

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220264

银腺杨 *PagWOX11/12a* 基因对 茎生长发育的影响

文爽爽¹, 王留强^{1,2}, 卢孟柱^{1,2,3*}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 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, 北京 100091;
2. 南京林业大学, 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 3. 浙江农林大学, 省部共建亚热带森林培育
国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: [目的] 分析 *PagWOX11/12a* 基因对杨树生长发育的影响, 为进一步研究该基因在木本植物中的调控机制奠定基础。[方法] 利用生物信息学方法及相关软件进行系统发育进化树构建、序列比对及生化特征分析。利用 qRT-PCR 分析其组织特异性表达模式。利用转基因植株 35S::*PagWOX11/12a-SRDX* (DR), 分析显性抑制 *PagWOX11/12a* 后杨树的表型。[结果] *PagWOX11/12a* 基因可编码含 255 个氨基酸的蛋白质, 该基因在 84K 的不同组织中均有表达。对 DR 转基因植株的表型分析表明, 与非转基因植株相比, 显性抑制该基因可导致茎中韧皮部细胞、髓心细胞及木质部纤维细胞长度变小, 节间伸长受到抑制, 株高明显降低。[结论] *PagWOX11/12a* 基因通过影响节间伸长参与调控了杨树的高生长, 该研究为进一步揭示 *PagWOX11/12a* 基因参与杨树生长发育的调控机制提供了参考。

关键词: *PagWOX11/12a*; 银腺杨; 节间伸长; 株高; 功能分析

中图分类号: S718.46

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2023)01-0039-08

WUSCHEL-related homeobox (WOX) 家族是真核生物中 Homeobox (HB) 转录因子超家族的成员, 该家族成员均含有同源异型结构 (Homeodomain, HD), 且为植物特异性转录因子^[1-3]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) WOX 家族共有 15 个成员, 这些成员可分成 3 个分支: 现代/WUS 型分支 (WUS、WOX1-7)、中间型分支 (WOX8-9、WOX11-12) 和古老型分支 (WOX10、WOX13-14)^[2,4]。除 WOX7 外, 现代/WUS 型分支的成员中均含有 1 个特定的 WUS-box 结构域, 该结构域在中间型分支及远古型分支成员中并不完整^[5-6]。

WOX 基因家族的成员参与调控了植物体不同的生长发育过程, 它们在调节细胞增殖和分化方面发挥着重要功能, 同时也参与了植物顶端分生组织

和干细胞的维持、侧生器官和花器官的形成、胚胎发育、激素信号转导和逆境响应等过程^[4-5,7-8]。拟南芥 WUS 蛋白可以通过和 SHOOT MERISTEMLESS (STM) 的相互作用, 增强 WUS 对 *CLAVATA3* (*CLV3*) 基因启动子的结合能力, 二者共同调控 *CLV3* 的表达, 维持干细胞稳态^[9]。同时, *AtWOX1* 基因也可以调控 *CLV3* 基因的表达, 且能通过调节脱羧酶蛋白 (Decarboxylase, SAMDC) 活性以及多胺的稳态, 参与拟南芥分生组织的发育^[10]。*AtWOX4* 基因可以促进原形成层的发育^[11], 调节植物的侧向生长^[12]。毛白杨 *PtoWOX5a* 基因可以调控杨树不定根的发育, 过表达该基因能够增加转基因杨树不定根的数量^[6]。过表达 *WOX14* 可以促进拟南芥体内赤霉素的积累, 促进花序茎中的维管细胞分化及木质化^[13]。过表达毛白杨 *WOX11/12a*

收稿日期: 2022-05-22 修回日期: 2022-07-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31971620)

* 通讯作者: 卢孟柱, 博士, 研究员。主要研究方向: 树木性状的分子基础。Email: lumz@caf.ac.cn

基因可以促进形成层的发育,影响杨树木质部分化^[14]。

杨树 (*Populus*) 是重要的速生造林树种,同时也是木本植物分子生物学的模式植物。已有报道指出, *WOX11/12* 基因可以调控植物的根系发育和茎部次生长,并能参与植物对非生物胁迫的响应^[14-19],这表明 *WOX11/12* 基因在植物生长发育中起着重要作用。为明确 *WOX11/12* 基因对杨树其它组织及器官生长发育的作用,本研究以非转基因银腺杨 (*Populus alba* × *P. glandulosa*, 即 '84K') 和 *PagWOX11/12a* 显性抑制转基因杨树 (*35S::PagWOX11/12a-SRDX*) 为材料,研究了显性抑制该基因后杨树高生长及茎中细胞长度的变化趋势,揭示了 *PagWOX11/12a* 基因对杨树茎部生长发育的影响,为进一步探讨其作用机制提供参考。

