

冬小麦*TaRRA6-D* 基因的克隆及抗寒功能初步分析

孙晨,宋慧珊,刘亚赞,徐铭泽,张达

(东北农业大学生命科学学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:细胞分裂素响应调节子(RR)是细胞分裂素信号转导途径中的重要组分,行使细胞分裂素信号输出与调控下游基因信号应答的重要功能。为了探究小麦RR基因在植物低温胁迫应答中的作用,以强抗寒性冬小麦品种东农冬麦1号(Dn1)为材料,克隆了小麦A型细胞分裂素响应调节基因(*TaRRA6-D*),对其进行生物信息学、亚细胞定位及低温下启动子活性分析,并转化拟南芥野生型创建了过表达株系,进行根长表型观察及抗冻实验。结果表明,*TaRRA6-D*基因(TraesCS5D02G140200)全长1 088 bp,编码序列696 bp,该基因被定位于小麦5D染色体,其编码蛋白为不稳定疏水性蛋白。经系统进化树分析,小麦*TaRRA6-D*蛋白与粗山羊草和大麦RR蛋白的亲缘关系较近。*TaRRA6-D*蛋白定位于细胞核。*TaRRA6-D*启动子区含有响应低温、干旱、光及多种激素的顺式作用元件;*TaRRA6-D*启动子的活性受低温诱导表达。与野生型相比,无论是否添加6-BA,过表达株系根长均显著增长。与野生型相比,过表达株系幼苗抗冻性显著增强,6-BA处理对幼苗抗冻性提高更明显。

关键词:冬小麦(*Triticum aestivum* L.);*TaRRA6-D*基因;基因克隆;抗寒;启动子活性;亚细胞定位

中图分类号:S512.1;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2025)11-1462-11

Cloning and Preliminary Analysis of the Cold Resistance Function of the *TaRRA6-D* Gene in Winter Wheat (*Triticum aestivum* L.)

SUN Chen, SONG Huishan, LIU Yayun, XU Mingze, ZHANG Da

(College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Cytokinin response regulators (RR), as important components of the cytokinin signaling pathway, perform critical functions in cytokinin signaling output and regulation of downstream gene signaling responses. In order to investigate the role of wheat RR genes in response to low-temperature stress, we cloned the A-type cytokinin responsive regulator gene *TaRRA6-D* from the wheat cultivar Dongnongdongmai 1 (Dn1), performed bioinformatics analysis, subcellular localization analysis, and promoter activity analysis under low-temperature. We also genetically transformed *Arabidopsis* wild type to create overexpression lines for phenotypic observation of root length and cold resistance evaluation. Bioinformatics analysis showed that the *TaRRA6-D* gene (TraesCS5D02G140200) was 1 088 bp in total length, with a coding sequence of 696 bp, which was localized to wheat chromosome 5D, and the encoded protein was an unstable hydrophobic protein. The phylogenetic tree analysis showed that the wheat *TaRRA6-D* protein was most closely related to the RR proteins of *Aegilops tauschii* and *Hordeum vulgare*. Transient expression analysis of transformed tobacco showed that *TaRRA6-D* protein was localized in the nucleus. Analysis of cis-acting elements in the promoter region of the gene showed that the *TaRRA6-D* promoter region contained cis-acting elements responsive to low-temperature, drought, light, and a variety of hormones. Expression pattern analysis of the transformed Ara-

收稿日期:2025-02-16 修回日期:2025-05-07

基金项目:国家自然科学基金项目(31701348);黑龙江省科学基金项目(LH2021C022)

第一作者 E-mail:1622045596@qq.com(孙晨)

通讯作者 E-mail:zhangda2011@126.com(张达)

bidopsis thaliana lines showed that *TaRRA6-D* promoter activity was induced to express by low-temperature. Phenotypic observations showed that root length of the overexpression lines increased significantly compared with the wild type, with or without the addition of 6-BA. Seedling freezing resistance assay showed that seedlings of overexpression lines were significantly resistant to low-temperature compared with wild type, and 6-BA treatment significantly improved the freezing resistance of seedlings.

Keywords: Winter wheat (*Triticum aestivum* L.); *TaRRA6-D*; Gene cloning; Cold resistance; Promoter activity; Subcellular localization

小麦作为三大谷物之一,在世界各地广泛种植。黑龙江地处高纬度地区,季节温差大,低温胁迫严重影响了小麦的生长与产量。东农冬麦 1 号(Dn1)是黑龙江省首例能在高寒地区成功越冬的冬小麦品种(返青率高达 85%),具有极强的抗寒性,深入研究其抗寒分子机制有助于挖掘抗寒基因资源,推动抗寒作物品种选育,提高土地利用率,促进作物产业健康稳定发展。

低温影响植物的生长发育、地理分布、产量及质量,植物激素细胞分裂素(CTK)在协调植物的生长发育及对低温胁迫的耐受性方面发挥着重要作用^[1]。研究表明,低温可引起小麦和水稻内源细胞分裂素含量降低^[2],外源细胞分裂素处理可通过增加内源细胞分裂素含量提高低温胁迫下小麦幼苗的耐冷性^[3]。

细胞分裂素响应调节子(cytokinin response regulators,RR)是细胞分裂素信号转导途径的重要组成部分,行使细胞分裂素信号输出与调控下游基因信号应答的重要功能^[4]。RR 参与茎部和根部顶端分生组织发育以及愈伤组织形成和维管形成层发生,诱导根尖向水性、不定根发生、下胚轴伸长、叶片衰老,改变叶序排列、气孔数量、种子萌发、性别分化等生长发育过程,还参与植物抵御干旱、冷害、冻害、高盐等非生物胁迫^[5]。RR 分为 4 种类型:A 型(RRA)、B 型(RRB)、C 型(RRC)和与生物钟相关的伪 RR(PRR)^[6]。B 型 RR 充当细胞分裂素应答的正调节因子,其 C-端含有 GARP 样 DNA 结合结构域,N-端含有受体结构域^[7]。A 型 RR 是细胞分裂素的应答基因,可直接受 B 型 RR 调节^[8],其 N-端含有一个受体结构域但缺乏 DNA 结合结构域,A 型 RR 可能通过与 B 型 RR 竞争磷酸基团而作为细胞分裂素的负调节因子^[9]。据报道,过表达拟南芥 A 型 ARR(拟南芥 RR 命名为 ARR)——*ARR7* 提高了植株的抗冻性^[10];A 型 ARR 被认为是整合乙烯和

