

小麦 *TaCLC-e-3AL* 基因功能分析及互作蛋白鉴定

宋腾钊, 毛培钧[†], 杨瑞鹏, 李冰冰, 刘腾飞, 谢玉民, 李妍珂,
袁梦营, 程西永*, 许海霞*

(神农种业实验室/河南农业大学农学院 / 省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室, 河南郑州 450002)

摘要: 【目的】分析小麦氯离子通道 *TaCLC-e-3AL* 基因功能并鉴定其互作蛋白, 以解析 *TaCLC-e-3AL* 参与小麦响应低氮胁迫的作用机制。【方法】以拟南芥 *AtCLC-e* 氨基酸序列为参考序列, 通过 BlastP 对小麦基因组数据库进行比对, 获得 *TaCLC-e-3AL* (TraesCS3A02G253600)、*TaCLC-e-3B* (TraesCS3B02G285500) 和 *TaCLC-e-3DL* (TraesCS3D02G254500) 3 个基因, 分析其基因结构和系统进化关系。将 *TaCLC-e-3AL*-p1300-GFP 融合蛋白表达载体转化至小麦原生质体中, 分析 *TaCLC-e-3AL* 的亚细胞定位特征; 采用转基因拟南芥进行异源功能验证, 利用酵母双杂交筛选与 *TaCLC-e-3AL* 相互作用的蛋白。【结果】生物信息学分析表明, *TaCLC-e-3AL* 编码的蛋白含有 11 个跨膜结构域, 与乌拉尔图小麦 *TuCLC-e* 同源性最高。组织表达量预测分析表明, *TaCLC-e-3AL* 基因在小麦的叶片和茎部表达量较高。顺式作用元件分析表明, 其可能响应光、激素以及逆境胁迫等信号。亚细胞定位显示, *TaCLC-e-3AL* 蛋白经内质网分选后定位于叶绿体内。过表达 *TaCLC-e-3AL* 转基因拟南芥植株在低氮胁迫条件下可以储存更多的 NO_3^- , 并能够维持植株体内 $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ 的稳态, 不引起植株根长和鲜重的显著变化。酵母双杂交文库筛选显示 *TaCLC-e-3AL* 与水通道、叶绿体 a/b 结合蛋白和电压依赖性阴离子通道 3 个蛋白互作, 表明 *TaCLC-e-3AL* 可能与它们协同参与干旱胁迫响应、光合作用、信号传导等生物过程。【结论】小麦氯离子通道蛋白 *TaCLC-e-3AL* 位于叶绿体内。*TaCLC-e-3AL* 基因转化至拟南芥中过表达, 在低氮胁迫条件下较野生型可以在植株体内储存更多的 NO_3^- , 并维持 $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ 的值, 表明 *TaCLC-e-3AL* 可能调控 Cl^- 和 NO_3^- 的协同运输。*TaCLC-e-3AL* 通过与水通道蛋白、叶绿体 a/b 结合蛋白、电压依赖性阴离子通道蛋白互作, 参与小麦的干旱胁迫、光合作用和离子胁迫应答。

关键词: 小麦; 氯离子通道蛋白; *TaCLC-e-3AL*; 功能分析; 互作蛋白

Functional analysis of *TaCLC-e-3AL* and the identification of interacting proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.)

SONG Teng-zhao, MAO Pei-jun[†], YANG Rui-peng, LI Bing-bing, LIU Teng-fei, XIE Yu-min, LI Yan-ke,
YUAN Meng-ying, CHENG Xi-yong*, XU Hai-xia*

(The Shennong Laboratory/ College of Agronomy, Henan Agricultural University / National Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, Zhengzhou, Henan 450046, China)

Abstract: 【Objectives】This study aimed to elucidate the mechanism of *TaCLC-e-3AL* involvement in response to low nitrogen stress by analyzing the function and identifying the interacted proteins of *TaCLC-e-3AL*.

【Methods】The amino acid sequence of *Arabidopsis thaliana* *AtCLC-e* was used as a reference sequence, and three genes, *TaCLC-e-3AL* (TraesCS3A02G253600), *TaCLC-e-3B* (TraesCS3B02G285500) and *TaCLC-e-3DL* (TraesCS3D02G254500), were obtained from wheat genome database by BlastP, and their structures and phylogenetic relationships were then analyzed. The *TaCLC-e-3AL*-p1300-GFP fusion was transformed into wheat protoplasts to analysis the subcellular localization characteristics of *TaCLC-e-3AL*. Transgenic *Arabidopsis*

收稿日期: 2023-11-22 接受日期: 2024-03-25

基金项目: 神农种业实验室一流课题项目 (SN01-2022-01); 河南省重大科技专项 (221100110300); 河南省重点研发专项 (231111110700)。

联系方式: 宋腾钊 E-mail: songtengzhao56@163.com; [†]共同第一作者 毛培钧 E-mail: mpj645873439@163.com

* 通信作者 程西永 E-mail: xyc634@163.com; 许海霞 E-mail: hauxhx@163.com

thaliana experiments were employed to determine the function of *TaCLC-e-3AL*. The interactors of *TaCLC-e-3AL* were identified by yeast two-hybrid system screening. 【 **Results** 】 The *TaCLC-e-3AL* gene was cloned from wheat, and bioinformatics analysis indicated that the encoded protein of *TaCLC-e-3AL* gene contained 11 transmembrane domains, and showed the highest homology with *TuCLC-e* in *Triticum urartu*. *TaCLC-e-3AL* gene was highly expressed in leaves and stems of wheat, and several light, hormone and stress response elements were detected in its promoter region using the method of cis-acting elements analysis. Subcellular localization in protoplasts showed that *TaCLC-e-3AL* was mainly expressed in chloroplasts. When *TaCLC-e-3AL* was overexpressed in *Arabidopsis thaliana* under low nitrogen condition, the transgenic plants stored more NO_3^- and maintained stable $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ homeostasis, the root length and fresh weight were not impacted significantly. The screening results of the yeast two-hybrid system showed that *TaCLC-e-3AL* interacted with aquaporin, voltage-dependent anion channel and other proteins, indicating the possible involvement of *TaCLC-e-3AL* in drought stress response, photosynthesis, signal transduction and other biological processes. 【 **Conclusions** 】 The wheat chloride ion channel protein *TaCLC-e-3AL* is located in the chloroplasts. The overexpression of *TaCLC-e-3AL* in *Arabidopsis thaliana* could raise NO_3^- -N storage and thereby keep the normal $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ homeostasis in plants under low nitrogen stress, so the *TaCLC-e-3AL* is thought regulating the synergistic transport of Cl^- and NO_3^- . Through interaction with aquaporin, voltage-dependent anion channel and other proteins, *TaCLC-e-3AL* participates in response to drought stress, photosynthesis, and ion stress in wheat.

Key words: wheat; low nitrogen stress; *TaCLC-e-3AL*; functional analysis; interaction proteins

氮素作为植物生长发育必需的大量元素之一，参与了蛋白质、核酸、磷脂等重要有机分子的合成^[1]。植物可吸收利用的氮素主要为硝态氮和铵态氮，硝态氮是植株吸收利用的主要氮素形态，铵态氮只有在水淹地或还原性强的土壤中才可能成为主要氮素营养来源^[2]。作为中国三大粮食作物之一的小麦 (*Triticum aestivum* L.)，其吸收利用氮源的形态主要是硝态氮，硝态氮能够促进小麦根系生长、增强抗逆性、提高产量和改善品质^[3]。植物吸收硝态氮主要依靠 4 类 NO_3^- 转运蛋白：低亲和硝态氮转运蛋白 (low affinity nitrate transporter, NRT1)、高亲和硝态氮转运蛋白 (high affinity nitrate transporter, NRT2)、氯离子通道蛋白 (chloride channel protein, CLC)、慢阴离子通道相关同系物 (slow anion channel related homologue SLAC1/SLAH)^[4]。

CLC 基因广泛存在于各种古菌、微生物真菌、动物和植物中。1996 年，首次在烟草^[5]和拟南芥^[6]中发现植物 CLC 基因，随后发现该家族基因也存在于水稻^[7]、玉米^[8]、大豆^[9]、小麦^[10]和棉花^[11]等物种中。大部分 CLC 蛋白结构特征为含有一个高度保守的电压门控氯离子通道 (voltage-gate CLC) 结构域和两个保守的胱硫醚 β 合成酶 (CBS) 结构域^[12]。植物 CLC 家族基因除了行使氮素吸收转运功能外，其在维持细胞内外渗透压、体内离子动态平衡、气孔运动、增强植物抗旱性和耐盐性等方面也发挥着重要

