

## 小麦气孔发育相关基因*TaMUTE*的克隆及功能分析

王嘉宁<sup>1</sup>, 郭然<sup>1,2</sup>, 李雨洁<sup>1</sup>, 曹雨舟<sup>1</sup>, 西尔艾力·依不拉衣木<sup>1</sup>,  
罗佳<sup>1</sup>, 丁博<sup>1</sup>, 李明<sup>1</sup>, 谢晓东<sup>1</sup>, 包曙光<sup>1</sup>

(1. 天津农学院农学与资源环境学院, 天津 300392; 2. 沈阳农业大学农学院, 辽宁沈阳 110866)

**摘要:**植物气孔通过控制叶片内部与外部环境的气体交换影响植物的蒸腾作用和光合作用,在植物的生长发育和适应环境变化中起着重要作用。为探究气孔发育相关基因*TaMUTE*在小麦生长发育中的潜在功能,本研究克隆了普通小麦*TaMUTE*基因并分析了其序列特征,利用qRT-PCR技术分析了在干旱和脱落酸(ABA)胁迫下*TaMUTE*基因的表达模式,采用转基因技术获得拟南芥*TaMUTE*转基因植株并分析了其表型。结果表明,从普通小麦中克隆了3个*TaMUTE*同源基因,将其分别命名为*TaMUTE2A*、*TaMUTE2B*和*TaMUTE2D*。小麦*TaMUTE2A*的开放阅读框(ORF)为651 bp,编码216个氨基酸;*TaMUTE2B*的ORF为717 bp,编码238个氨基酸;*TaMUTE2D*的ORF为648 bp,编码215个氨基酸。3个蛋白属于bHLH家族,均为疏水、不稳定蛋白,其二级结构主要由 $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角和无规则卷曲组成。系统进化分析表明,小麦*TaMUTE*与大麦*HvMUTE*的亲缘关系最近。在ABA处理4 h条件下,*TaMUTE*基因的表达显著上调;在干旱条件下,*TaMUTE*基因的表达无显著变化。过表达*TaMUTE*基因会导致转基因拟南芥植株矮小和发育缓慢,增加其气孔密度。

**关键词:**小麦;气孔;*TaMUTE*基因;功能分析

中图分类号:S512.1;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2025)06-0719-08

## Cloning and Functional Analysis of *TaMUTE* Gene Related to Stomatal Development in Wheat

WANG Jianing<sup>1</sup>, GUO Ran<sup>1,2</sup>, LI Yujie<sup>1</sup>, CAO Yuzhou<sup>1</sup>, XIERAILI · Yibulayimu<sup>1</sup>,  
LUO Jia<sup>1</sup>, DING Bo<sup>1</sup>, LI Ming<sup>1</sup>, XIE Xiaodong<sup>1</sup>, BAO Shuguang<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy and Resources and Environment, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China;

2. College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China)

**Abstract:** Stomata affects transpiration and photosynthesis in plants by controlling the gas exchange between the internal and external environments of leaves. It plays an important role in plant growth and development, and adaptation to environmental changes. To explore the potential function of *TaMUTE*, a gene related to wheat stomatal development, in plant growth and development, was cloned from the common wheat and analyzed for its sequence characteristics. The expression pattern of *TaMUTE* gene was analyzed under drought and abscisic acid (ABA) stresses by qRT-PCR. The *TaMUTE* transgenic plants were obtained by transgenic technology and analyzed for their phenotype. The results showed that three *TaMUTE* homologs gene were cloned from common wheat, which were named *TaMUTE2A*, *TaMUTE2B* and *TaMUTE2D*. The open reading frame (ORF) of the wheat *TaMUTE2A* gene is 651 bp, encoding 216 amino acids; the ORF of the *TaMUTE2B* gene is 717 bp,

收稿日期:2024-04-27 修回日期:2024-06-14

基金项目:国家大学生创新创业训练计划项目(202310061069);天津市教委科研计划项目(2020Kj098);国家自然科学基金(青年)项目(32301817);天津市“项目+团队”重点培养专项(XC202060)

第一作者 E-mail: wangjianing3956@163.com(王嘉宁)

通讯作者 E-mail: baoshuguang@tjau.edu.cn(包曙光); xiex@tjau.edu.cn(谢晓东)

encoding 238 amino acids; and the ORF of the *TaMUTE2D* gene is 648 bp, encoding 215 amino acids. Three MUTE proteins belong to the bHLH(basic helix-loop-helix) family, which are all hydrophobic and labile proteins. Their secondary structure is mainly composed of  $\alpha$ -helix, extended chain,  $\beta$ -turn and irregular recoil. Phylogenetic analysis revealed that TaMUTE is more closely related to the barley MUTE. The expression of the *TaMUTE* was significantly enhanced after 4 h under ABA treatment. While the expression of the *TaMUTE* gene did not change significantly under the drought treatment conditions. Overexpression of *TaMUTE* genes resulted in short stature, development retardation and increased stomatal density in transgenic plant.

**Keywords:** Wheat; Stoma; *TaMUTE* gene; Functional analysis

小麦(*Triticum aestivum*)属于禾本科小麦属,是一种营养丰富、经济价值较高的商品粮,也是中国重要的粮食作物。小麦在生长发育过程中会遭受各种胁迫,严重影响其产量与品质<sup>[1-2]</sup>,提高小麦的产量与品质对于粮食安全具有重要意义。

