

冬小麦*TaIPT9A* 基因的克隆及抗寒功能分析

宋慧珊, 孙 晨, 刘亚赞, 孙青川, 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(CKs)在植物生长发育和逆境应答中发挥重要的调控作用,异戊烯基转移酶(IPTs)是 CKs 生物合成的重要限速酶。为了探究小麦 IPT 编码基因在植物低温胁迫应答中的作用,从强抗寒冬小麦品种东农冬麦 1 号(Dn1)分蘖节中克隆了*TaIPT9A* 基因(TraesCS7A02G560300),对其进行生物信息学分析、低温下启动子活性分析,并采用农杆菌介导法将其转入水稻冷敏感品种龙粳 11 中,对创建的含有*TaIPT9A* 的株系的抗寒功能进行初步分析。结果表明,*TaIPT9A* 基因的 CDS 为 1 362 bp,编码 453 个氨基酸;小麦与粗山羊草 IPT 蛋白亲缘关系最近;*TaIPT9A* 启动子区含有响应低温、光、ABA、MeJA 等顺式作用元件,*TaIPT9A* 启动子活性受低温诱导。与野生型相比,过表达*TaIPT9A* 基因水稻的叶片在低温胁迫下更翠绿、生长状态更好;叶片的脯氨酸(Pro)含量、过氧化氢酶(CAT)活性、抗氧化酶相关基因(*OsCATC*、*OsSOD1*、*OsSOD2* 和 *OsAPX1*)及抗寒相关基因(*OsCATC*、*OsDREB1A*)的表达量显著提高。这说明*TaIPT9A* 基因增强了水稻幼苗的抗寒性。

关键词: 冬小麦; *TaIPT9A*; 基因克隆; 抗寒

中图分类号: S512.1+1; S330

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2026)03-0293-11

Cloning and Analysis of the Cold Resistance Function of the *TaIPT9A* Gene in Winter Wheat(*Triticum aestivum* L.)

SONG Huishan, SUN Chen, LIU Yayun, SUN Qingchuan, ZHANG Da

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

Abstract: Cytokinins(CKs) play a pivotal regulatory role in plant growth, development and stress responses, with isopentenyltransferases(IPTs) serving as critical rate-limiting enzymes in CKs biosynthesis. To investigate the role of wheat IPT genes in plant responses to low-temperature stress, this study cloned the *TaIPT9A* gene(TraesCS7A02G560300) from the tiller nodes of the cold-resistant winter wheat cultivar Dongnong Dongmai 1(Dn1). Bioinformatics analysis, low-temperature-induced promoter activity assays, and functional characterization were conducted. The *TaIPT9A* gene was overexpressed in the cold-sensitive rice cultivar Longjing 11 via *Agrobacterium*-mediated transformation to preliminarily analyze its cold resistance function. The results showed that *TaIPT9A* has a coding sequence(CDS) of 1 362 bp, encoding 453 amino acids. Phylogenetic analysis revealed that wheat IPT proteins are most closely related to those of *Aegilops tauschii*. The *TaIPT9A* promoter contains cis-acting elements responsive to low temperature, light, ABA and MeJA, and its activity was induced by cold stress. Compared to wild-type rice, *TaIPT9A*-overexpressing plants exhibited greener leaves and better growth under low-temperature stress. Additionally, these plants showed significantly increased proline(Pro) content, catalase(CAT) activity, and upregulated expression of antioxidant enzyme-related genes(*OsCATC*, *OsSOD1*, *OsSOD2* and *OsAPX1*) as well as cold resistance-related

收稿日期: 2025-03-22

修回日期: 2025-05-10

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: 3335761856@qq.com(宋慧珊)

通讯作者 E-mail: zhangda2011@126.com(张 达)

genes(*OsCATC* and *OsDREB1A*). These findings suggest that *TaIPT9A* enhances cold tolerance in rice seedlings.

Keywords: Winter wheat; *TaIPT9A*; Gene cloning; Cold resistance

小麦(*Triticum aestivum* L.)是全球种植最广泛的作物之一,是世界上40%人口的主粮,为人类提供20%的能量和蛋白质。中国2022年小麦总产1.38亿吨,是世界最大的小麦生产国和消费国,预计2030年总需求量为1.8亿吨,这要求中国小麦产量稳定提升^[1]。低温限制小麦的生长发育、地理分布、产量及质量。黑龙江省地处高寒地区,冬季寒冷漫长,历来是作物种植的禁区。东农冬麦1号(Dn1)是首例能在黑龙江省安全越冬的冬小麦品种,可耐-30℃低温,返青率>85%,具有极强的抗寒性,Dn1的种植可有效提高土地利用效率^[2]。

细胞分裂素(cytokinins, CKs)在植物生长发育和逆境应答中发挥重要作用。研究发现,无论外源施加还是内源增加CKs,都可以提高植物对低温的抗性^[3-4];低温胁迫下,莫邪菊(*Carpobrotus edulis*)的CKs含量增加^[5];用外源CKs预处理小麦叶片,可以通过增加叶片中内源CKs含量提高小麦幼苗的耐冷性^[6]。异戊烯基转移酶(isopentenyltransferases, IPTs)是CKs生物合成的重要限速酶,拟南芥CKs生物合成的起始受到IPTs的精细调控^[7]。IPT介导tRNA和ATP/ADP两种CKs合成途径^[7]。顺式玉米素(cZ)通过tRNA-IPT途径合成,异戊烯基腺嘌呤(iP)和反式玉米素(tZ)通过ATP/ADP途径合成^[8]。在拟南芥中鉴定出9个*AtIPTs*基因^[9-10],其中*AtIPT1*和*AtIPT3~AtIPT8*特异性地参与iP和tZ的生物合成,而*AtIPT2*、*AtIPT9*则负责cZ类化合物的合成^[7]。目前,在水稻基因组中鉴定出10个*OsIPTs*基因^[11];在小麦基因组中鉴定出24个*TaIPTs*基因^[12]。

毕田田等^[13]发现,5℃、0℃低温下毛果杨叶片中*PtIPT5*基因的相对表达量下降。Feng等^[14]发现,过表达*MdIPT5b*显著增强了苹果愈伤组织和番茄植株的抗寒性。转*Leafy-ipt*基因提高了高茅茅植株的抗寒能力,并可延缓其衰老^[15]。在水稻中表达IPT基因,可减轻低温伤害^[16]。转IPT基因小麦在温室和田间种植条件下均表现出产量较高的特征^[17];干旱可诱导*TaIPT8*基因的表达,*TaIPT8*基因过表达显著增强了小麦植株

