2022, 35(1): 82-91
http://www.lykxyj.com

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.01.009

水曲柳 *CUC1* 基因克隆及瞬时表达分析

崔靖弘[1,2]，于　磊[1,2]，梁楠松[1,2]，宋婷婷[1,2]，吕义品[1,2]，纪欣童[1,2]，徐　亮[3]，赵福江[3]，詹亚光[1,2*]

(1. 东北林业大学东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室，黑龙江 哈尔滨　150040；2. 黑龙江省头雁创新团队计划（林木遗传育种创新研究团队），黑龙江 哈尔滨　150040；3. 吉林省临江林业局，吉林 临江　134600)

摘要：[**目的**] 本研究克隆了水曲柳（*Fraxinus mandshurica* Rupr.）*CUC1* 基因，分析其表达特性，为该基因在水曲柳再生的调控研究中奠定基础。[**方法**] 从水曲柳苗克隆 *FmCUC1* 基因，利用生物信息学软件分析 *FmCUC1* 基因的核苷酸序列及其编码蛋白的氨基酸序列，并构建系统进化树；利用农杆菌介导法将 *FmCUC1* 基因转入洋葱内表皮细胞进行亚细胞定位，通过实时荧光定量分析 *FmCUC1* 基因在根、茎、叶、顶芽的组织表达特异性及 *FmCUC1* 基因在下胚轴芽再生与种子萌发过程中的差异表达；同时对水曲柳幼苗喷施 IAA、6-BA、BR 激素处理，分析 *FmCUC1* 基因在不同激素信号诱导下的表达模式；利用农杆菌介导法将 *FmCUC1* 基因瞬时转化水曲柳 72 h 后，分析其通路相关基因表达情况。[**结果**] 克隆得到 *FmCUC1* 基因全长 807 bp，编码 269 个氨基酸，*FmCUC1* 为稳定疏水蛋白，含有保守的 NAC-domain 蛋白结构域；FmCUC1 蛋白与同科的木犀榄蛋白序列相似性为 86.17%，亲缘关系较近；FmCUC1 蛋白定位于细胞核上。qRT-PCR 分析表明：*FmCUC1* 基因在水曲柳的顶芽中表达量最高；在下胚轴芽再生过程中，*FmCUC1* 基因在芽点产生与丛枝形成期均高表达；在水曲柳种子萌发过程中，*FmCUC1* 基因分别在第 4 天和第 8 天分别达到两个峰值，为第 0 天的 8.56 倍和 8.46 倍。外源喷施 IAA、6-BA、BR 激素处理结果显示，*FmCUC1* 基因表达量与对照相比均呈现上调表达，在 IAA、BR 处理 72 h 后均达到最高值，分别为对照的 45.72 倍和 20.36 倍；在 6-BA 处理 48 h 达到峰值，为对照 59.40 倍。利用农杆菌介导水曲柳 *FmCUC1* 基因瞬时过表达 72 h 后，该基因表达量显著上调，且其下游 *STM* 基因的表达量也明显上升。[**结论**]*FmCUC1* 基因属于 NAC 家族转录因子，参与水曲柳芽再生过程，响应了 IAA、6-BA、BR 植物激素信号诱导，过表达 *FmCUC1* 基因可激活其下游 *STM* 基因的表达，进而有利于顶端分生组织的形成；为进一步研究 *CUC1* 基因在水曲柳芽再生过程中的作用机制奠定基础，也为今后水曲柳转基因工作提供新思路。

关键词：水曲柳；*FmCUC1* 基因；生物信息学分析；瞬时转化；表达模式分析

中图分类号：S792.41　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-1498(2022)01-0082-10

CUCs（CUP-SHAPED COTYLEDONs）基因在调控植物营养生长到生殖生长中发挥着核心作用，如参与植物顶端分生组织建成[1]；与生长素、miRNA 等相互调控影响叶边缘形态[2]；通过调控下游 *LAS*（LATERALSUPRESSOR）基因促进腋生分生组织起始，进而影响侧枝发育[3]；在拟南芥根外植体培养中，*CUC1* 和 *CUC2* 基因表达量可与根形成不定芽的能力成正相关，可见，*CUC* 基因可作为一个预测性标志基因，筛选根形成芽的最佳组培条件[4]。*CUC1* 属于植物特有的 NAC 家族 NAM 超家族成员[5]，具有 NAC 家族典型的 N 端高度保守 NAC-domain 和 C 端高度多变序列，NAC-

收稿日期：2021-03-15　　修回日期：2021-09-18
基金项目：黑龙江省应用技术研究与开发计划项目（GA19B201）
作者简介: 崔靖弘，在读硕士。主要研究方向：林木遗传改良和基因工程。Email：1121209119@qq.com
* 通讯作者: 詹亚光，博士，教授。主要研究方向：林木遗传育种和生物技术。Email：yaguangzhan@126.com

domain 是一个包含约 150 至 160 个氨基酸[6]，分为 5 个亚结构域（A-E），其中，A、C、D 保守性高，B、E 保守性低，且 D、E 是 DNA 结合所必需的亚结构域[7]。*CUC1* 基因在愈伤组织再生出芽中发挥着重要作用，Daimon 等[8] 在愈伤组织中过表达 *CUC1* 基因，可促使芽的再生率从 30% 提高到 80%。进一步研究表明，通过对 *CUC* 亚家族和 *ATAF1* 亚家族 NAC-domain 互换实验中发现，*ATAF1* 的 NAC-domain 不能诱导愈伤组织再生出芽，这是由于其自身特异的 NAC-domain 所决定的[9]。Aida 等[10] 研究中发现，*CUC1* 和 *CUC2* 基因双突变体植株可呈现雄蕊、萼片和子叶愈合，很难产生 SAM（顶端分生组织）。进一步研究发现，*CUC1* 和 *CUC2* 可通过调控 *STM*（SHOOT MERISTEMLESS 对于分生组织起始和维持 SAM 中心区的未分化细胞是必需的）的表达来决定分生组织中心的建立[11]。如 *STM* 首先在 *CUC* 基因表达原基的细胞环中表达，当 SAM 形成时，*STM* 将 *CUC* 基因的表达限制在 SAM 的外周区，进而形成反馈调节环[12]。此外，*CUC1* 基因的表达受到其他转录因子和表观遗传修饰调控，如 *PLT3*（PLETHORA3）、*PLT5*、*PLT7* 可以促进 *CUC1* 的表达[13]，*ESR1*（ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1）也可以促进 *CUC1* 的表达[14]；在离体器官再生过程中，*CUC1* 基因表达与其启动子区和 3′端的 DNA 甲基化修饰水平呈明显负相关性[15]，且 *CUC1* 的表达也受到了 H3K4 乙酰化水平调控[16]。目前，*CUC1* 基因的研究大多集中于拟南芥等模式植物，而在木本植物中鲜有研究。

