作物学报 ACTA AGRONOMICA SINICA 2021, 47(8): 1437–1449 http://zwxb.chinacrops.org/
ISSN 0496-3490; CN 11-1809/S; CODEN TSHPA9 E-mail: zwxb301@caas.cn

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.01077

小麦 B-box 基因家族全基因组鉴定与表达分析

王艳朋 凌 磊 张文睿 王 丹 郭长虹*

哈尔滨师范大学生命科学与技术学院 / 黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150025

摘 要: B-box (BBX)是一类含有 1 个或 2 个 B-box 结构域的锌指蛋白, 在植物生长发育中起着重要作用。本研究明确小麦 B-box 转录因子的数量、基因结构和分类进化关系, 研究各基因成员在不同组织中的特异性表达以及对非生物胁迫的响应。从小麦全基因组中鉴定得到 87 个 B-box 基因家族成员, 所有 TaBBXs 蛋白均含有 B-box 结构域。TaBBXs 编码 146~489 个氨基酸, 理论等电点为 4.32~10.42。染色体定位分析表明, TaBBXs 分布在除 1A、1B 和 1D 之外的 18 条小麦染色体上。通过系统发育分析将 TaBBXs 划分为 5 个亚家族, 有 0~4 个内含子。在同组内同一个系统进化树分支中的亚族成员具有高度相似的基因结构。qRT-PCR 分析的 20 个 TaBBXs 基因, 具有不同的组织表达模式, 16 个基因在叶中有较高表达, *TaBBX10* 和 *TaBBX39* 仅在叶中有较高表达, 而 *TaBBX74* 在穗中表达, *TaBBX43* 在根中特异性表达。在不同逆境胁迫下, TaBBXs 呈现不同表达模式, 11 个基因在低温胁迫后上调表达, 12 个基因在 ABA 处理后下调表达, 盐胁迫后 10 个基因出现上调表达, 干旱胁迫后 7 个基因出现下调表达, *TaBBX10*、*TaBBX39*、*TaBBX60*、*TaBBX67* 和 *TaBBX74* 基因在 2 种或 2 种以上胁迫下有显著的上调表达。

关键词: 小麦; 全基因组; B-box 基因家族; 非生物胁迫; 基因表达

Genome-wide identification and expression analysis of B-box gene family in wheat

WANG Yan-Peng, LING Lei, ZHANG Wen-Rui, WANG Dan, and GUO Chang-Hong*

Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province / College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, Heilongjiang, China

Abstract: B-box (BBX) is a class of zinc finger proteins that contain one or two B-box domains and play important roles in plant growth and development. The number, gene structure and phylogenetic relationship of wheat B-box transcription factors, as well as their expression specificity in different tissues and response to abiotic stress were investigated. A total of 87 members of B-box gene family were identified from wheat genome and all contained the B-box domain. TaBBXs encoded 146 to 489 amino acids and the isoelectric points ranged from 4.32 to 10.42. Chromosome mapping showed that these genes were distributed on 18 wheat chromosomes except 1A, 1B, and 1D. Based on phylogenetic analysis, TaBBXs were divided into five subfamilies, with 0–4 introns. The members of the subfamily in the same phylogenetic tree branch in the same group had highly similar gene structures. The qRT-PCR revealed that the investigated 20 genes had different expression patterns, and most genes were highly expressed in leaves, and *TaBBX10* and *TaBBX39* were only highly expressed in leaves, while *TaBBX74* was expressed in spikes, *TaBBX43* was specifically expressed in roots. These genes showed different expression patterns under different stress. 11 genes were up-regulated after low temperature stress, 13 genes were down-regulated after ABA treatment, 10 genes were up-regulated after salt stress, and 7 genes were down-regulated after drought stress. *TaBBX10*, *TaBBX39*, *TaBBX60*, *TaBBX67*, and *TaBBX74* were significantly up-regulated under two or more stresses.

Keywords: wheat; genome-wide; B-box gene family; abiotic stress; gene expression

本研究由国家重点基础研究发展计划(973 计划)前期研究计划项目(2011CB111500)和哈尔滨师范大学研究生创新基金项目(HSDSSCX2020-08)资助。

This study was supported by the Preliminary Research Project of the National Basic Research Program of China (973 Program) (2011CB111500) and the Graduate innovation fund of Harbin Normal University (HSDSSCX2020-08).

* 通信作者(Corresponding author): 郭长虹, E-mail: kaku3008@126.com

第一作者联系方式: E-mail: 13694609045@163.com

Received (收稿日期): 2020-09-18; Accepted (接受日期): 2021-01-13; Published online (网络出版日期): 2021-02-22.

URL: https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210222.0940.002.html

小麦(*Triticum aestivum* L.)是世界上最重要的粮食作物之一, 占谷物种植面积的 30% [1-2]。其基因组十分复杂, 由 A、B、D 3 个亚基因组整合而形成的异源六倍体(AABBDD), 重复序列高达 85%, 大小约为 15 GB [3-4]。小麦在生长发育过程中面临多种环境胁迫, 其中盐、干旱、低温等非生物胁迫严重影响小麦的产量和品质[5]。植物 B-box 蛋白可参与逆境响应, 但目前尚未对小麦 B-box 基因家族进行系统分析。因此, 本研究基于小麦全基因组对 B-box 基因家族进行分析, 为进一步研究该基因家族成员功能提供参考, 研究结果对进一步培育或改良小麦抗性品种具有重要意义。

转录因子(transcription factors, TF)能够调节植物的生长发育, 在植物对高盐、干旱和高温等逆境的响应及应答过程中具有重要作用[6]。B-box 转录因子家族是一个具有 B-box 结构域的锌指蛋白家族。1995 年首次在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的一个晚花突变体中鉴定得到 B-box 基因, 命名为 *CONSTANS* (*CO*), 并证实了该基因参与植物开花和其他生命活动的调节[7]。随后的研究进一步揭示, 植物 B-box 转录因子在调节种子萌发[8]、开花[9]、避荫反应[10]、生物或非生物应激反应[11]、植物激素信号转导[12]等多种生命活动中发挥着重要的作用。如 *AtBBX19* 可以通过诱导 ABI5 抑制种子萌发[13], *AtBBX31* 能促进 UV-B 辐射下的光形态发生, 增强对高剂量 UV-B 辐射的耐受性[14]。Gangappa 等[15]指出, AtBBX25 通过与 HY5 形成二聚体并抑制其功能, 参与植物光形态发生的负调控。最新研究表明, 苹果中的 MdBBX37 能够和 MdMYB1 和 MdMYB9 相互作用, 抑制这两种蛋白与目标基因的结合, 从而对花青素生物合成产生负调控作用[16]。非生物胁迫方面, *AtBBX24* (最初被称为 *STO*)参与盐胁迫的信号转导, 可以使盐敏感型的突变体酵母具有更强的耐盐能力[17-18]。*AtBBX5* 通过 ABA 途径参与胁迫响应, 在受到外源的 ABA、盐和渗透胁迫时, 该基因上调表达[19]。*AtBBX18* 的下调表达可以使植物的耐热性增加, 过表达该基因可以降低植物的耐热性[11]。*MdBBX10* 能够增强拟南芥的耐盐耐旱性, 在大肠杆菌(*E. coli*)中表达的 MdBBXs 分别增强了细胞对盐胁迫和渗透胁迫的耐受性[20-21]。梨 *PuBBX24* 启动子显著响应 ABA、光、低温、渗透以及盐胁迫处理[22]。

目前 B-box 基因家族的研究主要集中在模式植物拟南芥、水稻和蒺藜苜蓿中, 而在小麦中尚未见报道。随着小麦基因组的公布[4], 使得对小麦 B-box 基因家族分析成为可能。通过生物信息学方法对全基因组中小麦 B-box 基因家族成员进行鉴定, 对所有家族成员的理化信息、结构功能、表达模式进行分析。利用 qRT-PCR 实验分析 20 个 B-box 基因在不同组织中以及非生物胁迫条件下的表达模式, 为解析 B-box 基因家族在小麦中的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

