

玉米BSKs基因家族生物信息学分析

胡雪微^{1,2}, 杨克军^{1,2,*}, 李佐同^{1,2}, 张海燕^{1,2}, 刘鑫¹, 赵莹^{1,2}, 聂江山¹, 韩雨^{1,2}, 赵长江^{1,2,*}

¹黑龙江八一农垦大学农学院, 黑龙江大庆163319; ²黑龙江省普通高校寒地作物种质改良与栽培重点实验室, 黑龙江大庆163319

摘要: 油菜素内酯信号激酶(BSKs)是一类参与油菜素内酯(BR)信号转导的植物特异受体类胞质激酶。本研究采用生物信息学的方法在玉米基因组水平鉴定玉米BSKs基因家族,对基因结构、启动子元件、蛋白质结构和性质、基因表达模式及候选互作蛋白等进行分析。鉴定的14个玉米BSKs基因分别定位在玉米的1、2、4、5和9号染色体上,1号染色体上多达6个;编码蛋白包含典型的PKc和TPR结构域,N端由延长链和螺旋结构组成,定位于叶绿体,多为亲水性、酸性蛋白,可能与热激蛋白、含CS结构域蛋白及受体BRI1互作。玉米BSKs基因在从种子萌发到成熟的整个生长发育期,以及不同组织和器官呈现不同的表达模式;基因启动子上含有大量激素和非生物逆境诱导的顺式作用元件,其中激素SA及NaCl诱导相关元件数量最多,表明玉米BSKs基因可能在不同生育期受多种激素调控,并参与玉米对多种逆境的应答调控。该研究有助于解析单子叶C4作物玉米BSKs基因在生长发育及逆境胁迫响应中的功能。

关键词: 玉米; BSK; BSKs基因家族; 生物信息学

Genome-Wide Analysis of the BSKs Gene Family in Maize (*Zea mays*)

HU Xue-Wei^{1,2}, YANG Ke-Jun^{1,2,*}, LI Zuo-Tong^{1,2}, ZHANG Hai-Yan^{1,2}, LIU Xin¹, ZHAO Ying^{1,2}, NIE Jiang-Shan¹, HAN Yu^{1,2}, ZHAO Chang-Jiang^{1,2,*}

¹College of Agronomy, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China; ²Key Laboratory of Crop Germplasm Improvement and Cultivation in Cold Regions of Heilongjiang Province Education Department, Daqing, Heilongjiang 163319, China

Abstract: Brassinosteroid signaling kinases (BSKs) are novel plant specific receptor-like cytoplasmic kinases involved in the brassinosteroid (BR) signal transduction pathway. In this study, a family of maize (*Zea mays*) BSKs genes was identified from maize genome using bioinformatic methods, and their structures, promoter elements, protein structure and properties, gene expression pattern and candidate interacting proteins were analyzed. The results revealed that 14 maize BSKs genes located on chromosome 1, 2, 4, 5 and 9, respectively, with up to 6 of them on chromosome 1. The encoded proteins had typical PKc and TPR motifs and a complicated N-terminal made up of extending chains and helices; they localized in chloroplast and most of them were hydrophilic and acidic, interacting probably with heat shock proteins, proteins with CS domain and BRI1. Differential expression profiles of maize BSKs genes were observed on developmental stages from germination to maturity, and in different tissues. A great deal of *cis*-elements related to hormones and abiotic stresses were uncovered in the promoter regions, and most of them were found to be salicylic acid (SA) and salt (NaCl) induced, which suggested that the maize BSKs genes were modulated by multiple hormones under different developmental stages, and might play a role in response to many kinds of abiotic stresses. This study will help to decipher the functions of BSKs genes from monocots C4 crop maize on growth, development and responses to abiotic stresses.

Key words: maize; BSK; BSKs gene family; bioinformatic analysis

油菜素内酯BR (brassinosteroid)在植物细胞增殖、衰老、雄性不育、诱导开花及果实成熟中发挥重要功能(Li等2010; Ye等2010; Bajguz和Hayat 2009; Symons等2006; Nakaya等2002; He等2001);有研究表明,施用外源BR能缓解植物幼苗受盐碱胁迫的毒害(刘强等2014),增强植物抗寒和抗高温能力(惠竹梅等2013; 吴雪霞等2013; 张永平等

收稿 2014-12-11 修定 2015-03-23

资助 国家自然科学基金(31101429)、教育部博士学科点博导类专项科研基金(20122305110001)、黑龙江省自然科学基金项目(C201324)、黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511360)、黑龙江八一农垦大学研究生创新项目(YJSCX2014-Y02)和黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(2012)。

* 共同通讯作者(E-mail: byndykj@163.com, Tel: 0459-6819170; E-mail: zhaocj15@126.com, Tel: 0459-6819181)。

2012), 提高植物光合作用(胡文海等2006)。玉米(*Zea mays*)作为重要的粮食作物, 在生长过程中不可避免的遭受逆境胁迫, 影响其产量和品质。所以, 揭示玉米BR信号组份及其转导途径对逆境胁迫响应及其生长发育调控具有重要意义。

在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 位于细胞膜的聚亮氨酸重复序列类受体激酶BR11 (brassinosteroid-insensitive 1)作为BR的受体, 与BAK1 (BR-associated kinase 1)形成复合体激活BR11磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶BSK1 (BR-signaling kinases 1) (Sreeramulu等2013; Hink等2008; Tang等2008; Wang等2005; Russinova等2004)。BSKs属于RLCK-XII (receptor-like cytoplasmic kinase XII)类超家族, 拟南芥中有12个成员, 包含N端激酶结构域PKc (putative kinase catalytic)和C端三羧氨酸重复TPR (tetratricopeptide repeats)结构域(Tang等2008; Shiu等2004)。除拟南芥*bsk3-1*突变体明显降低了对BR的敏感性外, 其他单突变体无明显表型变化(Tang等2008); 四倍突变体*bsk3,4,7,8*和五倍突变体*bsk3,4,6,7,8*显著降低了BR的敏感性及生长表型, 表明植物BSKs存在功能冗余(Sreeramulu等2013; Kim等2009, 2011), 并且BSKs组成型失活蛋白激酶可能通过别构机制调节BR信号转导(Grütter等2013)。最近研究指出, 拟南芥BSK1与病原相关分子模式PAMP (pathogen-associated molecular patterns)受体激酶FLS2 (flagellin-sensitive 2)存在生理相关, 参与PAMP-激发免疫反应PTI (PAMP-triggered immunity)的正向调节(Shi等2013), 阻止病原物的侵染扩散, 提高植物抗病能力(Boller和Felix 2009; Schwessinger和Zipfel 2008; Bent等2007; Stout等2006)。迄今为止, 关于玉米BSKs基因在激素信号转导、生长发育及逆境胁迫响应中的功能研究尚未见报道。本研究利用生物信息学方法对玉米BSKs基因家族进行基因结构、系统进化、组织表达及逆境响应的分析, 有助于揭示BSKs在玉米生长发育及逆境胁迫响应中的作用, 为解析单子叶C4植物BR信号转导途径奠定基础, 从而对玉米育种提供新的基因资源。

