

SbSBP5 基因参与高粱对干旱胁迫的响应

常建忠^{1,2}, 董春林¹, 张正¹, 杨睿¹, 蒋丹¹, 张一中³, 张彦琴¹, 杨丽莉¹, 闫凤霞³

(¹ 山西省农业科学院旱地农业研究中心 / 黄土高原东部旱作节水技术国家地方联合工程实验室 / 有机旱作山西省重点实验室, 太原 030031;

² 农业部黄土高原作物基因资源和种质创制重点实验室, 太原 030031; ³ 山西省农业科学院高粱研究所, 晋中 030600)

摘要: SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN box (SBP-box) 基因编码一类植物特有的转录因子, 其功能涉及植物生长发育的诸多过程, 包括植物叶片的形态建成、胚胎发生、营养生长到生殖生长的更替等, 在作物遗传改良方面具有重要的应用价值。本研究克隆了高粱 *SbSBP5* 基因, 分析了其序列特征及其在不同逆境下的表达模式。结果表明 *SbSBP5* 编码 884 个氨基酸, 含有一个典型 SBP 结构域, 其启动子区含有 ABRE、ARE 和 MBS 等逆境相关顺式元件; *SbSBP5* 可受 PEG 和外源 ABA 诱导上调表达, 表达峰值时分别是对照的 12 倍和 11 倍, *SbSBP5* 启动子在转基因拟南芥中可驱动 GUS 报告基因表达, 并且其活性可受干旱和 ABA 诱导增强, 分别是对照的 3 倍和 4 倍。本研究结果进一步证明 *SbSBP5* 参与了植株对干旱和外源 ABA 的响应, 为深入研究 *SbSBP5* 的功能奠定了基础。

关键词: SBP-box; 干旱胁迫; 高粱; 表达分析

SbSBP5 is Involved in Response to Drought Stress in Sorghum

CHANG Jian-zhong^{1,2}, DONG Chun-lin¹, ZHANG Zheng¹, YANG Rui¹, JIANG Dan¹, ZHANG Yi-zhong³,

ZHANG Yan-qin¹, YANG Li-li¹, YAN Feng-xia³

(¹ Dryland Agriculture Research Center, Shanxi Academy of Agricultural Sciences/National Local Joint Engineering Laboratory of Water-saving Techniques for Dry Farming in the Eastern Loess Plateau/Organic Dry Farming of Shanxi Province Key Laboratory, Taiyuan 030031; ² Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Taiyuan 030031; ³ Sorghum Institute of Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Jinzhong 030600)

Abstract: SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-box (SBP-box) genes, that belong to plant-specific transcription factors, are involved in many important aspects including leaf development, embryogenesis, vegetative and reproductive phase transitions. This family has important practical application in crop genetic improvement. In this study, we isolated a sorghum SBP-box gene named *SbSBP5*, and conducted the sequence analysis and the transcriptional pattern under different biotic stresses. *SbSBP5* coded for a polypeptide of 884 amino acids that contained a typical SBP domain. By analyzing the promoter sequence, several stress-related cis-elements including ABRE, ARE and MBS were detected. Twelve and 11-fold up-regulation of *SbSBP5* was detected by PEG-directed drought treatment or applying exogenous abscisic acid. In transgenic Arabidopsis that expressed *SbSBP5* promoter plus a GUS reporter, three and four fold of GUS activity were detected under drought or exogenous abscisic acid treatments, respectively. Thus, these results provided preliminary outcome of *SbSBP5* responding to drought and exogenous abscisic acid, which might provide a basis for further unlocking its molecular function.

Key words: SBP-box; drought stress; sorghum; expression analysis

收稿日期: 2018-12-10 修回日期: 2018-12-25 网络出版日期: 2019-01-24

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181210003>

第一作者研究方向为作物分子育种, E-mail: cjzyfx@163.com

基金项目: 山西省农业科学院优势课题组自选项目 (YYS1705); 有机旱作山西省重点实验室 (201805D111015); 山西省重点研发计划重点项目 (201703D211010); 山西省农业科学院特色农业技术攻关项目 (YGG17016)

Foundation project: The Optional Project of Advantage Research Group of SAAS (YYS1705), Organic Dry Farming of Shanxi Province Key Laboratory (201805D111015), The Key Program of Key Research and Development Projects of Shanxi province (201703D211010), Characteristic Agricultural Science and Technique Foundation of SAAS (YGG17016)

