

引用格式: 沈朱婷, 任 嶢, 周明兵. 毛竹 *PheWOX4c* 基因启动子克隆及调控元件分析[J]. 浙江农林大学学报, 2026, 43(1): 66–75. SHEN Zhuting, REN Zheng, ZHOU Mingbing. Cloning and regulatory element analysis of *PheWOX4c* gene promoter in *Phyllostachys edulis*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2026, 43(1): 66–75.

毛竹 *PheWOX4c* 基因启动子克隆及调控元件分析

沈朱婷, 任 嶢, 周明兵

(浙江农林大学 森林食物资源挖掘与利用全国重点实验室/竹子研究院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】*WOX4* 基因是参与植物生长发育调控的关键基因之一。研究毛竹 *Phyllostachys edulis* *PheWOX4c* 启动子的生物学功能和表达调控机理, 为阐明毛竹生长发育过程的调控机制提供参考。【方法】通过 Plant CARE 网站初步鉴定毛竹 *PheWOX4c* 基因启动子上顺式作用元件, 构建不同长度 5'端缺失启动子植物表达载体, 报告基因为 GUS, 选择不同环境因子对瞬时转化后的本氏烟草 *Nicotiana tabacum* 叶片进行处理。通过 GUS 染色分析 *PheWOX4c* 基因启动子全长及各长度启动子片段活性, 以及启动子在不同环境因子处理下的响应模式。【结果】*PheWOX4c* 基因启动子序列上可能包含众多激素响应元件 [水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA)、生长素 (IAA) 和茉莉酸甲酯 (MeJA) 等] 和非生物胁迫响应元件 (低温、干旱等)。通过 GUS 染色发现 *PheWOX4c* 基因启动子活性会受到 SA、ABA、IAA 以及低温处理的抑制, 表明有负调控 SA 的响应元件存在于启动子序列-507~-137 bp, 且该区间还存在负调控 ABA 的响应元件, 而-137~0 bp 处存在正调控 ABA 的响应元件, 在-2 045~-1 745 bp 和-137~0 bp 存在 MeJA 应答增强元件, 在-1 140~-507 bp 存在与低温相关的负调控响应元件。【结论】*PheWOX4c* 基因启动子含有多种激素响应元件和非生物胁迫响应元件, 且不同调控元件对多种激素的响应存在差异, 表明该基因受多个转录因子的调控, 其上游调控网络十分复杂。图 7 表 2 参 38

关键词: 毛竹; *WOX4* 基因; 启动子活性; 顺式作用元件; 激素

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2026)01-0066-10

Cloning and regulatory element analysis of *PheWOX4c* gene promoter in *Phyllostachys edulis*

SHEN Zhuting, REN Zheng, ZHOU Mingbing

(State Key Laboratory for Development and Utilization of Forest Food Resources/Bamboo Industry Institute, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The *WOX4* gene, a key member of the *WOX* gene family, is involved in the regulation of plant growth and development. This study aims to investigate the biological function and expression regulation mechanism of *PheWOX4c* promoter in *Phyllostachys edulis*, and provide a reference for the regulation mechanism of the growth and development process of *Ph. edulis*. [Method] Based on the distribution of *cis*-acting elements identified by Plant CARE, plant expression vectors with different lengths of the 5'-end deletion promoter were constructed with the reporter gene GUS. Different environmental factors were selected for the treatment of transiently transformed leaves of *Nicotiana tabacum*. The full-length promoter and each length promoter fragment activities of *PheWOX4c* gene were analyzed by GUS staining, as well as the response pattern of promoters with different environmental factors. [Result] *PheWOX4c* gene promoter had multiple hormonal response elements such as salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA), auxin (IAA), and methyl

收稿日期: 2025-03-13; 修回日期: 2025-06-20

基金项目: 浙江省自然科学基金重点资助项目 (LZ24C160002); 国家自然科学基金资助项目 (32430072, 32471980)

作者简介: 沈朱婷 (ORCID: 0009-0005-8939-5559), 从事毛竹生长发育研究。E-mail: 849810585@qq.com。通信作者: 周明兵 (ORCID: 0000-0001-5674-4410), 教授, 博士, 从事毛竹生长发育研究。E-mail: zhoumingbing@zafu.edu.cn

jasmonate (MeJA), as well as *cis*-acting elements involved in abiotic stresses such as low temperature and drought. GUS staining revealed that the promoter activity of *PheWOX4c* gene was inhibited by SA, ABA, IAA and low temperature treatment. This indicated the presence of a response element negatively regulating SA and also a response element negatively regulating ABA between -507 and -137 bp of promoter sequence, whereas a response element positively regulating ABA was found between -137 and 0 bp. MeJA response enhancer elements were found between -2 045 and -1 745 and between -137 and 0 bp, and low temperature negative regulatory elements were found between -1 140 and -507 bp. [Conclusion] *PheWOX4c* gene promoter contains multiple hormonal response elements and abiotic stress response elements. Different regulatory elements respond differently to different hormones, indicating that *PheWOX4c* gene is regulated by multiple transcription factors, with a very complex upstream regulatory network. [Ch, 7 fig. 2 tab. 38 ref.]

Key words: *Phyllostachys edulis*; *WOX4* gene; promoter activity; *cis*-acting element; hormone

竹子作为一种特殊的森林资源, 可为人类提供大量非木材产品, 又因其速生特性, 已成为替代塑料的首选材料^[1-4]。毛竹 *Phyllostachys edulis* 是中国最具特色的笋材两用竹种, 具有极强的生长能力和更新能力, 以及较高的经济、生态和文化价值^[5-7]。与多数双子叶植物不同, 毛竹茎中存在居间分生组织^[8]。居间分生组织和顶端分生组织一样都拥有很强的分裂能力, 毛竹依赖于细胞的快速分裂分化能力, 快速拔节长高^[9-10]。

