

小麦锌指转录因子 TaDi19A 对低温的响应及其互作蛋白的筛选

茹京娜^{1,2}, 于太飞², 陈隽², 陈明², 周永斌², 马有志², 徐兆师², 闵东红¹

(¹西北农林科技大学/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100; ²中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程/农业部麦类生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081)

摘要:【目的】锌指类转录因子在植物逆境信号转导和非生物胁迫响应中发挥重要的作用。通过对小麦锌指转录因子基因 *TaDi19A* 的耐冷性能进行鉴定, 利用酵母双杂交技术筛选并获得与 *TaDi19A* 互作的候选蛋白, 以解析 *TaDi19A* 介导的抗逆调控机制。【方法】通过对低温处理的小麦转录组测序结果进行分析, 获得一个锌指类转录因子 *TaDi19A*。利用生物信息学的方法分析 *TaDi19A* 的分子特性, 用 SMART 在线工具进行蛋白结构分析; 用 GSDS 和 PHYRE2 在线工具分别对 *TaDi19A* 结构和蛋白三级结构进行分析; 用 NetPhos 2.0 Server 数据库预测 *TaDi19A* 蛋白磷酸化位点。以低温处理的小麦 cDNA 作为模板, 通过 SYBR Green 染料法进行实时荧光定量 PCR, 检测 *TaDi19A* 在低温处理不同时间段的表达模式。构建植物表达载体 pBI121-*TaDi19A*, 通过花序侵染法转化拟南芥, 用 T₃ 代拟南芥进行耐冷性鉴定, 分析低温处理对转基因拟南芥的根长、鲜重和存活率的影响。检测转 *TaDi19A* 拟南芥中抗逆相关基因表达变化, 分析 *TaDi19A* 调控植物耐冷性的作用机制。构建诱饵载体 pGBKT7-*TaDi19A*, 验证自激活活性; 利用酵母双杂交技术, 将诱饵载体 pGBKT7-*TaDi19A* 和小麦 cDNA 文库共转化酵母 AH109 感受态细胞, 通过 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 和 X- α -gal 显蓝反应筛选得到阳性克隆, 测序和 BLAST 分析获得候选蛋白。【结果】小麦 *TaDi19A* 编码区全长 747 bp, 编码 248 个氨基酸, 分子量为 28.03 kD, 等电点为 4.74, 基因含 4 个外显子, 3 个内含子。*TaDi19A* 蛋白靠近 N-端包含锌指结合结构域, C 端为 Di19 结构域, 预测的 *TaDi19A* 蛋白三级结构包含 2 个 α 螺旋结构。磷酸化位点分析结果显示 *TaDi19A* 蛋白含有 12 个丝氨酸、9 个苏氨酸和 3 个酪氨酸磷酸化位点。实时荧光定量 PCR 结果显示, *TaDi19A* 受低温胁迫诱导表达。正常生长条件下, 转基因和野生型拟南芥没有明显差异, 低温处理下, 转基因拟南芥的根长明显大于野生型拟南芥, 并且耐冷性强于野生型拟南芥。下游基因检测结果表明, 低温处理后, *CBL1*、*CBL2* 和 *KIN1* 等冷胁迫响应相关基因在野生型和转基因植株中表达量都升高, 在转基因植株中的表达量显著高于野生型, 表明 *TaDi19A* 可能通过调节下游冷胁迫响应相关基因的表达提高转基因植物的耐冷性。通过对酵母双杂交系统筛选到的候选互作蛋白进行初步分析表明, 这些候选互作蛋白主要参与植物体的信号转导和非生物胁迫响应过程, 表明 *TaDi19A* 在植物的逆境信号转导及非生物胁迫响应过程中发挥着重要作用。【结论】小麦 *TaDi19A* 受低温诱导表达, 过表达能够提高转基因拟南芥的耐冷性; 而 *TaDi19A* 功能的发挥可能需要其他蛋白的参与。

关键词: 普通小麦; 锌指转录因子; 耐冷性; 酵母双杂交; 蛋白互作

Response of Wheat Zinc-Finger Transcription Factor TaDi19A to Cold and Its Screening of Interacting Proteins

RU JingNa^{1,2}, YU TaiFei², CHEN Jun², CHEN Ming², ZHOU YongBin², MA YouZhi²,
XU ZhaoShi², MIN DongHong¹

(¹ Northwest A & F University/State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling 712100, Shaanxi; ² Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Triticeae Crop, Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

收稿日期: 2017-01-23; 接受日期: 2017-03-07

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项 (2014ZX08009-016B)、国家自然科学基金 (31371620)、西北农林科技大学唐仲英育种基金
联系方式: 茹京娜, E-mail: rujingna1993@163.com. 通信作者闵东红, E-mail: mdh2493@126.com. 通信作者徐兆师, E-mail: xuzhaoshi@caas.cn

Abstract: 【Objective】 Zinc-finger transcription factors play an important role in stress signal transduction and abiotic stress response in plants. In this study, the function of *TaDi19A* was identified under low temperature stress and its interacting proteins were screened by yeast two-hybrid system to explore the regulation mechanism of *TaDi19A*. **【Method】** *TaDi19A* gene was isolated from the cold-treated wheat transcriptome profile. Bioinformatics method was used to analyze the molecular properties of the *TaDi19A* gene, SMART online tools were used for protein structure analysis; GSDS and PHYRE2 online tools were used to analyze gene structure and tertiary structure of TaDi19A protein; NetPhos 2.0 Server database was used to predict phosphorylation sites of TaDi19A protein. The quantitative real-time PCR (qRT-PCR), conducted using the cold-treated wheat cDNA based on SYBR Green technology, was used to analyze the expression pattern of *TaDi19A* under cold temperature stress treatment in different time periods. *TaDi19A* was fused with PBI121 to transform into wild-type (WT) *Arabidopsis* plants (Columbia-0) mediated by the floral dip method, homozygous T₃ seeds of transgenic lines and WT were used for cold tolerance analysis which the root length, fresh weight, and survival rate were measured before and after cold treatment. The expressions of four stress-response genes were investigated in transgenic lines and WT under normal and low temperature conditions to analyze the cold-resistant regulation mechanism of *TaDi19A*. Bait plasmid pGBKT7-*TaDi19A* was constructed and the self-activation was detected. The pGBKT7-*TaDi19A* and wheat cDNA library was co-transformed into yeast cell AH109 by two-hybrid system, and the positive clones were screened via SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade and SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal plate and these single clones were sequenced and analyzed by BLAST to obtain the interaction candidate proteins. **【Result】** The full length of *TaDi19A* gene was 747 bp with 4 exons, encoding 248 amino acids, and the protein molecular weight and isoelectric point of were 28.03 kDa and 4.74, respectively. TaDi19A protein included Zinc-finger binding domain, Di19 domain and the predicted tertiary structure contained 2 alpha helix. Phosphorylation site analysis showed that there were 12 serine, 9 threonine, and 3 tyrosine phosphorylation sites in TaDi19A protein. qRT-PCR analysis showed that *TaDi19A* was induced by low temperature. The root length and cold tolerance assays revealed that *TaDi19A* transgenic *Arabidopsis* increased the cold tolerance. The expression of several cold-stress-responsive genes was monitored through PCR analysis, the expression of genes *CBL1*, *CBL2*, *CBL3* and *KIN1* showed elevated levels in both WT and transgenic *Arabidopsis* plants under cold-stress condition, and the expression levels in transgenic plants were significantly higher than those in WT. Analysis of candidate proteins screened by yeast two-hybrid system revealed that those proteins mainly affected the signal transduction and abiotic stress response, which demonstrated that *TaDi19A* is critical to stress signal transduction and abiotic stress response in plants. **【Conclusion】** Cold-inducible *TaDi19A* improved cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*; *TaDi19A* might work via interacting with other proteins.