气孔是植物与外界环境交流的重要通道,对植物的生长发育和环境适应性具有重要作用;单子叶植物的气孔由一对保卫细胞和副卫细胞组成<sup>[3-7]</sup>。被子植物气孔发育受到 3 个 bHLH(basic-helix-loop-helix,碱性螺旋-环-螺旋)家族蛋白的严格调控,其中 SPEECH-LESS(SPCH)调控拟分生母细胞发育至拟分生细胞;*MUTE* 调控拟分生细胞发育至保卫母细胞;*FAMA* 调控保卫母细胞发育至保卫细胞<sup>[8-17]</sup>。研究发现,拟南芥 *mute* 突变体的叶片表面几乎不形成气孔,气孔发育停滞在分生组织时期;而过量表达 MUTE 基因导致叶片表面出现大量气孔<sup>[18]</sup>。二穗短柄草 *BdMUTE* 基因对保卫细胞和副卫细胞的形成具有重要作用<sup>[19]</sup>。玉米 *zmmute* (*zmbzu2*) 突变体的保卫细胞和副卫细胞表现异常,不能形成完整的气孔复合物<sup>[20]</sup>。水稻 *OsMUTE* 基因可限制分生组织不对称分裂,促进分生组织向保卫细胞母细胞的转变<sup>[21]</sup>。

目前,有关小麦 MUTE 基因的功能尚未见报道。因此,本研究以小麦幼苗为研究对象,对小麦 *TaMUTE* 基因 ORF 序列进行克隆及相关生物信息学分析,通过实时荧光定量 PCR 技术分析其在干旱和 ABA 处理下的表达水平,利用转基因技术获得拟南芥 *TaMUTE* 转基因植株,并对转基因植株的表型进行分析,以期小麦气孔发育基因的深入研究及其在育种中的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究所用小麦品种为 Fielder,由天津农学院天津市作物抗逆机理及遗传改良国际联合研究中心提供。选取饱满且均匀一致的小麦种子 800 粒,用 75%酒精处理 1 min;无菌水冲去酒精后加入 1%的 NaClO 浸泡 10 min,无菌水冲洗 3 次;将种子平铺在发芽盒中水培,每个发芽盒中 40 粒种子,置于人工气候室(温度 24 °C,湿度 70%,光照 10~14 h,光照强度 3 000 Lx)培养 4 d,待种子萌发整齐后进行后续试验。

### 1.2 小麦叶片总 RNA 的提取及 cDNA 模板的合成

分别采用 20%PEG 和 100  $\mu$ mol ABA 处理 1.1 中萌发整齐的小麦幼苗,置于人工气候室(条件同上)处理时间为 0、4、8、12 和 24 h;剪取处理不同时间的小麦叶片 100 mg 置于 1.5 mL 离心管中进行液氮速冻,置于 -80 °C 冰箱中保存备用。采用天根生化科技(北京)有限公司生产的 RNAPrep Pure 试剂盒按照说明进行总 RNA 的提取。采用宝日医生物技术(北京)有限公司生产的 PrimeScript™ IV 1st strand cDNA Synthesis Mix 试剂盒按照说明合成 cDNA。

### 1.3 小麦 *TaMUTE* 基因的克隆

通过 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)网站获得小麦 *TaMUTE* 序列。采用 primer 6.0 软件设计扩增引物(表 1),用 1.2 中合成的小麦幼苗 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 体系为 20  $\mu$ L; ddH<sub>2</sub>O 8.4  $\mu$ L, PrimeSTAR Max Premix (2X) 10  $\mu$ L,正、反向引物各 0.3  $\mu$ L, cDNA 模板 1  $\mu$ L。PCR 程序为:预变性 98 °C 3 min;变性 98 °C 10 s,退火 58 °C 5 s,72 °C 延伸 30 s,35 个循环;延伸 72 °C 5 min。PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳回收。采用 TA 克隆方法将目的片段连接

表 1 本研究使用的引物  
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物(5'-3') Primer (5'-3')	用途 Property
TaMUTE2A/D-F1	ATGTCGCACATCGCGGTGGA	Gene cloing
TaMUTE2A/B/D-R1	TTATATCGCCATGGATGAGTAG	
TaMUTE2B-F1	ATGCGGTGGTCGTCAGCCAG	Gene cloing
TaMUTE2A/B/D-R1	TTATATCGCCATGGATGAGTAG	
TaMUTE-qF1	CTTCGTCCTCAAGATTGGGC	qRT-PCR
TaMUTE-qR1	CTGGTGGTAGCAGAAGGTCT	
TaTubulin-qF1	CATGCTATCCCTCGTCTCGACCT	qRT-PCR
TaTubulin-qR1	CGCACTTCATGATGGAGTTGTAT	
TaMUTE2A/D-F2	GCTCTAGAATGTGCGACATCGCGGTGGA	过表达载体构建 Construction of overexpression vector
TaMUTE2A/B/D-R2	CCCAAGCTTTTATATCGCCATGGATGAGTAG	
TaMUTE2B-F2	GCTCTAGAATGCGGTGGTCGTCAGCCAG	
TaMUTE2A/B/D-R2	CCCAAGCTTTTATATCGCCATGGATGAGTAG	

在 T 载体上,然后通过热激转化法将其转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中;PCR 鉴定为阳性的菌落进行扩大培养,提取质粒;将质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,获得小麦 *TaMUTE* 基因序列。

#### 1.4 小麦 *TaMUTE* 基因的生物信息学分析

采用 Conserved Domain Search Service([www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)) 分析保守结构域;用 ProtParam tool(<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测理化性质;用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html)) 预测蛋白质二级结构;用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测三级结构;用 MEGA 7.0 软件分析序列及系统进化树构建。

#### 1.5 小麦 *TaMUTE* 系统进化分析

采用 NCBI 数据库检索大豆、棉花、向日葵、拟南芥、高粱、玉米、水稻、二穗短柄草、大麦和小麦共 10 个物种的 MUTE 蛋白序列。利用 Mega 11.0 软件构建系统进化树。

#### 1.6 干旱和 ABA 处理下小麦 *TaMUTE* 基因的相对表达量测定

根据 1.3 中测序结果,采用 primer 6.0 软件设计 *TaMUTE* 基因的实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)引物(表 1)。小麦 *Tatubulin* 基因为内参。采用 QuantStudio3 荧光定量 PCR 仪(ThermoFisher, 美国)进行基因扩增。qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L;TB Green Fast qPCR Mix(2X) 10  $\mu$ L,上、下游引物各 0.5  $\mu$ L,模板 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L。反应程序:预变性 95  $^{\circ}$ C 30 s;95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> 法分析 *TaMUTE* 基因的相对表达量。

