

转录因子基因 *TuGTγ-3* 参与乌拉尔图小麦对条锈病的抗性

丁刘军^{1,2}, 普明宇^{1,2}, 卫波¹, 王献平¹, 范仁春¹, 张相岐¹

1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物细胞与染色体国家重点实验室, 北京 100101;

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 小麦条锈病是由条形柄锈菌小麦专化型(*Puccinia striiformis* West. f. sp. *tritici* Eriks. & Henn., *Pst*)引起的一种严重的真菌病害, 发掘新的抗条锈病相关基因对于小麦抗病育种和抗病机理研究都具有重要意义。Trihelix 是植物特有的转录因子家族, 参与调控生长发育、形态建成、胁迫应答等过程。迄今, 小麦属 Trihelix 家族与抗条锈病相关的研究尚未见报道。本研究从乌拉尔图小麦(*Triticum urartu* Tum., 2n=2x=14, AA)中克隆了 Trihelix 家族 GTγ 亚家族中的一个基因, 命名为 *TuGTγ-3*。序列分析表明, *TuGTγ-3* 基因具有完整的开放阅读框(ORF), 编码序列(CDS)全长 1329 bp, 编码 442 个氨基酸, 推测其编码蛋白的分子量为 50.31 kDa, 理论等电点为 6.12。生物信息学预测 *TuGTγ-3* 蛋白有一个单分型核定位信号(GLPMQKKMRYT), 没有信号肽和跨膜结构域。*TuGTγ-3* 蛋白的保守 trihelix 结构域的氨基酸序列位置为 Q¹¹⁵~R¹⁸⁷, 第四 α-螺旋位置为 F²³⁴~Y²⁴¹, CC 结构域的位置为 K³⁶²~K⁴³⁶。二级结构分析显示, *TuGTγ-3* 蛋白由 43.89% 的 α-螺旋、9.51% 的伸展链、9.95% 的 β-转角和 36.65% 的不规则卷曲构成。利用普通小麦的基因组数据库 BLAST 分析表明, *TuGTγ-3* 被定位于 5A 染色体长臂上。瞬时表达实验显示, *TuGTγ-3* 蛋白主要定位在细胞核中, 但细胞质中也有少量分布。表达谱分析表明, *TuGTγ-3* 基因在叶片中的表达量显著高于根和叶鞘, 且受小麦条锈菌小种 CYR32 的诱导而强烈上调表达。进一步通过大麦条纹花叶病毒诱导的基因沉默(BSMV-VIGS)实验证明, 转录因子 *TuGTγ-3* 正向调控了乌拉尔图小麦对条锈病的抗性。

关键词: 乌拉尔图小麦; 转录因子; *TuGTγ-3* 基因; 条锈病抗性; BSMV-VIGS

收稿日期: 2016-04-18; 修回日期: 2016-07-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 31471484)和国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号: 2013CB127703)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31471484) and National Basic Research Program of China (973 Plan) (No. 2013CB127703)]

作者简介: 丁刘军, 硕士研究生, 专业方向: 作物遗传育种学。E-mail: ljding@genetics.ac.cn

通讯作者: 范仁春, 助理研究员, 研究方向: 小麦抗病基因的分离与功能研究。E-mail: rcfan@genetics.ac.cn

张相岐, 研究员, 研究方向: 小麦重要基因克隆与分子育种。E-mail: xqzhang@genetics.ac.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.16-133

网络出版时间: 2016/9/13 13:37:42

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160913.1337.002.html>

Transcription factor gene *TuGTγ-3* is involved in the stripe rust resistance in *Triticum urartu*

LiuJun Ding^{1,2}, Mingyu Pu^{1,2}, Bo Wei¹, Xianping Wang¹, Renchun Fan¹, Xiangqi Zhang¹

1. State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Wheat stripe rust, caused by *Puccinia striiformis* West. f. sp. *tritici* Eriks. & Henn. (*Pst*), is a serious fungal disease. Identification of new genes associate with stripe rust resistance is important for developing disease resistant wheat cultivars and studying the mechanism of disease resistance. Trihelix is a plant specific transcription factor family, which is involved in regulation of growth and development, morphogenesis, and response to stresses. So far, no study reports on the relationship between the Trihelix family and wheat stripe rust. In this study, a gene in the GTγ subfamily of *Trihelix* family, designated *TuGTγ-3*, was cloned from *Triticum urartu* Tum. (2n=2x=14, AA). The results of sequencing demonstrated that *TuGTγ-3* gene consisted of a complete open reading frame (ORF), and its coding sequence was 1329 bp in length, which encoded a protein with 442 amino acids. The predicted molecular weight of this protein was 50.31 kDa and the theoretical isoelectric point was 6.12. Bioinformatic analysis revealed that *TuGTγ-3* protein had a monopartite nuclear localization signal (GLPMQKKMRYT), and had neither transmembrane domain nor signal peptide. The conserved trihelix domain, the fourth α-helix and the CC domain were located in the regions of Q¹¹⁵–R¹⁸⁷, F²³⁴–Y²⁴¹ and K³⁶²–K⁴³⁶, respectively. Dissection of secondary structure showed that *TuGTγ-3* protein comprised of 43.89% α-helix, 9.51% extended strand, 9.95% β-turn and 36.65% random coil structures. Based on the BLAST search against the genome database of common wheat from IWGSC, *TuGTγ-3* was located on the long arm of chromosome 5A. Transient expression experiment using onion inner epidermal cell showed that the fusion protein *TuGTγ-3*-GFP distributed mainly in nuclear and slightly in cytoplasm. Expression profiles in different organs indicated that expression level of *TuGTγ-3* was much higher in leaves than that in roots or leaf sheaths, and the expression in leaves was extremely up-regulated by infection of the *Pst* race CYR32. Furthermore, the BSMV-VIGS experiment demonstrated that the transcription factor *TuGTγ-3* positively regulated resistance to stripe rust in *T. urartu*.

Keywords: *Triticum urartu*; transcription factor; *TuGTγ-3*; stripe rust resistance; BSMV-VIGS

条锈病在世界各主要小麦产区广为流行并造成严重减产。因此, 发掘小麦条锈病抗性相关基因对于深入理解小麦对条锈病的抗性机制和抗病育种均具有重要意义。

Trihelix 是植物特有的转录因子家族, 其主要结构特征是具有一个能与 DNA 特异结合的串联三螺旋结构域——trihelix^[1]。功能研究发现, Trihelix 家族不同成员分别参与光应答反应^[2,19]、生物及非生物胁迫应答^[3~12]、花被发育^[13~15]、胚胎成熟^[16~18]等过程。目前, 关于 Trihelix 家族基因参与生物胁迫应答的报道还很少。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.)