的抗旱性^[12]。然而,小麦IPT基因参与低温胁迫应答的机制尚不清楚。

课题组前期构建了低温胁迫下Dn1分蘖节(主要越冬器官)靶向激素代谢组,发现极端低温下Dn1分蘖节中内源CKs含量增高^[18];从Dn1分蘖节转录组数据库筛选到低温下高表达的*TaIPT9A*基因^[19]。本研究拟检测大田自然降温下该基因的表达量变化及转*TaIPT9A*基因对水稻抗寒性的影响,克隆*TaIPT9A*基因启动子进行低温下启动子活性分析,旨在明确*TaIPT9A*在冬小麦低温应答中的作用,为解析CKs调控小麦抗寒理论、挖掘抗寒基因资源、培育适应低温环境的小麦品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

冬小麦品种东农冬麦1号(Dn1),由东北农业大学小麦室提供。水稻(*Oryza sativa* L.)品种龙粳11(LJ11)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)Col-0野生型(WT),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 材料种植

Dn1的种植:Dn1于2023年9月9日在东北农业大学校内试验田播种;待自然降温且田间连续10 d的平均最低温分别为5℃(2023年10月12日)、-10℃(2023年11月11日)和-25℃(2023年12月20日)时,随机选取30株长势一致的小麦苗,取分蘖节,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℃冰箱中备用。

水稻的种植:将300粒饱满的LJ11种子放在盛有水的锥形瓶中浸泡1 d,之后放到湿润的纱布中萌发,萌发2~4 d后将其移到水分充足的黑土中培养至成熟,收取水稻种子。30粒转基因水稻种子(转化方法见1.2.4)采用相同的方法萌发后进行水培培养,至三叶期(14 d)进行处理。培养条件:光照培养箱,光周期14/10 h,温度30℃/24℃,相对湿度70%。

拟南芥的种植:将花土和蛭石等比例混合均匀,灭菌锅121℃灭菌20 min,待土冷却后装入

花盆中,撒入 100 粒种子,两周后单株移苗,待植株开花后用农杆菌对花序进行侵染。培养条件:温度 24 ℃,光周期 16/8 h,光照强度 120~150 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,相对湿度 60%。

1.2.2 抗寒相关基因表达量的检测

使用超纯 RNA 提取试剂盒(康为世纪,江苏)分别提取 1.2.1 中种植的 Dn1 分蘖节和水稻叶片 RNA,反转录合成 cDNA。使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,以*TaActin* (TraesCS5B01G124100)和*OsActin1*(Os03g0718100)作为小麦和水稻内参基因,基因及引物序列如表 1 所示。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测基因表达量,扩增体系 20 μL :2 $\times$ ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞,南京)10 μL ,引物各 0.4 μL ,cDNA 1 μL ,ddH₂O 8.2 μL ,程序设定参考说明书。每个样品均 3 个生物学重复,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

1.2.3 *TaIPT9A* 基因 T 载体构建

使用超纯 RNA 提取试剂盒(康为世纪,江苏)提取-25 ℃处理下 Dn1 分蘖节总 RNA,反转

录合成 cDNA。通过小麦多组学网站(<http://202.194.139.32/>)设计*TaIPT9A* 基因引物,序列如表 1。以 cDNA 为模版进行 PCR 扩增,反应体系同 1.2.2。反应程序:95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。回收*TaIPT9A* 扩增产物,将*TaIPT9A* 与 T 载体连接后转入大肠杆菌。对阳性菌株进行 PCR,对目的条带进行测序,将携带*TaIPT9A* 的菌液用 30%甘油保存于-80 ℃冰箱。

1.2.4 过表达载体构建及水稻遗传转化

使用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Kpa* I 对 PC1390U 载体进行酶切,以携带 *TaIPT9A* 的 T 载体质粒作为模板,引物序列见表 1。利用一步克隆试剂盒(诺唯赞,南京)构建 PC1390U-*TaIPT9A* 重组载体。将重组载体转入大肠杆菌 DH5 α 感受态,测序成功后,提取质粒转入农杆菌感受态 EHA105 中,将 PCR 鉴定为阳性的菌株用 30%甘油保存于-80 ℃冰箱中。

水稻种子去壳,用酒精消毒后移至诱导培养基上,置于培养箱中 24 ℃暗培养 5~10 d,诱导愈

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

基因 Gene	序列 Sequence (5'-3')	用途 Purpose
<i>TaActin</i>	F:CCTTAGTACCTTCCAACAGATGT R:CCAGACAACCTCGCAACTTAGA	荧光定量 PCR/qRT-PCR
<i>TaIPT9A</i>	F:CCTGACGCGAGGAAGAAGAG R:GATCTCTCCCCCTAGCCTCC	
<i>OsActin1</i>	F:CCTTCAACACCCCTGCTATG R:CAATGCCAGGGAACATAGTG	
<i>OsSOD1</i>	F:TGGCTTCCACATCCACTCCT R:CAACAAC TGCCCTTCCCAATA	
<i>OsSOD2</i>	F:AGGCTGTTGTTGTGCTTGGTAG R:CTTTCGGCAGGATTGTAGTG	
<i>OsCATC</i>	F:CTTCTCCTACTCCGACACGC R:AAGCCGTCG TAGTGGTTGTT	
<i>OsAPX1</i>	F:TTGACAACTCTTACTTCACGGA R:CATCTGCAGCATATTTCTCGAC	
<i>OsDREB1A</i>	F:GACCTGTACTACGCGAGCTT R:TAGTAGCTCCAGAGTGGGAC	
<i>TaIPT9A</i>	F:ATGTGCTGTGAAATGAGGCC R:CTTCCCCTGCGTCCTCCTA	基因克隆 Gene cloning
<i>PC1390U-TaIPT9A</i>	F:GTTACTTCTGCACTAGGTACCATGTGCTGTGAAATGAGGCC R:TCTTAGAATTCCC GGGGATCCTCACTTCCCCTGCGTCCT	过表达载体 Overexpression vector
<i>ProTaIPT9A</i>	F:TTGGCGATCAGATCCGATGG R:CGAGCTTTGGTGGGAGATCA	启动子克隆 Promoter cloning
<i>ProTaIPT9A</i> -GUS	F:ACGGGGGACTCTAGAGGATCCTTGGCGATCAGATCCGATGG R:GGACTGACCACCCGG GGATCCCGAGCTTTGGTGGGAGATCA	GUS 染色 GUS staining

伤组织形成。用悬浮培养基将活化两次的 *PC1390U-TaIPT9A* 农杆菌菌液浓度调至 OD₆₀₀ 值为 0.1~0.2, 将其与诱导 5~10 d 的愈伤组织混合, 30 min 后置于表面覆盖有一层灭菌滤纸的共培养基上, 移至培养箱中, 20 ℃ 暗培养 2 d。共培养完成后, 用灭菌水对愈伤组织进行清菌处理, 之后将愈伤组织浸入含 500 mg · L⁻¹ 羧苄青霉