#### 1.7 小麦 *TaMUTE* 过表达载体构建及转基因拟南芥植株筛选

以小麦幼苗的 cDNA 作为模板,采用 PCR 技术扩增 *TaMUTE* 基因(引物见表 1)。使用 *Xba*I 和 *Hind* III 限制性内切酶分别对 *TaMUTE* 基因扩增产物和含有 CaMV35S 启动子(Cauliflower mosaic virus 35S promoter)的表达载体 pCBAM-BIA3301 进行酶切。采用 T4 DNA 连接酶将酶切后的 *TaMUTE* 序列分别连接到 pCBAM-BIA3301 载体。将构建成功的表达载体通过农杆菌介导法转化到拟南芥中。采用 1:10 000 的 Basta 除草剂溶液喷施萌发的拟南芥幼苗进行转基因植株的初步筛选;待筛选获得的阳性幼苗生长到三周苗龄时,采用 PCR 技术再次鉴定。将获得转基因阳性植株命名为 *TaMUTE*OE。

#### 1.8 *TaMUTE* 转基因拟南芥气孔表型分析

取四周苗龄的野生型和转基因拟南芥叶片浸入到卡诺氏固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)中固定 6 h;用无水乙醇冲洗 3 次,无菌水冲洗 1 次,置入透明剂(水合氯醛:甘油:水=25:8:1)中透明 48 h;将透明的叶片置于载玻片上制片,在显微镜下观察分析。

## 2 结果与分析

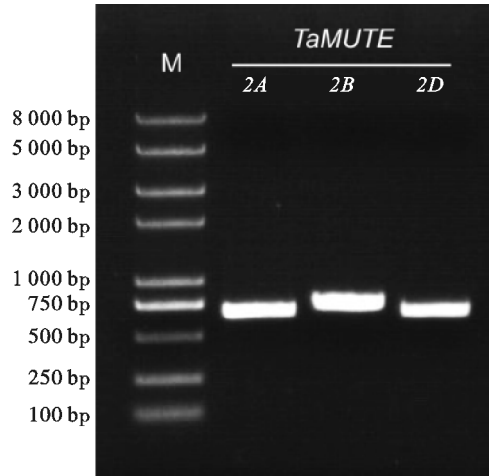
### 2.1 小麦 *TaMUTE* 基因及氨基酸序列分析

通过 NCBI 网站检索获得了三个小麦 *TaMUTE*, 分别命名为 *TaMUTE2A* (LOC123184797)、*TaMUTE2B* (LOC123040731) 和 *TaMUTE2D* (LOC123048785)。以小麦 Fielder 幼苗的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增和基因测序获得了 *TaMUTE* 基因的开放阅读框(ORF)序列(图 1)。小麦 *TaMUTE2A* 的 ORF 为 651 bp,编码了 216 个氨

氨基酸,其中亮氨酸与丝氨酸的含量最高,均为 23 个; *TaMUTE2A* 蛋白分子式为  $C_{1003}H_{1646}N_{294}O_{310}S_{12}$ , 分子量为 23 168. 61, 等电点(pI)为 7. 03, 不稳定系数为 56. 85, 是不稳定蛋白; *TaMUTE2A* 的平均亲水数 0. 069, 推测是疏水蛋白。 *TaMUTE2B* 的 ORF 为 717 bp, 编码了 238 个氨基酸, 其中 5-氨基乙酰丙酸和丝氨酸的含量较高, 分别是 29 个和 27 个; 蛋白分子式为  $C_{1107}H_{1814}N_{332}O_{343}S_{12}$ , 其分子量为 25 647. 32, 等电点(pI)为 8. 72, 不稳定系数为 58. 83, 是不稳定蛋白; *TaMUTE2B* 的平均亲水数为 -0. 068, 推测是亲水蛋白。 *TaMUTE2D* 的 ORF 为 648 bp, 编码了 215 个氨基酸, 其中 5-氨基乙酰丙酸和丝氨酸的含量最高, 均为 23 个; 蛋白分子式为  $C_{999}H_{1638}N_{292}O_{308}S_{12}$ , 其分子量为 23 052. 49, 等电点(pI)为 7. 03, 不稳定系数为 57. 96, 是不稳定蛋白; *TaMUTE2D* 的平均亲水数 0. 069, 推测为疏水蛋白。

*TaMUTE2A* 和 *TaMUTE2D* 的 ORF 序列与 NCBI 数据库的数据一致; 而 *TaMUTE2B* 的 ORF

序列与数据库序列不同, 数据库中第 249 bp 处为 C, 本研究测序结果为 G(图 2)。



M: Marker.

图 1 小麦 *TaMUTE* 基因的 PCR 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis image of the PCR products of wheat *TaMUTE* gene