1 材料与方 法

1.1 研究材料

本研究以 84K 杨和 *35S::PagWOX11/12a-SRDX* (DR) 转基因杨树为研究材料, *35S::PagWOX11/12a-SRDX* 是由编码 SRDX 肽的核酸序列与 *PagWOX11/12a* 的 cDNA 融合构建的载体转化 84K 杨所得到的转基因苗,该载体可以特异性抑制目标基因的表达,该转基因苗由前期研究获得^[20],组培苗保存于中国林业科学研究院林木遗传育种国家重点实验室。上述组培苗在生根培养基中培养,培养基组成为: 1/2 MS (Murashige & Skoog Basal Medium w/Vitamins) 基础培养基、0.05 mg·L⁻¹ 3-吲哚丁酸 (3-indole butyric acid, IBA)、0.02 mg·L⁻¹ 萘乙酸 (Naphthylacetic acid, NAA) 及 5 mg·L⁻¹ 琼脂粉 (pH = 5.8~6.0)。组培苗培养于人工气候室 (温度: 24 ± 1 °C; 光周期: 16 h/8 h 光照/黑暗; 相对湿度: 50%~60%; 光照强度: 55~65 μmol·m⁻²·s⁻¹)。待生长 21 d 后,将组培苗转入营养土 (土壤:珍珠岩 = 3:1) 中,并置于温室培养。

本研究中定量试剂盒 SYBR Premix Ex Taq™ Kit 及反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit 购自 TaKaRa, RNA 提取试剂盒 (RNAprep pure Plant Kit) 购自 QIAGEN。

1.2 研究方法

1.2.1 生物信息学分析 使用在线网站 ExpASY (<https://web.expasy.org/protparam/>) 分

析 *PagWOX11/12a* 蛋白的理化性质。利用植物基因组网站 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 获得毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray) *WOX* 基因家族的氨基酸序列。84K 杨基因组获取于 Figshare database (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.12369209>)^[21],利用本地 BLAST 获得 84K 杨中 *WOX* 基因家族的蛋白序列。使用 MEGA 11 软件,根据邻接法 (Neighbor-joining method) 构建系统发育进化树,节点旁的数字表示基于 1 000 次重复次数的自展值 (Bootstrap)。

1.2.2 基因组织表达特异性分析 利用 RNA 提取试剂盒提取生长 60 d 的 84K 杨不同组织的总 RNA,包括茎部木质部、韧皮部及形成层、成熟叶、1/2 株高处茎部、主根和侧根,提取方法参照说明书。分别用 Nanodrop8000 和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度及质量。利用反转录试剂盒合成 cDNA,反应体系及条件参照说明书。通过在线网站 (<https://sg.idtdna.com/Scitools/Applications/RealTimePCR/>) 设计 *PagWOX11/12a* 的定量引物 *PagWOX11/12a-RT-F* 和 *PagWOX11/12a-RT-R* (表 1)。利用 SYBR Premix Ex Taq™ Kit (TaKaRa) 定量试剂及实时荧光 PCR 仪器 Light Cycler 480 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) 进行 qRT-PCR 分析。选用 *PagActin* 作为内参基因,且进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复,相对表达量根据 2^{-ΔΔCT} 方法^[22] 进行计算。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence (5'-3') |
|--------------------------|---------------------------------|
| <i>PagWOX11/12a-RT-F</i> | ACCCTAACAGTCCAAGCAAC |
| <i>PagWOX11/12a-RT-R</i> | TCAGTATCTGCTCTGGCTTTG |
| <i>PagActin-F</i> | ACCCTCAAATCCAGACACTG |
| <i>PagActin-R</i> | TTGCTGACCGTATGAGCAAG |

1.2.3 转基因植株表型鉴定 分别选取 84K、DR1 和 DR9 各 9 株长势一致的组培苗移入营养土中,并将其置于温室培养。拍照记录其表型变化,测量植株在培养第 7、14、21、28 天后的株高及节间数,统计第 28 天节前 9 节间的节间长度。上述实验均进行 3 次生物学重复。

1.2.4 茎段解剖结构分析 选取生长 28 d 的植株第 9 节间茎段进行解剖结构分析。于第 9 节间茎

段中部取约 0.5~1 cm 的材料, 使用 5% 琼脂糖包埋后, 将其水平放置固定于样品架上, 通过震荡切片机 (LEICA VT1000) 进行纵切, 切片厚度设置为 40 μm 。将切片置于去离子水中等待后续观察。观察茎段解剖结构时使用 0.05% 甲苯胺蓝 O (Toluidine blue O, TBO) 进行染色, 待染色结束后用去离子水对样品进行冲洗; 随后, 用 Olympus BX51 显微镜进行观察并及时拍照, 利用 Image J 软件测量照片中髓心及韧皮部细胞的长度。

1.2.5 纤维离析 将生长 28 d 的植株相同节间茎段切成 1 cm 长度, 去除树皮, 并将茎段置于离析液 (30% 过氧化氢:去离子水:冰乙酸 = 1:4:5) 中, 样品至少在 56 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴中放置 72 h; 随后用去离子水将样品洗涤 3~5 次, 并浸泡过夜; 最后将样品捣碎, 使用 TBO 进行染色并吸取适量混悬液至载玻片中, 置于 Olympus BX51 显微镜下观察、拍照, 通过 Image J 软件测量木质部纤维细胞的长度。

1.2.6 数据统计 使用软件 IBM SPSS Statistics 23 对统计的数据进行分析, 使用 *t* 检验法分析差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 84K 杨 *WOX* 基因家族的鉴定及系统发育分析