细胞分裂素信号调控植物对冷胁迫响应的关键^[10];A 型 *ZmRR1* 正调控玉米耐冷性^[11]。目前,RR 参与小麦低温应答的作用机制尚不清楚。

本课题组前期构建了 5 °C、-10 °C 和 -25 °C 下强抗寒冬小麦品种 Dn1 和弱抗寒冬小麦品种济麦 22(J22)分蘖节的靶向植物激素代谢组,发现极端低温下 Dn1 的细胞分裂素水平显著增加^[12],而细胞分裂素调控小麦抗寒性的分子机制尚不清楚。本研究在低温下筛选出 Dn1 中表达量较高的 A 型 RR 基因 *TaRRA6-D*,对其进行生物信息学分析及预测,克隆该基因和启动子区进行亚细胞定位和低温下启动子活性分析,将 *TaRRA6-D* 基因异源表达拟南芥植株,对转基因植株在低温胁迫下的抗寒功能进行初步分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

小麦(*Triticum aestivum* L.):强抗寒冬小麦品种东农冬麦 1 号(Dn1)^[13-14],由东北农业大学小麦室提供。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*):野生型(WT, Col-0),由东北农业大学植物生理与分子生物学实验室保存。*arr7* 突变体(SALK_034612C),购自 AraShare(<https://www.arashare.cn/index.html>)网站。

烟草(*Nicotiana tabacum*):本氏型,由东北农业大学植物生理与分子生物学实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 植物材料的种植

Dn1 的种植:Dn1 于 2022 年 9 月 14 日在东北农业大学校内试验田播种。待大田自然降温且田间连续 10 d 的平均最低温分别在 5 °C(2022 年 10 月 20 日)、-10 °C(2022 年 11 月 27 日)和 -25 °C(2022 年 12 月 28 日)时,随机选取长势一致的小麦苗,取小麦分蘖节(Dn1 主要的越冬器官)部位,

剪成长约 1 cm 小段,用锡纸包裹好迅速放入液氮中冷冻,保存在-80 °C 冰箱中备用。

拟南芥的种植:将花土和蛭石等比例混合,搅拌均匀,灭菌锅 121 °C 灭菌 20 min,待土冷却后装入花盆中,撒入拟南芥种子,两周后单独移出幼苗,待幼苗开花后进行侵染。植物光照培养室培养:室温 24 °C,光/暗周期 16 h/8 h,光照强度 120~150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,相对湿度 60%。

烟草的种植:烟草种子消毒后种植于褐色托盘,放置于光照培养室培养。培养条件:室温 24 °C,光照强度 70~80 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,光/暗周期 16 h/8 h,相对湿度 70%左右。

1.2.2 实时荧光定量检测(qRT-PCR)

使用超纯 RNA 提取试剂盒(康为世纪,江苏)提取 Dn1 分蘖节总 RNA,用反转录试剂盒(诺唯赞,南京)进行 cDNA 合成。使用 Primer Premier 5.0 软件设计小麦 *TaRRA6-A* (TraesCS5A02G131600)、*TaRRA6-B* (TraesCS5B02G132900)、*TaRRA6-D* (TraesCS5D02G140200)的特异性引物用于 qRT-PCR, *TaActin* (TraesCS5B01G124100)作为内参基因,引物序列如表 1 所示。定量使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞,南京),体系为 20 μL ,具体程序设定参考说明书。每个样品均 3 个生物学重复,使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'-3')	用途 Purpose	
<i>TaActin</i> -F	CCTTAGTACCTTCCAACAGATGT	qRT-PCR	
<i>TaActin</i> -R	CCAGACAACCTCGCAACTTAGA		
<i>TaRRA6-A</i> -F	GCGATACCGTCACCATTAGCG		
<i>TaRRA6-A</i> -R	CGGATGTTGCTGCTATCACCAG		
<i>TaRRA6-B</i> -F	TCTTCTGTCCATGCAGACCAG		
<i>TaRRA6-B</i> -R	GATCTTCTTGAGCAGATCGTATCC		
<i>TaRRA6-D</i> -F	GTCCATGCAGACCAGCTGGAC		
<i>TaRRA6-D</i> -R	CTTGATCTTCTTGAGCAGATCATAC		
<i>TaRRA6-D</i> -F	ACGCTCGCTCTTCTTCTCC		基因克隆 Gene cloning
<i>TaRRA6-D</i> -R	CGAGCATGGTCTGACTGGAT		
<i>ProTaRRA6-D</i> -F	CGCCCTCGGAAAGTTGGAC	启动子克隆 Promoter cloning	
<i>ProTaRRA6-D</i> -R	ATCCAGGCATGCAGTAGTC		
<i>35S::TaRRA6-D</i> -F	CCTGCAGGCTGAGGCTTAATTAACGCTCGCTCTTCTTCTCC	过表达 Overexpression	
<i>35S::TaRRA6-D</i> -R	TCCCGGGGCTGAGGTTTAATTAACGAGCATGGTCTGACTGGAT		
<i>ProTaRRA6-D-GUS</i> -F	ACGGGGACTCTAGAGGATCCATTAGTGGTGAGCTGGAGGTA	GUS 染色 GUS staining	
<i>ProTaRRA6-D-GUS</i> -R	GGACTGACCACCCGGGATCCTGGAGTCGAGTTTATATGCAC		
<i>TaRRA6-D-GFP</i> -F	GAGCTCGGTACCCGGGATCCATGGCGGTGGCGATCGCGGA	亚细胞定位 Subcellular localization	
<i>TaRRA6-D-GFP</i> -R	GGTGTCGACTCTAGAGGATCCACAATTGTGGTTGGTCTGC		

1.2.3 *TaRRA6-D* 基因及启动子克隆

使用超纯 RNA 提取试剂盒(康为世纪,江苏)提取 Dn1 分蘖节总 RNA,用反转录试剂盒(诺唯赞,南京)合成 cDNA。使用植物 DNA 提取试剂盒(康为世纪,江苏)提取 Dn1 分蘖节总 DNA,具体实验步骤均参考说明书。利用 Primer Premier 5.0 软件设计克隆引物,进行目的基因及启动子的扩增,克隆引物序列如表 1 所示。PCR 扩增体系为 20 μL ,反应程序为 95 °C 反应 3 min;

95 °C 反应 15 s,58 °C 反应 30 s,72 °C 反应 30 s,35 个循环;72 °C 反应 5 min。使用克隆载体连接试剂盒(擎科,北京)将目的基因片段与克隆载体连接后转入大肠杆菌 DH5 α 感受态,待测序成功后菌液用 30%甘油保存于-80 °C 冰箱。

1.2.4 *TaRRA6-D* 基因生物信息学分析

利用 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)对 *TaRRA6-D* 蛋白的理化性质进行在线分析;使用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)对 *TaRRA6-D* 进行蛋白质结构域预测;使用 SOPMA (<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web/app.php>)进行蛋白质二级结构预测;使用同源建模 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>)在线程序对其蛋白三级结构建模;利用 MEGA11 软件对 12 个物种的 RR 蛋白序列进行比对和进化分析;利用 MEME 在线程序 (<http://meme-suite.org/tools/meme>)对不同物种的 RR 蛋白进行 motif 分析;利用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 *TaRRA6-D* 基因的启动子区(上游 2 000 bp)顺式作用元件进行分析。

