

干旱胁迫下棉花幼苗转录因子 *BES1/BZR1* 对外源油菜素内酯的响应表达特征

安汶铠, 常 丹, 张富春*

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046)

摘 要: 植物激素油菜素内酯(Brassinosteroid, BR)具有提高植物抗旱性的作用, 该研究探讨干旱胁迫下外源喷施 BR 对棉花干旱胁迫响应基因表达的影响。采用 PCR 方法从棉花‘新陆早 17 号’幼苗克隆获得 1 个干旱胁迫响应转录因子基因, 命名为 *GhBES1/BZR1* (GenBank 登录号 KP272000)。序列分析表明 *GhBES1/BZR1* 基因开放阅读框为 960 bp, 编码 319 个氨基酸, 理论分子量为 34.3 kD, 理论等电点为 8.95。保守结构域分析显示, 该基因编码的蛋白具有一个 DUF822 保守结构域。利用 2.5% PEG-6000 对棉花‘新陆早 17 号’幼苗进行干旱胁迫处理 24 h, 再分别喷施水、BR 和 Z(BR 抑制剂), qRT-PCR 分析结果表明, PEG-6000 干旱胁迫下用 BR 处理 3 h 后, *GhBES1/BZR1* 基因表达量明显提高, 当 BR 处理 6 和 12 h 时, *GhBES1/BZR1* 基因的表达量较 3 h 时明显下降。研究认为, 在干旱胁迫下对棉花喷洒 BR, *GhBES1/BZR1* 基因能够快速表达以响应干旱胁迫, 外源喷施 BR 有助于提高棉花的抗旱能力。

关键词: 棉花; *GhBES1/BZR1*; 干旱胁迫; 油菜素内酯(BR); 表达分析

中图分类号: Q786; Q789

文献标志码: A

Expression Characteristics of Transcription Factor *BES1/BZR1* of Cotton Seedling in Response to Brassinosteroid under Drought Stress

AN Wenkai, CHANG Dan, ZHANG Fuchun*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: Plant hormone brassinosteroid (BR) can improve the drought resistance of plant. This study explores the effects of spraying BR on the expression of transcription factor *BES1/BZR1* in cotton seedling under drought stress. It is helpful for elucidating the mechanism of BR improving the drought resistance of cotton. The *BES1/BZR1* gene was cloned by using PCR technique from the seedling of cotton ‘XLZ17’ (*Gossypium hirsutum*) and named as *GhBES1/BZR1* (GenBank accession number KP272000). Sequence analysis indicated that *GhBES1/BZR1* contains an open reading frame (ORF) of 960 bp, which encodes 319 amino acids included a conserved domain DUF822. The calculated molecular weight is 34.3 kD and the theoretical isoelectric point is 8.95. After 2.5% PEG-6000 treatment for 24 h, water, BR (brassinosteroids) and Z (BR inhibitor) were sprayed on the seedlings of cotton ‘XLZ17’, respectively. The effects of spraying BR on the expression of *GhBES1/BZR1* were analyzed by the real time quantitative PCR (qRT-PCR). The results showed that the expression levels of *GhBES1/BZR1* were greatly increased after BR spraying within 3 h, and then the expression levels of *GhBES1/BZR1* were significantly decreased after 6 and 12 h. The

收稿日期: 2015-01-30; 修改稿收到日期: 2015-04-22

基金项目: 国家自然科学基金-新疆联合基金重点项目 (U1303282)

作者简介: 安汶铠 (1990—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事生物化学分子生物学研究。E-mail: 873788221@qq.com

* 通信作者: 张富春, 博士, 教授, 主要从事分子生物学与基因工程研究。E-mail: zfcxju@xju.edu.cn

results demonstrated that spraying BR quickly up-regulated the expression of *GhBES1/BZR1* under drought stress, which might be contributed drought resistance of cotton.

