

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.02.005

核桃 *JrWOX4b* 基因的克隆和功能分析

雷夏烁¹, 常英英^{1,2}, 张 普¹, 宋晓波^{1*}, 白永超¹, 裴 东¹

(1. 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业和草原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. 河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: [目的] 为探索 *WOX4b* 基因在核桃不定根发生过程中的调控作用提供理论支撑。[方法] 以核桃品种‘林早香’(*Juglans regia* ‘Linzaoxiang’) 的 cDNA 为模板克隆该基因 CDS 全长序列; 利用生物信息学技术对其进行多重序列比对和系统进化分析; 构建该基因与黄色荧光蛋白 (Yellow Fluorescent Protein, YFP) 标签的融合表达载体进行亚细胞定位分析; 通过对银腺杨‘84K’的遗传转化, 分析其功能。[结果] *JrWOX4b* 基因的编码序列 (Coding sequence, CDS) 长度为 678 bp, 编码 226 个氨基酸, 分子量为 25.42 KDa。所编码氨基酸序列的多重比对及系统进化分析结果显示: 核桃 *JrWOX4b* 与山核桃属的长山核桃同源蛋白遗传关系最近, 与壳斗科栎属白栎次之, 而与禾本科的黍稷和二穗短柄草的亲缘关系最远。*JrWOX4b* 基因过表达植株的表型分析结果显示: *JrWOX4b* 的过表达和对照植株生长发育均正常, 但在相同培养条件下, *JrWOX4b* 基因的过表达能够显著增加杨树的不定根数量, 2 周龄过表达植株不定根数量为对照植株的 3 ~ 4 倍, 不定根长度是对照植株的 1/2。[结论] 从核桃中成功克隆了 *WOX* 基因家族成员 *JrWOX4b* 基因, 其过表达可显著增加转基因植株的不定根数量。研究结果不仅能够为不定根发生调控机制的研究提供理论支撑, 同时也为其他难生根木本植物的快速繁殖提供优良基因资源。

关键词: 核桃; *JrWOX4b*; 不定根; 功能分析

中图分类号: S664.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2022)02-0037-08

根系是植物在长期适应陆地生境过程中形成的重要器官, 是植物枝繁叶茂和抵御逆境的基础。根系主要由两种类型组成, 一是在胚胎的发育过程中形成的主根, 二是胚后发育过程中产生的根, 包括侧根和不定根^[1]。不定根的形成会出现在茎和叶等器官中, 它需要激素刺激细胞分裂发育成的根原基。促进“不定根的形成”是大多数林木和园艺作物无性繁殖和工厂化育苗的核心工作^[2]。因此, 不定根发生能力这一性状在林木遗传改良中占有重要的地位, 不定根发生分子调控机制的解析也成为当前林木遗传改良的重要研究内容之一。在过去的几十年中, 有关拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.)、

水稻 (*Oryza sativa* L.) 和玉米 (*Zea mays* L.) 等草本模式植物不定根发生遗传调控机制的研究, 已经获得丰硕的成果^[3], 而针对多年生木本植物特别是难生根木本植物不定根发生的研究却相对缺乏。

近年来, 随着分子遗传学和测序技术的飞速发展, 各类转录因子在植物发育生物学领域的调控作用受到越来越多的关注, 其中, 植物特有的 *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* (*WOX*) 基因家族^[4], 能够通过影响分生组织中干细胞的分裂和分化, 调控植物生长发育过程中的胚胎发育、微管系统发育和侧生器官发生等生物学过程^[5-6]。在

收稿日期: 2021-08-13 修回日期: 2021-10-22

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (CAFYBB2017ZA004-2); 国家自然科学基金项目 (32101479)

作者简介: 雷夏烁, 硕士。主要研究方向: 经济林生物技术。E-mail: 592100302@qq.com

* 通讯作者: 宋晓波, 博士, 助理研究员。主要研究方向: 难生根树种不定根发生分子机制。E-mail: xiaobo.song@caf.ac.cn

水稻中, *OsWOX4* 基因被证明参与茎尖分生组织的调控, 还能够通过调节生长素在水稻初生根的极性运输来控制水稻初生根的伸长^[7]。在拟南芥中, *AtWOX5* 与 *SCR*、*SHR*、*PLT* 基因一同调控根尖干细胞生态位的形成与稳定^[8]。在苜蓿中, *MtWOX5* 与 *MtPLT*、*MtBBM1* 基因共同调节根尖分生组织的形成^[9]。在杨树中, *PtoWUSa* 可通过调节生长素转运基因 *PIN* 的表达, 从而控制生长素的极性运输, 以此来完成对杨树不定根发育的调控^[10-11]。*WOX5/7* 还可以在 *WOX11/12* 的作用下激活表达, 进而在根原基起始过程中发挥着关键调控作用^[12]。*GhWOX13* 基因在棉花纤维中的特异性高表达, 暗示着其对棉花纤维形成的调控作用^[13]。综上可见, *WOX* 基因家族不同成员在功能方面存在分化, 相同成员在不同物种中的作用是保守性和特异性并存的。因此, 借鉴模式植物相关研究成果, 并从中寻找林木特色调控机制是十分必要的。

