

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2021.005.001

基于转录水平解析尾巨桉径向生长对 种植密度的响应

陈沫^{1,2}, 何沙娥^{1*}, 陈少雄¹, 欧阳林男¹, 张程¹, 张维耀¹

(1. 国家林业和草原局桉树研究开发中心, 广东 湛江 524022; 2. 南京林业大学, 江苏 南京 210037)

摘要: [目的] 挖掘和鉴定桉树中响应种植密度的木质部生成关键基因, 阐释种植密度影响林木径向生长的分子机制。[方法] 通过 PacBio Iso-Seq 和 RNA-Seq 联合分析, 鉴定了在高、低 2 个种植密度水平下尾巨桉 DH32-29 主茎的差异表达转录本并利用 qRT-PCR 进行组织表达分析。[结果] 分别获得 45 490 条在主茎中表达的非冗余全长转录本和 443 条在木质部中差异表达的转录本, 并鉴定出 60 条差异表达的调控因子编码基因。在低种植密度条件下, 植株直径生长量显著增加; 参与细胞分裂调控的 *PXL2* 及其互作基因 *CUL1* 和 *T15D22.7*、参与次生壁调控的 *MYB46*、*C3H14* 同源基因和其下游基因 *CesAs*、*LACs* 均上调表达, 这些基因很可能是种植密度影响主茎径向生长过程中负责调控细胞分裂和次生壁合成的重要成员; 参与筛管发育的 *NAC86* 同源基因及参与形成层发育和木质部分化的抑制子 *PTL* 同源基因也上调表达, 它们可能促进木质部生成, 这与草本植物中的功能不同。组织表达分析结果显示: *PXL2*、*CUL1*、*T15D22.7*、*NAC86* 和 *PTL* 在韧皮部和木质部中优势表达; *MYB46*、*C3H14*、*CesA* 和 *LAC17* 在木质部中优势表达。[结论] 本研究鉴定了一批参与种植密度响应的木质部生成候选基因, 构建了种植密度影响尾巨桉径向生长的分子调控网络模型, 研究结果为深入解析种植密度影响林木径向生长的分子机制奠定基础。

关键词: 种植密度; 尾巨桉; 转录组; 径向生长; 调控因子

中图分类号: S792.39

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2021)05-0001-12

合理的林分密度能够显著促进林木的径向生长^[1-2], 从而提高木材产量, 解析种植密度促进林木径向生长的内在机制意义重大。林木的径向生长(即次生木质部生成)来源于维管形成层的活动。维管形成层细胞向外分化产生次生韧皮部, 向内分化产生次生木质部, 其中, 次生木质部细胞不断积累, 使植株径向增粗^[3]。由维管形成层分化产生成熟的次生木质部细胞需要经历木质部母细胞分化和分裂、木质部细胞增大、次生壁加厚、细胞程序化凋亡和心材形成多个阶段^[4], 各个阶段在分子水平上均受到一大批基因的调控。因此, 研究木质部在不同种植密度下的基因表达模式, 挖掘和鉴定响应种植密度的木质部生成关键基因并解析其作用机制

是研究种植密度影响林木径向生长内在机制的重要内容。

以往以模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.) 和杨属 (*Populus*) 为研究对象, 分离鉴定了一些参与木质部生成各个阶段的关键调控基因, 在木质部生成方面取得了重要进展。诸多研究表明, 调控因子如受体激酶和转录因子等在木质部生成过程中发挥重要的调控作用, 如 *PTL* (*PETAL LOSS*, 花瓣缺失) 转录因子作为抑制子参与调控拟南芥根系发育过程中的形成层细胞分裂和木质部细胞分化活动^[5]; 类受体激酶 *PXY* 和其家族成员 *PXL1*、*PXL2* 参与调控拟南芥维管组织的细胞分裂活动^[6-7]; 类受体激酶 *FEI* 和 *SHOU* 参与次生壁物质

收稿日期: 2020-12-05 修回日期: 2020-07-08

基金项目: “十三五”国家重点研发计划课题 (2016YFD0600502); 广东省林业科技创新项目 (2019KJXCX005)

* 通讯作者: 何沙娥 (1983-), 女, 博士, 主要从事人工林定向培育技术研究。E-mail: cerchese@caf.ac.cn

合成, *fei* 突变体纤维素合成减少, 而 SHOU 能够恢复 *fei* 突变体表型^[8-9]。次生壁合成也需要一些转录因子参与, Chen 等^[10] 在毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) 中绘制了一个 4 层级的细胞壁合成转录调控网络, 其中包含 17 个转录因子和 27 个细胞壁成分合成基因, 它们协同调控木质部生成; 最近在杨属、松属 (*Pinus*) 等树种中又相继证实了多个 NAC 和 MYB 家族成员参与木材细胞壁物质合成过程^[11-13]。由此可见, 次生木质部生成的分子机制十分复杂, 仍然有许多未知亟待解析。

桉属 (*Eucalyptus*) 与杨属为世界公认的速生人工林树种, 但二者木材的生物量和质量存在明显差异。这 2 个树种在木质部生成调控机制上可能存在差异, 但目前关于桉属植物木质部生成相关重要基因的解析及其调控机制的研究相对较少^[14-15], 同时, 关于种植密度影响径向生长的分子基础研究尚未见报道。因此, 本研究以不同种植密度下尾巨桉 (*Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* W.Hill ex Maiden) 的主茎为试验材料, 联合 PacBio Iso-Seq 和 RNA-Seq 转录组技术, 通过对尾巨桉木质部差异表达转录本 (DETs) 的表达模式展开分析, 挖掘和鉴定桉树中响应种植密度的木质部生成关键基因, 以期科学阐明种植密度影响林木径向

生长的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验地位于广东省湛江市南方国家级林木种苗示范基地内 (111°38' E, 21°30' N)。试验材料为长势均一、主茎通直、无病虫害的尾巨桉 DH32-29 无性系组织培育苗。2019 年 7 月 14 日, 将幼苗移植至高 0.5 m 直径 0.3 m 的种植袋中, 并按照 10 株·m⁻² 高种植密度 (株行距 0.3 m × 0.3 m) 和 5 株·m⁻² 低种植密度 (株行距 0.6 m × 0.6 m) 移放至长 × 宽 × 高为 5.0 m × 4.5 m × 0.5 m 的样地内, 每个处理设置 3 个重复, 共计 6 个样地。在幼苗生长过程中, 水分和营养充分供应且保持一致。苗木种植后定期测定生长性状, 于直径及其增长率表现出显著差异的时期进行取样 (2019 年 10 月 15 日) (表 1)。每个样地选择 1 株平均木, 取距离地面 10 cm 处主茎的木质部、韧皮部, 共计 12 个样本。液氮冷冻后, 带回试验室置于 -80℃ 的超低温冰箱保存备用。样品命名为 H-X1~3、L-X1~3、H-P1~3、L-P1~3, 其中, H 为高种植密度, L 为低种植密度, X 表示木质部, P 表示韧皮部, 数字 1~3 代表生物学重复。

表 1 种植密度对尾巨桉幼苗生长性状的影响

Table 1 Effect of planting density on growth traits for seedlings of *E. urophylla* × *E. grandis*

处理 Treatment	平均直径/mm Average diameter	直径生长量/mm Diameter increment	平均株高/cm Average height	株高生长量/cm Height increment
低种植密度 Low planting density	6.84 ± 0.19 a	2.36 ± 0.28 a	65.72 ± 2.64 a	18.80 ± 2.51 a
高种植密度 High planting density	5.41 ± 0.20 b	1.41 ± 0.15 b	58.53 ± 2.21 a	13.97 ± 2.92 a

注: 不同小写字母表示不同种植密度间的生长性状具有显著性差异 (P=0.01)。

Note: The different letters indicate growth traits with significant differences in different planting densities (P=0.01).

