

广西植物

Guihaia

ISSN 1000-3142, CN 45-1134/Q

《广西植物》网络首发论文

题目: 星油藤细胞分裂素反应调节子基因 PvoRR22 克隆及表达分析
作者: 陈玮玥, 付乾堂
网络首发日期: 2025-01-14
引用格式: 陈玮玥, 付乾堂. 星油藤细胞分裂素反应调节子基因 PvoRR22 克隆及表达分析[J/OL]. 广西植物. <https://link.cnki.net/urlid/45.1134.Q.20250113.1410.002>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

DOI:10.11931/guihaia.gxzw202409010

星油藤细胞分裂素反应调节子基因 *PvoRR22* 克隆及表达分析

陈玮玥^{1,2}, 付乾堂^{1*}

(1. 中国科学院西双版纳热带植物园, 热带植物资源可持续利用重点实验室, 昆明 650223;
2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 细胞分裂素反应调节子 (RRs) 是细胞分裂素信号转导通路上的重要组分, 其中 RR22 是 C 型反应调节因子。基于星油藤基因组和转录组数据库, 该文克隆了 *PvoRR22* 基因, 并对其生物信息学以及不同组织部位和 6-BA 处理花序芽中的表达模式进行了分析。结果表明: (1) *PvoRR22* 编码含 170 个氨基酸的蛋白。*PvoRR22* 蛋白分子量为 18.65 kDa, 理论等电点为 4.54, 且为亲水性蛋白, 定位于细胞核。(2) 系统进化分析表明星油藤 *PvoRR22* 与蓖麻和南欧大戟来源的 RR22 关系较近。(3) *PvoRR22* 启动子序列含有大量光响应、节律与逆境胁迫响应、以及脱落酸、生长素和茉莉酸等激素响应元件。(4) PlantRegMap 分析发现 *PvoRR22* 的表达可能受 MYB 和 ERF 转录因子家族的调控。(5) *PvoRR22* 主要在星油藤的根、茎和茎尖中表达, 其中在根中的表达最高; 在 6-BA 处理的花序芽中, *PvoRR22* 的表达量在 12 h 时达到最高。综上推测, *PvoRR22* 可能在星油藤根、茎和茎尖的生长发育以及细胞分裂素信号转导方面发挥功能。

关键词: 星油藤, 细胞分裂素反应调节子, *PvoRR22*, 响应元件, 表达模式

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A

Cloning and expression analysis of cytokinin response regulator *PvoRR22* in *Plukenetia volubilis*

CHEN Weiyue^{1,2}, FU Qiantang^{1*}

(1. CAS Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Cytokinin response regulators (RRs) are key components of cytokinin signal transduction pathways, and RR22 belongs to type-C RR subfamily. *PvoRR22* was cloned based on the *Plukenetia volubilis* genome and transcriptome database, and its bioinformatics and expression patterns were analyzed in this study. The results were as follows: (1) *PvoRR22* encoded a protein of 170 amino acids with a calculated molecular mass of 18.65 kDa and a theoretical isoelectric point of 4.54. *PvoRR22* was characterized as a hydrophilic protein and localized in the nucleus. (2) Phylogenetic analysis revealed the closest evolutionary relationship of *PvoRR22* was the homologs from *Ricinus communis* and *Euphorbia peplus*. (3) Analysis of the *PvoRR22* promoter sequences revealed *cis*-acting elements that responded to light, a circadian rhythm, abiotic stresses, and hormones, including abscisic acid, auxin, and jasmonic acid. (4) PlantRegMap analysis revealed that *PvoRR22* might be primarily regulated by the transcription factors of MYB and ERF family. (5) *PvoRR22* was

基金项目: 国家自然科学基金 (32071739); 中国科学院先导专项 (XDA24030502)。

第一作者: 陈玮玥 (2000—), 硕士, 研究方向为基因工程, (E-mail) chenweiyue@xtbg.ac.cn。

***通信作者:** 付乾堂, 博士, 副研究员, 研究方向为星油藤花性别发育及良种培育, (E-mail) fuqiantang@xtbg.ac.cn。

principally expressed in the roots, stems, and stem apices of *P. volubilis*, with the highest expression levels in the roots. The expression levels of *PvoRR22* peaked at 12 h in inflorescence buds after 6-BA treatment. In conclusion, *PvoRR22* may play an important role in the growth and development of the roots, stems, and stem apices in *P. volubilis*, as well as in cytokinin signal transduction. This study provided valuable information for further research on the function of *PvoRR22*.

Key words: *Plukenetia volubilis*, cytokinin response regulators, *PvoRR22*, response elements, expression patterns

星油藤 (*Plukenetia volubilis*)，又名印加果、南美油藤，为大戟科 (Euphorbiaceae) 多年生木质藤本油料植物，原产于南美洲亚马逊地区的热带雨林 (Goyal et al., 2022)。星油藤种子富含油脂和蛋白质，极具营养价值 (Torres Sánchez et al., 2023)，尤其是其油脂中的亚油酸 (ω -6) 和亚麻酸 (ω -3) 含量分别达到了 34% 和 51%，在食品、医药制药、化妆品等领域具有潜在的应用前景 (Mhd Rodzi & Lee, 2022; Norhazlindah et al., 2023)。星油藤于 2006 年从南美洲引入中国科学院西双版纳热带植物园并获得成功，目前已在我国的云南、贵州、广西和海南，以及在老挝、泰国和缅甸等国家推广种植 (裴行杰等, 2024; 张佳林等, 2024)。在星油藤种植推广过程中发现其种子产量较低，一定程度上限制了其产业化发展。星油藤为雌雄同株异花植物，有 50~100 朵雄花位于总状花序的中上部，仅有 1~2 朵雌花着生于花序的基部 (Gillespie, 1993)，雌雄花比例偏低或许是限制其种子产量的原因之一。Fu 等 (2014) 发现外源喷施人工合成细胞分裂素 (6-BA) 可以诱导星油藤花序上的雄花芽转变为雌花芽，并且诱导的部分雌花芽可正常开花结果，进而提高了星油藤种子产量。