优良砧木无性繁育体系的建立, 是实现经济林产业整株无性系化的关键。然而, 核桃等经济林树种很难产生不定根, 特别是随着树龄的增长, 其不定根发生能力显著降低甚至完全丧失, 严重制约了优良砧木良种的推广应用。本课题组前期通过连续多次嫁接和黄化处理等手段, 成功诱导成龄植株复幼, 结合 IBA (3-吲哚丁酸) 等生长调节剂处理, 实现了核桃等多个难生根树种的高效扦插繁殖^[14]。并通过对 *WOX* 基因家族的表达模式分析发现, *JrWOX4b* 基因的表达水平发生在不定根发生过程中显著上调表达, 推测其在不定根发生过程中发挥了重要调控作用^[15]。因此, 本研究在前期工作基础之上, 通过对 *JrWOX4b* 基因的克隆、生物信息学分析和亚细胞定位, 分析其序列和表达特性, 重点通过对‘84K’杨的遗传转化和表型分析鉴定其在不定根发生方面的作用, 研究结果不仅有助于丰富植物器官从头建成的发育生物学理论, 也能指导开展植物优良品种的快速繁殖, 对农、林、园艺的发展都具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

核桃品种‘林早香’ (*Juglans regia* ‘Linzaoxiang’) 幼嫩叶片用于总 RNA 提取和基因克隆; 3 周龄银腺杨‘84K’ (*Populus alba* × *P. glandulosa* cl. ‘84K’) 无菌苗自上而下第 3~4 片

叶片用于遗传转化; 4~5 周龄野生型烟草自上而下第 6~8 片叶片用于亚细胞定位分析。核桃品种‘林早香’2 年生盆栽苗和野生型烟草植株均保存在中国林科院科研温室。‘84K’杨无菌苗保存于林木遗传育种国家重点实验室组培室, 培养条件为: 温度 23~25 °C, 光照周期 16/8 h (光照/黑暗)。

1.2 方法

1.2.1 核桃 *JrWOX4b* 基因 CDS 的克隆和生物信息学分析 总 RNA 的提取使用 EASY spin Plus 植物总 RNA 快速提取试剂盒 (艾德莱, 北京), 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop2000 微量分光光度计检测总 RNA 完整性和浓度。PeimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒 (Takara, 日本) 合成 cDNA 第一链。根据 NCBI 中登陆的核桃 *JrWOX4b* 的基因序列 (Genbank 登录号: XM_019000128.1) 设计 *JrWOX4b* 基因 CDS 区全长序列的 PCR 扩增引物 (表 1), 以‘林早香’核桃的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。利用在线工具 ExpasyProtParam (<http://web.expasy.org/prot-param/>) 对 *JrWOX4b* 基因序列特征进行分析, 氨基酸序列多重比对和系统进化树构建使用 MEGA 软件^[16] 完成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'→3')	功能 Function
<i>JrWOX4b</i> -CDS-F	ATGGAAGCATGAAGGTGCAT	CDS区扩增
<i>JrWOX4b</i> -CDS-R	ATGGAAGCAGCATGAAGGTA	
<i>HPT</i> -F	TAAATAGCTGCGCCGATGGT	阳性植株鉴定
<i>HPT</i> -R	GGTTTCCACTATCGGCGAGT	
<i>qJrWOX4b</i> -F	AGCACGAACCCTCCCTCAC	荧光定量PCR
<i>qJrWOX4b</i> -R	AAAAGCCGCAACACCAGC	
<i>JrGAPDH</i> -F	ATGATGTCAAGGAAGGACTC	内参基因
<i>JrGAPDH</i> -R	CACAATGATCTCAGCTCCG	

1.2.2 *JrWox4b* 蛋白亚细胞定位分析 根据前期克隆得到的 *JrWOX4b* 基因 CDS 序列 (引物见表 1), 通过 gateway 系统 BP 反应将其连接至中间载体 pDONR222.1 并测序, 随后将目的基因亚克隆至载体 pEarlyGate104, 得到 35::YEP-*JrWOX4b* 的融合表达载体, 电击转化农杆菌 GV3101。农杆菌菌液培养 OD_{600} 至 0.5~1.0, 离心后用侵染液重悬菌液至 OD_{600} 0.8 左右, 并注射