材料与方法

1 基因家族成员鉴定

通过三种方法鉴定玉米(*Zea mays* L.) *ZmBSKs*

基因家族成员: 利用已发表的拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) AtBSKs蛋白序列(Tang等2008)搜索玉米基因组数据库(<http://www.maizegdb.org/>)和NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); 利用BSKs基因典型的PKc和TPR保守结构域搜索玉米基因组和NCBI数据库; 利用关键词“maize”和“BSK”搜索NCBI数据库。在NCBI、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)和Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)数据库对非冗余的蛋白序列进行保守结构域分析。在MaizeSequence数据库(<http://www.maizesequence.org/index.html>)获取*ZmBSKs*基因的登录号、编码序列长度和氨基酸数量。分子式、分子量、等电点和亲水系数来自Expasy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) (陈秀玲等2014)。采用HMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html>)、WoLF PSORT (<http://wolfpsort.org/>)、SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行蛋白的跨膜螺旋、亚细胞定位和信号肽分析。

2 蛋白系统进化、基因结构及染色体定位分析

由MEGA6.0软件分析蛋白系统进化关系; 利用GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)进行基因结构分析(张海燕等2013); 通过MaizeSequence数据库分析供试基因在染色体上的定位, 并采用Map Inspect软件绘制定位图。

3 蛋白结构域及高级结构分析

采用InterProScan 5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>)进行蛋白结构域的分析, 应用程序选择HMMPfam、HMMSmart和SuperFamily; 蛋白结构域相互作用蛋白网络由STRING (<http://string.embl.de/>)数据库构建, 蛋白数量限制10以内; 由InParanoid8 (<http://inparanoid.sbc.su.se/cgi-bin/index.cgi>)进行直系同源蛋白分析, 并通过NCBI获取其互作蛋白; 采用Predictprotein (<https://www.predictprotein.org/>)预测蛋白二级结构; 采用Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白三级结构。

4 基因表达及其启动子顺式元件分析

供试基因在不同组织、器官和发育阶段的表达数据来自Maize eFP (http://bar.utoronto.ca/efp_maize/cgi-bin/efpWeb.cgi)数据库, 通过Cluster version 3.0和Tree View version 1.6软件进行聚类分

析。在MaizeSequence数据库获取基因翻译起始位点上游2 000 bp的启动子序列,提交至PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 统计分析激素及逆境相关顺式作用元件数量。

实验结果

1 *ZmBSKs*基因鉴定和命名

三种方法结合获得多达362个蛋白序列,提交至NCBI、SMART和Pfam数据库进行结构域验证,发现编码包含PKc和TPR结构域的非冗余蛋白基因14个,根据其染色体的位置分别命名为*ZmBSK1*~*ZmBSK9*(表1),其中包括3个*ZmBSKs*具有两种以上剪接方式的注释基因。*ZmBSKs*基因编码序列长度介于879 (*ZmBSK7.2*)~2 376 (*ZmBSK5.1*)

bp;蛋白分子量介于32.0 (*ZmBSK7.2*)~87.7 (*ZmBSK5.1*) kDa,平均分子量为55.1 kDa,均为亲水性蛋白,多数蛋白呈酸性,预测定位于叶绿体,其中只有*ZmBSK2.3*存在信号肽。

2 *ZmBSKs*蛋白进化和分类

通过邻接法对14个玉米、12个拟南芥及6个水稻的BSKs蛋白进行系统聚类分析(图1)。BSKs蛋白被分成3个亚组,组I包含8个*ZmBSKs*蛋白,与4个拟南芥BSKs同组;组II含3个*ZmBSKs*蛋白,与6个拟南芥BSKs同组;组III也含3个*ZmBSKs*蛋白,与2个拟南芥BSKs同组。在物种间,*ZmBSKs*和*OsBSKs*蛋白亲缘关系更近。