Heynh.)的 *AtGT-3b* 基因和大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)的 *SCaM-4* 基因受大豆细菌性叶斑病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* (Coerper) Young, Dye & Wilkie)诱导上调表达, 可能在病原菌胁迫应答过程中发挥作用^[3]。水稻(*Oryza sativa* L.)的 *rml1* 基因编码一个类 GT-1 转录因子, 它受稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr)诱导上调表达^[5]。拟南芥的 ASR3 作为转录抑制子反向调节 PTI(PAMP-triggered immunity)过程, 主要是通过 MAMP (Microbe associated molecular pattern)激活的 MPK4 的磷酸化来微调植物免疫基因的表达^[9]。GTγ

是 Trihelix 家族的一个重要亚家族,该亚家族 trihelix 结构域中的 3 个 α 螺旋起始或附近的保守氨基酸残基分别为 W、W 和 F^[19]。GT γ 亚家族成员的功能研究主要在非生物胁迫方面。拟南芥的 *HRA1* 参与了对低氧的应答过程^[10]。水稻 *OsGT γ -1* 基因受盐胁迫的诱导而强烈上调表达,同时也受干旱、低温、ABA 处理等的诱导表达^[4]。目前还没有关于 GT γ 亚家族基因参与生物胁迫应答方面的报道。

本研究从乌拉尔图小麦(*Triticum urartu* Tum., 2n=2x=14, AA, 普通小麦 A 基因组的供体种)中克隆了 1 个 GT γ 亚家族基因 *TuGT γ -3*, 并证明其正调控乌拉尔图小麦对条锈病的抗性。

1 材料和方法

1.1 材料

乌拉尔图小麦 G1812(PI428198)和 PI538724 由中国科学院遗传与发育生物学研究所张爱民研究员、唐定中研究员和李义文博士提供。条锈菌小种 CYR32 由中国农业科学院植物保护研究所徐世昌研究员提供。

1.2 方法

1.2.1 植物材料培养

选择饱满的乌拉尔图小麦(*T. urartu*)种子播种于盛有混合土壤(花卉营养土与蛭石比例 1:1)的花盆中,置光照培养箱(22 ℃,10000 Lux 光照 16 h;18 ℃,黑暗 8 h)中生长。

1.2.2 总 RNA 和基因组 DNA 的提取及 cDNA 合成

参照 Promega 公司的 SV Total RNA Isolation System 说明书进行植物不同组织的总 RNA 提取和

纯化。选用 TIANGEN®公司的离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒(Plant Genomic DNA Kit)提取植物组织的基因组 DNA,操作按说明书进行。采用 Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H-, TaKaRa)反转录系统合成 cDNA,实验操作参照说明书进行。

1.2.3 乌拉尔图小麦 *TuGT γ -3* 基因的克隆

以水稻基因 *OsGT γ -3*(Os12g06640, 来自水稻基因组数据库 <http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)作为检索序列,利用 NCBI 的本地 BLAST 模块,检索乌拉尔图小麦(G1812)CDS 数据库(由中国科学院遗传与发育生物学研究所张爱民研究员提供),获得同源基因序列 *TuGT γ -3*。根据检索到的 *TuGT γ -3* 序列,利用 Oligo 7 辅助设计特异引物组合 *TuGT γ -3-F* 和 *TuGT γ -3-R*(表 1),并利用该引物组合及高保真酶 Prime STAR® HS DNA Polymerase (TaKaRa)分别从乌拉尔图小麦的 cDNA 和基因组 DNA 中扩增 *TuGT γ -3* 基因编码区全长序列。利用 1%琼脂糖凝胶电泳分离扩增片段,采用离心柱型 DNA 回收纯化试剂盒(Universal DNA Purification Kit, TIANGEN)回收和纯化目标片段。然后,再利用 pLB 零背景快速克隆试剂盒(Lethal Based Fast Cloning Kit, TIANGEN)将目标片段连接到 pLB Vector 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(TIANGEN),过夜培养后挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定。菌落鉴定后的阳性克隆由上海英潍捷基生物技术公司进行测序。

1.2.4 相关 GT γ 亚家族基因序列信息的获取及生物信息学分析

水稻和拟南芥 GT γ 亚家族基因序列信息根据 Kaplan-Levy 等^[19]的报道,分别检索自水稻基因组注

表 1 基因克隆、亚细胞定位及 qRT-PCR 所用引物

Table 1 Primers used in gene isolation, subcellular localization and qRT-PCR

引物名称	序列(5' 3')	用途
TuGT γ -3-F TuGT γ -3-R	ATGGAAGGCAATAACCTG CATGAATGATTGACATTTC	扩增 <i>TuGTγ-3</i> 基因编码区全长序列
Loc-TuGT γ -3F Loc-TuGT γ -3R	TGGT CGAC ATGGAAGGCAATAACCTGCCA CC GTCGAC TGAATGATTGACATTTCCTTCAGC	构建 pJIT163:TuGT γ -3-hGFP 瞬时表达载体
TuGT γ -3Primer	CCAGCTTGCTTTGACACAGA	鉴定 pJIT163:TuGT γ -3-hGFP 载体
Tubulin-F Tubulin-R	TGAGGACTGGTGCTTACCGC GCACCATCAAACCTCAGGGA	克隆荧光定量 PCR 的内参基因 <i>Tubulin</i>
DTuGT γ -3F DTuGT γ -3R	GGAGCAACTTATGGCAGTTCAGAC ACCATGCTCCTCATATCGCTC	荧光定量 PCR 检测 <i>TuGTγ-3</i> 基因的相对表达量

注:粗体下划线序列为限制性内切酶 *Sal* 酶切位点。

释数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>)和拟南芥 TAIR 基因数据库(<http://www.arabidopsis.org/>); 番茄(*Solanum lycopersicum* Mill.) GT γ 亚家族基因信息根据 Yu 等^[20]的报道, 检索自番茄基因组数据库(<https://solgenomics.net/search/locus>); 二穗短柄草(*Brachypodium distachyum* (L.) Beauv.) 和高粱(*Sorghum bicolor* (L.) Moench) GT γ 亚家族基因的编号信息来自水稻的同源基因检索, 基因序列信息来自美国能源部联合基因组研究所(Joint Genome Institute, United States Department of Energy)的 Phytozome 数据库(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)。

利用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)计算蛋白质的分子量和理论等电点; 利用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测蛋白的跨膜结构域; 利用 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析蛋白的信号肽; 利用 cNLS Mapper(http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)在线预测目标蛋白的核定位信号; 利用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测目标蛋白的二级结构; 利用 SMART(http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)分析目标蛋白的保守结构域; 利用 DNAMAN 进行核酸及氨基酸多序列比对; 利用 MEGA 6 软件采用 Neighbor-Joining 方法构建基于氨基酸序列的系统进化树, Bootstrap 值的计算设 B=1000。利用 IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium)的普通小麦中国春基因组数据库(<http://www.wheatgenome.org/>)对克隆的基因进行染色体定位。

1.2.5 *TuGTγ-3* 蛋白的亚细胞定位

参照 Scott 的洋葱表皮细胞瞬时表达方法^[21]构建 *TuGTγ-3* 基因的瞬时表达载体 pJIT163:*TuGTγ-3*-hGFP, 进行 *TuGTγ-3* 蛋白的亚细胞定位。构建瞬时表达载体所用的引物见表 1。对照载体 pJIT163:hGFP 按照本实验室以前的方法^[23]构建。采用基因枪法转化洋葱内表皮细胞, 具体操作参照 PDS-1000He 型基因枪的使用说明书进行。瞬时表达阳性的洋葱表皮细胞用双光子激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss LSM710 NLO)观察和拍照。

