DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.94198

BnaBZR1 和 *BnaPIF4* 基因调控甘蓝型油菜弱光光效的机制

冯 韬^{1,2} 谭 晖^{1,2} 官 梅² 官春云^{2,*}

¹遵义师范学院生物与农业科技学院, 贵州遵义 563000; ²湖南农业大学农学院 / 国家油料改良中心湖南分中心, 湖南长沙 410128

摘 要: 甘蓝型油菜品系 XY881 和 XY883 是湘油 15 辐照诱变后连续自交筛选的 2 个种子含油量、光合效率和弱光敏感性等有明显差别的子代品系。分别从 XY881 和 XY883 中克隆了芸薹素唑抗性因子 1 (*brassinazole-resistant 1*, *BnaBZR1*) 和光敏色素互作因子 4 (*phytochrome interacting factor 4*, *BnaPIF4*) 基因并进行了序列结构、表达和功能分析。结果表明, XY883 的 *BnaBZR1* 和 *BnaPIF4* 基因存在结构变异, 引起表达和调控模式的差异。XY883 中 *BnaBZR1* 的启动子具有 124 bp 的富含 A/T 的插入序列, 且 XY883 具有比 XY881 高的 *BnaBZR1* 表达, 并且在弱光和 2,4-表油菜素内酯(2,4-BL)诱导下具有较少的表达变化。XY883 中 *BnaPIF4* 的 5'-UTR 区域存在可变剪接, 形成长度分别为 424 bp (U01)、239 bp (U02) 和 332 bp (U03) 的 3 种 5'-UTR, 在弱光和 2,4-BL 诱导下, XY883 中 3 种可变剪接的 *BnaPIF4* 转录产物的变化不一致。将 *BnaPIF4* 的 3 个 5'-UTR 与 CDS 分别组合转化拟南芥后其表达在转录水平无明显差异, 但蛋白翻译存在明显差异, 表明 *BnaPIF4* 的 5'-UTR 变异影响其翻译过程。转 *BnaPIF4* 基因拟南芥出现株高增加、叶片狭长且光合作用下降的表型, 共转化 *BnaBZR1* 能减弱 *BnaPIF4* 造成的光合作用下降; 转 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因对油菜的影响与拟南芥相似, 但表型不如拟南芥明显, 表明 *BnaPIF4* 是油菜光合作用的负调控因子, 而 *BnaBZR1* 可对 *BnaPIF4* 的光合负调控产生拮抗; 这与 XY881 和 XY883 中两基因表达调控模式及其光合表型相吻合。

关键词: 甘蓝型油菜; *BnaPIF4*; *BnaBZR1*; 可变剪接; 插入突变

Mechanism of *BnaBZR1* and *BnaPIF4* regulating photosynthetic efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under poor light

FENG Tao^{1,2}, TAN Hui^{1,2}, GUAN Mei², and GUAN Chun-Yun^{2,*}

¹College of Biology and Agriculture, Zunyi Normal College, Zunyi 563000, Guizhou, China; ²College of Agronomy, Hunan Agricultural University / National Oilseed Crops Improvement Center in Hunan, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: Double-low seed rape *B. napus* L. varieties XY881 and XY883 screened from the same parent Xiangyou 15 have significant differences in seed oil content, photosynthetic efficiency, and poor light sensitivity. Brassinazole-resistant 1 (*BnaBZR1*) and phytochrome interacting factor 4 (*BnaPIF4*) genes were cloned from XY881 and XY883, respectively, and their sequence structure, gene expression and gene function were analyzed. There were structural mutations in the *BnaBZR1* and *BnaPIF4* of XY883, causing differences in gene expression and regulation. The promoter of *BnaBZR1* in XY883 had a 124 bp A/T-rich insertion mutation, and XY883 had a higher expression of *BnaBZR1* than XY881, and fewer expression changes under low light and 2,4-epibrassinolide(2,4-BL) treatment. Splicing differences of *BnaPIF4* in the 5'-UTR region were found in XY883, and the alternative splicing resulted in three 5'-UTRs of 424 bp (U01), 239 bp (U02), and 332 bp (U03). Under the induction of low light and 2,4-BL treatments the changed of three alternative spliced *BnaPIF4* transcripts in XY883 had significant differences. The three 5'-UTRs combined with the CDS of *BnaPIF4* were transformed into *Arabidopsis thaliana*. There was no significant difference in *BnaPIF4* gene expression, but a significant difference in protein expression, indicating that the 5'-UTR mutation of *BnaPIF4* affects protein synthesis. Transgenic *BnaPIF4 Arabidopsis thaliana* showed a phenotype with increased plant height, narrow leaves, and decreased photosynthesis. Co-transformation with *BnaBZR1* could attenuate the decrease in photosynthesis caused by *BnaPIF4*. The effects of *BnaPIF4* and *BnaBZR1* genes on *Brassica napus* L. were similar to those on *Arabidopsis*

本研究由国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2015CB150206)资助。

This study was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (2015CB150206).

