

杨树次生壁纤维素合酶的表达与互作模式分析

魏凯莉¹, 周厚君¹, 江成¹, 赵岩秋¹, 宋学勤^{1,2*}, 卢孟柱^{1,2}

(1. 国家林业局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091;

2. 南方现代林业协同创新中心, 南京林业大学, 南京 210037)

摘要: [目的] 纤维素的合成在木材形成过程中具有重要的作用, 纤维素合酶 (Cellulose Synthase, CESA) 是参与纤维素合成的关键酶。由于 3 种 CESA 形成一个有功能的纤维素合酶复合体, 而杨树中包含 CESA4、CESA7A、CESA7B、CESA8A 和 CESA8B5 种次生壁 CESA, 本文从这 5 种 CESA 的表达模式与互作分析入手, 探讨了其在次生壁纤维素合成中的工作模式。 [方法] 利用 RNA-seq 与基因芯片数据进行基因表达分析, 揭示 5 种次生壁 CESA 在根、茎、叶组织的表达模式与次生维管再生过程中的表达变化。利用启动子驱动的 GUS 转基因材料 GUS 染色分析与实时定量 PCR 揭示 5 种次生壁 CESA 在各个组织的表达模式与在激素处理下的响应模式。利用荧光素酶互补实验揭示 CESA7A、CESA7B、CESA8A 与 CESA8B 之间的互作模式。 [结果] 基因表达分析表明, 杨树 5 种次生壁 CESA 基因在杨树成熟茎中高表达, 尤其在次生维管组织发育的后期高表达, 表明其主要参与木材次生壁纤维素的合成。对启动子驱动的 GUS 转基因材料观察表明, CESA4、CESA7B、CESA8A 和 CESA8B 的 GUS 信号在杨树茎和叶中较强, 但这些次生壁 CESA 的表达模式存在一定的差异, 这种差异在叶脉中表现地尤为明显。此外, 在赤霉素 GA₃ 和细胞分裂素 6-BA 处理下, 杨树次生壁 CESA 的表达量显著上调; 在生长素 NAA、油菜素内酯 BR 和乙烯处理下, 杨树次生壁 CESA 的表达量下调, 但不同的 CESA 对激素响应的表达量变化幅度存在差异。荧光素酶互补实验表明, 杨树次生壁 CESA7B 和 CESA8B、CESA7B 和 CESA8A、CESA7A 与 CESA8B 之间存在互作, 说明它们之间可以形成复合体。 [结论] 这些数据显示杨树 5 种次生壁 CESA 基因在不同组织与不同激素处理下的表达变化存在一定的差异, 而它们之间均能互作, 提示杨树 5 个次生壁 CESA 基因虽然具有同等的能力形成功能性的纤维素合酶复合体, 但在不同组织、不同激素作用下可能有不同的组合方式, 进而会导致木材成分差异。

关键词: 纤维素合酶 CESA; 次生壁; 表达分析; 互作; 激素; 杨树

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)02-0245-09

Interaction and Expression of Secondary Wall CESAs in *Populus*

WEI Kai-li¹, ZHOU Hou-jun¹, JIANG Cheng¹, ZHAO Yan-qiu¹, SONG Xue-qin^{1,2}, LU Meng-zhu^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: [Objective] Cellulose synthesis is important for the wood formation of woody plant. CESAs play important roles in the cellulose synthesis. Since that three kind of CESAs constitute a functional cellulose synthesis complex and five secondary wall CESAs existed in the poplar genome, we examined the expression pattern and interaction of these CESAs in *Populus* to reveal the work model of them in secondary wall cellulose synthesis. [Method] RNA-seq and microarray data analysis were used to examine the expression profile of the five secondary wall CESAs in root, stem and leaf, and in the regeneration of secondary vascular bundle, respectively. Promotor driving GUS expression assay and qRT-PCR were carried out to reveal the tissue expression pattern and hormone response of the five second-

收稿日期: 2016-04-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划) 形成层干细胞维持、分化以及次生木质部发育的调控机制 (2012CB114503)。

作者简介: 魏凯莉, 硕士在读。主要研究方向: 林木遗传育种。E-mail: wk19911228@163.com

* 通讯作者: 宋学勤, 博士。主要研究方向: 林木遗传育种。E-mail: xqsong@caf.ac.cn

ary wall *CESAs*. Firefly luciferase complementation assay was used to check the interaction between *CESA7A*, *CESA7B*, *CESA8A* and *CESA8B*. [**Result**] Expression analysis showed that all the five secondary wall *CESAs* exhibited high expression in the mature stem and preferred to express in the later stage of stem development, suggesting that they involved in the secondary wall synthesis during wood formation. Promotor driving GUS expression assay of *CESA4*, *CESA7B*, *CESA8A* and *CESA8B* demonstrated high expression of these secondary wall *CESAs* in stem and leaf, and some differences, however, were existed in the detail expression pattern, especially in leaf veins. In addition, the expression of secondary wall *CESAs* were upregulated during GA_3 and 6-BA treatment, while down-regulated during NAA, BR and ethylene treatment. The expression variation of these *CESAs* in response to different hormones were different. Firefly luciferase complementation assay showed that *CESA7A* and *CESA7B* could interact with *CESA8A* and *CESA8B*, indicating that they parallely determine the final secondary wall cellulose synthesis complex. [**Conclusion**] The five secondary wall *CESAs* showed different expression from one another in different tissue and under different hormone treatment. However, these *CESAs* could interact with each other. These data suggest that poplar secondary wall *CESAs* could form the cellulose synthesis complex in equal possibility, but the complex might be varied in different tissues and in response to different hormones, which might have an effect on the wood chemical composition.