3 基因结构分析

对基因内含子、外显子分析发现(图2和表1),

表1 *ZmBSKs*基因的特征

Table 1 Characters of *ZmBSKs* genes

基因名	登录号	编码区/bp	氨基酸/aa	分子式	分子量/kDa	等电点	亲水系数
<i>ZmBSK1</i>	GRMZM2G099598_T01	1 539	512	C ₂₅₁₈ H ₃₉₄₆ N ₇₁₆ O ₇₆₀ S ₃₀	57.4	6.48	-0.532
<i>ZmBSK2.1</i>	GRMZM2G026767_T01	882	293	C ₁₄₇₉ H ₂₃₄₉ N ₃₉₉ O ₄₄₀ S ₂₀	33.4	5.89	-0.305
<i>ZmBSK2.2</i>	GRMZM2G026767_T03	1 554	517	C ₂₅₅₂ H ₃₉₉₈ N ₇₁₈ O ₇₅₄ S ₂₈	57.7	7.56	-0.424
<i>ZmBSK2.3</i>	GRMZM2G026767_T04	1 134	377	C ₁₉₁₆ H ₂₉₉₀ N ₅₁₆ O ₅₆₈ S ₂₄	43.1	5.57	-0.348
<i>ZmBSK3</i>	GRMZM2G169080_T01	1 518	505	C ₂₄₈₅ H ₃₈₉₈ N ₆₈₀ O ₇₄₅ S ₂₂	55.9	5.83	-0.309
<i>ZmBSK4</i>	GRMZM2G177445_T01	1 476	491	C ₂₃₈₂ H ₃₇₂₅ N ₆₉₁ O ₇₁₉ S ₂₁	54.2	6.63	-0.316
<i>ZmBSK5.1</i>	GRMZM2G382104_T01	2 376	791	C ₃₈₈₇ H ₆₁₇₉ N ₁₁₀₁ O ₁₁₂₁ S ₄₆	87.7	8.73	-0.113
<i>ZmBSK5.2</i>	GRMZM2G382104_T02	1 473	490	C ₂₃₉₄ H ₃₇₇₂ N ₆₈₀ O ₇₄₅ S ₃₃	55.1	5.48	-0.406
<i>ZmBSK5.3</i>	GRMZM2G382104_T03	1 473	490	C ₂₃₉₄ H ₃₇₇₂ N ₆₈₀ O ₇₄₅ S ₃₃	55.1	5.48	-0.406
<i>ZmBSK6</i>	GRMZM2G164224_T01	1 926	641	C ₃₁₆₀ H ₅₀₅₁ N ₈₉₇ O ₉₆₈ S ₄₃	72.5	6.11	-0.453
<i>ZmBSK7.1</i>	GRMZM2G121826_T01	1 476	491	C ₂₃₈₇ H ₃₇₂₉ N ₆₈₉ O ₇₂₇ S ₂₁	54.4	6.26	-0.324
<i>ZmBSK7.2</i>	GRMZM2G121826_T02	879	292	C ₁₃₉₁ H ₂₂₀₄ N ₄₀₂ O ₄₄₆ S ₁₁	32.0	5.58	-0.374
<i>ZmBSK8</i>	GRMZM2G054634_T01	1 518	505	C ₂₄₈₂ H ₃₉₀₁ N ₆₈₃ O ₇₄₆ S ₂₃	56.0	5.94	-0.328
<i>ZmBSK9</i>	GRMZM2G127050_T01	1 533	510	C ₂₅₁₆ H ₃₉₄₆ N ₇₁₆ O ₇₆₂ S ₃₀	57.4	6.30	-0.550

基因名	跨膜螺旋	亚细胞定位	信号肽	内含子数	螺旋数	延长链数	蛋白三级结构与AtBSK8相似性/%
<i>ZmBSK1</i>	1	Chl/Mit/Nuc	—	8	19	20	68.64
<i>ZmBSK2.1</i>	1	Chl/Nuc/Cyt	—	4	14	3	—
<i>ZmBSK2.2</i>	1	Chl/Mit	—	8	15	11	68.07
<i>ZmBSK2.3</i>	0	Chl/Cyt/Ext	Y	6	15	13	—
<i>ZmBSK3</i>	1	Chl/Nuc/Cyt	—	9	16	17	65.85
<i>ZmBSK4</i>	1	Chl/Mit/Nuc/Cyt	—	9	16	21	72.82
<i>ZmBSK5.1</i>	5	Chl/Cyt	—	16	32	15	79.14
<i>ZmBSK5.2</i>	0	Chl/Mit/Nuc/Cyt	—	9	16	13	77.78
<i>ZmBSK5.3</i>	0	Chl/Mit/Nuc/Cyt	—	9	16	13	77.78
<i>ZmBSK6</i>	0	Chl/Nuc/Cyt	—	8	21	21	—
<i>ZmBSK7.1</i>	0	Chl/Mit/Nuc/Cyt	—	9	16	20	73.17
<i>ZmBSK7.2</i>	0	Chl/Nuc/Cyt	—	5	12	5	76.00
<i>ZmBSK8</i>	1	Chl/Mit/Nuc/Cyt	—	9	17	11	66.20
<i>ZmBSK9</i>	0	Chl/Mit/Cyt	—	8	15	12	68.40

Chl: 叶绿体; Mit: 线粒体; Nuc: 细胞核; Cyt: 细胞质; Ext: 细胞外; Y: 有。

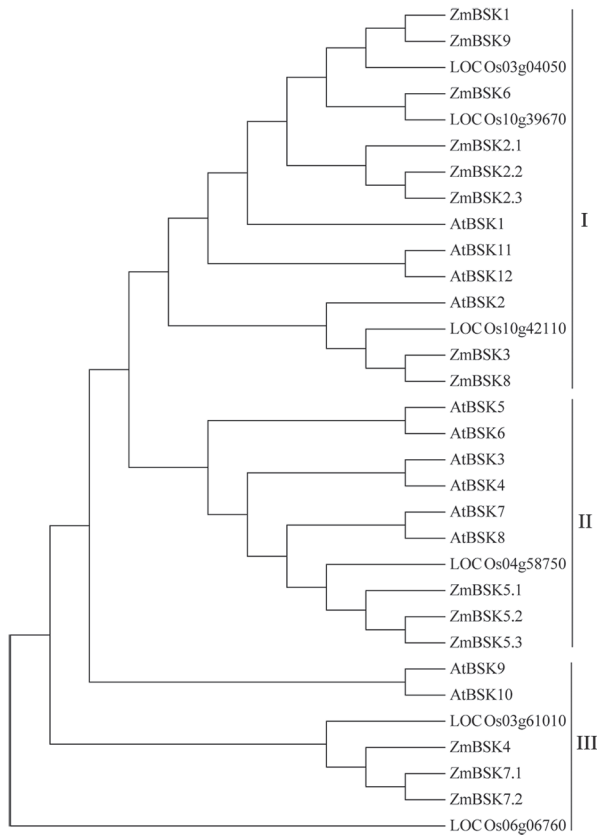


图1 玉米(ZmBSKs)、拟南芥(AtBSKs)和水稻(OsBSKs)蛋白进化树

Fig.1 Phylogenetic analysis of BSKs from maize (ZmBSKs), *Arabidopsis* (AtBSKs) and rice (OsBSKs)

水稻BSKs基因通过Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)和NCBI数据库获取, 采用TIGR登录号进行标注。

除ZmBSK5.1含有17个外显子外, 其余ZmBSKs基因外显子数量在5~10之间。亚组I内含8个内含子和9个外显子的基因最多(ZmBSK1/ZmBSK2.2/ZmBSK6/ZmBSK9); 亚组II和亚组III含9个内含子和10个外显子的基因最多(组II: ZmBSK5.2/ZmBSK5.3和组III: ZmBSK4/ZmBSK7.1)。

