

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.04.004

中山杉 406 *ThSHR3* 基因的克隆、表达及蛋白互作研究

宣磊, 王芝权, 殷云龙, 华建峰*

(江苏省中国科学院植物研究所, 江苏省落羽杉属树木种质创新与繁育工程研究中心, 江苏南京 210014)

摘要: [目的] 本研究在前期中山杉 (*Taxodium hybrid* 'Zhongshanshan') 不定根转录组及蛋白组研究的基础上, 克隆获得中山杉 *ThSHR3* (*SHORT-ROOT 3*) 基因, 对其进行表达特性检测及相关功能分析, 为深入研究 *ThSHR3* 基因在中山杉不定根发育过程中的调控机理提供理论基础。[方法] 以中山杉 406 扦插苗不定根为材料, 利用 RACE 技术克隆获得 *ThSHR3* 基因全长, 并对其进行生物信息学分析。采用半定量 PCR 和荧光定量 PCR 分别对 *ThSHR3* 进行表达特性检测。通过原生质体瞬时表达检测 *ThSHR3* 蛋白的亚细胞定位情况, 进一步使用双分子荧光互补 (BiFC) 技术验证 *ThSHR3* 的蛋白互作情况。[结果] *ThSHR3* 基因的全长为 2 019 bp, 其中, 开放阅读框 (ORF) 为 1 446 bp, 共编码 482 个氨基酸残基。*ThSHR3* 蛋白 C 端较保守, 具有 LHRI、VH1D、LHRII、PFYRE 和 SAW 等几个典型的蛋白结构域。系统进化分析表明: *ThSHR3* 属于 GRAS 转录因子家族中的 SHR 亚家族。*ThSHR3* 基因在中山杉不定根发育过程中呈逐渐上升的表达模式。原生质体瞬时表达实验表明: *ThSHR3* 蛋白定位于细胞核。BiFC 实验证明: *ThSHR3* 蛋白和 GRAS 家族另一成员 *ThSCR* 蛋白存在着明显互作。[结论] 中山杉 *ThSHR3* 和不定根发育密切相关, 且在中山杉不定根的发育过程中发挥着重要作用。**关键词:** 中山杉; SHR; 基因克隆; 基因表达; 蛋白互作

中图分类号: S722

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)04-0032-08

中山杉 (*Taxodium hybrid* 'Zhongshanshan') 是江苏省中国科学院植物研究所从落羽杉属树木杂交组合中选育出的, 是具有一定超亲性状的优良无性系总称。中山杉具有生长迅速、抗逆性强、景观性好、成材率高等特点, 已在我国沿海防护林建设、公路及城乡绿化、农田林网和滩涂造林等方面得到广泛应用^[1]。目前, 中山杉无性系主要通过嫩枝扦插的方法进行繁殖, 近些年林业工作者一直致力于通过中山杉扦插技术改良来提高中山杉的生根率, 研究表明: 泥炭土、珍珠岩及沙壤土组成的混合基质有利于大多数中山杉无性系生根^[2]。植物生长

调节物质的浓度对中山杉扦插生根率影响显著, 2 000 mg·L⁻¹ IAA 和 2 000 mg·L⁻¹ NAA 混合液处理的中山杉无性系插条, 生根率和生根数量都显著提升。然而, 在中山杉长期选育过程中发现, 不同无性系间生根能力差异显著, 即使优化扦插技术, 中山杉 302 的平均生根率 (57.50%) 仍显著低于中山杉 118 (83.93%) 和 406 (87.14%)^[3-4], 且随着无性系生理年龄的增长, 早期选育出的无性系生根力出现衰退现象^[1], 中山杉的生根机理亟需深入研究。

SHR (*SHORT-ROOT*) 是植物 GRAS 家族中与根系发生及形态建成密切相关的一个分支, 对根

收稿日期: 2020-08-19 修回日期: 2021-02-24

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31870592); 江苏省中国科学院植物研究所自主创新项目 (JSPKLB202048); 江苏省青年基金 (BK20200291)

作者简介: 宣磊, 博士, 助理研究员。主要研究方向: 林木遗传育种。电话: 138541991791。Email: 13851991791@163.com

* 通讯作者: 华建峰, 博士, 研究员。主要研究方向: 植物资源与环境。电话: 13770637371。Email: jfhua@cnbj.net。地址: 210014 江苏省南京市玄武区前湖后村 1 号。

