

杨树中 I 类 KNOX 基因结构、表达与功能分析

赵岩秋, 周厚君, 魏凯丽, 江成, 宋学勤*, 卢孟柱

(林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: [目的] 分生组织对器官发生和形态建成起到至关重要的作用, 其活性受多种转录因子的调控。KNOTTED-like homeobox (KNOX) 基因家族由 2 个亚类即 I 类和 II 类 KNOX 组成, 在模式植物拟南芥中 I 类 KNOX 成员主要在茎的顶端分生组织区域表达, 对维持顶端分生组织分化及侧生器官的形态建成过程起关键作用。木本植物生长发育过程主要包含以顶端分生组织 (Shoot apical meristem, SAM) 为中心的初生生长与以形成层为中心的次生生长过程, 本研究通过分析杨树 I 类 KNOX 基因在 SAM、根顶端分生组织 (Root apical meristem, RAM) 的形成过程及形成层相关区域的表达, 探讨 I 类 KNOX 基因在杨树分生组织形成与分化过程中的功能。[方法] 以拟南芥 I 类 KNOX 基因 STM 的蛋白序列在毛果杨基因组中进行同源比对分析, 获取杨树 I 类 KNOX 成员的核酸和氨基酸序列。根据核酸及氨基酸序列信息构建系统发育树, 并绘制基因结构与蛋白质结构图谱。利用 84K 杨 (*Populus alba* × *P. glandulosa*) 不定芽与不定根诱导实验体系模拟顶端分生组织发育过程, 通过实时定量 PCR (RT-PCR) 技术, 对杨树 I 类 KNOX 成员在不定芽与不定根形成过程及形成层相关区域中的表达进行分析。[结果] 本研究通过同源比对分析鉴定出 10 个杨树 I 类 KNOX 成员, 根据进化关系与基因结构差异将其分为三组: 组 1、组 2、组 3, 其中, 组 1 为拟南芥 *KNAT2* 和 *KNAT6* 同源基因, 组 2 为 *STM* 和 *BP* 同源基因, 组 3 为杨树所特有的 I 类 KNOX 基因。杨树 I 类 KNOX 基因在不定芽与不定根发生过程中表达量均发生较大的变化, 在不定芽发生过程中, 组 1 基因在芽原基分化产生不定芽的关键期上调表达, 而组 2 与组 3 基因多在分生组织分化产生芽原基阶段高表达; 在不定根发生过程中, 组 1 成员多在根原基分化产生不定根的过渡期上调表达, 组 2 与组 3 基因则多在发育后期不定根形态建成阶段高表达。杨树 I 类 KNOX 成员在形成层相关区域均表达, 组 1 中 *KNAT2/6* 与组 2 中 *STM*、*BP* 同源基因的表达量明显高于其他成员。[结论] 以上结果说明, 杨树 I 类 KNOX 除了与拟南芥同源的 2 个组外, 还进化产生新的组别, 分别参与分生组织形成和分化过程中不同阶段的调控, 且 *PtKNAT2/6b*、*ARK1* 与 *ARK2* 在形成层区域高表达, 提示以上 3 个基因可在形成层功能维持以及木质部分化中发挥主要作用。

关键词: I 类 KNOX; 分生组织; 形成层; 表达分析; 杨树

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2018)04-0118-08

Structure, Expression and Function Analysis of Class I KNOX Genes in *Populus*

ZHAO Yan-qiu, ZHOU Hou-jun, WEI Kai-li, JIANG Cheng, SONG Xue-qin, LU Meng-zhu

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] The expression of *Populus* class I KNOX genes during the regeneration of adventitious shoot and adventitious root as well as in the vascular cambium were analyzed to reveal the function of class I KNOX genes in woody plants meristem formation and differentiation. [Method] The nucleic acid and amino acid sequence of *Populus* class I KNOX genes were obtained through blast analysis using *Arabidopsis* STM protein sequence as query

收稿日期: 2016-08-27

基金项目: 林业公益性行业科研专项“林木顶端分生组织发育及环境适应性机制研究”(201504101)

作者简介: 赵岩秋, 硕士在读. 主要研究方向: 林木遗传育种. E-mail: yanqiusunny@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

