

杜仲 WOX 家族基因鉴定及在叶片发育中的表达

刘俊^{1,2,3}, 李龙⁴, 陈玉龙¹, 陈随清⁵

(1. 河南中医药大学 中医药科学院 河南省中医方证信号传导重点实验室, 河南 郑州 450046; 2. 国际竹藤中心 国家林业和草原局/北京市共建竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102; 3. 国际竹藤中心 安徽太平试验中心, 安徽 黄山 245716; 4. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 5. 河南中医药大学 药学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 【目的】Wuschel (WUS) 相关的同源异型盒 (Wuschel-related homeobox, WOX) 转录因子家族在植物生长发育中发挥重要作用。本研究旨在探索 WOX 转录因子在杜仲 *Eucommia ulmoides* 中的分布及表达特征。【方法】以杜仲基因组数据库为基础, 利用生物信息学方法对杜仲 WOX 家族进行全基因组鉴定; 基于转录组数据分析 *EuWOXs* 在叶片发育及杜仲胶形成中的表达特征, 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 *EuWOXs* 在‘紫叶’杜仲 ‘Ziye’ 叶片不同发育时期的表达模式。【结果】杜仲基因组中共鉴定出 8 条 *EuWOXs*, 分布于 8 条染色体; *EuWOXs* 蛋白质长度为 182~352 个氨基酸, 理论等电点为 5.10~6.47, 分子量为 20.7~40.4 kDa; 亚细胞定位预测 *EuWOXs* 均定位在细胞核中, 均为亲水性蛋白。根据系统进化关系, 杜仲 WOX 家族包括 3 个亚家族, 分别含 2、1 和 5 个 *EuWOXs* 基因。*EuWOXs* 均含有内含子, 并包含多个基序, 启动子中富含激素、胁迫和光周期响应元件。大部分 *EuWOXs* 在杜仲叶片中表达量较低, *EuWOX13-1* 随叶片发育表达量逐渐降低, *EuWOX13-2* 在生长叶中表达量最高。【结论】杜仲中有 8 个 *EuWOXs* 基因, *EuWOX13-1* 和 *EuWOX13-2* 可能在杜仲叶片发育中发挥重要作用。图 10 表 2 参 50

关键词: 杜仲; WOX 家族基因; 生物信息学分析; 基因表达; 叶片发育

中图分类号: S718.4; Q754 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2023)01-0001-11

Identification of WOX gene family and their expression in the leaf development of *Eucommia ulmoides*

LIU Jun^{1,2,3}, LI Long⁴, CHEN Yulong¹, CHEN Suiqing⁵

(1. Henan key Laboratory of TCM Prescription and Syndrome Signaling, Academy of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China; 2. State Forestry and Grassland Administration/Beijing Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China; 3. Anhui Taiping Experimental Station, International Center for Bamboo and Rattan, Huangshan 245716, Anhui, China; 4. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 5. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China)

Abstract: [Objective] This study is aimed to explore the distribution and expression characteristics of WOX (Wuschel-related homeobox) transcription factors in *Eucommia ulmoides* as they play an important role in plant growth and development. [Method] First, bioinformatics method was employed to identify the genome-wide of *EuWOX* gene family on the basis of *E. ulmoides* genome database. Then an analysis was conducted of the expression levels of *EuWOXs* in *E. ulmoides* leaf development and Eu-rubber formation based on transcriptomic

收稿日期: 2021-11-03; 修回日期: 2022-05-15

基金项目: 河南省科技研发计划联合基金项目 (222301420074); 河南省高等学校重点科研项目 (22A360005); 国际竹藤中心安徽太平试验中心开放课题基金 (1632021006-4); 国家林业和草原局/北京市共建竹藤科学与技术重点实验室开放基金 (ICBR-2020-05); 河南中医药大学博士科研启动基金项目 (RSBSJJ2019-04)

作者简介: 刘俊 (ORCID: 0000-0003-0468-5927), 助理研究员, 从事药用植物分子生物学研究。E-mail: liujun_0325@163.com

data. At last, the expression patterns of *EuWOXs* at different developmental stages of *E. ulmoides* ‘Ziye’ leaves were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). [Result] Eight *EuWOXs* were identified in *E. ulmoides* genome, distributing in eight chromosomes and they were composed of 182–352 amino acid residues with their isoelectric points being 5.10–6.47 and molecular weight between 20.7 to 40.4 kDa. According to the subcellular localization prediction, *EuWOXs* were all hydrophilic proteins and located in the nucleus. *EuWOX* gene family was divided into three subfamilies, containing two, one and five *EuWOX* genes respectively. All *EuWOX* genes had introns, and each *EuWOX* protein contains multiple motifs. *EuWOXs* promoters contained multiple hormones, stress and photoperiod response elements. The expression level of most *EuWOXs* in *E. ulmoides* leaves was low and the expression of *EuWOX13-1* gradually decreased with leaf development whereas the *EuWOX13-2* expression was the highest in growing leaves. [Conclusion] Of the eight *EuWOXs* genes in *E. ulmoides*, *EuWOX13-1* and *EuWOX13-2* may play important roles in the leaf development of *E. ulmoides*. [Ch, 10 fig. 2 tab. 50 ref.]

Key words: *Eucommia ulmoides*; WOX gene family; bioinformatics analysis; gene expression; leaf development

Wuschel-related homeobox (WOX) 是植物特有的新型转录因子, 属于 Homeobox (HOX) 超家族, 包含由 60~65 个氨基酸组成的螺旋-环-螺旋-转角-螺旋的保守结构域。WOX 家族基因分为 3 个独立进化支, 即现代进化支 (modern clade, WUS), 中间进化支 (intermediate clade) 和远古进化支 (ancient clade)^[1-3], 其中 WUS 是最早发现的 WOX 家族成员^[4]。WOXs 蛋白在植物胚胎形成^[5]、干细胞维持^[6] 和花发育^[7] 等方面发挥重要作用。拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中 WOX 家族有 15 个成员, 分别是 AtWUS 和 AtWOX1~AtWOX14^[4], 其中, AtWOX10、AtWOX13 和 AtWOX14 蛋白属于远古进化分支, AtWUS 和 AtWOX1~7 等 8 个蛋白质属于 WUS 分支, AtWOX8、AtWOX9、AtWOX11 和 AtWOX12 蛋白属于中间进化分支。AtWUS 在胚珠、花药和茎尖分生组织中表达, 是维持中央分生组织的关键基因, AtWOX11 和 AtWOX12 参与新生根器官发生, 在顶端分生组织发育阶段, AtWUS 参与干细胞稳态维持^[8]。超表达 AtWUS 促进棉花 *Gossypium hirsutum* 体细胞胚胎发育和器官发生^[9]。水稻 *Oryza sativa* 中, OsWOX11 激活冠根的萌发和生长, 过表达 OsWOX11 可促进雌蕊增加^[10]; OsWOX3A 参与水稻叶片、小穗、分蘖和侧根的发育^[11]; 在茎顶端分生组织和腋分生组织中 OsWOX4 正调控干细胞^[12]。超表达 WOX11 (*PeWOX11a* 和 *PeWOX11b*) 或 WOX11/12a 增加转基因植株不定根数量^[13-14]。在小麦 *Triticum aestivum* 中超表达 TaWUS 影响外花轮状器官发育, TaWOX9 促进转基因拟南芥根的发育^[15]。

