

小麦 *TabHLH123-6A* 基因克隆与功能标记开发

王晋萍^{1,2}, 李 龙², 贾小云³, 贺立恒¹, 李超男², 景蕊莲²

(¹ 山西农业大学农学院, 太谷 030801; ² 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ³ 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801)

摘要: 根系是植物吸收水分与养分的重要器官, 挖掘利用小麦根系相关调控基因对于粮食生产具有重要意义。bHLH (basic Helix-Loop-Helix) 是植物中广泛存在的一类转录因子, 参与调节植物的生长发育。本研究克隆了小麦基因 *TabHLH123-6A*, 其开放阅读框 1386 bp, 编码 461 个氨基酸, 含有保守的 HLH 结构域, 具有典型的 bHLH 家族成员特性。对其互作蛋白预测分析发现, *TabHLH123-6A* 与 HLH 家族的其他蛋白以及锌指蛋白存在相互作用。组织表达模式分析表明, *TabHLH123-6A* 在小麦不同生育时期的各个组织中均有表达, 在根和根基中表达量较高。启动子序列分析显示 *TabHLH123-6A* 启动子区含有多种顺式作用元件, 包括生长素、脱落酸和茉莉酸甲酯等激素应答元件。qRT-PCR 检测结果表明在生长素、脱落酸和茉莉酸甲酯的处理下 *TabHLH123-6A* 表达均上调, 但是在 PEG 模拟的干旱处理下其表达受到抑制。利用小麦多态性群体材料检测到 *TabHLH123-6A* 基因 25 bp 处有 1 个核苷酸变异位点 (C/T), 表示为 *TabHLH123^{25-C/T}*, 根据该位点开发了功能标记 dCAPS-KpnI。关联分析发现 *TabHLH123^{25-C/T}* 与小麦深根比显著相关, 且等位变异类型为 *TabHLH123^{25-C}* 的小麦深根比高于 *TabHLH123^{25-T}*, *TabHLH123^{25-T}* 在小麦育种历史中受到了正向选择。本研究结果为小麦根系构型改良提供了理论依据和基因资源。

关键词: 小麦; *TabHLH123-6A*; 表达模式; 功能标记; 根系构型

Cloning and Functional Marker Development of Wheat Gene *TabHLH123-6A*

WANG Jin-ping^{1,2}, LI Long², JIA Xiao-yun³, HE Li-heng¹, LI Chao-nan², JING Rui-lian²

(¹ College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, ³ College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801)

Abstract: The root system is a major organ for water and nutrient uptake. Exploration and utilization of the genes that regulate root development are important for enhancing wheat production. bHLH (basic Helix-Loop-Helix), a transcription factor family widely present in plants, plays an essential role in regulating the growth and development of plants. In this study, the *TabHLH123-6A* gene was isolated based on sequence homology, with an open reading frame of 1386 bp that encodes a protein comprises of 461 amino acids containing a conserved HLH domain. Based on the prediction of interacting proteins, *TabHLH123-6A* might be able to interact with HLH family members and zinc finger proteins. qRT-PCR analysis revealed the transcript of *TabHLH123-6A* in various tissues of wheat at different stages, with higher expression level in roots and root bases than that of other tissues. The promoter sequence analysis detected a number of *cis*-acting elements, including hormone response elements such as auxin, abscisic acid and methyl jasmonate. The expression of *TabHLH123-6A* was inducible under the treatments of auxin, abscisic acid or methyl jasmonate, but significantly repressed by PEG treatment. A nucleotide variation (C/T) at 25 bp of *TabHLH123-6A* gene (designated as *TabHLH123^{25-C/T}*) was found using a panel of

收稿日期: 2022-04-15 修回日期: 2022-04-23 网络出版日期: 2022-05-10

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220415001>

第一作者研究方向为小麦基因资源挖掘与功能验证, E-mail: 18734421840@163.com

通信作者: 贺立恒, 研究方向为旱作及作物生理, E-mail: sxndhlh@163.com

李超男, 研究方向为作物抗逆生物学, E-mail: lichaonan@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31571611); 黄土高原特色作物优质高效生产省部共建协同创新中心基金项目 (SBGJXTZX-29)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (31571611); Research Program Sponsored by Ministerial and Provincial Co-Innovation Centre for Endemic Crops Production with High-quality and Efficiency in Loess Plateau (SBGJXTZX-29)

wheat accessions. A functional marker dCAPS-*KpnI* of *TabHLH123-6A* was developed to target this polymorphic site. Association analysis showed this polymorphism being significantly correlated with the ratio of deep root in wheat. The ratio of deep root with *TabHLH123*^{25-C} allele is higher than that of *TabHLH123*^{25-T}, and the frequency of *TabHLH123*^{25-T} has been positively selected in the breeding process. Collectively, this study provided the theoretical basis and a locus for the improvement of wheat root system architecture.

Key words: wheat; *TabHLH123-6A*; expression pattern; functional marker; root system architecture

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是人类的主粮作物之一, 在世界各地广泛种植, 适应性强^[1]。我国是小麦的生产和消费大国, 小麦产量直接关系到国家的粮食安全。根系是小麦吸收土壤水分和养分的重要器官, 根系构型是描述根系组成在三维空间的立体分布, 良好根系构型有利于植株获取更多的水肥, 减轻逆境影响, 保持稳产^[2]。Kirkegaard 等^[3]在田间自然条件下检测了小麦扎根深度与土壤含水量, 发现扎根深度每增加 30 cm, 就能够在籽粒灌浆期多吸收相当于 10 mm 降雨量的水分, 使得每 hm^2 增产 500 kg。不仅如此, 不同土层根系的吸水能力存在较大差异, 冬小麦 100 cm 以下的根量仅占总根量的 3%, 但吸水量却占总吸水量的 20%^[4]。因此, 深层根系比例 (深根比, 即深层土壤与浅层土壤中的根系重量比值) 是作物生产相关的重要根系构型特征, 研究深根比将有助于提高作物的耐逆性和生产力。然而, 小麦根系深埋于土壤中, 观测困难, 这极大地限制了对根系多层面的深入研究和改良^[5]。发掘和利用小麦根系生长调节基因, 尤其是优异等位基因及其分子标记, 是加速分子育种进程的重要基础, 具有重大的应用潜力^[6]。与传统形态标记、生化标记相比, 分子标记具有准确性高、操作快速简便、可信度大、周期短、不受外界环境影响等优点^[7], 对于根系构型的遗传改良具有重要意义。

bHLH 转录因子广泛存在于真核生物中, 是植物中第二大转录因子超家族。bHLH 得名于 50~60 个氨基酸组成的高度保守结构域, 包括 N 端一段碱性区域 (basic region), 以及 C 端两个疏水性 α -螺旋 (Helix 1-Helix 2) 和环 (Loop) 组成的螺旋-环-螺旋 (HLH, Helix 1-Loop-Helix 2) 结构^[8]。bHLH 区域内某些保守氨基酸决定了其对下游基因识别位点的特异性, 例如 Glu-13 和 Arg-16 是必不可少的, 在 50% 植物 bHLH 蛋白中均发现了这两个氨基酸残基^[9], 这使得 bHLH 转录因子能够与下游靶基因 5' 端上游特定顺式作用元件结合, 调控基因的表达^[10]。目前植物转录因子数据库 PlantTFDB (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 已收录了来自 166 个物种的 28698 个

bHLH 转录因子, 其中小麦中的 bHLH 转录因子多达 324 个^[11], 但多数基因功能尚未被注释。

本研究利用生物信息学方法分析 *TabHLH123-6A* 基因及其编码的蛋白序列, 检测其在小麦不同组织和多种激素处理下的表达模式, 同时检测 *TabHLH123-6A* 的序列多态性, 根据其核苷酸变异位点开发分子标记, 发现了与深根比相关的优异等位变异。本研究为小麦根系构型的遗传改良提供了理论依据, *TabHLH123-6A* 分子标记在小麦分子标记辅助育种中具有应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦品种旱选 10 号用于基因表达量的检测分析, 通过 SSR 标记筛选得到的 32 份高多态性小麦材料用于 *TabHLH123-6A* 基因多态性分析^[12], 由 323 份普通小麦材料组成的自然群体用于基因型与根系性状的关联分析, 该群体包含 275 个现代育成品种、36 个高代品系和 12 个地方品种, 主要来自我国黄淮冬麦区和北部冬麦区^[13]。