WUSCHEL-related homeobox (*WOX*) 基因家族在植物形态建成的全过程中具有重要调控作用, 参与植物根系顶端分生组织、维管发育、胚胎发生与发育以及不定器官的发生与发育, 同时还参与植物对逆境(如干旱、盐和低温等)的响应^[11-12]。*WOX4* 基因是该基因家族中参与植物生长发育调控的关键基因之一, 在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和杨树 *Populus* 等双子叶植物中已有了广泛的研究, 而在单子叶植物中的研究相对较少。*AtWOX4* 在维持拟南芥形成层细胞中起着重要作用, *AtWOX4* 突变体植株矮小, 维管组织中积累未分化的细胞, 并且木质部、韧皮部和纤维细胞的分化减少^[13]。在多种杨树物种中, *WOX4a/b RNAi* 和双突变体均表现出次生生长显著减弱, 维管形成层明显减少, 毛白杨 *Populus tomentosa* 中过表达 *PtoWOX4a* 的植株也表现出髓部发育受抑制, 但木质部宽度增加^[14]。这一结果表明拟南芥和杨树之间存在保守的 *CLE/TDIF-TDR/PXY-WOX4* 调控途径。研究发现: 山新杨 *Populus davidiana* × *P. bolleana* 中 *WOX4* 基因的过表达降低了活性氧(ROS)的清除能力, 加剧了盐胁迫诱导的细胞损伤和死亡, 并通过抑制 *PdbDREB2C* 的表达负调控山新杨的耐盐性^[15]。棉花 *Gossypium hirsutum* 中的 *GhWOX4_A01* 在胚性愈伤组织中的表达水平高于普通愈伤组织, 而沉默植株(pCLCrVA: *GhWOX4_A01*)积累了更多的活性氧, 且对干旱处理更为敏感, 表明 *GhWOX4_A01* 参与调控组织再生和非生物胁迫^[16]。*OsWOX4* 是水稻 *Oryza sativa* 中 *WOX4* 的同源基因, 其不仅调控维管系统和叶片发育, 还参与了顶端分生组织的维持, 通过超表达水稻 *FCP1* 抑制 *OsWOX4* 的表达, 会导致水稻分生组织发育缺陷、叶片生长畸形和维管系统发育紊乱, 形成异常的顶端分生组织(SAM)^[17-18]。毛竹 *WOX4* 家族同源基因 *WOX4s* (*PheWOX4a*、*PheWOX4b*、*PheWOX4c*) 均在毛竹笋期表达活跃, 其中 *PheWOX4c* 在不同高度笋的顶端组织中, 例如鞭梢、冬笋和不同发育阶段幼竹的顶端组织中表达更加明显, 推测 *PheWOX4c* 的功能可能与水稻 *OsWOX4* 相近, 都参与顶端分生组织活性的维护^[19]。还有研究发现 *PheIAA15* 与 *PheWOX4c* 相互作用, 可能通过拮抗机制调控 *PheCLE25* 的表达, 区别于其他植物的生长素响应模式, 共同调控维管组织的分化^[20]。

启动子(promoter)作为基因表达的启动引擎, 主要位于 DNA 序列的 5'上游, 这一特殊位置的 DNA 序列被称为启动子区域。它能够与 RNA 聚合酶结合, 激活或抑制后续的转录过程, 通常包含多个关键的顺式作用元件, 在基因表达中发挥着关键的调节功能^[21]。已有研究发现在竹亚科 Bambusoideae 中 *WOX* 启动子的顺式作用元件分布特征十分类似, 且在不同竹类 *WOX* 的直系同源基因的同一起动子区域存在特殊顺式元件, 可能在竹子的生长发育过程中发挥重要调控作用^[19]。然而毛竹 *PheWOX4c* 基因启动子区域存在的调控元件以及不同环境因子对该基因的影响, 仍有待进一步研究。

基于此,本研究拟克隆 *PheWOX4c* 上游启动子序列,分析启动子上的顺式作用元件,分析 *PheWOX4c* 启动子全长和 5'端缺失启动子的活性,探究各顺式作用元件对不同处理的应答模式,以期阐明其生物学功能和表达调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

选取干燥新鲜的毛竹种子,冲洗干净在水中浸泡 2~3 d 后,均匀铺撒在育苗托盘中,在培养箱中遮光培养 1~2 周后,将发芽生根的毛竹种子栽至土培盆中,日常光照培养至三叶一心,提取毛竹总 DNA。

将种植培养土加水吸收至湿润松软的状态,将本氏烟草 *Nicotiana tabacum* 种子均匀少量撒播在土壤表面,使用聚乙烯膜覆盖花盆顶部并用皮筋固定,膜上扎出少许透气孔洞。处理好的烟草放置在透气温暖湿润的环境中,待烟草萌发去除覆膜。2~3 周后,将长出 2~3 片叶的烟草单株移栽,在温度 25 ℃,光照强度 10 klx,光照时间 16 h,黑暗时间 8 h 的培养箱中培养,用于侵染实验。

1.2 *PheWOX4c* 基因全长启动子克隆

在毛竹全基因组数据库中,检索得到 *PheWOX4c* 基因转录起始位点 (A) 上游 2 045 bp 的启动子序列。根据植物 DNA 提取试剂盒说明书,将毛竹叶片放入液氮中研磨,提取毛竹总 DNA,以此为模板设计引物进行扩增。选择 *Hind III* 和 *Xba I* 作为 PBI121-GUS 载体构建的双酶切位点,通过胶回收纯化扩增片段和酶切过的线性化载体,再使用同源重组试剂盒获得重组质粒后转化大肠埃希菌 *Escherichia coli*,选择菌检结果阳性的单菌落进行测序并与已知序列比对。

1.3 启动子生物信息学分析

根据 Plant CARE 在线网站提供的预测结果,通过生物信息学方法分析克隆得到的 *PheWOX4c* 基因启动子序列,并预测了其可能包含的顺式作用元件。

1.4 启动子 5'端缺失克隆及表达载体构建

根据 *PheWOX4c* 基因 2 045 bp 启动子序列上顺式作用元件预测的功能及定位,设计不同长度 5'端缺失克隆引物 (表 1),选择植物表达载体 PBI121,报告基因为 GUS,构建全长及各不同长度启动子片段的 5 个植物表达载体 (图 1)。对 PBI121 载体上 *Hind III* 和 *Xba I* 等 2 个酶切位点进行酶切后胶回收线性载体,与分离并回收得到的不同长度启动子片段进行同源重组,将重组质粒转化大肠埃希菌 *Escherichia coli*,对菌检阳性的菌株进行测序,获得与目标序列比对一致的 P1~P4 重组表达载体: PBI121-P1::GUS、PBI121-P2::GUS、PBI121-P3::GUS、PBI121-P4::GUS。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this experiment

引物名称	引物序列(5'→3')	引物功能
Promoter-F	GCTTGTAAGTTTAATTCAAAGTTTGATGG	启动子全长克隆
P1-F	CCGGGAGGCCTCTTTTAGC	缺失片段1克隆
P2-F	TGCTTTGCATCTGGGTCCAT	缺失片段2克隆
P3-F	GCGCCAATTTTCAGAGCACA	缺失片段3克隆
P4-F	TCAAAACCCGGCCTCACCA	缺失片段4克隆
Promoter-R	CGGCAGAGCTAGCAAGCACT	启动子全长及缺失片段克隆