* 通信作者(Corresponding author): 官春云, E-mail: guancy2011@aliyun.com

第一作者联系方式: E-mail: 812298771@qq.com

Received (收稿日期): 2019-12-16; Accepted (接受日期): 2020-03-24; Published online (网络出版日期): 2020-04-03.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200403.0932.002.html>

thaliana, while the phenotype was not as obvious as that of *Arabidopsis thaliana*, suggesting that *BnaPIF4* is a negative regulator of photosynthesis in rapeseed, and *BnaBZR1* can antagonize the negative regulation of photosynthesis by *BnaPIF4*, while is consistent with the regulation pattern and photosynthetic phenotype of the two genes in XY881 and XY883.

Keywords: *Brassica napus* L.; *BnaPIF4*; *BnaBZR1*; alternative splicing; insertion mutation

植物中转录因子 PIF4 和 BZR1 互作是植物油菜素内酯信号与光信号互作的核心节点^[1], 同时二者互作也是介导植物对弱光照等非生物胁迫响应的节点^[2]。油菜素内酯通过一系列信号转导调节 BZR1 和 BZR2 (BES1) 的表达和磷酸化^[3], 并通过磷酸化等方式串联与之互作的其他因子调控下游基因表达, 调控植物生长, 最后形成完整的反馈回路平衡植物内源油菜素内酯的合成^[4]。拟南芥和水稻中 BZR1/2 以单体或复合体形式与 PIF4 互作, 介导下游的基因转录调控^[5]。植物中 PIF4 蛋白在光照条件下稳定性较弱, 极易发生泛素化降解, 因此植物 PIF4 在转录水平的调控也是相关信号互作中重要的调节方式。

甘蓝型油菜是世界范围内最重要的油料作物之一^[6], 但其具有极为复杂的异源二倍体基因组^[7], 不同甘蓝型油菜对低光等非生物胁迫的抗性有极大的多态性^[8], 但油菜相关 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 的表达调控与功能均不清楚。前期研究发现, 从甘蓝型油菜湘油 15 中克隆 *BnaPIF4* 基因发现其 A03 染色体上的同源拷贝相较测序品种中双 11 号存在着内含子突变^[9], 这表明在甘蓝型油菜中 *BnaPIF4* 基因可能存在着更多的突变。甘蓝型油菜品系 XY881 和 XY883 由相同亲本湘油 15 经辐照诱变后连续自交筛选而得, 其中 XY881 基本保持了湘油 15 的原有特征, XY883 则表现为更高的光合效率, 更高的种子含油量和油酸含量, 但同时种子含油量的稳定性较低、对低光寡照胁迫更为敏感。在 XY881 和 XY883 中进行 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因克隆、序列特征、表达和功能分析, 对探明油菜中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 的表达调控规律及其在低光照胁迫中扮演的角色具有重要意义, 同时也将为阐明甘蓝型油菜对低光照胁迫响应存在差异的分子机制提供一些新的理论支持。

本文克隆了两品系甘蓝型油菜中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因并进行了完整的比较分析, 确定了甘蓝型油菜品系 XY883 中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因存在的可变剪接和启动子插入突变, 并通过酵母杂交、表达分析和植物遗传转化等方式确认了 XY883

中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因突变对基因表达和蛋白翻译的影响, 并初步确定了 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 在拟南芥和油菜中的功能。

1 材料与方法

1.1 植物材料与培养

甘蓝型油菜品种(系)湘油 15、XY881、XY883 以及野生型拟南芥由国家油料改良中心(湖南)提供。分别于湖南农业大学耘园试验基地和室内植物光照培养箱中(KBW240, BINDER, 美国) (16 h/8 h 光周期)种植受试材料, 以常规水肥管理。在植物培养箱中设置光源 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 模拟强光照, $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 模拟弱光照, 试验基地中以遮光网遮光模拟弱光胁迫。

1.2 取样和测试

分别于甘蓝型油菜品系 XY881 和 XY883 种子萌发后 45、120、200 和 220 d 对根、茎、叶、花、角果及完成遗传转化后的甘蓝型油菜和 T_2 代拟南芥叶片随机取样, 以液氮速冻后储存于 -80°C 冰箱, 用于 RNA 和蛋白提取。对经不同处理的甘蓝型油菜品系 XY881 和 XY883 完全成熟的种子随机取样, 以索氏抽提测试含油量, 以气相色谱法^[10]测试脂肪酸组成。

1.3 DNA 提取、RNA 提取与 cDNA 合成

使用 CTAB-PVP 提取液从甘蓝型油菜叶片中提取基因组 DNA。使用 TRIzol RNA Extraction Kit (TransGen Biotech Co., Ltd.) 从甘蓝型油菜和拟南芥样品中提取总 RNA。使用 Easy Script First-Strand cDNA Synthesis SuperMix Kit (TransGen Biotech Co., Ltd.) 进行第 1 链 cDNA 合成。