1.2.6 *TuGTγ-3* 基因的表达谱分析

抗条锈病的乌拉尔图小麦(PI538724)在人工气候箱中生长至三叶期, 分别取幼苗的根、叶鞘和叶片进行组织器官表达模式分析。

条锈菌诱导表达谱分析的材料准备程序如下: 乌拉尔图小麦(PI538724)在人工气候箱中生长至两叶期, 参考本实验室以前 Zhou 等^[23]在普通小麦上使用的方法接种条锈菌小种 CYR32。接种前用 0.05% 的吐温 20 溶液对幼苗进行喷雾; 将收集的新鲜条锈菌夏孢子与适量的滑石粉混合后, 均匀洒落在幼苗叶片上; 接种后的幼苗在 11 ℃ 黑暗条件下保湿培养 24 h, 然后置于培养室中正常生长, 培养条件为 22 ℃、8000~10000 Lux 光照 16 h, 18 ℃ 黑暗 8 h。分别在 CYR32 接种后 1~14 d 取叶片分析表达谱, 每天取样一次。同时, 平行取只喷吐温 20 溶液而未接种条锈菌的幼苗叶片为对照。每个时间点取样均设 4 个生物学重复, 所取样品立即放入液氮中速冻。

选用 Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System 对 *TuGTγ-3* 基因在不同组织器官和条锈病菌接种后的表达谱进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析, 具体操作按荧光试剂 SYBR[®] Premix Ex Taq[™](Tli RNaseH Plus)的说明书进行。以 *Tubulin* 基因作为内参基因, 检测设计引物的扩增效率, 选取扩增效率高(99.98%)且与内参基因的扩增效率无显著差异的引物作为定量 PCR 引物(表 1)。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[22]计算基因的相对表达量, 用 Excel、Prism 和 Photoshop 等软件进行统计分析和绘图。

1.2.7 *TuGTγ-3* 基因的抗条锈病功能分析

采用大麦条纹花叶病毒诱导基因沉默(BSMV-VIGS)方法分析 *TuGTγ-3* 基因的抗条锈病功能。首先利用 si-Fi 3.2 软件(<http://labtools.ipk-gatersleben.de/#Download>)分析了 *TuGTγ-3* 基因的 RNAi 靶标特异性和沉默效率。然后, 以乌拉尔图小麦的八氢番茄红素脱氢酶基因 *TuPDS* 作为报告基因对 BSMV-VIGS 系统在乌拉尔图小麦中的有效性进行了分析, 选取的沉默片段为编码区的第+657~+807 位碱基区间的 151 bp 序列。对于目标基因 *TuGTγ-3*, 选取编码区+227~+371 位碱基区间的 145 bp 序列作为沉默片段。参照本实验室 Zhou 等^[23]以前在普通小

麦上的 BSMV-VIGS 方法构建目标基因的重组病毒载体 BSMV:TuGT γ -3, 所用引物见表 2。原始的 BSMV 病毒载体(RNA α , β , $\gamma_{\text{gammab:GFP}}$)由 Andy Jackson 教授(University of California, Berkeley, USA)惠赠。

利用抗条锈病的乌拉尔图小麦 PI538724 分析 *TuGT γ -3* 基因的抗条锈病功能。PI538724 在培养箱中生长至第二叶展开期(12 天龄), 参照 Zhou 等^[23] 以前在普通小麦上的方法分别接种目标基因重组病毒载体 BSMV:TuGT γ -3 和阴性对照载体 BSMV:GFP 于供试乌拉尔图小麦幼苗的第二叶上, 同时以不含病毒转录物的 1 \times GKB 缓冲液模拟接种的植株作为空白对照(Mock)。接种和模拟接种的材料在室温条件下保湿避光培养 48 h, 然后置于正常条件的人工气候室中生长。12 d 后接种条锈菌小种 CYR32 于重组病毒侵染植株的第三叶上, 接种 14 d 后调查和记录各处理植株对 CYR32 的反应型, 同时取第四叶检测病毒 *CP* 基因和 *TuGT γ -3* 基因的表达水平, 以评估重组病毒的侵染情况及其对目标基因 *TuGT γ -3* 的沉默效果。

2 结果与分析

2.1 *TuGT γ -3* 基因的克隆与序列分析

用水稻基因 *OsGT γ -3*(Os12g06640)的 CDS 序列作为比对基准对乌拉尔图小麦(G1812)的 CDS 数据库进行 BLAST 分析, 选取同源性最高的序列 TRIUR3_11128 作为水稻 *OsGT γ -3* 基因在乌拉尔图小麦中的同源基因, 命名为 *TuGT γ -3*。电子克隆的 *TuGT γ -3* 基因编码区序列全长 1311 bp。随后, 利用根据 TRIUR3_11128 序列设计的能够扩增 *TuGT γ -3*

基因编码区全长的特异引物组合 TuGT γ -3-F 和 TuGT γ -3-R(表 1)对乌拉尔图小麦 PI538724 的 cDNA 和基因组 DNA 进行扩增, 结果两种模板均扩增出了 1 个约 1.3 kb 的片段(结果未显示), 与预期长度相符。序列分析显示, 从 cDNA 扩增的 *TuGT γ -3* 基因编码区序列(CDS)全长 1329 bp, 与电子克隆的序列相比, PI538724 与 G1812(PI428198)的 *TuGT γ -3* 基因编码区序列之间存在 5 个 SNP 和一个 18 bp InDel 的差异, 但这些序列差异并未影响到编码序列的通读, 引起的氨基酸变化也未改变 trihelix 保守结构域。序列分析还显示, 基因组 DNA 扩增的序列与 cDNA 序列相同, 说明 *TuGT γ -3* 基因的编码区不存在内含子。根据编码区序列推测, *TuGT γ -3* 基因编码一个由 442 个氨基酸残基组成的转录因子蛋白, 估算分子量为 50.31 kDa, 理论等电点为 6.12。生物信息学分析表明: TuGT γ -3 蛋白有一个单分型核定位信号(Monopartite-NLS, GLPMQKKMRYT), 没有跨膜结构域和信号肽。二级结构分析显示, TuGT γ -3 蛋白由 43.89%的 α -螺旋、9.51%的伸展链、9.95%的 β -转角和 36.65%的不规则卷曲组成; TuGT γ -3 蛋白含有保守的 trihelix 结构域、第四 α -螺旋和 CC 结构域, 它们在蛋白分子中的位置分别在 Q¹¹⁵~R¹⁸⁷、F²³⁴~Y²⁴¹和 K³⁶²~K⁴³⁶氨基酸序列区间; trihelix 结构域的 3 个 α 螺旋的起始点或附近存在的保守氨基酸残基分别为 W、W 和 F(图 1)。以上分析结果表明, 从乌拉尔图小麦中克隆的 *TuGT γ -3* 基因具有 GT γ 亚家族转录因子的保守结构域, 是一个典型的 Trihelix 家族的 GT γ 亚家族成员。*TuGT γ -3* 基因序列已在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)注册, 登录号为 KX514434。

表 2 BSMV-VIGS 实验所用引物
Table 2 Primers used in BSMV-VIGS experiment

名称	序列(5' 3')	用途	沉默片段长度/位置
γ -strain-p	CAACTGCCAATCGTGAGTAGG	鉴定 γ 链质粒插入方向	—
CP-F	TGACTGCTAAGGGTGGAGGA	检测 <i>CP</i> 基因的表达	—
CP-R	CGGTTGAACATCACGAAGAGT		
V-TuPDS-F	TGGCTAGCCCGTGACGAGTTATCCATGCAG	构建 BSMV:TuPDS 载体	151 bp/+657~+807
V-TuPDS-R	ACGGCTAGCTACGAGAATTCAGCCGGACC		
V-TuGT γ -3F	GAGGCTAGCAGGTCCACCATCACCCTAT	构建 BSMV:TuGT γ -3 载体	145 bp/+227~+371
V-TuGT γ -3R	CCAGCTAGCACCATTTGAATCCGTCCACTT		

