

中国红豆杉 TcAPLs 基因的克隆及表达分析

李艳艳, 杨艳芳, 刘洪伟, 王 帅, 邱德有*

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, 北京 100091

摘 要: 目的 克隆中国红豆杉 altered phloem development (APL) 基因, 研究 APL 在中国红豆杉剥皮后树皮再生过程中的表达状况, 以揭示其可能的调控作用机制。方法 利用反转录 PCR (RT-PCR) 方法克隆得到 3 个中国红豆杉 APL (TcAPLs) 基因的 cDNA 全长序列, 分别命名为 TcAPL1、TcAPL2 和 TcAPL3, 进一步利用生物信息学工具对其进行分析, 最后利用半定量 RT-PCR 对中国红豆杉不同组织和 qRT-PCR 技术对其剥皮再生不同时期的 TcAPLs 进行表达分析。结果 系统进化树结果显示, TcAPL1 与 TcAPL2 编码的蛋白与川桑的 APL 蛋白亲缘关系最近, 聚为一类; TcAPL3 处在 APL 另一个大的独立分支上。组织表达谱分析表明 TcAPL1 和 TcAPL2 2 个基因主要在根、茎、叶片和韧皮部(含形成层)中均高表达; TcAPL3 在叶片中表达量较高, 而在根和木质部(含形成层)表达较低。在中国红豆杉剥皮再生过程中, TcAPL1 和 TcAPL2 2 个基因的表达水平随着时间的延长表现为先上升后下降的趋势, 均在 36 d 下降最明显; TcAPL3 的表达则在整个组织再生过程中被抑制。结论 克隆了 3 个 TcAPLs 基因, 3 个基因在中国红豆杉剥皮再生过程中均有响应, 推测它们在中国红豆杉植物剥皮后组织再生中起一定的调控作用。

关键词: 中国红豆杉; APL 基因; 基因克隆; 生物信息学分析; 表达

中图分类号: 282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)10-1512-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.10.020

Cloning and expression analysis of TcAPLs in *Taxus chinensis*

LI Yan-yan, YANG Yan-fang, LIU Hong-wei, WANG Shuai, QIU De-you

State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, The Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China

Abstract: **Objective** To clone altered phloem development (APL) genes from *Taxus chinensis* and reveal their potential regulatory role in tissues regeneration after bark girdling by investigating the expression profiles of these APLs. **Methods** The full-length three APL genes were isolated using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and were named as TcAPL1, TcAPL2, and TcAPL3, respectively. The expression profiles of these genes in different tissues and at different regeneration stages after bark girdling were analyzed by semi-quantitative RT-PCR and quantitative real-time PCR (qRT-PCR), respectively. **Results** Phylogenetic tree analysis suggested that TcAPL1 and TcAPL2 could be clustered together with APL protein of *Morus notabilis*, which are closest in genetic relationship; TcAPL3 could be clustered with APL proteins of another big independent branch. The analysis of gene expression patterns in different tissues showed that the transcript abundances of TcAPL1 and TcAPL2 were mainly expressed in the roots, stems, leaves, and phloem with cambium; While TcAPL3 was higher in the leaves than that in the roots and xylem with cambium. Through analysis of the expression patterns in regeneration tissues after bark girdling, the mRNA expressions of TcAPL1 and TcAPL2 showed a up-down trend in the following periods and were found to decrease notably at 36 d after bark girdling, while the expression of TcAPL3 was repressed at all stages after bark girdling. **Conclusion** In this study, three TcAPLs genes are cloned from *T. chinensis*, and their expressions are regulated in the regeneration processes after bark girdling. Our results demonstrate that APL might play a regulatory role in tissue regeneration after bark girdling in *T. chinensis*.

