

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2026.51081

小麦 GSK 激酶 TaSK41 的功能分析及互作蛋白的筛选

李 灿^{1,**} 张喜伟^{2,**} 朱博涛¹ 张沛沛^{1,*}

¹ 甘肃农业大学干旱生境作物学国家重点实验室, 甘肃兰州 730070; ² 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃兰州 730070

摘 要: 植物糖原合成激酶 3 (GSK3) 家族成员 SK41 在籽粒发育和粒重形成过程中发挥重要作用。为进一步探究 *TaSK41* 调控小麦籽粒发育的生物学功能及其潜在的分子机制, 本研究分析了 *TaSK41* 在不同组织中的表达模式、亚细胞定位、过表达 *TaSK41* 水稻的籽粒表型, 以及与 TaSK41 相互作用的蛋白。qRT-PCR 分析表明, *TaSK41* 在各个组织中均有表达, 其中在穗部、早期发育的籽粒、子房以及种皮中的表达量较高。亚细胞定位显示, TaSK41-GFP 融合蛋白主要定位于细胞质和细胞核中。*TaSK41* 过表达转基因水稻株系的千粒重显著降低, 粒长和粒宽均显著减小。通过酵母双杂交系统筛选小麦籽粒 cDNA 文库, 共获得 17 个可能与 TaSK41 相互作用的候选蛋白。进一步对 TaSK41 与调控籽粒发育相关基因 *TaARF4* 和 *TaBSK3* 的全长互作验证, 结果显示, TaSK41 能够与小麦生长素响应因子 TaARF4 的全长蛋白发生相互作用。利用荧光素酶互补系统在体内对其互作关系进行了验证, 结果表明, TaSK41-nLUC 与 TaARF4-cLUC 共转化烟草叶片, 可观察到荧光信号, 这表明它们在体内确实存在互作关系。本研究结果为深入解析 *TaSK41* 调控小麦粒重形成的分子机制提供了重要理论依据。

关键词: 小麦; 粒重; *TaSK41*; 酵母双杂交; 互作蛋白

Functional characterization of wheat GSK kinase TaSK41 and screening for interacting proteins

Li Can^{1,**}, Zhang Xi-Wei^{2,**}, Zhu Bo-Tao¹, and Zhang Pei-Pei^{1,*}

¹ State Key Laboratory of Aridland Crop Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China; ² College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

Abstract: SK41, a plant glycogen synthase kinase 3 (GSK3) /SHAGGY-like kinases gene, plays an important role in grain development and grain weight formation. To further elucidate the biological function of *TaSK41* in regulating wheat grain development and its underlying molecular mechanisms, this study examined the expression patterns of *TaSK41* across different tissues, its subcellular localization, the grain phenotypes of transgenic rice overexpressing *TaSK41*, and its interacting proteins. qRT-PCR analysis revealed that *TaSK41* was ubiquitously expressed, with particularly high expression in spikes, early developing grains, ovaries, and seed coats. Subcellular localization assays showed that the TaSK41-GFP fusion protein was predominantly localized in both the cytoplasm and the nucleus. Overexpression of *TaSK41* in transgenic rice led to a reduction in thousand-grain weight, accompanied by significant decreases in both grain length and width. Through yeast two-hybrid screening, 17 candidate proteins were identified as potential interactors with TaSK41. Among these, full-length interaction validation was conducted for *TaARF4* and *TaBSK3*, both of which are associated with grain development. Point-to-point assays confirmed that TaSK41 interacts with the full-length TaARF4 protein. This interaction was further validated *in vivo* using a luciferase complementation assay, confirming

本研究由国家自然科学基金项目(32160487), 甘肃省联合科研基金一般项目(24JRRA839)和甘肃农业大学公招博士科研启动基金项目(GAU-KYQD-2018-41)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160487), the Natural Science Foundation of Gansu Provincial Joint Fund, China (24JRRA839), and the Scientific Research Start-up Funds for Openly-recruited Doctors of Gansu Agricultural University (GAU-KYQD-2018-41).

* 通信作者(Corresponding author): 张沛沛, E-mail: 13858061472@163.com

** 同等贡献(Contributed equally to this work)

第一作者联系方式: 李灿, E-mail: lican@gsau.edu.cn; 张喜伟, E-mail: zhangxw20002024@163.com

Received (收稿日期): 2025-09-01; Accepted (接受日期): 2025-11-18; Published online (网络出版日期): 2025-11-26.

URL: <https://link.cnki.net/urlid/11.1809.S.20251126.1241.006>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

that TaSK41 physically interacts with TaARF4 in plant cells. These findings provide a theoretical basis for future investigations into the molecular mechanisms by which TaSK41 regulates grain weight formation in wheat.

Keywords: wheat; grain weight; *TaSK41*; yeast two-hybrid; interacting proteins

小麦(*Triticum aestivum* L.)作为全球重要的粮食作物之一,其增产对我国粮食安全保障具有重要作用。小麦产量主要由单位面积穗数、穗粒数和粒重 3 个关键因素共同决定。其中,千粒重因其表型稳定且遗传力高,已成为小麦遗传改良中增产的关键育种目标^[1]。已有研究表明,泛素化途径、生长素信号途径、油菜素内酯信号途径和 G 蛋白信号转导途径等信号通路参与调控籽粒大小和粒重^[2]。

糖原合酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3/SHAGGY-like kinases)是一类高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族。该家族激酶通过识别 Ser/Thr-X-X-Ser/Thr 磷酸化基序对底物蛋白进行磷酸化修饰,进而调控其生物学功能^[3-5]。目前, GSK 基因家族成员已在多种植物中得到系统鉴定。例如,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组包含 10 个 GSK 基因^[6],大麦(*Hordeum vulgare*)基因组包含 9 个成员^[7],而小麦(*Triticum aestivum*)基因组则包含 22 个成员^[8]。越来越多的研究表明, GSK 家族成员在籽粒发育过程中发挥着重要的调控作用^[9]。例如,拟南芥 GSK 家族成员 AtSK21/BIN2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2)在油菜素内酯(brassinosteroid, BR)信号通路中作为负调控因子调控植物的生长发育。BIN2 通过与 BR 响应转录因子 BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1)和 BES1 (bri1-EMS suppressor 1)的相互作用,并对其磷酸化,从而调控 BR 响应基因的表达^[10]。水稻 OsGSK2 是拟南芥 BIN2 的同源物,同样作为 BR 信号通路的负调控因子发挥作用。过表达 *OsGSK2* 的转基因植株表现出籽粒变小、叶片直立和株高降低等表型^[11]。此外, OsGSK3 与控制籽粒长度的蛋白磷酸酶 OsPPKL1 相互作用,该相互作用介导了 OsGSK3 通过蛋白酶体途径被降解,进而导致 BR 信号通路中的转录因子 OsBZR1 在细胞核内积累,激活下游 BR 应答基因的表达,最终调控籽粒重量^[12]。在大麦中,沉默 *HvGSK1* 基因显著提高了植株在正常与盐胁迫条件下的生物量和籽粒重量^[13]。在玉米中, ZmSK2 通过与生长素/吲哚乙酸(Aux/IAA)转录调控因子 ZmIAA28 相互作用,促进其蛋白积累,进而参与胚胎发育过程的调控^[14]。在小麦中, *Tasg-D1* 是水稻 *OsGSK2* 的同源基因,作为 BR 信号通路的负调控因子发挥作用。*Tasg-D1* 功能获得型突

