

高粱 *BZR* 基因的鉴定及与籽粒性状关联分析

赵娟莹¹, 李金彪², 李皓翔², 王绘艳¹, 张晓娟¹, 范昕琦¹,
梁 笃¹, 郭 琦¹, 柳青山³, 张一中¹

(¹山西农业大学高粱研究所, 榆次 030600; ²山西农业大学农学院, 太谷 030801; ³山西农业大学社会服务部, 太原 030031)

摘要: 油菜素内酯(BRs, brassinosteroids)是植物体内存在的一种重要激素,在调控植物生长发育及抵抗多种环境胁迫过程中发挥作用。BZR_s转录因子是BR_s信号途径中的关键调节因子,通过调控靶基因的表达传递BR_s信号。为了深入研究高粱BZR_s基因的生物特性及功能,本研究从高粱基因组中鉴定获得10个BZR基因。组织特异性表达分析显示,*SbBZR3*、*SbBZR4*和*SbBZR10*在多个组织中高表达,且均在籽粒发育过程中的表达量较高。同时,基于340份高粱种质资源的重测序结果及籽粒性状表型数据,鉴定*SbBZR_s*的优异等位变异,结果表明,*SbBZR3*的优异等位变异*SbBZR3*-SNP404(T)与粒长显著相关,*SbBZR10*的优异等位变异*SbBZR10*-SNP660(A)与粒长、粒宽和千粒重显著相关,且在进化过程中*SbBZR3*-SNP404(T)和*SbBZR10*-SNP660(A)均受到了人工选择。本研究不仅为揭示高粱BZR_s基因的作用机制奠定了基础,也将为利用优异等位基因改良籽粒大小、促进高产高粱新种质的创制提供参考。

关键词: 高粱;BZR基因;籽粒性状;等位变异

Identification of *BZR* Genes and Its Association with Grain Traits in Sorghum

ZHAO Juanying¹, LI Jinbiao², LI Haoxiang², WANG Huiyan¹, ZHANG Xiaojuan¹, FAN Xinqi¹,
LIANG Du¹, GUO Qi¹, LIU Qingshan³, ZHANG Yizhong¹

(¹Sorghum Research Institute, Shanxi Agricultural University, Yuci 030600; ²College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taiyu 030801; ³Social Service Department, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031)

Abstract: Brassinosteroids (BRs) are class of important hormones in plants, which play a role in regulating plant growth and development and resisting various environmental stresses. BZR transcription factors are key regulatory factors in the BRs signaling pathway and transmit BRs signals by regulating the expression of target genes. To further study the biological characteristics and functions of *BZR* genes in sorghum, this study identified 10 *BZR* genes from the sorghum genome. The tissue-specific expression analysis showed that *SbBZR3*, *SbBZR4*, and *SbBZR10* are highly expressed in multiple tissues as well as have high expression levels during the grain development process. Meanwhile, based on the resequencing results and grain phenotype data of 340 sorghum germplasm resources, the superior alleles of *SbBZR_s* were identified. The results showed that the superior alleles *SbBZR3*-SNP404 (T) was significantly associated with grain length, and *SbBZR10*-SNP660 (A) was significantly associated with grain length, grain width and 1000-grain weight. Both *SbBZR3*-SNP404 (T) and *SbBZR10*-SNP660 (A) were artificially selected during the evolutionary process. This study not only lays a foundation for revealing the

收稿日期: 2024-06-21 网络出版日期: 2024-10-25

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240621001>

第一作者研究方向为高粱遗传育种, E-mail: zjy0502@yeah.net

通信作者: 张一中, 研究方向为高粱遗传育种, E-mail: zhyzh225@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(32241042); 山西省博士毕业生、博士后研究人员来晋工作奖励经费科研项目(SXBYKY2023022); 山西省科技重大专项计划“揭榜挂帅”项目(202101140601027); 山西农业大学高粱研究所国家基金培育项目(GLS-gp-202402)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32241042); The Scientific Research Project of Shanxi Province Outstanding Doctoral and Postdoctoral Researchers Work Award Fund (SXBYKY2023022); The Major Special Science and Technology Projects in Shanxi Province (202101140601027); National Fund Cultivation Project of Sorghum Research Institute, Shanxi Agricultural University (GLS-gp-202402)

action mechanism of *BZR* genes in sorghum, but also provides a reference for using excellent alleles to improve grain size and promote the creation of new sorghum seeds with high yield.

Key words: sorghum; *BZR* genes; grain trait; allelic variation

高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] 作为世界上第五大禾谷类作物, 栽培历史悠久, 具有抗旱耐瘠薄等优势。随着全球耕地面积的减少及高粱在国民饮食中所占比例的降低, 目前高粱种植地主要集中在干旱、半干旱及山区等一些边际农田, 严重限制了高粱的产量。高粱除了作为粮食之外, 还是工业、酿造业、畜牧业的重要原材料^[1], 因此, 提高高粱产量仍是高粱育种的重要目标, 也是提升高粱经济效益的有效途径。籽粒大小是影响作物产量的重要因素之一, 现有研究已在水稻和小麦等作物中发现了调控籽粒大小的基因^[2-4]。挖掘高粱基因组中调控籽粒发育的基因, 并鉴定其优异等位变异, 能够为高粱分子育种、提高高粱产量奠定基础。

油菜素内酯 (BRs, brassinosteroids) 是在花粉中发现的一种甾醇类植物激素, 广泛存在于花粉、种子、茎和叶片中, 是调节植物生长发育和抵抗环境胁迫的重要激素, 在光形态发生、细胞伸长、开花、籽粒发育、种子萌发以及抗旱、耐盐、耐高温等过程中发挥重要作用^[5-8]。BRs 信号由细胞质膜表面受体 BRI1 (Brassinosteroid insensitive 1) 和 BAK1 (BRI1 associated protein kinase 1) 感知, BRI1 与 BSU1 (BR-suppressor 1) 磷酸酶相互作用, 并激活 BSU1 磷酸酶, 触发 BIN2 (BR-insensitive 2) 去磷酸化, 失活的 BIN2 促使非磷酸化转录因子 BZR1 (Brassinazole resistant 1) 和 BES1 (BRI1-EMS-Suppressor 1) 在细胞核中积累, 进而调控 BRs 靶基因表达^[9-11]。BRs 的生物合成及信号传递受阻会对植物籽粒发育造成影响, 如小麦 BRs 缺失突变体 *Tad11* 的籽粒比野生型短^[12], 水稻 *OsGSK2* 的过表达导致籽粒变小等^[13]。

BZR 转录因子是 BRs 信号通路中的重要调节因子, 由 N 端的核定位信号序列 (NLS, nuclear localization sequence)、高度保守的 DNA 结合域 BES1_N、丝氨酸磷酸化位点、富含脯氨酸 (P, proline)-谷氨酸 (E, glutamic acid)-丝氨酸 (S, serine)-苏氨酸 (T, threonine) 的 PEST 序列及 C 端结构域组成^[14], 其中丝氨酸磷酸化位点可被 BIN2 识别并磷酸化^[15], BES1_N 结构域可以特异性结合下游基因启动子区的 E-box (CANNTG) 或 BRRE (CGTGT/CG) 元件, 进而调控 BRs 响应基因的表

达^[16-17]。BZR 作为 BRs 信号途径的重要转录因子, 参与植物生长发育及对非生物胁迫的响应^[18]。拟南芥 BZR 转录因子 AtBEH3 可以调节 E3 泛素连接酶基因 *AtRZF1* 的表达, 参与调控拟南芥对渗透胁迫、ABA 和 BRs 响应^[19]。AtBES1 与 RD26 互作, 负向调节植物抗旱性^[20]。小麦 TaBZR2 直接结合 *TaGST1* 启动子区的 E-box 元件, 激活 *TaGST1* 的表达, 提高植物耐旱性^[21]。此外, BZR 也在调控籽粒发育过程中发挥重要作用。研究表明, 大豆 BES1/BZR1 通过与 2C-1 型蛋白磷酸酶 PP2C-1 相互作用, 促进籽粒发育^[22]。水稻 *BES1/BZR1* 基因的过表达能够增加籽粒中糖分的积累, 提高产量^[23]。玉米 *ZmBES1/BZR1-5* 与酪蛋白激酶 II 亚基 *ZmCKIIβ4* 和铁氧还蛋白 *ZmFdx2* 互作, 通过结合 *AP2/EREBP* 基因启动子元件并抑制其转录, 正向调节籽粒大小^[16]。过表达小麦 *TabHLH489* 导致籽粒变短, 千粒重降低, 而 TaBZR1 可以抑制 *TabHLH489* 的表达, 促进籽粒发育^[24]。