in the genome of *Populus trichocarpa*. The phylogenetic tree was constructed according to the full length protein sequences of class I KNOX genes from *Arabidopsis* and *Populus*. The intron/exon structure and domain composition were presented along the phylogenetic tree. The regeneration of adventitious bud and adventitious root using leaf and stem explants from 84 K (*Populus alba* × *P. glandulosa*) was used to simulate the shoot and root apical meristem initiation and differentiation, respectively. Quantitative real-time PCR was carried out to analyze the expression of *Populus* class I KNOX genes during the regeneration of adventitious bud/root and in the vascular cambium related region. [**Result**] Ten class I KNOX genes were found in the genome of *P. trichocarpa* through sequence alignment analysis. According to the phylogenetic relationship and gene structure similarity, class I KNOX genes from *Arabidopsis* and *Populus* could be divided into three groups. *Arabidopsis* *KNAT2* and *KNAT6* along with their *Populus* homolog genes belong to group 1, *Arabidopsis* *STM* and *BP* along with their *Populus* homolog genes belong to group 2. Group 3, to be noticed, was unique to *Populus*. Through investigating the expression alteration of *Populus* class I KNOX genes during the regeneration of adventitious buds, it was found that group 1 genes showed increased expression during the transition from bud primordium to adventitious bud, while group 2 and group 3 genes demonstrated higher expression during the transition from meristem to bud primordium. As for the regeneration of adventitious root, group 1 genes showed increased expression in the stage when root primordium differentiate to adventitious root, while group 2 and group 3 genes demonstrated higher expression in the adventitious root formation stage. In addition, all *Populus* class I KNOX genes had an expression in the vascular cambium, and the expression of group 1 gene *PtKNAT2/6b* and group 2 genes *ARK1* and *ARK2* were especially high. [**Conclusion**] Group 3 is a new group occurred during the evolution of class I KNOX genes from *A. thaliana* to *P. trichocarpa*, which was along with group 1 and group 2 to participate in the regulation of different stages of meristem formation and differentiation. Most importantly, *PtKNAT2/6b*, *ARK1* and *ARK2* show high expression in the vascular cambium, which may play important roles in vascular cambium activity maintenance and xylem differentiation.

Keyword: class I KNOX; meristem; cambium; expression analysis; *Populus*

TALE(Three Amino Acid Loop Extension)蛋白因其在第一和第二螺旋结构中含有3个额外的氨基酸而得命,存在于所有的真核生物中,植物中TALE家族包含2个亚家族:KNOX(KNOTTED-like homeobox)和BELL(BELL-like homeobox)^[1]。植物KNOX家族中首次被克隆得到的成员是玉米(*Zea mays* L.)中的*Knotted1*(*KN1*)基因,因其突变体叶片上产生结状物凸起而得名^[2]。随着拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)等植物中*KN1*同源基因被克隆,这类基因被归为KNOX家族。根据基因结构与表达模式方面的差异,KNOX基因家族被分为2个亚类:I类KNOX和II类KNOX^[1]。

拟南芥中I类KNOX包含4个成员,分别是:*SHOOTMERISTEMLESS*(*STM*)、*BREVIPEDICELLUS*(*BP*)、*KNOTTED-like from Arabidopsis thaliana 2*(*KNAT2*)以及*KNAT6*^[3]。I类KNOX主要参与顶端分生组织(SAM)建成与功能维持过程,同时也参与调控侧生器官的形态发生^[4]。*STM*主要在SAM中

表达,其主要通过调控赤霉素与细胞分裂素的合成和降解途径,维持SAM中高细胞分裂素浓度和较低赤霉素含量,从而维持SAM中持续分裂分化的能力,*stm*突变体表现为SAM缺失^[5]。*KNAT2*主要参与心皮的形成,而与*KNAT2*结构极为相似的*KNAT6*则参与调控侧根的形态建成过程。另外,*KNAT2*与*STM*在胚胎分生组织功能维持及边界建立中存在功能上的冗余^[6]。*BP*与*STM*共同参与SAM建成过程的调控,但*BP*除了影响SAM建成外还调控花序轴的形态建成,*bp*突变体中花梗与花序轴之间的夹角显著大于野生型,而*knat2knat6*双突变能够使*bp*突变体花梗形态向野生型恢复,因此,在花序生长过程中,*BP*通过抑制*KNAT2*和*KNAT6*表达,从而保证花序轴上花梗正常的形态发生^[7]。

拟南芥中II类KNOX基因包括4个成员,分别是:*KNOTTED-like from Arabidopsis thaliana 3*(*KNAT3*)、*KNAT4*、*KNAT5*以及*KNAT7*,II类KNOX基因表达模式相对广泛,且功能多样^[8]。*KNAT3*和*KNAT4*负调控侧根形成,*KNAT7*则与BELL家族的

BLH6 形成二聚体进而调控次生细胞壁形成^[9]。拟南芥中已证明在过表达 II 类 KNOX 基因后, II 类 KNOX 与 BELL 家族成员选择性结合形成二聚体, 抑制 SAM 活性, 同时影响叶片形态建成^[10]。

综上所述, I 类 KNOX 在植物分生组织建成及功能维持中起关键作用, 是植物分生组织启动和器官发生的重要调控因子。但目前杨树中仅完成了对拟南芥 *STM*、*BP* 同源基因 *ARBORKNOX1* (*ARK1*)、*ARBORKNOX2* (*ARK2*) 功能的初步研究, 认为它们参与调控木本植物形成层的分化, 而杨树中 I 类 KNOX 其他成员的功能尚不清楚^[11-12]。本文对拟南芥与杨树中 I 类 KNOX 成员的蛋白结构、进化关系等进行比较分析, 同时利用 RT-PCR 方法分析杨树 I 类 KNOX 基因在不定芽、不定根形成过程中的表达, 探讨杨树 I 类 KNOX 在分生组织建成及器官分化过程中的作用, 为杨树 I 类 KNOX 基因的功能解析提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用实验材料均取自 84K。