Key words: *Gossypium hirsutum*; *GhBES1/BRI1*; drought stress; brassinosteroid (BR); expression analysis

棉花作为新疆的主要经济作物,干旱是制约新疆棉区棉花产量和品质的主要环境因素之一。油菜素内酯 (Brassinosteroid, BR) 作为一种影响植物生长发育和抗逆的植物内源激素,在提高植物抗盐、抗旱、耐高温以及调节植物衰老等生理功能方面发挥重要作用^[1-2]。研究表明 BR 能够广泛参与植物各种生理过程,调控植物生长发育以及对逆境条件下的生理响应^[3-6]。经过 BR 喷施处理后,植物叶片含水量增加,叶片水势提高,且植物的蒸腾作用明显降低,这样既保持了细胞膨压,又能够缓解干旱胁迫,改善植物细胞中的水分状况,提高植物在干旱胁迫下的生存能力。近年来,随着 BR 促进植物抗逆性研究的深入,BR 已经被广泛应用于农林业的生产中^[7-12]。

BZR1/BES1 是 BR 信号通路中一种重要的转录因子,与 BR 结合后使得 *BRI1* 的羧端磷酸化,调控 *BKI1* (*BRI1* kinase inhibitor1) 从质膜上解离下来,使 *BRI1* 与共受体 *BAK1* (*BRI1*-associated receptor kinase) 结合^[13-14],并形成异源二聚体,进而通过相互磷酸化完全激活 BR 信号通路^[15],异二聚体 *BRI1*-*BAK1* 可使得 *BSK* 激活,*BSK* 又能够活化 *BSU11* (*BRI 1* suppressor 1), *BSU1* 可使下游的 *BIN2* (Brassinosteroid-insensitive 2) 失活^[16],而 *BIN2* 则影响 *BZR1/BES1* 的磷酸化^[17]。Kim 等发现磷酸化后的 *BZR1/BES1* 失去了核输出以及与 DNA 结合的能力,并且可被蛋白酶降解,被激活的 *BSU1* 可以使 *BIN2* 的 Tyr 磷酸化位点去磷酸化从而抑制其活性,使得 *BZR1/BES1* 被蛋白磷酸 2A (PP2A) 去磷酸化,最终在细胞核内大量积累^[18]。核内聚集的 *BZR1/BES1* 能够与下游基因启动子上特定区域结合,激活转录,从而调节 BR 靶基因的表达,最终调节植物的生长、发育和抗逆性能^[19]。因此研究 BR 信号通路中基因 *BZR1/BES1* 的表达调控机理显得尤为重要。

本研究以新疆的主栽棉花品种‘新陆早 17 号’的幼苗为材料,根据亚洲棉‘石系亚 1 号’的转录组测序中转录因子 *BES1/BZR1* 基因的开放阅读框序列^[20],通过 PCR 克隆获 *BES1/BZR1* 转录因子基因,命名为 *GhBES1/BZR1* (GenBank 登录号 KP272000);在生物信息学分析的基础上,进一步探讨干旱胁迫下用油菜素内酯及油菜素内酯抑制剂 (Z) 处理棉花后, *Gh-*

BES1/BZR1 的表达变化规律,研究外源喷施植物激素 BR 对干旱胁迫下棉花 *GhBES1/BZR1* 表达的影响,揭示 BR 提高棉花抗旱能力的分子机制,为棉花生产中合理使用 BR 提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

棉花‘新陆早 17 号’种子由新疆农业科学院经济作物研究所玛纳斯实验站提供。挑选籽粒饱满大小一致的棉花种子,用 70% 乙醇消毒 1 min,蒸馏水冲洗 3~4 次,用 15% 过氧化氢浸种 5 h,再用蒸馏水冲洗 3~4 次,播种到固体 MS 培养基中,进行无菌培养,10 d 后将棉花幼苗转至 Hoagland 营养液^[21]中继续进行液体培养,每隔 5~7 d 换 1 次营养液,以 5~6 片真叶期的棉花幼苗为实验材料。