变体表现出千粒重降低、株高矮化、穗长缩短及小穗密度增加等多效性表型^[15]。然而,除 *Tasg-D1* 外,小麦 GSK 家族其他成员在籽粒发育中的功能及其作用机制仍有待进一步阐明。

水稻籽粒大小的数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL) *qTGW3* 编码 OsSK41 (也称为 OsGSK5),该蛋白是籽粒大小的关键负调控因子^[16]。研究表明, OsSK41 通过与 OsARF4 相互作用并介导其磷酸化,调节生长素响应基因的表达,从而负向调控水稻籽粒大小与粒重^[16]。最新研究发现, OsSK41 还可以通过磷酸化 OsIAA10,促进其与 OsTIR1 互作,进而加速 OsIAA10 的泛素化降解。过表达 *OsIAA10* 的转基因株系表现出籽粒增大和千粒重显著增加的表型^[17]。此外,组蛋白乙酰转移酶 HHC4 作为籽粒大小与千粒重的正调控因子,其活性也受到 OsSK41 磷酸化修饰的调控^[18]。上述研究表明, OsSK41 在籽粒形态建成过程中发挥重要调控作用。然而,其小麦同源基因 *TaSK41* 在调控籽粒大小和粒重方面的功能及其互作蛋白的研究尚未见报道。在前期研究中,课题组从小麦基因组中克隆了 *TaGSK5* 的 4 个同源基因,并对其序列进行了分析^[19]。结果显示, *TaGSK5* 分别位于小麦的 1A、4A、5B 和 5D 染色体上。由于 *TaGSK5* 与水稻 *OsGSK5/OsSK41* 的氨基酸序列高度相似,本研究将其统一命名为 *TaSK41*。在此基础上,本研究旨在解析 *TaSK41* 的功能及其互作蛋白,以期深入阐明其调控小麦籽粒大小与粒重的分子机制奠定基础,并为小麦产量性状的分子遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将水稻品种“中花 11”和 *TaSK41-1A* 基因过表达水稻转基因材料种植于中国水稻研究所的转基因试验基地。以小麦授粉后 10 d 的籽粒为材料,委托上海欧易生物科技有限公司构建小麦籽粒 cDNA 文库。酵母感受态细胞 AH109 购自上海昂羽生物技术有限公司,农杆菌感受态 GV3101 购自北京全式金生物技术股份有限公司。质粒 pGBKT7 和 pGADT7 为本实验室保存。酵母转化试剂盒购自 Coolaber 公司(SK2400-200T),无缝克隆试剂盒购自 Clontech 公

司(In-Fusion HD Cloning Kit)。

1.2 TaSK41 基因的表达式分析

将小麦品种“中国春”种植于温室中,待植株抽穗后,根据 TRIzol (Invitrogen, 中国上海)说明书分别提取抽穗期的根、茎、叶片,长度为 3 cm 的幼穗,开花期穗、子房、授粉后 5、15 和 25 d 的籽粒,以及发育 15 d 籽粒的胚和种皮。实时荧光定量 PCR

(qRT-PCR)参照 SYBR Premix Ex Taq (RR820A, TaKaRa, 中国)说明书进行。qRT-PCR 反应在 Quant Studio 5 (Applied Biosystems, 美国)仪器上进行。反应程序为: 95℃预变性 30 s; 95℃ 10 s, 58℃ 20 s, 72℃ 20 s, 共 40 个循环。采用 2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达量,并以小麦 TaGAPDH 基因作为内参基因进行标准化,所用引物序列见表 1。

表 1 引物名称及序列
Table 1 Primer names and sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
TaSK41-OE-1A-Forward	TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGATGGCGTATTCTGGGCAGAG	水稻过表达
TaSK41-OE-1A-Reverse	AGAGCCCTGGCATGCGCTGCAGCTAGGTGCGGAGCGCCATGA	Over-expression in rice
TaSK41-GFP-Forward	CACGGGGGACGAGCTCGGTACCATGGCGTATTCTGGGCAGAG	亚细胞定位
TaSK41-GFP-Reverse	TGCTCACCATGTCGACTCTAGAGGTGCGGAGCGCCATGAACA	Subcellular localization
qRT-TaSK41-Forward	ACCCACATACACACCAGCTT	实时荧光定量 PCR
qRT-TaSK41-Reverse	CAACTCCACTTTCCCCAGGA	qRT-PCR
TaGAPDH-Forward	GACCCAGACAACTCGCAAC	
TaGAPDH-Reverse	GGAATCCATGACCACCTAC	
BD-TaSK41-Forward	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGCGTATTCTGGGCAGAGGC	酵母双杂交
BD-TaSK41-Reverse	CCGCTGCAGGTCGACGGATCCCTAGGTGCGGAGCGCCATGA	Yeast two-hybrid assay
AD-TaARF4-Forward	GTACCAGATTACGCTCATATGATGCCGCCCGCCCATGG	
AD-TaARF4-Reverse	ATGCCACCCGGGTGGAATTCCTAGTTATCTAAATGGCTTG	
AD-TaBSK3-Forward	GTACCAGATTACGCTCATATGATGGGCGCCAGGGTGTCAA	
AD-TaBSK3-Reverse	ATGCCACCCGGGTGGAATTCCTAGCGTCCGCTGCTGCTACT	
TaSK41-nLUC-Forward	ACGGGGGACGAGCTCGGTACCATGGCGTATTCTGGGCAGAG	双荧光素酶互补
TaSK41-nLUC-Reverse	GCCGGGCCCTCTAGAGGATCCGGTGCGGAGCGCCATGAACA	Dual-luciferase reporter
TaARF4-cLUC-Forward	TACGCGTCCCGGGGCGGTACCATGCCGCCCGCCCATGGC	
TaARF4-cLUC-Reverse	GCCGGGCCCTCTAGAGGATCCGTTATCTAAATGGCTTGACGT	

1.3 TaSK41-1A 蛋白亚细胞定位

将 TaSK41-1A 基因的 cDNA 序列去除终止密码子后,通过同源重组方法将其连接到 pAN580-35S-GFP 载体上,构建由 35S 启动子驱动的 TaSK41-1A-GFP 融合蛋白表达载体 pAN580-35S-TaSK41-1A-GFP。随后,将构建的融合表达载体和空载体对照(pAN580-35S-GFP)共转化至农杆菌 GV3101 感受态细胞中。利用农杆菌介导的瞬时转化法,将重组载体在烟草叶片表皮细胞中进行表达。转化后的烟草植株在 25℃条件下培养 48~72 h。使用尼康 A1 激光共聚焦显微镜系统(Nikon, 日本)进行荧光信号检测并拍照,检测时采用 488 nm 激光作为激发光源。

1.4 TaSK41-1A 过表达水稻株系构建

从小麦品种“中国春”的幼穗 cDNA 中扩增获得 TaSK41-1A 基因的全长编码序列(CDS),将该序列插

入由水稻 ACTIN1 启动子驱动的 pCAMBIA2300 过表达载体的 Pst I 酶切位点处。经测序验证正确后,通过根癌农杆菌 EHA105 介导的遗传转化方法将重组载体导入粳稻品种“中花 11”的愈伤组织中。经 T₁代和 T₂代阳性筛选,最终获得转基因纯合株系。