1.1.1 不定芽取材 选取处于相同生长状态的 84K 组培苗的第 3 片展开叶, 将叶片主叶脉切断, 置于分化培养基, 诱导不定芽的发生。分别在 0、2、4、6、8、10、14、16、18、20 d 截取叶片伤口部位及后期诱导产生的不定芽。取材时间固定在 11:00 am, 所取材料均置于液氮中保存。

1.1.2 不定根取材 转接相同生长状态的 84K 组培苗于生根培养基中, 分别在 0、2、3、4、5、6、7、8、15、17 d 截取茎段伤口部位及后期诱导产生的不定根。取材时间固定在 11:00 am, 取材后将样品置于液氮中保存。

1.1.3 形成层取材 将 3 年生 84K 剥皮, 剥皮后在树皮上轻轻划取薄薄的一层松软组织, 主要包含了形成层组织及未成熟木质部, 并迅速将其置于液氮中保存。

1.2 方法

1.2.1 杨树中 I 类 KNOX 基因获取及结构分析 以拟南芥 I 类 KNOX 基因 *STM* 的蛋白序列在毛果杨基因组 (POPGENIE, <http://popgenie.org>) 中进行 BLAST 分析, 获取杨树 I 类 KNOX 基因的核酸及氨基酸序列; 通过 Clustalw2.0 软件对拟南芥和杨树的 I 类 KNOX 基因的氨基酸序列进行比对分析。利用

Mega6.0 软件采用基于遗传距离的邻近法构建拟南芥和杨树的 I 类 KNOX 基因的系统进化树。根据拟南芥和杨树的 I 类 KNOX 基因序列信息, 通过 GSDS2.0 (<http://gsds1.cbi.pku.edu.cn/>) 在线分析杨树 I 类 KNOX 基因的内含子与外显子结构, 并绘制基因结构图。

1.2.2 杨树中 I 类 KNOX 基因表达分析 不定芽与不定根形成过程中不同时期的 RNA 提取与第一链 cDNA 合成分别采用 RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 与 PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa) 完成, 具体方法参见试剂盒使用说明。qRT-PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq™ II Kit (TaKaRa) 在 Roche LightCycle 480 II 仪器上完成。杨树 I 类 KNOX 基因定量引物 (表 1) 使用在线引物设计软件 Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) 设计得到。

表 1 杨树中 I 类 KNOX 基因 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers used for qRT-PCR analysis.

引物名称 Primer Name	引物序列 Primer Sequence
ARK1-rtF	ATTGGTGGAGCAGGCATTAC
ARK1-rtR	CATCCATCACCAAACTGC
ARK2-rtF	TGGACTGCCAAAAGGTAGGA
ARK2-rtR	GTCTTGTAAAGCTCCTCACGGTA
PtSTMb-rtF	TTCTGCTCATCAGCATCACC
PtSTMb-rtR	CCAGTCGCAGTGACAGTGTT
PtKNA2/6a-rtF	CGCAGATTGCACGTTTCTTA
PtKNA2/6a-rtR	AGGCCTTTCAAGATCGGATT
PtKNA2/6b-rtF	CCTACTTGGATGTTGGGATG
PtKNA2/6b-rtR	CAGCAAATTCAGGTTCTCA
PtKNA2/6c-rtF	AACGAGGATCGAGAGCTGAA
PtKNA2/6c-rtR	ATCAGCTTCCGTTGGGATG
PtKNA2/6d-rtF	GCTTCAATGGTGGTGGAGTT
PtKNA2/6d-rtR	ATCGTTCTCTTCCCGGATTT
PtKNLPa-rtF	GTGCACCTCCAGAAATGGTT
PtKNLPa-rtR	CGTCAAACGGCTTGGATAAT
PtKNLPb-rtF	CTTGAAGCCATAGGCAGAGG
PtKNLPb-rtR	TCAAGAACGTAGCAGCCTCA
PtKNLPc-rtF	GGGAGGTTGAAGCATCTGAA
PtKNLPc-rtR	TGCCTTTCTCTCTTCCGTA
PtACTIN-rtF	AAACTGTAATGGTCTCCCTCCG
PtACTIN-rtR	GCATCATCACAACTACTCTCCGA

2 结果与分析

2.1 杨树 I 类 KNOX 基因的进化分析及结构分析

以拟南芥 *STM* 蛋白序列在毛果杨基因组中进行同源序列比对, 得到杨树 10 个 I 类 KNOX 基因。利用 Mega6.0 软件构建了杨树和拟南芥 I 类 KNOX

基因的系统进化树(图1A),并根据系统进化树中两物种间相对应的基因关系,对杨树中I类KNOX成员进行命名,其中,2个与*AtSTM*同源的基因,分别命名为*PtSTMa*与*PtSTMb*,*PtSTMa*即为之前报道的杨树*ARK1*基因^[11];与*AtBP*同源的基因仅1个,命名为*PtBP*,*PtBP*与之前报道的杨树*ARK2*基因为同一基因^[12];与*AtKNAT2*和*AtKNAT6*同源的基因有4个,分别命名为*PtKNAT2/6a*、*PtKNAT2/6b*、*Pt-*