植物试验材料为小麦中国春(*Triticum aestivum* L., Chinese Spring), 将小麦种子表面用 15%次氯酸钠消毒 5 min, 蒸馏水冲洗 3 次, 消毒后的种子置于无菌培养皿中进行发芽培养 24 h, 将幼芽移栽至小麦水培盒中, 种植在 1/2 Hoagland 营养液中, 在 22℃光照 16 h 的温室中生长。将 2 周龄小麦幼苗分别用 0.2 mol L^{-1} NaCl、20% PEG、100 μmol L^{-1} ABA 和 4℃进行胁迫处理, 以正常条件下的幼苗为对照。处理 6 h 后对处理组和对照组植株进行取材, 每个样品 3 个重复。此外, 采集在 4 月至 7 月大田中培养的小麦组织: 根、茎、叶、穗(开花前 1 d)和籽粒(授粉后 10 d)进行组织表达分析, 每个样品 3 个重复。将所有样品液氮速冻后, –80℃保存备用。

1.2 小麦 B-box 基因家族成员的鉴定

小麦全基因组数据、蛋白序列和注释文件从 Ensembl Plants 数据库中下载, 拟南芥和水稻 B-box 基因序列和蛋白序列下载自 NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)。已知的拟南芥[23]、水稻[24]B-box 蛋白序列为参考对小麦的蛋白序列进行本地 Blast, 设置 *E*-value 参数为 0.001, 得到候选的小麦 B-box 蛋白序列。去重复之后提交到 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) 和 NCBI 的在线工具 CDD (Conserved Domain Database)进行蛋白结构预测, 以确定其含有 B-box 所特有的 B-box 保守结构域。

1.3 小麦 B-box 蛋白理化性质及结构域预测分析

利用 ExPASy 网站(http://expasy.org/)对小麦 B-box 氨基酸序列进行等电点、分子量预测等理化性质分析。根据 CDD 所提供的家族成员所含结构域起始位点整理结构域氨基酸序列, 再采用 weblogo (http://weblogo.berkeley.edu/)对结构域保守氨基酸位点进行可视化显示。

1.4 小麦 B-box 基因家族的系统进化分析

使用 ClustalX 软件对小麦 B-box 氨基酸序列进

行多序列比对, 通过 MEGA7.0 软件构建系统发育树: 采用邻接法(Neighbor-Joining algorithm), 泊松校正(Poission correction), 成对删除(pairwise deletion), Bootstrap 重复值 1000 次。参考拟南芥和水稻 B-box 基因家族的亚族分类结果对小麦 B-box 基因家族进行亚族分类。

1.5　小麦 B-box 基因结构及染色体定位分析

从小麦基因信息 GFF3 文件中提取 TaBBXs 的染色体位置和基因结构信息, 分别使用 MapDraw 和 GSDS (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/)工具将 TaBBXs 的染色体定位信息和基因结构信息(外显子、内含子等)进行可视化显示。

1.6　小麦 B-box 基因家族的复制事件及同源性分析

使用 BLASTp、OrthoMCL、多重共线扫描工具包 (MCScanX) 和默认参数分析基因复制事件(E<1e^{-5}), 如果 2 个同源基因被 5 个或更少的基因分开, 则它们被鉴定为串联重复, 如果 2 个基因被 5 个以上的基因分开或分布在不同的染色体上, 则称为片段重复。同源基因结合系统发育树进一步鉴定, 鉴定标准为: 同源序列覆盖率>75%, 同源性>75%。

1.7　小麦 B-box 基因家族的启动子分析

从小麦全基因组数据库中提取每个小麦 B-box 基因启动子区域(上游 2000 bp), Plant CARE 数据库(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/)分析顺式作用元件(*cis*-acting element)的种类、数目及功能。

1.8　RNA 提取和实时荧光定量 PCR 分析

采用 RNAprep Pure Plant Kit 试剂盒提取小麦总 RNA, 将提取出的总 RNA 作为模板, 利用 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (RR047, TaKaKa)反转录获得 cDNA。利用软件 Primer 3 和 Primer Premier 6 设计引物, 具体引物序列见表 1, 其中小麦 *Actin* 为内参基因。PCR 反应体系为 cDNA 2 μL, 2×SYBR Premix Ex*Taq* 10 μL, 50×ROX Reference Dye 0.4 μL, 正、反向引物各 0.8 μL 和 ddH_2O 6 μL。扩增程序为 94℃ 30 s; 94℃ 5 s, 54℃ 15 s, 72℃ 31 s, 40 个循环。每个处理 3 个生物学重复, 并使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因的相对表达量。用 SPSS 软件进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

表 1　本试验所用引物
Table 1　Primers used in this study

基因 Gene	正向引物 Forward primer (5′–3′)	反向引物 Reverse primer (5′–3′)
TaBBX01	AACGGGGGAGTGTTACTTCT	AGTTGGAGCAGAGGAACCGA
TaBBX06	AACTCGCCAAGTCGGAGGA	AGCTGCTGATACGGAGGTACA
TaBBX08	TACCGCCGACGTGTTCTT	TCAGAGGAGGATACGCTGTG
TaBBX10	CTCGCATCGTCCTCTCCAA	TCTGCTGGCATGAAGGTACA
TaBBX12	CACAGCGTATCGTCGTCTGA	ATCTCCTCGTGCTCCTCCAT
TaBBX13	TCGAACAAGCCGTATCAGCA	AGAAGGAGGAGCCGAGAGAC
TaBBX14	AGCCGGAGGTAATCAAAGCC	GAGGAGGACGACAACGATCC
TaBBX18	GGGTTCTCCGGGTTCGAC	CCTCTAACTCTTGCTCCGGC
TaBBX35	TGACATTGAAAGGCTGCGT	TGACATTGAAAGGCTGCGT
TaBBX39	ACCGCCGATTCCTCATCAC	CCAATGTCGTCTTCTCCTCCT
TaBBX43	CTCCGAGTACCTCACCAAGAC	CAATGCTCCTGCCTCATCCA
TaBBX46	CACGCGGTACATGGCACG	CCGGTGCGCTTGACGAAG
TaBBX52	CCGAACTGCGAGGAAGGAATA	GCTGGCTGATGTGTAGGAAGT
TaBBX60	GCCGAACTGTGAGGAAGGAA	AGGCTGATGCGTAGGAAGTG
TaBBX62	CACGACGGGCGGGTAAAG	GGCTCCTTTTCAAGAACTGCG
TaBBX67	GAGAAGGAAGGGAGCGAGTG	GCTGGACTGGACCGTATTGT
TaBBX74	GCAACCAAGAGCAGTATGTGAT	TGTTGACGGAATCTGTGTAAGC
TaBBX76	AGGTAAGCTCATGCACCTCG	CGTCTCGCTGTCGATCCTTG
TaBBX77	GACGAGCCCATTCACAGCG	GGCAGATGTTGGTGAGGTAGTC
TaBBX86	AGGGCGGGAAGATGGACTAC	ATGAGGAGCTGTAGGTCTGC
TaActin	TACTCCCTCACAACAACCG	AGAACCTCCACTGAGAACAA

2 结果与分析

2.1 小麦基因组中 B-box 家族基因鉴定

参考 *AtBBX*、*OsBBX* 基因, 共获得 87 个小麦 B-box 基因家族成员, 根据它们在染色体上的相对位置将其命名为 *TaBBX1-87*。预测结果显示, 大多数 TaBBXs 蛋白的等电点都小于 7, 只有 *TaBBX27*、*TaBBX28*、*TaBBX33*、*TaBBX34*、*TaBBX38*、*TaBBX64* 和 *TaBBX65* 七个成员在 7 以上; TaBBXs 基因的长度有很大差距, 从 441 bp (*TaBBX26*)到 1473 (*TaBBX69*) bp, 分子量从 15,371.44 Da (*TaBBX26*)到 52,005.04 (*TaBBX69*) Da (附表 1)。