1.2 转录组测序及结果分析

使用植物 RNA 提取试剂盒 DP130508 (天根生物公司) 分别提取 12 个样本的 RNA, 等量混合后使用 SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成 mRNA 的全长 cDNA, 通过 PacBio 平台进行全长转录组测序 (百迈客公司); 使用 CD-HIT 软件^[16] 去除转录本中的冗余序列; 使用 BLAST 软件 (version 2.2.26)^[17] 将得到非冗余转录本序列和 NR、eggNOG、Pfam、GO、Swissprot、KOG、COG、KEGG 数据库比对进行转录本功能注释; 使用 iTAK 软件^[18] 进行调控因子预测。

对 12 个样本的 RNA 分别进行 cDNA 合成和文库构建, 委托百迈客公司进行 Illumina 二代测序。使用 RSEM^[19] 软件, 通过比对到三代转录本上的位置信息, 对转录本的表达水平进行定量, 采用 FPKM (Fragments Per Kb of transcript per Million fragments mapped) 作为衡量指标。

1.3 DETs 筛选及分析

使用 DESeq2^[20] 对样本 H-X1、H-X2、H-X3 和 L-X1、L-X2、L-X3 进行分析, 获得 2 个种植密度间 DETs。筛选标准为差异倍数 (Fold Change) ≥ 2 且错误发现率 (FDR) < 0.01; 使用百迈客云平

台热图绘制工具绘制 DETs 热图,每个表达量的数值均取以 10 为底数的对数 (Log_{10})^[21];使用 STRING 数据库^[22]对 DETs 构建蛋白互作网络。

1.4 DETs 实时荧光定量 PCR 验证

以转录组试验中 2 个种植密度下尾巨桉幼苗的木质部 RNA 为模板,使用 TSK302S RT6 cDNA Synthesis Kit Ver 2 (擎科生物公司)合成 cDNA 模板,从 443 个 DETs 中随机选取 9 个 DETs,进行 qRT-PCR 验证转录组测序结果的准确性;选择 9 个 DETs 进行组织表达分析,材料为尾巨桉幼苗

的叶片、韧皮部、第 2 节间木质部(木质部 2)和第 7 节间木质部(木质部 7)4 个部位, RNA 的提取采用植物 RNA 提取试剂盒 V1.5(百菲特生物公司)。利用 Primer 5.0 设计 qRT-PCR 引物,以 arp4(Actin-related protein 4)编码基因作为内参,引物见表 2。使用 $2 \times \text{T5 Fast qPCR Mix(SYBR Green I)}$ 荧光定量试剂盒(擎科生物公司)进行荧光定量检测。每个样品设置 4 个技术重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。使用 SPSS 25.0 处理数据,使用 Excel 2016 软件绘图,以 $P < 0.01$ 表示差异显著。

表 2 qRT-PCR 引物序列
Table 2 Primers for qRT-PCR

序号 Number	转录本编号 Transcripts ID	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
1	MIX-PB_transcript_46917	GGAGATGAAGAATGGCGTGC	CAGCGGAAGAACTCGCATAC
2	MIX-PB_transcript_39150	GGGACTAAAATTATCGGATTACGGT	GCATAGTCTGTTGATGTTGGTAGCA
3	MIX-PB_transcript_72449	GTTCTGGTCTCCGACAGTT	AGGCAAGATACAGCACCCCTG
4	MIX-PB_transcript_15209	CTCTGAAATCGGTGACTTCTCTC	AAGCATCTTTGCCACCCAAC
5	MIX-PB_transcript_17152	TCGTGGATGCGTTGCTTACT	GGGCTCTCGGGTTCCTAATG
6	MIX-PB_transcript_61822	CAAACGAGTGGGAGCAAGGA	CGGATCTCAATGCCATGCTG
7	MIX-PB_transcript_39624	TCGAGCACGCATTTTCTGTTT	GGGTCGCAGGTGGTTCTATT
8	MIX-PB_transcript_6405	GTTGGATTGGGTCTGTCTCG	GAGACTAGACACACCGGACAG
9	MIX-PB_transcript_6089	CCTTCGCTAAGAACAATCCACG	AGCTTGCGGGTACCATGTCATA
10	MIX-PB_transcript_67597	CGACCAGATTCCAGGAGAGC	GCCAGATCGAGACACCTTAAACT
11	MIX-PB_transcript_18228	GCTTTCTCCCCACAAGAGGA	TCGTGTTTGGCGAGTGICTA
12	MIX-PB_transcript_51497	GCCACCAAAGGACCGGAATA	ACTTCTCTGGCACTCACCG
13	MIX-PB_transcript_15184	GGCGGGAAAAGAAAAGCACG	GCGAAATCAGAGACGCTCAC
14	MIX-PB_transcript_70069	CCTGATGATACGGGCTTCGT	ATGATCCGTCCTCTTGCTGT
15	MIX-PB_transcript_73425	AGCTGGAATGTTGTAGTCGCT	CTCAAGGTCCACATCTGCCAA
16	MIX-PB_transcript_12050	GTTTCTGGCCGATAACCCA	AGGAGGAGGGGTCAACACTT
17	MIX-PB_transcript_52911	GGTCATGGAGTGTGTAAGC	TTCCCACGCCATTGTAAGAGA
18	MIX-PB_transcript_30100	TGCTGATGCTTGACAGACAG	AAGAAGCACCCACAATCCAC
19	arp4	GGAATTGTCGCGGATTGGGA	GCCTTTTCTCGTTGCTGCTG

2 结果与分析

2.1 转录组测序统计

对高、低 2 个种植密度下尾巨桉主茎木质部和韧皮部进行 Pacbio 全长转录组测序,共获得 247 536 条环形一致序列(CCS),其中,209 654 条为全

长非嵌合序列;对全长非嵌合序列进行聚类分析,获得 81 317 条一致性序列;进一步对一致性序列进行校正,最终获得高质量转录本(准确度 > 99%) 79 965 条,低质量转录本 1 281 条,高质量转录本达到 98% 以上;经 CD-HIT 去冗余后,获得非冗余转录本序列 45 490 条(表 3)。

