

小麦转录因子 TaDL1 生物信息学、亚细胞定位与表达分析

沈益庭, 刘怡辰, 韩俊杰, 李卫华

(石河子大学农学院/新疆绿洲生态农业兵团重点实验室, 新疆石河子 832000)

摘要: YABBY 转录因子家族是一类植物特有的转录因子, 在植物叶片生长和花器官建成方面发挥重要作用, 其 N 端具有 C2C2 型锌指结构域, C 端有螺旋-环-螺旋 YABBY 结构域。本研究以春小麦品种新春 9 号为材料, 克隆到一个 YABBY 家族的 *TaDL1* 基因, 其编码区全长 603 bp, 编码 201 个氨基酸。经生物信息分析, *TaDL1* 蛋白分子量为 22 765.21 Da, 等电点为 8.85, 为不稳定亲水性蛋白。通过系统进化树和保守结构域分析, 该基因属于 YABBY 家族의 CRC 亚家族成员, 与水稻 *OsDL* 基因亲缘关系较近。经转化烟草进行瞬时表达分析, *TaDL1* 蛋白定位在细胞核上。实时荧光定量分析发现, *TaDL1* 基因在小麦幼穗和叶片中特异性表达, 其中在叶片中表达量最高, 幼穗中次之。该基因对盐和热胁迫响应, 其中对盐胁迫响应最明显且在胁迫后 2~24 h 内有持续较高的表达量, 推测该基因可能参与盐胁迫应答相关的信号途径。

关键词: 小麦; *TaDL1* 基因; 生物信息学; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)03-0300-11

Bioinformatics, Subcellular Localization and Expression Analysis of Wheat Transcription Factor TaDL1

SHEN Yiting, LIU Yichen, HAN Junjie, LI Weihua

(College of Agriculture, Shihezi University/Key Laboratory of Oasis Ecology Agriculture of Xinjiang Production and Construction Corps, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: The YABBY transcription factor is a type of plant specific transcription factor that plays an important role in leaf growth and floral organogenesis. It has a C2C2 zinc finger domain at the N-terminus and a spiral ring spiral YABBY domain at the C-terminus. This study used a spring wheat variety Xinchun 9 as the material and cloned a *TaDL1* gene from the YABBY family, with a total coding region of 603 bp, encoding 201 amino acids. According to bioinformatics analysis, the molecular weight of *TaDL1* protein was 22 765.21 Da, with an isoelectric point of 8.85, indicating an unstable hydrophilic protein. Through phylogenetic tree and conserved domain analysis, it was found that this gene belonged to the CRC subfamily of the YABBY family and was closely related to the rice *OsDL* gene. Through transient expression analysis of tobacco, *TaDL1* protein was localized in the nucleus. Real time fluorescence quantitative analysis found that *TaDL1* was specifically expressed in wheat young ears and leaves, with the highest expression level in leaves and second in young ears. *TaDL1* responded to salt and heat stresses, with the most significant response to salt stress and sustained high expression levels within 2—24 h after stress. It is speculated that this gene may be involved in signaling pathways related to salt stress response.

Keywords: Wheat; *TaDL1* gene; Bioinformatics; Subcellular localization; Expression analysis

YABBY 转录因子家族基因广泛存在于植物中且为植物所特有,主要调控植物的胚胎发育、侧生器官分化、背腹极性建立等,对提高抗逆性也有重要影响^[1-3]。YABBY 转录因子家族包含两个保守的结构域即锌指结构域(C2C2)和 C 端的 YABBY 结构域^[4-5],包括 CRABS CLAW (CRC)、FILAMENTOUS FLOWER (FIL)/YABBY3 (YAB3)、INNER NO OUTER (INO)、YABBY2 (YAB2) 和 YABBY5 (YAB5) 等 5 个蛋白亚家族^[6-7]。在禾本科作物中,YABBY 转录因子家族成员基于蛋白水平的功能研究主要集中在水稻中^[8-10],而小麦的 YABBY 转录因子成员研究多数在转录水平,缺乏对其蛋白功能的探讨^[5]。小麦中 *TaYAB2* 和 *TaYAB1* 基因的功能研究较为深入。*TaYAB2* 在拟南芥中异源表达会改变叶片极性发育^[11];小麦 *TaYAB1* 在拟南芥中异源表达会引起侧生器官的远轴面的特征,并抑制拟南芥顶端分生组织的发育^[12]。此外,Zhang 等^[13] 对小麦 YABBY 成员启动子作用元件进行分析,发现存在多种激素和胁迫相关的调控元件,可能参与多种胁迫和激素应答相关的调控机制,其基因本身也响应多种非生物胁迫;Buttar 等在小麦中共鉴定出 21 个 YABBY 家族成员,不同成员响应的胁迫类型不同,在小麦的各组织中表达量也存在差异^[14];在二粒小麦中也鉴定出 12 个 YABBY 家族基因,同样在不同组织中表达量存在差异^[15]。这些研究表明小麦中的 YABBY 家族成员在植物生长发育和环境胁迫响应中发挥着重要作用。

YABBY 转录因子家族成员中的 CRC 转录因子亚家族成员大多数基因在植物心皮和蜜腺形成中有突出的作用。CRC 基因最初在拟南芥中被鉴定出来,其在拟南芥花雄蕊基部蜜腺的发育中是必需基因^[16];CRC 被确定为对心皮特征和蜜腺发育至关重要的转录因子,CRC 基因在心皮原基的远轴区域和蜜腺中表达^[17]。与拟南芥相同,小麦中 CRC 基因被证明在心皮中特异性表达^[18],玉米的 CRC 基因 *ZmYABBY1* 和 *ZmYABBY11* 调节雄性小花的发育^[19],DL (DROOPING LEAF) 基因在水稻突变体中被发现与拟南芥中的 CRC 基因直系同源^[20-21]。前人研究均表明,CRC 基因与植物生殖发育相关,主要在心皮中特异性表达,而 DL 基因在植物叶片和心皮中都发挥其功能^[22]。有学者认为,*OsDL1* 基因不仅可以调节水稻花的心皮规格,还可以调节叶片的中脉形成;*dl*

位点功能丧失突变会导致心皮转化为雄蕊、叶片缺乏中脉,引起叶片表型下垂^[22-23]。水稻 DL 基因的过表达条件下植株叶片向内卷曲,植株无法发育到成熟会提前死亡^[24]。同样,在玉米中 *ZmDL1* 和 *ZmDL2* 基因与叶片长度、宽度及叶片夹角有关^[25]。