1.2 试验方法

1.2.1 基因表达模式分析 用于幼苗期基因组织表达模式分析的小麦, 种植于 25 °C 16 h / 20 °C 8 h (光照 / 黑暗) 的人工气候室, 培养两周后对其叶、根基、根进行取样。用于拔节期、抽穗期表达模式分析的小麦种植于中国农业科学院作物科学研究所试验基地 (116° 28' E, 39° 48' N), 利用聚氯乙烯 (PVC) 硬管和软质塑料管套装的管栽法培养材料^[13], 分别在拔节期、抽穗期, 对地上部和地下部不同组织进行取样, 用于 RNA 提取。用于不同激素和模拟干旱胁迫处理的小麦材料种植于气候室, 采用去离子水培养两周左右, 待生长至一叶一心, 换用不同激素: 0.1 mmol/L 生长素 (IAA, indole 3-acetic acid)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 茉莉酸甲酯 (MeJA, methyl jasmonate)、50 $\mu\text{mol/L}$ 的脱落酸 (ABA, abscisic acid), 以及 16.1% 的 PEG6000 溶液模拟干旱处理, 在处理 0、1、2、3、6、12、24、72 h 对根系进行取样。

1.2.2 根系表型鉴定 苗期根系表型鉴定采用二维凝胶法^[14],即利用玻璃板(长×宽=50×25 cm)、塑料胶条和琼脂凝胶(1%, m/V)构建凝胶室,沿凝胶室顶端下方3 cm的水平线播种,每室播种15粒,种子间隔3 cm,将播种后的凝胶室置于人工气候室,培养7 d后,利用根系扫描系统(Epson Expression 10000XL)记录根系形态,调查幼苗根长、根角度及根数目。分蘖期、孕穗期和灌浆中期根系表型鉴定采用管栽法,每管播种8粒,待小麦生长至三叶期,定苗至3株。培养30 d后,对其分蘖期根系性状进行调查。从底端开始清洗根系,最先在底部发现根系的位置与根基部之间的距离,即为根深。剪下完整根系,105℃杀青30 min,80℃烘干至恒重,称量根干重。孕穗期、灌浆中期根深、根干重的测量采用相同的方法。除此之外,在灌浆中期,对清洗后的根系在60 cm处进行分割,将60 cm以下和60 cm以上根系分别进行烘干、称重,计算深根比,即60 cm以下根干重占60 cm以上根干重的比例。试验采用随机完全区组设计,3次重复。

1.2.3 DNA和RNA的提取 采用CTAB法提取小麦样品的DNA。采取Trizol法提取样品的RNA,参照RNA提取试剂盒KKFast PlantRNApure Kit(ZP405K, ZOMANBIO)说明书及步骤进行。

1.2.4 实时荧光定量PCR 利用RT试剂盒(KR116-02, TIANGEN)将RNA反转录合成cDNA。使用SYBR Premix Ex Taq™(RR420A, TaKaRa)进行实时荧光定量PCR。根据*TabHLH123-6A*基因序列设计出特异引物qRT-*TabHLH123-6A-F/R*(表1),以小麦*TaTUBULIN*基因作为内参,计算基因相对表达水平。

1.2.5 基因序列多态性分析 通过网站WheatOmics得到*TabHLH123-6A*基因序列(ID: Traes CS6 A02G254300),利用Premier 5软件设计*TabHLH123-6A*特异性引物序列*TabHLH123-6A-F/R*,以扩增其编码区全长。以32份高多态性小麦的基因组DNA为模板,采用PCR高保真DNA聚合酶TransStart FastPfu DNA Polymerase(AP221, TRAN)进行基因扩增,反应程序为:①95℃5 min;②95℃30 s;③61℃30 s;④72℃2 min;35个循环从②到④;⑤72℃10 min。随后在PCR产物中加入6×Loading buffer进行凝胶电泳,在紫外灯下切胶回收目的条带,用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(TD407-50, TIANMO BIOTECH)回收目的DNA片段。将目的片段连接于pEASY-Blunt Cloning载体(CB101,

TRAN),转化大肠杆菌Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell感受态细胞(CD501, TRAN),具体操作参考对应说明书。通过菌液PCR检测,选出阳性单克隆,利用引物M13F/R、Seq-F1、Seq-F2进行测序,SeqMan软件比对分析测序结果,统计其多态性位点。

1.2.6 dCAPS标记开发和关联分析 根据32份高多态性小麦材料中*TabHLH123^{25-CT}*等位变异,通过dCAPS Finder 2.0网站,设计dCAPS引物*TabHLH123-6A-KpnI-dCAPs-F/R*,用于鉴定323份小麦材料组成的自然群体中*TabHLH123-6A*基因型。采用TASSEL 5软件的一般线性模型(GLM, general liner model)分析基因型与根系性状的关联情况, $P<0.05$ 视为显著水平。利用SPSS软件对两种等位变异类型*TabHLH123^{25-CT}*的表型性状进行统计分析。

1.2.7 试验中所用引物和网址 本试验中所用的引物见表1,由北京六合华大基因科技有限公司合成。根据WheatOmics基因的克隆结果,利用GSDS对基因结构进行分析,并推导出氨基酸序列;利用SMART对蛋白结构域和蛋白互作网络进行预测分析;利用Phyre2对其二级结构进行预测;通过ExPASy-ProtScale分析蛋白的亲疏水性;蛋白三级结构预测通过SWISS-MODEL进行分析;利用ProtParam对蛋白质的基本理化性质进行分析;使用PlantCARE对启动子区顺式作用元件进行预测分析;通过dCAPS Finder 2.0设计dCAPS分子标记;这些生物信息学分析网址详见表2。

表1 试验所用引物列表

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence(5'-3')
<i>TabHLH123-6A-F</i>	AGCTGTCTGTCTGATGACAGTCTTC
<i>TabHLH123-6A-R</i>	AAACGCAAAGAGAGGAACGA
M13F	GTAACGACGCGCCAGT
M13R	CAGGAA ACAGCTATGAC
Seq-F1	ATCCATGTCATCGCAAGTC
Seq-F2	TGATACAGTGACTTGCCAATG
qRT- <i>TabHLH123-6A-F</i>	TCTATCGGCGGCTACAAACC
qRT- <i>TabHLH123-6A-R</i>	GCTTTCTCGCCTTTCCTCAG
<i>TaTUBULIN-F</i>	CGTGCTGTCTTTGTAGATCTCG
<i>TaTUBULIN-R</i>	GACCAGTGCAGTTGTCTGAAAG
<i>TabHLH123-6A-KpnI-dCAPs-F</i>	TATGCATCTGCACGCAGGCGAGGGG
<i>TabHLH123-6A-KpnI-dCAPs-R</i>	AGGTCGAGCCATCGAGGAGA

