

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230244

PagKNAT2/6a 与 PagKNAT2/6b 在木质部发育中存在功能保守性

李海阳^{1,2}, 赵立子^{1,2*}, 赵岩秋^{1,2}

(1. 鲁东大学农林工程研究院, 山东 烟台, 264025; 2. 鲁东大学农学院, 山东 烟台, 264025)

摘要: [目的] 通过比较分析 PagKNAT2/6a 与 PagKNAT2/6b 在木质部发育中的功能差异, 解析 KNOX 基因在木材形成过程中的生物学功能。[方法] 利用相关软件进行基因序列比对分析; 通过对转基因植株进行 GUS 染色和实时荧光定量 (qRT-PCR) 等实验进行基因表达模式分析, 随后对茎部解剖学分析, 进而解析 PagKNAT2/6a 对木质部发育的影响; 最后, 对次生壁合成相关基因 (如纤维素合成相关基因 CESA4、CESA7A、CESA7B 等; 半纤维素合成相关基因 GUX1a、GUX1b、PARVUS; 木质素合成相关基因 COMT、CAD、LAC4 等) 的表达分析探究 PagKNAT2/6a 对次生壁合成的调控机制。[结果] PagKNAT2/6a 与 PagKNAT2/6b 序列高度相似, 在 '84K' 不同组织中均有表达, 在杨树茎、茎尖以及幼嫩叶片中表现出较高的表达量。对 PagKNAT2/6a 转基因植株的茎部解剖分析表明, 与野生型相比, PagKNAT2/6a 过表达抑制木质部发育; 同时 qRT-PCR 分析表明 PagKNAT2/6a 基因通过调控次生壁合成相关基因的表达影响木质部发育。[结论] PagKNAT2/6a 与 PagKNAT2/6b 均负调控木质部发育, 同时存在功能保守性。

关键词: PagKNAT2/6a; PagKNAT2/6b; 杨树; 木质部发育; 保守性

中图分类号: S722

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2024)02-0009-07

木材是木本植物次生木质部长年累积的产物, 次生木质部发育是一个动态过程, 包括维管形成层分裂、木质部与韧皮部细胞分化、次生细胞壁形成等各个阶段^[1]。其中, 木质部细胞的分化是木材形成的关键。木本植物中杨树 (*Populus*) 凭借其基因组小、适应性强、生长速度快、易于无性繁殖等特点, 已被公认是林木分子生物学的模式物种^[2]。近年来, 随着对木质部发育相关研究的逐步深入, 已有大量研究表明杨树木质部发育受多种遗传和内源因子调控, 如激素、转录因子及多肽信号等^[3]。其中, 转录因子作为调控木质部发育的关键因子存在, 已有大量研究报道转录因子参与调控木质部发育, 如: XND1 (*XYLEM NAC DOMAIN 1*) 负调控木质部导管分化^[4]; 油菜素内酯对木质

部分化起到正向调控作用, 且有利于促进应力木的形成^[5]; 生长调节因子 *PagGRF12a* 被显性抑制可有效增加木质部宽度, 促进木质部发育^[6]。综上所述, 木质部发育受复杂的转录因子调控, 从而影响木材形成过程。

KNOX 家族是一类重要的同源异型盒基因, 广泛存在并参与生物的发育进程, 并通过调控植物分生组织影响不同组织、器官的发育^[7]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, I 类 KNOX 包括 4 个成员分别是: STM (*SHOOT MERISTEMLESS*)、KNAT1 (*KNOTED1-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1*)、KNAT2 和 KNAT6。已有研究表明 KNAT2 与 KNAT6 分别在茎顶端分生组织的底部与边缘处表达^[8]; 与此同

收稿日期: 2023-06-09 修回日期: 2024-01-22

基金项目: 山东省高等学校“青创团队计划”2022KJ120; 国家自然科学基金 32101482

* 通讯作者: 赵立子, 讲师, 主要研究方向: 林木遗传育种专业, E-mail: zhaolizi@126.com

时, 本研究团队前期对‘84K’杨 (*Populus alba* × *Populus glandulosa*) 中 *KNAT2* 和 *KNAT6* 的同源基因 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 的功能展开研究, 已发现 *PagKNAT2/6b* 通过直接激活 *XND1a* 的表达抑制木质部分化及次生细胞壁的合成^[9], 但 *PagKNAT2/6a* 作为与 *PagKNAT2/6b* 进化关系最近的成员, 其在杨树木质部发育中的调控功能未知。

