

寒地冬小麦膨胀素基因 *TaEXPB12* 同源基因的克隆及功能分析

冯珊珊,徐永清,赵梓颐,李凤兰,胡宝忠

(东北农业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150038)

摘要:为了进一步研究冬小麦的根系建成,并为今后高寒地区的冬小麦育种奠定基础。以东农冬麦2号为材料,利用PCR技术得到*TaEXPB12-A/B/D*3个同源基因的CDS全长。其核酸序列长度均为846 bp,编码281个氨基酸,同源性达到98.46%,分别定位在2AL,2BL,2DL染色体上,蛋白均具备膨胀素基因序列特有的结构域DPBB_1,分别位于142-810 bp,142-834 bp,142-834 bp。启动子分析结果显示,这3段序列中均含有多个与根特异表达相关的作用元件,以及多个激素响应元件和非生物胁迫响应元件。qRT-PCR分析发现*TaEXPB12-A/B/D*基因在根中特异性表达,低温会抑制*TaEXPB12-A/B/D*3个同源基因的表达,而干旱、脱落酸、茉莉酸甲酯及水杨酸等处理会促进它们的表达。洋葱表皮亚细胞定位结果显示,3个基因均定位于细胞壁。*TaEXPB12-A/B/D*蛋白质在冬小麦根的细胞壁中特异性分布,并参与冬小麦抵御外界多种非生物胁迫的过程,在3个基因响应外界胁迫的过程中,*TaEXPB12-A*占据表达优势。结果说明,*TaEXPB12-A/B/D*在冬小麦根系建成和抵御多种非生物胁迫过程中具有重要作用。

关键词:寒地冬小麦;膨胀素;*TaEXPB12-A/B/D*;同源基因;表达特性分析

中图分类号:Q78;S512.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2020)06-0074-07

doi:10.7668/hbxb.20191210



Cloning and Function Verification of *TaEXPB12* Homologous Genes in Frigid Region Winter Wheat

FENG Shanshan, XU Yongqing, ZHAO Ziyi, LI Fenglan, HU Baozhong

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150038, China)

Abstract: In order to further study the establishment of the root system of winter wheat, and lay the foundation for winter wheat breeding in alpine regions in the future. Dongnongdongmai 2 was used as the material, and the full-length CDS of three homologous genes of *TaEXPB12-A/B/D* was obtained by PCR technology. The nucleic acid sequence length was 846 bp, encoding 281 amino acids, homology reached 98.46%, the three genes located on the 2AL, 2BL, 2DL chromosomes respectively, their protein had the unique domain DPBB_1 of the expand in gene sequence, locating at 142-810 bp, 142-834 bp, 142-834 bp, respectively. Promoter analysis results showed that all three sequences contained multiple action elements related to root-specific expression, as well as multiple hormone response elements and abiotic stress response elements. qRT-PCR analysis found that *TaEXPB12-A/B/D* genes were specifically expressed in roots. Low temperature would inhibit the expression of three homologous genes of *TaEXPB12-A/B/D*, while drought, abscisic acid, methyl jasmonate and salicylic acid would promote their expression. Onion epidermal subcellular localization results showed that all three genes were localized on the cell wall. *TaEXPB12-A/B/D* protein was specifically distributed in the cell wall of winter wheat roots, and participated in the process of winter wheat resisting a variety of abiotic stresses. In the process of three genes responding to external stress, *TaEXPB12-A* had an expression advantage. These results indicated that *TaEXPB12-A/B/D* played an important role in the establishment of winter wheat roots and resistance to various abiotic stresses.

收稿日期:2020-08-25

基金项目:国家基础科学人才培养基金子课题资助项目(J1210069);国际科技合作资助项目(2013DFR30270);伊春市科技计划推广与产业化项目(T2016-2);哈尔滨市应用科技研究与开发项目(2015RAQXJ021)

作者简介:冯珊珊(1993-),女,黑龙江哈尔滨人,硕士,主要从事植物分子生物学研究。

通讯作者:胡宝忠(1962-),男,山东菏泽人,教授,硕士,博士生导师,主要从事植物分子生物学研究。

Key words: Winter wheat in cold region; Expansin; *TaEXPB12-A/B/D*; Homologous gene; Expression characteristic analysis

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 作为重要的谷类作物, 其产量对人类的生活具有重大影响。由于严峻的低温环境, 冬小麦在东北地区的种植受到严重制约。东农冬麦 2 号是能在这种严寒条件下生存的冬小麦品种, 发达的根系是其能够安全越冬的决定性因素之一, 因此, 研究其根系生长发育机制对扩大冬小麦在寒地的种植面积具有重要的意义。

