

小麦细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因*TaCKX1B* 克隆和功能分析

李婷婷¹, 周雪², 柴永懋¹, 王中华³

(1. 陕西农林职业技术大学, 陕西杨凌 712100; 2. 延安市农业科学研究院, 陕西延安 716000;

3. 西北农林科技大学农学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:为探究细胞分裂素对小麦根系形态建成的调控作用,并挖掘调控根系发育的关键功能基因,系统分析了 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 处理后小麦品种晋麦 47 幼苗根系表型的变化,评价了 110 份小麦品种(系)对 6-BA 的敏感性,同时采用同源克隆方法获得细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因*TaCKX1B*,并通过烟草异源过表达验证其功能。结果表明,0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 处理显著抑制小麦初生根伸长生长,促进根毛发生与伸长;小麦对 6-BA 敏感性存在基因型差异,敏感指数主要分布于 40%~60%,且苗期低敏感材料在灌浆期表现出更发达的根系表型;*TaCKX1B* 基因定位于 1B 染色体,编码区全长 1 569 bp,烟草过表达该基因后 T_1 代转基因植株根系生物量约为野生型的 2 倍。综上所述,*TaCKX1B* 基因在正向调控植物根系发育中具有重要作用。

关键词: 小麦;细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因;根系发育;基因功能;遗传转化

中图分类号:S512.1;S330

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2025)10-1331-11

Cloning and Functional Characterization of Cell Division Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Gene *TaCKX1B* in Wheat

LI Tingting¹, ZHOU Xue², CHAI Yongmao¹, WANG Zhonghua³

(1. Shaanxi Vocational and Technical University of A&F, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Yan'an Academy of Agricultural Sciences, Yan'an, Shaanxi, 716000, China;

3. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This study aimed to investigate the regulatory role of cell division cytokinin in wheat root morphological development and to identify key functional genes involved in root system architecture regulation. The seedlings of a wheat variety Jinmai 47 were treated with exogenous 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-benzylaminopurine(6-BA) to systematically analyze its effects on root phenotypic traits. The genotypic sensitivity of 110 wheat varieties(lines) to 6-BA was evaluated. Furthermore, the *TaCKX1B* gene was obtained through homology-based cloning, and its function was validated via heterologous overexpression in tobacco. The results showed that the treatment with 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA significantly inhibited primary root elongation while promoting root hair initiation and elongation. Considerable genetic variation in sensitivity to 6-BA was observed among wheat genotypes, with sensitivity indices predominantly ranging from 40% to 60%. Materials with low sensitivity at the seedling stage exhibited more developed root systems at the grain-filling stage. The *TaCKX1B* gene was located on chromosome 1B, with a coding sequence length of 1 569 bp. Heterologous overexpression of *TaCKX1B* in tobacco resulted in approximately a two-fold increase in root biomass in T_1 transgenic plants compared to wild-type controls. In conclusion, the *TaCKX1B* gene plays a positive regulatory

收稿日期:2024-11-12 修回日期:2025-09-19

基金项目:旱区农业陕西实验室开放课题(2024ZY-JCYJ-02-13);陕西省科技厅青年项目(S2023-JC-QN-0422);校内博士+高职生工作室建设项目(BG2022001);校内国家自然科学基金培育项目(GZ2023-003)

第一作者 E-mail:littingting8829@163.com(李婷婷)

通讯作者 E-mail:zhonghuawang@nwfau.edu.cn(王中华)

role in plant root development.

Keywords: Wheat; Cell division cytokinin oxidase/dehydrogenase gene; Root development; Gene function; Genetic transformation

在全球多个主要小麦产区,干旱胁迫是制约产量稳定性的关键非生物限制因素,提高小麦抗旱性已成为当前农业研究的重要方向。植物根系作为直接感知和吸收水分的主要器官,是抗旱生理生化研究重点关注的对象^[1-2]。然而,小麦传统育种与研究多聚焦于地上部性状,对根系构型与功能的系统挖掘仍相对薄弱。发达的根系可增强小麦植株对土壤深层水分的吸收能力,提高水分利用效率,并支持冠层在干旱条件下的生理功能稳定性^[3-4]。近年来,关于植物激素如细胞分裂素在抗旱中的作用机制逐渐受到关注,前人利用外源施用类细胞分裂素物质(如 6-BA)或内源调控细胞分裂素代谢以改变其水平,进而调控作物抗旱性^[5-6]。

在植物激素调控研究中,细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(CKX)的功能在拟南芥、水稻、烟草、玉米、大麦等物种中得到较为深入的揭示^[7-11]。研究表明,CKX 通过降解细胞分裂素(CTK)直接调控其代谢水平,进而影响植物生长发育^[12]。例如,水稻*osckx4*和*osckx9*双突变体的根长和根直径均下降,不定根数减少^[13]。在玉米籽粒发育过程中,调节 CTK 含量可诱导 CKX 活性升高^[14];在拟南芥过表达*AtCKX*基因植株中,CKX 活性显著增强,进而导致 CTK 含量下降,抑制茎部生长并促进根系发育^[15]。在植物根系中,CTK 对侧根和不定根形成具有负调控作用,CKX 表达升高可缓解该抑制效应,如过表达*AtCKX1*的拟南芥和烟草均表现出根系生物量显著增加及抗旱性增强^[16-17]。相对而言,小麦中 CKX 基因*TaCKX*的研究仍处于初步阶段,其中*TaCKX1*已完成克隆与原核表达验证^[18],*TaCKX2*和*TaCKX5*分别被定位于 7B/7D 和 3A/3B/3D 染色体^[19-20],*TaCKX3*与穗粒数形成相关^[21],而*TaCKX6*则被报道与粒重及产量提升有关^[22]。然而,关于*TaCKX*家族其他成员在小麦根系发育中的功能尚未系统阐明。

小麦*TaCKX*基因属于一个多基因家族,其成员在基因组中广泛存在且功能复杂。由于 CKX 基因在植物不同发育阶段和组织中具有表达特异性,要深入理解细胞分裂素(CTK)与 CKX 在小

麦中的互作关系,并阐明其在生长发育中的调控机制,必须系统获取更多*TaCKX*基因信息并进行功能解析。本研究通过克隆小麦*TaCKX1B*基因,并将其异源转化至模式作物本氏烟草中,通过分析转基因植株根系的形态和生理变化,验证*TaCKX1B*基因在根系发育中的功能,以期揭示*TaCKX*基因通过调控 CTK 水平改善小麦根系构型与抗旱性的机制,为遗传改良小麦抗逆性及产量性状提供理论和技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 110 份普通小麦品种(系)及本氏烟草,均由西北农林科技大学农学院提供。

