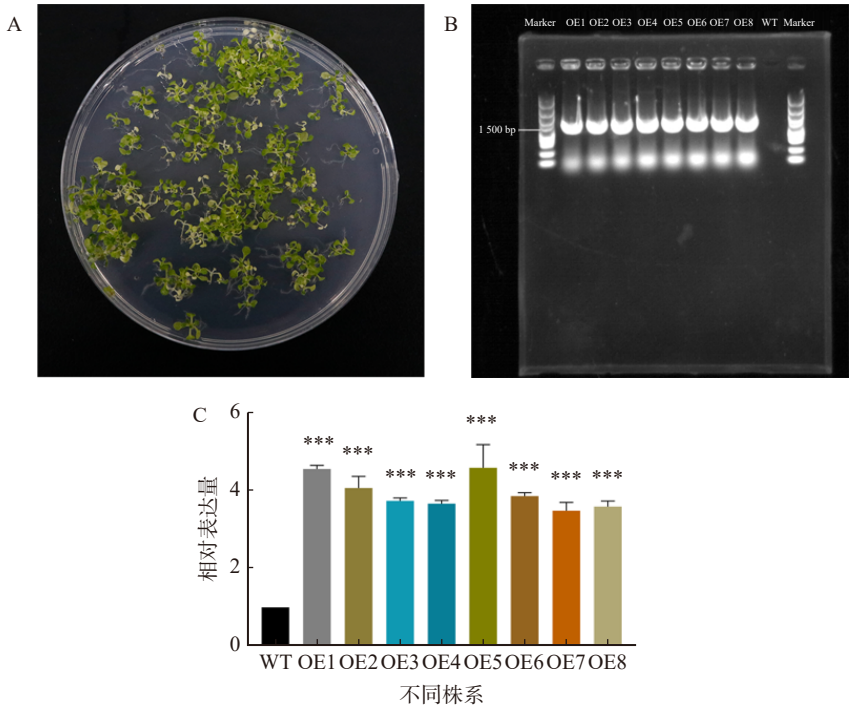


图 8 PtDof1 蛋白亚细胞定位分析

Fig. 8 Subcellular localization analysis of PtDof1 protein



A 为转基因植株筛选；B 为植株 DNA 水平鉴定（Marker 为 5 000 bp）；C 为半定量检测。***表示转基因株系和野生型之间差异显著水平为 $P < 0.001$。下同。

图 9 *PtDof*1 过表达拟南芥阳性苗筛选与鉴定

Fig. 9 Screening and identification of *PtDof*1 overexpressing *Arabidopsis thaliana* positive seedlings

量有所差异。在低温胁迫下，油松针叶 MDA 含量呈现下降趋势，而沙冬青（*Ammopiptanthus mongolicus*）叶片 MDA 含量呈上升趋势，说明相对于阔叶树来说，低温胁迫对针叶树的影响更小[21]。

转录因子在低温调控网络中发挥核心作用，本研究中参与油松针叶低温胁迫的转录因子主要包括 NAC、AP2、bHLH、Dof、HB、WRKY 等家族，且这些基因家族大多数起正调控作用。油松中 Dof 转录因子启动子区域含有响应低温胁迫的应答元件，说明油松 Dof 转录因子表达受低温调控。然而 *PtDof*1、*PtDof*2、*PtDof*4 等基因在低温胁迫过程中上调，*PtDof*13、*PtDof*14 等基因表达下调，说明 *Dof* 家族可能通过“激活–抑制”协同作用精细调控低温响应通路。这与拟南芥、番茄（*Solanum lycopersicum*）等被子植物中 *Dof* 基因的差异化表达模式相似[22−23]，表明 *Dof* 家族的调控机制在植物界具有一定保守性。