水曲柳（*Fraxinus mandshurica* Rupr.）系木犀科（Oleaceae）白蜡树属，是东北地区重要的珍贵用材树种，由于地域特征水曲柳能够耐寒、耐旱、耐盐碱，且木材优良，用途广泛，具有较高的经济价值[17-19]。其作为黑龙江省主要的造林树种，再生困难造成遗传转化效率低的现象一直困扰着育种工作者，而瞬时转化是一种快速有效的遗传转化方法，对研究植物基因功能具有重要意义，如邹全程等[20] 利用农杆菌介导刚毛柳（*Tamarix hispida*）*ThCBL4* 基因瞬时过表达可提高转基因植株耐盐性；Wu 等[21] 证实，在桑叶中瞬时过表达 *MaFT* 基因可能促使桑树（*Morus alba* L.）早熟开花等。因此，为了提高水曲柳遗传转化效率，解决再生难等问题，可见从分子水平研究再生相关的基因是必要的。本研究从水曲柳中克隆获得了 *FmCUC1* 基因，对其分子特征、组织特异性、亚细胞定位进行分析，测定其在不同激素信号下的基因表达情况，同时构建了 *FmCUC1* 基因表达载体（pNC-Cam1304-SubC-*FmCUC1*），利用农杆菌介导水曲柳 *FmCUC1* 基因瞬时过表达 72 h 后，分析比较其通路相关基因表达情况以初步鉴定 *FmCUC1* 基因功能。该研究将有助于为水曲柳转基因工作提供新思路。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验所用材料均为水曲柳种子种植。将水曲柳种子接种于 WPM 固体培养基中（pH5.8～6.0），培养于人工气候室（湿度为 60%～80%，温度为 22 ± 2℃，光照 15 h）。以生长 30 d，长势均一的实生幼苗为实验材料。根、茎、叶取自 30 d 组培苗，顶芽取自 3 年生盆栽苗。

1.2　试验方法

1.2.1　基因克隆　根据水曲柳 *CUC1* 基因的编码区（CDS）设计引物（表 1），以生长 30 d 的水曲柳组培苗 cDNA 为模板进行 *FmCUC1* 基因的 PCR 扩增（反应体系：上下游引物各 1.0 μL，cDNA 模板 1.0 μL，2 × Es MasterMix 10 μL，ddH_2O 7.0 μL。PCR 扩增程序为：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 35 s，56℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，30 个循环；72℃ 延伸 2 min，4℃ 保存）。将目的片段回收纯化，连接至 pEASY-T5-Zero 载体上，转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中，将阳性克隆送至擎科生物科技有限公司测序。

1.2.2　*FmCUC1* 基因生物信息学分析　根据 *FmCUC1* 基因序列分析其理化性质、亲疏水性、保守结构域及构建系统进化树，具体操作步骤参考郭依萍等[22]。

1.2.3　*FmCUC1* 基因表达载体构建及亚细胞定位　根据 *FmCUC1* 基因 CDS 序列设计引物（表 1），以阳性克隆质粒为模板进行 PCR 扩增，将扩增产物回收纯化后使用 Nimble Cloning MIX 试剂将其连接至 pNC-Green-SubC 表达载体中，构建植物表达载体 pNC-Green-SubC-*FmCUC1*，将阳性菌液送至擎科生物科技有限公司测序。将检测正确的 pNC-Green-SubC-*FmCUC1* 质粒转化农杆菌 GV3101 感受态细胞。利用农杆菌介导法分别将 pNC-Green-SubC-*FmCUC1* 和空载 pNC-Green-SubC 转入到洋葱内表皮细胞中，使用荧光共聚焦显微镜观察并照相。

1.2.4　*FmCUC1* 基因组特异性表达　分别以水曲

表 1 引物序列及用途

Table 1 Primer sequence and Application

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence（5′-3′）	用途 purpose
FmCUC1-F	ATGGAAAAAGTATCTGGTTTTAGTAGAG	基因克隆
FmCUC1-R	TTAACAATTCCAGAGAAAATCAAGG	
SFmCUC1-F	AGTGGTCTCTGTCCAGTCCTATGGAAAAAGTATCTGGTTT	过表达、亚细胞定位
SFmCUC1-R	GGTCTCAGCAGACCACAAGTACAATTCCAGAGAAAATCAA	
QFmCUC1-F	TTTGAATTACCTCCTGGATTTCG	实时荧光定量PCR
QFmCUC1-R	CAGCCTCTGTTGCTCTGTTTGT	
QFmESR1-F	GGCTTGGAACTTTTGACACG	
QFmESR1-R	TGAAGCTATACGAACGGACAAG	
QFmPLT3-F	CAGCCGTTCAACCAGTGTCAGTGT	
QFmPLT3-R	CCGAGGTTCCTGCATTGCTTGACT	
QFmPLT5-F	CCCATAGGAGGCTTGAACAACA	
QFmPLT5-R	ACGGCAGGAGTAGACCACGAAT	
QFmARR12-F	TGACCAGGGACCAGTTAGGAGT	
QFmARR12-R	TGTTTCCATATTGGGACGCC	
QFmSTM-F	GCTCATCCTCATTACCACCGTCTC	
QFmSTM-R	GCTTCCTCAAGTCTTGCCACTACT	
FmTU-F	AGGACGCTGCCAACAACTTT	内参基因
FmTU-R	TTGAGGGGAAGGGTAAATAGTG	

柳根、茎、叶、顶芽组织为 cDNA 模板，以水曲柳微管蛋白 *FmTU*[23] 为内参基因对 *FmCUC1* 基因表达进行荧光定量 PCR。

1.2.5 *FmCUC1* 基因在下胚轴芽再生与种子萌发过程中的差异表达 以水曲柳下胚轴和种子为实验材料，分别在培养 6、12、18、24、30、36 d 与接种 0、3、4、5、7、8、10、14、18、21 d 进行取样，待取样完毕后，使用 Tris-CTAB 法提取 RNA，反转录，对水曲柳下胚轴芽再生与种子萌发过程中 *FmCUC1* 基因表达进行荧光定量 PCR。