Key words: *Triticum aestivum*; zinc-finger transcription factor; cold tolerance; yeast two-hybrid; protein interaction

0 引言

【研究意义】 干旱、盐碱、高温、低温等非生物胁迫因子严重影响作物的产量和品质^[1], 其中低温是一个非常重要的环境因子。近年来气候变化异常, 极端低温天气出现频繁, 低温寒害已经成为农业生产中面临的严重自然灾害之一。低温通过影响植物细胞膜成分, 气孔开度等生理、生化过程对植物造成伤害, 限制作物的种植区域, 影响作物的产量^[2]。植物遭受冷胁迫时, 从接收低温信号到引起生理生化反应, 再到调节基因表达, 最后产生耐冷能力, 存在一个复杂的信号传导系统^[3-4], 其中低温胁迫相关转录因子的作用尤为关键, 它可以诱导下游多个耐冷基因的表达从而提高植物的耐冷性^[5]。小麦是世界重要的粮食作物之一, 低温冻害和倒春寒对小麦生产造成了严重的威胁。因此, 发掘小麦耐冷相关转录因子基因, 研究其调控机制, 对于完善低温胁迫应答的分子机制和利用分子手段改良作物耐冷性具有重要意义。 **【前人研究**

进展】 植物对逆境胁迫应答反应是一个涉及多基因、多信号传导途径及多基因表达产物的复杂过程^[6]。其中转录因子是植物体内一类重要的调节因子。转录因子 (transcription factor, TF) 也称反式作用因子, 能够与基因启动子区域中顺式作用元件特异性结合, 调节众多下游基因的表达, 对植物的生长发育、形态建成、以及抵抗非生物胁迫起重要作用^[7-9]。自植物中最早的转录因子在玉米中被报道以来^[10], 已从植物中分离鉴定出大量转录因子, 根据 DNA 结构域的特点将转录因子分成若干个家族, 包括 WRKY、AP2/EREBP、MYB、bZIP 和 ZFPs 等^[11-12]。在植物对低温胁迫的响应过程中, 转录因子通过调控下游抗逆相关基因的表达起着重要的作用^[13]。低温能够诱导多种植物基因的表达, 如 *COR*、*KIN*、*LTI* 或者 *RD* 等^[14-16]。CBFs/DREBs 转录因子能够与 *COR*/*KIN*/*LTI*/*RD* 基因启动子区的 DRE/CRT 顺式作用元件结合并调控其表达^[17-18]。拟南芥中过表达 *CBF1* 和 *CBF3* 能调控下游冷诱导基因的表达, 产生高水平的脯氨酸和可溶性糖, 从而提高植

物的耐冷性^[19-21]; 冷处理下 *CBF2* 能够负向调控 *CBF1* 和 *CBF3* 的表达, 从而调控下游基因表达及拟南芥的耐冷性^[22]。*ICE1* 编码一个 MYC 类 bHLH 转录因子, 位于 CBFs 上游, 正向调控 CBFs, 过表达 *ICE1* 的同源基因 *ICE2* 同样能够提高拟南芥的耐冷性^[23-24]。这些研究都表明 CBF-依赖途径在植物低温胁迫中起着重要的作用。除了 CBF-依赖途径, 在植物的低温胁迫响应中还存在着多重的信号途径^[25-27]。 C_2H_2 类锌指蛋白是真核生物中最大的转录因子家族之一, 在植物非生物胁迫响应中起着重要作用^[8, 28-29], 其中一些 C_2H_2 类锌指蛋白对低温胁迫响应。例如大豆的锌指蛋白基因 *SCOF-1*, 能够提高 bZIP 类转录因子 SGBF-1 与 ABRE 的结合效率, 调控转基因植物对低温的耐受性^[30]; 另一个大豆的锌指蛋白基因 *GsZFP1* 能够被 ABA、盐、干旱和低温诱导, 增强转基因拟南芥对干旱和低温的耐受性^[13]。据报道, 水稻锌指蛋白基因 *ZFP245/ZFP252/OSISAPI/OsCOIN* 和沙冬青的锌指蛋白基因 *AmZFPG* 受多种非生物胁迫诱导, 均提高了转基因植株对冷、干旱和盐胁迫的耐受性^[11, 31-34]。虽然近几年生物技术发展迅速, 但是植物 C_2H_2 类锌指蛋白的生理生化功能研究还很少。到目前为止, 大部分被鉴定的植物胁迫相关的 C_2H_2 类锌指蛋白都在干旱和盐胁迫中起着重要作用, 然而其中很少涉及到冷胁迫响应, 尤其是在作物中^[30-31]。【本研究切入点】小麦是世界重要的粮食作物之一, 而低温冻害和倒春寒却限制了小麦的种植区域。本研究通过对低温处理的小麦转录组测序结果进行分析, 获得一个 Di19 家族转录因子 *TaDi19A*。Di19 家族属于锌指蛋白中的一个小家族, 包含 zf-di19 和 di19_C 结构域, 涉及到植物非生物胁迫响应^[35-37]。在拟南芥、水稻和大豆中分别鉴定出了 7 个成员^[35, 38-39], 而在小麦中的研究却很少。小麦中, LI 等^[40]发现 *TaDi19A* 对植物非生物胁迫响应起着重要作用, 过表达 *TaDi19A* 能提高拟南芥在萌发期对盐胁迫、ABA 和甘露醇的敏感性, 根长试验表明过表达 *TaDi19A* 能够降低植株对盐胁迫的耐受性和对乙烯的敏感性, 然而关于 Di19 在小麦冷胁迫响应中的研究尚未见报道。【拟解决的关键问题】本研究通过实时荧光定量 PCR 鉴定了 *TaDi19A* 在低温胁迫下的表达模式, 以及转基因拟南芥对低温胁迫的响应; 为了进一步研究 *TaDi19A* 的耐冷作用机制, 利用酵母双杂交技术以 pGBKT7-*TaDi19A* 为诱饵筛选小麦 cDNA 文库, 筛选可能与其互作的候选蛋白, 为研究小麦 Di19 转录因子抗逆调控机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及胁迫处理

普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 农家品种小白麦是由中国农业科学院作物科学研究所景蕊莲研究员提供。将其播种在土中于 22℃ 生长 1 周, 然后对其进行低温胁迫处理: 将小麦幼苗放入 4℃ 继续生长, 并于 1、2、4、8、12 和 24 h 分别取样。取 2 周大的野生型拟南芥 (*Columbia-0*) 和过表达 *TaDi19A* 的拟南芥进行下游胁迫相关基因的分析。将所取样品迅速放入液氮中, 然后保存到 -80℃ 冰箱中。

1.2 基因的生物信息学分析

小麦 *TaDi19A* 数据来源于 EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org/index.html>) 数据库。小麦 *TaDi19A* 蛋白的分子量和等电点用在线工具 Compute pI/Mw tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 计算。其余的生物信息学分析方法如下: 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线工具分析小麦 *TaDi19A* 蛋白的结构域; 利用 GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 制作小麦 *TaDi19A* 外显子-内含子结构示意图; 利用 PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2.html>) 在线工具对 *TaDi19A* 蛋白三级结构进行分析^[41]。利用 NetPhos 3.1 Server 数据库 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测 *TaDi19A* 蛋白磷酸化位点。