1.2 方法

1.2.1 实验材料的处理 待棉花幼苗生长至 5~6 片真叶期时,用 2.5% PEG-6000 干旱胁迫处理 24 h 后,分别用水、BR (0.5 mg/L) 和 Z (1.0 mg/L, BR 抑制剂) 喷施。具体处理组为: (1) Hoagland 营养液 + 蒸馏水为对照组 (CK); (2) 含 2.5% PEG-6000 的 Hoagland 营养液 + 蒸馏水 (PEG); (3) Hoagland 营养液 + 0.5 mg/L BR (BR); (4) 含 2.5% PEG-6000 的 Hoagland 营养液 + 0.5 mg/L BR (PEG + BR); (5) 含 2.5% PEG-6000 的 Hoagland 营养液 + 0.5 mg/L BR + 1.0 mg/L Z (PEG + BR + Z); (6) 含 2.5% PEG-6000 的 Hoagland 营养液 + 1.0 mg/L Z (PEG + Z)。每隔 3 h 进行 1 次喷洒处理,在 0、3、6、12、24 h 时采集不同处理的不同棉花幼苗底部倒数第 3~4 片的 10 个叶片,分别称取 0.1 g 棉花幼苗叶片,迅速冻于液氮中备用。

1.2.2 棉花幼苗总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取 0.1 g 棉花幼苗叶片在液氮中充分研磨,采用植物总 RNA 提取试剂盒 (北京百泰克公司) 提取棉花总 RNA,接着进行定量和电泳检测。采用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (大连 TaKaRa 公司) 试剂盒合成 cDNA。

1.2.3 *GhBES1/BZR1* 基因的扩增和鉴定 根据亚洲棉‘石系亚 1 号’转录因子 *BES1/BZR1* 的开放阅读框序列,设计扩增开放阅读框的上游引物 (5'-

GCGCTGCTTTGAGGAAGGTATTG-3') 和下游引物 (5'-CTGACAGTGTCTTGCTTGATGTGATGCTC-3'), 以棉花幼苗叶片的 cDNA 为模板, 使用 ExTaq 酶 PCR 扩增目的基因, 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的基因片段, 与 pMD18-T 载体连接, 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。挑选菌液进行 PCR 及质粒酶切鉴定的阳性克隆, 送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.4 GhBES1/BZR1 蛋白生物信息学分析 利用 ExPASy ProtParam (http://expasy.org/tools/pi_tool.html) 分析 GhBES1/BZR1 蛋白的理化性质及疏水性; 用 NCBI CDD 数据库分析蛋白质的保守结构域, 用 SignalP4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 软件预测蛋白质的信号肽; Cell-PLoc 2.0 PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) 预测蛋白质的亚细胞定位; GOR4 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl) 软件预测蛋白质二级结构; NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) 分析蛋白质的磷酸化位点; NPS Prosite Scan (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/pattern_prosite.pl) 分析蛋白活性位点; 用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树^[22-23]。

1.2.5 不同处理 GhBES1/BZR1 基因的表达 根据 *GhBES1/BZR1* 的 cDNA 序列设计上游引物 (5'-TGGGATGAAATGAATGCTGGGC-3') 和下游引物 (5'-AGTGTAAGTTCGAGATCATCAGCTGC-3'), 以 18S 基因作为内参基因, 设计上游引物 (5'-CAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTT-3') 和下游引物 (5'-CAAGGAATCGAAACGAAAGAAAGG-3')。以处理组棉花幼苗叶片的 cDNA 为模板, 取 1.0 μ L cDNA, qRT-PCR 参照带有 ROX 的 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (美国 Invitrogen 公司) 试剂盒说明书进行。RT-PCR 反应参数为: 94 °C 预变性 15 s; 94 °C 变性 30 s; 59 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 45 s; 40 个循环。采用 ABI PRISM 7500 实时定量 PCR 仪进行检测, 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行分析^[24]。

2 结果与分析

2.1 GhBES1/BZR1 基因的克隆和鉴定

以棉花‘新陆早 17 号’幼苗叶片的 cDNA 为模板, 以根据 *BES1/BZR1* 基因开放阅读框序列设计

的特异性引物, 通过 PCR 进行 *GhBES1/BZR1* 开放阅读框的扩增。结果表明 PCR 扩增出与预测长度一致的条带 (图 1), 测序结果表明开放阅读框为 960 bp, 编码 319 个氨基酸, 提交 NCBI 基因库 (GenBank 登录号 KP272000), 所获得的 *GhBES1/BZR1* 基因为正确的目的基因。