转录因子是在转录水平控制基因表达的一大类因子,其在真核生物生长发育不同阶段充当“开关”的角色^[1-2]。SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN box (SBP-box) 是一类绿色植物中特有的转录因子,含有一个约 78 个氨基酸残基的高度保守的 SBP 结构域,该结构域含有 3 个重要功能基序,包含 2 个锌指结构 Cys-Cys- Cys-His (Zn1)、Cys-Cys- His-Cys (Zn2) 和 1 个高度保守的双向核定位信号 (NLS, Nuclear localization signal)^[3]。金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) SBP1 和 SBP2 是最早发现的 SBP-box 家族基因,其功能是通过与 MADS-box 基因启动子 SQUAMOSA 区域结合,参与调控花的早期发育^[4]。SBP-box 基因参与植物生长发育的诸多过程,包括植物叶片的形态建成^[5-6]、间隔期长度^[7]、营养生长到生殖生长的更替^[8]等。自发现以来,SBP-box 基因在许多重要植物中均有报道,如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)^[9]、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.)^[10]、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)^[11]、玉米 (*Zea mays* L.)^[12]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[13]、番茄 (*Solanum lycopersicum* L.)^[14]等。在植物育种方面,SBP-box 基因具有重要的实际利用价值,如番茄 CNR (color-less non-ripening) 是一个控制果实成熟的关键基因; *OsSPL14* 被誉为水稻理想株型基因,其在营养生长和生殖生长期分别控制水稻分蘖和穗分支^[13]; *ZmLG1* 的缺失突变体不能形成叶舌和叶耳,表现为叶片直立、株型紧凑,是作物株型育种的重要种质资源^[6]。除此之外,SBP-box 基因参与了植物对逆境胁迫的反应,如 CRR1 可维持衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 体内铜稳态平衡^[15]。

高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 是重要的禾谷类作物,具有较强的抗逆性,是我国重要的旱地粮食作物,此外还是酿酒、饲料、工业淀粉的重要来源。高粱基因组测序工作已于 2009 年完成^[16],为高粱一些重要基因的克隆和功能分析提供了方便。高粱是公认的综合抗旱性较强的作物,其抗旱能力体现在御旱、耐旱、避旱等多方面,克隆并研究高粱中的抗旱相关基因,对于深入探讨高粱抗旱的形成机制以及改善作物的抗旱性具有重要的意义。SBP-box 基因家族成员在作物生长发育诸多方面发挥重要作用,包括株型建成、产量形成、抗逆性等,但在高粱中还未见深入研究。前期本课题组用生物信息学方法在高粱中分离到 18 个 SBP-box 基因成员,分析了该家族成员的序列特征、染色体位置分布、基因

结构等,并利用 RNA-seq 数据分析了该家族成员的时空表达特性,筛选出了高粱 SBP-box 基因家族中可能与产量形成及逆境胁迫相关的重要基因^[17],其中可能与逆境胁迫相关的基因有 *SbSBP5*、*SbSBP8* 和 *SbSBP18*。本研究从高粱材料 BTx623 中克隆了 *SbSBP5* 基因,对其序列特征进行了分析,并通过实时荧光定量和转化启动子稳定表达的方法,对该基因在不同逆境条件下的时空表达模式进行了研究,旨在为深入研究 *SbSBP5* 的生物学功能,揭示 SBP-box 基因在作物逆境响应反应中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及菌种

利用本实验室保存的高粱材料 BTx623 克隆 *SbSBP5* 基因及其启动子序列,启动子转化所用拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为哥伦比亚 3 型,拟南芥转化所用感受态细胞为 GV3101。

高粱幼苗在人工气候箱中生长 2 周后,进行胁迫处理,干旱胁迫:加入 PEG-6000 (-0.5 MPa) 10 mL;盐胁迫:NaCl 溶液 (250 mmol/L) 6 mL;低温胁迫:将幼苗移入 4 °C 光照培养箱;外源 ABA 诱导:直接喷洒 ABA 溶液 (50 μmol/L) 至叶片湿润;对照 (CK),未经处理。处理时间为 0 h、1.5 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h 和 24 h。转基因拟南芥生长 1 周后,进行胁迫处理,方法如下:转入含有 PEG-6000 (-0.5 MPa) 或 NaCl 溶液 (250 mmol/L) 的 MS 固体培养基上;直接喷洒 ABA 溶液 (50 μmol/L) 至叶片湿润;移入 4 °C 光照培养箱;处理时间为 12 h。

1.2 *SbSBP5* 基因克隆及序列分析

基于 BTx623 的 XM_021456925.1 的 mRNA 序列,应用 Primer Premier 5.0 设计引物 *SbSBP5F1*/*SbSBP5R1* (表 1),以 BTx623 幼苗总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 (15 μL): 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 1 min, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环;最后延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收,与 pEAZY-Blunt simple vector (TRANSGEN, 北京) 克隆载体连接,转化 DH5α 大肠杆菌感受态细胞,挑取阳性菌提质粒送公司测序 (上海派森诺生物科技股份有限公司)。利用 ExPASy (<https://www.expasy.org/resources>) 的生物信息学工具对 *SbSBP5* 氨基酸序列进行分析。利用

MEGA 4.1 (NJ, 1000 BootStrap)^[18] 构建系统进化树。

表 1 本研究中所用到引物信息
Table 1 The primers used in this paper

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')	备注 Note
SbSBP5F1/ R1:	F: GGGCGACAGGGAGGAGGG R: CGTCATCGCAACATCTTCATC	基因 克隆
SbSBP5pF1/ R1	F: GTCGACATATCTCTCGCGCATACAT GTAGG R: CCCGGGTTTCCACAGGAACTAGC TTCCAT	启动子 克隆
SbSBP5Fe/ Re	F: AAAGAGAGCGGCGACCAAGC R: CCTCTTGTAACGACGACGC	基因 表达
SbUBIF/R	F: GGCTCGAAGACGATCAGAT ACC R: TCGGCATCGTTTATGGTT	内参