膨胀素 (Expansin) 是一类具有非水解活性的扩展蛋白^[1], 在植物的整个生长发育过程中均具有重要作用。膨胀素在植物中包括 EXPA、EXPB、EXLA 和 EXLB 4 个亚家族^[2]。EXPA 和 EXPB 家族的许多基因都已被证实对植物根系的生长发育具有重要影响。Gahoonia 等^[3] 研究发现 *HvEXPB1* 在大麦根中特异性表达, 并且直接参与大麦根毛的根原基形成与根毛的伸长。He 等^[4] 发现 *HvEXPB7* 基因对大麦根毛的生长具有促进作用。Guo 等^[5] 发现在大豆中, *GmEXPB2* 基因与根毛的伸长有关。Cho 等^[6] 发现 *OsEXPB3* 基因和 *OsEXPB2* 基因对水稻根系的发育具有重要作用。Zou 等^[7] 发现 *OsEXPB2* 基因的表达对水稻根毛的形成及发育具有重要的调控作用, 而且当 *OsEXPB2* 基因沉默时, 会影响侧根的生成。Han 等^[8] 发现在氧化胁迫下, 过表达 *TaEXPB23* 基因的转基因拟南芥表现出比野生型有更高的鲜质量和更长的初生根。Li 等^[9] 也证明过表达 *TaEXPB23* 基因可促进根系生长并使根系鲜质量增加。Lü 等^[10] 发现玫瑰膨胀素基因 *RhEXPA4* 的过表达会提高转基因拟南芥植株侧根的数量。Lee 等^[11] 发现敲除拟南芥中的 *AtEXPA17* 基因后, 植株侧根的形成会减少, 而拟南芥过表达该基因会促进植株侧根的形成。拟南芥 *AtEXPA4*、*AtEXPA7*、*AtEXPA9*、*AtEXPA14*、*AtEXPA17*、*AtEXPA18* 和水稻 *OsEXPA1*、*OsEXPA2*、*OsEXPA3*、*OsEXPA4*、*OsEXPA8*、*OsEXPA17* 基因也都被证实与根系的生长密切相关^[8,12-14]。除此之外, 上述的膨胀素基因也都被证实参与植物抵御外界非生物胁迫的过程。

现在膨胀素对冬小麦根系生长发育的调控机制尚未明确。本研究以东农冬麦 2 号为材料, 得到 *TaEXPB12-A/B/D* 3 个同源基因。通过生物信息学分析了解其基本的生物学功能; 通过 qRT-PCR 分析, 研究了这 3 个基因在小麦不同部位及在低温、干旱和激素胁迫下的表达特性及表达差异, 以期为进一步研究膨胀素在根系形态建成中的作用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为冬小麦东农冬麦 2 号, 由东北农业大学植物学研究室提供。RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、DNA 提取试剂盒均购自北京全式金生物公司; 引物在长春库美生物公司合成; 测序在哈尔滨擎科生物公司完成; 试验所需大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101、ABA、茉莉酸甲酯、水杨酸、聚乙二醇、LB 肉汤、LB 营养琼脂、氯仿、甘油等生化试剂均购自凯誉生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因序列克隆 根据本研究室的转录组测序结果, 利用引物设计软件 Primer Premire 5.0 分析, 设计克隆 *TaEXPB12-A/B/D* 基因的特异引物。以两叶一心期小麦幼苗根为材料, 参照说明书使用 TransZol Up PlusRNA Kit 试剂盒, 提取 RNA。再以其为模板, 获得 cDNA, 按照说明书使用 TransScript[®] One-step gDNA Removal and cDNA Synthesis Super-Mix 试剂盒进行反转录试验。根据本研究室转录组测序结果, 以 cDNA 为模板, *TaEXPB12-A* 利用上游引物 F: 5'-TAGCCCCTTGGTTTTCTGTC-3', 下游引物 R: 5'-GTTTCCTAGTGATGTCTTCTTCTTG-3'; *TaEXPB12-B* 利用上游引物 F: 5'-GCCCATTGGCTTTCTGTCT-3', 下游引物 R: 5'-CCCTAGCTGGCGTAGTTC A-3'; *TaEXPB12-D* 利用上游引物 F: 5'-GCCCATTC CCTTCTGTCT-3', 下游引物 R: 5'-CCCTAGCTGGC GTAGTTC A-3' 进行 PCR 扩增, 退火温度均为 58.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 序列生物信息学分析 同源性分析: DNAMAN 软件; 染色体定位分析: BioEdit 软件; 保守结构域分析: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>); 蛋白质信号肽预测分析: SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); 蛋白质的疏水性及亲水性预测: ExPASy-ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>); 蛋白三级结构预测: SWISS-MODEL (<https://swiss-model.expasy.org/interactive>)。

1.2.3 *TaEXPB12-A/B/D* 基因启动子元件分析 利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 在线网站对 *TaEXPB12-A/B/D* 3 个基因序列的启动子进行功能元件

预测分析。

1.2.4 qRT-PCR 分析 挑选颗粒饱满的种子,用 75% 酒精消毒 12 min, 无菌水冲洗 4~5 遍, 黑暗条件下浸种 12 h, 25 °C 培养箱黑暗催芽(保持种子湿润即可)12 h。然后将种子平铺于含有双层滤纸的培养皿中, 培养室培养至植株长到两叶一心期时, 随机选取 3 株长势一致的幼苗, 以水培为对照组, 在 4 °C、20% PEG、30% PEG、2 μmol/L 脱落酸(ABA)、10 μmol/L 茉莉酸甲酯(MeJA)以及 10 μmol/L 水杨酸(SA)分别处理 2, 6, 12, 24, 48 h, 分别取单株的根部, 随即液氮速冻, 然后置于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。以上述处理的冬小麦根 cDNA 为模板, 采用 TransStart® Top Green qPCR SuperMix 试剂盒(AQ131, 北京金全生物技术有限公司)进行 Real-time PCR 扩增, 扩增体系为 20 μL。以分蘖期冬小麦的根、茎、叶、分蘖节的 cDNA 为模板, 用同一试剂盒进行组织表达模式分析。设计的引物具体如下:

荧光引物: 上游 (*TaEXPB12-A-F*): 5'-GCTCTAG AATGGCTAGTCCAGGC-3', 下游 (*TaEXPB12-A-R*): 5'-CGGGATCCCTAACTGGCGTA-3'; 上游 (*TaEXPB12-B-F*): 5'-GCTCTAGAATGGCTAGTCCAGGC-3', 下游 (*TaEXPB12-B-R*): 5'-CGGGATCCCTAGCTGGCGTA-3'; 上游 (*TaEXPB12-D-R*): 5'-GCTCTAGAATGGCTAG TCCTGGC-3', 下游 (*TaEXPB12-D-R*): 5'-CGGGATC CCTAGCTGGCGTA-3'。

内参引物: 上游 (*β-actin-F*): 5'-TCCAATCTAT GAGGGATACACGC-3', 下游 (*β-actin-R*): 5'-TCTT CATTAGATTATCCGTGAGGTC-3'。

1.2.5 *TaEXPB12-A*、*TaEXPB12-B*、*TaEXPB12-D* 蛋白亚细胞定位 表达载体 YFP 上含有 *Pml* I 酶切位点, 而 *TaEXPB12-A/B/D* 基因序列上不含 *Pml* I 酶切位点, 因此, 在目的基因 *TaEXPB12-A/B/D* 的起始密码子前和终止密码子后加入 *Pml* I 酶切位点序列, 并且加上保护碱基 TTT, 利用 Primer Premire 5.0 软件设计酶切引物(表 1)。以已得到的 *TaEXPB12-A/B/D* 序列为模板, 进行 PCR 扩增, 退火温度都为 58 °C。用 *Pml* I 酶对 PCR 产物和载体 YFP 进行单酶切, 使用 20 μL 单酶切体系, 37 °C 水浴锅中 2 h, 添加 1 μL 小牛肠碱性磷酸酶(CIP), 再继续 37 °C 水浴 1 h, 电泳检测, 并对切开的质粒进行胶回收。利用 *T*₄ 连接酶, 将上述胶回收的 *TaEXPB12-A/B/D* 目的片段和 YFP 载体片段进行连接, 使用 20 μL 连接体系, 轻弹混匀, 14.5 °C 恒温箱中过夜。将连接产物转化到大肠杆菌中, 菌液 PCR 鉴定和测序后, 将重组质粒转入农杆菌 GV3101 中, 然后瞬吋

侵染洋葱表皮。为了区分融合蛋白在细胞膜和细胞壁的定位, 将洋葱表皮细胞用 30% 蔗糖溶液预处理 20 min, 使其质壁分离, 随后正常观察。

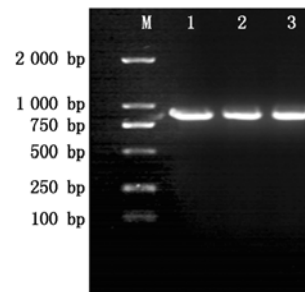
表 1 酶切位点添加的引物序列

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>TaEXPB12-A-F</i>	TTTCACGTGATGTACCCATACGAT
<i>TaEXPB12-A-R</i>	AAACACGTGACTGGCGTAGTTC
<i>TaEXPB12-B-F</i>	TTTCACGTGATGGCTAGTCCAG
<i>TaEXPB12-B-R</i>	AAACACGTGCTGGCGTAGTCA
<i>TaEXPB12-D-F</i>	TTTCACGTGATGGCTAGTCTCTGG
<i>TaEXPB12-D-R</i>	AAACACGTGCTGGCGTAGTCA

2 结果与分析

2.1 基因序列克隆与同源性分析

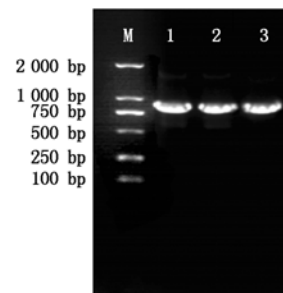
目的基因扩增获得 846 bp 左右的目的条带, 与预期片段大小相似(图 1)。胶回收, 连接 T3 载体, 转化大肠杆菌, 并进行菌液 PCR 鉴定(图 2)。测序结果与本研究室的转录组测序结果进行对比, 成功得到 *TaEXPB12-A/B/D* 基因。基因序列提交 NCBI 注册, GenBank 登录号分别为 MT232926、MT232927、MT232928。