1.2.6 *FmCUC1* 基因在激素信号下的差异表达 分别对长势均一的组培苗喷施 6-BA（100 μmol·L^{-1}）、BR（1 μmol·L^{-1}）、IAA（100 μmol·L^{-1}）激素处理，每个处理设 3 个重复，每重复 5 株水曲柳苗，于 0 h、10 min、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 进行整株取样。对 8 个取样点 *FmCUC1* 表达进行荧光定量 PCR。

1.2.7 *FmCUC1* 基因表达载体构建、瞬时侵染水曲柳及相关基因表达 以阳性克隆质粒为模板进行 PCR 扩增，将扩增产物回收纯化后使用 Nimble Cloning MIX 试剂[24] 将其连接至 pNC-Cam1304-SubC 表达载体中，构建植物表达载体 pNC-Cam1304-SubC-*FmCUC1*，将阳性菌液送至擎科生物科技有限公司测序。将检测正确的 pNC-Cam1304-SubC-*FmCUC1* 质粒转化农杆菌 GV3101 感受态细胞，保存菌种备用。

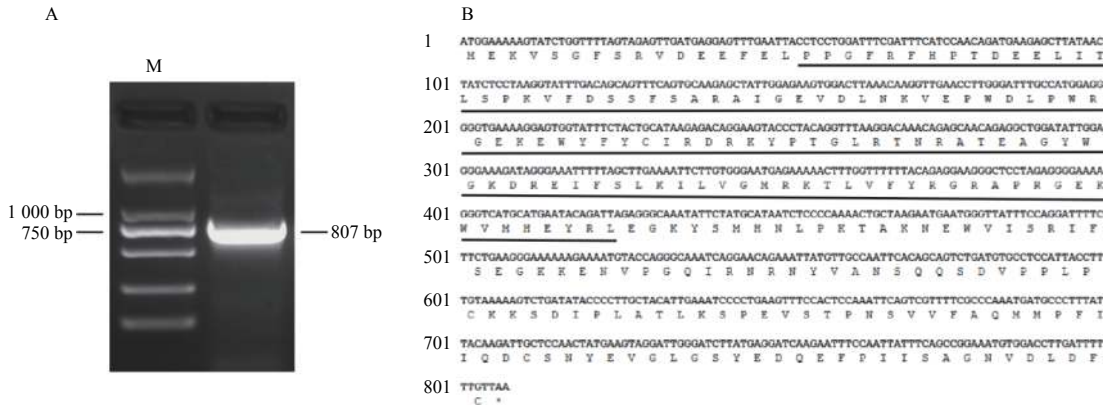
利用农杆菌介导的瞬时转化法，方法参照杨少彤等[25]；将 pNC-Cam1304-SubC-*FmCUC1*-GV3101 和转化液（对照）分别对生长 30 d 的整株水曲柳组培苗进行瞬时侵染。为了检验 *FmCUC1* 基因及其通路的 *ESR1*（ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1）、*PLT3*（PLETHORA3）、*PLT5*（PLETHORA5）、*B* 型*ARR12*（ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR12）、*STM*（SHOOT MERISTEMLESS）基因表达情况，提取 72 h 的 *FmCUC1* 瞬时过表达植株的总 RNA，进行荧光定量 PCR。

1.2.8 数据处理与分析 每个实验至少 3 次生物学重复；基因相对表达量使用 7500 Software v 2.0.6 软件获取，按照基因相对定量法（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）对基因相对表达量进行计算；利用 SPSS version 22.0 软件采用 Duncan’s 多重比较法进行显著性分析。

2　结果与分析

2.1　*FmCUC1* 基因克隆及基因结构分析

由图 1A 可知：PCR 扩增获得 1 条约 800 bp 的目的基因条带，经测序，证实得到目的基因即为 *FmCUC1* 基因（登录号：MH060997.1），其 CDS 序列为 807 bp，编码 269 个氨基酸（图 1B）。



注：A：*FmCUC1* 基因的 PCR 扩增电泳结果 B：*FmCUC1* 基因核苷酸序列及其编码氨基酸序列；下横线区域为 NAC-domain 结构域；“*”代表终止密码子

Notes：A: PCR amplification and electrophoresis of *FmCUC1* gene B: Nucleotide sequence and amino acid sequence of *FmCUC1* gene. The bottom line is NAC domain; "*" represents the stop codon

图 1　*FmCUC1* 基因克隆

Fig. 1　Cloning of *FmCUC1* gene

使用 ProtParam 预测 FmCUC1 蛋白脂肪系数为 32.71，不稳定系数值为 35.02，属于稳定蛋白。进一步使用 TMHMM 对 FmCUC1 蛋白的亲/疏水性分析可知：该蛋白的最大亲水性为−0.663、最大疏水性为 2.189，有 43 个氨基酸亲水数峰在 0 以下，有 438 个氨基酸疏水数峰在 0 以上，亲水性氨基酸数目明显少于疏水性氨基酸，为疏水蛋白。通过 CD-Search 对 FmCUC1 蛋白保守结构域和功能域预测可知：FmCUC1 蛋白近 N 端的第 49-423 位氨基酸为典型的 NAC-domain 结构域。

2.2　*FmCUC1* 编码蛋白的同源性分析

使用 NCBI 中的 Blastp 对 *FmCUC1* 氨基酸进行同源序列比对表明：水曲柳 *CUC1*（*NAC92*）氨基酸序列与同科的木犀榄 *CUC1*（*NAC92*）氨基酸序列相似度较高，为 86.17%；同时对水曲柳、木犀榄、拟南芥、水稻等 16 个物种的 CUC1 蛋白氨基酸序列构建系统发育树（图 2），结果显示进化树聚为 2 类，其中，水曲柳与木犀榄位于同一进化分支上，说明目前水曲柳 CUC1与木犀榄 CUC1 亲缘关系较近。

2.3　*FmCUC1* 基因表达载体构建、亚细胞定位

以 SFmCUC1-F 和 SFmCUC1-R 为引物，测序正确的 *FmCUC1* 基因阳性克隆质粒为模板，成功构建植物表达载体 pNC-Green-SubC-*FmCUC1*（图 3）。