Key words: *Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd.; APL gene; gene cloning; bioinformatic analysis; expression

红豆杉属 *Taxus* L. 为红豆杉科 (Taxaceae) 植物, 是裸子植物的一个属, 为多年生乔木或大型灌木树种, 生长缓慢仅为一般针叶树生长速度的 1/10。红豆杉属包含至少 14 个种, 在我国境内分布的红豆

收稿日期: 2015-02-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31170628, 31300567)

作者简介: 李艳艳 (1984—), 女, 河南襄城人, 博士在读, 研究方向为植物分子育种。Tel: 13161803477 E-mail: liyanyan041@163.com

*通信作者 邱德有, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物次生代谢研究。E-mail: qiudy@caf.ac.cn

杉有4个种1个变种^[1]。紫杉醇(taxol)是从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* Nutt. 树皮中分离提取到的天然抗肿瘤物质,是迄今为止最具抗癌活性的天然化合物之一^[2-3]。现在广泛用于对肺癌、乳腺癌、卵巢癌等的治疗^[4]。Strobel等^[5]利用同位素¹⁴C标记的乙酸盐为底物的方法证明短叶红豆杉韧皮部合成紫杉醇的能力很强。红豆杉树皮包含许多紫杉醇合成和储存的酶,韧皮部是树皮的最重要部分,所以红豆杉植株中紫杉醇量高低主要取决于其韧皮部量的多少(厚度和长度)。对一般植物而言,树皮在植物热绝缘性、养分存储、水损失预防和害虫的保护方面起着重要作用^[6],其韧皮部筛管分子的细胞形成特定运输网络,便于光合同化物和信号分子的长距离分配,作用更为重要^[7]。

许多植物特别是树木,表现出2种截然不同的发育类型,初生生长和次生生长^[8],形成层细胞通过平周分裂分化出次生木质部和次生韧皮部,最终形成以木质部为中心的木质部形成区和韧皮部同心环结构^[9]。MYB转录因子指含有MYB结构域的一类转录因子,是目前植物中最大的一类转录因子。MYB结构域是N端由51~52个氨基酸残基采用螺旋-转角-螺旋的形式(HTH)与DNA大沟结合,一般都含有3个保守的色氨酸残基且相邻的2个色氨酸间一般相隔18或19个氨基酸,这些色氨酸起着疏水核心的作用^[10-11]。APL(altered phloem development)是编码一类具MYB卷曲螺旋结构的转录因子的基因,特异地在韧皮部表达,该转录因子编码基因突变后,拟南芥根部韧皮部的筛管和伴胞没有形成,取而代之的是木质部的细胞,异位表达APL基因可以抑制木质部细胞的分化^[12-13]。采用激活标记技术得到的杨树 *Populus tremula* × *Populus alba* 突变体,其表型为韧皮部增厚,同时检测到APL基因表达水平成上调趋势^[14]。大面积剥皮后次生维管组织再生的最佳条件最先在杜仲上建立^[15]。利用该实验系统,人们已从转录组水平、功能基因组水平和蛋白质组水平系统研究维管形成层发生和分化及韧皮部、木质部形成相关的基因,探讨木本植物的次生维管组织形成的分子机制^[16-18],但中国红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd. 的剥皮再生及其分子机制研究还未见有报道。中国红豆杉是中国特有种,有关其研究主要集中在组织培养^[19]和紫杉醇合成相关酶^[20]等方面。为了研究其次生维管组织形成的机制,课题组前期利用高通量测序技

术(Illumina HiSeq™ 2000)对中国红豆杉的剥皮再生组织进行了转录组测序,并重点分析了参与韧皮部分化、发育调控的关键基因APL。本研究分析筛选得到了中国红豆杉APL(TcAPLs)片段序列,克隆了其中3个TcAPLs全长cDNA序列,并对其进行生物信息学和表达情况分析。研究结果以期今后深入揭示APL基因在中国红豆杉韧皮部分化、发育过程中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料和主要试剂

样品由湖北省襄阳市林业科学研究所提供,由中国林业科学研究院林业研究所邱德有研究员鉴定为中国红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilg.) Rehd. 十年生实生苗及三年生苗。

EASYpin Plus 植物RNA快速提取试剂盒购于北京艾德莱生物科技有限公司,1st Strand cDNA Sythesis Kit 与 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase mix 均购于大连宝生物公司(TakaRa); TIANScript RT Kit 购于天根生化科技有限公司; SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2×) Universal 购于KAPA公司。