菌株与载体材料:大肠杆菌菌株 DH5 α 和 Top10(购自 Thermo Fisher Scientific 公司)、根癌农杆菌菌株 GV3101(pMP90)、克隆载体 pMD18-T 及表达载体 pCXSIN,均由西北农林科技大学农学院提供。

分子生物学试剂:RNA 提取试剂盒、cDNA 第一条链合成试剂盒、凝胶回收试剂盒、DNA 纯化试剂盒和质粒提取试剂盒,均购自北京天根生化科技有限公司;限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准 DL2000、蛋白质分子量标准及核酸染料 GeneFinder 等,购自宝生物工程(大连)有限公司。

植物激素与抗生素类试剂:MS 培养基基础成分、琼脂、6-苄基嘌呤(6-BA)、 α -萘乙酸(NAA)、吲哚乙酸(IAA)均购自 PhytoTech Labs 公司;卡那霉素(Kan)、壮观霉素(Spec)、庆大霉素(Genta)、利福平(Rif)、头孢曲松钠(Cef)、乙酰丁香酮(AS)、潮霉素(Hyg)及醋酸洋红液等,均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 6-BA 浓度的筛选

以小麦品种晋麦 47 为材料,选取饱满、大小一致的小麦种子,用去离子水冲洗 3 次,置于铺有两层滤纸的培养皿中,加入适量去离子水湿润滤纸,于室温下避光催芽 2 d,待胚根长出后备用。选择长势一致的幼苗用 0、0.01、0.02、0.03、0.04、

0.05、0.06、0.07、0.08 和 0.09 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 溶液进行处理,每个处理设置 3 个生物学重复。用 MS 培养基培养期间每 2 d 更换 1 次处理液。光照培养箱培养。培养条件:温度 23 $^{\circ}\text{C}$ 、光周期 16 h 光照/8 h 黑暗、光照强度 3 000 lx。培养 7 d 后取样,进行根系形态和生理指标测定。

1.2.2 根系压片的制备与显微观察

取水培 7 d 后的晋麦 47 幼苗,于根尖伸长区切取约 0.5 cm 长的根段,置于洁净载玻片中央。滴加 1~2 滴醋酸洋红染液,静置染色 10 min。盖上盖玻片。在盖玻片上方轻压一层滤纸,用拇指均匀适度按压,使根组织分散成薄层。将制好的压片置于光学显微镜下,进行细胞形态和染色情况的详细观察与图像采集。每个处理重复观察不少于 3 个根段。

1.2.3 小麦根系对 6-BA 敏感性分析

根据 1.2.1 部分浓度筛选实验结果,设置无离子水对照和 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 溶液两个处理,对 110 个小麦品种(系)进行敏感性评估(供试小麦材料见表 2)。所有材料种子均经消毒处理后,置于铺有双层滤纸的培养皿中,加入适量去离子水,于光照培养箱中 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗培养 48 h 至萌发。每个处理重复 3 次,每重复选用 6 株根系长度一致(约 1.5 cm)的幼苗,固定于浮板上,并置于盛有 200 mL 相应溶液的培养杯中。所有组别均置于光照培养箱中培养。条件设置:温度 24 ± 1 $^{\circ}\text{C}$ 、光周期 16 h/8 h(光照/黑暗)、光照强度 3 000 lx。培养 7 d 后,测量各植株根长。按照“ $S = (\text{CK-处理}) / \text{对照} \times 100\%$ ”计算品种(系)根系对 6-BA 的敏感程度(S)

1.2.4 灌浆期不同敏感性小麦材料根系性状测定

根据 1.2.4 部分敏感性评估结果,选择苗期高敏感品种(晋麦 47 和小偃 6 号)以及低敏感品系(99 和 228)种植于特制根管中。根管由 PVC 材料制成,长度 80 cm,内径 10 cm,内装统一配比的栽培基质。每个根管定植 2 株小麦幼苗,每个品种(系)设 6 个生物学重复。所有材料置于可控温室条件下生长,光温条件与室外保持一致。每 4~5 d 定量浇灌 Hoagland 营养液,以维持正常生长所需水分和养分。灌浆中期小心取出整个根系的完整样品,用去离子水轻柔冲洗,去除附着基质。取样后先测定根系鲜重和最大根长,再于 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重后测干重。

1.2.5 小麦*TaCKX*基因的生物信息分析与染色体的初步定位

基于 GenBank 中拟南芥 *AtCKX3* 基因(AT5G56970)序列,通过 BLAST 比对鉴定出其小麦同源序列,利用国际小麦基因组测序联盟提供的 BLAST 分析平台(<https://urgi.versailles.inra.fr/blast/blast.php>),对基因进行染色体定位分析。本研究克隆的*TaCKX1*基因初步定位于 1B 染色体,命名为*TaCKX1B*。

为了鉴定小麦中 CKX 基因的同源序列,本研究通过拟南芥信息资源库(<http://www.arabidopsis.org/>)及国家生物资源项目(<http://www.NationalBioResourceProject.org>)进行同源基因检索。利用 MEGA 5.1、DNAMAN 及 EditSeq 等生物信息学软件,对已克隆的小麦*TaCKX*基因家族成员、拟南芥 *AtCKX3* 基因(AT5G56970)以及本研究新获得的*TaCKX1B*基因进行了多序列比对与系统进化分析,以明确其亲缘关系及进化地位。

1.2.6 小麦*TaCKX1B*基因的引物设计与 PCR 扩增

引物设计通过 DNASTar 中的 Primer Select 程序(<http://www.DNASTar.com>)实现;引物由上海生工合成,具体序列见表 1。PCR 扩增采用 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase,该酶是兼具高保真性和高扩增效率的 PCR 用 DNA 聚合酶。PCR 反应体系为 50 μL ,包括 ddH₂O 32.5 μL 、 $5 \times$ PrimeSTAR Buffer 10 μL 、正向和反向引物各(1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2.5 μL 、dNTP 4 μL 、PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 0.32 μL 、cDNA (<200 ng) 1 μL 。反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,然后进行以下循环,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共 38 个循环。

1.2.7 小麦*TaCKX1B*基因与 pCXS_N 载体的连接 选择 pCXS_N 作为植物表达载体来进行表达

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5'→3')
<i>TaCKX1B</i> -F	5'-TTTCTTCTTTTACCAGCCTCCA-3'
<i>TaCKX1B</i> -R	5'-GAAAAGAGCTACGAAAGAGAA-3'
<i>Hyg</i> -F	5'-ATGTTGGCGACCTCGTATT-3'
<i>Hyg</i> -R	5'-CGTTATGTTTATCGGCACTTT-3'