1.4 基因克隆

从 BRAD 数据库(<http://brassicadb.org/brad/>)获取甘蓝型油菜 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因及转录本序列并进行序列染色体步移分析。截取 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 起始密码子上游 1 kb 序列为启动子克隆区域, 根据序列特征设计用于 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 启动子及全长 mRNA 克隆的引物(表 1), 以 PrimeSTAR GXL DNA 聚合酶(TaKaRa, 日本)进行 PCR。

表 1 基因克隆引物
Table 1 Primer for gene cloning

引物 Primer	克隆产物 Product of cloning	序列 Sequence (5'–3')
PIF4_mF	mRNA of <i>BnaPIF4</i>	ATAGATCTCATCCCTAAAGA
PIF4_mR		TATGTTCAAAAAGATAGCCTTAG
BZR1_mF	mRAN of <i>BnaBZR1</i>	GGAGAAGGAAAAGAGAGATTC
BZR1_mR		TTGAGAGAAAACAAATGGGC
PIF4_cF	CDS of <i>BnaPIF4</i>	ATGGAACACCAAGGTTGGAG
PIF4_cR		CTAACGGGGACCGTCGG
BZR1_cF	CDS of <i>BnaBZR1</i>	ATGACGTCAGATGGAGCTACG
BZR1_cR		TCAACCACGAGCTTTGCC
PIF4_pF	Promoter of <i>BnaPIF4</i>	ATTGAAACCGATTGTAAGGA
PIF4_pR		AGAAACAAAAGGAGCATAAAG
BZR1_pF	Promoter of <i>BnaBZR1</i>	GGTTATTTTCAAATAATGGATG
BZR1_pR		CTTGAGCTCTTAGCCCTGTG
PIF4_uF	5'-UTR of <i>BnaPIF4</i>	ATAGATCTCATCCCTAAAGA
PIF4_uR		GTCAGATCTCAGATTGGAAAGC
PIF4_dF	Full-length gene of <i>BnaPIF4</i>	ATAGATCTCATCCCTAAAGAAG
PIF4_dR		TTTTGACAAACTAAACCAGG

1.5 RT-qPCR 与 WB

以 RT-qPCR 检测 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因表达, 以 WB 检测 BnaPIF4、BnaBZR1 及 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, RuBPCase)等蛋白表达。以 *BnaAction* 为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法以 RT-qPCR 检测 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 各拷贝表达, 根据序列特征设计所需引物(表 2), 各试验均 3 次技术重复。

分别以 HA-tag (ab18181, Abcam, Inc., 美

国)(1 1000)和 RbcL 抗体(AS03037, Agrisera, Ins., 瑞典)(1 2000)为一抗进行 WB, 检测连接 HA 标签的 BnaPIF4 蛋白和 RuBPCase 蛋白, 以 ECL 发光法进行印迹, 随后以 GS800 扫描仪(Bio-Rad Company, 美国)扫描蛋白光密度。

1.6 载体构建与遗传转化

用于拟南芥和甘蓝型油菜 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 遗传转化的 *pRI101-AN* 载体来源于国家油料改良中心(湖南)。分别以 3 种 *BnaPIF4* 基因的 5'-UTR 替换

表 2 RT-qPCR 引物
Table 2 Primer for RT-qPCR

引物 Primer	基因 Gene	序列 Sequence (5'–3')
ActF	<i>BnaActin</i>	GGTTGGGATGGACCAGAAGG
ActR		TCAGGAGCAATACGGAGC
PIF4F	<i>BnaPIF4_cds</i>	CTGTGCTGTTGTGCTTAC
PIF4R		AGTCTCTACATAAACCCATAGG
U1_F	<i>BnaPIF4_UTR_U01</i>	CTGTGCTGTTGTGCTTAC
U1_R		AGTCTCTACATAAACCCATAGG
U2_F	<i>BnaPIF4_UTR_U02</i>	CTGTGCTGTTGTGCTTAC
U2_R		TTCCTCTCACTTGCTCTC
U3_F	<i>BnaPIF4_UTR_U03</i>	GAGAGCAAGTGAGAGGAA
U3_R		CAGAAGCTGAAGTAGTAGAAG
BZR1F	<i>BnaBZR1</i>	CTCTCATCTCCAACCTCCAA
BZR1R		GACTCATCACACTCAGGTATA

pRII01-AN 载体中的 *AtADH* 的 5'-UTR 序列, 随后将携带 HA 标签的 *BnaPIF4* CDS 序列插入 *pRII01-AN* 载体。以农杆菌 *GV3103* 侵染介导进行拟南芥和甘蓝型油菜的遗传转化。

1.7 酵母杂交实验

分别以 *pGAD-T7* 作为酵母单杂交和双杂交的 AD 质粒, 以 *pGBK-T7* 为酵母双杂交的 BD 质粒, 以 *pHIS2* 为酵母单杂交的 BD 质粒, 共转化酵母菌株 *HF7c* 用于鉴定 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 之间的互作关系。