WOXs 转录因子不仅调控植物生长发育, 而且参与胁迫响应。在水稻中 OsWOX12A 和 OsWOX12B 等基因的表达受干旱、寒冷和盐胁迫差异调控, 超表达 OsWOX11 通过促进根毛生长发育提高转基因植株干旱胁迫耐受性^[16-17]。84K 杨树 *Populus alba*×*P. glandulosa* 中, 干旱胁迫诱导 PagWOX11/12a 基因强烈表达, 促进根系伸长和生物量生长, 上游调控因子 PagERF35 激活 PagWOX11/12a 表达^[18], PagWOX11/12a 通过调控 PagCYP736A12 基因表达, 调节活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 清除, 提高杨树耐盐性^[19]。

杜仲 *Eucommia ulmoides* 是杜仲科 Eucommiaceae 杜仲属 *Eucommia* 的落叶乔木, 为中国二级保护植物, 叶片、树皮和果皮中富含杜仲胶, 是重要的胶用和药用经济树种, 具有极高的开发利用价值^[20]。杜仲叶片中含有绿原酸、黄酮类、木脂素类、环烯醚萜类、 α -亚麻酸等药用成分, 具有抗疲劳、抗衰老、抗肿瘤、增强免疫力等重要作用^[21-22]。鉴于 WOX 基因在拟南芥、水稻、玉米 *Zea mays*、杨树、油菜 *Brassica napus*、铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 等中的作用, 推测 WOX 家族基因可能在杜仲叶芽的形成和激活过程中起关键作用。本研究以杜仲基因组数据为基础, 对杜仲 WOX 家族基因进行了全基因组鉴定和生物信息学分析, 基于转录组分析 WOX 在杜仲叶片不同发育时期以及杜仲胶形成中的表达模式, 利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测杜仲 WOX 基因 (*EuWOXs*) 在 ‘紫叶’ 杜仲 ‘Ziye’ 叶片发育中的表达水平, 以期对 *EuWOXs* 功能的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

自西北农林科技大学苗圃(陕西杨凌),取生长正常长势一致的 2 年生‘紫叶’杜仲幼苗的叶芽(茎尖)、生长叶(3 cm 长叶片)、幼叶(完全展开的新叶),用液氮迅速处理,置于-80 ℃ 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 杜仲 WOX 蛋白(EuWOXs)的鉴定及理化性质分析 拟南芥 WOX 蛋白序列下载于 TAIR 数据库(<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>),根据 Pfam 号(PF00046)在杜仲基因组数据库中筛选出 WOX 家族基因候选序列,利用美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的保守结构域搜索服务(Conserved Domain Search Service, CD Search)检测蛋白质保守结构域,筛选出具有完整 WOX 结构域的蛋白质作为 EuWOX 家族成员,利用生物信息学方法^[23]分析 EuWOXs 的理化性质。

1.2.2 杜仲 WOX 家族基因染色体定位及系统进化分析 通过杜仲基因组数据库搜索 WOX 基因在染色体上的位置及每条染色体长度,利用 MapGene2Chromosome v2(http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/)软件绘制 WOX 家族基因染色体定位。利用 DNAMAN 进行蛋白序列比对,通过 Clustal X 1.83 对杜仲、拟南芥、毛果杨、水稻和玉米 WOXs 蛋白进行多序列比对,利用 MEGA 6.0 邻接法(neighbor-joining),重复次数设置为 1 000 次^[24],构建系统发育树,根据拟南芥同源基因对 EuWOXs 蛋白命名。

1.2.3 EuWOXs 的结构、基序及启动子分析 利用 GSDS(<http://gsds.gao-lab.org/index.php>)软件分析 EuWOXs 的内含子和外显子分布。利用 MEME(<http://meme-suite.org/>)软件分析 EuWOXs 基序,参数设置为: any number of Repetitions, maximum number of Motifs=20, minimum width≥6, and maximum width≤50。分离 EuWOXs 启动子(ATG)上游 2 000 bp 序列,利用 Plant CARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析 EuWOXs 启动子顺式作用元件。

1.2.4 EuWOXs 的表达模式分析 从 NCBI 的 Short Read Archive (SRA) 数据库中下载‘秦仲 1 号’‘Qinzhong No.1’叶片不同发育时期(叶芽、初生叶、幼叶、老叶)(版本号: SRP218063)^[25]及高产胶杜仲品种‘秦仲 2 号’‘Qinzhong No.2’、低产胶杜仲品种‘小叶’‘Xiaoye’(版本号: SRP158357)^[26]的转录组数据,使用每 1 百万个映射上的碱基中映射到外显子的每 1 千个碱基上的碱基个数(fragments per kilobase million, FPKM)值表示 EuWOXs 相对表达丰度,取对数(log₂)进行统计分析,利用 TBtools 工具绘制基因表达图谱^[27]。

使用 Trizol(天根 DP424)提取 RNA,反转录成 cDNA,通过 Primer 3.0 软件设计 EuWOXs 特异性引物(引物序列见表 1),通过 Quant Studio 6(新加坡 Life Technologies 公司), All-in-One SYBR Premix EX Taq™ kit(美国 Gene Copoeia 公司)进行实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)反应,10 μL 反应体系: 2× mix 5.00 μL、正向引物/反向引物各 0.25 μL、cDNA 2.00 μL、ROX 0.20 μL、双蒸水 2.30 μL。反应程序: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 10 s, 72 ℃ 延伸 20 s, 45 个循环。以 UBCE2 为内参基因^[26],通过 2^{-ΔΔC_t}法对 3 次生物学重复进行数据分析。

1.2.5 EuWOXs 蛋白互作关系分析 通过 STRING 软件(<https://string-db.org/>)上传 EuWOXs 蛋白质序列,利用拟南芥数据库,根据拟南芥 WOXs 蛋白已知互作关系,预测 EuWOXs 互作蛋白,通过 Cytoscape 3.7.0 软件对 EuWOXs 蛋白质互作信息进行评估和预测^[28]。

2 结果与分析

2.1 杜仲 WOX 家族基因鉴定及其蛋白质理化性质

由表 2 可知:从杜仲基因组中共鉴定到 8 个 EuWOXs,分布在 8 条染色体上(图 1);均含有 HD 保守结构域,其中 EuWOX1 序列最长,编码 352 个氨基酸, EuWOX13-2 序列最短,编码 191 个氨基酸。EuWOXs 分子量为 22.12~40.36 kDa, EuWOX11 等电点最小,为 5.62, EuWOX4-1 等电点最大,为 9.04;亚细胞定位预测结果显示: EuWOXs 均定位在细胞核中,均为亲水性蛋白。