1.2.5 *TaRRA6-D* 基因启动子活性分析

使用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切 pBI121-35S-GUS 载体,以克隆成功的 *TaRRA6-D* 启动子质粒作为模板,使用同源重组引物(表 1)进行 PCR 扩增,利用一步克隆试剂盒(诺唯赞,南京)将含有 *TaRRA6-D* 启动子片段的同源重组产物与酶切后的 pBI121-35S-GUS 载体连接后转入大肠杆菌 DH5 α 感受态,待测序成功后,提取质粒转入农杆菌感受态 GV3101 中,待 PCR 鉴定菌液为阳性后,用 50% 甘油保存于一 80 °C 冰箱中。

取活化好的含有重组质粒的农杆菌菌液,6 000 r \cdot min⁻¹ 离心 2 min,弃上清用缓冲液(添加表面活性剂的 5% 蔗糖溶液)重悬菌液,测量 OD₆₀₀ = 0.8~1.0。将拟南芥 WT 花序浸入菌液 1 min,密封袋密封好暗处理 1 d 后在袋子上打孔,随后转移至正常光下 2 d 后去除密封袋,5 d 后重复侵染。收取侵染后拟南芥植株的种子记作 T₀ 代,用酒精和次氯酸钠消毒后均匀置于含有 Kan 的 1/2MS 培养基中筛选,重复筛选直至 T₃ 代,剪取拟南芥叶片提取 DNA。利用 *TaRRA6-D* 启动子克隆的上、下游引物进行 PCR 鉴定。将鉴定成功的拟南芥种子播种于土壤中,待其生长至 4 周苗龄时分别放置在常温条件下继续正常培养 4 h(对照组)和 4 °C 低温条件下处理 4 h(低温处理组)。将处理后的植株分别浸泡于 GUS 染液中进行组织化学染色。反应结束后用 95% 乙醇进行脱色处理,对样品染色情况进行观察并拍照。

1.2.6 *TaRRA6-D* 蛋白亚细胞定位分析

以克隆 *TaRRA6-D* 基因的质粒作为模板,使用

同源重组引物(表 1)进行 PCR 扩增。使用 *Bam* HI 对 pCAMBIA2300-EGFP 载体进行 37 °C 过夜酶切。同样,用一步克隆试剂盒(诺唯赞,南京)进行载体连接和转化农杆菌感受态 GV3101。将 PCR 鉴定成功的农杆菌进行活化,取 50 mL 二次活化的农杆菌菌液,6 000 r \cdot min⁻¹ 离心 8~10 min,弃上清液。加入菌悬液(10 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂、150 mmol \cdot L⁻¹ AS、10 mmol \cdot L⁻¹ MES)重悬菌液,调节 OD₆₀₀ 为 0.8 左右,室温避光静置 3~4 h。挑选苗龄 4 周、叶片大小一致的烟草,使用 1 mL 注射器将菌液缓慢注射进入烟草叶片下表皮中,室温暗培养 1 d,正常生长光下培养 2 d。用镊子撕取烟草叶片下表皮制作临时装片,在激光共聚焦显微镜(TCS SP8,德国徕卡)下实时观察叶片中的绿色荧光信号,成像。

1.2.7 *TaRRA6-D* 过表达拟南芥植株的筛选与鉴定

构建过表达载体 pCAMBIA230035S-*TaRRA6-D*,所用引物见表 1,使用花序侵染法侵染拟南芥,在含 Kan 的 1/2MS 培养基中筛选,待转基因植株生长至 T₃ 代,剪取拟南芥叶片提取 DNA。利用 35S 启动子序列上游引物及 *TaRRA6-D* 基因克隆的下游引物进行 PCR 鉴定。同样剪取 T₃ 代转基因拟南芥叶片提取 RNA,利用试剂盒反转录为 cDNA,用表 1 中 *TaRRA6-D* 的定量引物作为上下游引物,进行 PCR 鉴定及 qRT-PCR 鉴定。

1.2.8 *TaRRA6-D* 过表达拟南芥植株的表型观察

用 75% 酒精消毒拟南芥种子 1 min,随后用灭菌水清洗 3 次,继续用 2.5% 的次氯酸钠消毒 5 min,随后再用灭菌水清洗 5 次。将清洗后的种子均匀播种在处理组(0.1 μ mol \cdot L⁻¹ 6-BA)和对照组(无 6-BA)的 1/2MS 培养基上,在光照培养箱(光/暗周期 16 h/8 h)中垂直培养 7 d。观察根系生长情况,拍照,并用 Image J 软件测量根长。3 次重复,每重复约 50 株。

1.2.9 低温胁迫下 *TaRRA6-D* 过表达拟南芥植株的表型观察

在 1/2MS 培养基上分别点播相同数量的拟南芥种子,待其生长 10 d 后转移至 -10 °C 培养箱处理 4 h。另一部分待其生长 7 d 后,转移至添加 10 μ mol \cdot L⁻¹ 6-BA 的 1/2MS 培养基上,待其生长 3 d 后,转移至 -10 °C 处理 5 h,将上述处理好的拟南芥植株恢复室温培养 3 d 后进行表型变化观察,并统计存活率。拟南芥存活率统计按照

恢复期后所有植株中存活植株的百分比计算,3次重复,每重复约 50 株。植株在叶片变黄、不再生长时被定义为死亡。

2 结果与分析

2.1 低温下*TaRRA6* 基因表达分析和*TaRRA6-D* 基因及启动子的克隆

先前研究表明,8 个小麦 A 型 RR 基因(*TaRRA*) 的表达在冷胁迫处理 6 h 后增加,其中*TaRRA6-A*、*TaRRA6-B*和*TaRRA6-D*的表达持续增加至处理 12 h^[15]。为了探究 Dn1 中 *TaRRA* 基因对低温胁迫的响应,挑选 3 个 A 型 *TaRR* (*TaRRA6-A*、*TaRRA6-B*和*TaRRA6-D*) 基因,采用 qRT-PCR 法检测低温胁迫下 Dn1 中 *TaRRA* 基因表达变化。结果(图 1)表明,随着温度的降低,*TaRRA6-A* 和 *TaRRA6-B* 基因表达量呈先下降后上升的趋势,而*TaRRA6-D* 基因表达量呈上升趋势,3 个基因表达量均在 -25 °C 时达到最高,且*TaRRA6-D* 基因 -25 °C 下表达量为 5 °C 下表达量的 14 倍,表达量变化极显著。因此,选择*TaRRA6-D* 作为目的基因进行后续研究。

