

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2018.60824

李不凡, 姜雨彤, 张禹, 张燕洁, 林文慧. 甘蓝型油菜的 BR 响应及 *BnBZL2* 基因的功能分析[J]. 植物科学学报, 2018, 36(6): 824-834
Li BF, Jiang YT, Zhang Y, Zhang YJ, Lin WH. Brassinosteroid response of *Brassica napus* and functional characterization of *BnBZL2*[J].
Plant Science Journal, 2018, 36(6): 824-834

甘蓝型油菜的BR响应及*BnBZL2*基因的功能分析

李不凡¹, 姜雨彤¹, 张禹², 张燕洁¹, 林文慧^{1*}

(1. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240; 2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093)

摘要: 对甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 中保守的油菜素甾醇 (Brassinosteroids, BR) 信号相关基因进行对比分析, 并以甘蓝型油菜品种‘沪油 15’为材料, 对 BR 信号通路相关同源基因进行了组织表达分析。结果显示, BR 合成基因与信号组分在花和幼嫩种子中表达量更高; 低浓度 BR 处理可以促进幼苗根的生长, 高浓度 BR 处理则起抑制作用; BR 合成抑制剂 (Brassinazole, BRZ) 处理可抑制黑暗条件下幼苗下胚轴的伸长; BR 处理可以降低 BR 合成基因的表达水平, 而 BRZ 处理则相反, 表明甘蓝型油菜中 BR 信号增加能反馈抑制 BR 的合成。烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 瞬时表达实验结果发现, 与拟南芥 *BZR1* 基因同源的甘蓝型油菜 *BnBZL2* 编码蛋白定位在细胞质和细胞核中, BR 处理可增加 *BnBZL2* 的核定位。蛋白质免疫印迹检测结果显示, BR 处理可增加去磷酸化 *BnBZL2* 的比例。本研究进一步模拟了拟南芥 *bzr1-1D* 功能获得性突变体对 *BnBZL2* 蛋白进行点突变 (*BnBZL2*^{*}), 并构建载体转化拟南芥, 黑暗条件下转基因植株幼苗对 BRZ 处理不敏感, 提示 *BnBZL2*^{*} 可提高转基因植株的 BR 信号水平。本研究结果表明甘蓝型油菜中存在与拟南芥相似且保守的 BR 信号通路和调控机制。

关键词: 油菜素甾醇 (BR); 甘蓝型油菜; BR 响应; *BnBZL2* 基因

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2018)06-0824-11

Brassinosteroid response of *Brassica napus* and functional characterization of *BnBZL2*

Li Bu-Fan¹, Jiang Yu-Tong¹, Zhang-Yu², Zhang Yan-Jie¹, Lin Wen-Hui^{1*}

(1. School of Life Sciences, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Brassinosteroids (BR) are important phytohormones that regulate plant growth, development, and seed yield. *Brassica napus* L. is one of the main eatable oil crops in China. Studying BR signaling and regulation of *B. napus* growth and development can provide clues to increase yield. We compared BR-related genes in *B. napus* and *A. thaliana* and analyzed their expression levels in different tissues (using ‘Huyou15’ as material). Results indicated that the key genes involved in BR synthesis and signal transduction pathways were highly expressed in the flower and young seed; seedling root growth was promoted under BR treatment at low concentration but was inhibited at high concentration; and hypocotyl elongation was inhibited under brassinazole (BRZ, a BR biosynthesis inhibitor) treatment in

收稿日期: 2018-04-17, 退修日期: 2018-05-16。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771591, 31761163003); 中国科学院植物分子遗传国家重点实验室开放课题; 上海交通大学 SMC 晨星学者奖励计划。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31771591, 31761163003), Opening Research Projects of National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, CAS, and SMC-Funding (Plan A) of Shanghai Jiao Tong University.

作者简介: 李不凡(1992-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物发育生物学 (E-mail: libufan1122@qq.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: whlin@sjtu.edu.cn)。

darkness. Furthermore, BR treatment reduced the expression levels of BR synthesis genes, whereas BRZ treatment increased their expression levels, suggesting that BR signaling feedback inhibited the expression of BR biosynthesis genes. Transient expression experiments in tobacco demonstrated that *BnBZL2* (*BZR1*-like gene in *B. napus*) was localized in the cytoplasm and nucleus, and BR treatment increased the nuclear localization of *BnBZL2*. Western blotting revealed that BR treatment increased the ratio of dephosphorylated and phosphorylated *BnBZL2*. The vector of *BnBZL2* with point mutations (*BnBZL2*^{*}, mimicking *A. thaliana* gain-of-function mutant *bzr1-1D*) was transformed into *A. thaliana* and the transgenic plants showed insensitivity to BRZ treatment in darkness, suggesting that *BnBZL2*^{*} increased BR signaling. Thus, the above results indicated that BR signaling and regulatory mechanisms were conserved in *B. napus* and *A. thaliana*.

Key words: Brassinosteroid (BR); *Brassica napus* L.; BR response; *BnBZL2* gene

油菜素甾醇 (Brassinosteroid, BR), 是一类植物多羟基类固醇, 类似于动物和昆虫的类固醇激素, 由 Mitchell 等在 1970 年第一次从油菜 (*Brassica napus* L.) 花粉的提取物中发现^[1], 它在植物的生长与发育过程中起重要作用^[2], 调控植物许多生长发育过程, 包括细胞的分裂和伸长、木质部分化、促进营养生长、调控植物育性和种子发育等^[3-6]。

自 20 世纪 90 年代起, 油菜素甾醇的相关研究进入了快速发展时代, 随着技术方法的进步, 通过对模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) *det2*、*cpd* 和 *dwf4* 相关突变体的研究^[7, 8], 油菜素甾醇的主要合成途径被逐步揭示, 参与 BR 合成的主要基因是 *DWF4*、*CPD* 和 *DET2*, 它们都编码 BR 合成的关键酶, 控制着 BR 合成过程中几个重要步骤^[9-11]。拟南芥 BR 信号转导过程已经研究的比较清楚, 植物中 BR 首先与细胞表面受体激酶 BRI1 结合并激活信号转导途径来调节转录因子^[4, 12]。BRI1 的激活需要另一个共受体 BAK1 共同参与, 它们相互磷酸化将 BR 信号传递给下游通路^[13]。当细胞表面 BR 受体被激活后, BRI1 磷酸化 BSK1 和 CDG1, 促进它们与 BSU1 磷酸酶结合并将其磷酸化^[14, 15]。磷酸化的 BSU1 与 BIN2 结合使其去磷酸化失活^[14], BIN2 是 BR 信号的负调控因子, BIN2 的失活可使 BR 信号途径下游的关键转录因子 BZR1/BES1 的活性得到释放, 引起植株的 BR 响应。当 BR 水平较低时, BIN2 与转录因子 BZR1/BES2 结合将其磷酸化^[16, 17], 而磷酸化的 BZR1/BES2 不能与 DNA 结合^[16], 使得 BR 下