*KNAT2/6c*和*PtKNAT2/6d*;另外,还有3个基因没有与拟南芥相对应的同源基因,将其顺次命名为*KNOTTED-like from Populus a*(*PtKNLPa*)、*PtKNLPb*与*PtKNLPc*。同时参考基因结构图(图1B),将杨树中I类KNOX分为3组:组1、组2、组3。组1为*KNAT2*和*KNAT6*类基因,组2为*STM*和*BP*类基因,组3为杨树所特有的I类KNOX基因。

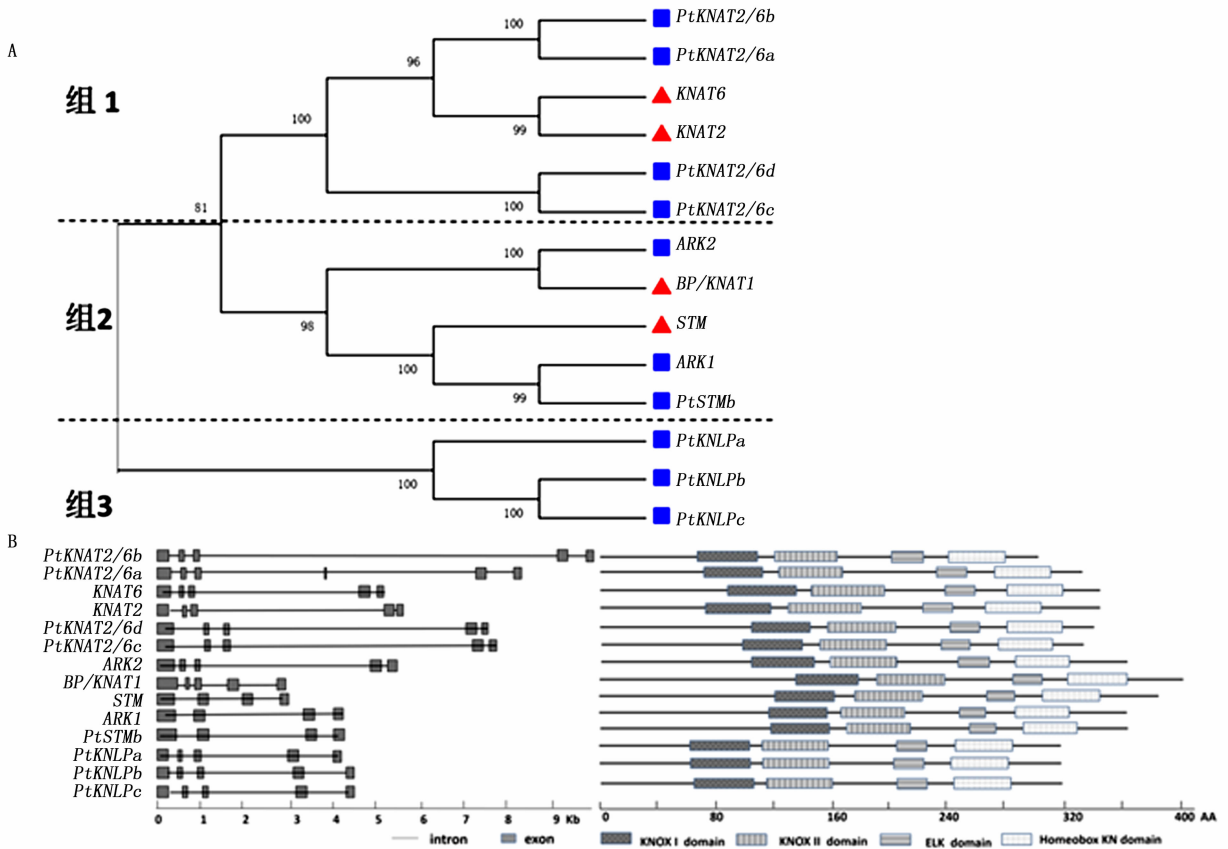


图1 拟南芥与杨树中I类KNOX系统进化树(A)及基因结构分析(B)

Fig. 1 Phylogenetic tree and gene structure of Class I KNOX from *Arabidopsis* and *Populus*

杨树中多数I类KNOX基因长度在3 kb以上,均长于拟南芥中I类KNOX基因。组1成员中,*PtKNAT2/6a*包含6个外显子,比同组中的其它基因多1个外显子。组2基因中,*ARK1*和*PtSTMb*含3个内含子,而同组中的其他基因均含有4个内含子(图1B,表2)。这些基因内含子、外显子结构的变化表明了杨树I类KNOX进化过程中发生了外显子获得与内含子丢失事件。