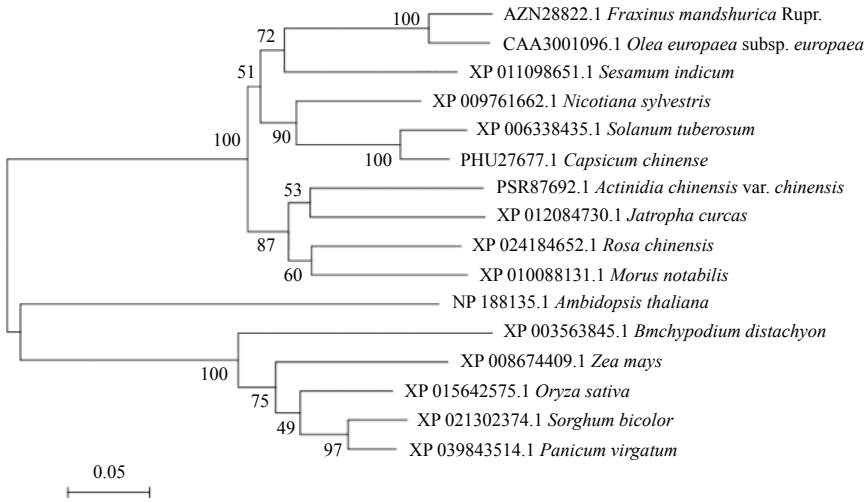
利用农杆菌介导法分别将 pNC-Green-SubC-*FmCUC1*-GV3101 和空载 pNC-Green-SubC-GV3101 转入到洋葱内表皮细胞中，使用荧光共聚焦显微镜观察侵染后得到的洋葱内表达细胞。实验结果（图 4）表明：对照组在细胞核与细胞膜中均发现绿色荧光，*FmCUC1*-EGFP 融合蛋白只在细胞核中有明显的绿色荧光，且与 DAPI 核染色位置一致，表明 *FmCUC1* 基因定位于细胞核中。

2.4　*FmCUC1* 基因组织特异性表达分析

采用荧光定量 PCR 技术对水曲柳 *FmCUC1* 基因在根、茎、叶、顶芽中的表达进行检测。结果表明：该基因在根、茎、叶、顶芽中均有表达，以根表达量作为参考，茎表达量低于根组织，为根表达量的 75%，叶片的表达量高于根，为根表达量的 3.27 倍，顶芽的表达量最高，为根表达量的 6.43 倍（图 5）。以上结果表明，*FmCUC1* 基因在水曲柳顶芽中表达量最高。

2.5　*FmCUC1* 基因在下胚轴芽再生与种子萌发过程中的差异表达分析

在水曲柳下胚轴芽再生过程中发现：*FmCUC1* 基



注 Notes：水曲柳（*Fraxinus mandshurica* Rupr.）、芝麻（*Sesamum indicum*）、马铃薯（*Solanum tuberosum*）、中华猕猴桃（*Actinidia chinensis* var. *Chinensis*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）、月季（*Rosa chinensis*）、川桑（*Morus notabilis*）、美花烟草（*Nicotiana sylvestris*）、木犀榄（*Olea europaea* subsp . *europaea*）、麻疯树（*Jatropha curcas*）、黄灯笼辣椒（*Capsicum chinense*）、水稻（*Oryza sativa*）、玉米（*Zea mays*）、短柄草（*Brachypodium distachyon*）、高粱（*Sorghum bicolor*）、柳枝稷（*Panicum virgatum*）

图 2 FmCUC1 与其他物种的 CUC1 蛋白进化分析

Fig. 2 Evolutionary analysis of FmCUC1 and CUC1 proteins in other species

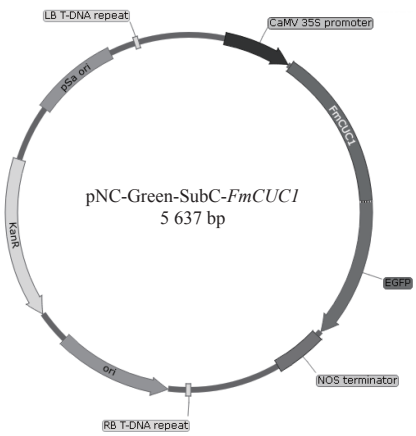


图 3 pNC-Green-SubC-*FmCUC1* 表达载体结构图

Fig. 3 Structure of pNC-Green-SubC-*FmCUC1* expression vector

因在 6～36 d 均有表达，以第 6 天表达量作为参考，培养 6 d 时可发现下胚轴端部开始膨大（图 6C），生长 12 d 时可以发现有芽点产生（图 6D），此时 *FmCUC1* 基因表达量为对照的 1.98 倍（图 6A）；进一步观察可发现 12～36 d 为丛枝形成期，待生长至 36 d 时 *FmCUC1* 基因表达量达到峰值，为对照的 11.33 倍（图 6A）。以上结果表明：*FmCUC1* 基因参与水曲柳下胚轴芽再生过程，并促进不定芽的分化。同样，在种子萌发过程中，通过定量分析得出：*FmCUC1* 基因在第 4 天和第 8 天分别达到 2 个峰值，分别为 0 d 的 8.56 倍和 8.46 倍（图 6B）。结果表明，这 2 个峰值与水曲柳种子芽的发生阶段及伸长阶段相互对应。上述结果均可推测，*FmCUC1*