表3 PacBio Iso-Seq 测序数据评估统计表

Table 3 Statistical table of PacBio Iso-Seq data evaluation

分类 Classification	统计 Count
CCS数量 Number of CCS	247 536
全长非嵌合序列数量 Number of full-length non-chimeric reads	209 654
一致性序列数量 Number of consensus isoforms	81 317
高质量转录本数量 Number of polished high-quality isoforms	79 965
低质量转录本数量 Number of polished low-quality isoforms	1 281
高质量转录本所占比例 Percent of polished high-quality isoforms/%	98.34
非冗余转录本数 Number of non-redundant transcripts	45 490

对高、低两个种植密度下尾巨桉主茎木质部进行 RNA-Seq 测序，共获得 130 292 914 条 150 bp

双端 Reads。6 个样本中，测序获得最多的 Clean Reads 为 23 322 440 条，最少为 19 998 315 条；获得 Clean Data 碱基数最多为 6 988 132 460 bp，最少为 5 990 895 036 bp；GC 含量为 50.30%~51.05%， $\geq Q30$ (Clean Data 质量值 ≥ 30 的碱基所占的百分比) 为 93.88%~94.41% (表4)，GC 含量和 $\geq Q30$ 均值分别为 50.60%、94.19%。

2.2 不同种植密度下尾巨桉主茎转录组分析

将三代转录组测序获得的 45 490 个非冗余转录本与 NR、eggNOG、Pfam、GO、Swissprot、KOG、COG、KEGG 数据库比对并进行功能注释，有 44 888 条转录本至少比对到一个数据库中，注释率达 98.68% (表5)，其中，NR 数据库注释率达 98.47%，eggNOG、Pfam、Swissprot、GO、KOG 数据库注释到的转录本数量均超过 50%，KEGG 数据库注释到的转录本数量最低。

表4 RNA-Seq 测序数据评估统计表

Table 4 Statistical table of RNA-Seq data evaluation

样品 Samples	Clean Reads数量 Number of Clean Reads	Clean Data碱基数/bp Number of Clean Data	GC含量/% GC Content	大于或等于Q30的百分比/% $\geq Q30$
H-X1	21 882 942	6 557 229 728	50.52	94.09
H-X2	22 886 461	6 843 134 076	50.81	94.41
H-X3	21 093 958	6 317 393 546	51.05	94.40
L-X1	19 998 315	5 990 895 036	50.42	94.21
L-X2	21 108 798	6 323 257 814	50.52	94.16
L-X3	23 322 440	6 988 132 460	50.30	93.88
共计/均值 Total/Mean	130 292 914	39 020 042 660	50.60	94.19

表5 转录本在各数据注释情况

Table 5 Statistics of BLAST annotation of different databases

数据库 Annotated databases	注释到的转录本数目 Number of transcripts	注释率/% Annotation rate
NR	44 854	98.47
eggNOG	43 433	95.47
Pfam	37 496	82.43
GO	36 631	80.52
Swissprot	33 276	73.15
KOG	27 767	61.04
COG	19 986	44.93
KEGG	17 093	37.58
All	44 888	98.68

2.3 不同种植密度木质部转录本表达模式分析

为了充分了解不同种植密度下尾巨桉木质部转录本的表达模式，以 H-X 为对照组，L-X 为试验组，筛选获得差异表达转录本 443 个，其中，215 个 DETs 在低种植密度条件下上调表达，228 个 DETs 下调表达。注释结果显示，443 个 DETs 中包含了 60 个假定的调控因子，归为 37 个家族 (图 1A、图 2)，其中，28 个差异表达调控因子在低种植密度下尾巨桉的木质部中上调表达，编码 21 类调控因子。这些调控因子与多种生物学过程有关，GARP-ARR-B、Trihelix 和 RLK-Pelle_LRR-XI-1 参与调控维管形成层活动；C3H、MYB、NAC 和 RLK-Pelle_LRR-XIIIa 参与调控细胞壁成分合成；

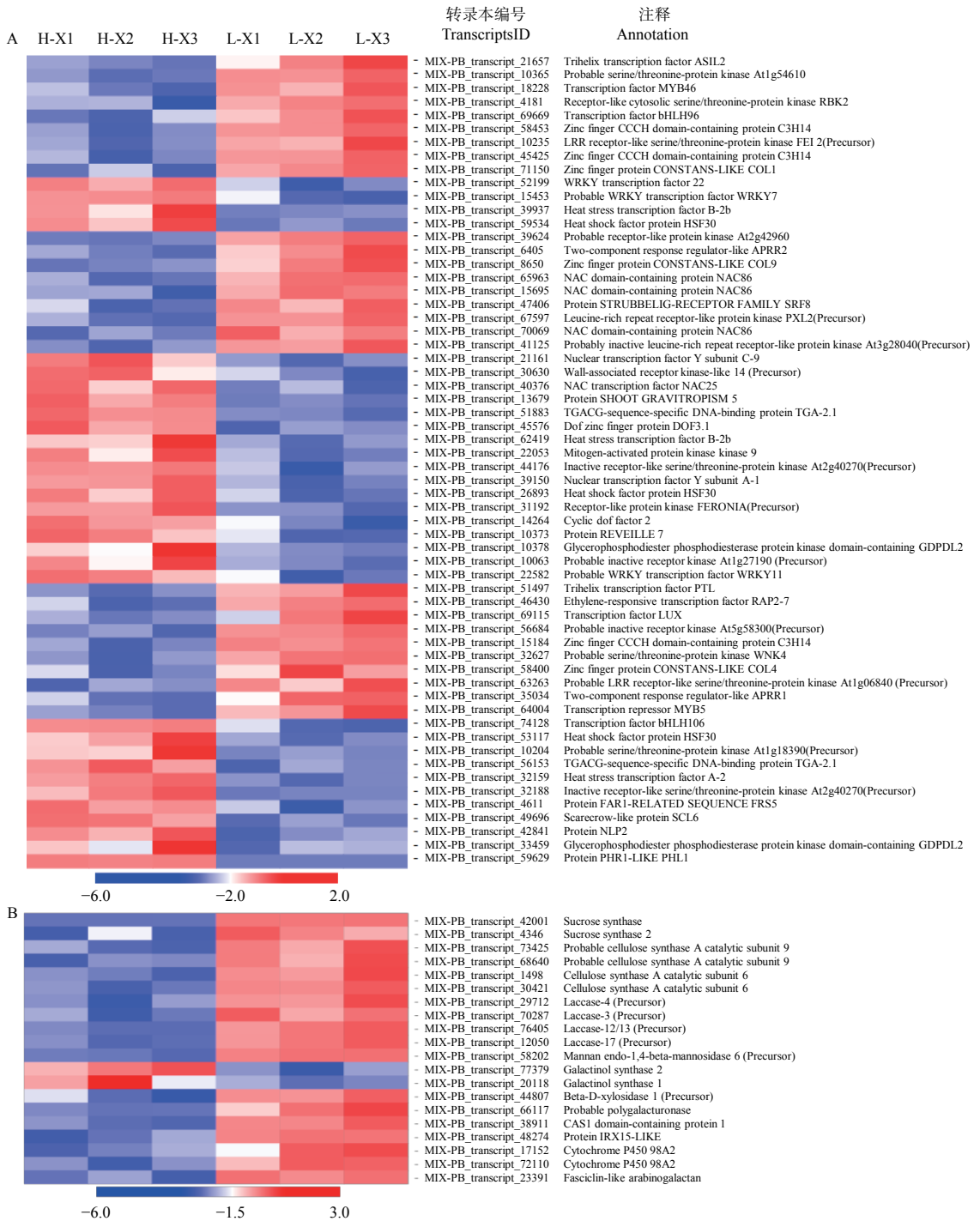


图 1 不同种植密度下尾巨桉木部中 80 条差异表达转录本的表达水平

Fig. 1 Heatmap showing the expression levels of 80 planting density-regulated differentially expressed transcripts in xylem for *E. urophylla* × *E. grandis*