1.3 RNA 提取和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

用植物总 RNA 提取试剂盒 (天根, 北京) 提取不同时间段低温处理的小麦 RNA 和拟南芥 RNA, 按照反转录试剂盒 (TaKaRa, 大连) 说明书将提取的 RNA 反转录成单链 cDNA。然后将反转录的 cDNA 模板均稀释到 200 ng· μ L⁻¹, 以 SYBR Green 染料法, 在 ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 仪器上进行实时荧光定量 PCR 反应。反应体系及程序参见 FENG 等^[38]。每个反应 3 次重复。按照基因相对表达分析 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析 *TaDi19A* 和拟南芥胁迫相关基因的相对表达量及其标准差。

1.4 转基因拟南芥的产生及低温鉴定

将 *TaDi19A* 的编码序列构建到带有 CaMV35S 启动子的 pBI121 表达载体上, 转入 GV3101 农杆菌中, 通过花序侵染法侵染开花期的野生型拟南芥。转基因拟南芥的筛选参照 HE 等^[42], T₃ 纯合转基因种子和野生型种子用于低温表型鉴定。

将野生型 WT 与 T₃ 转基因拟南芥种子用 70% 的酒精洗 3 min, 无菌水洗 3 次, 0.7% 的 NaClO 溶液泡

15 min, 无菌水再冲洗 3 次, 晾干后点种于 MS₀ 培养基上。先在 4℃ 春化 3 d 打破休眠, 然后转移到 16 h 光照/8 h 黑暗、60%相对湿度、22℃ 的培养箱中继续生长。将生长 5 d 的拟南芥幼苗移到新的 MS₀ 培养基上, 将其分别放入 22℃ 和 4℃ 直立生长, 观察转基因和野生型植株根部的生长状况, 统计根长和鲜重。将生长 10 d 大的拟南芥幼苗转移到营养土中(蛭石: 泥炭土=1:1), 在适宜条件下(16 h 光照/8 h 黑暗、温度 22℃、相对湿度 60%) 生长 3 周, 随后进行低温处理: 4℃ 放置 3 h 进行冷适应, 转移到-10℃ 放置 5 h, 然后转移到 4℃ 放置 3 h, 最后转移到正常生长条件(22℃) 恢复生长 5 d, 观察表型, 统计存活率并照相。采用 *t* 检验方法, 对所有数据进行显著性分析。 $P \leq 0.05$ 即为差异显著, 用一颗黑色五星标注, $P \leq 0.01$ 即为差异极显著, 用两颗黑色五星标注。

1.5 小麦 cDNA 文库构建和诱饵载体构建

利用 RNA 提取试剂盒(天根, 北京) 提取小麦叶片的总 RNA, 将提取的 RNA 反转录合成 cDNA 第一链(TaKaRa, 大连), 以反转录合成的第一链 cDNA 为模板进行 LD-PCR 扩增, 反应程序和后续反应按照于太飞等^[43]的方法进行, 最终得到小麦 cDNA 文库。

根据 *TaDi19A* 的序列以及诱饵载体 pGBKT7 (Clontech, 美国) 的限制性酶切位点设计特异引物, 通过 PCR 技术扩增 *TaDi19A* 的编码序列。pGBKT7 采用 *Nde* I 单酶切, 将 PCR 产物及酶切产物切胶回收, 然后通过 In-Fusion 技术(TaKaRa, 大连) 连接后转化入大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中(天根, 北京)。测序比对正确后提取质粒得到 pGBKT7-*TaDi19A* 重组质粒。

1.6 TaDi19A 互作蛋白的筛选

酵母 AH109 的感受态细胞按照试剂盒说明书(Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 User Manual, Clontech) 制备。自激活验证的方法参照于太飞等^[43]的方法。首先将 1 μg 的 pGBKT7-*TaDi19A* 重组质粒加入 50 μL 新制备的酵母感受态细胞中, 再加入 500 μL PEG/LiAc, 混匀后 30℃ 水浴 30 min, 每 5 min 颠倒混匀一次; 再加入 20 μL DMSO, 42℃ 水浴 15 min, 每 5 min 颠倒混匀一次; 8 000 r/min 离心 15 s, 弃上清, 将菌体重悬于 1 mL YPD 液体培养基中, 30℃ 振荡培养 90 min; 高速离心弃上清, 将菌体重悬于 0.9% 的 NaCl 中, 然后涂到 SD/-Trp、SD/-Trp/-His/-Ade 固体培养基上, 验证 pGBKT7-*TaDi19A* 是否存在自激活。

将 5 μg 的诱饵载体 pGBKT7-*TaDi19A* 质粒及 5 μg

的小麦 cDNA 文库质粒加入 600 μL 制备好的酵母感受态细胞中, 再加入 2.5 mL PEG/LiAc, 混匀后 30℃ 水浴 45 min, 期间每 10 min 颠倒混匀一次; 再加入 160 μL DMSO, 混匀后 42℃ 水浴 20 min, 每 10 min 颠倒混匀一次; 200 r/min 离心 5 min 弃上清, 将菌体重悬于 1 mL YPD 液体培养基中, 30℃ 振荡培养 90 min; 200 r/min 离心 5 min 弃上清, 将菌体重悬于 0.9% 的 NaCl 中, 然后涂到 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 固体培养基上, 30℃ 倒置培养 4 d 左右; 挑取直径大于 2 mm 的单克隆, 重悬于 0.9% 的 NaCl 中, 然后点涂到 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-gal 显蓝板上避光培养, 筛选蓝色阳性单克隆。

挑取筛选到的阳性菌落于 1 mL YPD 液体培养基中, 30℃, 230 r/min 振荡培养, 待菌液摇混后进行 PCR 检测。PCR 反应条件参照于太飞等^[43]的方法。将插入片段大小在 1 000 bp 左右的酵母单克隆提取质粒并转化到大肠杆菌 TOP10 (天根, 北京) 中, 测序, 然后将测序结果在 NCBI 网站进行同源性 BLAST 分析。

2 结果

2.1 TaDi19A 生物信息学分析

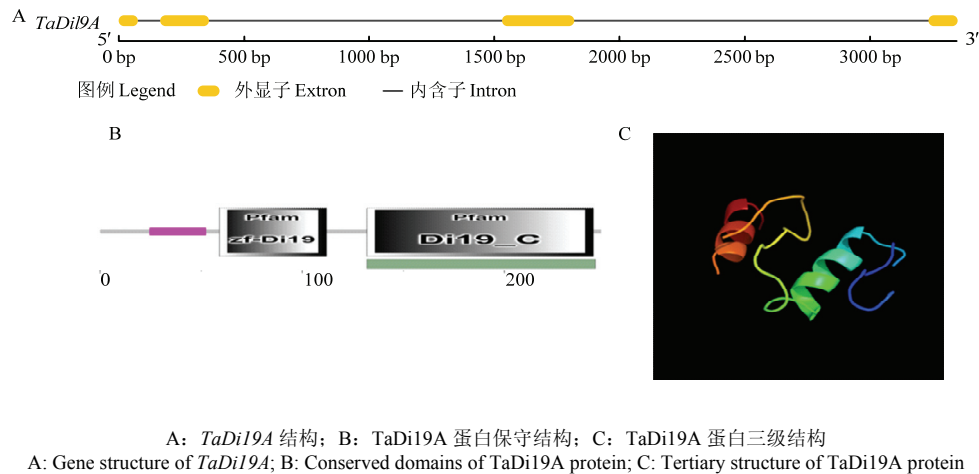
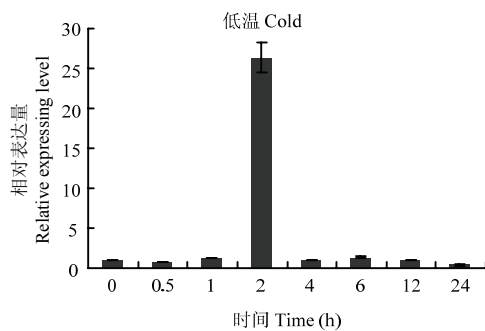
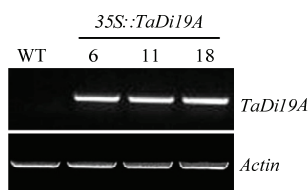
通过对低温处理的小麦转录组测序结果进行分析, 获得一个锌指类转录因子 *TaDi19A*。小麦 *TaDi19A* 全长 747 bp, 编码 248 个氨基酸, 分子量为 28.03 kD, 等电点为 4.74, 基因含有 4 个外显子和 3 个内含子(图 1-A); *TaDi19A* 蛋白靠近 N-端包含锌指结合结构域, C 端为 Di19 结构域(图 1-B), 预测的 *TaDi19A* 蛋白三级结构包含 2 个 α 螺旋结构(图 1-C), 有助于折叠成正确的蛋白结构, 从而行使其生物学功能; 磷酸化位点分析结果显示 *TaDi19A* 含有 12 个丝氨酸、9 个苏氨酸和 3 个酪氨酸磷酸化位点, 推测磷酸化作用可能与 *TaDi19A* 蛋白的活性调控有关。