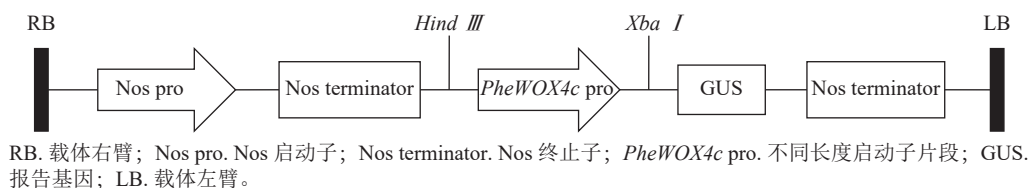


图 1 植物表达载体构建

Figure 1 Construction of plant expression vectors

1.5 农杆菌介导的烟草瞬时转化

将构建成功的 *PheWOX4c* 启动子全长载体及 P1~P4 重组表达载体转化农杆菌 *Agrobacterium* GV3101, 28 °C 振荡培养至菌液初步混浊后, 每 30 min 测量 1 次吸光度 $D(600)$, $D(600)$ 为 0.5 时进行离心, 用配置好的烟草侵染液重悬收集到的菌体, 重悬液 $D(600)$ 保持不变。在避光环境中, 室温静置至少 3 h。选择生长出第 4 或 5 轮叶片的本氏烟草进行注射, 每处理 4 个重复, 其中阳性对照为 PBI121-GUS 空载体, 阴性对照为去除 GUS 基因前 CaMV35S 启动子的 PBI121 表达载体, 分析 *PheWOX4c* 基因启动子在烟草中驱动基因表达的特征。

1.6 烟草 GUS 组织化学染色

注射农杆菌 72 h 后采集各处理烟草叶片, 使用圆形打孔器 (直径为 1 cm) 打孔, 染色液的配置参考 GUS 染色试剂盒说明书, 将各叶盘放置于 10 mL 离心管中, 加入没过样品的 GUS 染色液, 真空抽滤 30 min 后, 37 °C 摇床振荡培养 12 h。将染色反应后的叶盘取出, 去除多余染色液, 使用体积分数为 75% 的乙醇进行脱色, 完全脱色后用清水润洗, 置于体视镜下观察并拍照记录。

1.7 不同环境因子处理下烟草叶片 GUS 活性分析

配置浓度均为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生长素 (IAA)、脱落酸 (ABA)、茉莉酸甲酯 (MeJA) 和水杨酸 (SA), 分别均匀喷洒在注射农杆菌 48 h 后的烟草叶片上, 置于室温; 另选择一组烟草喷洒蒸馏水, 置于 4 °C 进行低温处理; 以室温喷洒蒸馏水的烟草作为对照组。每处理 4 个重复, 采集处理 24 h 后的烟草叶片并分组标记。使用 Bradford 法^[21] 蛋白提取试剂盒提取烟草叶片总蛋白, 测量各样品 595 nm 波长处的吸光度, 根据标准样品数值绘制的牛血清蛋白 (BSA) 标准曲线, 计算各启动子片段在不同处理下烟草中瞬时表达的总蛋白浓度。根据 GUS 基因定量检测试剂盒所述方法, 将酶促反应终止液提前置于 37 °C 温浴, 取 150 μL 蛋白提取物, 加入 150 μL 4-MUG 底物液, 37 °C 温浴反应, 分别在 10、20、30 min 时, 从反应液中取 100 μL 加入 900 μL 终止液中, 避光放至测量结束。使用激发波长 365 nm、发射波长 455 nm 测量各样品, 3 次荧光值测定后, 形成酶促反应的速率折线, 选择斜率较大的时间段作为最终计算数值, 计算标准时间内单位质量的总蛋白水解底物产生的 4-MUG 的物质的量 ($\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)。

2 结果与分析

2.1 *PheWOX4c* 基因启动子克隆

将毛竹全基因组 DNA 作为模板, 利用 PCR 技术, 克隆了 *PheWOX4c* 启动子序列, 全长为 2 045 bp (图 2)。测序结果显示扩增出的条带与预期目的序列一致, 表明 *PheWOX4c* 启动子片段已被成功克隆。

2.2 *PheWOX4c* 基因启动子顺式作用元件分析

使用 Plant CARE 在线网站分析启动子序列, 发现该启动子上含有 ABA 响应元件 (ABRE)、SA 响应元件 (TCA-element)、MeJA 响应元件 (TGACG-motif) 和 IAA 响应元件 (AuxRR-core) 等植物激素应答元件, 低温响应元件 (LTR)、转录因子 MYB 结合位点 Myb 和 bHLH 结合位点 MYC、厌氧诱导响应元件 (ARE) 等胁迫应答元件, Box 4、I-box 等光响应元件 (图 3 和表 2)。此外, 还存在种子特异性元件 (RY-element) 和愈伤调节响应元件 (WRE3)。以上表明 *PheWOX4c* 基因很可能受到多种植物激素的调节并能对各种逆境做出响应, 还可能参与植物生长发育的许多重要过程。

2.3 *PheWOX4c* 基因启动子缺失片段克隆

为了探究毛竹 *PheWOX4c* 启动子中预测出的激素相关顺式作用元件能否调控基因的表达, 根据 Plant CARE 预测的相关顺式作用元件功能及分布区域, 以 *PheWOX4c* 启动子序列全长为模板, 克隆获得长度为 1 745、1 140、507、137 bp 的 4 个 5'端缺失片段 (图 2), 分别命名为 P1、P2、P3、P4。与全长启

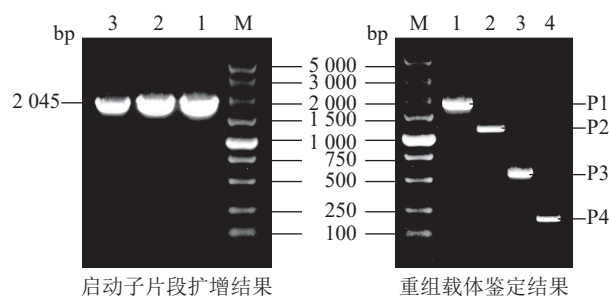


图 2 *PheWOX4c* 基因启动子片段扩增与重组载体鉴定

Figure 2 Amplification of *PheWOX4c* gene promoter fragment and identification of recombinant vector