2 结果与分析

2.1 弱光和 2,4-BL 处理下 XY881 与 XY883 重要农艺性状

对大田栽培的 XY881 和 XY883 分别进行遮光和 2,4-BL 处理, 并统计其有效光合叶 RuBPCase 活性、全株总角果数、每角果种子粒数、成熟种子含油量、油酸含量及种子千粒重(图 1)。

遮光处理下 XY881 和 XY883 表现出明显的敏感性差异, XY883 叶片中 RuBPCase 含量下降较 XY881 更明显, 与之对应的 XY883 每角果中种子粒

数和种子含油量也由明显下降, 而 XY881 每角果粒数和种子含油量均无明显下降。2,4-BL 处理对 XY881 与 XY883 的影响规律相似, 油菜叶片中 RuBPCase 含量明显上升, 光合作用加强, 与之对应的全株总角果数和每角果种子粒数明显增多, 但整体而言 XY883 受影响更明显。无论弱光照胁迫或 2,4-BL 处理均未对 XY881 和 XY883 种子千粒重及种子油脂中油酸比例。由此推测弱光和 2,4-BL 处理下主要通过影响光合作用水平, 调控 XY881 和 XY883 种子油脂合成的底物, 该过程中 XY881 和 XY883 存在油菜素内酯信号响应因子表达水平差异。

2.2 两品系甘蓝型油菜(XY881 和 XY883)中 *BnaBZR1* 和 *BnaPIF4* 基因克隆和结构分析

为进一步理解 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 在 XY881 和 XY883 对弱光和 2,4-BL 响应差异中的作用, 本文从 XY881 和 XY883 中分别克隆 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 的全长 mRNA 和全长基因, 并从中亚克隆启动子、CDS 和 5'-UTR 等元件, 并对两品系中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因结构进行分析(图 2)。

图 1 弱光和 2,4-BL 处理下 XY881 和 XY883 重要农艺性状

Fig. 1 Investigation of important agronomic traits of XY881 and XY883 under poor light and 2,4-BL treatment

A: 种子含油量; B: 种子油酸含量; C: 单株总角果数; D: 每角果种子粒数; E: 成熟种子千粒重; F: 叶片 RuBPCase 含量。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: oil content of seed; B: oleic acid content of seed; C: total number of silique per plant; D: number of seeds per silique; E: 1000-seed weight of mature seeds; F: RuBPCase content in leaves. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 XY881 和 XY883 中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因结构

Fig. 2 Different gene structures of *BnaPIF4* and *BnaBZR1* in XY881 and XY883

A: *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 全长 mRNA; B: *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 全长 CDS; C: *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 启动子; D: *BnaPIF4* 三种 5'-UTRs; E: *BnaPIF4* 全长基因; F: XY881 和 XY883 中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 突变结构示意图。1: XY881 中 *BnaPIF4*; 2: XY883 中 *BnaPIF4*; 3: XY881 中 *BnaBZR1*; 4: XY883 中 *BnaBZR1*; 01~03: XY883 中 *BnaPIF4* 三种 5'-UTRs; M1: 2K plus DNA marker; M2: 2K DNA marker。

A: cloning of mRNA of *BnaPIF4* and *BnaBZR1*; B: cloning of CDS of *BnaPIF4* and *BnaBZR1*; C: cloning of promoter of *BnaPIF4* and *BnaBZR1*; D: cloning of 5'-UTR of *BnaPIF4*; E: cloning of full-length *BnaPIF4* gene; F: the mutation structure of *BnaPIF4* and *BnaBZR1* in XY881 and XY883. 1: *BnaPIF4* of XY881; 2: *BnaPIF4* of XY883; 3: *BnaBZR1* of XY881; 4: *BnaBZR1* of XY883; 01~03: three 5'-UTRs of *BnaPIF4* from XY883; M1: 2K plus DNA marker; M2: 2K DNA marker.

基因结构分析显示, XY881 中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因与亲本湘油 15 一致, 而 XY883 中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因分别存在可变剪接和启动子插入突变。XY883 中 *BnaPIF4* 可变剪接共形成 3 种含有不同 5'-UTR 的转录产物, 分别为 U01 (424 bp)、U02 (239 bp) 和 U03 (332 bp) (图 2-D); 该可变剪接均发生于亲本 *BnaPIF4* 基因的第一外显子内, 3 个 5'-UTR 拷贝具有相同的剪接边界序列 (AGGT 和 AGAC), 第一剪接点分别位于 +97 bp、+191 bp 和 +415 bp 位置。XY883 中 *BnaBZR1* 基因在启动子 -470 bp 位置内存在一个 124 bp 长度的富 A/T 碱基插入突变。

2.3 *BnaBZR1* 启动子插入突变功能

为进一步确认 XY883 中 *BnaBZR1* 基因启动子区域的插入突变有何功能, 分别以 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 鉴定插入序列中的启动子元件 (图 3-A); 将 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 的 CDS 克隆到 *pGAD-T7* 载体 (AD-PIF4 和 AD-BZR1), 将 *BnaPIF4* 的 CDS 克隆到 *pGBK-T7* 载体 (pGBK-PIF4), 将 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 启动子克隆到 *pHIS2* 载体 (pHIS2-pPIF4、pHIS2-pBZR1.1 和 pHIS2-pBZR1.2), 分别进行酵母杂交, 验证 *BnaPIF4* 与 *BnaBZR1* 之间的互作关系是否受启动子突变影响 (图 3-B); 以 RT-qPCR 检测