游基因表达水平降低。当细胞接受到高水平 BR 信号使 BIN2 失活后, BZR1/BES2 会进行快速的去磷酸化反应, 进而与目标基因结合^[16, 17], 植株发生 BR 响应。

拟南芥中的 BR 合成与信号转导相关研究已开展地较为深入, 近年来在水稻 (*Oryza sativa* L.)、大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 等重要作物中的研究也取得了一定进展^[18-22]。目前针对油菜 BR 基因也开展了相关研究, 有研究表明使用外源 BR 处理可以增加油菜单株籽粒产量^[23]; 施加外源油菜素内脂 (eBL) 可以增加油菜幼苗根的细胞呼吸速率, 增强抗逆性^[24, 25]; 甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 过表达拟南芥的 *AtDWF4* 基因能够提高油菜种子的产量, 并增强油菜的抗逆性^[26]。

本研究以油料作物甘蓝型油菜为实验材料, 选择其 BR 合成与信号转导过程中的一些重要基因, 分析它们在甘蓝型油菜不同部位的组织表达特异性, 并观察植株幼苗对 BR 及 BR 合成抑制剂 BRZ 的响应, 阐明 BR 合成基因是否受到 BR 信号的反馈抑制。本研究进一步克隆了与拟南芥 BR 信号通路重要转录因子 *BZR1* 同源的甘蓝型油菜 *BnBZL2* 基因, 并对该基因的功能及 BR 对 *BnBZL2* 的调控机制进行研究, 比较甘蓝型油菜中 BR 信号及 BR 对其生长发育的调控与模式植物拟南芥的异同, 以期为深入分析植物 BR 响应和信号调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验材料为甘蓝型油菜品种‘沪油 15’, 拟

南芥为野生型 *col*, 拟南芥突变体为 *bzr1-1D*。将植物干燥的种子在超净台中使用 90% 的乙醇灭菌 5 min, 采用无菌水冲洗 3~4 次, 然后铺在干燥的无菌滤纸上吹干后播种于 1/2 MS 固体培养基上。于 4℃、黑暗条件下放置 48 h, 春化后转移至恒温光照培养箱培养(23℃, 16 h 光照/8 h 黑暗)。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

以‘沪油 15’的幼苗、根、茎、叶、花苞、成花、果实、幼嫩种子、成熟种子作为基因时空表达分析的实验材料, 以外源 eBL 和 BRZ 处理的幼苗为生理处理实验材料, 采用 TransZol 法提取甘蓝型油菜总 RNA。使用反转录试剂盒(TIANGEN, 北京)合成 cDNA, 用于基因表达分析。

1.2.2 荧光实时定量 RT-PCR 分析

利用 1.2.1 中获得 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR 仪(Eppendorf, 德国)进行候选基因时空表达水平分析。选取的内参基因为 *BnACTIN2*, 实验中检测的基因为 *BnCPD*、*BnDWF4*、*BnDET2*、*BnBRI1*、*BnBIN2* 和 *BnBZL2*。实验所用引物序列见表 1。

1.2.3 体外 eBL 与 BRZ 生理处理

本实验将甘蓝型油菜种子萌发出现胚根第 1 天的幼苗转移至含有 eBL (epi-Brassinolide) 或 BRZ 的固体 1/2 MS 培养基上(方形皿)。eBL 生理处理实验在光照条件下进行, 6 种处理浓度分别为 0、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 和 1×10^{-5} mol/L, 处理 4 d 后观察不同浓度 eBL 对幼苗发育的影响。BRZ 生理处理实验在黑暗下进行, 分为 0 和 1×10^{-6} mol/L 两个处理浓度, 处理 3 d 后观察 BRZ 对幼苗黑暗条件下发育的影响。

1.2.4 基因克隆与载体构建

从 EnsemblPlants(<http://plants.ensembl.org/Multi/Tools/Blast?db=core>)和 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得 *BnBZL2* 的全长 CDS 序列设计特异引物(表 1), 以‘沪油 15’幼苗的 cDNA 为模板, 使用高保真酶进行 PCR 扩增后送测序。运用 Gateway 克隆技术将获得的 *BnBZL2* 的 CDS 片段通过 BP 反应, 连接到入门载体 pDonor207(Life Technologies, 11789-020)中, 然后通过 LR 反应将入门载体的片段同源重组置换到最终载体 pEarlyGate103(Life technologies, 11791-020)中, 获得 *35S::BnBZL2-GFP* 表达载体。

表 1 引物序列信息
Table 1 Primer sequences

引物 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	注释 Annotation
<i>BnACT2</i> -RT-F	GACCGTATGAGCAAAGAGATCACA	qRT-PCR
<i>BnACT2</i> -RT-R	TCTCGGGAGGTGCAACGA	
<i>BnaCPD</i> -RT-F	TAAAGTGTTACACCGTTTGG	qRT-PCR
<i>BnaCPD</i> -RT-R	GATTGCAACCCTAGCTAGCTC	
<i>BnaDET2</i> -RT-F	TTAAGGACGAGTACCCAAAGA	qRT-PCR
<i>BnaDET2</i> -RT-R	GTAAAAACCTTTGATATATTAATAGA	
<i>BnaDWF4</i> -RT-F	CAAGAAGAAGACGAAGAAGAT	qRT-PCR
<i>BnaDWF4</i> -RT-R	GCGATGGCTACAGATGATGTC	
<i>BnaBRI1</i> -RT-F	CACCTTCTGGAGTCGCTCGTG	qRT-PCR
<i>BnaBRI1</i> -RT-R	AGAGATTCTGGGAGGATCGGAC	
<i>BnaBIN2</i> -RT-F	AGGTTCCCGCAGATAAAGGCA	qRT-PCR
<i>BnaBIN2</i> -RT-R	GGCTCTGAGTAATGGTACAAT	
<i>BnaBZL2</i> -RT-F	CAACCATCTCTGGCTCTATG	qRT-PCR
<i>BnaBZL2</i> -RT-R	CAATCTCTTGGAACACACCAG	
<i>BnBZL2</i> -m-F	CACCTGATCCGGTCGGTCCAGAAA	<i>pBnBZL2::BnBZL2*-GFP</i>
<i>BnBZL2</i> -m-R	ACCACGAGCCTTGCCGTTTCC	
<i>proBnBZL2-EcoR I</i> -F	ACCACGAGCCTTGCCGTTTCC	
<i>proBnBZL2-CA-Bgl II</i> -R	CACCTGATCCGGTCGGTCCAGAAA	
<i>35S::BnBZR2-GFP</i> -F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGACGTCAGATGGAGCTAC	<i>35S::BnBZL2-GFP</i>
<i>35S::BnBZR2-GFP</i> -R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTACCACGAGCCTTGCCGTTTCC	