1.5 诱饵载体 pGBKT7-TaSK41-1A 的构建

以小麦品种“中国春”授粉 5 d 种子的 cDNA 为模板,利用特异性引物扩增 TaSK41-1A 的编码区全长。根据 TaSK41 的 cDNA 序列和 pGBKT7 载体的多克隆位点,设计重组引物分别为 BD-TaSK41-1A-Forward 和 BD-TaSK41-1A-Reverse。采用高保真 DNA 聚合酶 KOD-FX 扩增目的片段,并对扩增产物进行回收和纯化。同时,使用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 对 pGBKT7 载体进行双酶切,获得线性化载体。通过同源重组技术,将纯化后的 TaSK41-1A

编码区片段与线性化载体连接, 构建诱饵重组载体 pGBKT7-TaSK41-1A。

1.6 TaSK41-1A 自激活检验

pGBKT7-TaSK41-1A 质粒通过聚乙二醇/醋酸锂(polyethylene glycol/lithium acetate, PEG/LiAc)法转化至酵母 AH109 感受态细胞, 转化产物分别涂布于 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 固体培养基上, 30℃ 培养 3~5 d。

1.7 酵母双杂交文库

取 5 μg 诱饵质粒 pGBKT7-TaSK41 和 20 μg 课题组前期构建的小麦籽粒 cDNA 文库, 采用 PEG/LiAc 法转化至感受态细胞。取 200 μL 转化液涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上, 共制备约 27 块平板, 于 30℃ 培养 3~5 d。挑选生长良好的菌落转移至 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal 平板上进行二次筛选, 观察酵母菌落显色及生长状况, 并对阳性菌落进行 PCR 鉴定和测序分析。

1.8 阳性克隆点对点验证

根据候选互作基因 *TaARF4* 与 *TaBSK3* 的 cDNA 序列以及 pGADT7 载体的多克隆位点, 设计引物 AD-TaARF4-Forward、AD-TaARF4-Reverse、AD-TaBSK3-Forward 和 AD-TaBSK3-Reverse (表 1)。使用上述引物分别扩增 *TaARF4* 和 *TaBSK3* 基因的编码区, 扩增产物经纯化及测序鉴定后, 获得目的基因片段。同时, 使用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Nde* I 对 pGADT7 载体进行双酶切, 经纯化后获得线性化载体。将上述目的片段与线性化载体通过同源重组方法进行连接, 测序验证后抽提质粒。将试验组质粒 (TaBSK3-pGADT7/pGBKT7-TaSK41、TaARF4-pGADT7/pGBKT7-TaSK41) 与对照质粒 (TaBSK3-pGADT7/pGBKT7、TaARF4-pGADT7/pGBKT7、pGADT7/pGBKT7-TaSK41) 以及 Carrier DNA 共转化至酵母感受态细胞中。取 100 μL 转化后的菌液, 分别涂布在二缺培养基 (SD/-Trp/-Leu) 和四缺培养基 (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade) 上, 平板置于 30℃ 培养箱中培养 3~5 d, 观察菌落生长状况。

1.9 TaSK41-nLUC 和 TaARF4-cLUC 互补表达载体的构建

使用 *Bam*H I 和 *Sac* I 对 pCambia1300-cLUC 和 pCambia1300-nLUC 载体进行双酶切处理, 回收并纯化线性化载体。将 *TaSK41* 的 cDNA 序列去除终止密码子后, 通过同源重组方法将其连接到 pCambia1300-nLUC 载体上。同时, 将 *TaARF4* 基

因序列导入 pCambia1300-cLUC 载体中。将构建好的载体转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 阳性克隆载体经菌液 PCR 鉴定后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序验证。最后, 将正确的重组质粒转化至农杆菌 GV3101 中。

1.10 荧光素酶互补试验

选取生长约 30 d、健壮的烟草叶片进行农杆菌侵染。取保存的农杆菌 10 μL 接种于 5 mL 含有卡那霉素 (Kan) 和利福平 (Rif) 的 LB 液体培养基中, 在摇床中过夜培养 12~16 h。取 2 mL 菌液离心后收集菌体。菌体用 2 mL 重悬液吹打混匀, 并使用重悬液 (10 mmol L⁻¹ MgCl₂、10 mmol L⁻¹ MES、150 μmol L⁻¹ 乙酰丁香酮) 调整菌液浓度至 OD₆₀₀ = 0.2~0.4。将稀释后的重悬液进行如下组合, 试验组 pCambia1300-TaARF4-cLUC 和 pCambia1300-TaSK41-nLUC; 对照组 1: pCambia1300-cLUC 和 pCambia1300-TaSK41-nLUC; 对照组 2: pCambia1300-TaARF4-cLUC 和 pCambia1300-nLUC; 阴性对照: pCambia1300-cLUC 和 pCambia1300-nLUC。将以上组合混匀后, 于室温静置 3~4 h。使用 1 mL 无针注射器吸取菌液, 从叶片背面进行注射, 直至菌液完全覆盖叶片表面。在 23℃ 的环境下培养 3 d 后, 小心撕取叶片下表皮, 将侵染后的叶片置于活体成像系统中, 利用 CCD 相机检测荧光素酶发光信号, 并进行照相记录。

2 结果与分析

2.1 TaSK41 蛋白的系统发育分析和多序列比对

前期研究表明, 植物 GSK 基因家族成员可划分为 4 个亚组, 其中 *TaSK41* 属于第 4 亚组成员^[8]。*TaSK41* 基因在小麦基因组中包含 4 个同源拷贝, 分别位于 1A、4A、5B 和 5D 染色体上。根据其在染色体上的位置信息, 分别命名为 *TaSK41-1A* (*TraesCS1A02G407700*)、*TaSK41-4A* (*TraesCS4A02G345500*)、*TaSK41-5B* (*TraesCS5B02G529300*) 和 *TaSK41-5D* (*TraesCS5D02G528400*)^[8]。为探究 *TaSK41* 的进化关系, 利用 MEGA11 软件构建了不同物种 *TaSK41* 蛋白的系统发育树。分析结果显示, *TaSK41* 蛋白与大麦 HvGSK4.1 和水稻 OsSK41 聚在同一分支上, 且序列相似性高于 85%, 表明 *TaSK41* 与这些蛋白具有较近的亲缘关系 (图 1-A)。这一结果进一步表明 *TaSK41* 可能具有与 OsSK41 相似的生物学功能。此外, 小麦基因组中包含 4 个 *TaSK41* 同源基因, 多序列比对结果表明, 其编码的氨基酸序列高度保守 (图 1)。