Dof 转录因子作为植物体特异性转录因子，在不同物种间家族成员数量存在显著差异。本研究在

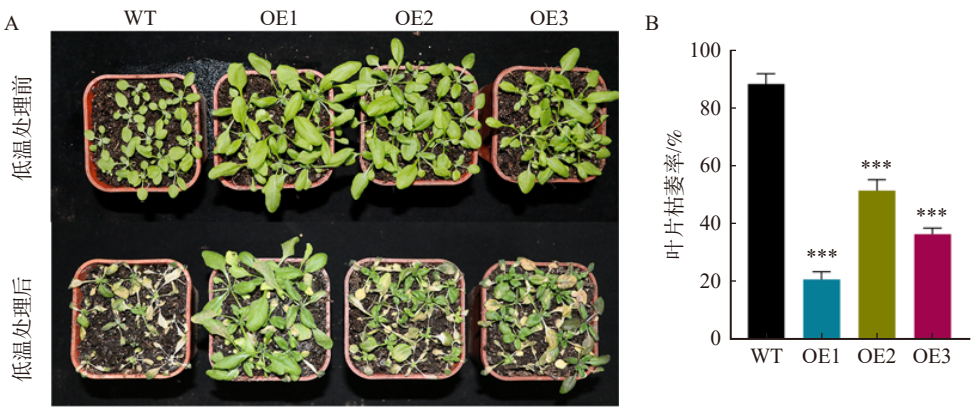
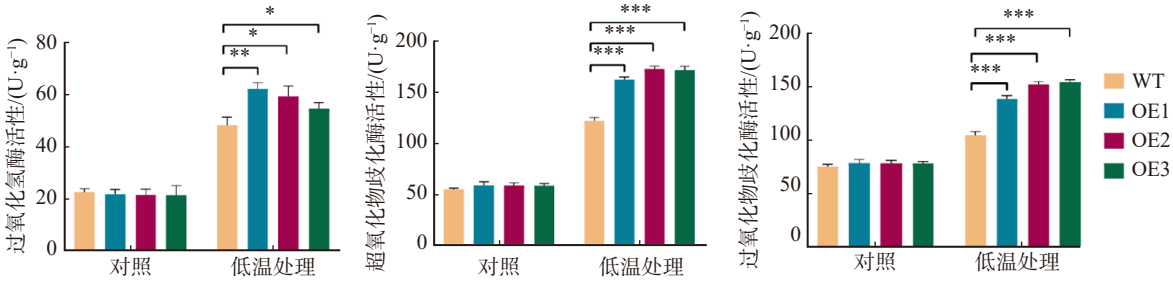


图 10　低温处理下过表达植株与野生型植株表型变化

Fig. 10　Phenotypic changes of overexpressing plants and wild-type plants under low temperature treatment



*、**表示转基因株系和野生型之间差异显著水平分别为 $P < 0.05$、$P < 0.01$。

图 11　低温处理下过表达植株与野生型植株生理指标变化

Fig. 11　Physiological index changes of overexpressing plants and wild-type plants under low temperature treatment

油松全基因组中鉴定出油松 30 个 *PtDof* 基因，而在莱茵衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）中仅鉴定到 1 个 *Dof* 基因，在小立碗藓（*Physcomitrella patens*）中鉴定到 23 个 *Dof* 基因，在江南卷柏（*Selaginella moellendorffiii*）中鉴定到 12 个 *Dof* 基因，在火炬松（*Pinus taeda*）中鉴定到 8 个 *Dof* 基因，在小麦（*Triticum aestivum*）中鉴定到 96 个 *Dof* 基因，这表明 *Dof* 基因家族扩增的数量并不取决于物种的基因组大小、进化的历史时期以及历史地位[14, 24−25]。这一结果打破了“基因家族扩增与物种进化地位正相关”的传统认知，推测 *Dof* 基因家族的扩张可能更多受物种生态适应需求驱动。例如，小麦（*Triticum aestivum*）作为温带作物需应对频繁低温胁迫，其 *Dof* 基因数量显著多于热带起源的水稻[26]。而油松作为北方针叶树，其 *Dof* 基因数量（30 个）也高于同属针叶树的火炬松（8 个），表明 *Dof* 基因数量可能与物种的抗寒需求呈正相关，然而，这一假说需更大样本量的物种数据支撑。