根据课题组前期小麦蛋白组和转录数据研究结果推测,*TaDL1* 基因可能参与小麦的叶片和花序发育及对非生物胁迫的响应。本研究通过 PCR 克隆得到小麦 *TaDL1* 基因全长和 CDS 序列,并通过生物信息学分析了解其蛋白结构特征和理化性质,探讨进化关系,预测其生物学功能,为深入解析 *TaDL1* 基因生物学功能奠定遗传基础;通过 qPCR 分析不同组织和胁迫下的表达模式及其可能参与的信号途径,为分析 *TaDL1* 基因生物学功能和深入了响应非生物胁迫分子调控网络提供参考,为小麦遗传育种提供候选基因。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小麦品种新春 9 号、本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*)、Maker-RFP 和 GV3101 农杆菌均由本实验室保存。

DNA 提取试剂盒 (EasyPure[®] Universal Plant Genomic DNA Kit)、RNA 提取试剂盒 (TransZol UP Plus RNA Kit)、RNA 反转录试剂盒 (TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix)、高保真酶 (TransStart[®] FastPfu Fly DNA Polymerase)、大肠埃希菌感受态细胞 (Trans-T1)、qPCR 试剂盒 (Perfect-Start Green Qpcr SuperMix) 均购于北京全式金生物技术股份有限公司。2×Taq max plus、胶回收试剂盒 (FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit) 购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司。质粒小提试剂盒 (TINprep Mini Plasmid Kit) 购于天根生化科技(北京)有限公司。pROK II-EGFP 载体(购于淼灵质粒平台)、引物由新疆乌鲁木齐有康生物有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 材料处理

选取春小麦品种新春 9 号均匀饱满的种子经 75% 乙醇消毒处理后,种植于 25 °C、16 h 光照的人工气候室,一部分进行土培(营养土和蛭石 3:1),一部分置于恒温培养箱中进行水培(将幼苗放置

于培养皿发芽 2 d, 幼苗根部置于无菌水中)。土培小麦长至孕穗期, 选取长势一致且较好的植株, 分别取根、茎、叶和幼穗, 经液氮冷激后放入 -80°C 超低温冰箱备用。水培 7 d 时选取长势一致的幼苗分为三组, 第一组幼苗根部分别置于 200 mM 的 NaCl 盐溶液和 20% PEG-6000 溶液中浸泡 2.5 h; 第二组将小麦幼苗进行 45°C 高温处理 2 h; 第三组小麦幼苗根部置于 200 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl 盐溶液中分别浸泡 1、2、6、18 和 24 h。以上处理均随机选取 5 株, 迅速经液氮冷激后放入 -80°C 超低温冰箱备用。

将烟草种子在水中浸泡 12 h, 68°C 水浴 10 min 后均匀撒播在带有滤纸的培养皿中, 室温放置 2 d 待其发芽后移栽至土中(营养土和蛭石 3:1), 放入 25°C 12 h 光照培养箱中进行生长, 待其长至 6 叶期备用。

1.2.2 基因全长及 CDS 全长序列克隆

将保存的材料, 经液氮冷冻充分研磨后。利用 DNA 提取试剂盒提取未处理小麦叶片的基因组 DNA; 利用 RNA 提取试剂盒提取未处理小麦的 RNA, 并利用反转录试剂盒得到小麦的 cDNA, 放入 -80°C 冰箱备用。根据 IWGS(<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Projects/IWGSC>) 数据库提供的 *TaDL1* 基因(TraesCS4A02G058800)的基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物(表 1)。以小麦基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 利用高保真酶按照说明书进行 PCR 扩增得到小麦 *TaDL1* 基因全长及 CDS 序列。

1.2.3 生物信息学分析

利用 SMART(<http://smart.embl.de>) 在线工具和 NCBI CDD 工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对该基因结构及蛋白保守结构域进行分析。利用 NetPhos 3.1 Server(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>) 进行蛋白磷酸化位点预测。用 NCBI、EnsemblPlants(<http://plants.ensembl.org>) 下载拟南芥 YABBY 家族蛋白家族序列和禾本科作物 DL 蛋白序列, 用 MEGA 最大似然法构建进化树。利用 DNAMAN 进行多重序列比对。用 SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线网站对 *TaDL1* 蛋白二级结构进行分析。利用 ProtParam 在线网站(<https://web.expasy.org/protparam>) 分析

TaDL1 蛋白理化性质。利用 TMHMMServer. 2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 和 signalp4.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 在线网站分析 *TaDL1* 转录因子是否存在跨膜区和信号肽。蛋白三级结构域建模利用 SWISS-MODEL 在线网站(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 完成。亚细胞定位预测利用(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 完成。蛋白磷酸化位点预测利用 NetPhos 3.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 完成; 作图由 GraphPad Prism 完成, 相关性分析利用 SPSS 完成。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

根据小麦 *TaDL1* 基因 CDS 序列设计特异性引物(表 1), 利用 RNA 提取试剂盒提取小麦未处理的根、茎、叶、幼穗、种子和四种处理后三组小麦幼苗的 RNA, 以小麦 *Tubulin* 基因为内参, 按照 qRT-PCR 试剂盒说明书, 每组三个重复进行小麦各组织和胁迫后小麦幼苗相对表达量测定。相关性分析利用 SPSS 完成作图, 图利用 Graph Pad Prism 9.0 完成。

1.2.5 亚细胞定位

根据 pROK II-GFP 质粒、*TaDL1* 基因 CDS 序列(去除终止密码子)利用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物, 并添加同源臂。用高保真酶进行 PCR 扩增, 用 *Xba* I 和 *Bam* H I 两种限制性核酸内切酶, 将 pROK II-GFP 进行双酶切线性化。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 DNA 胶回收试剂盒进行回收。回收产物用无缝克隆试剂盒按照说明书将线性化的 pROK II 质粒和 PCR 产物进行连接, 得到融合载体。融合载体转入大肠埃希菌感受态细胞 *Thrans-T1*, 在 LB 固体培养基上进行抗性筛选培养, 挑取单菌落进行菌落 PCR 检测, 检测成功的菌落于 LB 液体培养基中进行培养, 吸取菌液送样进行菌液测序。引物合成、测序由乌鲁木齐有康生物科技有限公司完成。

利用质粒小提试剂盒提取阳性大肠杆菌质粒, 转入提前制备好的 GV3301 农杆菌感受态后, 在 YEB 固体培养基进行抗性筛选。挑取单克隆菌落在 YEB 液体培养基扩大培养至 OD 值 0.8~1.0。4 000 $\text{r} \cdot \text{s}^{-1}$ 离心 20 min 后收集菌体, 重悬液重