1.3 高粱 *SbSBP5* 基因的表达分析

利用 Trizol 试剂提取胁迫处理后的高粱幼苗总 RNA, 使用 (RevertAid Premium Reverse Transcriptase) (Thermo Scientific EP0733) 合成第一链 cDNA。根据 *SbSBP5* 序列设计引物 SbSBP5Fe/Re (表 1), 选择高粱 18S rRNA (SbUBIF/R) 作为内参基因进行表达分析。使用 ABI Stepone plus 型荧光定

量 PCR 仪, 反应体系为 SybrGreen qPCR Master Mix 10 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL、cDNA 模板 2.0 μL 和 ddH₂O 补至 20 μL, 3 次重复。PCR 程序为: 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 3 s、60 ℃ 30 s, 45 个循环, 以不加模板的 PCR 作为阴性对照。用基因相对表达分析 2^{-ΔΔT} 方法计算各取样时间 *SbSBP5* 基因的相对表达量及其标准差^[19]。

1.4 *SbSBP5* 启动子表达载体的构建及基因转化

根据 *SbSBP5* 基因组序列 (LOC8060303) 设计引物并在其 5' 端分别加入 *Sal*I 和 *Sma*I 酶切位点, 以 BTx623 的 gDNA 为模板, 利用保真酶 TransStart Fast Pfu DNA polymerase (TRANSGEN, 北京), 扩增 *SbSBP5* 启动子片段, 将其命名为 SbSBP5P, 体系为 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 1 min, 58 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 32 个循环; 最后延伸 5 min。将扩增得到的片段连至 pEAZY-Blunt simple vector 测序验证。将正确的 SbSBP5P 重组质粒用 *Sal*I 和 *Sma*I 双酶切, 与经相同酶处理的 pCAMBIA1391z 载体片段进行连接, 经酶切测序验证, 构建成 pCAMBIA1391z-SbSBP5p 重组质粒 (图 1)。利用浸花法进行拟南芥的遗传转化^[20]。

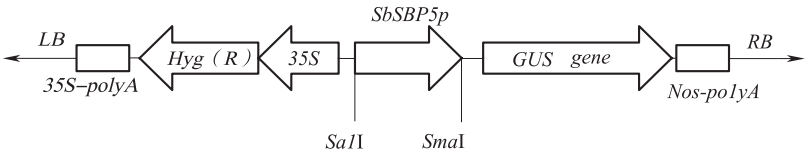


图 1 表达载体构建示意图
Fig.1 Schematic show of expression vector construction

1.5 GUS 组织化学染色

参考 Jefferson^[21] 的方法, 将拟南芥幼苗置于干净离心管中, 加入染色液, 放入 37 ℃ 温箱中过夜, 次日取出脱色, 利用莱卡体视显微镜 (M165FC) 观察并拍照。参考宸珩等^[22] 的方法配制 X-GLUC 染色液。

1.6 GUS 定量分析

GUS 活性的荧光检测参照 Jefferson^[21] 的方法。将 0.1 g 样品在液氮中迅速研成粉末, 加入 GUS 酶提取液 1 mL, 振荡混匀, 12000 r/min 离心 10 min, 取清液, 得到 GUS 粗酶提取液。

以 4-MUG 为作用底物进行酶促反应后, 在激发波长 350 nm, 发射波长 455 nm 条件下用酶活荧

光测量仪 (DQ200) 测定它们的荧光强度, 考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

2 结果与分析

2.1 *SbSBP5* 克隆及序列分析

以 BTx623 幼苗总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 克隆 *SbSBP5* 序列 (图 2)。*SbSBP5* 基因 CDS 全长 2655 bp, 编码 884 个氨基酸, 相对分子质量为 98.78 kD, 等电点为 6.31, 其中亮氨酸 (Leu) 和丝氨酸 (Ser) 含量最高, 为 9.1%。*SbSBP5* 蛋白二级结构中分别含有 α-螺旋 38%、延伸链 9.62%、β-转角 4.75% 和无规则卷曲 47.62%。*SbSBP5* 蛋白含有一个典型 SBP 结构域 (130-205)

(图3)、4个低复杂区、3个ANK重复和1个跨膜区(759-778)。亚细胞定位预测显示,该蛋白有可能位于细胞任何部位。将 *SbSBP5* 氨基酸序列在 NCBI 数据库中 BLAST 并构建系统发育树,结果表明所选植物 SBP 蛋白能被划分为3组,其中 *SbSBP5* 与玉米中的2个蛋白 PWZ31551.1 和 ONM31580.1 的关系最近。聚类结果显示第 I 组和第 II 组只有单子叶植物基因,而第 III 组既包含双子叶植物基因,也包含单子叶植物基因(图4)。