<i>TaMUTE2A</i>	.....	ATGTC	5
<i>TaMUTE2B</i>	ATGCGGTGGTCTGACCCAGCTCTGCTACCCGCGGGCCACCGTACCCGATCGAGCAGCTGAGGGAAGAAGGATGTC		80
<i>TaMUTE2D</i>	.....	ATGTC	5
Consensus	.....	atgtc	
<i>TaMUTE2A</i>	GCACATCGCGGTGGAGCGGAACCGCGCGGCAGATGAACGACCACCTCAAGGTGCTCGCGCTACGCGCGCTTCT		85
<i>TaMUTE2B</i>	GCACATCGCGGTGGAGCGGAACCGCGCGGCAGATGAACGACCACCTCAAGGTGCTCGCGCTACGCGCGCTTCT		160
<i>TaMUTE2D</i>	GCACATCGCGGTGGAGCGGAACCGCGCGGCAGATGAACGACCACCTCAAGGTGCTCGCGCTACGCGCGCTTCT		85
Consensus	gcacatcgcggtggagcggaaacggcgcgccagatgaacgaccacctcaaggtgctcgcgctacgccccgcttct		
<i>TaMUTE2A</i>	ACATCAAGCGCTCGACACGGCGTCCATATCGCGCGGCCATCGAGTTCATCCGGGAGCTGCACACCGTCTGGACGGC		165
<i>TaMUTE2B</i>	ACATCAAGCGCTCGACACGGCGTCCATATCGCGCGGCCATCGAGTTCATCCGGGAGCTGCACACCGTCTGGACGGC		240
<i>TaMUTE2D</i>	ACATCAAGCGCTCGACACGGCGTCCATATCGCGCGGCCATCGAGTTCATCCGGGAGCTGCACACCGTCTGGACGGC		165
Consensus	acatcaagcgctcgacacggcgctccat atcgcgcgcccatcgagttcatccgggagctgcacaccgtgctggacgcg		
<i>TaMUTE2A</i>	CTGGAGGC AAGAAGAAGCGCGCTCTGCAGCCCAACCCGAGCCCGCTCCCTCCTCACCTGCTCCAGCCCAACCG		245
<i>TaMUTE2B</i>	CTGGAGGC AAGAAGAAGCGCGCTCTGCAGCCCAACCCGAGCCCGCTCCCTCCTCACCTGCTCCAGCCCAACCG		320
<i>TaMUTE2D</i>	CTGGAGGC AAGAAGAAGCGCGCTCTGCAGCCCAACCCGAGCCCGCTCCCTCCTCACCTGCTCCAGCCCAACCG		245
Consensus	ctggaggc aagaagaagcgcgctctgcagcccaacccgagcccgctccctcctcacctgctccaagcccaacg		
<i>TaMUTE2A</i>	CGCCGGGGCTCGCCTCGGAGCTCTCCCCAACAGCAACGGCAGCAGCGCGGAGCTGCATTGTCGGGGCATCG		325
<i>TaMUTE2B</i>	CGCCGGGGCTCGCCTCGGAGCTCTCCCCAACAGCAACGGCAGCAGCGCGGAGCTGCATTGTCGGGGCATCG		394
<i>TaMUTE2D</i>	CGCCGGGGCTCGCCTCGGAGCTCTCCCCAACAGCAACGGCAGCAGCGCGGAGCTGCATTGTCGGGGCATCG		325
Consensus	cgccgggggctcgcctcggagctctccccaaacagcaacggcagcagcggcgagctgcattgtcggggcatcg		
<i>TaMUTE2A</i>	CGGGCCCGCGCTCAAAGACTCGCTCGCTGCTGCAACTCCCCGCGCCGACGTCGAGGCCAGGATCTCGGGCCCAAC		405
<i>TaMUTE2B</i>	TTGGCCCGCGCTCAAAGACTCGCTCGCTGCTGCAACTCCCCGCGCCGACGTCGAGGCCAGGATCTCGGGCCCAAC		474
<i>TaMUTE2D</i>	CGGGCCCGCGCTCAAAGACTCGCTCGCTGCTGCAACTCCCCGCGCCGACGTCGAGGCCAGGATCTCGGGCCCAAC		405
Consensus	ggcgcccgctcaagactcgcgctgctgcaactccccgcccggcagctcgaggccaggatctcggcgccaac		
<i>TaMUTE2A</i>	GTGCTGCTCCGCACGCTCTCGGCGGCATCCCGCCAGGCCGAGGATCGTCCGCTGCTCGAGAGCCTCCACCTCGA		485
<i>TaMUTE2B</i>	GTGCTGCTCCGCACGCTCTCGGCGGCATCCCGCCAGGCCGAGGATCGTCCGCTGCTCGAGAGCCTCCACCTCGA		554
<i>TaMUTE2D</i>	GTGCTGCTCCGCACGCTCTCGGCGGCATCCCGCCAGGCCGAGGATCGTCCGCTGCTCGAGAGCCTCCACCTCGA		485
Consensus	gtgctgctccgcacgctctcggcgcatccccgagggcaggatcgtccgctgctcgagagcctccacctcga		
<i>TaMUTE2A</i>	GGTGCTCCACGTCAACATCAGCACCATGGAAGACACCTCTCCACTCCTTCGTCTCAAGATTGGGCTCGAGTGGCAGC		565
<i>TaMUTE2B</i>	GGTGCTCCACGTCAACATCAGCACCATGGAAGACACCTCTCCACTCCTTCGTCTCAAGATTGGGCTCGAGTGGCAGC		634
<i>TaMUTE2D</i>	GGTGCTCCACGTCAACATCAGCACCATGGAAGACACCTCTCCACTCCTTCGTCTCAAGATTGGGCTCGAGTGGCAGC		565
Consensus	ggtgctccagctcaacatcagcaccatggaagacacctctccactccttcgctcctcaagattgggctcgagtggcagc		
<i>TaMUTE2A</i>	TCAGCGTGGAGGATGTCGCTTCGAGTCCAGCAGACCTTCTGCTACCACCAGCAGGAGCTCGACTACTCATCCATGGCG		645
<i>TaMUTE2B</i>	TCAGCGTGGAGGATGTCGCTTCGAGTCCAGCAGACCTTCTGCTACCACCAG...GAGCTCGACTACTCATCCATGGCG		711
<i>TaMUTE2D</i>	TCAGCGTGGAGGATGTCGCTTCGAGTCCAGCAGACCTTCTGCTACCACCAG...GAGCTCGACTACTCATCCATGGCG		642
Consensus	t cagcgtggagatgtcgcttcgagttccagcagacctctgctaccaccag gagctcgactactcatccatggcg		
<i>TaMUTE2A</i>	ATATAA		651
<i>TaMUTE2B</i>	ATATAA		717
<i>TaMUTE2D</i>	ATATAA		648
Consensus	atataa		

图 2 *TaMUTE2A*、*TaMUTE2B* 和 *TaMUTE2D* 的 ORF 序列比对

Fig. 2 Sequence alignment analysis of *TaMUTE2A*, *TaMUTE2B* and *TaMUTE2D*

### 2.2 小麦 TaMUTE 蛋白结构分析

利用 SOPMA 在线工具预测发现,TaMUTE2A、TaMUTE2B 和 TaMUTE2D 蛋白的二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋、延伸链、 $\beta$ -转角和无规则卷曲组成(图 3A、图 3C 和图 3E),三级结构均含有碱性螺旋-环-螺旋结构(图 3B、图 3D 和图 3F)。