4 ZmBSKs基因在染色体上的分布

ZmBSKs基因分布在玉米10条染色体中的1、2、4、5和9号染色体上(图3)。4号染色体只分布1个ZmBSK基因, 染色体5和9都分布2个ZmBSKs基因, 2号染色体分布3个ZmBSKs基因, 1号染色体分布6个ZmBSKs基因; ZmBSKs基因多数远离中心粒, 定位于染色体两端, 同一亚组内不同剪接方式转录本定位于同一染色体, 例如: ZmBSK5.1、ZmBSK5.2和ZmBSK5.3聚集在染色体2上, ZmBSK7.1、ZmBSK7.2聚集在染色体5上。结合系统进化可以发现: 共生同源的ZmBSK1 (1号染色体)和ZmBSK9 (9号染色体)间、ZmBSK3 (1号染色体)和ZmBSK8 (9号染色体)间、ZmBSK4 (1号染色体)和ZmBSK7.1/ZmBSK7.2 (5号染色体)间在不同染色体上发生片段重复。

5 ZmBSKs蛋白结构域及互作蛋白网络分析

由InterProScan分析发现, ZmBSKs蛋白同时含PKc (PF07714、SSF56112)和TPR (PF13414、SSF48452)结构域, ZmBSK6还含有Motile_Sperm (PF00635、SSF49354)结构域, 该结构域蛋白主要调控精子的能动性, 其寡核苷酸聚合物可能参与

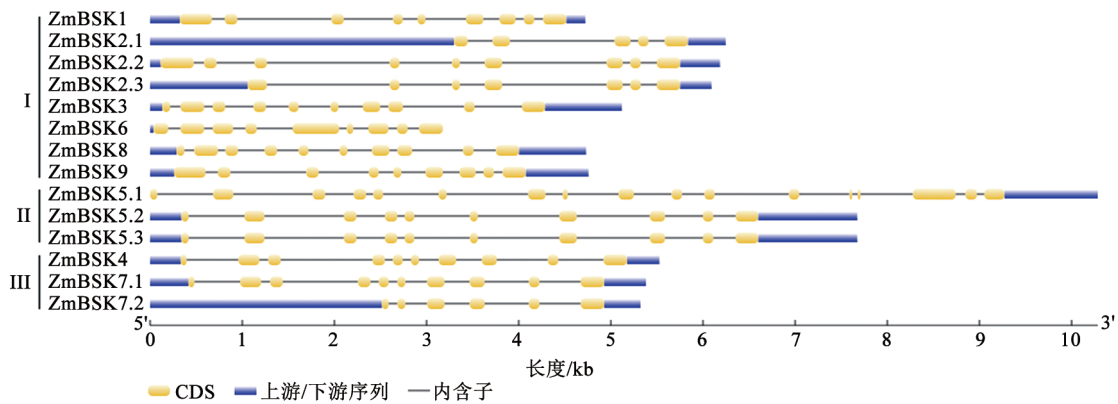


图2 ZmBSKs基因结构

Fig.2 Gene structure of ZmBSKs gene family

花丝形成。通过PKc和TPR结构域序列分析, 选择与ZmBSKs蛋白保守域一致性最高的假定蛋白

(JGI97572)进行互作蛋白分析, 获得10个可能与ZmBSKs保守域(JGI97572)互作的候选蛋白(图

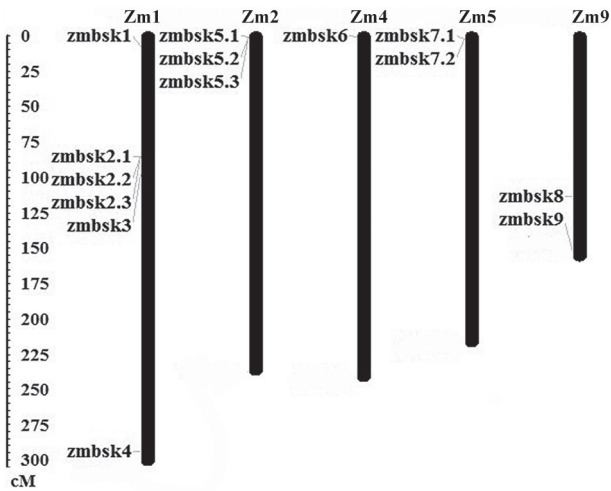


图3 *ZmBSKs*基因在玉米染色体上分布
Fig.3 Chromosomal distributions of *ZmBSKs* genes in the maize genome

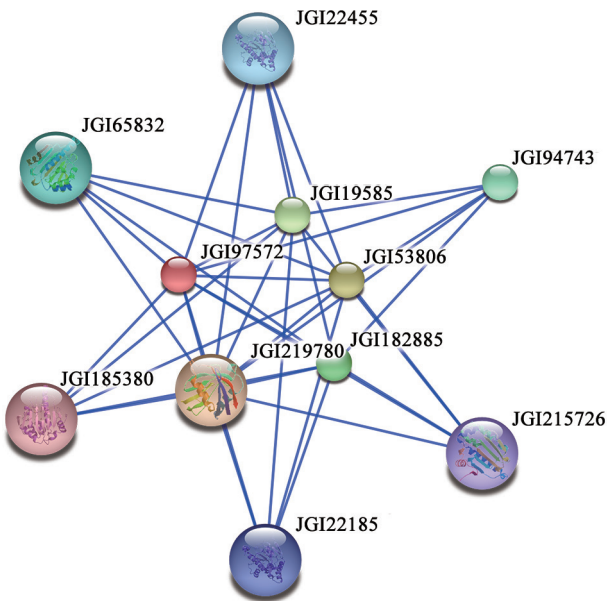


图4 *ZmBSKs*蛋白保守域(JGI97572)与其他蛋白相互作用网络
Fig.4 The interaction network of *ZmBSKs* proteins domain (JGI97572) with other proteins