本研究为探究 *PagKNAT2/6a* 在木质部发育中的功能, 以 *PagKNAT2/6a* 为研究对象, 通过‘84K’杨树遗传转化技术获得异常表达 *PagKNAT2/6a* 转基因株系, 借助 GUS 染色实验和实时荧光定量 (qRT-PCR) 比较分析 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 组织表达特异性, 同时借助茎部解剖学分析其异常表达 *PagKNAT2/6a* 转基因株系茎中木质部分化差异, 通过比较分析 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在杨树木质部中的表达定位及木质部分化中的功能差异发现该基因在木质部发育中可能存在的功能保守性。本研究对 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在杨树木质部发育中功能保守性的解析, 以期为 KNOX 类基因在木本植物木质部发育上的保守性和分化性提供理论支持, 并为 KNOX 基因在定向分子设计育种工作开展中提供重要的基因资源。

1 材料与方法

1.1 氨基酸序列比对

通过 NCBI 中的 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 检索‘84K’杨树 (*Populus alba* × *Populus glandulosa*) 中 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 基因序列, 然后利用 MEGA 软件中 Clustal Co 程序进行多序列比对。

1.2 GUS 染色

取生长 3~4 周的 $P_{PagKNAT2/6ba}::GUS$ 组培苗整株浸泡于固定液 (90% 丙酮) 中, 4 °C 固定过夜; 固定后的材料用配置好的 GUS 染色缓冲液 (0.2 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钠, 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钠, 2 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾, 2 mmol·L⁻¹ 亚铁氰化钾, 现用现配) 在冰上洗涤 3 次, 然后将材料转移至 GUS 染色液 (1 mmol·L⁻¹ x-Gluc 先溶于 DMF, 后溶于染色缓冲液, 并加 0.2% 的 TritonX-100, 现配现用) 中, 抽真空 20~30 min, 后置

于 37 °C 摇床 70 r·min⁻¹, 染色 10 h。最后用 75% 乙醇进行脱色, 取脱色后的茎或叶片, 将其固定于 5%~6% 琼脂中, 待凝固后使用振动式切片器切片, 后使用显微镜对 GUS 信号的定位进行观察。GUS 染色实验包含 2 个转基因株系, 每个转基因株系设置单株重复。

1.3 RNA 提取及 qRT-PCR 分析下游基因表达量

采用华越洋植物 RNA 提取试剂盒, 分别提取‘84K’杨, 过表达株系 (OE6, OE18) 的相同节间总 RNA, 然后以 RNA 为模板按照 HiScript II Q RT SuperMix for Qpcr (+ gDNA wiper) 试剂盒说明书合成 cDNA, 并利用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒进行 qRT-PCR (反应体系: SYBR Premix Ex Taq Tm 5 μL, 引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 3 μL), 以 *Actin* 作为内参基因, 每个样本设 4 个生物学重复。最后采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算茎植物组织相对表达量。同时, 本研究选择了细胞壁三大素 (纤维素, 半纤维素, 木质素) 部分合成相关的基因 (*CESA4*、*CESA7A*、*CESA7B*、*CESA8A*、*CESA8B*、*GUX1a*、*GUX1b*、*PARVUS*、*4CL*、*C3H*、*COMT*、*CAD*、*LAC4*、*LAC17*) 通过 qRT-PCR 技术进行分析 *PagKNAT2/6a* 可能的下游靶基因, 所有引物见表 1。

1.4 震荡切片与 TBO 染色

将新鲜杨树茎的节间切成 1 cm 长, 一端用胶水固定于样品架, 利用震荡切片器对样品进行切片, 切片厚度一般设置为 60 μm, 将切片收集至 ddH₂O 中, 待染色观察。染色时直接将染色液 (0.5% 甲苯胺蓝) 滴到切片上, 1 min 左右后用蒸馏水冲洗在荧光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.5 扫描电镜分析

用双面刀片迅速取下野生型及 *PagKNAT2/6a* 异常表达的转基因植株新鲜的茎段, 后将其置于装有 4% 多聚甲醛中固定 2 h, 后经过脱水, 临界点干燥, 将茎段垂直放置于样品台上, 喷金处理使茎段横切面均匀喷上金粉, 最后用扫描电镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 氨基酸序列高度保守

