

马银花愈伤组织 *RoWUS* 基因及其启动子的克隆与表达分析

匡华琴, 刘生财, 陈裕坤, 赖钟雄*

福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建福州 350002

摘要 *WUSCHEL(WUS)* 基因是植物干细胞的标志基因。采用同源克隆法结合 RACE 技术从马银花愈伤组织中克隆得到 *RoWUS* cDNA 全长序列, 采用染色体步移法克隆得到该基因的启动子序列, 登录号分别为 KF365488、KF861578。马银花 *RoWUS* cDNA 全长 1 123 bp, 编码 302 个氨基酸; DNA 序列 2 001 bp, 包含 2 个内含子和 3 个外显子; 启动子序列 3 122 bp。生物信息学分析表明: *RoWUS* 亚细胞定位于细胞核, 是不稳定的亲水蛋白, 无信号肽, 具有跨膜结构, 包含 homeodomain 功能位点。系统进化树分析结果表明: *RoWUS* 单独形成一个分支, 与葡萄、大豆和苜蓿的亲缘关系最近。对 *RoWUS* 的启动子进行分析表明, 该启动子除了含有丰富的 TATA-box 和 CAAT-box 等基本元件以外, 还含有多个光响应元件、逆境胁迫响应元件、激素应答元件和其他功能元件。qPCR 结果表明: *RoWUS* 基因在马银花愈伤组织不同生长时期中呈先上升后下降的趋势, 在第 5 个继代周期时表达量最高。外源赤霉素和脱落酸浓度为 15 mg/L 时表达量最高, 说明 *RoWUS* 基因在该浓度时对赤霉素和脱落酸的响应最强。

关键词 马银花; 愈伤组织; *WUS*; 启动子; 基因克隆; 生物信息学分析; 荧光定量 PCR

中图分类号 S685.21

文献标识码 A

Cloning and qPCR Analysis of *RoWUS* Gene and Isolation of Promoter from Callus in *Rhododendron ovatum* Planch.

KUANG Huaqin, LIU Shengcai, CHEN Yukun, LAI Zhongxiong*

Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract The *WUSCHEL (WUS)* gene was a plant stem cell marker gene. The *RoWUS* gene was cloned from the callus of *Rhododendron ovatum* Planch by the homologous cloning and RACE technology (GenBank: KF365488). The complete cDNA sequence was 1 123 bp, encoding 302 amino acids. The DNA sequence of *RoWUS* was 2 001 bp which included 3 exons and 2 introns. The *RoWUS* promoter fragment was cloned from the callus of *R. ovatum* Planch by the genome walking (GenBank: KF861578), and the sequence was 3 122 bp. Bioinformatics analysis showed that the protein was likely a kind of hydrophilicity and unstable protein which located in the nucleus. The protein had transmembrane structure without signal peptide, which obtained a homeodomain functional site. The phylogenetic tree analysis showed that *RoWUS* has the closest relationship with *Vitis vinifera*, *Glycine max* and *Medicago truncatula*. The promoter software analysis showed that the promoter fragment contained a number of TATA-box, CAAT-box elements and many other promoter elements, such as light response elements, environmental stress response elements, hormone response elements and some function unknown elements. The qPCR results indicated that *RoWUS* showed a downward trend after the first rising at different culture stages in *R. ovatum* Planch callus. It expressed at the highest levels in the 5th cycle. The *RoWUS* gene had strong response under the hormone treatments of GA₃ and ABA, and the peak of expression level appeared at 15 mg/L GA₃ and ABA.

Key words *Rhododendron ovatum*; Callus; *WUSCHEL*; Promoter; Cloning; Bioinformatics; qPCR

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2014.10.017

植物干细胞是植物器官发育的源泉, 其产生的子细胞具有持续分裂能力并能进行自我更新, 是顶端生长过程中必不可少的^[1-4]。*WUSCHEL(WUS)* 基因能使它周围的细胞具有干细胞的特征, 是植物干细胞的决定基因, 该基因的表达与干细胞的形成和

器官的发生有密切关系^[5]。*WUS* 基因在茎端分生组织中心表达能诱导分生组织细胞增殖, 该基因编码一个同源异型结构域(homeodomain)蛋白, 此蛋白在多种生物中都存在, 参与发育过程并且决定细胞的类型^[5]。*WUS* 基因通过与转录阻遏物结合来抑制

收稿日期 2014-03-28

修回日期 2014-08-10

基金项目 福建省农业科技平台(No. 2008N2001); 国家科技支持计划资助项目(No. 2007BAD07B03)。

作者简介 匡华琴(1987年—), 女, 硕士; 研究方向: 花卉生物技术; *通讯作者(Corresponding author): 赖钟雄(LAI Zhongxiong), E-mail: Laizx01@163.com。

分化, 使茎端分生组织中的干细胞保持未分化状态, 既能保持干细胞的多能性特征, 又能维持分生组织的形态以及功能的完整, 在植物器官和组织的生长过程中对干细胞的维持和分化的调控起到极为重要的作用^[6-15]。最近的研究结果表明, *WUS* 基因在番茄花的形态发育、器官鉴别、花离层区和器官脱落过程以及控制番茄小室的数量中起到重要调控作用^[16-17]。*WUS* 突变体形成的茎端分生组织不具有正常功能, 可能导致叶序混乱、茎和花的分生组织提前终止等现象发生, 多数情况下花的大部分器官缺失只形成一个雄蕊, 不产生心皮^[18-19]。