由于 BZR 转录因子在 BRs 信号通路及植物生长发育过程中发挥多种重要功能, BZR 基因家族鉴定、功能研究及调控机制解柝备受关注。目前, BZR 转录因子家族已在拟南芥^[14]、玉米^[25]、油菜^[26]、水稻^[27]、小麦^[28] 和马铃薯^[29] 等植物中被鉴定, 且已有研究鉴定了高粱的 BZR 基因家族成员^[30], 但高粱 BZR 家族基因调控籽粒大小的研究还未见报道。本研究对高粱 BZR 家族成员进行了重新鉴定, 检测了 *SbBZR*s 在 BRs 处理下及高粱不同组织和发育时期的表达, 并对 *SbBZR3* 和 *SbBZR10* 的自然变异与粒长、粒宽和千粒重进行了关联分析, 为高粱籽粒大小相关性状的遗传改良及高产新种质创制提供了参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

挑选籽粒饱满、大小一致的高粱品种 L17 种子, 种植于山西农业大学高粱研究所实验基地, 采集正常生长至幼苗期的高粱根、茎、叶、孕穗期的小穗, 半花期的花, 以及开花后 5 d、10 d 和 15 d 的籽粒, 液氮冷冻后保存于 -80 °C 冰箱, 用于基因组组织特异性表达分析。此外, 用 0.5 μmol/L BRs 对人工气候室正常生长的两周龄高粱幼苗进行叶片喷施处理, 试

验分3次重复,每重复8盆,每盆10株苗,分别于处理后0 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、6 h、12 h、24 h取叶片,液氮速冻后保存于-80 °C冰箱,用于检测*SbBZR*s在BRs处理下的表达。

1.2 高粱 *BZR* 基因鉴定

从 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)数据库下载高粱蛋白(*Sorghum bicolor* v3.1.1)序列及注释文件,根据已报道的拟南芥^[14]、玉米^[25]和水稻^[27]的*BZR*蛋白序列信息,对高粱蛋白序列进行本地BLAST(E-value<1e⁻⁵),去除重复序列后,使用CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>)和SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线工具对候选序列进行筛选,删除不包含BES1_N结构域的蛋白序列,具有BES1_N完整结构域的蛋白即为高粱*BZR*家族成员,用于进一步分析。使用ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>)网站预测*SbBZR*s蛋白的等电点(PI)和蛋白分子量(Mw),并根据*SbBZR*s基因在高粱染色体上的位置对其进行命名。在高粱功能基因组数据库(<http://structuralbiology.cau.edu.cn/sorghum/pattern.php>)中检索*BZR*基因在高粱根、茎、胚、营养分生组织、花分生组织和花等6个组织中的RNA-seq数据(GSE50464)^[31]。

1.3 系统进化分析

使用Clustal X软件对高粱、拟南芥、水稻、小麦和玉米的*BZR*s蛋白进行多重序列比对分析,并利

用最大似然法在MEGA7中分析系统进化关系,bootstrap值设定为1000。

1.4 染色体定位及基因共线性分析

在Phytozome数据库中查找所有*BZR*基因在高粱不同染色体上的位置信息,利用MCScanX软件分析*SbBZR*s在高粱基因组内的片段重复和串联重复事件,同时分析高粱、拟南芥、水稻、玉米和番茄基因组间共线性关系,统计不同物种间*BZR*基因的共线性基因对数量,利用TBtools软件对共线性结果进行可视化^[32],并根据染色体位置信息在物种内共线性结果图中定位*SbBZR*s基因。

1.5 总RNA提取及荧光定量PCR

利用植物总RNA快速提取试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司)提取高粱根、茎、叶、小穗、花、籽粒及BRs处理后0 h、0.5 h、1 h、2 h、3 h、6 h、12 h、24 h的叶片总RNA,具体方法参见试剂盒说明书。使用EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix反转录试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司)反转录高粱总RNA获得cDNA。根据*SbBZR*s基因序列设计荧光定量PCR(qRT-PCR)引物(表1),以*SbEIF4a*(*Sobic.004G039400*)为内参基因,使用TransStart Top Green qPCR SuperMix试剂盒(北京全式金生物技术股份有限公司)在ABI7500荧光定量PCR仪中完成检测。每个反应设置3次技术重复,使用2^{-ΔΔCt}法计算相对表达量。

表1 高粱*SbBZR*s基因荧光定量检测所用引物

Table 1 The primers were used in qRT-PCR of *SbBZR*s

引物名称 Primer name	正向序列(5'-3') Forward sequence(5'-3')	反向序列(5'-3') Reverse sequence(5'-3')
<i>SbBZR1</i>	ACAACATGTCCCACTCCGAC	ATATCTGCAACCCCGTCAGC
<i>SbBZR2</i>	TACTCCCAGACGTTGGTAGATCA	AGCATTTAGACCTGCCATACT
<i>SbBZR3</i>	GGCGTCATCCAGCTTCCC	GAGACCGGAAGAAGGGG
<i>SbBZR4</i>	AGCCCTACTTCTCCTCATTCC	TGGTTGCTTCGTCCCAGTCT
<i>SbBZR6</i>	ACTCCTCGGAAGTATGAATGGTC	CAGTGTGATTGCCGTAAATG
<i>SbBZR7</i>	TTCTCCTCCAGACCTCCACC	TCCTCGTCGGCGTTCTTCT
<i>SbBZR9</i>	TGCTTCTGCCTGGATGCTC	TCGTCCGGTGTCTTGTGCTT
<i>SbBZR10</i>	ATCTGCTGGTCCTTCATCTCC	CACCTCCTCGTGTATCCGTTCC

1.6 基因等位变异鉴定

实验室前期已完成340份高粱种质资源的重测序工作,这些高粱品种为山西农业大学高粱研究所

饲料高粱研究室近年来收集、自主选育的育种资源,包含318份育成种(其中恢复系231份、保持系87份),22份地方品种,主要来源于中国山西、内蒙

古、黑龙江、吉林、辽宁、四川、贵州等高粱主产区,以及美国、印度、马达加斯加、澳大利亚等国家。本研究根据重测序数据,使用PilotEdit软件提取*SbBZR*s基因所在区段的核苷酸变异信息,分析*SbBZR*s基因的变异位点,并根据变异位点差异将*SbBZR*s分为不同单倍型。结合340份高粱种质资源在3个环境下(2022东白、2023东白、2023运城)的粒长、粒宽和千粒重统计结果(数据未发表),对*SbBZR*s基因不同等位变异分别在这些材料中所占比例进行统计分析。数据分析利用Excel 2016和GraphPad Prism 5软件完成,并使用SPSS 20.0软件对数据进行差异显著性分析。

1.7 关联分析

采用340份高粱种质资源的群体结构信息以及粒长、粒宽和千粒重统计结果,结合*SbBZR*s基因的等位变异信息,利用TASSEL 5软件的一般线性模型对*SbBZR*s基因的等位变异与籽粒性状进行关联