KNOX家族成员由MEINOX、ELK与homeobox KN保守结构域组成,MEINOX结构域位于KNOX蛋白N端,由KNOX1和KNOX2两个亚结构域组成。

通过多重序列比对及I类KNOX蛋白质结构域分析(图1B)发现,杨树与拟南芥中I类KNOX蛋白结构相似,均含有以上4个结构域:KNOX1、KNOX2、ELK和homeobox KN结构域,说明I类KNOX进化历程中蛋白质结构相对保守。

2.2 杨树中I类KNOX基因在分生组织的表达分析

不定芽与不定根的再生过程能够模拟SAM与RAM的发育过程,根据杨树不定芽与不定根再生过程中形态学观察(图2),将此过程分三个阶段:分生组织形成阶段、芽(根)原基形成阶段、不定芽(根)

形成阶段,其中,不定芽再生过程中0~6 d为分生组织形成阶段(图2A),7~11 d为芽原基形成阶段(图2B),12~20 d为不定芽形成阶段(图2C);在

不定根再生过程中0~4 d为分生组织形成阶段(图2D),5~6 d为根原基形成阶段(图2E),7~17 d为不定根形成阶段(图2F)。

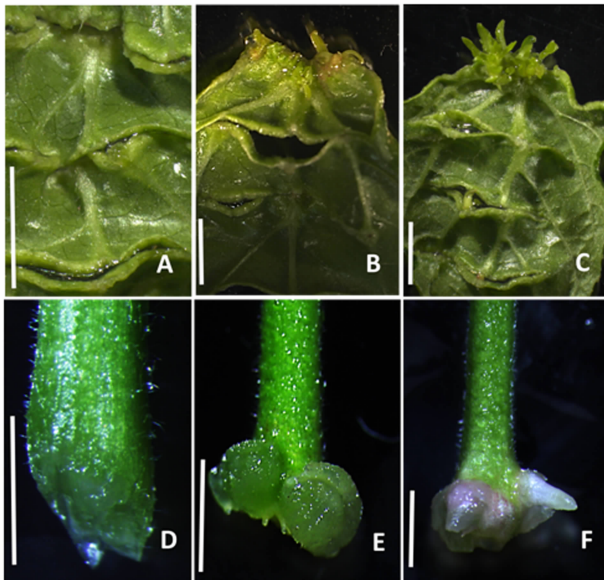
表2 杨树中I类KNOX成员信息

Table 2 Detailed information about Class I KNOX genes from *Populus*

基因名称 Gene name	基因号 Locus	染色体上位置 Genomic position	亚细胞定位预测 POSRT prediction	氨基酸数 Protein length	内含子数 introns
<i>ARK1</i>	Potri. 011G011100.1	Chr11:844486 - 848858 -	N; 14	373	3
<i>ARK2</i>	Potri. 002G113300.1	Chr02:8461980 - 8468320 +	N; 14	368	4
<i>PtSTMb</i>	Potri. 004G004700.1	Chr04:304576 - 308944 +	N; 14	369	3
<i>PtKNAT2/6a</i>	Potri. 008G188700.1	Chr08:13039428 - 13047773 -	N; 12, C; 1	341	5
<i>PtKNAT2/6b</i>	Potri. 010G043500.1	Chr10:7430322 - 7440628 +	N; 10, C; 2	309	4
<i>PtKNAT2/6c</i>	Potri. 012G087100.1	Chr12:11401140 - 11409183 -	N; 14	340	4
<i>PtKNAT2/6d</i>	Potri. 015G079100.1	Chr15:10400171 - 10408171 +	N; 14	347	4
<i>PtKNLPa</i>	Potri. 013G008600.1	Chr13:557144 - 561807 +	N; 12, M; 1	320	4
<i>PtKNLPb</i>	Potri. 005G014200.1	Chr05:1100485 - 1105673 +	N; 14	317	4
<i>PtKNLPC</i>	Potri. 005G017200.1	Chr05:1390283 - 1394969 +	N; 13	316	4

注:N:细胞核;C:细胞质;Ch:叶绿体;M:线粒体。

N: nucleus; C: cytoplasm; Ch: chloroplast; M: mitochondria.



注:A、B、C分别代表不定芽再生过程中分生组织形成阶段(5 d)、芽原基形成阶段(7 d)、不定芽形成阶段(12 d);D、E、F分别代表不定根再生过程中分生组织形成阶段(3 d)、根原基形成阶段(5 d)、不定根形成阶段(7 d);比例尺代表1 cm。

A, B, C represents meristem formation stage (5 d), bud primordium formation stage (7 d), shoot growth stage (12 d) during the regeneration of adventitious shoot; D, E, F represents meristem formation stage (3 d), root primordium formation stage (5 d), adventitious root elongation stage (7 d) during the regeneration of adventitious root. Bar = 1 cm.