表 1 本研究所用到的引物
Table 1 Primers used in this study

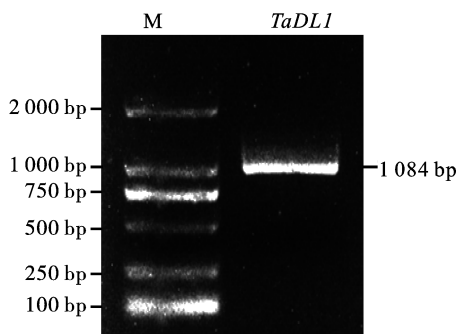
引物名称 Primer name	引物序列 5'—3' Primer Sequence 5'—3'	用途 Usage
TaDLDNA-F	TCTTCTACCTCCCACCCTC	TaDL1 基因全长克隆 Full-length cloning of TaDL1 gene
TaDLDNA-R	CAGCAACAGCAGCAACG	
TaDL1-F	AGAACACGGGGGACTATGCAGAGCATGGATTT	pROKII-GFP-TaDL 重组载体, TaDL1 序列克隆 pROKII-GFP-TADL recombinant vector, and TaDL1 sequence cloning
TaDL1-R	CATGGTACCCTCGAGGGCGCTGCGCTCCAT	
TaDLq-F	GACACGGTGACTGTGAAATGC	相对表达量测定 Measuring relative expression level
TaDLq-R	AGCGGCTGGTTCCTCCT	
Tubulin-F	CATGCTATCCCTCGTCTCGACCT	内参基因 Reference gene
Tubulin-R	CGCACTTCATGATGGAGTTGTAT	

悬至 OD 值 0.6~0.8。maker-RFP 为甘油菌划线挑单菌落后,扩大培养至 OD 值 0.8~1.0,重悬至 OD 值 0.6~0.8。试验组两种重悬液体等比混合;对照组 pROK II 空载体农杆菌重悬液与 maker-RFR 农杆菌重悬液等比混合。静置 3 h 后分别注射 6 叶期的本氏烟草第 4 和第 5 片叶。暗培养 1 d,弱光(200 Lx)培养 1 d 后,取注射叶片在激光共聚焦显微镜镜检观察荧光信号。

2 结果分析

2.1 TaDL1 基因全长及 CDS 全长克隆

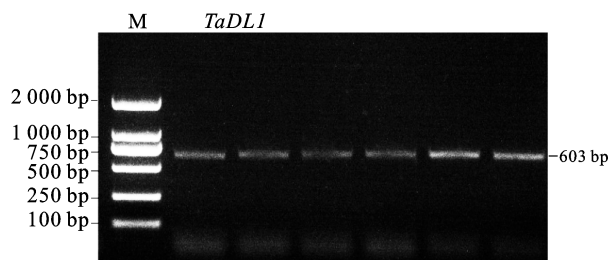
对提取的小麦 DNA 利用高保真酶,经 PCR 扩增克隆到一条符合预期大小的 DNA 条带(图 1),以反转录得到的 cDNA 为模板,利用 PCR 扩增出 TaDL1 基因(TraesCS4A02G058800)CDS 全长,得到一条符合预期大小的 DNA 条带(图 2),经胶回收后,送至新疆乌鲁木齐有康生物有限公司测序。通过比对,测序结果与 IWGS 数据库提供的 CDS 序列完全一致,CDS 全长 603 bp,编码 200 个氨基酸序列。基因全长也与 IWGS 提供的序列完全相符,大小为 1 084 bp。



M:Marker.

图 1 TaDL1 基因全长克隆

Fig. 1 Full length cloning of TaDL1 gene



M:Marker.

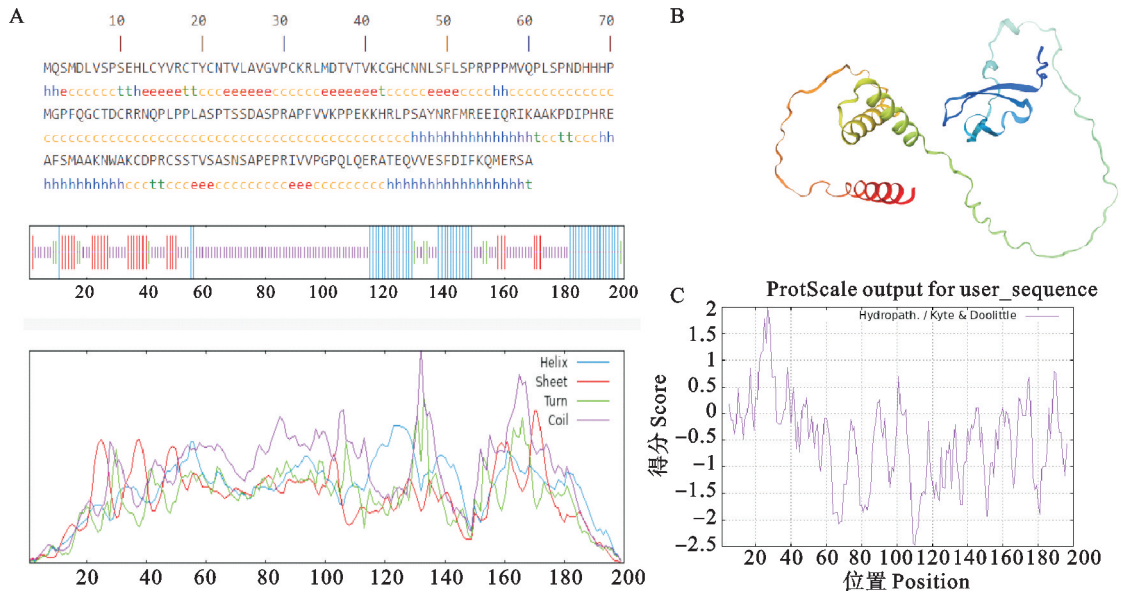
图 2 TaDL1 基因 CDS 全长克隆

Fig. 2 Full length cloning of TaDL1 gene CDS

2.2 TaDL1 蛋白理化性质及二级结构预测

利用 ProtParam 网站分析显示,TaDL1 蛋白由 200 个氨基酸构成,与克隆得到的结果吻合,分子量为 22 304.67 Da,理论等电点为 8.98,分子式为 C₉₆₇H₁₅₃₇N₂₈₇O₂₈₄S₁₈,共包含 3 098 个原子;不稳定系数为 56.95,大于 40,为不稳定蛋白。脂溶指数为 60.45,亲水平均值为 -0.532,说明 TaDL1 蛋白为亲水蛋白。