毛果杨 *PtWOX* 基因家族共有 18 个成员。利用从 Phytozome 网站获取的 *PtWOX* 基因序列在 84K 杨基因组数据库中进行 BLAST 分析, 最后在 84K 杨中鉴定出 18 个 *PagWOX* 基因家族成员。基于 *PtWOX* 和 *PagWOX* 的蛋白序列, 利用邻接法构建了毛果杨和 84K 杨 *WOX* 家族的系统发育进化树 (图 1)。根据构建好的系统发育进化树, 对 84K 杨 *PagWOX* 进行命名。

2.2 *PagWOX11/12a* 序列分析

对 *PagWOX11/12a* 基因的核酸及蛋白序列进行分析。结果表明: 84K 杨与毛果杨 *WOX11/12a* 基因的核酸序列相似度为 96.88%, 蛋白序列相似度为 95.29%。*PagWOX11/12a* 基因编码区长度为 768 bp, 编码的蛋白序列包含 255 个氨基酸, 该蛋白的分子量约为 28.18 kDa, 等电点为 5.30, 脂肪系数为 67.22, 不稳定系数为 62.31, 蛋白平均亲水性 (GRAVY) 为 -0.461。

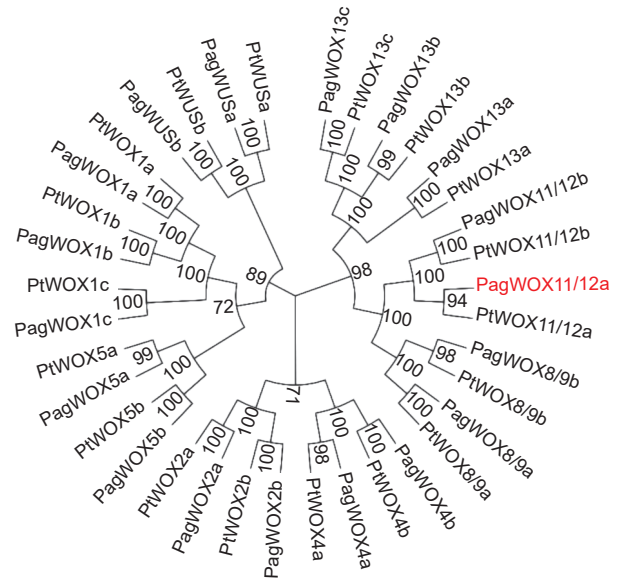
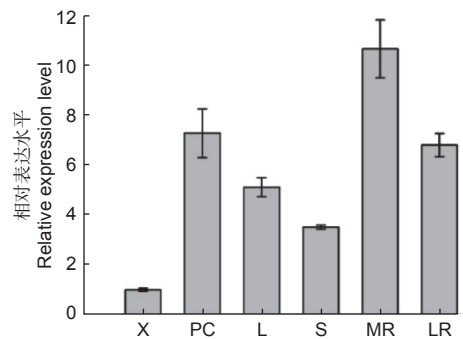


图 1 毛果杨与 84K 杨 *WOX* 家族系统发育进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of *WOX* family proteins from *Populus. trichocarpa* and *Populus alba* × *P. glandulosa*

2.3 *PagWOX11/12a* 基因组织表达特异性分析

为探究 *PagWOX11/12a* 基因在 84K 杨不同组织中的表达情况, 分别提取生长 60 d 的 84K 杨的木质部、韧皮部及形成层、成熟叶、1/2 株高处茎部节间、主根和侧根的总 RNA, 反转录后对各部位进行 qRT-PCR 检测。结果表明: *PagWOX11/12a* 基因在各个部位中均有不同程度的表达, 在主根、侧根及韧皮部和形成层中表达量较高, 在叶片及茎段中也有一定的表达量, 在木质部中表达量最低 (图 2)。



注: X: 木质部; PC: 韧皮部+形成层; L: 叶; S: 茎; MR: 主根; LR: 侧根
Notes: X: Xylem; PC: Phloem + Cambium; L: Leaf; S: Stem; MR: Main root; LR: Lateral root