尖干细胞微环境的特化和维持起着关键作用,它调控根皮层、内皮层初始细胞及初始胞子细胞的垂周和平周不均等分裂,影响植物根的辐射式生长模式^[5-7]。拟南芥 *shr* 突变体植株根尖分生组织的基本组织子细胞不能发生不对称平周分裂,仅产生一层类似皮层的细胞^[8], *shr* 突变体植株表现出主根生长减弱,侧根数量减少,植株矮小,子叶颜色深暗等一系列表型。过量表达 *SHR* 基因,根尖形态变化显著,基本组织发生大量的平周分裂,产生多个细胞层^[9]。同时, *SHR* 基因是一个功能进化比较保守的基因,目前已在玉米 (*Zea mays* Linn.)^[10]、水稻 (*Oryza sativa* Linn.)^[11]、毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray.)^[12]、辐射松 (*Pinus radiata* D. Don)^[13] 等植物中发现的 *SHR* 家族成员均和根的生长发育息息相关。研究表明: *SHR* 转录功能的行使,通常需要依靠其下游另一个 *GRAS* 家族成员 *SCR*(*SCARECROW*)^[14]。 *SCR* 与 *SHR* 形成 *SCR/SHR* 复合体共同激活下游基因表达, *SCR/SHR* 复合体直接作用于 *CYCD6.1* (*D-type cyclin 6.1*) 蛋白, *CYCD6.1* 是细胞发生平周分裂的标志性蛋白,保证根尖细胞会在早期和晚期分别自发地进行2次平周分裂,产生完整的基本组织^[15-17]。国内外学者对于不同植物 *SHR* 基因的挖掘以及 *SHR* 对根部细胞分裂调控机制的解析一直处于探索之中,本研究在前期已获得2个中山杉 *SHR* 基因 (*ThSHR1*, *ThSHR2*) 的基础上^[18], 新筛选到1个在中山杉406不定根生长期高表达的基因 *ThSHR3*, 而 *ThSHR3* 的生物学功能尚不清楚,拟通过生物信息学手段对其进行系统进化分析,探索其在中山杉不定根发育过程中表达模式,对 *ThSHR3* 蛋白进行亚细胞定位以及互作研究,推测其可能存在的信号通路。以期为中山杉以及落羽杉属植物不定根发育的分子机理研究提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

“中山杉406”的嫩枝扦插试验于2019年7月中旬开展于江苏省中国科学院植物研究所中山杉苗圃内。插穗长度约10~15 cm,扦插基质为珍珠岩和泥炭土,体积比例为1:1,光周期为14 h的光照周期和10 h的暗周期。根据中山杉406插穗基部明显的形态学改变,在4个时间点取样:0 d 皮层

休眠期 (S0), 21 d 愈伤组织形成期 (S1), 35 d 初生根形成期 (S2) 和 56 d 根系生长期 (S3)^[18]。其中,皮层休眠期和愈伤组织形成期的取样部位为插穗基部皮层组织 (0.3 cm 左右), 初生根形成期和根系生长期的取样部位为根系。

RNeasy Plant Mini Kit 及 Plant Genomic DNA Kit 购自 QIAGEN 公司; PrineScript @ RTase 逆转录试剂盒、3'-Full RACE 和 5'-Full RACE 试剂盒、LAtaq 酶、rtaq 酶均购自 TaKaRa 公司; 载体构建使用的 GATEWAY 技术及相关试剂均来自 Invitrogen 公司。

1.2 基因克隆

使用 RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒提取中山杉406根总 RNA, 确保 RNA 浓度为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 并通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。使用 PrineScript @ RTase 逆转录试剂盒合成中山杉406根 cDNA, 根据前期不定根转录组数据, 筛选到 605 bp 的目的基因 *ThSHR3* 的片段 (CL8931.Contig2), 通过 PCR 扩增验证目的基因序列, PCR 扩增体系如下: cDNA 模板 $1.0 \mu\text{L}$, TaKaRa LA Taq ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$, $10 \times \text{LA PCR Buffer (Mg}^{2+} \text{ Free)}$ $5.0 \mu\text{L}$, MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $5.0 \mu\text{L}$, dNTP Mixture (各 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $8.0 \mu\text{L}$, 正向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2.0 \mu\text{L}$, 反向引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2.0 \mu\text{L}$, 加超纯水补至 $50.0 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为: 94°C 3 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 2 min, 35 个循环; 72°C 10 min。进一步参照 TaKaRa 公司 3'和 5'-Full RACE 试剂盒说明进行巢氏 PCR 扩增, 完成 *ThSHR3* 基因全长克隆, 其中, 涉及到的引物参考 (表 1)。将扩增片段序列进行序列比对、拼接, 最终获得了 *ThSHR3* 基因的全长 cDNA 序列。利用 BioXM 软件预测 *ThSHR3* 基因的开放阅读框 (ORF), 进一步通过 PCR 验证。

1.3 生物信息学分析

利用美国国家生物信息中心 (NCBI) 在线 BLAST 软件比对分析 *ThSHR3* 的 DNA 和蛋白质序列。使用在线程序 ExPASy ProtParam 计算蛋白质的理论等电点 (pI)、分子量 (MW) 和氨基酸组成。通过 PROSITE 以及 GORIV 二级结构检测程序分别预测蛋白质的结构域及二级结构。使用 ClustalX2 软件将 *ThSHR3* 的蛋白序列与其他植物已公布的 *SHR* 蛋白序列进行序列多重比对。利用 NLStradamus 程序预测 *ThSHR3* 蛋白是否具有核定位信号。通

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	功能 Function	扩增长度/bp Amplified fragment length
3GSP1	AAGGTGTTCAATCAGAAGAGATTTA	3'-巢氏PCR引物1	1 998
3GSP2	ATTAAC TCGCAGT CATG	3'-巢氏PCR引物2	
5GSP1	TGAACGAATTGCATT	5'-巢氏PCR引物1	1 232
5GSP2	TCAGATGCTTTGTAGTAGTTTGCTATG	5'-巢氏PCR引物2	
ThSHR3-qPCR F	TGGAGGAGAGCTTTT	定量及半定量前引物	147
ThSHR3-qPCR R	CTCGCAGCCGCGCAG	定量及半定量后引物	
APRT-F	TCCACAGTCTTGAATCGCT	内参基因前引物	106
APRT-R	TGACTTGAGCCTCATTTCGCTC	内参基因后引物	
ThSHR3-ORF F	ATGGATAGATTGTTTACCTCCAG	编码阅读框前引物	1 446
ThSHR3-ORF R	CAAGCAAGGCTTCCAGCGGAA	编码阅读框后引物	