图 3 *BnaBZR1* 启动子插入突变、基因表达和 *BnaBZR1* 与 *BnaPIF4* 互作

Fig. 3 Insertion mutation in the *BnaBZR1* promoter changed the *BnaBZR1* gene expression, did not change the interaction of *BnaBZR1* with *BnaPIF4*

A: *BnaBZR1* 启动子插入突变序列分析; B: *BnaBZR1* 和 *BnaPIF4* 酵母杂交分析; C: XY881 和 XY883 中 *BnaBZR1* 时空表达; D: 弱光和 2,4-BL 处理下 XY881 和 XY883 中 *BnaBZR1* 表达。DAG 表示种子萌发后天数。

A: sequence analysis of insertion mutation regions in the promoter of *BnaBZR1*; B: analysis of the interaction between *BnaBZR1* and *BnaPIF4* by yeast hybridization; C: the temporal and spatial gene expression of *BnaBZR1* in XY881 and XY883; D: the expression of *BnaBZR1* in XY881 and XY883 under poor light stress and 2,4-BL treatment. DAG means days after seed germination.

XY883 和 XY881 中 *BnaBZR1* 基因表达调控规律的异同点(图 3-C, D)。

分析发现, *BnaBZR1* 基因启动子区 124 bp 的插入突变中含有大量的启动子元件, 包含多个 TATA 盒、2 个 CAAT 盒、1 个 MRE 结构域及 2 个 Skn-1 结构域。酵母杂交结果表明, *BnaBZR1* 与 *BnaPIF4* 蛋白可相互结合, *BnaBZR1* 能结合 *BnaPIF4* 启动子, 而 *BnaPIF4* 不能结合 *BnaBZR1* 启动子, *BnaBZR1* 基因启动子插入突变不影响 *BnaPIF4* 与 *BnaBZR1* 启动子的结合关系。XY883 中 *BnaBZR1* 启动子插入突变会明显提高其表达量, 苗期和苔期 XY883 中 *BnaBZR1* 表达明显高于 XY881, 叶片和茎等光合作用部位 XY883 中 *BnaBZR1* 表达明显高于 XY881。XY883 中 *BnaBZR1* 表达稳定, 不受低光和 2,4-BL

的明显诱导, 而 XY881 中 *BnaBZR1* 表达受到低光和 2,4-BL 明显诱导, 刺激后 XY881 中 *BnaBZR1* 表达明显提高, 这表明 *BnaBZR1* 启动子插入突变可能提高 *BnaBZR1* 本底表达水平, 同时造成 *BnaBZR1* 表达对环境响应减弱, 插入突变序列影响 *BnaBZR1* 表达具体通过何种方式尚需进一步研究, 由插入突变中大量启动子元件来看, 该插入突变可能引入了上游转录因子的结合位点, 加强了启动, 但同时由于启动子元件的增加造成光响应和油菜素内酯响应的转录因子结合位点竞争抑制, 降低了 *BnaBZR1* 表达对低光和 2,4-BL 的响应。

2.4 可变剪接影响 *BnaPIF4* 基因表达和翻译

通过 RT-qPCR 检测 XY881 和 XY883 中 *BnaPIF4* 基因的时空表达规律以及在弱光胁迫和 2,4-BL 处理

下 *BnaPIF4* 不同转录产物表达的响应(图 4-A, B)。将 *BnaPIF4* 可变剪接形成的不同转录产物分别克隆到 *pRI101-AN* 载体上, 重组载体结构如图 4-C, 随后

将重组载体转化拟南芥, 观察表型并检测转基因拟南芥中 *BnaPIF4* 表达情况及光合酶 RuBPCase 含量(图 4-D~F)。

图 4 *BnaPIF4* 可变剪接对基因表达和翻译的影响

Fig. 4 Alternative splicing affects *BnaPIF4* gene expression and protein translation

A: XY881 和 XY883 中 *BnaPIF4* 时空表达; B: 弱光和 2,4-BL 处理下 XY881 和 XY883 中 *BnaPIF4* 表达; C: 含不同 5'-UTRs 重组 *pRI101-AN* 载体结构; D: 转基因拟南芥中 *BnaPIF4* mRNA 和蛋白表达; E: 转 *BnaPIF4* 拟南芥表型; F: 转 *BnaPIF4* 拟南芥 RuBPCase 含量。DAG 表示种子萌发后天数。

A: temporal and spatial gene expression of *BnaPIF4* in XY881 and XY883; B: the expression of *BnaPIF4* in XY881 and XY883 under poor light stress and 2,4-BL treatment; C: construction of *pRI101-AN* vector with different 5'-UTRs; D: the mRNA expression of *BnaPIF4* and the protein expression of *BnaPIF4*; E: the phenotype of transgenic *BnaPIF4 Arabidopsis thaliana*; F: the RuBPCase protein content of transgenic *BnaPIF4 Arabidopsis thaliana*. DAG means days after seed germination.