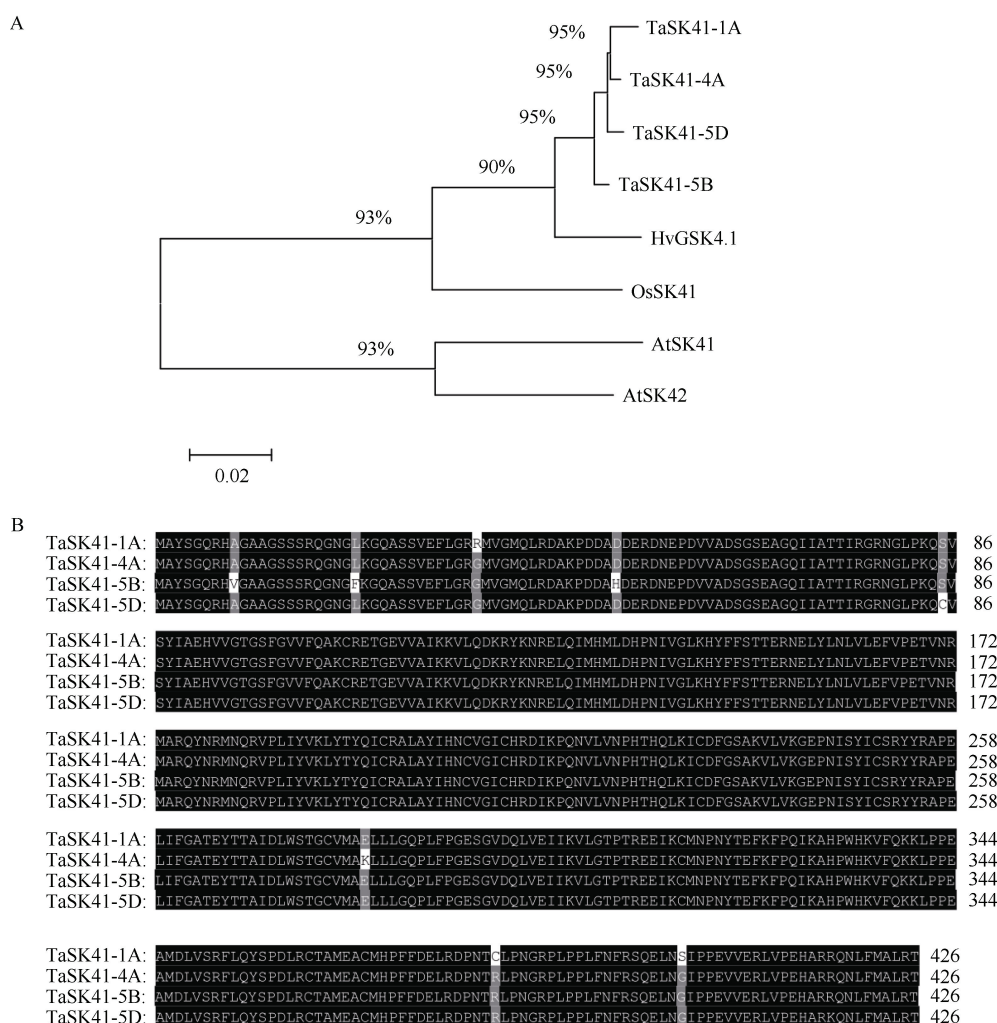


图 1 不同物种 SK41 蛋白系统进化 and 多重序列比对

Fig. 1 Phylogenetic analysis of SK41 orthologs across different species and multiple sequence alignment of four TaSK41 homeologs

A: 不同物种 TaSK41 蛋白的进化分析。At: 拟南芥; Os: 水稻; Hv: 大麦; Ta: 小麦。B: TaSK41 蛋白序列比对。

A: evolutionary analysis of TaSK41 proteins across different species. At: *Arabidopsis thaliana*; Os: *Oryza sativa*; Hv: *Hordeum vulgare*; Ta: *Triticum aestivum*. B: sequence alignment of TaSK41 proteins.

2.2 TaSK41-1A 蛋白的亚细胞定位

TaSK41 包含 4 个同源基因, 鉴于它们所编码蛋白的氨基酸序列一致性大于 98%, 本研究选择 TaSK41-1A 进行亚细胞定位分析。通过农杆菌介导的瞬时转化法, 在本氏烟草叶片表皮细胞中表达 TaSK41-1A-GFP 融合蛋白。如图 2 所示, TaSK41-1A 定位于烟草细胞的细胞核和细胞质中, 而作为对照的 GFP 蛋白则在细胞内呈现广泛的信号分布。

2.3 TaSK41 基因的表达模式分析

为探究 TaSK41 基因在不同组织器官中的表达模式, 本研究采用 qRT-PCR 技术检测了其在抽穗期根、茎、叶、幼穗、以及子房、种皮和授粉后不同发育时期籽粒中的表达水平。结果表明, TaSK41 基因在所检测的各个组织中均有表达, 其中在幼穗、

授粉后 5 d 的籽粒、子房和种皮中表达量较高, 在根中的表达量次之, 而在茎和叶中的表达量最低(图 3)。

2.4 TaSK41-1A 转基因水稻籽粒表型分析

为探究 TaSK41 在籽粒发育中的功能, 本研究构建了 TaSK41-1A 基因的过表达载体, 并将其转入粳稻品种“中花 11”中。通过 PCR 鉴定转基因植株(图 4-A), 筛选获得 2 个 TaSK41-1A 高表达的转基因株系 (TaSK41-OE1 和 TaSK41-OE2)。进一步对野生型和 TaSK41-1A 过表达株系的籽粒表型进行统计分析。结果显示, 与野生型相比, 过表达株系 TaSK41-OE1 和 TaSK41-OE2 的籽粒显著变小(图 4-B), 其千粒重、粒长及粒宽均显著降低(图 4-C~E)。以上结果表明, TaSK41-1A 可能作为负调控因子影响籽粒大小。

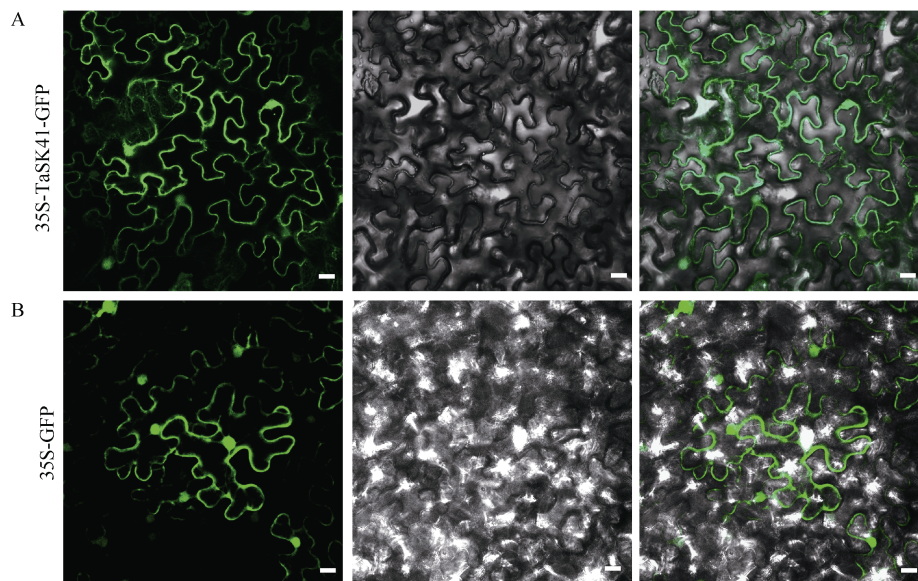


图 2 TaSK41-1A 亚细胞定位
Fig. 2 Subcellular localization of TaSK41-1A in tobacco leaf
A: TaSK41-GFP 融合蛋白在烟草叶片中的瞬时表达。B: GFP 在烟草叶片中的瞬时表达。从左到右分别为 GFP 绿色荧光蛋白、明场和叠加图。标尺为 20 μm 。
A: transient expression of TaSK41-GFP fusion protein in tobacco leaf. B: transient expression of green fluorescent protein (GFP) in tobacco leaf. From left to right, GFP fluorescent signal, bright field, and merged image. Scale bar = 20 μm .