烟草叶片。培养 2 d 后, 使用共聚焦显微镜 (LSM510) 进行 *JrWOX4b* 蛋白的亚细胞定位观察, 荧光成像参数为 YFP/FM464:488/543 nm 和 505~530/585 nm 接受滤镜。

1.2.3 *JrWox4b* 基因植物过表达载体构建及‘84K’杨遗传转化 通过 Gateway 系统的 BP 反应构建 *JrWOX4b* 基因的入门载体 P1-*JrWOX4b*-P2, 通过 LR 反应将 *JrWOX4b* 基因构建于过表达载体 PMDC32 中, 得到 35::*JrWOX4b* 过表达载体, 并通过电击法转化至农杆菌感受态 GV3101 中, 参照张利^[17]的方法, 通过叶盘法转化‘84K’杨: 以生长 3 周的‘84K’杨组培苗 (顶端向下 3~4 片叶片) 为材料, 农杆菌菌液 OD_{600} 培养至 0.6~0.8 后, 将叶片在菌液中浸泡 10 min, 用滤纸吸净表面菌液后转入不定芽诱导培养基 (MS + 3 mg·L⁻¹ 潮霉素 + 200 mg·L⁻¹ 特美汀 + 0.5 mg·L⁻¹ 6BA + 0.05 mg·L⁻¹ NAA) 上诱导和筛选不定芽。在经过大约 30 d 的不定芽诱导后将抗性不定芽更换至生根培养基 (1/2MS + 3 mg·L⁻¹ 潮霉素 + 200 mg·L⁻¹ 特美汀 + 0.05 mg·L⁻¹ IBA) 的诱导生根培养基, 直至诱导出不定根。

1.2.4 转基因阳性植株的鉴定 提取转基因抗性植株和对照‘84K’植株的基因组 DNA, PCR 检验目

的基因的插入。利用筛选出的阳性转基因植株为材料, 提取抗性植株总 RNA, 反转录为 cDNA, qRT-PCR 检测 *JrWOX4b* 基因在转基因植株中的相对表达量 (引物序列见表 1)。

1.2.5 转基因‘84K’杨不定根相关表型分析 每个阳性遗传转化株系和对照‘84K’株系分别扩繁至 30 株。取茎尖扦插于不定根诱导培养基中, 诱导不定根发生。诱导 0~6 d 内在体视显微镜下观察茎段基部的形态学变化。诱导后 14 d 统计不定根数量和长度。

1.2.6 数据处理和分析 通过 Microsoft Excel 和 SPSS18.0 软件对试验数据进行整理和单因素方差分析, 显著性差异水平设定为 0.05, 当 $P \leq 0.05$ 时表示对比的样本间有显著性差异。

2 结果分析

2.1 核桃 *JrWOX4b* 基因克隆和生物信息学分析

以‘林早香’核桃叶片 cDNA 为模板进行 *JrWOX4b* 基因的 PCR 扩增, 切胶回收和测序结果显示: *JrWOX4b* 基因 CDS 区长度为 678 bp, 编码 226 个氨基酸, 分子量为 25.42 KDa; 理论等电点 (pI) 为 9.16, 带负电荷残基总数 (Asp + Glu) 为 28, 带正电荷残基总数 (Arg + Lys) 为