2.2 GhBES1/BZR1 蛋白的理化特性和结构分析

通过在线 EXPASY 的 ProtParam 软件对 *BES1/BZR1* 基因编码蛋白的理化性质进行分析表明, *GhBES1/BZR1* 蛋白的理论分子量为 34.3 kD, 理论等电点为 8.95。利用在线 NCBI 的保守结构域数据库 (conserved domain database, CDD) 对 *GhBES1/BZR1* 蛋白的保守结构域进行预测, 结果说明 *GhBES1/BZR1* 蛋白含有一个 DUF822 保守结构域, 而 DUF822 为基因未知功能的植物蛋白, 此家族由未知功能的几个植物蛋白的 N 末端区域组成。利用 SignalP4.0 Server 软件对 *GhBES1/BZR1* 蛋白进行信号肽的预测。结果说明 *GhBES1/BZR1* 蛋白的 N 端不存在剪切位点, 表明其不包含信号肽, 推测 *GhBES1/BZR1* 蛋白为非分泌蛋白。利用在线 EXPASY 的 ProtParam 软件对 *GhBES1/BZR1* 蛋白的疏水性/亲水性进行预测。推测 *GhBES1/BZR1* 蛋白是一种可溶性蛋白。利用在线软件 GOR4 对 *GhBES1/BZR1* 蛋白的二级结构进行预测。结果表明, *GhBES1/BZR1* 蛋白主要由 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链构成 (表 1)。其中无规则卷曲结构最多, 占据整条链的 62.07%。 α -螺旋占了 24.76%, 其余的全为延伸链。

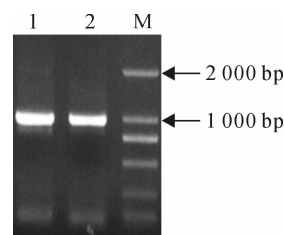


图 1 *GhBES1/BZR1* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *GhBES1/BZR1* gene

M, DL2000; 1, 2, *GhBES1/BZR1*

表 1 *GhBES1/BZR1* 蛋白的二级结构预测

Table 1 *GhBES1/BZR1* protein of secondary structure prediction

二级结构类型 Secondary structure	氨基酸残基数目 Amino acid residue	百分比 Percentage/%
α -螺旋 Alpha helix	79	24.76
无规则卷曲 Random coil	198	62.07
延伸链 Extended strand	42	13.17

2.3 GhBES1/BZR1 蛋白质磷酸化位点及活性位点的分析

磷酸化是生物体内的一种重要调节方式,主要在细胞信号转导和蛋白调控过程中发挥作用^[25]。利用 NPS(network protein sequence analysis)的 Prosite Scan 对 GhBES1/BZR1 蛋白进行活性位点分析。如表 2 所示,GhBES1/BZR1 有 3 类磷酸化位点和 1 类 N-糖基化位点、1 类酰胺化位点和 1 类豆蔻酰化位点。

2.4 GhBES1/BZR1 蛋白的系统进化树

通过 NCBI 数据库检索 GhBES1/BZR1 同源蛋白序列,使用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。其结果表明 GhBES1/BZR1 蛋白和可可聚类在一起(图 2),Blast 比对编码棉花和可可这两种植物同源蛋白的序列相似度达到 99%。