4)。其中6个候选互作蛋白JGI94743、JGI165832、JGI224556、JGI221851、JGI215726和JGI185380均为为热休克蛋白HSP90 (heat shock protein 90), 参与植物生长发育进程及抗病反应; JGI53806、JGI19585和JGI182885是含CS (CHORD and SGT1) 结构域的一类蛋白, 该类蛋白典型代表为抗病相

关蛋白Rar1; JGI219780是肽基脯氨酰顺反异构酶类(peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase), 功能为提高蛋白质的折叠率。另外, 为更好的了解*ZmBSKs*蛋白功能, 对其进行直系同源蛋白的预测, 预测结果显示, *ZmBSK1/ZmBSK2.1/ZmBSK2.2/ZmBSK2.3/ZmBSK9*与拟南芥*AtBSK1*属于直系同源蛋白, 可与BIN2、BRI1、BRL3 (BRI1-like 3)、FLS2和GSK1互作, 主要调节BR信号途径; *ZmBSK3/ZmBSK8*与拟南芥*AtBSK2*属于直系同源蛋白, 可与Zinc finger (C3HC4-type RING finger)和Copper amine oxidase蛋白互作, 参与锌铜离子的结合; *ZmBSK4/ZmBSK7.1/ZmBSK7.2*与拟南芥*AtBSK5*属于直系同源蛋白, 可与BIN2、BRI1和GSK1互作, 调节BR信号途径; *ZmBSK5.1/ZmBSK5.2/ZmBSK5.3*与拟南芥*AtBSK7*属于直系同源蛋白, 可与BRL3互作, 调节激素信号途径; *ZmBSK6*与拟南芥无直系同源蛋白。

6 蛋白高级结构预测分析

如图5-A和B所示, *ZmBSKs*蛋白N端由延长链和螺旋结构组成, C端基本由螺旋结构组成。其中, *ZmBSK2.1*和*ZmBSK7.2*延长链数量最少, 其余蛋白延长链数量均在11以上; *ZmBSK5.1*蛋白螺旋结构数量最多, 占自身结构的38.1%, *ZmBSK7.2*螺旋结构最少, 其余蛋白螺旋结构数量在14~21之间(图5-A和表1)。而且, 三级结构也表明*ZmBSKs*蛋白含有多个螺旋、延长链及回折结构组成。Swiss-Model分析结果发现: *ZmBSK4/ZmBSK5.1/ZmBSK5.2/ZmBSK5.3/ZmBSK7.1/ZmBSK7.2*与*AtBSK8*三级结构相似性均达70%以上(表1)。

7 *ZmBSKs*基因表达模式分析

利用已发布的微阵列数据分析*ZmBSKs*基因在不同组织和发育阶段的表达(图6), *ZmBSKs*基因表达模式可分成4组: 组I中各基因在不同组织和发育时期表达变异较大; 组II在不同发育时期的表达水平略低; 组III在玉米早期发育阶段表达量高, 发育后期表达量低; 组IV在花药、根、叶、苞叶、胚乳种子形成后期表达量较低, 其余表达量高。

8 启动子激素及逆境相关顺式元件分析

选择激素诱导表达元件水杨酸SA (S000390)、生长素Auxin (S000370)、赤霉素GA (S000439)、脱落酸ABA (S000263)、茉莉酸JA (S000430)和乙

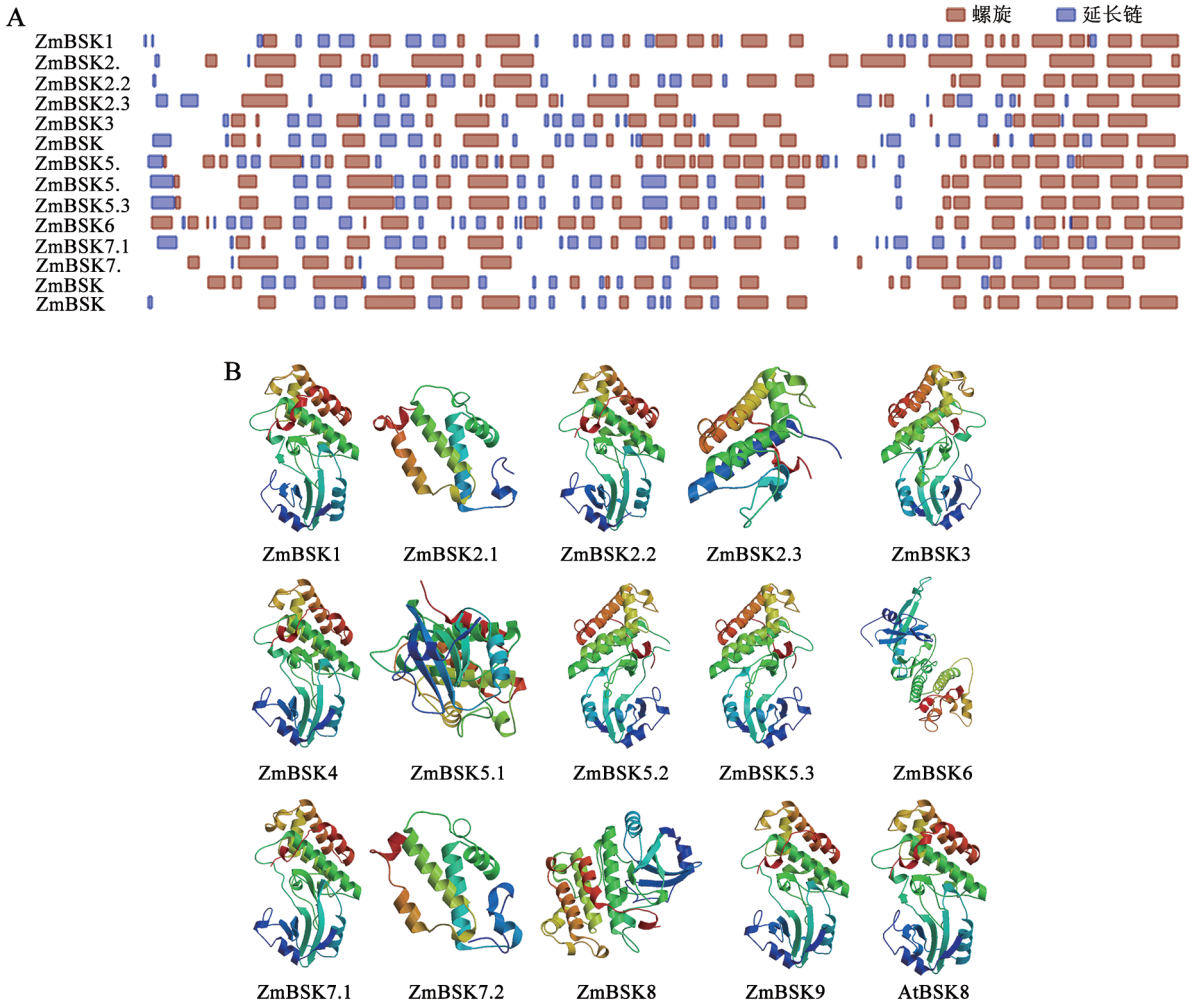


图5 ZmBSKs蛋白二级结构(A)及三级结构(B)