采用 Overlap PCR 的方法获得 *BnBZL2* 的点突变 gDNA 片段。分别采用 2 对引物 *proBnBZL2-EcoRI-F* 和 *BnBZL2-m-R* 以及 *BnBZL2-m-F* 和 *proBnBZL2-CA-Bgl II-R*, 以全长 *BnBZL2* 为模板扩增 2 个片段, 再以这 2 个片段为模板采用引物 *proBnBZL2-EcoRI-F* 和 *proBnBZL2-CA-Bgl II-R* 再次进行片段扩增, 获得点突变后的 *BnBZL2** 片段。采用酶切-连接法将扩增的点突变目的片段克隆到 pCAMBIA1302 载体中, 获得 *BnBZL2* 点突变克隆载体 *pBnBZL2::BnBZL2*-GFP*。

1.2.5 农杆菌转化

挑取 *pBnBZL2::BnBZL2*-GFP* 转基因农杆菌阳性克隆, 在含有 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素的 YEP 培养基中于 28℃ 培养 10 h, 收集农杆菌并用含有 0.02% (V/V) Silwet L-77 (SL77080596, GE) 的 5% 蔗糖溶液将农杆菌稀释至 OD₆₀₀ 值处于 0.8~1.0 之间。将拟南芥花序浸入该缓冲液中, 密封并在黑暗中过夜。筛选阳性苗, 获得 *pBnBZL2::BnBZL2*-GFP* 转基因株系。

1.2.6 烟草叶片细胞的亚细胞定位

将上述 *BnBZL2* 过表达的阳性克隆 (*35S::BnBZL2-GFP*) 导入农杆菌 GV301 中, 培养并转化, 注射到 4 周的烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 叶片中, 将叶片切下并在黑暗中侵染 48 h, 然后将叶表皮层撕开, 浸入水中, 并使用激光共聚焦荧光显微镜观察。

1.2.7 蛋白质印迹分析

将转基因烟草叶片用 100 μmol/L 的 eBL 处理 10 h。提取 *BnBZL2* 蛋白, 将 20 mg 蛋白加到 12% 的 SDS-PAGE 上进行分离, 并转移至硝酸纤维素膜 (100 mA, 1 h)。将硝酸纤维素膜在含有 1% BSA 的 PEB 缓冲液中封闭处理 1 h, 然后用抗 GFP 抗体 (Santa cruz biotechnology) 探测碱性磷酸酶标记的二抗。15 min 后加入底物 BCIP/NBT (Invitrogen), 停止反应后进行观察。

1.2.8 系统进化树构建

本研究选取双子叶植物拟南芥 (*A. thaliana* 和 *A. lyrata* L.)、白菜型油菜 (*B. rapa* L.)、芥菜型油菜 (*B. oleracea* L.)、甘蓝型油菜、大豆、菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.) 及单子叶植物水稻等物种, 分析甘蓝型油菜中 BR 合成及信号通路主要基因的进化关系。从 TAIR (<https://www.arabidop->

[sis.org](https://www.arabidopsis.org)) 网站找到在拟南芥中同源基因的氨基酸序列, 在 EnsemblPlants 网站使用 BLAST 工具找到它们在其它物种中的同源基因, 分别对 *CPD*、*DET2*、*DWF4*、*BRI1*、*BIN2* 和 *BZR1* 这 6 个关键基因的氨基酸序列进行多重序列比对, 使用 MEGA7 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜 BR 合成及信号通路主要基因的系统进化分析

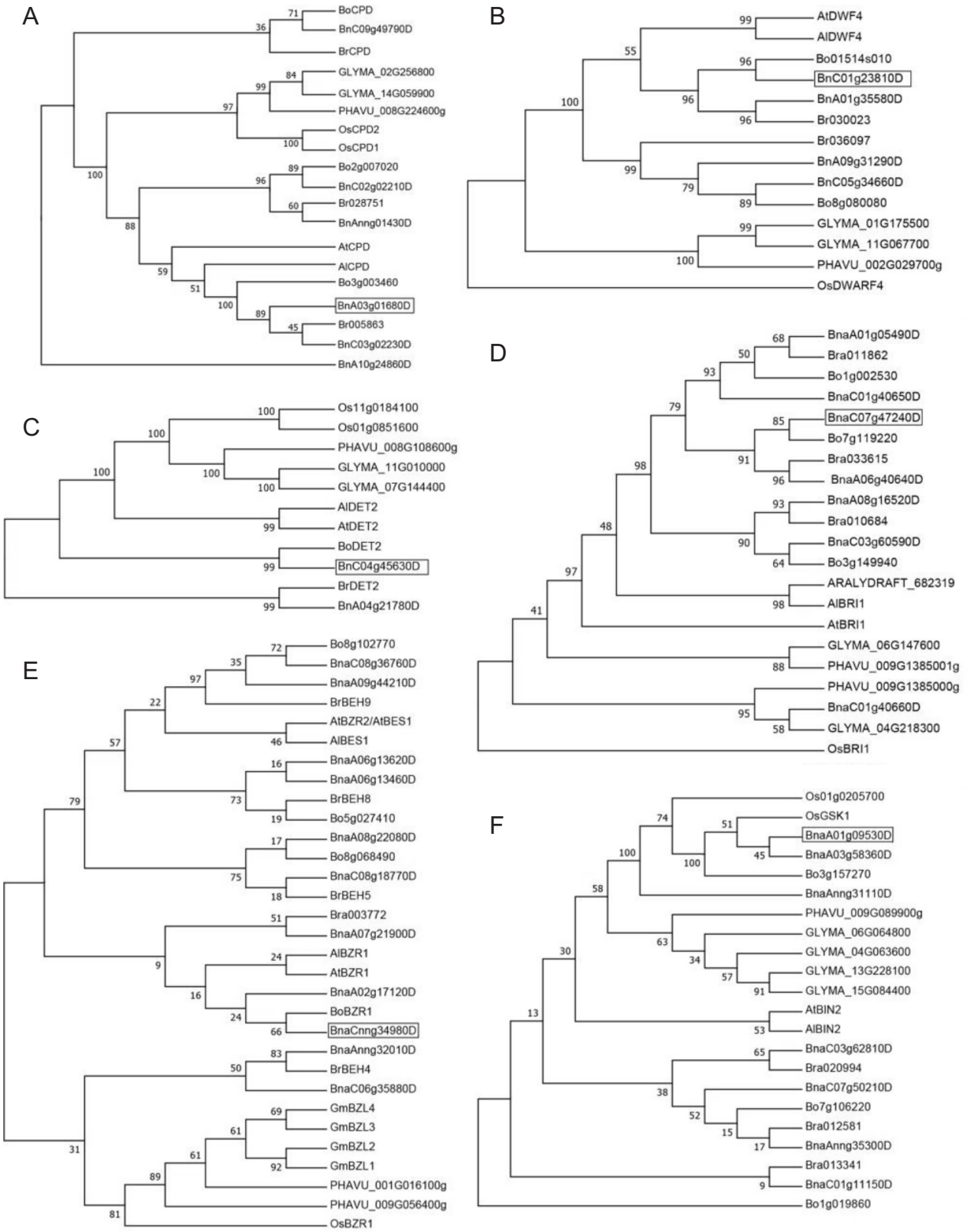
通过同源蛋白质氨基酸比对分析, 本研究构建了 BR 合成及信号通路主要基因的系统进化树 (图 1), 结果显示这 6 个基因在各物种间都拥有很高的同源性, 部分序列同源性超过 95%。3 种油菜间部分基因的相似性接近 100%。在甘蓝型油菜中 *CPD* 共有 6 个同源蛋白, *DET2* 有 2 个, *DWF4* 有 4 个, *BRI1* 有 7 个, *BIN2* 有 7 个, *BZR1* 有 11 个。研究结果说明 BR 合成及信号通路上的基因在进化过程中非常保守。