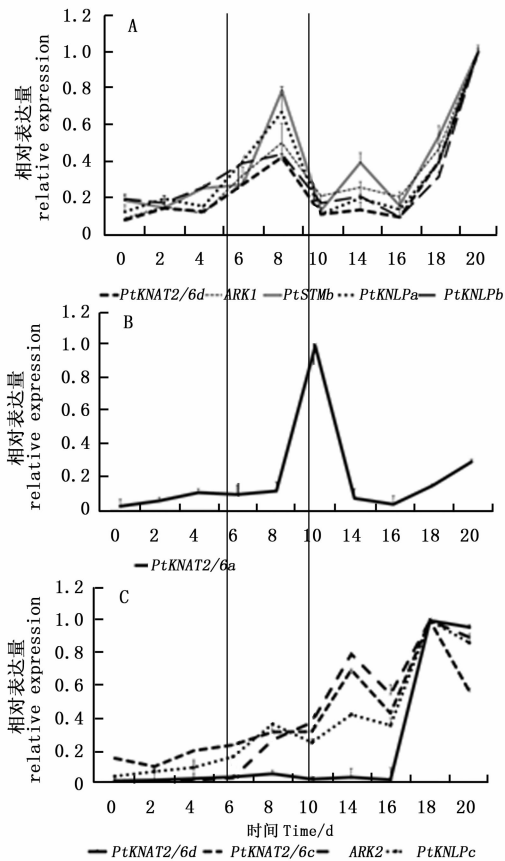
图2 杨树不定芽、不定根再生过程

Fig.2 Regeneration of adventitious shoots and adventitious roots

不定芽发生过程中,杨树I类KNOX成员的表达量在不定芽形成的3个阶段中均表现出短暂的上调趋势,但上调时间与上调幅度存在差异,因此,将总的变化趋势分为以下3种(图3):(1)芽原基形成时期表达量出现上调趋势,此类基因包括组1的*PtKNAT2/6d*、组2的*ARK1*和*PtSTMb*及组3的*PtKNLPa*和*PtKNLPb*(图3A);(2)组1的*PtKNAT2/6a*表达量在芽原基分化产生不定芽的关键时期特异上调,而在不定芽发生过程的其他阶段表达量较低且无显著变化(图3B);(3)不定芽发育前期表达量较低且变化不大,而在不定芽形成后表达量多次呈现上调的变化趋势,此类基因主要有组1的*PtKNAT2/6b*和*PtKNAT2/6c*、组2的*ARK2*与组3的*PtKNLPC*(图3C)。

在不定根的形成过程中,根据I类KNOX基因表达分析,可总结为2种变化趋势(图4):(1)表达量在根原基分化产生不定根的关键期出现短暂的上调,包括组1的*PtKNAT2/6a*、*PtKNAT2/6b*、*PtKNAT2/6d*和组3的*PtKNLPb*(图4A);(2)表达量在分生组织与根原基形成阶段不断下调,而在不定根形成后期呈现上调的趋势,包括组1的*PtKNAT2/6c*、组2的*ARK1*、*ARK2*、*PtSTMb*和组3的*PtKNLPa*、*PtKNLPc*(图4B)。

为考察杨树I类KNOX基因与形成层这一木本植物特有的分生组织之间的关系,对杨树I类KNOX基因在形成层区域(形成层+未成熟木质部)中的表达量进行了检测,结果(图5)显示:I类KNOX的



注:A,B,C 分别代表杨树 I 类 KNOX 的不同成员在不定芽发生过程中表达量的变化,图中两条竖线将杨树不定芽发生过程分成三个阶段。

A, B, C represents different expression alteration of Class I KNOX members in the regeneration of adventitious shoot, and two vertical lines marks three stages during the regeneration of adventitious shoot.

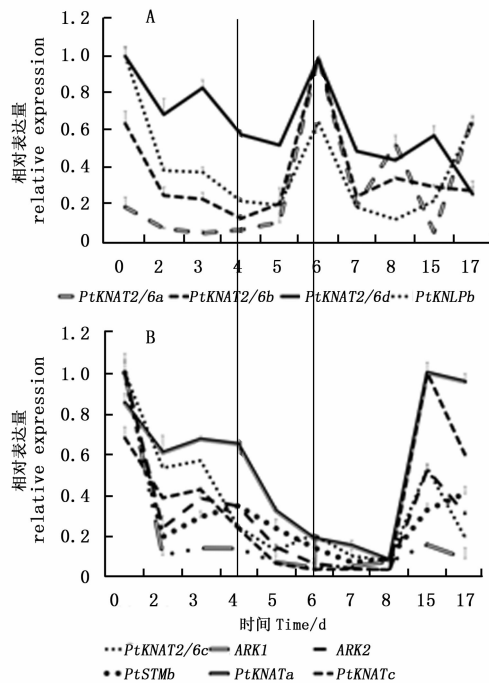
图3 杨树 I 类 KNOX 成员在不定芽形成过程中的表达分析

Fig. 3 Expression alteration of Class I KNOX members during the regeneration of adventitious shoot

成员在形成层区域中均有一定的表达,其中, *PtKNAT2/6b*、*ARK2* 及 *ARK1* 表达量明显高于其他成员,表明 *PtKNAT2/6b*、*ARK2* 及 *ARK1* 可能参与调控形成层活动或木质部分化过程。上述结果与 *ARK1*、*ARK2* 调控形成层细胞分化活性的结论相一致^[11-12]。