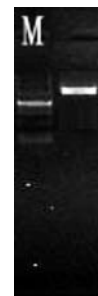
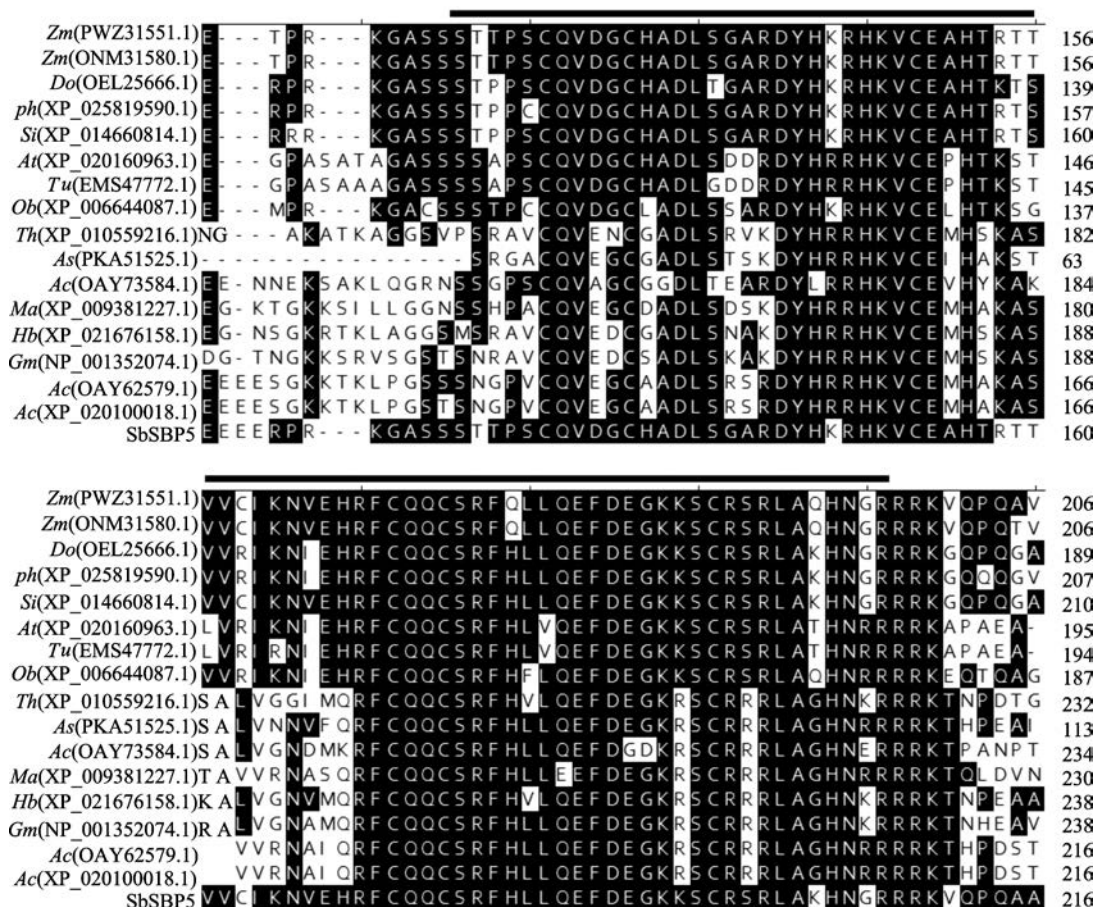


图2 高粱 *SbSBP5* 的 PCR 扩增
Fig.2 PCR amplification of *SbSBP5*



黑线所示区域表示 SBP 结构域。The black line indicated the location of SBP-box,
Zm: *Zea mays* L., Do: *Dichanthelium oligosanthes* S., Ph: *Panicum hallii*, Si: *Setaria italica* L.,
At: *Aegilops tauschii* subsp. *Tauschii*, Tu: *Triticum urartu* L.,
Ob: *Oryza brachyantha* L., Th: *Tarenaya hassleriana* C., As: *Apostasia shenzhenica*
Z.J.Liu&L.J.Chen, Ac: *Ananas comosus* L., Ma: *Musa acuminata* subsp. *Malaccensis*,
Hb: *Hevea brasiliensis* W., Gm: *Glycine max* L. The same as below

图3 高粱 *SbSBP5* 与植物中其他同源 SBP 蛋白比对分析

Fig.3 Alignment of *SbSBP5* and other SBP5 homolog in plants

2.2 *SbSBP5* 启动子序列分析

采用 PlantCARE 分析 *SbSBP5* 启动子序列的顺式作用元件。结果表明 *SbSBP5* 启动子包含多种顺式作用元件(图5),其中包括真核生物启动子基本

调控元件 TATA-box、CAAT-box,还有多种逆境响应元件,如 ABA 响应元件 ABRE、抗旱相关转录因子 MYB 结合位点、低氧响应元件 ARE 和茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-Motif 等(表2)。