2.2 甘蓝型油菜 BR 合成与信号通路主要基因的组织表达特异性

本研究根据上述系统进化分析结果, 分别选取与拟南芥 BR 合成途径关键酶编码基因 *CPD*、*DET2* 和 *DWF4* 同源性最高的 3 个甘蓝型油菜基因 *BnaA03g01680D* (*BnCPD*)、*BnaC04g45630D* (*BnDET2*)、*BnC01g23810D* (*BnDWF4*); 以及与拟南芥 BR 信号转导通路重要组分 *BRI1*、*BIN2* 和 *BZR1* 编码基因同源性最高的 3 个甘蓝型油菜基因 *BnaC07g47240D* (*BnBRI1*)、*BnaA01g09530D* (*BnBIN2*)、*BnaCnng34980D* (*BnBZL2*), 通过实时荧光定量 PCR 法对甘蓝型油菜不同组织中上述各基因进行了表达分析。实验结果显示 (图 2: A~C), *BnCPD*、*BnDET2*、*BnDWF4* 在花和幼嫩种子中表达量很高, 但在根、茎、叶中的表达水平很低, 说明 BR 在幼嫩且生长旺盛的组织中含量较高。*BnBRI1*、*BnBIN2* 和 *BnBZL2* 的表达分析结果显示 (图 2: D~F), *BnBRI1* 和 *BnBZL2* 在花和种子中有相对较高的表达量, 而 *BnBIN2* 在各组织中的表达水平没有明显差异, 仅在叶片中表达量最低。

2.3 甘蓝型油菜幼苗对 BR 处理的响应

甘蓝型油菜幼苗响应 BR 处理的实验结果显示 (图 3), 1×10^{-9} mol/L 的 eBL 可以促进幼苗根的



A: CPD; B: DWF4; C: DET2; D: BRI1; E: BZR1; F: BIN2。
方框表示在甘蓝型油菜中与拟南芥相似性最高的蛋白。
Box indicates the protein with the highest similarity to the *A. thaliana* in *B. napus*.

图 1 BR 合成及信号通路主要基因蛋白序列的系统进化分析
Fig. 1 Phylogenetic analysis of protein involved in the synthesis and transduction of BR

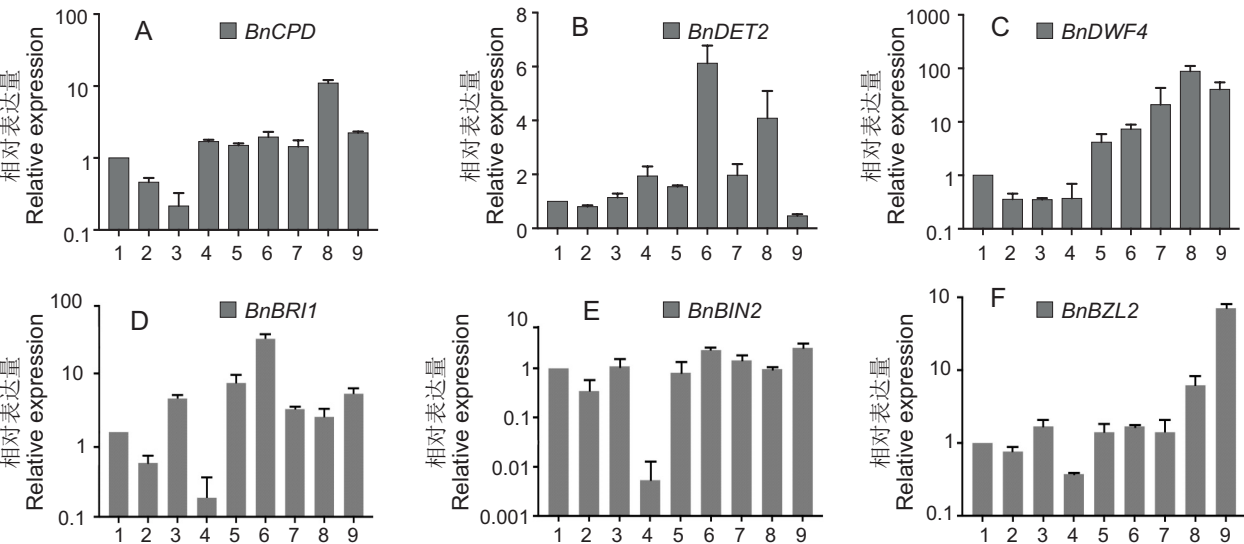


图 2 BR 合成与信号转导通路中主要基因的组织表达特异性

Fig. 2 qRT-PCR analysis of the expression of key genes involved in BR synthesis and signal transduction pathways