通过 Sopma 二级结构预测,TaDL1 蛋白中含有 49 个氨基酸构成的 α 螺旋、11 个氨基酸构成的 β 折叠、111 个氨基酸构成的无规则卷曲和 29 个氨基酸构成的延伸链,占比分别为 24.5%、5.5%、55%和 14.5%(图 3A)。 α 螺旋在蛋白中形成的氢键对于蛋白的稳定性至关重要。TaDL1 蛋白 α 螺旋占比较少,其稳定性较差,与 ProtParam 网站预测结果一致。经 ProtScale 预测,TaDL1 蛋白氨基酸中亲水氨基酸残基数量较多,其中第 110 个氨基酸 Score 值最低(-2.478),第 27 个氨基酸 Score 值最高(2.000)(图 3C),与 ProtParam 分析结果一致,说明 TaDL1 蛋白为水溶性蛋白。利用 SWISS-MODEL 对 TaDL1 蛋白三级结构建模,发现其 α 螺旋占比较少,更多的是无规则卷曲,与 Sopma 预测一致(图 3B)。综合来看,TaDL1 蛋白属于水溶性不稳定蛋白。



A: TaDL1 蛋白二级结构分析; 蓝色: α 螺旋; 绿色: β 折叠; 黄色: 无规则卷曲; 红色: 延伸链。B: TaDL1 蛋白三级结构图。C: TaDL1 蛋白疏水预测, 横轴表示氨基酸在蛋白中的位置, 纵轴正值表示疏水性负值表示亲水性。

A: Secondary structure analysis of TaDL1 protein; Blue: α -helix; Green: β -fold; Yellow: Random coil; Red: Extended strand. B: Tertiary structure of TaDL1 protein. C: Hydrophobic prediction of TaDL1 protein; the horizontal axis represents the position of amino acids in the protein, and the positive value of the vertical axis indicates hydrophobicity, and a negative value indicates hydrophilicity.

图 3 TaDL1 蛋白结构预测
 Fig. 3 Structure prediction TaDL1 protein

2.3 TaDL1 蛋白跨膜结构域、信号肽及磷酸化位点预测

利用 TMHMMServer v. 2.0 预测结果表明, TaDL1 蛋白无跨膜区域, 说明 TaDL1 蛋白不是细胞膜蛋白(图 4A)。经 SignalP 预测, TaDL1 蛋白没有信号肽, 为胞内蛋白, 不向细胞膜外进行运输(图 4B)。亚细胞定位结果显示, 该蛋白在细胞核中的可靠性最高。综上推测该蛋白属于非分泌蛋白且定位在细胞核中。

利用 NetPhos 对 TaDL1 蛋白磷酸化位点预测结果(图 4C)表明, TaDL1 蛋白可能存在 21 个磷酸化位点, 包括 13 个丝氨酸和 8 个苏氨酸。其中 8、63、98 和 116 号氨基酸值均远远超临界值(0.5)且都在 0.96 以上, 为最可能发生磷酸化的位点, 这也说明 TaDL1 蛋白有可能通过蛋白磷酸化行使某些生物学功能。

2.4 TaDL1 蛋白系统进化树及基序分析

为进一步了解 TaDL1 蛋白进化关系, 使用 MEGA 对多种植物中的 DL 蛋白序列进行了进化树分析, 结果(图 5)表明, 所有的 DL 蛋白均属于 CRC 亚家族, 具有 YABBY 家族典型的保守结构域(图 6)。TaDL1 基因与二粒小麦进化关系最近, 其蛋白序列相似度为 100%(图 7); 与同属禾

本科作物水稻中的 DL 基因序列相似度在 95% 以上(图 7), 表明小麦 TaDL1 基因可能与水稻中的 OsDL 基因具有相似的生物学功能。

为了更好地描述 DL 蛋白的保守性, 利用 NCBI 的 CDD 工具和 MEME 分析, 经 TBtools 可视化(图 6), 对多个植物的 DL 蛋白的基序分析结果表明, 所有的 DL 蛋白都具有一个 HGM-box 和调节植物极性建立和侧生器官形成有关的保守基序。具有 HMG-box 的蛋白可以作为转录因子与其他基因序列的结合发挥生物学功能, 且 DL 蛋白都具有 YABBY 家族典型的保守结构域。这些结果表明, TaDL1 蛋白与其他基因的某些元件相结合, 共同调节植物侧生器官的形成。DL 蛋白与其他禾本科作物序列相似且结构域一致性非常高, 说明 DL 基因在进化上的保守性。此外, 在 24 个植物 DL 蛋白中还包含一个 HGM20 保守基序。根据报道, HMG20 在细胞内可以与一种蛋白去甲基酶复合物 LSD1-CoREST 结合, 在组织分化和发育方面发挥重要作用^[26-27]。

2.5 TaDL1 蛋白亚细胞定位

为进一步明确 TaDL1 蛋白在细胞中的具体位置, 构建了 pROK II-TaDL1-EGFP 融合载体(图 8)。利用农杆菌介导的方法将实验组 pROKII-