1.2 方法

1.2.1 中国红豆杉剥皮再生材料与其不同组织材料的采集 在湖北襄阳于2013年6月初形成层活动旺盛期进行剥皮处理,取生长良好、干形良好、茎干均匀的中国红豆杉,按照Li等^[15]的方法进行剥皮实验,稍作改动。对选取的中国红豆杉从其基部距地面约40 cm处开始一直向上环剥约25 cm,分别用无菌处理的刀片轻轻刮取暴露在外树干的材料,做好标记,迅速投入液氮中,为对照,即第0天。剥皮后将树用消毒的塑料薄膜包裹好。剥皮后第6天,选择第0天未取过样的树,揭开塑料薄膜,刮取树干上的材料做好标记立即投入液氮中,重新包裹好树干。剥皮后第12、18、24、30、36天参照第6天的方法分别取样,共处理了实验材料15株。采集三年生中国红豆杉的根、茎、叶、包含形成层的韧皮部和包含形成层的木质部的组织用于组织表达分析。

1.2.2 中国红豆杉总RNA的提取及cDNA的合成 将采集的中国红豆杉的不同组织材料和不同时期剥皮再生的组织用液氮研磨之后,采用EASYpin Plus 植物RNA快速提取试剂盒提取其总RNA,用30 μL 无RNA酶的处理水溶解RNA。并对RNA进行浓度、完整性等质量检验后,保存于-80℃。然后用TIANScript RT Kit 反转录试剂盒合成cDNA,用作

RT-PCR 和 qRT-PCR 分析。将中国红豆杉的树皮提取的 RNA 按照 1st Strand cDNA Sythesis Kit 说明书进行反转录合成单链 cDNA, 用于基因克隆。

1.2.3 TcAPLs 基因的克隆 根据这 3 个 APL 序列信息, 分别在其开放阅读框 (ORF) 上、下游设计特异性引物 (表 1), 扩增全长 cDNA 序列。采用 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase mix 12.5 μ L, 引物 0.6 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 用灭菌双蒸水补足 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 35 个循环,

最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。将获得的 PCR 产物连接于 pEASY-T1 载体上, 并利用中美泰和生物技术有限公司 (北京) 的 ABI 3730 进行测序。

1.2.4 TcAPLs 基因的生物信息学分析 利用 ExPaSy、ProtScale、SOPMA 和 Swiss-model 等生物信息学软件对 TcAPLs 的理化性质、结构域及其高级结构进行预测与分析, 分析软件的网址见表 2, 多序列比对使用 Clustalx 1.83 软件; 进化树构建用 MEGA 4.0 软件完成, 采用邻接算法 (neighbor joining, NJ), bootstrap 检测设置重复为 1 000 次。

表 1 所用引物列表

Table 1 Primer sequences used

基因名称	引物名称	引物(5'-3')	预期片段大小/bp
TcAPL1	APL1-F	GACAAACTGTTTTCCTTTTCTC	1 698
	APL1-R	GCCAGGATCTTCACCACTTTC	
TcAPL2	APL2-F	GATGCAATTCAAACAGTCTGT	1 388
	APL2-R	TCATGTACACTGCCTTCCTGT	
TcAPL3	APL3-F	AATCGCAACACTAAGCAGATA	1 275
	APL3-R	TTGTTTGAGCCATCCTTGCC	
RT-APL1	RT-APL1-F	GTTGCCTCTGAATGTAGCCAG	
	RT-APL1-R	GCCAGGATCTTCACCACTTTC	
RT-APL2	RT-APL2-F	TAGATTCAGCCGCTTCTTTGC	
	RT-APL2-R	TCATGTACACTGCCTTCCTGT	
RT-APL3	RT-APL3-F	CGGATGATGTAAGGTTGCGG	
	RT-APL3-R	TTGTTTGAGCCATCCTTGCC	
actin	actin-F	AAGAGAAGCTTGCTTATGTAGC	
	actin-R	TCTGATATCCACATCACACTTC	

表 2 所用生物信息在线分析软件

Table 2 Online analysis softwares of informatics used

检索内容	软件名称	在线网址
理化性质	ExPaSy-Protparam	http://www.expasy.org/protparam/
结构域分析	CD Search	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
二级结构分析	SOPMA	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
三维结构模拟	Swiss-model	http://swissmodel.expasy.org/

1.2.5 TcAPLs 基因的表达分析 采用 RT-PCR 分析 APL 基因在正常生长的中国红豆杉根、茎、叶、包含形成层的韧皮部、包含形成层的未成熟木质部间的表达模式, 以 actin 为内参基因, 引物序列见表 1。采用 Genesnap 软件处理系统分析电泳图像目标条带的光密度值, 计算各因子与 actin 的光密度比值作为半定量指标。采用 qRT-PCR 检测剥皮后不同时期组织中这 2 个基因的表达水平。荧光定量 PCR 反应体系: 模板 cDNA 1 μ L, 每对特异性引物均为 0.4 μ L (10 μ mol/L), SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2 $\times$) 10 μ L, 0.4 μ L