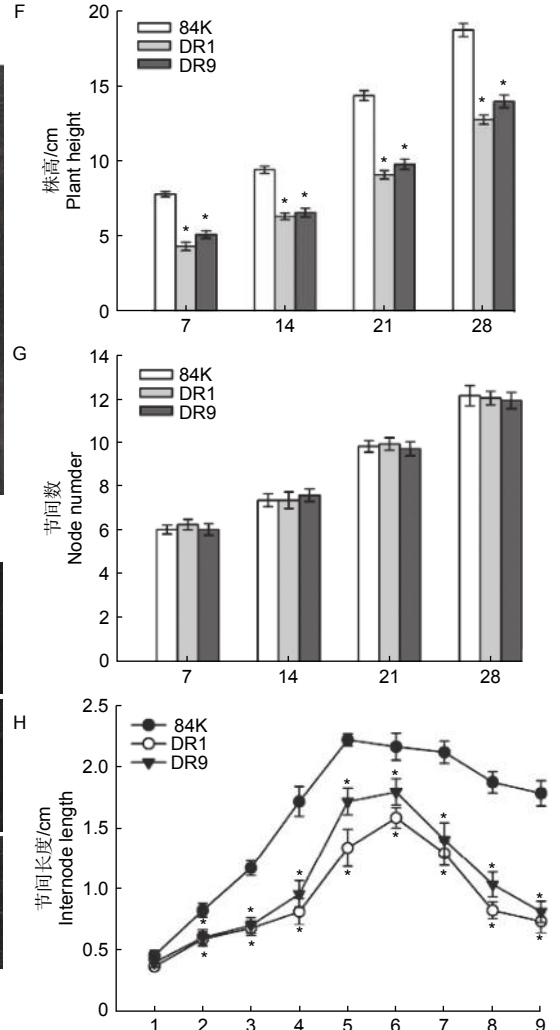
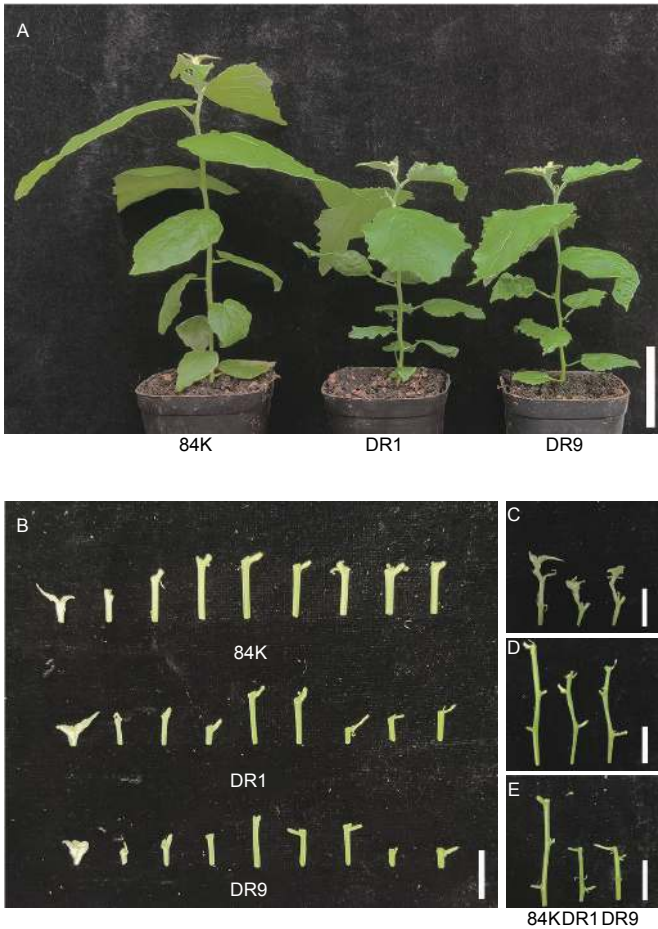
图 2 *PagWOX11/12a* 基因在 84K 杨不同组织中的表达分析

Fig. 2 The expression levels of *PagWOX11/12a* in different tissues of 84K poplar

2.4 转基因植株表型分析

为了明确 *PagWOX11/12a* 基因对杨树生长发育的影响, 分别统计了非转基因 84K 和 DR 转基因植株在温室生长 7、14、21 和 28 d 后的表型 (图 3)。通过统计不同株系的株高与节间数发现, DR 转基因植株的株高在第 7、14、21、28 天时均显著小于非转基因 84K, 而二者的节间数则无明显差异 (图 3 A, F~G)。同时比较了非转基因

84K 和 DR 转基因植株在第 28 天时前 9 节间的表型 (图 3 B) 以及第 1~3、4~6、7~9 节间的变化 (图 3 C~E), 可见 DR 转基因植株的节间长度小于对应 84K 的节间长度。为进一步明确各株系节间长度的变化, 测量了第 28 天时非转基因 84K 和 DR 转基因植株前 9 节间的长度 (图 3 H)。结果表明: 从第 2 节间开始, DR 转基因植株的节间长度均显著小于非转基因 84K。上述结果表明,



注: A: 非转基因 84K 和 DR 转基因植株生长 28 d 后表型, 比例尺 = 5 cm; B: 非转基因 84K 和 DR 转基因植株生长 28 d 后前 9 节间形态变化, 比例尺 = 2 cm; C-E: 生长 28 d 时非转基因 84K 和 DR 转基因植株第 1~3 节间 (C)、4~6 节间 (D)、7~9 节间 (E) 长度对比, 比例尺 = 2 cm; F, G: 非转基因 84K 和 DR 转基因植株生长第 7、14、21 和 28 d 时株高 (F) 与节间数 (G) 变化; H: 生长 28 d 后非转基因 84K 和 DR 转基因植株前 9 节间长度变化。星号表示差异显著 (*, $p < 0.05$)。

Notes: A: Photographs of non-transgenic 84K and DR transgenic plants after 28 days of growth, bar = 5 cm; B: Photographs of the first nine internodes of non-transgenic 84K and DR transgenic plants after 28 days of growth, bar = 2 cm; C-E: Length of 1st-3rd (C), 4th-6th (D), and 7th-9th (E) internodes of non-transgenic 84K and DR transgenic plants after 28 days of growth, bar = 2 cm; F, G: Plant height (F) and number of internodes (G) of non-transgenic 84K and DR transgenic plants at 7, 12, 21 and 28 days; H: The internode length for the first nine internodes of non-transgenic 84K and DR transgenic plants after 28 days of growth. Asterisks indicate significant differences (*, $p < 0.05$).