细胞分裂素是一种重要的植物激素，不仅调控着植物的生长发育 (Argyros et al., 2008; Schaller et al., 2014; Joseph et al., 2018; 徐梦璇等, 2020)，还在植物胁迫反应中发挥着重要作用 (Cortleven et al., 2019)。细胞分裂素的信号转导主要依靠连续磷酸化的双组分信号转导系统 (Cheung & Hendrickson, 2010)。细胞分裂素反应调节子 (response regulators, RRs) 作为细胞分裂素信号通路上的重要组分，参与调控细胞分裂和分化、茎尖分生组织和心皮发育以及花性别分化 (Cucinotta et al., 2016; Wang et al., 2017; Rong et al., 2018; Müller et al., 2020; Xue et al., 2020)。在拟南芥中共鉴定出 23 个 ARR (Arabidopsis response regulators) 成员，根据其蛋白结构划分为 A、B 和 C 3 种类型 (D'Agostino et al., 2000)。A 型 ARR 具有保守的磷酸接收 (Receiver, REC) 结构域和较短的 C 末端 (Rashotte et al., 2003)。B 型 ARR 比 A 型多一个可以结合 DNA 的 GARP (Golden2, ARR-B, Psr1) 结构域，可作为转录因子发挥作用 (Hosoda et al., 2002; Ishida et al., 2008)，C 型 ARR 在结构上与 A 型类似，但在功能上存在差异 (Kiba et al., 2004)。

目前，关于 C 型 RRs 研究主要集中在 RR22。研究表明，拟南芥 ARR22 通过参与组氨酸 (His) 至天冬氨酸 (Asp) 的磷酸化传递途径而调节细胞分裂素信号转导，在拟南芥中过表达 ARR22 可削弱转基因植株中的细胞分裂素信号，进而导致转基因植株的矮小和根系发育不良 (Kiba et al., 2004)。此外，ARR22 也可作为双组分磷酸转导系统的抑制因子阻碍 B 型 ARR 的激活 (Wallmeroth et al., 2019)。Kang 等 (2012) 发现 ARR22 可以响应干旱胁迫且其表达部分依赖于细胞分裂素受体 AHK2 和 AHK3。Akagi 等 (2018) 在猕猴桃中发现的 C 型 RR22 的同源基因 *SyGI* 位于 Y 染色体特异性区域，可以抑制雌花的形成，被认为是猕猴桃雄性性别决定基因。廖礼昱 (2023) 发现油桐 *VjRR22* 在油桐雌、雄花发育的早期发挥作用，并且其在

外源 6-BA 处理后的 3 h 和 12 h 表达量显著上调并在 12 h 达到峰值, 通过构建 *VjRR22* 过表达载体并转化拟南芥和烟草, 外源 6-BA 处理转基因植株后发现其花发育异常, 种子数量减少。因此, *RR22* 具有重要的生物学功能且在不同物种中呈现功能的多样性, 那么星油藤中的 *RR22* 在星油藤的生长发育过程中发挥着怎样的功能值得进一步研究。本研究首先通过对星油藤基因组和转录组数据库进行检索, 获得 *ARR22* 的同源基因并命名为 *PvoRR22*, 然后对其进行基因克隆、生物信息学分析、亚细胞定位、启动子序列分析、启动子序列可能被结合的转录因子预测以及在不同组织部位和 6-BA 处理的花序芽中的表达分析, 初步了解 *PvoRR22* 可能参与星油藤生长发育调控的方面和是否响应细胞分裂素处理, 为后续其基因功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和处理

以种植在云南省勐腊县中国科学院西双版纳热带植物园星油藤基地的星油藤植株为实验材料, 分别采集其根、茎、茎尖、叶片、花序和幼果组织; 参照 Fu 等 (2014) 6-BA 处理花序芽的方法, 采用 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 处理生长在星油藤嫩茎枝上长约 0.5 cm 的花序芽, 分别于处理后 0、2、4、8、12、24、36、48 h 采集花序芽样品, 每个样品 3 个生物学重复, 液氮速冻后贮存于 -80°C 备用。本文亚细胞定位实验所使用的烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 为本氏二倍体野生型, 种子由本实验室保存。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 EASYspin Plus 多糖多酚/复杂植物 RNA 快速提取试剂盒 (北京艾德莱生物有限公司) 提取星油藤样品总 RNA, 具体操作步骤参照说明书, 用 NanoDrop One 分光光度计 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司] 和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量和完整性, 提取的 RNA 于 -80°C 冰箱保存。使用 PrimeScriptTM RT Master Mix 反转录试剂盒 [宝日医生物技术 (北京) 有限公司], 具体操作参照说明书, 将 RNA 反转录成 cDNA。

1.3 星油藤 *PvoRR22* 基因的克隆

根据搜索获得的 *PvoRR22* 序列, 利用 Primer Premier 5 软件设计扩增 *PvoRR22* 编码序列 (coding sequence, CDS) 和荧光定量引物 (表 1)。采用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 扩增 *PvoRR22* 的 CDS (去除终止密码子), 扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行切胶回收, 利用同源重组方法构建至 pOCA30-GFP 载体, 转化大肠杆菌 DH-5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆提取质粒送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.4 *PvoRR22* 的生物信息学分析

利用 Expasy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *PvoRR22* 的理化性质, 利用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 预测 *PvoRR22* 蛋白的亲疏水性, 利用 SOPMA (<https://npsa.lyon.inserm.fr>) 预测 *PvoRR22* 蛋白的二级结构。不同植物的蛋白同源性分析相关序列来源于 NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), 用 DNAMAN 软件进行序列比对, 利用 MEGA 7.0 软件的邻接法 (N-J 法) 构建系统进化树。