RLK-Pelle_LRR-III 参与次生长过程；RLK-Pelle_RLCK-V 参与细胞周期调控；GARP-G2-like 和 WNK_NRBP 参与节律调控。32 个 DETs 下调表达，所对应调控因子的功能多与外界胁迫有关，如热激转录因子 HSF、参与盐胁迫的 bHLH 和 STE_STE7、参与干旱胁迫的 RLK-Pelle_WAK_LRK10L-1、参与病虫害应答的 RLK-Pelle_LRR-VI-2 和 RLK-Pelle_LRR-Xa、对脱落酸 (ABA) 敏感的 bHLH 和 RLK-Pelle_CrRLK1L-1 等。除编码调控因子的转录本外，一些转录本的表达模式也发生了显著的变化，在低种植密度植株的木质部中细胞壁物质合成相关蛋白 (蔗糖合成酶，纤维素合成酶，漆酶，糖基转移酶，糖基水解酶) 和木质素物质合成相关编码基因多为上调表达 (图 1B)。

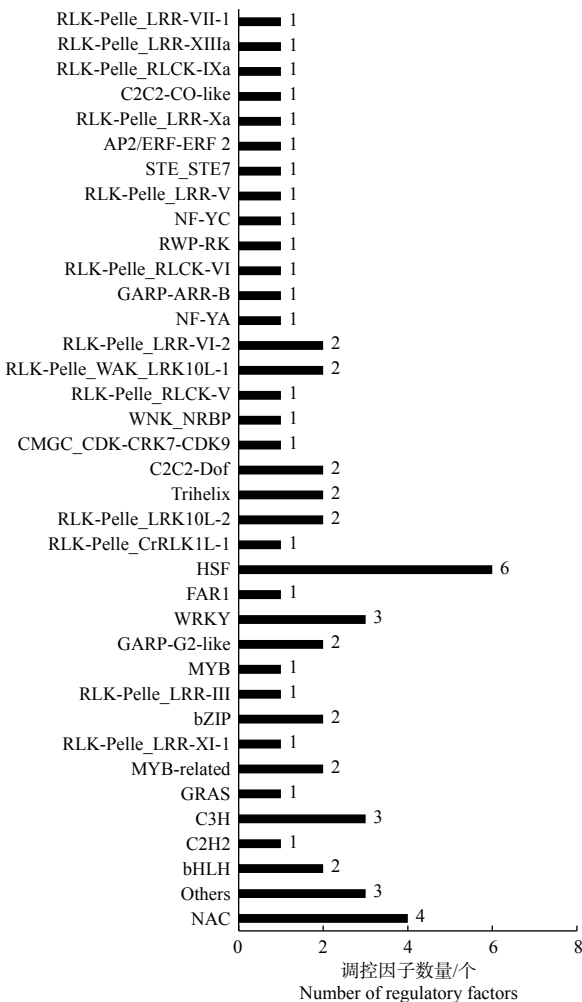


图 2 不同种植密度下尾巨桉木质部中 60 条差异表达调控因子的类型分布

Fig. 2 Classification of 60 differentially expressed regulatory factors in xylem for *E. urophylla* × *E. grandis* under different planting densities

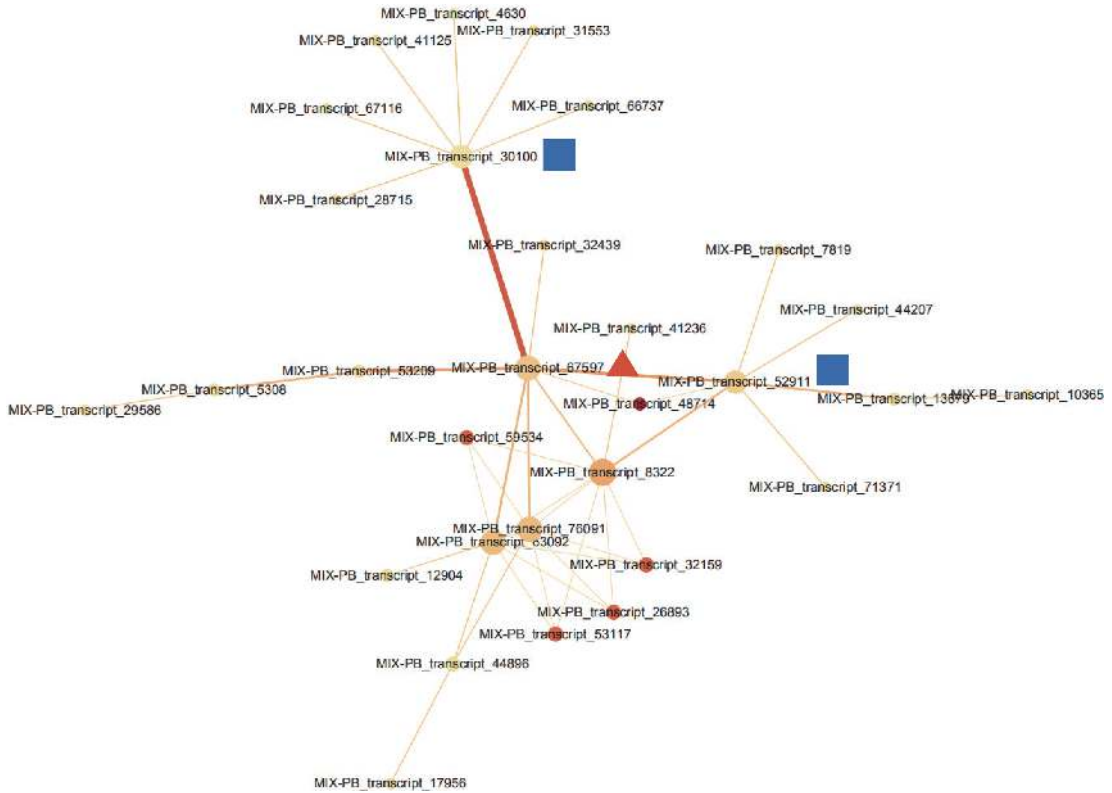
2.4 差异表达转录本蛋白互作网络分析

通过 STRING 数据库对 443 个 DETs 进行蛋白互作网络分析，检测到一簇相互作用的基因簇，共包含 30 个转录本 (图 3, 附表 1)。这些基因主要与参与翻译后修饰、蛋白质转换和伴侣蛋白，细胞周期控制、细胞分裂和染色体分割，转录等功能。MIX-PB_transcript_67597 作为网络的核心基因，与 MIX-PB_transcript_30100 和 MIX-PB_transcript_52911 占据了网络的中心位置 (图 3)。数据库注释表明：MIX-PB_transcript_67597 编码类受体激酶家族 RLK-Pelle_LRR-XI-1 的 PXL2，注释功能为转录。转录本 MIX-PB_transcript_52911 编码蛋白 CUL1 参与目标蛋白的泛素化；MIX-PB_transcript_30100 编码蛋白 T15D22.7 参与硫醇氧化酶和硫氧还蛋白家族蛋白的合成，二者在数据库的注释功能均为细胞周期控制、细胞分裂和染色体分割。这 3 个基因在低种植密度植株的木质部中均上调表达，可能在尾巨桉主茎径向生长中发挥关键作用 (附表 1)。