Keywords: *CESA*; Secondary cell wall; Expression analysis; Interaction; Hormone; *Populus*

纤维素是植物细胞壁的主要多糖类组成成分^[1]。根据细胞壁的组成成分和形成方式,可将植物细胞壁分为初生细胞壁和次生细胞壁^[1]。初生细胞壁的主要成分是纤维素、半纤维素和果胶,通常在细胞板形成后开始沉积。木本植物木质部细胞在初生细胞壁形成后,进一步分化形成次生细胞壁。次生细胞壁的主要成分是纤维素、半纤维素和木质素,构成了木材的主要成分^[2]。纤维素是由 D-葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接而成的多聚物,其分子结构非常简单,但合成机制却极其复杂^[3]。高等植物中纤维素的合成是在位于细胞膜上的纤维素合酶复合体 (Cellulose Synthesis Complex, CSC) 完成的,其中纤维素合酶 (Cellulose Synthase/*CESA*) 是 CSC 的主要组成成分,是参与纤维素合成的关键酶^[3]。植物的 *CESA* 基因最早从棉花 (*Gossypium hirsutum*) 纤维中被克隆得到^[4],随后,其他植物中的 *CESA* 基因相继被报道。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组包含 10 个 *CESA* 基因,水稻 (*Oryza sativa*) 中含有 8 个 *CESA* 基因^[5-6]。*CESA* 蛋白序列高度保守,含有 8 个跨膜结构域,2 个在 N 端,6 个在 C 端^[3]。在第 2 和第 3 跨膜域之间存在一个胞质环区,该胞质区里含有一些与底物结合与催化相关的残基,这些残基构成了一个保守的 D, D, D, Q/RXXRW (天冬氨酸,天冬氨酸,谷氨酰胺-X-X-精氨酸-色氨酸) 结构^[3]。

目前的研究结果认为,3 种 *CESA* 蛋白形成一个有功能的 CSC^[7]。拟南芥中负责次生壁纤维素合成

的 CSC 是由 *CESA4*、*CESA7* 和 *CESA8* 组成,负责初生壁纤维素合成的 CSC 由 *CESA1*、*CESA3* 和 *CESA6* 及其类似基因 *CESA2*/*CESA5*/*CESA9* 组成^[5, 8-14]。双分子荧光互补和酵母双杂实验证实,*CESA4* 可与自身互作,且 *CESA4*、*CESA7* 和 *CESA8* 之间可以相互作用^[15],而免疫共沉淀、双分子荧光互补和酵母双杂实验证明,初生壁 *CESA1*、*CESA3* 和 *CESA6* 自身以及相互之间可以相互作用^[11, 16]。随后, Pull-down 实验证实所有次生壁纤维素合成相关 *CESA* 基因之间存在互作关系^[13, 17]。

次生细胞壁是木材的主要来源,其中纤维素含量高达 40 ~ 50%,因而,参与次生壁纤维素合成的 *CESA* 基因将在木材形成中发挥关键作用。通过同源序列比对,毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 基因组中鉴定出 17 个 *CESA* 基因^[18-20],其中,负责次生壁纤维素合成 *CESA* 基因有 5 种 (*PtCESA4*、*PtCESA7A*、*PtCESA7B*、*PtCESA8A* 和 *PtCESA8B*),相对于拟南芥 (*AtCESA4*、*AtCESA7*、和 *AtCESA8*) 多出 2 种 *CESA* 基因。由于 3 种 *CESA* 蛋白组成一个有功能的 CSC,因此,研究杨树 5 个次生壁 *CESA* 基因的表达模式和作用方式,有助于揭示这 5 个次生壁 *CESA* 基因在木本植物纤维素合成中的工作机理。目前,杨树次生壁 *CESA* 基因的表达模式已有部分研究,例如, Naoki 等通过启动子驱动的 GUS 转基因材料研究了次生壁 *CESA* 基因的在木质部、韧皮部、根冠等组织的表达模式^[21]。另外, Song 等曾利用 *PtCESA7A* 或

PtCESA8B 的抗体以分化的木质部材料开展共沉淀研究,对共沉淀获得的复合体进行质谱分析检测到了所有 5 个杨树次生壁 *CESA* 基因,表明杨树 5 个次生壁 *CESA* 基因之间存在一定的互作关系,且均参与木材形成过程中的纤维素合成^[22]。然而,目前关于杨树 5 个次生壁 *CESA* 基因以何种形式组成有功能的 CSC,是随机组合还是有所偏好,尚无相关的研究。本文通过对杨树 5 个次生壁 *CESA* 基因的表达模式与互作模式展开分析,试图为揭示杨树 5 个次生壁 *CESA* 基因的作用模式提供一些线索。

1 材料与方法

1.1 植物材料

杂种杨 84K (*P. alba* × *P. glandulosa*) 组培苗用于基因遗传转化。84K 组培苗在温度为 23 ~ 25℃、光照为 16/8 h (白天/黑夜)、光照强度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的条件下培养。克隆获得 2 Kb 的 *CESA4*、*CESA7B*、*CESA8A* 与 *CESA8B* 基因的启动子区,通过 Gateway 反应重组到 pMDC164 载体。所有表达载体通过电击转化法转化入根癌农杆菌菌株 GV3101,随后采用叶盘法进行遗传转化^[23]。简略描述如下:将叶盘与转化了目的构建的农杆菌 (*OD*₆₀₀ 为 0.4 ~ 0.8) 共同孵育 10 min,之后在分化培养基 (MS + 0.5 g · L⁻¹ 6-苄氨基腺嘌呤 (6-Benzylaminopurine, 6-BA) + 0.05 mg · L⁻¹ 萘乙酸 (1-Naphthaleneacetic acid, NAA)) 上暗培养 3 天;暗培养后在添加 3 mg · L⁻¹ 潮霉素与 200 mg · L⁻¹ 特美汀的分化培养基上继续培养,获得生长良好的不定芽;将不定芽转移至添加 3 mg · L⁻¹ 潮霉素与 200 mg · L⁻¹ 特美汀的生根培养基 (MS + 0.05 mg · L⁻¹ IAA + 0.02 mg · L⁻¹ NAA) 中继续培养,直到获得不定根生长良好的转基因植株。转基因植株获得后,通过克隆片段特异引物加载体特异引物进行 PCR 筛选验证转基因阳性植株。每个基因的转基因阳性植株至少拿到 10 个独立株系。转基因植株培养 4 w 后进行 GUS 染色。荧光素酶互补报告实验中所用烟草材料为本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*),在温度为 23 ~ 25℃、光照为 16/8 h (白天/黑夜) 的培养室中培养。播种后生长一个月左右可以用于荧光素酶互补报告实验。