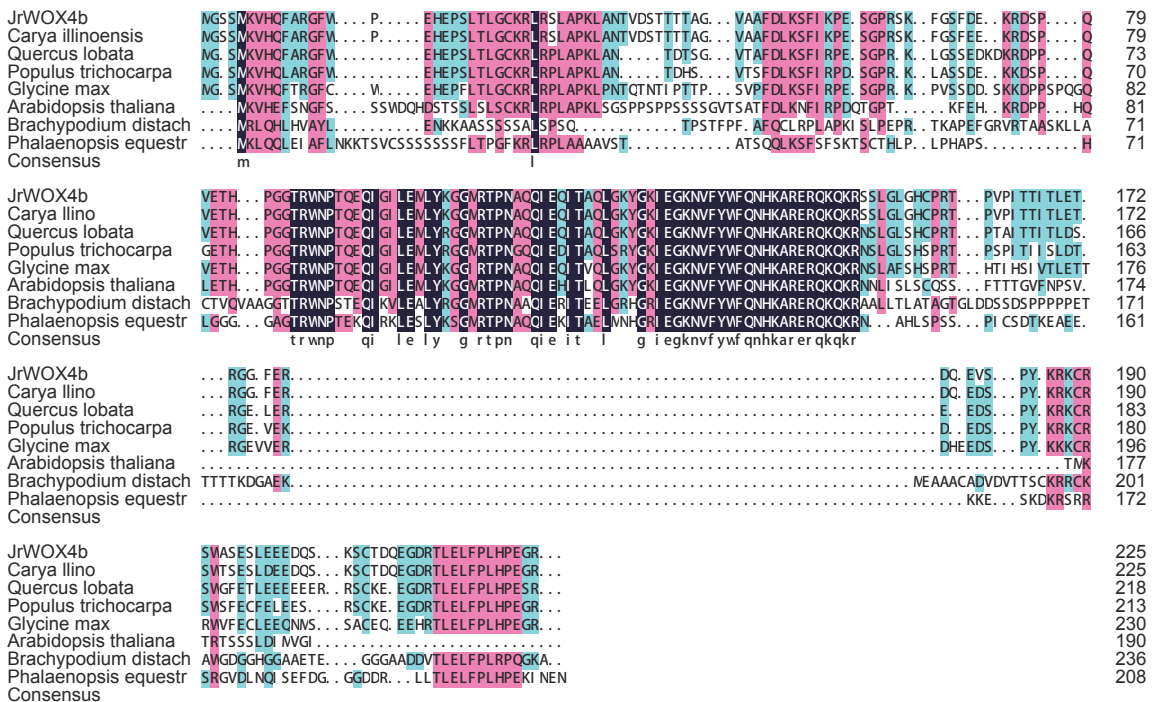


图 1 核桃 *JrWOX4b* 与其他植物的氨基酸序列多重比对

Fig. 1 The alignment of amino acid sequences of *JrWOX4b* in walnut and other plants

34; 脂肪族指数为 54.82, 平均亲水性为-0.908, 属于亲水蛋白, 定位于细胞核。氨基酸序列多重比对结果 (图 1) 显示: JrWOX4b 蛋白具有 1 个同源异型 HD 结构域, 属于典型的 WOX 家族成员。为了分析 JrWOX4b 蛋白在不同植物间的亲缘关系, 应用 MEGA7.0 软件, 采用 Neighbor-joining 方法将核桃 JrWOX4b 与其他 9 个物种的同

源蛋白进行系统进化分析, 聚类结果显示: 核桃 JrWOX4b 与山核桃属的长山核桃 (*Carya illinoensis*) 同源蛋白遗传关系最近, 与壳斗科栎属白栎 (*Quercus lobata*) 次之, 而与禾本科的黍稷 (*Panicum miliaceum*) 和二柄短穗草 (*Brachypodium distachyon*) 亲缘关系最远 (图 2)。

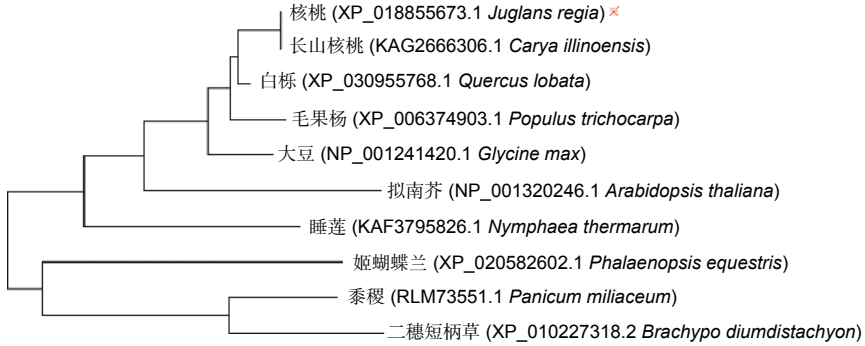


图 2 JrWOX4b 与其同源序列的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of JrWOX4b and its homologous

2.2 亚细胞定位分析

为了确定 JrWOX4b 蛋白在细胞中的表达位置, 进而明确其作用机制。将 35S::YFP-JrWOX4b 融合表达载体在烟草叶片中瞬时表达, 结果

(图 3) 表明: 在 288 nm 的条件下激发, 烟草下表皮细胞的细胞核呈现明显的黄色荧光信号, 且细胞核的轮廓清晰。在与明场叠加后, 可见 35S::YFP-JrWOX4b 黄色荧光蛋白表达的位置在细胞核上。