作用。植物中 CLC 基因家族可以分为 2 个亚类 (I、II)，7 个簇，其中亚类 I 包含 5 个簇 (-a、-b、-c、-d、-g)，亚类 II 包含 2 个簇 (-e、-f)。亚类 I 的研究较为广泛，AtCLC-a、AtCLC-b 参与液泡中 NO_3^- 的积累，AtCLC-c 能转运 Cl^- 并增强植株耐盐性^[12-14]。玉米 ZmCLC-a 定位于细胞膜上，能使转基因拟南芥积累更多的硝酸盐^[15]。大豆 GsCLC-c2 通过调节阴离子稳态提高转基因拟南芥和大豆的耐盐性^[16]。棉花 GhCLC-g1 可以调节植株体内离子含量，增强植株耐盐性^[17]。亚类 II 中的 AtCLC-e 能够维持拟南芥细胞内膜的硝酸盐稳态，且与 AtCLC-a 基因存在相关性^[18]；AtCLC-e 可以维持拟南芥体内 Cl^- 稳态，影响叶绿体的超微结构和调节光合电子的传输^[19]；茶树 CsCLC-e 参与了阴离子 Cl^- 和 F^- 的反应过程^[20]；过表达苹果 *MhCLC-e2* 能够增强愈伤组织对缺氮胁迫的耐受性^[21]。

目前氯离子转运蛋白 CLC 仅在模式植物拟南芥和水稻中进行了较为系统的研究，小麦 *TaCLC* 家族的研究主要集中于基因家族的初步分析^[10]，家族成员的克隆和具体功能解析鲜有报道。本研究通过同源比对获得 3 个 *TaCLC-e* 同源基因，利用小麦原生质体转化、转基因拟南芥和酵母双杂交技术对 *TaCLC-e-3AL* 的亚细胞定位、基因功能以及互作机制进行了初步解析，以为小麦氮素吸收利用提供基因资源和理解氮素调控的分子生物学机制提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料及培养条件

1.1.1 小麦 (*Triticum aestivum* L.) 种子处理及培养

以河南农业大学小麦育种研究室选育的小麦品种‘豫农 804’为材料, 挑选籽粒饱满均匀一致的种子, 用 10% H₂O₂ 消毒种子 5 min, ddH₂O 冲洗 5~6 次, 浸泡过夜。次日将小麦均匀撒播在营养土中, 培养环境光/暗周期为 16 h/8 h; 昼夜温度为 22 °C/18 °C; 相对湿度 70%。在培养箱中培养 7~14 天。

1.1.2 拟南芥培养 哥伦比亚生态型 (*Columbia-0*) 拟南芥种子, 用 70% (v/v) 酒精表面灭菌 7 min, 0.1% (v/v) NaClO 灭菌 5 min, 用 ddH₂O 洗涤后铺于 MS 固体培养基上, 4 °C 黑暗条件下放置 3 天以使种子同步萌发; 竖直放置培养皿于 22 °C、光周期为 16 h/8 h (光/暗) 的培养箱中培养。

1.1.3 试验所用载体 亚细胞定位表达载体 p-super1300-GFP (p1300-GFP)、植物表达载体 pCambia1300 (p1300)、酵母双杂交载体 pGBKT7 (BD) 和 pGADT7 (AD), 试验中酵母菌株为 Y2Hgold, 大肠杆菌菌株为 DH5 α 。酵母文库委托上海欧易生物医学科技有限公司构建。

1.2 *TaCLC-e* 基因生物信息学分析

以拟南芥 AtCLC-e(AT4G35440) 的氨基酸序列为参考, 通过 BlastP 检索小麦全基因组数据库 (http://ftp.ensemblgenomes.org/pub/plants/release-54/fasta/triticum_aestivum/), 获得小麦 *TaCLC-e* 基因序列及基本信息 (E-value < 1E⁻⁵)。利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线工具 CDD search 检测完整结构域, 设置为默认参数。通过在线工具 Exon-Intron Graphic Maker (<http://www.wormweb.org/exonintron>) 对 *TaCLC-e* 3 个同源基因的基因结构及保守结构域进行可视化分析。使用 Wolfpsort (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 对 3 个同源基因编码蛋白表达的亚细胞定位进行预测。

结合文献^[10]和基因结构, 挑选 *TaCLC-e-3AL* 进一步分析。利用 NCBI 选取乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu*)、二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、野生稻 (*Oryza brachyantha*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、小米 (*Setaria italica*)、高粱 (*Sorghum bicolor*)、凤梨 (*Ananas comosus*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、

番茄 (*Solanum lycopersicum*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 的 13 个与 *TaCLC-e-3AL* 同源性较高的氨基酸序列, 通过 Cluster W 进行氨基酸序列比对, 使用 MEGA 7.0 软件^[22]采取 NJ 法 (neighbor-joining) 构建系统发育进化树 (Bootstrap 参数为 1000); 使用 Protter 在线工具^[23] (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) 和 CDD search 对 *TaCLC-e-3AL* 同源蛋白序列进行跨膜结构和保守结构域分析; 通过 WheatOmics 1.0^[24] (<http://202.194.139.32/expression/wheat.html>) 对 *TaCLC-e-3AL* 在小麦不同组织和不同发育时期中的表达量进行预测, 利用 TBtools 软件进行可视化分析; 利用 PlantCare 在线工具^[25] (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对 *TaCLC-e-3AL* 的启动子 (起始密码子前 2000 bp) 顺式作用元件进行统计分析。

1.3 RNA 的提取、cDNA 的反转录和 qRT-PCR 分析

采用 Trizol (Invotrigen, 美国) 试剂从小麦幼苗和转基因拟南芥中分别提取总 RNA, 使用核酸蛋白测定仪 Nanodrop 对提取的总 RNA 浓度进行检测, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 质量。利用 Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (翌圣生物, 中国) 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。使用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (Vazyme) 试剂盒、*TaCLC-e-3AL*-RT F/R 和 AtCLC-e-RT F/R 引物进行荧光定量 PCR。拟南芥转基因材料荧光定量分析中以拟南芥组成型表达基因 *Actin* 作为转录本均一化内参 (表 1)。

1.4 *TaCLC-e-3AL* 基因的克隆

根据 Ensembl Plant 数据库 (http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index) 中 *TaCLC-e-3AL* 基因 CDS 序列, 使用 Primer 5.0 软件设计引物 (表 1)。以小麦幼苗的 cDNA 为模板, 使用 Phanta® Super Fidelity DNA Polymerase 扩增目的基因。反应体系 (20 μ L) 为: 6.8 μ L ddH₂O, 2 \times Max buffer 10 μ L, dNTP Mix 0.4 μ L, cDNA 0.8 μ L, *TaCLC-e-F/R* 各 0.8 μ L, polymerase 0.4 μ L。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 3 min, 34 个循环; 72 °C 彻底延伸 10 min。使用琼脂糖凝胶回收试剂盒 (翌圣生物, 中国) 对目的条带进行胶回收, 将回收产物连接到 pESI-Blunt vector 载体上, 转入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 过夜培养后挑选单菌落进行菌液 PCR, 将检测为阳性克隆的菌液送至

表 1 试验所用的引物列表

Table 1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer name	正向引物 (5'—3') Forward primer	反向引物 (5'—3') Reverse primer
TaCLC-e-3AL F/R	ATGGCGCCAGCAGCG	TCAACTCTCTCCCTTCTGATCTC
TaCLC-e-3AL-p1300-GFP F/R	CAAATCGACTCTAGAAAGCTTATGGCGCCA GCAGCG	GCCCTTGCTCACCATGGTACCCTCTCTCCCTTCTGA TCTCCG
TaCLC-e-3AL-p1300 F/R	ATACACCAAATCGACTCTAGAAATGGCGCCA GCAGCG	CGATCGGGGAAATTCGAGCTCTCAACTCTCTCCCTT CTGATCTC
BD-TaCLC-e-3AL F/R	CTCAGAGGAGGACCTGCATATGATGGCGCC AGCAGCG	TAGTTATGCGGCCGCTGCAGTCAACTCTCTCCCTTCT GATCTC
TaCLC-e-3AL-RT F/R	TCTTCATCCCTTTCCAACCTCAA	AGCCATCGGCAATCCTGT
AtCLC-e-RT F/R	GACGCTTGGGACTGGAAT	CAACTGCAAAGAAGCATCCA
Actin-F/R	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC

注：下划线处表示限制性内切酶识别序列。

Note: At the underline indicates the recognition sequence of the restriction endonuclease.