1.2 生物信息学分析

从 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 和 Phytozome (<http://www.phytozome.net/poplar.php>) 网

站获取拟南芥和杨树的 *CESA* 基因家族的序列信息。采用 MEGA 5.0 软件中基于遗传距离的邻近结合法 (Neighbor Joining, NJ) 构建进化树。根据拟南芥 AtCESA 锌指结构和跨膜结构域信息 (<http://www.uniprot.org/>), 手工绘制杨树 *CESA* 锌指结构和跨膜结构域位置图。依据杨树次生壁 *CESA* 基因的基因号 (PtCESA4: Potri. 002G257900; PtCESA7A: Potri. 006G181900; PtCESA7B: Potri. 018G103900; PtCESA8A: Potri. 011G069600; PtCESA8B: Potri. 004G059600) 在已报道的杨树幼嫩与成熟的茎、叶和根组织的 RNA-seq 数据^[23] 与剥皮再生过程再生组织表达量的基因芯片数据^[24] 中进行检索,获得基因的表达数据。杨树幼嫩与成熟的茎、叶和根组织的 RNA-seq 实验方法详见 Liu 等的方法^[23], 简略而言,使用 RNeasy Plant Mini 试剂盒和 RNase-free DNase I 试剂盒 (Qiagen) 提取杨树幼嫩与成熟的茎、叶和根组织的总 RNA, 交由公司完成测序。剥皮再生过程再生组织表达量的基因芯片数据的实验方法详见 Tang 等的方法^[24], 简略而言,取生长时间一致的毛白杨在同一时间进行茎干的环剥,剥皮后第 0、7、10、12、16、18 和 21 d 用无菌刀片刮取树干表面再生组织,利用 Affymetrix 系统平台进行基因芯片的杂交、洗染和扫描。

1.3 植株激素处理及 qRT-PCR 分析

分别用 0.1 mol · L⁻¹ NAA, 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素 (Gibberellin, GA₃), 1 nmol · L⁻¹ 油菜素内酯 (epibrassinolide, BR) 和 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙烯 (ethylene), 对组培培养 4 w 的 84K 植株进行处理。处理方法为,选取生长状态一致的 84K 组培苗,去除培养基,将根部置于上述浓度的激素溶液中,在处理 0 h、3 h、6 h 时取样进行次生壁 *CESA* 的表达量分析。取样部位为组培苗的茎。所有的试剂购于 Sigma-Aldrich。在 qRT-PCR 实验中,取激素处理后的 84K 茎段,使用 RNeasy Plant Mini 试剂盒和 RNase-free DNase I 试剂盒 (Qiagen) 提取总 RNA。每个样品取 2 μg RNA 使用 SuperScript III first-strand synthesis system (Invitrogen) 合成 cDNA 第一链。定量 PCR 的引物使用 Primer 3 软件设计,按照 SYBR Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa) 使用说明书准备反应混合液,实时定量 PCR 反应在 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) 或 Roche 480 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche) 上进行。PtACTIN 作为内参,一次 qRT-PCR 实验包含四次技术重

复。所有实时定量实验至少重复三次。实验所用 qRT-PCR 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primers for qRT-PCR.

引物名 Primer	引物序列 Sequence
PtCesA4rtF	GAGTTGGAGAAATCATCA
PtCesA4rtR	GAGAGTTAGTTCCTTCAG
PtCesA7ArtF	CTTCCATGTGCACCTTTGAAGCCA
PtCesA7ArtR	TCAGGAGCTCGAGGTTCTATGCTA
PtCesA7BrtF	AACCACTGCAACCATCTCA
PtCesA7BrtR	ATGTTCCATGACAGCTCAGG
PtCesA8ArtF	GTATTCTGGGGCTAAACCTTCG
PtCesA8ArtR	TCTCGCAGTTCATGTAACCTCAAC
PtCesA8BrtF	AAGGACCAAGCAAACATT
PtCesA8BrtR	AACTGGATGTAACCGTAAG

1.4 荧光素酶互补报告体系

荧光素酶互补报告体系所用载体由中科院遗传所周奕华老师课题组惠赠。按照文献中操作步骤进行荧光素酶互补报告实验^[25], 简言之, 将克隆得到的次生壁 PtCESA 蛋白 CDS 序列通过酶切连接的方法分别构建到包含荧光素酶蛋白 N 端序列的 NLuc 载体或 C 端序列的 Cluc 载体, 构建好的载体通过农杆菌 GV3101 介导转化本氏烟草叶片, 培养 3 d 后, 在叶片上涂布荧光素, 利用 IndiGO 软件检测荧光信号。

1.5 GUS 染色分析

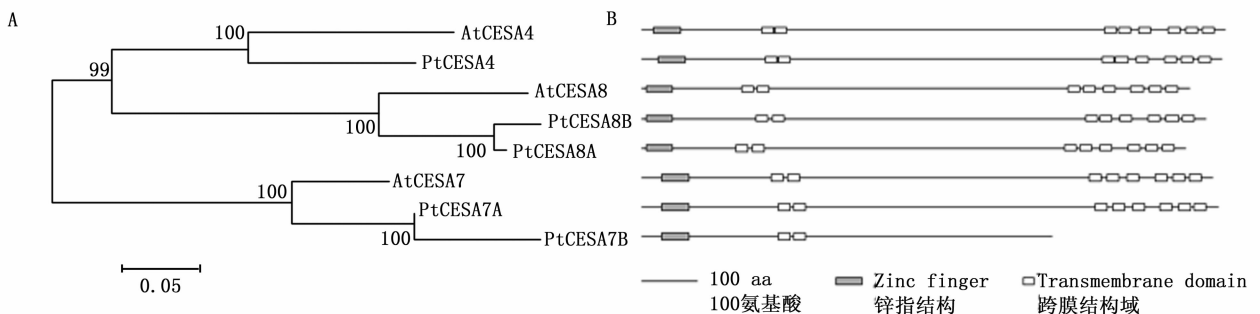
GUS 的组织化学染色按照如下步骤进行^[23]: 培养 4 w 的转基因组培苗, 在预冷的 90% 丙酮中固定约 2 h。固定结束后, 在冰上将组织材料使用 GUS