马银花 (*Rhododendron ovatum* Planch) 是杜鹃花科 (Ericaceae) 杜鹃花属 (*Rhododendron*) 常绿灌木或小乔木, 为杜鹃花属中的中国特有种, 世界著名的观赏花卉。马银花主产江苏、浙江、广东、广西等省 (区) 海拔 1 000 m 以下的灌丛中, 除了具有很高的园林价值之外, 还具有一定的药用价值, 具有消热利湿的功效。目前已从拟南芥、番茄、萝卜等物种中克隆得到了 *WUS* 基因^[20-25], 但已分离出的木本植物 *WUS* 基因还相当少。迄今为止, 杜鹃花中还没有进行该基因的相关研究, 也还未见愈伤组织中克隆得到该基因的相关报道。为了深入研究 *RoWUS* 基因在马银花愈伤组织形成过程中对干细胞的维持和分化的调控作用, 本研究以马银花试管苗为材料诱导愈伤组织, 从愈伤组织中分离和克隆 *RoWUS* 基因及启动子, 对其进行生物信息学分析, 并通过 qPCR 法研究其在马银花愈伤组织生长过程中的表达规律及外源激素处理对该基因的表达情况, 为进一步探讨马银花 *RoWUS* 在愈伤组织形成过程中的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以福建农林大学园艺植物生物工程研究所提供的马银花 (*Rhododendron ovatum* Planch.) 无菌试管苗为材料诱导愈伤组织, 取继代 20 d 左右的松散愈伤组织用于总 RNA 的提取及后续试验。

1.2 方法

1.2.1 马银花愈伤组织 DNA 及总 RNA 的提取 愈伤组织 DNA 的提取采用改良 CTAB 法, 总 RNA 使用柱式植物 RNAOUT2.0 (TIANDZ) 试剂盒 (北京天恩泽公司) 提取, 然后运用超微量核酸检测仪 (ND lite) 检测样品浓度和纯度, 以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 和 RNA 完整性。

1.2.2 马银花愈伤组织 cDNA 合成 采用 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 试剂盒

的方法进行逆转录合成第一链 cDNA, 用于保守区及 3'-RACE 的扩增; 5'-RACE cDNA 第一链的合成参照 Clontech 公司 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒的说明书。

1.2.3 引物设计与 PCR 扩增 *RoWUS* 保守区引物设计及 PCR 扩增: 在 NCBI 数据库中获得拟南芥、大豆、甜橙、葡萄等的基因序列, 利用 DNA MAN6.0 软件对其进行同源比对分析, 在保守区域设计上下游引物 *RoWUS*-F、*RoWUS*-R, 以反转录第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应。

RoWUS 3'-RACE 和 5'-RACE 引物设计及 PCR 扩增: 根据已得到的 *RoWUS* 基因保守区核苷酸序列设计 2 条 3'-RACE 正向特异引物 *RoWUS* 3' GSP1、*RoWUS* 3' GSP2, 结合 GeneRacer™ 3' Primer 和 GeneRacer™ 3' Nested Primer 引物, 以反转录第一链 cDNA 为模板进行二轮 PCR 反应扩增 3' 末端序列; 再分别设计 2 条 5'-RACE 反向特异引物 *RoWUS* 5' GSP1、*RoWUS* 5' GSP2, 结合 UPM 引物, 以反转录得到的 5' 端 cDNA 为模板进行二轮 PCR 反应扩增 5' 末端序列。

RoWUS ORF 验证及 gDNA 引物设计及 PCR 扩增: 在拼接得到的马银花 *RoWUS* 全长序列的 3' 和 5' 端分别设计上下游特异引物 ORF-F、ORF-R, 以反转录第一链 cDNA 为模板对 ORF 进行验证。同时利用该 ORF 验证引物, 以马银花愈伤组织 DNA 为模板进行 PCR 扩增得到该基因的 DNA 序列。

RoWUS 启动子引物设计及 PCR 扩增: 在已克隆得到的 *RoWUS* DNA 序列的 5' 端设计 3 条同向特异引物 SP1、SP2、SP3。参照 Genome Walking Kit (TaKaRa) 的方法, 首先以 DNA 为模板, 用 SP1 与 AP1 进行第一轮热不对称 PCR 反应; 然后以第一轮 PCR 产物为模板, 用 SP2 与 AP1 进行第二轮热不对称 PCR 反应; 再以第二轮 PCR 产物为模板, 用 SP3 与 AP1 进行第三轮热不对称 PCR 反应。

所有引物均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。引物序列、退火温度、扩增目的片段大小及扩增用途见表 1。

PCR 扩增体系: *RoWUS* 基因克隆 PCR 体系为 cDNA 模板 1 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2 $\times$ Prime STAR® GC Buffer (Mg²⁺ plus) 12.5 μ L, dNTPs Mixture (2.5 mmol/L) 2 μ L, PrimeSTAR® HS DNA polymerase (2.5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 7.25 μ L, 总计 25 μ L。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。根据扩增的目的