素的无菌蒸馏水中 30 min。将愈伤组织转移至筛选培养基上, 32 ℃ 暗培养 14 d 后, 将筛选出来的具有抗潮霉素的愈伤转入分化培养基上, 28 ℃ 培养(光周期 14/10 h), 每隔两周更换 1 次培养基, 待愈伤组织长出绿芽和须根, 炼苗后将幼苗移栽到土壤中培养至成熟, 收取种子进行后续试验。所用培养基如表 2 所示。

表 2 培养基配方
Table 2 Medium formulation

培养基类型 Culture medium type	培养基成分 Medium composition	方法 Method
悬浮培养基 Suspension medium	N6max 储备液(10×)12.5 mL, N6min 储备液(100×)1.25 mL, Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100×)1.25 mL, Vitamin 储备液(100×)2.5 mL, 2,4-D 0.625 mL, Proline 0.15 g, CH 0.2 g, 蔗糖 5 g	pH=5.2, 加入蒸馏水定容至 250 mL, 灭菌后加入 AS 250 μL 和 50% 葡萄糖 5 mL
诱导培养基 Induction medium	N6max 储备液(10×)100 mL, N6min 储备液(100×)10 mL, Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100×)10 mL, Vitamin 储备液(100×)10 mL, 2,4-D 2.5 mL, Proline 0.6 g, CH 0.8 g, 蔗糖 30 g, Phytigel 3 g	加入 900 mL 蒸馏水, pH=5.8, 加入 3 g phytigel, 用蒸馏水定容至 1 L, 121 ℃ 灭菌 20 min
共培养基 Co-medium	N6max 储备液(10×)12.5 mL, N6min 储备液(100×)1.25 mL, Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100×)1.25 mL, Vitamin 储备液(100×)2.5 mL, 2,4-D 0.625 mL, Proline 0.15 g, CH 0.2 g, 蔗糖 7.5 g	pH=5.6, 定容至 250 mL, 加入 2 g agar powder, 灭菌后加入 5 mL 50% 葡萄糖与 250 μL AS 储备液
筛选培养基 Screening medium	N6max 储备液(10×)25 mL, N6min 储备液(100×)2.5 mL, Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100×)2.5 mL, Vitamin 储备液(100×)2.5 mL, 2,4-D 0.625 mL, Proline 0.15 g, CH 0.2 g, 蔗糖 7.5 g	pH=6.0, 加 2 g agar powder 并定容至 250 mL, 灭菌后加入 250 μL Hn(50 mg · mL ⁻¹) 与 500 μL Cn(250 mg · mL ⁻¹)
分化培养基 Differentiation medium	MSmax(10×)储备液 100 mL, MSmin(100×)储备液 10 mL, Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100×)10 mL, Vitamin 储备液(100×)10 mL, KT 储备液 2.0 mL, NAA 储备液 0.2 mL, Proline 0.6 g, CH 0.8 g, D-sorbitol 30 g, 蔗糖 30 g	加入 900 mL 蒸馏水, pH=5.8 后定容至 1 L, 加入 3 g phytigel, 灭菌后加入 2 mL Cn(250 mg · mL ⁻¹)
生根培养基 Rooting medium	MSmax(10×)储备液 50 mL, MSmin(100×)储备液 5 mL, Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100×)5 mL, Vitamin 储备液(100×)5 mL, 蔗糖 20 g	加入 900 mL 蒸馏水, pH=5.8, 加入 3 g phytigel 定容至 1 L

1.2.5 *TaIPT9A* 生物信息学分析及预测

从小麦多组学数据库(<http://202.194.139.32/>)获得 *TaIPT9A* 基因序列; 利用 ExPASy-ProtParam(<https://web.expasy.org/protparam/>)对蛋白理化性质分析。使用 SOPMA(<https://prabi.ibcp.fr/htm/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 软件对小麦(*Triticum aestivum*, XM_044569640.1)、粗山羊草(*Aegilops tauschii subsp. strangulata*, XM_020307919.3)、大麦(*Hordeum vulgare*, XM_045102245.1)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*, XM_003563175.4)、黑麦草(*Lolium perenne*, XM_051354021.2)、水稻(*Oryza sativa*

Japonica Group, AB239807.1)、高粱(*Sorghum bicolor*, XM_021453915.1)、玉米(*Zea mays*, NM_001365497.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, AY040056.1)、黍(*Panicum hallii*, XR_003227293.1)共 10 个物种的 IPT 蛋白序列进行比对和系统进化树分析。利用 MEME 在线程序(<http://meme-suite.org/tools/meme>)对 10 个物种的 IPT 蛋白进行 motif 分析; 使用 Plant CARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 *TaIPT9A* 基因的启动子区(上游 2 000 bp)进行顺式作用元件分析。

1.2.6 *TaIPT9A* 基因启动子活性分析

从小麦多组学数据库(<http://202.194.139.32/>)获得 *TaIPT9A* 启动子序列, 用 DNA 提取试剂盒(康为世纪, 江苏)提取 1.2.1 中保存的 Dn1

分蘖节总 DNA,用引物*ProTaIPT9A* (表 1)扩增 *TaIPT9A* 启动子区。PCR 扩增体系为 20 μ L: DNA 1 μ L,上、下游引物各 1 μ L,2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 10 μ L,ddH₂O 7 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C 3 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min。

以*ProTaIPT9A* 扩增获得的目的片段为模板,在上、下游引物的 5'端加上特异性接头(ACGGGG-GACTCTAGAGGATCC 和 GGACTGACCACCCGGG-GATCC)进行 PCR 扩增,获得含有同源臂的*Pro-TaIPT9A*,胶回收产物。将 pBI121-35S-GUS 植物表达载体用 *Hind* III 和 *Bam* HI 进行双酶切,将含有同源臂的 *ProTaIPT9A* 与酶切后的 pBI121-35S-GUS 植物表达载体连接,转入大肠杆菌 DH5 α 中,培养单菌落,摇菌培养后测序。测序结果比对成功后转化到农杆菌 GV3101 中,对阳性菌液进行 PCR 扩增,检测出与目的片段大小一致的条带,表明*ProTaIPT9A*-GUS 成功转入农杆菌。

将含有*ProTaIPT9A*-GUS 的农杆菌菌液进行活化后,6 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 8 min 收集菌体,用 5%的蔗糖溶液(含表面活性剂 Silwet-77)稀释菌液至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0 作为浸染液。将 1.2.1 中培养至开花的拟南芥花序完全浸入浸染液 1 min,用塑料袋密封后暗培养 1 d。在塑料袋上打孔,转移至光下培养 2 d 后,去塑料袋在光下培养至成熟,收取种子,记作 T₀ 代。将 T₀ 代种子播种至含 Kan 的 1/2 MS 培养基中,挑选能够正常生长至四叶期的拟南芥幼苗移至土壤中继续培养,筛选至 T₃ 代,提取叶片 DNA 进行鉴定。将鉴定为*ProTaIPT9A*-GUS 阳性的种子播种于土壤中,待植株长至 28 d,取植株分别置于常温(对照组)及 4 $^{\circ}$ C 培养(低温处理组)4 h。将拟南芥植株整株浸泡于 GUS 染液,37 $^{\circ}$ C 暗培养 12 h。将染色后的植株取出用 95%酒精脱色,对脱色完全的植株进行观察及拍照。