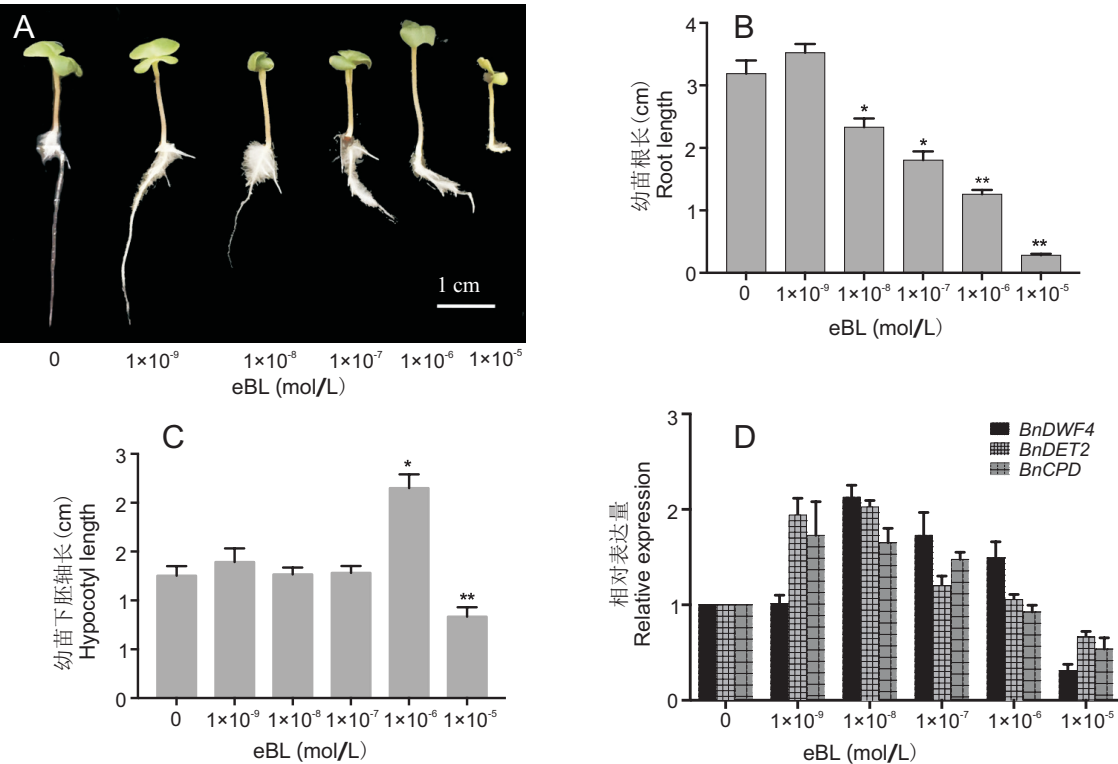


图 3 甘蓝型油菜幼苗对外源 eBL 处理的响应

Fig. 3 Response of *B. napus* seedlings to exogenous eBL treatment

生长，而 1×10^{-8} mol/L 的 eBL 则开始抑制根的生长。随着处理浓度的升高，对根生长的抑制作用更加明显，当浓度达到 1×10^{-5} mol/L 时，根完全停止伸长。研究结果表明甘蓝型油菜幼苗的根对 BR 的反应与拟南芥相似，而且敏感程度超过拟南芥。同时，本研究还统计了不同浓度 eBL 处理对甘蓝型油菜幼苗下胚轴生长的影响，发现低浓度的 eBL 对下胚轴没有明显影响，当浓度达到 1×10^{-6} mol/L 时，下胚轴出现显著的伸长，但当浓度升高到 1×10^{-5} mol/L 时，下胚轴的生长开始受到抑制。表明植株下胚轴和根对 eBL 反应的敏感性具有较大差异，根对 BR 的敏感性比下胚轴更高。

2.4 甘蓝型油菜幼苗对黑暗条件下 BRZ 的反应

研究发现，拟南芥 BR 缺失或不敏感突变体幼苗在黑暗条件下表现出下胚轴明显变短，子叶张开等光形态建成的表型^[27]，采用 BR 合成抑制剂 BRZ 处理野生型拟南芥也发现类似的表型^[27, 28]，说明 BR 信号可参与拟南芥光/暗形态建成。本研究在黑暗条件下采用 BRZ 处理甘蓝型油菜幼苗，结果显示(图 4)，与对照组相比，使用 1×10^{-6} mol/L BRZ 处理的实验组幼苗下胚轴伸长受到明显的抑制，说明在黑暗条件下甘蓝型油菜对 BRZ 的反应与拟南芥相似，BR 水平下降导致幼苗黑暗条件下的光形态建成，但实验同时也发现幼苗的子叶没有明显张开。

2.5 BR 信号的反馈抑制机制

研究发现，*CPD*、*DWF4* 和 *DET2* 不仅是 BR 合成途径的关键酶编码基因，也是 BR 响应基因。在拟南芥中，BR 信号激活其末端转录因子 BZR1，抑制 *CPD* 等 BR 合成基因的表达，使 BR 合成降低，BR 信号回复到基础水平，防止过高的 BR 信号持续响应对植株产生不利影响，这种机制称为反馈抑制^[29, 30]。本研究检测了甘蓝型油菜幼苗中上述 3 个 BR 合成/响应基因表达量的变化(图 3)，结果显示外源 eBL 处理影响了 3 个基因的表达，低浓度的 eBL 处理略微促进了 BR 合成基因的表达。提高 eBL 处理浓度时，BR 响应基因 *BnCPD*、*BnDET2*、*BnDWF4* 的表达水平明显降低。BRZ 处理下，3 个基因的表达水平均明显提高(图 4)，研究结果说明外源合成抑制剂 BRZ 处理可促进 BR 合成基因的表达，而外源高浓度 BR 处理起抑制作用，提示甘蓝型油菜中的 BR 信号也存在保守的反馈抑制机制。

2.6 BR 影响 BnBZL2 的亚细胞定位和去磷酸化水平

研究表明，拟南芥中 BZR1 是 BR 信号通路上的重要转录因子，一旦植物细胞接受到 BR 信号，BZR1 便去磷酸化进入细胞核内与目标基因的 DNA 序列结合，激活基因表达^[16, 17]。本研究从甘蓝型油菜中克隆了与拟南芥 BZR1 同源的 *BnBZL2* 基因，并利用烟草转化系统对 BnBZL2