过 MEGA 7.0 软件, 选用最大似然法构建系统发育树, 自举检测 1 000 次。

1.4 实时定量及半定量 PCR

以中山杉 406 不定根发育的 4 个时间点 S0~S3 为材料, 根据已验证的 cDNA 序列设计定量引物 (表 1), 以中山杉的 *APRT* 基因为内参基因^[19], 采用半定量 PCR 和荧光定量 PCR 分别对 *ThSHR3* 进行表达分析检测。半定量 PCR 反应体系及程序参照 rtaq 酶说明书 (<https://www.takarabiomed.com.cn/>)。选择 Analitik Jena qTOWER2.2 PCR 系统 (Biometra, 德国) 进行荧光定量 RT-PCR (qPCR)。反应程序设定为: 50℃ 2 min; 95℃ 10 min; 40 个循环: 95℃ 15 s, 60℃ 1 min; 通过从 60℃ 到 95℃ 加热扩增产物, 获得溶解曲线。反应体系共 20 μL, 其中包括 2 μL 稀释后的 cDNA, 10 μL FastStart Universal SYBR Green Master (Rox, 德国), 10 pmol 正向引物, 10 pmol 反向引物以及灭菌去离子水, 每个样品设 3 次技术重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量的分析^[20]。

1.5 载体构建和原生质体瞬时表达

表达的载体构建利用 Gateway Technology (Invitrogen, 美国) 技术, 先将不包含终止密码子的 *ThSHR3* ORF 序列连接到入门载体 pCR8/GW/TOPO 上, 再使用 LR 酶将入门载体连接到包含绿色荧光蛋白 (GFP) 标签的目的载体 p2GWF7 上。同理, 使用相同的方法构建 *ThSHR3* 及 *ThSCR* 的蛋白互作载体, 目的载体为含有黄色荧光蛋白 (YFP) 标签的 pUC-SPYNE、pUC-SPYCE。最终重组

表达载体有: 35S::*ThSHR3*-GFP、*ThSHR3*-YFP^N、*ThSHR3*-YFP^C、*ThSCR*-YFP^N、*ThSCR*-YFP^C。利用 PEG 介导转化法将测序正确的融合表达载体导入杨树叶肉原生质体中^[21]。利用 BX51 荧光显微镜 (Olympus, 日本) 观测样品中荧光表达情况。

2 结果与分析

2.1 *ThSHR3* 基因克隆及生物信息学分析

根据中山杉不定根发育的转录组及蛋白组数据, 利用 RACE 巢式 PCR 扩增, 拼接得到 *ThSHR3* 基因的全长序列。结果表明: *ThSHR3* 基因的 cDNA 全长为 2 019 bp, 包含 1 个 1 446 bp 的开放阅读框 (ORF), 5'端非编码翻译区 (UTR) 长度为 354 bp, 3'端非编码翻译区 (UTR) 长度为 219 bp。 *ThSHR3* 基因编码 482 个氨基酸残基。Ex-pasyProtparma 预测 *ThSHR3* 分子量和等电点分别为 66.082 和 5.17。GOR IV 的分析结果显示: *ThSHR3* 含有 30.03%α 螺旋 (Hh), 15.77% 延伸链 (Ee), 54.19% 的无规则卷曲 (Cc), 不含有 beta 转角 (Tt)。NLStradamus 程序预测 *ThSHR3* 蛋白主要定位在细胞核上。Prosit 分析表明: *ThSHR3* 蛋白具有保守的 GRAS 结构域。

2.2 *ThSHR3* 基因同源性及系统进化分析

将 *ThSHR3* 的蛋白质序列与 TAIR 中的拟南芥 *AtSHR*(At4g37650.1) 蛋白序列和杨树 *PeSHR1*、*PeSHR2*、*PeSHR3* 蛋白序列^[22], 中山杉 *ThSHR1* (MF045148)、*ThSHR2* (MF045149) 蛋白序列进行多重序列比对。结果表明: *ThSHR* 蛋白的