注: 粗体下划线序列为限制性内切酶 *Nhe* 酶切位点。

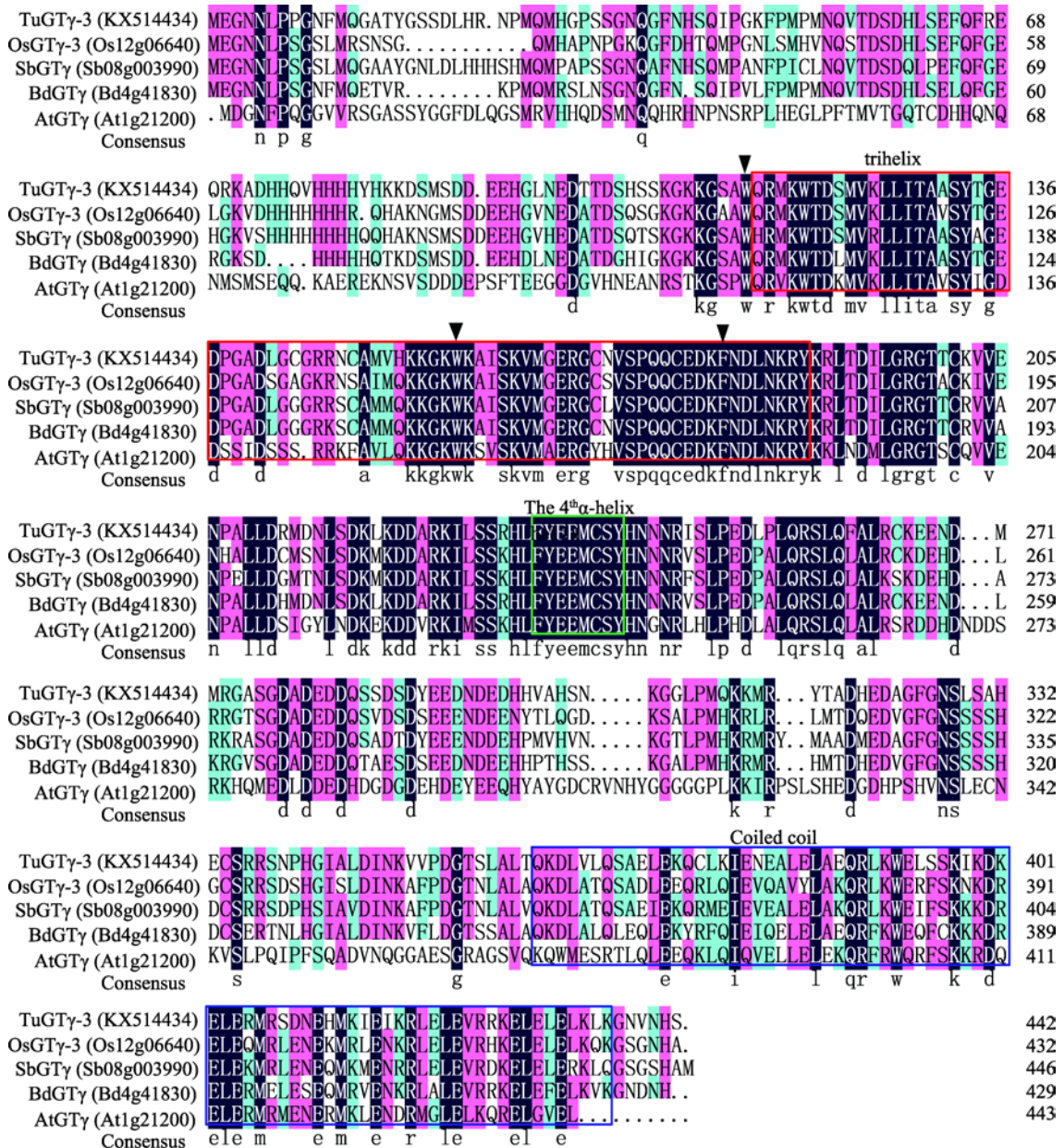


图 1 乌拉尔图小麦 *TuGTγ-3* 与其他物种 *GTγ* 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences of *TuGTγ-3* from *T. urartu* and other *GTγ* proteins from different species. *OsGTγ-3* (Os12g06640) 来自水稻 (*O. sativa*); *SbGTγ* (Sb08g003990) 来自高粱 (*S. bicolor*); *BdGTγ* (Bd4g41830) 来自二穗短柄草 (*B. distachyon*); *AtGTγ* (At1g21200) 来自拟南芥 (*A. thaliana*). 红框中为 trihelix 结构域, 绿框中为第四螺旋, 蓝框中为 CC 结构域, 黑色箭头示 *GTγ* 亚家族的保守氨基酸残基。

2.2 乌拉尔图小麦 *TuGTγ-3* 蛋白与不同物种 *GTγ* 亚家族成员的亲缘关系分析

利用 MEGA 6 软件构建了乌拉尔图小麦的 *TuGTγ-3* 蛋白与水稻、高粱、二穗短柄草、拟南芥和番茄的 *GTγ* 亚家族成员的 Neighbor-Joining 系统进化树 (图 2)。由进化树可见, 乌拉尔图小麦的

TuGTγ-3 与二穗短柄草 *BdGTγ* (Bd4g41830)、高粱 *SbGTγ* (Sb08g003990) 和水稻 *OsGTγ-3* (Os12g06640) 聚在同一个进化枝, 说明与它们的亲缘关系较近。其中, *TuGTγ-3* 与二穗短柄草 *BdGTγ* (Bd4g41830) 同处于一个最小的分枝中, 说明分化时间最晚, 是亲缘关系最近的直系同源基因 (Orthologous gene)。

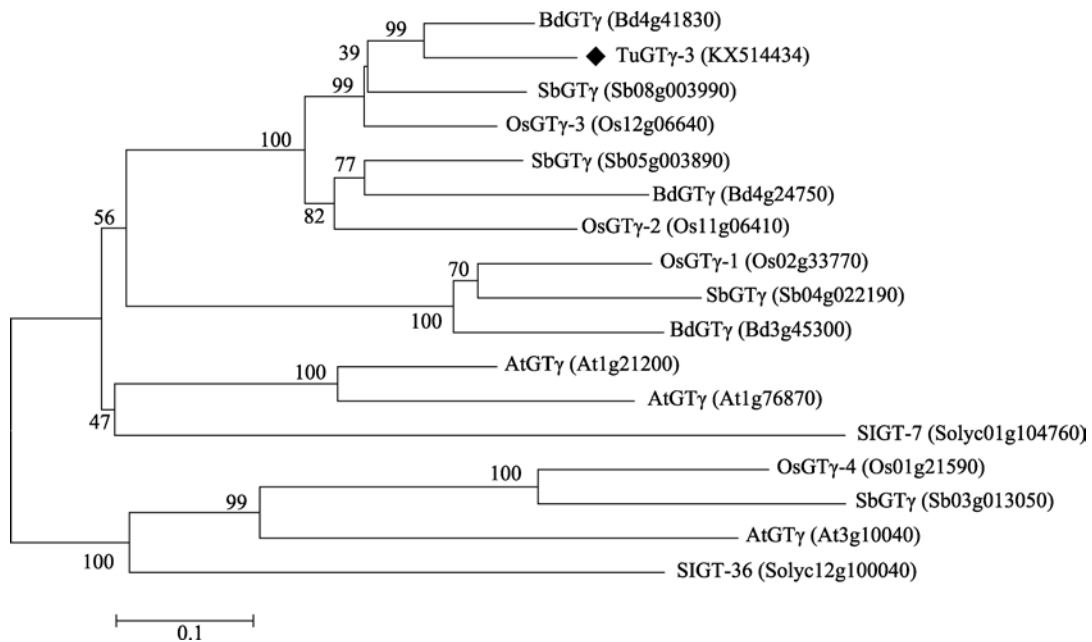


图 2 乌拉尔图小麦转录因子 *TuGTγ-3* 与其他 *GTγ* 亚家族成员的 N-J 系统进化树

Fig. 2 Neighbor-Joining phylogenetic tree of transcription factor *TuGTγ-3* from *T. urartu* and other *GTγ* sub-family members