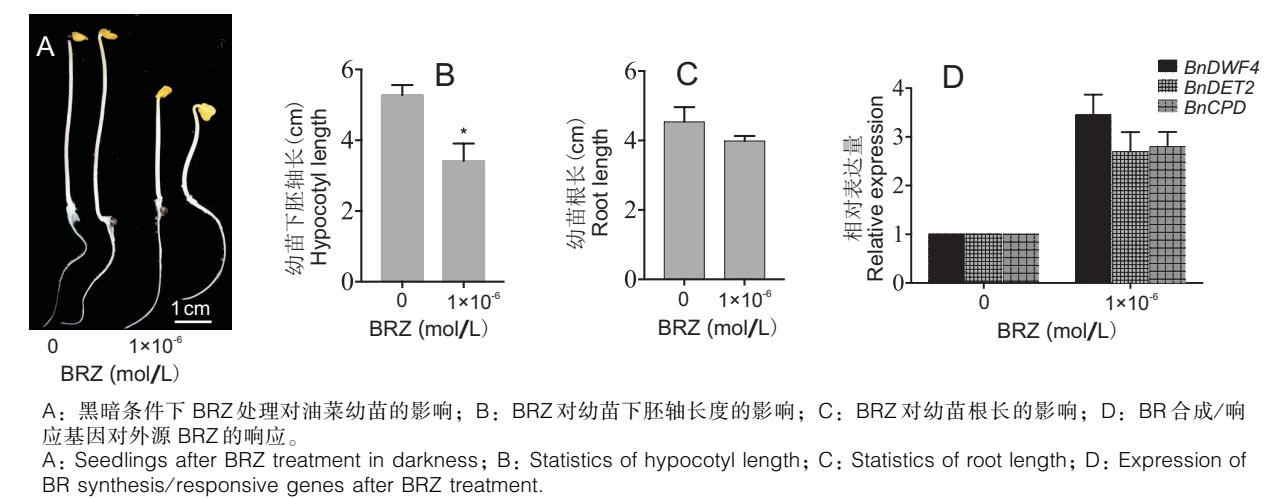


图 4 甘蓝型油菜幼苗黑暗条件下对 BRZ 处理的响应

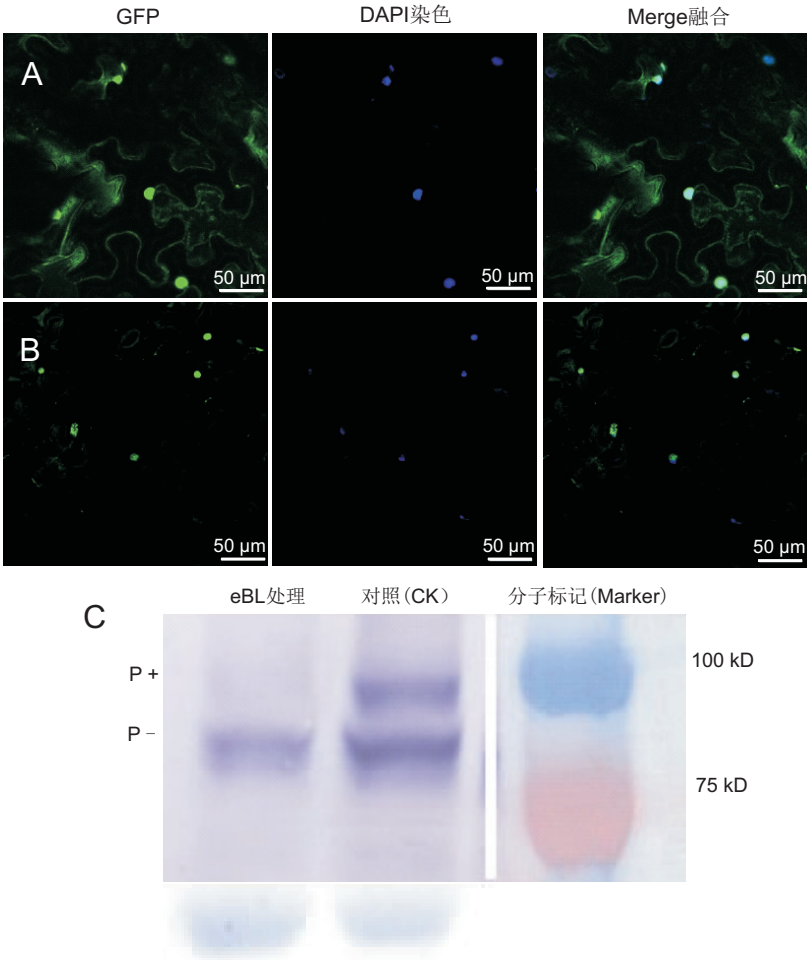
Fig. 4 Response of *B. napus* seedlings to exogenous BRZ treatment in darkness

融合 GFP 的蛋白进行了亚细胞定位观察。结果显示(图 5), *BnBZL2* 在烟草叶片表皮的细胞质和细胞核中遍在表达。当采用 1×10^{-5} mol/L 的 eBL 处理 8 h 后, 烟草叶片细胞核内 *BnBZL2*-GFP 的信号增强, 而细胞质中的信号减少。表明 BR 能使 *BnBZL2* 重新定位在细胞核内。蛋白质免疫印迹检测发现, 经 1×10^{-4} mol/L eBL 处理 10 h 后, 烟草叶片中的 *BnBZL2* 去磷酸化蛋白与磷酸化蛋白比例较对照上升, 推测 BR 水平升高后, *BnBZL2* 发生去磷酸化, 然后进入细胞核启动下游基因的表达。