2.5 qRT-PCR 验证

以转录组测序中 2 个种植密度下的木质部 RNA 为模板，随机选择 9 个 DETs 进行 qRT-PCR 验证，qRT-PCR 结果与转录组测序的表达结果基本一致 (图 4)，证明转录组测序数据准确可靠。

为了验证木质部生成候选基因的功能，通过 qRT-PCR 对 9 个木质部生成候选基因进行分析，检测了它们在不同组织的基因表达情况。这 9 个 DETs 分别是转录因子基因 *PTL*、*MYB46*、*C3H14*、*NAC86*，细胞壁合成酶基因 *CesA*、*LAC17* 以及 *PXL2*、*T15D22.7*、*CUL1*。qRT-PCR 结果 (图 5)：这些编码基因在叶片中几乎不表达，在韧皮部、木质部均有不同程度的表达，其中，*PXL2* 在木质部 2 中的表达量最高，在韧皮部和木质部 7 中表达水平也较高；*CUL1* 和 *T15D22.7* 在韧皮部和木质部中高水平表达；*PTL* 在韧皮部和木质部 7 中表达量最高，显著高于叶片和木质部 2；*NAC86* 在韧皮部中表达水平最高，但在木质部 2 和木质部 7 中也有较高表达水平；*MYB46*、*C3H14*、*CesA* 和 *LAC17* 的表达模式相对一致，在木质部 2 的表达量最高，木质部 7 中略低，而韧皮部中表达量极低。这些结果进一步证明了测序结果的可靠性，同时也表明这些基因可能在木质部生成中发挥重要作用。

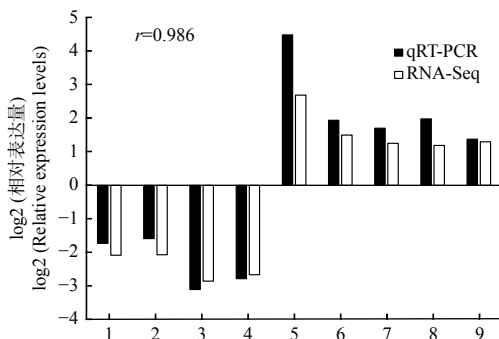


注: 红色三角形和蓝色正方形为关键节点基因。节点为蛋白质, 边为互动关系, 节点颜色越深, 表示此节点与邻接点之间的连通性越好; 边越宽相互作用的关系越强。

Notes: Red triangle and blue squares are key genes; Nodes indicate the protein, lines indicate interactional relations of proteins; The depth of the colors indicate the degree of nodes or lines; The thickness of lines indicate the strength of the interactional relations.

图 3 不同种植密度下尾巨桉木质部中差异表达转录本蛋白互作网络

Fig. 3 The interaction network of proteins of differentially expressed transcripts in xylem for *E. urophylla* × *E. grandis* under different planting densities



注 Notes: 1. MIX-PB_transcript_46917, 2. MIX-PB_transcript_39150, 3. MIX-PB_transcript_72449, 4. MIX-PB_transcript_15209, 5. MIX-PB_transcript_17152, 6. MIX-PB_transcript_61822, 7. MIX-PB_transcript_39624, 8. MIX-PB_transcript_6405, 9. MIX-PB_transcript_6089.

图 4 9 个差异表达转录本的 qRT-PCR 验证

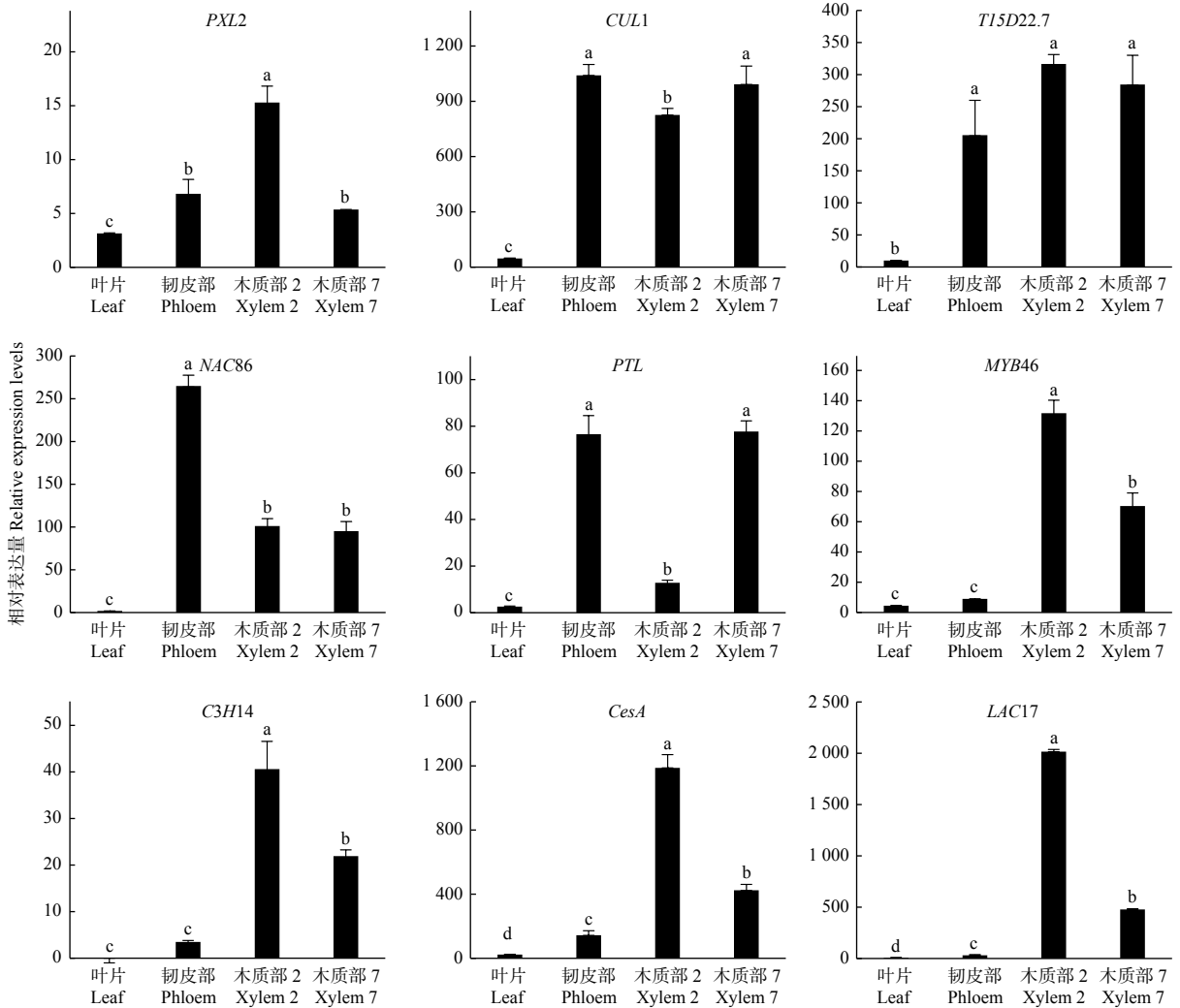
Fig. 4 Confirmation of the expression profiles of 9 differentially expressed transcripts by qRT-PCR