染色缓冲液 (50 mmol · L⁻¹ sodium phosphate (pH7.0), 2 mmol · L⁻¹ potassium ferrocyanide, 2 mmol · L⁻¹ potassium ferricyanide, 10 mmol · L⁻¹ EDTA, 0.2% Triton X-100 (v/v)) 洗涤 3 次, 再转移至 GUS 染色液 (染色缓冲液添加 20% (v/v) methanol 和 1 mM X-Gluc), 于 37℃ 温浴 12 h 后, 使用 70% 乙醇脱色。对 *CESA4*、*CESA7B*、*CESA8A* 与 *CESA8B* 基因启动子驱动 GUS 转基因材料, 每一个转基因材料至少选择 5 个株系进行 GUS 染色, 每个转基因材料的染色至少重复三次, 以保证结果的可靠性。

2 结果与分析

2.1 杨树次生壁 *CESA* 基因的进化关系和蛋白结构

杨树 5 个次生壁 *CESA* 基因, 包含 1 个 *CESA4* 基因, 2 个 *CESA7* 基因和 2 个 *CESA8* 基因, 这些基因的序列与拟南芥次生壁 *CESA* 基因的序列相似性很高 (图 1A)。基因的蛋白结构分析是研究基因功能的基础。有报道表明锌指结构在 *CESA* 之间的互动中起重要的作用, 跨膜结构域是 *CESA* 形成三维结构的基础^[3]。杨树次生壁 *CESA* 的结构分析发现, 杨树和拟南芥次生壁 *CESA* 的锌指结构和跨膜结构的位置高度保守 (图 1B)。杨树 5 个次生壁 *CESA* 的 N 端均含有锌指结构, 杨树 *CESA4*、*CESA7A*、*CESA8A* 和 *CESA8B* 也与拟南芥的 *CESA4*、*CESA7* 和 *CESA8* 一样, 均含有 8 个跨膜结构域, 而杨树 *CESA7B* 的 C 端则缺少 6 个跨膜结构域。



A 拟南芥和杨树 *CESA* 基因的系统进化树; B 拟南芥和杨树 *CESA* 蛋白的结构图。图中标示了锌指结构和跨膜结构域。

A The phylogenetic tree of *CesA* genes from *Arabidopsis* and *Populus*; B Schematic representation of zinc finger and transmembrane domains AtCesAs and PtCesAs. Zinc finger domain and transmembrane domains was marked on the protein sequence.

图 1 杨树与拟南芥次生壁 *CESA* 基因的进化关系与蛋白结构分析

Fig. 1 The phylogenetic relationship and topology of *CesA* genes

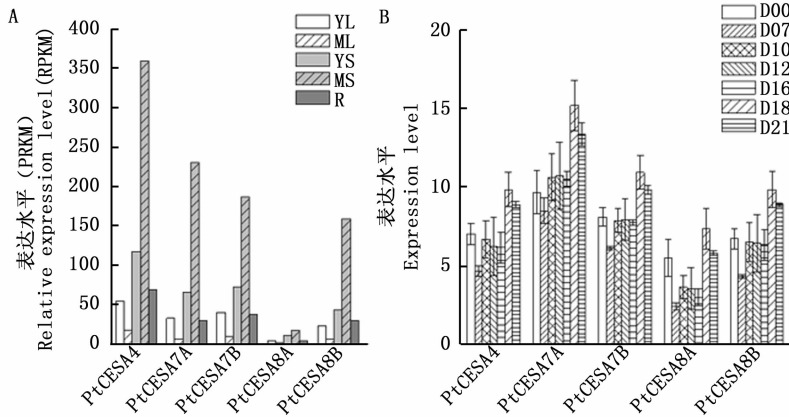
2.2 杨树次生壁 *CESA* 在不同组织及次生维管发育中的表达特征

基因表达分析研究有助于揭示基因的功能。为

了获得杨树不同次生壁 *CESA* 基因的表达模式, 检测了它们在不同组织及次生维管再生过程中的基因表达情况。杨树幼嫩与成熟的茎、叶和根组织的

RNA-seq 数据分析表明,杨树次生壁 *CESA* 基因在幼嫩叶、幼嫩茎、成熟茎以及根组织中均有可观的表达,但在成熟茎中表达量最高(图 2A)。值得注意的是,*CESA8A* 在各个组织中的表达量均较其他几个 *CESA* 基因低(图 2A)。随后,通过对次生维管再生实验系统中不同时期再生组织基因表达的基因芯片数据分析表明,杨树次生壁 *CESA* 基因在剥皮 12 d

后的再生组织(木质部分化阶段)的表达量不断提高,与它们参与木材形成过程中次生壁纤维素合成的功能相吻合(图 2B)。另外,在这一过程中,5 个杨树次生壁 *CESA* 基因的变化趋势一致,变化幅度相差不大。相对而言,*CESA8A* 在再生组织中的表达量较其他几个 *CESA* 基因略低。



A 杨树次生壁 *CESA* 基因在幼嫩叶 (YL)、成熟叶 (ML)、幼嫩茎 (YS)、成熟茎 (MS) 和根 (R) 中的表达分析; B 杨树次生壁 *CESA* 基因在剥皮后 0 (D00)、7 (D07)、10 (D10)、12 (D12)、16 (D16)、18 (D18) 和 21 (D21) d 的再生组织中的表达分析。

A The expression of secondary wall *PtCESAs* in young leaf (YL), mature leaf (ML), young stem (YS), mature stem (MS) and root (R); B The expression of secondary wall *PtCESAs* in the regeneration tissue at 0 (D00), 7 (D07), 10 (D10), 12 (D12), 16 (D16), 18 (D18) and 21 days (D21) after debarking.