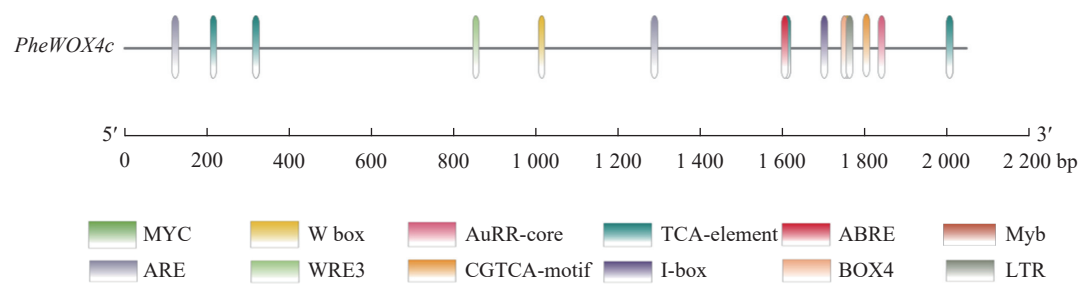


图 3 *PheWOX4c* 基因启动子顺式作用元件分析

Figure 3 Analysis of cis-acting elements in the promoter of *PheWOX4c* gene

表 2 Plant CARE 预测的 *PheWOX4c* 基因启动子部分顺式作用元件

Table 2 Partial <i>cis</i> -acting elements in <i>PheWOX4c</i> gene promoter predicted by Plant CARE				
顺式作用元件	序列(5'→3')	功能	数量	位置/bp
TGACG-motif	TGACG	MeJA响应元件	4	-2 014、-1 619、-326等
I-box	CGATAAGGCG	光响应元件	1	-1 817
Box 4	ATTAAT	光响应元件	1	-1 759
ABRE	CGTACGTGCA/AACCCGG	ABA响应元件	2	-1 301、-132
LTR	CCGAAA	低温响应元件	1	-1 710
TCA-element	CCATCTTTTT	SA响应元件	1	-1 854
AuxRR-core	GGTCCAT	IAA响应元件	1	-864
ARE	AAACCA	厌氧诱导型元件	1	-1 772
WRE3	CCACCT	愈伤调节响应元件	2	-120、-61
RY-element	CATGCATG	种子特异性元件	2	-1 768、-1 025
Myb	TAACTG	MYB转录因子结合位点	1	-516
MYC	CATGTG/CATTG	bHLH转录因子结合位点	3	-1 206、-1 144、-230
TATA-box	ATATAT/TATA/TATAA/TATATA等	转录起始-30 bp处启动子核心元件	32	-1 783、-1 655、-987等
CAAT-box	CAAAT/CAAT/CCAAT	启动子和增强子区域顺式作用元件	58	-1 805、-1 423、-770等

动子相比，P1~P4 片段分别缺失了 SA 响应元件 TCA-element、LTR 响应元件 TGA-element、IAA 响应元件 AuxRR-core、MeJA 响应元件 CGTCA-motif，最终短片段仅含有 ABA 响应元件 (图 4)。

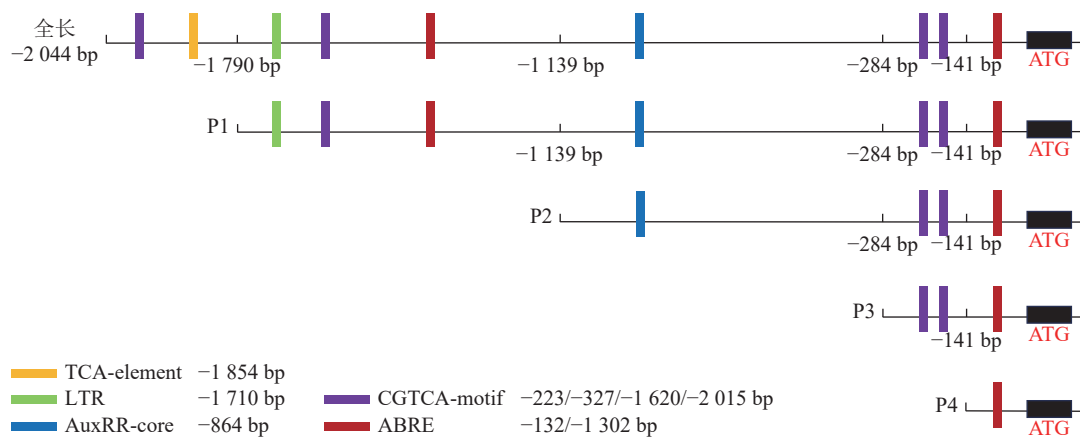


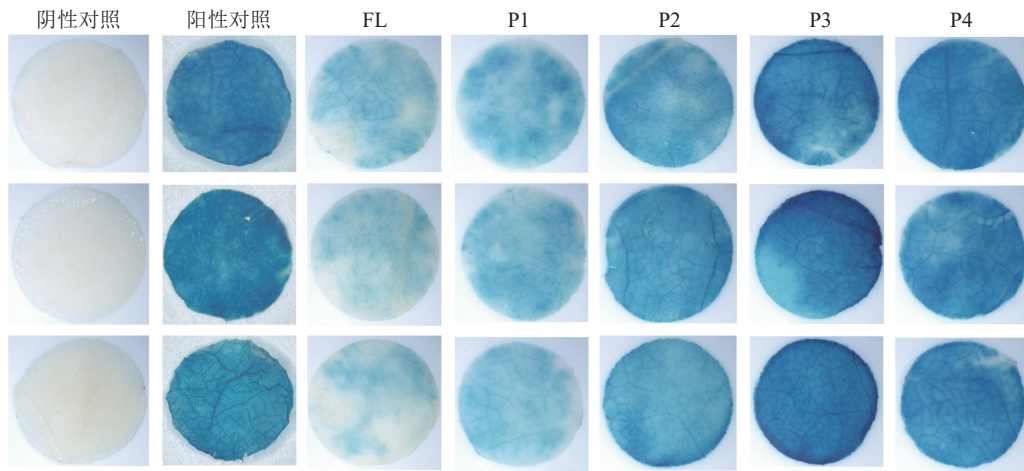
图 4 *PheWOX4c* 启动子缺失片段示意图

Figure 4 Schematic diagram of the partial fragments of *PheWOX4c* gene promoter

2.4 全长及不同缺失片段启动子作用下的 GUS 染色分析

PheWOX4c 启动子全长载体及 P1~P4 载体注射烟草叶片 72 h 后，对取下的叶片进行 GUS 染色并分析不同长度启动子片段的活性，不带有 CaMV35S 启动子的阴性对照 PBI121 载体注射烟草叶片无法染上颜色，说明染色处理无背景污染；阳性对照野生型 PBI121 空载体注射的烟草叶片经过染色变蓝，说明可以正常表达 GUS 基因；注射启动子全长及 P1~P4 片段的烟草叶片经 GUS 染色后均出现明显蓝色，表