分别提取 Dn1 分蘖节 RNA 和 DNA,以 RNA 为模板进行基因克隆,以 DNA 为模板进行启动子克隆。电泳检测获得完整的 696 bp 基因片段(图 2A)和 2 000 bp 启动子片段(图 2B),测序结果无碱基突变,与数据库序列匹配,表明已成功克隆*TaRRA6-D* 基因和启动子序列。

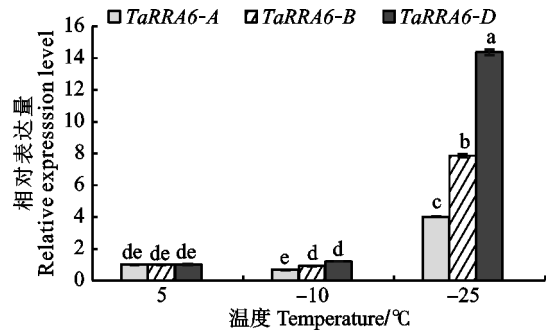
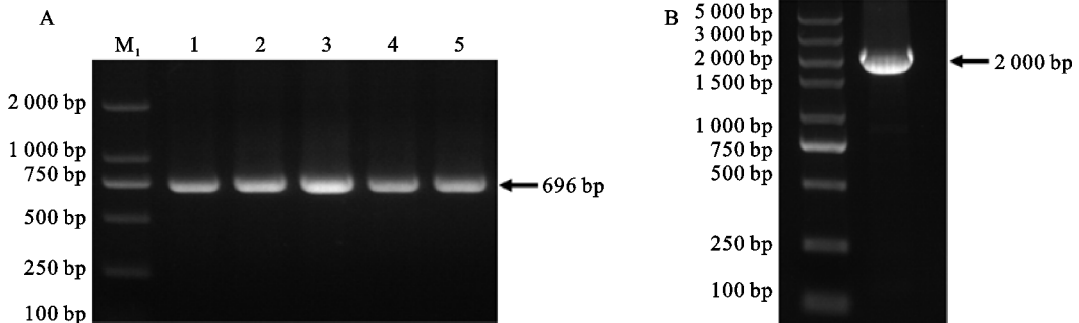


图 1 低温胁迫下 Dn1 分蘖节中*TaRRA6* 同源基因的表达量

Different letters above columns indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$). The same in figures 6–9.

图 1 低温胁迫下 Dn1 分蘖节中*TaRRA6* 同源基因的表达量
Fig. 1 Expression of *TaRRA6* homologous gene in tillering node of Dn1 under low-temperature stress



M₁ 和 M₂: Markers; 1~5 代表不同重复。
M₁ and M₂: Markers; 1–5 represent different repetitions.

图 2 Dn1 分蘖节中*TaRRA6-D* 基因(A)及启动子克隆(B)

Fig. 2 Cloning of *TaRRA6-D* gene(A) and promoter(B) in tillering node of Dn1

2.2 *TaRRA6-D* 生物信息学分析

TaRRA6-D 基因 (TraesCS5D02G140200) 全长 1 088 bp, CDS 长为 696 bp, 位于小麦基因组 5D 染色体。编码 231 个氨基酸, 含有 4 个内含子和 5 个外显子。蛋白分子质量为 25.36 kD, 理论等电点为 5.05, 属弱酸性; 不稳定指数为 50.10, 脂肪指数为 80.17, 亲水性平均值为 -0.475, 表明该基因编码的蛋白为不稳定疏水性蛋白。

TaRRA6-D 属于 A 型响应调节蛋白, 是 PLN03029 超家族成员。*TaRRA6-D* 蛋白二级结构预测显

示: 该蛋白中无规则卷曲占 51.95%, α -螺旋占 27.27%, 延伸链占 16.88%, 表明该蛋白为无规则卷曲型蛋白。蛋白三级结构建模结果显示该蛋白为 F2CZB4.1.A, 与模板序列相似度为 94.76%, GMQE 值为 0.7。

将小麦 (*Triticum aestivum*, XP_044396212.1) 与粗山羊草 (*Aegilops tauschii*, XP_020160428.1)、大麦 (*Hordeum vulgare*, KAI4991868.1) 等的 RR 蛋白序列进行比对, 结果(图 3A)显示, 小麦与粗山羊草和大麦的 RR 蛋白亲缘关系较近。

motif 分析结果(图 3B)显示,小麦 *TaRRA6-D* 与粗山羊草和大麦含有 7 个相同的 motif 基序,与二穗短柄草含有 6 个相同的 motif 基序。结果说明不同物种的 RR 蛋白序列高度保守,可能具有相似的生物学功能。

2.3 *TaRRA6-D* 基因启动子活性分析

顺式作用元件分析结果(表 2)显示, *TaRRA6-D* 基因启动子区含有参与 MeJA 响应元件、ABA 响应的 ABRE 基序, SA 响应元件及参与光

响应的 G-box 基序等作用元件;此外, *TaRRA6-D* 还含有响应低温的 LTR 和脱水响应的 DRE 顺式作用元件, *TaRRA6-D* 的基因表达可能响应低温。低温下 *TaRRA6-D* 基因的启动子活性分析显示,常温下, *TaRRA6-D* 的启动子能够启动转 *ProTaRRA6-D*-GUS 拟南芥植株中 GUS 基因的表达;4 °C 低温处理 4 h 后, GUS 染色明显加深(图 4)。结果表明, *TaRRA6-D* 的启动子可以受低温诱导而启动下游基因的表达。

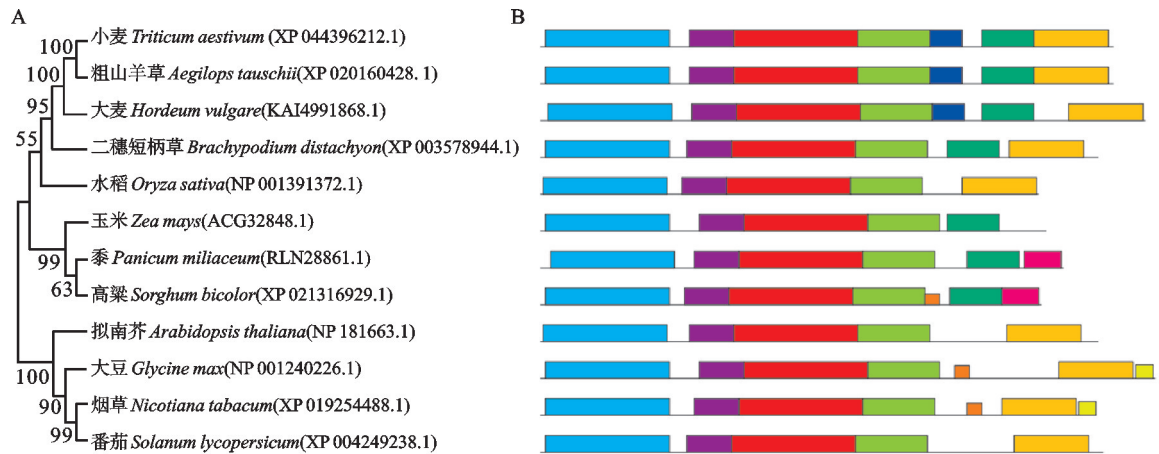


图 3 *TaRRA6-D* 系统进化树(A)及 motif 分析(B)