片段大小不同 PCR 程序进行适当调整。启动子克隆 PCR 体系参考 Genome Walking Kit(Takara)说明书。

1.2.4 目的片段的回收、克隆和测序 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后割胶回收目的产物, 回收方法参照 Ezgene™ Gel/PCR Extraction Kit (BIOMIGA) 说明书。取 4 μ L 目的产物与 1 μ L pEASY™-Blunt Zero 进行连接, 然后转化至 50 μ L Trans-T1 感受态细胞, 挑取单克隆于菌液中过夜培养, 菌液经 PCR 鉴定后送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.2.5 马银花愈伤组织 *RoWUS* 基因的生物信息学分析及启动子序列分析 在 NCBI 数据库中对测序结果进行 BLAST 比对分析。使用 DNA MAN6.0 拼接序列并对其氨基酸序列进行推导。采用 ExPASy ProtParam 预测编码蛋白的理化性质; 以 PredictProtein 进行亚细胞定位; 蛋白质信号肽预测采用 SignalP 4.1 Server; 采用 TMpred 预测蛋白质跨膜结构; NetPhos 2.0 Serve 预测蛋白质磷酸化位点; ScanProsite 预测蛋白质的功能位点; 经 InterProScan 预测蛋白质的保守结构域; 以 PHD 在线软件预测蛋白质二级结构; 利用 SWISSMODEL 对三维结构进行预测; 采用 MEGA5.0 软件构建系统进化树。利用 Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 软件

对 *RoWUS* 基因可能的核心启动子位置及可能存在的转录起始位点进行分析; 使用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 结合 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.html>) 软件对该启动子序列潜在的顺式作用元件进行分析。

1.2.6 马银花愈伤组织不同生长时期 *RoWUS* 的定量表达分析 以 *EF-1a* 为内参基因, 检测 *RoWUS* 在马银花愈伤组织不同生长时期的表达情况。本试验采用 TaKaRa SYBR ExScript™ 试剂和罗氏 LightCycler480 仪器, 使用柱式植物 RNAOUT2.0 (TIANDZ) 试剂盒(北京天恩泽公司)提取马银花愈伤组织不同继代周期(第 1、3、5、7、9、40、45 代)的总 RNA, 并用 SYBR ExScript™ RT-PCR 试剂盒(TAKARA 公司)合成 cDNA, 根据荧光引物设计原则设计上下游引物进行 PCR 扩增。qPCR 反应体系和扩增程序参照 Lin 等的方法^[26]。反应结束后进行扩增曲线和溶解曲线等分析, 检测引物的特异性, 各不同生长时期的 cDNA 模板混合样以不同梯度稀释(5 $\times$ 、25 $\times$ 、125 $\times$ 、625 $\times$), 进行标准曲线制作, 获得扩增效率等相关参数。然后将不同生长时期的马银花愈伤组织 cDNA 分别稀释成 10 倍样进行荧光定量 PCR, 每个样本重复 3 次。qPCR 引物见表 1。

表1 基因克隆引物序列
Table 1 Primers used in gene cloning

引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度/℃	产物大小/bp	用途
<i>RoWUS</i> -F	TTTCTTTGCAGGCAAACCACTAC	51.5	199	保守区扩增
<i>RoWUS</i> -R	TCTCAGGAGCTTTATGGTTCTG			
<i>RoWUS</i> 3'GSP1	CAGATTTCAGAGGATCTCAGCTAGGCT	57.3	825	3'-RACE
<i>RoWUS</i> 3'GSP2	AGCTAGGCTTAGACAGTACGGC	55		
<i>RoWUS</i> 5'GSP1	GACCTAACTCCATTGTTGTAGTAGAGC	55.9	204	5'-RACE
<i>RoWUS</i> 5'GSP2	ACCTCGTACTGTTTGCTGCTGCAA	55.2		
ORF-F	CTGAACAATGGAATCTCAACAACAACC	55	909	ORF验证及 DNA扩增
ORF-R	TTCTGTAATCAGAGGACCACATGCC			
SP1	CTGCGGGACTGGTATTGATGATAGG	57.2		启动子扩增
SP2	GTGTTGGTGCTGGTGAACCTCTTCTT	57.3		
SP3	CCTTATCTGGTCAGTTGTCGGTGTCC	58.9		
<i>RoWUS</i> -qF	GGACACCAACAACAGTACCAG	59	130	荧光定量PCR
<i>RoWUS</i> -qR	TTACCCTCAATCTTGCCGTA	59		
GeneRacer™ 3'Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG			3'-RACE
GeneRacer™ 3'Nested	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG			
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCA AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT			5'-RACE

说明: M=A/C, R=A/G, W=A/T。

Note: M=A/C, R=A/G, W=A/T.

1.2.7 外源 GA_3 和 ABA 处理下 *RoWUS* 的定量表达分析 以 *EF-1a* 为内参基因, 检测马银花愈伤组织 *RoWUS* 在不同浓度 GA_3 (0、5、10、15、20 mg/L) 和 ABA (0、5、10、15、20 mg/L) 处理 24 h 后的表达情况。试验方法同 1.2.6。

2 结果与分析

2.1 马银花愈伤组织 *RoWUS* cDNA、gDNA 及启动子序列的获得

经巢式 PCR 扩增得到与预期一致的保守片段, 测序表明该序列长度为 199 bp, NCBI 数据库比对

结果表明, 该片段与蓖麻、葡萄、杨树、矮牵牛等的 *WUS* 基因序列具有较高的同源性, 初步推断克隆得到马银花愈伤组织 *RoWUS* 的部分序列。经二轮 PCR 扩增后分别得到 204 bp 5'-RACE 序列和 825 bp 3'-RACE 序列, 其中 5'-UTR 长度为 101 bp, 3'-UTR 长度为 94 bp, 终止密码子为 TAA, Poly (A) 尾长 18 bp。

序列拼接得到 *RoWUS* 全长序列为 1 123 bp, 对拼接结果进行 PCR 验证得到约 900 bp 目的片段, 测序表明验证产物长度为 922 bp, 包括完整的开放阅读框, 与拼接结果相符 (图 1、2)。将