图2 杨树次生壁 *CESA* 基因在不同组织和次生维管再生过程中的表达模式

Fig. 2 The expression of secondary wall *PtCESAs* in different tissues and in the regeneration of secondary vascular system

2.3 基于启动子驱动 GUS 表达的转基因杨树中次生壁 *CESA* 的表达模式

为了检测杨树次生壁 *CESA* 基因的组织表达特异性,创制了次生壁 *CESA* 基因启动子驱动 GUS 表达的转基因植株。通过 GUS 染色分析发现,在 $P_{PtCESA4}::GUS$ 、 $P_{PtCESA7A}::GUS$ 、 $P_{PtCESA8A}::GUS$ 和 $P_{PtCESA7B}::GUS$ 转基因植株的茎和叶中,均检测到较强的 GUS 信号(图 3)。在茎段中,顶端节间的 GUS 信号明显较基部节间的强。 $P_{PtCESA4}::GUS$ 、 $P_{PtCESA7A}::GUS$ 、 $P_{PtCESA8A}::GUS$ 和 $P_{PtCESA7B}::GUS$ 转基因植株之间,在叶中的 GUS 信号存在一定的差异。 $P_{PtCESA8A}::GUS$ 和 $P_{PtCESA7B}::GUS$ 转基因植株在整个叶片中均观测到了 GUS 信号(图 3B 和 3C),而 $P_{PtCESA4}::GUS$ 和 $P_{PtCESA7A}::GUS$ 转基因植株在叶脉中则基本上未检测到 GUS 信号(图 3A 和 3D)。

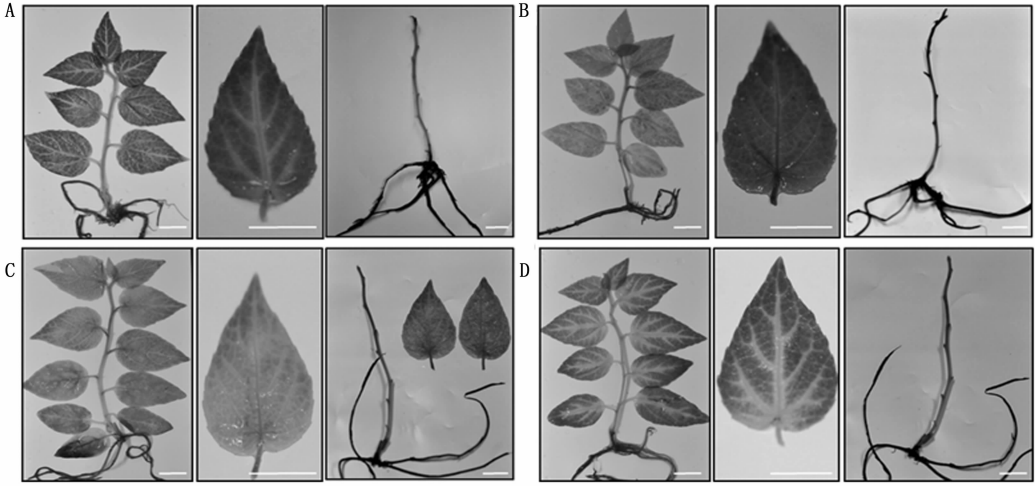
2.4 杨树次生壁 *CESA* 对激素处理的响应

许多研究表明,激素可诱导 *CESA* 基因的表达^[25-26]。利用赤霉素 GA_3 、萘乙酸 NAA、油菜素内

酯 BR、细胞分裂素 6-BA 和乙烯处理 84K 杨幼苗,检测了茎中次生壁 *CESA* 对激素的响应模式。结果显示, GA_3 和 6-BA 使杨树次生壁 *CESA* 的表达量上调,其中 GA_3 的作用更显著(图 4A 和 4D)。NAA、BR 和乙烯处理下,杨树次生壁 *CESA* 的表达量下调,其中 BR 的作用相对显著(图 4)。就 5 个杨树次生壁 *CESA* 基因的表达量变化对激素的响应而言,*PtCESA4* 的表达量变化最显著,*PtCESA7A* 较 *PtCESA7B* 的表达量变化显著,*PtCESA8B* 较 *PtCESA8A* 的表达量变化显著。