Fig. 3 Phylogenetic tree(A) and motif analysis(B) of *TaRRA6-D* protein

表 2 *TaRRA6-D* 启动子区顺式作用元件

Table 2 *Cis*-acting elements in the promoter region of *TaRRA6-D*

种类 Category	元件 Element	描述 Description	个数 Quantity
胁迫 Stress	DRE core	脱水响应元件 Dehydration responsive element	1
	LTR	参与低温响应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in low-temperature responsiveness	1
光 Light	chs-CMA2a	光响应元件 A light responsive element	1
	TCCC-motif	光响应元件 A light responsive element	1
	GATA-motif	光响应元件 A light responsive element	1
	I-box	光响应元件 A light responsive element	1
	Sp1	光响应元件 A light responsive element	1
	G-box	参与光响应的顺式作用调节元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness	2
调节 Regulation	CAAT-box	启动子和增强子区域中的常见顺式作用元件 Common <i>cis</i> -acting element in promoter and enhancer regions	8
	TATA-box	在转录开始 30 左右的核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start	11
	A-box	顺式作用调节元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element	1
生长 Development	ARE	厌氧诱导所必需的顺式作用调节元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction	2
	GC-motif	参与缺氧特异性诱导的增强子样元件 Enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility	1
激素 Hormone	TGACG-motif	参与茉莉酸甲酯反应的顺式作用调节元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	2
	CGTCA-motif	参与茉莉酸甲酯反应的顺式作用调节元件 <i>Cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	2
	ABRE	参与脱落酸反应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness	2
	TCA-element	参与水杨酸反应的顺式作用元件 <i>Cis</i> -acting element involved in salicylic acid responsiveness	1
	TGA-element	生长素响应元件 Auxin-responsive element	1
	GARE-motif	赤霉素响应元件 Gibberellin-responsive element	3



图 4 低温下TaARRA6-D 基因启动子活性分析

Fig. 4 Promoter activity analysis of TaARRA6-D gene under low-temperature

2.4 TaARRA6-D 蛋白亚细胞定位

将TaARRA6-D 基因与 GFP 绿色荧光蛋白融合,在本氏烟草叶片瞬时表达。如图 5 所示,单独表达 GFP 蛋白时,整个烟草叶片细胞中均可检测到绿色荧光信号;而在表达 TaARRA6-D-GFP 融合蛋白时,仅在烟草叶片细胞核中检测到绿色荧光信号,表明 TaARRA6-D 蛋白位于细胞核中。

2.5 TaARRA6-D 过表达拟南芥植株的筛选及鉴定

遗传转化拟南芥野生型植株(图 6A),获得 T₀ 代种子,后续在添加 Kan 的 1/2 MS 培养基中继续筛选至 T₃ 代(图 6B、C)。提取 T₃ 代拟南芥植株叶片 DNA,以野生型拟南芥为对照,用含有 35S 启动子的上游引物和 TaARRA6-D 基因克隆的下游引物进行 PCR 扩增,验证并获得 TaARRA6-D 过表达植株(图 6D)。提取 T₃ 代过表达拟南芥植株叶片总 RNA 进行半定量 PCR(图 6E)及定量 qRT-PCR 检测(图 6F),选取表达量最高的 3 个过表达株系(OE-8、OE-9、OE-10)进行后续功能验证。

2.6 TaARRA6-D 过表达拟南芥植株根长生长对 6-BA 的敏感性

用TaARRA6-D 序列在 TAIR(<https://www.arabidopsis.org/>)网站进行 Blast,检索到拟南芥

A 型 ARR 突变体 arr7 (SALK_034612C)。以 WT、arr7、OE-8、OE-9、OE-10 拟南芥植株为材料,对其根系伸长生长进行 6-BA 敏感性分析。如图 7A 所示,无 6-BA 处理下,植株根长表现为 arr7>过表达植株>WT;但 0.1 μmol · L⁻¹ 6-BA 处理显著抑制了各株系根系的伸长生长,且植株根长表现为过表达植株>arr7>WT。根长测量结果(图 7B)与表型观察结果相一致。这表明,过表达TaARRA6-D 基因降低了拟南芥植株的根长对 6-BA 的敏感性。

2.7 TaARRA6-D 过表达拟南芥植株的抗冻表型观察及存活率统计

为了探究转 TaARRA6-D 基因对拟南芥植株抗寒性的影响,对 WT、arr7、OE-8、OE-9、OE-10 拟南芥植株进行幼苗抗冻实验。如图 8A 所示,-10 °C 4 h 处理后,所有株系均出现叶片发黄、植株萎蔫的现象;存活率统计发现,TaARRA6-D 过表达拟南芥植株存活率显著大于突变体大于 WT 植株,突变体和 WT 存活率差异不显著(图 8B)。先前的研究表明,拟南芥 arr7 突变体在冷处理后存活率与 WT 相比无明显差异^[16],本实验结果与之相一致。过表达 TaARRA6-D 基因提高了拟南芥植株的抗寒性。