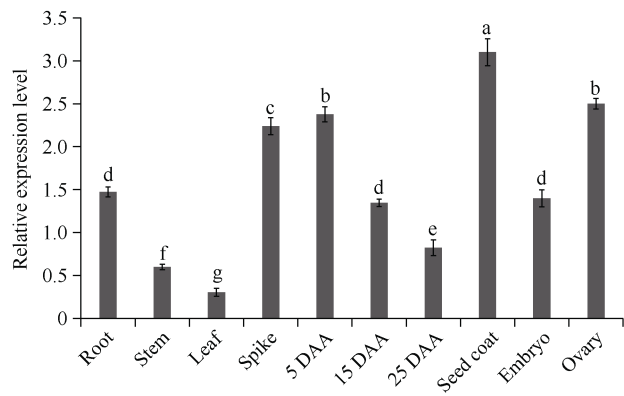
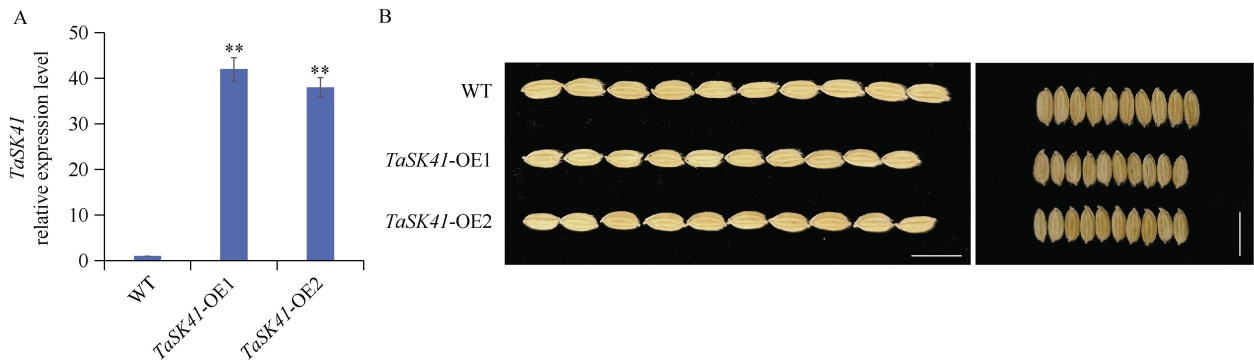


图 3 TaSK41 在不同组织中的表达模式
Fig. 3 Relative expression pattern of TaSK41 across different tissues
不同小写字母表示在 0.05 概率水平差异显著。DAA: 授粉后天数。
Different lowercase letters indicate significant differences at $P < 0.05$. DAA: days after anthesis.



(图 4)

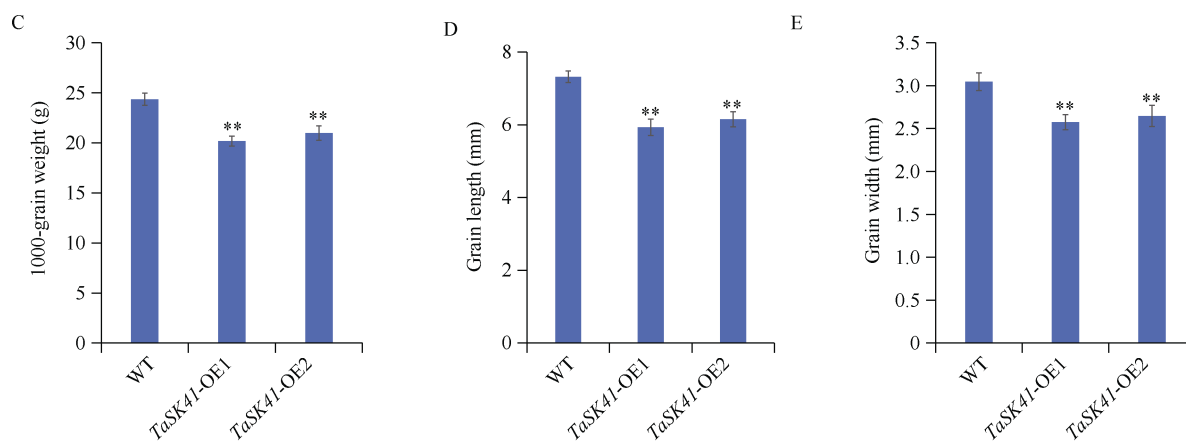


图 4 野生型和 *TaSK41-1A* 过表达水稻株系籽粒表型分析

Fig. 4 Phenotypic comparison of kernel traits between wild type (WT) and *TaSK41-1A* overexpression (OE) lines in rice

A: *TaSK41* 在转基因与野生型水稻中的基因表达水平。B: WT、*TaSK41*-OE1 和 *TaSK41*-OE2 的籽粒表型。标尺为 1 cm。C: 千粒重; D: 粒长; E: 粒宽。数据为平均值±标准差。**: $P < 0.01$, t 检验。

A: gene expression levels of wild type and transgenic rice overexpressing *TaSK41*. B: grain phenotypes of Zhonghua 11, *TaSK41*-OE1, and *TaSK41*-OE2. Bars = 1 cm. C: thousand-grain weight; D: grain length; E: grain width. Data are presented as mean ± SD. **: $P < 0.01$, Student's t -test.

2.5 诱饵载体自激活检测

将诱饵载体 pGBKT7-TaSK41-1A 与 pGADT7 共转化至 AH109 酵母感受态细胞中, 涂布于相应营养缺陷培养基上, 30℃ 培养 3~5 d。结果显示, 共转化 pGBKT7-TaSK41-1A/pGADT7 的酵母细胞能够在 SD/-Trp/-Leu/X- α -gal 固体培养基上正常生长, 表明 pGBKT7-TaSK41-1A 质粒已成功转入酵母菌株。然而, 在 SD/-Trp/-Leu/-His/X- α -gal 培养基上仅观察到微弱的菌落生长, 而在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal 培养基上则完全无生长(图 5)。这表明诱饵蛋白 TaSK41 无自激活活性, 可用于后续互作蛋白的筛选。

2.6 pGBKT7-TaSK41 酵母文库筛选结果

将小麦籽粒 cDNA 文库与成功构建的 pGBKT7-TaSK41 共转化至酵母 AH109 感受态细胞, 涂布于四缺培养基 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上, 30℃ 培养 3~5 d。随后, 将生长的单克隆划线转接至 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 固体培养基上进行初筛