表 2 试验所用软件网址列表
Table 2 Software and websites used in this study

软件 Software	用途 Function	详细网址 Website
WheatOmics	序列下载	http://202.194.139.32/#
GSDS	序列分析	http://gsds.gao-lab.org/
SMART	蛋白质结构域预测	http://smart.embl.de/
Phyre2	蛋白质二级结构预测	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index
ExPASy	亲疏水性分析	https://web.expasy.org/protscale/
SWISS-MODEL	蛋白三级结构预测	https://swissmodel.expasy.org/
ProtParam	理化性质分析	https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam
SMART	互作蛋白预测	http://smart.embl.de/
PlantCARE	顺式作用元件预测	https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/
dCAPS Finder 2.0	dCAPS 标记设计	http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html

2 结果与分析

2.1 *TabHLH123-6A* 序列分析

通过 GSDS 和 WheatOmics 分析 *TabHLH123-6A* 基因及其内含子与外显子分布,结果表明该基因位于小麦染色体 6A 上,序列全长 5643 bp,包括编码区 2566 bp,非编码区 3077 bp,由 7 个外显子和 6 个内含子构成(图 1a),最大开放阅读框 1386 bp,编码 461 个氨基酸。SMART 分析显示 *TabHLH123-6A* 蛋白第 345 至 389 位氨基酸为 HLH 保守结构域(图 1b)。利用 Phyre2 对其二级结构预测,发现 *TabHLH123-6A* 含有 15 个 α 螺旋,2 个 β 折叠,对应的氨基酸分别占总氨基酸数 28% 和 3%(图 1c)。通过 ProtScale 分析 *TabHLH123-6A* 蛋白的亲疏水性, Amino acid scale 参数为默认 Hphob./Kyte & Doolittle,分析发现第 163 个氨基酸标度值最大,为 1.760,表明该氨基酸的疏水性最强。第 195 位氨基酸亲水性最强,其标度值为 -3.522(图 1d)。不稳定性指数(II)为 50.73,可归为不稳定蛋白。利用 SWISS-MODEL 对 *TabHLH123-6A* 结构域三级结构进行预测,结果显示含有典型的螺旋-环-螺旋结构域(图 1e)。

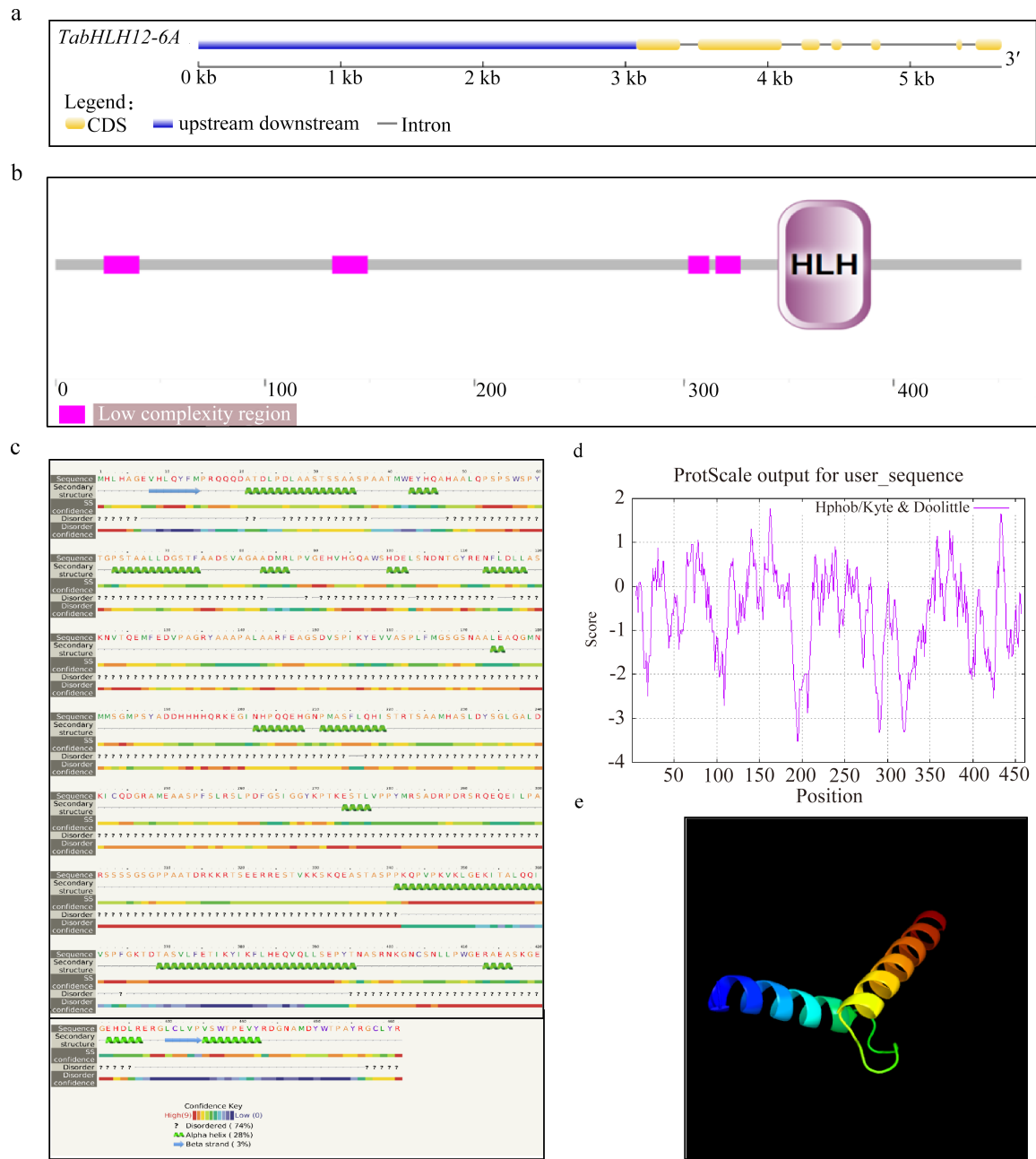
通过 ProtParam 分析 *TabHLH123-6A* 蛋白序列,结果显示,其分子式为 $C_{2191}H_{3395}N_{633}O_{693}S_{19}$,含总原子数 6931,分子质量为 50301.02,等电点为 6.06,脂肪系数 61.74,总平均亲水性 -0.610,其氨基酸组成中丙氨酸含量最高,有 54 个,占总氨基酸数目的 11.71%(图 2a)。利用 SMART 预测 *TabHLH123-6A* 的互作蛋白,发现其主要与含有锌指结构域的蛋白(Traes_3DL_7E0F183DA.1、

Traes_7AL_1E62CBC95.1、Traes_7AL_3BC7FE4B7.1、Traes_7BL_D5434A287.1、Traes_7BL_E2BB2BEA6.1、Traes_7DL_5BA698633.1、Traes_7DL_C54D10538.1)和螺旋-环-螺旋结构蛋白(Traes_5AL_F6FD8FEFF.1、Traes_5BL_DB5410008.2、Traes_5DL_1CD573458.2)存在互作(图 2b)。