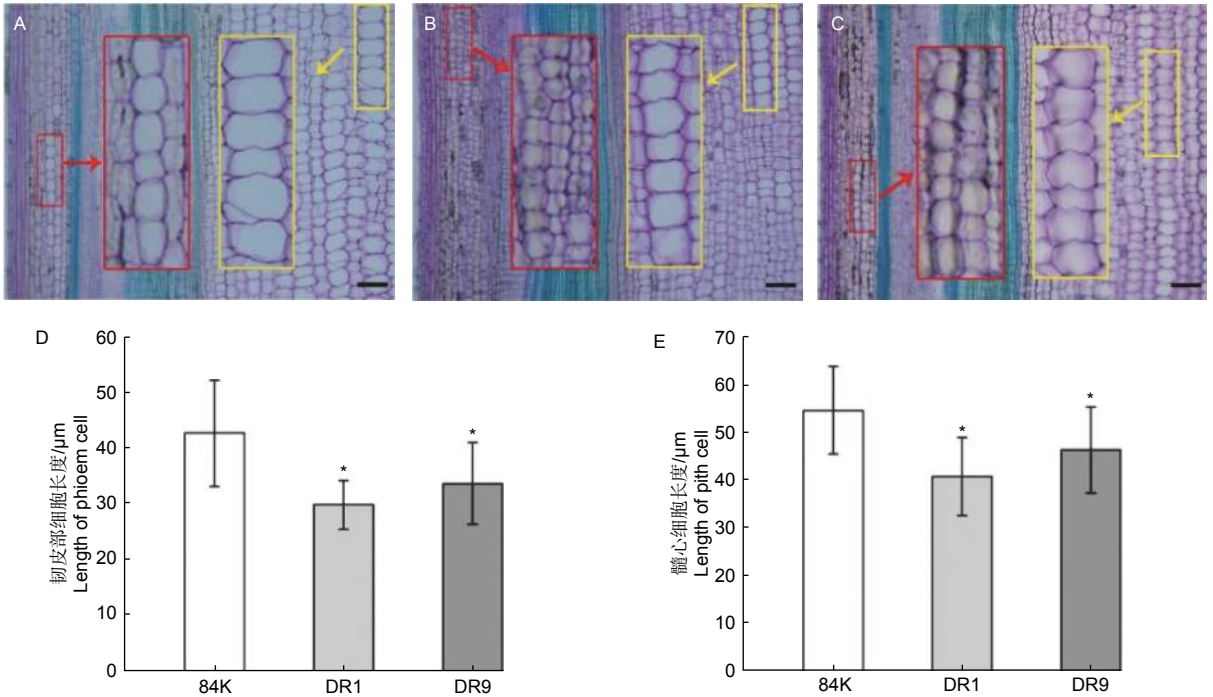
图 3 非转基因 84K 和 DR 转基因植株表型分析

Fig. 3 Phenotype of non-transgenic 84K and DR transgenic poplars

显性抑制 *PagWOX11/12a* 基因抑制了杨树节间的伸长。

为进一步明确 *PagWOX11/12a* 基因对杨树茎部生长发育的影响, 取生长 28 d 的非转基因 84K 和 DR 转基因植株第 9 节间茎段, 通过纵切切片观察髓心和韧皮部细胞的结构特征, 并统计其长度 (图 4)。结果表明: DR 转基因植株的韧皮部细

胞及髓心细胞与非转基因 84K 相比, 长度均有不同程度的减小 (图 4 A~C)。DR1 和 DR9 的韧皮部细胞及髓心细胞长度显著小于非转基因 84K。与 84K 相比, DR 转基因株系 DR1 和 DR9 的韧皮部细胞分别减小了 30% 与 21%, 髓心细胞长度分别缩短了 25% 及 15% (图 4 D、E)。



注: A~C: 84K (A)、DR1 (B) 和 DR9 (C) 第 9 节间纵切图, 比例尺 = 100 μm; D、E: 韧皮部细胞 (D) 与髓心细胞 (E) 长度统计结果。星号表示差异显著 (*, $p < 0.05$)。

Notes: A~C: Longitudinal sections of 9th internode from non-transgenic 84K (A), DR1 (B) and DR9 (C), bar = 100 μm; D, E: Cell length of phloem cells (D) and pith cells (E) from 9th internode of non-transgenic 84K, DR1 and DR9. Asterisks indicate significant differences (*, $p < 0.05$).