2.7 *BnBZL2* 在拟南芥中功能保守

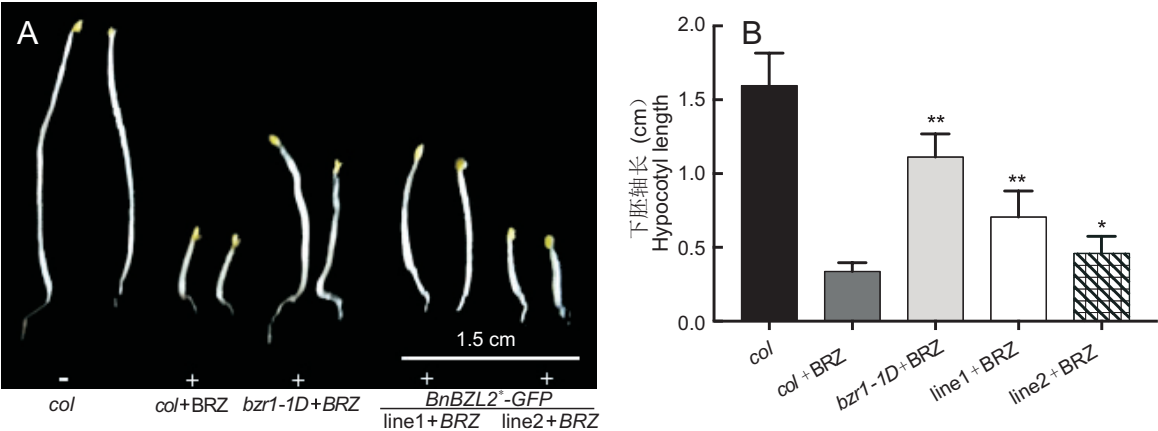
研究表明, 在拟南芥中, *BZR1* 的功能获得

性突变体 *bzr1-1D* 表现为 BR 信号增加的表型, 对外源 BRZ 的处理表现不敏感^[21]。本研究根据 *bzr1-1D* 的点突变位点确定了在 *BnBZL2* 中与之保守的位点, 并进行点突变, 构建了 *pBnBZL2::BnBZL2*-GFP* 载体转化拟南芥, 获得了 2 个转基因拟南芥株系 line1 和 line2。在黑暗条件下使用 2×10^{-6} mol/L 的 BRZ 处理转基因植株幼苗后发现, 相比野生型, 转基因幼苗的下胚轴伸长对 BRZ 抑制影响不敏感(图 6), 说明 *pBnBZL2::BnBZL2*-GFP* 转基因拟南芥植株中 BR 的信号增强, *BnBZL2** 在拟南芥中发挥了与 *BZR1* 相似的功能, 甘蓝型油菜 *BnBZL2* 与拟南芥 *BZR1* 功能同样保守。



A: 35S ::*BnBZL2*-GFP 在烟草叶片中的亚细胞定位; B: 1×10^{-5} mol/L eBL 处理 8 h 后的定位图; C: 1×10^{-4} mol/L eBL 处理 10 h 对 *BnBZL2* 磷酸化水平的影响; P+表示磷酸化, P-表示去磷酸化。
A: Subcellular localization of 35S ::*BnBZL2*-GFP in leaves; B: Localization map after 8 h of treatment with 1×10^{-5} mol/L eBL; C: Phosphorylation levels of *BnBZL2* after 1×10^{-4} mol/L eBL treatment for 10 h; P+: Phosphorylation, P-: Dephosphorylation.

图 5 BR 影响 *BnBZL2*-GFP 的亚细胞定位与磷酸化水平
Fig. 5 Effects of BR on subcellular localization and phosphorylation of *BnBZL2*-GFP



A: 2×10^{-6} mol/L BRZ 处理不同株系表型图 (+ 表示 BRZ 处理, - 表示未处理)。B: 各株系下胚轴长度统计。
A: Phenotype after 2×10^{-6} mol/L BRZ treatment (+: BRZ treatment, -: Untreated). B: Statistics of hypocotyl length.

图 6 *pBnBZL2::BnBZL2*-GFP* 的暗下 BRZ 反应
Fig. 6 BRZ responses of *pBnBZL2::BnBZL2*-GFP* in darkness

3 讨论

BR 作为一种重要的植物激素, 在植物生长发育的各个方面都发挥重要的作用。研究表明, BR 可以调控拟南芥种子的发育^[12, 31], 并提高种子的产量^[5, 6]。油菜是与拟南芥亲缘关系相近的一种重要油料作物, 已有研究发现, 使用体外油菜素内酯处理可以增加油菜单株籽粒的产量^[23]; 外源施加 eBL 可以增加油菜幼苗根的细胞呼吸速率, 增强其抗逆性^[24, 25]; 甘蓝型油菜过表达拟南芥的 *AtDWF4* 基因能够提高油菜的种子产量, 并增强油菜的抗逆性^[26]。以上研究结果表明 BR 在油菜发育过程中也发挥重要作用。

本研究对甘蓝型油菜中 BR 合成与信号转导通路的重要基因进行了初步分析, 通过同源进化分析发现, 甘蓝型油菜中 BR 合成关键基因与信号通路重要组分具有多个同源基因, 它们与拟南芥相关基因具有很高的相似性。对 BR 合成关键基因的组织表达分析发现, *BnCPD*、*BnDET2*、*BnDWF4* 在花期和幼嫩种子内呈现较高的表达水平, 说明幼嫩生殖器官中 BR 含量较高, 提示甘蓝型油菜中 BR 信号也可以提高种子产量。*BnBRI1*、*BnBIN2*、*BnBZL2* 这 3 个 BR 信号通路重要组分基因的表达分析结果显示, 它们在花等幼嫩组织中表达水平相对较高, 具有一定的组织特异性。拟南芥 BR 信号通路中的组分基因是遍在表达的, 组织特异性不高。这种差异可能是由于甘蓝型油菜基因的拷贝数

更多, 进化过程中同源基因的时空表达发生了差异, 产生了新的分工。

本研究同时也对甘蓝型油菜如何响应 BR 进行了研究, 结果表明合适浓度的外源 BR 处理可以促进油菜幼苗根的生长, 过高浓度的 BR 反而产生抑制作用, 研究结果与拟南芥一致, 但甘蓝型油菜的根对 BR 的敏感性比拟南芥更高。黑暗条件下 BRZ 处理可使甘蓝型油菜幼苗的下胚轴伸长受到抑制, 提示 BR 信号也参与了幼苗的光/暗形态建成, 但是幼苗的子叶并未完全张开, 根的生长差异也不明显, 说明 BR 信号介导的甘蓝型油菜幼苗的光形态建成与拟南芥相似, 但存在略微差异^[33]。

BR 合成基因表达检测结果发现, 外源 BR 处理会降低 *BnCPD*、*BnDET2*、*BnDWF4* 的表达量, 而 BRZ 处理则会增加它们的表达量, 说明甘蓝型油菜的 BR 信号也具有与拟南芥相似的保守反馈抑制机制, 过高的 BR 信号可以反馈抑制 BR 合成基因的表达。*BZR1* 作为 BR 信号下游重要的转录因子, 接受 BR 信号后去磷酸化进入细胞核内, 激活目标基因的表达。