2.2 *TabHLH123-6A* 基因表达量检测

为了明确 *TabHLH123-6A* 在小麦中的时空表达模式,利用 qRT-PCR 检测 *TabHLH123-6A* 在小麦幼苗期、拔节期及抽穗期各组织中的表达量,结果显示, *TabHLH123-6A* 在小麦幼苗期、拔节期及抽穗期各组织中均有表达。在小麦幼苗期, *TabHLH123-6A* 在根与根基中的表达量显著高于叶片(图 3a);在拔节期,在倒三节、根基、0~30 cm、30~60 cm 及 60~90 cm 的根中的表达量显著高于其他部位(图 3b);在抽穗期,根基及 0~30 cm、30~60 cm、60~90 cm、90~120 cm、120~150 cm 的根中表达量显著高于其他部位(图 3c)。综上, *TabHLH123-6A* 在小麦叶片中的表达量较低,但在根和根基中表达量较高,这表明 *TabHLH123-6A* 可能参与调控小麦根系的生长发育。

采用在线软件 PlantCARE 分析 *TabHLH123-6A* 启动子区序列的顺式作用元件,发现在起始密码子 ATG 上游 3000 bp 序列内,除含有核心启动子元件 TATA-box 和 CAAT-box 基本顺式作用元件外,还含有生长素、脱落酸、茉莉酸甲酯等激素和光响应元件、与分生组织活性相关以及 DREB、MYB 和 WRKY 蛋白结合元件(表 3),预示 *TabHLH123-6A* 可能参与生长素、脱落酸、茉莉酸甲酯等激素和干旱胁迫应答。



a: 基因结构分析; b: 蛋白结构域的预测分析; c: 蛋白二级结构预测; d: 蛋白序列亲疏水区域分布预测, 横坐标为氨基酸残基数, 纵坐标表示相对的亲疏水区, 零点以上为疏水区, 零点以下为亲水区; e: 蛋白结构域三级结构预测

a: Gene structure analysis; b: Prediction and analysis of protein domain; c: Protein secondary structure prediction; d: Prediction of hydrophobic region distribution of protein sequences; the abscissa represents the number of amino acid residue, and the ordinate represents the relative hydrophilic and hydrophobic region. Above and below zero are regarded as hydrophobic and hydrophilic regions, respectively;

e: Protein domain tertiary structure prediction

图 1 *TabHLH123-6A* 基因和蛋白结构预测

Fig.1 Structure prediction of *TabHLH123-6A* gene and protein

为了明确 *TabHLH123-6A* 是否参与对生长素、茉莉酸甲酯、脱落酸信号和干旱胁迫的应答, 检测了其在这些处理条件下的表达量。在 0.1 mmol/L IAA 处理下, *TabHLH123-6A* 的表达量从处理 1 h 至 72 h 显著上调表达; 在 50 μ mol/L ABA 处理后 24、48、72 h 基因表达量显著上调; 在 0.1 μ mol/L

MeJA 处理的前 6 h, *TabHLH123-6A* 的表达量都显著上调, 3 h 时表达量最高; 在 PEG 模拟的干旱处理下, *TabHLH123-6A* 表达量整体呈下降趋势, 在 2 h 时表达量最低, 在 3 h 时表达量最高。该结果表明 *TabHLH123-6A* 参与生长素、茉莉酸甲酯、脱落酸信号和干旱胁迫应答过程。

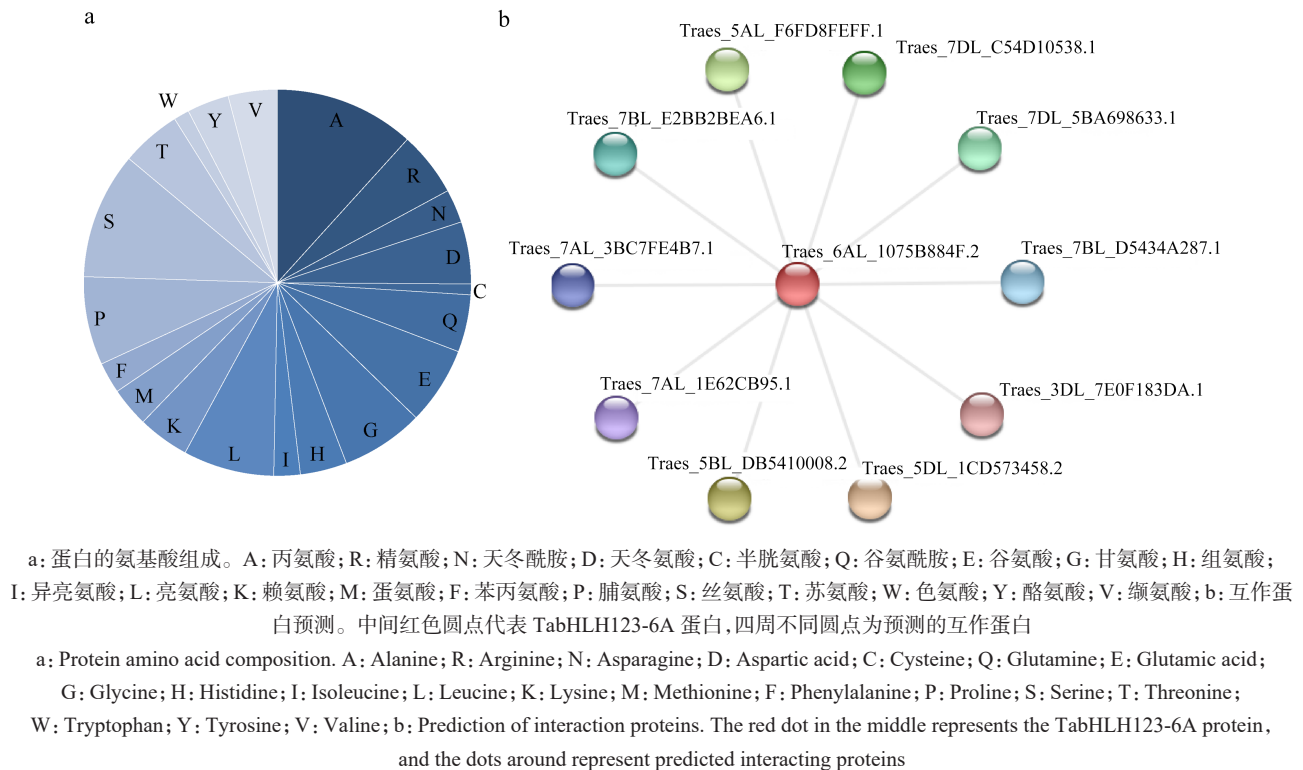
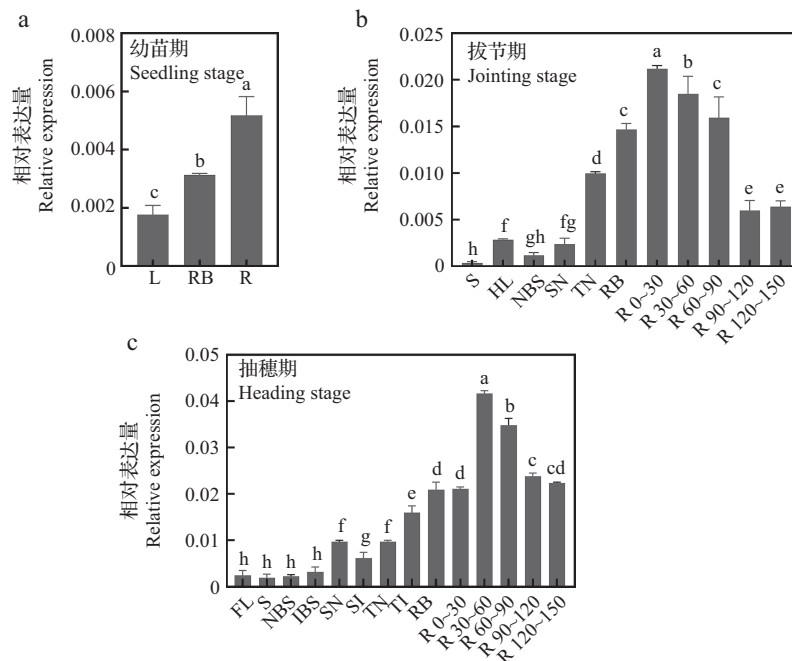
图 2 *TabHLH123-6A* 氨基酸组成和互作蛋白预测Fig.2 Amino acid composition and interaction protein prediction of *TabHLH123-6A*图 3 *TabHLH123-6A* 基因在小麦不同时期不同组织中的表达Fig.3 The relative expression patterns of *TabHLH123-6A* gene in different tissues of wheat at different stages