N 端不保守, 而 C 端相对比较保守, 和其他物种的 SHR 蛋白一样, *ThSHR* 蛋白包括 GRAS 家族成

员特有的 LHRI、VHIID、LHRII、PFYRE 和 SAW 基础序列 (图 1)。

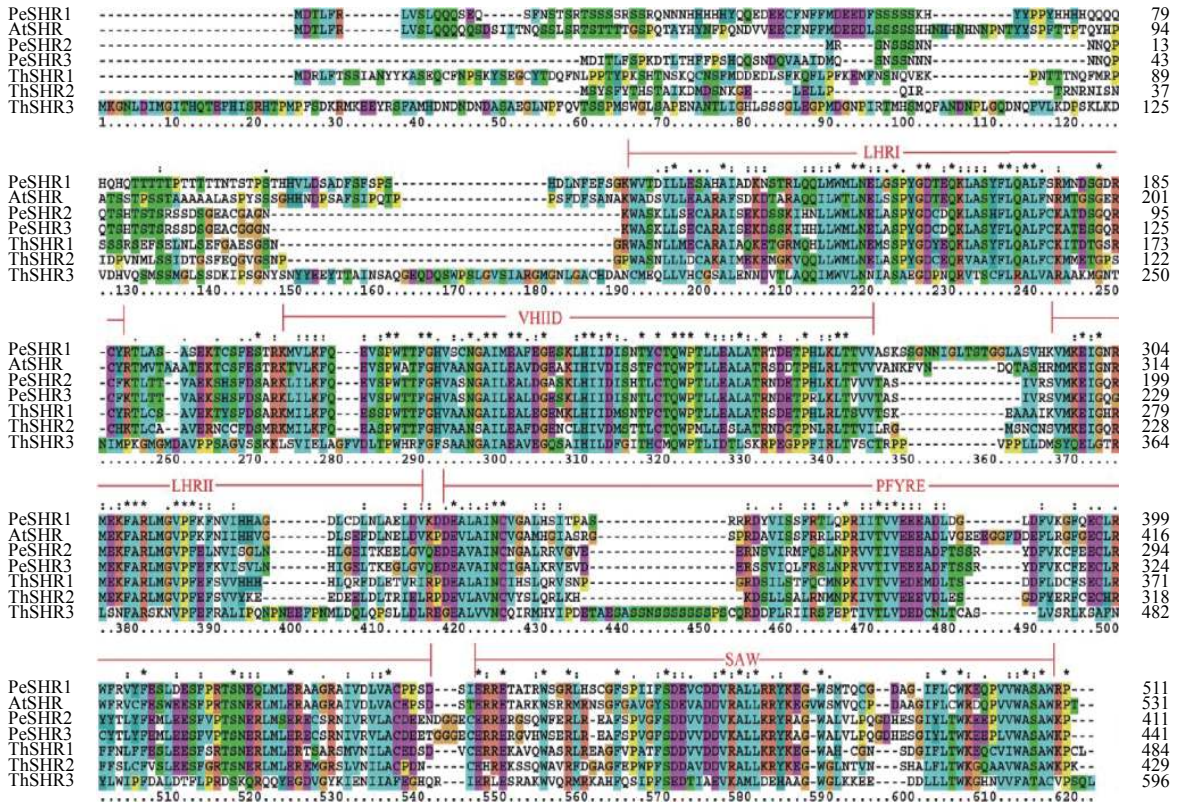


图 1 *ThSHR3* 蛋白序列的同源性比对结果

Fig. 1 Homologous sequence alignment of *ThSHR3* protein

将 *ThSHR3* 的氨基酸序列与其他物种中已公布的 45 个较典型的 GRAS 蛋白的氨基酸序列进行系统进化树分析。结果表明: GRAS 蛋白家族可划分为具有不同的特征的 SHR、DELLA、PAT1、SCL9、SCR、LAS/SCL18、SCL4/7、HAM 的 8 个分支^[9] (图 2)。 *ThSHR3* 被划分到 SHR 分支, 和其他物种的 SHR 蛋白聚为一类, *ThSHR3* 和中山杉 *ThSHR1* 亲缘关系最近, 同源性均为 81%, 和松科植物 *PmSHR* (QCU71495.1) 及辐射松 *PrSHR* (ABW20412.1) 的亲缘关系也较近 (图 2)。

2.3 *ThSHR3* 基因表达分析

本研究利用半定量 PCR 和荧光定量 PCR 方法, 检测 *ThSHR3* 基因在中山杉 406 不定根皮层休眠期、愈伤组织形成期、初生根形成期和根系生长期 4 个时期的动态表达情况, 内参基因均为 *APRT* 基因。结果表明: *ThSHR3* 基因在中山杉不定根 4 个不同发育阶段均有表达。 *ThSHR3* 表达呈现持续上升的表达模式, 在根系生长期表达量最