载体的构建。其携带两个 *Xcm* I 酶切位点(分别位于 291 和 981 bp 处)。*Xcm* I 酶作为植物表达载体的内切酶,将载体进行酶切后回收酶切产物,利用 T4 DNA 连接酶将目的基因与 pCXSXN 载体连接,重组产物转化至大肠杆菌(Top10)感受态细胞中,筛选阳性克隆并提取重组质粒,送交上海英维捷基生物工程技术服务有限公司测序验证。通过电转化法将构建正确的重组表达载体导入根癌农杆菌 GV3101 菌株中。

1.2.8 根癌农杆菌介导的本氏烟草遗传转化

农杆菌感受态细胞复苏后,加入 2 μ L 质粒 DNA(约 100 ng),冰浴 30 min,液氮速冻 1 min,37 $^{\circ}$ C 热激 5 min,加入 950 μ L 无抗生素 LB 液体培养基,28 $^{\circ}$ C、200 rpm 振荡培养 3 h。离心收集菌体,重悬后涂布于含 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 和 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rif 的 YEP 固体培养基,28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d。挑取单菌落进行 PCR 验证。

将阳性农杆菌接种于含 Rif(100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Kan(50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 YEP 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、200 rpm 培养 36 h 进行活化。取 200 μ L 菌液转接至 20 mL 相同培养基中,继续培养至 $\text{OD}_{600} \approx 0.8$ 。离心收集菌体,用含 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮(AS)的 MS 液体培养基重悬至 $\text{OD}_{600} = 0.2$,用于侵染实验。

本氏烟草遗传转化方法:种子萌发培养 1 个月,取叶片切除子叶边缘,切成 1 cm \times 1 cm 外植体,预培养 2 d(暗培养)^[23]。侵染时,将外植体浸入农杆菌菌液轻摇 5~10 min,取出吸干后共培养 2 d(暗培养)。随后转移至含 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Crb 的 MS 培养基光下培养 3 d,再转至含 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hyg 和 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Crb 的 MS 分化培养基中进行愈伤诱导与芽分化,每 2 周继代 1 次。待芽体长至 2~3 cm 时,切下转入 MS 生根培养基诱导生根。根系发育完整后移栽至基质中,弱光保湿培养 1 周,后转入温室常规管理。

1.2.9 转化株系的 PCR 检测

提取转基因植株叶片基因组 DNA,以 DNA 为模板,以潮霉素磷酸转移酶基因(*Hgy*)为筛选标记,设计引物 *Hgy*-F 和 *Hgy*-R 扩增 510 bp 的片段进行 PCR 验证。反应体系(25 μ L): 0.5 μ L DNA, 2.5 μ L 10 \times buffer(Mg^{2+} plus)、1.5 μ L 25 mm MgCl_2 、2 μ L 2.5 mm dNTP、1 μ L F/R、0.125 μ L rTaq 酶、16.325 μ L ddH₂O。反应程

序:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min,然后进行以下循环,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.10 T₁ 代转基因植株和野生型植株根系干重的测定

将转基因及野生型烟草种子播种于盛有混合基质(营养土:蛭石 = 2:1, v/v)的穴盘中,每基因型设 3 个生物学重复,每个重复不少于 3 株。所有植株置于人工气候培养室中培养。条件设置:光照/黑暗周期 16 h/8 h,昼夜温度 25 $^{\circ}$ C/22 $^{\circ}$ C,光照强度约为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,相对湿度控制在 60%~70%。培养至六叶期后,小心取出完整植株。根系样品于 80 $^{\circ}$ C 烘干至恒重后称重,获得根系干重数据。

2 结果与分析

2.1 6-BA 浓度对小麦根系生长的影响

6-BA 对小麦根系生长均有明显的调控作用(图 1)。与 CK 相比,不同浓度的 6-BA 处理下小麦根长均缩短,说明 6-BA 对小麦根系伸长生长产生抑制作用(图 1A)。在 0~0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 处理下,小麦根系长度随 6-BA 浓度升高而下降,当 6-BA 浓度超过 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,根长变化不明显(图 1B)。因此,将 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为小麦根系对 6-BA 响应的敏感性临界浓度。

此外,6-BA 对小麦幼苗根毛发育也产生影响(图 1C)。0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 处理的根毛密度和长度较 CK 均明显增加,说明 6-BA 显著促进了小麦根毛的发育。

以上结果表明,外源 6-BA 虽抑制了小麦初生根的伸长生长,但可正向调控根毛的发育和生长,说明细胞分裂素在不同根系组织中可能具有差异化的调控功能。

2.2 不同小麦品种(系)根系发育对 6-BA 的敏感性差异

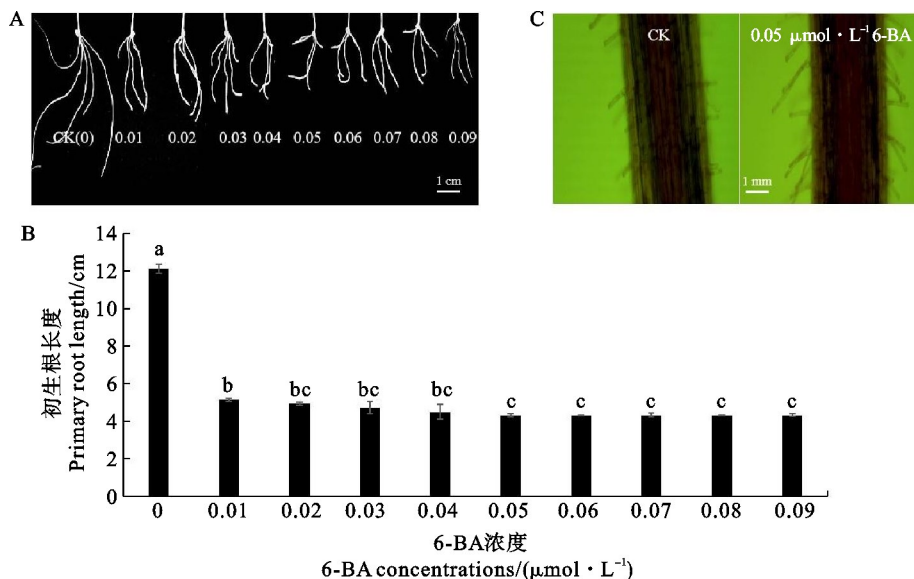
不同小麦材料根系发育对 6-BA 响应的敏感性存在差异。利用 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 处理后 110 个小麦品种(系)的敏感性指数变化范围为 16.85%~84.90%,呈连续分布,符合多基因控制的数量性状特征(表 2)。根据敏感性指数分布,将 110 个小麦品种(系)组成的群体可划分为 5 个等级:极不敏感型(<30%)、不敏感型(30%~40%)、中间型(40%~60%)、敏感型(60%~70%)和极敏感型(>70%)。其中,63.63%的品