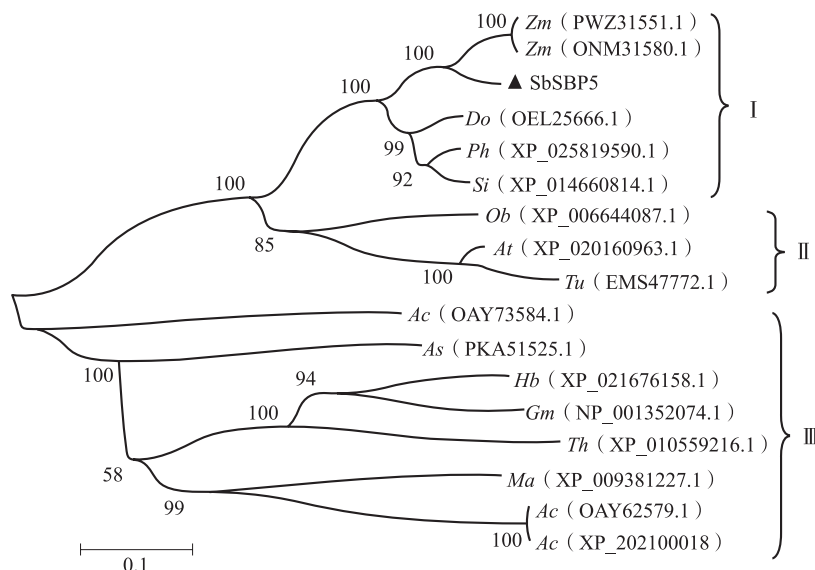


图 4 SBP5 的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of SBP5

1727 AAGATTTCATCTCTATTTTATCTCGTAATACTGCTAATAAAACCAGTTACAAATCTTATTCTGTAGAGT
 1657 GGAGGATATGCCTTTACCTTTCATAAGGTAGTTTATAATTCCCAAGGTGGTCAAAGTTGAGAAAGCTT
 1587 ATAAAAAAGCTAAAAATGGACTATACAATTTAGGACAACAAATAATGTTAGTTCTATTAAACGGTTCTTT
 1517 CTATCCATAAAAAATGCAATTCTCATTCTTTTGGAGAGTTAAACAATTTAAAGATTGAGCAAAGTTA
 1447 TATAAAAAAGTACTCCTACTTTGATAGTACAAAAATATCATTAAATTAATTAAAAATATATTGATAGT
 1377 ATAAGGAGGTTCTGTGTTGGAAGATGTGACGACGGTTTAAATGCTGAAAATTCACATAGTATGGCCTTGTT
 1307 CAGTTCCGATTTTCTTTTAAAAATTTGGGTATATTTTCGTTTTATTGATAATTATTATCTAATTATAA
 1237 ATTAAGTAGATTTAAAGATTATCTTATGATTTACAGATAAATTATGTAATTAGTTTTATTTTTGTGTT
 1097 ATATTTAATGTTTTCTATATGAGCCGTACAATCTTGAAAAGTTTTGGTTTTGAGTGAAATATAAACAA
 1027 AGCCTATGTTCCAGTTGTAAGACGTGAGCAATGATTCAGGCCTTGTTAGTTCACTACGAAATTCAAAAA
 957 GTTTTCAAGATTCTCTGTACATCGAATCTTGCAGCACATACATGAAGCATTAAATATAGACGAAAAACA
 887 AAATTAATTACACAGTTTGCTGTAAATCGCGACACGAATCTTTAATCTTAGTTAGTTATGATTAGAC
 817 AATATTTGTTAAATAAAAAATGAAAGTGCTACAGTAGCTAAACAAGGCCTCAAATAATGCCCAAATTCAGT
 747 CCCCTGATGAACATGCAGCGCTGGCCTCGGTTGTGGGGCGTGCGGCTGACCGCTGACCGCCAGCGAG
 677 CGGGTCTGTCAGGAAACGAGTGAATCGCCGCGCCGCGCTGCGTCATCAGGTTTACCCCTGCTCTTCCAAG
 607 TTCCAACCGGCAGCCGACCTCCGTGGCGTCTGCTGCCAGCGCCAGACAAGAAACAGGGGTGATGAAAA
 537 AGAGGCGGCGGTGGTGTGAATATGCCGGGGCGCCGGGGCGGAGGGATCTGCCCTCCCAGGATACTTCGC
 467 CCCCCGTTCCACCGGAGCCCTTCTCCCTCCGTTCCGCGCTACAGGATCCGGGAGACGAAAAGTAGTA
 397 GTAGTAGCCCCATCCCCAACCGGTCTTAACCTACGGTACCCAATTTCTGACTCTGCTCTCTCCGTGAGCT
 327 ACTACTCCATCTCCATTTCTTCAATCATTTCTCGCCTTTTCAAGTGAAGGGCGGTTGCTTGCCTTGGATAA
 257 CCACGGCGTCGTTCTAGCCGCGGGGCGGAGCTAAGGTAATCTTGGTTCTTGTCTCTTGTATTAGTTTC
 187 AGGATTGTCCCAACCAAGGTTGGTAATCTCTGTGTTTGTTCGCTGTAGTCTGGGATGTAGTTGAA
 117 TTCAGGGATCTTTGGATTCTTGTATACGTGCCAACACAGGAGGATCAGTTCCCTCAAAGAGCAGCA
 47 AAAGAAGAGCAAGAGGGGCGACAGGGAGGAGGGAAGGCAGAGGAAATG

MBSI
 TGACG-motif
 ARE
 MBS ABRE
 TGACG-motif
 GC-motif
 CAAT-box
 CAAT-box MYB-binding site
 TGA-element
 ABRE MYB-binding site
 +1

图 5 *SbSBP5* 启动子序列及顺式作用元件分布Fig.5 Sequence and cis-acting elements distribution of *SbSBP5* promoter

表 2 *SbSBP5* 启动子主要顺式作用元件及预测的功能
Table 2 The cis-acting elements and predicted functions in the *SbSBP5* promoter sequence