根据 *PagKNAT2/6a* (Pop_A08G045880) 与 *PagKNAT2/6b* (Pop_A10G047641) 进化关

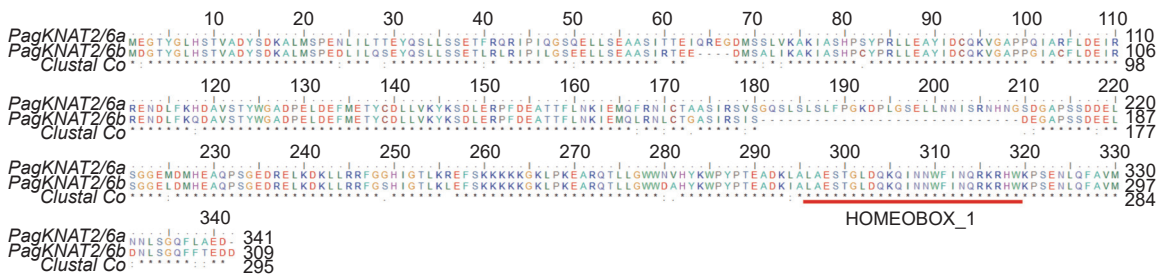
表 1 本研究中所用的引物序列

Table 1 The primer sequences used in this study.

基因名 Gene name	Transcript ID in <i>Populus</i>	正向引物 (5'→3') Forward primers (5'→3')	反向引物 (5'→3') Reverse primers (5'→3')	注 Notes
<i>KNAT2/6a</i>	Potri.008G188700	CGCAGATTGCACGTTTCTTA	AGGCCTTTCAAGATCGGATT	RT-PCR
<i>Actin</i>	Potri.001G309500	AAACTGTAATGGTCTCCCTCCG	GCATCATCAATCACTCTCCGA	RT-PCR
<i>CesA4</i>	Potri.002G257900	CAGTCTGTCTCAGTGCAA	CAACACTTCTGCTGACGAA	RT-PCR
<i>CesA7A</i>	Potri.006G181900	TGCAGTGCTAACCAATGCTC	TGTTGGCGTAACGATCATGT	RT-PCR
<i>CesA7B</i>	Potri.018G103900	TGCAGTGCTTACCAATGCTC	TGTTGGCGTATCGATCATGT	RT-PCR
<i>CesA8A</i>	Potri.011G069600	AAAACACCTGACGAGGGATG	GGCTTTCTTGTTGGTGTGGT	RT-PCR
<i>CesA8B</i>	Potri.004G059600	TGCTGTTTCTTGGCCTCTTT	GTATCTTCGGCTGCTTTTGC	RT-PCR
<i>GUX1a</i>	Potri.005G061600	CCAAAAGCTGAGAAGGATGC	TGCAGTTTGAAGGCTCAATG	RT-PCR
<i>GUX1b</i>	Potri.007G107200	TGGCATCGTATTCCAAAACA	GCAATCGTAGTCTCGGAAGC	RT-PCR
<i>PARVUS</i>	Potri.014G040300	ACATGGACTTGGTGGGGATA	TAAGAATCCAAGGCGAATGG	RT-PCR
<i>4CL1</i>	Potri.001G036900	CTTTCCTAGGCGCTTACAC	GGCAGAGTCTACGCACATGA	RT-PCR
<i>C3H</i>	Potri.006G033300	GTGGAGGTGCCAAGAAACAT	GATTTGGGAAATCTGCCTCA	RT-PCR
<i>COMT</i>	Potri.012G006400	GATGCGCCTGTCATGTTAGA	GAGGACCTTGTCTGGTTCA	RT-PCR
<i>CAD</i>	Potri.009G095800	AAGCTTGATGGCAAGCTGAT	CCTCTCGAATGCTGTGTTGA	RT-PCR
<i>LAC4</i>	Potri.010G193100	GTTTCCGGGACCCACTATTT	CCCAGGCTGTATTGGACT	RT-PCR
<i>LAC17</i>	Potri.006G087100	AATGTGCCACAAACAGTGGA	CGGAGGTGAAGACACCATTT	RT-PCR
<i>KNAT2/6a</i>	Potri.008G188700	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GCATGGAAGGAACTTACGGTCTACTCA	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGT ATCAGTCTTCAGCAAGGAACTGCCAGA	Clone