分析,根据 P 值大小确定相关性($P < 0.05$ 为显著相关, $P < 0.01$ 为极显著相关)。

2 结果与分析

2.1 高粱*BZR*家族基因鉴定

将拟南芥、水稻和玉米的*BZR*蛋白序列与高粱蛋白序列进行序列比对,并对候选蛋白序列进行功能域预测,删除不包含BES1_N结构域的序列,最终在高粱基因组中鉴定获得10个编码BES1_N结构域蛋白的基因,根据这些基因在高粱10条染色体上的位置信息将其命名为*SbBZR1*~*SbBZR10*(表2)。这些基因编码蛋白大小存在很大差异,其中序列最短的基因(*SbBZR5*)编码191个氨基酸,序列最长的基因(*SbBZR6*)编码717个氨基酸。对这些蛋白的理化性质分析发现,*SbBZR*s的分子量变化范围为20.99 kDa(*SbBZR5*)~80.40 kDa(*SbBZR6*),等电点在4.75(*SbBZR2*)~10.62(*SbBZR7*)之间。

表2 高粱*BZR*基因基本信息

Table 2 Basic information of *BZR* genes in sorghum

序号 Number	基因名称 Gene name	基因序列号 Sequence ID	染色体 Chr.	氨基酸数量(aa) Amino acid number	分子量(kDa) Mw	等电点 PI	染色体位置(bp) Chr. location
1	<i>SbBZR1</i>	<i>Sobic.001G511400</i>	1	413	41.81	6.00	77886569~77891227 -
2	<i>SbBZR2</i>	<i>Sobic.002G136200</i>	2	597	66.99	4.75	20562012~20574672 +
3	<i>SbBZR3</i>	<i>Sobic.002G353200</i>	2	337	35.26	8.83	71635213~71637226 -
4	<i>SbBZR4</i>	<i>Sobic.003G026300</i>	3	349	36.55	8.61	2228808~2231971 +
5	<i>SbBZR5</i>	<i>Sobic.003G046600</i>	3	191	20.99	9.25	4267646~4268762 +
6	<i>SbBZR6</i>	<i>Sobic.004G027800</i>	4	717	80.40	7.94	2235984~2242049 +
7	<i>SbBZR7</i>	<i>Sobic.004G102500</i>	4	400	40.78	10.62	9584880~9586747 -
8	<i>SbBZR8</i>	<i>Sobic.004G102600</i>	4	276	28.33	10.34	9610539~9611889 -
9	<i>SbBZR9</i>	<i>Sobic.004G102700</i>	4	376	38.98	10.54	9632194~9633870 -
10	<i>SbBZR10</i>	<i>Sobic.010G163900</i>	10	357	37.65	8.08	48237054~48240678 +

+表示基因序列在高粱基因组中正向插入,-表示基因序列在高粱基因组中反向插入

+ indicates the gene sequence is inserted in forward in sorghum genome, - indicates that the gene sequence is inserted in reverse in sorghum genome

2.2 *BZR*蛋白系统进化分析

为了研究*BZR*基因的进化关系,对10个高粱*BZR*蛋白、8个拟南芥*BZR*蛋白、6个水稻*BZR*蛋白、11个玉米*BZR*蛋白及20个小麦*BZR*蛋白序列进行系统进化分析(图1)。根据亲缘关系远近,将这55个*BZR*蛋白划分为4组,组I~组IV分别包含12个、12个、13个和18个成员,其中高粱*BZR*s在组III中分布最多。进化结果显示,与高粱亲缘关系最近的是单子叶植物玉米,其次是水稻,例如*SbBZR6*与*ZmBZR1-5*和*OsBZR3*亲缘关系较近,而亲缘关

系最远的是双子叶植物拟南芥。

2.3 高粱*BZR*基因的染色体分布及共线性分析

从Phytozome数据库中查找高粱*BZR*基因在不同染色体上的位置信息,对高粱*BZR*基因进行染色体定位(图2)。*SbBZR*s基因分布在高粱的5条染色体上,其中4号染色体上分布最多,包含4个基因,2号和3号染色体上各分布2个基因,1号和10号染色体上分布1个基因,其余染色体未检测到*BZR*家族成员,表明*BZR*基因在高粱染色体上是不均匀分布的。

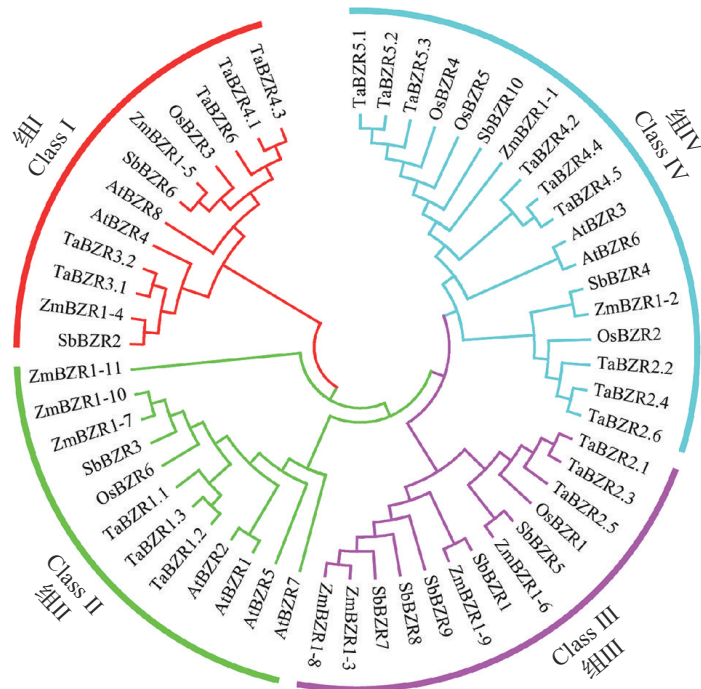
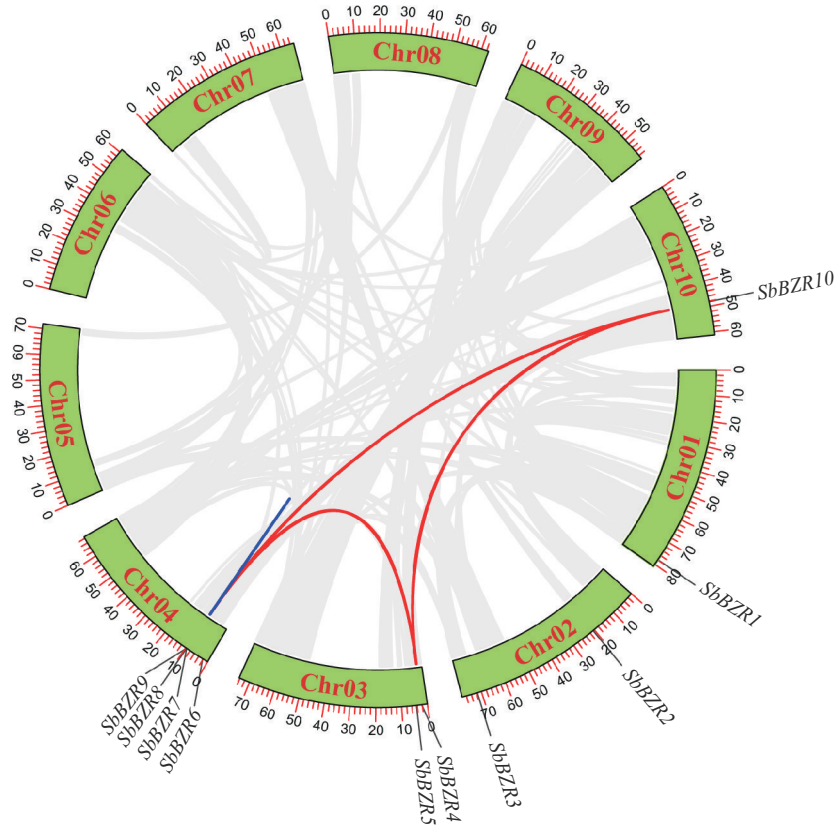


图1 高粱(Sb)、拟南芥(At)、水稻(Os)、玉米(Zm)和小麦(Ta)的BZR蛋白系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of BZR proteins in sorghum (Sb), Arabidopsis (At), rice (Os), maize (Zm) and wheat (Ta)