在被子植物中，*Dof* 基因家族成员在低温胁迫中的关键作用已有广泛研究。在草本植物中：拟南芥 Dof 转录因子 *AtCDF*3 可以提高转基因植物对低温胁迫的耐受性[27]；苜蓿（*Medicago truncatula*）*MtDof*32 通过减少水分流失、提高抗氧化酶活性和脯氨酸累积，同时提高低温响应基因表达水平来增强植物的耐寒性[28]；水稻 *OsDof*1 基因可响应低温胁迫，相关转基因实验验证了其调控抗低温能力的功能[11]；甘薯（*Dioscorea esculenta*）中共鉴定 42 个 *Dof* 基因，大部分均可响应低温胁迫[29]。在木本植物中：2 个不同茶树品种在低温条件下，*CsDof*1 和 *CsDof*2 的表达水平均上调[30]；欧李（*Prunus humilis*）*ChDof*11、*ChDof*12 和 *ChDof*17 基因能够快速响应低温胁迫[31]；鹅掌楸（*Liriodendron chinense*）中 *LhDof*6 的过表达增强了植株在−20 ℃ 的抗性[32]。而在针叶树中，*Dof* 基因还未被全基因组鉴定，生物学功能也尚未报道。目前所熟知的植物响应低温信号以 *CBF-COR/ICE*1 调控模块为主。然而在针叶树中并没有鉴定到 *CBF* 基因，推测针叶树可能不利用 *CBF-COR/ICE*1 调控模块响应低温胁迫，而是存在其他调控机制。在本研究中油松 *PtDof*1 基因异源过表达提升了植株抗寒性，表明针叶树 *Dof* 基因在应对低温胁迫时同样发挥关键作用，且属于通过非 CBF 依赖途径来抵御低温胁迫。这一发现不仅丰富了植物低温调控的理论体系，更为解析针叶树独特的抗寒机制开辟了新方向。然而，本研究仅初步探究了油松 *PtDof* 基因在低温下的生物学功能，未明确其下游靶基因及互作蛋白，无法解析其调控通路的分子作用机制。后续

可利用酵母单杂交、ChIP-seq 与 Co-IP 技术，鉴定 *PtDof*1 的下游靶基因及互作转录因子，进一步解析其介导的非 CBF 依赖调控网络的分子机制。

4 结　　论

本研究针对油松依靠非 CBF 途径响应低温胁迫，从生理和转录水平上探究了油松响应低温胁迫的机制。利用全基因组和低温胁迫转录组数据，开展了油松 *PtDof* 基因家族鉴定及系统进化分析，探究了 *PtDof* 基因家族成员在低温下的表达模式，挖掘了响应低温过程的关键基因 *PtDof*1 并进行功能验证。研究得到以下结论。

（1）低温处理后，油松针叶丙二醛含量持续降低，过氧化物酶活性、超氧化物歧化酶活性和脯氨酸含量升高，氧化应激反应生理指标变化明显。

（2）油松基因组中共筛选鉴定出 30 个 *Dof* 基因，其在低温响应过程中的表达模式差异显著，其中 *PtDof*1 与冷胁迫显著相关。

（3）*PtDof*1 过表达提高了转基因拟南芥的抗寒性，植株氧化应激反应显著升高。推测油松 *PtDof*1 基因能够通过非 CBF 依赖途径响应低温胁迫，进而正向调控植物的耐寒性。

研究结果将为针叶树低温胁迫响应的非 CBF 依赖途径提供证据，并进一步为针叶树抗寒遗传改良提供理论基础。

参 考 文 献

[1] 周永学, 樊军锋, 龚月桦, 等. 奥地利黑松的生长特性及抗寒性研究 [J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(6): 53−57.
Zhou Y X, Fan J F, Gong Y H, et al. Growth characteristics and cold resistance of *Pinus nigra* var. *austriaca*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2007, 29(6): 53−57.