ROX, 用灭菌双蒸水补足 20 μ L, 具体的操作步骤按 SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2 $\times$) Universal 说明书进行。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C、30 s, (95 $^{\circ}$ C、5 s, 56 $^{\circ}$ C、34 s) $\times$ 40 个循环, 以灭菌双蒸水为模板作为空白对照, 在 ABI7500 仪器 (ABI, 美国) 上进行。目的基因相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[21], 所有反应均为 2 次生物学重复, 3 次技术性重复。

2 结果分析

2.1 基因克隆

利用生物信息学分析筛查中国红豆杉的剥皮再

生组织转录组数据库比对查找获得了 3 个 TcAPLs 电子序列。经 NCBI 的 BLASTx 比对及 ORF 分析显示三者均具有完整的 ORF, 因此推测为全长基因, 分别命名为 TcAPL1、TcAPL2 和 TcAPL3。以中国红豆杉树皮总 cDNA 为模板, 利用 RT-PCR

方法扩增目的条带, PCR 产物经过 1.0% 的琼脂糖电泳之后, 检测到大小分别为 1 700、1 300、1 200 bp 左右的条带。测序的序列结果与转录组电子序列基本一致, 3 个基因序列 cDNA 克隆的基本信息见表 3。

表 3 TcAPLs 的 cDNA 序列特征
Table 3 cDNA sequence identities of TcAPLs

基因名称	全长 cDNA/bp	5'非编码区/bp	3'非编码区/bp	编码区/bp	氨基酸残基/aa
TcAPL1	1 698	26	22	1 650	459
TcAPL2	1 388	26	21	1 341	446
TcAPL3	1 275	41	67	1 167	388

2.2 TcAPLs 生物信息学分析

运用 ExPaSy-Protparam 工具对 TcAPLs 编码蛋白的理化性质进行了分析和预测, 其中这 3 个 TcAPLs 基因的 ORFs 编码蛋白推测的氨基酸残基数为 388~546 aa, 预测的相对分子质量为 $4.320 \times 10^4 \sim 6.008 \times 10^4$, 理论等电点在 5.38~6.49。从表 4

可看出, 3 个基因之间的蛋白质理化性质基本相似, 差异并不明显。蛋白质的二级结构主要 TcAPLs 蛋白的氨基酸主要由 α -螺旋 (alpha helix)、无规则卷曲 (random coil) 和延伸链 (extended strand) 和 β -转角 (beta turn) 4 种形式组成, 并且这 4 种结构均匀分布在蛋白质中, 分布情况见表 5。

表 4 TcAPLs 蛋白序列特征
Table 4 Sequence characteristics of TcAPLs protein

蛋白名称	预测蛋白的分子式	相对分子质量	理论等电点	正电残基 (Arg + Lys)	带负电残基 (Asp + Glu)
TcAPL1	C ₂₆₁₆ H ₄₁₁₄ N ₇₂₈ O ₈₆₇ S ₁₄	6.008×10^4	5.38	44	66
TcAPL2	C ₂₀₈₀ H ₃₃₁₅ N ₆₂₉ O ₆₈₀ S ₁₂	4.840×10^4	6.49	43	48
TcAPL3	C ₂₀₈₀ H ₃₃₁₅ N ₆₂₉ O ₆₈₀ S ₁₂	4.320×10^4	5.83	45	53

表 5 TcAPLs 蛋白的二级结构
Table 5 Secondary structure of TcAPLs protein

蛋白名称	二级结构类型的比例/%			
	α -螺旋	无规则卷曲	延伸链	β -转角
TcAPL1	28.96	46.63	17.30	7.10
TcAPL2	30.72	50.67	10.09	8.52
TcAPL3	40.72	49.74	7.47	2.06