时空表达检测发现 XY881 和 XY883 中 *BnaPIF4* 总表达量模式无明显差异, *BnaPIF4* 表达均为随生育进程表达量逐渐降低, 有明显的组织特异性, 主要表达于地上部分, 叶中表达量最高。低光照和 2,4-BL 处理诱导 *BnaPIF4* 表达, 且 XY883 中 *BnaPIF4* 表达量增幅远大于 XY881, 进一步分析发现 *BnaPIF4* 不同转录产物对弱光和 2,4-BL 的响应具有明显差别, 其中转录本 U01 (具有 U01 结构 5'-UTR, 即亲本无突变转录产物) 响应最明显, U03 转录产物次之 (具有 U03 结构 5'-UTR), U02 转录产物 (具有 U02 结构 5'-UTR) 无明显响应。拟南芥遗传转化发现不同的 5'-UTR 在 35S 启动子驱动下不影响 *BnaPIF4* 的 CDS 转录, 但不同的 5'-UTR 对 *BnaPIF4* 蛋白合成具有显著影响, 其中 U01 与对照 *AtADH5* 具有相近的高水平 *BnaPIF4* 蛋白合成, U02 和 U03 具有明显偏低的 *BnaPIF4* 蛋白合成量。转 *BnaPIF4* 基因拟南芥表现出叶片狭长、茎伸长、早花及结实减少等表型, 转不同的 *BnaPIF4* 转录产物, 效应具有差异, U01 转录产物影响最大, U03 次之, U02 影响最小, 叶片光合关键酶 RuBPCase 含量的下降也表现 U01 最明显, U03 次之, U02 相对野生型无明显下降。*BnaPIF4* 本身是 bHLH 家族重要的转录因子, 其下游存在大量的响应基因, *BnaPIF4* 不同转录产物的蛋白合成能力具有差异, 由此推测, 环境因素可能影响 XY883 中 *BnaPIF4* 的剪接过程, 调控不同转录产物的比例, 一方面在转录水平响应 *BnaPIF4* 上游因子的调控, 一方面在蛋白水平传导和改变对下游响应基因的调控水平, 通过自身在转录和翻译上平衡的调节来调控 XY883 对环境的综合响应, 这可能是 XY883 相对亲本湘油 15 在正常光照条件下具有更高的光合效能且对弱光等环境因素更敏感的原因之一。

2.5 甘蓝型油菜和拟南芥中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 功能

为进一步验证 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 的功能, 分别对拟南芥和甘蓝型油菜亲本湘油 15 进行遗传转化, 观察过表达 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 后的表型 (图 5)。

转 *BnaPIF4* 基因拟南芥相较野生型表现出叶片狭长、茎伸长、早花且结实率降低, 叶片中 RuBPCase 含量明显下降的表型, 成熟种子的含油量也明显下降, *BnaPIF4* 不同转录产物的效应存在差异, 转 U01 和 U03 拟南芥种子含油量下降明显, 转 U02 拟南芥

种子含油量则无明显下降, 这与 3 种转录物对拟南芥叶片 RuBPCase 含量的影响一致。转 *BnaBZR1* 基因拟南芥相较野生型具有明显更大的生物量, 生育期适度缩短, 总结实量上升, 但叶片 RuBPCase 含量和种子含油量无明显变化。共转化 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因拟南芥仍保持转 *BnaPIF4* 基因拟南芥叶片狭长和早花的特征, 但植株生物量明显提升, 叶片 RuBPCase 含量和种子含油量相对野生型无明显变化。综合来看, 在拟南芥中 *BnaPIF4* 表现为光合作用的负调控因子; *BnaBZR1* 表现生长促进作用, 提升拟南芥生物量; *BnaBZR1* 对 *BnaPIF4* 的光合作用负效应具有拮抗作用。在亲本湘油 15 中过表达 *BnaPIF4* 会让其主茎相对更细长, 叶片也更狭长, 开花略有提前; 在湘油 15 中过表达 *BnaBZR1* 会提高其生物量, 提早花期, 增加开花量, 但均无统计学差异; 湘油 15 过表达 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 后叶片 RuBPCase 含量亦无明显变化。整体而言, *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 过表达对甘蓝型油菜的影响和拟南芥基本一致, 但对甘蓝型油菜的影响远小于拟南芥, 这可能与甘蓝型油菜复杂的双二倍体基因组中存在大量同源拷贝有关, 单一基因过表达影响远不如拟南芥明显。