系, 本研究首先分析了 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 氨基酸序列的相似性, 如图 1 所示, *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 氨基酸序列高度相似, 且都包含 HOMEBOX-1 保守的同源

盒, 表明 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 基因同源性相对较高, 序列相对保守, 为此推测 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 基因在杨树发育中可能存在功能保守性。

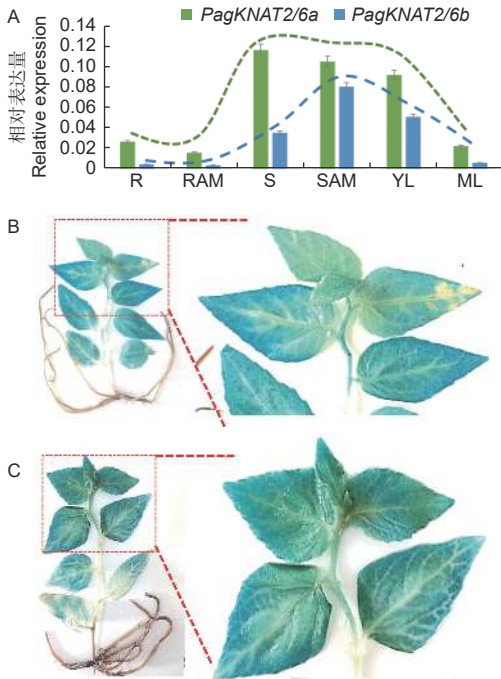
图 1 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 氨基酸序列比对Fig. 1 *PagKNAT2/6a* and *PagKNAT2/6b* amino acid sequence alignment.

2.2 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 具有相似的表达模式

为比较分析 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在杨树不同组织中的表达特异性, 本研究首先借助实时荧光定量 PCR 技术, 检测 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 基因在‘84K’杨树根、根尖、茎、茎尖、幼嫩叶及成熟叶 6 个部位中的组织表达变化 (图 2A), 结果显示 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b*

基因均在杨树茎、茎尖以及幼嫩叶片中表现出较高的表达量。与此同时, 本研究克隆了 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 基因启动子序列, 将其融合至含有 GUS 报告基因的载体中, 通过稳定的杨树遗传转化方法获得 $P_{PagKNAT2/6a}::GUS$ 与 $P_{PagKNAT2/6b}::GUS$ 转基因杨树并进行 GUS 染色实验分析其表达定位 (图 2B 与 2C)。结果显示 *PagKNAT2/6b* 基因 (图 2B) 在幼嫩节间与叶片中 GUS 信号强于

PagKNAT2/6a (图 2C), 且在 GUS 信号观察中发现 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在幼嫩叶片与幼嫩茎段中的表达均强于成熟叶片与根。



注: A, R 与 RAM 分别代表根与根尖; S 与 SAM 分别代表茎与茎尖; YL 与 ML 分别代表幼嫩叶与成熟叶; B, $P_{PagKNAT2/6b}::GUS$ 转基因植株 GUS 染色分析; C, $P_{PagKNAT2/6a}::GUS$ 转基因植株 GUS 染色分析

Notes: A, R and RAM represent root and root tip, respectively; S and SAM represent stem and stem tip, respectively; YL and ML represent young leaf and mature leaf, respectively; B, GUS staining analysis of $P_{PagKNAT2/6b}::GUS$ transgenic plants; C, GUS staining analysis of $P_{PagKNAT2/6a}::GUS$ transgenic plants

图 2 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 基因组织表达特异性分析

Fig. 2 Tissue expression specificity analysis of *PagKNAT2/6a* and *PagKNAT2/6b* genes

随后, 为深入研究 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 基因在茎中的表达特性, 通过 GUS 染色放大图发现 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 均特异在木质部与韧皮部表达 (图 3A、C), 但利用 Popgenie 网站分析发现 *PagKNAT2/6b* 表达量在木质部表达量显著高于 *PagKNAT2/6a* (图 3B、3D)。根据上述结果推测, 杨树 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 基因可能均参与杨树茎部木质部发育方面的调控。

