

水稻 *CRF* 基因家族的鉴定与表达模式分析

宋永森¹, 于洋^{1,2*}, 谭楚禾¹, 孟琪¹, 勾宇睿¹, 段香波^{1,2*}

1 沈阳大学生命科学与工程学院, 辽宁 沈阳 110044

2 辽宁省城市有害生物治理与生态安全重点实验室, 辽宁 沈阳 110044

宋永森, 于洋, 谭楚禾, 孟琪, 勾宇睿, 段香波. 水稻 *CRF* 基因家族的鉴定与表达模式分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(4): 1157-1169.

SONG Yongsen, YU Yang, TAN Chuhe, MENG Qi, GOU Yurui, DUAN Xiangbo. Identification and expression profile analysis of rice *CRF* gene family[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(4): 1157-1169.

摘要: 细胞分裂素响应因子(cytokinin response factors, CRFs)作为植物特有的转录因子, 在生长发育调控、激素信号通路以及胁迫应答过程中发挥着重要作用。本研究以拟南芥 12 个 *AtCRF* 蛋白序列为基础, 通过 BLAST 比对, 从水稻基因组中鉴定出 9 个 *CRF* 基因, 分布于 7 条染色体上。利用各种在线网站和本地软件, 对水稻 *CRF* 家族蛋白的保守结构域、理化性质、二级结构以及系统进化关系进行全面的解析。同时, 也分析了 *OsCRF* 基因的外显子-内含子结构和启动子区顺式作用元件。结果发现, 水稻 *CRF* 基因的启动子中含有大量与植物激素响应和非生物胁迫应答相关的元件。时空表达模式分析显示, 4 个 *OsCRF* 基因在各器官中表达量均比较低, 而另外 5 个则高表达于水稻的叶片、花序或种子等部位。基因芯片数据表明, *OsCRFs* 不同程度地受到脱落酸(abscisic acid, ABA)、生长素(auxin)、细胞分裂素(cytokinin, CK)以及茉莉酸(jasmonic acid, JA)的调控作用。通过分析转录组测序数据, 研究还发现, *OsCRF* 基因主要参与水稻的温度(低温及高温)胁迫应答, 部分基因还参与了干旱胁迫响应, 但几乎所有的基因都不响应盐胁迫。本研究为进一步解析水稻 *CRF* 家族基因的生物功能提供了依据。

关键词: 水稻; 细胞分裂素响应因子; 基因家族分析; 表达模式

资助项目: 国家自然科学基金(32201730); 沈阳大学大学生创新创业训练计划(202311035226)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32201730) and the College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of Shenyang University (202311035226).

*Corresponding authors. E-mail: YU Yang, yuyang_syu@163.com; DUAN Xiangbo, duanxiangbo@aliyun.com

Received: 2023-10-09; Accepted: 2023-11-28; Published online: 2023-12-05

Identification and expression profile analysis of rice *CRF* gene family

SONG Yongsen¹, YU Yang^{1,2*}, TAN Chuhe¹, MENG Qi¹, GOU Yurui¹, DUAN Xiangbo^{1,2*}

1 College of Life Science and Engineering, Shenyang University, Shenyang 110044, Liaoning, China

2 Liaoning Key Laboratory of Urban Integrated Pest Management and Ecological Security, Shenyang 110044, Liaoning, China

Abstract: Cytokinin response factors (CRFs), as unique transcription factors in plants, play crucial roles in regulating development, phytohormone signaling pathway, and stress responses. In this study, we identified nine *CRF* genes from the rice genome by conducting a BLAST analysis using the protein sequences of twelve *Arabidopsis* AtCRFs. These genes are located on seven different rice chromosomes. We conducted a comprehensive analysis of the conserved domains, physicochemical properties, secondary structures, and phylogenetic relationships of rice CRF proteins using various online tools and local software. Additionally, we analyzed the exon-intron structures and *cis*-acting elements of *OsCRFs*, and found an abundance of elements relevant to phytohormone response and stress response on the promoters of rice *CRF* genes. Spatial-temporal expression pattern analysis revealed that four of the *OsCRFs* were barely expressed in all tested samples, while the other five were highly expressed in the leaf, panicle, or seed of rice. Microarray data showed that *OsCRF* genes are regulated to varying degrees by abscisic acid, auxin, cytokinin, and jasmonic acid. Furthermore, through analyzing the RNA-seq data, we found that *OsCRFs* are primarily involved in plant response to temperature stress (chilling and heat), with several *OsCRFs* also implicated in drought response, while hardly any respond to salt stress. This study provides an important basis for the functional characterization of rice *CRF* family genes.

Keywords: rice; cytokinin response factors; gene family analysis; expression profile

细胞分裂素(cytokinin, CK)在植物的正常生长发育和复杂环境适应等生命活动中具有广泛的生物学功能。CK的信号转导是一个由双元组分系统介导的磷酸接力传递过程,该系统主要包括一系列组氨酸蛋白激酶(histidine kinase, AHK)、磷酸转运蛋白(histidine phosphotransfer protein, AHP)和反应调节因子(response regulator, ARR)等^[1]。除此之外,由细胞分裂素响应因子(cytokinin response factors, CRFs)组成的分支通路在CK信号传导过程中也发挥着重要作用^[2]。

CRF属于APETALA2/乙烯响应因子(APETALA2/ethylene response factors, AP2/ERF)转录因子超

家族的亚组成员。除AP2结构域之外,CRF家族还含有本亚组所特有的CRF结构域,该结构域主要参与CRF蛋白之间以及CRF与磷酸转运蛋白之间的相互作用,进而调节植物的CK信号传导通路^[3-4]。拟南芥基因组中存在12个*AtCRF*基因,主要在维管系统中表达,但它们的时空表达模式具有一定差异。比如在根中,*AtCRF1*仅在靠近下胚轴的部位表达,而*AtCRF2*在整个主根和侧根中均有表达;在叶片中,*AtCRF1*主要在第一对叶片的发育早期表达,而*AtCRF6*则特异地高表达于成熟叶片^[5]。类似地,番茄*SICRF1*高表达于成熟的器官,而

SICRF2 则在幼嫩的部位表达量较高^[6]。

在细胞分裂素信号通路中, CK 信号经 AHK、AHP 传递至 B 类 ARR 响应因子并将后者激活, ARR 通过结合 *CRF* 基因(如 *AtCRF2*)的启动子上调其表达量。同时, AHP 也与 *CRF* 蛋白互作, 并介导 *CRF* 在细胞核的积累, *CRF* 作为转录因子与 B 类 ARR 共同调节下游 CK 响应基因的表达^[4,7-8]。除了 CK, *CRF* 基因在其他植物激素的信号通路中也具有一定功能。研究发现, *AtCRF2* 和 *AtCRF6* 可与生长素外向转运载体基因 *PIN1* 和 *PIN7* 的启动子结合, 通过调节其表达量调控生长素在体内的分布^[9]。乙烯处理下, 番茄 *SICRF1* 受诱导上调表达, *SICRF7* 则下调表达; *SICRF6* 在茉莉酸(jasmonic acid, JA)处理下也发生了下调^[10]。白菜的 *CRF* 基因还受到脱落酸(abscisic acid, ABA)的调控, 部分基因的表达量在 ABA 处理下显著升高, 而有些则受到 ABA 的抑制^[11]。