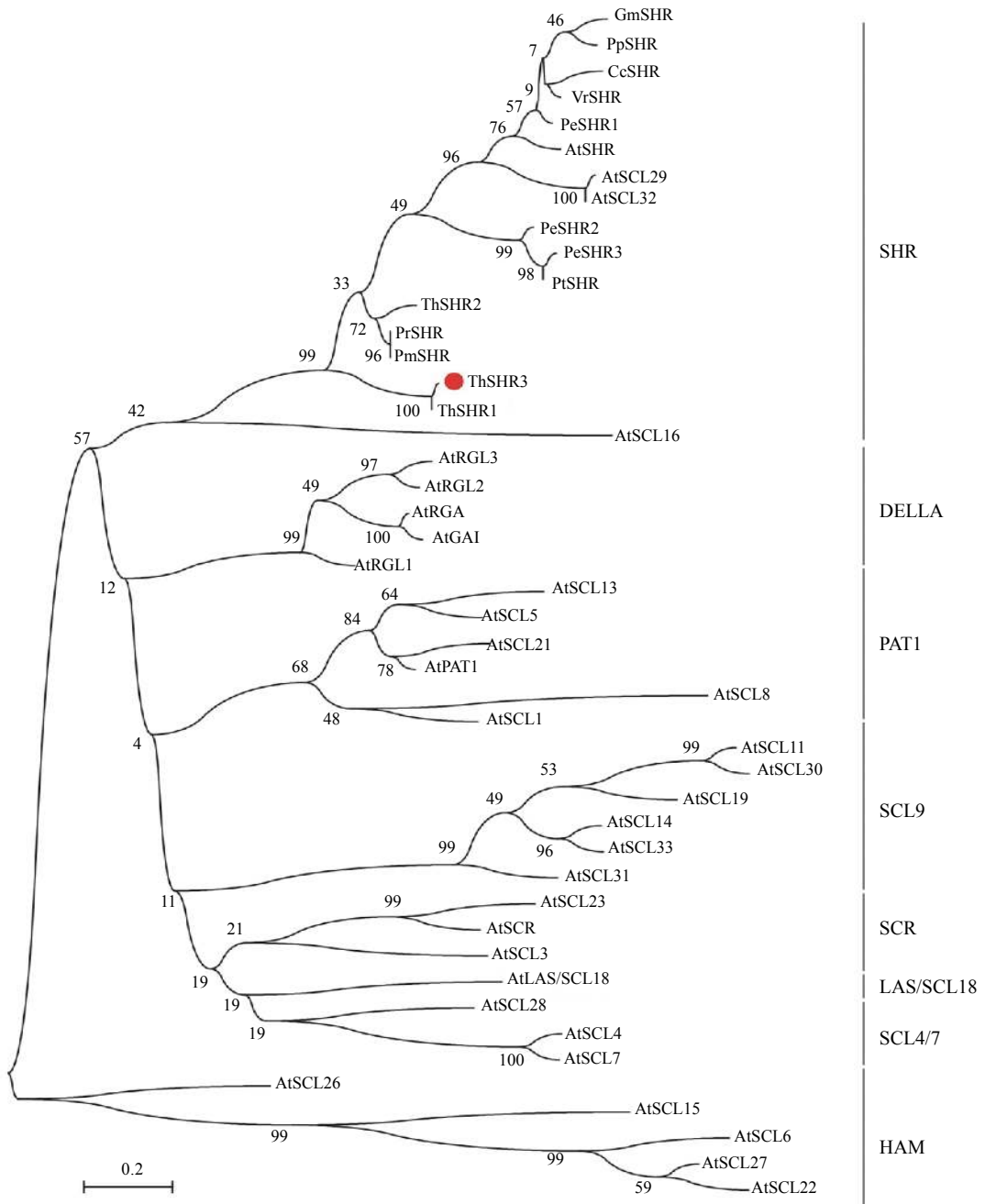
高, 在皮层休眠期表达量最低, 最高表达量是最低表达量的 28.4 倍, 且半定量 PCR 和荧光定量 PCR 结果基本一致 (图 3)。

2.4 *ThSHR3* 蛋白的亚细胞定位

本研究以绿色荧光蛋白作为报告基因, 在前期已经成熟的杨树叶肉原生质体瞬时表达体系的基础上^[21], 将中山杉重组融合表达载体导入杨树叶肉原生质体中。经过 18 h, 23℃ 暗培养, 观察可得 GFP 标签在 488 nm 蓝光激发下产生了 509 nm 的绿色荧光, 阳性对照 35S::GFP 在细胞核、细胞质、细胞膜等区域中都产生了明显的绿色荧光信号, 35S::*ThSHR3*-GFP 融合蛋白仅在细胞核区域产生绿色荧光, 表明中山杉 *ThSHR3* 基因所编码的蛋白质定位于细胞核, 这和前期在线程序预测结果一致, 也符合其作为转录因子的特性 (图 4)。

2.5 *ThSHR3* 与 *ThSCR* 的蛋白互作

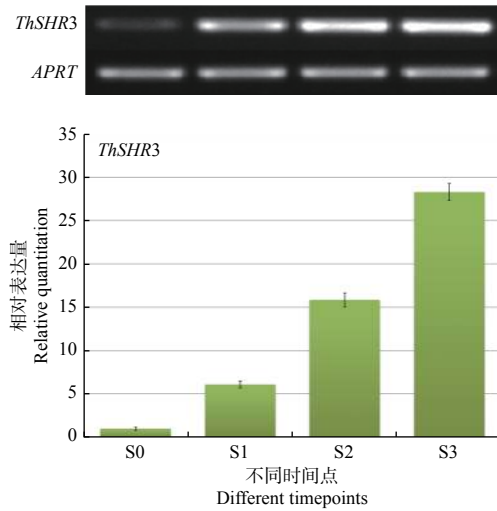
双分子荧光互补 (BiFC) 是目前用于检测细胞体内蛋白质互作的一项成熟技术, 本研究利用