2.3 *PagKNAT2/6a* 异常表达影响木质部分化与次生细胞壁合成

基于 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在杨树茎中木质部区域特异性表达, 为深入比较分析

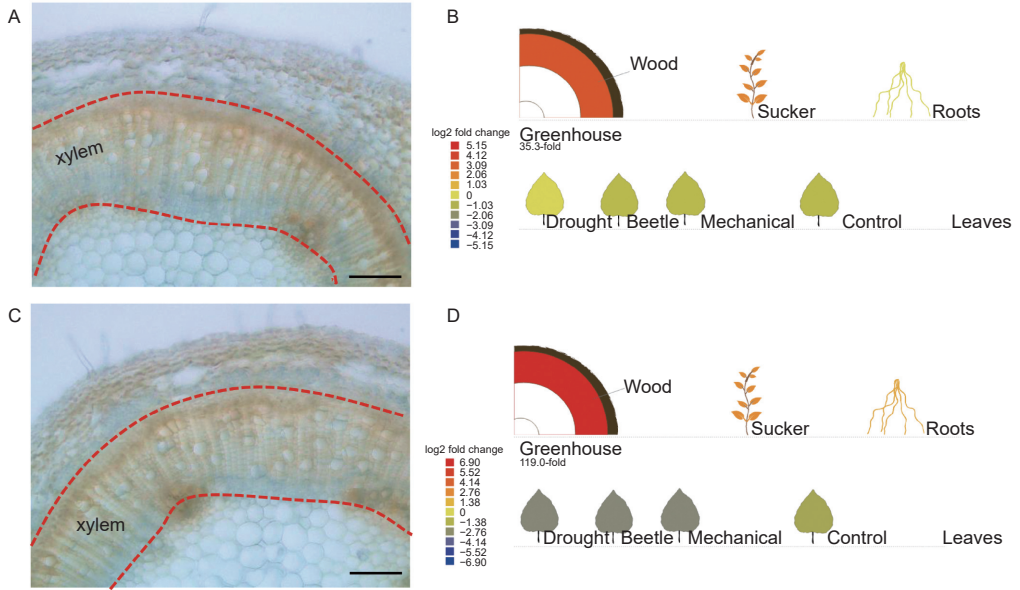
PagKNAT2/6a 与 *PagKNAT2/6b* 在木质部发育中的功能, 本研究在前期分别创制了 *PagKNAT2/6a* 过量表达转基因杨树 (*PagKNAT2/6a* OE, OE6 与 OE18) 和 *PagKNAT2/6a* 抑制表达转基因杨树 (*PagKNAT2/6a* SRDX, DR3 与 DR15) 转基因株系 (已发表)。与此同时, 对生长一个月的不同转基因株系的第八节间分别进行切片 (图 4A) 及扫描电镜分析 (图 4B)。结果显示: *PagKNAT2/6a* OE 株系的木质部宽度和次生壁沉积厚度显著窄于野生型 (CK), 而 *PagKNAT2/6a* SRDX 株系茎中木质部显著宽于 CK。该结果与研究团队前期发现的 *PagKNAT2/6b* 基因对木质部的影响相似, 说明 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在木质部分化调控上的保守性。

2.4 *PagKNAT2/6a* 调控壁合成相关转录因子

众所周知, 次生细胞壁是木质部的主要组成部分, 其组成成分对木材品质有直接的影响, 基于 *PagKNAT2/6b* 基因抑制次生壁合成相关基因的表达从而抑制杨树茎中木质部分化的研究基础^[10]; 为此, 推测 *PagKNAT2/6a* 基因可能通过调控次生壁合成基因来影响木质部的发育。为进一步解释 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 异常表达与次生壁合成相关基因之间的调控关系, 本研究通过 qRT-PCR 分析了细胞壁三大素 (纤维素、半纤维素、木质素) 合成相关基因在 CK、*PagKNAT2/6a* OE 植株茎中的表达变化 (图 5)。结果分析发现: 相比于 CK, 参与调控次生壁合成的纤维素、木糖 (半纤维素中主要组分)、木质素等相关基因 (COMT、CAD、LAC4、LAC17、CesA4、CesA7A、CesA7B、CesA8A、CesA8B) 在 *PagKNAT2/6a* OE 茎中均表现出下调表达的趋势, 其中, 纤维素合成相关的 CesA 类基因的下调趋势最显著 (图 5C)。根据以上结果可知, *PagKNAT2/6a* 基因通过调控次生壁合成相关基因的表达影响木质部发育, 且 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在对次生壁合成相关基因的调控上具有保守性。