(图 6-A)。进一步挑取单菌落摇菌后点板于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal 平板上进行复筛, 最终获得 50 个显蓝色的阳性克隆(图 6-B)。利用 pGADT7 载体通用引物对四缺培养基 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal 上的阳性菌落进行 PCR 扩增并测序。测序结果经 BLAST 比对至小麦“中国春”参考基因组(IWGSC v1.1), 去除重复序列及移码突变序列后, 初步筛选出 18 个与 TaSK41 相互作用的全长候选蛋白。如表 2 所示, 这些候选蛋白包括 SCREAM2 转录因子、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 BSK3、B3 类结构域转录因子、E3 泛素连接酶 WAV3、ARF4 转录因子、扩展蛋白 B4、NADH-细胞色素 b5 还原酶、泛素融合降解蛋白 UFD1、SH3 结构域结合蛋白 2、泛素羧基末端水解酶 14 及谷氨酰 tRNA 还原酶等。

2.7 点对点互作关系验证

前人研究表明, 水稻 OsARF4^[16]和 OsBSK3^[20]在调控籽粒大小中发挥重要作用。基于酵母双杂交

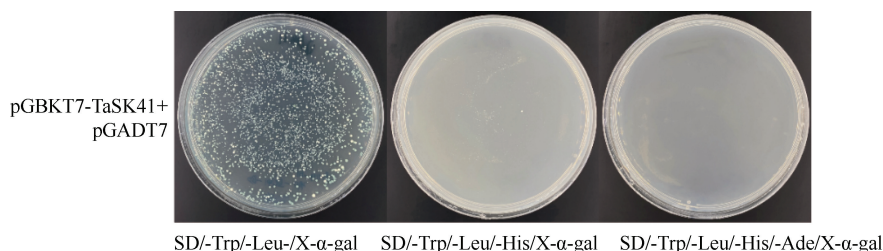


图 5 诱饵载体 pGBKT7-TaSK41 自激活检测

Fig. 5 Autoactivation detection of bait vector pGBKT7-TaSK41 in yeast

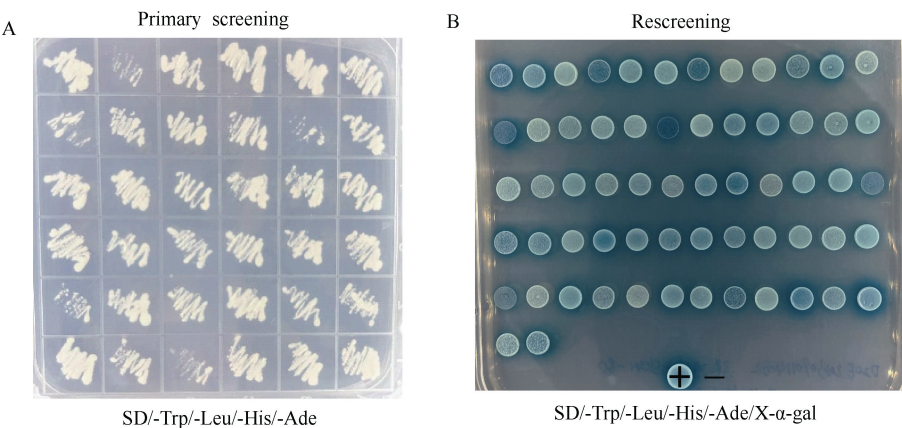


图 6 在四缺培养基 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 上筛选阳性克隆

Fig. 6 Screening of positive clones on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade medium

A: 共转化 pGADT7-cDNA 文库质粒和 pGBKT7-TaSK41 的 AH109 在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上生长的克隆。B: 共转化 pGADT7-cDNA 文库质粒和 pGBKT7-TaSK41 的 AH109 在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 培养基上生长的克隆。

A: yeast clones of the AH109 yeast strain cotransformed with pGADT7-cDNA library plasmid and pGBKT7-TaSK41 growing on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade medium. B: yeast clones of the AH109 yeast strain cotransformed with pGADT7-cDNA library plasmid and pGBKT7-TaSK41 growing on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal medium.

表 2 TaSK41 的候选互作蛋白

Table 2 Candidate interacting proteins of TaSK41

序号 Number	NCBI 蛋白登录号 NCBI accession number	基因注释 Gene annotation
1	XP_044359233.1	SCREAM2 转录因子 Transcription factor SCREAM2
2	XP_044369315.1	葡聚糖内切 β-1,3-葡聚糖酶前体 Glucanendo-1,3-beta-glucosidase precursor
3	XP_044399719.1	谷氨酰 tRNA 还原酶 Glutamyl-tRNA reductase1,chloroplastic
4	XP_044325399.1	ARF4 转录因子 transcription factor ARF4
5	XP_044436880.1	SH3 结构域结合蛋白 2 SH3 domain-containing protein 2
6	XP_044376166.1	B3 结构域蛋白 B3 DNA binding domain containing protein
7	XP_044369954.1	SNF1 相关蛋白激酶 β-1 亚基 SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta-1
8	XP_044459833.1	丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 BSK3 Serine/threonine-protein kinase BSK3
9	XP_044408408.1	泛素融合降解蛋白 UFD1 Ubiquitin fusion degradation protein UFD1
10	XP_044439125.1	E3 泛素连接酶 WAV3 E3 ubiquitin-protein ligase WAV3
11	XP_044347787.1	NADH-细胞色素 b5 还原酶 NADH-cytochrome b5 reductase-like protein
12	XP_044349897.1	富含脯氨酸的延伸蛋白样受体激酶 PERK9 Proline-rich receptor-like protein kinase PERK9
13	XP_044387058.1	MYB 转录因子 MYB transcription factor
14	XP_044347705.1	泛素羧基末端水解酶 14 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
15	XP_044396272.1	保守的假设蛋白 Os07t0213400-01 Conserved hypothetical protein Os07t0213400-01
16	XP_044403661.1	扩展蛋白 B4 Expansin-B4
17	XP_044363920.1	DNA 拓扑异构酶 DNA topoisomerase

筛选获得的 17 个 TaSK41 潜在互作蛋白，本研究选取与籽粒发育密切相关的 *TaARF4* 和 *TaBSK3* 基因，验证其编码蛋白与 TaSK41 的互作关系。为此，本研究构建了 pGADT7-TaBSK3 和 pGADT7-TaARF4 重组表达载体，并分别与 pGBKT7-TaSK41 诱饵载体共转化至 AH109 酵母感受态细胞，涂布于相应缺陷培养基上培养。结果显示，共转化 pGADT7-TaARF4 与 pGBKT7-TaSK41 的酵母细胞能在四缺培养基 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 上正常生长(图 7)，而共转化 pGADT7-TaBSK3 与 pGBKT7-TaSK41 的酵母细胞则不能生长，这表明 TaARF4 与 TaSK41 之间存在相互作用。