CRF 基因还广泛参与植物的非生物学胁迫应答。刚毛柞柳 *ThCRF1* 基因响应盐胁迫和渗透胁迫, 其过量表达能够促进渗透调节物质的积累, 并提高抗氧化酶的活性, 进而增强植物的耐盐性^[12]。*AtCRF6* 通过抑制细胞分裂素相关基因的表达介导氧化胁迫应答, 在胁迫条件下其过量表达能够增强植物的光合效率和主根生长^[13]。*AtCRF2*、*AtCRF3* 和 *AtCRF4* 受冷胁迫诱导表达, 前两者调控侧根起始过程, 通过促进侧根发育提高植株对冷胁迫的适应能力; 在冻害条件下, *AtCRF4* 的过表达植株抗性增强, 而其突变体则表现为敏感表型^[8,14]。除此之外, *CRF* 基因在高温、干旱等环境条件下的作用也已有相关报道^[6,15]。

CRF 基因生物学功能的解析主要集中于模式植物拟南芥和番茄, 在白菜^[11]、大豆^[16]以及苹果^[17]等物种中也进行了全基因组鉴定, 但对水稻 *CRF* 基因目前还缺乏了解。本研究利用同

源比对方法鉴定了水稻 *CRF* 家族基因, 对其序列信息、理化性质、进化关系、基因结构和启动子顺式作用元件等进行了系统分析。此外, 研究还对水稻细胞分裂素响应因子(*Oryza sativa* *CRF*, *OsCRF*)基因的表达模式进行了分析, 以期为解析该家族基因的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 水稻 *CRF* 家族基因的鉴定

从拟南芥信息资源网站(The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>)下载 12 个 *AtCRF* 蛋白(*AtCRF1/At4g11140*、*AtCRF2/At4g23750*、*AtCRF3/At5g53290*、*AtCRF4/At4g27950*、*AtCRF5/At2g46310*、*AtCRF6/At3g61630*、*AtCRF7/At1g22985*、*AtCRF8/At1g71130*、*AtCRF9/At1g49120*、*AtCRF10/At1g68550*、*AtCRF11/At3g25890* 和 *AtCRF12/At1g25470*)的氨基酸序列, 从 Phytozome 数据库(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)下载水稻基因组蛋白序列文件, 将两者进行 BLAST 比对。对获得的候选序列进行进一步筛选, 删除重复基因和短序列, 最后得到水稻 *OsCRF* 基因家族成员。将水稻 *CRF* 基因的 ID 号输入 Phytozome 检索, 获得其染色体定位信息以及 DNA 序列、编码序列(coding sequence, CDS)和编码氨基酸的长度信息。

1.2 多序列比对

从 Phytozome 数据库下载各 *OsCRF* 蛋白的氨基酸序列, 利用 ClustalX 软件对拟南芥和水稻的 *CRF* 蛋白进行多序列比对, 并根据比对结果分析保守结构域。

1.3 理化性质与二级结构分析

将 *OsCRF* 蛋白的氨基酸序列输入 ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)网站, 根据检索结果记录分子量、理论等电点、不

稳定指数、脂溶指数以及总平均亲水性等理化参数。将蛋白序列输入 SOPMA (self-optimized prediction method from alignment, https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)在线工具, 预测分析其二级结构组成。

1.4 进化树构建与基因结构分析

将 *OsCRF* 的蛋白序列输入 MEGAX 软件, 首先利用 ClustalW 算法进行多序列比对, 之后以邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, 并通过步长检验(bootstrap method)检验建树质量, 次数设置为 1 000。遗传距离计算模型选择 JTT model, 选择 complete deletion 删除多序列比对中空位较多的列。从 Phytozome 数据库下载水稻基因组注释文件, 将其与 *OsCRF* 基因的 ID 号输入 TBtools 软件, 进行基因结构的可视化。

1.5 启动子分析

提取各 *OsCRF* 基因翻译起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 的 DNA 序列, 之后导入 PlantCARE 网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)预测顺式作用元件, 筛选植物激素和胁迫应答相关的元件, 并通过 TBtools 软件对其在启动子上的分布进行可视化。

1.6 时空表达与激素处理下的表达模式分析

在水稻基因表达数据库 RED (<http://expression.ic4r.org/index>)检索 *OsCRF* 基因, 记录其在不同器官(幼苗根、幼苗地上部分、成熟叶片、抽穗前的花序、开花后的稻穗和种子)中的表达数据每千个碱基的转录每百万映射读取的片段 (fragments per kilobase of exon model per

million mapped reads, FPKM)值, 经 \log_2 标准化后绘制层次聚类热图。从水稻表达谱数据库 RiceXPro (<https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/>)下载 *OsCRF* 基因在植物激素 ABA、生长素、CK 以及 JA 处理前后的基因芯片数据, 利用 Microsoft Excel 处理数据并绘制柱形图。

1.7 非生物胁迫下的表达模式分析

于 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载水稻在冷胁迫(GSE67373)^[18]、高温胁迫(GSE144566)^[19]、干旱胁迫(GSE74465)^[20]以及盐胁迫(GSE109617)^[21]下的转录组测序数据, 提取 *OsCRF* 基因的表达量数据 FPKM 或每千个碱基的转录每百万映射读取的 reads (reads per kilobase of exon model per million mapped reads, RPKM)值, 输入 TBtools 软件绘制聚类热图。

1.8 冷胁迫下 *OsCRFs* 表达模式的实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)验证

生长 2 周的水稻(日本晴)幼苗进行 4 °C 冷胁迫处理, 24 h 后对地上部分进行取材。利用北京全式金生物技术有限公司 EasyPure[®] Plant RNA Kit 提取总 RNA, 以此为模板通过 TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录获得 cDNA。以 *OsActin1* 作为内参, 设计基因特异性引物(表 1), 利用 TransStart[®] Top Green qPCR SuperMix 进行 qRT-PCR 实验, 上述操作均按照说明书进行。最后通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 分析所用引物

Table 1 Primers used in qRT-PCR analysis

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>OsCRF1</i>	ATTTGGGGCTGTCGTCTCTG	GACGAGTTGCAATGCGACGA
<i>OsCRF4</i>	CTGAGGGTCCAATTATCCGTAA	ACCTTACCAAATCAGGTCACAT
<i>OsCRF5</i>	GCAACCAGCAGCAATGTTATTA	GCCACCACCATTTACTACTACT
<i>OsCRF7</i>	GCTTTGCTTCTCCTGCATTAGG	GTCAACACCACAATGTCACAAC
<i>OsCRF9</i>	GATTCGATGGGCGCTGTTC	AACGCATCTGCAAGCCTAGT
<i>OsActin1</i>	TCATAGGAATGGAAGCTGCG	AGGAGCCAAGGCAGTGATCT

2 结果与分析

2.1 水稻 *CRF* 家族基因的鉴定及其序列信息

将拟南芥 CRF 蛋白序列与水稻基因组蛋白序列进行本地 BLAST 比对, 结果共筛选得到 9 个 *CRF* 基因, 不均匀地分布在水稻 7 条染色体上(表 2)。1 号染色体上分布最多, 为 3 个; 3、5、6、7、8 和 9 号染色体上各含有 1 个 *CRF* 基因。为方便后续研究, 将该家族基因依次命名为 *OsCRF1*–*OsCRF9*。利用 Phytozome 数据库, 对水稻 *CRF* 基因的序列信息进行了检索记录。