2.2 小麦 B-box 基因家族蛋白序列及系统进化分析

TaBBXs 蛋白的分子长度在 146~490 个氨基酸不等。在 87 个 TaBBXs 中, 23 个 TaBBXs 包含 2 个 B-box 结构域和 1 个保守的 CCT 结构域。29 个成员包含 2 个 B-box 结构域, 但没有 CCT 结构域。9 个 TaBBXs 只包含 1 个 B-box 结构域, 剩下的 26 个包含 1 个 B-box 域和 1 个 CCT 结构域(附表 1)。蛋白质序列比对显示, TaBBXs 的 B-box1 和 B-box2 结构域具有相似的保守序列, TaBBXs 蛋白质中的 CCT 结构域是高度保守的(图 1)。此外, 特定位点的氨基酸残基高度保守, 暗示其保守的功能, 例如 1、4、13、21 和 24 位点的半胱氨酸残基在 B-box 结构域中高度保守。

为了详细研究 TaBBXs 成员的系统发育关系和功能差异, 对 87 个 TaBBXs 蛋白质序列构建系统发育树, 包括 AtBBXs 和 OsBBXs 系统发育树(附图 1)。根据 Khanna 等[23]的分组研究和分析, 将 TaBBXs 进一步划分为 5 个亚家族(图 2), 5 个亚家族成员数量分别为 23、9、21、28、6。亚家族 I、II 和 III 的成员是同时包含 B-box 结构域和 CCT 结构域的 TaBBXs。亚家族 I 成员包含 1~2 个 B-box 结构域和 1 个 CCT 结构域, 亚家族 II 成员包含 1 个 B-box 结构域和 1 个 CCT 结构域, 亚家族 III 成员包含 1~2 个 B-box 结构域和 0~1 个 CCT 结构域。小麦有两类在拟南芥中没有发现的 B-box 基因, 亚族 I 成员中有一类, 它包含 1 个 B-box 结构域(*TaBBX23*、*TaBBX29*、

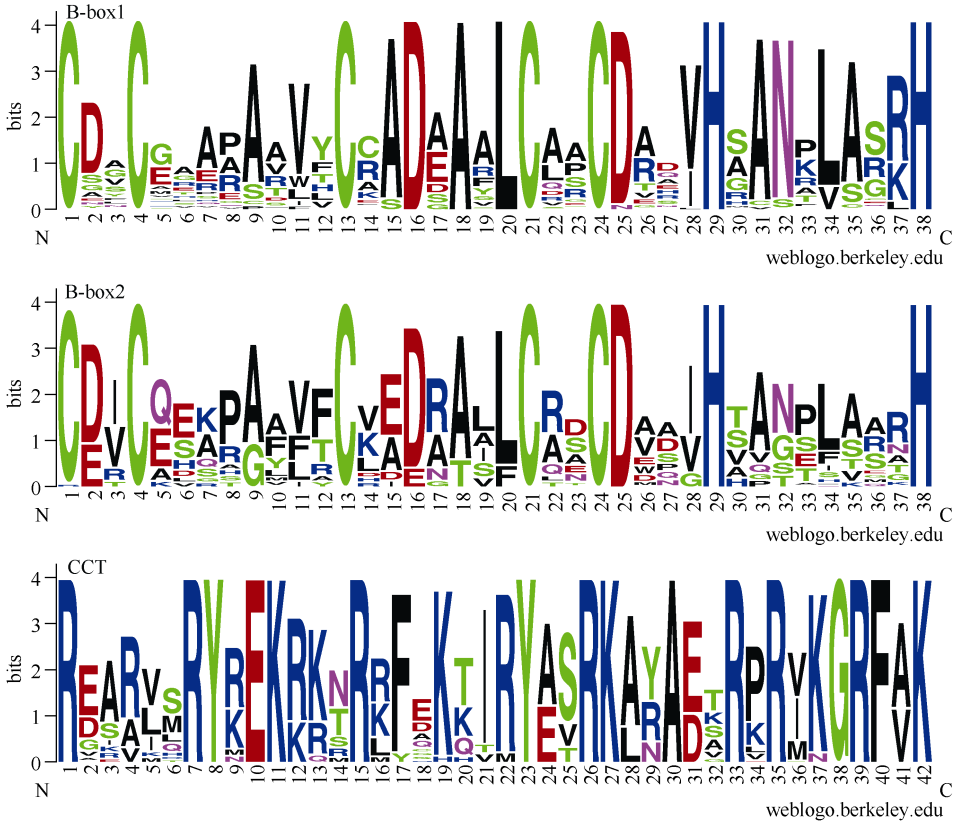


图 1 小麦 B-box 基因家族的保守结构域
Fig. 1 Conserved domains of B-box genes family in wheat



图 2　小麦 B-box 基因家族进化树
Fig. 2　Phylogenetic tree of B-box genes family in wheat

TaBBX35、*TaBBX65* 和 *TaBBX80*); 另一类是亚族 III 成员, 其中大多数成员具有 1 个 B-box 结构域和 1 个 CCT 结构域, 但 *TaBBX44*、*TaBBX52*、*TaBBX60*、*TaBBX68* 和 *TaBBX75* 拥有 B-box2 结构域, 这与包含 2 个 B-box 结构域的其他成员分组不同。第 IV 组和第 V 组的成员没有 CCT 结构域, 分别有 2 个和 1 个 B-box 结构域。

2.3　小麦 B-box 基因家族的染色体定位与基因复制

小麦 B-box 基因不均等地分布在小麦 21 条染色体中的 18 条上, 1A、1B、1D 染色体上没有发现 B-box 基因, 其中的 1 个成员(*TaBBX87*)无法进一步定位到染色体(图 3)。在 7A 染色体上分布的基因最多, 共含有 9 个基因; 其次是 6A、6B、6D 和 7D 染色体上分别含有 8 个基因; 其余染色体上均含有 1~7 个基因不等。有 92% (80/87)的小麦 B-box 成员显示出重复事件, 在 122 个复制事件中并未发现串联重复事件, 在不同的染色体中发现了高度相似的基因, 出现了片段重复事件。如图 3 所示, 重复事件主要发生在染色体 6A、6B 和 6D 上, 而 3A、3B 和 3D 上则较少。此外, 我们对同源基因进行进一步聚类分析发现, 所有同源基因都处于同一进化分支中(附图 2), 除 *TaBBX17*、*TaBBX20*、*TaBBX65* 和 *TaBBX80* 基因外, 在 3 个部分同源染色体组(A、B、D)上都有同源位点, 如: *TaBBX03*、*TaBBX08* 和 *TaBBX12* 为同源基因位于同一进化分支中, 且分别位于 2A、2B 和 2D 染色体上, 表明小麦 B-box 基因具有大量的同源位点, 同源保留率高。

2.4　小麦 B-box 基因家族的基因结构分析

小麦 B-box 家族成员的外显子数目为 1~5 个, 内含子数目为 0~4 个(图 4)。对基因结构进一步分析发现, I 组的大多数成员具有 1 个内含子; II 组中 *TaBBX66*、*TaBBX73* 和 *TaBBX81* 不含内含子, 其余