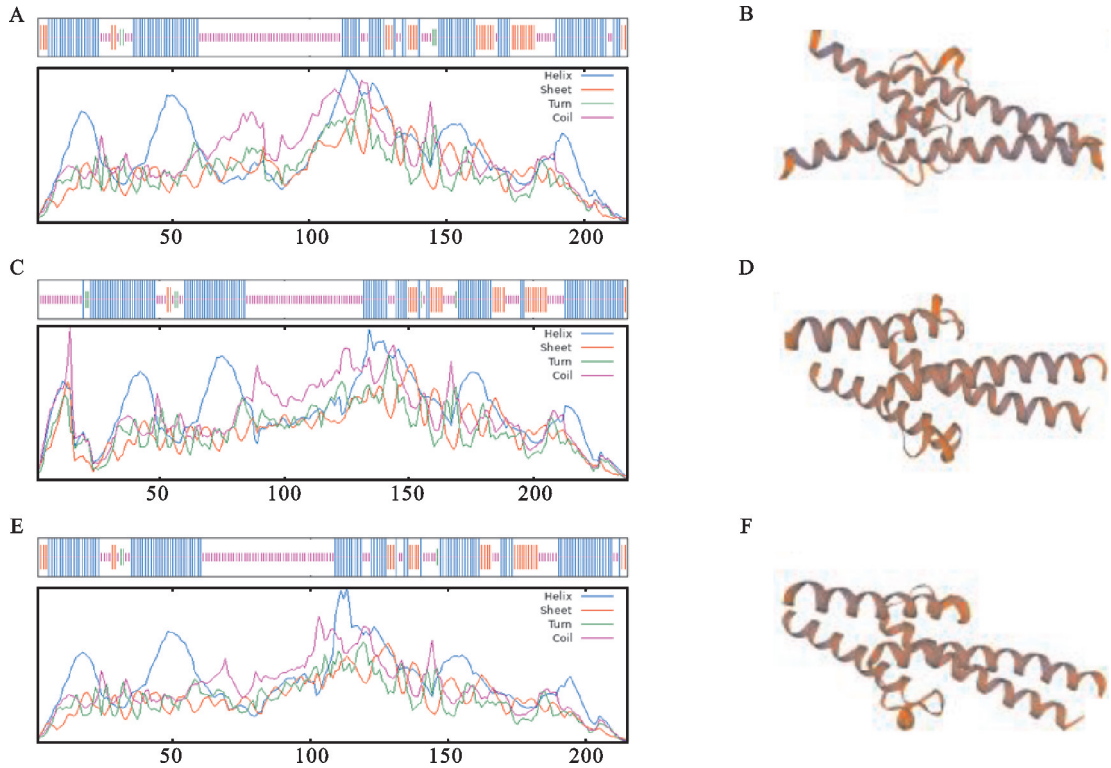
### 2.3 小麦 TaMUTE 保守结构域分析

采用 NCBI 中的 CD-Search 进行 TaMUTE

蛋白的保守结构域预测,发现 3 个 TaMUTE 均属于 bHLH 家族蛋白成员(图 4)。

### 2.4 小麦 TaMUTE 系统进化分析

将小麦 TaMUTE 蛋白与其他物种 MUTE 蛋白构建系统进化树,结果表明,小麦 TaMUTE 蛋白与大麦 HvMUTE 的亲缘关系最近,其次为二穗短柄草(图 5)。

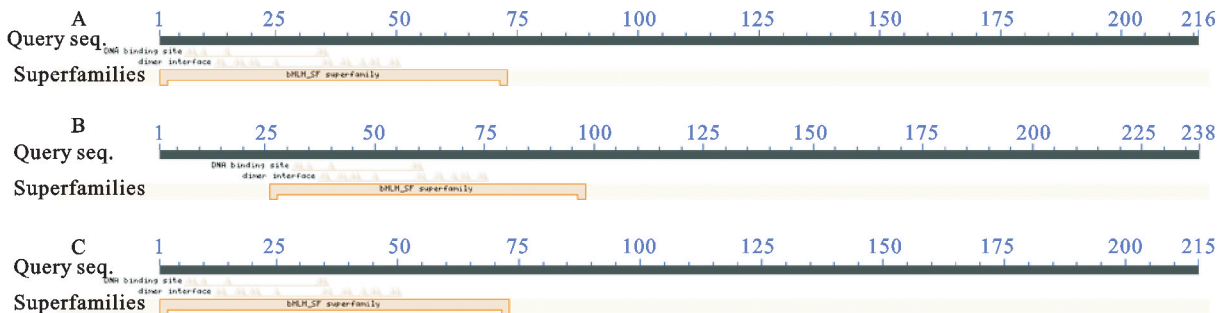


A 和 B:TaMUTE2A 蛋白二级结构和三级结构;C 和 D:TaMUTE2B 蛋白二级结构和三级结构;E 和 F:TaMUTE2D 蛋白二级结构和三级结构。

A and B: Secondary and tertiary structures of the TaMUTE2A protein; C and D: Secondary and tertiary structures of the TaMUTE2B protein; E and F: Secondary and tertiary structures of the TaMUTE2D protein.

图 3 TaMUTE 蛋白结构预测

Fig. 3 Prediction of TaMUTE protein structures



A、B 和 C:TaMUTE2A、TaMUTE2B 和 TaMUTE2D。

A, B and C: TaMUTE2A, TaMUTE2B and TaMUTE2D.