2.2 EuWOXs 的保守结构域

利用 DNAMAN 软件对 8 个 EuWOXs 及 12 个拟南芥 WOXs 蛋白(AtWOXs)保守结构域进行序列分

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences		
基因名	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>EuWOX1</i>	ATGGTGGGTGACCAGCTTAG	TTCTCTGGCCTTGTGGTTCT
<i>EuWOX2</i>	ACCGTACCCCAACCTACTCC	ACTTCCCGTTGGATGAAGTG
<i>EuWOX4-1</i>	GGAACCCTACGCAAGAACAG	GCGCTTCTGCTTTTGTCTCT
<i>EuWOX4-2</i>	TAGAGCAGATCACGGCACAG	CTAGGGTCGGATGTTGGAGA
<i>EuWOX5</i>	GACGGAGCAAGTGAGAGTCC	TCTCCCGTGCCCTATGATTC
<i>EuWOX11</i>	ACTCGAGTTTGTGGCCTGT	AATTGGAGGCATCTGGATTG
<i>EuWOX13-1</i>	GGTCTGAGGGCATGTGTTTT	TTGGAGATATGGGTGGTGGT
<i>EuWOX13-2</i>	GGGTTGTTTCGTCAAGGTCAT	GTTGGAATCCACCGTTGTCT
<i>UBCE2</i>	AGTGGGTGGTGTGTAGTCC	AACTCCCGTTTCGTTTGTG

表 2 *EuWOXs* 蛋白质序列特征及亚细胞定位

Table 2 Sequence characteristics and subcellular location of <i>E. ulmoides</i> WOX proteins										
基因号	基因名	拟南芥同源基因	染色体	位置	CDS长度/ bp	氨基酸数/ 个	分子量/ kDa	等电点	亚细胞定位	
EUC13591-RA	<i>EuWOX1</i>	AT3G18010.1	Super-Scaffold_235	3 540 694-3 544 292	1 059	352	40.36	5.78	细胞核	
EUC12552-RA	<i>EuWOX2</i>	AT5G59340.1	Scaffold912_obj	156 744-159 059	810	269	30.16	8.11	细胞核	
EUC15721-RA	<i>EuWOX4-1</i>	AT1G46480.1	Super-Scaffold_242	604 979-606 289	618	205	23.48	9.04	细胞核	
EUC21176-RA	<i>EuWOX4-2</i>	AT1G46480.1	Scaffold272_obj	37 477-39 280	642	213	24.31	8.82	细胞核	
EUC18832-RA	<i>EuWOX5</i>	AT3G11260.1	Super-Scaffold_117	336 319-340 482	549	182	20.70	6.92	细胞核	
EUC00362-RA	<i>EuWOX11</i>	AT3G03660.1	Super-Scaffold_154	68 808-70 507	765	254	27.67	5.62	细胞核	
EUC00756-RA	<i>EuWOX13-1</i>	AT4G35550.1	Super-Scaffold_233	319 468-325 733	810	269	30.42	6.22	细胞核	
EUC02503-RA	<i>EuWOX13-2</i>	AT4G35550.1	Super-Scaffold_71	6 332 599-6 364 092	576	191	22.11	6.54	细胞核	

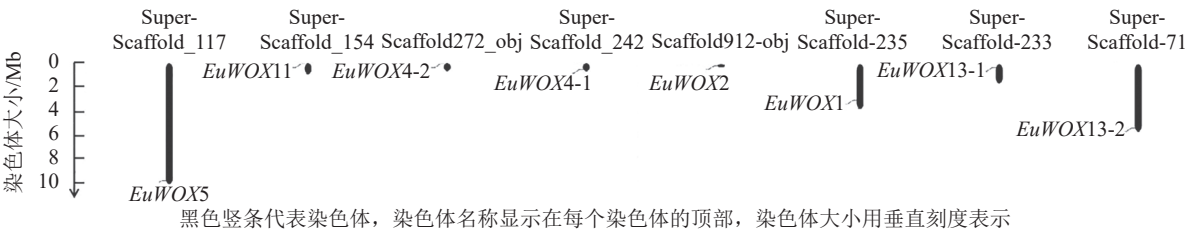


图 1 *EuWOXs* 染色体位点

Figure 1 Chromosome site of *EuWOXs* genes

析。结果(图 2)显示: WOXs 蛋白质 HD 结构域氨基酸及其分布具有显著的相似性,均包含由 60 个氨基酸组成的螺旋-环-螺旋-转角-螺旋,螺旋较环和转角保守。谷氨酰胺(Q)、亮氨酸(L)和脯氨酸(Pro)是螺旋 I(Helix I)结构域的保守氨基酸,脯氨酸、异亮氨酸(Ile)和亮氨酸是螺旋 II(Helix II)结构域的保守氨基酸,相比之下,螺旋 III(Helix III)结构域最为保守,其中保守氨基酸有天冬酰胺(N)、缬氨酸(V)、色氨酸(W)、苯丙氨酸(F)、谷氨酰胺、天冬酰胺和精氨酸(R)。EAR-like 仅存在于 *EuWOX1*、*EuWOX2*、*EuWOX4-1*、*EuWOX4-2*和 *EuWOX5* 中,属于 WUS,暗示 *EuWOXs* 在进化过程中具有保守性。

2.3 不同物种 WOX 家族蛋白的系统发育树

对 8 个杜仲 *EuWOXs*、15 个拟南芥 *AtWOXs*、18 个毛果杨 *Populus trichocarpa* WOX 蛋白(PotriWOXs)、13 个水稻 *OsWOXs*、20 个玉米 *ZmWOXs* 的蛋白质序列进行多重比对,构建无根系统发育树。结果如 图 3 所示: 74 个 WOXs 蛋白共分为 3 组[远古进化支、中间进化支和现代进化支(WUS)],其中远古进化支含有 12 个 WOXs 蛋白,中间进化支含 22 个 WOXs 蛋白,现代进化支包含的蛋白数量最多,共有 40 个。8 个 *EuWOXs* 中, *EuWOX13-1* 和 *EuWOX13-2* 属于远古进化支, *EuWOX11* 属于中间进化支, *EuWOX1*、*EuWOX2*、*EuWOX5*、*EuWOX4-1* 和 *EuWOX4-2* 等 5 个蛋白质属于