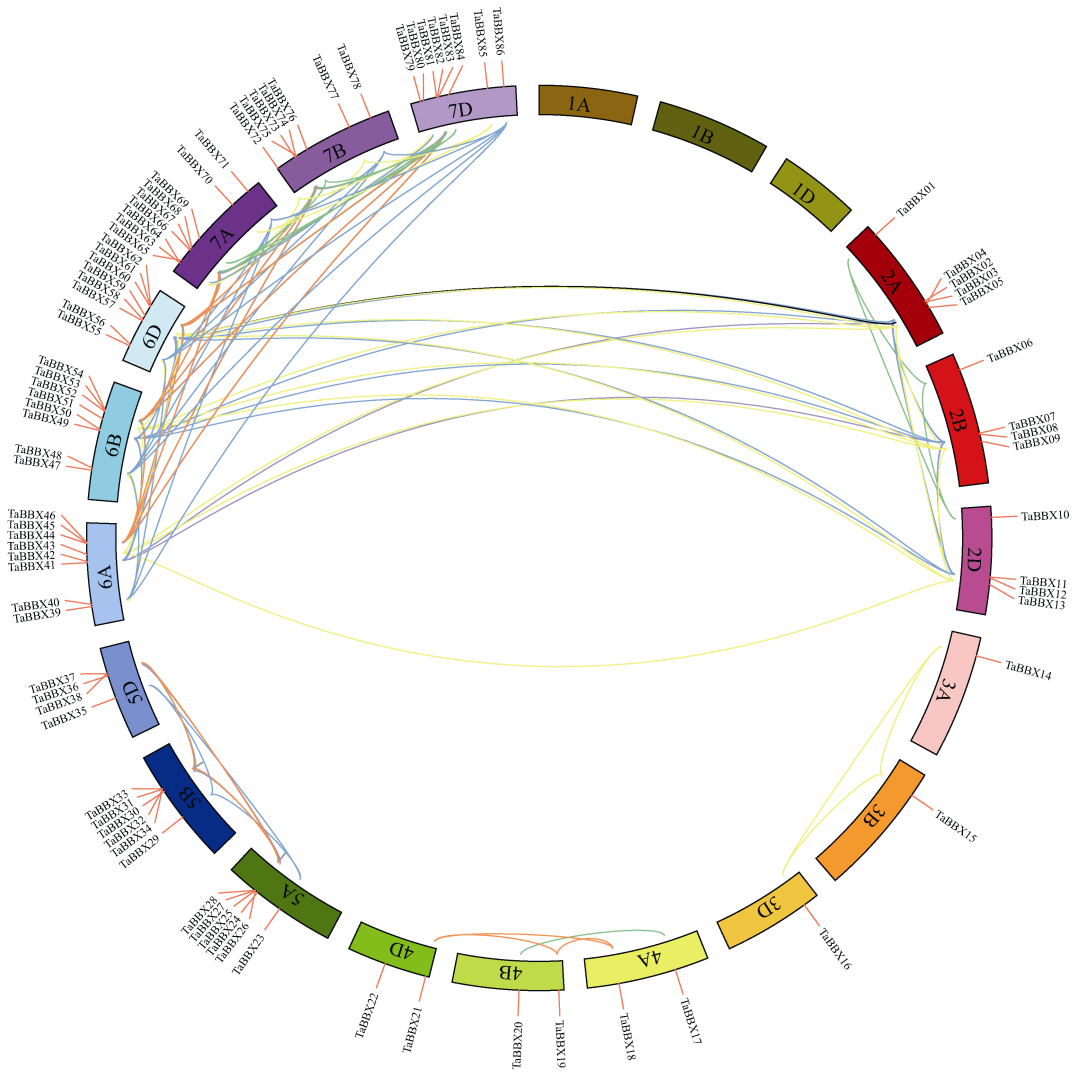


图 3 小麦 B-box 基因家族成员在染色体上的位置和基因复制

Fig. 3 Chromosome location and gene duplications of the B-box gene family in wheat

每个彩色条代表一条染色体，基因命名是根据它们在染色体上的位置来标记的，片段复制基因用彩色线条连接。

Each colored bar represents a chromosome, gene names are labeled on the basis of their positions on the chromosomes, segmental duplication genes are linked by colored lines.

基因含 1 个内含子; III 组和 IV 组的成员结构较相似，含 1~4 个内含子; V 组中的基因结构较简单，所有成员都不含内含子。

2.5 小麦 B-box 基因家族的启动子分析

从 TaBBXs 中鉴定出 101 种顺式作用元件，其中 40 种在大多数成员中被检测出来。除了 2 种传统的启动子元件(TATA-box，CAAT-box)外，其余 38 个顺式作用元件可分为 4 组：14 个具有光响应性，包括 MRE、G-Box、ACE、AE-box、Sp1、GT1-motif、GATA-motif、TCCC-motif、I-box、TCT-motif、GA-motif、Box I、Box 4 和 ATCT-motif; 8 个是激素反应性的，包括 CGTCA-motif、TGACG-motif、ABRE、P-box、ERE、GARE-motif、AuxRR-core 和 TGA-element; 9 个是胁迫响应元件: ARE、MBS、LTR、W box、GC-motif、CCAAT-box、TCA-element、WUN-motif 和 TC-rich repeats。第 4 组为其他顺式作用元件，如：胚乳表达所需的顺式作用元件(GCN4_motif)，与分生组织表达相关的顺式作用调控元件(CAT-box)等。下表展示了与胁迫和激素响应相关的元件(表 2)。

2.6 小麦 B-box 基因家族在不同组织和非生物胁迫及激素处理下的表达

采用 qRT-PCR 分析了 20 个小麦 B-box 基因在不同组织和干旱、低温、盐和 ABA 处理下的表达模式(图 5)。20 个基因在所有检测组织中均有不同程度的表达，*TaBBX08*、*TaBBX12*、*TaBBX14*、*TaBBX43*、