图 4 TaMUTE 蛋白的保守结构域分析

Fig. 4 Conserved domain analysis of the TaMUTE proteins

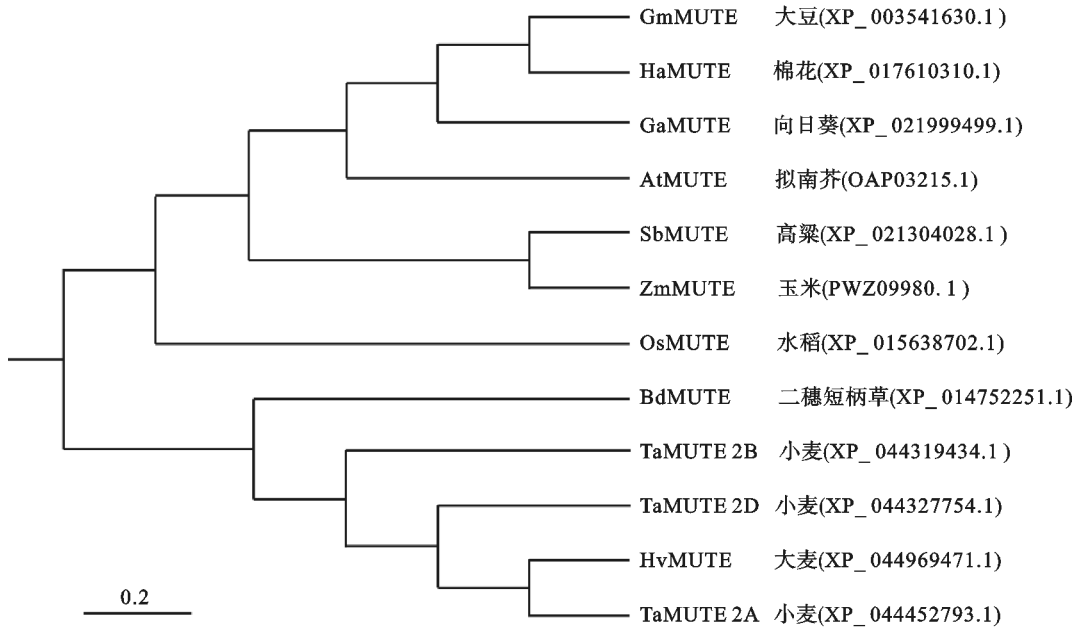


图 5 TaMUTE 系统进化分析  
Fig. 5 Phylogenetic analysis of TaMUTE

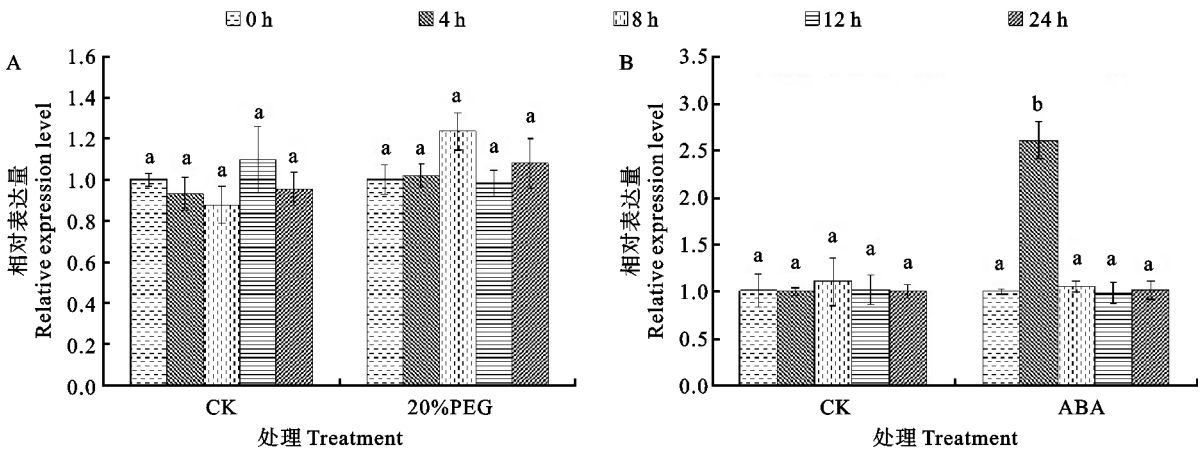
2.5 干旱和 ABA 胁迫下小麦 *TaMUTE* 基因表达模式分析

采用 20%PEG 和 100 μmol ABA 分别处理小麦幼苗,分析 *TaMUTE* 基因的表达变化,结果表明,干旱处理 0、4、8 和 12 h 条件下, *TaMUTE* 基因相对表达量无显著差异(图 6A); ABA 处理幼苗 0、8、12 和 24 h 条件下, *TaMUTE* 的相对表达量无显著差异,而在 ABA 处理小麦幼苗 4 h 时, *TaMUTE* 的相对表达量较处理 0 h 显著上调约 2.6 倍(图 6B)。这表明小麦 *TaMUTE* 基因的

表达会受到 ABA 影响,而干旱对 *TaMUTE* 基因的表达影响不显著。

2.6 *TaMUTE* 转基因拟南芥植株表型分析

由图 7A 可知,在野生型(WT)拟南芥植株中没有检测到 *TaMUTE* 基因的表达,而在转基因植株中, *TaMUTE* 大量表达。与野生型植株相比,过表达 *TaMUTE* 的植株生长发育缓慢,叶片较小(图 7B),气孔密度明显较高,且出现了成簇排列的气孔(图 7C 和图 7D)。这说明小麦 *TaMUTE* 基因对植物气孔及生长发育具有重要作用。

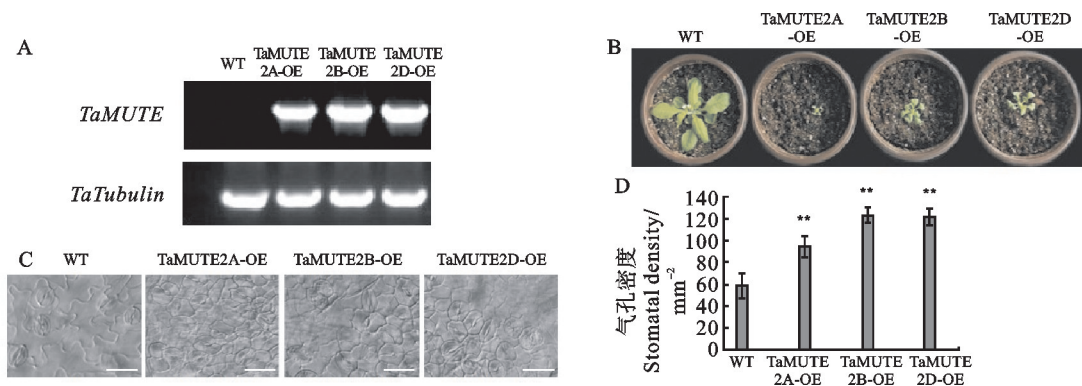


图柱上不同小写字母表示不同处理时间间差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。

Different lowercase letters above columns indicate significant differences among different durations of the treatment ( $P < 0.05$ ).