元件名称 Name	序列 Sequence	功能 Function
ABRE	GACACGTGGC/ TACGTG	ABA 响应
ARE	AAACCA	低氧响应
MBSI	C (G/C) GTTA	黄酮基因 MYB 结合位点
MBS	CAACTG	抗旱相关转录 因子 MYB 结合 位点
TGACG-Motif	TGACG	茉莉酸甲酯 响应
GC-motif	CCCCCG	氧胁迫增强 元件
TGA-element	TGACGTAA	茉莉酸甲酯 响应
MYB-binding site	CAACAG	MYB 结合位点

2.3 *SbSBP5* 在不同逆境下的表达

通过 PEG、NaCl、ABA 和 4 ℃模拟 4 种非生物胁迫处理高粱幼苗,分析 *SbSBP5* 在不同逆境下的表达模式。结果表明 *SbSBP5* 在 PEG 处理后 1.5 h 和 2 h 出现表达峰值,分别是对照的约 12 倍和 8 倍,随后相对表达量逐渐回落;在外源 ABA 处理条件下, *SbSBP5* 的相对表达量在 4 h 达到最高水平,随后逐渐下降,到 6 h 和 12 h 形成 2 个小高峰,随后回落; *SbSBP5* 在 NaCl 和低温 (4 ℃) 处理条件下,相对表达量未见明显变化 (图 6)。

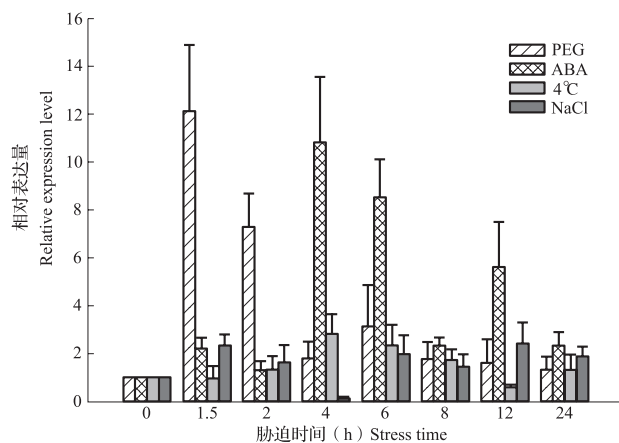


图 6 *SbSBP5* 在不同逆境下的表达分析

Fig.6 Expression analysis of *SbSBP5* under different abiotic stresses

2.4 *SbSBP5* 启动子转拟南芥功能分析

GUS 染色结果表明转 *SbSBP5* 启动子拟南芥幼苗在受到 PEG 和外源 ABA 胁迫 12 h 后,其 GUS 着色深度显著大于对照 (0 h);而在 NaCl 和低温 (4 ℃) 胁迫下,其 GUS 染色结果变化不明显 (图 7)。GUS 定量结果表明 *SbSBP5* 启动子活性可受外源 ABA 和 PEG 胁迫上调表达约 4 倍 ($P<0.01$) 和 3 倍 ($P<0.05$),在 NaCl 和低温 (4 ℃) 胁迫下,未见显著变化 ($P>0.05$) (图 8)。

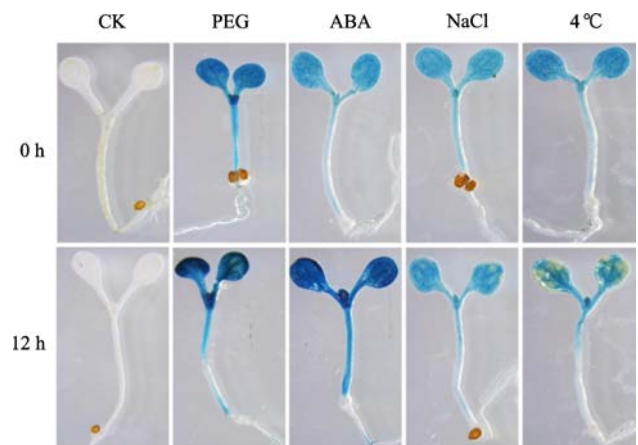
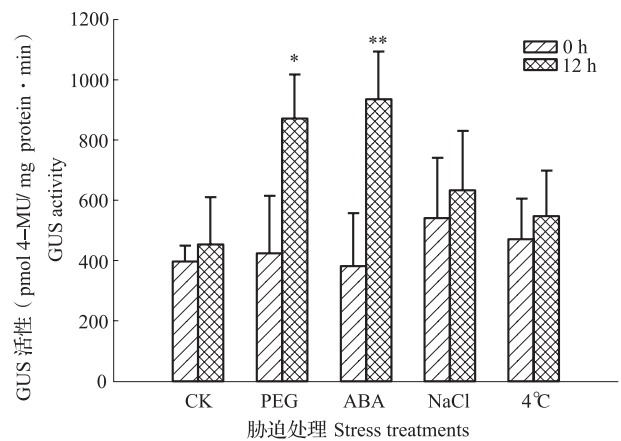


图 7 胁迫条件下转基因拟南芥的 GUS 组织化学染色
Fig.7 Histochemical GUS staining activity in transgenic *Arabidopsis thaliana* under different stresses



