

刘 丹, 梁 丹, 王建贺, 等. 小麦 *TaBES1/BZR1* 基因的克隆及其在祖先种和六倍体小麦中的序列比较[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 238-240.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.034

# 小麦 *TaBES1/BZR1* 基因的克隆及其在祖先种和六倍体小麦中的序列比较

刘 丹<sup>1</sup>, 梁 丹<sup>1</sup>, 王建贺<sup>1</sup>, 王从磊<sup>1</sup>, 崔燕娇<sup>2</sup>, 时晓伟<sup>1</sup>, 冯 刚<sup>1</sup>, 刘正理<sup>2</sup>

(1. 天津市农作物研究所, 天津 300384; 2. 唐山师范学院生命科学系, 河北 唐山 063000)

关键词: 小麦; 祖先种; 油菜素内酯; *BES1/BZR1*; 序列分析

中图分类号: S512.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2019)01-0238-03

## Cloning and sequences analysis of *TaBES1/BZR1* in ancestors and hexaploid wheat

LIU Dan<sup>1</sup>, LIANG Dan<sup>1</sup>, WANG Jian-he<sup>1</sup>, WANG Cong-lei<sup>1</sup>, CUI Yan-jiao<sup>2</sup>, SHI Xiao-wei<sup>1</sup>, FENG Gang<sup>1</sup>, LIU Zheng-li<sup>2</sup>

(1. Tianjin Crop Research Institute, Tianjin 300384, China; 2. Tangshan Normal University, Tangshan 063000, China)

Key words: wheat; ancestors; brassinosteroids; *BES1/BZR1*; sequence analysis

高温、冻害、土壤盐渍化等非生物胁迫已经成为小麦稳产高产的重要限制因素<sup>[1-3]</sup>。解决这一问题的根本途径在于培育抗逆性强的小麦新品种,并在生产上进行大面积应用,而挖掘和利用与抗逆性密切相关的关键基因能够为培育抗逆性强的小麦品种提供重要的基因资源,因而与抗逆性相关的信号通路及信号通路上的关键基因的功能及序列特征的解析业已成为研究人员关注的热点。油菜素内酯(BR)被称为植物的第六大激素,其类似物在细胞伸长与分裂、维管束分化、叶片形态发生、植物育性、衰老及抗逆性中发挥重要的调节作用。外施油菜素内酯可以提升植物对盐胁迫的抵御能力<sup>[4]</sup>。拟南芥中的研究表明,*BES1/BZR1* 是油菜素内

酯(BR)信号通路上的关键转录因子,其活性高低决定着 BR 信号通路的开放与关闭<sup>[5-8]</sup>。在棉花中,*BES1/BZR1* 的表达受到了干旱的诱导<sup>[9]</sup>;水稻中过表达拟南芥 *BES1/BZR1* 基因的转基因株系的耐盐能力明显提升,表明 *BES1/BZR1* 与植物抵御非生物胁迫的生物学过程密切相关,并起到了正向调控的作用<sup>[5,10-12]</sup>。在小麦中目前尚未见对该基因的克隆及序列分析等相关研究的报道。

小麦为异源六倍体作物,基因组信息庞大,基因结构复杂,存在着多种基因形态,而基因形态在不同品种中的差异又为基因的标记开发提供了可能。如通过单倍型及关联分析的方式挖掘优异等位基因,为基因在育种中的直接利用奠定了坚实的基础<sup>[13]</sup>。本研究通过在六倍体小麦、小麦祖先种中分离 *TaBES1/BZR1* 基因,并对该基因进行相关的生物信息学分析,研究该基因的序列特征,为以后该基因功能研究及育种利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 小麦材料

所用小麦材料为沧麦 119(六倍体冬小麦)、辽春 10 号(六倍体春小麦)、3 份乌拉尔图小麦(*Triticum urartu*, AA,

收稿日期: 2018-06-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0101001); 天津市科技计划项目(17ZXZYENC00040、16ZXZYNC00140); 天津市农业科学院院长基金项目(16001)

作者简介: 刘 丹(1989-),女,河北沧州人,硕士,助理研究员,主要从事小麦抗逆基因克隆相关研究。(E-mail) dannieliu89@126.com

通讯作者: 冯 刚, (E-mail) Fg7195@aliyun.com; 刘正理, (E-mail) liuzhengli65@126.com

$2n=2x=14$ ), 2 份粗山羊草 (*Aegilops tauschii*, DD,  $2n=2x=14$ ), 上述材料由天津市农作物研究所提供。沧麦 119 和辽春 10 号亲缘关系较远, 冬、春性不同, 地理来源不同, 耐盐、抗旱、抗冻能力存在较大差异。

生长条件: 在生长箱中, 采用 12 h 光照, 12 h 黑暗, 28 °C, 4 500 lx 育苗, 种子萌发至一叶一心时, 部分植株用于 DNA 提取, 另一部分植株 4 °C 处理 1 h, 迅速取叶片及根系于 2.0 ml 的离心管中, -80 °C 贮存, 待提取 RNA 用。