1.2.7 *TaIPT9A* 对低温胁迫的效应分析

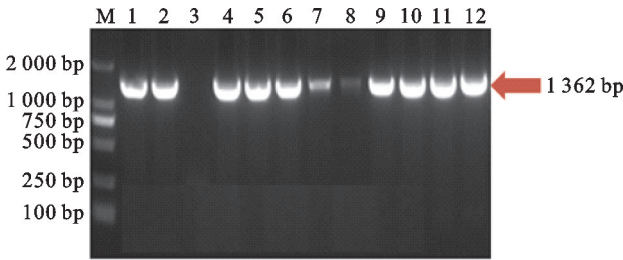
将水稻 LJ11 野生型(WT)及其转基因(OE)幼苗置于光照培养箱中,培养条件同 1.2.1 中水稻种植 14 d 后取生长状态一致的幼苗分两批处理。一批于原生长条件下培养(对照组),另一批于 12 $^{\circ}$ C 低温培养(处理组);3 d 后,对水稻幼苗进行表型观察并拍照。取幼苗叶片,用锡纸包裹,液氮冷冻后置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

采用试剂盒(苏州,科铭)测定水稻幼苗叶片脯氨酸(Pro)含量和过氧化氢酶(CAT)活性。

2 结果与分析

2.1 *TaIPT9A* 基因的克隆

提取-25 $^{\circ}$ C 下 DnI 分蘖节总 RNA,反转录成 cDNA,扩增 *TaIPT9A* 的 CDS,经琼脂糖凝胶电泳检测和测序,获得 1 362 bp 的目的片段(图 1),与小麦多组学网站公布序列相比无碱基突变。



M:DL2000;1~12;重复。
M: DL2000; 1-12: Repetitions.

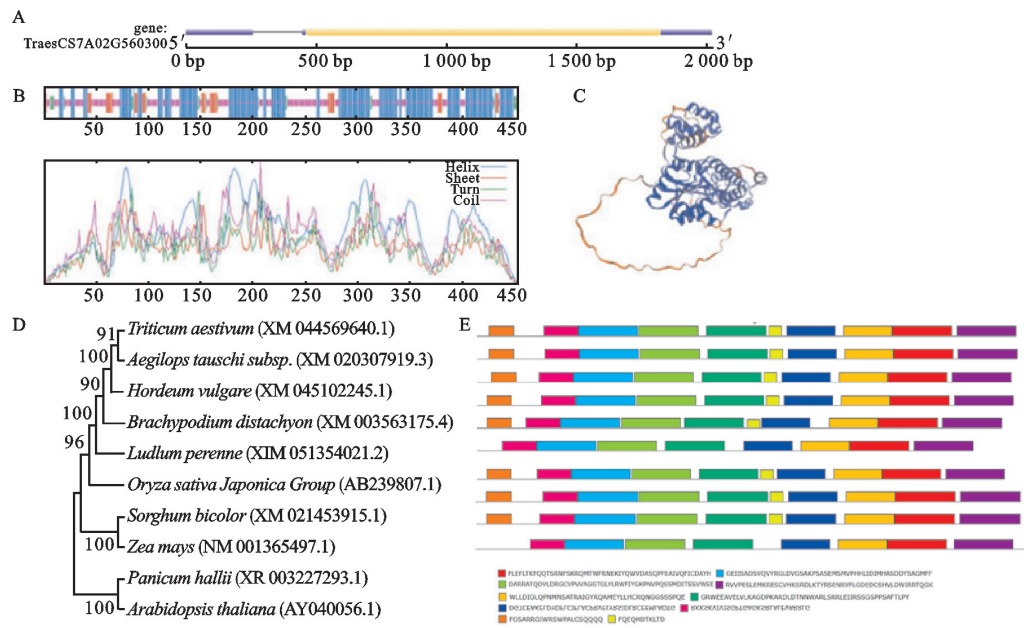
图 1 *TaIPT9A* 基因扩增结果
Fig. 1 PCR result of *TaIPT9A* gene

2.2 *TaIPT9A* 理化性质及结构

TaIPT9A 基因(TraesCS7A02G560300)全长 1 830 bp,位于 7A 染色体上,包含 1 个内含子(图 2A)。*TaIPT9A* 的 CDS 为 1 362 bp,编码 453 个氨基酸。*TaIPT9A* 蛋白的分子量为 50.99 kDa,理论等电点(PI)为 6.53,属于弱酸性蛋白;脂肪指数为 74.30,不稳定指数为 58.94,亲水指数为-0.369,说明 *TaIPT9A* 为不稳定亲水性蛋白。*TaIPT9A* 蛋白二级结构预测分析显示,该蛋白中无规则卷曲(Coils)占 43.93%, α -螺旋(Helix)占 47.90%,延伸链占 6.84%, β -转角(Turns)为 0(图 2B)。*TaIPT9A* 蛋白三维建模为 6dtl.1.A,与模板的氨基酸序列同源性为 94.47%,GMQE 值为 0.83(图 2C)。

系统进化树分析发现,小麦与粗山羊草的 IPT 蛋白亲缘关系最近(图 2D)。Motif 分析显示,小麦 IPT 与粗山羊草、大麦、二穗短柄草、黍、高粱、玉米具有 10 个相同的 motif,与黑麦草、水稻有 9 个相同的 motif,与拟南芥有 8 个相同的 motif(图 2E)。

TaIPT9A 基因启动子区含有低温响应元件 LTR、光响应元件、激素 ABA、MeJA、ABA 及生长素响应元件(表 3),表明*TaIPT9A* 基因可能响应低温和激素处理。



A: 基因结构; B: 蛋白质二级结构; C: 蛋白质三级结构; D: 系统进化树; E: Motif 分析。
A: Gene structure; B: Protein secondary structure; C: Protein tertiary structure; D: Phylogenetic tree; E: Motif analysis.