表 2 水稻 *CRF* 家族基因的序列信息

Table 2 Sequence information of the rice *CRF* family genes

Gene name	Gene ID	Chromosome	Start	End	Gene length (bp)	CDS length (bp)	Peptide length (aa)
<i>OsCRF1</i>	LOC_Os01g04020	1	1 746 415	1 748 549	2 134	1 017	338
<i>OsCRF2</i>	LOC_Os01g12440	1	6 813 713	6 815 546	1 833	1 143	380
<i>OsCRF3</i>	LOC_Os01g46870	1	26 734 013	26 735 516	1 503	900	299
<i>OsCRF4</i>	LOC_Os03g60120	3	34 192 416	34 193 650	1 234	726	241
<i>OsCRF5</i>	LOC_Os05g25260	5	14 662 778	14 664 671	1 893	846	281
<i>OsCRF6</i>	LOC_Os06g06540	6	3 067 708	3 068 737	1 029	1 029	342
<i>OsCRF7</i>	LOC_Os07g12510	7	7 139 565	7 140 775	1 210	849	282
<i>OsCRF8</i>	LOC_Os08g27220	8	16 620 170	16 621 109	939	939	312
<i>OsCRF9</i>	LOC_Os09g13940	9	8 199 883	8 203 350	3 467	957	318

OsCRF 基因的 DNA 长度在 939–3 467 bp 之间, 其中 *OsCRF8* 的序列最短, 而 *OsCRF9* 的序列最长。CDS 长度在 726–1 143 bp 之间, 最短的是 *OsCRF4*, 编码 241 个氨基酸; 最长的是 *OsCRF2*, 编码 380 个氨基酸。

2.2 *CRF* 蛋白的多序列比对及保守结构域分析

利用 ClustalX 软件对拟南芥和水稻的 *CRF* 蛋白进行多序列比对, 并分析其保守结构域。如图 1 所示, 除 AP2 结构域之外, 所有的 AtCRF 和 OsCRF 蛋白还含有 1 个保守的 CRF 结构域, 进一步说明了筛选到的 9 个基因均属于 *CRF* 家族。

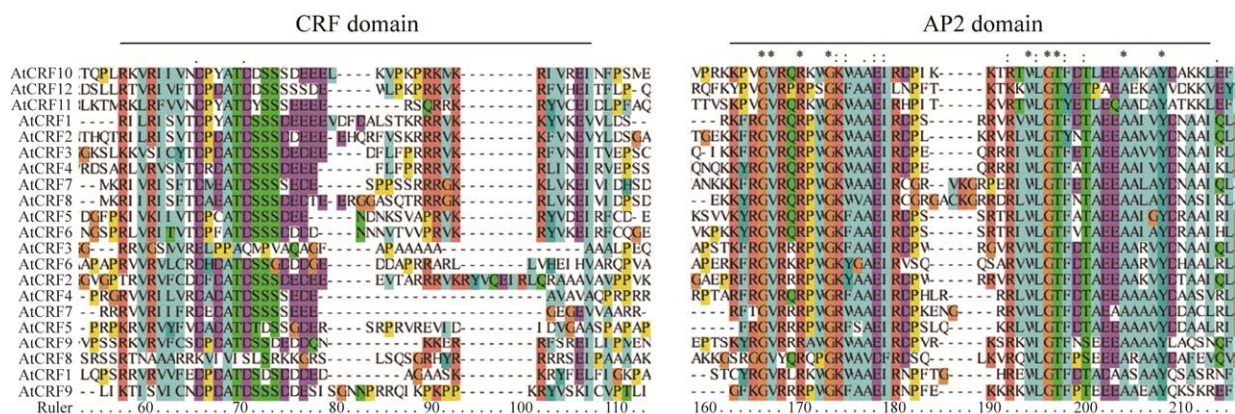


图 1 拟南芥和水稻 *CRF* 蛋白的多序列比对

Figure 1 Multiple sequence alignment of *Arabidopsis* and rice *CRF* proteins.

2.3 水稻 CRF 蛋白的理化性质与二级结构

利用 ExPasy ProtParam 工具对水稻 CRF 家族蛋白的基本理化性质进行预测分析(表 3)。OsCRF 蛋白的分子量在 30.33–40.51 kDa 之间。OsCRF1、OsCRF2、OsCRF3、OsCRF6 以及 OsCRF9 的理论等电点低于 7, 最低为 4.48; 其余 4 个 CRF 蛋白的理论等电点在 7 以上, 最高为 10.21。根据预测结果来看, OsCRF 蛋白的不稳定指数均高于 40, 说明为不稳定蛋白。同时, 所有 CRF 蛋白的脂溶指数都小于 100, 且亲水性平均值(grand average of hydropathicity, GRAVY)小于 0, 表明 OsCRF 蛋白均为脂溶性亲水蛋白。在水稻 CRF 蛋白的二级结构中, 无规则卷曲占比最高, 为 46.15% (OsCRF1)–61.41% (OsCRF4), 其次是 α 螺旋, 占 20.21% (OsCRF7)–37.87% (OsCRF1), 然后是延伸链, 占 9.36% (OsCRF3)–16.99% (OsCRF8), β 转角占比最低, 仅为 2.37% (OsCRF2)–6.73% (OsCRF8)。

2.4 CRF 蛋白的系统进化关系分析

利用 MEGA 软件以拟南芥和水稻 CRF 蛋白的氨基酸序列构建系统进化树。由图 2 可以看出, OsCRF8 与其他 CRF 蛋白亲缘关系较远, 位于一个单独分支, 而剩余的 CRF 蛋白可分为

2 个亚家族。亚家族 I 中 CRF 成员较多, 有 8 个 AtCRF 和 6 个 OsCRF 蛋白, 且水稻和拟南芥的 CRF 分别属于 2 个分支, 表明该亚家族中 CRF 基因的进化具有一定种属特异性。亚家族 II 中包含 4 个 AtCRFs 和 2 个 OsCRFs, 2 个水稻 CRF 蛋白(OsCRF1 和 OsCRF9)与拟南芥 AtCRF9 亲缘关系较近, 三者位于 1 个分支; 而 AtCRF10、AtCRF11 和 AtCRF12 位于另外 1 个分支。

2.5 水稻 CRF 家族的基因结构

基因结构分析常用来比较家族各基因间的遗传多样性。本研究利用水稻的基因组注释文件, 对 *OsCRF* 基因的外显子-内含子结构进行了分析。如图 3 所示, 水稻 9 个 CRF 基因的编码区均由 1 个完整的外显子构成。*OsCRF6* 和 *OsCRF8* 无非翻译区(non-translation region, UTR)序列; *OsCRF7* 不含 5'UTR, 但含有 3'UTR; *OsCRF1* 和 *OsCRF9* 的 5'UTR 区含内含子序列, 且后者有多段内含子片段, 这也是 *OsCRF9* 基因 DNA 序列较长的原因。其余 4 个基因(*OsCRF2*、*OsCRF3*、*OsCRF4* 及 *OsCRF5*)的 5' 端和 3' 端各含有 1 个长度不等的 UTR 区。以上结果表明, *OsCRF* 基因在进化过程中产生了较高的序列多样性。