红线:片段重复基因对;蓝线:串联重复基因对

Red line: Fragment duplicate gene pairs; Blue line: Tandem duplicate gene pairs

图2 高粱BZR基因染色体分布及基因复制分析

Fig. 2 Chromosomes distribution and gene duplication of BZR genes in sorghum

基因复制事件是基因家族进化和扩张的主要原因,包括片段复制和串联复制^[33]。分析发现高粱*BZR*s存在多个基因复制事件(图2),结果显示共有5个基因(*SbBZR4*、*SbBZR7*、*SbBZR8*、*SbBZR9*和*SbBZR10*)参与基因复制,占高粱*SbBZR*s家族成员的50%,分别为3个片段重复基因对*SbBZR4*和*SbBZR7*、*SbBZR4*和*SbBZR10*、*SbBZR7*和*SbBZR10*,以及1个串联重复基因对*SbBZR7*、*SbBZR8*和*SbBZR9*,表明片段重复和串联重复是导致高粱*SbBZR*s基因扩增的主要原因。

为了进一步阐明*BZR*基因在植物中的进化关系,对高粱及两个双子叶植物(拟南芥和番茄)和两

个单子叶植物(水稻和玉米)分别进行了共线性分析,如图3所示,高粱-玉米、高粱-水稻、高粱-拟南芥和高粱-番茄间分别存在12个、13个、2个和5个*BZR*基因的同源基因对,对应7个高粱基因和9个玉米基因、7个高粱基因和7个水稻基因、2个高粱基因和1个拟南芥基因、3个高粱基因和3个番茄基因,统计分析显示高粱-水稻/玉米的同源基因对比高粱-拟南芥/番茄的同源基因对多,进一步说明*BZR*基因在单子叶植物之间的亲缘关系更近。此外,*SbBZR4*和*SbBZR10*在其他4个物种中均存在共线基因,推测这两个基因可能在进化过程中是保守的。

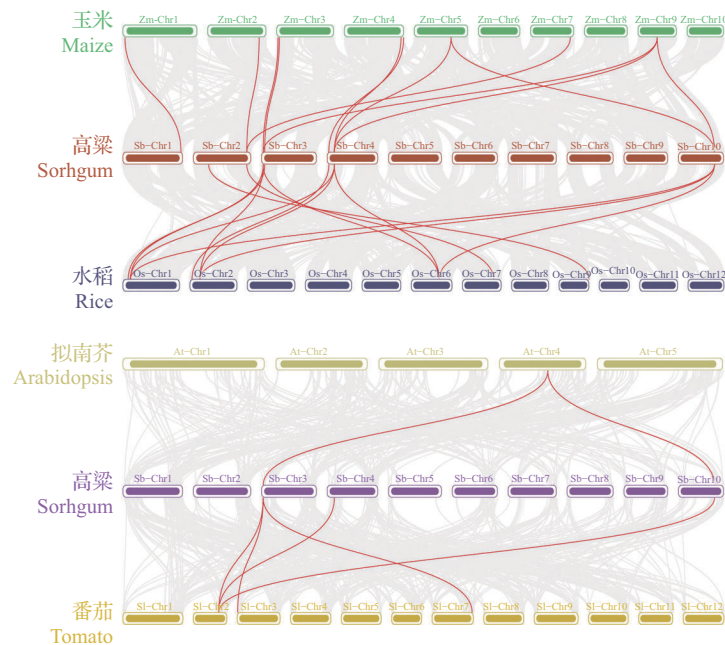


图3 高粱、玉米、水稻、拟南芥和番茄*BZR*基因共线性分析

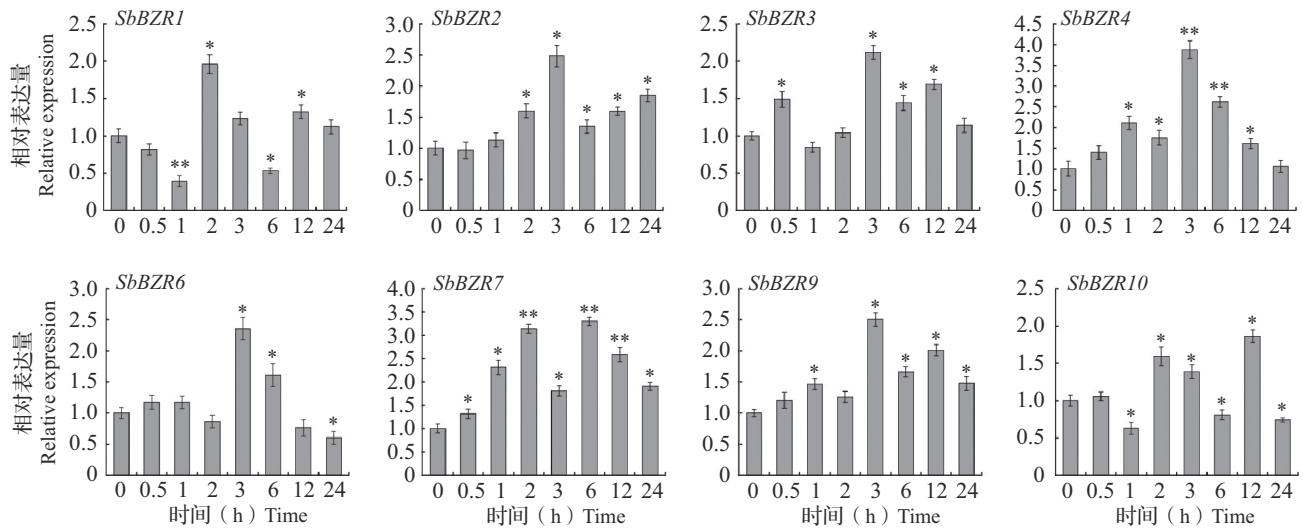
Fig. 3 Synteny analysis of *BZR* gene among sorghum, maize, rice, *Arabidopsis*, and tomato

2.4 *SbBZR*s在BRs处理下的表达分析

*BZR*s基因作为BRs信号途径的关键转录因子基因,在植物响应BRs过程中发挥重要作用。为了探索高粱*BZR*基因是否也在BRs信号途径中发挥作用,本研究检测了*SbBZR*s在外源BRs处理后的表达模式(图4)。qRT-PCR结果显示,多数*SbBZR*s基因受BRs诱导表达,其中*SbBZR4*和*SbBZR7*经BRs诱导后极显著上调表达,与0 h相比,*SbBZR4*在BRs处理后3 h表达量达到峰值(3.9倍),*SbBZR7*在处理的6 h表达量达到最高(3.3倍),推测*SbBZR4*和*SbBZR7*可能在BRs信号途径中发挥作用。

2.5 *SbBZR*s在高粱不同组织及籽粒发育不同时期的表达谱

基因在植物不同组织及不同发育时期的差异表达可以为鉴定基因功能提供参考。为了检测*BZR*家族基因在高粱不同组织中的表达,本研究首先从高粱功能基因组数据库中检索了6个高粱组织的RNA-seq数据(GSE50464)^[31],结果显示,在根、茎、胚、营养分生组织、花分生组织和花中共检测到7个*SbBZR*s基因的表达(图5),其中*SbBZR1*、*SbBZR6*、*SbBZR7*和*SbBZR9*在所有组织中均不表达或表达量极低,*SbBZR3*在营养分生组织和花分生组织中特异表达,*SbBZR4*和*SbBZR10*不仅在营养分生组织和花分生组织中高表达,在胚中也有表达,而*SbBZR4*在花中也特异表达。



*和**分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平下具有显著性差异,下同

* and ** indicated significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively, the same as below