生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 小麦原生质体的制备、转化及亚细胞定位

使用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Kpn* I 线性化 p1300-GFP 载体，纯化回收酶切产物。设计带有载体同源臂、酶切位点以及去掉终止密码子的引物(表 1)，以测序正确的载体为模板亚克隆 *TaCLC-e-3AL*，通过 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 将 *TaCLC-e-3AL* 基因连接到 p1300-GFP 载体上，将连接产物转化大肠杆菌，挑取阳性克隆，提取质粒。

取三叶一心期的小麦幼嫩叶片，用刀片将其切成 0.5~1 mm 的细条，置于 0.6 mol/L 甘露醇中处理 10 min，细胞筛过滤，向滤液中加入 50 mL 酶解液，真空抽提 30 min 后置于 20℃~25℃ 摇床上 40 r/min 酶解 5 h。利用 PEG 转化法^[26]将 *TaCLC-e-3AL-p1300-GFP* 重组质粒和 p1300-GFP 空载质粒分别转化至小麦原生质体，避光培养 20 h，在激光共聚焦显微镜下观察 GFP 信号。

1.6 拟南芥转化和离子含量及形态学性状测定

构建 p1300-*TaCLC-e-3AL* 重组载体，限制性内切酶为 *Xba* I 和 *Sac* I，带有载体同源臂和酶切位点的引物见表 1。将拟南芥于 MS 培养基上培养至四叶期，将幼苗移栽至装有营养土的培养盒中继续培养至盛花期，采用浸花法将 p1300-*TaCLC-e-3AL* 重组载体转化到拟南芥野生型 (WT) 中，潮霉素筛选至获得阳性 T₃ 代纯合拟南芥植株。将 WT 和 3 个随机挑选的阳性转基因株系点播在 MS 培养基和低氮 MS 培养基 (LN-MS, N 0.18 mmol/L) 上，竖直放置 10 天后观察表型，拍照。使用 ImageJ 软件手动锚点测量每

个处理株系 30 株主根长度；每个处理株系使用 10 株材料，分 3 组使用分析天平测定鲜重，每个处理重复 3 次。杀青烘干后取 0.1 g 样品粉碎，采用分光光度法^[11]测定 WT 和转基因株系的 Cl⁻ 和 NO₃⁻ 含量，每个处理重复 3 次。

1.7 酵母双杂交试验

构建 BD (pGBKT7)-*TaCLC-e-3AL* 重组质粒为诱饵载体，限制性内切酶为 *Nde* I 和 *Pst* I，带有载体同源臂和酶切位点的引物见表 1。采用 LiAC/PEG 法^[27]将诱饵载体转化 Y2H 酵母菌株，经扩繁后分别涂布于 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Trp/-His/-Ade 缺陷培养基上，30℃ 培养 3~4 天，观察菌落的生长状况，判断诱饵载体是否具有自激活活性。

利用共转法^[28]将 cDNA 文库质粒转化到含有诱饵载体的 Y2H 酵母中，涂布于 SD/-Trp/-His/-Ade 缺陷培养基上，30℃ 培养 3~5 天后挑取直径约为 1~2 mm 的单克隆菌落至 SD/-Trp/-His/-Ade/-Leu/X- α -Gal 缺陷培养基上进行二次筛选，将变蓝色的菌落扩繁，用 AD 载体 (pGADT7) 引物对候选阳性克隆菌液进行 PCR 扩增，反应体系同 1.4。将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。在 NCBI 网站上比对测序序列，对可能与诱饵蛋白互作的蛋白(以下称互作蛋白，Prey)分析整理。

1.8 酵母双杂交回转变验证

根据上述分析结果挑选与 *TaCLC-e-3AL* 存在互作的蛋白进行回转变验证，使用 Primer 5.0 软件设计引物并扩增。构建猎物载体 Prey-AD 重组载体(下称诱饵载体)，构建方法同 1.5，限制性内切酶为 *Xba* I 和

Sac I, 带有载体同源臂、酶切位点的引物见表 1。将 Prey-AD 质粒与 BD-*TaCLC-e-3AL* 质粒共转化 Y2H 酵母菌株, 以 Prey-AD+BD-*TaCLC-e-3AL* 为试验组, BD-p53+AD-T 为阳性对照组、BD-Lam+AD-T 为阴性对照组, 同时涂布于 SD/-Trp/-Leu (DDO)、SD/-Trp/-Leu/-His (TDO) 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade (QDO) 缺陷培养基上, 30℃ 培养 3~5 天, 观察菌落生长状况并拍照。

1.9 数据分析

采用 IBM SPSS Statistics 26 软件对数据进行独立样本 *t* 检验, 结果表示为平均值±标准误 (SE), 采用 Prism 8 软件进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 *TaCLC-e* 基因的生物信息学分析

通过 Ensemble plant 的 BlastP 工具获得与拟南芥 *AtCLC-e* 同源的小麦基因 *TraesCS3A02G253600*、*TraesCS3B02G285500* 和 *TraesCS3D02G254500* 的基因序列及编码氨基酸等基本信息, 分别命名为 *TaCLC-e-3AL*、*TaCLC-e-3B* 和 *TaCLC-e-3DL*^[10] (表 2)。对基因结构及其编码蛋白保守结构域进行可视化分析, 这 3 个基因均含有 7 个外显子和 6 个内含子,

编码的蛋白长度相同, 为 717 aa, 且具有 Voltage_CLC 结构域 (Pfam ID: PF00654, <http://pfam.xfam.org/>) 和 CBS 结构域 (Pfam ID: PF00571) (图 1)。结构域分析显示 *TaCLC-e-3AL* 在 563~613 aa 和 637~691 aa 区间各存在 1 个 GBS, 共 2 个 CBS 结构域, 而 *TaCLC-e-3B* 和 *TaCLC-e-3DL* 各只有 1 个 CBS 结构域。相较于 2 个同源基因, *TaCLC-e-3AL* 具有更为完整的基础蛋白结构, 因此我们选择 *TaCLC-e-3AL* 进行下一步分析。

系统发育进化树结果表明, *TaCLC-e-3AL* 与乌拉尔图小麦 *TuCLC-e* 同源性最高, 亲缘关系最近; 保守结构域分析表明, *TaCLC-e-3AL* 与 *TuCLC-e* 的 N 端具有相似的跨膜结构, 但 *TuCLC-e* 的 C 端只有 1 个 CBS 结构域 (图 2)。跨膜结构分析表明, *TaCLC-e-3AL* 蛋白具有 11 个跨膜结构域, 其 C 端位于胞内, N 端位于胞外, 具有两个 N-glyco motif (图 2 和 3), Voltage_CLC 保守结构域和 CBS 结构域分别位于跨膜区域和细胞外。

根据 Zadoks 等^[29]对小麦不同组织不同发育阶段 Z10、Z13、Z23、Z30、Z32、Z39、Z65、Z71、Z75 和 Z85 的表达量预测分析, *TaCLC-e-3AL* 在小麦叶片和茎部的表达量较高, 在穗部的表达量较低 (图 4A); 在小麦不同发育时期, *TaCLC-e-3AL* 在

表 2 *TaCLC-e* 基因信息

Table 2 Genomic information of the *TaCLC-e* genes

基因名称 Gene name	登录号 Ensemble ID	长度 Length	外显子 Exon	内含子 Intron	起始→终止位置 Star to end location	染色体 Chromosome
<i>TaCLC-e-3AL</i>	TraesCS3A02G253600	2838	7	6	474962330 474970320	3A
<i>TaCLC-e-3B</i>	TraesCS3B02G285500	2415	7	6	457013924 457026915	3B
<i>TaCLC-e-3DL</i>	TraesCS3D02G254500	2489	7	6	355885478 355893581	3D

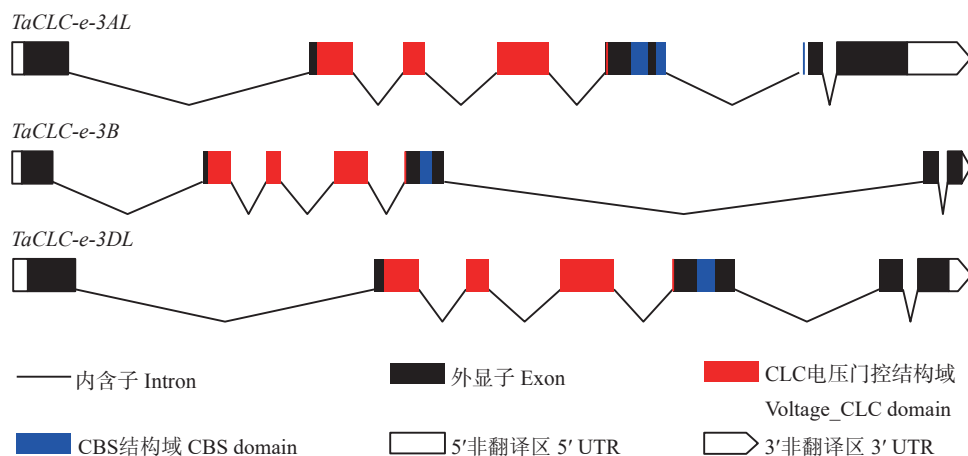


图 1 *TaCLC-e* 基因结构及保守结构域可视化图

Fig. 1 Visualization of gene structure and conserved domain of the three *TaCLC-e* genes