1.5 *PvoRR22* 的亚细胞定位

利用 Plant-mPlo (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi>) 预测 *PvoRR22* 的亚细胞定位。将构建好的质粒 35S::*PvoRR22*-GFP 转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 挑取阳性菌落 PCR 鉴定后, 扩大培养至菌液 $\text{OD}_{600} = 1.0$, 收集菌体, 加入 10 mL 烟草注射液 [$10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES

(pH5.7), 10 mmol·L⁻¹ MgCl₂], 悬浮沉淀, 加入终浓度为 150 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮溶液, 混合均匀, 室温静止 30 min, 用注射器吸取菌液注射烟草叶片, 于黑暗湿润环境中培养 48 h, 取叶片 DAPI 染色后, 采用激光共聚焦显微镜观察细胞核和绿色荧光。

1.6 *PvoRR22* 的启动子序列分析及上游转录因子预测

在星油藤本地基因组数据库中 (数据未发表), 提取 *PvoRR22* 基因起始密码子 ATG 上游 1 500 bp 的启动子序列, 在 PlantCARE 在线网站上进行分析。利用 PlantRegMap 预测可能结合 *PvoRR22* 启动子序列的转录因子。

1.7 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

以星油藤不同组织和 6-BA 处理花序芽的 cDNA 为模板, 采用 RT-qPCR 技术分析 *PvoRR22* 基因的相对表达量, 以 *PvoGAPDH* 作为内参基因, 每个样品 3 个技术重复。所用仪器为 Roche Light Cycler 480, 反应体系 (20 μL): 2×NovoStart®SYBR qPCR SuperMix Plus 10 μL, RNAase free H₂O 7 μL, Primer F 1 μL, Primer R 1 μL, cDNA 1 μL。反应程序: 95℃ 3 min, 95℃ 3 s, 65℃ 15 s, 72℃ 15 s, 40 个循环。实验结果采用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算。

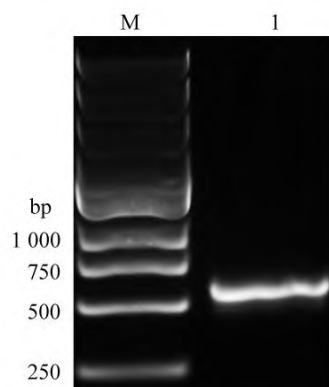
表 1 该文使用的引物
Table 1 The primers used in this paper

用途	引物名称	引物序列 (5'-3')
Usage	Primer name	Primer sequence (5'-3')
构建 35S:: <i>PvoRR22</i> -GFP 载体 Construction of 35S:: <i>PvoRR22</i> -GFP	<i>PvoRR22</i> GFP-F	TTTCTTCGGAGCTTTTCGCGAGCTCATG
		ACTATGAGTTCAGAGAGTTCAA
	<i>PvoRR22</i> GFP-R	TCGCCCTTGCTCACCATGGTTCTAGAATA ATAGCTGTTGCTGCCACAG
实时荧光定量 RT-qPCR	<i>PvoRR22</i> -F	ATTTCAGTGTGCTTGTGGTGG
	<i>PvoRR22</i> -R	GCCAAATGAACATCTGCC
	<i>PvoGAPDH</i> -F	TGGCAAGCATATTCAGGCAGGAG
	<i>PvoGAPDH</i> -R	TTGGCTCATCAGGATTGTAGGTATCAG

2 结果与分析

2.1 *PvoRR22* 的基因克隆

以拟南芥 ARR22 的蛋白序列 (<https://www.arabidopsis.org/>) 为参照, 通过对星油藤本地基因组数据库比对分析, 筛选获得 xingyouteng_10014312 的序列信息, 并命名 *PvoRR22*。利用 *PvoRR22* CDS 特异引物, 经 PCR 扩增后, 获得一条 500 bp 左右的特异条带 (图 1), 与数据库中 513 bp *PvoRR22* CDS 长度一致; 对扩增产物进行胶回收, 利用同源重组法连接至 pOCA30-GFP 载体, 阳性克隆测序结果表明, 获得的序列与原序列一致。



M. Marker 5 000; 1. PCR 扩增产物。

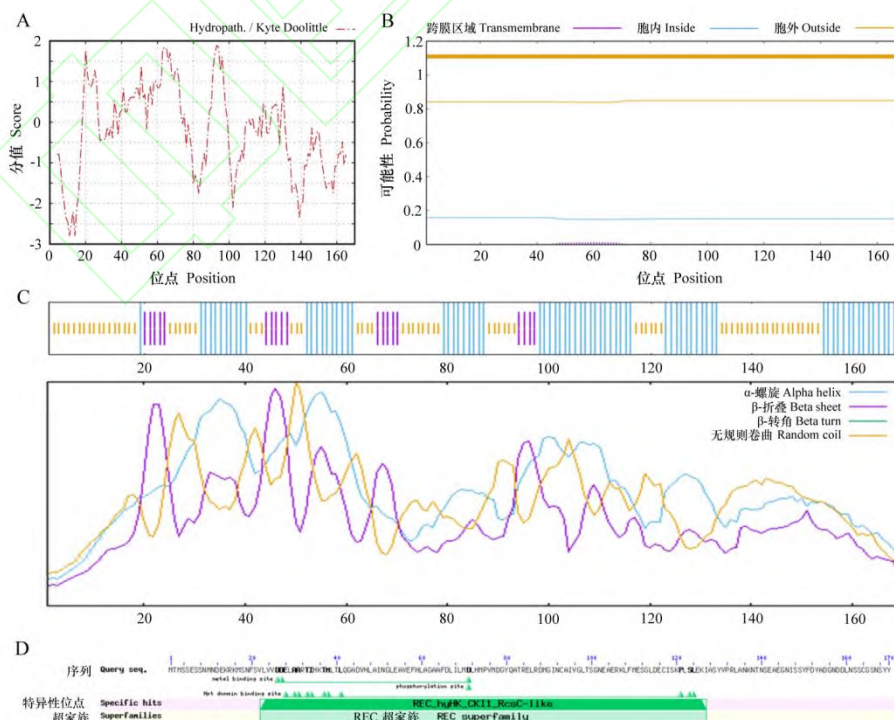
M. Marker 5 000; 1. PCR-amplified product.