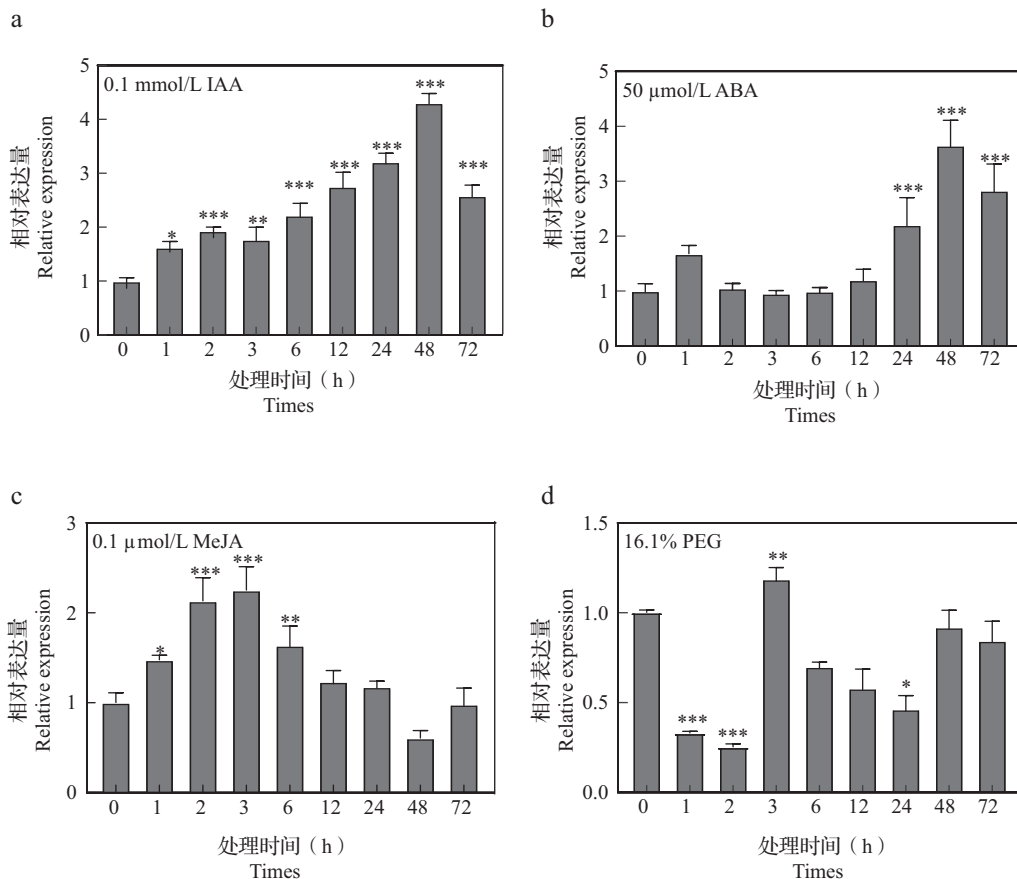
表 3 *TabHLH123-6A* 启动子区顺式作用元件预测Table 3 Putative *cis*-acting regulatory elements in the promoter region of *TabHLH123-6A*

顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element	数量 Frequency	生物学功能 Biological function
TATA-box	24	转录起始核心启动子元件
CAAT-box	35	启动子和增强子共有的作用元件
TGA-element	1	生长素应答元件
ABRE	12	脱落酸应答元件
TGACG-motif	7	茉莉酸甲酯应答元件
G-Box	13	光响应元件
I-box	3	光响应元件
A-box	3	与分生组织活性相关的作用元件
DRE core	1	DREB 结合元件
MYB	6	MYB 蛋白结合元件
W-box	1	WRKY 蛋白结合元件

2.3 *TabHLH123-6A* 的序列多态性分析与分子标记开发

以 32 份高多态性小麦为材料,通过测序分析 *TabHLH123-6A* 基因组序列的多态性。结果表明在起始密码子(ATG)下游 25 bp 位置存在一个非同义突变 C/T,使蛋白序列中第 9 位氨基酸由组氨酸变为酪氨酸,表示为 *TabHLH123*^{25-C/T}(图 5a、b)。

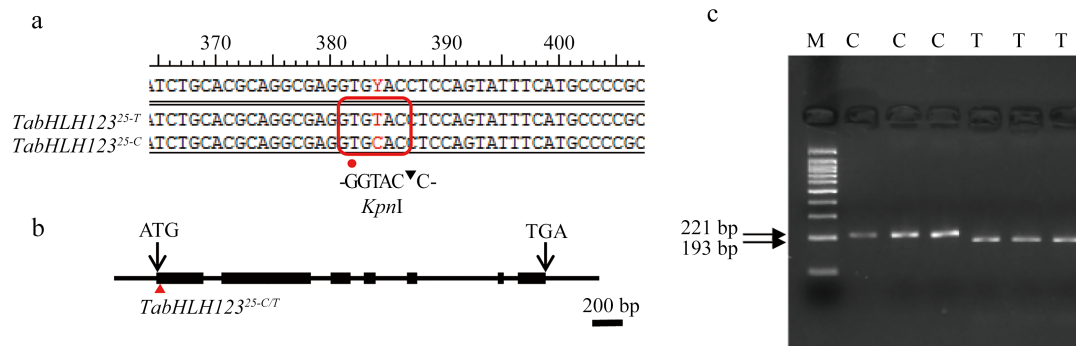
根据 *TabHLH123*^{25-C/T} 等位变异,利用 dCAPS Finder 2.0 设计了一个含有 *KpnI* 酶切位点的标记 dCAPS-*KpnI*。通过引物 *TabHLH123-6A-KpnI*-dCAPS-F/R 可扩增出 221 bp 的目的片段。其中 *TabHLH123-6A-KpnI*-dCAPS-F 中包含一个错配碱基(T/G),使 *TabHLH123*^{25-T} 基因型扩增的目的片段中含有 *KpnI* 酶切位点,而 *TabHLH123*^{25-C} 基因型的扩增产物不存在 *KpnI* 识别位点。经 *KpnI* 酶消化反应其扩增产物,则 *TabHLH123*^{25-T} 基因型的扩增产物被酶切为 193 bp 和 28 bp 两个片段,而基因型为 *TabHLH123*^{25-C} 的扩增产物仍为 221 bp,通过琼脂糖凝胶电泳,根据其酶切后的电泳片段大小,即可区分 *TabHLH123*^{25-C/T} 的两种等位变异(图 5c)。