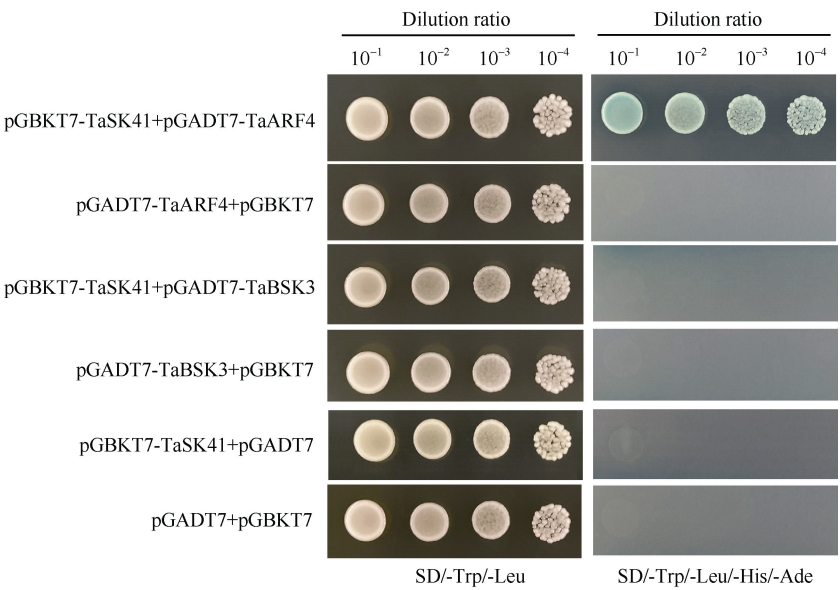


图 7 酵母双杂交验证 TaSK41 与 TaARF4 和 TaBSK3 的互作

Fig. 7 Yeast two-hybrid confirmed the interaction between TaSK41 and TaARF4 or TaBSK3

携带指定质粒的酵母细胞在生长培养基(SD/-Trp/-Leu)和选择培养基(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal)上的生长情况。
Yeast cells containing the indicated plasmids were plated on the growth medium (SD/-Trp/-Leu) and selection medium (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal).

2.8 荧光素酶互补法体内验证互作

为验证 TaSK41 与 TaARF4 在植物体内的相互作用，本研究利用荧光素酶互补成像技术(luciferase complementation imaging assay, LCI)对其在体内的互作情况进行检测。结果如图 8 所示，在共转化 TaSK41-nLUC 与 TaARF4-cLUC 的烟草叶片中检测到了明显的荧光信号，而阴性对照则未检测到任何信号。这一结果表明，TaSK41 与 TaARF4 在植物体内能够发生相互作用。

3 讨论

GSK 基因家族在植物籽粒发育过程中具有重要的调控作用。Tong 等^[11]首次在水稻中鉴定了 BR 信号途径的关键调控因子 *OsGSK2*。该激酶与转录因子 *OsGRF4/GS2* 相互作用，后者通过促进小穗颖壳细胞扩张来调控籽粒发育^[21]。在小麦中，首个报道的 GSK 基因 *Tasg-D1* 属于第 2 亚组，该基因对小麦株型和粒型具有重要的调控作用。除第 2 亚组外，研

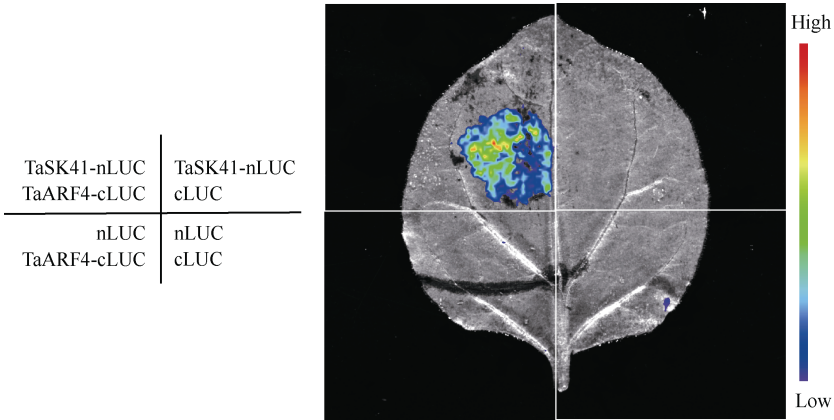


图 8 荧光素酶互补验证 TaSK41 和 TaARF4 在体内存在相互作用

Fig. 8 Protein interaction between TaSK41 and TaARF4 verified by luciferase complementation imaging (LCI) assay

TaSK41-nLUC 和 TaARF4-cLUC 共转化的烟草叶片中显示 LUC 荧光。以共表达 TaSK41-nLUC 和 cLUC 或 TaARF4-cLUC 和 nLUC 的叶片为阴性对照。
Nicotiana benthamiana leaves co-transformed with constructs expressing TaSK41-nLUC and TaARF4-cLUC showed a strong luminescence (LUC) signal. Leaves co-expressing TaSK41-nLUC and cLUC or TaARF4-cLUC and nLUC were used as negative controls.

究还发现水稻第 4 亚组成员的 *OsSK41* 负调控籽粒大小和粒重^[16]。本研究在水稻中异源表达 *TaSK41* 发现, 其过表达导致水稻籽粒显著变小、千粒重降低, 表明 GSK 家族第 4 亚组基因在单子叶植物籽粒大小调控中可能具有一定的功能保守性。

研究表明, 种皮(或果皮)细胞的扩张与增殖在籽粒大小的调控中发挥关键作用。例如, 小麦 *TaDA1* 基因突变通过影响外层细胞的增殖来调控种子大小^[22]。此外, *TaGW2* 敲除突变体也被证实可通过调控果皮细胞数量和长度来影响籽粒大小^[23-24]。本研究发现, *TaSK41* 在籽粒种皮组织中的表达量显著高于其他组织, 这提示该基因可能通过调控种皮细胞的增殖或扩张进而参与籽粒发育的调控。

生长素(auxin)在调控籽粒发育过程中发挥关键作用, 尤其是在胚、胚乳及种皮的形态建成过程中。研究表明, 生长素响应因子(auxin response factors, ARF)和吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)相关基因通过调控下游靶基因表达从而影响器官大小^[25-26]。本研究利用酵母双杂交技术筛选 *TaSK41* 的互作蛋白, 共获得 17 个候选蛋白, 从中选取 *TaARF4* 和 *TaBSK3* 进行全长互作蛋白验证。酵母双杂交结果表明, *TaSK41* 与 *TaARF4* 蛋白存在相互作用。通过荧光素酶互补试验进一步证实了二者的互作关系。ARF 蛋白包含 3 个保守结构域: N 端 DNA 结合结构域(B3 DNA-binding domain, DBD)、中间区域(middle region, MD)和 C 端二聚化结构域(C-terminal dimerization domain, CTD)。其中, DBD 能够特异性识别并结合生长素响应元件(AuxRE), 从而调控生长素响应基因的表达。ARF 家族成员既可发挥转录激活因子的功能, 也可作为转录抑制因子发挥作用。研究表明, *OsARF4* 作为生长素信号通路中的转录抑制因子, 能够抑制 *OsIAA23*、*OsIAA27* 和 *OsIAA30* 等 Aux/IAA 家族基因的启动子活性, 从而负调控该家族基因的表达。此外, *OsSK41* 通过与 *OsARF4* 相互作用参与调控水稻籽粒大小和千粒重^[16]。尽管小麦中 *TaSK41* 与 *TaARF4* 的互作关系已得到初步验证, 但 *TaARF4* 调控生长素响应基因表达的具体分子机制仍需深入研究。此外, 有报道水稻 *OsBSK* 家族成员也参与籽粒大小的调控^[27]。例如, *OsBSK2* 可与 GSK 家族第 2 亚组成员 *OsGSK2* 发生互作, 进而参与籽粒大小和株型的调控^[28]。然而, 在本研究中, 共转化 pGBKT7-*TaSK41* 和 pGADT7-*TaBSK3* 的酵母细胞在四缺培养基上无法