研究发现, 在白菜型油菜和玉米中 *BZR1* 都存在多个同源基因^[32, 33]。本研究分析甘蓝型油菜中与拟南芥 *BZR1* 高度相似的 *BnBZL2*, 发现 *BnBZL2* 在细胞质和细胞核中均有表达, BR 处理可促进 *BnBZL2* 的核定位, 并且使 *BnBZL2* 的去磷酸化蛋白与磷酸化蛋白的比例增高, 表明 *BnBZL2* 在 BR 处理下去磷酸化, 重新定位在细胞核内, 与

目标基因结合, 引起 BR 响应基因表达量的变化和植株的 BR 响应。将自身启动子驱动点突变的高活性 *BnBZL2* 载体 *pBnBZL2::BnBZL2*-GFP* 转入拟南芥中, 研究转基因植株在黑暗下对 BRZ 的反应, 发现转基因植株与野生型相比对 BRZ 的反应不敏感, 在 BRZ 处理后下胚轴的生长抑制作用相比对照更低, 且与拟南芥 BR 信号过量突变体 *bzr1-1D* 的表型相似, 说明 *BnBZL2* 在拟南芥中能够发挥其作为 BR 信号正调控因子的功能, *BZR1* 和 *BnBZL2* 的功能在油菜和拟南芥中是保守的。

参考文献:

- [1] Mitchell JW, Mandava N, Worley JF, Plimmer JR, Smith MV. Brassins-a new family of plant hormones from rape pollen[J]. *Nature*, 1970, 225(5237): 1065-1066.
- [2] Belkhadir Y, Jaillais Y. The molecular circuitry of brassinosteroid signaling[J]. *New Phytol*, 2015, 206(2): 522-540.
- [3] Sasse JM. Physiological actions of Brassinosteroids: an update[J]. *J Plant Growth Regul*, 2003, 22(4): 276-288.
- [4] Clouse SD. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(4): 1219-1230.
- [5] Huang HY, Jiang WB, Hu YW, Wu P, Zhu JY, et al. BR signal influences *Arabidopsis* ovule and seed number through regulating related genes expression by *BZR1*[J]. *Mol Plant*, 2013, 6(2): 456-469.
- [6] Jiang WB, Huang HY, Hu YW, Zhu SW, Wang ZY, Lin WH. Brassinosteroid regulates seed size and shape in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2013, 162(4): 1965-1977.
- [7] Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1996, 272(5260): 398-401.
- [8] Ohnishi T, Godza B, Watanabe B, Fujioka S, Hategan L, et al. CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of *Arabidopsis*, catalyzes C-3 oxidation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(37): 31551-31560.
- [9] Choi YH, Fujioka S, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A. A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone[J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(3): 593-596.
- [10] Asami T, Yoshida S. Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor [J]. *Plant Physiol*, 2000, 123(1): 93.
- [11] 孙超, 黎家. 油菜素甾醇类激素的生物合成、代谢及信号转导[J]. *植物生理学报*, 2017, 53(3): 291-307.
- [12] Wang ZY, Bai MY, Oh E, Zhu JY. Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis [J]. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 701-724.
- [13] Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling[J]. *Cell*, 2002, 110(2): 213-222.
- [14] Kim TW, Guan S, Sun Y, Deng Z, Tang W, et al. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(10): 1254-1260.
- [15] Kim TW, Guan S, Burlingame AL, Wang ZY. The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2[J]. *Mol Cell*, 2011, 43(4): 561-571.
- [16] He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes *BZR1*, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 10185-10190.
- [17] Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, et al. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation[J]. *Cell*, 2002, 109(2): 181-191.
- [18] Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, Noguchi T, Fujioka S, et al. Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive1 homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(9): 1591-1606.
- [19] Bai MY, Zhang LY, Gampala SS, Zhu SW, Song WY, et al. Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(34): 13839-13844.
- [20] Tong H, Chu C. Brassinosteroid signaling and application in rice[J]. *J Genet Genomics*, 2012, 39(1): 3-9.
- [21] Zhang Y, Zhang YJ, Yang BJ, Yu XX, Wang D, et al. Functional characterization of *GmBZL2* (*AtBZR1* like gene) reveals the conserved BR signaling regulation in *Glycine max*[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31134.
- [22] Yang BJ, Lin WH, Fu FF, Xu ZH, Xue HW. Receptor-like protein ELT1 promotes brassinosteroid signaling through interacting with and suppressing the endocytosis-mediated degradation of receptor BRI1[J]. *Cell Res*, 2017, 27(9): 1182-1185.
- [23] 朱聪明. 油菜素甾醇类及茉莉酸类化合物对油菜籽粒产量及品质的调节作用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [24] Dhaubhadel S, Chaudhary S, Dobinson KF, Krishna P. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and

- tomato seedlings [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 40(2): 333–342.
- [25] Derevyanchuk M, Kretynin S, Iakovenko O, Litvinovskaya R, Zhabinskii V, *et al.* Effect of 24-epibrassinolide on *Brassica napus* alternative respiratory pathway, guard cells movements and phospholipid signaling under salt stress[J]. *Steroids*, 2017, 117: 16–24.
- [26] Sahni S, Prasad BD, Liu Q, Grbic V, Sharpe A, *et al.* Overexpression of the brassinosteroid biosynthetic gene *DWF4* in *Brassica napus* simultaneously increases seed yield and stress tolerance[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28298.
- [27] Chory J, Nagpal P, Peto CA. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(5): 445–459.
- [28] Nagata N, Min YK, Nakano T, Asami T, Yoshida S. Treatment of dark-grown *Arabidopsis thaliana* with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants[J]. *Planta*, 2000, 211(6): 781.
- [29] Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, *et al.* Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis[J]. *Dev Cell*, 2002, 2(4): 505–513.
- [30] Shimada Y, Goda H, Nakamura A, Takatsuto S, Fujioka S, Yoshida S. Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(1): 287–297.
- [31] Choe S, Fujioka S, Noguchi T, Takatsuto S, Yoshida S, Feldmann KA. Over-expression of *DWARF4* in brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2001, 26(6): 573–582.
- [32] Manoli A, Trevisan S, Quaggiotti S, Varotto S. Identification and characterization of the BZR transcription factor family and its expression in response to abiotic stresses in *Zea mays* L. [J]. *Plant Growth Regul*, 2018, 84(3): 423–436.
- [33] Saha G, Park JI, Jung HJ, Ahmed NU, Kayum MA, *et al.* Molecular characterization of BZR transcription factor family and abiotic stress induced expression profiling in *Brassica rapa* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 92: 92–104.

(责任编辑: 周 媛)