注 Notes: *Arabidopsis thaliana*(拟南芥): AtSCL1(At1g21450.1), AtSCL3(At1g50420.1), AtSCL4(At5g66770.1), AtSCL5(At1g50600.1), AtSCL6(At4g00150.1), AtSCL7(At3g50650.1), AtSCL8(At5g52510.1), AtSCL11(At5g59450.1), AtSCL13(At4g17230.1), AtSCL14(At1g07530.1), AtSCL15(At4g36710.1), AtSCL16(At5g67411.1), AtSCL21(At2g04890.1), AtSCL22(At3g60630.1), AtSCL23(At5g41920.1), AtSCL26(At4g08250.1), AtSCL27(At2g45160.1), AtSCL28(At1g63100.1), AtSCL29(At3g13840.1), AtSCL30(At3g46600.1), AtSCL31(At1g07520.1), AtSCL32(At3g49950.1), AtSCL33(At2g29060.1), AtSHR(At4g37650.1), AtSCR(At3g54220.1), AtRGL3(At5g17490.1), AtRGL2(At3g03450.1), AtRGL1(At1g66350.1), AtRGA(At2g01570.1), AtPAT1(At5g48150.1), AtLAS/SCL18(At1g55580.1), AtGAI(At1g14920.1); *Glycine max*(大豆): GmSHR(XP_003538789.1); *Prunus persica*(桃树): PpSHR(XP_007205058.1); *Capsicum chinense*(黄灯笼辣椒): CcSHR(PHU27341.1); *Vitis riparia*(葡萄): VrSHR(XP_034691976.1); *Populus × euramericana*(欧美杨): PeSHR1, PeSHR2, PeSHR3; *Pinus massoniana*(马尾松): PmSHR(QCU71495.1); *Populus trichocarpa*(毛果杨): PtSHR(XP_006372828.1); *Pinus radiata*(辐射松): PrSHR(ABW20412.1); *Taxodium hybrid 'zhongshanshan'*(中山杉): ThSHR1(MF045148), ThSHR2(MF045149)

图 2 基于 ThSHR3 蛋白序列构建的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on ThSHR3 protein sequence



注: 不定根皮层休眠期 (S0), 愈伤组织形成期 (S1), 初生根形成期 (S2), 根系生长期 (S3)

Notes: the control time point (S0), the initial formation of callus (S1), the formation of primary root (S2) and lateral root systems (S3).

图3 *ThSHR3* 基因在中山杉根不同发育时间点的表达模式

Fig. 3 Expression pattern of *ThSHR3* gene in adventitious root formation in *Taxodium* hybrid 'Zhongshanshan 406' at different developmental time points

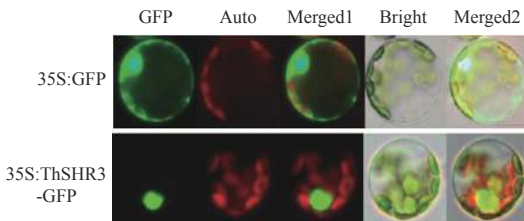


图4 *ThSHR3* 在杨树叶肉原生质体内的亚细胞定位
Fig. 4 Subcellular-localization of *ThSHR3* in *Populus* mesophyll protoplasts

BiFC 技术检测中山杉的 *ThSHR3* 与 *ThSCR* 蛋白的互作情况, 前期已经证明 *ThSHR3* 及 *ThSCR* 亚细胞定位结果均定位在细胞核^[23]。3 次重复性实验结果显示: *ThSHR3*-YFP^N 与 *ThSCR*-YFP^C、*ThSHR3*-YFP^C 与 *ThSCR*-YFP^N 这 2 个组合的 YFP 荧光蛋白重新恢复活性, 在细胞核处观察到清晰的荧光信号, 2 组对照组合均无荧光信号产生 (图 5), 表明 *ThSHR3* 与 *ThSCR* 在细胞核发生了互作。

3 讨论

根系是植物长期适应陆地生境而形成的重要器官, 根系从土壤中吸收水分和矿质营养, 并对植物起机械支撑作用^[24]。2000 年, Helariutta 等首次在拟南芥根中发现了转录因子 *SHR*^[8], 证明其参与根

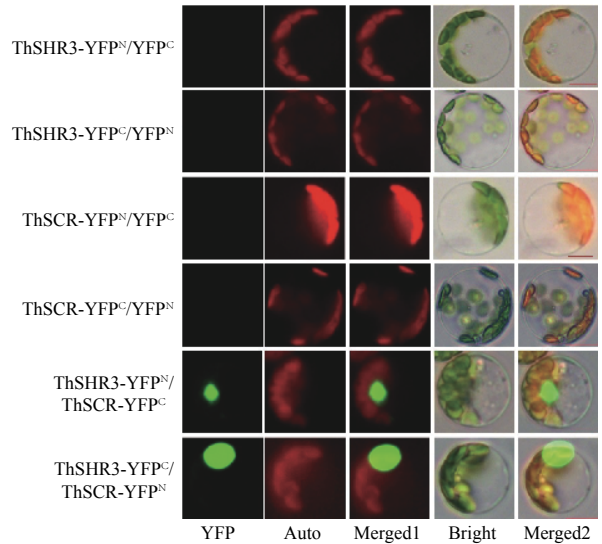


图5 *ThSHR3* 和 *ThSCR* 蛋白互作

Fig. 5 *ThSHR3* and *ThSCR* interaction by BiFC

尖辐射形态建成, 在基本组织细胞平周分裂形成过程中发挥着的重要作用, 进而其他物种的 *SHR* 基因陆续被挖掘研究^[25]。本研究成功克隆获得了中山杉 406 *ThSHR3* 基因全长。经过氨基酸序列比对和系统进化分析发现, *ThSHR3* 和中山杉 *ThSHR1*、*ThSHR2* 高度同源, 和其他物种的 *SHR* 基因一起划分到 *SHR* 分支, 且具有植物 GRAS 蛋白家族特有的结构域, 因而推测 *ThSHR3* 可能参与中山杉 406 不定根的发育。