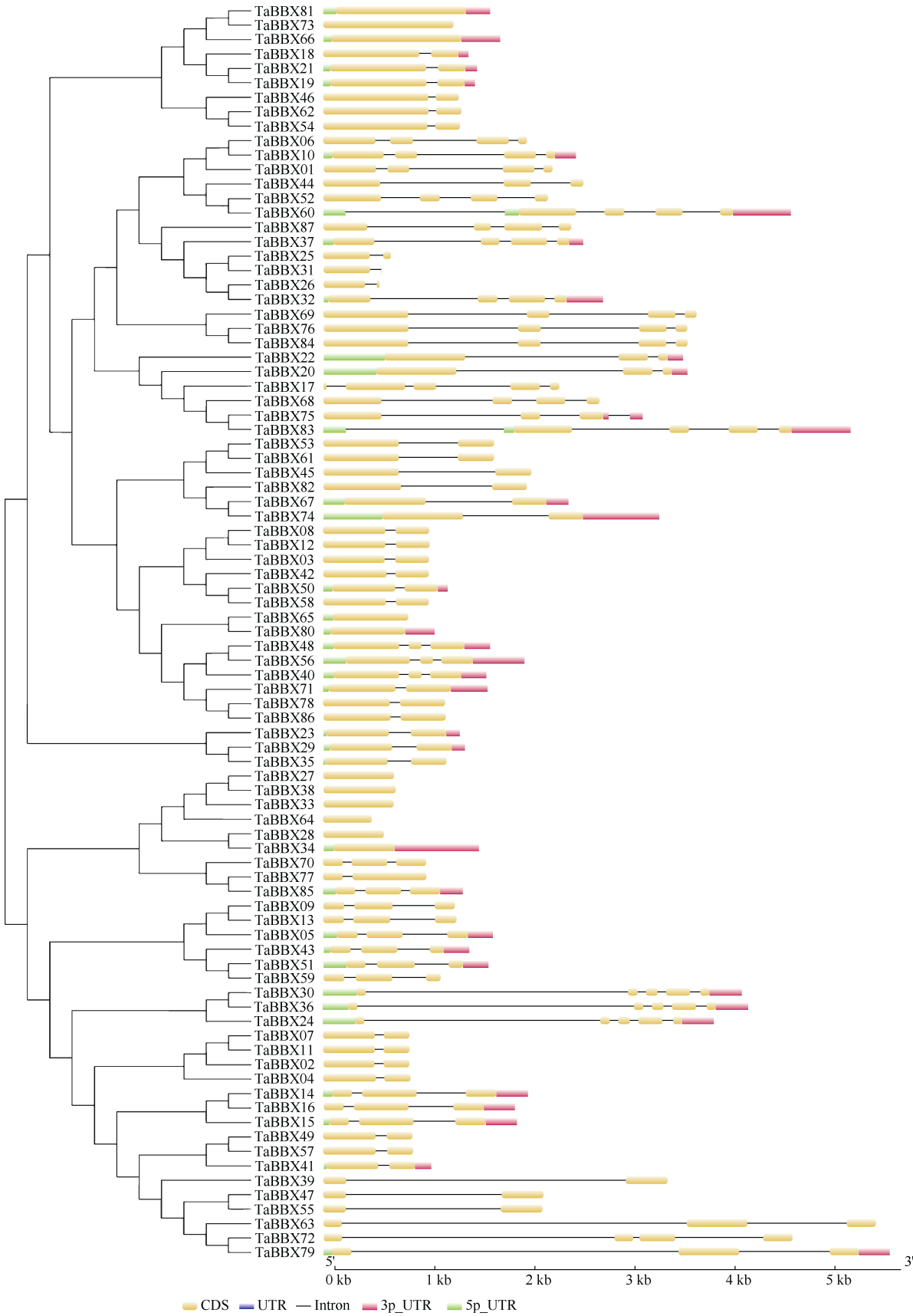


图 4　小麦 B-box 基因家族基因结构

Fig. 4　Gene structure of B-box gene family in wheat

表 2 预测小麦 B-box 家族基因启动子中顺式调控元件
Table 2 Putative regulatory *cis*-elements in wheat B-box family gene promoters

顺式作用元件 *cis*-elements	基因数目 Number of genes	顺式作用元件的功能 Functions of *cis*-elements
CAAT-box	87	Common *cis*-acting element in promoter and enhancer regions
TATA-box	87	Core promoter element around –30 of transcription start
CGTCA-motif	75	*cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGACG-motif	75	*cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
ABRE	84	*cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
ARE	67	*cis*-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
MBS	49	MYB binding site involved in drought-inducibility
LTR	57	*cis*-acting element involved in low-temperature responsiveness
W box	51	Wounding and pathogen responsiveness.
TGA-element	42	Auxin-responsive element
GC-motif	51	Enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility
CCAAT-box	24	MYBHv1 binding site
TCA-element	30	*cis*-acting element involved in salicylic acid responsiveness
P-box	31	Gibberellin-responsive element
WUN-motif	20	Wound-responsive element
ERE	18	Ethylene-responsive element
GARE-motif	23	Gibberellin-responsive element
TC-rich repeats	27	*cis*-acting element involved in defense and stress responsiveness
AuxRR-core	18	*cis*-acting regulatory element involved in auxin responsiveness

TaBBX76 在所有组织中均有表达, 大多数(16 个)基因在叶中有较高的表达, 其次是在穗、根和茎中表达, 而较少在籽粒中表达。*TaBBX10* 和 *TaBBX39* 在叶中有较高表达, *TaBBX74* 在穗中特异性表达, *TaBBX43* 在根中特异性表达, *TaBBX52* 和 *TaBBX60* 在穗和根中表达量较高。

TaBBXs 响应非生物胁迫, 但表达水平不同(图 6)。在干旱胁迫下, *TaBBX10*、*TaBBX52*、*TaBBX60*、*TaBBX67*、*TaBBX74* 和 *TaBBX86* 显著上调表达; 大多数基因在低温胁迫下上调表达, *TaBBX08*、*TaBBX10*、*TaBBX12*、*TaBBX39* 和 *TaBBX60* 等 11 个基因的表达量与对照组相比显著上调; 在盐胁迫处理下, 基因出现上调或下调表达, 其中 *TaBBX60*、*TaBBX62*、*TaBBX67* 和 *TaBBX76* 等 10 个基因显著上调表达; 在 ABA 处理下, 除 *TaBBX14*、*TaBBX35* 和 *TaBBX86* 外, 所有小麦 B-box 基因成员的表达水平都很低; *TaBBX10*、*TaBBX39*、*TaBBX60*、*TaBBX67* 和 *TaBBX74* 在 2 种或 2 种以上胁迫下相比对照有显著的上调表达。

3 讨论

B-box 基因家族是锌指转录因子中的一个家族, 包含 B-box 和 CCT 结构域[23,25]。目前, B-box 基因家族已经在多个物种中被鉴定出来, 比如在拟南芥[23]、水稻[24]、番茄[26]、马铃薯[27]、苹果[28-29]、梨[30]、葡萄[31]分别鉴定出 32、30、29、30、64、37、24 个 B-box 家族成员。本研究从小麦全基因组数据库中获得了 87 个 B-box 基因成员, 均高于上述物种中的成员数, 可能是因为小麦是异源六倍体, 具有 3 个部分同源基因组, 存在更多的同源基因(homoeologs), 高同源保留率也可以部分解释小麦 B-box 基因数量多的原因。

根据 B-box 结构域的数目和序列特征以及 CCT 结构域的存在特征, B-box 在拟南芥中被分为 5 组, I 组和 II 组中的所有成员都包含 2 个 B-box 和 CCT 结构域, 第 III 组具有 1 个 B-box 和 CCT 结构域, 第 IV 组和 V 组分别具有 2 个和 1 个 B-box 结构域[23]。在小麦中同样被分为 5 组, 有 1 个或 2 个 B-box 结构域和 1 个 CCT 结构域的 53 个 TaBBXs 被分为 I 组、II 组和 III 组, 具有 2 个 B-box 结构域的 28 个成员为 IV 组, V 组 6 个成员含有 1 个 B-box 结构域。但其中 III 组中有 4 个 TaBBXs (*TaBBX25*、*TaBBX26*、*TaBBX31* 和 *TaBBX75*)不具有 CCT 结构域, 这与拟南芥分组不一致, 在其他物种中也发现了类似的不一致, 例如, 水稻中的 *OsBBX25* 和 *OsBBX27* 属于第 I