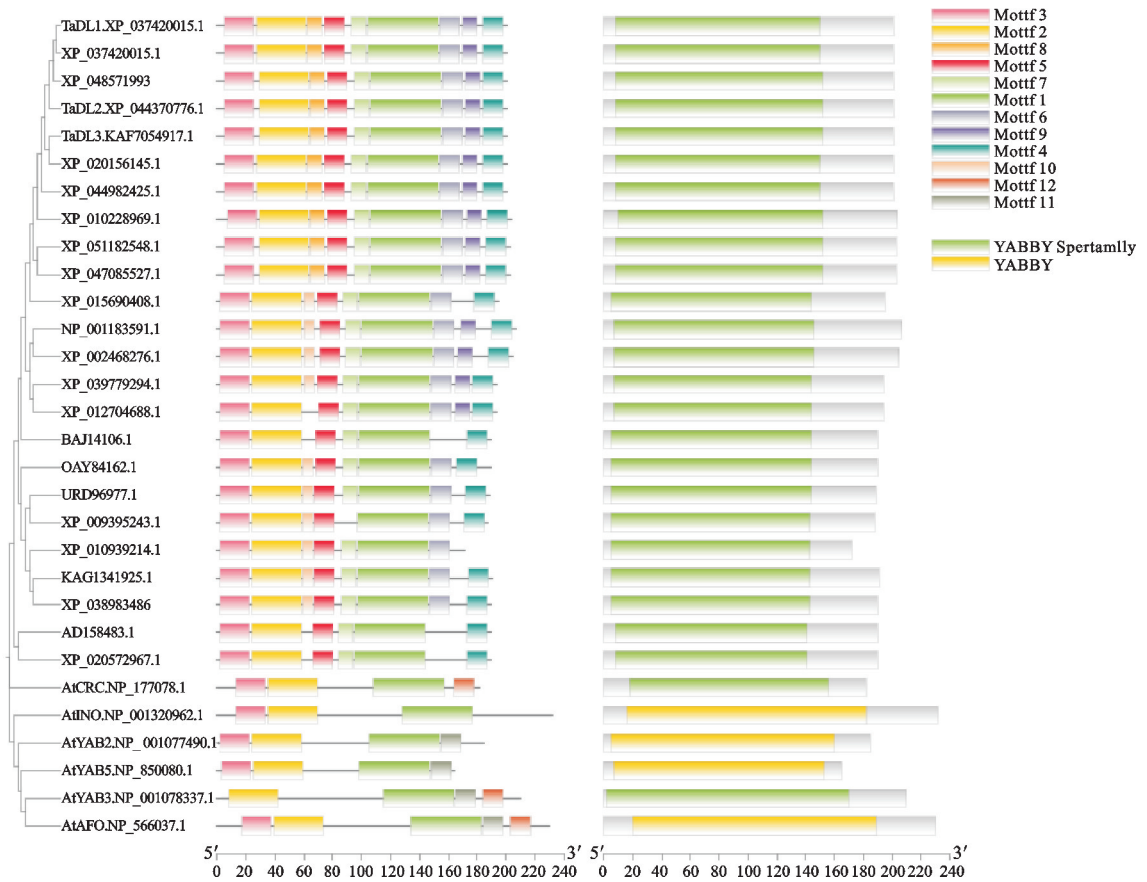


图 6 多种植物 DL 蛋白及拟南芥 YABBY 家族成员基序及保守结构域
 Fig. 6 Conserved motifs and structural domains of DL proteins in various plants and YABBY family members in *Arabidopsis thaliana*



图 7 DL 蛋白序列比对
 Fig. 7 Alignment of DL protein sequences

TaDL1-EGFP 表达载体、细胞核 maker-RFP 及对照组 pROK II-EGFP 空载体转入烟草叶片,经激光共聚焦显微镜镜检,明场可见清晰的烟草细胞轮廓。通过对荧光信号分布情况观察,绿色荧光蛋白在对照组(pROK II-EGFP)烟草叶片细胞中广泛分布,包括细胞膜、细胞质和细胞核,且与 RFP 红色信号在细胞核部位有重叠,表明载体在烟草叶片中成功表达(图 9);实验组(pROK II-TaDL1-EGFP)的烟草叶片中,EGFP 绿色荧光信号与细胞核 maker-RFP 红色荧光信号有 6 处明

显的重叠,且只分布在细胞核中,其他部位未观察到荧光信号(图 9),说明 TaDL 蛋白定位在细胞核中。生物信息学预测此蛋白属于非分泌蛋白,与其定位结果相符。CELLO 预测 TaDL1 蛋白定位在细胞核中的可靠性为 82.4%,wolf psort 也预测 TaDL1 蛋白定位在细胞核中,与实验结果相吻合。以上结果揭示了 TaDL1 蛋白作为 YABBY 家族转录因子的一员在细胞核中行使着生物学功能。

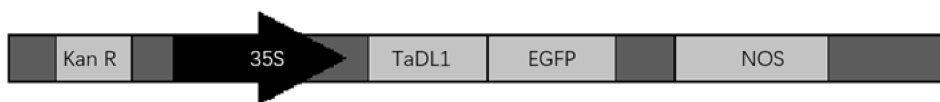
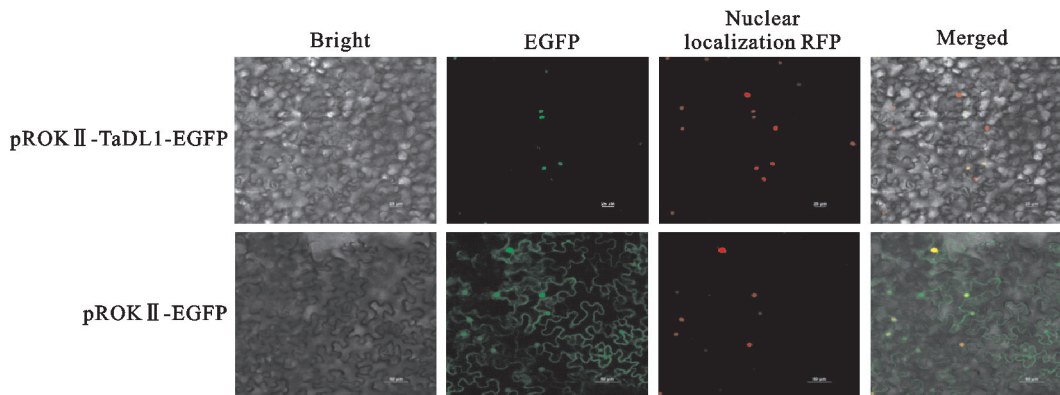


图 8 pROK II-TaDL1-EGFP 融合载体图谱

Fig. 8 Map of pROK II-TaDL1-EGFP fusion carrier



pROK II-EGFP 为空载体。pROK II-TaDL1-EGFP 为 TaDL1 蛋白定位结果。绿色为 EGFP。红色为细胞核 maker-RFP。

pROK II-EGFP is an empty vector. pROK II-TaDL1-EGFP is the TaDL1 protein localization result. Green is EGFP. Red is the nuclear maker RFP.