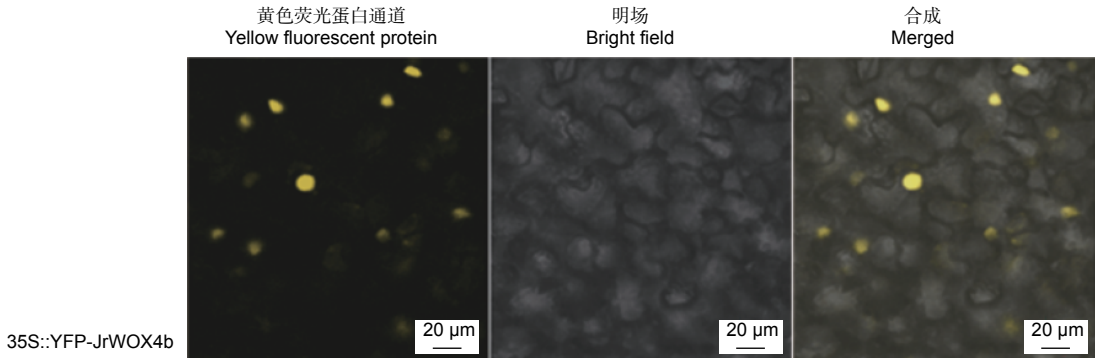


图 3 JrWOX4b 蛋白在野生烟草叶片中的亚细胞定位分析

Fig. 3 Analysis of Subcellular Localization of JrWOX4b Protein in Wild Tobacco Leaves

2.3 JrWOX4b 转基因阳性植株鉴定

分别提取不同转基因株系和对照‘84K’植株的基因组 DNA, 通过 PCR 验证目的基因的插入, 图 4A 表明: 共鉴定得到 JrWOX4b 基因过表达阳性株系 14 个。进一步通过 qRT-PCR 技术检测 JrWOX4b 在对照‘84K’和转基因注释中的表达水平, 结果 (图 4B) 显示: 对照组 84K 中未检测到 JrWOX4b 基因的表达, 将 11# 中的基因表达量设

为 1, 在获得的 14 个阳性株系中, OE-JrWOX4b-3#、5#、8#、9#、13# 的表达量较高, 均达到 11# 表达水平的 4 倍以上。

2.4 JrWOX4b 基因过表达对‘84K’杨不定根发生的影响

为了分析 JrWOX4b 基因对于‘84K’杨不定根发生的影响, 选取已验证的阳性植株进行不定根诱导试验。诱导过程中, 利用体视镜观察‘84K’杨茎段

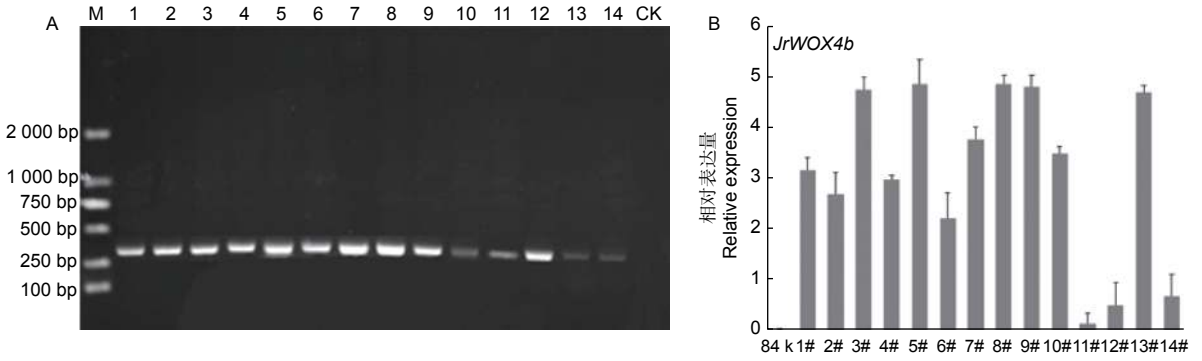


图 4 ‘84K’阳性再生植株鉴定 (A) 和 *JrWOX4b* 基因的相对表达量 (B)

Fig. 4 Identification of *Populus alba* × *P. glandulosa* cl. ‘84K’ positive regenerated plants (A) and relative expression of *JrWOX4b* gene (B)