图 2 TaIPT9A 基因、蛋白结构预测、系统进化树及 motif 分析

Fig. 2 Prediction of gene, protein structure, phylogenetic tree and motif analysis of TaIPT9A

表 3 TaIPT9A 启动子区顺式作用元件分析
Table 3 Analysis of cis-acting elements in the promoter region of TaIPT9A

种类 Category	元件 Element	描述 Description	个数 Category
胁迫 Stress	LTR	参与低温响应的顺式作用元件 Cis-acting element involved in low-temperature responsiveness	2
	G-box	参与光响应的顺式作用调节元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness	1
光 Light	GT1-motif	光响应元件 Light responsive element	1
	Sp1		1
调节 Regulation	MRE	参与光响应的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light responsiveness	1
	3-AF3 binding site	部分保守的 DNA 模块阵列(CMA3) Part of a conserved DNA module array(CMA3)	1
	CAAT-box	启动子和增强子区常见顺式作用元件 Common cis-acting element in promoter and enhancer regions	13
	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	15
	A-box	顺式作用调节元件 Cis-acting regulatory element	1
	CCAAT-box	MYBHv1 结合位点 MYBHv1 binding site	4
	CAT-box	与分生组织表达相关的顺式作用调节元件 Cis-acting regulatory element related to meristem expression.	1
	AT-rich element	富含 AT 序列的 DNA 结合蛋白(ATBP-1)的结合位点 Binding site of AT-rich DNA binding protein(ATBP-1)	1
	O2-site	参与玉米醇溶蛋白代谢调控的顺式作用调节元件 Cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation	1
	ARE	厌氧诱导所必需的顺式作用调节元件 Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction	2
生长 Development	RY-element	参与种子特异性调控的顺式作用调节元件 Cis-acting regulatory element involved in seed-specific regulation	2
激素 Hormone	TGACG-motif	参与茉莉酸甲酯反应的顺式作用调节元件 Cis-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 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	2
	ABRE	参与脱落酸反应的顺式作用元件 Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	1
	TCA-element	参与水杨酸反应的顺式作用元件 Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness	2
	TGA-element	参与生长素响应性的顺式作用调节元件 Cis-acting regulatory element involved in auxin responsiveness	1

2.3 *TaIPT9A* 基因表达量及其启动子活性分析

2.3.1 *TaIPT9A* 表达量分析

随着温度降低,*TaIPT9A* 表达量呈显著上升的趋势,−25 ℃下基因表达量是 5 ℃时的 52.5 倍(图 3),表明*TaIPT9A* 表达响应低温。

2.3.2 *TaIPT9A* 启动子活性分析

提取 Dn1 分蘖节总 DNA,扩增*TaIPT9A* 启动子区,获得完整的 2 000 bp 目的片段(图 4A),将其测序结果与数据库序列比对,发现无碱基突变。构建植物表达载体*ProTaIPT9A* -GUS,转化拟南芥,筛选至 T₃ 代进行低温处理(图 4B)。

常温下(24 ℃),*TaIPT9A* 启动子能启动 GUS 基因的表达;4 ℃处理 4 h 后,转*ProTaIPT9A* -GUS 拟南芥植株 GUS 染色明显加深(图 5),表明*TaIPT9A* 启动子活性受低温诱导后能够启动下游基因的表达。

2.4 转*TaIPT9A* 基因水稻及抗寒性分析

2.4.1 转*TaIPT9A* 水稻的筛选及鉴定

以水稻 LJ11 成熟胚为外植体,用含有 *PC1390U-TaIPT9A* 的农杆菌菌液侵染愈伤组织进行转基因处理(图 6)。取筛选出的转基因幼苗 T₁ 代生长状态良好叶片进行 PCR 鉴定,结果(图 7A)发现*TaIPT9A* 目标条带,说明*TaIPT9A* 被成功转入水稻。提取*TaIPT9A* 阳性水稻叶片总 RNA,进行 qRT-RCR 检测(图 7B)发现,部分株系的

TaIPT9A 表达量显著提高。选取表达量较高的株系 OE-13、OE-28 进行后续试验。

2.4.2 水稻幼苗抗寒性分析

正常生长条件下,LJ11 与其转*TaIPT9A* 幼苗的生长状态、叶片颜色无明显差异;12 ℃处理 3 d 后,转*TaIPT9A* 水稻幼苗的生长状态明显优于其野生型,植株较高,叶色更翠绿(图 8)。这表明转*TaIPT9A* 可提高水稻的抗寒性。

2.4.3 Pro 含量和 CAT 活性分析

常温下,LJ11 与其转基因株系的 Pro 含量和 CAT 活性无明显差异;12 ℃处理 3 d 后,水稻各株系 Pro 含量和 CAT 活性显著提高(图 9),且转*TaIPT9A* 株系的 Pro 含量(图 9A)和 CAT 活性(图 9B)显著高于 LJ11 野生型。这表明转*TaIPT9A* 基因提高了低温下水稻植株的渗透调节能力和抗氧化能力。

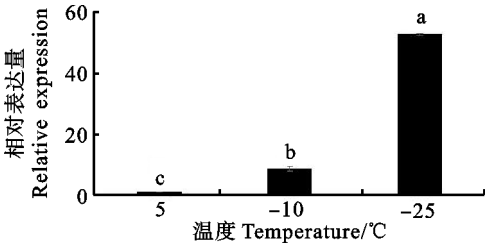


图 3 Dn1 分蘖节中*TaIPT9A* 基因的表达量
Fig. 3 Expression of *TaIPT9A* gene in Dn1 tillering node

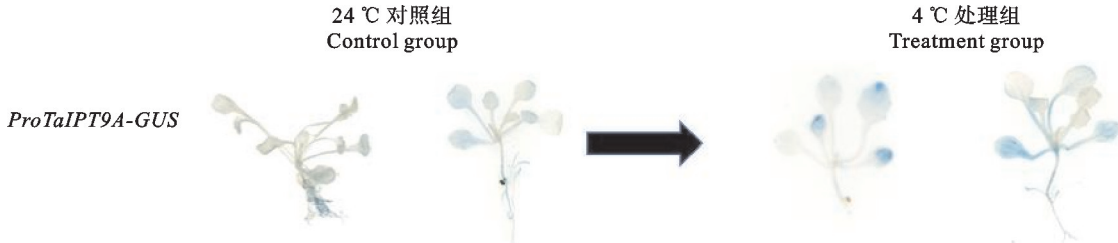


图 5 低温下*TaIPT9A* 启动子活性分析
Fig. 5 Analysis of *TaIPT9A* promoter activity under low temperature

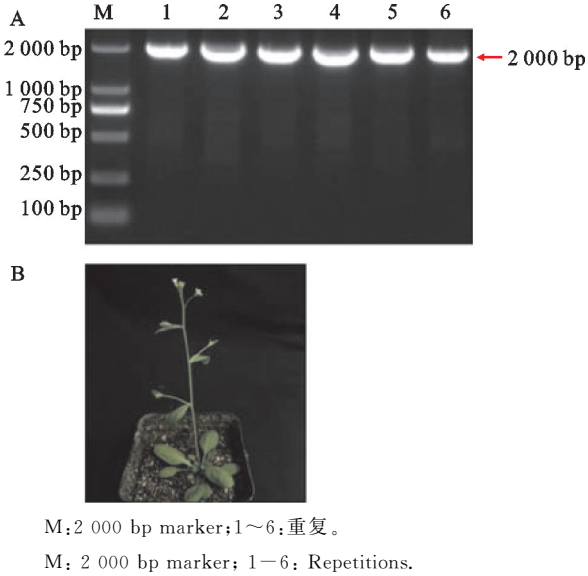
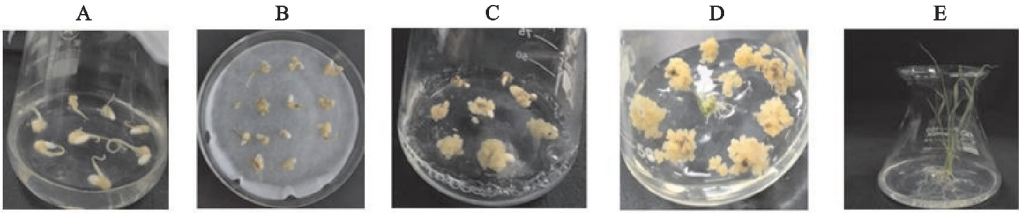