2.5 干旱胁迫下不同处理 GhBES1/BZR1 基因的表达分析

采用 qRT-PCR 方法,以 18S 作为内参基因,分别检测不同处理和不同时间棉花幼苗叶片 Gh-

BES1/BZR1 的表达变化(图 3)。

实验结果表明,处理 3 h 时,PEG-6000 处理相对于水处理的 GhBES1/BZR1 基因表达量极显著地上调了 3.9 倍($P<0.01$),PEG-6000 处理下喷洒 BR(PEG+BR)相对于其他处理基因的表达量最高,而 PEG+BR 处理下再喷洒 BR 抑制剂(PEG+BR+Z)相对于 PEG+BR 处理有显著性的降低($P<0.05$)。说明 PEG 处理下喷施 BR 能够显著提高 GhBES1/BZR1 的表达,而喷施 BR 抑制剂后 GhBES1/BZR1 的表达显著降低。处理 6 h 时,PEG+BR 处理的基因表达量相对于其他处理是最高,除 PEG 处理和 PEG+BR 处理外,其它处理下该基因的表达量都有所上升,PEG+BR 处理的基因表达量有所下降,但相互之间都无显著性差异($P>0.05$)。说明在 6 h 直接喷施 BR 和在 PEG-6000 处理下喷施 BR 均能够显著提高 GhBES1/BZR1,而喷施 BR 抑制剂后 GhBES1/BZR1 的表达也显著降低。处理 12 h 时,各处理的 GhBES1/BZR1 表达量相对于 6 h 处理都有所下降,而 PEG+BR 处理的

表 2 GhBES1/BZR1 在 NPS 中活性位点预测分析
Table 2 The prediction analysis of GhBES1/BZR1 active site in NPS

活性位点名称 Active site	序列号 Prosite access No.	膜体类型 Motif model	氨基酸序列 Amino acid sequence	概率值 Randomized probability
N-糖基化位点 N-glycosylation site	PS00001	N-{P}-[ST]-{P}	131-134 NLSS 287-290 NMTG	5.138e-03
cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点 cAMP-and GMP-dependent protein kinase phosphorylation site	PS00004	[RK](2)-x-[ST]	188-191 KRFS	1.572e-03
蛋白激酶 C 磷酸化位点 Protein kinase C phosphorylation site	PS00005	[ST]-x-[RK]	9-11 TWK,69-71 TYR 140-142 SSK,166-168 TSR 169-171 TPR,186-188 TGK	1.423e-02
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 Casein kinase II phosphorylation site	PS00006	[ST]-x(2)-[DE]	9-12 TWKE,62-65 TVEE 172-175 TRSD,174-177 SDWD 213-216 SRLE,84-89 GGSASA	1.482e-02
N-豆蔻酰化位点 N-myristoylation site	PS00008	G-{EDRKHPFYW}-x (2)-[STAGCN]-{P}	85-90 GSASAS,118-123GNADAN 135-140 GSSSAS,151-156 GGSISA 253-258 QQSGTC,265-270 GVDQTS 285-290GSNMTG,314-319 GNSKTR	1.397e-02
酰胺化位点 Amidation site	PS00009	x-G-[RK]-[RK]	186-189 TGKR	8.636e-04

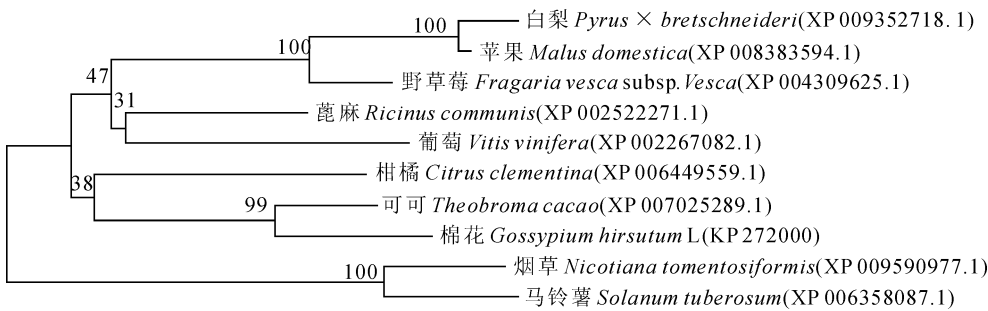


图 2 不同植物基于 GhBES1/BZR1 氨基酸序列的系统进化树

分支点的数字表示从 1 000 次重复计算得到的 Bootstrap 百分比值

Fig. 2 Phylogenetic tree of different plants based on amino acid sequence of GhBES1/BZR1
Numbers represent the Bootstrap percent values calculated from 1 000 replicates