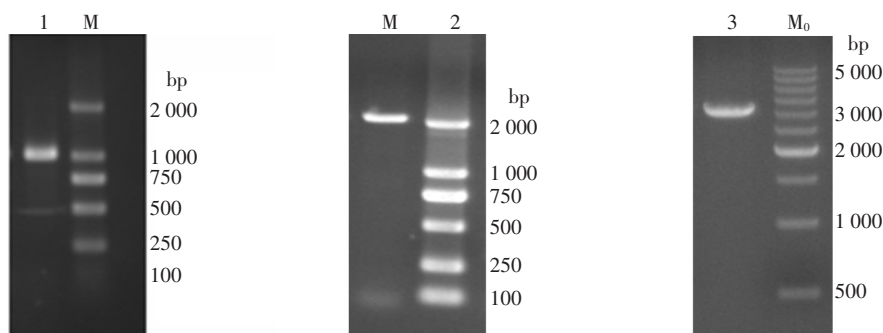
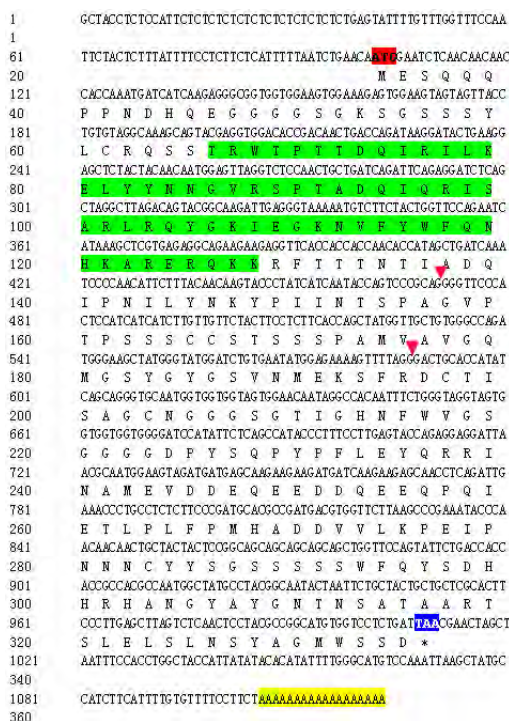


图1 *RoWUS* 的PCR扩增
M. DL 2 000 DNA Ladder; M₀. 500 bp DNA Ladder Marker; 1. *RoWUS*-开放阅读框; 2. *RoWUS*-DNA序列扩增; 3. *RoWUS*-启动子序列扩增。

图1 *RoWUS* 的PCR扩增
Fig. 1 PCR amplification of *RoWUS*



红色-起始密码子; 绿色-保守结构域; 蓝色-终止密码子; 黄色-PloyA尾巴结构; 三角形-内含子位置。

Red-initiation codon; Green- The conserved domain; Blue-termination codon; Yellow-PloyA; Pink triangles-The positions of introns.

图2 *RoWUS* cDNA 及其氨基酸序列
Fig. 2 *RoWUS* cDNA and amino acid sequence

RoWUS 的核苷酸序列在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 结果表明该序列与葡萄、毛果杨、番茄、向日葵的同源性分别达到 87%、86%、85%、84%, 说明所得片段为 *WUS* 基因, 将其命名为 *RoWUS*, GenBank 登录号: KF365488。

对马银花基因组 DNA 进行 PCR 扩增得到一条大约 2 000 bp 的片段(图 1), 测序表明该片段大小为 2 001 bp。DNAMAN 分析表明, 该序列包含 2 个内含子和 3 个外显子, 3 个外显子序列与 cDNA 序列一致, 在 DNA 序列上的位点分别是 1~370; 831~946; 1 579~2 001。所有内含子的剪切位点均符合真核生物“GT-AG”规则。

经三轮巢式 PCR 扩增得到约 3 500 bp 的启动子序列(图 1), 测序结果显示该片段长度为 3 427 bp。根据 DNA 序列拼接结果和 NCBI 比对结果, 表明所得序列为该基因的启动子序列, *RoWUS* 5'端调控序列长度为 3 122 bp, 该序列在 GenBank 上的序列号为 KF861578。

2.2 生物信息学分析

ProtParam 预测可知马银花 *RoWUS* 的分子式为 $C_{1444}H_{2186}N_{416}O_{477}S_{13}$, 由 4 536 个原子构成, 包括 302 个氨基酸, 相对分子量为 33.4 ku, 理论等电点(pI)5.81, 带正电的氨基酸(Arg+Lys)有 25 个, 带负电的氨基酸(Asp+Glu)有 30 个, 总平均疏水性为-0.830, 属于亲水蛋白, 此蛋白不稳定系数达到 58.52, 是一个不稳定蛋白。

SignalP 4.1 Server 预测可知马银花 *RoWUS* 蛋白无信号肽。经 TMpred 软件预测 *RoWUS* 在 164~183 处形成一个由内向外的跨膜螺旋。PredictProtein 亚细胞定位表明, *RoWUS* 定位于细胞核的可能性最高。根据 NCBI-CDS 对马银花愈伤组织 *RoWUS* 结构域分析的结果, 该蛋白属于同源异型结构域(homeodomain)蛋白超级家族, 包含 homeodomain 功能位点(图 2)。Coils 软件预测结果显示 *RoWUS* 可能形成卷曲螺旋。NetPhos 2.0 Serve 软件预测结果表明 *RoWUS* 含有 23 个蛋白磷酸化位点, 其中丝氨酸(Ser)13 个, 苏氨酸(Thr)3 个, 酪氨酸(Tyr)7 个。PHD 软件预测表明 *RoWUS* 二级结构以无规则卷曲结构为主, 所占的比例为 74.83%, 其次为 α 螺旋结构占 15.23%, 延伸链所占的比例较少, 为 9.93%。SWISSMODEL 三维结构预测显示, *RoWUS* 的主要结构元件是无规则卷曲、 α 螺旋和延伸链(图 3)。