种(系)表现为中间型,12.72%的品种(系)表现为不敏感型,敏感型的品种(系)占总体的0.10%,0.03%的品种(系)表现为极不敏感型。极不敏感型的品种(系)包括228、石麦15号等,其根长受6-BA的影响最弱。晋麦47、小偃6号等品种(系)表现为极敏感型,占比只有0.02%,其根长受到6-BA的强烈抑制。

2.3 灌浆期低敏感与高敏感小麦品种(系)根系生长特性差异

取苗期高敏感小麦品种晋麦47(敏感性指数

84.90%)和小偃6号(敏感性指数71.14%)以及低敏感品系99(敏感性指数33.09%)和228(敏感性指数16.85%)为材料,利用根管栽培观察灌浆期不同敏感性小麦基因型的根长、根鲜重及根干重差异。结果(图2)显示,低敏感品系99和228灌浆期的根长、根鲜重及根干重均显著高于高敏感品种晋麦47和小偃6号(图2D),表明对6-BA不敏感的小麦基因型在灌浆期可能具有较发达的根系,其根系生长潜力和物质积累能力较强。



图柱上不同字母表示不同处理间在0.05水平上差异显著。

Different letters on the columns indicate significant difference among different treatments at 0.05 level.

图 1 不同浓度 6-BA 处理下小麦根系的发育状况

Fig. 1 Development performance of wheat root under different concentrations of 6-BA

表 2 小麦品种(系)根系对 6-BA 的敏感性分级

Table 2 Root sensitivity classification of wheat varieties(line) to 6-BA

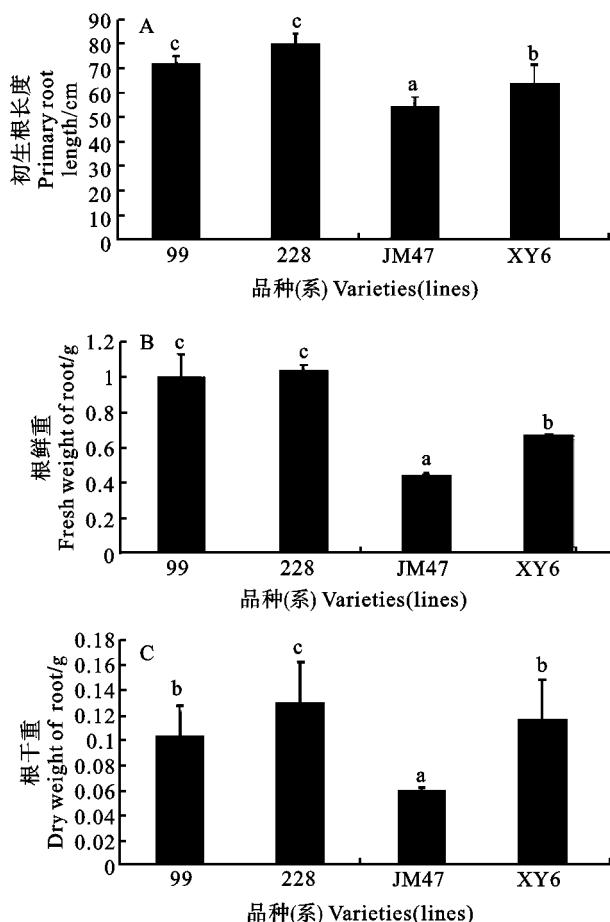
品种(系) Varieties(lines)	敏感性指数 Sensitivity index	类型 Type	品种(系) Varieties(lines)	敏感性指数 Sensitivity index	类型 Type
228	16.85%	HI	阿勃 Ab	48.17%	MS
石麦 15 号 Shimai 15	22.53%	HI	轮选 0610 Lunsan 0610	48.22%	MS
80909	28.20%	HI	B64	48.72%	MS
116-422	28.45%	HI	Q323	48.80%	MS
81-24	28.61%	HI	泰山 4447 Taishan 4447	49.33%	MS
西农 221 Xinong 221	30.45%	I	山农 0919 Shannong 0919	49.86%	MS
陕麦 122 Shanmai 122	31.19%	I	秦农 21 Qinong 21	50.01%	MS
陕 160 Shaan 160	31.62%	I	运 97169 Yun 97169	50.02%	MS
陕麦 107 Shaanmai 107	32.22%	I	2595	50.14%	MS
99	33.09%	I	武农 986 Wunong986	50.33%	MS
B-75	35.19%	I	小偃 9 号 Xiaoyan9	50.48%	MS
郑育麦 9988 Zhengyumai 9988	36.11%	I	冀 8756 Ji 8756	50.74%	MS
CA61	36.58%	I	342	51.01%	MS

(续表2 Continued table 2)