图4 高粱 *BZR* 家族基因对 BRs 的响应

Fig. 4 Expression level of *SbBZR*s genes under BRs treatments

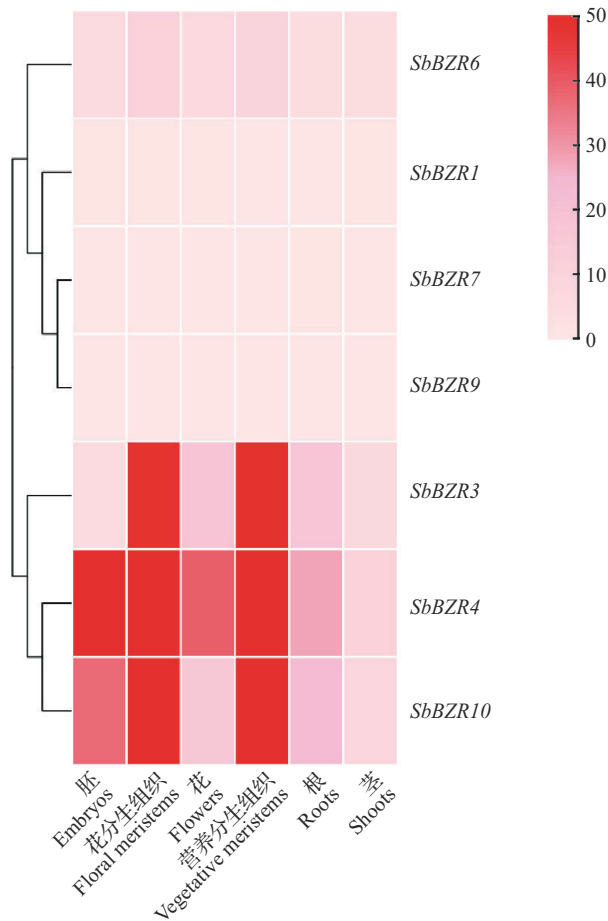


图5 高粱 *BZR* 家族基因的组织表达热图

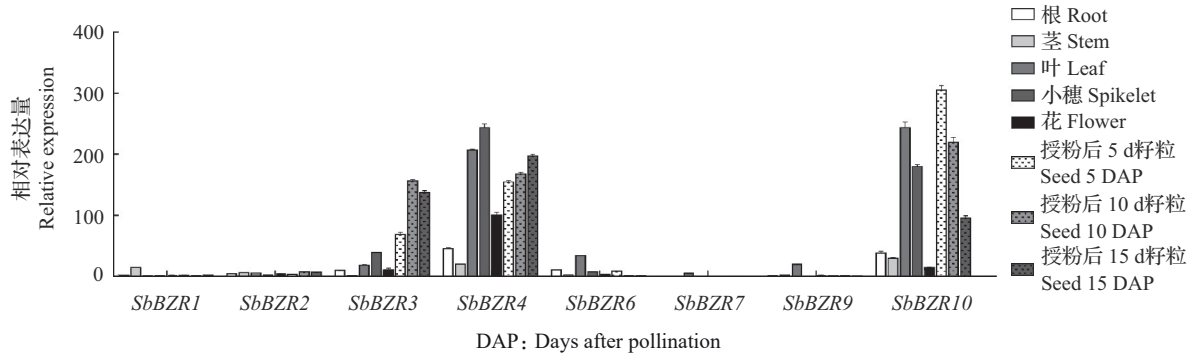
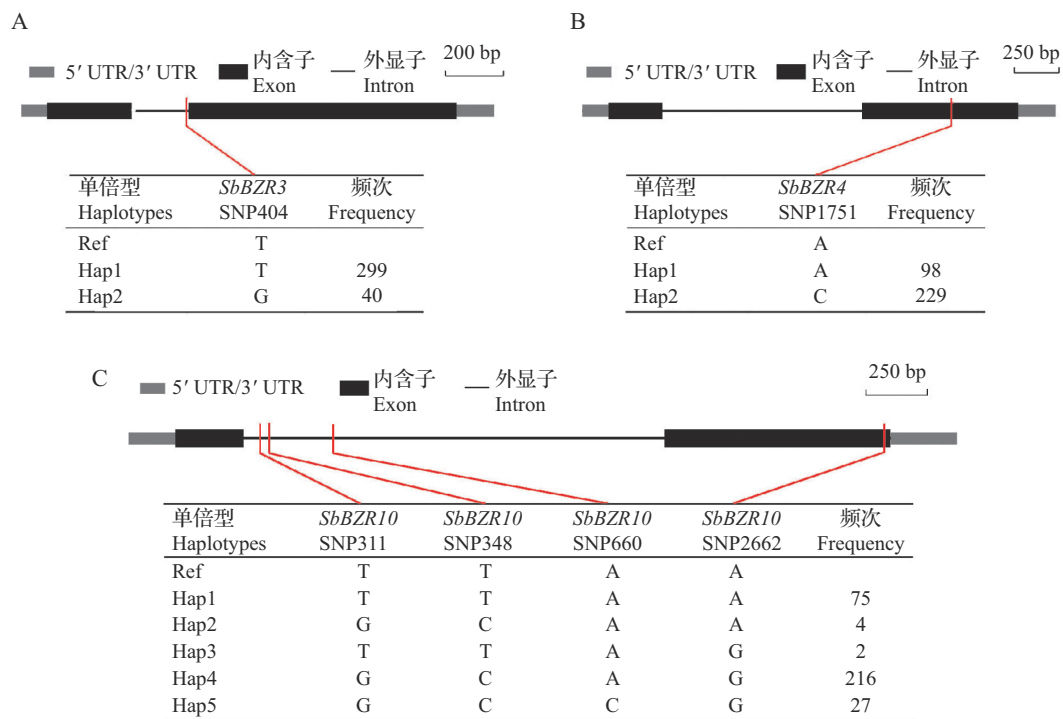
Fig. 5 Heat map of expression profiles of *SbBZR*s genes in different tissues

为了进一步确定 *SbBZR*s 的组织及发育时期表达谱,本研究利用 qRT-PCR 技术检测了 *SbBZR*s 在高粱根、茎、叶、花、小穗,以及开花后 5 d、10 d、15 d

籽粒中的表达(图6)。除未检测到 *SbBZR5* 和 *SbBZR8* 的表达外,其余 *SbBZR*s 在 8 个组织或时期中差异表达。qRT-PCR 结果显示,*SbBZR1*、*SbBZR2* 和 *SbBZR7* 在所检测组织中的表达量均较低,*SbBZR3*、*SbBZR4* 和 *SbBZR10* 在多个组织中高表达,且均在籽粒发育过程中的表达量较高,这些结果验证了 RNA-seq 结果的可靠性。此外,*SbBZR6* 和 *SbBZR9* 在叶中也有表达。根据高粱 *BZR* 家族基因的组织差异表达,推测这些基因可能在调节不同的生理发育过程中发挥作用。

2.6 *SbBZR3*、*SbBZR4* 和 *SbBZR10* 的等位变异分析

根据组织表达结果,本研究挑选 *SbBZR3*、*SbBZR4* 和 *SbBZR10* 三个基因鉴定其优异等位变异。基于 340 份高粱种质资源的重测序数据,对 *SbBZR3*、*SbBZR4* 和 *SbBZR10* 进行单倍型分析(图7),结果显示,这 3 个基因均存在等位变异,其中 *SbBZR3* 和 *SbBZR4* 各有 1 个变异位点,分为两种单倍型。与参考基因组(BTx623)相比,*SbBZR3* 的第 404 个碱基(SNP404)由 T 突变为 G, *SbBZR3*-Hap1 的出现频率最高,为主要单倍型;*SbBZR4* 的第 1751 个碱基(SNP1751)由 A 突变为 C, *SbBZR4*-Hap2 为主要单倍型;*SbBZR10* 存在 4 个变异位点,分别为第 311 个碱基(SNP311)由 T 突变为 G,第 348 个碱基(SNP348)由 T 突变为 C,第 660 个碱基(SNP660)由 A 突变为 C 以及第 2662 个碱基(SNP2662)由 A 突变为 G,根据这些变异位点,将 *SbBZR10* 分为 5 种单倍型, *SbBZR10*-Hap4 出现频率最高,为主要单倍型。

图6 *BZR*家族基因在高粱不同组织及发育时期的表达Fig. 6 Expression level of *BZR* genes in different tissues and development stages of sorghum图7 *SbBZR3*(A)、*SbBZR4*(B)和*SbBZR10*(C)的等位变异分析Fig. 7 Allelic variation analysis of *SbBZR3* (A), *SbBZR4* (B) and *SbBZR10* (C)