图 4 非转基因 84K 与 DR 转基因植株韧皮部细胞及髓心细胞长度分析

Fig. 4 Length of phloem and pith cells from 9th internode of non-transgenic 84K and DR transgenic poplars

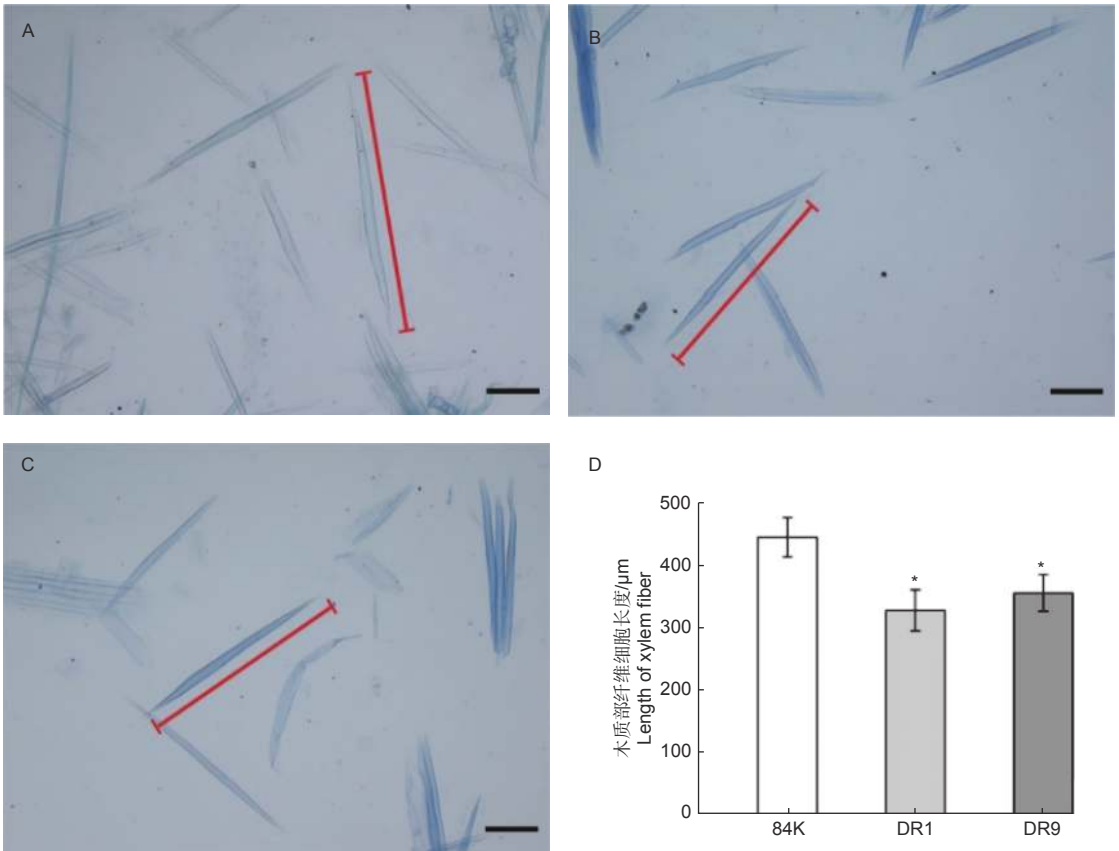
除了韧皮部及髓心外, 木质部也是杨树茎段的重要组成部分, 利用木质部纤维离析对非转基因 84K 和 DR 转基因植株的木质部纤维细胞长度进行了分析 (图 5)。通过对木质部纤维细胞的长度统计 (图 5 D) 可知: DR1 和 DR9 的木纤维细胞与非转基因 84K 相比, 分别减小了 26% 与 20%。上述结果表明, DR 转基因植株节间缩短是由茎中细胞长度减小导致。

3 讨论

杨树是我国重要的速生造林树种, 具有繁殖容易、生长快等特性, 是生产建筑、造纸工业及生物

燃料生产的重要材料。同时其转基因体系相对成熟, 也是最早完成全基因组测定的树种, 是木本植物进行分子生物学的模式树种。研究参与调控杨树生长发育相关基因, 对于杨树的分子育种具有重要意义。本研究选取了与分生组织相关的 *WOX* 家族基因, 以期明确 *PagWOX11/12a* 基因对杨树高生长发育的作用, 进而提高木材产量。

已有研究表明, 毛果杨 *PtWOX* 基因家族共有 18 个成员^[3], 本研究利用 84K 杨的基因组信息^[21], 通过序列比对在 84K 中找到了 18 个同源序列, 并构建了系统发育进化树 (图 1)。通过序列分析发现, *PagWOX11/12a* 基因与毛果杨 *PtWOX11/12a*



注: A-C: 84K (A)、DR1 (B) 和 DR9 (C) 木质部纤维细胞, 比例尺 = 100 μm; D: 纤维细胞长度统计结果。星号表示差异显著 (*, $p < 0.05$)。

Notes: A-C: Xylem fibers were isolated from internode of non-transgenic 84K (A), DR1 (B) and DR9 (C), bar = 100 μm; D: Cell length of xylem fibers from non-transgenic 84K, DR1 and DR9. Asterisks indicate significant differences (*, $p < 0.05$).