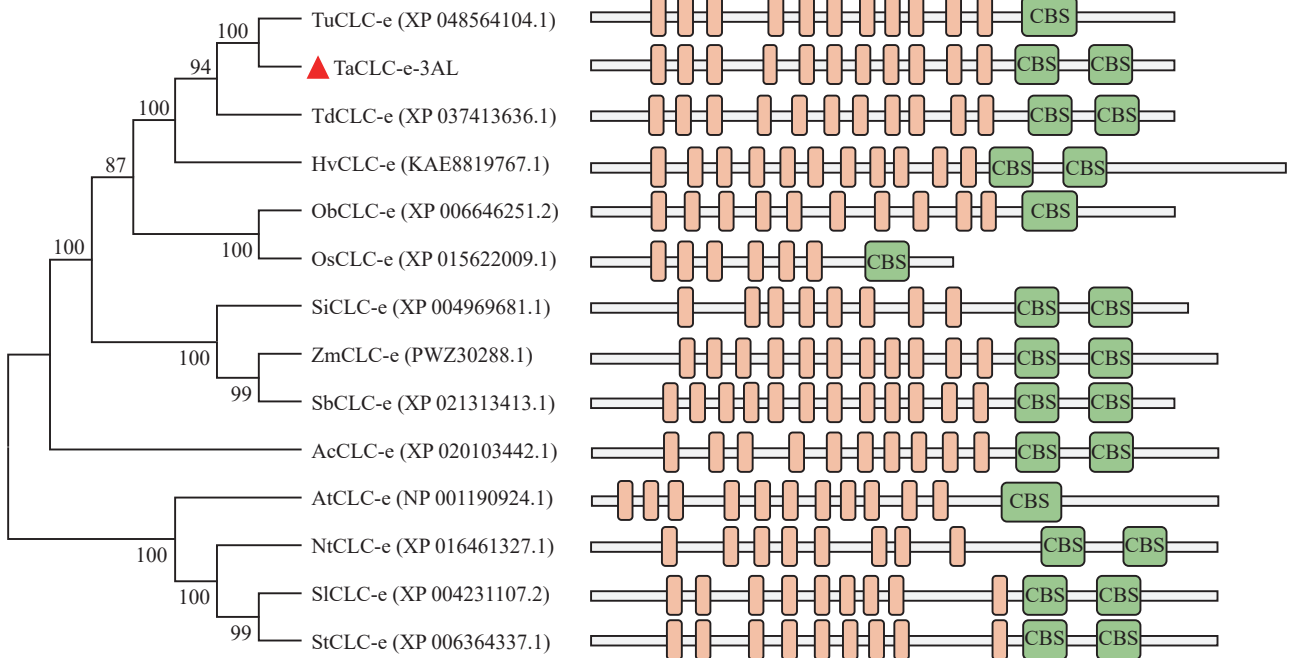


图2 TaCLC-e-3AL 蛋白家族系统进化树及结构域分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of TaCLC-e-3AL protein family and functional domain analysis

注：红色三角为小麦 TaCLC-e-3AL 蛋白，括号内为 NCBI 登录号。Tu—乌拉尔图小麦；Td—二粒小麦；Hv—大麦；Ob—野生稻；Os—水稻；Zm—玉米；Si—小米；Sb—高粱；Ac—凤梨；At—拟南芥；Nt—烟草；Sl—番茄；St—马铃薯。橙色方块为跨膜结构域，绿色方块为 CBS 结构域。

Note: The red triangle is the wheat TaCLC-e-3AL protein, and the NCBI accession number is in parentheses. Tu—*Triticum urartu*; Td—*Triticum dicoccoides*; Hv—*Hordeum vulgare*; Ob—*Oryza brachyantha*; Os—*Oryza sativa*; Zm—*Zea mays*; Si—*Setaria italica*; Sb—*Sorghum bicolor*; Ac—*Ananas comosus*; At—*Arabidopsis thaliana*; Nt—*Nicotiana tabacu*; Sl—*Solanum lycopersicum*; St—*Solanum tuberosum*. The orange box represents the transmembrane structural domain, and the green box represents the CBS domain.

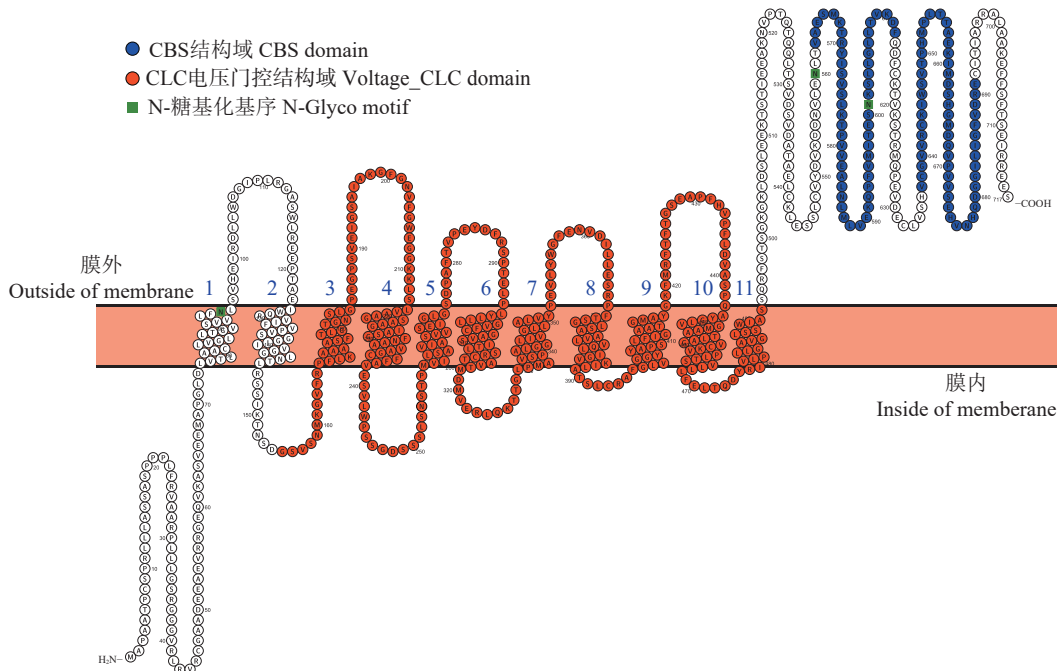
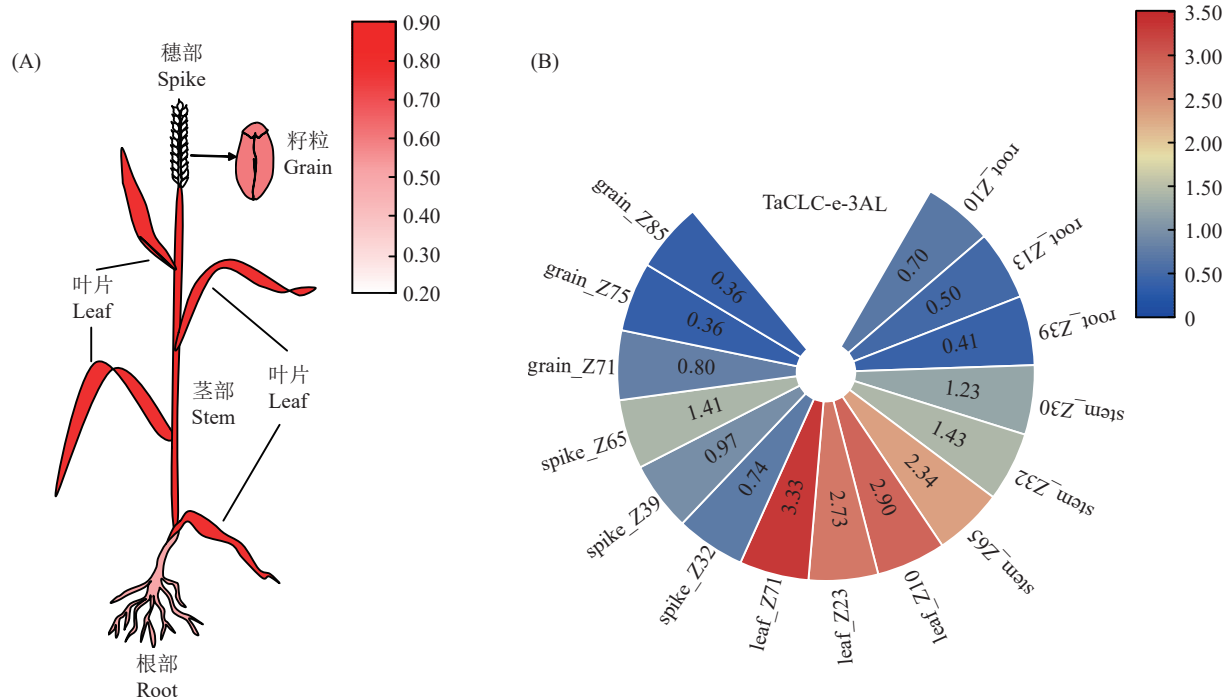


图3 TaCLC-e-3AL 蛋白的跨膜结构模型

Fig. 3 Model of the transmembrane structure of TaCLC-e-3AL protein

注：圆圈表示氨基酸，圆圈内字母表示不同种类氨基酸的缩写。

Note: The circle represents amino acids, and the letters inside the circle represent abbreviations of amino acids.