3 讨论

次生木质部由维管形成层细胞通过平周、垂周分裂不断增殖, 位于内侧的细胞不断分化, 伴随次生壁形成和细胞内容物溶解从而形成成熟的次生木质部^[11]。次生木质部发育是木材生产的生物学基础, 其发育调控原理一直是林木分子生物学基础研

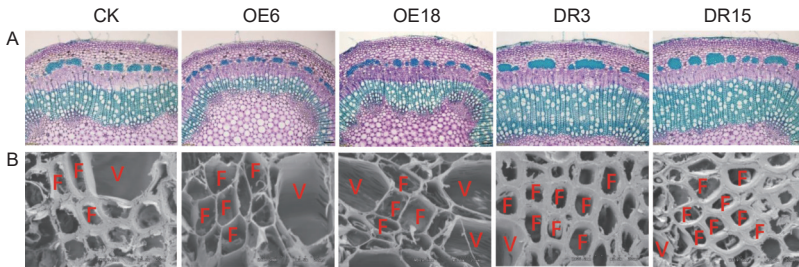


注: A, C 分别代表 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在茎中木质部 (xylem) 与韧皮部特异性表达; B, D 分别代表 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在不同组织中的表达量 (数据来源于 Gene popgenie.org 网站)

Notes: A and C represent the xylem and phloem specific expression of *PagKNAT2/6a* and *PagKNAT2/6b* in the stem, respectively. B and D represent the expressions of *PagKNAT2/6a* and *PagKNAT2/6b* in different tissues, respectively. Data from the Gene popgenie.org website

图 3 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 基因在茎中高表达

Fig. 3 *PagKNAT2/6a* and *PagKNAT2/6b* genes are highly expressed in stems



注: OE6 与 OE18 为 *PagKNAT2/6a* 过表达植株, DR3 与 DR15 为 *PagKNAT2/6a* 显性抑制植株。F, 纤维细胞; V, 导管细胞

Notes: OE6 and OE18 are *PagKNAT2/6a* overexpression plants, and DR3 and DR15 are *PagKNAT2/6a* dominant inhibitory plants. F, Fiber; V, Vessel

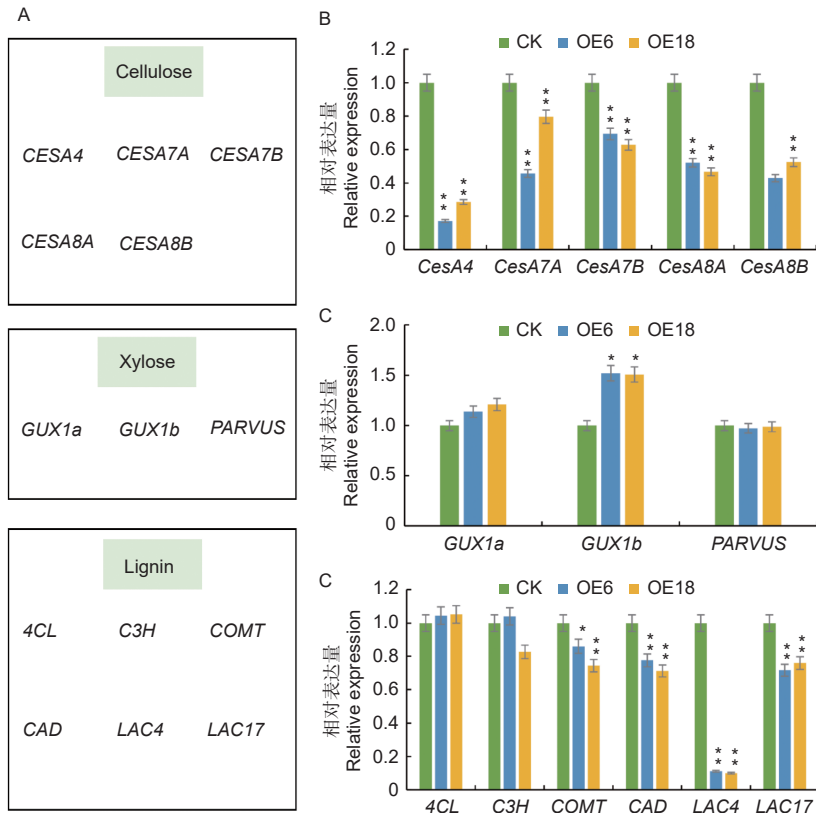
图 4 *PagKNAT2/6a* 异常表达影响茎中木质部分化与木质部细胞壁厚度