2.7 *SbBZR*s的等位变异与籽粒性状关联分析

实验室前期对340份高粱种质资源在3个环境下(2022东白、2023东白、2023运城)粒长、粒宽和千粒重数据进行统计分析发现,2022东白粒长变异范围在3.22~5.36 mm之间,粒宽在2.60~4.27 mm之间,千粒重在12.90~40.39 g之间,其他两个环境下粒长、粒宽和千粒重变异范围与2022东白相近,且均呈正态分布(未发表)。为了鉴定*SbBZR*s基因是否参与调控籽粒发育,本研究结合340份高粱种质资源的籽粒性状统计数据,分别对*SbBZR3*、*SbBZR4*和*SbBZR10*的等位变异位点及籽粒性状进行关联分析(表3)。结果显示,*SbBZR3*-SNP404与粒长在3个环境中显著相关,与粒宽在1个环境中显著相关;

SbBZR10-SNP660与粒长、粒宽和千粒重在3个环境中均显著相关;*SbBZR4*-SNP1751及*SbBZR10*的其余3个突变位点SNP311、SNP348、SNP2662与粒长、粒宽和千粒重均不相关,表明*SbBZR3*的第404个碱基和*SbBZR10*的第660个碱基的自然变异与籽粒大小相关。

进一步对*SbBZR3*和*SbBZR10*在3个环境中的不同单倍型进行籽粒表型分析,发现*SbBZR3*-Hap1的粒长显著高于*SbBZR3*-Hap2(图8),而*SbBZR3*-Hap1在第404个碱基处的自然变异类型为T(图7),表明*SbBZR3*-SNP404(T)为优异等位变异,*SbBZR3*-Hap1为优异单倍型。同时发现,作为优异等位变异,*SbBZR3*-Hap1在自然群体中所占比例为88.2%,

而 *SbBZR3*-Hap2 所占比例仅有 11.8% (图 9), 说明 *SbBZR3*-SNP404(T) 在进化过程中受到了人工选择。同样, 比较分析 *SbBZR10* 在 3 个环境中的不同单倍型与籽粒表型, 发现 *SbBZR10*-Hap1 的粒长和粒宽在 2 个环境中 (2022 东白和 2023 东白) 显著高于 *SbBZR10*-Hap5, *SbBZR10*-Hap1 的千粒重在 3 个环境中均显著高于 *SbBZR10*-Hap5 (图 8); *SbBZR10*-Hap4 的粒长、粒宽和千粒重在 3 个环境

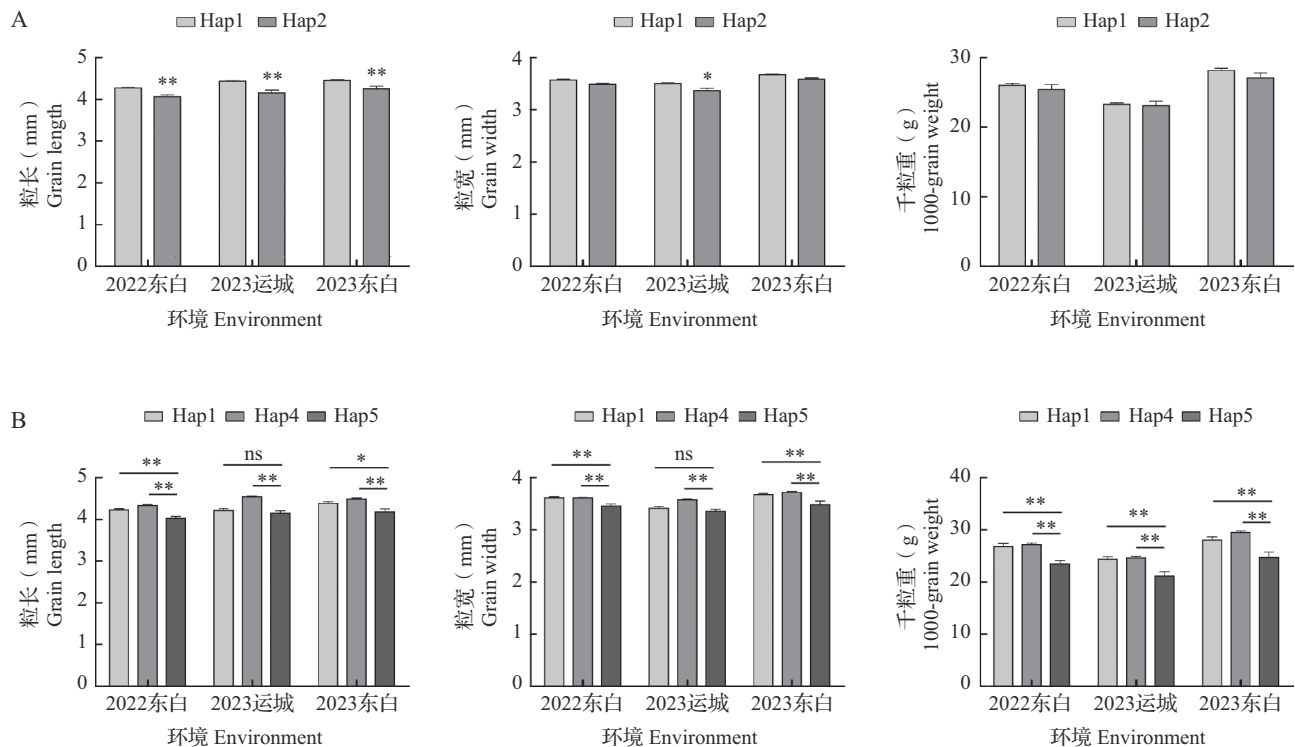
中均显著高于 *SbBZR10*-Hap5 (图 8), 而第 660 个碱基处, *SbBZR10*-Hap1 和 *SbBZR10*-Hap4 的自然变异类型均为 A (图 7), 表明 *SbBZR10*-SNP660 (A) 为优异等位变异, 且 *SbBZR10*-Hap1 (23.1%) 和 *SbBZR10*-Hap4 (66.7%) 在自然群体中出现的频率明显高于 *SbBZR10*-Hap5 (8.3%) (图 9), 说明 *SbBZR10*-SNP660 (A) 在进化过程中同样受到了人工选择。

表 3 *SbBZR*s 基因的等位变异与籽粒表型关联分析 (*P* 值)

Table 3 Association analysis (*P*-value) of *SbBZR*s alleles and grain phenotype

环境 Environment	<i>SbBZR3</i> -SNP404			<i>SbBZR4</i> -SNP1751			<i>SbBZR10</i> -SNP311		
	粒长 GL	粒宽 GW	千粒重 TKW	粒长 GL	粒宽 GW	千粒重 TKW	粒长 GL	粒宽 GW	千粒重 TKW
2022 东白 2022 Dongbai	0.00098**	0.05777	0.62018	0.54706	0.56323	0.95023	0.41734	0.76019	0.75157
2023 运城 2023 Yuncheng	0.00132**	0.03949*	0.80204	0.24692	0.76431	0.91748	0.48803	0.53010	0.83634
2023 东白 2023 Dongbai	0.01184*	0.19217	0.59287	0.70159	0.80346	0.55609	0.29386	0.76323	0.66457
环境 Environment	<i>SbBZR10</i> -SNP348			<i>SbBZR10</i> -SNP660			<i>SbBZR10</i> -SNP2662		
	粒长 GL	粒宽 GW	千粒重 TKW	粒长 GL	粒宽 GW	千粒重 TKW	粒长 GL	粒宽 GW	千粒重 TKW
2022 东白 2022 Dongbai	0.41734	0.76019	0.75157	0.00144**	0.00383**	0.00330**	0.93514	0.89261	0.76837
2023 运城 2023 Yuncheng	0.48803	0.53010	0.83634	0.00404**	0.00906**	0.00818**	0.16820	0.22856	0.75111
2023 东白 2023 Dongbai	0.29386	0.76323	0.66457	0.00132**	0.00027**	0.00173**	0.41202	0.37284	0.82488