木本模式植物杨树的 *SHR* 分支基因包含 3 个成员: *PeSHR1*、*PeSHR2*、*PeSHR3*, 其表达存在着 2 种模式, *PeSHR1*、*PeSHR2* 基因表达量在根的发育过程中呈逐渐上升趋势, 根发育到 4 周时表达量最高, 而 *PeSHR3* 基因在根中的表达模式为先上升后下降^[22]。中山杉 3 个 *SHR* 基因的表达特性在根的不定根不同发育阶段是否也存在着差异? 研究表明: *ThSHR1* 呈逐渐上升的表达趋势, 在根的生长期表达量最高, 而 *ThSHR2* 表达量先上升再下降, 在初生根形成期表达量最高^[23], 中山杉 *ThSHR3* 和 *ThSHR1* 的表达趋势基本一致, 且聚类分析发现二者的同源性较高, 推测二者的功能可能更相近。*SHR* 基因家族成员不同的表达模式, 暗示着它们可能在根系发育过程中行使着不同的生物学功能, 但也不排除它们之间存在功能冗余性, 有待通过遗传转化等方法进行深入探究。

染色体免疫共沉淀及酵母双杂交实验表明, 拟南芥中 *SCR* 与 *SHR* 互作区域在 *LHRI-VHIID-LHRII*

基序之间^[15]。水稻的 SHR 与 SCR 蛋白也存在着互作,然而水稻的 2 个 *SHR* 基因 *OsSHR1* 和 *OsSHR2*, 仅发现 *OsSHR1* 可与 *OsSCR* 发生互作^[11]。目前,关于 SHR 和 SCR 及其互作基因调控根部细胞不均等分裂的研究,主要集中在 SHR/SCR/RBR/CYCD6-1-CDK 这信号通路中。SHR/SCR/RBR/CYCD6-1-CDK 是一条双稳信号回路,细胞周期蛋白 CYCD6 及其依赖性激酶 1-CDK 共同磷酸化 RBR (RING Between RING) 蛋白,进而影响 SCR 蛋白活力,同时 CYCD6 转录活性又受到 SHR-SCR 复合物共同的转录调控,此通路中 SHR-SCR 复合物的活性适中,才能保证根部细胞不均等分裂有序完成^[15]。胥猛等利用 BiFC 技术对杨树 SHR/SCR/RBR/CYCD6-1-CDK 信号通路基因的互作进行研究,发现仅 PeSHR1 与 PeSCR、PeSHR1 与 PeCYCD6、PeSCR 与 PeCYCD6 三个组合发生了互作^[22, 26]。中山杉 SHR-SCR 信号通路的研究尚未开展,本研究对中山杉中新挖掘出的 ThSHR3 进行了蛋白互作研究, BiFC 实验发现中山杉 ThSHR3 可以和 ThSCR 发生明显互作,推测 ThSHR3 可能和 ThSCR 存在于同一信号通路中,通过形成 ThSHR3/ThSCR 复合体来行使转录功能;而 ThSHR 分支上的其它成员之间以及 ThSHR1、ThSHR2 与 ThSCR 的互作情况仍然未知,具体的作用机制仍需通过分子生物学手段进一步深入解析。

4 结论

本研究从中山杉 406 扦插苗不定根中克隆获得了 *ThSHR3* 基因,该基因编码的蛋白具有 GRAS 家族成员特有的保守结构域,且从属于 SHR 亚家族。*ThSHR3* 基因在中山杉皮层休眠期、愈伤组织形成期、初生根形成期、根系生长期 4 个时期中呈逐渐上升的表达趋势。双分子荧光互补实验显示:ThSHR3 蛋白和 ThSCR 蛋白存在着明显互作,而 SHR-SCR 信号通路在植物根系发育过程中发挥着关键调控作用,表明 ThSHR3 为中山杉不定根发育相关的重要转录因子,为进一步探究中山杉以及落羽杉属树木不定根发育的分子机理提供了理论基础。

参考文献:

[1] 殷云龙, 於朝广. 中山杉-落羽杉属树木杂交选育[M]. 北京: 中国

林业出版社, 2005.