图 4 *TaIPT9A* 启动子克隆(A)及*ProTaIPT9A* -GUS 转基因拟南芥 T₃ 代阳性植株(B)
Fig. 4 Cloning of *TaIPT9A* gene promoter in Dn1(A) and T₃-generation positive plants of *ProTaIPT9A* -GUS transgenic *Arabidopsis* (B)



A: 诱导阶段; B: 共培养阶段; C: 筛选阶段; D: 生芽阶段; E: 生根阶段。
A: Induction phase; B: Co-cultivation phase; C: Selection phase; D: Budding phase; E: Rooting phase.

图 6 水稻转基因培养过程
Fig. 6 Rice transgenic cultivation

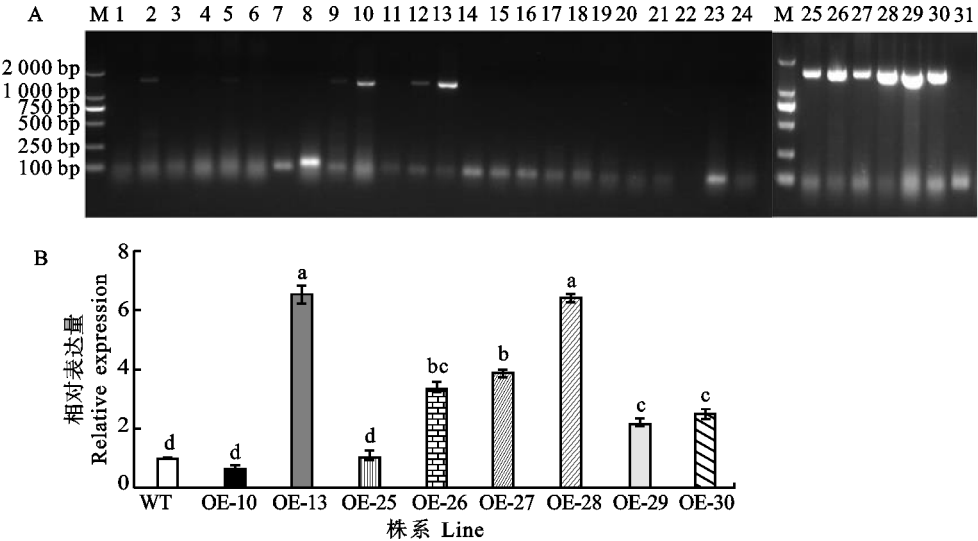


图 A 中, M; DL2000; 1~31: 水稻植株。图 B 中, WT; LJ11 野生型; OE-10~OE-30; LJ11 的转基因株系。图 8~图 10 相同。

In Fig. A, M; DL2000; 1~31: Rice plants. In Fig. B, WT: Wild type of LJ11; OE-10—OE-30: Transgenic line of LJ11. The same in Fig. 8—Fig. 10.

图 7 转*TaIPT9A* 水稻鉴定 (A) 和相对表达量检测 (B)

Fig. 7 Identification(A) and detection of relative expression levels(B) of *TaIPT9A* transgenic rice

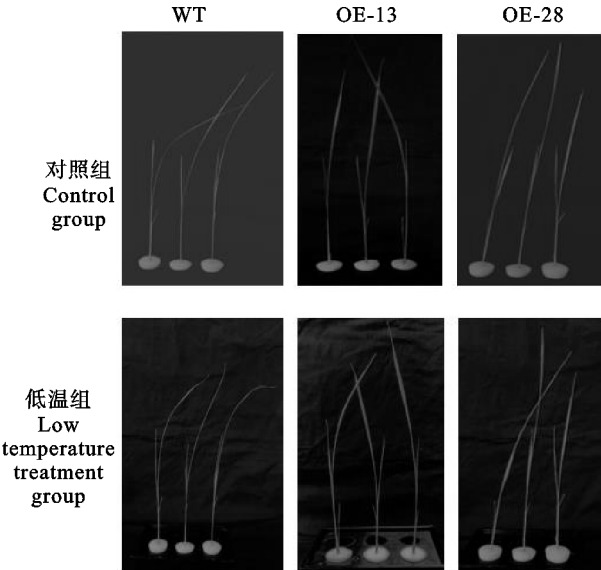


图 8 转*TaIPT9A* 基因水稻的植株表型

Fig. 8 Phenotypic of *TaIPT9A* transgenic rice plants

2. 4. 4 抗氧化酶和抗寒相关基因检测

CAT、超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸过氧化物酶(APX)是重要的抗氧化酶, *OsCATC* (Os03g0131200)、*OsSOD1* (Os03g0219200)、*OsSOD2* (Os03g0351500)和*OsAPX1* (Os03g0285700)是这 3 个酶的主要编码基因。 *OsCATC*、*OsDREB1A* (Os09g0522200)是抗寒相关基因^[20-22]。基因表达量检测发现, 常温水稻不同株系的*OsCATC* (图 10A)、*OsSOD1* (图 10B)、*OsSOD2* (图 10C)、*OsAPX1* (图 10D)和*OsDREB1A* (图 10E)表达量无显著差异; 当温度降至 12 ℃ 时, 转*TaIPT9A* 基因株系植株中这 5 个基因表达量均显著高于其野生型(图 10)。这表明, 转*TaIPT9A* 提高了低温胁迫下水稻植株的抗氧化酶相关基因(*OsCATC*、*OsSOD1*、*OsSOD2* 和*OsAPX1*)和抗寒相关基因(*OsCATC*、*OsDREB1A*)的表达量。