表 3 水稻 CRF 蛋白的理化参数与二级结构

Table 3 Physicochemical parameters and secondary structures of rice CRF proteins

Protein	Molecular weight (kDa)	pI	Instability index	GRAVY	Aliphatic index	Secondary structure (%)			
						Alpha helix	Beta turn	Random coil	Extended strand
OsCRF1	36.53	4.75	58.83	-0.526	61.66	37.87	6.21	46.15	9.76
OsCRF2	40.51	4.83	57.78	-0.322	71.39	29.21	2.37	57.63	10.79
OsCRF3	31.54	4.48	64.35	-0.404	59.50	28.09	3.01	59.53	9.36
OsCRF4	25.49	10.21	59.87	-0.421	68.92	20.33	5.81	61.41	12.45
OsCRF5	30.33	9.72	68.12	-0.579	61.32	29.89	3.56	56.94	9.61
OsCRF6	36.46	4.85	65.86	-0.432	65.18	26.32	5.26	51.75	16.67
OsCRF7	30.60	10.12	90.17	-0.664	70.67	20.21	4.96	60.99	13.83
OsCRF8	33.36	9.15	69.00	-0.568	63.04	22.44	6.73	53.85	16.99
OsCRF9	35.68	5.36	51.80	-0.606	75.41	33.02	4.72	46.23	16.04

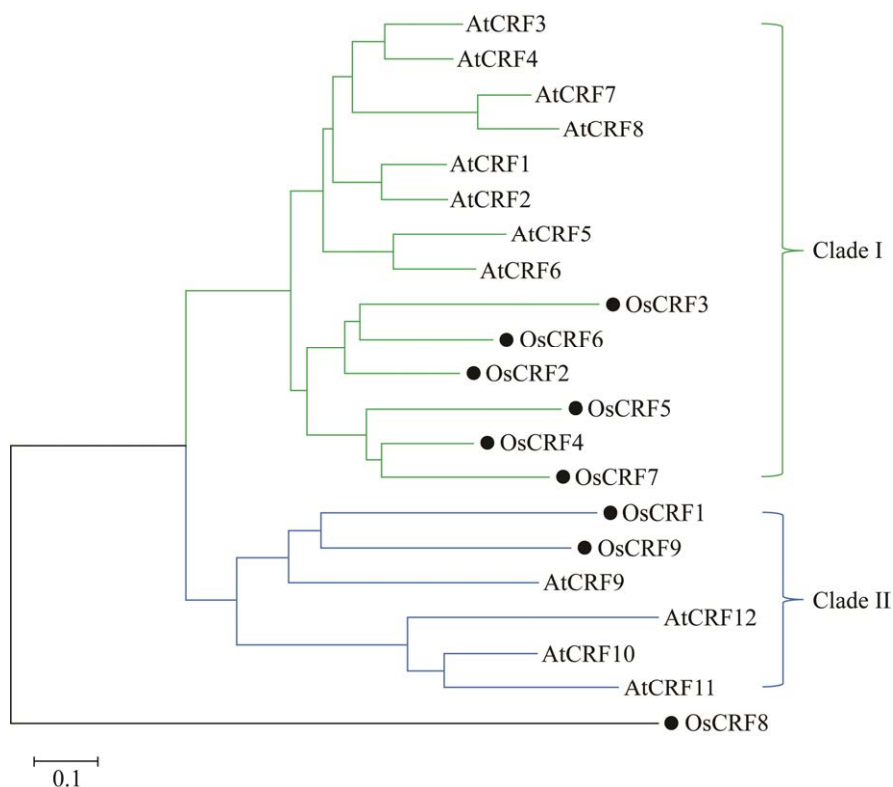


图 2 拟南芥和水稻 *CRF* 蛋白的系统进化关系

Figure 2 Phylogenetic relationships between *Arabidopsis* and rice *CRF* proteins. The *OsCRFs* were marked with black dot.

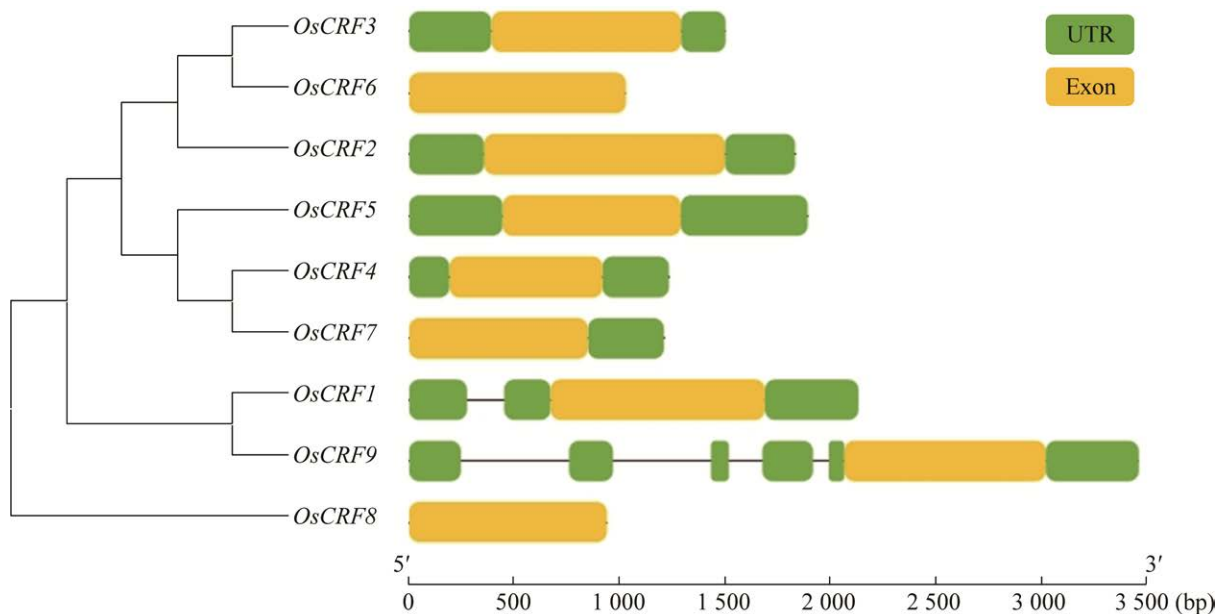


图 3 水稻 *OsCRFs* 的基因结构

Figure 3 Gene structure of rice *OsCRFs*.

2.6 水稻 *CRF* 基因的顺式作用元件分析

CRF 基因广泛参与植物激素信号通路和非生物胁迫应答^[16]。为初步了解 *OsCRF* 基因可能的生物学功能, 对其启动子区的顺式作用元件进行了分析(图 4)。在 *OsCRF* 基因的启动子区, 发现了大量植物激素相关的应答元件, 其中所有基因均含有 ABA 响应元件 ABRE、MeJA 响应元件 CGTCA-motif 与 TGACG-motif, 暗示水稻 *CRF* 基因在这 2 种激素的信号通路中发挥一定的作用; 此外, 部分基因的启动子还存在其他激素的响应元件, 包括生长素响应元件 (TGA-element、AuxRR-core)、赤霉素响应元件 (P-box、GARE-motif) 以及水杨酸响应元件 (TCA-element)。非生物胁迫响应元件主要有厌氧诱导元件 ARE、干旱诱导元件 MBS、低温响应元件 LTR 和创伤响应元件 WUN-motif, 它们不均匀地分布于部分 *OsCRF* 基因的启动子区。