图 5 非转基因 84K 与 DR 转基因植株木质部纤维细胞长度分析

Fig. 5 Length of xylem fibers of non-transgenic 84K and DR transgenic poplars

基因序列相似度较高。

PagWOX11/12a 基因的组织表达特异性分析结果 (图 2) 表明, 该基因在主根中的表达量最高, 在侧根中表达量也相对较高, 这表明 *PagWOX11/12a* 基因可能影响杨树根系发育。已有研究表明, 在杨树中过表达 *WOX11/12a* 可以促进植物根系发育^[3, 20]。同时该基因在韧皮部及形成层中也有较高的表达量, 暗示该基因很有可能参与韧皮部及分生组织发育的调控。

植株的高度通常由节间数量及节间长度决定^[23]。本研究对非转基因 84K 及 DR 转基因植株进行表型分析 (图 3), 发现在不同时期内, 二者的节间数量均无明显差异, 而 DR 转基因植株的株高则显著低于非转基因 84K, 表明 DR 转基因植株的节间长度小于非转基因 84K。为明确 *PagWOX11/12a* 基因对节间长度的影响, 观察并统计了在温室生长 28 d 后非转基因 84K 及 DR 转基因植株的节

间长度 (图 3 B~E, H), 结果显示从第 2 节间开始, DR 转基因植株的节间长度均低于非转基因 84K, 且差异显著。由此可知, *PagWOX11/12a* 基因可以通过改变节间伸长来影响植株高度, 节间长度的降低是 DR 转基因植株矮化的主要原因。为更精准的分析 *PagWOX11/12a* 基因对杨树高生长的影响, 对杨树茎段进行了解剖学分析, 通过观察对比非转基因 84K 与 DR 转基因植株茎段纵切切片 (图 4), 发现 DR 转基因杨树茎中韧皮部细胞及髓心细胞长度小于非转基因 84K, 同时纤维离析结果 (图 5) 表明, 与非转基因 84K 相比, DR 转基因植株的纤维细胞的长度也显著变短。上述结果进一步说明, DR 转基因植株节间长度的降低是由茎中细胞长度缩短所致, *PagWOX11/12a* 基因可以通过影响杨树茎中细胞长度来控制节间伸长, 进而改变植株高度。已有研究表明, 毛白杨 *PtoWOX11/12a* 基因可以影响杨树茎的发育, 改变转基因植株

株高及地径, 过表达毛白杨 *PtoWOX11/12a* 基因后可以促进形成层细胞层数的增加, 但会抑制木质部的发育, 表明 *PtoWOX11/12a* 基因可以影响形成层干细胞的活动及木质部的分化^[14]; 而 84K 杨 *PagWOX11/12a* 基因可以通过调控韧皮部、髓心细胞及木质部纤维细胞的伸长, 影响植株的节间长度, 说明了 *WOX11/12a* 基因对茎生长发育的调控途径。前期已有研究表明, *PagWOX11/12a* 基因可以促进根系生长, 增强植物的抗旱性及耐盐性^[19-20], 而本研究指出, 该基因也可以调控杨树茎的生长发育, 进一步明确了 *PagWOX11/12a* 基因对杨树生长发育新的调控途径。

通过了解 *PagWOX11/12a* 基因对节间伸长的调控作用有助于提高木材产量。已有研究表明, 茎段节间伸长主要由生长素 (Auxin)、赤霉素 (Gibberellins, GAs)、油菜素内酯 (Brassinosteroids, BRs) 和独角金内酯 (Strigolactones, SLs) 等激素控制^[24]。虽然上述激素在茎段节间伸长中发挥的作用不同, 但它们的生物合成或信号转导过程均可能影响植株高度^[25]。后续可以通过测定激素含量进一步明确 *PagWOX11/12a* 基因影响节间伸长的途径。

4 结论

株高是林木遗传育种中的重要性状之一, 本研究明确了 *PagWOX11/12a* 基因可以通过影响节间伸长改变植株高度, 通过统计韧皮部细胞、髓心细胞及木质部纤维细胞的长度可以得知, 该基因对节间伸长的抑制主要是通过控制茎中细胞长度来实现的, 上述结果对揭示 *PagWOX11/12a* 基因对杨树的生长调控机制具有重要意义。

参考文献:

[1] LI J, JIA H, SUN P, *et al.* The *WUSCHEL* (*PtoWUSa*) is involved in developmental plasticity of adventitious root in poplar[J]. *Genes*, 2020, 11(2): 176.

[2] VAN DER GRAAFF E, LAUX T, RENSING S A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(12): 248.

[3] 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): 296.

[4] HAECKER A, GROSS-HARDT R, GEIGES B, *et al.* Expres-

sion dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 2004, 131(3): 657-668.

[5] LIN H, NIU L, MCHALE N A, *et al.* Evolutionarily conserved repressive activity of *WOX* proteins mediates leaf blade outgrowth and floral organ development in plants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(1): 366-371.

[6] LI J, ZHANG J, JIA H, *et al.* The *WUSCHEL*-related homeobox 5a (*PtoWOX5a*) is involved in adventitious root development in poplar[J]. *Tree Physiology*, 2018, 38(1): 139-153.