图 1 *PvoRR22* 基因 CDS PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR-amplified product of *PvoRR22* CDS

2.2 *PvoRR22* 的生物信息学分析

PvoRR22 的 CDS 为 513 bp，编码 170 个氨基酸，蛋白分子量为 18.65 kDa，理论等电点为 4.54，含有 26 个带负电氨基酸，13 个带正电氨基酸，不稳定系数为 39.46，蛋白结构相对稳定。*PvoRR22* 蛋白序列中第 93 位半胱氨酸 (Cys) 处具有亲水性最大值，为 1.89，第 11 位天冬氨酸 (Asp) 和第 14 位赖氨酸 (Lys) 处具有亲水性最小值，为 -2.80，亲水性平均值为 -0.24，为亲水性蛋白 (图 2: A)。跨膜结构域分析结果表明该蛋白无跨膜结构域，不属于跨膜蛋白 (图 2: B)。蛋白质二级结构预测结果显示 *PvoRR22* 蛋白是由 44.71% 的 α -螺旋、44.21% 的无规则卷曲和 11.18% 的 β -转角构成 (图 2: C)。利用 NCBI 的 Conserved Domain Database 分析 *PvoRR22* 的蛋白序列的保守结构域，结果显示该蛋白含有 REC 结构域 (图 2: D)，表明 *PvoRR22* 属于 RRs 基因家族。



A. PvoRR22 蛋白的亲水性预测; B. PvoRR22 蛋白的跨膜结构域预测; C. PvoRR22 蛋白的二级结构预测; D. PvoRR22 的保守结构域预测。

A. Hydrophilic and hydrophobic analysis of PvoRR22; B. Prediction of the transmembrane domain of PvoRR22; C. Prediction of the secondary structure of PvoRR22; D. Prediction of the conserved domain of PvoRR22.

图 2 PvoRR22 生物信息学分析

Fig. 2 Bioinformatics analysis of PvoRR22

从 NCBI 数据库中下载拟南芥、葡萄、蓖麻等 16 种植物的 RR22 蛋白序列, 并利用 MEGA 7.0 软件的邻接法 (N-J 法) 构建星油藤和其他物种的 RR22 的系统进化树, 结果表明星油藤 PvoRR22 与同为大戟科的蓖麻亲缘关系最近, 与南欧大戟次之, 与其他物种的亲缘关系则相对较远 (图 3)。

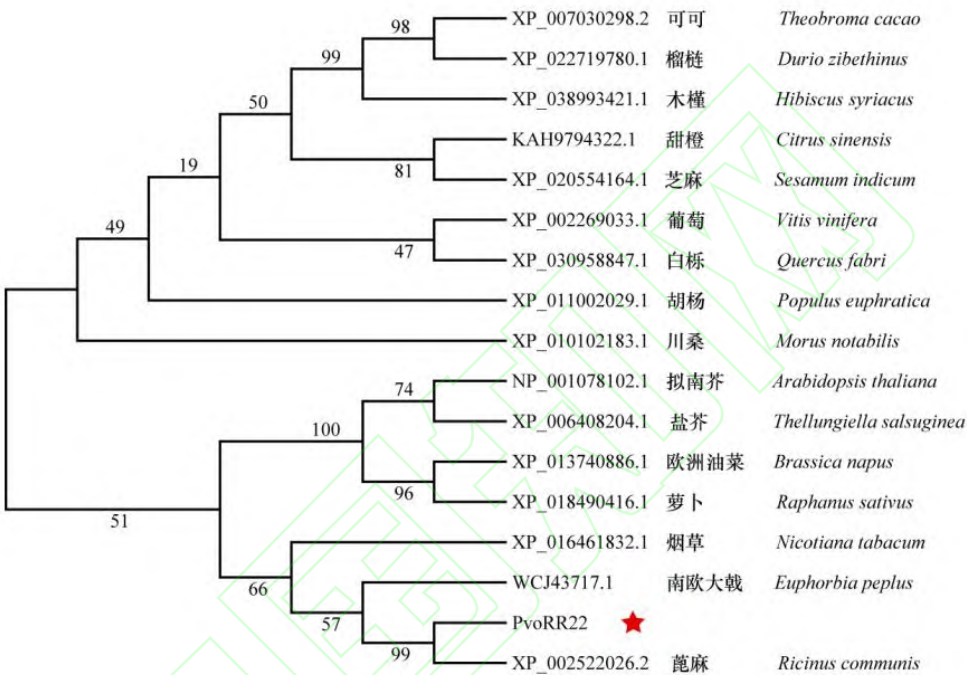


图 3 PvoRR22 与其他物种同源蛋白系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of PvoRR22 and homologous proteins of other species

2.3 PvoRR22 的启动子分析

PlantCARE 分析结果显示, PvoRR22 启动子区含有 8 种光响应元件, 如 LAMP-element、G-box、GATA-motif、Sp1、Box 4、GT1-motif、GA-motif 和 Gap-box (表 2), 说明 PvoRR22 极可能参与光信号途径, 进而调节星油藤的生长发育。同时, 还发现一些节律与逆境胁迫响应元件, 表明 PvoRR22 可能参与节律调节以及干旱低温等逆境胁迫反应过程。此外, 还发现一些激素响应元件, 如脱落酸响应元件 ABRE、生长素响应元件 TGA-element 和茉莉酸响应元件 TGACG-motif, 表明 PvoRR22 的表达可能受到脱落酸、生长素和茉莉酸等植物激素的调控。