3 讨论

本文对杨树 I 类 KNOX 的 10 个成员进行了分析,包括系统进化树构建、基因与蛋白质结构及其在分生组织中的表达等。通过蛋白质结构分析发现,杨树中所有 I 类 KNOX 成员蛋白结构相对保守,均由 KNOX1、KNOX2、ELK 与 homebox KN 4 个保守结



注:A,B 分别代表杨树 I 类 KNOX 的不同成员在不定根发生过程中表达量的变化,图中两条竖线将杨树不定根发生过程分成三个阶段。

A, B represents different expression alteration of Class I KNOX members in the regeneration of adventitious root, and two vertical lines marks three stages during the regeneration of adventitious root.

图4 杨树 I 类 KNOX 成员在不定根形成过程中的表达分析

Fig. 4 Expression alteration of Class I KNOX members during the regeneration of adventitious root

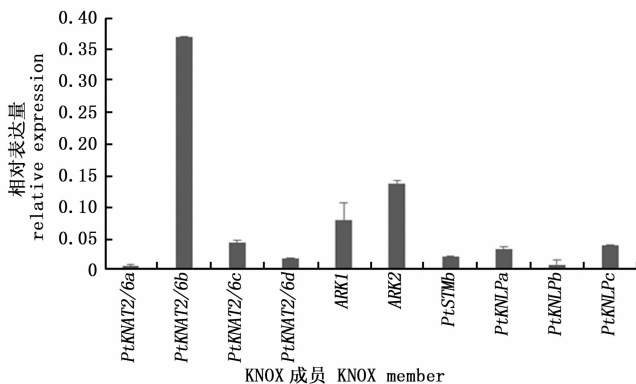


图5 杨树 I 类 KNOX 成员在杨树形成层中的表达分析

Fig. 5 Expression level of Class I KNOX members in the cambium of *populus*

构域组成^[13]。由杨树与拟南芥 I 类 KNOX 基因蛋白结构的相似性可知,I 类 KNOX 在功能上可能具有高度保守性^[14-15]。依据进化关系及基因结构将杨树 I 类 KNOX 成员分为 3 个组:组 1、组 2、组 3。

拟南芥 I 类 KNOX 成员包含组 1 和组 2, 而杨树中除了包含与拟南芥中相对应的组 1 和组 2 外, 还包括进化关系较远的组 3。组 3 的产生表明在杨树进化过程中 KNOX 家族出现了基因扩张, 这种扩张可能为 KNOX 基因参与调控杨树不同分生组织的分化提供了更多选择。

木本植物 I 类 KNOX 的研究较匮乏, 在杨树中仅完成了 *ARK1* 和 *ARK2* 功能的初步研究。Andrew 等首次在杨树中克隆得到拟南芥 *STM* 的同源基因 *ARK1*, 发现 *ARK1* 主要在形成层区域表达, 并通过对 *ARK1* 转基因材料分析, 发现 *ARK1* 参与调控杨树次生生长过程中形成层分化、次生壁合成过程^[11]。Du 等克隆了拟南芥 *BP* 的同源基因 *ARK2*, 通过原位杂交实验发现其在 SAM 和形成层区域特异表达, *ARK2* 转基因杨树表型与组织学分析证明了 *ARK2* 参与调控形成层发育与木质部细胞的分化过程^[12]。正如拟南芥中 *STM* 和 *BP* 在 SAM 发育的调控中各有侧重, 杨树中 *ARK1* 和 *ARK2* 对形成层及木质部分化的调控同样存在差异。为分析杨树 I 类 KNOX 成员的功能, 本研究利用不定根和不定芽诱导体系模拟杨树顶端分生组织形态建成过程, 发现杨树 I 类 KNOX 不同组别在茎端或根端分生组织形成过程中表达量发生明显变化, 且在茎和根两种不同的顶端发生过程的同一阶段的表达量不同。如不定芽形成过程中, 组 1 基因多在发育的中后期芽原基分裂分化产生不定芽的过渡期高表达, 而组 2 与组 3 成员则在芽原基形成阶段表达量明显提高, 提示 SAM 形成过程中组 1 基因主要参与不定芽形成及侧生器官分化过程, 而组 2 和组 3 基因则主要在分生组织分化产生芽原基的过程发挥作用。在不定根形成过程中, 组 1 基因多在根原基分化产生不定根的过渡期高表达, 组 2 与组 3 基因则多在发育后期不定根形成阶段上调表达, 提示 RAM 形成过程中组 1 成员主要参与调控分生组织分化产生根原基的过程, 组 2 和组 3 成员则侧重于发育后期不定根形态建成过程。

由杨树 I 类 KNOX 成员在形成层区域(形成层与未成熟的木质部)的表达分析, 发现组 1 成员 *PtKNAT2/6b* 与组 2 成员 *ARK1*、*ARK2* 表达量明显高于其他成员, 并且结合以上成员在不定芽与不定根形成过程中的表达分析发现, *ARK1* 与 *ARK2* 主要参与原基形成及后期原基内分生组织细胞进一步分化产生不定芽(根)过程, 这与之前 *ARK1* 和 *ARK2* 参与调