[2] 李传胄. 水曲柳物候性状高通量评价及萌动差异耐寒杂种优势形成机制研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2024.
Li C Z. High-throughput evaluation of climatic traits andthe formation mechanism of sprouting differentialcold-tolerant hybrids in *Fraxinus mandshurica*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2024.

[3] 梅闯. *MdNAC*104 转录因子在苹果低温胁迫中的功能和调控机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
Mei C. Study on the function and mechanism of the *MdNAC*104 transcription factor in apple under low-temperature stress[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023.

[4] Wang Y C, Mao Z L, Jiang H Y, et al. A feedback loop involving *MdMYB*108*L* and *MdHY*5 controls apple cold tolerance[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 512(2): 381−386.

[5] Yang G Y, Gao X Q, Ma K H, et al. The walnut transcription factor *JrGRAS*2 contributes to high temperature stress tolerance involving in Dof transcriptional regulation and HSP protein expression[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 367.

[6] Yanagisawa S, Izui K. Molecular cloning of two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif[J]. Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(21): 16028−16036.

[7] Yoshimi U, Tomoko I, Rie Y, et al. The Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain conserved only in higher plants, truly functions as a Cys2/Cys2 Zn finger domain[J]. The Plant Journal, 2004, 37(5): 741−749.

[8] Kim H S, Kim S J, Abbasi N, et al. The DOF transcription factor Dof5.1 influences leaf axial patterning by promoting Revoluta transcription in arabidopsis[J]. The Plant Journal, 2010, 64(3): 524−535.

[9] Inés I L, Isabel D A, Manuel M, et al. SAD: a new DOF protein from barley that activates transcription of a cathepsin B-like thiol protease gene in the aleurone of germinating seeds[J]. The Plant Journal, 2003, 33(2): 329−340.

[10] Xiaolu Z, Daniel M N, Qi S. Interactions of two transcriptional repressors and two transcriptional activators in modulating gibberellin signaling in aleurone cells[J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 176−186.

[11] Liu J, Meng Q L, Xiang H T, et al. Genome-wide analysis of Dof transcription factors and their response tocold stress in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 800.

[12] Xu J Y, Dai H B. Brassica napus cycling Dof factor1 (*BnCDF*1) is involved in flowering time and freezing tolerance[J]. Plant Growth Regulation, 2016, 80: 315−322.

[13] Wang Z, Wang Y, Tong Q, et al. Transcriptomic analysis of grapevine Dof transcription factor gene family in response to cold stress and functional analyses of the *VaDof*17*d* gene[J]. Planta, 2021, 253(2): 55.

[14] Su Y, Liang W, Liu Z J, et al. Overexpression of *GhDof*1 improved salt and cold tolerance and seed oil content in *Gossypium hirsutum*[J]. Journal of Plant Physiology, 2017, 218: 222−234.

[15] 王舒婷. 霍山石斛响应低温低湿的转录因子 *DhDof*5 调控机制初探 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2024.
Wang S T. Preliminary study of molecular mechanism of *DhDof*5 transcription factor in response to low temperature and low humidity in *Dendrobium huoshanensis*[D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicne, 2024.

[16] Moreno-Risueno M A, Martinez M, Vicente-Carbajosa J, et al. The family of DOF transcription factors: from green unicellular algae to vascular plants[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2007, 277(4): 379−390.

[17] Nystedt B, Street N R, Wetterbom A, et al. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution[J]. Nature, 2013, 497: 579−584.

[18] Niu S H, Li J, Bo W H, et al. The Chinese pine genome and methylome unveil key features of conifer evolution[J]. Cell, 2022,

185(1): 204−217.