Fig.5 Secondary structure (A) and tertiary structure (B) of ZmBSKs proteins

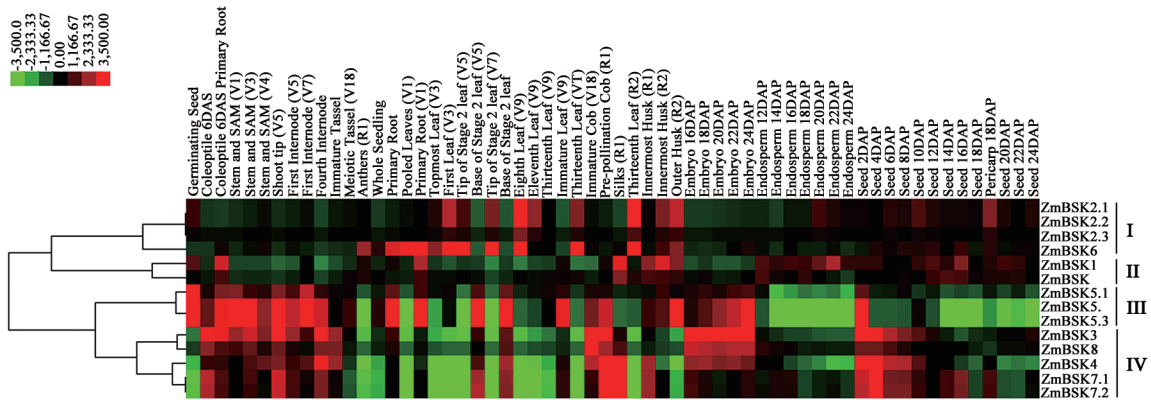


图6 ZmBSKs基因在玉米不同组织器官和生长发育阶段的表达谱

Fig.6 The expression profile of ZmBSKs genes in different tissues and developmental stages

烯ET (S00037), 逆境诱导表达元件厌氧Anaerobic (S000478)、低温Low-temperature (S000250)、紫外

讨 论

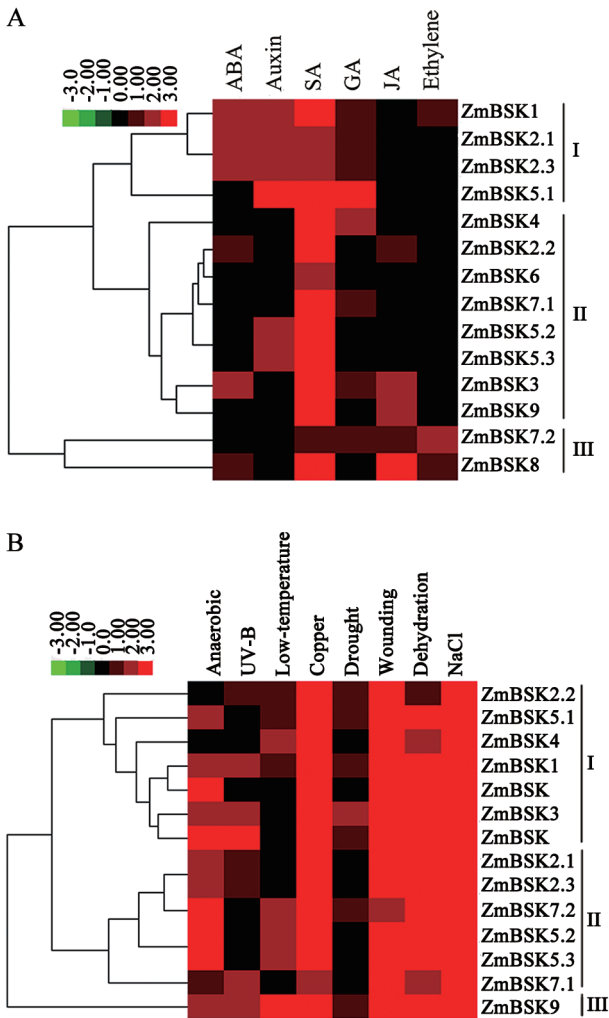


图7 *ZmBSKs*基因启动子激素(A)及逆境(B)相关顺式元件数量分布

Fig.7 Amount of *cis*-elements related to hormone (A) and stress (B) in *ZmBSKs* promoters

辐射UV-B (S000492)、干旱Drought (S000418)、铜Copper (S000493)、伤害Wounding (S000457)、盐NaCl (S000198)和脱水Dehydration (S000176), 通过Cluster version 3.0和Tree View version 1.6软件完成这些顺式元件在启动子上数量的聚类分析。激素和逆境相关顺式元件按数量可分3类; 在供试激素诱导相关分析元件中(图7-A), *ZmBSKs*基因启动子上SA诱导相关元件最多, *ZmBSK5.1*的启动子上Auxin、GA和SA等激素相关元件分布较多。在供试逆境诱导相关分析元件中(图7-B), *ZmBSKs*的启动子上NaCl诱导相关元件数量最多, 其次为Copper、Wounding和Dehydration。