表 2 PvoRR22 启动子区的顺式作用元件及功能

Table 2 The cis-acting elements and functions of PvoRR22 promoter

顺式作用元件	功能
Cis-acting element	Function
Circadian	昼夜节律调节元件 Circadian control element
MBS	干旱响应元件 Drought responsive element (MYB binding site)

LTR	低温响应元件 Low-temperature responsive element
MBSI	类黄酮生物合成响应元件 Flavonoid biosynthesis responsive element (MYB binding site)
ABRE	脱落酸响应元件 Absciscic acid responsive element
TGA-element	生长素响应元件 Auxin responsive element
TGACG-motif	茉莉酸响应元件 MeJA responsive element
CGTCA-motif	茉莉酸响应元件 MeJA responsive element
LAMP-element	光响应元件 Light responsive element
G-box	光响应元件 Light responsive element
GATA-motif	光响应元件 Light responsive element
Sp1	光响应元件 Light responsive element
Box 4	光响应元件 Light responsive element
GT1-motif	光响应元件 Light responsive element
GA-motif	光响应元件 Light responsive element
Gap-box	光响应元件 Light responsive element

2.4 结合 *PvoRR22* 的转录因子预测

利用 PlantRegMap 对 *PvoRR22* 的启动子序列进行分析预测，共有 176 个转录因子可能会结合到 *PvoRR22* 的启动子上，其中 MYB 和 ERF 转录因子家族最多，均达到 30 个以上；MIKC-MADS 和 G2-like 家族次之，分别为 26 个和 21 个；此外，HD-ZIP、GATA 和 NAC 转录因子家族数量在 11~14 之间；而其他转录因子家族数量则较少，为 1~4 个之间（图 4）。这些结果表明 *PvoRR22* 的表达可能主要受 MYB 和 ERF 转录因子家族的调控。

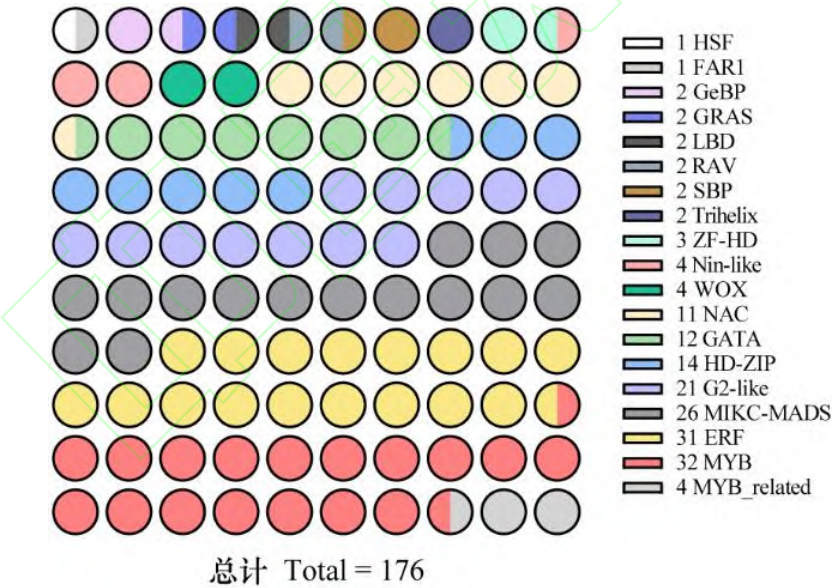


图 4 结合 *PvoRR22* 启动子的转录因子统计

Fig. 4 Analysis of transcription factors binding *PvoRR22*

2.5 *PvoRR22* 的亚细胞定位

将携带 35S::*PvoRR22*-GFP 质粒的 GV3101 菌液注射烟草叶片，然后暗培养 48 h，利用激光共聚焦显微镜进行观察。结果发现 GFP 标记的 *PvoRR22* 蛋白绿色荧光区域与 DAPI 染色呈蓝色的细胞核共定位在一起，这表明 *PvoRR22* 定位于细胞核（图 5）。

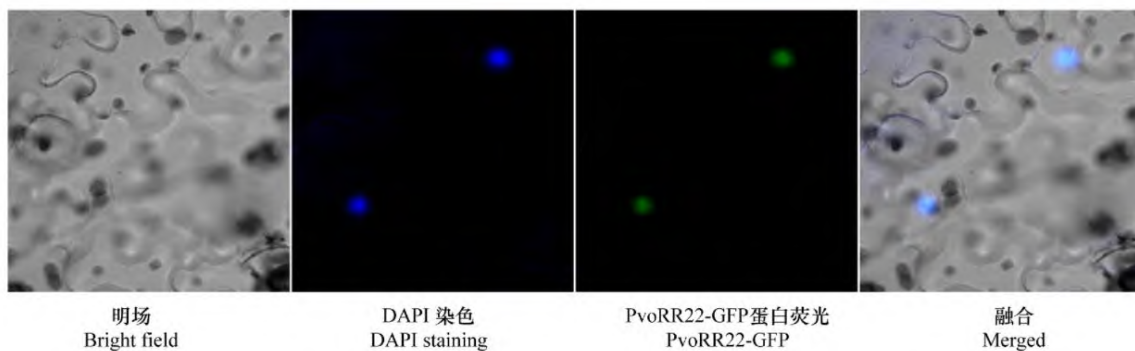
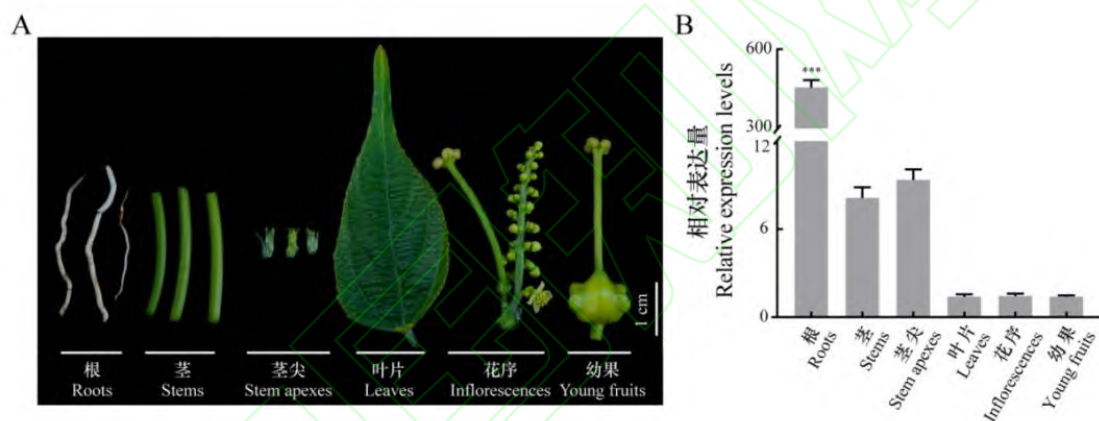