2.3 *TuGTγ-3* 基因的染色体定位和蛋白的亚细胞定位

对 IWGSC(International Wheat Genome Sequencing Consortium)的普通小麦中国春(Chinese Spring)基因组数据库进行 BLAST 分析发现, *TuGTγ-3* 基因序列所在的 scaffold(TRIUR3_11128, locus=scaffold26979: 7760:9070)来自 5A 连锁群的长臂, 由此说明 *TuGTγ-3* 基因位于 5A 染色体长臂上。

蛋白质在细胞中的分布往往代表其行使功能的亚细胞部位, 可为蛋白功能研究提供线索。因此, 本文利用洋葱表皮细胞瞬时表达方法对 *TuGTγ-3* 蛋白进行了亚细胞定位。细胞瞬时表达结果显示, *TuGTγ-3* 蛋白主要定位在细胞核中, 同时在细胞质中也有少量分布(图 3)。这与转录因子主要在细胞核中调控基因表达的功能特征是相符的。

2.4 *TuGTγ-3* 基因表达谱

2.4.1 *TuGTγ-3* 基因的组织器官表达谱

利用 qRT-PCR 方法在苗期检测了 *TuGTγ-3* 基因的组织器官表达谱。结果显示, *TuGTγ-3* 基因在根、叶鞘和叶片组织中均有表达, 但在叶片中的表达量最高, 分别约为根和叶鞘中表达量的 7 倍和 9 倍(图

4)。这暗示 *TuGTγ-3* 基因可能主要与叶片参与的功能相关。

2.4.2 *TuGTγ-3* 基因在小麦条锈菌胁迫下的表达谱

为了探究 *TuGTγ-3* 基因是否参与了乌拉尔图小麦对条锈病的抗性反应过程, 本文首先分析了 *TuGTγ-3* 基因在对条锈病免疫的乌拉尔图小麦 PI538724 中条锈菌胁迫条件下的表达谱。结果显示, 乌拉尔图小麦 PI538724 中的 *TuGTγ-3* 基因受小麦条锈菌小种 CYR32 的侵染诱导而显著上调表达。由表达谱可见, 从接种后 24 h(黑暗低温保湿培养结束, 条锈菌完成侵染)第一次取样到接种后第 14 d 最后一次取样(孢子堆已成熟并开裂), *TuGTγ-3* 基因一直持续极显著地上调表达(图 5)。这暗示 *TuGTγ-3* 基因很可能参与了乌拉尔图小麦对条锈病菌侵染的应答过程。

2.5 *TuGTγ-3* 基因的抗条锈病功能分析

病毒诱导的基因沉默(Virus induced gene silencing, VIGS)是研究植物基因功能的一种有效方法。基于大麦条纹花叶病毒(Barley stripe mosaic virus, BSMV)建立的病毒诱导基因沉默系统(BSMV-VIGS)在

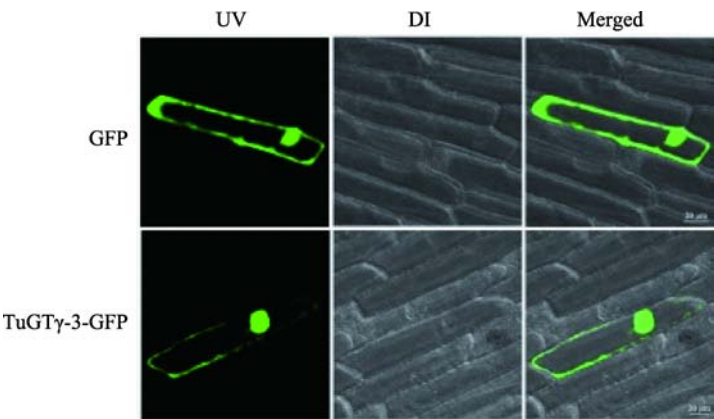


图 3 *TuGTγ-3* 蛋白在洋葱内表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of *TuGTγ-3* protein in onion inner epidermal cells

GFP : 只表达报告基因 GFP 的阴性对照细胞 ; *TuGTγ-3*-GFP : 表达 *TuGTγ-3* 与 GFP 融合蛋白的细胞 ; UV : 紫外光(Ultraviolet)激发下的图像 ; DI : 微分干涉(Differential Interference)图像 ; Merged : 合成图像。

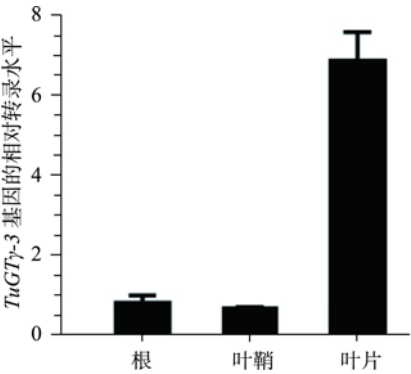


图 4 *TuGTγ-3* 基因在乌拉尔图小麦 PI538724 不同组织器官中的表达谱

Fig. 4 Expression patterns of *TuGTγ-3* in different organs of *T. urartu* (PI538724)

小麦和大麦等的基因功能研究中已得到广泛应用^[23-25]。本研究在表达谱分析的基础上,进一步利用 BSMV-VIGS 系统分析了乌拉尔图小麦 *TuGTγ-3* 基因在抗小麦条锈病方面的功能。

首先,利用 si-Fi 软件对 *TuGTγ-3* 基因的 RNAi 结构进行了预测。结果表明,利用 *TuGTγ-3* 基因序列可同时检测到序列 TRIUR3_11128、TRIUR3_08128 和 TRIUR3_28119,其有效沉默匹配位点分别为 484、5 和 5。而利用构建 VIGS 载体所用的沉默片段(+227~+371)只能预测到序列 TRIUR3_11128。以上预测结果说明,所构建的 VIGS 载体具有很高的沉默特异性。