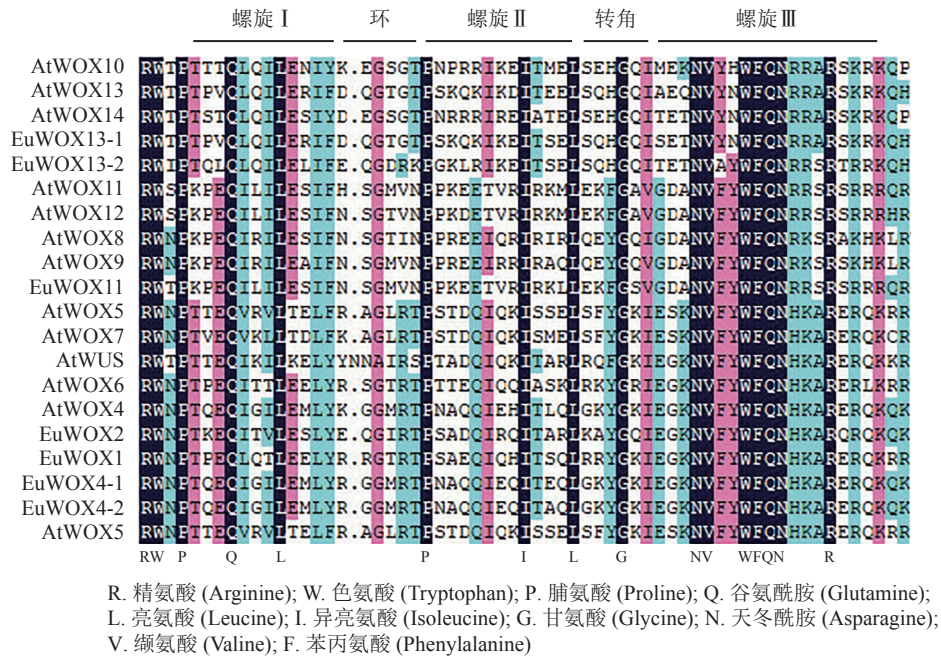


图 2 拟南芥和杜仲 WOXs 的蛋白质同源结构域序列分析

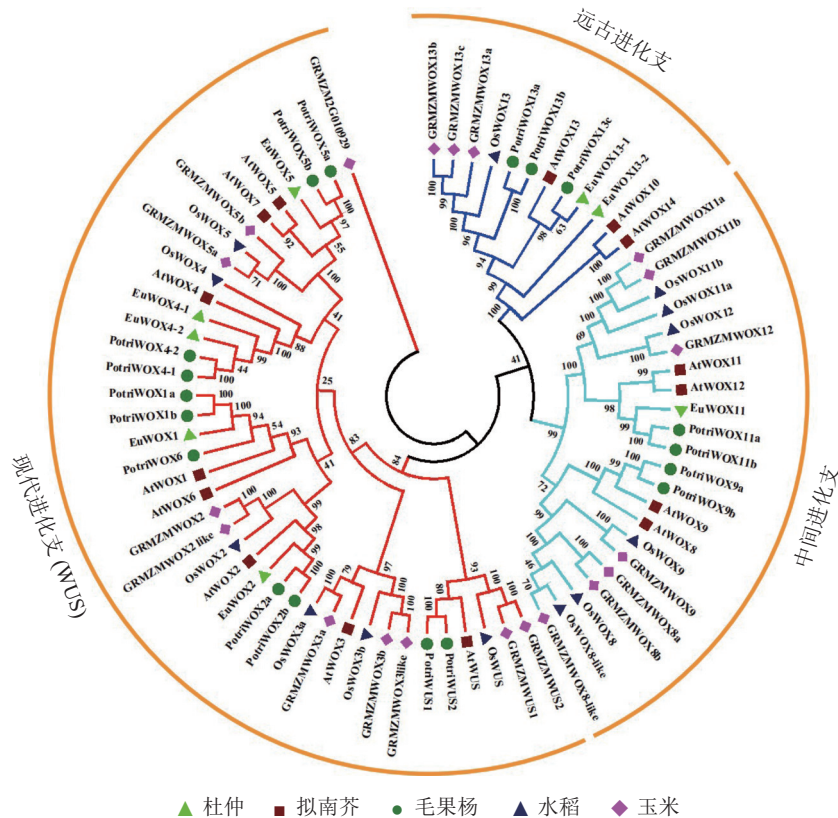
Figure 2 Sequence analysis of WOX proteins homeo domain in *A. thaliana* and *E. ulmoides*

图 3 杜仲、拟南芥、毛果杨、水稻和玉米 WOXs 蛋白系统发育树

Figure 3 WOX proteins phylogenetic trees of *E. ulmoides*, *A. thaliana*, *P. trichocar*, *O. sativa* and *Z. mays*

WUS。进化结果显示：杜仲与毛果杨亲缘关系最近。

2.4 *EuWOXs* 基因结构及蛋白质的保守结构域

利用 GSDS 软件构建 *EuWOXs* 基因内含子-外显子结构图，结果如图 4 显示：*EuWOXs* 含有 1~3 个内含子，*EuWOX13-2*、*EuWOX2* 和 *EuWOX5* 基因含有 2 个外显子，*EuWOX11*、*EuWOX13-1*、*EuWOX4-1* 和 *EuWOX4-2* 含有 3 个外显子，*EuWOX1* 含有 4 个外显子。不同进化分支基因结构差异显著，同一分支

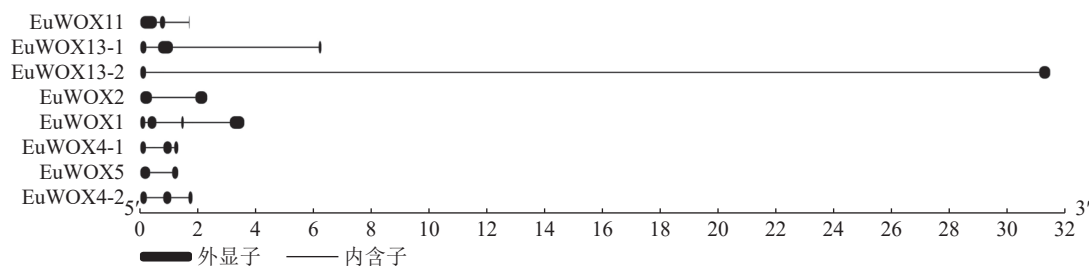


图4 杜仲 WOX 家族基因的结构分析

Figure 4 Structural analysis of WOX gene family in *E. ulmoides*

基因结构也存在差异。属于中间进化支的 *EuWOX11* 含有 3 个外显子，同属远古进化支的 *EuWOX13-1* 和 *EuWOX13-2* 分别含有 3 个和 2 个外显子，在 WUS 中，*EuWOX2* 和 *EuWOX5* 含有 2 个外显子，*EuWOX4-1* 和 *EuWOX4-2* 含有 3 个外显子，而 *EuWOX1* 含有 4 个外显子。

蛋白质保守基序分析显示：*EuWOXs* 含有 10 个保守基序，分别命名为 Motif 1~Motif 10 (图 5)，其中 Motif 1 和 Motif 2 最为保守，是 WOX 的核心基序，存在于所有 *EuWOXs* 中。Motif 6 较为保守，存在于 4 个 *EuWOXs* 蛋白质 (*EuWOX4-2*、*EuWOX2*、*EuWOX1* 和 *EuWOX5*) 中。相同分支 *EuWOXs* 含有相似的保守基序，不同分支 *EuWOXs* 基序之间存在显著差异，Motif 4~Motif 10 只存在于现代进化分支，Motif 3 只在 *EuWOX13-1* 和 *EuWOX13-2* 蛋白质中存在。