品种(系) Varieties(lines)	敏感性指数 Sensitivity index	类型 Type	品种(系) Varieties(lines)	敏感性指数 Sensitivity index	类型 Type
HQ04	37.41%	I	沧麦 2009-19 Cangmai 2009-19	51.19%	MS
XN10-1	37.71%	I	静 2001 Jing 2001	51.59%	MS
陕 7859 Shaan 7859	37.90%	I	省 B10 收晋麦 47 Sheng B10 Shoujinmai 47	51.97%	MS
陕 481 Shaan 481	37.90%	I	周麦 18 Zhoumai 18	52.02%	MS
陕 229 Shaan 229	38.28%	I	武农 886 Wunong 886	52.48%	MS
AYL1	38.30%	I	西农 224 Xinong 224	52.52%	MS
克早 8 号 Kehan 8	39.13%	I	泛麦 5 号 Fanmai 5	52.71%	MS
小偃 166 Xiaoyan 166	39.38%	I	临 8159 Lin 8159	52.94%	MS
698	39.82%	I	小偃 270 Xiaoyan 270	53.12%	MS
陕农 33 Shaannong 33	40.22%	MS	洛麦 01395 Luomai 01395	53.34%	MS
小偃 398 Xiaoyan 398	41.00%	MS	西农 979 Xinong 979	53.38%	MS
绵阳 25 Mianyang 25	41.08%	MS	荔高 7 号 Ligao 7	53.83%	MS
N9644	41.73%	MS	西农 928 Xinong 928	54.21%	MS
N9820	42.08%	MS	邢台 456 Xingtai 456	54.55%	MS
N9738	42.42%	MS	白冬麦 Baidongmai	54.56%	MS
运早 103 Yunhan 103	42.45%	MS	西农 998 Xinong 998	54.89%	MS
京 11925 Jing 11925	42.60%	MS	CP03-141-8	55.27%	MS
临 Y8159 Lin Y8159	42.71%	MS	周麦 8846 Zhoumai 8846	55.63%	MS
西农 837 Xinong 837	42.72%	MS	太空 6 号 Taikong 6	55.76%	MS
长 4853 Chang 4853	42.93%	MS	2B11	55.89%	MS
CYL12	43.10%	MS	郑 9023 Zheng 9023	55.97%	MS
川育 12 Chuanyumai 12	43.11%	MS	秦农 322 Qinnong 322	56.10%	MS
九麦 2 号 Jiumai 2	43.47%	MS	Marguis	56.52%	MS
南大 2419 Nanda 2419	43.94%	MS	2B09	56.68%	MS
陕麦 150 Shaanmai 150	44.11%	MS	浚麦 35 Junmai 35	57.03%	MS
N9609	44.53%	MS	豫麦 18 Yumai 18	59.15%	MS
N9628-2	44.71%	MS	陕麦 94 Shaanmai 94	59.34%	MS
HQ03	45.04%	MS	3392	59.39%	MS
淮麦 18 Huaimai 18	45.05%	MS	陕垦 6 号 Shaanken 6	59.74%	MS
04233N	45.07%	MS	北京 8 号 Beijing 8	60.63%	S
陕 952 Shaan 952	45.12%	MS	济麦 6097 Jimai 6097	60.78%	S
济南 17 Jinan 17	45.94%	MS	运早 719 Yunhan 719	61.01%	S
绵阳 19 Mianyang 19	45.98%	MS	漯麦 9 号 Zhaomai 9	62.09%	S
周 27 Zhou 27	46.02%	MS	京 14196 Jing 14196	62.28%	S
绵阳 11 Mianyang 11	46.19%	MS	衡 7228 Heng 7228	63.30%	S
155	46.19%	MS	济南 2 号 Jinan 2	63.36%	S
豫麦 13 Yumai 13	46.51%	MS	西农 2718 Xinong 2718	66.49%	S
XN10-2	46.87%	MS	中国春 Chinese Spring	67.08%	S
淮麦 18 Huaimai 18	47.18%	MS	HQ08	68.40%	S
08WM198	47.28%	MS	04233N	69.97%	S
RD-14-2	47.58%	MS	小偃 6 号 Xiaoyan 6	71.14%	HS
9020	48.17%	MS	晋麦 47 Jinmai 47	84.90%	HS

HI: 极不敏感型; I: 不敏感型; MS: 中间型; S: 敏感型; HS: 极敏感型。

HI: Highly insensitive type; I: Insensitive type; MS: Intermediate type; S: Sensitive type; HS: Highly sensitive type.



JM47: 晋麦 47; XY6: 小偃 6 号。图柱上不同字母表示不同材料间在 0.05 水平上差异显著。

JM47: Jinmai 47; XY6: Xiaoyan 6. Different letters on the columns indicate significant difference among different materials at 0.05 level.

图 2 不同 6-BA 敏感性小麦材料的灌浆期根系生理指标比较

Fig. 2 Comparison of root physiological indicators at filling stage in wheat lines with different sensitivity to 6-BA

2.4 小麦*TaCKX1B*基因的结构、同源性分析及染色体的初步定位结果

前人研究发现拟南芥, *AtCKX3* (AT 5G56970) 基因可显著增加根系的生物量, 进而提高植物的抗旱性^[12]。根据该基因序列设计特异性引物, 以高敏感小麦品种晋麦 47 根系为材料, 利用 Trizol 法提取总 RNA, Oligo(dT)₁₈ 引物反转录合成第一链 cDNA。通过 PCR 扩增及克隆测序, 获得全长为 1 607 bp 的 *TaCKX* cDNA 序列(图 3A), 其中编码区长度为 1 569 bp。

为进一步明确克隆基因 *TaCKX* 的进化地位, 利用小麦和拟南芥参考基因组序列全面鉴定了两个物种所有 *CKXs* 基因家族成员, 随后利用

MEGA5.1 软件进行了基因系统发育分析。从图 3B 可以看出, 本研究克隆的 *TaCKX* 基因与 TraesCS1B03G0521500 基因聚为一支, 相似性达到 100%, 将该基因命名为 *TaCKX1B*。结合中国春参考基因组注释, 小麦 *TaCKX1B* 基因包含两个转录本, 且均由 5'-UTR、3'-UTR、5 个外显子和 6 个内含子构成(图 3C)。利用小麦表达数据库(Wheat eFP Browser; https://bar.utoronto.ca/efp_wheat/cgi-bin/efpWeb.cgi) 分析表明, *TaCKX1B* 在苗期的茎尖分生组织、孕穗期和旗叶期的根中表达量最高(图 3D), 暗示 *TaCKX1B* 基因可能参与调控小麦根系的发育。

2.5 *TaCKX1B* 表达载体构建与农杆菌转化结果

将植物超表达载体 pCXS_N (由 pCAM-BIA1300 改造而来^[24]) 经酶切、电泳回收和纯化后与 *TaCKX1B* 全长序列连接, 构建重组表达载体。连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 经 Kan 抗性筛选及菌落 PCR 鉴定, 获得阳性克隆。提取质粒 DNA 并通过冻融法将重组质粒导入根癌农杆菌 GV3101, 挑取 Kan 抗性单菌落, 用基因特异性引物 PCR 确定为阳性克隆(图 4)。