图 4 *TaCLC-e-3AL* 基因表达量的预测热图Fig. 4 Predicted heat map of *TaCLC-e-3AL* gene expression

注: 图 (A) 为成熟期不同组织中 *TaCLC-e-3AL* 的表达水平; 图 (B) 为不同生育期组织中 *TaCLC-e-3AL* 的表达量, 扇形外围为不同组织, 扇形内数值为表达量。grain_Z85—开花后 30 天籽粒; grain_Z75—开花后 14 天籽粒; grain_Z71—开花后 2 天籽粒; spike_Z65—开花期的穗; spike_Z39—孕穗期的穗; spike_Z32—拔节期的穗; leaf_Z71—开花后 2 天叶片; leaf_Z23—分蘖期叶片; leaf_Z10—幼苗期叶片; stem_Z65—开花期的茎; stem_Z32—拔节期的茎; stem_Z30—直立假茎; root_Z39—孕穗期的根; root_Z13—三叶期的根; root_Z10—幼苗期的根。数据来源于 RNA-seq 数据库。

Note: Figure (A) is the *TaCLC-e-3AL* expression levels in tissues at maturity stage, and figure (B) is the *TaCLC-e-3AL* expression level in tissues at different stages. The periphery of the sector is composed of different tissues, and the values inside the sector represent the expression level. grain_Z85—Grain 30 days after flowering; grain_Z75—Grain 14 days after flowering; grain_Z71—Grain 2 days after flowering; spike_Z65—Flowering spike; spike_Z39—Spike at booting stage; spike_Z32—Spike at jointing stage; leaf_Z71—Leaf 2 days after flowering; leaf_Z23—Leaf at tillering stage; leaf_Z10—Leaf at seedling stage; stem_Z65—Stem at flowering stage; stem_Z32—Stem at jointing stage; stem_Z30—Upright pseudostem; root_Z39—Root at booting stage; root_Z13—Root at trifoliate stage; root_Z10—Root during seedling stage. The data were obtained from the RNA-seq database.

leaf_Z71 (开花后 2 天) 的叶片中具有较高的表达量, 在 grain_Z75 (开花后 14 天) 和 grain_Z85 (开花后 30 天) 的籽粒中表达量较低 (图 4B)。

分析 *TaCLC-e-3AL* 启动子的顺式作用元件, 结果表明该基因上游启动子存在多种顺式作用元件, 除最基本的顺式作用元件 CAAT-box、TATA-box 外, 还具有光响应元件、激素 (赤霉素、脱落酸、茉莉酸甲酯、生长素、水杨酸) 响应元件以及胁迫相关 (干旱、厌氧) 的响应元件 (表 3)。

2.2 *TaCLC-e-3AL* 的亚细胞定位

采用 PEG 转化法将 p1300-*TaCLC-e-3AL*-GFP 融合蛋白表达载体和 p-super1300-GFP 空载体 (对照) 质粒分别转化至小麦原生质体中, 在激光共聚焦显微镜下观察蛋白的表达情况。使用 GFP、叶绿体和白光激发原生质体。p-super1300-GFP 空载体的绿色荧

光遍布整个细胞, 在细胞膜、细胞核与细胞质中均有表达, 而 *TaCLC-e-3AL* 的绿色荧光和叶绿体的红色荧光表现出一致的分布, 两种荧光完全重叠, 表明 *TaCLC-e-3AL* 亚细胞定位于叶绿体 (图 5)。

2.3 *TaCLC-e-3AL* 在拟南芥中的功能验证

通过潮霉素筛选获得 T₃ 代过表达 *TaCLC-e-3AL* 的转基因拟南芥纯合株系, 随机挑选 3 个株系 OE-3、OE-6、OE-11, 将这 3 个转基因株系与野生型拟南芥 WT 的种子点播于低氮培养基 (LN, 0.18 mol/L N) 及正常培养基 (MS) 上进行培养, 3 个转基因株系 (OE-3、OE-6、OE-11) 与 WT 相比根长没有显著差异 (图 6A、B)。qRT-PCR 分析显示, 3 个株系中 *TaCLC-e-3AL* 的表达量较 *AtCLC-e* 高出 5~6 倍 (图 6C)。选取 WT 和 OE 株系 (OE-3、OE-6、OE-11) 各 30 株测定鲜重 (下同), 结果显示 OE 株系与

表 3 *TaCLC-e-3AL* 启动子区顺式作用元件分析
Table 3 Analysis of cis-acting elements in *TaCLC-e-3AL* promoter

顺式作用元件 Cis-acting elements	功能注释 Function annotation	数量 Number
CAAT-box	增强子区顺式作用元件 Common <i>cis</i> -acting element in enhancer regions	34
TATA-box	转录起始位点-30的核心元件 Core element at -30 of transcription start site	22
MYB	MYB转录因子结合区域, 干旱诱导相关元件 Relating to drought-inducibility in MYB binding site	8
STRE	调控脱落酸、干旱响应 Involved in abscisic acid and drought response	6
MYC	顺式调控逆境胁迫 Stress related <i>cis</i> -regulation	6
TCA-element	参与水杨酸响应 Involved in salicylic acid responsiveness	3
ABRE	参与脱落酸响应 Involved in abscisic acid responsiveness	3
P-box	参与赤霉素响应 Involved in gibberellin-responsiveness	2
G-box	参与光响应的顺式调节 Involved in <i>cis</i> -acting regulation of light responsiveness	2
ARE	参与厌氧诱导的顺式调节 Involved in <i>cis</i> -acting regulatory of the anaerobic induction	2
W-box	赤霉素响应 Involved in gibberellin responsiveness	1
TGA-element	参与生长素响应 Involved in auxin- responsiveness	1
TGACG-motif	参与茉莉酸甲酯响应 Involved in MeJA responsiveness	1
TC-rich repeats	参与防御和胁迫反应 Involved in defense and stress responsiveness	1
TCCC-motif	参与光响应 Involved in light responsiveness	1
Box 4	参与光反应的保守DNA模块部分 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	1
AuxRR-core	参与生长素响应 Involved in auxin responsiveness	1
as-1	参与赤霉素响应 Involved in gibberellin responsiveness	1
DRE core	参与干旱胁迫响应 Involved in drought stress responsiveness	1
GATA-motif	参与光响应 Involved in light responsiveness	1
CGTCA-motif	参与茉莉酸甲酯响应 Involved in MeJA responsiveness	1
GT1-motif	参与光响应 Involved in light responsiveness	1

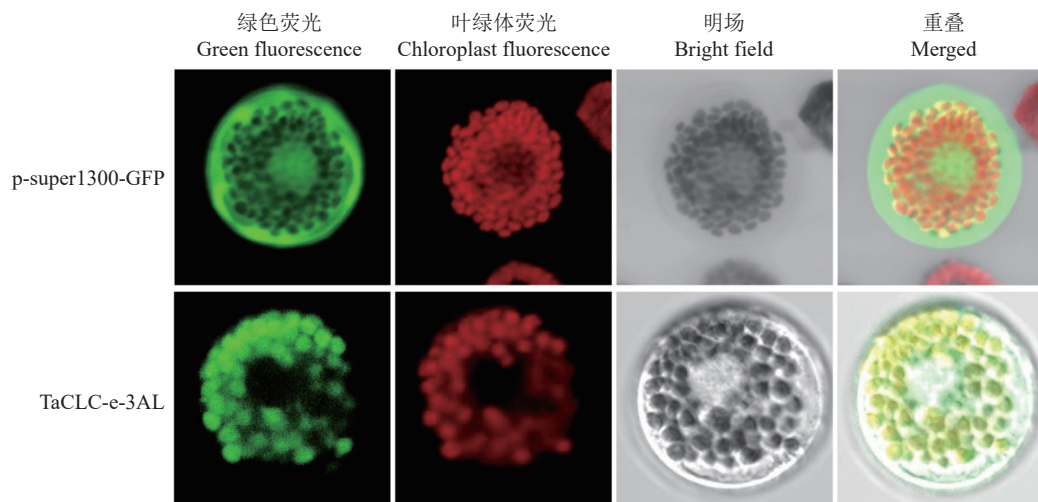


图 5 *TaCLC-e-3AL* 在小麦原生质中的亚细胞定位分析
Fig. 5 Subcellular localization analyses of *TaCLC-e-3AL* in wheat protoplasts