Fig. 4 Abnormal expression of *PagKNAT2/6a* affects woody partialization and xylem cell wall thickness in stems

究中关注的核心科学问题。已有研究表明, 木质部发育受多种因子调控, 如细胞比例, 次生细胞壁的结构组成, 植物激素和关键基因等。目前, 次生壁合成被认为由三级调控网络调控, 调控木质部细胞分化的 VND 类转录因子, 其可直接调控第二级转录因子 MYB46、MYB83 的表达, 后者又作为重要开关, 调控细胞壁三大素合成相关酶基因的表达^[12]。与此同时, 已有研究发现 KNOX 基因参与调控木本植物形成层分化, 其中杨树中 I 类 KNOX 成员 ARK1 与 ARK2 均在形成层区域表达^[13-14], 而 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在形

成层两侧表达, 可见不同 KNOX 类成员分别影响形成层的分裂及子细胞的分化过程^[15]。

木材来自形成层的活动, 调控形成层活动的基因会影响木质部的发育, 杨树中 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 均在形成层两侧区域有较高的表达量, 分析 *PagKNAT2/6b* 在木质部发育中的功能, 发现 *PagKNAT2/6b* 过表达会使木质部分化受到抑制^[9]。本研究着重比较了 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在对杨树茎中木质部的发育调控上的异同, 结果发现其在木质部发育中的功能存在一定保守性, 但从茎部切片结果可知 (图 4A),



注: A, 自上至下的 3 个框分为纤维素, 木糖, 木质素合成过程中关键基因; B, C, D 分别为纤维素、木糖及木质素合成相关基因在 *PagKNAT2/6a* 过表达材料茎中的表达分析。星号表示显著性: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

Notes: A, the three boxes from top to bottom are the key genes in the synthesis of cellulose, xylose and lignin; B, C and D were analyzed for the expression of cellulose, xylose and lignin synthesis related genes in the stem of *PagKNAT2/6a* overexpressed material, respectively. Asterisks indicate significant differences (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)

图 5 *PagKNAT2/6a* 异常表达影响细胞壁合成相关基因的表达

Fig. 5 Aberrant expression of *PagKNAT2/6a* affects the expression of genes related to cell wall synthesis

PagKNAT2/6b 对木质部发育的影响大于 *PagKNAT2/6a*。

4 结论

本研究在探究 *PagKNAT2/6a* 基因在木质部发育中的功能, 同时对杨树 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在木质部发育中功能的保守性进行分析, 确定了 *PagKNAT2/6a* 与 *PagKNAT2/6b* 在木质部发育与次生壁合成中的功能保守性, 本研究不仅为木材形成调控网络建立提供有效线索, 而且为木本植物分子育种工作提供理论基础。

参考文献:

- [1] MAHONEN, PEKKA A, HELARIUTTA, *et al.* Plant vascular development: from early specification to differentiation[J]. NAT REV MOL CELL BIO, 2016, 17(1): 30-40.
- [2] STETTLER R F, BRADSHAW H D J, HEILMAN P E, *et al.* Bio-
- logy of populus and its Implications for Management and Conservation[M]. NRC Research Press, 1996: 542.
- [3] FISCHER U, KUCUKOGLU M, HELARIUTTA Y, *et al.* The dynamics of cambial stem cell activity[J]. Annual Review of Plant Biology, 2019, 70(1): 293-319.
- [4] ZHAO C, LASSES T, BAKO L, *et al.* XYLEM NAC DOMAIN1, an angiosperm NAC transcription factor, inhibits xylem differentiation through conserved motifs that interact with RETINOBLASTOMA-RELATED[J]. New Phytologist, 2017, 216(1): 76-89.
- [5] DU J, GERTTULA S, LI Z, *et al.* Brassinosteroid regulation of wood formation in poplar[J]. The New phytologist, 2019, 225(4): 1516-1530.
- [6] WANG J, ZHOU H, ZHAO Y, *et al.* *PagGRF12a* interacts with *PagGIF1b* to regulate secondary xylem development through modulating *PagXND1a* expression in *Populus alba* × *P. glandulosa*[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(10): 1683-1694.
- [7] FURUMIZU C, ALVAREZ J P, SAKAKIBARA K, *et al.* Antagon-