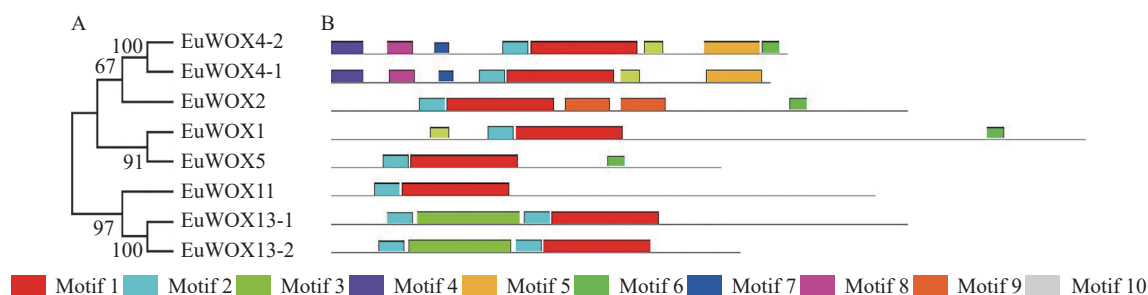


图5 杜仲 WOX 基因家族保守基序分析

Figure 5 Conserved motifs analysis of *E. ulmoides* WOX gene family

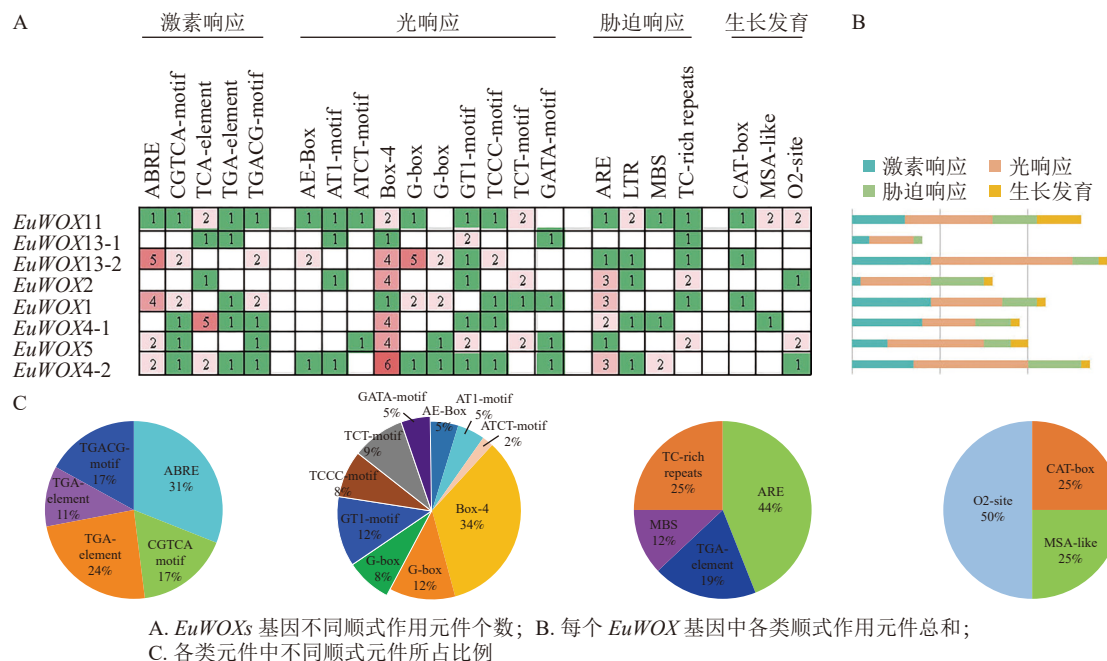
2.5 杜仲 *EuWOXs* 启动子顺式作用元件分析

顺式作用元件分析结果 (图 6) 显示：*EuWOXs* 启动子中主要包括脱落酸 (ABRE) 和水杨酸反应元件 (TCA-element)、厌氧响应元件 (ARE)、光响应元件 (Box 4) 及玉米蛋白代谢调节元件 (O2-site)。所有顺式作用元件中光响应元件最多，达 77 个，其中 Box 4 元件有 26 个，所占比例是 34%；G-box 和 GT1-motif 元件均有 9 个，占比为 12%，表明 *EuWOXs* 基因表达可能与光合作用有关。*EuWOXs* 共含有 46 个激素响应元件，32 个胁迫响应元件，其中 ABRE 和 ARE 元件数量最多，均含有 14 个，所占比例分别为 31% 和 44%，暗示 *EuWOXs* 参与杜仲激素及胁迫响应。此外 *EuWOXs* 共含有 12 个生长发育调控相关元件，其中 O2-site 有 6 个，占 50%。

2.6 *EuWOXs* 基因表达模式分析

利用‘秦仲 1 号’叶片不同发育时期转录组数据对 *EuWOXs* 基因的表达模式进行分析。结果 (图 7) 可见：*EuWOXs* 在叶片不同发育时期表达丰度存在显著差异，*EuWOX11* 和 *EuWOX2* 在杜仲叶芽、初生叶、幼叶、老叶时期均不表达，*EuWOX5* 仅在叶芽和老叶中低表达，*EuWOX13-2* 在 4 个时期中的 FPKM 值均大于 20，推测 *EuWOX13-2* 参与杜仲叶片的整个发育过程；*EuWOX13-1* 和 *EuWOX4-1* 在叶芽中表达丰度最高，随着叶片发育表达水平逐渐降低，表明 *EuWOX13-1* 和 *EuWOX4-1* 主要在叶芽中发挥作用；*EuWOX1* 在生长叶中表达量相对较高，其余 *EuWOXs* 基因表达丰度较低，FPKM 值小于 5。

利用 RT-qPCR 检测 *EuWOXs* 在‘紫叶’杜仲叶片不同发育阶段 (叶芽、生长叶、幼叶) 的表达水平。结果 (图 8) 可见：*EuWOX1*、*EuWOX2*、*EuWOX4-1*、*EuWOX5* 和 *EuWOX13-2* 在生长叶中表达量最高，随着叶片发育表达水平呈先升高后降低趋势，*EuWOX4-2* 在幼叶中表达量最高，*EuWOX13-1* 在叶芽中表

Figure 6 Cis-element analysis of *EuWOX* genes promoter

达量最高，随着叶片发育，表达量逐渐降低，暗示 *EuWOX13-1* 在叶片发育的起始阶段发挥重要作用。*EuWOX1*、*EuWOX13-1* 和 *EuWOX13-2* 在‘紫叶’杜仲叶片中的表达趋势与‘秦仲 1 号’一致。

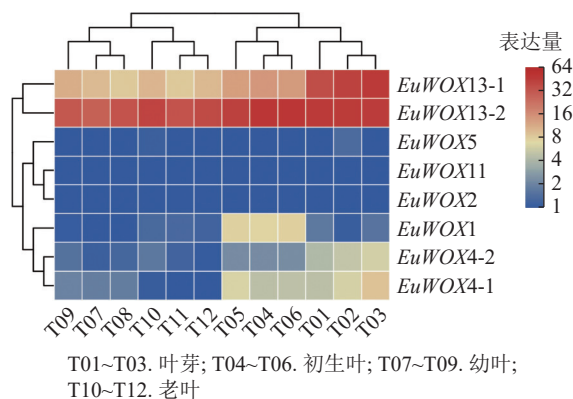
利用‘秦仲 2 号’和‘小叶’杜仲成熟叶片转录组数据检测 *EuWOXs* 的表达模式。由如图 9 可见：大部分 *EuWOXs* 转录水平较低，其中有 6 个 *EuWOXs* 基因几乎不表达，*EuWOX13-2* 表达水平最高，FPKM 值 > 40，不同胶含量样品之间无显著差异，推测 *EuWOXs* 在杜仲胶形成过程中发挥作用较小。