- [2] 徐建华, 胡李娟, 殷云龙等. 不同栽培基质对4个杂交墨西哥落羽杉无性系扦插苗的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2013, 22 (2): 114-116.
- [3] 王紫阳, 徐建华, 李火根, 等. 中山杉优良无性系302、118、405扦插生根能力的比较[J]. 浙江林业大学学报, 2015, 32 (4): 648-654.
- [4] 韩路弯, 华建峰, 刘江, 等. 不同扦插基质和扦插时间对中山杉118插条生根的影响[J]. 亚热带植物科学, 2015, 44 (2): 150-153.
- [5] Dinneny J R, Benfey P N. Plant stem cell niches: Standing the test of time[J]. Cell, 2008, 132(4): 553-557.
- [6] Bennett T, Scheres B. Root development-two meristems for the price of one?[J]. Current topics in developmental biology, 2010, 91: 67-102.
- [7] Cui H, Kong D, Liu X, et al. SCARECROW, SCR-LIKE 23 and SHORT-ROOT control bundle sheath cell fate and function in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 2014, 78(2): 319-327.
- [8] Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, et al. The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling[J]. Cell, 2000, 101(5): 555-567.
- [9] 高潜, 刘玉瑛, 费一楠, 等. 拟南芥根的辐射形态相关基因 *SHORT-ROOT* 研究进展[J]. 植物学报, 2008, 25 (3): 363-372.
- [10] Lim J, Jung J W, Lim C E, et al. Conservation and diversification of SCARECROW in *Maize*[J]. Plant molecular biology, 2005, 59(4): 619-630.
- [11] Cui H, Levesque M P, Vernoux T, et al. An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants[J]. Science, 2007, 316(5823): 421-425.
- [12] Wang J, Andersson-Gunneras S, Gaboreanu I, et al. Reduced expression of the *SHORT-ROOT* gene increases the rates of growth and development in hybrid poplar and *Arabidopsis*[J]. PLoS one, 2011, 6(12): e28878.
- [13] Solé A, Sánchez C, Vielba J M, et al. Characterization and expression of a *Pinus radiata* putative ortholog to the *Arabidopsis* *SHORT-ROOT* gene[J]. Tree physiology, 2008, 28: 1629-1639.
- [14] Yu Q, Li P, Liang N, et al. Cell-Fate Specification in *Arabidopsis* roots requires coordinative action of lineage instruction and positional reprogramming[J]. Plant Physiology, 2017, 175(2): 816-827.
- [15] Gong X, Flores-Vergara M A, Hong J H, et al. SEUSS integrates gibberellin signaling with transcriptional inputs from the SHR-SCR-SCL3 module to regulate middle cortex formation in the *Arabidopsis* root[J]. Plant Physiology, 2016, 170(3): 1675-1683.
- [16] Bao F, Azhakanandam S, Franks R G. SEUSS and SEUSS-LIKE transcriptional adaptors regulate floral and embryonic development in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2010, 152(2): 821-836.
- [17] Azhakanandam S, Nole-Wilson S, Bao F, et al. SEUSS and AINTEGUMENTA mediate patterning and ovule initiation during gynoecium medial domain development[J]. Plant Physiology, 2008, 146(3):

1165-1181.

- [18] Wang Z, Hua J, Yin Y, *et al.* An integrated transcriptome and proteome analysis reveals putative regulators of adventitious root formation in *Taxodium* 'Zhongshanshan' [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(5): 1225-1246.
- [19] Wang Z, Gu C, Xuan L, *et al.* Identification of suitable reference genes in *Taxodium* 'Zhongshanshan' under abiotic stresses [J]. Trees-Structure and Function, 2017, 31(8/9): 1-12.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-naly} Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Tan B, Xu M, Chen Y, *et al.* Transient expression for functional gene analysis using *Populus* protoplasts [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2013, 114: 11-18.
- [22] Xuan L, Xu M, Chen C, *et al.* Identification and characterization of three *PeSHRs* and one *PeSCR* involved in adventitious root development of *Populus* [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 117(2): 253-264.
- [23] Wang Z, Yin Y, Hua J, *et al.* Cloning and characterization of *ThSHRs* and *ThSCR* transcription factors in *Taxodium* hybrid 'Zhongshanshan 406' [J]. Genes, 2017, 8(7): 185-198.
- [24] 胥猛. 杨树不定根发育的基因表达调控研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- [25] Sozzani R, Cui H, Moreno-Risueno M A, *et al.* Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by *SHORTROOT* links patterning and growth [J]. NATURE, 2010, 466(7302): 128-132.
- [26] Xu M, Liu S, Xuan L, *et al.* Isolation and characterization of a poplar D-type cyclin gene associated with the *SHORT-ROOT/SCARECROW* network [J]. Trees-Structure and Function, 2016, 30(1): 255-263.

Cloning, Expression and Protein Interaction of *ThSHR3* Genes in *Taxodium* hybrid 'Zhongshanshan406'

XUAN Lei, WANG Zhi-quan, YIN Yun-long, HUA Jian-feng

(Jiangsu Engineering Research Center for *Taxodium* Rich. Germplasm Innovation and Propagation; Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] To obtain the *SHORT-ROOT 3* gene (*ThSHR3*) from *Taxodium* hybrid 'Zhongshanshan 406' by cloning and to identify and analyze its characteristics and related functions based on proteome and transcriptome data of adventitious roots of *Taxodium* hybrid 'Zhongshanshan406'. [Method] The full length of *ThSHR3* gene was cloned by RACE technology and the bioinformatics characteristics were analyzed by bioinformatics software. Semi-quantitative PCR and real-time quantitative PCR were used to detect the expression characteristics of *ThSHR3*. The subcellular localization of *ThSHR3* protein was confirmed by transient expression of protoplasts, and the protein interaction of *ThSHR3* was verified by bimolecular fluorescence complementation (BiFC) technique. [Result] The authors assembled a full-length of *ThSHR3* gene, which consists of 2 019 bp nucleotide sequence, containing a 1 446 bp open reading frame (ORF) encoding 482 amino acid proteins. *ThSHR3* protein has conserved GRAS domains in the C-terminal, such as LHRI, VHIID, LHR II, PFYRE and SAW. Phylogenetic analysis showed that *ThSHR3* belongs to the SHR subfamily. *ThSHR3* gene showed a gradually increased expression pattern in the development of adventitious root. Transient expression analysis of protoplasts showed that *ThSHR3* protein was located in the nucleus. Further BiFC experiment revealed that *ThSHR3* protein and *ThSCR* protein which also belongs to GRAS protein family can interact with each other in nucleus. [Conclusion] This study indicates that *ThSHR3* plays an important role in regulating the development of adventitious roots of *Taxodium* hybrid 'Zhongshanshan 406'.

Keywords: *Taxodium* hybrid 'Zhongshanshan 406'; SHR; gene cloning; gene expression; protein interaction

(责任编辑: 张 研)