2.7 水稻 *CRF* 基因的时空表达模式

从 RED 数据库下载水稻各 *CRF* 基因在不同器官中的表达数据, 绘制层次聚类热图(图 5)。结果显示, 4 个基因(*OsCRF2*、*OsCRF3*、*OsCRF6* 与 *OsCRF8*)在各个器官中的表达量均比较低, 而另外 5 个基因在不同器官中均有一定的表达, 但表达水平各有差异。*OsCRF7* 高表达于

幼苗的地上部分和成熟叶片; *OsCRF5* 在种子中表达量最高, 其次是在开花后的稻穗中; *OsCRF9* 在成熟叶片和抽穗前的花序中表达量最高。*OsCRF4* 和 *OsCRF1* 的表达量明显高于其他基因, 其中 *OsCRF4* 在成熟叶片中表达量最高; 而 *OsCRF1* 在抽穗前的花序、开花后的稻穗以及种子中表达量最高, 可能参与了水稻种子的发育过程。以上结果表明, 水稻 *CRF* 基因可能在各器官的生长发育过程中发挥一定的生物学功能。

2.8 不同激素处理下 *OsCRF* 基因的表达模式

有研究指出, *CRF* 基因能够介导多种植物激素的信号转导通路^[22]。为明确 *OsCRFs* 是否响应激素信号, 本研究通过检索基因芯片数据, 分析了水稻植株中表达量较高的 5 个基因在 ABA、生长素、CK 和 JA 处理下的表达量变化。整体来看, 不同基因在各激素处理下的表达模式不尽相同。*OsCRF1* 的表达水平在 ABA、生长素和 CK 这 3 种激素处理后没有太大的变化; 在 JA 处理后则呈现先下降后上升然后再下降的趋势(图 6A)。*OsCRF4* 在 ABA 处理 3 h 后表达量显著升高, 但随后又降至正常水平; JA 处理下该基因的表达量随时间逐渐下降(图 6B)。*OsCRF5*

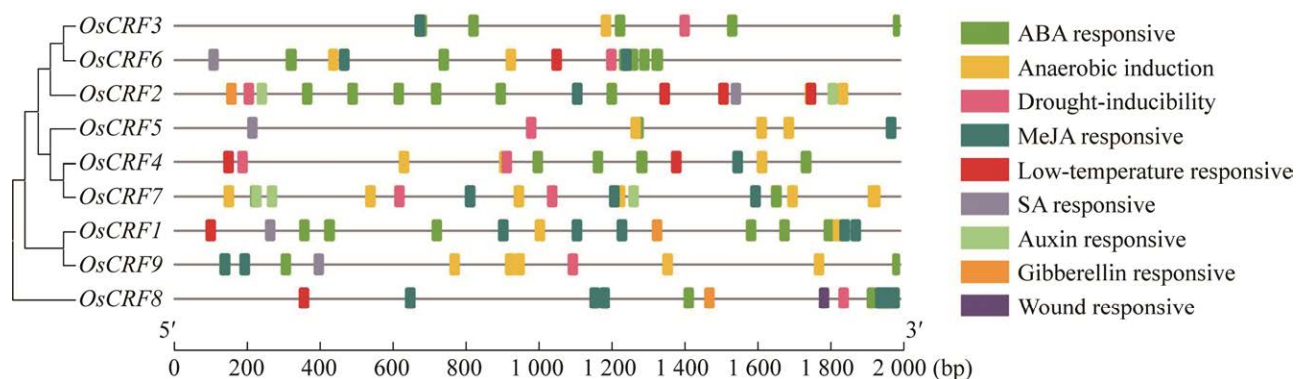


图 4 水稻 *CRF* 基因启动子区的顺式作用元件

Figure 4 *cis*-acting elements on the promoters of rice *CRF* genes.

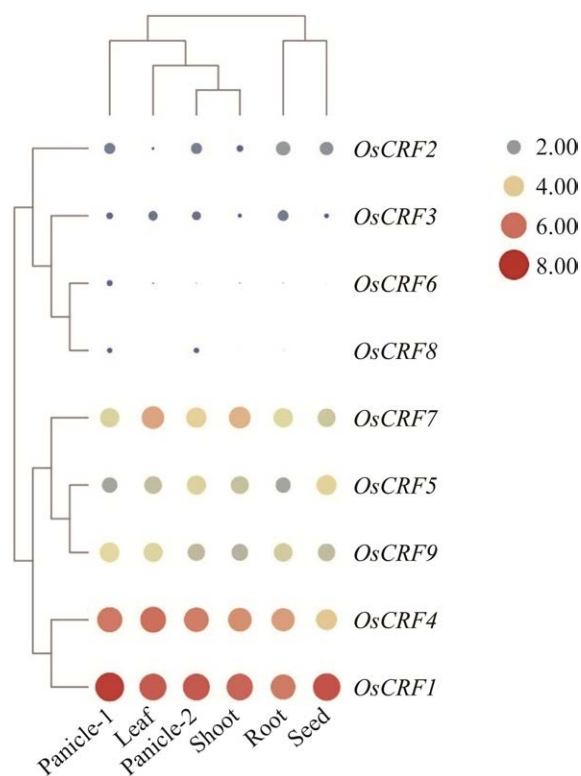


图5 水稻 *CRF* 基因的组织表达模式

Figure 5 Tissue expression patterns of rice *CRF* genes. Panicle-1: The panicle 7 d before heading; Leaf: Mature leaf; Panicle-2: The panicle 7 d after flowering; Shoot: 7 d seedling shoot; Root: 7 d seedling root; Seed: Mature seed.

和 *OsCRF7* 在激素处理下的表达模式具有较高的相似性(图 6C, 6D), ABA 处理后, 两者表达量均逐渐升高, 并在 3 h 时达到峰值, 随后表达量降低, 但仍显著高于正常水平; 生长素处理 3 h 后, *OsCRF5* 和 *OsCRF7* 的表达量轻微上调, 但并未超过 2 倍; JA 处理主要显著上调 *OsCRF5* 的表达, 而 *OsCRF7* 呈现先升高后降低随后又升高的趋势; CK 处理下, *OsCRF5* 发生了显著的上调表达, 但 *OsCRF7* 的表达量无明显变化。*OsCRF9* 的表达模式类似于 *OsCRF1*, ABA 和生长素处理 3 h 后该基因轻微上调, 而 JA 处理下则同样呈现先下降后上升然后再下降的趋势(图 6E)。

2.9 非生物胁迫下 *OsCRF* 基因的表达模式

通过分析转录组测序数据, 研究了 *OsCRFs* 在低温、高温、干旱以及盐胁迫下表达水平的变化, 以揭示其是否参与水稻的非生物胁迫应答过程。冷胁迫下, 所有能检测到的 *OsCRF* 基因(部分基因由于表达水平过低而未检测到表达量)均发生了明显的上调表达, 例如 *OsCRF2*, 正常条件下的表达量相对较低, 低温处理后提升了 13 倍; 而 *OsCRF9* 的表达量更是提升了近 30 倍; 其他基因则上调了 4–10 倍不等(图 7A)。高温条件下, *OsCRF2* 同样受到明显的诱导表达; 此外, *OsCRF5* 和 *OsCRF9* 也发生了较高等度的上调, 分别升高了 5.8 倍和 3.6 倍; *OsCRF1* 和 *OsCRF4* 呈现上调趋势, 但上调程度较低; *OsCRF7* 的表达不受高温的影响(图 7B)。干旱胁迫下, 大多数基因并未发生超过 2 倍的上调或下调, 但 *OsCRF7* 的表达水平明显提高, 且随处理时间持续上升; *OsCRF4* 在干旱处理 1 h 后下调了约 55%, 6 h 时基本恢复正常(图 7C), 说明 *OsCRF4* 和 *OsCRF7* 参与水稻的干旱胁迫应答, 但两者的作用机制或作用途径并不一致。盐胁迫处理后, 仅 *OsCRF3* 表现一定的上调趋势, 其他基因的表达量均未发生明显变化(图 7D), 因此 *OsCRFs* 可能不参与水稻的盐胁迫应答过程。