2.2 TaDi19A 低温胁迫响应分析

为进一步研究 *TaDi19A* 对低温胁迫的响应, 通过实时荧光定量 PCR 分析 *TaDi19A* 在低温处理不同时间段的表达模式。结果显示, 在低温胁迫下, *TaDi19A* 上调表达, 在胁迫处理 2 h 时达到最大值, 为对照的 25 倍, 之后表达量迅速下降, 处理后 12 h 后恢复到初始水平(图 2)。

2.3 转 TaDi19A 拟南芥植株的耐冷性鉴定

为进一步研究 *TaDi19A* 对低温胁迫的响应, 通过获得的 *TaDi19A* 转基因拟南芥(图 3) 分析其在低温

图 1 *TaDi19A* 的基因结构和蛋白结构Fig. 1 Gene structure, protein structure of *TaDi19A*图 2 *TaDi19A* 在低温胁迫下的表达模式Fig. 2 The expression pattern of *TaDi19A* under low temperature treatment图 3 *TaDi19A* 在野生型和转基因拟南芥中的表达Fig. 3 Gel electrophoresis detection of *TaDi19A* in the WT and 35S::*TaDi19A* lines.

胁迫下的根长和耐冷性。在正常生长条件下,野生型拟南芥与 3 个转基因株系的主根长、总根长和鲜重均没有显著差异。而在 4℃处理后,野生型和转基因拟南芥的生长都受到抑制,野生型拟南芥受抑

制的程度要比转基因植株严重,转基因拟南芥的主根长、总根长和鲜重都显著高于野生型拟南芥(图 4)。例如,在低温处理 20 d 后,野生型拟南芥的主根长平均为 2.4 cm 左右,而转基因拟南芥达到 2.9 cm 左右。

为进一步检测野生型和转基因拟南芥的耐冷性,将植株种在土盆里于 22℃生长 4 周,随后经 4℃/3 h、-10℃/5 h 和 4℃/3 h 低温处理,22℃/5 d 恢复正常生长,发现大约 60%野生型拟南芥存活,而大约 90%的转基因植株存活,转基因植株的存活率明显高于野生型(图 5)。无论是低温根长试验还是存活率都表明转基因植株的耐冷性强于野生型拟南芥,表明 *TaDi19A* 提高了转基因植株的耐冷性。

2.4 冷胁迫相关基因在转 *TaDi19A* 植株中的表达

为研究 *TaDi19A* 耐低温胁迫的机制,检测正常生长情况下转基因和野生型拟南芥植株中冷胁迫响应有关基因的表达。结果显示,正常生长条件下,除了 *CBL1* 在转基因拟南芥中的表达量比野生型高之外,*CBL2*、*CBL3* 和 *KINI* 的表达量在野生型和转基因拟南芥中没有显著差异;4℃处理后,*CBL1*、*CBL2*、*CBL3* 和 *KINI* 在野生型和转基因拟南芥中表达量都有显著提高,但在转基因植株的表达量明显高于野生型,如 *CBL1* 在转基因拟南芥中的表达量是野生型的 2 倍多(图 6)。结果表明,*TaDi19A* 能正向调控 *CBL1*、*CBL2*、*CBL3* 和 *KINI* 的表达,并通过调控冷胁迫相关基因的表达提高转基因植株的耐冷性。

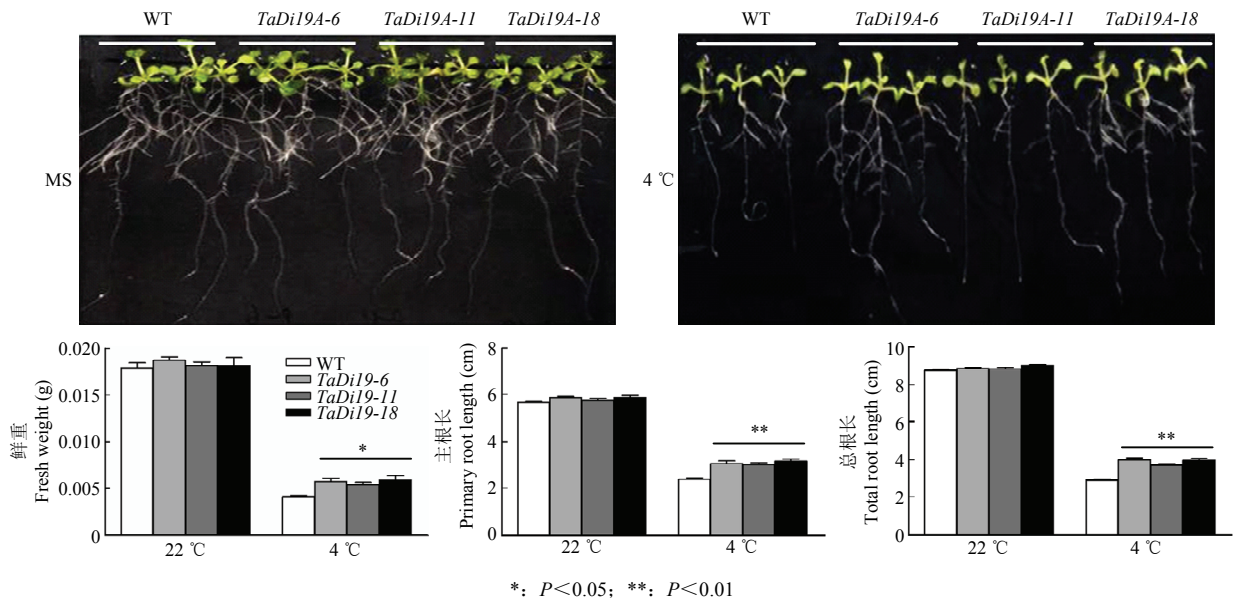


图 4 低温处理下 *TaDi19A* 转基因拟南芥根长统计

Fig. 4 The effect of low temperature on root length of *TaDi19A* transgenic seedlings