将马银花 *RoWUS* 的氨基酸序列在 NCBI 中进行在线 Blast, 结果显示马银花 *RoWUS* 氨基酸序列

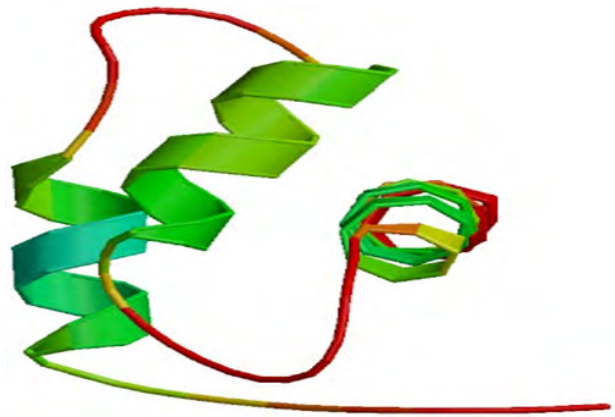


图3 *RoWUS*三维结构预测

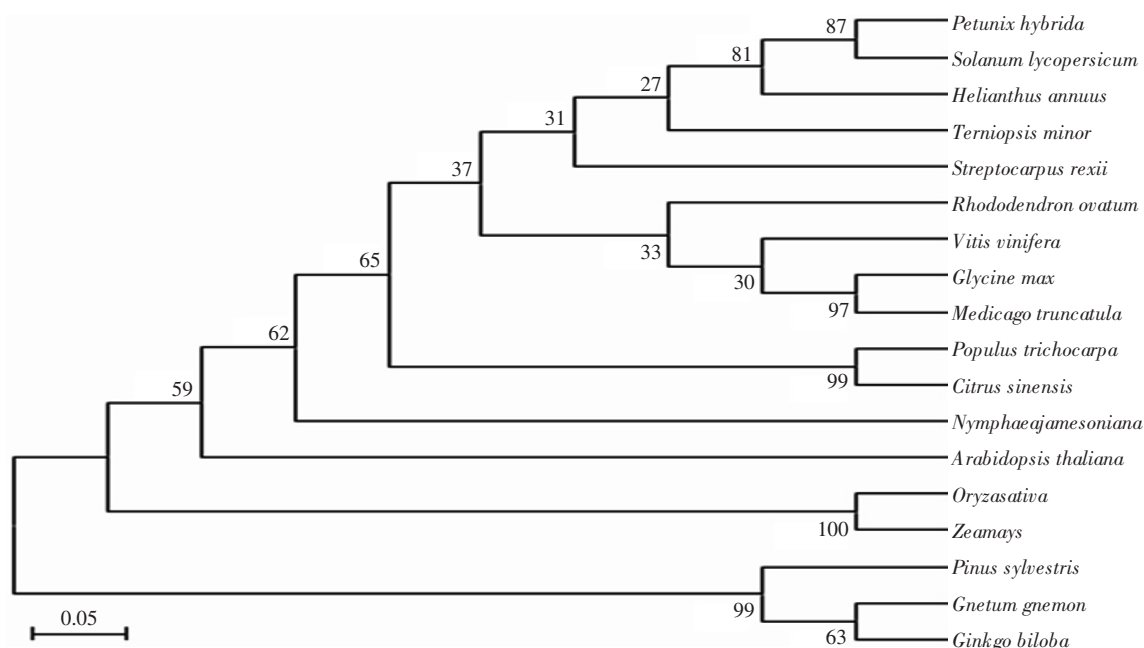
Fig. 3 Prediction of three-dimensional structure of *RoWUS*

与无油樟 (*Amborella trichopoda*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*) 的同源性分别达到了 93%、86%、79%、75%, 比对结果表明马银花 *RoWUS* 与其他物种该基因同源性较高。为了研究 *RoWUS* 的进化关系, 本研究选取大豆、葡萄、番茄、毛白杨、银杏等 18 种植物的 *WUS* 氨基酸序列, 运用 MEGA5.0 软件的邻位相连法(NJ)构建 *WUS* 的系统进化树(图 4)。进化结果表明, *WUSCHEL* 根据种属关系被分为两大类, 其中被子植物聚为一类、裸子植物聚为另一类。在被子植物中水稻和玉米等单子叶植物聚为一类, 其他双子叶植物聚为另一类。马银花单独形成一个分支, 与葡萄、大豆和苜蓿的亲缘关系较近, 与樟子松、银杏等裸子植物亲缘关系较远。

2.3 马银花 *RoWUS* 启动子序列及其结构分析

马银花 *RoWUS* 启动子具有 3 122 bp 的核苷酸序列, Neural Network Promoter Prediction 预测到该启动子具有多个核心启动子区域, 其中最可能的核心启动子区域为 GTCGTTTCATATATATTTATGCCGATCAATCTGATTTTCTCTGCGAT, 可能的转录起始位点位于翻译起始位点 ATG 上游的-1 381 bp 处的 T(将起始密码子 ATG 中的 A 定义为位+1)。

PlantCARE 顺式元件分析表明, 该序列存在大量的调控元件, 其中核心元件 TATA-Box 有 57 个、CAAT-Box 有 27 个。此外, 还存在多个光响应元件 AE-box、G-Box、I-box、L-box、AT1-motif、ATCT-motif、GAG-motif、GATA-motif、TCCC-motif、TCT-motif 和 Sp1; 激素应答元件 P-box、TATC-box、TCA-element、TGA-element 和 ABRE; 逆境胁迫响应元件 ARE、TC-rich repeat、MBS 及 circadian, 另外还存在一些其他功能的元件。



图中分支点的数字表示Bootstrap验证中基于1 000次重复该节点可信度的百分比。
The number at the nodes represents the reliability percent of bootstraps values based on 1 000 replications.