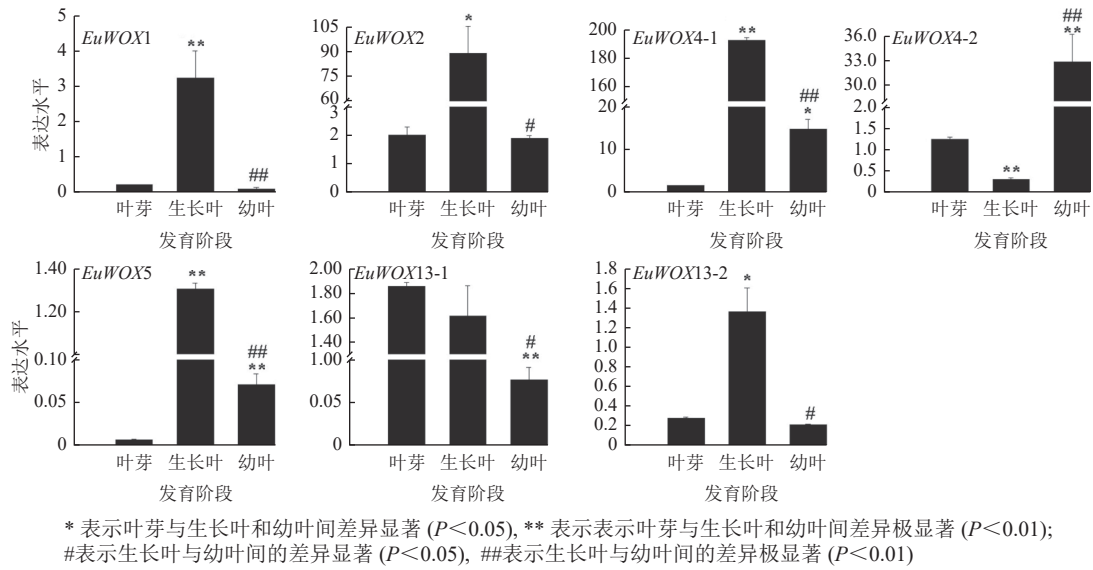
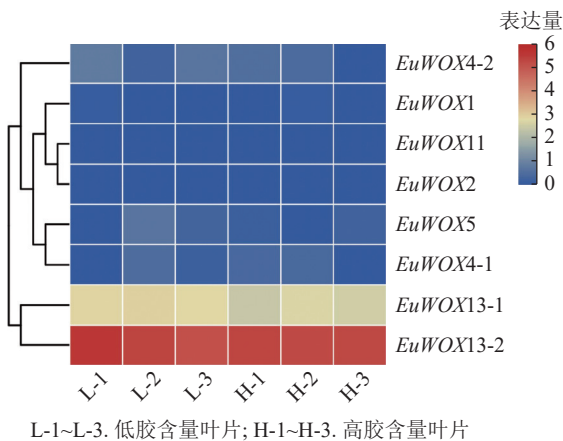
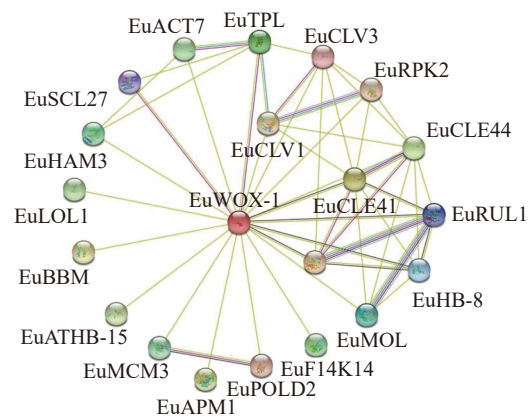
2.7 *EuWOXs* 蛋白互作网络预测分析

植物 WOXs 蛋白由多基因家族编码，蛋白质之间可能存在相互作用。利用 STRING 数据库，构建 *EuWOXs* 蛋白相互作用网络。图 10 显示：该网络包含 21 个节点（互作蛋白）和 82 条边（相互作用组合）。*EuWOX4-1* 可与 20 个蛋白质互作，其中包含干细胞分化抑制因子（CLE41 和 CLE44），细胞增殖和愈伤组织形成蛋白（CLV1、CLV3 和 ACT7），胚胎发育相关蛋白（TPL、BBM 和 APM1），维管组织发育蛋白（PXY、HB-8、ATHB-15、MOL 和 RUL1），细胞程序化死亡调控因子（LOL1），参与 DNA 的复制和延伸（MCM1、POLD2）以及信号转导蛋白（F14K14），花药发育关键调控因子（RPK2），参与 DNA 的复制植物发育相关转录因子 GRAS（HAM3 和 SCL27）等，推测 *EuWOXs* 全面参与了杜仲的生长发育。

3 讨论

WOX 蛋白是植物特有的高度保守的一类转录因子，广泛参与植物的生长发育、干细胞维持、组织器官发生和形成等多种生物学过程。到目前为止，WOX 家族基因已在多个物种进行了研究报道，如拟南芥中含有 15 个、毛果杨 18 个、水稻中有 13 个、玉米中有 20 个、毛竹 *Phyllostachys edulis* 中存在 27 个^[29]，小麦中有 26 个^[30]、茶树 *Camellia sinensis* 中包含 18 个^[31]，黄瓜 *Cucumis sativus* 中有 11 个^[3]，

Figure 7 Expression patterns of *EuWOXs* at different developmental stages in *E. ulmoides* leaves

图8 杜仲 *EuWOXs* 基因在杜仲叶片不同发育时期的表达模式Figure 8 Expression pattern of *EuWOX* genes in *E. ulmoides* leaves at different developmental stages图9 *EuWOXs* 在杜仲胶形成中的表达模式Figure 9 Expression patterns of *EuWOX* genes in the form of Eu-rubber图10 *EuWOXs* 蛋白互作网络预测Figure 10 Prediction of interaction network between *EuWOX* proteins

陆地棉 *Gossypium hirsutum* 中含有 38 个^[32]。小麦 (17 Gb)^[33]、玉米 (2 300 Mb)^[34] 和毛竹 (2 021 Mb)^[35] 基因组大于杜仲 (1.2 Gb)^[36]，拟南芥 (164 Mb)^[37]、水稻 (441 Mb)^[38] 和毛果杨 (392.3 Mb)^[39] 基因组小于杜仲。杜仲 *WOX* 数量低于拟南芥、毛果杨、水稻、玉米、小麦和毛竹，表明 *WOXs* 基因的丰富程度与基因组大小无关，这可能与基因重复有关。

杜仲基因组中共鉴定出 8 个 *EuWOXs*，分布在 8 条染色体上。*EuWOXs* 均为核定位蛋白，在现代进化支 (WUS)、中间进化支和远古进化支分别含有 5、1 和 2 个成员，其系统发育模式与拟南芥、水稻、陆地棉等类似^[29, 31-32]。*EuWOXs* 基因启动子中含有多种生长发育、激素响应、非生物胁迫以及光周期响应元件。在水稻中，WUS 的 *OsWOX5* 和中间进化支的 *OsWOX11*、*OsWOX12A* 和 *OsWOX12B* 基因表达受生长素、细胞分裂素和赤霉素调节，超表达 *OsWOX11* 可提高水稻抗旱性^[16-17]。细胞分裂素强烈促进苹果 *Malus pumila* *WOX1* 和 *WOX3* 基因表达，生长素诱导黄瓜 *CsWOX1b* 和 *CsWOX3* 基因表达^[3]。在拟南芥中，生长素反应因子 5 (AUXIN RESPONSE FACTOR, ARF5) 上调 *AtWOX1* 和 *PRS* (*AtWOX3*) 基因的表达，*ARF2*、*ARF3* 和 *ARF4* 抑制 *AtWOX1* 和 *PRS* 的表达^[40]。*OsWOX3A* 参与水稻器官发育、叶片横向轴伸长、颖花外稃形态发生以及分蘖和侧根发育^[10]，*MtWOX1* 的同源基因 *STENOFOLIA* 是蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* 叶片生长和维管组织形成的必须基因^[41]，*PttWOX4* 在杨树形成层中特异表达，*PttWOX4a/b* RNAi 干扰后导致维管形成层宽度缩小，次生长减弱^[42]。推测 *EuWOXs* 可能在杜仲生长发