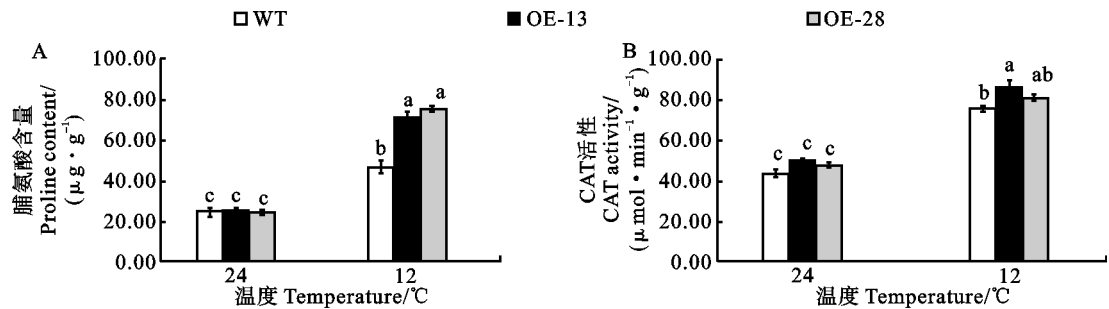


图 9 不同温度下水稻植株 Pro 含量(A)和 CAT 活性(B)

Fig. 9 Pro content(A) and CAT activities(B) in rice plants under different temperature

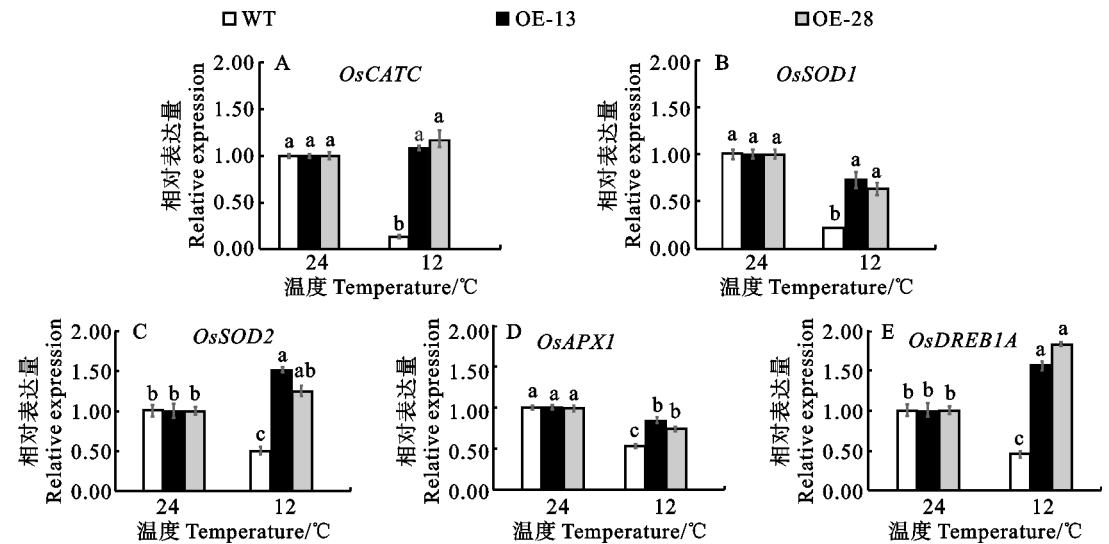


图 10 不同温度下水稻植株*OsCATC*、*OsSODs*、*OsAPX1* 和*OsDREB1A* 基因的表达量

Fig. 10 Expression levels of *OsCATC*, *OsSODs*, *OsAPX1* and *OsDREB1A* in rice plants under different temperature

3 讨论

本研究检测了低温胁迫下冬小麦 Dn1 分蘖节中*TaIPT9A* 基因的表达变化,发现-25℃下该基因表达量显著增高,是5℃时的52.5倍,这与低温降低了毛果杨叶片中*PtIPT5* 基因的相对表达量^[13]的结果相反。低温诱导了*TaIPT9A* 基因的表达,这可能与 Dn1 在低温下分蘖节中积累较多的细胞分裂素水平^[18]有关。结合*TaIPT9A* 的启动子活性受低温诱导,*TaIPT9A* 可能是 Dn1 应答冷胁迫的正调节因子。

水稻是单子叶模式植物,相较于小麦对低温更敏感;苗期,当环境温度低于15℃,水稻的生理代谢受到影响^[23]。LJ11 是一个高产、优质、冷敏感的水稻品种^[24]。将*TaIPT9A* 基因在 LJ11 中表达,发现苗期12℃低温处理的转基因 LJ11 与其野生型相比,植株更高,叶片更翠绿,Pro 含量更高,这与过表达*MdIPT5b* 基因促进了 Pro 的积

累,显著提高了苹果愈伤组织和番茄植株的抗寒能力^[14]结论相似。再次证明 Pro 的积累有助于清除超氧阴离子或羟基自由基,提高植物的抗寒性^[25]。

低温常常引起植物体内 ROS(包括超氧阴离子 O_2^- 、过氧化氢 H_2O_2 和氢氧根离子 OH^-) 的过度积累,引发膜脂过氧化,造成细胞膜损伤^[26]。抗氧化酶和抗氧化物有助于清除 ROS 的毒害,提高植物对低温的耐受性。SOD、CAT、APX 和过氧化物酶(POD)是调节生物体内 ROS 稳态的重要抗氧化酶。SOD 和 CAT 可将 O_2^- 和 H_2O_2 变成水和氧分子,减轻 ROS 对细胞的伤害^[27]。CAT 可提高植物的耐冷性^[28-29]。APX 是抗坏血酸-谷胱甘肽循环的关键酶,可以清除叶绿体、过氧化物酶体和细胞质中过量产生的 H_2O_2 ^[30]。过表达 APX 基因家族不同成员的转基因植物可有效解除 ROS 的毒害作用并改善植物的耐寒性^[31-33]。本研究检测了转*TaIPT9A* 水稻中 CAT 酶活性和抗氧化酶相关基因的表达量,发现转基

因水稻幼苗的 CAT 活性显著高于其野生型,这与转 IPT 基因提高了茄子活性氧(ROS)清除酶活性,显著增强了茄子对冷胁迫的耐受性^[34]的结论相似。本研究中,转 *TaIPT9A* 基因水稻幼苗抗氧化酶相关基因 *OsCATC*、*OsSOD1*、*OsSOD2* 和 *OsAPX1* 的表达量均显著提高。*OsCATC* 被报道正调节水稻生长发育和冷响应^[20,35];*OsDREB1A* 的表达受低温诱导^[21],过表达 *OsDREB1A* 增强了拟南芥的抗冻性^[22]。转 *TaIPT9A* 基因水稻幼苗的 *OsCATC* 和 *OsDREB1A* 的表达量也显著提高。推测转 *TaIPT9A* 基因可能通过提高抗氧化酶基因和抗寒相关基因的表达量提高水稻抗寒性。