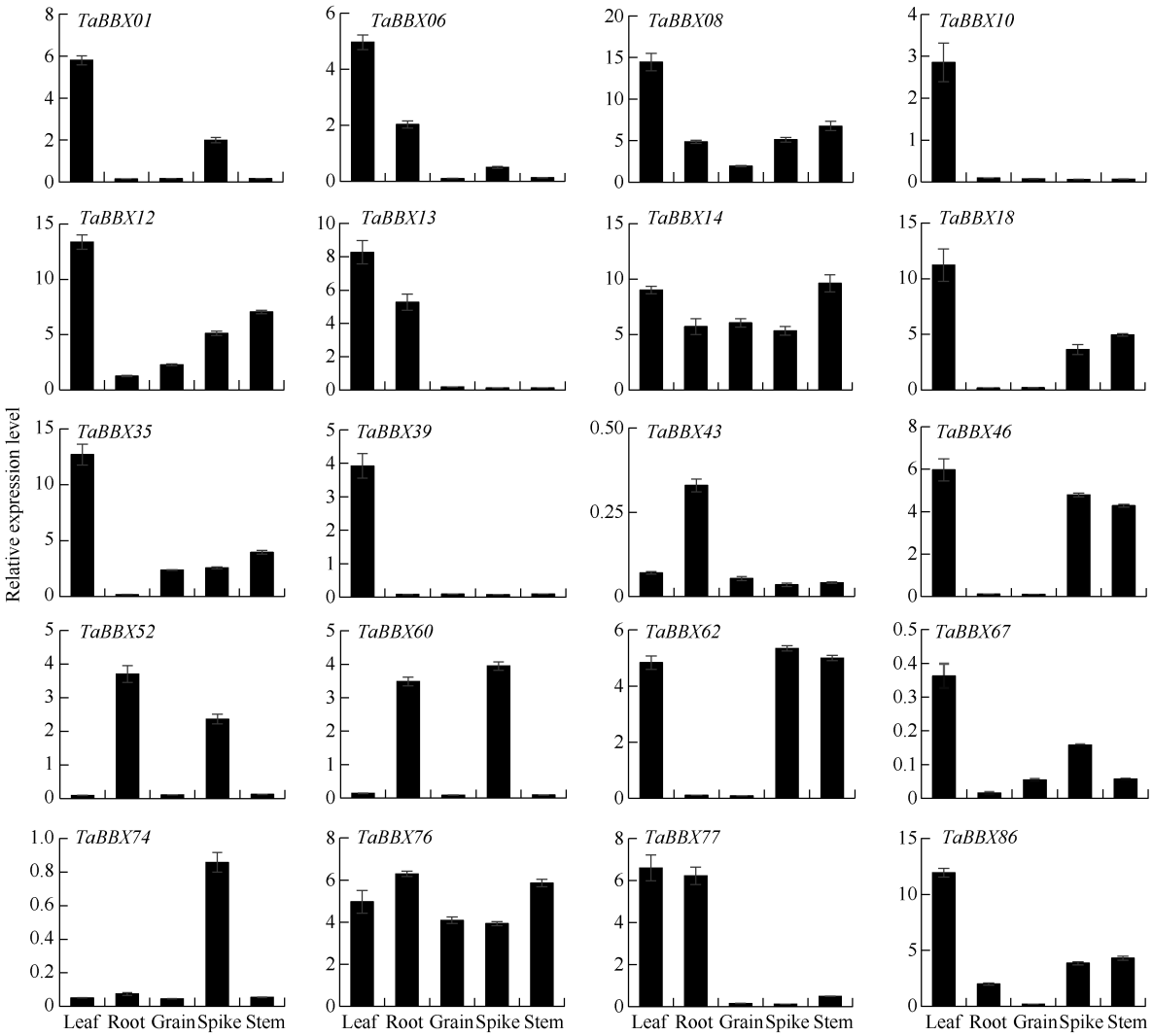


图 5　小麦 B-box 基因家族在不同组织中的表达分析

Fig. 5　Expression profile of B-box gene family in different tissues of wheat

组, 玉米中的 *ZmBBX7* 属于第 II 组, 尽管它们都缺少 1 个 B-box 结构域[25,32]。番茄中的 *SlBBX9*、*SlBBX11* 和 *SlBBX12* 以及水稻中的 *OsBBX7* 和 *OsBBX19* 属于第 III 组, 尽管它们有 2 个 B-box 结构域[25-26]。可能是进化缺失或重复导致了分组的差异, 与之前在水稻研究中的分类相似[25]。

基因结构的多样性在基因家族的进化中也起着重要的作用。本研究结果显示, 小麦 B-box 基因在同组内同一个系统进化树分支中的亚族成员具有高度相似的基因结构, 总体内含子数目较少, 显示出进化的保守性。V 组中的一些同源基因, 如 *TaBBX24*、*TaBBX30* 和 *TaBBX36* 显示了一个保守的基因结构, 与同组成员有所差异。这种差异可能不是偶然的突变事件, 而是植物 B-box 转录因子进化的一种保守模式[33]。此外, 保守序列分析发现, B-box1 与 B-box2 相比具有更高的保守性, CCT 结构域是高度保守的[32]。前人报道中, 有一种理论认为, 最初仅有的 B-box2 结构域在进化过程中发生复制事件随后又发生删除事件, 导致出现 B-box 结构域数目不同的 B-box 基因[32]。本研究中 B-box1 比 B-box2 具有更高的保守性, 所以可能是 B-box2 中发生了删除事件并产生 B-box1, 与 Crocco 和 Botto 提出的进化模型一致[32]。

复制事件对植物进化过程中基因家族成员的扩增至关重要[34]。植物中的基因复制主要有片段复制和串联复制[35-36]。在本研究中, 没有发现串联复制事件只发生了片段复制事件。表明片段复制事件可能是小麦 B-box 基因家族成员扩增的主要原因, 这与玉米、水稻等物种相类似[37]。

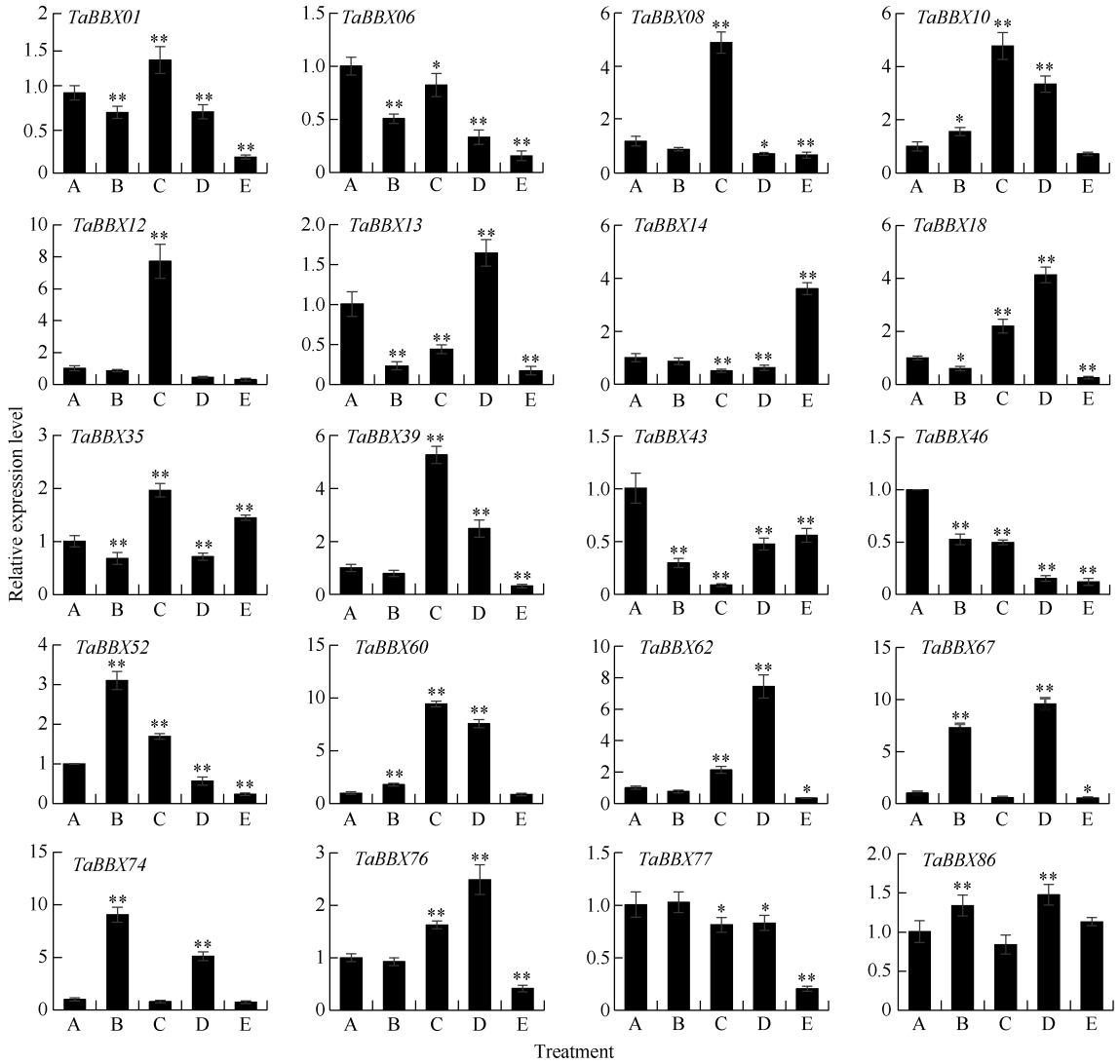


图 6 小麦 B-box 基因家族在不同处理下的表达分析

Fig. 6 Expression profile of B-box gene family under different treatments in wheat

A: 对照; B: 20% PEG 处理 6 h; C: 4℃处理 6 h; D: 0.2 mol L^{-1} NaCl 处理 6 h; E: 100 μmol L^{-1} ABA 处理 6 h。*表示在 0.05 水平上显著; **表示在 0.01 水平上显著。