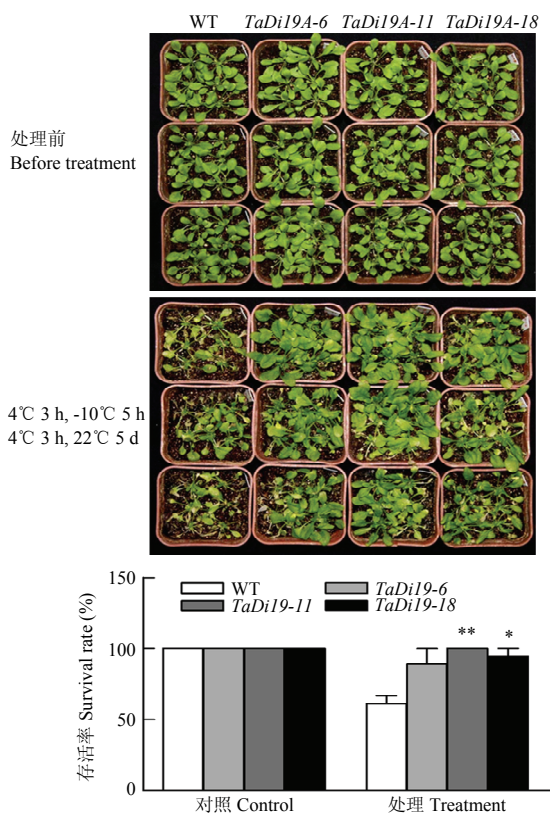


图 5 *TaDi19A* 转基因拟南芥耐冷性鉴定

Fig. 5 Identification of cold tolerance in *TaDi19A* transgenic *Arabidopsis*

2.5 诱饵载体的构建及自激活检测

将 *TaDi19A* 编码区全长构建到 pGBKT7 诱饵载体上, 用 PCR 技术进行菌液检测, 琼脂糖电泳得到与目的片段大小相符的单一带约 750 bp, 经测序和序列比对, 提取正确的重组质粒 pGBKT7-*TaDi19A*。

为检测 *TaDi19A* 是否存在自激活活性, 将 pGBKT7-*TaDi19A* 重组质粒转入酵母感受态细胞中, 转化产物分别涂布于 SD/-Trp、SD/-Trp/-His/-Ade 的固体培养基上, 30°C 倒置培养 3 d, 结果只有在 SD/-Trp 培养基长出酵母菌落, 而 SD/-Trp/-His/-Ade 平板上没有菌落长出 (图 7)。表明 pGBKT7-*TaDi19A* 成功转入酵母感受态细胞, 且 *TaDi19A* 无自激活活性, 可以用酵母双杂交系统筛选小麦 cDNA 文库。

2.6 小麦 cDNA 文库的筛选以及候选互作蛋白序列分析

为解析 *TaDi19A* 的抗性机理, 利用酵母双杂交系统筛选其可能的互作候选蛋白。将诱饵载体 pGBKT7-*TaDi19A* 质粒与小麦 cDNA 文库质粒共转化酵母感受态细胞, 转化后产物涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 固体培养基上, 30°C 倒置培养 4 d 左右, 挑取直径大于 2 mm 的单克隆, 点涂于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-gal 显蓝板上培养, 筛选蓝色阳性单克隆 (图 8)。

将显蓝的单克隆进行菌液 PCR 检测, 结果表明不同克隆插入的片段大小不同, 大部分集中在 1 000 bp

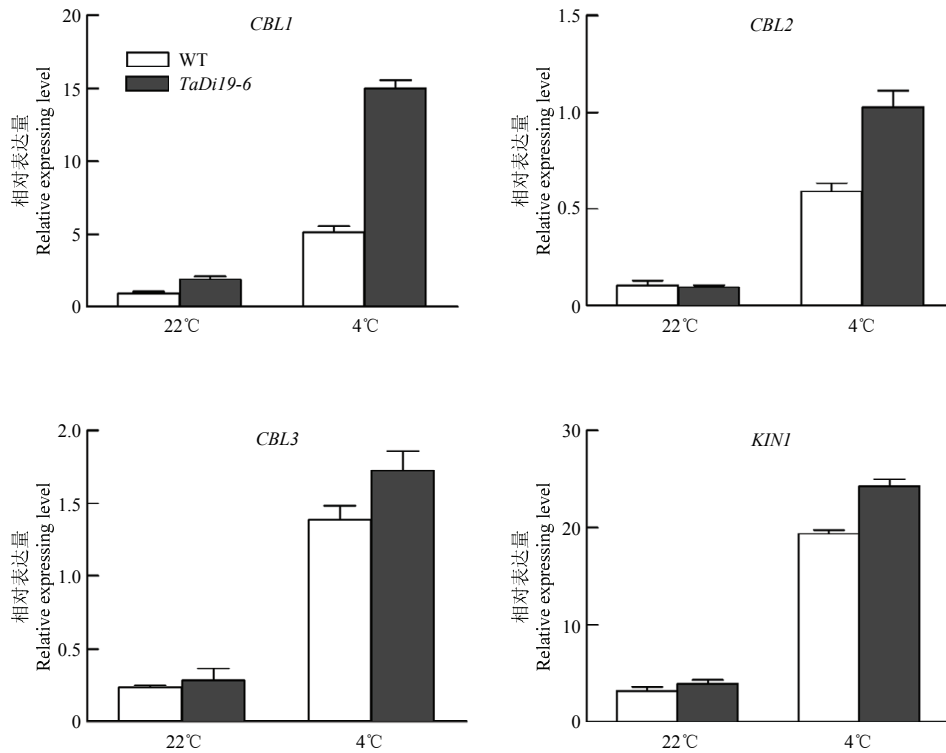


图 6 冷胁迫响应相关基因的表达分析

Fig.6 Expression analyses of cold response genes in WT and *TaDi19A* transgenic plants under normal and 4°C condition

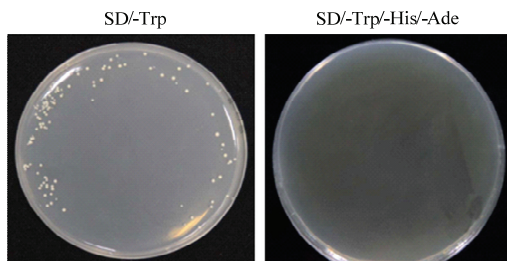
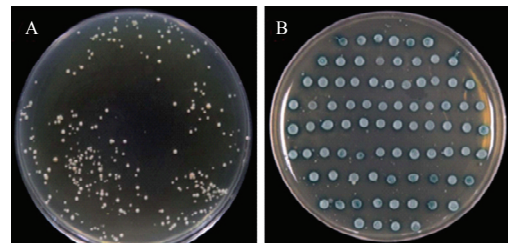
图 7 *TaDi19A* 自激活验证

Fig. 7 Auto-activity assays of *TaDi19A*

左右 (图 9), 大部分克隆扩增结果为 1 条带, 但还有一些克隆扩增结果为 2 条带。将插入片段大小在 1 000 bp 左右的单克隆提质粒并转化到大肠杆菌 TOP10 (天根, 北京) 中, 送达公司测序, 然后将测序结果在 NCBI 网站进行同源性比对分析。通过序列比对分析结果 (表 1), 发现筛选出的互作候选蛋白包括金属硫蛋白、PSBR 蛋白、温度诱导的脂质运载蛋白、热激蛋白、低温诱导蛋白、核转运因子等, 其中大多能够参与植物对逆境胁迫响应, 还有的能介导