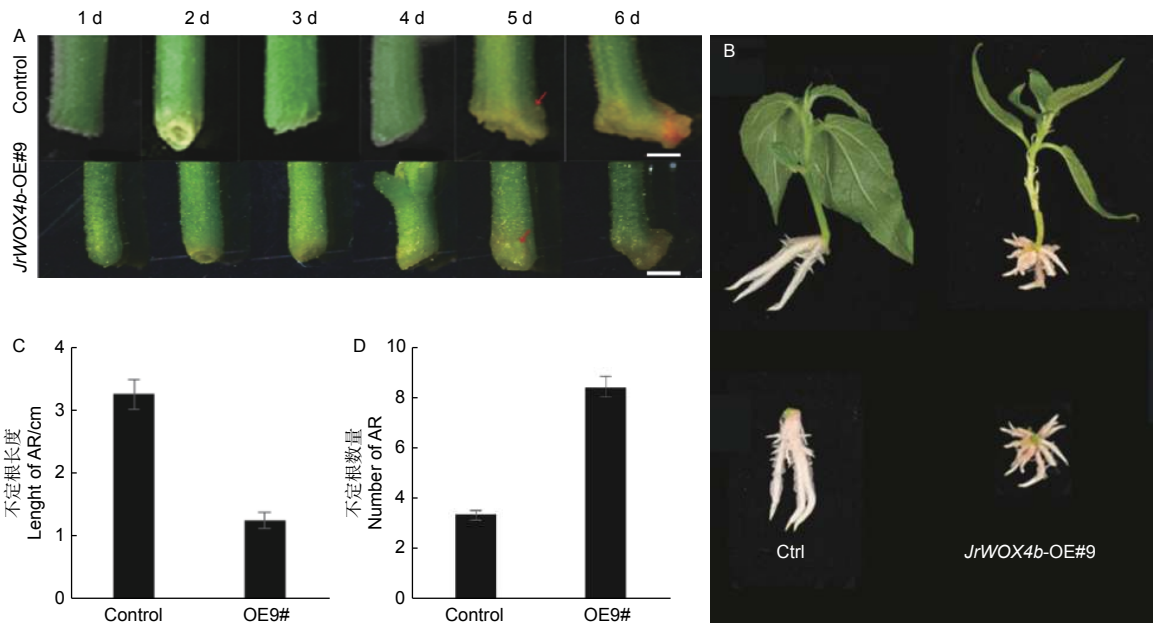
基部形态变化, 结果 (图 5A) 显示: 在诱导 5 d 时 *JrWOX4b*-OE#9 和对照 (Control) 中同时观察到茎基部出现不定根原基向外突出产生的小突起, 诱导 6 d 时, *JrWOX4b*-OE#9 和对照基部可观察到不定根的出现。过表达株系和对照植株在不定根发生时间方面没有显著差异, 但过表达植株的不定根粗度增加, 并且根尖部位发生明显弯曲 (图 5B)。

诱导后 14 d, 过表达和对照株系的不定根相

关表型分析结果显示: *JrWOX4b* 基因的过表达能显著促进不定根发生数量, 不定根的长度显著缩短 (图 5B)。在 *JrWOX4b* 基因过表达的植株中, 不定根的数量为 8.3 根, 平均不定根的长度约为 1.25 cm, 对照 ‘84K’ 杨的平均不定根数量为 3.2 根, 平均不定根长度为 3.26 cm (图 5C、D)。

3 讨论

通常情况下具有相似的物理和化学性质的蛋白



注: A: 不定根诱导过程中转基因和对照茎段基部形态学变化; B: 对照及阳性再生植株的不定根长度表型; C: 对照及阳性再生植株的不定根长度; D: 对照及阳性再生植株的不定根数量

Notes: A: The morphological changes of the base of the transgenic and control stem segments during adventitious root induction; B: The adventitious root length phenotype of the control and positive regenerated plants; C: The adventitious root length of the control and positive regenerated plants; D: The number of adventitious roots of the control and positive regenerated plants

图 5 ‘84K’杨阳性转基因植株不定根发生相关表型分析

Fig. 5 Phenotypic analysis of adventitious root of *Populus alba* × *P. glandulosa* cl. ‘84K’ positive transgenic plants

可能具有相似的生物学功能。本研究成功地从核桃中克隆到 1 个 *WOX* 转录因子家族成员基因 *JrWOX4b*, 其编码氨基酸的多重序列比和系统进化分析结果显示, 该基因编码的 *JrWOX4b* 蛋白与山核桃属的长山核桃同源蛋白具有 97.79% 的高相似性, 并且具有典型的 *HOX* 结构域, 说明 *WOX4b* 基因在生物演变过程中的高度保守性, 同时也说明 *JrWOX4b* 基因可能具有 *WOX* 转录因子家族在分生组织调控方面的功能。