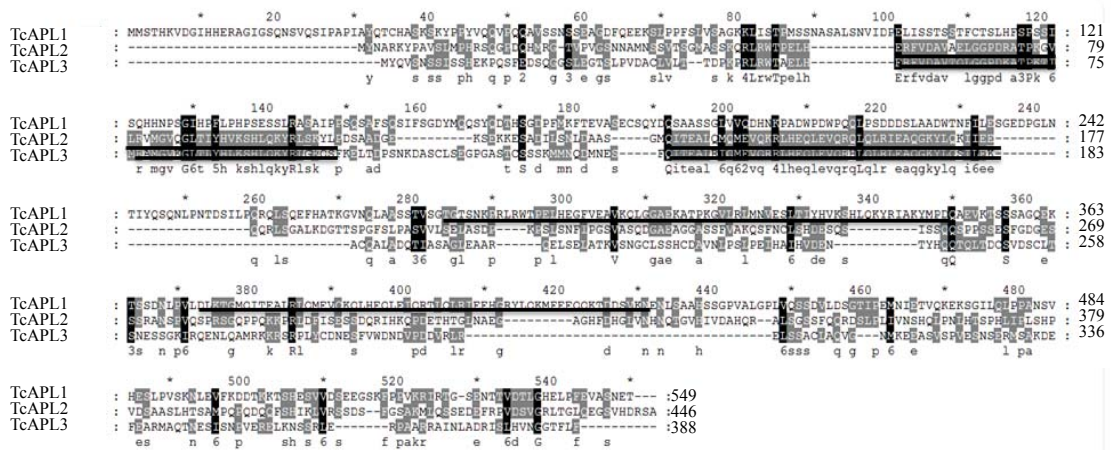
对推测的 TcAPLs 氨基酸序列进行序列比对分析, 它们都具有 APL 基因的 MYB 保守结构域 (图 1)。同时利用 NCBI 在线工具 CD Search 对 3 个 TcAPLs 进行保守结构域的分析, 也表明该转录因子均具有保守的 MYB 结构域 (图 2)。MYB 结构域是 N 端由 51~52 个氨基酸残基采用螺旋-转角-螺旋的形式 (HTH) 与 DNA 大沟结合^[10-11]。这与 Rubio 等^[22]报道的 APL 蛋白含有保守的 MYB 的 DNA 结构域相一致。

由于 TcAPL1 的氨基酸残基数最多, 且 TcAPLs

二级结构相似性较高, 因此以 TcAPL1 为例, 用 SWISS-MODEL 模拟其三维结构 (图 3), 三维模型中用于该模型的氨基酸残基范围为 289~344 位。模型以 1irz.1.A 蛋白为模板, 序列同源性为 46.00%, 可以看到一个卷曲螺旋的结构 (coiled-coil domain)。而此结构涉及蛋白与蛋白的相互作用^[22]。

2.3 TcAPLs 进化树分析

从 GenBank 数据库中筛选获得苹果 *Malus domestica* Borkh、川桑 *Morus notabilis* L.、甜橙 *Citrus sinensis* L.、葡萄 *Vitis vinifera* L.、烟草 *Nicotiana tabacum*



下划线表示 MYB 结构域

Underline showed MYB conserved domains

图1 TcAPLs 蛋白多序列比对分析

Fig. 1 Comparison on multiple alignment of TcAPLs protein

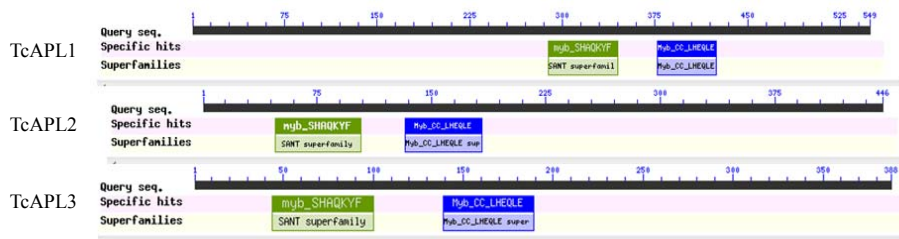


图2 TcAPLs 蛋白保守结构域预测分析

Fig. 2 Predicted conserved domains of TcAPLs protein

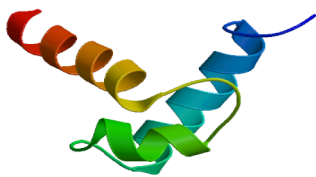


图3 TcAPL1 蛋白三维结构分析

Fig. 3 3D structure of TcAPL1 protein

L、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 等不同植物来源的 APL 的氨基酸序列, 利用 MEGA 4.0 软件构建了系统进化树 (图 4)。结果表明, 无根进化树出现大的 3 个独立分支: TcAPL1 与川桑的 APL 氨基酸 (EXB62671) 具有很高的相似性, 聚为一类, 处于独立的小分支上; TcAPL2 与川桑的 APL (EXB64633) 和马铃薯的 APL (XP 001275151) 聚为一类, 二者处在一个大的独立分支上。TcAPL3 与芸苔和香瓜等的 APL 处在一个大的独