M. 2K Marker; 1-3. 菌落 PCR 产物。
M. 2K Marker; 1-3. The PCR production of bacteria.

图 1 *TaEXPB12* 基因的菌落 PCR 扩增结果

Fig. 1 The bacteria PCR product results of *TaEXPB12*



M. 2K Marker; 1-3. 菌液 PCR 产物。
M. 2K Marker; 1-3. The PCR production of bacterial liquid.

图 2 *TaEXPB12* 基因的菌液 PCR 鉴定结果

Fig. 2 The bacterial liquid PCR identification results of *TaEXPB12*

2.2 序列生物信息学分析

通过 DNAMAN 软件进行同源性分析,3 条序列的同源性高达 98.46% (图 3)。通过 BioEdit 软件对测序获得的 3 条序列进行染色体定位分析,结果显示序列 1、序列 2、序列 3 分别定位在 2AL、2BL、2DL 染色体上,编码 281 个氨基酸,其长度均为 846 bp,依次命名为: *TaEXPB12-A*、*TaEXPB12-B*、*TaEXPB12-D*。除此之外,通过对比发现 *TaEXPB12* 基因序列与大麦中的 *HuEXPB1* 基因相似性达 95%。

TaEXPB12-A/B/D 蛋白质信号肽预测分析显示,该蛋白质的切割点位于氨基酸 25 - 26 位, *TaEXPB12-A/B/D* 基因信号肽序列完全相同。除此

之外,生物信息学分析结果显示, *TaEXPB12-A/B/D* 蛋白均具备膨胀素基因序列特有的结构域 DPBB₁, 分别位于 142 - 810 bp, 142 - 834 bp, 142 - 834 bp。*TaEXPB12-A* 蛋白的相对分子质量为 29.498 31 ku, 等电点为 9.17、分子式为 $C_{1292}H_{1979}N_{369}O_{388}S_{19}$; *TaEXPB12-B* 蛋白的相对分子质量为 29.494 34 ku, 等电点为 9.16、分子式为 $C_{1296}H_{1987}N_{367}O_{388}S_{18}$; *TaEXPB12-D* 蛋白的相对分子质量为 29.496 37 ku, 等电点为 9.16、分子式为 $C_{1295}H_{1985}N_{367}O_{387}S_{19}$, 3 种蛋白质均为亲水性蛋白。但是蛋白三级结构预测分析显示,3 种蛋白具有 3 处明显差异(图 4),因此,预测这 3 种蛋白可能功能略有差异。

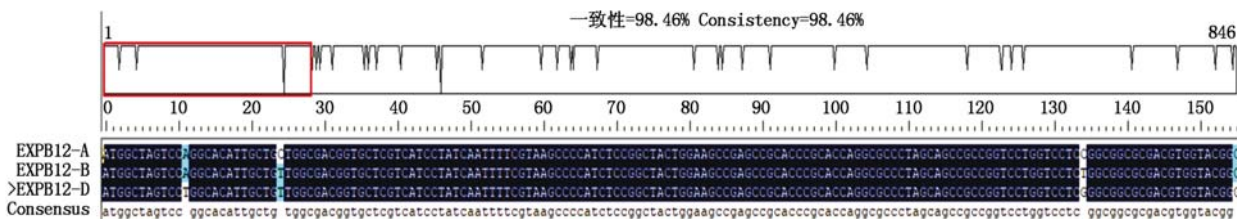


图 3 *TaEXPB12-A/B/D* 的氨基酸同源比对

Fig. 3 Amino acid homologous alignment of *TaEXPB12-A/B/D*

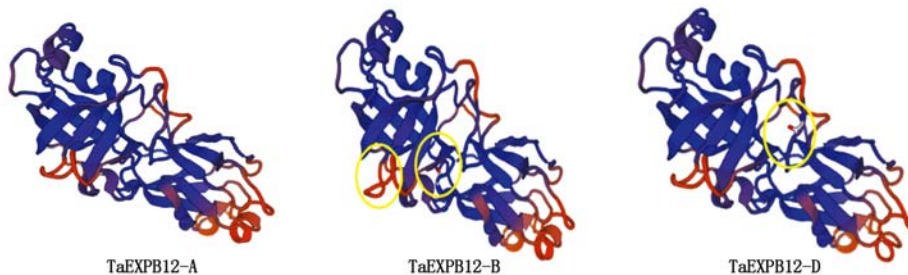


图 4 *TaEXPB12-A/B/D* 编码的蛋白质三级结构的预测

Fig. 4 Prediction of the tertiary structure of protein encoded by *TaEXPB12-A/B/D*

2.3 启动子反应元件预测分析

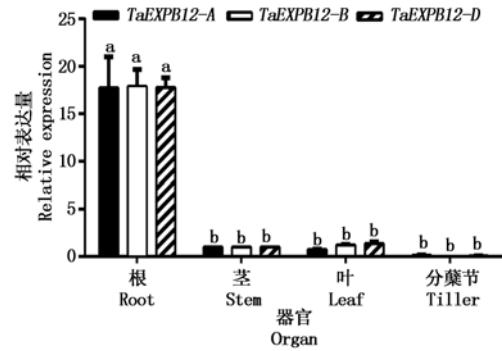
对 *TaEXPB12-A/B/D* 基因序列的启动子进行预测分析,结果显示,均含有与 CBF 冷反应通路相关的 CRT/DRE 元件、光响应元件(Light responsive element)、脱落酸响应元件(Abscisic acid responsiveness)、茉莉酸甲酯响应元件(MeJA responsiveness)、干旱诱导响应元件(Drought inducibility)、水杨酸响应元件(Salicylic acid responsiveness)、生长素响应元件(Auxin-responsive element)、赤霉素响应元件(Gibberellin-responsive element)、厌氧诱导响应元件(Anaerobic induction)、低温响应元件(Low-temperature responsiveness)以及根特异表达相关元件 ROTMOTIFTAPOX1、OSE1ROOTNODULE、OSE2ROOTNODULE 和 RHE 等。