2.10 冷胁迫下基因表达量的 qRT-PCR 验证

转录组数据显示大多数 *OsCRF* 基因参与了冷胁迫应答, 为检验其准确性, 选择在水稻各器官中表达量较高的 *OsCRF1*、*OsCRF4*、*OsCRF5*、*OsCRF7* 和 *OsCRF9* 进行 qRT-PCR 验证。如图 8 所示, 冷胁迫处理 24 h 后, 5 个基因的表达量均发生了显著提高, 其中 *OsCRF9* 上调了 20 多倍, 其他 4 个基因的表达量也升高了 2–8 倍, 这与转录组分析的结果基本一致。以上结果表明 *OsCRFs* 在水稻的低温胁迫应答中可能发挥着重要作用。

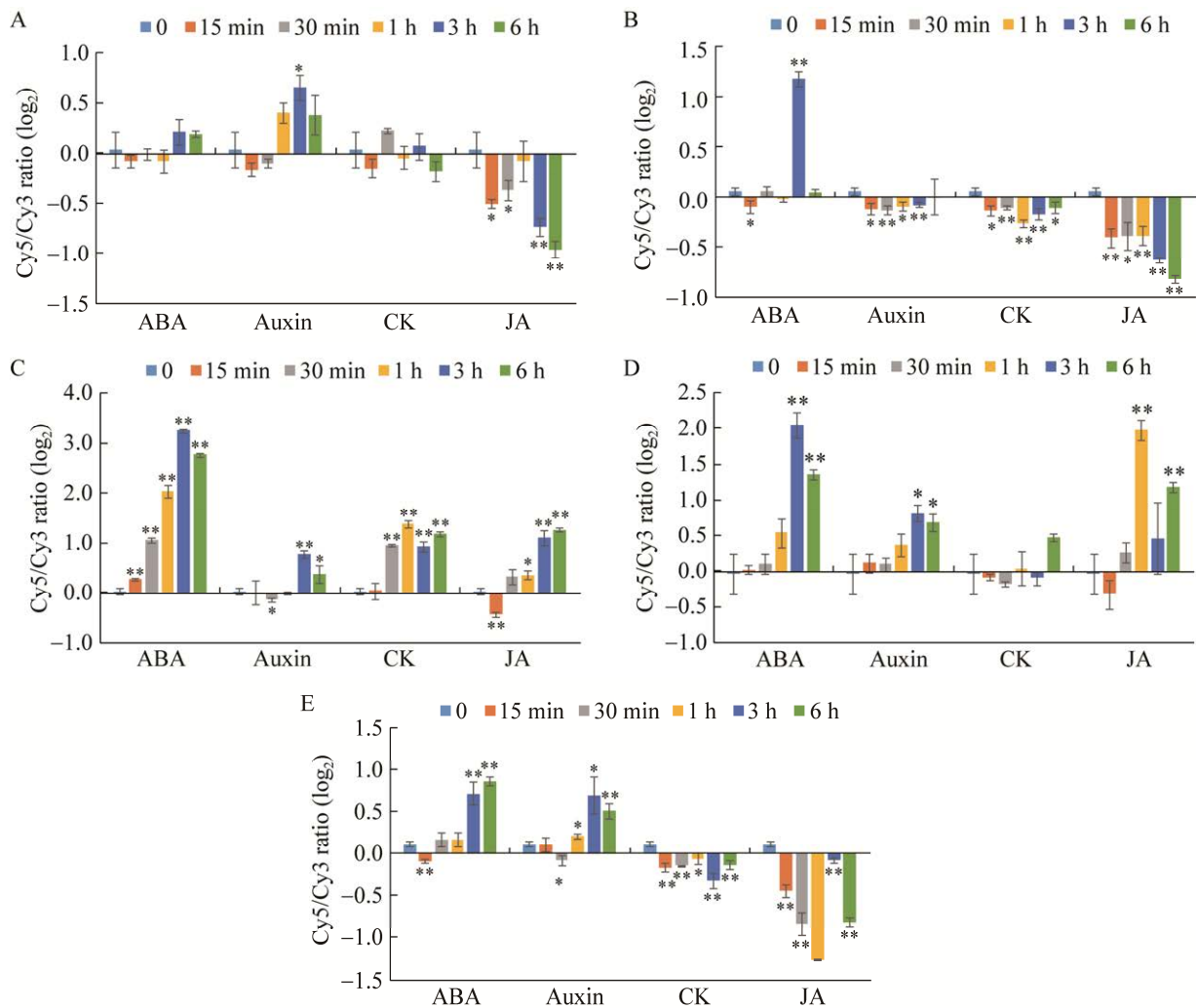


图 6 植物激素处理下水稻 *CRF* 基因的表达模式

Figure 6 Expression patterns of rice *CRF* genes under phytohormone treatment. A: *OsCRF1*. B: *OsCRF4*. C: *OsCRF5*. D: *OsCRF7*. E: *OsCRF9*. Cy5: Cyanine 5, Cy3: Cyanine 3, ABA: Abscisic acid, CK: Cytokinin, JA: Jasmonic acid. * and ** represent significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively.

3 讨论与结论

CRF 基因在植物中普遍存在, 属于 AP2/ERF 超家族的亚组成员^[23]。除了模式植物拟南芥, 在一些作物中也对该家族基因进行了鉴定, 如白菜和大豆基因组中各存在 21 个和 26 个 *CRF* 基因^[11,16]。本研究以拟南芥 12 个 *CRF* 蛋白的氨基酸序列为参考, 通过同源比对的方法, 从水稻基因组中共鉴定出 9 个 *CRF* 基因,

定位在水稻的 7 条染色体上。在结构上, 它们均包含由约 50 个氨基酸组成的 AP2 结构域和由约 40 个氨基酸组成的 *CRF* 结构域。

早期的研究将 *CRF* 家族分为 2 个亚家族^[3], 之后 Zwack 等又根据蛋白序列的差异, 进一步将被子植物的 *CRF* 家族细分为 5 个亚家族^[5]。但对于具体的物种来说, 由于经历了不同的基因复制和基因丢失事件, 情况会有所差异。在经济作物苹果中, *CRF* 家族被划分为 3 个亚组, 且