图4 基于氨基酸序列的*RoWUS*系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *RoWUS* based on the amino acid sequence

2.4 马银花愈伤组织不同生长时期 *RoWUS* 的定量表达分析

qPCR 结果经扩增曲线和溶解曲线分析结果表明, EF-1a 引物和 qPCR 引物特异性好, 标准曲线符合试验要求。马银花愈伤组织不同生长时期 *RoWUS* 的相对表达情况见图 5。由图 5 可以看出, *RoWUS* 在马银花愈伤组织各个继代周期都有表达, 且呈现先升高后下降的变化趋势, 最后趋于稳定状态。*RoWUS* 在第 1 代之后表达量缓慢上升, 第 3 代之后急剧上升, 在第 5 代时表达量达到峰值, 此时细胞处于分裂旺盛期。第 5 代之后表达量迅速下降, 从第 7 代之后表达量没有明显变化。

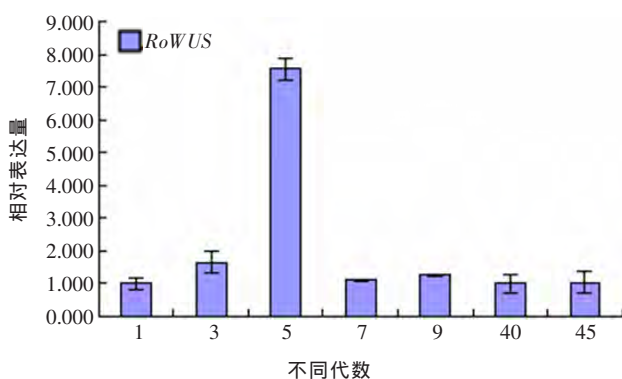


图5 马银花愈伤组织不同继代周期*RoWUS*的相对表达量
Fig. 5 Relative expressions of *RoWUS* in different subculture cycles of *Rhododendron ovatum* Planch

2.5 外源 GA₃ 和 ABA 处理下 *RoWUS* 的定量表达分析

马银花愈伤组织 *RoWUS* 在不同浓度赤霉素和脱落酸处理下的定量表达情况见图 6。试验结果表明, 赤霉素浓度较低时 *RoWUS* 的响应比较弱, 随着赤霉素浓度的升高 *RoWUS* 对赤霉素响应逐渐增强, 在浓度为 15 mg/L 时表达量达到峰值, 浓度进一步增加时又降低。这可能是试验所用的培养基中含有活性较高的细胞分裂素和一定浓度的生长素导致的。用低浓度脱落酸处理时 *RoWUS* 相对表达量较稳定, 但是当 ABA 浓度从 10 mg/L 增加到 15 mg/L 时 *RoWUS* 的相对表达量迅速上升, 在

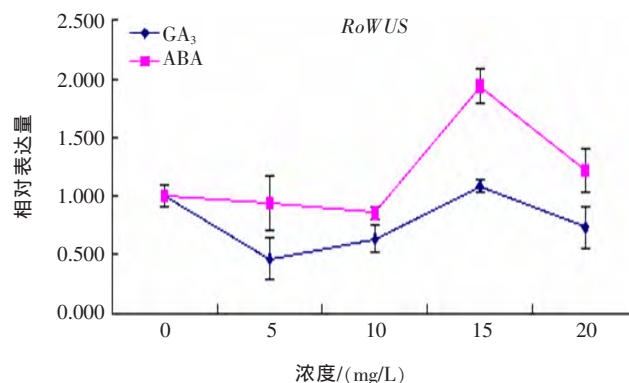


图6 不同激素处理下*RoWUS*的相对表达量
Fig. 6 Relative expressions of *RoWUS* under different hormone treatments

15 mg/L 时达到峰值。说明 *RoWUS* 在脱落酸浓度为 15 mg/L 时响应最强, 可以促进愈伤组织细胞快速分裂。

3 讨论与结论

3.1 马银花愈伤组织 *RoWUS* 的功能推测

对马银花 *RoWUS* 的氨基酸序列进行生物信息学分析发现马银花 *RoWUS* 蛋白具有跨膜螺旋, 不含信号肽, 属于可溶性的亲水蛋白。亚细胞定位表明, *RoWUS* 蛋白主要在细胞核内发挥作用, 这与谭文勃等^[5]的研究结论一致。马银花 *RoWUS* 结构域分析发现该蛋白属于同源异型结构域(homeodomain)蛋白超级家族, 包含 homeodomain 功能位点。研究发现多种生物中都存在同源异型结构域蛋白, 番茄、狗蔷薇等的 *WUS* 蛋白也含有高度保守的 homeodomain 结构域^[16,23], 该结构域可以以单体或异源二聚体的方式与 DNA 序列特异性结合, 参与真核生物的发育过程, 在茎尖分生组织中通过调控可塑性干细胞来决定细胞类型, 从而在许多器官的生长和发育过程中发挥重要的调控作用^[5]。