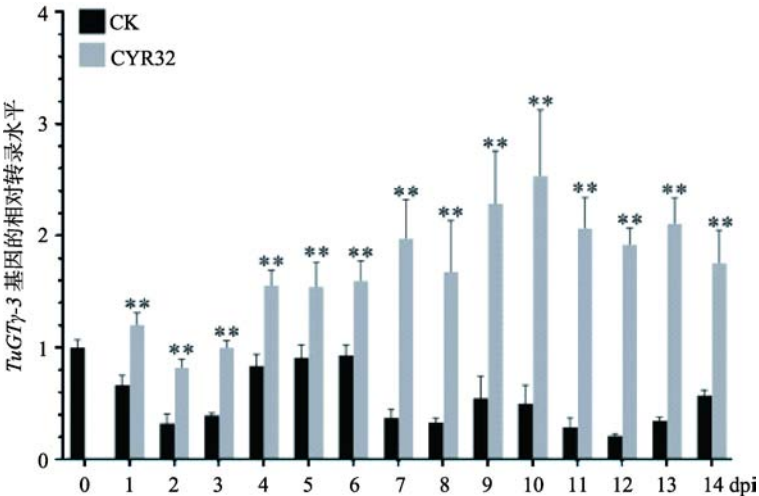


图 5 *TuGTγ-3* 基因在条锈菌小种 CYR32 侵染的乌拉尔图小麦(PI538724)叶片中的表达谱

Fig. 5 Expression profiles of *TuGTγ-3* in leaves of *T. urartu* (PI538724) seedlings infected by *Pst* CYR32

dpi : 接种条锈菌后的天数(Days post inoculation)。

由于利用 BSMV-VIGS 实验系统验证乌拉尔图小麦基因的功能尚未见报道, 所以本文对该系统在乌拉尔图小麦中的有效性进行了验证。实验参考 Zhou 等^[23]在普通小麦上的方法, 选择乌拉尔图小麦的八氢番茄红素脱氢酶基因 *TuPDS* 作为报告基因。结果表明, 当接种重组病毒 BSMV:TuPDS 的转录物降低 *TuPDS* 基因的表达后, 叶片出现典型的光漂白表型(图 6A)。从而说明 BSMV-VIGS 实验系统用于二倍体的乌拉尔图小麦是有效的。

随后, 本文利用 *TuGTγ-3* 基因的重组病毒载体 BSMV:TuGTγ-3 和阴性对照载体 BSMV:GFP 分别侵染抗小麦条锈病的乌拉尔图小麦 PI538724 幼苗的第二叶, 12 d 后(第三叶展开期)接种条锈菌小种 CYR32。继续培养 14 d 后调查第三叶对 CYR32 的反应型, 同时取第四叶检测病毒 CP 基因和 *TuGTγ-3* 基因的表达水平。CP 基因的表达分析显示, 在重组病毒 BSMV:TuGTγ-3 和 BSMV:GFP 侵染的幼苗叶片中都有 CP 基因的高水平表达, 而模拟接种(Mock)的幼苗叶片中则完全检测不到 CP 基因的转录本(图 6B)。同时定量检测 *TuGTγ-3* 基因的表达水平结果表明,

在重组病毒 BSMV:TuGTγ-3 侵染的幼苗中, *TuGTγ-3* 基因的表达量较 BSMV:GFP 侵染的幼苗(阴性对照)下降了 61%, 达到极显著水平(图 6C)。从而说明重组病毒对乌拉尔图小麦幼苗的侵染是成功的, 并有效降低了目标基因 *TuGTγ-3* 的转录水平。重组病毒侵染的幼苗接种小麦条锈菌小种 CYR32 14 d 后的叶片表型如图 6D 所示。BSMV:TuGTγ-3 侵染的幼苗叶片出现了条锈菌的孢子堆, 并且孢子堆可正常开裂, 反应型为 3 级, 属于感病表型。同时, BSMV:GFP 侵染的幼苗(阴性对照)叶片表型与模拟接种(Mock)的植株叶片相似, 既没有条锈菌的孢子堆产生, 也没有过敏性坏死斑出现, 仍然处于正常的免疫状态(反应型为 0 级)。本文也注意到, 虽然 VIGS 后的 PI538724 植株表现为感病表型(反应型为 3 级), 但是严重度在所有感病植株中都比较低, 均在 10% 以下。同时, 感染叶片出现大面积褪绿现象, 并且产生的时间较早(接种后 7 d 左右), 发展也较快。产生这种现象的原因尚不清楚, 也可能是与普通小麦不同的一种感病表现形式。总之, BSMV-VIGS 降低 *TuGTγ-3* 基因的表达后, 对小麦条锈菌小种 CYR32

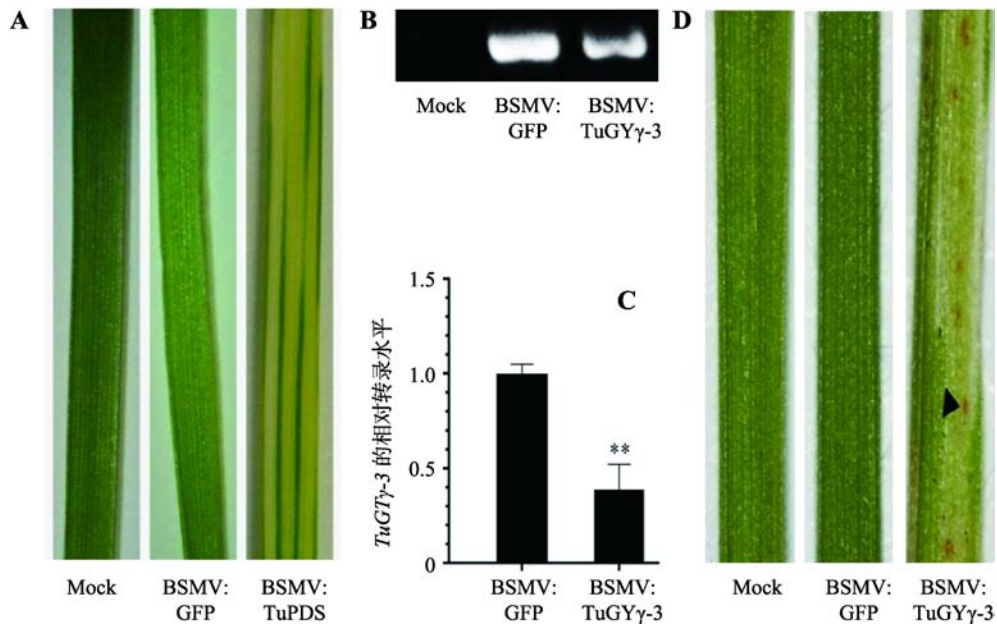


图 6 利用 BSMV-VIGS 技术分析 *TuGTγ-3* 基因的抗小麦条锈病功能

Fig. 6 Functional analysis of *TuGTγ-3* gene on resistance to stripe rust in *T. urartu* by BSMV-VIGS method

A: BSMV-VIGS 沉默乌拉尔图小麦的 *TuPDS* 基因后叶片出现典型的光漂白表型; B: BSMV 外壳蛋白基因 CP 在重组病毒 BSMV:GFP、BSMV:TuGTγ-3 的转录物侵染的及 Mock 处理的乌拉尔图小麦植株中的表达; C: *TuGTγ-3* 基因在重组病毒 BSMV:GFP 和 BSMV:TuGTγ-3 的转录物侵染的乌拉尔图小麦植株中的相对表达水平; D: 重组病毒 BSMV:GFP 和 BSMV:TuGTγ-3 的转录物侵染的及 Mock 处理的乌拉尔图小麦 PI538724 幼苗接种条锈菌小种 CYR32 后 14 d 时的叶片表型。黑色三角示条锈菌孢子堆。