2.4 *TaEXPB12-A/B/D* 基因的表达特性分析

如图 5 所示, qRT-PCR 分析结果显示, *TaEX-*

PB12-A/B/D 基因均在根中特异性表达。如图 6 所示,在不同胁迫处理下, *TaEXPB12-A/B/D* 基因表达趋势不同。在 4 °C 低温处理的条件下, *TaEXPB12-A/B/D* 的表达量都呈下调趋势,其中 6 ~ 48 h 显著下调 ($P < 0.05$),且 *TaEXPB12-A* 表达量下降幅度更大。在不同程度的干旱处理后, *TaEXPB12-A/B/D* 的表达量都呈先上升后下降的趋势,但 *TaEXPB12-A/B/D* 对 30% PEG 更敏感,响应更快。在 20% PEG 的处理条件下, *TaEXPB12-A/B/D* 的表达量在 12 h 达到峰值, *TaEXPB12-A/B/D* 的表达量均达到 0 h 表达量的 1.65 倍以上,差异显著 ($P < 0.05$); 在 30% PEG 的处理条件下, *TaEXPB12-A/B/D* 的表达量在 6 h 表达量最高,约为 0 h 表达量的 3 倍,差异显著 ($P < 0.05$)。在脱落酸和水杨酸的处理条件下, *TaEXPB12-A/B/D* 的表达量也都呈先上升后下降的趋势,其中 *TaEXPB12-A/B/D* 在脱落酸处理条

件下 3 h 时达到峰值,为 0 h 的 2.5 倍以上,差异显著 ($P < 0.05$),且 *TaEXPB12-A* 的表达占据主导地位,其表达量达到了 0 h 的 3.5 倍以上,高于 *TaEXPB12-B* 和 *TaEXPB12-D*,而水杨酸处理条件下在 6 h 表达量最高,约为 0 h 的 13.5 倍,差异亦显著 ($P < 0.05$),说明其对脱落酸的响应更快(峰值提前)而对水杨酸的响应水平更高(增幅更大)。在茉莉酸甲酯的处理下,*TaEXPB12-A/B/D* 的表达量都呈现先下降后上升的趋势,0~6 h 略有下降但差异不显著,而在 6 h 后,*TaEXPB12-A/B/D* 的表达量开始上升并在 48 h 表达量均达到 0 h 的 5.7 倍以上,差异显著 ($P < 0.05$)。从根中的基因表达量整体来看,在 *TaEXPB12-A*、*TaEXPB12-B* 和 *TaEXPB12-D* 中 *TaEXPB12-A* 基因的表达量相对较高。



不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 6 同。
Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same as Fig. 6.

图 5 *TaEXPB12-A/B/D* 在不同器官的表达差异
Fig. 5 The difference expression of *TaEXPB12-A/B/D* genes in different organs