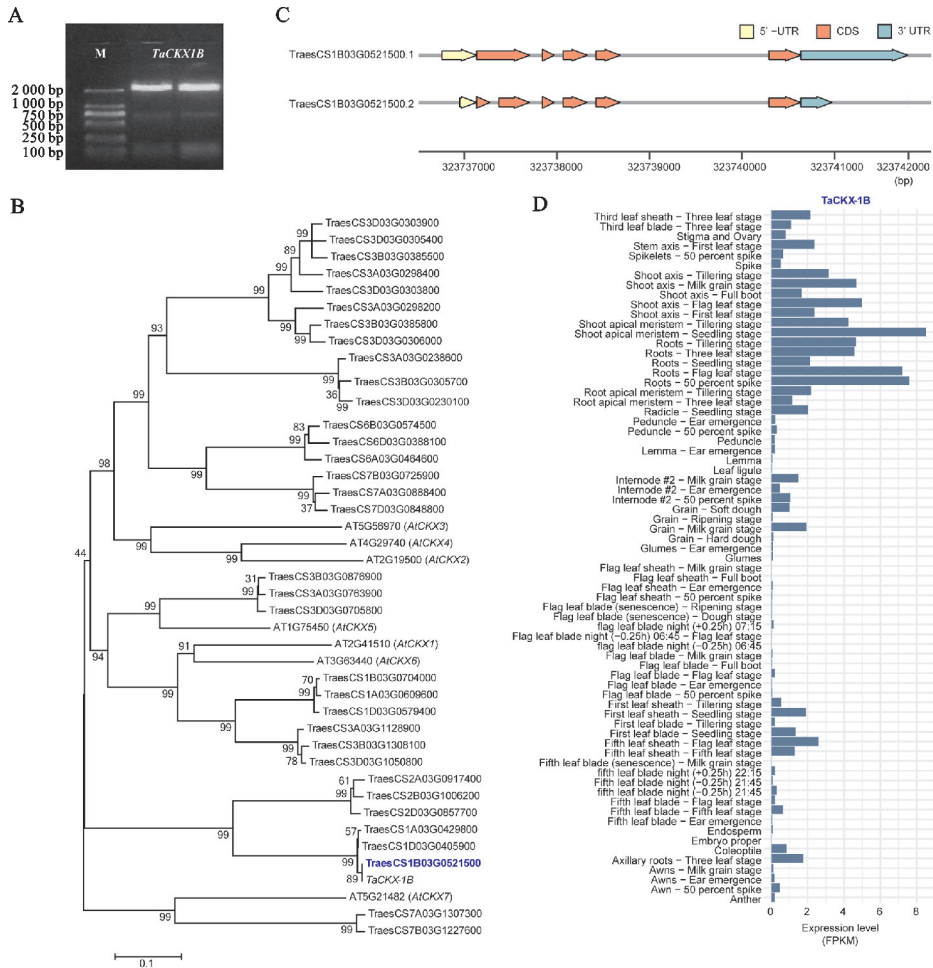
2.6 本氏烟草转基因植株的获得及根系干重表现

通过农杆菌介导的叶盘法对本氏烟草进行遗传转化, 再经外植体经预培养等过程获得转基因植株(图 5)。提取野生型及转基因烟草植株基因组 DNA, 以潮霉素磷酸转移酶基因(*Hyg*) 特异性引物进行 PCR 扩增。结果显示, 转基因株系均扩增出预期条带, 野生型无扩增信号(图 6), 表明 *TaCKX1B* 基因已成功整合至烟草基因组中, 并获得具有 *Hyg* 抗性的 T₁ 代转基因植株。

与野生型相比, T₁ 代转基因烟草株系根系发育状况显著改善(图 6B)。定量分析表明, 转基因植株根系干重显著高于野生型, 约为后者 2 倍(图 6C), 证实 *TaCKX1B* 基因的表达可正向调控烟草根系物质的积累。

3 讨论

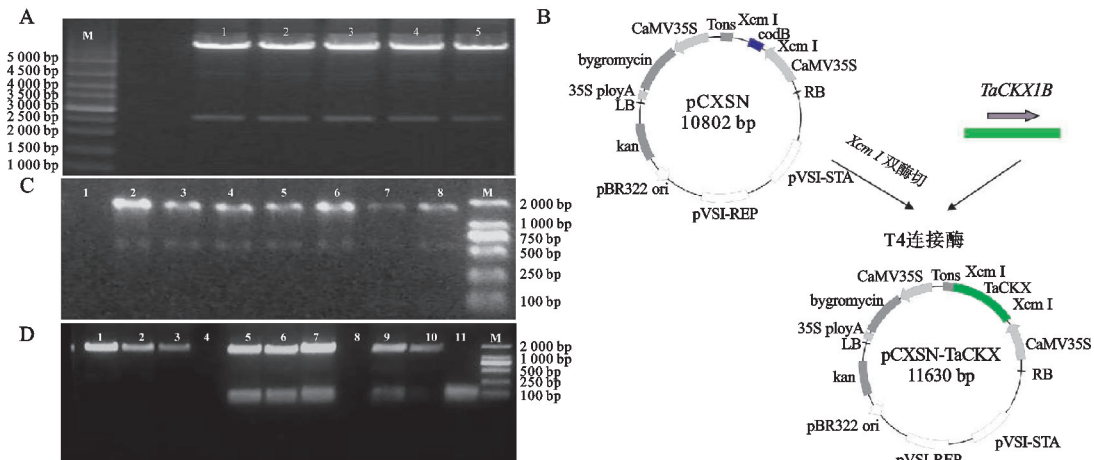
细胞分裂素(CTK)作为关键植物激素, 通过其合成、代谢与信号转导网络精确调控植物生长发育及逆境响应。细胞分裂素氧化酶/脱氢酶(CKX)是降解 CTK 的核心酶类, 是维持其内源稳态的“分子开关”^[16, 25]。本研究通过克隆小麦 *TaCKX1B* 基因并在烟草中验证其功能, 揭示了该基因在正向调控根系发育中的重要作用。



A: *TaCKX1B* cDNA 扩增电泳分析; B: *TaCKX1B* 基因结构分析; C: *TaCKX1B* 基因系统进化树分析; D: *TaCKX1B* 基因的染色体初定位。

A: Electrophoretic analysis of *TaCKX1B* cDNA amplification; B: Gene structure analysis of *TaCKX1B*; C: Phylogenetic tree analysis of *TaCKX1B*; D: Chromosomal localization of *TaCKX1B*.

图 3 *TaCKX1B* 基因克隆及特征分析
Fig. 3 Cloning and characterization of *TaCKX1B*



A: pCXSNI 载体 *Xcm* I 酶切电泳图; B: pCXSNI-*TaCKX1B* 植物表达载体的构建; C: 阳性克隆 PCR 筛选电泳鉴定; D: pCXSNI-*TaCKX1B* 重组质粒在农杆菌 GV3101 中的 PCR 验证。

A: Electrophoretogram of pCXSNI vector digested with *Xcm* I; B: Construction of the plant expression vector pCXSNI-*TaCKX1B*; C: Electrophoretic identification of positive clones by PCR screening; D: PCR-based verification of pCXSNI-*TaCKX1B* recombinant plasmid in *Agrobacterium* GV3101.