明 *PheWOX4c* 基因启动子全长和 4 个不同长度启动子缺失片段都具有活性，从染色深浅可以看出启动子活性呈现先升高后降低的趋势 (图 5)。



FL. 全长启动子；P1~P4. 不同长度启动子片段。每处理3个重复。

图 5 *PheWOX4c* 全长及缺失启动子作用下的 GUS 染色

Figure 5 GUS staining under the promotion of full-length and partial *PheWOX4c* gene promoters

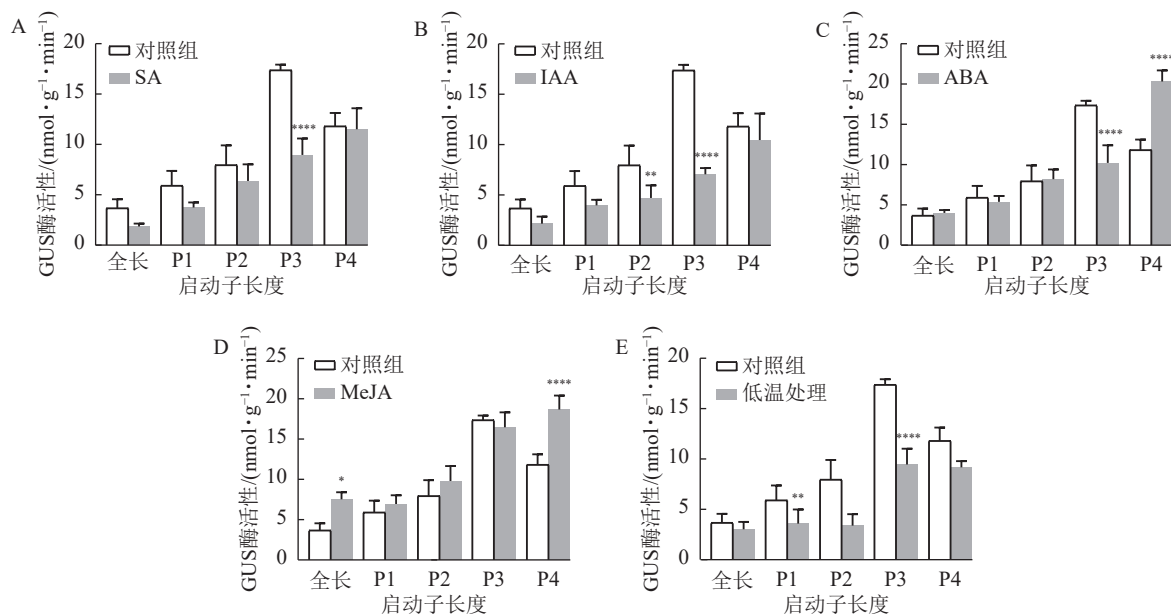
2.5 不同环境因子处理下的 GUS 酶活性测定

通过测定 GUS 酶活性和观察 GUS 染色结果分析各响应元件功能。ABA、SA、IAA 以及 4 °C 低温处理均不同程度抑制了 *PheWOX4c* 基因启动子驱动 GUS 基因表达的活性。由图 6A~B 可知：SA 和 IAA 处理下 P3 缺失片段 GUS 酶活性比其他片段显著下降 ($P < 0.0001$)，结合图 7 中 P3 片段颜色相较于对照组明显变浅，推测在启动子-507~-130 bp 中存在 SA 的负调控响应元件。由图 6C 可知：ABA 处理下，P3 片段 GUS 酶活性抑制作用显著 ($P < 0.0001$)，而 P4 片段在 ABA 处理下的染色结果明显深于对照组 (图 7)，酶活性呈现显著促进作用 ($P < 0.0001$)，推测在启动子-507~-130 bp 存在负调控的 ABA 响应元件，在-137~0 bp 存在 ABA 应答增强元件。由图 6D 可知：MeJA 处理下，启动子全长和 P4 片段 GUS 酶活性提高，结合染色结果 (图 7)，推测启动子-2 045~-1 745 bp 和-137~0 bp 存在正调控的 MeJA 响应元件。由图 6E 可知：在低温处理下，启动子全长与各长度片段 GUS 酶活性均有不同程度下降，其中 P3 片段抑制作用最显著 ($P < 0.0001$)，与图 7 的叶片染色结果相吻合。

3 讨论

WOX 家族基因在植物的生长发育中扮演着重要角色，同时在植物对于干旱、盐和低温等逆境的响应中也发挥着重要功能^[22-24]。启动子是基因序列中非常重要的一部分，能引导 RNA 聚合酶以一种精确而有序的方式进行转录。这种特性使得启动子能够控制基因的起始、延伸以及终止，进而影响基因的时空表达^[25-26]。因此，对 *PheWOX4c* 基因启动子进行结构与功能研究，可以更全面地了解其背后的调控机理。通过克隆并分析 *PheWOX4c* 基因的启动子序列，发现 *PheWOX4c* 启动子在具有基本顺式作用元件 TATA-box、CAAT-box 的同时，还存在多种植物激素调控元件、低温响应元件、光响应元件以及种子特异性反应元件等，这表明 *PheWOX4c* 基因可能与种子萌发等生长发育过程相关，并且光照、激素以及各种胁迫也可能影响该基因的表达。根据毛竹 *PheWOX4c* 启动子序列上含有的植物激素应答元件以及低温响应元件，设计不同长度启动子片段植物表达载体，对瞬时转化启动子全长以及 P1、P2、P3 和 P4 片段长度的烟草叶片喷施 SA、ABA、IAA 和 MeJA 等 4 种激素以及低温处理，GUS 染色与酶活性测定结果显示不同处理对各启动子片段的活性有不同影响。