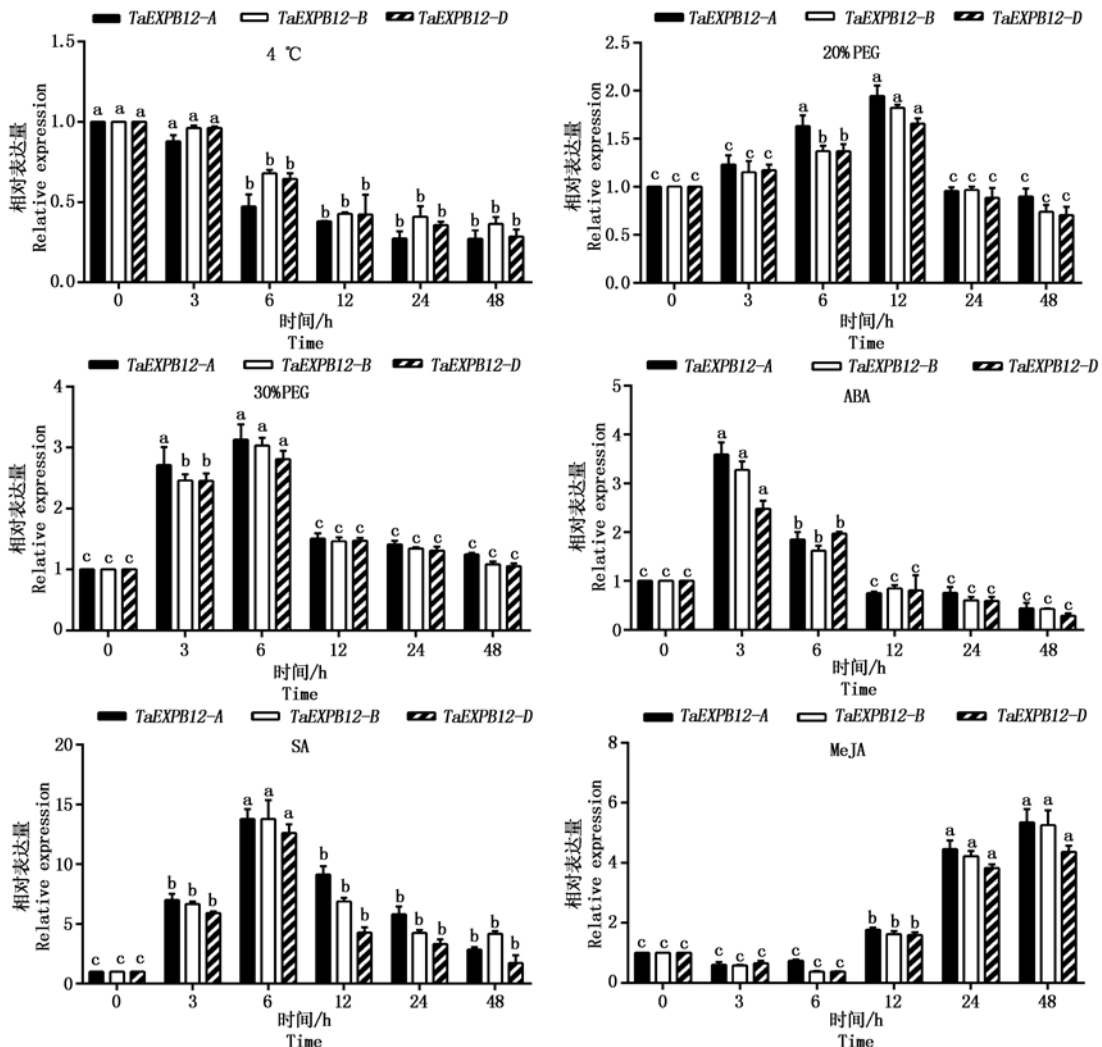


图 6 不同胁迫处理下 *TaEXPB12-A/B/D* 基因的表达差异

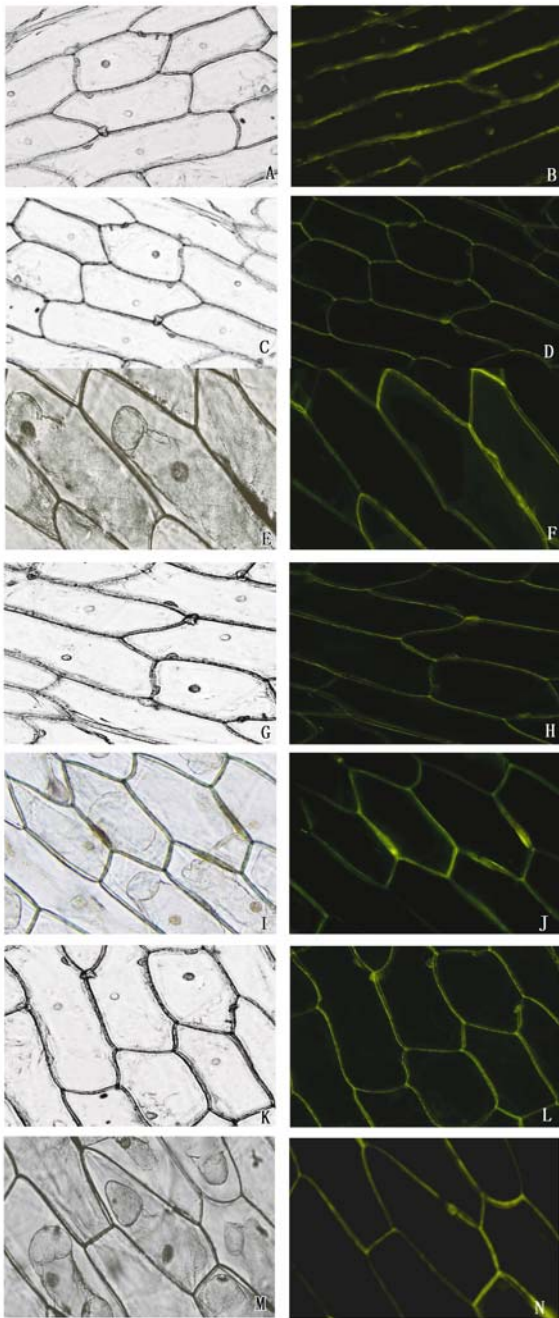
Fig. 6 The differential expression of *TaEXPB12-A/B/D* gene under different stress treatments

2.5 5*TaEXPB12-A*、*TaEXPB12-B*、*TaEXPB12-D* 蛋白亚细胞定位

将含有 YFP 质粒和重组质粒的农杆菌进行活化,瞬时侵染洋葱表皮,然后在荧光显微镜下观察洋

葱表皮。如图 7 所示,在转化有 35S::YFP 阳性对照载体的洋葱细胞中,荧光信号在整个细胞中都有分布。与阳性对照相比,无论质壁分离前后,*TaEXPB12-A::YFP*、*TaEXPB12-B::YFP*、*TaEXPB12-D::YFP*

融合蛋白荧光信号都定位在细胞壁。结果说明, *TaEXPB12-A/B/D* 主要分布在细胞壁中, *TaEXPB12-A/B/D* 编码的蛋白均为细胞壁蛋白。



A, B. 35S::YFP; C, D. 35S::TaEXPB12-A-YFP 正常; E, F. 35S::TaEXPB12-A-YFP 质壁分离; G, H. 35S::TaEXPB12-B-YFP 正常; I, J. 35S::TaEXPB12-B-YFP 质壁分离; K, L. 35S::TaEXPB12-D-YFP 正常; M, N. 35S::TaEXPB12-D-YFP 质壁分离。

A, B. 35S::YFP; C, D. 35S::TaEXPB12-A-YFP normal; E, F. 35S::TaEXPB12-A-YFP plasmolysis; G, H. 35S::TaEXPB12-B-YFP normal; I, J. 35S::TaEXPB12-B-YFP plasmolysis; K, L. 35S::TaEXPB12-D-YFP normal; M, N. 35S::TaEXPB12-D-YFP plasmolysis.