## 1.2 DNA、RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

采用天根生化科技有限公司的植物 DNA 提取试剂盒 (DP321) 和多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441) 分别进行 DNA 和 RNA 提取, 采用 Thermo 的 RevertAid Strand cDNA Synthesis Kit 进行 cDNA 合成。DNA、RNA 及 cDNA 提取后储存 -20 °C 冰箱中, 待使用。

## 1.3 聚合酶链式反应

以拟南芥、玉米中公布的 *BES1/BZR1* 序列为参照, 利用项目组构建的本地序列比对系统对 A、D 基因组 (A 基因组: <http://gigadb.org/dataset/100050>; D 基因组: <http://gigadb.org/dataset/100054>) 进行序列比对, 搜寻小麦中 *BES1/BZR1* 的序列; 通过小麦祖先种的 *BES1/BZR1* 序列信息, 采用 Primer premier 5.0 软件设计克隆引物, *TaBES1/BZR1*-F: 5'-AGGAGCAGGGGAGCTAGCATG-3'; *TaBES1/BZR1*-R: 5'-CATTTGTGAGTGCCAGTGCAAT-3', 用于分离基因组序列及编码区序列。

采用 15  $\mu$ l 体系,  $T_m=53$  °C, 以小麦材料的 DNA 为模板进行基因组扩增, 所用高保真酶为 TransStart® FastPfu DNA Polymerase。

## 1.4 测序

将上述 PCR 产物, 采用 1.2% 的琼脂糖进行凝胶电泳, 并对目的条带进行切胶回收, 与 Blunt 载体连接, 通过热击法转入大肠杆菌中, 挑取 12 个单克隆, 送至中科希林生物科技有限责任公司测序。

## 1.5 生物信息学分析

使用以下网站及本地软件进行系列生物信息学分析。基因结构预测: <http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>; 氨基酸序列比对: DNAMAN; 进化分析: MAGE 7.0。

# 2 结果与克隆

## 2.1 *TaBES1/BZR1* 的克隆

在沧麦 119 的 cDNA 中分离得到长为 942 bp 的编码区序列, 在沧麦 119 及辽春 10 号的基因组中分离得到长度为 1 087 bp 的基因组序列。该基因存在 2 个外显子及 1 个内含子, 内含子占该基因序列的 13.34%, 位于 256~402 bp 处。

## 2.2 *TaBES1/BZR1* 结构特性分析

通过对沧麦 119 中 cDNA 克隆序列进行手动六框翻译, 得到了 1 条长度为 313 个氨基酸残基的片段。通过 NCBI 上

公布的部分 *BES1/BZR1* 序列信息及潜在的序列信息进行氨基酸序列比对, 并通过 MEGA 7.0 构建 NJ 进化树。结果表明, 小麦的氨基酸序列与大麦、二穗短柄草及水稻的 *BES1/BZR1* 的氨基酸序列聚成 1 类, 因此命名此序列为 *TaBES1/BZR1*。氨基酸结构分析结果表明, 在该氨基酸的 N 端具有 DUF822 结构域, 为典型的 *BES1/BZR1* 转录因子所具有的保守结构域, 与大豆、高粱、谷子中的 *BES1/BZR1* 氨基酸序列进行比较发现, DUF822 结构域的前端在大豆、高粱、谷子和小麦中高度一致。

## 2.3 祖先种中 *TaBES1/BZR1* 序列分析

在小麦祖先种 A、D 基因组的供体 3 份乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu*, AA), 2 份粗山羊草 (*Aegilops tauschii*, DD) 中进行 *TaBES1/BZR1* 的克隆。测序结果表明, 在上述 5 个祖先种中, 每种材料仅得到 1 种序列, 其中 A 基因组的 3 个供体中每个材料的序列都存在差异, 但差异不大, 而 D 基因组的 2 个供体的序列一致。

## 2.4 *TaBES1/BZR1* 同源基因查找

通过将氨基酸的保守结构进行提取, 并结合 Ensemble 数据库中的数据信息进行查找发现, 具有与 DUF822 结构域相似性较高的序列一共有 22 条, 其中有 4 条与 *TaBES1/BZR1* 相似度超过 90%。表明该基因位于小麦第二同源群的 2AS、2BS、2DS 上。

## 2.5 *TaBES1/BZR1* 在沧麦 119 和辽春 10 号中的序列分析

经过测序发现, 在六倍体冬小麦沧麦 119 中得到 5 种序列, 而在春小麦辽春 10 号中得到 4 种序列。分析结果表明, 沧麦 119 的 01 序列和辽春 10 号的 01 序列一致率为 100%, 且与祖先种 AA 供体聚类在一组, 说明该序列来源于 A 基因组。辽春 10 号 03 序列和沧麦 119 的 03、05 号序列相似度较高, 且来源于 D 基因组。