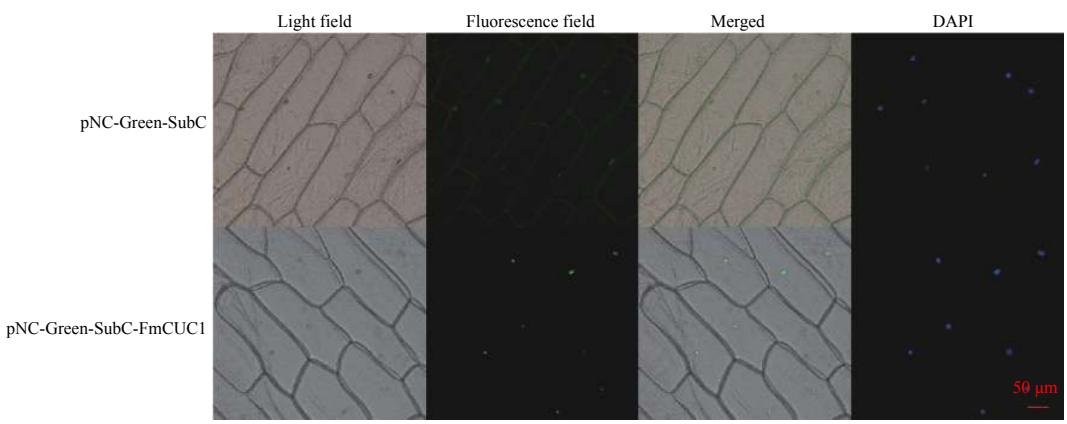
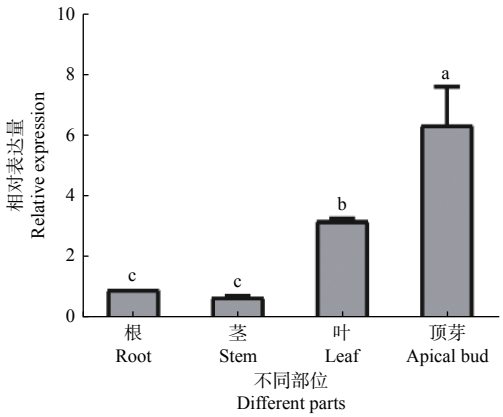


图 4 FmCUC1 蛋白亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of FmCUC1 protein



注：不同小写字母表示显著差异（$p < 0.05$）。下同.

Note: Different lowercase letters indicate significant differences（$p < 0.05$）.The same below

图 5　*FmCUC1* 基因在根、茎、叶、顶芽中的表达差异

Fig. 5　Expression difference of *FmCUC1* gene in roots, stems,leaf and apical bud

基因在水曲柳芽再生过程具有重要作用。

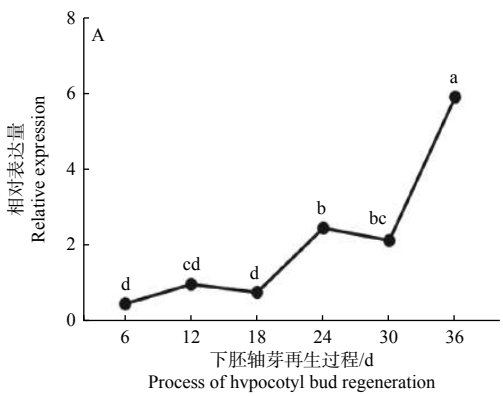
2.6　*FmCUC1* 基因在激素信号下的表达模式

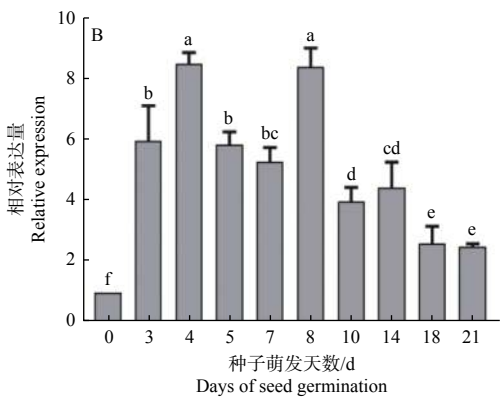
水曲柳在激素信号处理下，随着处理时间的延长，发生了明显的表达变化（图 7），其中，在 IAA 与 BR 处理后，*FmCUC1* 呈现升-降-升的表达模式；在处理 1 h 与 10 min 时显著上调，分别为对照的 27.65 倍和 11.38 倍，随后表达量逐渐下降；处理 72 h 后表达量均达到峰值，分别为对照的 45.72 倍和 20.36 倍。在 6-BA 处理后，*FmCUC1* 的表达量亦呈现升-降-升的趋势，其中，在处理 48 h 后达到最高值，为对照的 59.40 倍。以上结果说明 *FmCUC1*基因响应了 IAA、6-BA、BR 的信号刺激。

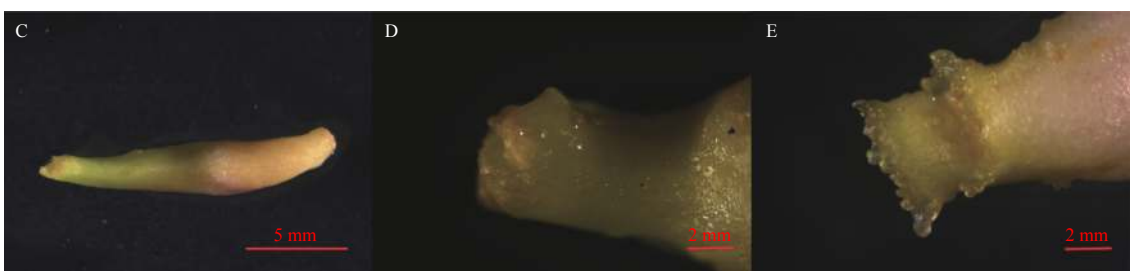
2.7　*FmCUC1* 基因表达载体构建、瞬时侵染水曲柳及相关基因表达情况分析

以 SFmCUC1-F 和 SFmCUC1-R 为引物，以测序正确的 *FmCUC1* 基因阳性克隆质粒为模板，成功构建植物表达载体 pNC-Cam1304-SubC-*FmCUC1*（图 8）。

利用农杆菌介导的瞬时转化法，能够快速鉴定基因功能。*FmCUC1* 瞬时过表达 72 h 后（图 9），基因表达量明显高于对照（*FmCUC1* 基因相对表达量 > 1），*FmCUC1* 的过表达显著上调了细胞分裂素信号转导通路关键基因 *STM* 与 B 型 *ARR12* 的表达分别为对照的 2.82 倍和 1.42 倍，而 *ESR1* 则下调表达；相反生长素信号转导通路关键基因







注：A:*FmCUC1* 基因在下胚轴芽再生过程表达模式；B：*FmCUC1* 基因在种子萌发过程表达模式；C：6 d 后下胚轴开始膨大；D：12 d 后芽点产生；E：丛枝形成期