A: control; B: six hours of 20% PEG treatment; C: six hours of 4℃ treatment; D: six hours of 0.2 mol L^{-1} NaCl treatment; E: six hours of 100 μmol L^{-1} ABA treatment. * and ** indicate significantly different at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

基因表达模式可以提供相关基因功能的重要信息。在拟南芥中, B-box 基因(*BBX6*, *COL5*)的过表达促进开花[38], 而过表达 *COL9* (*BBX7*)则延迟开花[39], 在小麦中与 *BBX6* 处于同一组的基因有 *TaBBX08*、*TaBBX12*、*TaBBX35*、*TaBBX67*、*TaBBX74* 和 *TaBBX86*, 其中 *TaBBX08*、*TaBBX12* 和 *TaBBX35* 基因在低温胁迫下显著上调表达。小麦开花主要受春化影响, 即小麦开花需经过长时间环境低温诱导的生理过程, 同时在 *TaBBX12* 和 *TaBBX35* 启动子区发现了参与低温响应的顺式作用元件 LTR (表 2), 因此 *TaBBX12* 和 *TaBBX35* 基因可能参与了小麦开花调控过程。在玉米中, B-box 同源基因参与不同的生物学过程, 在基因表达上具有明显的组织特异性[40]; B-box 基因家族成员在番茄各组织中均有不同程度的表达[26], 马铃薯 B-box 家族成员在不同器官中表达模式不同[27]。小麦 B-box 基因在不同组织中有不同的表达模式, *TaBBX10*、*TaBBX39* 等 16 个基因在叶中有较高的表达, *TaBBX43*、*TaBBX52*、*TaBBX60* 和 *TaBBX74* 在穗、根等组织中表达量较高, 说明小麦 B-box 基因在植物生长发育过程中可能发挥重要作用, 在不同发育阶段可能具有独特的功能。

非生物胁迫, 如盐、干旱、极端温度, 都会对植物的生长和发育产生负面影响[41-42]。本研究发现, 在 B-box 基因启动子区存在胁迫反应顺式作用元件,

如 ARE、LTR、MBS 和 TC-rich, 与干旱、盐和低温有关。79 个 B-box 基因都至少具有 1 个胁迫响应顺式作用元件, 表明它们在逆境反应中可能发挥着重要作用。在盐、低温、干旱胁迫和 ABA 处理下, 小麦 B-box 家族成员均有不同程度的诱导表达。之前的研究结果表明, 耐盐蛋白 AtBBX24 在拟南芥的高盐度条件下促进根的生长, 耐盐活性也在酵母细胞中触发[17], 小麦 *TaBBX13*、*TaBBX14*、*TaBBX39*、*TaBBX43* 和 *TaBBX77* 与 *AtBBX24* 处于同一分组内, 这些基因受到盐胁迫诱导, 因此 *TaBBX13*、*TaBBX14*、*TaBBX39*、*TaBBX43* 和 *TaBBX77* 可能参与了盐胁迫调控。菊花 *CmBBX24* 能够提高植物的耐寒性或耐旱性[43], *OsBBX25* 在拟南芥中过表达, 可以增强转基因植物对干旱胁迫的抗性[44], 小麦 *TaBBX08*、*TaBBX12*、*TaBBX35*、*TaBBX67*、*TaBBX74* 和 *TaBBX86* 与 *OsBBX25* 处于同一分组内, 干旱胁迫显著诱导 *TaBBX35*、*TaBBX67*、*TaBBX74* 和 *TaBBX86* 的表达, 并且在 *TaBBX67* 和 *TaBBX74* 基因启动子中发现含有响应干旱胁迫的顺式作用元件 MBS (表 2), 表明 *TaBBX67* 和 *TaBBX74* 在干旱胁迫过程中可能起着重要的作用。我们还发现, *TaBBX10* 和 *TaBBX60* 在盐、低温和干旱胁迫下都上调表达, 表明这 2 个基因可能整合了不同的非生物胁迫信号。*TaBBX01*、*TaBBX08* 和 *TaBBX13* 等 11 个基因在盐、低温和干旱胁迫下表现出不同的表达模式, 说明这些基因可能在小麦响应不同的非生物胁迫过程中发挥作用。

4　结论

本研究对小麦 B-box 基因家族进行了全基因组鉴定, 共筛选获得 87 个 TaBBXs 家族成员, 可分为 5 组。除了 1A、1B 和 1D 号染色体外, 其他的 18 条小麦染色体上均有 TaBBXs 分布, TaBBXs 内含子数目 0~4 个。小麦 B-box 基因家族表达具有组织特异性, TaBBXs 不同程度地响应盐、干旱和低温胁迫, 推测 TaBBXs 可能参与调控小麦的盐、干旱和低温等逆境响应过程。

附表和附图　请见网络版: 1) 本刊网站 http://zwxb.chinacrops.org/; 2) 中国知网 http://www.cnki.net/; 3) 万方数据 http://c.wanfangdata.com.cn/Periodical-zuowxb.aspx。

References

[1] 解松峰, 吉万全, 张耀元, 张俊杰, 胡卫国, 李俊, 王长有, 张宏, 陈春环. 小麦重要产量性状的主基因+多基因混合遗传分析. 作物学报, 2020, 46: 365–384.
Xie S F, Ji W Q, Zhang Y Y, Zhang J J, Hu W G, Li J, Wang C Y, Zhang H, Chen C H. Genetic effects of important yield traits analyzed by mixture model of major gene plus polygene in wheat. *Acta Agron Sin*, 2020, 46: 365–384 (in Chinese with English abstract).

[2] 刘登才, 张连全, 郝明, 黄林, 甯顺腴, 袁中伟, 姜博, 颜泽洪, 伍碧华, 郑有良. 小麦族的基因组显性及其育种学意义. 作物学报, 2020, 46: 1465–1473.
Liu D C, Zhang L Q, Hao M, Huang L, Ning S Z, Yuan Z W, Jiang B, Yan Z H, Wu B H, Zheng Y L. Genome dominance and the breeding significance in Triticeae. *Acta Agron Sin*, 2020, 46: 1465–1473 (in Chinese with English abstract).

[3] Choulet F, Alberti A, Theil S, Glover N, Barbe V, Daron J, Pingault L, Sourdille P, Couloux A, Paux E, Leroy P, Mangenot S, Guilhot N, Le Gouis J, Balfourier F, Alaux m, Jamilloux V, Poulain J, Durand C, Bellec A, Gaspin C, Safar J, Dolezel J, Rogers J, Vandepoele K, Aury J M, Mayer K, Berges H, Quesneville H, Wincker P, Feuillet C. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science*, 2014, 345: 1249721.

[4] IWGSC. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 2018, 361: eaar7191.

[5] 茹京娜, 于太飞, 陈隽, 陈明, 周永斌, 马有志, 徐兆师, 闵东红. 小麦锌指转录因子 *TaDi19A* 对低温的响应及其互作蛋白的筛选. 中国农业科学, 2017, 50: 2411–2422.
Ru J N, Yu T F, Chen J, Chen M, Zhou Y B, Ma Y Z, Xu Z S, Min D H. Response of wheat Zinc-Finger transcription factor *TaDi19A* to cold and its screening of interacting proteins. *Sci Agric Sin*, 2017, 50: 2411–2422 (in Chinese with English abstract).

[6] Klug A, Schwabe J W. Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J*, 1995, 9: 597–604.

[7] Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 1995, 80: 847.

[8] Chang C S, Maloof J N, Wu S H. COP1-mediated degradation of *BBX22*/*LZF1* optimizes seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 156: 228−239.

[9] Gonzalezschain N D, Diazmendoza M, Zurczak M, Suarezlopez P. Potato *CONSTANS* is involved in photoperiodic tuberization in a graft-transmissible manner. *Plant J*, 2012, 70: 678–690.