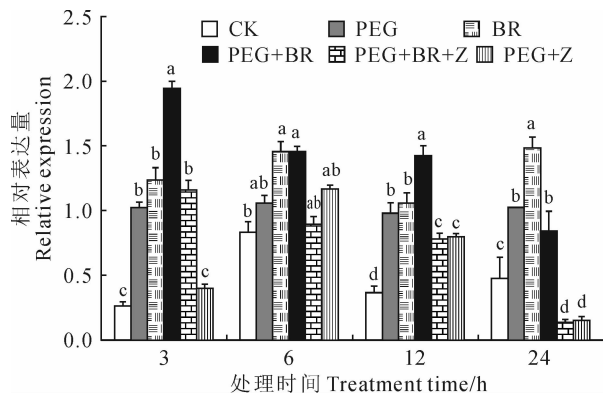


图3 干旱胁迫下不同处理‘新陆早17号’棉花幼苗叶片中 *GhBES1/BZR1* 的相对表达

不同小写字母表示同一时间不同处理下差异显著 ($P < 0.05$)

Fig. 3 Relative expression of *GhBES1/BZR1*

in the seedling leaves of cotton ‘XLZ17’ for the different treatments under drought stress

Different letters represent significant differences among treatments under the same time ($P < 0.05$)

基因表达量依然最高,并显著性地高于 PEG-6000 处理和 PEG+BR+Z 处理 ($P < 0.05$),分别是其 1.3 和 1.6 倍。处理 24 h 时,PEG+BR 处理的基因表达量降低,直接喷施 BR 处理的基因表达量达到最高。而 PEG+Z 和 PEG+BR+Z 处理的基因表达量只有 BR 处理组的 1/7 左右。说明随着 PEG 处理时间的延长,在 PEG 处理下喷施 BR *GhBES1/BZR1* 的表达明显下降,而喷施 BR 抑制剂后 *GhBES1/BZR1* 的表达更加显著降低,已经低于对照组,说明随着处理时间的延长,BR 抑制剂极大地降低了 *GhBES1/BZR1* 的表达。

3 讨论

BR 作为一种重要的植物内源激素,在植物的生长发育和抵御干旱方面发挥作用。*BES1/BZR1* 作为 BR 信号通路中的一种重要的转录因子,其编码的 *BES1/BZR1* 蛋白是植物防御的一种内源信号分子,当植物受到各种胁迫时,可以诱导防御基因的表达去抵御外界的胁迫,并直接影响植物的生长发育同时调节植物的生理代谢过程^[26-27]。

通过对棉花‘新陆早17号’*GhBES1/BZR1* 基因序列的生物信息学分析表明,该基因编码蛋白质的氨基酸序列与可可编码的 *BES1/BZR1* 氨基酸序列的相似性达 99%,且与可可的 *BES1/BZR1* 聚在进化树的同一分支上,这表明其进化上与可可具有趋同性。利用 NPS 的 Prosite Scan 对 *BES1/BZR1* 蛋白进行活性位点分析结果表明,*GhBES1/BZR1* 有 3 类磷酸化,这可能是与 *GhBES1/BZR1* 蛋白的

磷酸化参与调解干旱胁迫的信号通路有关。蛋白质的疏水性通常依据蛋白的 GRAVY 值预测,而 GRAVY 值通常分布在 -2~2 之间,正值表明蛋白为疏水蛋白,负值表明为亲水蛋白。预测显示 *GhBES1/BZR1* 蛋白的 GRAVY 值为 -4.211,说明 *GhBES1/BZR1* 蛋白是一种可溶性蛋白,结果与 *BES1/BZR1* 蛋白不与膜结合在细胞核内与特定启动子发挥作用的结果相一致^[13]。表明该蛋白可能是一种能够通过磷酸化和去磷酸化在 BR 信号通路中发挥作用的可溶性蛋白。