3 讨论

为了研究种植密度影响林木径向生长的分子机

制, 本研究联合 PacBio Iso-Seq 和 RNA-Seq 测序技术, 在高、低 2 个种植密度下尾巨桉 DH32-29 幼苗直径及直径生长量开始出现显著差异时进行转录组测序, 获得 45 490 条在主茎表达的非冗余转录本, 共有 44 888 (98.68%) 个转录本得到注释, 其中, 在 NR 数据库中有 98.47% (44 854/45 490) 的转录本能够预测到同源序列, 注释率较高, 可能是因为巨桉 (*Eucalyptus grandis* Hill) 全基因组测序已经完成, 剩余 602 (1.32%) 个转录本未得到注释, 可能是尾巨桉中的新基因。由于缺乏尾巨桉全基因组序列, 本研究结合二代和三代转录组测序结果进行分析有利于数据的分类和定量研究, 提高了序列的准确性和可靠性。

木材的生长性状是由多基因决定的高度复杂性状。调控因子在木材形成过程中发挥了重要的调控作用, 改变调控因子的表达就可促使多个功能基因共同发挥作用, 从而达到性状改良的效果^[10, 23]。因



注 Note: $P < 0.01$ 。

图5 木质部候选基因的组织表达模式

Fig. 5 The expression of candidate genes of xylem in various tissues

此, 本研究重点关注木质部中响应种植密度的60个差异表达调控因子。高种植密度植株木质部中优势表达的调控因子多数与胁迫相关, 这与欧美杨 (*Populus × euramericana* (Dode) Guinier) 中参与胁迫响应的转录因子在高种植密度植株叶片中上调表达相一致^[24]; 而低种植密度中优势表达的调控因子主要与细胞分裂活动和细胞壁物质合成相关。这可能是因为在高种植密度条件下, 植株生长过密, 易受多种生物或非生物因子的胁迫, 从而引起胁迫相关基因上调表达以响应劣势的生长环境, 而在低种植密度条件下有利于植株生长, 促进了木质部生成相关基因的表达, 因而使其径向生长显著大于高种植密度。

为了更好的挖掘和鉴定响应种植密度的木质部

生成关键基因, 本研究进一步对低种植密度植株木质部中优势表达的调控因子进行分析, 发现了一些重要的调控因子编码基因 *PXL2*、*MYB46*、*C3H14*、*NAC86* 和 *PTL*, 它们在低种植密度植株木质部中均上调表达 (图 1A)。蛋白互作网络和组织表达分析结果表明, 类受体激酶 *PXL2* 与 2 个关键节点基因 *CUL1* 和 *T15D22.7* 互作并具有一致的表达模式 (图 3), 这与拟南芥中的研究相吻合, *PXL2* 与 *PXL1*、*PXY* 共同协作调控维管组织发育过程中细胞分裂活动^[6]; 此外, 杨属植物中 *PXL2* 的同源基因 *PXY* 通过调控维管组织的细胞分裂活动参与木质部生成^[25], 由此表明, *PXL2*、*CUL1* 和 *T15D22.7* 可能共同协作调控尾巨桉主茎维管组织的细胞分裂活动, 这可能是造成不同种植密度下植株径向生长

差异的重要原因之一。

MYB和锌指蛋白C3H是植物中普遍存在的转录因子,越来越多的研究表明,这些转录因子在植物次生壁的合成中发挥重要作用^[26-31]。在拟南芥中,MYB46及其杨属和桉属植物中的同源基因*PtrMYB21*和*EgMYB2*是次生壁合成调控网络的主控开关成员,能够直接调控其它转录因子和次生壁合成相关基因的表达^[26-30]; *AtC3H14*及其杨属植物中同源基因*PdC3H17/18*是MYB46的直接靶基因,可正向调控次生壁的合成及木质部生成相关MYBs基因的表达^[31]。本研究表明,MYB46、C3H14、*CesA*和参与木质素合成的漆酶基因*LAC17*等主要在木质部中表达,且均在直径生长量显著增大的植株上调表达,推测MYB46、C3H14可能参与调控LACs和CesAs的表达,并且MYB46、C3H14可能通过参与尾巨桉木质部生成过程中次生壁合成的调控对种植密度做出响应。这些结果表明木质部生成过程中转录调控的复杂性,进一步揭示这些调控因子在木质部生成中的作用具有重要意义。

值得关注的是,在拟南芥根系发育过程中,*NAC86*直接参与韧皮部内筛管分子成熟过程的调控^[32],*PTL*作为抑制子参与调控木质部细胞分化活

动^[5],尚未见二者参与木本植物木质部生成调控的报道。在本研究中,*NAC86*、*PTL*在低种植密度植株的木质部中上调表达(图1A),在韧皮部和木质部中均有表达(图5),这表明拟南芥同源基因*NAC86*和*PTL*可能同时参与木本植物中木质部和韧皮部的生成,*PTL*可能在木本植物的维管组织发育过程中发挥正向调控作用,暗示这2个基因可能具有与草本植物中不同的功能,值得进一步研究。

基于以上研究结果,笔者提出了关于种植密度影响尾巨桉径向生长的分子调控网络模型(图6)。该模型中,种植密度通过影响调控维管组织细胞分裂的*PXL2*、调控次生壁合成的MYB46和C3H14、以及调控木质部细胞分化的*PTL*及其下游功能基因的表达模式进而促进了植株的径向生长。然而,该模型中各部分成员尤其是*PTL*、*NAC86*的具体功能和作用机制仍有待深入研究。为此,接下来将进一步开展基因功能研究,明确模型中关键成员如*PTL*、*NAC86*和*PXL2*在木材形成中的功能,并开展调控机制研究,明确其上下游调控基因,同时将研究结果推广到更多研究群体中,验证研究结论普遍性,以使研究结果得以为生产实践应用。