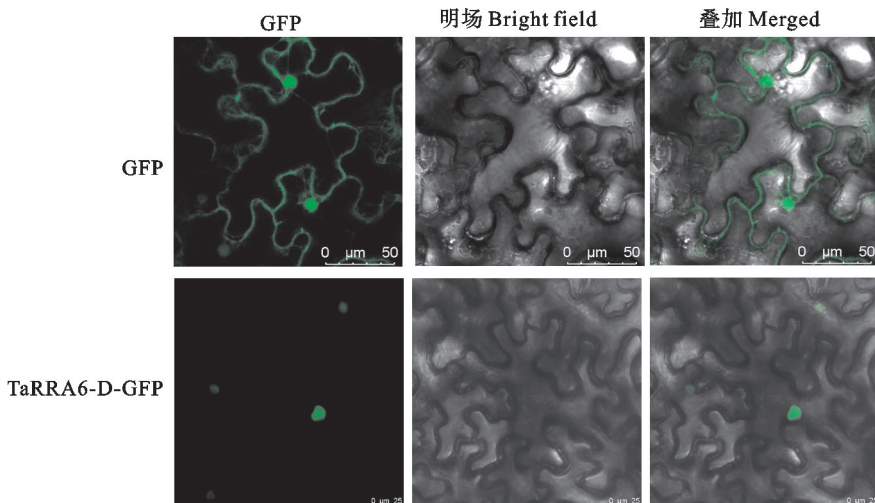
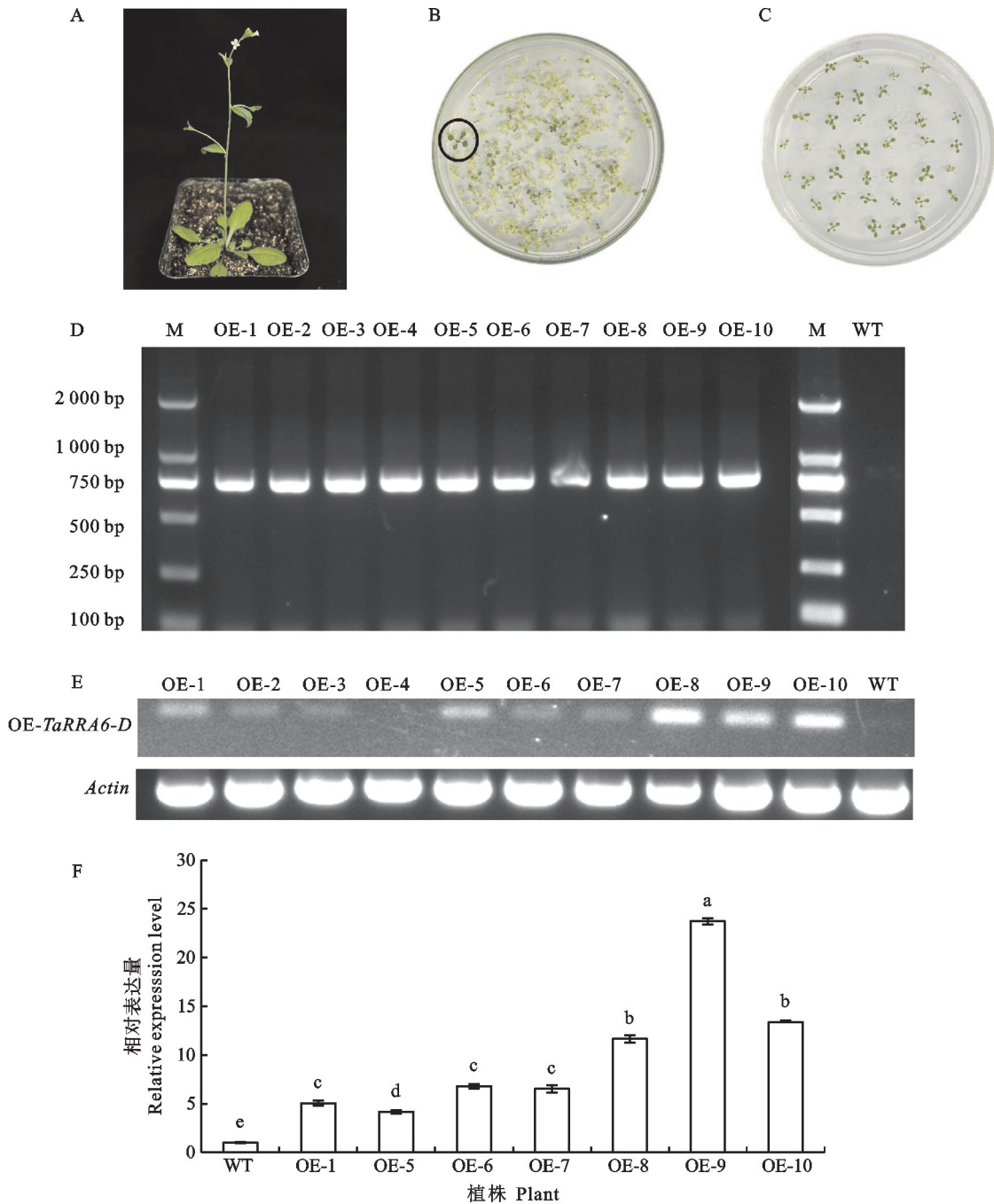


图 5 TaARRA6-D 蛋白亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of TaARRA6-D



M: Marker; A: T₀; B: T₁; C: T₂; D~E: 阳性植株鉴定, OE-1~OE-10 分别代表阳性植株; WT: 野生型; F: *TaRRA6-D* 过表达拟南芥 T₃ 代植株基因相对表达量检测。

A: T₀; B: T₁; C: T₂; D-E: Identification of positive plants OE-1-OE-10; WT: Wild type; F: Relative expression analysis of *Arabidopsis* T₃ generation plant overexpressing *TaRRA6-D*.

图 6 *TaRRA6-D* 基因过表达拟南芥阳性植株筛选及鉴定

Fig. 6 Screening and identification of *Arabidopsis thaliana* positive plants overexpressing *TaRRA6-D* gene

BA 可提高过表达*ARR5*、*ARR7* 和*ARR15* 植株的抗冻性^[10]。为了探究外源细胞分裂素处理对转*TaRRA6-D* 基因拟南芥植株抗寒性的影响,对 WT、*arr7*、OE-8、OE-9、OE-10 拟南芥植株外源施加 6-BA 进行幼苗抗冻实验。如图 9A 所示,未添加 6-BA 的培养基上各植株均呈黄白色,死

亡率为 100%;添加 10 μmol · L⁻¹ 6-BA 的培养基上,各植株出现部分黄化现象,存活率统计显示 6-BA 处理组存活率均显著高于对照组,其中 *TaRRA6-D* 过表达拟南芥植株的存活率显著大于突变体大于 WT(图 9B)。这表明,外源细胞分裂素处理提高了转基因拟南芥植株的抗冻性。

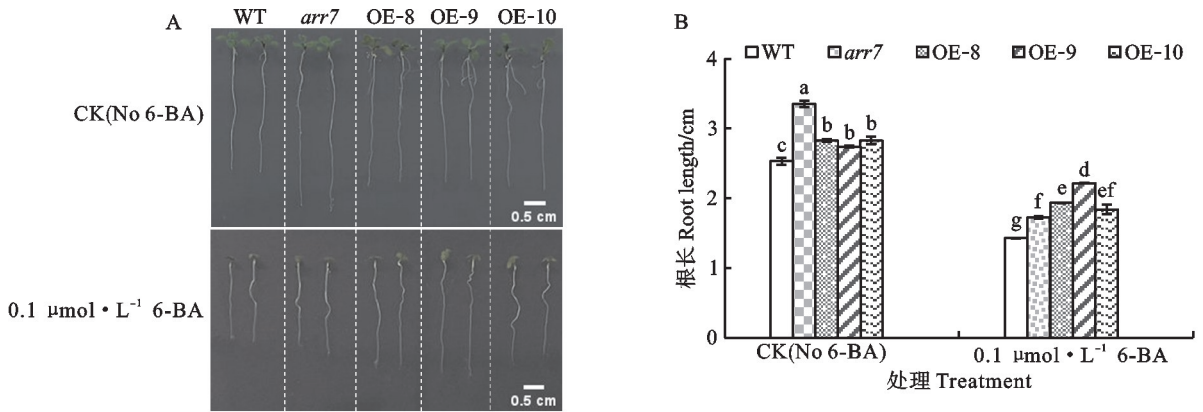


图 7 *TaRRA6-D* 基因过表达拟南芥植株根系伸长表型观察 (A) 和根长测量结果 (B)