控形成层细胞分化活性的结论一致^[11-12]。*PtKNAT2/6b* 在形成层相关区域表达量最高, 与其在根原基分化产生不定根的关键时期高表达的结果一致, 共同说明了 *PtKNAT2/6b* 可能在分生组织细胞分化过程中发挥作用。而与 *PtKNAT2/6b* 结构最相似的 *PtKNAT2/6a* 虽未在形成层相关区域表现出较高的表达量, 但在不定芽与不定根形成过程中芽(根)原基分化产生不定芽(根)的关键时期均表现出特异的上调, 提示 *PtKNAT2/6a* 可能与芽(根)原基分化功能的开启有关。组 3 作为杨树特有的 I 类 KNOX, 其成员均在形成层相关区域表达, 结合在不定芽(根)发生过程中组 3 成员的特异表达, 推测 *PtKNLPa*、*PtKNLPb*、*PtKNLPC* 也参与顶端分生组织发生过程中不同阶段的调控, 可知杨树 I 类 KNOX 进化过程中, 通过增加其特有的 KNOX 成员对分生组织的分化进行调控。另外, 拟南芥 I 类 KNOX 基因成员之间还存在复杂的调控关系, 如 *BP* 通过抑制 *KNAT2* 和 *KNAT6* 的表达, 从而调控花序轴上花梗正常的形态发生^[7]。杨树 I 类 KNOX 成员在不定根和不定芽诱导发生的不同阶段出现动态、差异的表达, 成员之间可能存在着调控关系, 例如 *BP* 的同源基因 *ARK2* 与 *KNAT2* 的同源基因 *PtKNAT2/6b* 之间是否存在与拟南芥中同样的调控关系, 尚需要进一步研究。

4 结论

本研究确认了杨树中 10 个 I 类 KNOX 成员, 通过进化树构建及基因结构分析将其分为 3 组, 根据其在不定根与不定芽发生过程及其在形成层区域的表达分析, 推测杨树 I 类 KNOX 不同成员在茎顶端、根顶端及形成层等不同分生组织分化中的作用, 为深入研究木本植物中 I 类 KNOX 的功能提供了线索, 为揭示它们在木本植物生长、发育中的作用, 特别是木材形成中的调控机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Kerstetter R, Vollbrecht E, Lowe B, et al. Sequence analysis and expression patterns divide the maize Knotted1-like homeobox genes into two classes [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(12):1877-1887.
- [2] Vollbrecht E, Veit B, Sinha N, et al. The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family [J]. *Nature*, 1991, 350 (6315): 241-243.
- [3] Olivier Hamant, Fabien Nogue', Enric Belles-Boix, et al. The KNAT2 homeodomain protein interacts with ethylene and cytokinin signaling [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(2):657-665.

- [4] Nishimura A, Tamaoki M, Sato Y, *et al.* The expression of tobacco knotted1-type class I homeobox genes correspond to regions predicted by the cytohistological zonation model [J]. *Plant Journal*, 1999, 18(4): 337–347.
- [5] Long J A, Moan E I, Medford J I, *et al.* A member of gene KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *SHOOTMERIS-TEMLESS* gene of *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1996, 379(6560): 66–69.
- [6] Simon Scofield, Walter Dewitte, James A. H. Murray. A model for *Arabidopsis* class I KNOX gene function [J]. *Plant Signaling & Behavior*. 2008, 3(4): 257–259.
- [7] Laura Ragni, Enric Belles-Boix, Markus G. Interaction of KNAT6 and KNAT2 with BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE in *Arabidopsis* inflorescences [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(4): 888–900.
- [8] Elisabeth Truernit, Jim Haseloff. A role for KNAT class II genes in root development [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2007, 2(1): 10–12.
- [9] Li EY, Bhargava A, Qiang W Y, *et al.* The class II KNOX gene *KNAT7* negatively regulates secondary wall formation in *Arabidopsis* and is functionally conserved in *Populus* [J]. *New Phytologist*, 2012, 194(1): 102–115.
- [10] Liu Lijun, Matthew Zinkgraf, Andrew Groover. 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.
- [11] Andrew T. Groover, Shawn D. Mansfield, *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.
- [12] Du Juan, Shawn D. Mansfield, *et al.* Groover. The *Populus* homeobox gene ARBORKNOX2 regulates cell differentiation during secondary growth [J]. *Plant Journal*, 2009, 60(6): 1000–1014.
- [13] Finn R D, Mistry J, Tate J, *et al.* The Pfam protein families database: towards a more sustainable future [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44: 279–285.
- [14] Hay A, Tsiantis M. KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity [J]. *Development*, 2010, 137(19): 3153–3165.
- [15] Woody J L, Shoemaker R C. Gene expression: sizing it all up [J]. *Frontiers in Genetics*, 2011, 2: 70–76.

(责任编辑:张 研)