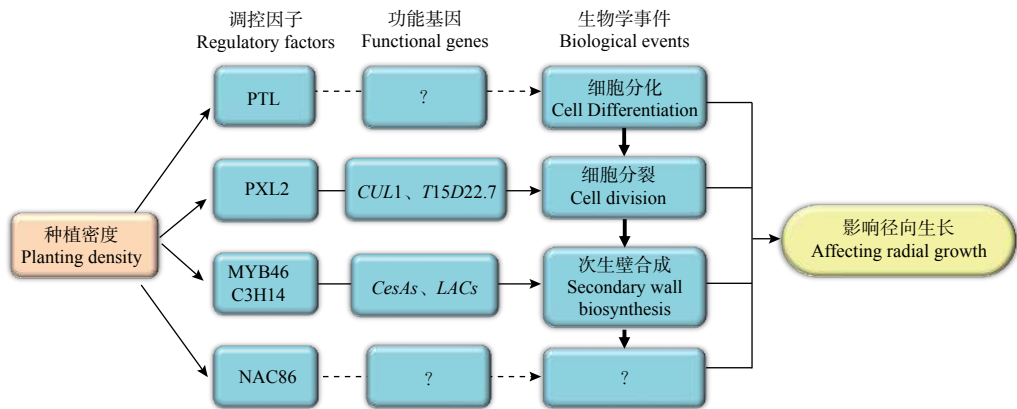


图6 种植密度影响尾巨桉径向生长的分子调控网络模型

Fig. 6 The regulatory network model of radial growth proposed for the *E. urophylla* × *E. grandis* related to planting density

4 结论

本研究从全基因组转录水平和基因表达两方面,鉴定了参与种植密度响应的显著表达的基因,获得了参与桉树径向生长的候选调控因子,提出了种植密度影响尾巨桉径向生长的分子调控网络模型,并提出*NAC86*和*PTL*在木本植物径向生长与草本植物生长中的功能具有差异,该研究对于揭示

桉树人工林密度调控的分子机制和木质部生成关键基因的研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] 李洁,列志旻,许松葵,等.不同密度的银合欢林生长分析[J].中南林业科技大学学报,2016,36(6):70-74.
- [2] 楚秀丽,王艺,金国庆,等.不同生境、初植密度及林龄木荷人工林生长、材性变异及林分化[J].林业科学,2014,50(6):

- 152-159.
- [3] Larson P R. The Vascular Cambium: Development and Structure[M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994: 9-30.
- [4] Plomion C, Leprovost G, Stokes A. Wood formation in trees[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(4): 1513-1523.
- [5] Zhang J, Eswaran G, Serra A J, *et al.* Transcriptional regulatory framework for vascular cambium development in *Arabidopsis* roots[J]. *Nature Plants*, 2019, 5(10): 1033-1042.
- [6] Fisher K, Turner S. PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development[J]. *Current Biology*, 2007, 17(12): 1061-1066.
- [7] Smit M E, McGregor S R, Sun H, *et al.* A PXY-mediated transcriptional network integrates signaling mechanisms to control vascular development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2019, 32(2): 319-335.
- [8] Xu S, Rahman A, Baskin I T. Two leucine-rich repeat receptor kinases mediate signaling, linking cell wall biosynthesis and ACC synthase in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(11): 3065-3079.
- [9] Polko K J, Barnes J W, Voiniciuc C, *et al.* SHOU4 proteins regulate trafficking of cellulose synthase complexes to the plasma membrane[J]. *Current Biology*, 2018, 28(19): 1-9.
- [10] Chen H, Wang J P, Liu H, *et al.* Hierarchical transcription factor and chromatin binding network for wood formation in *Populus trichocarpa*[J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(3): 602-626.
- [11] Akiyoshi N, Nakano Y, Sano R, *et al.* Involvement of VNS NAC-domain transcription factors in tracheid formation in *Pinus taeda*[J]. *Tree Physiology*, 2019, 40(6): 1-13.
- [12] Sun Y, Ren S, Ye S, *et al.* Identification and functional characterization of *PtoMYB055* involved in the regulation of the lignin biosynthesis pathway in *Populus tomentosa*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(14): 4857.
- [13] Balmant K, Noble J, Alves F C, *et al.* Xylem systems genetics analysis reveals a key regulator of lignin biosynthesis in *Populus deltoides*[J]. *Genome Research*, 2020, 30(8): 1131-1143.
- [14] Soler M, Plasencia A, Larbat R, *et al.* The *Eucalyptus* linker histone variant EgH1.3 cooperates with the transcription factor EgMYB1 to control lignin biosynthesis during wood formation[J]. *New Phytologist*, 2017, 213(1): 287-299.
- [15] Ployet R, Soler M, Carocha V, *et al.* Long cold exposure induces transcriptional and biochemical remodelling of xylem secondary cell wall in *Eucalyptus*[J]. *Tree Physiology*, 2017, 38(3): 1-14.
- [16] Li W, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(13): 1658-1659.
- [17] Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [18] Zheng Y, Jiao C, Sun H, *et al.* iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(12): 1667-1670.
- [19] Li B, Dewey C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323.
- [20] Robinson M D, McCarthy D J, Smyth G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139-140.
- [21] Becker R A, Chambers J M, Wilks A R. *The New S Language*[M]. Monterey: Wadsworth and Brooks/Cole, 1988.
- [22] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, *et al.* STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: D808.
- [23] Zhong R, McCarthy R L, Lee C, *et al.* Dissection of the transcriptional program regulating secondary wall biosynthesis during wood formation in poplar[J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(3): 1452-1468.
- [24] Ning K, Ding C, Huang Q, *et al.* Transcriptome profiling revealed diverse gene expression patterns in poplar (*Populus×euramericana*) under different planting densities[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0217066.
- [25] Etschells J P, Mishra L S, Kumar M, *et al.* Wood formation in trees is increased by manipulating PXY-regulated cell division[J]. *Current Biology*, 2015, 25(8): 1050-1055.
- [26] Zhong R, Richardson E A, Ye Z. The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(9): 2776-2792.
- [27] Ko J H, Kim W C, Han K H, *et al.* Ectopic expression of MYB46 identifies transcriptional regulatory genes involved in secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2009, 60(4): 649-665.
- [28] Kim W C, Ko J H, Han K H. Identification of a cis-acting regulatory motif recognized by MYB46, a master transcriptional regulator of secondary wall biosynthesis[J]. *Plant Molecular Biology*, 2012, 78(4-5): 489-501.
- [29] Kim W C, Ko J H, Kim J Y, *et al.* MYB46 directly regulates the gene expression of secondary wall-associated cellulose synthases in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2013, 73(10): 26-36.
- [30] Zhong R, McCarthy R L, Haghigat M, *et al.* The poplar MYB master switches bind to the SMRE site and activate the secondary wall biosynthetic program during wood formation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69219.
- [31] Chai G, Qi G, Cao Y, *et al.* Poplar *PdC3H17* and *PdC3H18* are direct targets of *PdMYB3* and *PdMYB21*, and positively regulate secondary wall formation in *Arabidopsis* and poplar[J]. *New Phytologist*, 2014, 203(2): 520-534.
- [32] Furuta K M, Yadav S R, Lehesranta S, *et al.* *Arabidopsis* NAC45/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation[J]. *Science*, 2014, 345(6199): 933-937.