Fig. 7 Phenotypic observation of root length (A) and measurement of root length (B) in *Arabidopsis* overexpression lines

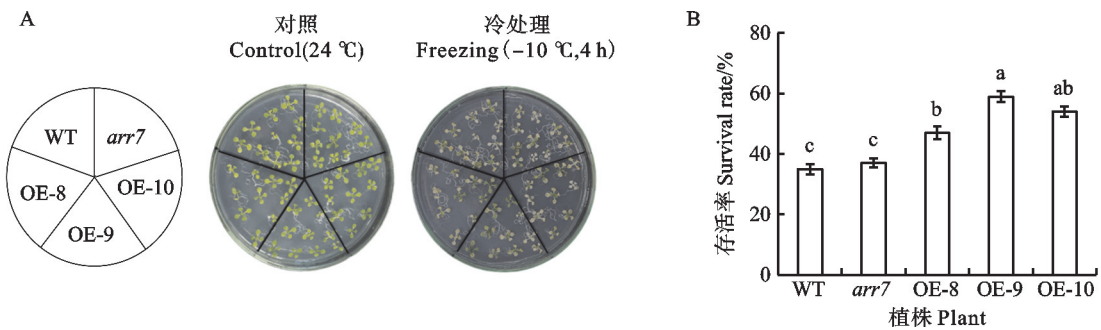


图 8 *TaRRA6-D* 过表达拟南芥植株冷冻表型观察 (A) 和存活率统计 (B)

Fig. 8 Phenotype observation (A) and survival rate statistics (B) of the *Arabidopsis* overexpression lines under low-temperature treatment

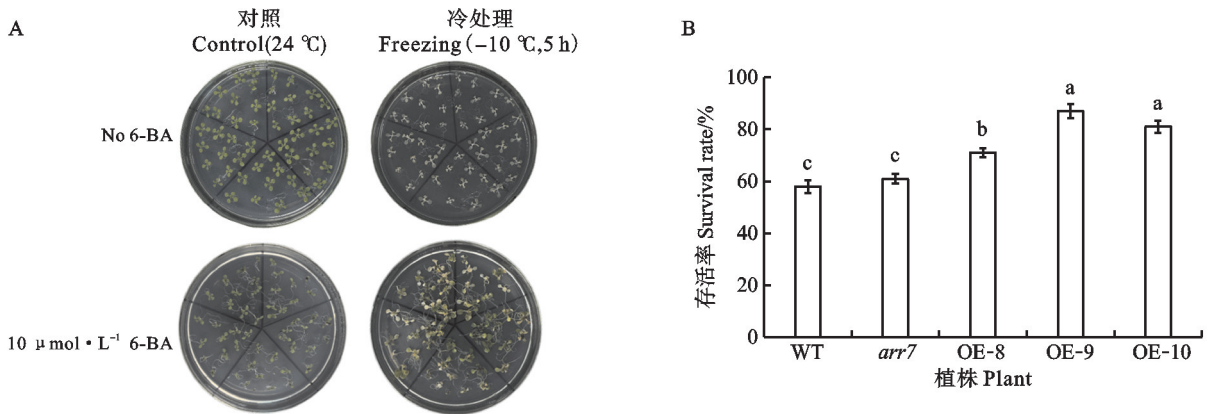


图 9 6-BA 处理下 *TaRRA6-D* 过表达拟南芥植株冷冻表型观察 (A) 和存活率统计 (B)

Fig. 9 Phenotype observation (A) and survival rate statistics (B) of the *Arabidopsis* overexpression lines under 6-BA treatment

3 讨论

A 型 RR 已从拟南芥^[17]、水稻^[18]、玉米^[19]、大豆^[20]、番茄^[21]、紫花苜蓿^[22]等物种中被分离和鉴定。2022 年, Sun 等^[15]从小麦参考基因组中鉴定了 20 个 RRA、71 个 RRB、43 个 RRC 和 17 个 PRR。对 *TaRRA* 表达模式分析显示, 8 种 *TaR-*

RA 的表达量在低温 (4 °C) 处理 6 h 后开始增加, 5 种 *TaRRA* (*TaRRA1-D*、*TaRRA4-B*、*TaRRA6-A*、*TaRRA6-B*、*TaRRA6-D*) 的表达量持续增加至处理 12 h 后。本研究检测了大田自然降温条件下 Dn1 分蘖节中 *TaRRA6* 基因的表达量, 发现 -25 °C 下 *TaRRA6-A*、*TaRRA6-B* 和 *TaRRA6-D* 的表达量均显著高于 5 °C, 这与低温提高

了小麦 *TaARR6-A*、*TaARR6-B*、*TaARR6-D*^[15] 及拟南芥 *ARR4* 和 *ARR5* 表达量^[23] 的结果相似。特别是 *TaARR6-D* 基因表达量在 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下为 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的 14 倍,表明 *TaARR6-D* 响应低温表达。*TaARR6-D* 基因启动子区含有低温胁迫响应元件 LTR,启动子活性分析进一步证实,*TaARR6-D* 的启动子受低温($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 h)诱导,进而能够启动下游 GUS 基因的表达,这与转 *Pro_{ARR7}: GUS* 基因的拟南芥(拟南芥 *ARR7* 启动子活性分析)在低温($1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 6 h)下显著增强了 GUS 基因的表达^[16] 结果相一致。

蛋白质亚细胞定位与其功能密切相关。将 *TaARR6-D-GFP* 融合蛋白在烟草中瞬时表达,发现 *TaARR6-D* 蛋白定位于细胞核中。拟南芥 *ARR7*(A 型 ARR)是 *TaARR6-D* 的同源物,其蛋白定位于细胞核中^[24];甜瓜 *CmRR6*(A 型 RR)也定位于细胞核中^[25]。*TaARR6-D* 蛋白与 *ARR7* 和 *CmRR6* 有类似的定位模式,提示不同物种间 RR 蛋白功能的保守性。