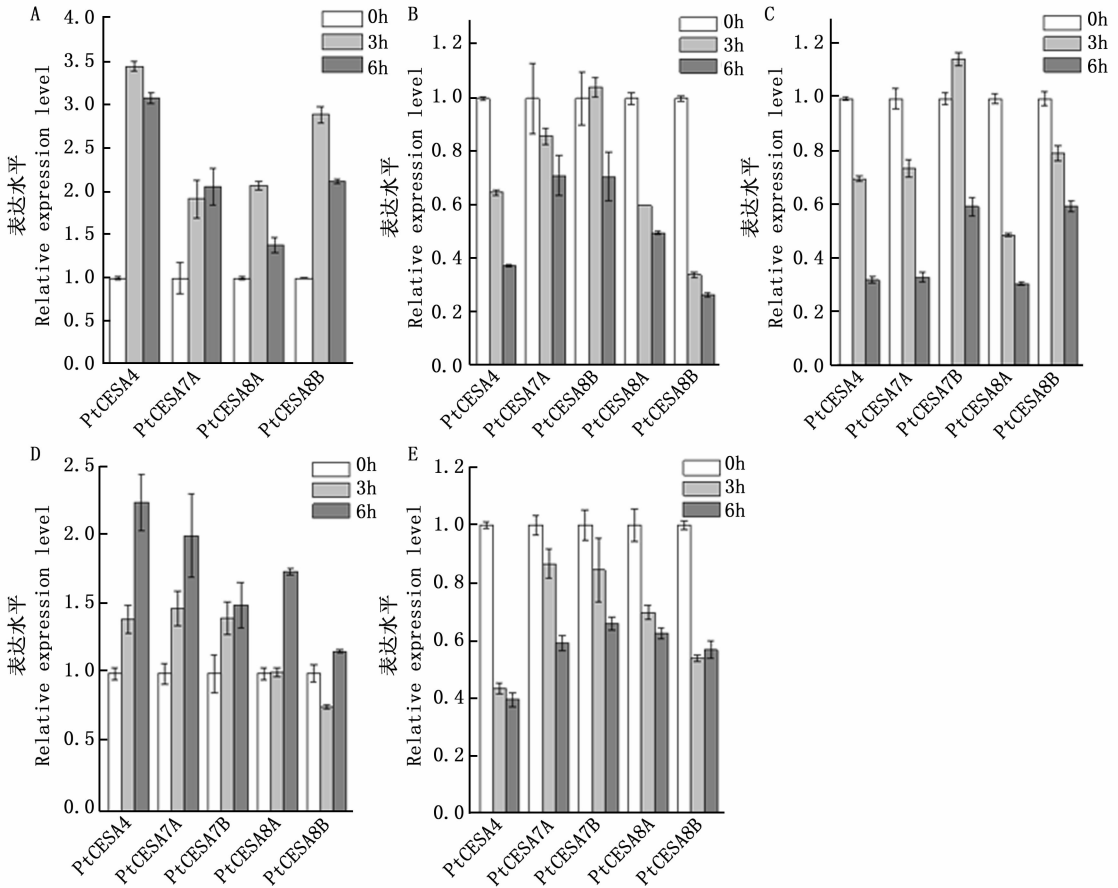
2.5 杨树次生壁 *CESA* 间的互作

遗传学研究证实正常行使功能的 CSC 中含有 3 种 *CESA* 蛋白^[27]。拟南芥中负责次生壁纤维素合成的 CSC 是由 *CESA4*、*CESA7* 和 *CESA8* 组成。在杨树中有 5 个次生壁 *CESA*,其中 1 个 *CESA4*、2 个 *CESA7* 和 2 个 *CESA8*。为了确定杨树中的 2 个 *CESA7* 和 2 个 *CESA8* 在与 *CESA4* 形成复合体的过程中究竟是几率均等还是有所偏好,对它们之间的互



A $P_{pCESA4}::GUS$ 转基因杨树; B $P_{pagCESA7B}::GUS$ 转基因杨树; C $P_{pagCESA8A}::GUS$ 转基因杨树; D $P_{pagCESA7A}::GUS$ 转基因杨树。标尺 = 1 cm。
 A $P_{pCESA4}::GUS$ -expressing poplar plants; B $P_{pagCESA7B}::GUS$ -expressing poplar plants; C $P_{pagCESA8A}::GUS$ -expressing poplar plants; D $P_{pagCESA7A}::GUS$ -expressing poplar plants. Bar = 1 cm.

图3 杨树次生壁 *CESA* 基因启动子驱动 *GUS* 表达转基因杨树的 *GUS* 染色分析
 Fig. 3 *GUS* staining assay of *Populus* secondary wall *PtCESA* gene promoters

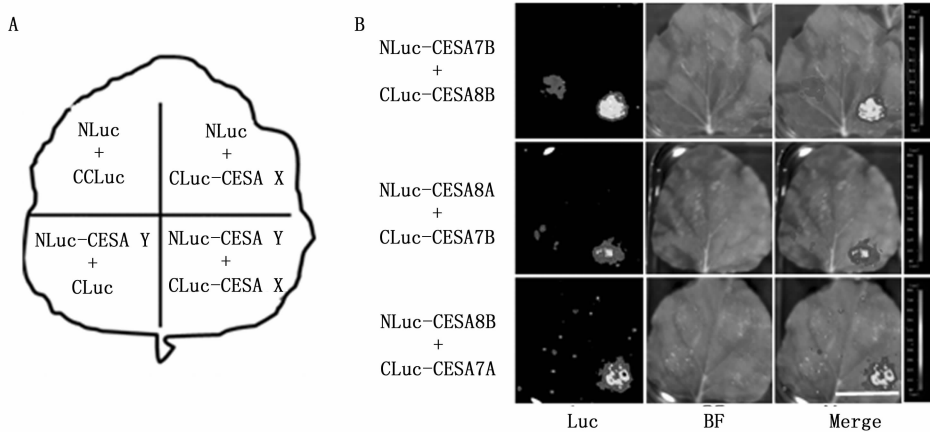


A 赤霉素 GA_3 ; B 生长素 NAA; C 油菜素内酯 BR; D 细胞分裂素 6-BA; E 乙烯利。
 A The expression of *PtCESA4*, *8A* and *8B* under GA_3 treatment; B The expression of *PtCESA4*, *7B*, *8A* and *8B* under NAA treatment; C The expression of *PtCESA4*, *7B*, *8A* and *8B* under BR treatment; D The expression of *PtCESA4*, *7B*, *8A* and *8B* under 6BA treatment; E The expression of *PtCESA4*, *7B*, *8A* and *8B* under ethylene treatment.