立分支上。而拟南芥 APL 则处于与上述所用 APL 亲缘关系都较远的一个大的独立分支上。聚类分析进一步证实了克隆的 3 个 TcAPLs 为中国红豆杉的 APL 基因。

2.4 TcAPLs 基因在不同组织中的表达分析

利用半定量 RT-PCR 技术对 3 个 TcAPLs 基因在中国红豆杉不同组织中的表达进行分析 (图 5), Genesnap 软件分析目标条带的光密度值 (图 6), 结果显示, 3 个基因在中国红豆杉的根、茎和叶片中均有表达; TcAPL1 和 TcAPL2 在根、茎、叶片和韧皮部 (含形成层) 中的表达量相当, 且明显高于木质部 (含形成层) 的表达量, 特别是 TcAPL1 在韧皮部 (含形成层) 中的表达量是木质部 (含形成层) 的 2 倍多。TcAPL3 在叶片中表达量最高, 而在根和木质部 (含形成层) 中表达较低, 其在韧皮部 (含形成层) 中的表达量是木质部 (含形成层) 中的 2 倍。

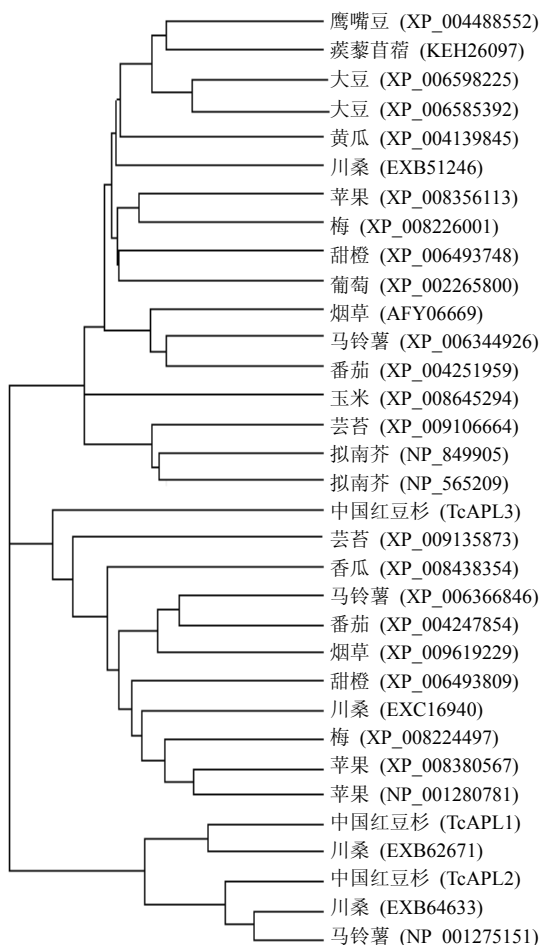
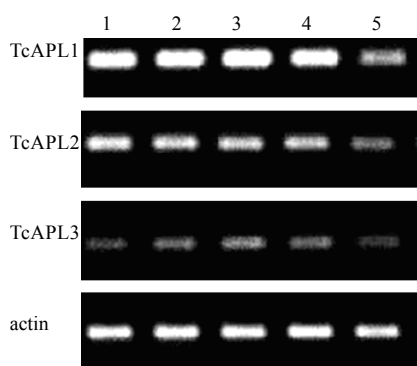
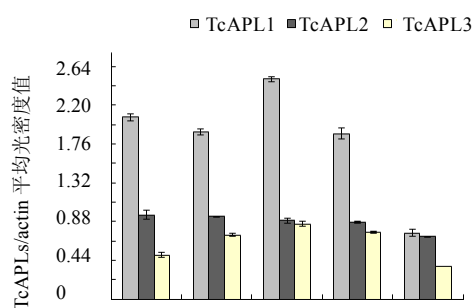


图 4 TcAPLs 蛋白与其他植物来源的 APLs 系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of TcAPLs protein and APLs from other plants