*、**、*** 分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 和 $P<0.001$ 水平上差异显著;下同

*, **, *** respectively indicate significant difference at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$ levels; The same as below

图 4 *TabHLH123-6A* 基因在不同激素和干旱胁迫处理下的表达Fig.4 The expression patterns of *TabHLH123-6A* gene under different hormones treatment and drought stress



a: *TabHLH123-6A* 两种基因型的比对结果及分子标记的设计。红色矩形框表示 *KpnI* 酶切位点, 红点标记表示错配碱基, 通过碱基 T 错配为 G 形成 *KpnI* 酶切位点; b: *TabHLH123-6A* 中的变异位点在基因序列中的位置。黑色实心框代表编码区域, 红色三角指示变异位点; c: 两种基因型的 PCR 产物经 *KpnI* 酶切后的琼脂糖凝胶电泳图。C: 基因型为 *TabHLH123-25-C* 酶切后的电泳片段; T: 基因型为 *TabHLH123-25-T* 酶切后的电泳片段; M: 100 bp 的 DNA Marker

a: Comparison of *TabHLH123-6A* two genotypes and design of molecular markers. The *KpnI* restriction site and a base T mismatched to G were marked in red rectangle and red point, respectively; *KpnI* restriction site was formed by base T mismatch for G; b: Polymorphic locus found in *TabHLH123-6A*. Black boxes represent the coding regions, red triangle indicates allelic variation sites; c: PCR products of *TabHLH123-6A* digested by *KpnI*. C: The genotype was the electrophoretic fragment after enzyme digestion of *TabHLH123-25-C*; T: The genotype was the electrophoretic fragment after enzyme digestion of *TabHLH123-25-T*; M: 100 bp DNA marker

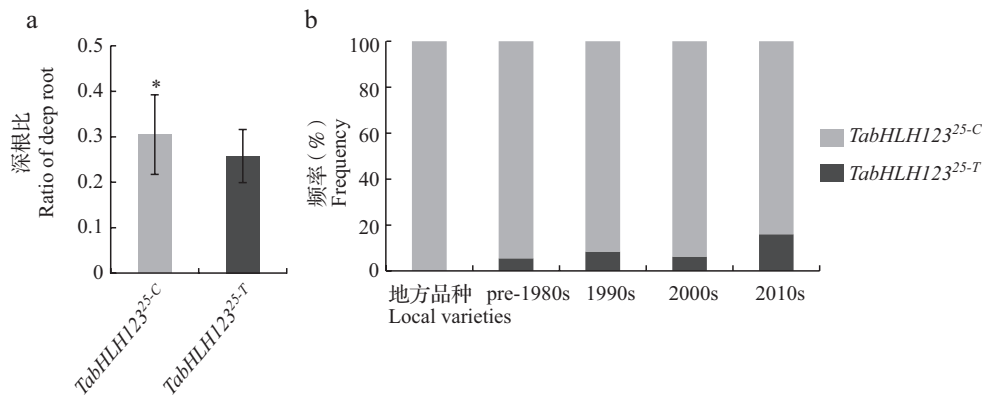
图 5 *TabHLH123-6A* 序列多态性及 dCAPS 标记

Fig.5 Sequence polymorphisms and dCAPS marker of *TabHLH123-6A*

2.4 *TabHLH123-25-CT* 与根系性状的关联分析

为了研究 *TabHLH123-25-CT* 等位变异与小麦根系性状的关系, 利用分子标记 dCAPs-*KpnI* 对 323 份小麦材料组成的自然群体进行了扫描, 分析 *TabHLH123-25-CT* 等位变异类型与根系性状的关系。结果显示 *TabHLH123-25-CT* 与小麦灌浆中期深根比显著相关 ($P=0.013$), 其中携带等位变异 *TabHLH123-25-C* 的小麦材料深根比显著高于 *TabHLH123-25-T* 的深根

比(图 6a)。基于 323 份小麦材料的育成年代及其 *TabHLH123-25-CT* 等位变异类型, 分析了随着育种年代推移等位变异类型的频率变化。结果如图 6B 所示: 地方品种全部携带深根比较大的等位变异 *TabHLH123-25-C*, 而现代育成品种中, 从 20 世纪 80 年代之前到 21 世纪初, 深根比较小的等位变异 *TabHLH123-25-T* 的分布频率由 5.5% 增加到 16%, 表明 *TabHLH123-25-T* 在育种过程中逐渐受到了育种家的选择。



a: 小麦自然群体中携带 *TabHLH123-25-CT* 不同等位变异材料的深根比;

b: 在小麦育种进程中 *TabHLH123-25-CT* 等位变异类型的频率变化。pre-1980s: 1980s 以前

a: Ratio of deep root in wheat natural population accession carrying different allelic variation of *TabHLH123-25-CT*;

b: Frequency variation of *TabHLH123-25-CT* allele types in the history of wheat breeding. pre-1980s: before 1980s

图 6 *TabHLH123-25-CT* 不同等位变异类型小麦深根比的比较

Fig.6 Comparison of deep root ratio of wheat with different allelic variation types of *TabHLH123-25-CT*

3 讨论

作为广泛分布于动植物体内的转录因子超家族, bHLH 转录因子对植物的生长发育起着至关重要的作用^[15]。已有研究表明 bHLH 转录因子 N 端 10~15 个碱性氨基酸组成的碱性区域, 作为 DNA 结合区域, 可识别 E-box 和 G-box。保守的 HLH 结构域主要促进蛋白-蛋白之间相互作用, 这种蛋白结构有利于与其他蛋白结合, 形成同源二聚体或异源二聚体复合物^[16]。本研究结果显示, 小麦 *TabHLH123-6A* 基因含有 7 个外显子和 6 个内含子, 最大开放阅读框 1386 bp, 编码 461 个氨基酸, 含有保守的 HLH 结构域。通过预测分析发现 *TabHLH123-6A* 主要与含有锌指结构域以及 HLH 结构域的蛋白相互作用。前人研究发现, 拟南芥中两类 bHLH 转录因子基因 *PERICYCLE FACTOR TYPE-A* (*PFA*, 其中 *PFA1* 代表 *bHLH111*, *PFA2* 代表 *bHLH133*, *PFA3* 代表 *bHLH068*, *PFA4* 代表 *bHLH111*) 和 *PERICYCLE FACTOR TYPE-B* (*PFB*, 其中 *PFB1* 代表 *bHLH059*, *PFB2* 代表 *bHLH007*) 调控中柱鞘细胞形成, 且蛋白 *PFA* 能够与 *PFB* 形成二聚体, 这两种类型的 bHLH 蛋白相互作用, 调控细胞分裂, 共同参与侧根原基的起始与发育^[17], 该结果与本研究蛋白互作的预测结果相吻合, 为深入解析 *TabHLH123-6A* 的蛋白互作网络提供了重要的参考价值。