图4 不同激素处理3 h、6 h后杨树次生壁 *CESA* 基因的表达变化
 Fig. 4 The response of secondary wall *CESA* genes to 3 h and 6 h hormone treatment

作情况进行了检测。如图5所示,在荧光素酶互补报告体系中,相对于对照,*PtCESA7B*和*PtCESA8B*,*PtCESA8A*和*PtCESA7B*,*PtCESA8B*和*PtCESA7A*的组合表现出强的荧光信号,表明上述次生壁 CESA

可以互作形成二聚体,因此,*PtCESA7A*和*PtCESA7B*、*PtCESA8A*和*PtCESA8B*可能具有相同的能力形成有功能的CSC。



A 本氏烟草叶表面农杆菌注射位置以及所转化的组合示意图。NLuc:荧光素酶N端,CLuc:荧光素酶C端;CESA X与CESA Y代表转化组合中的两个CESA;B CESA组合转化后的荧光素酶荧光检测。Luc:荧光素酶荧光信号;BF:明场;Merge:荧光信号与明场图像的叠加。

A. The general scheme showed the constructs and their infiltrated location used in the split-luciferase complementation assay. NLUC: the split N terminal of luciferase; CLUC: the split C terminal of luciferase; CESA X and CESA Y: two different secondary wall PtCESAs. B. The fluorescence signal detected after the transformation of different secondary wall PtCESA combination. Luc: the fluorescence signal; BF: bright field; Merge: the merged image of Luc and BF.

图5 荧光素酶互补试验分析杨树次生壁 CESA 成员间的互作

Fig. 5 The split-luciferase complementation assay showed the interaction between secondary wall PtCESAs.

3 讨论

纤维素合成需要纤维素合酶不同成员形成复合体,正常行使功能的CSC需要3种CESA蛋白^[28]。本论文研究了杨树中5个次生壁纤维素合成相关的CESA基因的表达模式与互作模式,为揭示木本植物木材形成过程中5个次生壁CESA的作用提供了线索。研究表明,杨树5个次生壁CESA基因在杨树成熟茎中高表达,尤其在次生维管组织发育的后期高表达;CESA4、CESA7B、CESA8A和CESA8B的GUS信号在杨树茎和叶中较强,但这些次生壁CESA的表达模式存在一定的差异;杨树次生壁CESA的表达量被赤霉素和细胞分裂素上调,被生长素、油菜素内酯和乙烯下调;杨树次生壁CESA7B和CESA8B、CESA7B和CESA8A、CESA7A与CESA8B之间存在互作。这些数据提示杨树5个次生壁CESA基因虽然都能够参与形成CSC,但在不同组织、不同激素作用下可能有不同的组合方式。

参与次生壁纤维素合成的CSC需要由3种次生壁纤维素合成的CESA蛋白组成^[15]。在拟南芥中,*AtCESA4*、*AtCESA7*与*AtCESA8*组成有功能的CSC,参与次生壁纤维素合成^[13]。在水稻中,与*AtCESA8*、*AtCESA4*与*AtCESA7*同源的*OsCESA4*、*OsCESA7*与*OsCESA9*组成有功能的CSC,参与次生壁纤维素合成^[29]。而在杨树中,有5个参与次生壁纤维素合成的CESA,其中包括了1个CESA4、2个CESA7和2个CESA8,它们有多达4种组合方式形成CSC,以参与次生壁纤维素的合成。RAN-seq与基因芯片的分析表明,杨树次生壁CESA基因在杨树成熟茎以及次生维管发育的后期即木质部形成时期表达量较高,提示它们在木材形成过程发挥重要作用。在这5个基因中,*PtCESA8A*的表达量略低,推测它被招募进入木材形成过程的CSC的机会略低。揭示杨树多个次生壁CESA以及多种次生壁纤维素合成CSC的存在,可为理解纤维素合成的质与量控制提供基础,进而为木材材性的多样性改良提供了潜在可能性。

基因结构分析发现,杨树 5 个次生壁 *CESA* 基因 N 端都具有锌指结构,为它们的互作提供了结构基础^[15]。随后的荧光素酶互补实验也证实了这一点。*CESA* 通常含有 8 个跨膜结构域,2 个位于 N 端,6 个位于 C 端^[3]。然而,*PtCESA7B* 的 C 端缺少 6 个跨膜结构域,不同于其它 *CESA*,这种特殊的结构会否影响纤维素的合成目前尚不清楚。

杨树次生壁 *CESA* 启动子驱动 GUS 转基因杨树的 GUS 染色分析表明,这些基因的组织表达模式存在一定的差异。例如,*PtCESA8A* 和 *PtCESA7B* 转基因株系整个叶片中均检测到了 GUS 信号,而 *PtCESA4* 和 *PtCESA7A* 转基因株系叶脉中则基本上未检测到 GUS 信号,此结果与 Naoki 等的研究结果一致^[21]。这种差异提示在叶脉的发育中包含 *PtCESA7A* 的 CSC 作用应该大于包含 *PtCESA7B* 的 CSC。另外,Naoki 等的研究结果显示,*PtCESA8B* 在木质部中高表达,而 *PtCESA8A* 则在根冠高表达;*PtCESA7B* 在叶、叶柄、根冠和幼茎中表达量比 *PtCESA7A* 高,而 *PtCESA7A* 和 *PtCESA7B* 的表达量在成熟茎木质部中无明显差异^[21]。这种组织表达的差异暗示,可能由不同的 *CESA* 组合形成不同的 CSC,以参与不同组织器官的发育。

杨树次生壁 *CESA* 基因对不同激素处理的表达和响应存在较大差异。赤霉素 GA₃ 和细胞分裂素 6-BA 上调杨树次生壁 *CESA* 的表达,而 NAA, BR 和乙烯下调杨树次生壁 *CESA* 的表达。其中,*PtCESA4* 基因的表达量变化最显著,*PtCESA7A* 较 *PtCESA7B* 基因的表达量变化显著,*PtCESA8B* 又较 *PtCESA8A* 基因的表达量变化显著。这一结果提示,由 *PtCESA4*、*PtCESA7A* 和 *PtCESA8B* 组成的 CSC,在激素处理的响应中可能贡献更大。