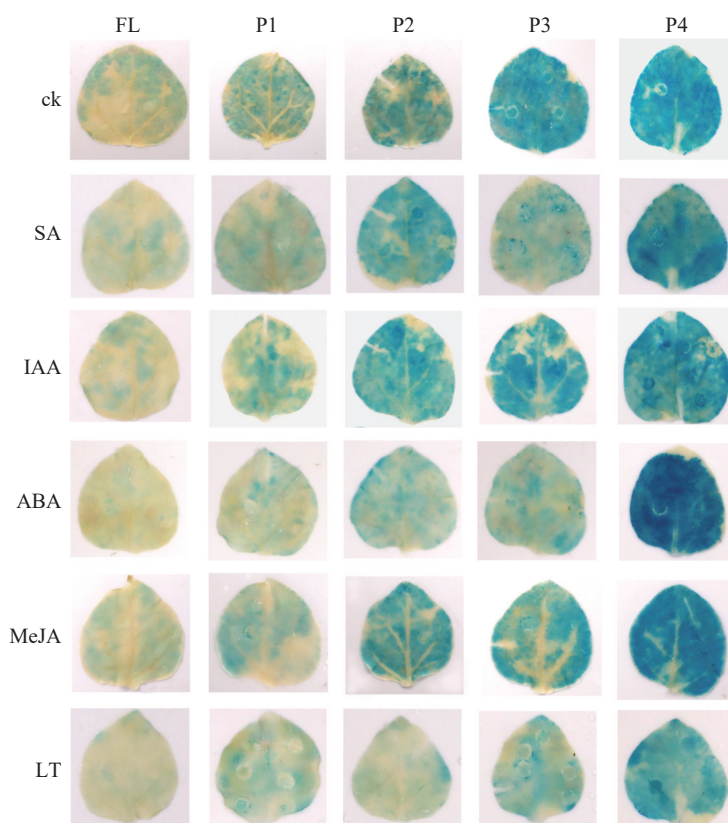
已有研究分析了不同生长期的毛竹笋茎秆上、中以及下部内源激素含量，发现 IAA 含量与笋的生长发育密切相关。IAA 通过促进茎秆细胞的分裂来调控竹子的高生长^[27-29]，而在木本植物中 IAA 诱导的 MP/ARF5 会抑制 *WOX4* 基因活性，并限制干细胞数量^[30]。双分子荧光互补实验验证了 *PhelAA15* 和 *PheWOX4c* 能够直接互作，推测毛竹具有独特的 IAA 响应模式^[20]。本研究中 IAA 处理明显抑制



A~E分别表示用 SA、IAA、ABA、MeJA以及低温处理烟草叶片后测定的GUS酶活性。*, 与对照组差异显著($P < 0.05$); **, 与对照组差异高度显著($P < 0.01$); ****, 与对照组差异极显著($P < 0.0001$)。

图6 不同处理下 *PheWOX4c* 基因不同长度启动子驱动的 GUS 酶活性

Figure 6 Analysis of GUS protein content driven by different lengths of *PheWOX4c* gene promoters under different treatments



FL. 启动子全长片段; P1~P4. 不同长度启动子片段; ck. 对照组; SA. 水杨酸处理组; IAA. 生长素处理组; ABA. 脱落酸处理组; MeJA. 茉莉酸甲酯处理组; LT. 低温处理组。

图7 不同处理下 *PheWOX4c* 基因不同长度启动子的 GUS 染色结果

Figure 7 Analysis of GUS staining with different lengths of *PheWOX4c* gene promoters under different treatments

PheWOX4c 启动子活性, 推测 *PheWOX4c* 基因表达会受到 IAA 影响, 从而参与调控毛竹生长发育的重要过程。研究表明 ABA 通过调控细胞壁发育以及木质素合成相关功能基因的上游调控因子, 促进毛竹单节间 (SCW) 增厚^[31], 而 SCW 增厚相关的基因在毛竹快速生长阶段节间中的表达水平远高于快速生长阶

段, 这表明细胞壁的快速木质化对竹子茎秆快速生长尤为重要^[32]。*PheWOX4c* 启动子序列存在 2 个 ABA 应答元件 ABRE, 注射 P4 片段的烟草叶片在 ABA 处理下启动子活性明显增强, 推测 *PheWOX4c* 启动子序列上受 ABA 诱导的顺式作用元件与毛竹竹笋快速生长密切相关。

此外, 植物中 *WOX* 基因的表达也受逆境胁迫的影响, 包括构树 *Broussonetia papyrifera*、茶树 *Camellia sinensis*、小黑杨 *Populus nigra* 和麻风树 *Jatropha curcas* 在内的木本植物中的大多数 *WOX* 基因在不同程度上响应干旱、盐和低温等各种非生物胁迫刺激^[15, 33]。如黄瓜 *Cucumis sativus* 叶片中 *CsWOX4* 基因表达量会在受低温胁迫后下降^[34]; 乌拉尔图小麦 *Triticum urartu* 在低温胁迫下 *TuWOX4* 基因表达量显著降低^[35]。*PheWOX4c* 启动子上存在低温响应元件, GUS 酶活性和染色结果证实低温抑制了 *PheWOX4c* 启动子活性。植物激素也是植物体应对生物胁迫重要的防御信号分子^[34], 如 SA 主要通过受体蛋白 NPR 调控相关的 bHLH 及 MYB 类转录因子^[36], 影响下游相关抗逆基因及次生代谢物合成途径基因的表达, 提高植物抗逆性^[37]。MeJA 主要通过靶蛋白茉莉酸 ZIM 结构域 (JAZ) 的泛素化降解释放 MYC2、MYC3、MYC4 等转录因子活性, 进而激活 JA 信号通路相关基因的表达^[38]。*PheWOX4c* 启动子存在转录因子 MYB 结合位点 Myb 和 bHLH 结合位点 MYC。在本研究中, 发现 SA 和 MeJA 处理对启动子活性有抑制作用, 而 P4 片段启动子活性在 MeJA 处理下显著升高, 推测该位置具有响应 MeJA 的正调控元件, *PheWOX4c* 基因表达可能受 MeJA 和 SA 的调控, 进而影响植物对逆境胁迫的应答。

综上, *PheWOX4c* 基因启动子上不同顺式元件驱动基因表达效率的不同, 反映出激素和低温调控 *PheWOX4c* 基因表达是一个相对复杂的过程。

4 结论

本研究克隆了毛竹 *PheWOX4c* 基因启动子, 并通过生物信息学分析预测了启动子序列上可能存在的顺式作用元件, 通过对瞬时转化后的烟草进行激素处理, 发现 *PheWOX4c* 基因启动子可能存在 SA、IAA 和低温负调控元件, 存在 MeJA 和 ABA 正调控元件。