* 和 ** 分别表示差异显著和极显著

*and** indicated significant and highly significant, respectively

图 8 胁迫条件下转基因拟南芥的 GUS 定量分析
Fig.8 Quantification of GUS activity in transgenic *Arabidopsis thaliana* under different stresses

3 讨论

干旱、低温、高盐等非生物胁迫是制约作物产量的重要环境因素,为了适应环境,植物能够通过信号传导及表达特定抗逆性基因等途径来抵抗外

界不良环境的影响,在这一过程中转录因子发挥着重要作用。SBP-box 基因是一类植物特有的转录因子,参与众多生物学过程,其基因可分为几类:产量相关基因,如 *OsSPL16* 控制水稻籽粒大小和品质^[23];株型相关基因,如 *OsSPL14* 控制水稻分蘖数^[13], *ZmUB2/3* 控制玉米植株雄穗分支数^[24];胁迫应答基因,如拟南芥 *AtSPL14* 与对真菌类毒素伏马菌素 B1 (Fumonisin B1) 的响应有关^[25]。前期有关 SBP-box 基因的研究主要集中在前两类功能上,目前,人们越来越关注该家族基因在逆境胁迫应答方面的功能。葡萄 *VpSBP16* 可通过调控 SOS 和 ROS 信号通路来增强转基因拟南芥对高盐和干旱的抗性^[26];桦树 *BpSPL9* 通过增加植株体内 SOD 和 POD 积累,从而提高转基因株系对非生物逆境的抗性^[27];玉米 31 个 SBP-box 家族中有一部分成员与逆境胁迫响应有关,如 *ZmSPL4*、*ZmSPL19* 和 *ZmSPL24* 可受干旱、高盐和外源 ABA 诱导上调表达^[28]。

前期我们在高粱中鉴定出 18 个 SBP-box 基因^[17], *SbSBP5* 基因 CDS 长 2655 bp, 含有 10 个内含子和 11 个外显子。系统进化可将所选 SBP-box 蛋白分为 3 组,第 I 组和第 II 组只包含单子叶植物基因,而第 III 组既包含双子叶植物基因,又包含单子叶植物基因,可能暗示该基因的起源早于单、双子叶植物的分化;*SbSBP5* 蛋白位于第 I 组,它与玉米 PWZ31551.1 和 ONM31580.1 关系最近,这 2 个蛋白对应于 *ZmSPL8*^[28],但在该文献中并未发现 *ZmSPL8* 参与逆境响应,这可能由于胁迫处理方法的差异或该基因功能在进化过程中发生了分化。

前期我们基于公共数据库的 RNA-seq 数据分析表明 *SbSBP5* 可能参与了高粱植株对逆境的胁迫响应。为进一步验证该结果,本研究通过人工模拟干旱 (PEG)、低温 (4 °C)、高盐 (NaCl) 和外源 ABA 的方法,对 *SbSBP5* 进行了实时荧光定量表达分析,分析表明 *SbSBP5* 可受 PEG 和外源 ABA 诱导上调表达,但是出现峰值的时间点和强度差别较大, *SbSBP5* 对干旱 (PEG) 的响应要早于外源 ABA,强度大于外源 ABA; *SbSBP5* 启动子序列含有一些与逆境胁迫相关的顺式元件,如 MBRE、ARE 和 MBS 等,该启动子在转基因拟南芥中可驱动 GUS 报告基因表达,并且其活性可受干旱和 ABA 诱导增强,这与实时荧光定量的结果一致,进一步证明高粱 *SbSBP5* 参与了植株对干旱和外源 ABA 的响应,同时 *SbSBP5* 启动子可作为诱导性启

动子,在基因工程中加以利用。

参考文献

- [1] Sun Y, Oberley L W.Redox regulation of transcriptional activators.Free Radical Biology and Medicine, 1996, 21: 335-348
- [2] 丘日光,张天缘,杨仕梅,宋莉,赵德刚.百脉根 TALE 转录因子家族的鉴定与生物信息学分析.植物遗传资源学报,2019, 20(2): 466-475
Qiu R G, Zhang T Y, Yang S M, Song L, Zhao D G.Genome-wide identification and bioinformatics analysis of TALE transcription factor family in *Lotus japonicus*.Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(2): 466-475
- [3] Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S.A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of Arabidopsis SBP-family transcription factors.Journal of Molecular Biology, 2004, 337: 49-63
- [4] Klein J, Saedler H, Huijser P.A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*.Molecular Genetics and Genomics, 1996, 250: 7-16
- [5] Usami T, Horiguchi G, Yano S, Tsukaya H.The more and smaller cells mutants of *Arabidopsis thaliana* identify novel roles for SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE genes in the control of heteroblasty.Development, 2009, 136: 955-964
- [6] Moreno M A, Harper L C, Krueger R W, Dellaporta S L, Freeling M.*liguleless1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis.Genes & Development, 1997, 11: 616-628
- [7] Kawakatsu T, Itoh J, Miyoshi K, Kurata N, Alvarez N, Veit B, Nagato Y.*PLASTOCHRON2* regulates leaf initiation and maturation in rice.Plant Cell, 2006, 18: 612-625
- [8] Wahl V, Ponnu J, Schlereth A, Arrivault S, Langenecker T, Franke A, Feil R, Lunn J E, Stitt M, Schmid M.Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*.Science, 2013, 339: 704-707
- [9] Cardon G H, Hohmann S, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P.Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition.The Plant Journal, 1997, 12: 367-377
- [10] 李月颖,李菁,刘长宁.蕹菜苜蓿 SBP-box 转录因子基因家族全基因组分析.湖南师范大学: 自然科学学报,2017, 40: 24-33
Li Y Y, Li J, Liu C N.Genome-wide analysis of SBP-Box transcription factor gene family in *Medicago truncatula*.Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2017, 40: 24-33
- [11] 崔梦杰,王晨,冷翔鹏,吴伟民,汤威,张文颖,朱旭东,贾海锋,沈文彪,房经贵.葡萄 SBP-box 转录因子家族的生物信息学分析及其应答激素调控葡萄果实成熟的作用.南京农业大学学报,2018, 41(3): 429-439
Cui M J, Wang C, Leng X G, Wu W M, Tang W, Zhang W Y, Zhu X D, Jia H F, Shen W B, Fang J G.Bioinformatic analysis of the SBP-box transcription factor and function of