3 讨论

甘蓝型油菜品系 XY883 和 XY881 均来源于亲本湘油 15, XY881 基本保持了亲本特性, XY883 的 RuBPCase 含量、种子含油量、种子油酸含量和结实量相较亲本均明显提升, 弱光胁迫对 XY881 和湘油 15 影响较小, 而对 XY883 影响十分明显, 这表明 XY883 和 XY881 的表型差异可能源于光响应元件的差异。2,4-BL 对 XY881 和 XY883 的调控规律基本一致, 均提升 RuBPCase 含量, 促进光合, 但影响幅度差异明显, 2,4-BL 对 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 基因具有一致的诱导作用, 诱导效应存在品系差异^[11], 这表明 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 的表达调控介导油菜素甾类信号和光信号通路的互作可能是 XY881 和 XY883 光合作用和弱光敏感性等差异的原因。

植物中 BZR1 是油菜素内酯信号通路中的关键转录因子, 其通过核质穿梭调控下游靶基因表达, 并通过反馈回路影响植物油菜素甾醇合成来调节植物的生长^[12], 可见油菜中 *BnaBZR1* 自身的表达调控同样可以影响油菜素内酯信号途径。XY883 中 *BnaBZR1* 启动子中的插入突变引入了多个具有转录

图 5 转基因拟南芥和转基因油菜表型

Fig. 5 Phenotype of transgenic *Arabidopsis thaliana* and *B. napus* L.

A: 转基因拟南芥; B: 转基因拟南芥 RuBPCase 含量; C: 转基因拟南芥种子含油量; D: 转基因油菜; E: 转基因油菜中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 表达; F: 转基因油菜 RuBPCase 含量。

A: the phenotype of transgenic *BnaPIF4* and *BnaBZR1* *Arabidopsis thaliana*; B: the RuBPCase protein content of transgenic *BnaPIF4* and *BnaBZR1* *Arabidopsis thaliana*; C: the oil content of transgenic *Arabidopsis thaliana* seed; D: the plant of transgenic *B. napus* L.; E: the gene expression of *BnaPIF4* and *BnaBZR1* in transgenic *B. napus* L.; F: the RuBPCase content of leaves of transgenic *B. napus* L.

因子特征的元件,本底表达水平明显高于 XY881,但弱光胁迫和 2,4-BL 处理对 XY883 中 *BnaBZR1* 的诱导效应较弱,造成在胁迫和 2,4-BL 处理下两品系油菜中 *BnaBZR1* 表达水平接近,这可能是由于启动子插入突变之后增强了启动,同时对上游转录调控因子产生竞争性结合,抑制了弱光和 2,4-BL 的响应元件工作,但具体的分子机制尚需进一步探索,另一方面,XY883 中 *BnaBZR1* 对弱光和 2,4-BL 钝感,导致内源油菜素内酯合成的 *BnaBZR1* 反馈调节失效,造成 XY883 对弱光照等不利环境因素的调节能力下降。

PIF4 是植物光信号通路中的核心转录因子之一,它通过响应光质变化^[13]和热胁迫^[14]等调节植物开花和生长等生物学过程。PIF4 是介导光信号与植物激素途径相互作用的关键转录因子,如与赤霉素信号^[15]、油菜素内酯信号^[16]和生长素信号^[17]等产生互作。在 XY883 中 *BnaPIF4* 选择性剪接形成 3 种具有不同 5'-UTR 的转录物,弱光和 2,4-BL 对这 3 种转录物的诱导效应具有明显差别,在转基因拟南芥中这 3 种转录物也表现明显不一致的翻译效率,并导致转基因拟南芥产生不同的 RuBPCase 含量,这表明 XY883 中 *BnaPIF4* 的剪接调控可能是其与 XY881 存在明显光合水平和弱光敏感性差异的原因。XY883 中 *BnaPIF4* 通过可变剪接形成不同转录物,造成转录水平和翻译水平的变化量存在明显差异,在正常光照下 XY883 中 *BnaPIF4* 低翻译水平的 U02 和 U03 转录物相对比例较高,弱光下高翻译水平的 U01 转录物比例明显上升,而 *BnaPIF4* 在拟南芥和油菜中都表现出光效负调控因子的特征,这可能是 XY883 在常光下表现明显高于亲本光合效能,而弱光下光合效能明显降低的原因。

酵母杂交实验表明, *BnaBZR1* 蛋白与 *BnaPIF4* 相互作用, *BnaBZR1* 与 *BnaPIF4* 的启动子相互作用,但 *BnaPIF4* 不与 *BnaBZR1* 的启动子相互作用,这表明 *BnaBZR1* 可能调节 *BnaPIF4* 的表达,而 *BnaPIF4* 可能不直接调控 *BnaBZR1* 的表达。PIF4 和 BZR 的互作是植物油菜素内酯信号和光信号互作的关键节点, *BnaBZR1* 与 *BnaPIF4* 的互作模式可能意味着油菜中油菜素内酯信号与光信号的互作存在方向性偏好。前期研究显示在甘蓝型油菜中 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 均存在大量同源拷贝^[9,18],因此在功能上可能存在大量的冗余,二者在甘蓝型油菜光效调节中可能存在更复杂的互作网络,需要进一步对二者