根原基的形成是不定根发生的先决条件。前人研究结果显示, 不定根原基原始细胞通常为具有潜在分生能力的细胞, 如形成层、中柱鞘或者薄壁细胞等^[18]。对于草本植物而言, 不定根起始于下胚轴或叶片微管组织中的形成层细胞。在木本植物中, 不定根通常起源于茎段微管组织中的形成层细胞或近缘的薄壁细胞^[19]。作为植物中最重要的转录因子家族之一, *WOX* 基因家族成员在干细胞维持和分生组织中重要的调控作用已得到研究人员的广泛关注^[20]。拟南芥、杨树等模式植物有关研究过程中也发现, *WOX4/5/11* 等 *WOX* 家族成员表达水平变化会显著影响植物的不定根发生能力^[21-22]。本研究中, 笔者通过对 *JrWOX4b* 基因的过表达能显著促进转基因‘84K’杨的不定根数量, 并显著抑制不定根的伸长, 证实了其在不定根发生过程中的调控作用。植物激素在植物不定根形成中起着重要的作用, *IAA* 能够通过调节茉莉酸 (*Jasmonic Acid*, *JA*) 的稳态来调控不定根的形成, 但 *JA* 会破坏不定根的根尖优势, 抑制不定根的根尖伸长^[23]。*ABA* 对不定根的形成和发育有多种作用, 较低浓度的 *ABA* 会促进不定根的形成, 但同时 *ABA* 也会抑制不定根的伸长^[24]。*LkWOX4* 过表达植株中不定根内 *JA* 和 *ABA* 含量升高, *IAA* 含量降低, 这可能是不定根数量增多但长度缩短的原因^[25]。因此, 笔者推测 *JrWOX4b* 基因的过表达可能通过对转基因植株中内源激素的含量和分布影响, 促进了不定根的发生, 同时也抑制了其伸长。这一推测, 笔者将通过对转基因植株内源激素和基因表达水平的分析进一步研究。

研究过程中, 笔者还观察到 *JrWOX4b* 过表达的‘84K’杨叶片边缘向着近轴面卷曲的现象。据报道, 在杨树中, *PtWOX4* 的过量表达也会导致杨树叶片的卷曲^[26], 原因可能是 *PtWOX4* 的超量表达影响了叶片维管的正常发育, 进而导致叶片与叶

脉的夹角改变, 与本研究观察到的表型相似。同样, 在水稻中, 与 *JrWOX4b* 基因同属于 *WUS* 分支的 *OsWOX3b*, 其缺失突变体同样也会影响水稻叶片的形状^[27], 但其中的深层机制仍需进一步的试验探索。

4 结论

本研究从核桃叶片中成功克隆了 *WOX* 基因家族成员 *JrWOX4b* 基因, 该基因编码的蛋白具有 *WOX* 家族成员特有的保守结构域。亚细胞定位分析发现, *JrWOX4b* 蛋白定位于细胞核。基因功能分析结果显示, *JrWOX4b* 基因的过表达可显著促进转基因植株的不定根数量, 暗示了其在不定根发生方面的重要作用。研究结果不仅能够为其他难生根树种不定根发生的研究提供优良基因资源, 同时也为林木和园艺作物优良品种的快速繁殖提供理论支撑。

参考文献:

- [1] Verstraeten I, Schotte S, Geelen D. Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5 (495): 495.
- [2] Petricka J J, Winter C M, Benfey P N. Control of *Arabidopsis* root development[J]. *Annual review of Plant Biology*, 2012, 63(1): 563-590.
- [3] Lv B, Wei K, Hu K, et al. MPK14-mediated auxin signaling controls lateral root development via *ERF13*-regulated very-long-chain fatty acid biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(2): 285-297.
- [4] Haecker A. Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 2004, 131(3): 657-668.
- [5] Liu B, Wang L, Zhang J, et al. *WUSCHEL*-related *Homeobox* genes in *Populus tomentosa*: diversified expression patterns and a functional similarity in adventitious root formation[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1-14.
- [6] Deveaux Y, Toffano-Nioche C, Claisse G, et al. Genes of the most conserved *WOX* clade in plants affect root and flower development in *Arabidopsis*[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8(1): 1-19.
- [7] Ohmori Y, Tanaka W, Kojima M, et al. *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the *CLE* gene *FCP1* in rice[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(1): 229-241.
- [8] Xu J, Hofhuis H, Heidstra R, et al. A molecular framework for