GL: Grain length; GW: Grain width; TKW: 1000-grain weight



ns 表示在 $P < 0.05$ 水平无显著性差异

ns indicated no significant difference at $P < 0.05$ level

图 8 *SbBZR3* (A) 和 *SbBZR10* (B) 不同等位变异材料之间表型性状比较分析

Fig. 8 Comparative analysis of phenotypic traits among different allelic variants of *SbBZR3* (A) and *SbBZR10* (B)

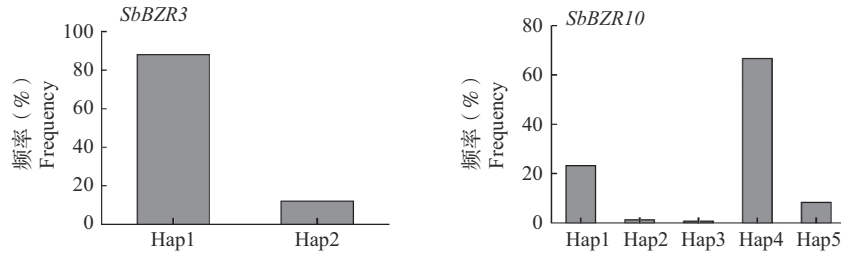


图9 *SbBZR3*和*SbBZR10*不同单倍型在自然群体中的频率分布

Fig. 9 Frequency of different haplotypes of *SbBZR3* and *SbBZR10* in natural populations

3 讨论

BRs是一种重要的植物激素,参与植物生长发育及适应逆境胁迫等多种过程。BRs信号通路包含多种功能基因,如蛋白激酶、泛素连接酶、转录因子基因等,这些基因相互作用,通过一系列级联反应,使植物对BRs信号做出响应^[8]。BZR是BRs信号通路中的关键转录调节因子,当蛋白激酶等将BRs信号传递给BZR后,激活的BZR通过结合靶基因启动子将信号传递给下游目标基因^[34]。BZR转录因子不仅在BRs信号途径中发挥作用,还参与BRs与ABA、GA等激素途径的交互作用^[18]。之前杜巧丽等^[30]已经对高粱BZR家族基因进行了系统分析,鉴定到高粱基因组中存在9个BZR家族成员。本研究以拟南芥、水稻和玉米的BZR蛋白序列为靶标,在高粱基因组中鉴定获得了10个BZR转录因子基因,与杜巧丽等^[30]的研究相比,本研究新鉴定到一个BZR基因*Sobic.004G102600*(*SbBZR8*),其与*SbBZR7*(*Sobic.004G102500*)和*SbBZR9*(*Sobic.004G102700*)组成串联重复基因对。基因复制在生物进化过程中起着关键作用^[35],除串联重复外,*SbBZR*家族成员还存在多个片段重复基因对(*SbBZR4*和*SbBZR7*、*SbBZR4*和*SbBZR10*、*SbBZR7*和*SbBZR10*),表明基因复制事件是高粱BZR家族成员扩增的主要原因。

基因在植物不同组织和不同发育阶段的表达丰度不同,以此适应多种不同的生物学过程。本研究检测了BZR家族基因在高粱根、茎、叶、花、小穗,以及开花后5 d、10 d和15 d的籽粒中的表达,结果显示,*SbBZR3*、*SbBZR4*和*SbBZR10*在高粱多个组织中高表达,表明这些基因可能在广泛的生理和发育过程中发挥重要作用。BZR作为BRs信号途径的重要转录因子,不仅在植物响应非生物胁迫过程中发挥作用,还参与调控植物的生长发育^[18]。2013年,Jiang等^[36]证实拟南芥BZR1可以结合一些籽粒大小负调节基因的启动子,通过抑制这些基因的表

达,直接参与调控BRs介导的籽粒发育。随后BZR基因调控籽粒大小的研究相继报道。水稻*OsBZR1*的过表达使种子发育过程中糖积累增加,提高水稻产量,*OsBZR1*的敲除突变体籽粒变小,产量降低^[23]。进一步研究表明,*OsBZR1*可以通过结合*DGS1*基因启动子激活*DGS1*的表达,正向调控籽粒大小^[34]。这些研究均表明BZR基因参与调控籽粒发育,本研究发现*SbBZR3*、*SbBZR4*和*SbBZR10*在高粱籽粒发育过程中高表达,推测*SbBZR*s也在调控籽粒发育过程中发挥功能。

为了满足人类的生存需求,在几千年的驯化过程中,人们对作物产量相关农艺性状进行了强烈选择,这使得一些优异基因得到保留,同时也有大量基因在驯化过程中丢失^[37]。通过分析340份高粱种质资源中*SbBZR*s的核苷酸多样性发现,在籽粒发育过程中高表达的*SbBZR3*、*SbBZR4*和*SbBZR10*均存在多个等位变异位点,且*SbBZR3*-SNP404与粒长显著相关,*SbBZR10*-SNP660与粒长、粒宽和千粒重显著相关,分析*SbBZR3*和*SbBZR10*不同基因型的分布发现,*SbBZR3*和*SbBZR10*的优异等位变异*SbBZR3*-SNP404(T)和*SbBZR10*-SNP660(A)在进化过程中均受到了人工选择,推测*SbBZR3*和*SbBZR10*可能在调控籽粒发育过程中发挥功能,而*SbBZR3*和*SbBZR10*的具体功能还需通过转基因等技术进一步验证。本研究将为之后开发功能标记,并利用标记对高粱育种材料进行检测,聚合高产有利等位基因,快速创制高产高粱新种质提供依据。此外,也可利用分子育种手段,将这些优异等位基因导入具有抗旱耐盐碱等优良表型但籽粒较小的高粱品种中,为进一步提高干旱、半干旱地区及盐碱地的高粱产量提供参考。