- their regulation modes on berry ripening process by responding to hormones. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41 (3): 429-439
- [12] Hultquist J F, Dorweiler J E. Feminized tassels of maize *mop1* and *ts1* mutants exhibit altered levels of miR156 and specific SBP-box genes. *Planta*, 2008, 229: 99-113
- [13] Miura K, Ikeda M, Matsubara A, Song X J, Ito M, Asano K, Matsuoka M, Kitano H, Ashikari M. *OsSPL14* promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nature Genetics*, 2010, 42: 545-549
- [14] Salinas M, Xing S, Hohmann S, Berndtgen R, Huijser P. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. *Planta*, 2012, 235: 1171-1184
- [15] Kropat J, Tottey S, Birkenbihl R P, Depege N, Huijser P, Merchant S. A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102: 18730-18735
- [16] Paterson A H, Bowers J E, Bruggmann R, Dubchak I, Grimwood J, Gundlach H, Haberer G, Hellsten U, Mitros T, Poliakov A, Schmutz J, Spannagl M, Tang H, Wang X, Wicker T, Bharti A K, Chapman J, Feltus F A, Gowik U, Grigoriev I V, Lyons E, Maher C A, Martis M, Narechania A, Otiillar R P, Penning B W, Salamov A A, Wang Y, Zhang L, Carpita N C, Freeling M, Gingle A R, Hash C T, Keller B, Klein P, Kresovich S, McCann M C, Ming R, Peterson D G, Mehboob ur R, Ware D, Westhoff P, Mayer K F, Messing J R. The sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*, 2009, 457: 551-556
- [17] 常建忠, 闫凤霞, 乔麟轶, 郑军, 张福耀, 柳青山. 高粱 SBP-box 基因家族全基因组鉴定及表达分析. *遗传*, 2016, 38 (6): 569-580
Chang J Z, Yan F X, Qiao L Y, Zheng J, Zhang F Y, Liu Q S. Genome-wide identification and expression analysis of SBP-box gene family in *Sorghum bicolor* L.. *Hereditas*, 2016, 38 (6): 569-580
- [18] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599
- [19] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402-408
- [20] Zhang X, Henriques R, Lin S S, Niu Q W, Chua N H. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 2006, 1: 641-646
- [21] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 4: 387-405
- [22] 袁珩, 李昂, 刘惠民, 景蕊莲. 小麦蛋白磷酸酶 2A 基因 TaPP2AbB''- α 启动子的克隆及表达分析. *作物学报*, 2016, 42 (9): 1282-1290
Yi H, Li A, Liu H M, Jing R L. Cloning and expression analysis of protein phosphatase 2A gene *TaPP2AbB''- α* promoter in wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42 (9): 1282-1290
- [23] Wang S, Wu K, Yuan Q, Liu X, Liu Z, Lin X, Zeng R, Zhu H, Dong G, Qian Q, Zhang G, Fu X. Control of grain size, shape and quality by *OsSPL16* in rice. *Nature Genetics*, 2012, 44: 950-954
- [24] Chuck G S, Brown P J, Meeley R, Hake S. Maize SBP-box transcription factors *unbranched2* and *unbranched3* affect yield traits by regulating the rate of lateral primordia initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111: 18775-18780
- [25] Stone J M, Liang X, Nekl E R, Stiers J J. Arabidopsis AtSPL14, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *The Plant Journal*, 2005, 41: 744-754
- [26] Hou H, Jia H, Yan Q, Wang X. Overexpression of a SBP-Box Gene (*VpSBP16*) from Chinese wild vitis species in Arabidopsis improves salinity and drought stress tolerance. *International journal of Molecular Sciences*, 2018, DOI: 10.3390/ijms19049940
- [27] Ning K, Chen S, Huang H, Jiang J, Yuan H, Li H. Molecular characterization and expression analysis of the SPL gene family with BpSPL9 transgenic lines found to confer tolerance to abiotic stress in *Betula platyphylla* Suk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2017, 130: 469-481
- [28] Mao H D, Yu L J, Li Z J, Yan Y, Han R, Liu H, Ma M. Genome-wide analysis of the SPL family transcription factors and their responses to abiotic stresses in maize. *Plant Gene*, 2016, 6: 1