同源拷贝及上下游调控因子进行发掘和探索。

总体来看,甘蓝型油菜中涉及油菜素内酯和光信号互作因子存在着基因多态性,由此介导的油菜素内酯信号途径和光信号途径互作等方面差异可能是不同品系甘蓝型油菜光合效能差异的原因,两信号途径之间互作的平衡可能是筛选稳定的高产油菜品种的重要指标。

4 结论

甘蓝型油菜品系 XY883 相对亲本湘油 15, 分别存在 *BnaPIF4* 的可变剪接和 *BnaBZR1* 启动子的插入突变,导致两基因在不同条件下的表达出现不同于亲本的变化规律。*BnaPIF4* 在拟南芥和油菜中表现光合负效应因子的特点,而 *BnaBZR1* 可对此负效应形成拮抗,拟南芥受 *BnaPIF4* 和 *BnaBZR1* 遗传转化影响较甘蓝型油菜更大。

References

- [1] Oh E, Zhu J Y, Wang Z Y. Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 802–809.
- [2] Bai M Y, Shang J X, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun T P, Wang Z Y. Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 810–817.
- [3] Gudesblat G E, Russinova E. Plants grow on brassinosteroids. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 530–537.
- [4] Ryu H, Hwang I. Brassinosteroids in plant developmental signaling networks. *J Plant Biol*, 2013, 56: 267–273.
- [5] Wang W, Bai M Y, Wang Z Y. The brassinosteroid signaling network—a paradigm of signal integration. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 21: 147–153.
- [6] USDA FAS (Foreign Agricultural Service), 2016. Oilseeds: World Markets and Trade. <https://www.fas.usda.gov/data/oil-seeds-world-markets-and-trade>.
- [7] Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin I A, Tang H, Wang X, Corréa M. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 2014, 345: 950–953.
- [8] Mölmann J A, Hagen S F, Bengtsson G B, Johansen T J. Influence of high latitude light conditions on sensory quality and contents of health and sensory-related compounds in swede roots (*Brassica napus* L. ssp. *rapifera* Metz.). *J Sci Food Agric*, 2018, 98: 1117–1123.
- [9] 冯韬, 官春云. 甘蓝型油菜光敏色素互作因子 4 (*BnaPIF4*) 基因克隆和功能分析. 作物学报, 2019, 45: 204–213.
- [10] Feng T, Guan C Y. Cloning and characterization of phytochrome interacting factor 4 (*BnaPIF4*) gene from *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 2019, 45: 204–213 (in Chinese with English abstract).
- [10] Wei F, Gao G Z, Wang X F, Dong X Y, Li P P, Hua W, Wang X, Wu X M, Chen H. Quantitative determination of oil content in small quantity of oilseed rape by ultrasound-assisted extraction

- combined with gas chromatography. *Ultrason Sonochem*, 2008, 15: 938–942.
- [11] 冯韬, 谭晖, 徐江林, 官春云. 油菜素内酯在不同生育期对两品系甘蓝型油菜的生长调控. *中国油料作物学报*, 2019, 41: 904–913.
- Feng T, Tan H, Xu J L, Guan C Y. Epibrassinolide regulation on oilseed rape (*Brassica napus* L.) in different period. *Chin J Oil Crop Sci*, 2019, 41: 904–913 (in Chinese with English abstract).
- [12] Wang Z Y, Nakano T, Gendron J, He J X, Chen M, Vafeados D, Yang Y L, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell*, 2002, 2: 505–513.
- [13] Casson S A, Franklin K A, Gray J E, Grierson C S, Whitelam G C, Hetherington A M. Phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity. *Curr Biol*, 2009, 19: 229–234.
- [14] Kumar S V, Lucyshyn D, Jaeger K E, Alós E, Alvey E, Harberd N P, Wigge P A. Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, 2012, 484: 242–245.
- [15] Lucas M D, Davière J M, Mariana R F, Pontin M, Manuel J I P, Lorrain S, Fankhauser C, Blázquez M A, Titarenko E, Prat S. A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature*, 2008, 451: 480–484.
- [16] Stella B G, Miguel D L, Cristina M, Ana E R, Davière J M, Prat S. BR-dependent phosphorylation modulates PIF4 transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth. *Genes Dev*, 2014, 28: 1681–1694.
- [17] Franklin K A, Lee S H, Patel D, Kumar S V, Spartz A K, Gu C, Ye S Q, Yu P, Breen G, Cohen J D, Wigge P A, Gray W M. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 20231–20235.
- [18] 冯韬, 官春云. 甘蓝型油菜芸薹素内酯耐受因子(BnaBZR1/BnaBES1)全长 CDS 克隆与生物信息学分析. *作物学报*, 2018, 44: 1793–1801.
- Feng T, Guan C Y. Cloning and characterization of brassinazole-resistant (BnaBZR1 and BnaBES1) CDS from *Brassica napus* L. *Acta Agron Sin*, 2018, 44: 1793–1801 (in Chinese with English abstract).