A: 筛库得到的克隆; B: SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 平板上鉴定的阳性克隆

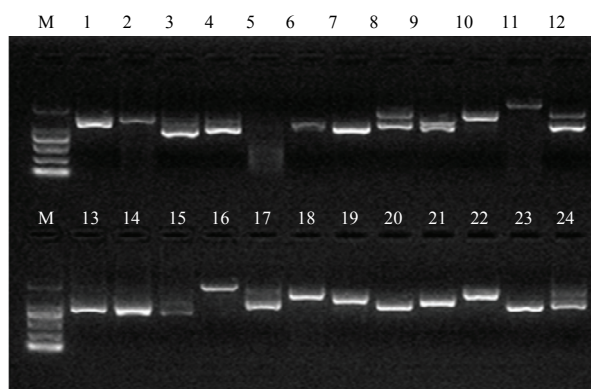
A: Clones screened from cDNA library; B: The positive clones tested on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal plates

图 8 *TaDi19A* 互作蛋白的筛选

Fig. 8 Screening of *TaDi19A*-interacting proteins

细胞内代谢物质交换, 还有一些编码功能未知蛋白。例如金属硫蛋白能够解除金属离子的毒害、维持细胞内环境的稳定、消除活性氧的危害, 对植物抵御非生物胁迫有着重要作用^[44]; 核转运因子能够协助运载物运进或运出细胞; 温度诱导的脂质运载蛋白能够传递信号并调节植物抵御逆境^[45]; 低温诱导蛋白和热激蛋白都能参与植物对逆境胁迫的响应等^[46-48]。这些蛋白

能参与植物的能量代谢以及对非生物胁迫的响应,对植物抵御逆境胁迫有着重要的作用。



M: DL2000 Marker; 1—24: 酵母克隆
M: DL2000 Marker; 1-24: Yeast clones

图 9 候选克隆的 PCR 检测

Fig.9 PCR identification of candidate clones

3 讨论

干旱、盐碱、高温、低温等非生物胁迫因子严重影响植物的生长和发育。目前已经报道的参与逆境胁迫调控过程的蛋白主要分两类:一类是功能蛋白,主

要参与逆境胁迫的直接调控,包括分子伴侣、离子通道蛋白等;另一类是调节蛋白,包括转录因子、蛋白激酶等信号分子^[49]。其中转录因子能够与基因启动子区域中顺式作用元件特异性结合,是一大类转录调控因子。本研究从低温处理的小麦转录组测序结果中获得了一个转录因子基因 *TaDi19A*。*Di19* 蛋白编码一个小基因家族,包含保守的 C_2H_2 锌指结构域,属于锌指类转录因子,在植物的生长、发育和非生物胁迫响应中起着重要的作用^[35-37]。拟南芥中 *Di19* 基因广泛的在不同组织中表达,包括幼苗、根、茎、花和果实中;*AtDi19-1* 和 *AtDi19-3* 能够快速被干旱胁迫诱导,*AtDi19-2* 和 *AtDi19-4* 在高盐的诱导下表达量增加,而 *AtDi19-7* 与光信号的调控有关,对非生物胁迫无响应^[50-51]。拟南芥 *AtDi19-1* 能结合 *PR1*、*PR2*、*PR5* 启动子的 TACA(A/G)T 元件,增强其表达,过表达 *AtDi19-1* 能提高转基因拟南芥的抗旱性^[35]。另外拟南芥 *Di19* 家族成员能够以 Ca^{2+} 依赖的方式被 CPK11 和 CPK3 磷酸化^[50]。qRT-PCR 和芯片数据分析表明,水稻 7 个 *Di19* 家族成员能够大量在营养器官中表达,但在生殖器官中表达量很少,一些 *OsDi19* 能显著被非生物胁迫和外源激素诱导^[37]。过表达 *OsDi19-4* 通过增强 ROS 的清除活性提高转基因水稻的抗旱性,并且转基因水稻对 ABA 高度敏感,*OsDi19-4* 敲除表现出对 ABA 敏

表 1 候选基因的 BLAST 分析结果及其功能推测

Table 1 BLAST analysis and predicted functions of candidate genes

TaDi19A 互作基因 The genes interacting with TaDi19A	GenBank 登录号 GenBank accession No.	功能 Function
金属硫蛋白 Metallothionein-like protein	EMS61268.1	解除金属离子的毒害、维持内环境的稳定、消除活性氧 Remove metal ions poison, maintain the stability of internal environment and eliminate reactive oxygen species
1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基 Rubisco small subunit	BAB19812.1	调控羧化反应催化效率和影响 Rubisco 对 CO_2/O_2 的底物特异性 Control carboxylation catalytic rate, impact the Rubisco substrate specificity for carbon/oxygen
NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase	EMS47720.1	催化电子从 NADH 传递给辅酶 Q Catalyze electrons from NADH to coenzyme Q
PSBR 蛋白 Photosystem II polypeptide	EMS68597.1	在光合系统 II 的组装过程中发挥着重要作用 Small molecule protein in photosynthetic II system, important in the process of assembly
温度诱导的脂质运载蛋白 Temperature stress-induced lipocalin	AAL75812.1	在植物抵御逆境时具有重要的调节作用和信号传递作用 Regulate plant response to stress, important in signal transduction
核转运因子 Nuclear transport factor	XP_010235339.1	协助运载物运进或运出细胞 Impact in carrying objects into or out of the cell
低温诱导蛋白 Low temperature induced protein	AAC96100.2	增强细胞抗冰冻脱水能力、保护酶行使正常功能、稳定细胞膜 Enhance the cellular anti-freeze dehydration, protect the action of normal function of enzymes, stability membrane
热激蛋白 Heat shock protein	XP_003558274.1	分子伴侣功能、与逆境胁迫相关 Molecular chaperone, regulate plant response to stress

感性降低^[37,39]。*OsCDPK14* 与 *OsDi19-4* 互作并磷酸化, ABA 处理后 *OsDi19-4* 的磷酸化作用增强, 提高了 *OsDi19-4* 调控下游 ABA 相关基因的能力^[39]。大豆中共鉴定出了 7 个 Di19 基因, 每个 Di19 基因对盐、干旱、氧化、ABA 胁迫有着特定的响应。*GmDi19-5* 在非生物胁迫中起着负调的作用, 过表达 *GmDi19-5* 提高了转基因拟南芥对盐、干旱、氧化和 ABA 胁迫的敏感性; *GmDi19-5* 与 *GmLEA3.1* 互作, 通过调控胁迫相关基因的表达参与 ABA 和 SOS 信号通路^[38]。

小麦 *TaDi19A* 在植物对非生物胁迫的响应中起着重要作用, 过表达 *TaDi19A* 提高了拟南芥在萌发期对盐、ABA 和甘露醇的敏感性, 过表达 *TaDi19A* 降低了拟南芥在苗期对盐胁迫的耐受性和对乙烯的敏感性^[40]。FAN 等^[52]发现 *TaDi19* 能被多种胁迫诱导, 过表达 *TaDi19* 提高了转基因拟南芥的耐盐性。这些研究都表明 Di19 在植物非生物胁迫响应中起着重要的作用。