[7] DOLZBLASZ A, NARDMANN J, CLERICI E, *et al.* Stem cell regulation by *Arabidopsis WOX* genes[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(7): 1028-1039.

[8] JHA P, OCHATT S J, KYNNAR V. *WUSCHEL*: a master regulator in plant growth signaling[J]. *Plant Cell Reports*, 2020, 39(4): 431-444.

[9] SU Y H, ZHOU C, LI Y J, *et al.* Integration of pluripotency pathways regulates stem cell maintenance in the *Arabidopsis* shoot meristem[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(36): 22561-22571.

[10] ZHANG Y, WU R, QIN G, *et al.* Over-expression of *WOX1* leads to defects in meristem development and polyamine homeostasis in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011, 53(6): 493-506.

[11] JI J, STRABLE J, SHIMIZU R, *et al.* *WOX4* promotes procambial development[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(3): 1346-1356.

[12] SUER S, AGUSTI J, SANCHEZ P, *et al.* *WOX4* imparts auxin responsiveness to cambium cells in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(9): 3247-3259.

[13] DENIS E, KBIRI N, MARY V, *et al.* *WOX14* promotes bioactive gibberellin synthesis and vascular cell differentiation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2017, 90(3): 560-572.

[14] 李真, 王留强, 卢孟柱. 毛白杨 *PtoWOX11/12a* 对杨树扦插苗生长发育的影响[J]. *林业科学*, 2017, 53(11): 69-76.

[15] HU X, XU L. Transcription factors *WOX11/12* directly activate *WOX5/7* to promote root primordia initiation and organogenesis[J]. *Plant Physiology*, 2016, 172(4): 2363-2373.

[16] ZHOU S, JIANG W, LONG F, *et al.* Rice homeodomain protein *WOX11* recruits a histone acetyltransferase complex to establish programs of cell proliferation of crown root meristem[J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(5): 1088-1104.

[17] CHEN J, ZHANG H Q, HU L B, *et al.* Microcystin-LR-induced phytotoxicity in rice crown root is associated with the cross-talk between auxin and nitric oxide[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(2): 283-293.

[18] LIU J, CHEN T, ZHANG J, *et al.* Ginsenosides regulate adventitious root formation in *Panax ginseng* via a PgCLE45-Pg-*WOX11* regulatory module[J]. *Journal of Experimental Botany*,

2020, 71(20): 6396-6407.

- [19] WANG L Q, WEN S S, WANG R, *et al.* PagWOX11/12a activates *PagCYP736A12* gene that facilitates salt tolerance in poplar[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(11): 2249-2260.
- [20] WANG L Q, LI Z, WEN S S, *et al.* WUSCHEL-related homeobox gene *PagWOX11/12a* responds to drought stress by enhancing root elongation and biomass growth in poplar[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71(4): 1503-1513.
- [21] HUANG X, CHEN S, PENG X, *et al.* An improved draft genome sequence of hybrid *Populus alba* × *Populus glandulosa*[J]. *Journal of Forestry Research*, 2021, 32(4): 1663-1672.

- [22] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [23] LV H, ZHENG J, WANG T, *et al.* The maize *d2003*, a novel allele of *VP8*, is required for maize internode elongation[J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 84(3): 243-257.
- [24] WANG B, SMITH S M, LI J. Genetic regulation of shoot architecture[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2018, 69: 437-468.
- [25] ZHANG X, HOU X, LIU Y, *et al.* Maize *brachytic2 (br2)* suppresses the elongation of lower internodes for excessive auxin accumulation in the intercalary meristem region[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 589.

Effects of *PagWOX11/12a* Gene on Stem Growth and Development of *Populus alba* × *P. glandulosa*

WEN Shuang-shuang¹, WANG Liu-qiang^{1,2}, LU Meng-zhu^{1,2,3}

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of the National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China; 2. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 3. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] To analyze the effects of *PagWOX11/12a* gene on the growth and development of poplar for further research on the regulation mechanism of this gene in woody plants. [Method] Bioinformatics methods and software were used to construct phylogenetic evolutionary tree, sequence alignment and biochemical characterization analysis. Tissue-specific expression patterns were analyzed by qRT-PCR. The phenotype of poplar after specifically suppressed the expression of *PagWOX11/12a* was analyzed by using transgenic plant *35S::PagWOX11/12a-SRDX* (DR). [Result] *PagWOX11/12a* gene could encode a protein with 255 amino acids, which was expressed in different tissues of 84K. The phenotypic analysis of DR transgenic plants showed that inhibiting the expression of this gene could reduce the length of phloem cells, pith cells and xylem fiber cells, inhibit internode elongation, and significantly reduced plant height compared with non-transgenic 84K. [Conclusion] *PagWOX11/12a* gene participates in regulating the height growth of poplar by affecting the elongation of internodes. This study provides a reference for further revealing the regulatory mechanism of *PagWOX11/12a* gene involved in the growth and development of poplar.

Keywords: *PagWOX11/12a*; *Populus alba* × *P. glandulosa*; internode elongation; plant height; functional analysis

(责任编辑: 张 研)