根系是植物吸收水分和养分的主要器官, 其构型与作物的适应性和产量关系密切^[18], 因此根系构型改良是小麦育种的重要目标之一。然而, 由于缺乏高效的根系研究方法, 调控小麦根系发育的相关基因和分子机制很大程度上仍是未知的。已有研究发现拟南芥和玉米中 bHLH 转录因子调控根系发育。bHLH 转录因子家族成员 *ZmPTF1* 过表达改善了玉米根系, 在低磷条件下表现出较多的穗分枝和更大的籽粒, 且抗旱能力增强^[19-20]。*bHLH74* 是 miR396 的靶基因, 在根系发育中也起着关键作用^[21]。bHLH 转录因子 MYC2 直接结合并抑制 *PLETHORA* (*PLT1* 和 *PLT2*) 表达, 通过茉莉酸信号抑制根系生长^[22]。bHLH 蛋白复合物 LHW-TMO5/T5L1 通过调控 RAM 中的细胞分裂素产生和信号传导, 诱导根尖细胞的分裂与增殖^[23]。本研究通过检测 *TabHLH123-6A* 基因表达量, 发现该基因在小麦幼苗期、拔节及抽穗期的不同组织中均有表达, 其中在根和根基中表达量较高, 且在不同深度根系中表达量不同。在拔节期, 0~30 cm、30~60 cm

及 60~90 cm 根中 *TabHLH123-6A* 的表达量高于 90~120 cm、120~150 cm, 在抽穗期, 30~60 cm、60~90 cm 根中表达量较高, 推测 *TabHLH123-6A* 可能参与根系发育和根系构型的调控。推测 *TabHLH123-6A* 可能参与调控根系发育和构型。前人研究发现 bHLH 转录因子家族不仅与根系生长发育有关, 也参与了植物次生代谢花青素的合成^[24]、气孔发育^[25]、花药和柱头的发育^[26]、冷胁迫响应^[27]、脱落酸、茉莉酸和光信号通路^[28-29]。本研究通过分析启动子顺式作用元件和 qRT-PCR 检测, 发现 *TabHLH123-6A* 的表达受 IAA、ABA 和 MeJA 的诱导, 而在 PEG 模拟的干旱处理下 *TabHLH123-6A* 的表达量呈现急剧下降, 并在处理 2 h 后降至最低, 说明该基因可能参与小麦中 IAA、ABA 和 MeJA 等植物激素的应答和干旱胁迫的早期响应过程。

已有研究表明不同的根系构型对植物吸收营养、应对干旱胁迫具有重要影响^[30]。拥有“大根系”的玉米植株对浅土层中磷的吸收效率明显增强^[31], 而“陡-廉-深”(steep-cheap-deep)的根系结构有利于氮的吸收^[32]。钾、钙、镁的分布和磷相似, 主要分布于浅土层, 浅根型根系更有利于这些元素的吸收^[33]。通过研究 10 个小麦品种在不同环境中的根系性状, 发现在干旱环境下, 根长、根组织密度(根重/根体积)较高, 而比根长(根长/根重)和根表面积(根表面积/根重)较小; 相反, 在较湿润的环境中, 小麦根长密度(根长/土壤体积)和根冠比较高^[34]。在干旱条件下, 深根比较高的材料更有利于植株的生长, 但在干旱和磷胁迫同时发生时, 深根比较低的表现更优越^[35]。然而, 研究发现小麦根系的遗传多样性在减少, 且在育种中“小根系”和低根冠比的根系类型受到正向选择^[36]。挖掘和利用调控根系构型的基因资源及其优异等位变异, 利用分子标记技术鉴定根系表型, 能够有效规避破坏性的根系鉴定, 加速小麦根系构型的遗传改良, 提升小麦生产力^[37]。本研究通过分析 *TabHLH123-6A* 序列多态性, 发现了一个核苷酸变异位点(C/T), 根据该位点开发了功能分子标记 dCAPs-*KpnI*, 与小麦深根比显著相关。其中, 携带 *TabHLH123*^{25-T} 等位变异的小麦材料深根比较低, 随着小麦育种年代的推进, 该等位变异在小麦品种中的分布频率逐渐增加, 与先前研究发现在现代育种中深根型小麦占比呈下降趋势的结论相吻合^[38]。因此, 本研究为小麦根系构型的解析提供基因资源, 所开发的分子标记对于小麦根系构型改良具有重要的应用价值。