[10] Crocco C D, Holm M, Yanovsky M J, Botto J F. Function of B-box under shade. *Plant Signal Behav*, 2011, 6: 101–104.

[11] Wang Q, Tu X, Zhang J, Chen X, Rao L. Heat stress-induced *BBX18* negatively regulates the thermotolerance in *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep*, 2013, 40: 2679–2688.

[12] Fan X Y, Sun Y, Cao D M, Bai M Y, Luo X M, Yang H J, Wei C Q, Zhu S W, Sun Y, Chong K. *BZS1*, a B-box protein, promotes photomorphogenesis downstream of both Brassinosteroid and light signaling pathways. *Mol Plant*, 2012, 5: 591–600.

[13] Bai M J, Sun J J, Liu J Y, Ren H R, Wang K, Wang Y L, Wang C Q, Dehesh K. The B-box protein BBX19 suppresses seed germination *via* induction of ABI5. *Plant J*, 2019, 99: 1192–1202.

[14] Yadav A, Lingwan M, Yadukrishnan P, Masakapalli S K, Datta S. *BBX31* promotes hypocotyl growth, primary root elongation and UV-B tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav*, 2019, 14: e1588672.

[15] Gangappa S N, Crocco C D, Johansson H, Datta S, Hettiarachchi C, Holm M, Botto J F. The *Arabidopsis* B-box protein BBX25 interacts with HY5, negatively regulating *BBX22* expression to suppress seedling photomorphogenesis. *Plant Cell*, 2013, 25: 1243–1257.

[16] An J P, Wang X F, Espley R V, Lin W K, Bi S Q, You C X, Hao Y J. An apple B-box protein MdBBX37 modulates anthocyanin biosynthesis and hypocotyl elongation synergistically with MdMYBs and MdHY5. *Plant Cell Physiol*, 2020, 61: 130–143.

[17] Lippuner V, Cyert M S, Gasser C S. Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast. *J Biol Chem*, 1996, 271: 12859–12866.

[18] Nagaoka S, Takano T. Salt tolerance-related protein STO binds to a MYB transcription factor homologue and confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2003, 54: 2231–2237.

[19] Min J H, Chung J S, Lee K H, Kim C S. The *CONSTANS-like 4* transcription factor, *AtCOL4*, positively regulates abiotic stress tolerance through an abscisic acid-dependent manner in *Arabidopsis*. *J Integr Plant Biol*, 2015, 57: 313–324.

[20] Liu X, Li R, Dai Y Q, Yuan L, Sun Q H, Zhang S Z, Wang X Y. A B-box zinc finger protein, MdBBX10, enhanced salt and drought stresses tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2019, 99: 437–447.

[21] Liu X, Dai Y Q, Li R, Yuan L, Chen X S, Wang X Y. Members of B-box protein family from *Malus domestica* enhanced abiotic stresses tolerance in *Escherichia coli*. *Mol Biotechnol*, 2019, 61: 421–426.

[22] 王日红, 宋敏燕, 王然, 杨英杰. 山梨 B-box 基因 *PuBBX24* 表达特性及其在童期调控中的功能分析. 园艺学报, 2019, 46: 1458–1472.
Wang R H, Song M Y, Wang R, Yang Y J. Expression characteristics of B-box gene *PuBBX24* and its function in juvenile regulation. *Acta Hortic Sin*, 2019, 46: 1458–1472 (in Chinese with English abstract).

[23] Khanna R, Wu S H. The *Arabidopsis* B-box zinc finger family. *Plant Cell*, 2009, 21: 3416.

[24] Huang J Y, Zhao X B, Weng X Y, Wang L, Xie W B. The rice B-box zinc finger gene family: genomic identification, characterization, expression profiling and diurnal analysis. *PLoS One*, 2012, 7: e48242.

[25] Gangappa S N, Botto J F. The BBX family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2014, 19: 460–470.

[26] Chu Z, Wang X, Li Y, Yu H, Li J, Lu Y, Li H, Ouyang B. Genomic organization, phylogenetic and expression analysis of the B-box gene family in tomato. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1552.

[27] Talar U, Kiełbowicz-Matuk A, Czarnecka J, Rorat T. Genome-wide survey of B-box proteins in potato (*Solanum tuberosum*)—Identification, characterization and expression patterns during diurnal cycle, etiolation and de-etiolation. *PLoS One*, 2017, 12: e0177471.

[28] Shalmani A, Fan S, Jia P, Li G, Muhammad I, Li Y, Sharif R, Dong F, Zuo X, Li K. Genome identification of B-box gene family members in seven rosacea species and their expression analysis in response to flower induction in *Malus domestica*. *Molecules*, 2018, 23: 1763.

[29] Liu X , Li R , Dai Y Q, Chen X S, Wang X Y. Genome-wide identification and expression analysis of the B-box gene family in the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome. *Mol Genet Genome*, 2017, 293: 1–13.

[30] Cao Y, Han Y, Meng D, Li D, Jiao C, Jin Q, Lin Y, Cai Y. B-box genes: genome-wide identification, evolution and their contribution to pollen growth in pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *BMC Plant Biol*, 2017, 17: 156.

[31] Wei H R, Wang P P, Chen J Q, Li C J, Wang Y Z, Yuan Y B, Fang J G, Leng X P. Genome-wide identification and analysis of B-box gene family in grapevine reveal its potential functions in berry development. *BMC Plant Biol*, 2020, 20: 72.

[32] Crocco C D, Botto J F. BBX proteins in green plants: insights into their evolution, structure, feature and functional diversification. *Gene*, 2013, 531: 44−52.

[33] Zou Z Y, Wang R H, Wang R, Yang S L, Yang Y J. Genome-wide identification, phylogenetic analysis, and expression profiling of the BBX family genes in pear. *J Hortic Sci Biotechnol*, 2017, 93: 37–50.

[34] Magadum S, Banerjee U, Murugan P, Gangapur D, Ravikesavan R. Gene duplication as a major force in evolution. *J Genet*, 2013, 92: 155–161.

[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 Biol*, 2004, 4: 10.

[36] Moore R C, Purugganan M D. The early stages of duplicate gene evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 15682–15687.

[37] Abdullah S, Jing X Q, Shi Y, Izhar M, Zhou M R, Wei X Y, Chen Q Q, Li W Q, Liu W T, Chen K M. Characterization of B-box gene family and their expression profiles under hormonal, abiotic and metal stresses in *Poaceae* plant. *BMC Genome*, 2019, 20: 27.

[38] Hassidim M, Harir Y, Yakir E, Kron I, Green R M. Over-expression of *CONSTANS-LIKE 5* can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis*. *Planta*, 2009, 230: 481–491.

[39] Cheng X F, Wang Z Y. Overexpression of *COL9*, a *CONSTANS-LIKE* gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2005, 43: 758–768.

[40] Li W, Wang J, Sun Q, Li W, Yu Y, Zhao M, Meng Z. Expression analysis of genes encoding double B-box zinc finger proteins in maize. *Funct Integr Genome*, 2017, 17: 653–666.

[41] Rengasamy P. World salinization with emphasis on Australia. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1017–1023.

[42] Cramer G R, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol*, 2011, 11: 163.

[43] Yang Y, Ma C, Xu Y, Wei Q, Imtiaz M, Lan H, Gao S, Cheng L, Wang M, Fei Z. A zinc finger protein regulates flowering time and abiotic stress tolerance in chrysanthemum by modulating gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*, 2014, 26: 2038–2354.

[44] 刘焱, 邢立静, 李俊华, 戴绍军. 水稻含有 B-box 锌指结构域的OsBBX25蛋白参与植物对非生物胁迫的响应. 植物学报, 2012, 47: 366–378.

Liu Y, Xing L J, Li J H, Dai S J. Rice B-box zinc finger protein OsBBX25 is involved in the abiotic response. *Chin Bull Bot*, 2012, 47: 366–378 (in Chinese with English abstract).