- plant regeneration[J]. *Science*, 2006, 311(5759): 385-388.
- [9] Imin N, Nizamidin M, Wu T, *et al.* Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(3): 439-451.
- [10] van der Graaff E, Laux T, Rensing S A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(12): 1-9.
- [11] Schoof H, Lenhard M, Haecker A, *et al.* The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes[J]. *Cell*, 2000, 100(6): 635-644.
- [12] Xu L. *De novo* root regeneration from leaf explants: wounding, auxin, and cell fate transition[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, 41: 39-45.
- [13] He P, Zhang Y, Liu H, *et al.* Comprehensive analysis of *WOX* genes uncovers that *WOX13* is involved in phytohormone-mediated fiber development in cotton[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 1-12.
- [14] Song X, Liu H, Bu D, *et al.* Rejuvenation remodels transcriptional network to improve rhizogenesis in mature *Juglans* tree[J]. *Tree Physiology*, 2021, 41(10): 1938-1952.
- [15] Chang Y, Song X, Zhang Q, *et al.* Genome-wide identification of *WOX* gene family and expression analysis during rejuvenational rhizogenesis in walnut (*Juglans regia* L.) [J]. *Forests*, 2020, 11(1): 16.
- [16] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [17] 张利. 杨树糖转运体SWEETs和SUT4的功能分析[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2016.
- [18] da Rocha Correa L, Troleis J, Mastroberti A A, *et al.* Distinct modes of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Biology*, 2012, 14(1): 100-109.
- [19] Legué V, Rigal A, Bhalerao R P. Adventitious root formation in tree species: involvement of transcription factors[J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 151(2): 192-198.
- [20] Wang C, Zhao B, He L, *et al.* The *WOX* family transcriptional regulator *SILAM1* controls compound leaf and floral organ development in *Solanum lycopersicum*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(5): 1822-1835.
- [21] Li H, Yao L, Sun L, *et al.* *ETHYLENE INSENSITIVE 3* suppresses plant *de novo* root regeneration from leaf explants and mediates age-regulated regeneration decline[J]. *Development*, 2020, 147(9): dev179457.
- [22] Xu M, Xie W, Huang M. Two *WUSCHEL* - related *HOMEOBOX* genes, *PeWOX11a* and *PeWOX11b*, are involved in adventitious root formation of poplar[J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, 155(4): 446-456.
- [23] Gutierrez L, Mongelard G, Floková K, *et al.* Auxin controls *Arabidopsis* adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(6): 2515-2527.
- [24] Zhou W, Lozano-Torres J L, Bliou I, *et al.* A jasmonate signaling network activates root stem cells and promotes regeneration[J]. *Cell*, 2019, 177(4): 942-956.e14.
- [25] Wang H, Xie Y, Liu W, *et al.* Transcription factor *LkWOX4* is involved in adventitious root development in *Larix kaempferi*[J]. *Gene*, 2020, 758: 144942.
- [26] 李建波, 贾会霞, 张进, 等. 毛白杨 *PtoWOX4a* 基因过表达对次生生长的影响[J]. *林业科学*, 2018, 54(2): 52-59.
- [27] Cho S H, Yoo S C, Zhang H, *et al.* The rice narrow *leaf2* and narrow *leaf3* loci encode *WUSCHEL* - related homeobox3 A (*OsWOX3A*) and function in leaf, spikelet, tiller and lateral root development[J]. *New Phytologist*, 2013, 198(4): 1071-1084.

Cloning and Functional Analysis of *JrWOX4b* in *Juglans hindsii* × *regia* ‘Linzaoxiang’

LEI Xia-shuo¹, CHANG Ying-ying^{1,2}, ZHANG Pu¹, SONG Xiao-bo¹, BAI Yong-chao¹, PEI Dong¹

(1. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Silviculture of National Forestry and Grassland Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

2. College of Life Sciences, He'nan Normal University, Xinxiang 453007, He'nan, China)

Abstract: [Objective] To provide theoretical support for exploring the regulatory function of *WOX4b* gene in walnut adventitious rooting. [Method] Using the cDNA of *Juglans regia* ‘Linzaoxiang’ as template, the full-length CDS of *JrWOX4b* was cloned. The multiple sequence alignments and evolution analysis were applied by using bioinformatics technology to analyze its molecular characteristics. The fusion expression vector of *JrWOX4b* and yellow fluorescent protein (YFP) tag were constructed for subcellular localization analysis. After completing the genetic transformation and phenotype analysis of *Populus alba* × *P. glandulosa*, the function of this gene was determined. [Result] The CDS of *JrWOX4b* is 678 bp in length, encoding 226 amino acids, and molecular weight is 25.42 KDa. The results of multiple alignment and phylogenetic analysis of the amino acid sequences showed that walnut *JrWOX4b* has the closest genetic relationship with the homologous protein of *Carya illinoensis*, followed by *Quercus lobata*, while has the farthest genetic relationship with *Panicum miliaceum* and *Brachypodium distachyon*. Phenotypic analysis of *JrWOX4b* overexpression plants showed that both the transgenic and control plants grew normally. However, under the same culture conditions, *JrWOX4b* could significantly increase the number of adventitious roots. The number of adventitious roots of 2-week-old overexpression plants is 3~4 times that of the control plants, and the length of adventitious roots is 1/2 of that of control plants. [Conclusion] *JrWOX4b*, the member of *WOX* gene family, was successfully cloned from walnut, and its overexpression can significantly promote the number of adventitious roots. The results provide theoretical support for the research on adventitious root regulation mechanism, and also provide excellent genetic resources for the rapid propagation of other difficult-to-root plant species.

Keywords: walnut; *JrWOX4b*; adventitious root; functional analysis.

(责任编辑: 张 研)