图 5 *PvoRR22* 亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular location of *PvoRR22*

2.6 *PvoRR22* 在星油藤不同组织中的表达分析

利用荧光定量 PCR 对 *PvoRR22* 在星油藤根、茎、茎尖、叶片、花序和幼果（图 6: A）中的表达量进行检测，结果发现 *PvoRR22* 在星油藤各个组织中的表达量有明显差异，其在根中的表达量最高，在茎和茎尖中也有较高的表达量，而在叶片、花序和幼果中的表达量则相对较低（图 6: B）。



A. 用于 *PvoRR22* 表达谱分析的 6 个星油藤组织；B. *PvoRR22* 在星油藤不同组织中的相对表达量。***表示与其他组织的表达相比有极显著差异 ($P < 0.001$)。

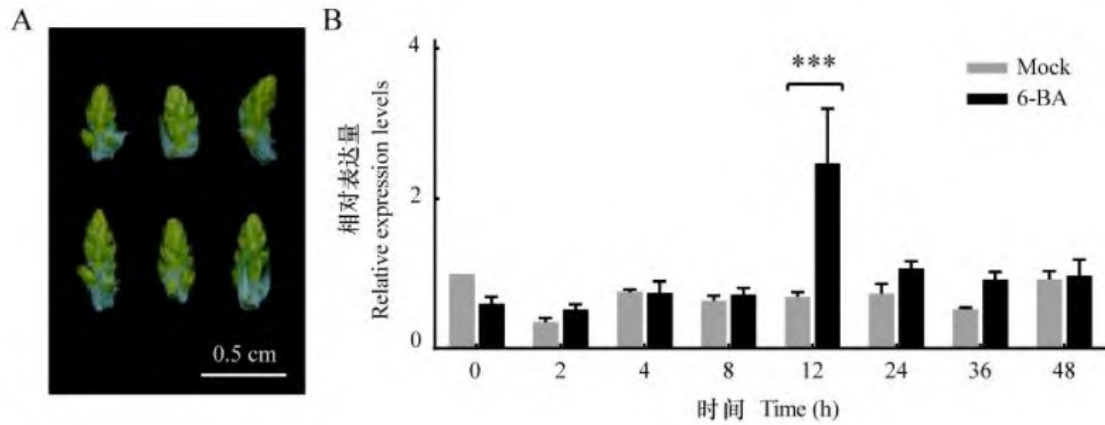
A. The six tissues of *P. volubilis* used for the analysis of *PvoRR22* expression profiles; B. The relative expression levels of *PvoRR22* in different tissues *P. volubilis*. *** indicates extremely significant differences compared to other tissues ($P < 0.001$).

图 6 *PvoRR22* 在星油藤不同组织中的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *PvoRR22* in different tissues of *Plukenetia volubilis*

2.7 *PvoRR22* 在 6-BA 处理星油藤花序芽中的表达分析

RRs 作为细胞分裂素信号转导的重要组分，参与细胞分裂素调控植物生长发育的诸多过程。为探讨 *PvoRR22* 对细胞分裂素的响应，利用荧光定量 PCR 检测分析 6-BA 处理星油藤花序芽（图 7: A）不同时间后 *PvoRR22* 的相对表达量，结果表明在 6-BA 处理 12 h 时，*PvoRR22* 表达量相比对照显著上调且表达量达到最高，随后又恢复正常表达量（图 7: B）。



A. 用于 6-BA 处理的星油藤花序芽；B. *PvoRR22* 在 6-BA 处理星油藤花序芽不同时间后的相对表达量。*** 表示与对照组的表达有极显著差异 ($P < 0.001$)。

A. Inflorescence buds of *P. volubilis* used for 6-BA treatment; B. Relative expression levels of *PvoRR22* in inflorescence buds of *P. volubilis* treated with 6-BA after different time intervals. *** indicates extremely significant differences compared to Mock ($P < 0.001$).