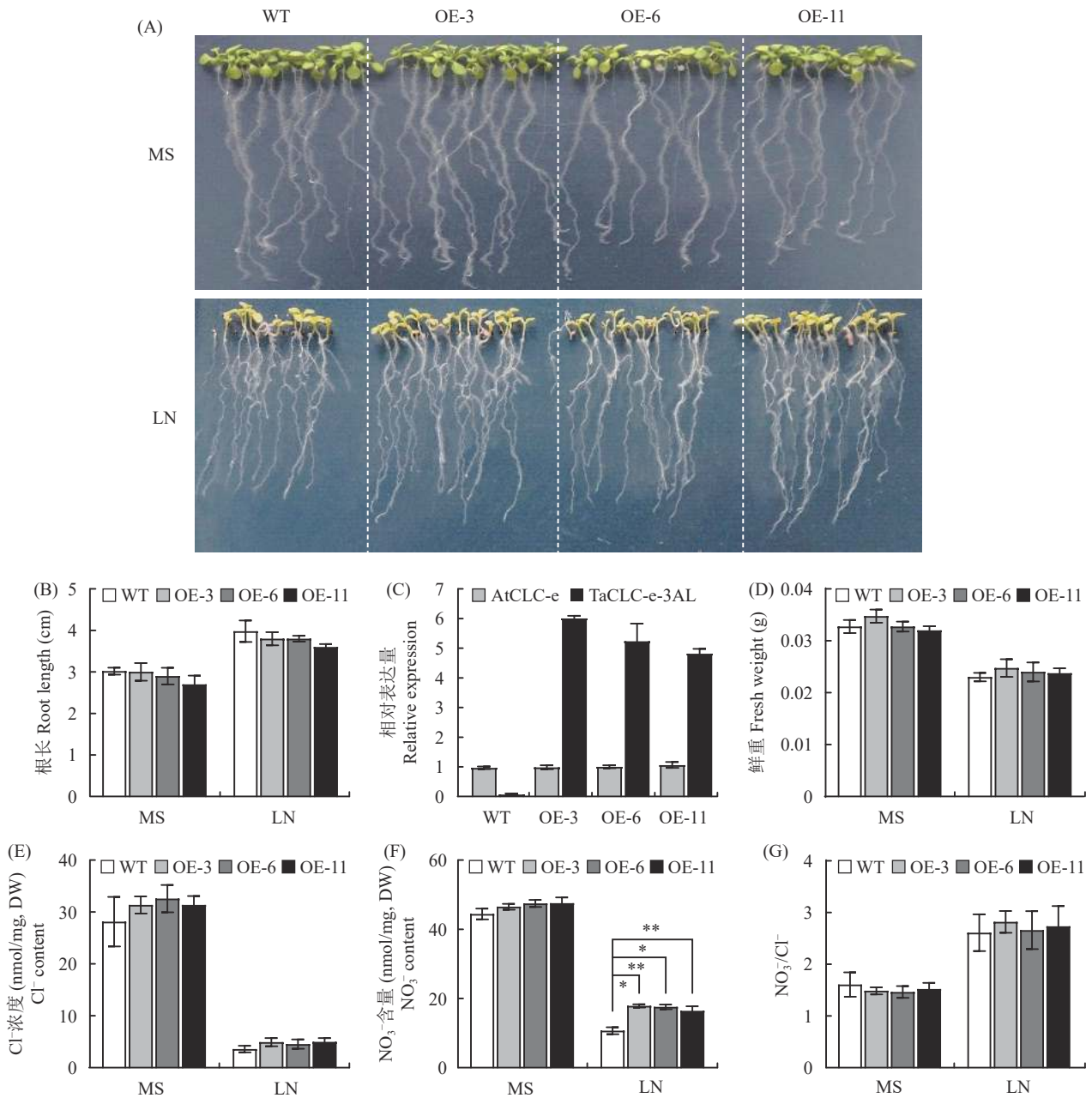


图 6 正常和低氮培养基上生长的野生型和过表达 *TaCLC-e-3AL* 基因的拟南芥植株表型及离子含量
Fig. 6 Phenotypes and ion contents of wild and *TaCLC-e-3AL* overexpression *Arabidopsis* (OE) plants cultured on normal and low N mediums

注: WT 为野生型拟南芥, OE-3、OE-6 和 OE-11 为 *TaCLC-e-3AL* 的 3 个过表达株系, MS 和 LN 分别表示正常和低氮条件培养。图 (A) 为生长表型, 图 (B)~(G) 分别为根长、植株中 *TaCLC-e-3AL* 表达量、鲜重、Cl⁻ 含量、NO₃⁻ 含量以及 NO₃⁻/Cl⁻ 值。**—*P*<0.01。

Note: WT is wild type *Arabidopsis thaliana*. OE-3, OE-6 and OE-11 represent three *TaCLC-e-3AL* overexpressing lines, respectively. MS and LN indicate the normal and low nitrogen mediums for growth. Figure (A) is the phenotypes of the WT and three *TaCLC-e-3AL* overexpressing lines, and figure (B)~(G) are the results of root length, qRT-PCR detection of *TaCLC-e-3AL* expression, fresh weight, Cl⁻ content, NO₃⁻ content, and NO₃⁻/Cl⁻ ratio. **—*P*<0.01.

WT 之间鲜重无显著差异 (图 6D)。

体内离子含量分析表明, 在 MS 和 LN 培养基上, OE 株系体内的 Cl⁻ 含量与 WT 相比差异均不显著 (图 6E); MS 培养基上生长的 OE 株系体内的 NO₃⁻ 离子含量与 WT 无显著差异, LN 培养基上生

长的 OE 株系 NO₃⁻ 离子含量显著、极显著高于 WT (图 6F)。MS 和 LN 培养基上生长的 OE 株系的 NO₃⁻/Cl⁻ 值与 WT 均无显著差异 (图 6G)。说明在低氮条件下, 拟南芥体内过表达 *TaCLC-e-3AL* 可以使植株体内储存更多的 NO₃⁻, 并维持植株体内的 NO₃⁻/

CI值, 维持植物正常的生长发育。

2.4 TaCLC-e-3AL 互作蛋白的筛选

构建诱饵载体 BD-TaCLC-e-3AL 重组质粒, 转化 Y2H 酵母菌株, 将菌液涂布于 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Trp/-His/-Ade 缺陷型培养基上, 验证目的基因酵母双杂交体系中的自激活水平。酵母菌落在 SD/-Trp/-His/-Ade 三缺培养基上不能生长, 在其它培养基上正常生长, 且在含有 X- α -Gal 的培养基上未变蓝 (图 7), 说明 TaCLC-e-3AL 在酵母双杂交系统中不具有自激活活性, 可以进行互作蛋白筛选。

将诱饵蛋白与酵母文库杂交后, 通过 SD/-Trp/-Leu/-His、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal 缺陷型培养基筛选并挑选蓝色单菌落进行鉴定, 对 500 bp 以上扩增条带的 PCR 产物测序提交 NCBI 数据库比对, 发现 6 个可能与 TaCLC-e-3AL 互作的蛋白 (表 4)。

2.5 酵母双杂交回转变验证

设计特异性引物扩增互作蛋白基因, 结合表 3 注释序列, 从小麦 cDNA 中克隆到了 TaVDAC、TaCYT、TaTIP1;03_3D 分别作为 Prey 蛋白, 构建

Prey-AD 载体并与 BD-TaCLC-e-3AL 载体共同转化 Y2H 酵母验证互作。结果表明, 相较于 AD 空载体, 含有 Prey-AD 和 BD-TaCLC-e-3AL 质粒的 Y2H 酵母均可以在 TDO (SD/-Trp/-Leu/-His) 和 QDO (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade) 缺陷培养基上生长 (图 8), 说明 TaCLC-e-3AL 与筛选出的蛋白 TaVDAC (电压依赖性阴离子通道蛋白)、TaCYT (叶绿体 a/b 结合蛋白)、TaTIP1;03_3D (水通道蛋白) 存在互作关系。

3 讨论

氮素是限制作物产量的重要营养元素。植物利用的氮素主要来源于硝态氮和铵态氮^[30]。目前关于小麦氮素转运吸收的研究主要集中于 *NRT* 和 *AMT* 基因, 而 *CLC* 基因研究较少。在拟南芥、玉米等植物中, *CLC* 基因的功能主要集中于植株体内 Cl^- 或 NO_3^- 吸收转运、储存和耐氯 (盐) 性的调控机理方面^[31]。

本研究通过 BlastP 比对获得了与拟南芥 *AtCLC-e* 同源的 3 个小麦 *TaCLC-e* 基因。对 *TaCLC-e* 基因的保守结构域分析表明, 3 个 *TaCLC-e* 基因编码蛋白均具有保守的 Voltage_CLC 结构域和 CBS 结构域。这与先前研究中 TaCLC-e-3DL 不具有完整的 Voltage_CLC 结构域结果不一致, 可能是由于目前