Notes: A: Expression pattern of *FmCUC1* gene during hypocotyl bud regeneration; B: Expression pattern of *FmCUC1* gene during seed germination; C: The hypocotyl began to expand after 6 days; D: After 12 days, the bud point appeared;E:Arbuscular formation stage

图 6　*FmCUC1* 基因在下胚轴芽再生与种子萌发过程中的表达分析

Fig. 6　Expression analysis of *FmCUC1* gene during hypocotyl bud regeneration and seed germination

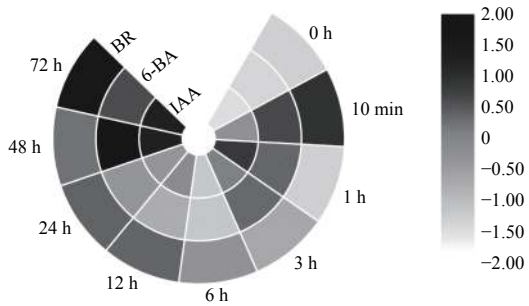


图 7 *FmCUC1* 基因在不同激素处理下的表达情况

Fig. 7 Expression of *FmCUC1* gene under different hormone treatments

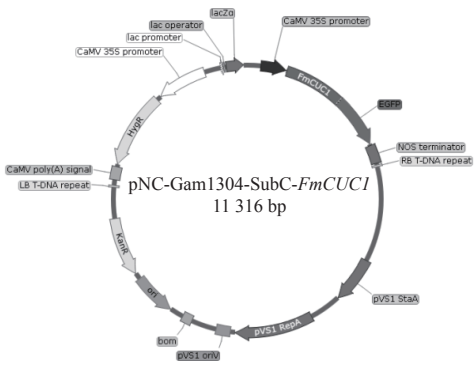


图 8 pNC-Cam1304-SubC-*FmCUC1* 表达载体结构图

Fig. 8 Structure of pNC-Cam1304-SubC-*FmCUC1* expression vector

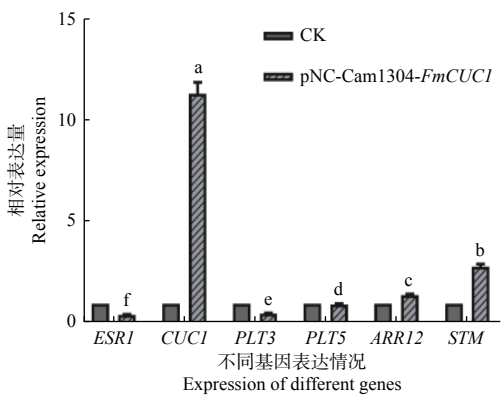


图 9 *CUC1* 基因通路相关基因表达情况

Fig. 9 Expression of genes related to *CUC1* gene pathway

PLT3、*PLT5* 基因均下调表达，可能是因为生长素与细胞分类素在植物体内的微变化才更有利于芽的分化。进一步验证了 *CUC1* 基因通过调控下游 *STM* 基因的表达进而促进顶端分生组织的建立。

3 讨论

近年来，由于分子技术的发展使人们对植物再生的基本过程有了新的认识，再生相关基因功能已在模式植物中逐渐被验证[26]。本研究从水曲柳中克隆获得 *FmCUC1* 基因，该基因与同科植物木犀榄亲缘关系较近。蛋白序列分析发现，*FmCUC1* 基因含有保守的 NAC-domain 蛋白结构域与以往研究结果类似[11]，这表明 *FmCUC1* 属于 NAC 基因家族。已有研究报道，拟南芥 *AtCUC1* 定位于细胞核[9]，亚细胞定位结果显示，*FmCUC1* 基因定位于细胞核中，与上诉研究结果一致，表明 *FmCUC1* 可作为转录因子在细胞核中行使功能。*FmCUC1* 基因在水曲柳 3 年生盆栽苗的芽中表达量最高，这与刘超逸[27] 研究结果类似；在水曲柳下胚轴芽再生过程中，进一步探究 *FmCUC1* 基因的表达模式，结果（图 6A）显示其在芽点产生与丛枝形成期均上调表达。张佳薇等[23] 关于水曲柳 *FmPHV* 基因克隆及在形成层愈伤组织中的表达分析研究中可知，芽再生过程中关键基因会出现 2 次表达峰值的现象。本研究发现，*FmCUC1* 基因在种子萌发的第 4 天和第 8 天分别达到 2 个峰值，分别为第 0 天的 8.56 倍和 8.46 倍，与上述结果类似。因此，推测 *FmCUC1* 基因在芽再生过程中发挥着重要作用。

植物的再生机制是一个复杂的调控网络，往往依赖植物激素间的相互作用[28]。研究表明[29]，生长素与细胞分裂素可直接或者间接地加速植物再生过程。因此，探究了 *FmCUC1* 基因对生长素与细胞分裂素的响应模式，结果显示，在 IAA 处理后，*FmCUC1* 的表达水平与对照相比明显升高。研究表明[27,30]，*CUC1* 基因表达受 *PIN1*（生长素输出运输蛋白）基因调控，促进 SAM 的起始，参与其形态建成，可推测 *FmCUC1* 同样响应生长素信号，这与惠麦侠[6] 在白菜中的研究结果一致。外源施加生长素与细胞分裂素可协同增强 *ESR1*[31]（芽再生中关键基因）表达，进而增强其下游基因 *CUC1* 的表达，促进芽再生[13]。本课题组发现，*FmCUC1* 基因同样响应了 6-BA 信号，推测在外源施加细胞分裂素同样可促进芽再生。此外，已有研究表明[32]，低浓度 BR 可诱导 SAM 中 *CUC* 基因的表达，进而促进芽再生。本研究发现，在 1 μmol·L^{-1} BR 处理后，与对照相比 *FmCUC1* 的表达水平明显升高，与上述研究结果一致。可推测在水曲柳芽再生过程中添加少量 BR，有利于茎端分生组织形成，提高不定芽分化。