在拟南芥中, BSKs能将信号传给下游胞质元件磷酸酶BSU1 (BRI1 suppressor 1) (Wang等2012), 磷酸化的BSU1脱去磷酸并抑制BIN2 (GSK3/shaggy-like kinase brassinosteroid insensitive 2), 钝化的BIN2不能抑制转录因子BES1 (bri1-EMS suppressor 1)和BZR1 (brassinazole resistant 1)以及其辅助因子(Ye等2012; Vert和Chory 2006; Yin等2005; He等2002; Li和Nam 2002; Yin等2002), 使BES1和BZR1被PP2A (protein phosphatase 2A)去磷酸化, 随后, 被激活的BES1和BZR1迁移至细胞核, 结合BR反应元件启动子, 形成BR信号通路(Tang等2011), 调节植物生长发育。目前关于BSKs功能研究多见于模式植物拟南芥, 但是在粮食作物中, 尤其是单子叶C4植物玉米中该类基因的功能研究至今未见报道。

本研究首次在玉米全基因组水平分离*BSKs*基因, 鉴定的14个*ZmBSKs*候选基因, 都含有N端激酶结构域和C端TPR结构域, 这与拟南芥中的*BSKs*基因结构一致(Tang等2008)。研究发现*ZmBSK5.2*和*ZmBSK5.3*基因序列、结构及表达情况完全相同, 说明其属于同一基因, 只是在玉米基因组数据库中的注释不同。值得一提的是, *ZmBSK2.1*、*ZmBSK5.1*和*ZmBSK7.2*与其他*BSKs*基因相差较大, 如*ZmBSK5.1*的编码蛋白长度最长, 基因外显子、蛋白跨膜结构和螺旋数量最多, 并且与拟南芥*BSK3*、*BSK4*、*BSK6*、*BSK7*和*BSK8*属同一亚组, 玉米*ZmBSK5*可能承担了上述几个拟南芥*BSKs*的功能, 换句话说, 玉米*bsk5*突变体可能与拟南芥*bsk3, 4, 7, 8*和*bsk3, 4, 6, 7, 8*相当, 引起植物表型变化; *ZmBSK2.1*基因外显子和蛋白延长链数量最少, 与拟南芥*BSK1*同源, 其可能参与PTI的调节; *ZmBSK7.2*编码蛋白序列最短, 螺旋结构最少, 与拟南芥*BSK9*和*BSK10*在同一亚组内, 其功能未知。研究中, 尽管因聚类方法方式造成的基因表达模式差异, 但系统进化上相近的*ZmBSKs*蛋白在组织和器官中的表达基本一致, 表明同源蛋白可能功能相近, 而且存在冗余。

研究中进行互作蛋白预测发现, *ZmBSKs*蛋白结构域可与植物抗病相关蛋白作用, 这与Shi等(2013)报道拟南芥中BSK与病原物互作的结果一

致, ZmBSK1/ZmBSK2.1/ZmBSK2.2/ZmBSK2.3/ZmBSK9可能与AtBSK1作用相同, 结合受体BRI1, 调节玉米中的BR信号转导途径(Tang等2008)。有研究表明, 施用BL (brassinolide)可抑制野生型拟南芥下胚轴和根的生长, 只有*bsk3-1*缓解了此表型; 而且在拟南芥中, *BSK3*与*BSK8*功能冗余(Tang等2008; Sreeramulu等2013)。那么与AtBSK8三级结构相似的ZmBSK4/ZmBSK5.1/ZmBSK5.2/ZmBSK5.3/ZmBSK7.1和ZmBSK7.2是否能在玉米中行使类似的功能, 值得深入分析。另外*AtBSK1~8*基因的T-DNA嵌入株系和多倍突变体中, *bsk3, 4, 7, 8*和*bsk3, 4, 6, 7, 8*突变体表现出减少丛生尺寸、叶片卷曲及加大叶倾角, 一些突变体组合表现出对立互作(Sreeramulu等2013), 表明不同的BSKs在形态建成中分工不尽相同。由此可见, 玉米中*ZmBSKs*基因在不同组织器官及生长发育阶段均有表达, 可能具有不同的分工, 当然也可能存在功能冗余。

启动子顺式元件的分析显示, *ZmBSKs*基因启动子上激素及逆境相关元件均有不同程度分布, 不仅为BR与其他植物激素SA、GA、Auxin、JA、ET、ABA和Cytokinin相互作用提供了理论支持(Hao等2013; 尹昌喜等2009), 也为BR参与盐、铜、低温、干旱和厌氧等(尹博等2012; 康云艳等2008; Arora等2008; 周天等2004; 邹华文2002)逆境响应提供了合理的解释。已有研究指出, BR诱导的拟南芥耐盐和耐高温是通过SA的关键调节蛋白NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related genes 1)所调节的, 同时施用BR和SA能增强芸薹属植物耐盐性(Hayat等2012; Divi等2010)。上述研究结论在一定程度上为本研究中指出的玉米*ZmBSKs*基因启动子上水杨酸(SA)和盐(NaCl)诱导相关元件数量多的结果提供了更为合理的注解。综上所述, *ZmBSKs*基因可能在玉米生长发育及逆境胁迫响应中发挥重要调控作用, 但仍需进一步试验证明。

参考文献

陈秀玲, 王傲雪, 张珍珠, 李景富(2014). 番茄NAC转录因子家族的鉴定及生物信息学分析. 植物生理学报, 50 (4): 461~470
胡文海, 黄黎锋, 毛伟华, 周艳虹, 喻景权(2006). 油菜素内酯对黄瓜苗期叶片光合机构调节作用的研究. 园艺学报, 33 (4): 762~766
惠竹梅, 王智真, 胡勇, 邓敏敏, 张振文(2013). 24-表油菜素内酯对低温胁迫下葡萄幼苗抗氧化系统及渗透调节物质的影响. 中