图7 *TaEXPB12-A*、*TaEXPB12-B*、*TaEXPB12-D*

蛋白的亚细胞定位

Fig. 7 Subcellular localization of the *TaEXPB12-A*, *TaEXPB12-B*, *TaEXPB12-D* fusion protein

3 讨论与结论

多倍体化是维管植物的重要进化过程^[15]。多倍体化使水稻、小麦等农作物产生了更具有竞争力的新表型,从而在优胜劣汰的自然界留存下来。多倍体化是多倍体物种形成和进化的基础^[16]。因此,研究小麦膨胀素同源基因的表达差异对了解小麦的异源多倍体进化具有重要意义。本研究发现在冬小麦的基因组中,位于不同染色体上的膨胀素同源基因的序列、立体构象存在差异。Hu等^[17]研究发现 *TaEXPA1-A* 和 *TaEXPA1-D* 基因在幼叶中表达,而 *TaEXPA1-B* 在幼叶中沉默。Peng等^[18]发现 *TaEXPA8-A* 和 *TaEXPA8-B* 主要在根中表达,而 *TaEXPA8-D* 主要在花中表达。董佳敏等^[19]发现在不同的非生物胁迫下, *TaEXPA7-A/B/D* 基因均下调表达,但 B 染色体组上的 *TaEXPA7-B* 基因占主要的表达优势。赵巧琴^[20]发现 *TaEXPA4-A/B/D* 在抵御不同非生物胁迫的过程中,表达量存在显著差异。在本研究中, *TaEXPB12-A*、*TaEXPB12-B* 和 *TaEXPB12-D* 的同源性很高,在不同非生物胁迫的处理下,3 个同源基因的表达趋势也一致,但 A 染色体组上的 *TaEXPB12-A* 基因表达量较高。

本研究发现 *TaEXPB12-A/B/D* 基因在根中特异性表达,而且通过对比,发现其基因序列与大麦中的 *HvEXPB1* 基因相似性达 95%。参考小麦与大麦的进化关系和基因之间的相似程度,推测该基因在功能上基本与 *HvEXPB1* 一致。已有研究证实 *HvEXPB1* 在大麦根中特异性表达,并且直接参与大麦根毛的根原基形成与根毛的伸长。因此,推测 *TaEXPB12-A/B/D* 基因可能参与小麦根毛的根原基形成与根毛的伸长。qRT-PCR 分析结果显示,在低温条件下, *TaEXPB12-A/B/D* 基因的表达呈下调趋势,这可能是为了减少根的表面积,从而减少寒胁迫所造成的伤害。在干旱条件下, *TaEXPB12-A/B/D* 基因的表达量会先上升,这可能是植物受到旱胁迫早期为了增强吸水能力而促进根毛生长的缘故。*TaEXPB12-A/B/D* 基因编码的蛋白是细胞壁蛋白,它们可能通过修饰细胞壁来帮助植物抵御外界的非生物胁迫。在启动子分析中,发现了与 CBF 冷反应通路相关的 CRT/DRE 元件,这说明 *TaEXPB12-A/B/D* 可能在 CBF 冷反应通路中承担着一定的角色。但 *TaEXPB12-A/B/D* 基因在小麦根系生长发育中的具体作用还需要进一步的研究。

分别定位于 2AL、2B、2DL 染色体上的 *TaEXPB12-A/B/D* 同源基因,其 CDS 序列长度均为 846 bp,编

码 281 个氨基酸。*TaEXPB12-A/B/D* 基因高度同源, 编码蛋白质理化性质相似, 其编码蛋白的三级结构有 3 处明显差异, 这可能使它们的功能有所不同。这 3 段序列的启动子区域中均含有与根特异表达相关的作用元件, 以及大量激素响应元件和非生物胁迫响应元件。*TaEXPB12-A/B/D* 蛋白在冬小麦根的细胞壁中特异性分布, 并参与冬小麦抵御干旱、低温、ABA、SA 和 MeJA 的过程。

参考文献:

- [1] 陈艳辉. 小麦扩展蛋白基因 *TaEXPA2* 的功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
Chen Y H. Functional analysis of wheat expanding protein gene *TaEXPA2* [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2016.
- [2] Feng X, Xu Y Q, Peng L N, Yu X Y, Zhao Q Q, Feng S S, Zhao Z Y, Li F L, Hu B Z. *TaEXPB7-B*, a β -expansin gene involved in low-temperature stress and abscisic acid responses, promotes growth and cold resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 240 (6): 153004. doi: 10. 1016/j. jplph. 2019. 153004.
- [3] Gahoonia T S, Nielsen N E, Joshi P A, Jahoor A. A root hairless barley mutant for elucidating genetic of root hairs and phosphorus uptake [J]. *Plant and Soil*, 2001, 235 (2): 211 - 219. doi: 10. 1023/A: 1011993322286.
- [4] He X Y, Zeng J B, Cao F B, Ahmed I M, Zhang G P, Vincze E, Wu F B. *HtEXPB7*, a novel β -expansin gene revealed by the root hair transcriptome of Tibetan wild barley, improves root hair growth under drought stress [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66 (22): 7405 - 7419. doi: 10. 1093/jxb/erv436.
- [5] Guo W B, Zhao J, Li X X, Qin L, Yan X L, Liao H. A soybean β -expansin gene *GmEXPB2* intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses [J]. *The Plant Journal*, 2011, 66 (3): 541 - 552. doi: 10. 1111/j. 1365-313X. 2011. 04511. x.
- [6] Cho H T, Kende H. Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9 (9): 1661 - 1671. doi: 10. 1105/tpc. 9. 9. 1661.
- [7] Zou H Y, Wenwen Y H, Zang G C, Kang Z H, Zhang Z Y, Huang J L, Wang G X. *OsEXPB2*, a β -expansin gene, is involved in rice root system architecture [J]. *Molecular Breeding*, 2015, 35 (1): 41. doi: 10. 1007/s11032-015-0203-y.
- [8] Han Y Y, Chen Y H, Yi S H, Zhang M, Wang W. Over-expression of *TaEXPB23*, a wheat expansin gene, improves oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 173: 62 - 71. doi: 10. 1016/j. jplph. 2014. 09. 007.
- [9] Li A X, Han Y Y, Wang X, Chen Y H, Zhao M R, Zhou S M, Wang W. Root-specific expression of wheat expansin gene *TaEXPB23* enhances root growth and water stress tolerance in tobacco [J]. *Environ Exp Bot*, 2015, 110: 73 - 84. doi: 10. 1016/j. envexpbot. 2014. 10. 002.
- [10] Lü P, Kang M, Jiang X Q, Dai F W, Gao J P, Zhang C Q. *RhEXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2013, 237 (6): 1547 - 1559. doi: 10. 1007/s00425-013-1867-3.
- [11] Lee H W, Kim J. EXPANSINA17 up-regulated by LBD18/ASL20 promotes lateral root formation during the auxin response [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54 (10): 1600 - 1611. doi: 10. 1093/pcp/pct105.
- [12] Marowa P, Ding A, Kong Y Z. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement [J]. *Plant Cell Rep*, 2016, 35: 949 - 965. doi: 10. 1007/s00299-016-1948-4.
- [13] 俞志明. EXPA7 亚家族调控水稻根毛伸长机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
Yu Z M. Regulated mechanism of EXPA7 subfamily regulating root hair elongation in rice [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.
- [14] 何晓薇. 水稻根毛发育相关基因 *OsEXPI7* 的克隆和功能研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
He X W. Cloning and functional study of rice root hair development related gene *OsEXPI7* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [15] Hegarty M J, Hiscock S J. Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants [J]. *Current Biology*, 2008, 18 (10): 435 - 444. doi: 10. 1016/j. cub. 2008. 03. 043.
- [16] Wendel J F, Lisch D, Hu G J, Mason A S. The long and short of doubling down: polyploidy, epigenetics, and the temporal dynamics of genome fractionation [J]. *Curr Opin Genets Dev*, 2018, 49: 1 - 7. doi: 10. 1016/j. gde. 2018. 01. 004.
- [17] Hu Z R, Song N, Xing J W, Chen Y H, Han Z F, Yao Y Y, Peng H R, Ni Z F, Sun Q X. Overexpression of three *TaEXPA1* homoeologous genes with distinct divergence in hexaploid wheat exhibit functional retention in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (5): e63667. doi: 10. 1371/journal. pone. 0063667.
- [18] Peng L N, Xu Y Q, Wang X, Feng X, Zhao Q Q, Feng S S, Zhao Z Y, Hu B Z, Li F L. Overexpression of paralogues of the wheat expansin gene *TaEXPA8* improves low-temperature tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Biology*, 2019, 21 (6): 1119 - 1131. doi: 10. 1111/plb. 13018.
- [19] 董佳敏, 徐永清, 彭丽娜, 冯旭, 姚树宽, 赵巧芬, 李凤兰, 胡宝忠. 小麦品种东农冬麦 2 号根中 *TaEXPA7* 部分同源基因的克隆及表达特性分析 [J]. 麦类作物学报, 2017, 37 (11): 1419 - 1427. doi: 10. 7606/j. issn. 1009-1041. 2017. 11. 03.
Dong J M, Xu Y Q, Peng L N, Feng X, Yao S K, Zhao Q Q, Li F L, Hu B Z. Cloning and characterization of *TaEXPA7* partial homologous genes in roots of winter wheat Dongnongdongmai 2 [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2017, 37 (11): 1419 - 1427.
- [20] 赵巧芬. 寒地冬小麦膨胀素基因 *TaEXPA4-A/B/D* 的克隆及功能分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
Zhao Q Q. Cloning and function analysis of a cold resistance winter wheat expansin gene *TaEXPA4-A/B/D* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.