免疫的乌拉尔图小麦 PI538724 即丧失抗性而沦为感病, 由此证明转录因子 *TuGTγ-3* 作为正调控因子参与了乌拉尔图小麦对条锈病的抗性反应。

3 讨 论

Trihelix 是植物特有的转录因子家族^[19]。截止目前, 有关 Trihelix 家族的研究还较少, 主要来自模式植物拟南芥^[6,8-11,14,15,26-33]、以及水稻^[2,4,5,34-36]、番茄^[20]和少数几种油料和经济作物^[3,7,12,37,38], 而有关小麦属 Trihelix 家族的研究还未见报道。本研究从乌拉尔图小麦中克隆了一个属于 Trihelix 家族 *GTγ* 亚家族的基因成员 *TuGTγ-3*。氨基酸序列及高级结构的生物信息学分析表明, *TuGTγ-3* 蛋白具有 Trihelix 家族特征性的串联三螺旋结构域 trihelix, 以及第四 α -螺旋和 CC 结构(图 1)。因此, *TuGTγ-3* 是一个典型的 Trihelix 家族成员。本文对 *TuGTγ-3* 基因的研究结果为系统研究小麦属植物中 Trihelix 家族的成员组成、结构特征及生物学功能奠定了基础。

Trihelix 家族是一个较小的转录因子家族, 已有的研究表明该家族参与多种生理生化过程^[3-19]。但有关 Trihelix 家族基因参与调控生物胁迫的研究很少, 只在属于 *GT-1* 亚家族的水稻基因 *rm11* 和拟南芥基因 *AtGT-3b* 上有初步的报道。研究表明 *rm11* 受到稻瘟病原菌(*M. grisea*)的诱导而上调表达^[6]。拟南芥的 *AtGT-3b* 基因表达受到大豆细菌性叶斑病(Bacterial blight)病原菌(*P. syringae* pv. *glycinea*)的快速诱导^[4]。迄今, 还没有 Trihelix 家族基因参与抗生物胁迫的充分证据, 也未见关于 *GTγ* 亚家族基因响应生物胁迫的相关报道。本研究的表达谱分析和 BSMV-VIGS 实验结果表明, *TuGTγ-3* 基因受小麦条锈菌 CYR32 侵染的诱导而强烈上调表达(图 5), 当其转录水平被 BSMV-VIGS 显著下调后, 原本对条锈菌小种 CYR32 免疫的乌拉尔图小麦 PI538724 则丧失了抗性, 表现为感病表型(图 6D)。所以, 本研究从诱导表达和沉默表型两个方面都证明 *TuGTγ-3* 基因参与了乌拉尔图小麦对条锈菌的抗性反应过程。这是首次发现 *GTγ* 亚家族成员参与植物对生物胁迫的应答。

本研究分别从乌拉尔图小麦的抗条锈病基因型 PI538724 和感病基因型 G1812 中克隆了 *TuGTγ-3* 基因, 序列比对发现两者存在 5 个 SNP 和 1 个 18 bp

的 InDel。5 个 SNP 导致 3 个氨基酸残基的差异, 而 18 bp 的 InDel 则使感病基因型 G1812 的 *TuGTγ-3* 蛋白较抗病基因型 PI538724 的同源蛋白缺失了 6 个氨基酸残基。但两者之间的序列差异是否与抗性差异有关, 或其中的哪一个序列差异与抗性差异有关尚有待进一步研究。另外, 本研究从 IWGSC 的普通小麦中国春的测序数据库中搜索到了分别为 A、B 和 D 基因组的 *TuGTγ-3* 同源序列。序列比对显示: 中国春 A 基因组和乌拉尔图小麦 G1812 的 *TuGTγ-3* 编码区序列之间有 7 个 SNP 和 1 个 18 bp InDel 的差异, 序列一致性为 98.12%, 而与 PI538724 的 *TuGTγ-3* 编码区序列之间只有 6 个 SNP 的差异, 序列一致性达到 99.55%; 中国春 D 基因组与 G1812 的 *TuGTγ-3* 编码区序列之间存在 23 个 SNP 和 1 个 18 bp InDel 的差异, 序列一致性为 96.91%, 而与 PI538724 的 *TuGTγ-3* 的编码区序列之间有 18 个 SNP 的差异, 序列一致性达到 98.65%; 来自中国春 B 基因组的 *TuGTγ-3* 的同源序列与从乌拉尔图小麦 G1812 和 PI538724 中克隆的两个基因序列之间的一致性也很高, 分别达到 95.86% 和 97.59%, 但该序列没有完整的 ORF, 编码区出现 43 个终止密码子, 是一个假基因。这一方面说明 *GTγ-3* 基因具有很高的保守型, 另一方面也说明 *GTγ-3* 在小麦属植物的不同基因组和不同物种间都存在多态性。可以推测, 这些序列多态性很可能造成抗病调控网络的差异, 最终导致抗病表型的不同。

致谢

感谢中国科学院遗传与发育生物学研究所张爱民研究员、唐定中研究员和李义文博士提供乌拉尔图小麦种子, 以及小麦条锈病鉴定平台林凡云和胡盼老师在条锈病接种鉴定方面给予的帮助。感谢中国农业科学院植物保护研究所徐世昌研究员提供条锈菌菌种 CYR32 和作物科学研究所李洪杰研究员在文章修改过程中所给予的帮助和建议。

参考文献(References):

- [1] Luo JL, Zhao N, Lu CM. Plant Trihelix transcription factors family. *Hereditas (Beijing)*, 2012, 34(12): 1551–1560. 罗军玲, 赵娜, 卢长明. 植物 Trihelix 转录因子家族研究进展. *遗传*, 2012, 34(12): 1551–1560. [DOI]