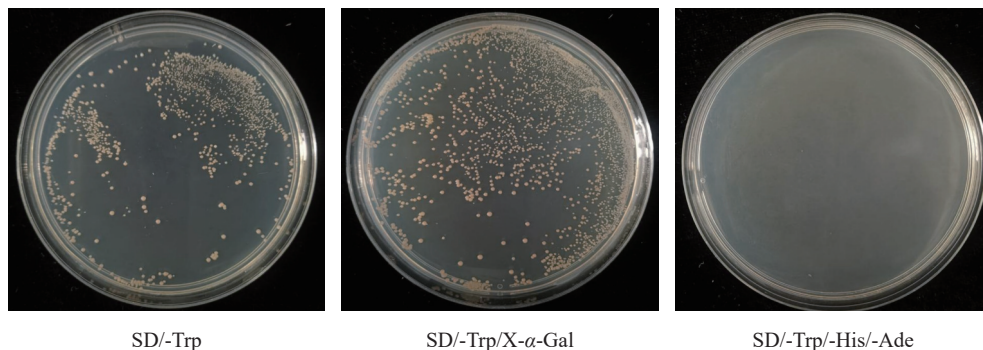


图 7 诱饵载体的自激活检测

Fig. 7 The detection of auto-activation for bait vector

表 4 基于酵母双杂交文库筛选的互作蛋白

Table 4 Interaction proteins based on the two-hybrid yeast library screening

序号 No.	互作蛋白 Interacting protein	NCBI基因登录号 ⑤Gene registration number in NCBI	对应的编码基因名称 Name of coding gene
1	电压依赖型阴离子通道 Voltage-dependent anion channel	NM_001405971.1	TaVDAC
2	细胞色素b6-f复合铁硫亚基 Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	XM_044467339.1	TaCYT
3	水通道蛋白 TIP1-2 Aquaporin TIP1-2	XM_044496561.1	TaTIP1;03_3D
4	水通道蛋白PIP1-5类似蛋白 Aquaporin PIP1-5-like	XP_044415650.1	TaPIP1;15_6A
5	水通道蛋白 PIP2-5 Aquaporin PIP2-5	XP_044325316.1	TaPIP2;27_2A
6	液泡膜镶嵌蛋白 Tonoplast intrinsic protein	ABI96817.1	TaTIP1;02b_2A

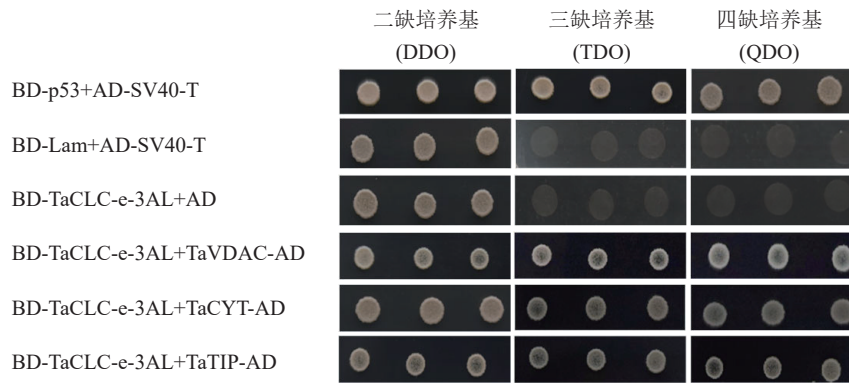


图 8 酵母双杂交点对点互作验证

Fig. 8 Verification of point-to-point protein interactions in yeast two-hybrid

注: BD—pGBKT7 载体; AD—pGADT7 载体; DDO—SD/-Trp/-Leu 培养基; TDO—SD/-Trp/-Leu/-His 培养基; QDO—SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基。p53 和 Lam 分别代表小鼠 p53 和层粘连蛋白, SV40-T 为猿猴空泡病毒 SV40 (Simian Virus 40) 较大的 T 抗原。

Note: BD—pGBKT7 vector; AD—pGADT7 vector; DDO—SD/-Trp/-Leu culture medium; TDO—SD/-Trp/-Leu/-His culture medium; QDO—SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade culture medium. p53 and Lam represent mouse p53 and laminin protein, respectively. SV40-T is the large T antigen of simian virus SV40.

CDD search 数据库更新所致^[10]。此外 *TaCLC-e-3B* 和 *TaCLC-e-3DL* 蛋白只有 1 个 CBS 结构域, 而 *TaCLC-e-3AL* 具有 2 个 CBS 结构域。由于乌拉尔图小麦和二粒小麦分别为普通小麦的 AA 基因组和 AABB 基因组的供体, 乌拉尔图小麦 *TuCLC-e* 蛋白只有 1 个 CBS 结构域, 而二粒小麦 *TdCLC-e* 蛋白存在 2 个 CBS 结构域, 分别位于 563~613、637~691 aa 处, 与普通小麦 *TaCLC-e-3AL* 的 CBS 结构域位置相同, 推测可能是由于进化过程中, 基因突变导致二粒小麦 *TdCLC-e* 的 CBS 结构域增多, 使得其作为普通小麦 AABB 供体导致 *TaCLC-e-3AL* 的 CBS 保守结构域比 *TaCLC-e-3B*、*TaCLC-e-3DL* 增加一个。系统发育进化树结果表明, *TaCLC-e-3AL* 与 *TuCLC-e*、*TdCLC-e* 的同源性高于其他物种, 这也与上述研究结果相符, 基于此我们选择 *TaCLC-e-3AL* 进行功能分析。

亚细胞定位预测与膜结构预测表明, *TaCLC-e-3AL* 编码的蛋白定位于质膜上, 包含 11 个跨膜结构域, 而小麦原生质体的亚细胞定位显示 *TaCLC-e-3AL* 主要位于叶绿体中, 拟南芥 *AtCLC-e* 定位于类囊体膜上^[32], 这与 *TaCLC-e-3AL* 发挥功能的细胞器类似, 但具体位置不同。*TaCLC-e-3AL* 基因在不同组织的表达量预测分析表明, 该基因在叶片和茎部表达量较高, 这可能是由于叶片和茎部的叶绿体数量比其他组织多。该基因在茎叶表现较高的转录丰度, 暗示 *TaCLC-e-3AL* 可能主要参与离子转运和利用, 具有低亲和特性。

拟南芥 *AtCLC-e* 主要调节植物体内硝酸盐的动

态平衡, 与 *AtCLC-a* 共同参与硝酸盐同化过程^[18]。本研究中, 低氮培养基上的 *TaCLC-e-3AL* 过表达株系植株体内 NO_3^- 含量显著高于 WT, 而植株体内 Cl^- 含量以及 $\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$ 值与 WT 相比无显著差异, 并且 *TaCLC-e-3AL* 在茎叶的表达量高于根部, *TaCLC-e-3AL* 亚细胞定位于叶绿体, 具有与 *AtCLC-e* 类似的亚细胞定位, 表明 *TaCLC-e-3AL* 在小麦体内具有与 *AtCLC-e* 类似的功能, 主要参与植株对 NO_3^- 含量的调节, 维持植株体内 NO_3^- 和 Cl^- 稳态。*AtCLC-e* 主要参与 Cl^- 稳态的调节和调控光合电子传输, 通过将 NO_3^- 转运至类囊体腔, 引起细胞质中亚硝酸盐浓度的改变, 并且 *AtCLC-e* 和 *AtCLC-a* 可能在硝酸盐同化中具有串联作用^[19]。*TaCLC-e-3AL* 过表达并未改善低氮条件下植株生物量, 相较于野生型根长和鲜重无显著差异, 推测 *TaCLC-e-3AL* 与 *AtCLC-e* 具有类似的生物学功能, 尽管 *TaCLC-e-3AL* 的过表达引起了植株体内 NO_3^- 含量的积累, 但由于缺乏氮的转运及同化过程中相应的酶或 NO_3^- 转运蛋白家族 (*CLC-a*、*NRT2* 等), 导致 *TaCLC-e-3AL* 的过表达并未显著提升植株整体的氮素利用效率。在正常和低氮条件下, 转基因 OE 株系的 Cl^- 含量和 NO_3^- 含量略高于 WT, 推测 *TaCLC-e-3AL* 维持植株体内 NO_3^- 和 Cl^- 稳态的主要途径可能是调控 Cl^- 和 NO_3^- 协同运输, 调控植株体内 Cl^- 含量和 NO_3^- 含量增加, 具有同时改善低氮处理下 Cl^- 和 NO_3^- 含量的功能, 维持 NO_3^- 和 Cl^- 稳态。由于目前研究认为 *CLC* 家族蛋白包括通道蛋白和交换蛋白 (质子偶联)^[33-36], 实验室前期的研究发现 *TaCLC-e-3AL* 在酵母突变体中表达可以使外界的

Cl⁻和NO₃⁻进入细胞内,维持酵母正常生长^[10],结合本研究转基因拟南芥中的功能鉴定,推测TaCLC-e-3AL主要是以阴离子通道(Cl⁻和NO₃⁻)在小麦中发挥作用。

酵母双杂交文库筛选获得6个互作蛋白,这些蛋白涉及植物的光合作用、信号转导、抵御逆境胁迫和离子吸收储存等多个途径。水通道蛋白在调节植物生长发育、促进根系吸水、控制气孔闭合、提高植物抗逆性等方面发挥重要作用,同时还参与植株体内水分运输、营养元素的吸收储存等过程^[37-40]。TaCLC-e-3AL可能参与光合作用响应机制、植物体内离子吸收储存、信号传递等一系列的非生物胁迫生理生化反应,进而维持植物体内NO₃⁻/Cl⁻离子稳态平衡。