图 4 *TaCKX1B* 表达载体构建与农杆菌转化
Fig. 4 Construction of *TaCKX1B* expression vector and *Agrobacterium* transformation

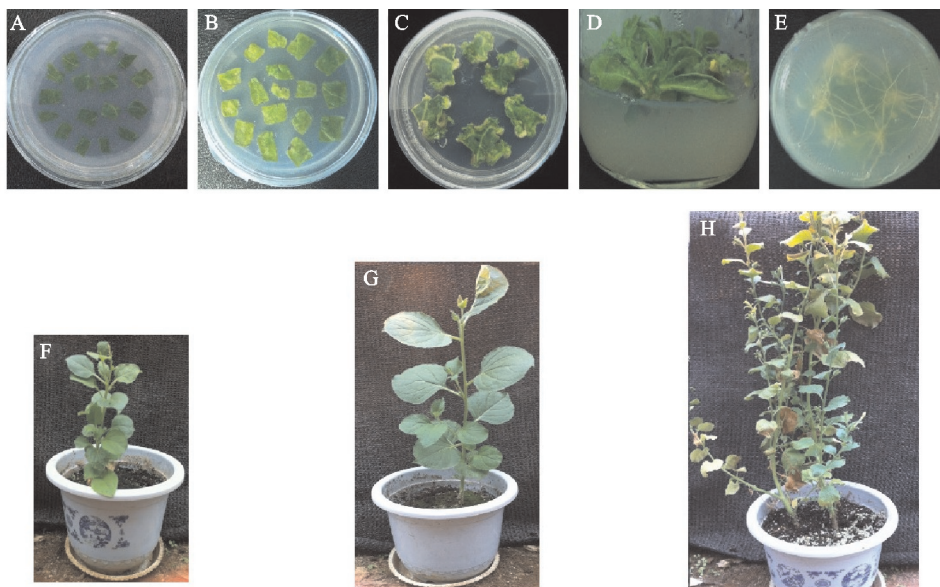
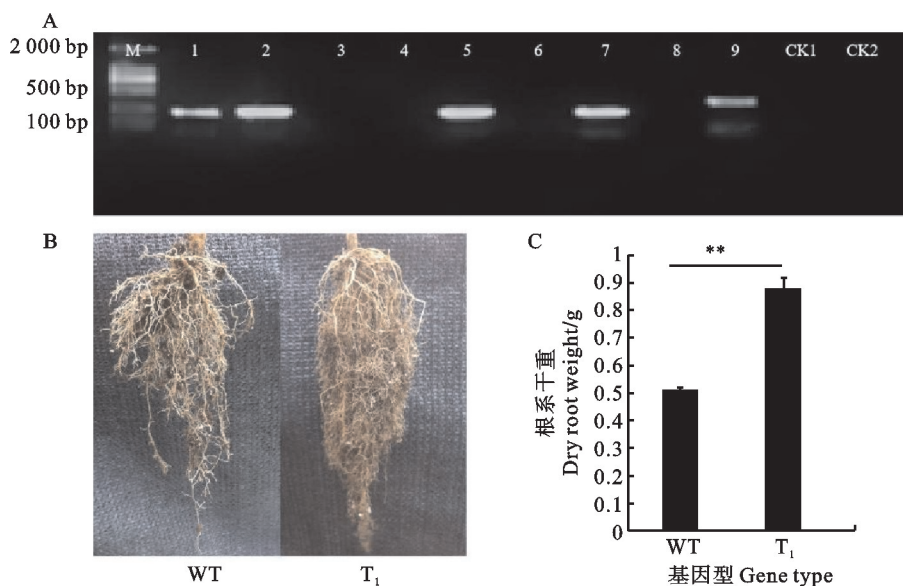


图 5 根癌农杆菌介导的本氏烟草遗传转化过程

Fig. 5 Process of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Nicotiana benthamiana*



WT:野生型。A:转基因烟草植株的 PCR 检测;B: 野生型与 T₁ 代转基因烟草根系的比较分析;C: 野生型和转基因型烟草根系干重分析。* * : $P < 0.01$ 。

WT: Wild type. A: PCR detection of transgenic tobacco plants; B: Comparative analysis of root systems between wild type and T₁ transgenic tobacco plants; C: Analysis of root dry weight in wild type and transgenic tobacco lines. * * : $P < 0.01$.

图 6 转基因烟草植株的 PCR 检测及野生型和 T₁ 转基因型烟草根系分析

Fig. 6 PCR detection of transgenic tobacco plants and analysis of wild type and T₁ transgenic tobacco root

3.1 小麦根系对 6-BA 响应变异的遗传基础与育种潜力

本研究利用 110 份小麦材料系统分析了根系对 $0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的敏感性,结果显示,小麦敏感性呈现连续分布特征(16.85%~84.90%),符合多基因控制的数量性状遗传特征,与水稻、玉米等作物中细胞分裂素(CTK)响应变异

的遗传结构具有相似性^[13-14]。值得关注的是,苗期对 6-BA 表现低敏感的材料(如 228 和 99)在灌浆期展现出较发达的根系表型,这一关联性提示 6-BA 低敏感性有益于小麦育种早期表型筛选的潜在价值。近年来研究表明,作物性状的表达常具有显著的基因型依赖性^[7-8]。本研究结果进一步说明,6-BA 低敏感性很可能反映了一种有利的

等位基因组合,能够在特定遗传背景下通过协调内源激素稳态,促进根系形态建成,从而增强植株对水分和养分的获取能力^[13,27]。因此,苗期 6-BA 低敏感性可作为筛选具有优良根系构型和抗旱潜力小麦基因型的有效表型标记,为小麦抗旱育种提供简便可靠的筛选依据。

3.2 TaCKX1B 通过调控 CTK 稳态促进根系发育

本研究通过烟草过表达体系明确 *TaCKX1B* 可显著提高根系生物量(约为野生型 2 倍),与拟南芥 *AtCKX1*、水稻 *OsCKX4* 和 *OsCKX9* 的功能一致^[6,13]。目前研究表明,CKX 通过调控根尖分生区 CTK 浓度影响细胞分裂周期及伸长区细胞分化,其作用机制与生长素-细胞分裂素互作网络密切相关^[31-32]。我们推测, *TaCKX1B* 可能通过降解根系局部 CTK,解除其对细胞分裂的抑制作用,同时改变生长素极性运输,共同促进侧根发生和根毛发育。后续需进一步解析 *TaCKX1B* 的亚细胞定位及其在根系不同细胞层中的表达模式,以揭示其精确作用机制。

3.3 TaCKX 家族功能分化与作物性状协同调控

本研究发现 *TaCKX1B* 主要调控根系,而此前研究表明 *TaCKX2* 和 *TaCKX3* 等成员主要影响小麦穗粒数、粒重等地上部性状^[21,26]。这种功能分化是 CKX 家族的普遍特征,在水稻和大麦中同样存在^[13,15]。其分子基础可能源于基因表达的组织特异性(如本研究中 *TaCKX1B* 在根中高表达)以及启动子元件的差异。更为复杂的是,家族成员间存在反馈调控与协同表达网络。最新研究发现,沉默小麦中的某个 *TaCKX* 基因(如 *TaCKX1*)会导致其他成员(如 *TaCKX2.2.1*)的表达量发生显著变化,形成一个精密的反馈调节机制以维持整体 CTK 稳态^[28]。这意味着,在利用单个 *TaCKX* 基因进行遗传改良时,必须充分考虑其对整个家族表达网络的潜在影响。未来利用 CRISPR/Cas9 技术创制多基因编辑突变体,将有助于解析 *TaCKX* 家族成员在调控“源-库”关系及根系-产量协同改良中的互作机制。