本研究从强抗寒冬小麦 Dn1 中克隆了细胞分裂素异戊烯基转移酶基因 *TaIPT9A*,对其生物学信息、启动子活性、低温胁迫下的表达进行了初步分析,发现 *TaIPT9A* 基因正调节植物对低温的耐受性,这为进一步探究 CKs 在小麦低温胁迫应答中的作用机制提供了依据。*TaIPT9A* 基因正调节小麦和水稻的抗寒应答,转 *TaIPT9A* 基因是否提高了内源 CKs 水平?该抗寒功能是否通过 CBF 途径影响冷响应基因的表达?这都有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] YAN Y, GUO Y T, CHANG C Y, *et al.* HSP90. 2 modulates 2Q2-mediated wheat resistance against powdery mildew [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2023, 46(6): 1935.
- [2] 佟明耀, 郑家兰, 李卓夫, 等. 高寒地区超强抗寒新品种“东农冬麦 1 号”的选育[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(7): 1. TONG M Y, ZHENG J L, LI Z F, *et al.* Research on breeding new winter wheat cultivar “Dongnongdongmai 1” of super-freezing tolerance in frigid region [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2010, 41(7): 1.
- [3] BELINTANI N G, GUERZONI J T S, MOREIRA R M P, *et al.* Improving low-temperature tolerance in Sugarcane by expressing the ipt gene under a cold inducible promoter [J]. *Biologia Plantarum*, 2012, 56(1): 71.
- [4] JEON J, KIM J. *Arabidopsis* response regulator 1 and *Arabidopsis* histidine phosphotransfer protein 2 (AHP2), AHP3, and AHP5 function in cold signaling [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(1): 408.
- [5] FENOLLOSA E, GÁMEZ A, MUNNÉ-BOSCH S. Plasticity in the hormonal response to cold stress in the invasive plant *Carpobrotus edulis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2018, 231: 202.
- [6] 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.
- [7] NGUYEN H N, LAI N, KISIALA A B, *et al.* Isopentenyltransferases as master regulators of crop performance: Their function, manipulation, and genetic potential for stress adaptation and yield improvement [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(7): 1297.
- [8] LI S M, ZHENG H X, ZHANG X S, *et al.* Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response [J]. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(2): 271.
- [9] TAKEI K, SAKAKIBARA H, SUGIYAMA T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(28): 26405.
- [10] KAKIMOTO T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2001, 42(7): 677.
- [11] YADAV P, YADAV S K, SINGH M, *et al.* Genome wide identification and characterization of isopentenyl transferase (IPT) gene family associated with cytokinin synthesis in rice [J]. *Plant Physiology Reports*, 2024, 29(2): 207.
- [12] WANG N, CHEN J, GAO Y, *et al.* Genomic analysis of isopentenyltransferase genes and functional characterization of TaIPT8 indicates positive effects of cytokinins on drought tolerance in wheat [J]. *The Crop Journal*, 2023, 11(1): 46.
- [13] 毕田田, 张 骐, 代金玲, 等. 毛果杨 PtIPT5 基因的克隆及低温胁迫表达分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(22): 14. BI T T, ZHANG Q, DAI J L, *et al.* Cloning of the PtIPT5 gene from *Populus trichocarpa* and expression analysis under cold stress [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51(22): 14.
- [14] FENG Y, LV J H, PENG M Q, *et al.* Genome-wide identification and characterization of the IPT family members in nine *Rosaceae* species and a functional analysis of MdIPT5b in cold resistance [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2023, 9(4): 616.
- [15] 张 晓, 杨丽莉, 杨晓玲. 转 Leafy-ipt 基因高羊茅草生育后期 SOD, POD, MDA 的变化[J]. 山西农业科学, 2008(9): 26. ZHANG X, YANG L L, YANG X L. Changes of transgenic leafy-ipt plants in tall fescue SOD, POD, MDA in the later growth stage [J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2008(9): 26.
- [16] 陈能刚, 余显权, 赵德刚, 等. 转 IPT 基因水稻植株耐冷性研究[J]. 西南农业学报, 2006, 19(2): 255. CHEN N G, YU X Q, ZHAO D G, *et al.* Cold tolerance performance of transgenic IPT plants in rice [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2006, 19(2): 255.
- [17] BEZNEC A, FACCIO P, MIRALLES D J, *et al.* Stress-induced expression of IPT gene in transgenic wheat reduces grain yield penalty under drought [J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2021, 19(1): 67.

- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] GUO Z H, CAI L J, LIU C X, *et al.* Low-temperature stress affects reactive oxygen species, osmotic adjustment substances, and antioxidants in rice (*Oryza sativa* L.) at the reproductive stage [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 6224.
- [21] WANG Q Y, GUAN Y C, WU Y R, *et al.* Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(6): 589.
- [22] DUBOUZET J G, SAKUMA Y, ITO Y, *et al.* *OsDREB* genes in rice, (*Oryza sativa* L.) encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression [J]. *Plant Journal*, 2003, 33(4): 751.
- [23] ZHANG Q, CHEN Q H, WANG S L, *et al.* Rice and cold stress: Methods for its evaluation and summary of cold tolerance-related quantitative trait loci [J]. *Rice*, 2014, 7(1): 24.
- [24] LIU J, MENG Q L, XIANG H T, *et al.* Genome-wide analysis of Dof transcription factors and their response to cold stress in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 800.
- [25] HOSSAIN M A, BHATTACHARJEE S, ARMIN S M, *et al.* Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 420.
- [26] 刘次桃, 王威, 毛毕刚, 等. 水稻耐低温逆境研究: 分子生理机制及育种展望 [J]. *遗传*, 2018, 40(3): 171.
- LIU C T, WANG W, MAO B G, *et al.* Cold stress tolerance in rice: Physiological changes, molecular mechanism, and future prospects [J]. *Hereditas*, 2018, 40(3): 171.
- [27] BONNECARRÈRE V, BORSANI O, DÍAZ P, *et al.* Response to photooxidative stress induced by cold in Japonica rice is genotype dependent [J]. *Plant Science*, 2011, 180(5): 726.
- [28] YAN L, SHAH T, CHENG Y, *et al.* Physiological and molecular responses to cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(12): 2742.
- [29] RAZA A, SU W, JIA Z Q, *et al.* Mechanistic insights into trehalose-mediated cold stress tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 857980.
- [30] ROSA S B, CAVERZAN A, TEIXEIRA F K, *et al.* Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(5-6): 548.
- [31] VAN BUER J, CVETKOVIC J, BAIER M. Cold regulation of plastid ascorbate peroxidases serves as a priming hub controlling ROS signaling in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 163.
- [32] YAN H, LI Q, PARK S C, *et al.* Overexpression of CuZn-SOD and APX enhance salt stress tolerance in sweet potato [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 109: 20.
- [33] ZHANG Z G, ZHANG Q, WU J X, *et al.* Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2 (*OsAPX2*) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57472.
- [34] XIAO X O, ZENG Y M, CAO B H, *et al.* *P_{SAG12}*-IPT overexpression in eggplant delays leaf senescence and induces abiotic stress tolerance [J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2017: 1.
- [35] VIGHI I L, BENITEZ L C, DO AMARAL M N, *et al.* Changes in gene expression and catalase activity in *Oryza sativa* L. under abiotic stress [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15(4): 4238.