CUC1 基因受生长素、细胞分裂素信号转导通路中多个关键基因调控[29]，共同促进植物的芽再生

能力。生长素通路中的 *PLT3*、*PLT5* 和 *PLT7* 三个转录因子可激活下游芽再生特征因子 *CUC1* 和 *CUC2* 的表达，进而促进植物具有再生出芽能力[13]。*WUS* 突变体可使植物丧失芽再生能力，表明 *WUS* 同样是芽再生的关键调节因子，而 *WUS*的表达又受细胞分裂素信号途径关键因子 B 型 *ARR* 的调控，*ARR* 基因可直接结合到 *WUS* 启动子区域激活其表达，进而影响植物的芽再生能力[33-35]，随着研究的深入，发现 *WUS* 与 *STM* 基因的缺失均会影响 SAM 的形成[34]。在拟南芥中，*CUC1* 和 *CUC2* 基因在 SAM 形成过程中冗余地发挥作用，*CUC1* 与 *CUC2* 基因双突变体才会导致幼苗缺失 SAM，进而表现出杯状子叶[11]。Wang 等[7] 关于水稻 *CUC1* 基因研究表明，*OsCUC*1与 *OsCUC3* 基因对于维持 SAM 活性起到关键作用，当 *OsCUC1* 与 *OsCUC3* 基因功能缺失时，会导致水稻停止生长最终在苗期死亡。*STM* 基因在 SAM 表达较高，可调控 SAM 中的干细胞活性[28]，激活细胞分裂素途径相关基因表达，进而影响植物生长[36]。研究表明[6]，*CUC1* 可促进下游 *STM* 基因在 SAM 中表达，起始 SAM。本研究发现，在水曲柳中过表达 *CUC1* 基因，其下游 *STM* 的表达上调，说明 *FmCUC1* 基因可能通过调控下游 *STM* 基因的表达，进而促进顶端分生组织的建立，影响芽再生能力。因此，可能正是由于生长素与细胞分类素在植物体内的这种微变化才会更有利于芽的分化。

4　结论

综上所诉，*FmCUC1* 基因属于 NAC 家族转录因子，参与水曲柳芽再生过程，响应了 IAA、6-BA、BR 植物激素信号诱导，在水曲柳植株中过表达 *FmCUC1* 能促进其下游 *STM* 基因的表达显著上调，进而促进芽再生。本研究可为进一步研究 *CUC1* 基因在水曲柳芽再生过程中的作用机制奠定基础，但其具体分子机制及调控网络有待进一步深入分析。

参考文献：

[1] Fal K, Landrein B, Hamant O. Interplay between miRNA regulation and mechanical stress for *CUC* gene expression at the shoot apical meristem[J]. Plant signaling & behavior, 2016, 11(3): e1127497.

[2] Bilsborough G D, Runions A, Barkoulas M, *et al*. Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(8): 3424-3429.

[3] Raman S, Greb T, Peaucelle A, *et al*. Interplay of miR164, *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes and Lateral Suppressor controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2008, 55(1): 65-76.

[4] Howell S H, Lall S, Che P. Cytokinins and shoot development[J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(9): 453-459.

[5] Jiao K, Li X, Guo Y, *et al*. Regulation of compound leaf development in mungbean (*Vigna radiata* L.) by *CUP-SHAPED COTYLEDON/NO APICAL MERISTEM* (*CUC/NAM*) gene[J]. Planta, 2019, 249(3): 765-774.

[6] 惠麦侠. 白菜叶缘裂刻基因的精细定位及BcCUC基因克隆和功能分析[D]. 杨凌：西北农林科技大学, 2011.

[7] Wang J, Bao J, Zhou B, *et al*. The osa‐miR164 target *OsCUC1* functions redundantly with *OsCUC3* in controlling rice meristem/organ boundary specification[J]. New Phytologist, 2021, 229(3): 1566-1581.

[8] Daimon Y, Takabe K, Tasaka M. The *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes promote adventitious shoot formation on calli[J]. Plant & Cell Physiology, 2003,44(2): 113-121.

[9] Taoka K I, Yanagimoto Y, Daimon Y, *et al*. The NAC domain mediates functional specificity of CUP-SHAPED COTYLEDON proteins.[J]. Plant Journal, 2004, 40(4): 462-473.

[10] Aida, M. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant[J]. The Plant cell, 1997, 9(6): 841-857.

[11] Hibara K, Takada S, Tasaka M. *CUC1* gene activates the expression of SAM‐related genes to induce adventitious shoot formation[J]. The Plant Journal, 2003, 36(5): 687-696.

[12] Spinelli, Silvana, V, *et al*. Mechanistic Link between *STM* and *CUC1* during *Arabidopsis* development[J]. Plant Physiology, 2011, 156(4): 1894-1904.

[13] Perez-Garcia P, Moreno-Risueno M A. Stem cells and plant regeneration[J]. Developmental biology, 2018, 442(1): 3-12.

[14] Iwase A, Harashima H, Ikeuchi M, *et al*. WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2017, 29(1): 54-69.

[15] 宋玉光, 马宗琪, 邱念伟, 董　蔚. 拟南芥离体器官再生过程中*CUC1*的DNA甲基化修饰状态分析[J]. 植物生理学报, 2016, 52(6)：926-932.

[16] Song Y G, Liu Y L, Qiu N W, *et al*. Involvement of histone modification in regulating *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes during shoot regeneration in *Arabidopsis*[J]. Biologia Plantarum, 2017, 61(1): 1-4.

[17] Yu L, Li X, Tian H, *et al*. Effects of hormones and epigenetic regulation on the callus and adventitious bud induction of *Fraxinus mandshurica* Rupr[J]. Forests, 2020, 11(5): 590.

[18] Wang H, Wang C, Liu H, *et al*. An efficient Agrobacterium-mediated

transformation and regeneration system for leaf explants of two elite aspen hybrid clones *Populus alba*× *P. berolinensis* and *Populus davidiana*× *P. bolleana*[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(11): 2037-2044.

[19] Chen X, Wang H, Li X, *et al*. Molecular cloning and functional analysis of 4-Coumarate: CoA ligase 4 (4CL-like 1) from *Fraxinus mandshurica* and its role in abiotic stress tolerance and cell wall synthesis[J]. BMC plant biology, 2019, 19(1): 1-16.

[20] 邹全程, 唐绯绯, 刘中原, 等. 瞬时过表达ThCBL4基因提高刚毛柽柳耐盐能力[J]. 林业科学研究, 2018, 31（3）：60-67.

[21] Wu S L, Yang X B, Liu L Q, *et al*. Agrobacterium -mediated transient MaFT expression in mulberry (*Morus alba* L.) leaves[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2015, 79(8): 1-6.