参考文献

- [1] Ma M, Sun Q J, Li M, Zhu K X. Deterioration mechanisms of high-moisture wheat-based food-A review from physicochemical, structural, and molecular perspectives. *Food Chemistry*, 2020, 318: 126495
- [2] Li B, Liu D, Li Q R, Mao X G, Li A, Wang J Y, Chang X P, Jing R L. Overexpression of wheat gene *TaMOR* improves root system architecture and grain yield in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67: 4155-4167
- [3] Kirkegaard J A, Lilley J M. Root penetration rate-a benchmark to identify soil and plant limitations to rooting depth in wheat. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2007, 47: 590-602
- [4] Gregory P J, McGowan M, Biscoe P V. Water relations of winter wheat. 1. Growth of the root system. *Journal of Agricultural Science*, 1978, 91: 91-102
- [5] 李龙, 李超男, 毛新国, 王景一, 景蕊莲. 作物根系表型鉴定评价方法的现状与展望. *中国农业科学*, 2022, 55(3): 425-437
- [6] Li L, Li C N, Mao X G, Wang J Y, Jing R L. Advances and perspectives of approaches to phenotyping crop root system. *Scientia Agricultura Sinica*, 2022, 55(3): 425-437
- [6] 武晶, 黎裕. 基于作物种质资源的优异等位基因挖掘: 进展与展望. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(6): 1380-1389
- [6] Wu J, Li Y. Mining superior alleles in crop germplasm resources: Advances and perspectives. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(6): 1380-1389
- [7] Soriano J M. Molecular marker technology for crop improvement. *Agronomy Journal*, 2020, 10: 1462
- [8] Sun X, Wang Y, Sui N. Transcriptional regulation of bHLH during plant response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 503: 397-401
- [9] Castilhos G, Lazzarotto F, Spagnolo-Fonini L, Bodanese-Zanettini M H, Margis-Pinheiro M. Possible roles of basic helix-loop-helix transcription factors in adaptation to drought. *Plant Science*, 2014, 223: 1-7
- [10] Qian Y C, Zhang T Y, Yu Y, Gou L P, Yang J T, Xu J, Pi E. Regulatory mechanisms of bHLH transcription factors in plant adaptive responses to various abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 677611
- [11] Jin J P, Zhang H, Kong L, Gao G, Luo J C. PlantTFDB 3.0: A portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic Acids Research*, 2013, 42: D1182-D1187
- [12] Zhang B, Shi W, Li W, Chang X, Jing R. Efficacy of pyramiding elite alleles for dynamic development of plant height in common wheat. *Molecular Breeding*, 2013, 32: 327-338
- [13] Li L, Peng Z, Mao X G, Wang J Y, Chang X P, Reynolds M, Jing R L. Genome-wide association study reveals genomic regions controlling root and shoot traits at late growth stages in wheat. *Annals of Botany*, 2019, 124: 993-1006
- [14] Liu X L, Li R Z, Chang X P, Jing R L. Mapping QTLs for seedling root traits in a doubled haploid wheat population under different water regimes. *Euphytica*, 2013, 189: 51-66
- [15] Hong Y Q, Ahmad N, Tian Y Y, Liu J Y, Wang L Y, Wang G, Liu X M, Dong Y Y, Wang F W, Liu W C, Li X W, Zhao X, Yao N, Li H Y. Genome-wide identification, expression analysis, and subcellular localization of *Carthamus tinctorius* bHLH transcription factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20: 3044
- [16] Guo X J, Wang J R. Global identification, structural analysis and expression characterization of bHLH transcription factors in wheat. *BMC Plant Biology*, 2017, 17: 90
- [17] Zhang Y, Mitsuda N, Yoshizumi T, Horii Y, Oshima Y, Ohme-Takagi M, Matsui M, Kakimoto T. Two types of bHLH transcription factor determine the competence of the pericycle for lateral root initiation. *Nature Plants*, 2021, 7: 633-643
- [18] Sandhu N, Raman K A, Torres R O, Audebert A, Dardou A, Kumar A, Henry A. Rice root architectural plasticity traits and genetic regions for adaptability to variable cultivation and stress conditions. *Plant Physiology*, 2016, 171: 2562-2576
- [19] Li Z X, Gao Q, Liu Y Z, He C M, Zhang X R, Zhang J R. Overexpression of transcription factor *ZmPTF1* improves low phosphate tolerance of maize by regulating carbon metabolism and root growth. *Planta*, 2011, 233: 1129-1143
- [20] Li Z X, Liu C, Zhang Y, Wang B M, Ran Q J, Zhang J R. The bHLH family member *ZmPTF1* regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70: 5471-5486
- [21] Bao M L, Bian H W, Zha Y L, Li F Y, Sun Y Z, Bai B, Chen Z H, Wang J H, Zhu M Y, Han N. MiR396a-mediated basic Helix-Loop-Helix transcription factor *bHLH74* repression acts as a regulator for root growth in *Arabidopsis* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55: 1343-1353
- [22] Chen Q, Sun J Q, Zhai Q Z, Zhou W K, Qi L L, Xu L, Wang B, Chen R, Jiang H L, Qi J, Li X G, Palme K, Li C Y. The basic helix-loop-helix transcription factor *MYC2* directly represses *PLETHORA* expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2011, 23: 3335-3352
- [23] Ohashi-Ito K, Saegusa M, Iwamoto K, Oda Y, Katayama H, Kojima M, Sakakibara H, Fukuda H. A bHLH complex activates vascular cell division via cytokinin action in root apical meristem. *Current Biology*, 2014, 24: 2053-2058
- [24] Liu X, Zhang M H, Jiang X M, Li H, Jia Z J, Hao M, Jiang B, Huang L, Ning S Z, Yuan Z W, Chen X J, Chen X, Liu D C, Liu B L, Zhang L Q. *TbMYC4A* is candidate gene controlling the blue aleurone trait in a wheat-*Triticum boeoticum* substitution line. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 762265
- [25] Serna L. The role of grass *MUTE* orthologs in GMC progression and GC morphogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 678417
- [26] Nan G L, Teng C, Fernandes J, O' Connor L, Meyers B C, Walbot V. A cascade of bHLH-regulated pathways programs maize anther development. *The Plant Cell*, 2022, 34: 1207-1225
- [27] Zhao Q, Xiang X H, Liu D, Yang A G, Wang Y Y. Tobacco transcription factor *NtHLH123* confers tolerance to cold stress by regulating the *NtCBF* pathway and reactive oxygen species homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 381
- [28] Li J L, Wang T, Han J, Ren Z H. Genome-wide identification and characterization of cucumber bHLH family genes and the functional characterization of *CsbHLH041* in NaCl and ABA tolerance in *Arabidopsis* and cucumber. *BMC Plant Biology*,

- 2020, 20: 272
- [29] Castelain M, Le H R, Bellini C. The non-DNA-binding bHLH transcription factor *PRE3/bHLH135/ATBS1/TMO7* is involved in the regulation of light signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2012, 145: 450-460
- [30] Fan Y, Miguez-Macho G, Jobbágy E G, Jackson R B, Otero-Casal C. Hydrologic regulation of plant rooting depth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2017, 114: 10572-10577
- [31] Sun B R, Gao Y Z, Lynch J P. Large crown root number improves topsoil foraging and phosphorus acquisition. *Plant Physiology*, 2018, 177: 90-104
- [32] Lynch J P. Steep, cheap and deep: An ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. *Annals of Botany*, 2013, 112: 347-3579
- [33] Lynch J P. Root phenotypes for improved nutrient capture: An underexploited opportunity for global agriculture. *New Phytologist*, 2019, 223: 548-564
- [34] Peng B, Liu X W, Dong X J, Xue Q W, Neely C B, Marek T, Ibrahim A M H, Zhang G, Leskovar D I, Rudd J C. Root morphological traits of winter wheat under contrasting environments. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2019, 205: 571-585
- [35] Van der Bom F J T, Williams A, Bell M J. Root architecture for improved resource capture: Trade-offs in complex environments. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71: 5752-5763
- [36] Voss-Fels K P, Qian L, Parra-Londono S, Uptmoor R, Frisch M, Keeble-Gagnère G, Appels R, Snowdon R J. Linkage drag constrains the roots of modern wheat. *Plant Cell and Environment*, 2017, 40: 717-725
- [37] Li C N, Li L, Reynolds M P, Wang J Y, Chang X P, Mao X G, Jing R L. Recognizing the hidden half in wheat: Root system attributes associated with drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72: 5117-5133
- [38] 张维军, 李甜, 秦琳, 赵静, 赵俊杰, 柳洪, 侯健, 郝晨阳, 陈东升, 魏亦勤, 景蕊莲, 张学勇. 小麦 *TaDRO* 与根系形态的关联分析及在中国和全球品种中的地理分布与演变. *中国农业科学*, 2018, 51 (10): 1813-1829
- Zhang W J, Li T, Qin L, Zhao J, Zhao J J, Liu H, Hou J, Hao C Y, Chen D S, Wei Y Q, Jing R L, Zhang X Y. *TaDRO*, a gene associated with wheat root architectures, its global distribution and evolution in breeding. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51 (10): 1813-1829

欢迎订阅 2023 年《果树资源学报》

《果树资源学报》由山西农业大学主管,山西农业大学果树研究所主办。

本刊辟有专家论坛、研究论文、研究报告、经验技术、专论综述、引选育种、特异资源等栏目,全面介绍果树种质资源的收集保存、鉴定评价及种质创新等领域的研究进展;刊登有关果树资源基础理论研究、应用研究及栽培技术等方面的研究成果;积极开展学科领域内的学术交流与研讨,促进果树资源学科研究的繁荣,推动果树产业可持续发展。

本刊为双月刊,大 16 开本,94 页,每逢单月 10 日出版,每册定价 10.00 元,全年 6 册共 60.00 元。国内外公开发行,全国各地邮政局均可订阅,邮发代号 22—17;漏订者可直接汇款至《果树资源学报》编辑部订阅,免收邮寄费。

本刊地址:山西省太原市龙城大街 79 号山西农业大学果树研究所《果树资源学报》编辑部

邮编:030031

电话:0351—7639463/7639464

电子信箱:sxgszszs@126.com (广告)

sxgszszs@163.com (投稿)