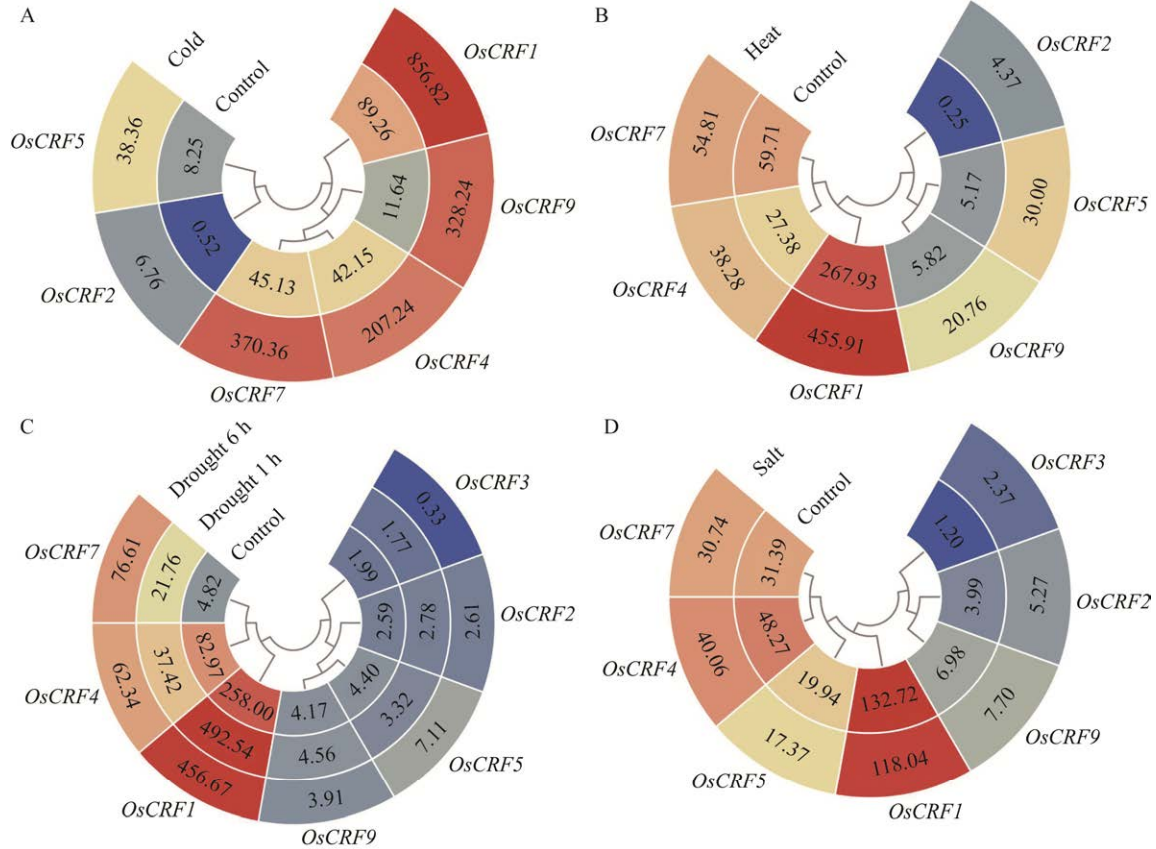


图 7 非生物胁迫下水稻 *CRF* 基因的表达模式

Figure 7 Expression patterns of rice *CRF* genes under abiotic stress. A: Expression level of *OsCRFs* under cold stress (numbers in color patches denote RPKM values). B: Expression level of *OsCRFs* under heat stress (numbers in color patches denote FPKM values). C: Expression level of *OsCRFs* under drought stress (numbers in color patches denote FPKM values). D: Expression level of *OsCRFs* under salt stress (numbers in color patches denote FPKM values).

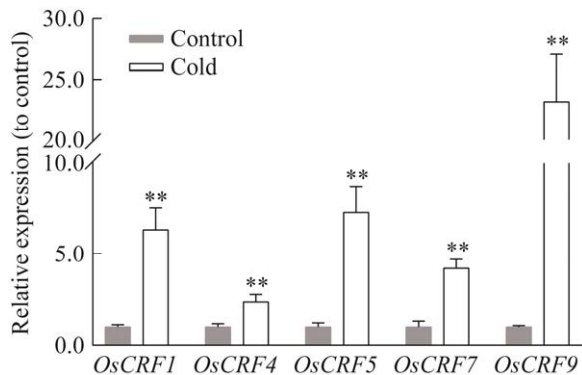


图 8 冷胁迫下 *OsCRF* 基因的 qRT-PCR 分析

Figure 8 qRT-PCR analysis of *OsCRF* genes under cold stress. ** represent a significant difference at 0.01 level.

每个亚组中 *CRF* 蛋白的分布相对均匀^[17]。经系统进化关系分析，水稻的 *CRF* 蛋白也被分为 3 个亚家族，其中 *OsCRF8* 位于一个单独的分支，且与其他 *CRF* 蛋白亲缘关系较远，推测在进化中该基因较早地与家族成员分离开来。亚家族 I 中 *AtCRFs* 和 *OsCRFs* 各处于一个分支，说明在进化过程中该族 *CRF* 的分化可能晚于拟南芥和水稻的分化时间。

虽然最早以细胞分裂素响应因子命名，但并不是所有的 *CRF* 都参与 CK 信号通路。在番茄 11 个 *CRF* 基因中，仅 3 个(*SICRF2*、*SICRF3*、*SICRF5*)受 CK 的强烈诱导，其余均不响应 CK

或仅微弱上调^[10]。拟南芥 *CRF1*、*CRF3* 以及 *CRF4* 的表达量在 CK 处理下也未发生明显改变^[7]。在水稻 *CRF* 基因的启动子区,发现了大量与 ABA 和 JA 响应相关的顺式作用元件。激素处理下的基因芯片数据显示,多数 *OsCRFs* 在 ABA 或 JA 处理下出现了显著的上调或下调表达,检测的 5 个 *OsCRF* 基因均响应 JA 信号,4 个响应 ABA 信号,而仅有 *OsCRF5* 在 CK 处理 30 min 后出现了持续的上调表达,其余基因几乎不受 CK 的影响。在其他作物中,*CRF* 基因也有类似的表现,能够不同程度地应答多种植物激素信号^[10,11,15]。因此,*CRF* 类基因可能在不同植物激素的交叉互作中起着关键的节点作用。

已有研究证实,*CRF* 基因参与了根系生长^[24]、生殖发育^[25-26]和花青苷积累^[27]等过程。本研究发现水稻各 *OsCRF* 基因在幼苗、成熟叶片、花序以及种子等部位均有一定的表达,暗示 *OsCRFs* 在水稻的各个部位以及各生长发育阶段可能发挥相应的生物学功能。此外,*OsCRF* 基因还参与了水稻的非生物胁迫应答,特别是在冷胁迫下,6 个基因的表达量明显提高。有趣的是,在大豆中也发现了相似的现象,几乎全部 *GmCRFs* 都响应冷胁迫,且受冷胁迫的强烈诱导^[16]。高温条件下,*OsCRFs* 也出现了不同程度的上调表达。推测 *OsCRF* 基因在水稻的温度信号传导及胁迫响应过程中起着至关重要的作用。

综上所述,本研究对水稻 *CRF* 家族进行了全基因组鉴定和系统的生物信息学分析,并着重分析了其在不同器官、植物激素处理和非生物胁迫下的表达模式,为深入研究 *OsCRFs* 在生长发育调控、激素信号通路以及复杂环境适应等方面的生物学功能和分子机制提供了参考依据。

REFERENCES

[1] WU WQ, DU K, KANG XY, WEI HR. The diverse

roles of cytokinins in regulating leaf development[J]. Horticulture Research, 2021, 8(1): 118.