- [2] Kay SA, Keith B, Shinozaki K, Chye ML, Chua NH. The rice phytochrome gene: structure, autoregulated expression, and binding of GT-1 to a conserved site in the 5' upstream region. *Plant Cell*, 1989, 1(3): 351–360. [DOI]
- [3] Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee SH, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC, Cho MJ. Pathogen- and NaCl-induced expression of the *SCaM-4* promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol*, 2004, 135(4): 2150–2161. [DOI]
- [4] Fang YJ, Xie KB, Hou X, Hu HH, Xiong LZ. Systematic analysis of GT factor family of rice reveals a novel subfamily involved in stress responses. *Mol Genet Genom*, 2010, 283(2): 157–169. [DOI]
- [5] Wang R, Hong GF, Han B. Transcript abundance of *rml 1*, encoding a putative GT1-like factor in rice, is up-regulated by *Magnaporthe grisea* and down-regulated by light. *Gene*, 2004, 324: 105–115. [DOI]
- [6] Wang XH, Li QT, Chen HW, Zhang WK, Ma B, Chen SY, Zhang JS. Trihelix transcription factor *GT-4* mediates salt tolerance via interaction with *TEM2* in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 2014, 14(1): 339. [DOI]
- [7] Xie ZM, Zou HF, Lei G, Wei W, Zhou QY, Niu CF, Liao Y, Tian AG, Ma B, Zhang WK, Zhang JS, Chen SY. Soybean Trihelix transcription factors GmGT-2A and GmGT-2B improve plant tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2009, 4(9): e6898. [DOI]
- [8] Xi J, Qiu YJ, Du LQ, Poovaiah BW. Plant-specific trihelix transcription factor *AtGT2L* interacts with calcium/calmodulin and responds to cold and salt stresses. *Plant Sci*, 2012, 185–186: 274–280. [DOI]
- [9] Li B, Jiang S, Yu X, Cheng C, Chen SX, Cheng YB, Yuan JS, Jiang DH, He P, Shan LB. Phosphorylation of Trihelix transcriptional repressor ASR3 by MAP KINASE4 negatively regulates *Arabidopsis* immunity. *Plant Cell*, 2015, 27(3): 839–856. [DOI]
- [10] Giuntoli B, Lee SC, Licausi F, Kosmacz M, Oosumi T, van Dongen JT, Bailey-Serres J, Perata P. A Trihelix DNA binding protein counterbalances hypoxia-responsive transcriptional activation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol*, 2014, 12(9): e1001950. [DOI]
- [11] Yoo CY, Pence HE, Jin JB, Miura K, Gosney MJ, Hasegawa PM, Mickelbart MV. The *Arabidopsis* GTL1 transcription factor regulates water use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density via transrepression of *SDD1*. *Plant Cell*, 2010, 22(12): 4128–4141. [DOI]
- [12] Weng H, Yoo CY, Gosney MJ, Hasegawa PM, Mickelbart MV. Poplar GTL1 is a Ca^{2+} /calmodulin-binding transcription factor that functions in plant water use efficiency and drought tolerance. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32925. [DOI]
- [13] Griffith ME, Conceição ADS, Smyth DR. *PETAL LOSS* gene regulates initiation and orientation of second whorl organs in the *Arabidopsis* flower. *Development*, 1999, 126(24): 5635–5644. [DOI]
- [14] Brewer PB, Howles PA, Dorian K, Griffith ME, Ishida T, Kaplan-Levy RN, Kilinc A, Smyth DR. *PETAL LOSS*, a trihelix transcription factor gene, regulates perianth architecture in the *Arabidopsis* flower. *Development*, 2004, 131(16): 4035–4045. [DOI]
- [15] O'Brien M, Kaplan-Levy RN, Quon T, Sappl PG, Smyth DR. *PETAL LOSS*, a trihelix transcription factor that represses growth in *Arabidopsis thaliana*, binds the energy-sensing SnRK1 kinase AKIN10. *J Exp Bot*, 2015, 66(9): 2475–2485. [DOI]
- [16] Tzafrir I, Pena-Muralla R, Dickerman A, Berg M, Rogers R, Hutchens S, Sweeney TC, McElver J, Aux G, Patton D, Meinke D. Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2004, 135(3): 1206–1220. [DOI]
- [17] Gao MJ, Lydiate DJ, Li X, Lui H, Gjetvaj B, Hegedus DD, Rozwadowski K. Repression of seed maturation genes by a Trihelix transcriptional repressor in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 54–71. [DOI]
- [18] Willmann MR, Mehalick AJ, Packer RL, Jenik PD. MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 155(4): 1871–1884. [DOI]
- [19] Kaplan-Levy RN, Brewer PB, Quon T, Smyth DR. The trihelix family of transcription factors—light, stress and development. *Trends Plant Sci*, 2012, 17(3): 163–171. [DOI]
- [20] Yu CY, Cai XF, Ye ZB, Li HX. Genome-wide identification and expression profiling analysis of trihelix gene family in tomato. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 468(4): 653–659. [DOI]
- [21] Scott A, Wyatt S, Tsou PL, Robertson D, Allen NS. Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. *Biotechniques*, 1999, 26(6): 1125, 1128–1132. [DOI]
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408. [DOI]

- [23] Zhou HB, Li SF, Deng ZY, Wang XP, Chen T, Zhang JS, Chen SY, Ling HQ, Zhang AM, Wang DW, Zhang XQ. Molecular analysis of three new receptor-like kinase genes from hexaploid wheat and evidence for their participation in the wheat hypersensitive response to stripe rust fungus infection. *Plant J*, 2007, 52(3): 420–434. [DOI]
- [24] Wang GF, Wei XN, Fan RC, Zhou HB, Wang XP, Yu CM, Dong LL, Dong ZY, Wang XJ, Kang ZS, Ling HQ, Shen QH, Wang DW, Zhang XQ. Molecular analysis of common wheat genes encoding three types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance. *New Phytol*, 2011, 191(2): 418–431. [DOI]
- [25] Bruun-Rasmussen M, Madsen CT, Jessing S, Albrechtsen M. Stability of barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in barley. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2007, 20(11): 1323–1331. [DOI]
- [26] Kaplan-Levy RN, Quon T, O'Brien M, Sappl PG, Smyth DR. Functional domains of the PETAL LOSS protein, a trihelix transcription factor that represses regional growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2014, 79(3): 477–491. [DOI]
- [27] Ayadi M, Delaporte V, Li YF, Zhou DX. Analysis of GT-3a identifies a distinct subgroup of trihelix DNA-binding transcription factors in *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 2004, 562(1–3): 147–154. [DOI]
- [28] García-Cano E, Magori S, Sun Q, Ding ZH, Lazarowitz SG, Citovsky V. Interaction of *Arabidopsis* trihelix-domain transcription factors VFP3 and VFP5 with *Agrobacterium* virulence protein VirF. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142128. [DOI]
- [29] Maréchal E, Hiratsuka K, Delgado J, Nairn A, Qin J, Chait BT, Chua NH. Modulation of GT-1 DNA-binding activity by calcium-dependent phosphorylation. *Plant Mol Biol*, 1999, 40(3): 373–386. [DOI]
- [30] Hiratsuka K, Wu XD, Fukuzawa H, Chua NH. Molecular dissection of GT-1 from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1994, 6(12): 1805–1813. [DOI]
- [31] Nagata T, Niyada E, Fujimoto N, Nagasaki Y, Noto K, Miyanoiri Y, Murata J, Hiratsuka K, Katahira M. Solution structures of the trihelix DNA-binding domains of the wild-type and a phosphomimetic mutant of *Arabidopsis* GT-1: mechanism for an increase in DNA-binding affinity through phosphorylation. *Proteins*, 2010, 78(14): 3033–3047. [DOI]
- [32] Gourrierc JL, Li YF, Zhou DX. Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex. *Plant J*, 1999, 18(6): 663–668. [DOI]
- [33] Breuer C, Kawamura A, Ichikawa T, Tominaga-Wada R, Wada T, Kondou Y, Muto S, Matsui M, Sugimoto K. The Trihelix transcription factor GTL1 regulates ploidy-dependent cell growth in the *Arabidopsis* trichome. *Plant Cell*, 2009, 21(8): 2307–2322. [DOI]
- [34] Ji JH, Zhou YJ, Wu HH, Yang LM. Genome-wide analysis and functional prediction of the Trihelix transcription factor family in rice. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(12): 1228–1241.
纪剑辉, 周颖君, 吴贺贺, 杨立明. 水稻 Trihelix 转录因子家族全基因组分析及功能预测. *遗传*, 2015, 37(12): 1228–1241. [DOI]
- [35] Lin ZW, Griffith ME, Li XR, Zhu ZF, Tan LB, Fu YC, Zhang WX, Wang XK, Xie DX, Sun CQ. Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2007, 226(1): 11–20. [DOI]
- [36] Li CB, Zhou AL, Sang T. Rice domestication by reducing shattering. *Science*, 2006, 311(5769): 1936–1939. [DOI]
- [37] Li Y, Liu XD, Dong YM, Xie ZM, Chen SY. Cloning and functional analysis of the cotton Trihelix transcription factor *GhGT29*. *Hereditas (Beijing)*, 2015, 37(12): 1218–1227.
李月, 刘晓东, 董永梅, 谢宗铭, 陈受宜. 棉花 Trihelix 转录因子 *GhGT29* 基因的克隆及功能分析. *遗传*, 2015, 37(12): 1218–1227. [DOI]
- [38] Green PJ, Kay SA, Chua NH. Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J*, 1987, 6(9): 2543–2549. [DOI]

(责任编辑: 夏先春)