BR 在作物上的应用主要是浸种或外源喷等,有关 BR 信号转导途径中的重要组分如 *GhBES1/BZR1* 基因表达变化对作物抗旱性的影响鲜见报道。根据河南棉花所对亚洲棉进行干旱胁迫下的转录组分析发现,BR 信号通路中 *BES*、*BKI*、*BRI* 等基因的表达上调,其中 PEG 模拟干旱胁迫 3 h 后,亚洲棉‘石系亚1号’叶中 *GhBES1/BZR1* 表达量上调了 2.7 倍^[20]。本研究结果中,PEG-6000 模拟干旱胁迫,PEG+BR 处理 3 h 时 *GhBES1/BZR1* 基因的表达量分别是 PEG 和 PEG+BR+Z 处理的 1.9 倍和 1.7 倍。BR 处理 6 和 12 h 时,*GhBES1/BZR1* 表达量相对于 3 h 时都有明显下降,但喷施 BR 表达量明显高于没有喷施 BR 处理组,而 BR+Z 处理 *GhBES1/BZR1* 表达量降低,这说明喷施 BR 能够诱导 *GhBES1/BZR1* 表达上调,而 BR 抑制剂 Z 能够干涉 BR 的作用致使 *GhBES1/BZR1* 表达下降。喷施 BR 处理下 3 h 时,*GhBES1/BZR1* 表达量快速升高,表明在干旱胁迫下喷施 BR 能够让 *GhBES1/BZR1* 表达快速升高以响应干旱胁迫。而喷施 BR 6、12 和 24 h 相对于 3 h 处理 *GhBES1/BZR1* 表达有所下降,则表明在干旱胁迫下喷施 BR 对于 *GhBES1/BZR1* 表达的影响在时间上没有持久性,伴随着时间的延长诱导作用逐渐减弱,与植物激素作用快的特性相一致。在没有干旱胁迫而单独喷施 BR 处理 24 h 时,*GhBES1/BZR1* 表达量远高于干旱胁迫下喷施 BR 处理。说明干旱胁迫下喷施 BR 可快速诱导 *GhBES1/BZR1* 表达,但在没有干旱胁迫下喷施 BR 诱导 *GhBES1/BZR1* 表达明显存在一定的滞后性,证明干旱胁迫下喷施 BR 是 *GhBES1/BZR1* 快速表达诱导因素。

总之,从棉花‘新陆早17号’幼苗中克隆获得的转录因子 *GhBES1/BZR1*,在 BR 信号通路的基因调控中发挥重要作用,在干旱胁迫下外源喷施 BR 及 BR 抑制剂 Z 对棉花 *GhBES1/BZR1* 基因表达有明显的影 响。表明 BR 是促进干旱胁迫下 *GhBES1/BZR1* 表达的主要诱因,干旱胁迫和非干旱

胁迫喷施 BR 能够直接影响 *GhBES1/BZR1* 表达水平升高的速率。进一步探讨外源喷施 BR 对棉花 *GhBES1/BZR1* 表达的影响,有助于阐明 BR 调控棉花抗旱性的分子机理。

参考文献:

- [1] GUO H Q(郭慧琴), REN W B(任卫波), LI P(李平), *et al.* Effect of epi-brassinosteroid and gibberellin on seed germination and seedling growth of *Leymus chinensis*[J]. *Pratacultural Science*(草业科学), 2014, **31**(6): 1 097—1 103(in Chinese).
- [2] BAJGUZ A, HAYAT S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, **47**(1): 1—8.
- [3] WANG H H(王红红), LI K R(李凯荣), HOU H W(侯华伟), *et al.* Research progress of plant stress-resistance promoting related to brassinolides[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*(干旱地区农业研究), 2005, **23**(3): 213—219(in Chinese).
- [4] LI K R(李凯荣), FAN J SH(樊金栓). Research progress brassinosteroid lactones-the new plant hormone in forestry[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*(干旱地区农业研究), 1998, **16**(4): 104—109(in Chinese).
- [5] SAIRAM R K. Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture-stress conditions of two wheat varieties[J]. *Plant Growth Regulation*, 1994, **14**(2): 173—181.
- [6] LI K R, WANG H H, HAN G, *et al.* Effects of brassinolide on the survival, growth and drought resistance of *Robinia pseudoacacia* seedlings under water stress[J]. *New Forests*, 2007, **35**(3): 255—266.
- [7] ZHANG M C, ZHAI Z X, TIAN X L, *et al.* Brassinolide alleviated the adverse effect of water deficits on photosynthesis and the antioxidant of soybean(*Glycine max* L.)[J]. *Plant Growth Regulation*, 2008, **56**(3): 257—264.
- [8] FAROOQ M, WAHID A, BASRA S M A, *et al.* Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2009, **195**(4): 262—269.
- [9] XU F F(徐芬芬), XU W H(徐卫红). Induction of resistance to downy mildew in *Brassica campestris* ssp. *chinensis* L. by brassinolide[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*(河南农业科学), 2013, **49**(5): 658—665(in Chinese).
- [10] WU X X(吴雪霞), ZHA D SH(查丁石), *et al.* Effects of exogenous 24-epibrassinolide on plant growth and antioxidant system in eggplant seedlings under high temperature stress[J]. *Plant Physiology Journal*(植物生理学报), 2013, **49**(9): 929—934(in Chinese).
- [11] 黄鲤娴. BR 相关基因转化水稻及转基因植株的耐盐性分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [12] QIAN W J(钱文静), LIU J(刘静), SONG D(宋丹), *et al.* Research progress on brassinosteroid related genes and their functions in rice[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*(河南农业科学), 2013, **42**(9): 1—5(in Chinese).
- [13] XIONG J L(熊俊兰), KONG H Y(孔海燕), SONG D(宋丹), *et al.* Effects of brassinosteroids on plant drought adaptability and their regulatory mechanism[J]. *Journal of Lanzhou University*(兰州大学学报), 2013, **49**(5): 658—666(in Chinese).
- [14] WANG X L, CHORY J. Brassinosteroids regulate dissociation of BIK1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane[J]. *Science*, 2006, **313**(5 790): 1 118—1 122.
- [15] NAM K H, LI J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling[J]. *Cell*, 2002, **110**(2): 203—212.
- [16] TANG W Q, KIM T W, OSES P J A, *et al.* BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2008, **321**(5 888): 557—560.
- [17] KIM T W, GUAN S H, SUN Y, *et al.* Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors[J]. *Nature Cell Biology*, 2009, **11**(10): 1 254—1 260.
- [18] TANG W Q, YUAN M, WANG R J, *et al.* PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1[J]. *Nature Cell Biology*, 2011, **13**(2): 124—131.
- [19] HE J X, GENDRON J M, SUN Y, *et al.* BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses[J]. *Science*, 2005, **307**(5 715): 1 634—1 638.
- [20] ZHANG X, YAO D, WANG Q, XU W, WEI Q, *et al.* mRNA-seq analysis of the *Gossypium arboreum* transcriptome reveals tissue selective signaling in response to water stress during seedling stage[J]. *PLoS ONE*, 2013, **8**(1): e54762.
- [21] MUHEREPIYA A(木合热皮亚·艾尔肯), ZHANG F CH(张富春). Physiological and biochemical analysis for the salt tolerance of transgenic cotton transformed by the vacuolar H⁺-Pyrophosphatase gene(VP1) from *Halostachys caspicas*[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*(新疆农业科学), 2013, **50**(6): 1 016—1 023.
- [22] MA Y B(马燕斌), WU X(吴霞), WANG X(王霞), *et al.* Specific expression of *BnDGAT1* gene in *Brassica napus*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2013, **33**(10): 1 958—1 963(in Chinese).
- [23] CUI B(崔波), JIANG S H(蒋素华), LIU J(刘佳), *et al.* Cloning and expression analysis of AP1-like gene from *Sedirea japonica*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2013, **33**(9): 1 739—1 744(in Chinese).
- [24] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402—408.
- [25] CHANG D(常丹), ZHANG X(张霞), ZHANG F CH(张富春) *et al.* Cloning and expression analysis of *HcPEAMT* gene from *Halostachys caspica*[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报), 2014, **34**(8): 1 522—1 528(in Chinese).
- [26] KRISHNA P. Brassinosteroid-mediated stress responses[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, **22**(4): 289—297.
- [27] BAJGUZ A. Effect of brassinosteroids on nucleic acid and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2000, **38**(3): 209—215.

(编辑: 宋亚珍)