- [2] HALLMARK HT, RASHOTTE AM. Review-cytokinin response factors: responding to more than cytokinin[J]. Plant Science, 2019, 289: 110251.
- [3] RASHOTTE AM, GOERTZEN LR. The CRF domain defines cytokinin response factor proteins in plants[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 74.
- [4] CUTCLIFFE JW, HELLMANN E, HEYL A, RASHOTTE AM. CRFs form protein-protein interactions with each other and with members of the cytokinin signalling pathway in *Arabidopsis* via the CRF domain[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(14): 4995-5002.
- [5] ZWACK PJ, SHI XL, ROBINSON BR, GUPTA S, COMPTON MA, GERKEN DM, GOERTZEN LR, RASHOTTE AM. Vascular expression and C-terminal sequence divergence of cytokinin response factors in flowering plants[J]. Plant and Cell Physiology, 2012, 53(10): 1683-1695.
- [6] SHI XL, GUPTA S, RASHOTTE AM. Characterization of two tomato *AP2/ERF* genes, *SICRF1* and *SICRF2* in hormone and stress responses[J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(1): 35-45.
- [7] RASHOTTE AM, MASON MG, HUTCHISON CE, FERREIRA FJ, SCHALLER GE, KIEBER JJ. A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(29): 11081-11085.
- [8] JEON J, CHO C, LEE MR, van BINH N, KIM J. Cytokinin response factor2 (CRF2) and CRF3 regulate lateral root development in response to cold stress in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2016, 28(8): 1828-1843.
- [9] ŠIMÁŠKOVÁ M, O'BRIEN JA, KHAN M, van NOORDEN G, ÖTVÖS K, VIETEN A, de CLERCQ I, van HAPEREN JMA, CUESTA C, HOYEROVÁ K, VANNESTE S, MARHAVÝ P, WABNIK K, van BREUSEGEM F, NOWACK M, MURPHY A, FRIML J, WEIJERS D, BEECKMAN T, BENKOVÁ E. Cytokinin response factors regulate PIN-FORMED auxin transporters[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8717.
- [10] SHI XL, GUPTA S, RASHOTTE AM. *Solanum lycopersicum* cytokinin response factor (*SICRF*) genes: characterization of CRF domain-containing *ERF* genes in tomato[J]. Journal of Experimental Botany, 2012,

- 63(2): 973-982.
- [11] LIU ZN, KONG LJ, ZHANG M, LV YX, LIU YP, ZOU M, LU G, CAO JS, YU XL. Genome-wide identification, phylogeny, evolution and expression patterns of *AP2/ERF* genes and cytokinin response factors in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83444.
- [12] QIN LP, WANG LQ, GUO Y, LI Y, ÜMÜT H, WANG YC. An ERF transcription factor from *Tamarix hispida*, ThCRF1, can adjust osmotic potential and reactive oxygen species scavenging capability to improve salt tolerance[J]. Plant Science, 2017, 265: 154-166.
- [13] ZWACK PJ, de CLERCQ I, HOWTON TC, HALLMARK HT, HURNY A, KESHISHIAN EA, PARISH AM, BENKOVA E, MUKHTAR MS, van BREUSEGEM F, RASHOTTE AM. Cytokinin response factor 6 represses cytokinin-associated genes during oxidative stress[J]. Plant Physiology, 2016, 172(2): 1249-1258.
- [14] ZWACK PJ, COMPTON MA, ADAMS CI, RASHOTTE AM. Cytokinin response factor 4 (CRF4) is induced by cold and involved in freezing tolerance[J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(3): 573-584.
- [15] GUPTA S, RASHOTTE AM. Expression patterns and regulation of *SICRF3* and *SICRF5* in response to cytokinin and abiotic stresses in tomato (*Solanum lycopersicum*)[J]. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(3/4): 349-358.
- [16] DUAN XB, ZHANG K, DUANMU HZ, YU Y. Genome-wide identification and expression characteristics of cytokinin response factors in soybean[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2023, 42(7): 4484-4496.
- [17] 李珂, 刘桢, 雷超, 左超然, 董凤, 孟媛, 毛江萍, 韩明玉, 张东. 苹果全基因组 CRF 家族成员鉴定及在不定根发育过程中的表达分析[J]. 园艺学报, 2018, 45(4): 627-640.
LI K, LIU Z, LEI C, ZUO CR, DONG F, MENG Y, MAO JP, HAN MY, ZHANG D. Genome-wide identification and expression analysis of CRF family gene during adventitious root development in apple[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(4): 627-640 (in Chinese).
- [18] ZHANG JY, LUO W, ZHAO Y, XU YY, SONG SH, CHONG K. Comparative metabolomic analysis reveals a reactive oxygen species-dominated dynamic model underlying chilling environment adaptation and tolerance in rice[J]. The New Phytologist, 2016, 211(4): 1295-1310.
- [19] LIANG Z, ZHANG Q, JI CM, HU GH, ZHANG PX, WANG YF, YANG LW, GU XF. Reorganization of the 3D chromatin architecture of rice genomes during heat stress[J]. BMC Biology, 2021, 19(1): 53.
- [20] AHN H, JUNG I, SHIN SJ, PARK J, RHEE S, KIM JK, JUNG W, KWON HB, KIM S. Transcriptional network analysis reveals drought resistance mechanisms of AP2/ERF transgenic rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1044.
- [21] ZHENG DY, WANG L, CHEN LF, PAN XC, LIN KD, FANG Y, WANG XE, ZHANG WL. Salt-responsive genes are differentially regulated at the chromatin levels between seedlings and roots in rice[J]. Plant & Cell Physiology, 2019, 60(8): 1790-1803.
- [22] KIM J. Cytokinin response factors gating environmental signals and hormones[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(12): 993-996.
- [23] 杨蕾, 洪林, 王武, 杨海健. CRF 转录因子调控植物生长发育的研究进展[J]. 植物生理学报, 2020, 56(9): 1773-1783.
YANG L, HONG L, WANG W, YANG HJ. Advances in the regulation of plant growth and development by cytokinin response factor[J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(9): 1773-1783 (in Chinese).
- [24] KONG LJ, ZHAO K, GAO YY, MIAO LM, CHEN CQ, DENG H, LIU ZN, YU XL. Comparative analysis of cytokinin response factors in *Brassica* diploids and amphidiploids and insights into the evolution of *Brassica* species[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 728.
- [25] SWINKA C, HELLMANN E, ZWACK P, BANDA R, RASHOTTE AM, HEYL A. Cytokinin response factor 9 represses cytokinin responses in flower development[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(5): 4380.
- [26] CUCINOTTA M, MANRIQUE S, GUAZZOTTI A, QUADRELLI NE, MENDES MA, BENKOVA E, COLOMBO L. Cytokinin response factors integrate auxin and cytokinin pathways for female reproductive organ development[J]. Development (Cambridge, England), 2016, 143(23): 4419-4424.
- [27] 安建平, 宋来庆, 赵玲玲, 由春香, 王小非, 郝玉金. 苹果细胞分裂素响应因子基因 *MdCRF4* 的分离与功能鉴定[J]. 园艺学报, 2017, 44(11): 2055-2063.
AN JP, SONG LQ, ZHAO LL, YOU CX, WANG XF, HAO YJ. Molecular cloning and functional characterization of a cytokinin response factor gene *MdCRF4* in apple[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(11): 2055-2063 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)