5 参考文献

- [1] ATANDA J. Environmental impacts of bamboo as a substitute constructional material in Nigeria[J]. *Case Studies in Construction Materials*, 2015, 3: 33–39. DOI: 10.1016/j.cscm.2015.06.002.
- [2] NIU Liangzhong, XU Wei, MA Pengfei, et al. Single-base methylome analysis reveals dynamic changes of genome-wide DNA methylation associated with rapid stem growth of woody bamboos[J]. *Planta*, 2022, 256(3): 53. DOI: 10.1007/s00425-022-03962-8.
- [3] 郑钧, 吴仁武, 史琰, 等. 竹类植物的主要环境效应研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2017, 34(2): 374–380. ZHENG Jun, WU Renwu, SHI Yan, et al. Research progress on environmental effects of bamboo: a review[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2017, 34(2): 374–380. DOI: 10.11833/j.issn.2095-0756.2017.02.024.
- [4] 刘萱, 邹龙海, 周明兵. 黄槽毛竹叶绿体基因组及毛竹种下分类群的叶绿体基因组序列比较[J]. *浙江农林大学学报*, 2024, 41(5): 1037–1046. LIU Xuan, ZOU Longhai, ZHOU Mingbing. Chloroplast genome of *Phyllostachys edulis* f. *luteosulcata* and comparison of chloroplast genome sequence of subspecies of *Ph. edulis*[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2024, 41(5): 1037–1046. DOI: 10.11833/j.issn.2095-0756.20240110.
- [5] HUANG Bin, HUANG Zhinuo, MA Ruifang, et al. Genome-wide identification and expression analysis of LBD transcription factor genes in Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 296. DOI: 10.1186/s12870-021-03078-3.
- [6] GAO Jian, ZHANG Ying, ZHANG Chunling, et al. Characterization of the floral transcriptome of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) at different flowering developmental stages by transcriptome sequencing and RNA-seq analysis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e98910. DOI: 10.1371/journal.pone.0098910.
- [7] 丁雨龙, 林树燕, 魏强, 等. 竹子发育生物学研究进展[J]. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 2022, 46(6): 23–40. DING Yulong, LIN Shuyan, WEI Qiang, et al. Advances in developmental biology of bamboos[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2022, 46(6): 23–40. DOI: 10.12302/j.issn.1000-2006.202208067.
- [8] GUO Rongfang, LI Wenjing, WANG Xingru, et al. Effect of photoperiod on the formation of cherry radish root[J]. *Scientia*

- Horticulturae*, 2019, **244**: 193–199. DOI: [10.1016/j.scienta.2018.09.044](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.044).
- [9] SRIVASTAVA G, SU Tao, MEHROTRA R C, *et al.* Bamboo fossils from Oligo-Pliocene sediments of Northeast India with implications on their evolutionary ecology and biogeography in Asia[J]. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 2019, **262**: 17–27. DOI: [10.1016/j.revpalbo.2018.12.002](https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2018.12.002).
- [10] LÜ Zhuo, ZHU Fangwei, JIN Diankun, *et al.* Seed germination and seedling growth of *Dendrocalumus brandisii* in vitro, and the inhibitory mechanism of colchicine[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, **12**: 784581. DOI: [10.3389/fpls.2021.784581](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.784581).
- [11] TANAKA W, HIRANO H Y. Antagonistic action of TILLERS ABSENT1 and FLORAL ORGAN NUMBER2 regulates stem cell maintenance during axillary meristem development in rice[J]. *New Phytologist*, 2020, **225**(2): 974–984. DOI: [10.1111/nph.16163](https://doi.org/10.1111/nph.16163).
- [12] ETCHELLES J P, PROVOST C M, MISHRA L, *et al.* *WOX4* and *WOX14* act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation[J]. *Development*, 2013, **140**(10): 2224–2234. DOI: [10.1242/dev.091314](https://doi.org/10.1242/dev.091314).
- [13] HIRAKAWA Y, KONDO Y, FUKUDA H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *WOX4* homeobox gene in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2010, **22**(8): 2618–2629. DOI: [10.1105/tpc.110.076083](https://doi.org/10.1105/tpc.110.076083).
- [14] KUCUKOGLU M, NILSSON J, ZHENG Bo, *et al.* *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 (WOX 4)*-like genes regulate cambial cell division activity and secondary growth in *Populus* trees[J]. *New Phytologist*, 2017, **215**(2): 642–657. DOI: [10.1111/nph.14631](https://doi.org/10.1111/nph.14631).
- [15] LI Jianbo, JIA Huixia, SUN Pei, *et al.* The *WUSCHELa (PtoWUSa)* is involved in developmental plasticity of adventitious root in poplar[J]. *Genes*, 2020, **11**(2): 176. DOI: [10.3390/genes11020176](https://doi.org/10.3390/genes11020176).
- [16] TAJO S M, PAN Zhao'e, HE Shoupu, *et al.* Characterization of *WOX* genes revealed drought tolerance, callus induction, and tissue regeneration in *Gossypium hirsutum*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, **13**: 928055. DOI: [10.3389/fgene.2022.928055](https://doi.org/10.3389/fgene.2022.928055).
- [17] 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**(1): 229–241. DOI: [10.1105/TPC.112.103432](https://doi.org/10.1105/TPC.112.103432).
- [18] YASUI Y, OHMORI Y, TAKEBAYASHI Y, *et al.* *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* acts as a key regulator in early leaf development in rice[J]. *PLoS Genetics*, 2018, **14**(4): e1007365. DOI: [10.1371/journal.pgen.1007365](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007365).
- [19] 李翔宇. 毛竹 *WOX* 基因家族进化与初步功能研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2020. LI Xiangyu. *Evolutionary and Functional Analysis of WUSCHEL-related Homeobox Family of Moso Bamboo*[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2020. DOI: [10.27625/d.cnki.gzlk.2020.000014](https://doi.org/10.27625/d.cnki.gzlk.2020.000014).
- [20] MU Changhong, JIANG Jutang, FANG Hui, *et al.* Unraveling developmental patterns and differentiation trajectories in a single developing internode of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, **222**: 119646. DOI: [10.1016/j.indcrop.2024.119646](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119646).
- [21] 周俊杰, 王艺光, 董彬, 等. 桂花 *OjPSY*、*OjPDS* 和 *OjHYB* 基因启动子克隆及表达特性分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2023, **40**(1): 64–71. ZHOU Junjie, WANG Yiguang, DONG Bin, *et al.* Cloning and expression characterization of *OjPSY*, *OjPDS* and *OjHYB* gene promoters in *Osmanthus fragrans*[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2023, **40**(1): 64–71. DOI: [10.11833/j.issn.2095-0756.20220110](https://doi.org/10.11833/j.issn.2095-0756.20220110).
- [22] 冯珊珊, 王璐, 周益, 等. *WOX* 家族基因调控植物生长发育和非生物胁迫响应的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2023, **39**(5): 1–13. FENG Shanshan, WANG Lu, ZHOU Yi, *et al.* Research progresses on *WOX* family genes in regulating plant development and abiotic stress response[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, **39**(5): 1–13. DOI: [10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-1098](https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2022-1098).
- [23] LIAN Gaibin, DING Zhiwen, WANG Qin, *et al.* Origins and evolution of *WUSCHEL*-related homeobox protein family in plant kingdom[J]. *The Scientific World Journal*, 2014: 534140. DOI: [10.1155/2014/534140](https://doi.org/10.1155/2014/534140).
- [24] 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. DOI: [10.1016/j.devcel.2008.03.008](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.008).
- [25] HERNANDEZ-GARCIA C M, FINER J J. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements[J]. *Plant Science*, 2014, **217/218**: 109–119. DOI: [10.1016/j.plantsci.2013.12.007](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007).