研究结果表明, *WUS* 基因能使其周围的细胞具有干细胞的特征, 是植物干细胞的决定基因^[5], 而本试验从马银花愈伤组织中分离得到 *RoWUS*, 表明存在 *WUS* 这个标志基因的表达, 说明马银花愈伤组织可能是干细胞。结构分析表明, *RoWUS* 蛋白具有与拟南芥相似的二三级结构, 都是由无规则卷曲、 α 螺旋和延伸链组成, 由此可以推测他们在功能方面具有相似性。林庆光等^[27-28]研究发现 *WUS* 的编码产物是调控植物干细胞数量的内源性信号分子, 在拟南芥体胚发生中起促进作用。Gallois 等^[29]的研究结果表明 *WUS* 的异位表达会在异位产生干细胞并且抑制这些干细胞的分化。因此, 在马银花愈伤组织的发生过程中, *RoWUS* 基因在干细胞维持和分化的调控途径中也可能起到极其重要的作用。

3.2 马银花 *RoWUS* 基因启动子的潜在功能

生物信息学软件预测表明, 马银花愈伤组织 *RoWUS* 启动子的转录活性受到多种环境因素和激素的诱导。预测结果显示 *RoWUS* 启动子包含多个调控区域, 这与 Baurle 等^[30]的研究结果一致, 这些调控区域在该基因的转录水平以及组织特异性方面起到重要的调控作用。植物干细胞的分化除了产生地上和地下器官以外, 也会根据内外环境信号来决定器官的发生、生长以及衰老等生物学过程。很多植物的侧根干细胞都是木质部顶端的中柱鞘细胞, 它们受生长素等因子的诱导, 被激活后进入细胞分裂过程^[31]。李传友等^[32]研究发现在拟南芥的侧根干

细胞和根尖生长点中, 生长素和激素在干细胞的建立和维持中起到重要作用。Shani 和 Castellano^[33-34]研究发现生长素是影响干细胞微环境的外源性信号, 能调控茎尖干细胞的分化、促进器官原基形成。马银花 *RoWUS* 启动子含有多种激素应答元件, 赤霉素对植物的各个生长发育阶段起到重要影响, 水杨酸在植物的抗旱、抗盐、抗病等逆境条件下起到重要调控作用^[35]。因此, 该启动子对马银花愈伤组织中干细胞的分化也可能具有一定的调控作用。

3.3 马银花愈伤组织不同生长时期 *RoWUS* 的表达模式

植物愈伤组织形成过程可分为诱导期、分裂期和分化期。在诱导期时, 外植体上已分化的活细胞在外源激素和其他刺激因素的作用下, 细胞的大小没有明显改变。在分裂期时细胞快速分裂成子细胞。当细胞继续培养时候, 愈伤组织细胞停止分裂, 进入分化期, 此时细胞的体积相对稳定, 不再减少, 生长旺盛的愈伤组织呈乳白色、白色或浅绿色, 老化的很容易转化为黄色或褐色^[36]。大量研究已经明确 *WUS* 基因可以促进细胞分裂。本研究中 *RoWUS* 基因在第 3 代以前相对表达量较低, 此时愈伤组织细胞较硬, 致密性强, 水分少, 细胞分裂能力较弱, 在培养基上生长很慢。从第 3 代以后 *RoWUS* 基因相对表达量迅速升高, 并在第 5 代达到最高峰, 此时愈伤组织细胞松软, 水分比较多而且透明, 说明此时大部分细胞处于分裂期, 细胞分裂能力强, 能快速分裂成小细胞。随着继代周期代数增加, *RoWUS* 基因相对表达量又迅速下降并趋于稳定, 说明大部分愈伤组织细胞处于分化期, 出现形态和功能各异的细胞。

3.4 外源 GA_3 和 ABA 促进马银花愈伤组织 *RoWUS* 的表达

许多研究结果表明, 增加细胞分裂素浓度和降低赤霉素浓度可以调控分生组织中 *WUS* 基因的表达, 这对于分生组织的保持和器官的形成是非常重要的^[37]。但高浓度细胞分裂素与低浓度赤霉素比值在茎顶端分生组织调控模式中也不是唯一的方式, 对于多数植物而言, 该模式可以促进器官分化。本研究中, 低浓度时 *RoWUS* 基因对赤霉素和脱落酸响应比较弱, 随着浓度的提高, *RoWUS* 基因对赤霉素和脱落酸的响应逐渐增强, 这可能是因为本试验采用的培养基配方中含有活性很强的细胞分裂素 TDZ 和一定浓度的生长素 NAA, 从而影响了细胞分裂素与低浓度赤霉素比值, 另外, 本研究采用的试验材料为愈伤组织, 与前人采用的材料不同, 这也可能是导致 *RoWUS* 的相对表达量随着激素浓度升高而上升的原因。*RoWUS* 的相对表达量在赤霉

素和脱落酸浓度为 15 mg/L 时达到峰值, 说明此浓度时该基因中 GA_3 和 ABA 元件的响应最强, 可以促进愈伤组织细胞快速分裂。当浓度进一步增加时, *RoWUS* 基因对赤霉素和脱落酸的响应又减弱, 可能是激素浓度过高时对愈伤组织产生了毒害作用。