过表达 *TaARR6-D* 基因提高了拟南芥植株的抗冻性,这与过表达 A 型(*ARR5*、*ARR7* 和 *ARR15*)^[10] 和 B 型 *ARR1* 基因均提高了拟南芥植株的抗冻性^[26] 相一致。BA 被报道能够稳定 A 型 ARR 蛋白^[27]。本研究进一步检测了 6-BA 处理下植株的抗冻性,发现外源 6-BA 处理显著增强了野生型及过表达植株的抗冻性,这与 BA 提高了过表达 *ARR5*、*ARR7* 和 *ARR15* 植株的抗冻性结果相类似^[10]。转基因植株的表型观察发现,外源 6-BA 处理下过表达植株的根长大于野生型,表明过表达 *TaARR6-D* 降低了拟南芥植株根长对细胞分裂素的敏感性,这与过表达 *ARR3*、*ARR5*、*ARR6*、*ARR15*、*ARR16* 植株对细胞分裂素敏感性降低^[27-28] 的结果相似。进一步表明 RR 蛋白的功能是高度保守的。

本研究从强抗寒冬小麦品种 Dn1 中克隆了细胞分裂素响应调节子基因 *TaARR6-D*,通过生物信息学分析、亚细胞定位、启动子活性分析、低温胁迫下基因功能初步分析发现,*TaARR6-D* 基因能够增强拟南芥植株对低温的耐受性,这为进一步探究 *TaARR6-D* 基因在小麦低温信号转导及对逆境胁迫应答的作用机制提供了依据。Li 等^[25] 发现,沉默 *CmRR6* 或 *CmPRR3* 时,显著增强甜瓜植株的抗寒性;冷处理下沉默 *CmRR6* 和 *CmPRR3* 的植物中 *CmCBF1*、*CmCBF2* 和 *Cm-*

CBF3 的表达水平显著增加。而 Shi 等^[11] 发现,A 型 ARR(*ARR5*、*ARR7* 和 *ARR15*)并不通过 CBF 途径参与拟南芥的抗冻应答。*TaARR6-D* 基因正调节小麦和拟南芥的抗寒应答,该抗寒功能是否与其调节植物体内的抗氧化防御系统、是否通过 CBF 途径影响冷响应基因的表达变化、是否受 B 型 RR 的转录调控甚至磷酸化调节,有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] RAZA A, CHARAGH S, NAJAFI-KAKAVAND S, *et al.* Role of phytohormones in regulating cold stress tolerance: Physiological and molecular approaches for developing cold-smart crop plants [J]. *Plant Stress*, 2023, 8: 100152.
- [2] MARUYAMA K, URANO K, YOSHIWARA K, *et al.* Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts [J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(4): 1759.
- [3] VESELOVA S V, FARHUTDINOV R G, VESELOV S Y, *et al.* The effect of root cooling on hormone content, leaf conductance and root hydraulic conductivity of durum wheat seedlings (*Triticum durum* L.) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(1): 21.
- [4] DUAN J B, YU H, YUAN K, *et al.* Strigolactone promotes cytokinin degradation through transcriptional activation of *CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE 9* in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(28): 14319.
- [5] KIEBER J J, SCHALLER G E. Cytokinin signaling in plant development [J]. *Development*, 2018, 145(4): dev149344.
- [6] HEYL A, BRAULT M, FRUGIER F, *et al.* Nomenclature for members of the two-component signaling pathway of plants [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1063.
- [7] FENG J, WANG C, CHEN Q G, *et al.* S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling [J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1529.
- [8] HWANG I, SHEEN J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction [J]. *Nature*, 2001, 413(6854): 383.
- [9] ARGYROS R D, MATHEWS D E, CHIANG Y H, *et al.* Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(8): 2102.
- [10] SHI Y T, TIAN S W, HOU L Y, *et al.* Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of *CBF* and type-A ARR genes in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(6): 2578.
- [11] ZENG R, LI Z Y, SHI Y T, *et al.* Natural variation in a type-A response regulator confers maize chilling tolerance [J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4713.
- [12] WANG R, YU M, XIA J, *et al.* Cold stress triggers freezing

- tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) via hormone regulation and transcription of related genes [J]. *Plant Biology*, 2023, 25(2):308.
- [13] BAO Y, YANG N, MENG J, *et al.* Adaptability of winter wheat Dongnongdongmai 1 (*Triticum aestivum* L.) to overwintering in alpine regions [J]. *Plant Biology*, 2021, 23(3):445.
- [14] TIAN Y, PENG K K, LOU G C, *et al.* Transcriptome analysis of the winter wheat Dn1 in response to cold stress [J]. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1):277.
- [15] SUN L J, LV L J, ZHAO J, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the *TaRRA* gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:1006409.
- [16] JEON J, KIM N Y, KIM S, *et al.* A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(30):23371.
- [17] WERNER T, SCHMÜLLING T. Cytokinin action in plant development [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(5):527.
- [18] SAHA S R, ISLAM S M S, ITOH K. Identification of abiotic stress-responsive genes: A genome-wide analysis of the cytokinin response regulator gene family in rice [J]. *Genes & Genetic Systems*, 2024, 99:99.
- [19] ASAKURA Y, HAGINO T, OHTA Y, *et al.* Molecular characterization of His-Asp phosphorelay signaling factors in maize leaves: Implications of the signal divergence by cytokinin-inducible response regulators in the cytosol and the nuclei [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 52(2):331.
- [20] MOCHIDA K, YOSHIDA T, SAKURAI T, *et al.* Genome-wide analysis of two-component systems and prediction of stress-responsive two-component system members in soybean [J]. *DNA Research*, 2010, 17(5):303.
- [21] HE Y J, LIU X, YE L, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of two-component system genes in tomato [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(8):1204.
- [22] QIANG Y Q, HE X J, LI Z, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the response regulator gene family in alfalfa (*Medicago sativa* L.) reveals their multifarious roles in stress response [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14:1149880.
- [23] URAO T, YAKUBOV B, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, *et al.* Stress-responsive expression of genes for two-component response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Letters*, 1998, 427(2):175.
- [24] DORTAY H, GRUHN N, PFEIFER A, *et al.* Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(9):3649.
- [25] LI L L, ZHANG X Y, DING F, *et al.* Genome-wide identification of the melon (*Cucumis melo* L.) response regulator gene family and functional analysis of *CmRR6* and *CmPRR3* in response to cold stress [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2024, 292:154160.
- [26] ZHU J, ZHANG K X, WANG W S, *et al.* Low temperature inhibits root growth by reducing auxin accumulation via ARR1/12 [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56(4):727.
- [27] REN B, LIANG Y, DENG Y, *et al.* Genome-wide comparative analysis of type-A *Arabidopsis* response regulator genes by overexpression studies reveals their diverse roles and regulatory mechanisms in cytokinin signaling [J]. *Cell Research*, 2009, 19(10):1178.
- [28] KIBA T, YAMADA H, SATO S, *et al.* The type-A response regulator, ARR15, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2003, 44(8):868.