4 结论

本研究从小麦中克隆的氯离子转运蛋白TaCLC-e-3AL基因(编码717 aa),含有7个外显子和6个内含子,蛋白亚细胞位于叶绿体内。将TaCLC-e-3AL转入拟南芥建立的3个过表达转基因植株,在低氮胁迫条件下相较野生型均可以在植株内储存更多的NO₃⁻,并维持植株体内NO₃⁻/Cl⁻的值。TaCLC-e-3AL与水通道蛋白(TaTIP1;03_3D)、叶绿体a/b结合蛋白(TaCYT)和电压依赖性阴离子通道蛋白(TaVDAC)3个蛋白互作。

参考文献:

- [1] 储成才,王毅,王二涛.植物氮磷钾养分高效利用研究现状与展望[J].中国科学:生命科学,2021,51(10):1415-1423.
Chu C C, Wang Y, Wang E T. Improving the utilization efficiency of nitrogen, phosphorus and potassium: Current situation and future perspectives[J]. Scientia Sinica: Vitae, 2021, 51(10): 1415-1423.
- [2] 付帅,刘晓明,马阳,等.氮素形态对强筋和中筋小麦产量和品质的影响[J].植物营养与肥料学报,2022,28(1):83-93.
Fu S, Liu X M, Ma Y, et al. Effects of nitrogen supply forms on the quality and yield of strong and medium gluten wheat cultivars[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2022, 28(1): 83-93.
- [3] Ijato T, Porras-Murillo R, Ganz P, et al. Concentration-dependent physiological and transcriptional adaptations of wheat seedlings to ammonium[J]. Physiologia Plantarum, 2021, 171(3): 328-342.
- [4] Wang Y, Cheng Y, Chen K, Tsay Y F. Nitrate transport, signaling, and use efficiency[J]. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69(1): 85-122.
- [5] Lurin C, Geelen D, Barbier-Brygoo H, et al. Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel[J]. The Plant Cell, 1996, 8(4): 701-711.
- [6] Hechenberger M, Schwappach B, Fischer W N, et al. A family of putative chloride channels from Arabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption[J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(33): 632-638.
- [7] Nakamura A, Fukuda A, Sakai S, Tanaka Y. Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (Oryza sativa L.)[J]. Plant and Cell Physiology, 2006, 47(1): 32-42.
- [8] Wang S, Su S Z, Wu Y, et al. Overexpression of maize chloride channel gene ZmCLC-d in Arabidopsis thaliana improved its stress resistance[J]. Plant Biology, 2015, 59(1): 55-64.
- [9] Zhou G A, Qiu L J. Identification and functional analysis on abiotic stress response of soybean Cl⁻ channel gene GmCLCt[J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(2): 199-206.
- [10] Mao P J, Run Y H, Wang H H, et al. Genome-wide identification and functional characterization of the chloride channel TaCLC gene family in wheat (Triticum aestivum L.)[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 846795.
- [11] Liu X, Pi B Y, Pu J W, et al. Genome-wide analysis of chloride channel-encoding gene family members and identification of CLC genes that respond to Cl⁻/salt stress in upland cotton[J]. Molecular Biology Reports, 2020, 47(12): 9361-9371.
- [12] Zifarelli G, Pusch M. CLC transport proteins in plants[J]. FEBS Letters, 2010, 584(10): 2122-2127.
- [13] Wege S, Jossier M, Filleur S, et al. The proline 160 in the selectivity filter of the Arabidopsis NO₃⁻/H⁺ exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta[J]. The Plant Journal, 2010, 63(5): 861-869.
- [14] Jossier M, Kroniewicz L, Dalmas F, et al. The Arabidopsis vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance[J]. The Plant Journal, 2010, 64(4): 563-576.
- [15] 曾廷儒,张静,张登峰,杜金友.玉米ZmCLCa基因克隆及其对氮素吸收的功能验证[J].植物遗传资源学报,2017,18(1):112-116.
Zeng T R, Zhang J, Zhang D F, Du J Y. Cloning of ZmCLCa gene in maize and its functional characterization of nitrogen absorption[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(1): 112-116.
- [16] Liu X, Liu F, Zhang L, et al. GsCLC-c2 from wild soybean confers chloride/salt tolerance to transgenic Arabidopsis and soybean composite plants by regulating anion homeostasis[J]. Physiologia Plantarum, 2021, 172(4): 1867-1879.
- [17] Liu W, Feng J, Ma W, et al. GhCLC-g1, a vacuolar chloride channel, contributes to salt tolerance by regulating ion accumulation in upland cotton[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 765173.
- [18] Monachello D, Allot M, Oliva S, et al. Two anion transporters AtCLCa and AtCLCc fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways[J]. New Phytologist, 2009, 183(1): 88-94.
- [19] Herdean A, Nziengui H, Zsiros O, et al. The Arabidopsis thylakoid chloride channel AtCLCe functions in chloride homeostasis and regulation of photosynthetic electron transport[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 165238.
- [20] Xing A Q, Ma Y C, Wu Z C, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the CLC superfamily genes in tea plants

- (*Camellia sinensis*)[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2020, 20(4): 497–508.
- [21] 韩梦圆, 于婷婷, 许阿飞, 等. 氯离子通道基因MhCLC-e2促进缺氮条件下苹果愈伤组织的生长[J]. *植物生理学报*, 2022, 58(5): 857–863.
- Han M Y, Yu T T, Xu A F, *et al.* Chloride channel gene MhCLC-e2 promotes the growth of apple calli under nitrogen deficiency[J]. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(5): 857–863.
- [22] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [23] Omasits U, Ahrens C H, Muller S, Wollscheid B. Protter: Interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(6): 884–886.
- [24] Ma S W, Wang M, Wu J H, *et al.* Wheat Omics: A platform combining multiple omics data to accelerate functional genomics studies in wheat[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(12): 1965–1968.
- [25] Lescot M, Dehais P, Thijs G, *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325–327.
- [26] Luo G B, Shen L S, Song Y H, *et al.* The MYB family transcription factor *TuODORANT1* from *Triticum urartu* and the homolog *TaODORANT1* from *Triticum aestivum* inhibit seed storage protein synthesis in wheat[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(9): 1863–1877.
- [27] Cheng X Y, Liu X D, Mao W W, *et al.* Genome-wide identification and analysis of HAK/KUP/KT potassium transporters gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12): 3969.
- [28] Zhang N, Zhang L R, Shi C N, *et al.* Identification of proteins using iTRAQ and virus-induced gene silencing reveals three bread wheat proteins involved in the response to combined osmotic-cold stress[J]. *Journal of Proteome Research*, 2018, 17(7): 2256–2281.
- [29] Zadoks J, Chang T, Konzak C. A decimal code for growth stages of cereals[J]. *Weed Research*, 1974, 14(6): 415–421.
- [30] Meng L, Dong J X, Wang S S, *et al.* Differential responses of root growth to nutrition with different ammonium/nitrate ratios involve auxin distribution in two tobacco cultivars[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(12): 2703–2715.
- [31] Subba A, Tomar S, Pareek A, Singla-Pareek S L. The chloride channels: Silently serving the plants[J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 171(4): 688–702.
- [32] Marmagne A, Vinauger-Douard M, Monachello D, *et al.* Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and golgi membranes, respectively[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(12): 3385–3393.
- [33] Jentsch T, Pusch M. CLC chloride channels and transporters: Structure, function, physiology, and disease[J]. *Physiological Reviews*, 2018, 98(3): 1493–1590.
- [34] Yang Z, Zhang X, Ye S W, *et al.* Molecular mechanism underlying regulation of *Arabidopsis* CLCa transporter by nucleotides and phospholipids[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 4879.
- [35] Demes E, Besse L, Cubero-Font P, *et al.* Dynamic measurement of cytosolic pH and [NO₃⁻] uncovers the role of the vacuolar transporter AtCLCa in cytosolic pH homeostasis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(26): 15343–15353.
- [36] Pottosin I, Dobrovinskaya O. Ion channels in native chloroplast membranes: Challenges and potential for direct patch-clamp studies [J]. *Frontiers in Physiology*, 2015, 6: 396.
- [37] Guo Y, Xu C B, Sun X J, *et al.* TaSAUR78 enhances multiple abiotic stress tolerance by regulating the interacting gene TaVDAC1[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2019, 18(12): 2682–2690.
- [38] Zhang J F, Deng Z Y, Cao S H, *et al.* Isolation of six novel aquaporin genes from *Triticum aestivum* L. and functional analysis of TaAQP6 in water redistribution[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2008, 26(1): 32–45.
- [39] Pandey B, Sharma P, Pandey D, *et al.* Identification of new aquaporin genes and single nucleotide polymorphism in bread wheat[J]. *Evolutionary Bioinformatics*, 2013, 9: 437–452.
- [40] Wang Y W, Yu J, Jiang X H, *et al.* Analysis of thylakoid membrane protein and photosynthesis-related key enzymes in super high-yield hybrid rice LYPJ grown in field condition during senescence stage[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, 37(2): 1.