# 3 讨论

植物通过多种信号通路参与植物对非生物胁迫的响应, 外施油菜素内酯能够提高小麦对盐胁迫的抵御能力<sup>[14-15]</sup>, 说明油菜素内酯信号通路参与了小麦对非生物胁迫的反应, 而 *BES1/BZR1* 作为油菜素内酯的关键转录因子, 控制着油菜素内酯信号通路的开放与关闭, 暗示其在小麦抵御盐胁迫中起着重要的作用。

祖先种中的序列分析结果表明, D 基因组的 2 个供体材料中 *BES1/BZR1* 序列完全一致, 而在 3 个 A 基因组的供体材料中序列都不相同, 但差异不大。项目组研究发现无论是 A 基因组还是 D 基因组中序列信息显示, A 基因组供体的 *BES1/BZR1* 序列相似度在 99.0% 以上, 而 D 基因组供体的 *BES1/BZR1* 序列相似度为 97.2%。说明该基因在 A、D 基因组上存在一定的差异, 为设计基因组特异引物在六倍体中分离单一来源的 *BES1/BZR1* 基因组序列提供了可能。

从 A、D 祖先种的序列进化分析结果可以看出, 沧麦 119

和辽春 10 号的 01 序列一致,且来自于 A 基因组;沧麦 119 的 03、05 序列及辽春 10 号的 03 序列来源于 D 基因组,且在六倍体小麦中存在差异,这为该基因在 D 基因组上开发标记提供了可能。因此小麦 *BES1/BZR1* 在育种上的应用具有较大价值,可通过进行多种耐逆性状的关联分析深入研究该基因的功能,并将其开发成可用的分子标记,辅助育种选择,加速育种进程。

## 参考文献:

- [1] LIANG D, WANG J, LIU D, et al. The effect on germination and seedlings of wheat under different salt stresses [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2016, 17(11): 2564-2568.
- [2] 高树涛, 石生伟. 盐胁迫对 5 种抗旱型小麦苗期生理特性的影响[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(8): 1374-1380.
- [3] 曹荣珍, 闻珊珊. 小麦 *TaNIP4-I* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. *麦类作物学报*, 2017, 37(10): 1285-1293.
- [4] LIY X, YANG Q, WANG Y, et al. Brassinosteroids regulate pavement cell growth by mediating BIN2-induced microtubule stabilization [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(5): 1037-1049.
- [5] CHEN J, NOLAN T, YE H, et al. Arabidopsis WRKY46, WRKY54 and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought response [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(6): 1425.
- [6] QIAO S, SUN S, WANG L, et al. The RLA1/SMOS1 transcription factor functions with OsBZR1 to regulate brassinosteroid signaling and rice architecture [J]. *Plant Cell*, 2017, 29(2): 292.
- [7] YEH Y H, PANZERI D, KADOTA Y, et al. The arabidopsis Malectin-Like/LRR-RLK IOS1 is critical for BAK1-Dependent and BAK1-Independent Pattern-triggered immunity [J]. *Plant Cell*, 2016, 28(7): 1701.
- [8] ZHANG B, WANG X, ZHAO Z, et al. OsBRI1 activates BR signaling by preventing binding between the TPR and kinase domains of OsBSK3 via phosphorylation [J]. *Plant Physiology*, 2016, 170(2): 1149.
- [9] 安汶铠, 常 丹, 张富春. 干旱胁迫下棉花幼苗转录因子 *BES1/BZR1* 对外源油菜素内酯的响应表达特征 [J]. *西北植物学报*, 2015, 35(7): 1311-1316.
- [10] SAITO M, KONDO Y, FUKUDA H. BES1 and BZR1 redundantly promote phloem and xylem differentiation [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2018, 59(3): 590.
- [11] SHIGETA T, ZAIZEN Y, SUGIMOTO Y, et al. Heat shock protein 90 acts in brassinosteroid signaling through interaction with BES1/BZR1 transcription factor [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 178: 69-73.
- [12] YE H, LIU S, TANG B, et al. RD26 mediates crosstalk between drought and brassinosteroid signalling pathways [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14573.
- [13] 聂新辉, 尤春源, 鲍 健, 等. 基于关联分析的新陆早棉花品种农艺和纤维品质性状优异等位基因挖掘 [J]. *中国农业科学*, 2015, 48(15): 2891-2910.
- [14] HE F, XU C, FU X, et al. The microRNA390/TRANS ACTING SHORT INTERFERING RNA3 module mediates lateral root growth under salt stress via the auxin pathway. [J]. *Plant Physiology*, 2018, 177(2): 775-791.
- [15] LIU L, WU X, QIANG Z. Research progress of abiotic stress responsive signal pathway in plant [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(2): 614-625.

(责任编辑:陈海霞)