本研究从低温处理的小麦转录组测序结果中获得了 *TaDi19A*。实时荧光定量 PCR 结果表明 *TaDi19A* 受低温诱导; 低温处理的根长试验, 转基因和野生型拟南芥的耐冷性鉴定 (图 4 和图 5) 都表明过表达 *TaDi19A* 能提高转基因植株的耐冷性。为研究 *TaDi19A* 耐冷胁迫响应机制, 通过检测正常和低温处理情况下转基因和野生型拟南芥中冷胁迫响应相关基因的表达, 表明 *TaDi19A* 能正向调控 *CBL1*、*CBL2*、*CBL3* 和 *KINI* 的表达, 说明 *TaDi19A* 可能通过调控冷胁迫相关基因的表达提高转基因植株的耐冷性。为进一步研究 *TaDi19A* 调控植物冷胁迫响应的作用机制, 本研究通过酵母双杂交技术筛选到一些可能与 *TaDi19A* 互作的候选蛋白, 其中括金属硫蛋白、PSBR 蛋白、温度诱导的脂质运载蛋白、热激蛋白、低温诱导蛋白、核转运因子等, 其中大多能够参与植物对逆境胁迫响应, 比如热激蛋白。热激蛋白广泛分布于真菌、动物和植物细胞中, 研究发现, 热激蛋白在高温、低温、干旱、过氧化等逆境下均能大量表达, 通过作为分子伴侣促进其他蛋白合成、折叠、稳定、运输和降解等来维持植物内环境的稳定, 在植物抵御逆境及适应环境中发挥重要作用^[53-54]。据报道, HSP90、HSP70 家族和一些小的 HSPs 能在低温响应中积累, 通过保护细胞膜、蛋白质的重新折叠等抵御低温胁迫^[53]。当植物遭遇低温胁迫时, *TaDi19A* 表达量上升, 热激蛋白积累量增多, 植物抵御低温能力增强, *TaDi19A* 可能通过与热激蛋白相互作用提高转基因拟南芥的耐冷性。

另外, 有研究表明温度诱导的脂质运载蛋白涉及非生物胁迫响应^[55-57]。温度诱导的脂质运载蛋白是一种膜蛋白, 在低温胁迫下大量积累^[57]。拟南芥中 *TIL1* 缺失突变体对光和冷敏感, 与野生型相比, 过氧化氢和活性氧的积累增多; 而过表达 *TIL1* 植株对冷和强光胁迫的耐受性增强^[58]。小麦和苜蓿 *TIL1* 都响应低温胁迫, 转 *MfTIL1* 烟草通过促进活性氧的清除和调控下游耐冷相关基因的表达提高转基因植株的耐冷性^[56-57]。本研究通过酵母双杂交技术筛选出的脂质运载蛋白、热激蛋白、低温诱导蛋白等都是和温度胁迫相关的蛋白, 它们可能通过与 *TaDi19A* 相互作用共同调控植物对低温胁迫的响应, 这可能部分解释了 *TaDi19A* 转基因拟南芥的耐冷性提高。

4 结论

小麦 *TaDi19A* 受低温胁迫诱导表达, *TaDi19A* 过表达提高了转基因拟南芥的耐冷性; *TaDi19A* 可能通过与其他蛋白相互作用参与植物对低温的响应过程。

References

- [1] BOYER J S, Plant productivity and environment. *Science*, 1982, 218(4517): 443-448.
- [2] THOMASHOW M F. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 1999, 50(50): 571-599.
- [3] XIONG L, SCHUMAKER K S, ZHU J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, 2002, 14(Suppl): s165-s183.
- [4] ZHU J, DONG C H, ZHU J K. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(3): 290-295.
- [5] 冯勋伟, 才宏伟. 结缕草 *CBF* 基因的同源克隆及其转基因拟南芥的抗寒性验证. *作物学报*, 2014, 40(9): 1572-1578.
FENG X W, CAI H W. Cloning of zoysiagrass *CBF* gene and validation of cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Acta Agronomica Sinica*, 2014, 40(9): 1572-1578. (in Chinese)
- [6] 裴丽丽, 郭玉华, 徐兆师, 李连城, 陈明, 马有志. 植物逆境胁迫相关蛋白激酶的研究进展. *西北植物学报*, 2012(5): 1052-1061.
PEI L L, GUO Y H, XU Z S, LI L C, CHEN M, MA Y Z. The research progress of stress related protein kinase in plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012(5): 1052-1061. (in Chinese)
- [7] CHEN W J, ZHU T. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(12):

- 591-596.
- [8] SAKAMOTO H, MARUYAMA K, SAKUMA Y, MESHI T, IWABUCHI M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. *Arabidopsis* Cys2/His2-type Zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology*, 2004, 136(1): 2734-2746.
- [9] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 88-94.
- [10] PAZARES J, GHOSAL D, WIENAND U, PETERSON P A, SAEDLER H. The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *EMBO Journal*, 1987, 6(12): 3553-3558.
- [11] XU D Q, HUANG J, GUO S Q, YANG X, BAO Y M, TANG H J, ZHANG H S. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene ZFP252 enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Letters*, 2008, 582(7): 1037-1043.
- [12] XU Z S, CHEN M, LI L C, MA Y Z. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(7): 570-585.
- [13] LUO X, BAI X, ZHU D, LI Y, JI W, CAI H, WU J, LIU B, ZHU Y. GsZFP1, a new Cys2/His2-type zinc-finger protein, is a positive regulator of plant tolerance to cold and drought stress. *Planta*, 2012, 235 (6): 1141-1155.
- [14] MEDINA J, BARGUES M, TEROL J, PÉREZ-ALONSO M, SALINAS J. The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology*, 1999, 119(2): 463-470.
- [15] NORDIN K, VAHALA T, PALVA E T. Differential expression of two related, low-temperature-induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Molecular Biology*, 1993, 21(2): 641-653.
- [16] WELIN B V, OLSON A, PALVA E T. Structure and organization of two closely related low-temperature-induced dhn/lea/rab-like genes in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Plant Molecular Biology*, 1995, 29(2): 391-395.
- [17] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1997, 94(3): 1035-1040.
- [18] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. A novel cisacting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 1994, 6(2): 251-264.
- [19] GILMOUR S J, SEBOLT A M, SALAZAR M P, EVERARD J D, THOMASHOW M F. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology*, 2000, 124(4): 1854-1865.
- [20] JAGLO-OTTOSEN K R, GILMOUR S J, ZARKA D G, SCHABENBERGER O, THOMASHOW M F. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, 1998, 280(5360): 104-106.
- [21] LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, ABE H, MIURA S, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1998, 10(8): 1391-1406.
- [22] NOVILLO F, ALONSO J M, ECKER J R, SALINAS J. CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2004, 101(11): 3985-3990.
- [23] CHINNUSAMY V, OHTA M, KANRAR S, LEE B H, HONG X, AGARWAL M, ZHU J K. ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 2003, 17(8): 1043-1054.
- [24] FURSOVA O V, POGORELKO G V, TARASOV V A. Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 2009, 429(1/2): 98-103.
- [25] DONG C H, PEI H. Over-expression of miR397 improves plant tolerance to cold stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Biology*, 2014, 57(4): 209-217.
- [26] MATSUI A, ISHIDA J, MOROSAWA T, OKAMOTO M, KIM J M, KURIHARA Y, KAWASHIMA M, TANAKA M, TO T K, NAKAMINAMI K, KAMINUMA E, ENDO T A, MOCHIZUKI Y, KAWAGUCHI S, KOBAYASHI N, SHINOZAKI K, TOYODA T, SEKI M. *Arabidopsis* tiling array analysis to identify the stress-responsive genes. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 639: 141-155.
- [27] XIN Z, MANDAOKAR A, CHEN J, LAST R L, BROWSE J.