图 9 TaDL1 蛋白亚细胞定位

Fig. 9 Subcellular localization of TaDL1 protein

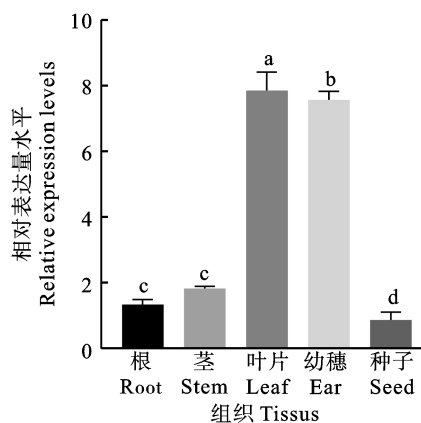
2.6 TaDL1 基因表达分析

为进一步了解 TaDL1 基因的功能,以未处理的小麦根、茎、叶、幼穗和种子的 cDNA 为模板,利用实时荧光定量 PCR 分析了 TaDL1 基因在小麦不同组织中的表达模式。结果显示, TaDL1 基因在小麦不同组织中都有表达,其表达量存在明显差异。叶片和幼穗中表达量显著高于其他组织,其中叶片表达量最高,幼穗次之,种子中表达量最低,叶片和幼穗中的表达量约是种子中的 8 倍(图 10)。这一结果说明 TaDL1 基因在叶片和幼穗中特异性表达,推测可能在叶片和幼穗中发挥生物学功能。

2.7 TaDL1 基因在非生物胁迫下的表达分析

为进一步研究 TaDL1 基因在非生物胁迫下的表达模式,利用 qRT-PCR 技术对 NaCl 溶液、PEG-6000 和热胁迫处理后 7 d 的幼苗进行了基因相对表达量分析。结果表明,在三种胁迫下, TaDL1 基因表达量出现明显差异。其中,NaCl 胁迫和热胁迫处理的表达量均显著高于对照,而 PEG-6000 处理与对照差异不显著(图 11A),说明 TaDL1 基因对盐和热胁迫有明显的响应,而对干旱胁迫不敏感。

为进一步明确 TaDL1 基因在盐胁迫下不同时间段的表达模式,利用 200 mmol · L⁻¹ NaCl 溶



图柱上不同小写字母间表示不同组织间差异显著。

Different lowercase letters above the columns indicate significant differences among different tissues.

图 10 TaDL1 基因在小麦不同组织中的相对表达量

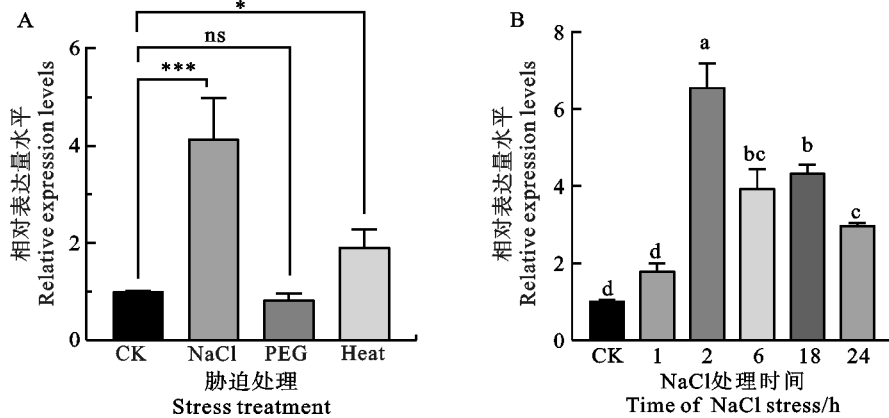
Fig. 10 Relative expression levels of TaDL1 gene in each tissue.

液胁迫处理小麦幼苗,发现 TaDL1 基因在 NaCl 处理后 2 h 的表达量不断升高,且在 2~24 h 之内表达量都与未 NaCl 处理差异显著,其中在 NaCl 处理后 2 h 之内的表达量与未 NaCl 处理差异最显著,是未 NaCl 处理的 6.5 倍;2 h 后逐渐降低,6~18 h 表达量相对恒定,是未 NaCl 处理的 4 倍左右;18 h 后表达量逐渐降低,到 24 h 后

表达量降低到未 NaCl 处理的 3 倍(图 11B)。

总体来看 *TaDL1* 基因对热和盐胁迫有较明显的响应,尤其对盐胁迫的响应更为显著且在 2~

24 h 内持续较高的表达水平,表明 *TaDL1* 基因可能在小麦非生物胁迫中尤其是盐胁迫中发挥着一定的功能,可能参与盐胁迫应答相关的信号途径。



A:不同胁迫处理下 *TaDL1* 基因的表达模式。*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$ 。B: NaCl 胁迫处理不同时间 *TaDL1* 基因表达。图柱上不同小写字母表示不同处理时间差异显著。

A: The expression patterns of the *TaDL1* gene under different stress treatments. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ns: $P > 0.05$. B: The gene expression levels of *TaDL1* after NaCl stress treatment at different time points. Different lowercase letters on the columns indicate significant differences among different treatment time.

图 11 不同胁迫处理下 *TaDL1* 基因相对表达量

Fig. 11 Relative expression level of the *TaDL1* gene under different stress treatments

3 讨论

YABBY 基因家族成员是与植物的侧生器官发育相关,且为植物特有的转录因子^[28],其成员在植物生长发育特别是花和叶器官的发育、激素响应、胁迫应答方面发挥重要作用^[29]。通过生物信息学分析, *TaDL1* 转录因子具有 YABBY 家族保守结构域和 CRC 亚家族结构域;通过进化树分析, *TaDL1* 基因属于 CRC 亚家族成员。因此, *TaDL1* 基因属于 YABBY 家族和 CRC 亚家族。

通过 PCR 技术克隆得到 *TaDL1* 基因 CDS, 其编码区全长 603 bp, 编码 201 个氨基酸。理化性质分析结果显示, *TaDL1* 蛋白为亲水蛋白, 且无跨膜结构域和信号肽, 说明其属于胞内蛋白。因此, *TaDL1* 转录因子不向膜外转运, 在细胞内发挥自身功能。通过农杆菌介导法将 pROK II-*TaDL1*-EGFP 融合载体与细胞核 marker-RFP 瞬时转化到烟草叶片, 观察发现, 两者荧光信号有多处重叠, 说明 *TaDL1* 转录因子和小麦其他转录因子一样定位在细胞核中, 且与核中其他的基因序列或调控区域进行结合调控其他基因的表达, 进而发挥自身功能, 进一步证实 *TaDL1* 蛋白为胞内蛋白且无跨膜结构域。此外, *TaDL1* 蛋白存在多个磷酸化位点, 推测 *TaDL1* 转录因子可能通过磷