生长, 表明第 4 亚组成员 *TaSK41* 与 *TaBSK3* 之间可能不存在互作关系。这一结果提示 GSK 家族不同亚组成员在功能上可能存在分化。本研究通过酵母双杂交系统筛选获得了一批可能与 *TaSK41* 相互作用的候选蛋白。除已验证的 *TaBSK3* 和 *TaARF4* 外, 是否还存在其他蛋白与 *TaSK41* 相互作用并参与籽粒大小的调控, 仍需进一步验证。

4 结论

小麦 GSK 家族成员 *TaSK41* 存在 4 个同源拷贝, 其编码蛋白定位于细胞质和细胞核。qRT-PCR 分析表明, *TaSK41* 基因在所检测组织中呈现组成型表达, 在籽粒外层组织中表达水平最高。功能分析进一步表明, *TaSK41* 负调控籽粒大小和粒重。酵母双杂交和双荧光素酶互补试验结果证实, *TaSK41* 与生长素响应因子 *TaARF4* 蛋白之间存在相互作用。本研究为进一步阐明 *TaSK41* 调控小麦粒重形成的分子机制提供了重要的理论依据。

References

- [1] Cao S H, Xu D A, Hanif M, et al. Genetic architecture underpinning yield component traits in wheat. *Theor Appl Genet*, 2020, 133: 1811–1823.
- [2] Alam I, Batool K, Huang Y Y, et al. Developing genetic engineering techniques for control of seed size and yield. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 13256.
- [3] Youn J H, Kim T W. Functional insights of plant GSK3-like kinases: multi-taskers in diverse cellular signal transduction pathways. *Mol Plant*, 2015, 8: 552–565.
- [4] Mao J, Li W X, Liu J, et al. Versatile physiological functions of plant GSK3-like kinases. *Genes (Basel)*, 2021, 12: 697.
- [5] Li C X, Zhang B, Yu H. GSK3s: nodes of multilayer regulation of plant development and stress responses. *Trends Plant Sci*, 2021, 26: 1286–1300.
- [6] Dornelas M C, Lejeune B, Dron M, et al. The *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) gene family: structure, organization and evolution. *Gene*, 1998, 212: 249–257.
- [7] Groszyk J, Yanushevska Y, Zielezinski A, et al. Annotation and profiling of barley *GLYCOGEN SYNTHASE3/Shaggy-like* genes indicated shift in organ-preferential expression. *PLoS One*, 2018, 13: e0199364.
- [8] Zhang P P, Zhang L H, Chen T, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the GSK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Biol Rep*, 2022, 49: 2899–2913.
- [9] Xia D, Zhou H, Liu R J, et al. *GL3.3*, a novel QTL encoding a GSK3/SHAGGY-like kinase, epistatically interacts with *GS3* to produce extra-long grains in rice. *Mol Plant*, 2018, 11: 754–756.
- [10] Li T T, Lei W, He R Y, et al. Brassinosteroids regulate root meristem development by mediating BIN2-UPB1 module in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*, 2020, 16: e1008883.

- [11] Tong H N, Liu L C, Jin Y, et al. DWARF AND LOW-TILLERING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. *Plant Cell*, 2012, 24: 2562–2577.
- [12] Gao X Y, Zhang J Q, Zhang X, et al. Rice qGL3/OsPPKL1 functions with the GSK3/SHAGGY-like kinase OsGSK3 to modulate brassinosteroid signaling. *Plant Cell*, 2019, 31: 1077–1093.
- [13] Kloc Y, Dmochowska-Boguta M, Zielezinski A, et al. Silencing of *HvGSK1.1*—A GSK3/SHAGGY-like kinase—enhances barley (*Hordeum vulgare* L.) growth in normal and in salt stress conditions. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 6616.
- [14] Wang Y, Xu J H, Yu J J, et al. Maize GSK3-like kinase ZmSK2 is involved in embryonic development. *Plant Sci*, 2022, 318: 111221.
- [15] Cheng X J, Xin M M, Xu R B, et al. A single amino acid substitution in STKc_GSK3 kinase conferring semispherical grains and its implications for the origin of *Triticum sphaerococcum*. *Plant Cell*, 2020, 32: 923–934.
- [16] Hu Z J, Lu S J, Wang M J, et al. A novel QTL *qTGW3* encodes the GSK3/SHAGGY-like kinase OsGSK5/OsSK41 that interacts with OsARF4 to negatively regulate grain size and weight in rice. *Mol Plant*, 2018, 11: 736–749.
- [17] Ma M, Shen S Y, Bai C, et al. Control of grain size in rice by TGW3 phosphorylation of OsIAA10 through potentiation of OsIAA10-OsARF4-mediated auxin signaling. *Cell Rep*, 2023, 42: 112187.
- [18] Shen S Y, Ma M, Bai C, et al. Optimizing rice grain size by attenuating phosphorylation-triggered functional impairment of a chromatin modifier ternary complex. *Dev Cell*, 2024, 59: 448–464.
- [19] 张令慧, 张沛沛, 刘媛, 等. 小麦 *TaGSK5* 基因的克隆与表达分析. *甘肃农业大学学报*, 2021, 56(6): 64–72.
- Zhang L H, Zhang P P, Liu Y, et al. Cloning and expression analysis of *TaGSK5* gene in wheat. *J Gansu Agric Univ*, 2021, 56(6): 64–72.
- [20] Tian P, Liu J F, Yan B H, et al. OsBSK3 positively regulates grain length and weight by inhibiting the phosphatase activity of OsPPKL1. *Plants*, 2022, 11: 1586.
- [21] Hu J, Wang Y X, Fang Y X, et al. A rare allele of *GS2* enhances grain size and grain yield in rice. *Mol Plant*, 2015, 8: 1455–1465.
- [22] Liu H, Li H F, Hao C Y, et al. *TaDA1*, a conserved negative regulator of kernel size, has an additive effect with *TaGW2* in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 1330–1342.
- [23] Wang W, Simmonds J, Pan Q L, et al. Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of *TaGW2* homoeologues to grain size and weight in wheat. *Theor Appl Genet*, 2018, 131: 2463–2475.
- [24] Zhang Y, Li D, Zhang D B, et al. Analysis of the functions of *TaGW2* homoeologs in wheat grain weight and protein content traits. *Plant J*, 2018, 94: 857–866.
- [25] Ishimaru K, Hirotsu N, Madoka Y, et al. Loss of function of the IAA-glucose hydrolase gene *TGW6* enhances rice grain weight and increases yield. *Nat Genet*, 2013, 45: 707–711.
- [26] Farooq H, Asghar H N, Khan M Y, et al. Auxin-mediated growth of rice in cadmium-contaminated soil. *Turk J Agric For*, 2015, 39: 272–276.
- [27] Tian P, Liu J F, Yan B H, et al. BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1-1, a positive regulator of brassinosteroid signalling, modulates plant architecture and grain size in rice. *J Exp Bot*, 2023, 74: 283–295.
- [28] Yuan H, Xu Z Y, Chen W L, et al. OsBSK2, a putative brassinosteroid-signalling kinase, positively controls grain size in rice. *J Exp Bot*, 2022, 73: 5529–5542.