综上所述, *TaCKX1B* 基因在调控植物根系干物质积累中具有重要功能,其潜在机制可能在于 CKX 通过降解细胞分裂素(CTK),解除其对根分生组织活性的抑制,进而促进根系生长。本研究为小麦 *TaCKX* 基因家族的功能解析提供了新依据,也为通过遗传手段改良小麦根系构型及抗逆性奠定了理论基础。后续研究将进一步开展

TaCKX1B 在小麦中的遗传转化与功能验证,明确其组织特异性表达模式,并深入解析其与其他激素互作的分子机制。

参考文献:

- [1] LI J, ZHOU S B, WANG C J, *et al.* Comparative study of drought tolerance and tolerance mechanisms in wild and cultivated *Dichondra repens* [J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2007, 31(3): 521.
- [2] ALONI R, LANGHANS M, ULLRICH A C I. Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism [J]. *Planta*, 2004, 220(1): 177.
- [3] ASHIKARI M, SASKIBARA H, LIN S, *et al.* Cytokinin oxidase regulates rice grain production [J]. *Science*, 2005, 309(5735): 741.
- [4] HU Y, MA P, WU S, *et al.* Spatial-temporal distribution of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and water use efficiency under ridge-furrow dual mulching [J]. *Agricultural Water Management*, 2020, 240: 106301.
- [5] MUELLER B, SHEEN J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis [J]. *Nature*, 2008, 453(7198): 1094.
- [6] WERNER T, MOTYKA V, STRNAD M, *et al.* Regulation of plant growth by cytokinin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(18): 10487.
- [7] GUO T, WEBER H, NIEMANN M C E, *et al.* Arabidopsis HIPP proteins regulate endoplasmic reticulum-associated degradation of CKX proteins and cytokinin responses [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(11): 1918.
- [8] TU B, TAO Z, WANG S, *et al.* Loss of *Gn1a/OsCKX2* confers heavy-panicle rice with excellent lodging resistance [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(1): 23.
- [9] CORTLEVEN A, REMANS T, BRENNER W G, *et al.* Selection of plastid- and nuclear-encoded reference genes to study the effect of altered endogenous cytokinin content on photosynthesis genes in *Nicotiana tabacum* [J]. *Photosynthesis research*, 2018, 102(1): 21.
- [10] GALUSZKA P, FREBORTOVA J, LUHOVA L, *et al.* Tissue localization of cytokinin dehydrogenase in maize: Possible involvement of quinone species generated from plant phenolics by other enzymatic systems in the catalytic reaction [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(5): 716.
- [11] ZALEWSKI W, ORCZYK W, GASPARIS S, *et al.* HvCKX2 gene silencing by biolistic or *Agrobacterium*-mediated transformation in barley leads to different phenotypes [J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12(1): 206.
- [12] WERNER T, MOTYKA V, LAUCOU V, *et al.* Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(11): 2532.
- [13] RONG C, LIU Y, CHANG Z, *et al.* Cytokinin oxidase/dehy-

- drogenase family genes exhibit functional divergence and overlap in rice growth and development, especially in control of tillering [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73 (11): 3552.
- [14] ZHANG M, ZHENG H, JIN L, *et al.* miR169o and ZmNF-YA13 act in concert to coordinate the expression of *ZmYUC1* that determines seed size and weight in maize kernels [J]. *New Phytologist*, 2022, 235(6): 2270.
- [15] BRUGIERE N, JIAO S, HANTKE S, *et al.* Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid and abiotic stress [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(3): 1228.
- [16] WERNER T, KOLLMER I, BARTRINA I, *et al.* New insights into the biology of cytokinin degradation [J]. *Plant Biology*, 2006, 8(3): 371.
- [17] WERNE T, MOTYKA V, LAUCOU V, *et al.* Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants shown multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2532.
- [18] 马信, 林爱玲, 封德顺. 小麦细胞分裂素氧化酶基因*TaCKX1*原核表达载体的构建及表达[J]. 生物技术, 2009, 19(1): 10.
MA X, LIN A L, FENG D S. Construction and expression of prokaryotic expression vector for wheat cytokinin oxidase gene *TaCKX1* [J]. *Biotechnology*, 2009, 19(1): 10.
- [19] 张磊, 张宝石, 周荣华, 等. 小麦细胞分裂素氧化酶/脱氢酶基因(*TaCKX2*)的克隆及遗传作图[J]. 作物学报, 2007, 33(9): 1419.
ZHANG L, ZHANG B S, ZHOU R H, *et al.* Cloning and genetic mapping of cytokinin oxidase/dehydrogenase gene (*TaCKX2*) in wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(9): 1419.
- [20] 张磊, 张宝石, 周荣华, 等. 小麦细胞分裂素氧化/脱氢酶基因(*TaCKX5*)的克隆及其染色体定位[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 636.
ZHANG L, ZHANG B S, ZHOU R H, *et al.* Cloning and chromosomal localization of cytokinin oxidase/dehydrogenase gene(*TaCKX5*) in wheat [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(3): 636.
- [21] 常成, 张海萍, 张秀英, 等. 小麦细胞分裂素氧化酶基因*TaCKX3*参与穗粒数的形成[J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 303.
CHANG C, ZHANG H P, ZHANG X Y, *et al.* Wheat cytokinin oxidase gene *TaCKX3* is involved in the formation of grain number per spike [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2009, 7(2): 303.
- [22] ZENG Q W, QIN S, SO S Q, *et al.* Molecular cloning and characterization of a cytokinin dehydrogenase gene from upland cotton(*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter Rep*, 2012, 30(1): 1.
- [23] HORSCH R B, FRY J E, HOFFMANN N L, *et al.* A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, 227(4691): 1229.
- [24] CHEN S, SONGKUMARN P, LIU J, *et al.* A Versatile zero background T-vector system for gene cloning and functional genomics [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150(3): 1111.
- [25] KHABLAK S H, SPIVAK S I, PASTUKHOVA N L, *et al.* Cytokinin oxidase/dehydrogenase as an important target for increasing plant productivity [J]. *Cytology and Genetics*, 2024, 58(2): 115.
- [26] JABLONSKI B, BAJGUZ A, BOCIAN J, *et al.* Genotype-dependent effect of silencing of *TaCKX1* and *TaCKX2* on phytohormone crosstalk and yield-related traits in wheat [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(21): 11494.
- [27] LYNCH J P. Harnessing root architecture to address global challenges [J]. *The Plant Journal*, 2022, 109(2): 415.
- [28] JABLONSKI B, SZALA K, PRZYBOROWSKI M, *et al.* *TaCKX2.2* Genes coordinate expression of other *TaCKX* family members, regulate phytohormone content and yield-related traits of wheat [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22: 4142.