酸化来行使自身生物学功能。

已有研究表明, 在水稻中 *DL* 基因位于第 3 号染色体短臂上^[30]。它促进细胞沿着叶原基的轴增殖, 形成支撑植物叶片直立伸长的中脉^[31-32]。携带 *DL* 的突变体植株无法形成完整的中脉, 导致叶片下垂, 形成披垂叶的特征。 *DL* 基因的严重突变还可导致花部的异常, 如心皮向雄蕊同源转换^[33]。蛋白序列比对发现, 小麦的 *TaDL1* 基因与水稻 *OsDL* 基因的相似度在 95% 以上; 与其他物种中的 *DL* 基因同源性也较高, 也从侧面说明 *DL* 功能的保守性。值得一提的是二粒小麦和普通小麦的 *TaDL1* 蛋白序列氨基酸相似度为 100%, 也证明了其保守性。保守结构域和基序分析也证明了这一点。有研究认为, 禾本科作物的 *DL* 基因表达模式具有保守性^[34], 与前人研究结论相符。经利用 qPCR 技术测定, 小麦 *TaDL1* 在叶片和幼穗中有较高的表达量, 与水稻 *OsDL* 基因表达模式具有很高的相似性。关于花器官的发育从最开始经典的 ABC 模型发展到 ABCD、ABCDE、四聚体模型等^[35-38]。 *DL* 基因属于 C 类基因, 主要在雌蕊的发育发挥重要功能, 缺失此基因可能会导致雌蕊发育异常。综上推测, 小麦 *TaDL1* 基因由于在表达模式的保守性, 可能和其他 *DL* 基因有相似的生物学功能, 在小麦叶片发育中发

挥重要功能。进化树分析表明, *TaDL1* 基因属于 CRC 亚家族, 根据 ABC 经典模型, 此基因属于 C 类基因, 推测在小麦花序发育尤其是雌蕊的发育中发挥重要功能。在禾本科作物中关于 DL 基因在花器官和叶片的调控机制的研究, 主要以水稻为研究对象。DL 基因在小麦花器官发育调控发面有待进一步的探究, 需要进一步完善其调控机制。

YABBY 家族成员参与胁迫多种生物胁迫, 在大豆中 *GmYABBY3*、*GmYABBY10* 和 *GmYABBY16* 参与干旱、盐分和 ABA 的非生物胁迫^[39]。在非生物胁迫处理下陆地棉中几乎一半的 YABBY 家族基因都有不同程度的下调^[40]。通过 qPCR 分析, *TaDL1* 基因对非生物胁迫产生明显的响应, *TaDL1* 基因对盐胁迫响应最明显, 且在 1~24 h 内表达量保持较高水平, 对热胁迫处理下表达量也有明显的提升。在 YABBY 家族中许多基因参与信号应答。在番茄中, *SlYABBY2b* 转录因子直接与 GH3.8 启动子结合参与生长素信号通路^[41]; 拟南芥中 *AtCRC* 参与脂肪酸代谢调节^[42]; 白菜中的 YABBY 基因参与多种非生物胁迫^[43-44]等, 推测 *TaDL1* 基因参与小麦对于盐胁迫和热胁迫的抗性调节。此外, *TaDL1* 作为转录因子可能会和特定的盐胁迫和热胁迫相关基因的启动子调控元件结合, 调控相关基因的表达, 可能参与盐胁迫和热胁迫相关的应答途径, 在小麦抗盐和抗热方面发挥重要功能。但关于其具体的胁迫应答模式及互作基因还需要进一步的研究。

本研究利用 PCR 技术在小麦新春 9 号中克隆得到 *TaDL1* 基因, 分析 *TaDL1* 蛋白的序列特征, 构建了进化树及多种植物种的 DL 结构域分析, 证明了其在进化和功能上的保守性。该基因的亚细胞定位和不同组织及胁迫后的表达模式探讨, 为后续探索其在花和叶器官的调控模式及胁迫应答等研究奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 张占平, 孙嘉莹, 陆佳欣, 等. 植物特有的 YABBY 基因特征与功能研究现状[J]. 浙江农业科学, 2023, 64(6): 1545.
ZHANG Z P, SUN J Y, LU J X, et al. Research status of plant-specific YABBY gene characteristics and functions [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2023, 64(6): 1545.
- [2] 向建华, 李灵之, 陈信波. 植物非生物逆境相关锌指蛋白基因的研究进展[J]. 核农学报, 2012, 26(4): 666.
XIANG J H, LI L Z, CHEN X B. Progress in the study of abiotic stress-related zinc finger protein genes in plants [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2012, 26(4): 666.
- [3] DU F, GUAN C, JIAO Y. Molecular mechanisms of leaf morphogenesis [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(9): 1117.
- [4] BOWMAN J L, SMYTH D R. CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains [J]. *Development*, 1999, 126(11): 2387.
- [5] HAO L, ZHANG J, SHI S, et al. Identification and expression profiles of the YABBY transcription factors in wheat [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e12855.
- [6] BOWMAN J L. The YABBY gene family and abaxial cell fate [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2000, 3(1): 17.
- [7] VILLANUEVA J M, BROADHVEST J, HAUSER B A, et al. INNER NO OUTER regulates abaxial-adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules [J]. *Genes & Development*, 1999, 13(23): 3160.
- [8] DU H, RAN J H, FENG Y Y, et al. The flattened and needle-like leaves of the pine family (Pinaceae) share a conserved genetic network for adaxial-abaxial polarity but have diverged for photosynthetic adaptation [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2020, 20(1): 131.
- [9] ZHANG T, WU A, HU X, et al. Comprehensive study of rice YABBY gene family: Evolution, expression and interacting proteins analysis [J]. *PeerJ*, 2023, 11: e14783.
- [10] LIU H L, XU Y Y, XU Z H, et al. A rice YABBY gene, *OsYABBY4*, preferentially expresses in developing vascular tissue [J]. *Development Genes and Evolution*, 2007, 217(9): 629.
- [11] 赵翔宇, 谢洪涛, 陈祥彬, 等. 小麦 *TaYAB2* 基因的过量表达造成转基因拟南芥叶片近轴面特征趋向远轴面[J]. 作物学报, 2012, 38(11): 2042.
ZHAO X Y, XIE H T, CHEN X B, et al. Overexpression of *TaYAB2* gene in wheat caused the paraxial characteristics of transgenic *Arabidopsis* leaves to tend to the far axis [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(11): 2042.
- [12] ZHAO W, SU H Y, SONG J, et al. Ectopic expression of *TaYAB1*, a member of YABBY gene family in wheat, causes the partial abaxialization of the adaxial epidermises of leaves and arrests the development of shoot apical meristem in *Arabidopsis* [J]. *Plant Science*, 2006, 170(2): 364.
- [13] ZHANG T, LI C, LI D, et al. Roles of YABBY transcription factors in the modulation of morphogenesis, development, and phytohormone and stress responses in plants [J]. *Journal of Plant Research*, 2020, 133(6): 751.
- [14] ALI BUTTAR Z, YANG Y, SHARIF R, et al. Genome wide identification, characterization, and expression analysis of YABBY-gene family in WHEAT (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Agronomy*, 2020, 10(8): 1189.
- [15] 高英, 杨光, 张瑞浦, 等. 野生二粒小麦 YABBY 转录因子家族的鉴定与表达分析[J]. 分子植物育种, 2023, 21(1): 17.
GAO Y, YANG G, ZHANG R P, et al. Identification and expression analysis of YABBY transcription factor family in wild emmer wheat [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(1): 17.
- [16] 赵燕. 拟南芥、芥菜心皮发育相关基因 CRABS CLAW cDNA 克隆及交互转化[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007: 1.