图 6 小麦 *TaMUTE* 基因在干旱(A)和 ABA(B)处理下的表达分析

Fig. 6 *TaMUTE* gene expression analysis in wheat with drought(A) and ABA(B) treatments



A: *TaMUTE* 基因在拟南芥植株中的表达; B: *TaMUTE* 转基因拟南芥植株 4 周苗龄的表型。C 和 D: *TaMUTE* 转基因拟南芥植株气孔表型和密度分析。标尺: 20  $\mu\text{m}$ 。\* \* : 转基因与野生间差异极显著 ( $P < 0.01$ )。WT: 野生植株; TaMUTE2A-OE、TaMUTE2B-OE、TaMUTE2D-OE: 转 *TaMUTE* 基因植株。

A: *TaMUTE* gene expression level in transgenic *Arabidopsis* plants; B: Phenotypic of *TaMUTE* transgenic *Arabidopsis* plants at 4-week-old plants; C and D: Stomatal phenotype(C) and density(D) in *TaMUTE* transgenic *Arabidopsis* plants. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ . \* \* : Significant differences between wild type and transgenic *Arabidopsis* plants ( $P < 0.01$ ). WT: Wild plant; TaMUTE2A-OE, TaMUTE2B-OE, TaMUTE2D-OE: Transgenic plants of *TaMUTE* gene.

图 7 过表达 *TaMUTE* 转基因植株表型分析

Fig. 7 Phenotypic analysis of transgenic plants overexpressing *TaMUTE*

### 3 讨论

研究发现, bHLH 家族是广泛存在于植物中的转录因子超家族之一, 参与了植物的生长发育、信号转导和非生物胁迫响应等重要生理过程<sup>[22-23]</sup>。本研究克隆的 *TaMUTE* 基因具有典型的 bHLH 结构域, 属于 bHLH 转录因子家族。推测 *TaMUTE* 对小麦的生长发育、信号转导和非生物胁迫响应具有重要作用。蛋白序列比对分析表明, 小麦 *TaMUTE* 与单子叶植物 *MUTE* 的亲缘关系较近, 与大麦 *HvMUTE* 的亲缘关系最近, 说明小麦在长期的生物进化过程中保持了单子叶植物的特征。

植物气孔的发育不仅受到自身发育调控因子的调控, 还受到外界环境和植物激素的调控<sup>[24-26]</sup>。研究发现, 干旱胁迫下, 植物可以通过合成渗透调节物质及抗氧化酶来快速响应干旱胁迫, 并进一步影响气孔的分化发育<sup>[27-28]</sup>。本研究中, 采用 20% 的 PEG 模拟干旱处理小麦幼苗后, *TaMUTE* 基因的相对表达含量没有显著变化。这与王宏鹏等<sup>[29]</sup> 对大麦 *HvMUTE* 的研究结果一致。推测干旱不会改变植物体内 *MUTE* 基因的相对表达水平, 而是有可能改变其他气孔发育相关基因的相对表达水平。有研究认为, ABA 与气孔的关闭和发育有关; ABA 可以通过调控保卫细胞中的离子通道影响细胞的水势变化, 从而促进

气孔关闭; 也可以通过调控气孔的发育过程影响气孔的密度<sup>[30-31]</sup>。Tanaka 等<sup>[32]</sup> 研究表明, 拟南芥中 ABA 合成重要基因 *ABA2* 缺失后会导致其子叶变小, 气孔数目增加; 施加外源 ABA 会导致拟南芥叶片气孔数目减少。Quarrie 等<sup>[33]</sup> 同样发现, 外源 ABA 会导致小麦叶片气孔减少, 推测 ABA 可能通过调控 *SPCH* 和 *MUTE* 基因的表达量改变气孔的发育过程。本研究中, 外源 ABA 处理小麦幼苗 4 h 时, *TaMUTE* 基因的相对表达量显著提高, 其他处理时间下没有显著变化, 表明 ABA 可能通过调控 *TaMUTE* 基因的相对表达调控气孔发育。

为进一步研究 *TaMUTE* 基因的功能, 将 *TaMUTE* 基因在双子叶模式植物拟南芥中进行表达分析, 发现携带 *TaMUTE* 植株较野生型植株叶片气孔密度增大, 并且出现成簇气孔的表型。与在拟南芥中过量表达拟南芥 *AtMUTE*、水稻 *OsMUTE*、玉米 *ZmMUTE* 均会导致叶片气孔密度增大的结果一致<sup>[18, 20-21]</sup>。Raissig 等<sup>[19]</sup> 发现, 单子叶植物二穗短柄草与拟南芥 *AtMUTE* 同源的 *BdMUTE* 基因不仅能够调控保卫细胞母细胞的分化, 还能够调控副卫细胞的形成。考虑到本研究中的 *TaMUTE* 基因来源于单子叶植物小麦, 后续的研究将会借助基因敲除和过表达等技术, 重点分析 *TaMUTE* 在小麦气孔复合物形成中的功能及其分子机制。