图 7 *PvoRR22* 在 6-BA 处理星油藤花序芽中的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *PvoRR22* in inflorescence buds of *Plukenetia volubilis* treated with 6-BA

3 讨论与结论

RRs 基因家族成员的生物学功能在包括模式植物拟南芥在内的多个物种中已有不少报道，尤其是 *RR22* 参与调控植物生长发育和花性别分化 (Akagi et al., 2018; 廖礼昱, 2023)，但星油藤中 *RR22* 基因的功能还未见报道，为探究其在星油藤生长发育和响应细胞分裂素信号转导过程中的潜在功能。本研究基于星油藤基因组信息，筛选获得了 *PvoRR22*，通过对其生物信息学和表达谱进行分析，初步明确了 *PvoRR22* 可能参与细胞分裂素调控花序芽发育的生物学过程。

PvoRR22 氨基酸序列包含 *RRs* 家族特征性 REC 结构域，但不包含可以结合 DNA 的 GARP 结构域，说明 *PvoRR22* 属于 C 型 *RRs* (Kiba et al., 2004; Ishida et al., 2008)。系统进化分析表明 *PvoRR22* 与同属于大戟科的蓖麻和南欧大戟的来源的 *RR22* 同源性最高，而与可可和榴莲来源的同源性则较远，这说明 *RR22* 蛋白的结构在演化过程中具有一定的保守性；而 *RR22* 在不同物种间的同源性差异则可能反映了它们在调控功能上的分化 (Pils & Heyl, 2009)。真核生物的转录调控主要通过顺式作用元件和反式作用因子之间的相互作用来实现 (Cui et al., 2023)。通过对 *PvoRR22* 的启动子序列进行分析，发现其含有多个光响应、逆境胁迫和生长素、茉莉酸和脱落酸响应元件。已有研究表明，A 型 *ARR4* 可以与 phytochrome B 相互作用调节红光信号转导 (Sweere et al., 2001)，也可能参与星油藤的光合作用或光信号调控。此外，干旱响应元件的发现与 Kang 等 (2012) 关于 *ARR22* 响应干旱胁迫的结果一致，说明 *PvoRR22* 可能在星油藤的逆境胁迫响应中发挥作用。Geng 等 (2022) 在小桐子 *JcRRs* 的启动子中发现了脱落酸 (ABA) 和赤霉素 (GA) 响应元件，而在 *PvoRR22* 启动子序列中发现的生长素、茉莉酸和脱落酸响应元件说明 *PvoRR22* 可能受多种激素的调控进而影响星油藤的生长发育。MYB 作为植物中最大的转录因子家族之一，广泛参与各种激素的信号转导过程以及生物和非生物胁迫反应 (Li et al., 2019)。在对可能结合 *PvoRR22* 启动子序列的转录因子进行富集分析

发现多个 MYB 家族成员, 这表明 *PvoRR22* 可能受其调控发挥相关的功能。此外, *PvoRR22* 启动子序列还富集了多个乙烯反应因子 (ERF) 家族成员。Pan 等 (2021) 发现黄瓜 *CsERF* 基因家族成员与黄瓜的雌花发育有关, 并参与黄瓜的性别决定, 这预示着 *PvoRR22* 也有可能受其调控而在星油藤花性别发育方面发挥功能。

通过将含有携带 35S 启动子驱动 *PvoRR22* 与 *GFP* 融合质粒的农杆菌注射到烟草叶片中, 我们观察到绿色荧光与细胞核的染色重叠在一起, 说明 *PvoRR22* 定位于细胞核, 推测 *PvoRR22* 可能在细胞核中发挥其功能, 这与之前的相关研究结果一致 (Powell & Heyl, 2023)。不同组织的表达谱分析发现, *PvoRR22* 在星油藤根中表达量最高, 其次是茎尖和茎中, 说明它主要影响根、茎和茎尖的生长发育, 这一结果与油桐 *VjRR22* 的表达谱类似 (廖礼昱, 2023)。虽然 *PvoRR22* 在对照花序芽中的表达量不高, 但在 6-BA 处理 12 h 后的花序芽中的表达量则显著上调, 说明 *PvoRR22* 是能响应细胞分裂素处理的, 今后可进一步明确其在 6-BA 处理的根、茎和茎尖中的表达情况, 以及不同发育阶段的雌雄花芽中的表达量, 探究其在星油藤根、茎、茎尖和雌雄花芽发育中的生物学功能。

综上所述, *PvoRR22* 作为 C 型 *RRs* 成员, 可能受多个信号的调控, 并可能在星油藤根、茎和茎尖的生长发育中发挥一定的功能; 同时, *PvoRR22* 可响应细胞分裂素处理, 也可能参与细胞分裂素调控星油藤花序芽发育的过程。这些结果为进一步研究 *PvoRR22* 的基因功能奠定基础, 此外, *PvoRR22* 能否影响星油藤雌雄花芽的性别分化也值得进一步探索。

参考文献:

- AKAGI T, HENRY IM, OHTANI H, et al., 2018. A Y-Encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit [J]. *The Plant Cell*, 30(4): 780-795.
- ARGYROS RD, MATHEWS DE, CHIANG YH, et al., 2008. Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development [J]. *The Plant Cell*, 20(8): 2102-2116.
- CHEUNG J, HENDRICKSON WA, 2010. Sensor domains of two-component regulatory systems [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 13(2): 116-123.
- CORTLEVEN A, LEUENDORF JE, FRANK M, et al., 2019. Cytokinin action in response to abiotic and biotic stresses in plants [J]. *Plant, Cell & Environment*, 42(3): 998-1018.
- CUCINOTTA M, MANRIQUE S, GUAZZOTTI A, et al., 2016. Cytokinin response factors integrate auxin and cytokinin pathways for female reproductive organ development [J]. *Development*, 143(23): 4419-4424.
- CUI Y, CAO Q, LI Y, et al., 2023. Advances in *cis*-element- and natural variation-mediated transcriptional regulation and applications in gene editing of major crops [J]. *Journal of Experimental Botany*, 74(18): 5441-5457.
- D'AGOSTINO IB, DERUÈRE J, KIEBER JJ, 2000. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin [J]. *Plant Physiology*, 124(4): 1706-1717.
- FU Q, NIU L, ZHANG Q, et al., 2014. Benzyladenine treatment promotes floral feminization and fruiting in a promising oilseed crop *Plukenetia volubilis* [J]. *Industrial Crops and Products*, 59: 295-298.
- GENG X, ZHANG C, WEI L, et al., 2022. Genome-wide identification and expression analysis of cytokinin response regulator (RR) genes in the woody plant *Jatropha curcas* and functional analysis of *JcRR12* in *Arabidopsis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19):