- [26] 刘利伟, 范付华, 徐刚. 麻风树 *JcGASA6* 基因启动子克隆及其功能初步分析[J]. *植物生理学报*, 2023, **59**(7): 1321–1328. LIU Liwei, FAN Fuhua, XU Gang. Cloning and preliminary function analysis of *Jatropha curcas* *JcGASA6* gene promoter[J]. *Plant Physiology Journal*, 2023, **59**(7): 1321–1328. DOI: [10.13592/j.cnki.ppj.100560](https://doi.org/10.13592/j.cnki.ppj.100560).
- [27] CUI Kai, HE Caiyun, ZHANG Jianguo, *et al.* Characteristics of temporal and spatial tissue development during the rapidly growing stage of Moso bamboo culms[J]. *Forest Research*, 2012, **25**(4): 425–431. DOI: [10.1007/s11783-011-0280-z](https://doi.org/10.1007/s11783-011-0280-z).
- [28] MA Yanfei, MIOTK A, ŠUTIKOVIĆ Z, *et al.* WUSCHEL acts as an auxin response rheostat to maintain apical stem cells in *Arabidopsis*[J]. *Nature Communications*, 2019, **10**(1): 5093. DOI: [10.1038/s41467-019-13074-9](https://doi.org/10.1038/s41467-019-13074-9).
- [29] LI Long, CHENG Zhanchao, MA Yanjun, *et al.* The association of hormone signalling genes, transcription and changes in shoot anatomy during moso bamboo growth[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, **16**(1): 72–85. DOI: [10.1111/pbi.12750](https://doi.org/10.1111/pbi.12750).
- [30] WEI Qiang, JIAO Chen, DING Yulong, *et al.* Cellular and molecular characterizations of a slow-growth variant provide insights into the fast growth of bamboo[J]. *Tree Physiology*, 2018, **38**(4): 641–654. DOI: [10.1093/treephys/tpx129](https://doi.org/10.1093/treephys/tpx129).
- [31] Brackmann K, Qi Jiyan, GEBERT M, *et al.* Spatial specificity of auxin responses coordinates wood formation[J]. *Nature Communications*, 2018, **9**: 875. DOI: [10.1038/s41467-018-03256-2](https://doi.org/10.1038/s41467-018-03256-2).
- [32] 陈铭. 毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 笋快速生长的细胞路线图, 转录组图谱及环境调控因子[D]. 南京: 南京林业大学, 2023. CHEN Ming. *Rapid Growth of Moso Bamboo (Phyllostachys edulis): Cellular Roadmaps, Transcriptome Dynamics, and Environmental Factors*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2023. DOI: [10.27242/d.cnki.gnjlu.2023.001055](https://doi.org/10.27242/d.cnki.gnjlu.2023.001055).
- [33] TANG Yuehui, LI Han, GUAN Yaxin, *et al.* Genome-wide identification of the physic nut WUSCHEL-related homeobox gene family and functional analysis of the abiotic stress responsive gene *JcWOX5*[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, **11**: 670. DOI: [10.3389/fgene.2020.00670](https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00670).
- [34] HAN Ni, TANG Rui, CHEN Xueqian, *et al.* Genome-wide identification and characterization of *WOX* genes in *Cucumis sativus*[J]. *Genome*, 2021, **64**(8): 761–776. DOI: [10.1139/gen-2020-0029](https://doi.org/10.1139/gen-2020-0029).
- [35] 单强强, 阳文龙, 李英洁, 等. 乌拉尔图小麦 *WOX* 基因的克隆与表达分析[J]. *麦类作物学报*, 2019, **39**(8): 903–911. SHAN Qiangqiang, YANG Wenlong, LI Yingjie, *et al.* Cloning and expression analysis of *WOX* genes in *Triticum urartu*[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2019, **39**(8): 903–911. DOI: [10.7606/j.issn.1009-1041.2019.08.03](https://doi.org/10.7606/j.issn.1009-1041.2019.08.03).
- [36] 陈运梁, 邹竹荣, 杨双龙. 外源茉莉酸甲酯对盐胁迫下小桐子幼苗渗透调节和脯氨酸代谢的影响[J]. *西北植物学报*, 2023, **43**(5): 794–804. CHEN Yunliang, ZOU Zhurong, YANG Shuanglong. Effect of exogenous methyl jasmonate on osmotic adjustment capacity and proline metabolism of *Jatropha curcas* seedlings under salt stress[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, **43**(5): 794–804. DOI: [10.7606/j.issn.1000-4025.2023.05.0794](https://doi.org/10.7606/j.issn.1000-4025.2023.05.0794).
- [37] 杨文博, 严汉池. 植物水杨酸受体 NPR 结构与功能研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2023, **42**(11): 70–76. YANG Wenbo, YAN Hanchi. Research progress on structure and function of plant salicylic acid receptor NPR[J]. *Chinese Wild Plant Resources*, 2023, **42**(11): 70–76. DOI: [10.3969/j.issn.1006-9690.2023.11.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-9690.2023.11.011).
- [38] 焦龙, 陈勋, 谭荣荣, 等. 植物[1]焦龙, 陈勋, 谭荣荣, 等. 植物茉莉酸与水杨酸信号途径互作研究进展[J]. *植物生理学报*, 2023, **59**(8): 1489–1504. JIAO Long, CHEN Xun, TAN Rongrong, *et al.* Research progress on the interaction between jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2023, **59**(8): 1489–1504. DOI: [10.13592/j.cnki.ppj.300133](https://doi.org/10.13592/j.cnki.ppj.300133).