- Arabidopsis* ESK1 encodes a novel regulator of freezing tolerance. *The Plant Journal*, 2007, 49(5): 786-799.
- [28] CHINNUSAMY V, ZHU J K, SUNKAR R. Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 639: 39-55.
- [29] DAVLETOVA S, SCHLAUCH K, COUTU J, MITTLER R. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2005, 139(2): 847-856.
- [30] KIM J C, LEE S H, CHEONG Y H, YOO C M, LEE S I, CHUN H J, YUN D J, HONG J C, LEE S Y, LIM C O, CHO M J. A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. *The Plant Journal*, 2001, 25(3): 247-259.
- [31] HUANG J, SUN S J, XU D Q, YANG X, BAO Y M, WANG Z F, TANG H J, ZHANG H. Increased tolerance of rice to cold, drought and oxidative stresses mediated by the overexpression of a gene that encodes the zinc finger protein ZFP245. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 389(3): 556-561.
- [32] LIU K, WANG L, XU Y, CHEN N, MA Q, LI F, CHONG K. Overexpression of *OsCOIN*, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta*, 2007, 226(4): 1007-1016.
- [33] MUKHOPADHYAY A, VIJ S, TYAGI A K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2004, 101(16): 6309-6314.
- [34] 智冠华, 史军娜, 赵晓鑫, 刘胜利, 陈玉珍, 卢存福. 转沙冬青锌指蛋白基因 *AmZFPG* 烟草非生物胁迫抗性分析. *园艺学报*, 2013, 40(4): 713-723.
- ZHI G H, SHI J N, ZHAO X X, LIU S L, CHEN Y Z, LU C F. The abiotic stress resistance analysis of Zinc-finger protein gene *AmZFPG* in tobacco. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(4): 713-723. (in Chinese)
- [35] LIU W X, ZHANG F C, ZHANG W Z, SONG L F, WU W H, CHEN Y F. *Arabidopsis* Di19 functions as a transcription factor and modulates *PR1*, *PR2*, and *PR5* expression in response to drought stress. *Molecular Plant*, 2013, 6(5): 1487-1502.
- [36] MILLA M A, TOWNSEND J, CHANG I F, CUSHMAN J C. The *Arabidopsis* *AtDi19* gene family encodes a novel type of Cys2/His2 zinc-finger protein implicated in ABA-independent dehydration, high-salinity stress and light signaling pathways. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(1/2): 13-30.
- [37] WANG L, YU C, CHEN C, HE C, ZHU Y, HUANG W. Identification of rice Di19 family reveals *OsDi19-4* involved in drought resistance. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(12): 2047-2062.
- [38] FENG Z J, CUI X Y, CUI X Y, CHEN M, YANG G X, MA Y Z, HE G Y, XU Z S. The soybean *GmDi19-5* interacts with GmLEA3.1 and increases sensitivity of transgenic plants to abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 179.
- [39] WANG L, YU C, XU S, ZHU Y, HUANG W. *OsDi19-4* acts downstream of *OsCDPK14* to positively regulate ABA response in rice. *Plant Cell Environment*, 2016, 39 (12): 2740-2753.
- [40] LI S, XU C, YANG Y, XIA G. Functional analysis of *TaDi19A*, a salt-responsive gene in wheat. *Plant Cell Environment*, 2010, 33(1): 117-129.
- [41] KELLEY L A, MEZULIS S, YATES C M, WASS M N, STERNBERG M J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845-858.
- [42] HE G H, XU J Y, WANG Y X, LIU J M, LI P S, CHEN M, MA Y Z, XU Z S. Drought-responsive WRKY transcription factor genes *TaWRKY1* and *TaWRKY33* from wheat confer drought and/or heat resistance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 2016, 16(1): 116.
- [43] 于太飞, 徐兆师, 李盼松, 陈明, 李连城, 张俊华, 马有志. 小麦蛋白激酶 TaMAPK2 互作蛋白的筛选与验证. *中国农业科学*, 2014, 47(13): 2494-2503.
- YU T F, XU Z S, LI P S, CHEN M, LI L C, ZHANG J H, MA Y Z. Screening and identification of proteins interacting with TaMAPK2 in wheat. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(13): 2494-2503. (in Chinese)
- [44] 张艳, 杨传平. 金属硫蛋白的研究进展. *分子植物育种*, 2006(S1): 73-78.
- ZHANG Y, YANG C P. The research progress of metallothionein. *Molecular Plant Breeding*, 2006(S1): 73-78. (in Chinese)
- [45] 丁安琪, 冯莹, 朱里莹, 徐世荣, 秦军, 潘东明. 水仙温度诱导脂质运载蛋白基因 *NiTIL* 的克隆与表达分析. *园艺学报*, 2016, 43(1): 161-167.
- DING A Q, FENG Y, ZHU L Y, XU S R, QIN J, PAN D M. Cloning and expressional analysis of narcissus temperature stress-induced lipocalin gene *NiTIL*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43(1): 161-167. (in Chinese)
- [46] 栗振义, 龙瑞才, 张铁军, 杨青川, 康俊梅. 植物热激蛋白研究进展. *生物技术通报*, 2016(2): 7-13.
- LI Z Y, LONG R C, ZHANG T J, YANG Q C, KANG J M. The research progress of plant heat shock proteins. *Biotechnology Bulletin*, 2016(2): 7-13. (in Chinese)

- [47] 齐妍, 徐兆师, 李盼松, 陈明, 李连城, 马有志. 植物热激蛋白 70 的分子作用机理及其利用研究进展. 植物遗传资源学报, 2013(3): 507-511.
QI Y, XU Z S, LI P S, CHEN M, LI L C, MA Y Z. The molecular mechanism and research progress of plant heat shock protein 70. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013(3): 507-511. (in Chinese)
- [48] 杨玉珍, 雷志华, 彭方仁. 低温诱导蛋白及其与植物的耐寒性研究进展. 西北植物学报, 2007(2): 421-428.
YANG Y Z, LEI Z H, PENG F R. The research progress of low temperature induced protein and cold tolerance in plants. *Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica*, 2007(2): 421-428. (in Chinese)
- [49] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(2): 221-227.
- [50] KANG X, CHONG J, NI M. HYPERSENSITIVE TO RED AND BLUE 1, a ZZ-type zinc finger protein, regulates phytochrome B-mediated red and cryptochrome-mediated blue light responses. *The Plant Cell*, 2005, 17(3): 822-835.
- [51] MILLA M A R, TOWNSEND J, CHANG I F, CUSHMAN J C. The *Arabidopsis AtDi19* gene family encodes a novel type of Cys2/His2 Zinc-finger protein implicated in ABA-independent dehydration, high-salinity stress and light signaling pathways. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(1/2): 13-30.
- [52] FAN Y, ZHANG S, MENG Y, HUANG Z. Increase in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* by *TaDi19*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 35(1): 163-171.
- [53] TIMPERIO A M, EGIDI M G, ZOLLA L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, 2008, 71(4): 391-411.
- [54] WANG W, VINOCCUR B, SHOSEYOV O, ALTMAN A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(5): 244-252.
- [55] ABO-OGIALA A, CARSEJENS C, DIEKMANN H, FAYYAZ P, HERRFURTH C, FEUSSNER I, POLLE A. Temperature-induced lipocalin (TIL) is translocated under salt stress and protects chloroplasts from ion toxicity. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(3/4): 250-259.
- [56] CHARRON J B, OUELLET F, PELLETIER M, DANYLUK J, CHAUVE C, SARHAN F. Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. *Plant Physiology*, 2005, 139(4): 2017-2028.
- [57] HE X, SAMBE M A, ZHUO C, TU Q, GUO Z. A temperature induced lipocalin gene from *Medicago falcata* (*MfTIL1*) confers tolerance to cold and oxidative stress. *Plant Molecular Biology*, 2015, 87(6): 645-654.
- [58] CHARRON J B, OUELLET F, HOUDE M, SARHAN F. The plant apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biology*, 2008, 8: 86-98.

(责任编辑 李莉)