育、激素和胁迫响应等生物学过程中发挥重要作用。

WOX 家族基因参与叶片发育。属于中间支的 *AtWOX9/STIMPY* 过表达导致拟南芥叶缘波浪化^[43], *SILAM1* 主要在番茄 *Solanum lycopersicum* 叶片、花和果实中表达, *SILAM1* 缺失导致叶片变窄, 次生小叶数量减少^[44], 超表达黄瓜 *CsWOX9* 导致转基因拟南芥角果变短, 莲座叶和分枝数目增加^[3]。来源于 *WUS* 的 *AtWOX3* 是拟南芥侧托叶发育的必需基因, *Atwox1* 和 *Atwox3* 缺失突变体导致叶片和花器官变窄, 影响叶片横向扩张和花瓣融合^[45-46]; *GhWOX9_At*, *GhWUSa_At* 和 *GhWUSb_Dt* 主要在棉花幼叶中大量表达^[47]。远古进化分支中的 *OsWOX13* 在水稻叶、茎、根维管组织中表现为空间表达调控, 在花和发育中的种子中是时间表达调控^[48]。在杜仲中, *EuWOX13-1* 在叶芽中表达量最高, 随着叶片发育, 转录水平逐渐降低, 暗示 *EuWOX13-1* 主要在杜仲叶片发育的早期阶段发挥作用。*EuWOX13-2* 在生长叶中表达量较高, 在叶片发育过程中呈现先升高后降低的趋势。*EuWOX13-1* 和 *EuWOX13-2* 是一对重复基因, 其表达水平的差异可能与基因结构不同有关, 也可能是 *EuWOX13-1* 和 *EuWOX13-2* 在重复后发生了功能分化。在甘蓝型油菜 *Brassica napus* 中, *BnCWOX13a* 与 *BnCWOX13c* 互为同源基因, 然而它们的表达趋势完全不同^[49], 在拟南芥中, *AtWOX13* 在初生根、侧根、雌蕊和胚发育中动态表达, 而 *AtWOX13* 的直系同源基因 *AtWOX14* 只在侧根形成的早期阶段和发育的花药中特异表达^[50], 由此推测 *EuWOX13-2* 可能只获得了 *EuWOX13-1* 基因的部分功能, 具体功能还需要进一步研究。

4 参考文献

- [1] ZHANG Xin, ZONG Jie, LIU Jianhua, *et al.* Genome-wide analysis of WOX gene family in rice, sorghum, maize, *Arabidopsis* and poplar [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, **52**(11): 1016 – 1026.
- [2] HAO Qingnan, ZHANG Ling, YANG Yanyan, *et al.* Genome-wide analysis of the WOX gene family and function exploration of *GmWOX18* in soybean [J/OL]. *Plants*, 2019, **8**(7): 215 [2021-11-01]. doi: 10.3390/plants8070215.
- [3] GU Ran, SONG Xiaofei, LIU Xiaofeng, *et al.* Genome-wide analysis of *CsWOX* transcription factor gene family in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J/OL]. *Scientific Reports*, 2020, **10**: 6216 [2021-11-01]. doi: 10.1038/s41598-020-63197-z.
- [4] HAECKER A, GROß-HARDT R, GEIGES B, *et al.* Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 2004, **131**(3): 657 – 668.
- [5] BREUNINGER H, RIKIRSCH E, HERMANN M, *et al.* Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo [J]. *Developmental Cell*, 2008, **14**(6): 867 – 876.
- [6] DOLZBLASZ A, NARDMANN J, CLERICI E, *et al.* Stem cell regulation by *Arabidopsis* *WOX* genes [J]. *Molecular Plant*, 2016, **9**(7): 1028 – 1039.
- [7] COSTANZO E, TREHIN C, VANDENBUSSCHE M. The role of *WOX* genes in flower development [J]. *Annals of Botany*, 2014, **114**(7): 1545 – 1553.
- [8] 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.
- [9] BOUCHABKÉ-COUSSA O, OBELLIANNE M, LINDERME D, *et al.* Wuschel overexpression promotes somatic embryo genesis and induces organogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues cultured in vitro [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, **32**(5): 675 – 686.
- [10] ZHAO Yu, HU Yongfeng, DAI Mingqiu, *et al.* The *WUSCHEL*-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice [J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(3): 736 – 748.
- [11] CHO S H, YOO S C, ZHANG Haitao, *et al.* The rice narrow leaf2 and narrow leaf3 loci encode *WUSCHEL*-related homeobox 3A (*OsWOX3A*) and function in leaf, spikelet, tiller and lateral root development [J]. *New Phytologist*, 2013, **198**(4): 1071 – 1084.
- [12] 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**: 229 – 241.
- [13] LIU Bobin, WANG Lin, ZHANG Jin, *et al.* *WUSCHEL*-related Homeobox genes in *Populus tomentosa*: diversified expression patterns and a functional similarity in adventitious root formation [J/OL]. *BMC Genomics*, 2014, **15**: 296 [2021-11-01]. doi: 10.1186/1471-2164-15-296.