国农业科学, 46 (5): 1005~1013
康云艳, 郭世荣, 李娟, 段九菊(2008). 24-表油菜素内酯对低氧胁迫下黄瓜幼苗根系抗氧化系统的影响. 中国农业科学, 41 (1): 153~161
刘强, 王庆成, 王占武, 周晓梅(2014). 外源油菜素内酯对苍耳盐碱胁迫的缓解效应. 东北林业大学学报, 42 (10): 34~37
吴雪霞, 查丁石, 朱宗文, 许爽(2013). 外源24-表油菜素内酯对高温胁迫下茄子幼苗生长和抗氧化系统的影响. 植物生理学报, 49 (9): 929~934
尹博, 王秀峰, 姜春辉, 李晓云, 崔秀敏(2012). 外源油菜素内酯对番茄铜胁迫的缓解效应. 植物营养与肥料学报, 18 (1): 162~168
尹昌喜, 汪献芳, 曾汉来, 夏凯(2009). 生长素对植物茎伸长的调控作用. 植物生理学通讯, 45 (5): 503~508
张海燕, 李佐同, 赵长江, 杨克军, 王玉凤, 胡雪微, 赵莹(2013). 玉米LIM结构域蛋白基因家族分析. 玉米科学, 21 (3): 40~47
张永平, 陈幼源, 杨少军(2012). 高温胁迫下2,4-表油菜素内酯对甜瓜幼苗生理及光合特性的影响. 植物生理学报, 48 (7): 683~688
周天, 周晓梅, 胡勇军, 姜天亮, 郭继勋(2004). 油菜素内酯对玉米幼苗抗冷性的影响. 吉林师范大学学报(自然科学版), (1): 6~8
邹华文(2002). 表高油菜素内酯浸种对提高玉米幼苗抗旱性的影响. 湖北农学院学报, 22 (1): 40~43
Arora N, Bhardwaj R, Sharma P, Arora HK (2008). 28-Homobrassinolide alleviates oxidative stress in salt-treated maize (*Zea mays* L.) plants. *Braz J Plant Physiol*, 20 (2): 153~157
Bajguz A, Hayat S (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol Bioch*, 47: 1~8
Bent AF, Mackey D (2007). Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol*, 45: 399~436
Boller T, Felix G (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 379~406
Divi UK, Rahman T, Krishna P (2010). Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol*, 10: 151~164
Grütter C, Sreeramulu S, Sessa G, Rauh D (2013). Structural characterization of the RLCK family member *BSK8*: A pseudokinase with an unprecedented architecture. *J Mol Biol*, 425: 4455~4467
Hao JJ, Yin YH, Fei SZ (2013). Brassinosteroid signaling network: implications on yield and stress tolerance. *Plant Cell Rep*, 32: 1017~1030
Hayat S, Maheshwari P, Wani AS, Irfan M, Alyemini MN, Ahmad A (2012). Comparative effect of 28 homobrassinolide and salicylic acid in the amelioration of NaCl stress in *Brassica juncea* L. *Plant Physiol Bioch*, 53: 61~68
He YH, Tang WN, Swain JD, Green AL, Jack TP, Gan S (2001). Networking senescence-regulating pathways by using *Arabidopsis* enhancer trap lines. *Plant Physiol*, 126: 707~716
He JX, Gendron JM, Yang YL, Li JM, Wang ZY (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99 (15): 10185~10190
Hink MA, Shah K, Russinova E, Vries SC, Visser AJ (2008). Fluores-

- cence fluctuation analysis of *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinase and brassinosteroid insensitive 1 receptor oligomerization. *Biophys J*, 94 (3): 1052~1062
- Kim TW, Guan SH, Burlingame AL, Wang ZY (2011). The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Mol Cell*, 43: 561~571
- Kim TW, Guan SH, Sun Y, Deng ZP, Tang WQ, Shang JX, Sun Y, Burlingame AL, Wang ZY (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol*, 11 (10): 1254~1260
- Li JH, Li YH, Chen SY, An LZ (2010). Involvement of brassinosteroid signals in the floral-induction network of *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 61: 4221~4230
- Li JM, Nam KH (2002). Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-Like kinase. *Science*, 295: 1299~1301
- Nakaya M, Tsukaya H, Murakami N, Kato M (2002). Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 43(2): 239~244
- Russinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Caño-Delgado A, Yin YH, Chory J, Vries SC (2004). Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell*, 16: 3216~3229
- Schwessinger B, Zipfel C (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 11: 389~395
- Shiu SH, Karlowski WM, Pan R, Tzeng YH, Maye KF, Li WH (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, 16: 1220~1234
- Shi H, Shen QJ, Qi YP, Yan HJ, Nie HZ, Chen YF, Zhao T, Katagiri FK, Tang DZ (2013). BR-SIGNALING KINASE1 physically associates with FLAGELLIN SENSING2 and regulates plant innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 1143~1157
- Sreeramulu S, Mostizky Y, Sunitha S, Shani E, Nahum H, Salomon D, Hayun LB, Gruetter C, Rauh D, Ori N et al (2013). BSKs are partially redundant positive regulators of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*, 74: 905~919
- Stout MJ, Thaler JS, Thomma BP (2006). Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annu Rev Entomol*, 51: 663~689
- Symons GM, Davies C, Shavrukov Y, Dry IB, Reid JB, Thomas MR (2006). Grapes on steroids. Brassinosteroids are involved in grape berry ripening. *Plant Physiol*, 140: 150~158
- Tang WQ, Kim TW, Osés-Prieto JA, Sun Y, Deng ZP, Zhu SW, Wang RJ, Burlingame AL, Wang ZY (2008). BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science*, 321: 557~560
- Tang WQ, Yuan M, Wang RJ, Yang YH, Wang CM, Osés-Prieto JA, Kim TW, Zhou HW, Deng ZP, Gampala SS et al (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol*, 13 (2): 124~131
- Vert G, Chory J (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature*, 441: 96~100
- Wang XL, Li XQ, Meisenhelder J, Hunter T, Yoshida S, Asami T, Chory J (2005). Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Dev Cell*, 8: 855~865
- Wang ZY, Bai MY, Oh E, Zhu JY (2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu Rev Genet*, 46: 701~724
- Ye HX, Li L, Guo HQ, Yin YH (2012). MYBL2 is a substrate of GSK3-like kinase BIN2 and acts as a corepressor of BES1 in brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *PNAS*, 109 (49): 20142~20147
- Ye QQ, Zhu WJ, Li L, Zhang SS, Yin YH, Ma H, Wang XL (2010). Brassinosteroids control male fertility by regulating the expression of key genes involved in *Arabidopsis* anther and pollen development. *PNAS*, 107 (13): 6100~6105
- Yin YH, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li JM, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*, 109: 181~191
- Yin YH, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*, 120: 249~259