- GILLESPIE LJ, 1993. A synopsis of neotropical *Plukenetia* (Euphorbiaceae) including two new species [J]. Systematic Botany, 18(4): 575-592.
- GOYAL A, TANWAR B, SIHAG MK, et al., 2022. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): An emerging source of nutrients, omega-3 fatty acid and phytochemicals [J]. Food Chemistry, 373: 131459.
- HOSODA K, IMAMURA A, KATOH E, et al., 2002. Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the Arabidopsis response regulators [J]. The Plant Cell, 14(9): 2015-2029.
- ISHIDA K, YAMASHINO T, YOKOYAMA A, et al., 2008. Three Type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant and Cell Physiology, 49(1): 47-57.
- KIEBER JJ, SCHALLER, GE, 2018. Cytokinin signaling in plant development [J]. Development, 145(4): dev149344.
- KANG NY, CHO C, KIM NY, et al., 2012. Cytokinin receptor-dependent and receptor-independent pathways in the dehydration response of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Plant Physiology, 169(14): 1382-1391.
- KIBA T, AOKI K, SAKAKIBARA H, et al., 2004. *Arabidopsis* response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant [J]. Plant and Cell Physiology, 45(8): 1063-1077.
- LI X, GUO C, AHMAD S, et al., 2019. Systematic analysis of MYB family genes in potato and their multiple roles in development and stress responses [J]. Biomolecules, 9(8): 317.
- LIAO LY, 2023. Functional study of the *VjRR22* of tung tree and its interaction protein identification [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology: 6-8. [廖礼昱, 2023. 油桐 *VjRR22* 基因功能研究及其互作蛋白鉴定 [D]. 长沙: 中南林业科技大学: 6-8.]
- RODZI NARM, LEE LK, 2022. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.): recent insight on phytochemistry, pharmacology, organoleptic, safety and toxicity perspectives [J]. Heliyon, 8(9): e10572.
- MÜLLER NA, KERSTEN B, LEITE MONTALVÃO AP, et al., 2020. A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination [J]. Nature Plants, 6: 630-637.
- NORHAZLINDAH MF, JAHURUL MHA, NORLIZA M, et al., 2023. Techniques for extraction, characterization, and application of oil from sachu inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seed: a review [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 17(1): 904-915.
- PAN J, WEN H, CHEN G, et al., 2021. A positive feedback loop mediated by *CsERF31* initiates female cucumber flower development [J]. Plant Physiology, 186(2): 1088-1100.
- PEI XJ, NIU J, LIU LY, et al., 2024. Genes related to the synthesis pathway of tocopherol in Sacha Inchi [J/OL]. Molecular Plant Breeding, 1-16[2024-12-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20231019.1133.004.html>. [裴行杰, 钮俊, 刘丽岩, 等, 2024. 星油藤生育酚合成途径相关基因挖掘 [J/OL]. 分子植物育种, 1-16[2024-12-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20231019.1133.004.html>.]
- PILS B, HEYL A, 2009. Unraveling the evolution of cytokinin signaling [J]. Plant Physiology, 151(2): 782-791.
- POWELL AE, HEYL A, 2023. The origin and early evolution of cytokinin signaling [J]. Frontiers in Plant Science, 14: 1142748.
- RASHOTTE AM, CARSON SDB, TO JPC, et al., 2003. Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 132(4): 1998-2011.

- RONG XF, SANG YL, WANG L, et al., 2018. Type-B ARR_s control carpel regeneration through mediating *AGAMOUS* expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 59(4): 761-769.
- SCHALLER GE, STREET IH, KIEBER JJ, 2014. Cytokinin and the cell cycle [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 21: 7-15.
- SWEERE U, EICHENBERG K, LOHRMANN J, et al., 2001. Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling [J]. *Science*, 294(5544): 1108-1111.
- TORRES SÁNCHEZ EG, HERNÁNDEZ-LEDESMA B, GUTIÉRREZ LF, 2023. Sacha inchi oil press-cake: physicochemical characteristics, food-related applications and biological activity [J]. *Food Reviews International*, 39(1): 148-159.
- WALLMEROOTH N, JESCHKE D, SLANE D, et al., 2019. *ARR22* overexpression can suppress plant Two-Component Regulatory Systems [J]. *PLoS ONE*, 14(2): e0212056.
- WANG J, TIAN C, ZHANG C, et al., 2017. Cytokinin signaling activates *WUSCHEL* expression during axillary meristem initiation [J]. *The Plant Cell*, 29(6): 1373-1387.
- XU MX, WU L, LEI YD, et al., 2020. Cloning and expression analysis of cytokinin hydoxylase gene *PmCYP735A* in *Pinus massoniana* [J]. *Guihaia*, 40(6): 864-872. [徐梦璇, 吴玲, 类彦东, 等, 2020. 马尾松细胞分裂素羟化酶基因 *PmCYP735A* 克隆与表达分析 [J]. *广西植物*, 40(6): 864-872.]
- XUE L, WU H, CHEN Y, et al., 2020. Evidences for a role of two Y-specific genes in sex determination in *Populus deltoides* [J]. *Nature Communications*, 11(1): 5893.
- ZHANG JL, LIU CA, FU QT, 2024. Current situation and research prospect of rhizome rot and stem rot of sachal inchi (*Plukenetia volubilis*) in China [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*(4): 97-101. [张佳林, 刘长安, 付乾堂, 2024. 我国星油藤根腐病和茎腐病发生现状及研究展望 [J]. *黑龙江农业科学*(4): 97-101.]