[22] 郭依萍, 石晶静, 周美琪, 等. 白桦*BpbZIP1*基因抗旱耐盐分析及ABRE元件结合鉴定[J]. 林业科学研究, 2020, 33（5）：68-76.

[23] 张佳薇. 水曲柳形成层培养及*FmPHV*基因在离体再生中的作用分析[D]. 哈尔滨：东北林业大学, 2020.

[24] Yan P, Zeng Y, Shen W, *et al*. Nimble cloning: asimple, versatile, and efficient system for standardized molecular cloning[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 7: 460.

[25] 杨少彤, 刘宗林, 屈　申, 等. *FmJAZ1*基因瞬时侵染水曲柳对JA通路相关基因表达的影响[J]. 广西植物, 2021, 41（4）：662-670.

[26] Lardon R, Geelen D. Natural variation in plant pluripotency and regeneration[J]. Plants, 2020, 9(10): 1261.

[27] 刘超逸. *BpCUC2*调控白桦叶形和节间发育的功能研究[D]. 哈尔滨：东北林业大学, 2019.

[28] Ikeuchi M, Favero D S, Sakamoto Y, *et al*. Molecular mechanisms of plant regeneration[J]. Annual review of plant biology, 2019, 70: 377-406.

[29] Bidabadi S S, Jain S M. Cellular, molecular, and physiological aspects of in vitro plant regeneration[J]. Plants, 2020, 9(6): 702.

[30] Furutani M, Vernoux T, Traas J, *et al*. PIN-FORMED1 and PINOID regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis embryogenesis*[J]. Development, 2004, 131(20): 5021-5030.

[31] Zhang C, Wu X, Zhang B, *et al*. Functional analysis of the *GmESR1* gene associated with soybean regeneration[J]. PloS ONE, 2017, 12(4): e0175656.

[32] Gendron J M, Liu J S, Fan M, *et al*. Brassinosteroids regulate organ boundary formation in the shoot apical meristem of *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(51): 21152-7.

[33] Lee D K, Parrott D L, Adhikari E, *et al*. The mobile bypass signal arrests shoot growth by disrupting shoot apical meristem maintenance, cytokinin signaling, and WUS transcription factor expression[J]. Plant physiology, 2016, 171(3): 2178-2190.

[34] Orłowska A, Kępczyńska E. Involvement of O_2·− in the regulation of *Polycomb, Trithorax* and *LEC1, L1L, WUS, WOX5, STM* gene expression during somatic embryogenesis induction in *M. truncatula*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2020, 142: 201-212.

[35] 许智宏, 张宪省, 苏英华, 等. 植物细胞全能性和再生[J]. 中国科学: 生命科学, 2019, 49（10）：1282-1300.

[36] 赵玉红, 马　骊, 常　瑜, 等. *STM*和*CUC2*基因对不同抗寒性白菜型冬油菜生长点的调控研究[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41（2）：157-165.

Cloning and Transient Expression Analysis of *CUC1* Gene from *Fraxinus mandshurica* Rupr.

CUI Jing-hong[1,2], *YU Lei*[1,2], *LIANG Nan-song*[1,2], *SONG Ting-ting*[1,2], *LYU Yi-pin*[1,2], *JI Xin-tong*[1,2], *XU Liang*[3], *ZHAO Fu-jiang*[3], *ZHAN Ya-guang*[1,2]

(1. Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 2. Heilongjiang Touyan Innovation Team Program (Tree Genetics and Breeding Innovation Team), Harbin 150040, Heilongjiang, China; 3. Linjiang Forestry Bureau, Jilin Province, Linjiang　134600, Jilin, China)

Abstract: [**Objective**] To clone the *CUC1* gene of *Fraxinus mandshurica* and analyze its expression characteristics, so as to lay a foundation for the regulation of the gene in the regeneration of *F. mandshurica* [**Method**] The *FmCUC1* gene was cloned from *F. mandshurica* seedlings. The nucleotide sequence of *FmCUC1* gene and the amino acid sequence of its coding protein were analyzed by bioinformatics software, and the phylogenetic tree was constructed. The *FmCUC1* gene was transferred into onion inner epidermis cells by Agrobacterium tumefaciens infection method for subcellular localization. The tissue surface of *FmCUC1* gene in root, stem, leaf and apical bud was analyzed by real-time fluorescence quantitative analysis. At the same time, the seedlings of *F. mandshurica* were sprayed with IAA, 6-BA and BR hormones to analyze the expression pattern of *FmCUC1* gene induced by different hormone signals; the *FmCUC1* gene was transiently transformed into *F. mandshurica* by *A. tumefaciens* for 72 hours. [**Result**] The full length of *FmCUC1* gene was 807 bp, encoding 269 amino acids. *FmCUC1* was a stable hydrophobic protein with a conserved NAC domain protein domain. The sequence similarity of FmCUC1 protein and *Olea europaea* subsp. *europaea* protein was 86.17%, which was close to each other. FmCUC1 protein was located in the nucleus. q-RT PCR analysis showed that the expression of *FmCUC1* gene was the highest in the terminal bud of *F. mandshurica*; during hypocotyl bud regeneration, the expression of *FmCUC1* gene was high in both bud point formation and clump formation; during seed germination, the expression of *FmCUC1* gene reached two peaks on the 4th and 8th day, which were 8.56 and 8.46 times of that on the first day. The results of exogenous spraying IAA, 6-BA and BR showed that the expression of *FmCUC1* gene was up-regulated compared with the control, and reached the highest value after 72 h of IAA and BR treatment, which were 45.72 times and 20.36 times of the control, respectively, and reached the peak value after 48 h of 6-BA treatment, which was 59.40 times of the control. Agrobacterium tumefaciens mediated transient overexpression of *FmCUC1* gene for 72 hours, the expression of *FmCUC1* gene and its downstream *STM* gene increased significantly. [**Conclusion**] *FmCUC1* gene belongs to NAC family and is a nuclear transcription factor. It participates in the process of shoot regeneration of *F. mandshurica*, and responds to the induction of IAA, 6-BA and BR plant hormone signals. Overexpression of *FmCUC1* gene can activate the expression of its downstream *STM* gene, which is conducive to the formation of apical meristem.

Keywords: *Fraxinus mandshurica* Rupr.; *FmCUC1* gene; bioinformatics analysis; instantaneous transformation; expression pattern analysis

（责任编辑：张　研）