[19] Qi J S, Song C P, Wang B S, et al. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(9): 805−826.

[20] 田丹青, 葛亚英, 潘刚敏, 等. 低温胁迫对 3 个红掌品种叶片形态和生理特性的影响 [J]. 园艺学报, 2011, 38(6): 1173−1179.
Tian D Q, Ge Y Y, Pan G M, et al. Morphological and physiological characteristics of different cultivars of *Anthurium andraenum* under chilling stress[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(6): 1173−1179.

[21] 刘槟. 代谢组学分析揭示五种常绿树木对自然低温生理适应机制的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2024.
Liu B. Metabolomics analysis reveals the physiological adaptation mechanismof five evergreens to natural low temperature[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024.

[22] 刘俊. 毛竹 Dof 转录因子响应非生物胁迫及影响开花启动的研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2019.
Liu J. Studies on Dof transcription factors from moso bamboo (*Phyllostrachys edulis*) responding abiotic stress and influencing flowering initiation[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2019.

[23] Zhu X, Hong X S, Liu X, et al. Calcium-dependent protein kinase 32 gene maintains photosynthesis and tolerance of potato in response to salt stress[J]. Scientia Horticulturae, 2021, 285: 110179.

[24] Shigyo M, Tabei N, Yoneyama T, et al. Evolutionary processes during the formation of the plant-specific Dof transcription factor family[J]. Plant and Cell Physiology, 2007, 48(1): 179−185.

[25] Liu Y, Liu N N, Dong X, et al. Genome-wide analysis of wheat DNA-binding with one finger (Dof) transcription factor genes: evolutionary characteristics and diverse abiotic stress responses[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 276.

[26] Lijavetzky D, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J. Genome-wide comparative phylogenetic analysis of the rice and arabidopsis Dof gene families[J]. BMC Evolutionary Biology, 2003, 3(1): 17.

[27] Corrales A R, Carrillo L, Lasierra P, et al. Multifaceted role of cycling DOF factor 3 (CDF3) in the regulation of flowering time and abiotic stress responses in arabidopsis[J]. Plant Cell & Environment, 2017, 40(5): 748−764.

[28] 郭涛. 蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)*MtDof*32 调控器官发育及分枝机制研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2021.
Guo T. Study on regulation mechanism of *MtDof*32 on organ development and branching in *Medicago truncatula*[J]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014.

[29] 靳容, 蒋薇, 刘明, 等. 甘薯 *Dof* 基因家族挖掘及表达分析 [J]. 作物学报, 2022, 48(3): 608−623.
Jin R, Jiang W, Liu M, et al. Genome-wide characterization and expression analysis of *Dof* family genes in sweetpotato[J]. Acta Agronomica Sinca, 2022, 48(3): 608−623.

[30] 李辉, 黄蔚, 刘志薇, 等. 茶树两个 Dof 转录因子的分离及其在温度胁迫中的响应分析 [J]. 茶叶科学, 2016, 36(3): 312−322.
Li H, Huang W, Liu Z W, et al. Isolation and expression analysis of two temperature responsive *Dof* genes from *Camellia sinensis*[J]. Journal of Tea Science, 2016, 36(3): 312−322.

[31] 赵雅欣, 郭夕雯, 郭子微, 等. 欧李 *Dof* 基因家族鉴定及非生物胁迫表达分析 [J]. 经济林研究, 2023, 41(1): 143−153.
Zhao Y X, Guo X W, Guo Z W, et al. Identification of *Dof* gene family and analysis of abiotic stress expression in *Cerasus humilis*[J]. Non-wood Forest Research, 2023, 41(1): 143−153.

[32] Liao B, Liang P, Tong L, et al. The role of Liriodendron *Dof* gene family in abiotic stress response[J]. Plants (Basel), 2024, 13(14): 2009.

（责任编辑　赵田芸
责任编委　马履一）