参考文献

- [1] 白文斌,张福跃,焦晓燕,董良利,柳青山,平俊爱.中国高粱产业工程技术研究的定位思考.中国农学通报,2013,29(11):107-110

- Bai W B, Zhang F Y, Jiao X Y, Dong L L, Liu Q S, Ping J A. The fixed position thought of sorghum engineering technology research in china. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29 (11): 107-110
- [2] Wang Y, Lv Y, Yu H, Hu P, Wen Y, Wang J, Tan Y, Wu H, Zhu L, Wu K, Chai B, Liu J, Zeng D, Zhang G, Zhu L, Gao Z, Dong G, Ren D, Shen L, Zhang Q, Li Q, Guo L, Xiong G, Qian Q, Hu J. GR5 acts in the G protein pathway to regulate grain size in rice. Plant Communications, 2024, 5 (1): 100673
- [3] Hu Y, Liu Y, Lu L, Tao J J, Cheng T, Jin M, Wang Z Y, Wei J J, Jiang Z H, Sun W C, Liu C L, Gao F, Zhang Y, Li W, Bi Y D, Lai Y C, Zhou B, Yu D Y, Yin C C, Wei W, Zhang W K, Chen S Y, Zhang J S. Global analysis of seed transcriptomes reveals a novel PLATZ regulator for seed size and weight control in soybean. New Phytologist, 2023, 240 (6): 2436-2454
- [4] Guo X, Fu Y, Lee Y J, Chern M, Li M, Cheng M, Dong H, Yuan Z, Gui L, Yin J, Qing H, Zhang C, Pu Z, Liu Y, Li W, Li W, Qi P, Chen G, Jiang Q, Ma J, Chen X, Wei Y, Zheng Y, Wu Y, Liu B, Wang J. The PGS1 basic helix-loop-helix (bHLH) protein regulates *F13* to impact seed growth and grain yield in cereals. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20 (7): 1311-1326
- [5] Zhao X, Dou L, Gong Z, Wang X, Mao T. BES1 hinders ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 and promotes seed germination in *Arabidopsis*. New Phytologist, 2019, 221 (2): 908-918
- [6] Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris T C, Chory J. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. Science, 1996, 272 (5260): 398-401
- [7] Fariduddin Q, Khalil R R A E, Mir B A, Yusuf M, Ahmad A. 24-Epibrassinolide regulates photosynthesis, antioxidant enzyme activities and proline content of *Cucumis sativus* under salt and/or copper stress. Environmental Monitoring and Assessment, 2013, 185 (9): 7845-7856
- [8] Nolan T M, Vukašinović N, Liu D, Russinova E, Yin Y. Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. Plant Cell, 2019, 32 (2): 295-318
- [9] Kim T W, Guan S, Sun Y, Deng Z, Tang W, Shang J X, Sun Y, Burlingame A L, Wang Z Y. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. Nature Cell Biology, 2009, 11 (10): 1254-1260
- [10] Kir G, Ye H, Nelissen H, Neelakandan A K, Kusnandar A S, Luo A, Inzé D, Sylvester A W, Yin Y, Becraft P W. RNA interference knockdown of BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 in maize reveals novel functions for brassinosteroid signaling in controlling plant architecture. Plant Physiology, 2015, 169 (1): 826-839
- [11] Clouse S D. Brassinosteroid signal transduction: From receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. Plant Cell, 2011, 23 (4): 1219-1230
- [12] Xu H, Sun H, Dong J, Ma C, Li J, Li Z, Wang Y, Ji J, Hu X, Wu M, Zhao C, Qin R, Wu J, Ni F, Cui F, Wu Y. The brassinosteroid biosynthesis gene *TaD11-2A* controls grain size and its elite haplotype improves wheat grain yields. Theoretical and Applied Genetics, 2022, 135 (8): 2907-2923
- [13] Lyu J, Wang D, Duan P, Liu Y, Huang K, Zeng D, Zhang L, Dong G, Li Y, Xu R, Zhang B, Huang X, Li N, Wang Y, Qian Q, Li Y. Control of grain size and weight by the GSK2-LARGE1/OML4 pathway in rice. Plant Cell, 2020, 32 (6): 1905-1918
- [14] Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. Cell, 2005, 120 (2): 249-259
- [15] Yin Y, Wang Z Y, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. Cell, 2002, 109 (2): 181-191
- [16] Sun F, Ding L, Feng W, Cao Y, Lu F, Yang Q, Li W, Lu Y, Shabek N, Fu F, Yu H. Maize transcription factor ZmBES1/BZR1-5 positively regulates kernel size. Journal of Experimental Botany, 2021, 72 (5): 1714-1726
- [17] Xiong M, Yu J, Wang J, Gao Q, Huang L, Chen C, Zhang C, Fan X, Zhao D, Liu Q Q, Li Q F. Brassinosteroids regulate rice seed germination through the BZR1-*RAMy3D* transcriptional module. Plant Physiology, 2022, 189 (1): 402-418
- [18] Li Q F, Lu J, Yu J W, Zhang C Q, He J X, Liu Q Q. The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth. Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms, 2018, 1861 (6): 561-571
- [19] Van Nguyen T, Park C R, Lee K H, Lee S, Kim C S. BES1/BZR1 homolog 3 cooperates with E3 ligase AtrZRF1 to regulate osmotic stress and brassinosteroid responses in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany, 2020, 72 (2): 636-653
- [20] Ye H, Liu S, Tang B, Chen J, Xie Z, Nolan T M, Jiang H, Guo H, Lin H-Y, Li L, Wang Y, Tong H, Zhang M, Chu C, Li Z, Aluru M, Aluru S, Schnable P S, Yin Y. RD26 mediates crosstalk between drought and brassinosteroid signalling pathways. Nature Communications, 2017, 8 (1): 14573
- [21] Cui X Y, Gao Y, Guo J, Yu T F, Zheng W J, Liu Y W, Chen J, Xu Z S, Ma Y Z. BES/BZR transcription factor TaBZR2 positively regulates drought responses by activation of *TaGST1*. Plant Physiology, 2019, 180 (1): 605-620
- [22] Lu X, Xiong Q, Cheng T, Li Q T, Liu X L, Bi Y D, Li W, Zhang W K, Ma B, Lai Y C, Du W G, Man W Q, Chen S Y, Zhang J S. A PP2C-1 allele underlying a quantitative trait locus enhances soybean 100-seed weight. Molecular Plant, 2017, 10 (5): 670-684
- [23] Zhu X, Liang W, Cui X, Chen M, Yin C, Luo Z, Zhu J,

- Lucas W J, Wang Z, Zhang D. Brassinosteroids promote development of rice pollen grains and seeds by triggering expression of Carbon Starved Anther, a MYB domain protein. *Plant Journal*, 2015, 82 (4): 570-581
- [24] Lyu J, Wang D, Sun N, Yang F, Li X, Mu J, Zhou R, Zheng G, Yang X, Zhang C, Han C, Xia G M, Li G, Fan M, Xiao J, Bai M Y. The TaSnRK1-TabHLH489 module integrates brassinosteroid and sugar signalling to regulate the grain length in bread wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22 (7): 1989-2006
- [25] Yu H, Feng W, Sun F, Zhang Y, Qu J, Liu B, Lu F, Yang L, Fu F, Li W. Cloning and characterization of BES1/BZR1 transcription factor genes in maize. *Plant Growth Regulation*, 2018, 86 (2): 235-249
- [26] Sarwar R, Geng R, Li L, Shan Y, Zhu K M, Wang J, Tan X L. Genome-wide prediction, functional divergence, and characterization of stress-responsive BZR transcription factors in *B. napus*. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 790655
- [27] Ullah U, Shalmani A, Ilyas M, Raza A, Ahmad S, Shah A Z, Khan F U, AzizUd D, Bibi A, Rehman S U, Abbas Z, Buttar Z A. BZR proteins: Identification, evolutionary and expression analysis under various exogenous growth regulators in plants. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49 (12): 12039-12053
- [28] Zhang P, Yan H, Liu Y, Chai Y. Genome-wide identification and functional characterization of wheat brassinazole-resistant transcription factors in response to abiotic stresses and stripe rust infection. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1144379
- [29] Li R, Zhang B, Li T, Yao X, Feng T, Ai H, Huang X. Identification and characterization of the BZR transcription factor genes family in potato (*Solanum tuberosum* L.) and their expression profiles in response to abiotic stresses. *Plants-Basel*, 2024, 13 (3): 407
- [30] 杜巧丽, 刘均霞, 陈美晴, 蒋君梅, 任明见, 李向阳, 姜于兰, 谢鑫. 高粱BR信号转录因子BZR1基因家族的鉴定及激素应答分析. *植物保护学报*, 2022, 49 (3): 848-856
- Du Q L, Liu J X, Chen M Q, Jiang J M, Ren M J, Li X Y, Jiang Y L, Xie X. Identification of sorghum BR signal transcription factor *BZR1* gene family and analysis of hormone response. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49 (3): 848-856
- [31] Olson A, Klein R R, Dugas D V, Lu Z, Regulski M, Klein P E, Ware D. Expanding and vetting *Sorghum bicolor* gene annotations through transcriptome and methylome sequencing. *Plant Genome*, 2014, 7 (2): 1-20
- [32] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools-an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13 (8): 1194-1202
- [33] Lynch M, Conery J S. The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 2000, 290 (5494): 1151-1155
- [34] Zhu X, Zhang S, Chen Y, Mou C, Huang Y, Liu X, Ji J, Yu J, Hao Q, Yang C, Cai M, Nguyen T, Song W, Wang P, Dong H, Liu S, Jiang L, Wan J. Decreased grain size1, a C3HC4-type RING protein, influences grain size in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology*, 2021, 105 (4): 405-417
- [35] Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, Young N D, May G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 2004, 4: 10
- [36] Jiang W B, Huang H Y, Hu Y W, Zhu S W, Wang Z Y, Lin W H. Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2013, 162 (4): 1965-1977
- [37] Xiao B, Li P, Wu Q. Weak allele versus null allele: Which one to select? *Trends in Genetics*, 2022, 38 (10): 989-990