- ZHAO Y. Cloning and mutual transformation of genes related to carpel development in *Arabidopsis thaliana* and *Capsella bursa-pastoris* [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2007:1.
- [17] BAUM S F, ESHED Y, BOWMAN J L. The *Arabidopsis* nectary is an ABC-independent floral structure [J]. *Development*, 2001, 128(22):4657.
- [18] 赵伟, 宿红艳, 王磊, 等. 小麦 TaCRC 基因的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(7):1298.
- ZHAO W, SU H Y, WANG L, *et al.* Cloning and expression analysis of TaCRC in *Triticum aestivum* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(7):1298.
- [19] STRABLE J, WALLACE J G, UNGER-WALLACE E, *et al.* Maize YABBY genes drooping leaf1 and drooping leaf2 regulate plant architecture [J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(7):1622.
- [20] NAGASAWA N, MIYOSHI M, SANO Y, *et al.* SUPERWOMAN1 and DROOPING LEAF genes control floral organ identity in rice [J]. *Development*, 2003, 130(4):705.
- [21] WANG A, TANG J, LI D, *et al.* Isolation and functional analysis of LiYAB1, a YABBY family gene, from lily (*Lilium longiflorum*) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(9):988.
- [22] ISHIKAWA M, OHMORI Y, TANAKA W, *et al.* The spatial expression patterns of DROOPING LEAF orthologs suggest a conserved function in grasses [J]. *Genes & Genetic Systems*, 2009, 84(2):137.
- [23] OHMORI Y, TORIBA T, NAKAMURA H, *et al.* Temporal and spatial regulation of DROOPING LEAF gene expression that promotes midrib formation in rice [J]. *The Plant Journal*, 2011, 65(1):77.
- [24] YAMAGUCHI T, NAGASAWA N, KAWASAKI S, *et al.* The YABBY gene DROOPING LEAF regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa* [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(2):500.
- [25] STRABLE J, VOLLBRECHT E. Maize YABBY genes drooping leaf1 and drooping leaf2 regulate floret development and floral meristem determinacy [J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(7):1622.
- [26] CEBALLOS-CHÁVEZ M, RIVERO S, GARCÍA-GUTIÉRREZ P, *et al.* Control of neuronal differentiation by sumoylation of BRAF35, a subunit of the LSD1-CoREST histone demethylase complex [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(21):8085.
- [27] ESTEGHAMAT F, VAN DIJK T B, BRAUN H, *et al.* The DNA binding factor Hmg20b is a repressor of erythroid differentiation [J]. *Haematologica*, 2011, 96(9):1252.
- [28] BARTHOLMES C, HIDALGO O, GLEISSBERG S. Evolution of the YABBY gene family with emphasis on the basal eudicot *Eschscholzia californica* (Papaveraceae) [J]. *Plant Biology*, 2012, 14(1):11.
- [29] FINET C, FLOYD S K, CONWAY S J, *et al.* Evolution of the YABBY gene family in seed plants [J]. *Evolution & Development*, 2016, 18(2):116.
- [30] NAGASAWA N, MIYOSHI M, SANO Y, *et al.* SUPERWOMAN1 and DROOPING LEAF genes control floral organ identity in rice [J]. *Development*, 2003, 130(4):705.
- [31] HUANG J, CHE S, JIN L, *et al.* The physiological mechanism of a drooping leaf2 mutation in rice [J]. *Plant Science*, 2011, 180(6):757.
- [32] YAMAGUCHI T, NAGASAWA N, KAWASAKI S, *et al.* The YABBY gene DROOPING LEAF regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa* [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(2):500.
- [33] 王永全. 一个新的 DL 等位突变体的形态特征、表达与功能分析[D]. 福州:福建农林大学, 2012:1.
- WANG Y Q. Morphological characteristics, expression and function analysis of a new allelic mutant of DROOPING LEAF(DL) gene [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012:1.
- [34] 向江. 华东葡萄 VpYABBY 基因功能分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2013:1.
- XIANG J. Functional analysis of the VpYABBY genes from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2013:1.
- [35] COEN E S, MEYEROWITZ E M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development [J]. *Nature*, 1991, 353:31.
- [36] HONMA T, GOTO K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs [J]. *Nature*, 2001, 409:525.
- [37] MÜNSTER T, URSULA WINGEN L, FAIGL W, *et al.* Characterization of three GLOBOSA-like MADS-box genes from maize; Evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses [J]. *Gene*, 2001, 262(1-2):1.
- [38] THEIBEN G. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(1):75.
- [39] ZHAO S P, LU D, YU T F, *et al.* Genome-wide analysis of the YABBY family in soybean and functional identification of GmYABBY10 involvement in high salt and drought stresses [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2017, 119:132.
- [40] YANG Z, GONG Q, WANG L, *et al.* Genome-wide study of YABBY genes in upland cotton and their expression patterns under different stresses [J]. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9:33.
- [41] SUN M, LI H, LI Y, *et al.* Tomato YABBY2b controls plant height through regulating indole-3-acetic acid-amido synthetase (GH3.8) expression [J]. *Plant Science*, 2020, 297:110530.
- [42] HAN X, YIN L, XUE H. Co-expression analysis identifies CRC and AP1 the regulator of *Arabidopsis* fatty acid biosynthesis [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54(7):486.
- [43] SHI B, GUO X, WANG Y, *et al.* Feedback from lateral organs controls shoot apical meristem growth by modulating auxin transport [J]. *Developmental Cell*, 2018, 44(2):204.
- [44] XIONG Y, JIAO Y. The diverse roles of auxin in regulating leaf development [J]. *Plants*, 2019, 8(7):243.