## 参考文献:

- [1]陶志强,王德梅,杨玉双,等.北方冬麦区小麦产量潜力及增产技术研究进展[J].中国农学通报,2018,34(2):48.  
TAO Z Q, WANG D M, YANG Y S, *et al.* Yield potential and yield-increasing techniques of winter wheat in northern winter wheat region: Research progress [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2018, 34(2):48.
- [2]王沙沙,黄绍敏,宋晓,等.小麦氮利用效率相关基因TaARE1的生物信息学分析及等位变异[J].江苏农业科学,2023,51(22):34.  
WANG S S, HUANG S M, SONG X *et al.* Bioinformatics analysis and allelic variation of TaARE1 gene related to nitrogen use efficiency in wheat [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51(22):34.
- [3]CHATER C C C, CAINE R S, FLEMING A J, *et al.* Origins and evolution of stomatal development [J]. *Plant Physiology*, 2017, 174(2):624.
- [4]陈青云,李有志,樊宪伟.植物气孔发育的分子调控机制[J].遗传,2017,39(4):302.  
CHEN Q Y, LI Y Z, FAN X W. Molecule mechanism for regulating stomatal development in plants [J]. *Hereditas (Beijing)*, 2017, 39(4):302.
- [5]ZARINKAMAR F. Stomatal observations in dicotyledons [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, 10(2):199.
- [6]GEISLER M J, DEPPONG D O, NADEAU J A, *et al.* Stomatal neighbor cell polarity and division in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2003, 216(4):571.
- [7]NADEAU J A, SACK F D. Control of stomatal distribution on the *Arabidopsis* leaf surface [J]. *Science*, 2002, 296(5573):1697.
- [8]PETERSON K M, RYCHEL A L, TORII K U. Out of the mouths of plants: The molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development [J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(2):296.
- [9]TORII K U. Stomatal development in the context of epidermal tissues [J]. *Annals of Botany*, 2021, 128(2):137.
- [10]侯慧姣,韩鸿鹏.单、双子叶植物气孔发育调控差异研究进展[J].分子植物育种,2016,14(4):896.  
HOU H J, HAN H P. Research progress on the difference of stomata development and their regulation between monocotyledon and dicotyledon [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(4):896.
- [11]CHATER C, GRAY J E, BEERLING D J. Early evolutionary acquisition of stomatal control and development gene signaling networks [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2013, 16(5):638.
- [12]BERGMANN D C, SACK F D. Stomatal development [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2007, 58:163.
- [13]PILLITTERI L J, TORII K U. Mechanisms of stomatal development [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63:591.
- [14]SERNA L. Stomatal development in *Arabidopsis* and grasses: Differences and commonalities [J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2011, 55(1):5.
- [15]NADEAU J A. Stomatal development: New signals and fate determinants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(1):29.
- [16]LAU O S, BERGMANN D C. Stomatal development: A plant's perspective on cell polarity, cell fate transitions and intercellular communication [J]. *Development*, 2012, 139(20):3683.
- [17]NUNES T D G, ZHANG D, RAISSIG M T. Form, development and function of grass stomata [J]. *The Plant Journal*, 2020, 101(4):780.
- [18]PILLITTERI L J, SLOAN D B, BOGENSCHUTZ N L, *et al.* Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata [J]. *Nature*, 2007, 445(7127):501.
- [19]RAISSIG M T, MATOS J L, ANLEU GIL M X, *et al.* Mobile MUTE specifies subsidiary cells to build physiologically improved grass stomata [J]. *Science*, 2017, 355(6330):1215.
- [20]WANG H, GUO S, QIAO X, *et al.* BZU2/ZmMUTE controls symmetrical division of guard mother cell and specifies neighbor cell fate in maize [J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(8):e1008377.
- [21]WU Z, CHEN L, YU Q, *et al.* Multiple transcriptional factors control stomata development in rice [J]. *The New Phytologist*, 2019, 223(1):220.
- [22]HAO Y, ZONG X, REN P, *et al.* Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factors regulate a wide range of functions in *Arabidopsis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13):7152.
- [23]GAO F, DUBOS C. The *Arabidopsis* bHLH transcription factor family [J]. *Trends in Plant Science*, 2024, 29(6):668.
- [24]王宏亮,郭思义,王棚涛,等.植物气孔发育机制研究进展[J].植物学报,2018,53(2):164.  
WANG H L, GUO S Y, WANG P T, *et al.* Research progress in stomatal development mechanism [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2018, 53(2):164.
- [25]CASSON S, GRAY J E. Influence of environmental factors on stomatal development [J]. *The New Phytologist*, 2008, 178(1):9.
- [26]HARRISON E L, ARCE CUBAS L, GRAY J E, *et al.* The influence of stomatal morphology and distribution on photosynthetic gas exchange [J]. *The Plant Journal*, 2020, 101(4):768.
- [27]CAINE R S, HARRISON E L, SLOAN J, *et al.* The influences of stomatal size and density on rice abiotic stress resilience [J]. *The New Phytologist*, 2023, 237(6):2180.
- [28]DARYANAVARD H, POSTIGLIONE A E, MÜHLEMANN J K, *et al.* Flavonols modulate plant development, signaling, and stress responses [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2023, 72:102350.
- [29]王宏鹏,曹高燧,李明,等.大麦气孔发育转录因子基因HvMUTE的克隆及生物学功能初步鉴定[J].华北农学报,2023,38(1):40.  
WANG H P, CAO G Y, LI M, *et al.* Gene cloning and preliminary function identification of HvMUTE transcription factor for barley stomatal development [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2023, 38(1):40.
- [30]CHEN K, LI G J, BRESSAN R A, *et al.* Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(1):25.
- [31]DONG T, PARK Y, HWANG I. Abscisic acid: Biosynthesis, inactivation, homeostasis and signalling [J]. *Essays in Biochemistry*, 2015, 58:29.
- [32]TANAKA Y, NOSE T, JIKUMARU Y, *et al.* ABA inhibits entry into stomatal-lineage development in *Arabidopsis* leaves [J]. *The Plant Journal*, 2013, 74(3):448.
- [33]QUARRIE S A, JONES H G. Effects of abscisic acid and water stress on development and morphology of wheat [J]. *Journal of Experimental Botany*, 1977, 28(1):192.