- [14] XU Meng, XIE Wenfan, HUANG Minren. Two WUSCHEL-related HOMEBOX genes, *PeWOX11a* and *PeWOX11b*, are involved in adventitious root formation of poplar [J]. *Physiologia Plantarum*, 2015, **155**(4): 446 – 456.
- [15] LI Zheng, LIU Dan, XIA Yu, *et al.* Identification of the WUSCHEL-related Homeobox (*WOX*) gene family, and interaction and functional analysis of TaWOX9 and TaWUS in wheat [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, **21**(5): 1581 [2021-11-01]. doi: 10.3390/ijms21051581.
- [16] CHENG Saifeng, HUANG Yulan, ZHU Ning, *et al.* The rice WUSCHEL-related homeobox genes are involved in reproductive organ development, hormone signaling and abiotic stress response [J]. *Gene*, 2014, **549**(2): 266 – 274.
- [17] CHENG Saifeng, ZHOU Daoxiu, ZHAO Yu. *WUSCHEL*-related homeobox gene *WOX11* increases rice drought resistance by controlling root hair formation and root system development [J/OL]. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, **11**(2): e1130198 [2021-11-01]. doi: 10.1080/15592324.2015.1130198.
- [18] WANG Liuqiang, LI Zhen, WEN Shuangshuang, *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.
- [19] WANG Liuqiang, WEN Shuangshuang, WANG Rui, *et al.* *PagWOX11/12a* activates *PagCYP736A12* gene that facilitates salt tolerance in poplar [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, **19**(11): 2249 – 2260.
- [20] 杜红岩. 中国杜仲图志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2014.
- DU Hongyan. *Chinese Eucommia Pictorial* [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2014.
- [21] LI Zhenyu, GU Juan, YAN Jin, *et al.* Hypertensive cardiac remodeling effects of lignan extracts from *Eucommia ulmoides* Oliv. bark: a famous traditional Chinese medicine [J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2013, **41**(4): 801 – 815.
- [22] WU Dong, YU Danmeng, ZHANG Yujia, *et al.* Metabolite profiles, bioactivity, and HPLC fingerprint of different varieties of *Eucommia ulmoides* Oliv. : Towards the utilization of medicinal and commercial chinese endemic tree [J/OL]. *Molecules*, 2018, **23**(8): 1898 [2021-11-01]. doi: 10.3389/molecules.23081898.
- [23] 刘俊, 陈玉龙, 刘燕, 等. 杜仲 TIFY 转录因子鉴定与表达分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, **27**(19): 165 – 174.
- LIU Jun, CHEN Yulong, LIU Yan, *et al.* Identification and expression analysis of TIFY transcription factor in *Eucommia ulmoides* [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2021, **27**(19): 165 – 174.
- [24] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2013, **30**(12): 2725 – 2729.
- [25] LI Long, LIU Minhao, SHI Kan, *et al.* Dynamic changes in metabolite accumulation and the transcriptome during leaf growth and development in *Eucommia ulmoides* [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(16): 4030 [2021-11-01]. doi: 10.3390/ijms20164030.
- [26] YE Jing, HAN Wenjing, FAN Ruisheng, *et al.* Integration of transcriptomes, small RNAs, and degradome sequencing to identify putative miRNAs and their targets related to eu-rubber biosynthesis in *Eucommia ulmoides* [J/OL]. *Genes*, 2019, **10**(8): 623 [2021-11-01]. doi: 10.3390/genes10080623.
- [27] CHEN Chengjie, CHEN Hao, ZHANG Yi, *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Molecular Plant*, 2020, **13**(8): 1194 – 1202.
- [28] LIU Jun, CHENG Zhanchao, XIE Lihua, *et al.* Multifaceted role of *PheDof12-1* in the regulation of flowering time and abiotic stress responses in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, **20**(2): 424 [2021-11-01]. doi: 10.3390/ijms20020424.
- [29] LI Xiangyu, LI Juan, CAI Miaomiao, *et al.* Identification and evolution of the WUSCHEL related homeobox protein family in Bambusoideae [J/OL]. *Biomolecules*, 2020, **10**(5): 739 [2021-11-01]. doi: 10.3390/biom10050739.
- [30] 武强强, 张凤洁, 董浩欢, 等. 小麦 WOX 转录因子基因的全基因组鉴定与分析[J]. *激光生物学报*, 2021, **30**(1): 67 – 74.
- WU Qiangqiang, ZHANG Fengjie, DONG Haohuan, *et al.* Genome-wide identification and analyses of WOX transcription factor genes in wheat [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2021, **30**(1): 67 – 74.
- [31] WANG Pengjie, GUO Yongchun, CHEN Xuejin, *et al.* Genome-wide identification of *WOX* genes and their expression patterns under different hormone and abiotic stress treatments in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Trees*, 2019, **33**(4):

- 1129 – 1142.
- [32] YANG Zhaoen, GONG Qian, QIN Wenqiang, *et al.* Genome-wide analysis of WOX genes in upland cotton and their expression pattern under different stresses [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2017, **17**(1): 113[2021-11-01]. doi: 10.1186/s12870-017-2015-8.
- [33] International Wheat Genome Sequencing Consortium. A chromosomebased draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome [J/OL]. *Science*, 2014, **345**(6194): 1251788[2021-11-01]. doi: 10.1126/science.1251788.
- [34] WANG Guifeng, ZHONG Mingyu, WANG Jiajia, *et al.* Genome-wide identification, splicing, and expression analysis of the myosin gene family in maize (*Zea mays*) [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **65**(4): 923 – 938.
- [35] PENG Zhenhua, LU Ying, LI Lubin, *et al.* The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nature Genetics*, 2013, **45**(4): 456 – 461.
- [36] WUYUN Tana, WANG Lin, LIU Huimin, *et al.* The hardy rubber tree genome provides insights into the evolution of polyisoprene biosynthesis [J]. *Molecular Plant*, 2018, **11**(3): 429 – 442.
- [37] The International Brachypodium Initiative. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* [J]. *Nature*, 2009, **463**: 763 – 768.
- [38] BURR B. Mapping and sequencing the rice genome [J]. *The Plant Cell*, 2002, **14**(3): 521 – 523.
- [39] HOFMEISTER B T, DENKENA J, COLOMÉ-TATCHÉ M, *et al.* A genome assembly and the somatic genetic and epigenetic mutation rate in a wild long-lived perennial *Populus trichocarpa* [J/OL]. *Genome Biology*, 2020, **21**: 259[2021-11-01]. doi: 10.1186/s13059-020-02162-5.
- [40] GUAN Chunmei, WU Binbin, YU Ting, *et al.* Spatial auxin signaling controls leaf flattening in *Arabidopsis* [J]. *Current Biology*, 2017, **27**(19): 2940 – 2950.
- [41] TADEGE M, LIN Hao, BEDAIR M, *et al.* *STENOFOLIA* regulates blade outgrowth and leaf vascular patterning in *Medicago truncatula* and *Nicotiana sylvestris* [J]. *The Plant Cell*, 2011, **23**(6): 2125 – 2142.
- [42] KUCUKOGLU M, NILSSON J, ZHENG Bo, *et al.* *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* (*WOX*)-like genes regulate cambial cell division activity and secondary growth in *Populus* trees [J]. *New Phytologist*, 2017, **215**(2): 642 – 657.
- [43] BLEIN T, PAUTOT V, LAUFS P. Combinations of mutations sufficient to alter *Arabidopsis* leaf dissection [J]. *Plants*, 2013, **2**: 230 – 247.
- [44] WANG Chaoqun, ZHAO Baolin, HE Liangliang, *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.
- [45] VANDENBUSSCHE M, HORSTMAN A, ZETHOF J, *et al.* Differential recruitment of WOX transcription factors for lateral development and organ fusion in *Petunia* and *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(8): 2269 – 2283.
- [46] NAKATA M, MATSUMOTO N, TSUGEKI R, *et al.* Roles of the middle domain-specific *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* genes in early development of leaves in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2012, **24**(2): 519 – 535.
- [47] HE Peng, ZHANG Yuzhou, LIU Hao, *et al.* Comprehensive analysis of *WOX* genes uncovers that *WOX13* is involved in phytohormone-mediated fiber development in cotton [J/OL]. *BMC Plant Biology*, 2019, **19**: 312[2021-11-01]. doi: 10.1186/s12870-019-1892-x.
- [48] MINH-THU P T, KIM J S, CHAE S, *et al.* A WUSCHEL homeobox transcription factor, OsWOX13, enhances drought tolerance and triggers early flowering in rice [J]. *Molecular Cells*, 2018, **41**(8): 781 – 798.
- [49] LI Mengdi, WANG Ruihua, LIU Zhengyi, *et al.* Genome-wide identification and analysis of the *WUSCHEL*-related homeobox (*WOX*) gene family in allotetraploid *Brassica napus* reveals changes in WOX genes during polyploidization [J/OL]. *BMC Genomics*, 2019, **20**: 317[2021-11-01]. doi: 10.1186/s12864-019-5684-3.
- [50] 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/OL]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, **8**: 291[2021-11-01]. doi: 10.1186/1471-2148-8-291.