荧光素酶互补实验结果表明,*PtCESA7A*、*PtCESA7B*、*PtCESA8A* 和 *PtCESA8B* 之间可以相互作用。拟南芥次生壁 *CESA* 成员之间可以两两互作,形成二聚体,这种互作是其形成 CSC 的基础^[15]。因此,*PtCESA7A* 与 *PtCESA7B*、*PtCESA8A* 与 *PtCESA8B* 具有同等的几率形成有功能的 CSC。然而,*PtCESA7A* 与 *PtCESA7B*、*PtCESA8A* 与 *PtCESA8B* 在组织表达、激素响应上存在一定的差异,这些差异可能使得在不同组织、不同激素作用下,次生壁 CSC 招募不同的 *CESA* 成员参与次生壁纤维素的合成。CSC 的多样性可以多方面影响细胞壁中的纤维素含量,从而导致木材材性差异。

4 结 论

杨树 5 种次生壁 *CESA* 基因具有同等的能力形成功能性的纤维素合酶复合体,但在不同组织、不同激素作用下可能有不同的组合方式。

参 考 文 献:

- [1] Keegstra K. Plant cell walls[J]. *Plant physiology*, 2010, 154(2): 483-486.
- [2] Mellerowicz E J, Sundberg B. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties[J]. *Current opinion in plant biology*, 2008, 11(3):293-300.
- [3] Somerville C. Cellulose synthesis in higher plants[J]. *Annual review of cell and developmental biology*, 2006, 22:53-78.
- [4] Pear JR, Kawagoe Y, Schreckengost WE, et al. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(22):12637-12642.
- [5] Arioli T, Peng L, Betzner AS, et al. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis[J]. *Science*, 1998, 279(5351):717-720.
- [6] Wang L, Guo K, Li Y, et al. Expression profiling and integrative analysis of the *CESA/CSL* superfamily in rice[J]. *BMC plant biology*, 2010, 10:282.
- [7] Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, et al. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes[J]. *Plant & cell physiology*, 2002, 43(12):1407-1420.
- [8] Persson S, Paredez A, Carroll A, et al. Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in Arabidopsis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(39):15566-15571.
- [9] Cano-Delgado A, Penfield S, Smith C, et al. Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in Arabidopsis thaliana[J]. *The Plant journal*, 2003, 34(3):351-362.
- [10] Scheible WR, Eshed R, Richmond T, et al. Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in Arabidopsis *Ixr1* mutants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(18):10079-10084.
- [11] Desprez T, Juraniec M, Crowell EF, et al. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in Arabidopsis thaliana[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(39):15572-15577.
- [12] Bischoff V, Desprez T, Mouille G, et al. Phytochrome regulation of cellulose synthesis in Arabidopsis[J]. *Current biology*, 2011, 21(21):1822-1827.
- [13] Taylor NG, Howells RM, Huttly AK, et al. Interactions among three distinct *CesA* proteins essential for cellulose synthesis[J].

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(3):1450–1455.
- [14] Turner SR, Somerville CR. Collapsed xylem phenotype of Arabidopsis identifies mutants deficient in cellulose deposition in the secondary cell wall[J]. The Plant cell, 1997, 9(5):689–701.
- [15] Timmers J, Vernhettes S, Desprez T, *et al.* Interactions between membrane-bound cellulose synthases involved in the synthesis of the secondary cell wall[J]. FEBS letters 2009, 583(6):978–982.
- [16] Carroll A, Mansoori N, Li S, *et al.* Complexes with mixed primary and secondary cellulose synthases are functional in Arabidopsis plants[J]. Plant physiology, 2012, 160(2):726–737.
- [17] Atanassov, II, Pittman JK, Turner SR. Elucidating the mechanisms of assembly and subunit interaction of the cellulose synthase complex of Arabidopsis secondary cell walls[J]. The Journal of biological chemistry, 2009, 284(6):3833–3841.
- [18] Djerbi S, Lindskog M, Arvestad L, *et al.* The genome sequence of black cottonwood (*Populus trichocarpa*) reveals 18 conserved cellulose synthase (*CesA*) genes [J]. Planta, 2005, 221(5):739–746.
- [19] Kumar M, Thammannagowda S, Bulone V, *et al.* An update on the nomenclature for the cellulose synthase genes in Populus [J]. Trends in plant science, 2009, 14(5):248–254.
- [20] Suzuki S, Li L, Sun YH, *et al.* The cellulose synthase gene superfamily and biochemical functions of xylem-specific cellulose synthase-like genes in *Populus trichocarpa* [J]. Plant physiology, 2006, 142(3):1233–1245.
- [21] Takata N, Taniguchi T. Expression divergence of cellulose synthase (*CesA*) genes after a recent whole genome duplication event in *Populus* [J]. Planta, 2015, 241(1):29–42.
- [22] Song D, Shen J, Li L. Characterization of cellulose synthase complexes in *Populus* xylem differentiation [J]. The New phytologist, 2010, 187(3):777–790.
- [23] Liu B, Zhang J, Wang L, *et al.* A survey of *Populus* PIN-FORMED family genes reveals their diversified expression patterns [J]. Journal of experimental botany, 2014, 65(9):2437–2448.
- [24] Tang F, Wei H, Zhao S, *et al.* Identification of microRNAs Involved in Regeneration of the Secondary Vascular System in *Populus tomentosa* Carr [J]. Frontier in plant science, 2016, 7:724.
- [25] Huang D, Wang S, Zhang B, *et al.* A Gibberellin-Mediated DELLA-NAC Signaling Cascade Regulates Cellulose Synthesis in Rice [J]. The Plant cell, 2015, 27(6):1681–1696.
- [26] Xie L, Yang C, Wang X. Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of *CESA* genes in Arabidopsis [J]. Journal of experimental botany, 2011, 62(13):4495–4506.
- [27] Kumar M, Turner S. Plant cellulose synthesis: *CESA* proteins crossing kingdoms [J]. Phytochemistry, 2015, 112:91–99.
- [28] McFarlane HE, Doring A, Persson S. The cell biology of cellulose synthesis [J]. Annual review of plant biology, 2014, 65:69–94.
- [29] Tanaka K, Murata K, Yamazaki M, *et al.* Three distinct rice cellulose synthase catalytic subunit genes required for cellulose synthesis in the secondary wall [J]. Plant physiology, 2003, 133(1):73–83.

(责任编辑:张 研)