- istic roles for *KNOX1* and *KNOX2* genes in patterning the land plant body plan following an ancient gene duplication[J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(2): e1004980.
- [8] BYRNE M E, SIMOROWSKI J, MARTIENSSEN R A. *ASYMMETRIC LEAVES1* reveals knox gene redundancy in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2002, 129(8): 1957-1965.
- [9] ZHAO Y, SONG X, ZHOU H, *et al.* *KNAT2/6b*, a class I *KNOX* gene, impedes xylem differentiation by regulating NAC domain transcription factors in poplar[J]. *The New Phytologist*, 2019, 225(4): 1531-1544.
- [10] 赵岩秋. *PagKNAT2/6b*基因调控杨树生长发育的机制研究[D]. 中国林业科学研究院, 2020.
- [11] 江 成, 张 进, 卢孟柱. 林木木材的分子改良[J]. *生命的化学*, 2021, 41 (6): 1126-1132.
- [12] JIN, ZHANG, MENG, *et al.* Recent advances in the transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in the woody plants.[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1535.
- [13] GROOVER A T, MANSFIELD S D, DIFAZIO S P, *et al.* The populus homeobox gene *ARBORKNOX1* reveals overlapping mechanisms regulating the shoot apical meristem and the vascular cambium[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(6): 917-932.
- [14] LIU L, ZINKGRAF M, PETZOLD H E, *et al.* The populus *ARBORKNOX1* homeodomain transcription factor regulates woody growth through binding to evolutionarily conserved target genes of diverse function[J]. *New Phytologist*, 2015, 205(2): 682-694.
- [15] 赵岩秋, 周厚君, 魏凯丽, 等. 杨树中I类KNOX基因结构、表达与功能分析[J]. *林业科学研究*, 2018, 31 (4): 118-125.

Functional Conservation Existed in *PagKNAT2/6a* and *PagKNAT2/6b* During Xylem Development

LI Hai-yang^{1,2}, ZHAO Li-zi^{1,2}, ZHAO Yan-qiu^{1,2}

(1. The Engineering Research Institute of Agriculture and Forestry, Ludong University, Yantai 264025, Shandong, China; 2. College of Agriculture, Ludong University, Yantai 264025, Shandong, China)

Abstract: [Objective] To analyze the regulatory mechanism of *PagKNAT2/6a* in poplar dendritic development and the functional conservation of *PagKNAT2/6a* and *PagKNAT2/6b* in xylem development. [Methods] Gene sequence alignment analysis was carried out by using related software; Gene expression pattern analysis was performed by experiments such as GUS staining and real-time quantitative (qRT-PCR) of transgenic plants, and then stem anatomy analysis was also performed; Finally, genes related to secondary wall synthesis (such as cellulose synthesis-related genes *CESA4*, *CESA7A*, *CESA7B*, etc.; Hemicellulose synthesis-related genes *GUX1a*, *GUX1b*, *PARVUS*; Expression analysis and regulatory mechanism of lignin synthesis-related genes *COMT*, *CAD*, *LAC4*, etc) were explored. [Results] The sequences of *PagKNAT2/6a* and *PagKNAT2/6b* were highly similar, and they were expressed in different tissues of '84K', showing higher expression levels in poplar stems, stem tips and young leaves. Stem anatomy analysis of transgenic plants abnormally expressing *PagKNAT2/6a* showed that *PagKNAT2/6a* overexpression inhibited xylem development compared with wild type. At the same time, qRT-PCR analysis showed that *PagKNAT2/6a* gene related the expression of genes related to secondary wall synthesis and affected xylem development. [Conclusion] *PagKNAT2/6a* and *PagKNAT2/6b* both negatively regulate xylem development and have functional conservation.

Keywords: *PagKNAT2/6a*; *PagKNAT2/6b*; Poplar; xylem development; Conservatism

(责任编辑: 张 研)