Response of Stem Radial Growth of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* to Planting Density Based on Transcriptome Analysis

CHEN Mo^{1,2}, HE Sha-e¹, CHEN Shao-xiong¹, OUYANG Lin-nan¹, ZHANG Cheng¹, ZHANG Wei-yao¹

(1. Eucalyptus Research and development center of the State Forestry and Grassland Administration, Zhanjiang 524022, Guangdong, China; 2. Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: [Objective] To identify the key genes of secondary xylem development response to planting density for a well understanding of molecular mechanism of planting density affecting radial growth of eucalypts. [Method] By a combination of PacBio Iso-Seq and RNA-Seq analysis, the differentially expressed transcriptomes of xylem cells in *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* were identified under high and low planting densities. The tissues expression profiles of these key genes were analyzed via qRT-PCR. [Result] A total of 45 490 non-redundant full-length transcripts and 443 transcripts differentially expressed in xylem cells were obtained under high and low planting densities, and 60 transcripts encoding regulatory factors were obtained. Under low planting density, the diameters of trees increased significantly. The *PXL2* and its interactional genes *CUL1*, *T15D22.7* related to cell division, the *MYB46*, *C3H14* with their downstream genes *CesAs* and *LACs* related to secondary wall regulation were preferentially expressed in the xylem cells. These genes might play key roles in the regulation of diameter growth under different densities. In addition, the *NAC86* homologous genes involved in sieve element development and the inhibitor *PTL* homologous genes with dual functions in cambial cell proliferation and xylem differentiation were also up-regulated. They could promote the xylem development, which were different from the functions in herbaceous plants. The results of tissue expression analysis showed that *PXL2*, *CUL1*, *T15D22.7*, *NAC86* and *PTL* were predominantly expressed in phloem and xylem, whereas *MYB46*, *C3H14*, *CesA* and *LAC17* were predominantly expressed in xylem. [Conclusion] In this study, the candidate genes of xylem development related to planting density are identified and a model of molecular regulatory network that how the planting density affects radial growth of *E. urophylla* × *E. grandis* is proposed, which will benefit the intensive study of the molecular mechanism under different planting densities affecting radial growth for trees.

Keywords: planting density; *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*; transcriptome; radial growth; regulatory factors

(责任编辑:张研)

附表1 蛋白互作网络中30个参与种植密度响应的差异表达转录本注释

Attached list 1: The annotation of 30 differentially expressed transcripts responding to planting density in protein interaction network

转录本 Transcripts ID	转录本的功能 Transcript function	注释 Annotation
MIX-PB_transcript_67597	转录 Transcription	富含亮氨酸的重复类受体蛋白激酶PXL2 (前体) Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PXL2 (Precursor)
MIX-PB_transcript_52911	细胞周期控制, 细胞分裂, 染色体分割 Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	类枯素蛋白1 cullin-1-like ,CUL1
MIX-PB_transcript_30100	细胞周期控制, 细胞分裂, 染色体分割 Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	巯基氧化酶1 (前体) Sulfhydryl oxidase 1 (Precursor), T15D22.7
MIX-PB_transcript_31553	--	推定的抗病蛋白RGA4 Putative disease resistance protein RGA4
MIX-PB_transcript_4630	--	Toll/白细胞介素-1受体-类蛋白 Toll/interleukin-1 receptor-like protein, TIR
MIX-PB_transcript_41125	--	可能的无活性富含亮氨酸重复受体类蛋白激酶 Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At3g28040
MIX-PB_transcript_67116	--	烟草花叶病毒抗性蛋白N TMV resistance protein N
MIX-PB_transcript_66737	--	烟草花叶病毒抗性蛋白N TMV resistance protein N
MIX-PB_transcript_28715	--	烟草花叶病毒抗性蛋白N TMV resistance protein N
MIX-PB_transcript_32439	信号转导机制 Signal transduction mechanisms	可能的蛋白磷酸酶2C60 Probable protein phosphatase 2C
MIX-PB_transcript_41236	翻译后修饰, 蛋白质转换, 伴侣蛋白 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	类硫氧还蛋白1-1, 叶绿体 (前体) Thioredoxin-like 1-1, chloroplastic (Precursor)
MIX-PB_transcript_53209	--	金属内蛋白酶1 (前体) Metalloendoproteinase 1 (Precursor)
MIX-PB_transcript_5308	--	枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶 (前体) Subtilisin-like protease (Precursor)
MIX-PB_transcript_29586	脂质运输和代谢Lipid transport and metabolism	C型1类尼曼-匹克蛋白 Niemann-Pick C1 protein isoform X1
MIX-PB_transcript_48714	一般功能预测General function prediction only	锚定重复序列蛋白 Ankyrin repeat-containing protein, At5g02620
MIX-PB_transcript_59534	转录Transcription	热激因子蛋白30 Heat shock factor protein HSF30
MIX-PB_transcript_8322	转录Transcription	热激蛋白83 Heat shock protein 83
MIX-PB_transcript_76091	翻译后修饰, 蛋白质转换, 伴侣蛋白 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	热激同源蛋白70 Heat shock cognate 70 kDa protein HSP70
MIX-PB_transcript_63092	翻译后修饰, 蛋白质转换, 伴侣蛋白 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	热激同源蛋白70 Heat shock cognate 70 kDa protein HSP70
MIX-PB_transcript_12904	一般功能预测General function prediction only	多元醇转运蛋白5 Polyol transporter 5, PLT5
MIX-PB_transcript_32159	转录Transcription	热激转录因子A-2 T19L18.4 Heat stress transcription factor A-2 T19L18.4
MIX-PB_transcript_26893	转录Transcription	热激因子蛋白30 Heat shock factor protein HSF30
MIX-PB_transcript_53117	转录Transcription	热激因子蛋白30 Heat shock factor protein HSF30
MIX-PB_transcript_44896	氨基酸转运和代谢 Amino acid transport and metabolism	类酪氨酸脱羧酶1 tyrosine decarboxylase 1-like
MIX-PB_transcript_17956	翻译后修饰, 蛋白质转换, 伴侣蛋白 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	DnaJ同源蛋白 (前体) DnaJ protein homolog (Precursor), DNAJ1
MIX-PB_transcript_7819	一般功能预测 General function prediction only	F框/亮氨酸精氨酸精氨酸重复蛋白3 F-box/LRR-repeat protein 3, FBL3
MIX-PB_transcript_44207	翻译后修饰, 蛋白质转换, 伴侣蛋白 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	E3泛素蛋白连接酶环1 E3 ubiquitin-protein ligase RING1
MIX-PB_transcript_13679	一般功能预测General function prediction only	顶端向地性蛋白5 Protein SHOOT GRAVITROPISM 5
MIX-PB_transcript_10365	细胞周期控制, 细胞分裂, 染色体分割 Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	可能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Probable serine/threonine-protein kinase, At1g54610
MIX-PB_transcript_71371	翻译后修饰, 蛋白质转换, 伴侣蛋白 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	E3泛素蛋白连接酶环1 E3 ubiquitin-protein ligase RING1