参考文献

- [1] Carraro N, Peaucelle A, Laufs P, *et al.* Cell differentiation and organ initiation at the shoot apical meristem [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60: 811–826.
- [2] Singh M B, Bhalla P L. Plant stem cells carve their own niche[J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11: 241–246.
- [3] Sablowski R. The dynamic plant stem cell niches[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007a, 10: 639–644.
- [4] Sablowski R. Flowering and determinacy in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007b, 58: 899–907.
- [5] 谭文勃, 李玉花, 徐启江. 植物茎端分生组织中的干细胞调控机制[J]. *植物生理学通讯*, 2008, 44(4): 811–815.
- [6] Lenhard M, Bohnert A, Jorgens G, *et al.* Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*[J]. *Cell*, 2001, 105(6): 805–814.
- [7] Mayer K F, Schoof H, Haecker A, *et al.* Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem[J]. *Cell*, 1998, 95: 805–815.
- [8] Kiefer M, Stem Y, Cook H, *et al.* Analysis of the transcription factor *WUSCHEL* and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance[J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 560–573.
- [9] Fletcher J C. Coordination of cell proliferation and cell fate decisions in the angiosperm shoot apical meristem[J]. *BioEssays*, 2002, 24: 27–37.
- [10] Byrne M E, Kidner C A, Martienssen R A. Plant stem cells: divergent pathways and common themes in shoots and roots[J]. *Current opinion in Genetics and Development*, 2003, 13: 551–557.
- [11] Sharma V K, Carles C, Fletcher J C. Maintenance of stem cell populations in plants[J]. *PNAS*, 2003, 100: 11 823–11 829.
- [12] Morrison S J, Spradling A C. Stem cells and niches: mechanism that promote stem cell maintenance throughout life[J]. *Cell*, 2008, 132: 598–611
- [13] Harald Hedman, Tianqing Zhu, Sara von Arnold, *et al.* Analysis of the *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* gene family in the conifer *Picea abies* reveals extensive conservation as well as dynamic patterns[J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13: 89–98.
- [14] Lian G B, Ding Z W, Wang Q, *et al.* Origins and Evolution of *WUSCHEL* -Related Homeobox Protein Family in Plant Kingdom[J]. *The Scientific World Journal*, 2014, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/534140>.
- [15] Judith N, Wolfgang W. Symplesiomorphies in the *WUSCHEL* clade suggest that the last common ancestor of seed plants contained at least four independent stem cell niches[J]. *New Phytologist*, 2013, 4: 1 081–1 092.
- [16] Wang X, Wang X G, Ren J P, *et al.* Characterization of Tomato Transcription Factor *WUSCHEL* and Functional Study in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2012, 11(8): 1 257–1 265.
- [17] Liu Y, Li H, Zhang Q B, *et al.* *Wuschel* and *W40* Expression Analysis Undergoing Different *Lc* Locus Background in Tomato[J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 10.4028/www.scientific.net/AMR.864–867.571.
- [18] 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: 635–644.
- [19] Laux T, Mayer K F, Berger J, *et al.* The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 1996, 122(1): 87–96.
- [20] 王增, 代茹, 张江巍, 等. 拟南芥 *WUSCHEL* 蛋白的原核表达、亲和纯化和多克隆抗体制备[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(9): 1 409–1 416.
- [21] 马光, 郭继平, 高小宽, 等. 萝卜干细胞决定基因 *WUS* 的电子克隆与序列分析[J]. *生物技术*, 2012, 22(4): 46–49.
- [22] Dai R, Jin H P, Wang Z, *et al.* Cloning and Characterization of *WOX4* Gene from *Vitis vinifera* L. Involved in Stem Cell Regulation[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(12): 1 861–1 871
- [23] 姜福星, 刘凤来, 赵梁军. 狗蔷薇 *RoWUS* 基因的超量表达诱导转基因烟草根尖形成不定芽[J]. *林业科学*, 2011, 47(12): 43–52.
- [24] 姜福星, 刘凤来, 马男, 等. 狗蔷薇 *RoWUS* 基因组成型表达对烟草叶片形态的影响[J]. *核农学报*, 2012, 26(2): 0262–0269.
- [25] 杨晓慧, 张有慧, 张志毅, 等. 毛白杨干细胞决定基因 *Wuschel* 的克隆及其单核苷酸多态性分析[J]. *林业科学*, 2009, 45(1): 43–49.
- [26] Lin Y L, Lai Z X. Reference genes selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree[J]. *Plant Science*, 2010, 178(4): 359–365.
- [27] 林庆光, 崔百明, 彭明. 拟南芥 *WUSCHEL* 基因植物表达载体的构建及对烟草的转化[J]. *热带农业科学*, 2007, 27(3): 17–23.
- [28] Laux T, Mayer K F, Berger J, *et al.* The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 1996, 122(1): 87–96.
- [29] Gallois J L, Nora F R, Mizukami Y, *et al.* *WUSCHEL* induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem[J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 375–380.
- [30] Baurle I, Laux T. Regulation of *WUSCHEL* transcription in the stem cell niche of the *Arabidopsis* shoot meristem[J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 2 271–2 280.
- [31] De S I, Zhang H, Iiz D, *et al.* A novel role for abscisic acid emerges from underground[J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11: 434–439.
- [32] 李传友. 生长素调控植物根尖干细胞维持研究取得重要进展[J]. *遗传*, 2011, 33(2): 146.
- [33] Shani E, Yanai O, Ori N. The role of hormones in shoot apical meristem function[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006, 9(5): 484–489.
- [34] Castellano M, Sablowski R. Intercellular signalling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(1): 26–31.
- [35] 孟雪娇, 邱昆, 丁国华. 水杨酸在植物体内的生理作用研究进展[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(15): 207–214.
- [36] 王蒂. 植物组织培养[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010, 39.
- [37] RaVaella M, Paola T, Michael M, *et al.* *WUS* and *STM* homologs are linked to the expression of lateral dominance in the acaulescent *Streptocarpus rexii* (Gesneriaceae)[J]. *Planta*, 2009, 230: 529–542.

责任编辑: 叶庆亮