1-根 2-茎 3-叶 4-韧皮部 (含形成层) 5-木质部 (含形成层)
1-root 2-stems 3-leave 4-phloem with cambium 5-xylem with cambium

图 5 TcAPLs 基因在中国红豆杉不同组织中的表达
Fig. 5 Expression of TcAPLs genes in different tissues of *T. chinensis*



1-根 2-茎 3-叶 4-韧皮部 (含形成层) 5-木质部 (含形成层)
1-roots 2-stems 3-leaves 4-phloem with cambium 5-xylem with cambium

图 6 中国红豆杉不同组织中 TcAPLs/actin 平均光密度值比较
Fig. 6 Comparison on average OD of TcAPLs/actin in different tissues of *T. chinensis*

2.5 TcAPLs 基因在剥皮再生过程中的表达分析

TcAPLs 基因在中国红豆杉剥皮再生过程中相对表达情况见图 7。TcAPL1 表达量前 30 d 都处于上调表达, 尤其 12 d 和 30 d 时, 是对照的 3 倍左右, 而在 36 d 时下调表达; TcAPL2 在前期基因表达量变化不大, 在 18 d 后有所增加, 在 24 d 时达到最高, 随后被抑制表达。而 TcAPL3 在中国红豆杉剥皮再生组织中一直处于下调趋势。

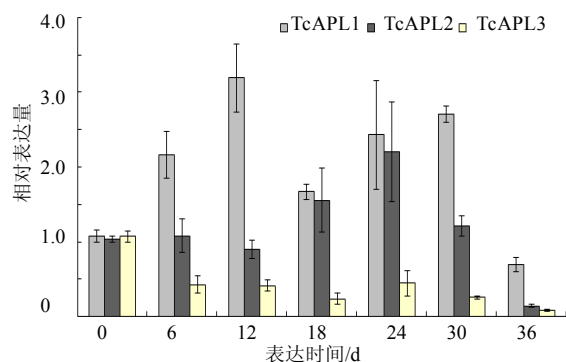


图 7 TcAPLs 基因在中国红豆杉剥皮再生过程中的表达水平
Fig. 7 Expression levels of TcAPLs in regeneration after bark girdling in *T. chinensis*

3 讨论

本研究通过 RT-PCR 技术成功克隆获得了 3 个中国红豆杉 TcAPLs 基因, TcAPLs 是红豆杉属植物第 1 次获得该基因。3 个基因与其他木本植物中克隆的 APL 基因编码的蛋白具有很高相似性, 而且它们编码的氨基酸序列预测有保守的 MYB 的 DNA 结

合域和一个卷曲螺旋蛋白与蛋白的二聚化位点^[22], 表明这 3 个基因均属于典型的 APL 基因。

在正常生长的中国红豆杉不同组织中均能检测 TcAPLs 基因的表达,但也具有组织特异性。TcAPL1 和 TcAPL2 主要在根、茎、叶片和韧皮部(含形成层)中的表达;TcAPL3 在根和木质部(含形成层)中表达较弱,推测其可能是由于它们氨基酸的差异,而导致各自在组织表达模式上有所不同。在拟南芥维管组织发育过程中,APL 基因是第一个确定有特定的功能的基因:在不对称的韧皮部细胞分裂时,APL 表达就固定在了维管组织区^[12]。在杨树 PtaLBD1 突变体中 APL 基因在韧皮部的表达量最高^[14]。这些与 TcAPLs 基因在茎中和韧皮部(含形成层)高表达是一致的。

这 3 个基因相比,无论是中国红豆杉正常条件下还是在剥皮再生过程中,TcAPL1 的转录水平均高于 TcAPL2 和 TcAPL3。在剥皮再生过程中,TcAPL1 和 TcAPL2 2 个基因随着时间的延长表现出先上升后下降的趋势,但 TcAPL1 诱导表达上升的时间比 TcAPL2 要早,在剥皮再生第 6 天就开始表现出上升的趋势;而 TcAPL3 的表达则在整个组织再生过程中被抑制。TcAPL3 表达情况与 APL 基因在杨树次生维管再生过程的韧皮部形成期(第 2 阶段)转录水平是增强的,直到损伤的形成层形成(第 3 阶段)时也保持较高得水平^[18]的结果有所不同。推测此现象与红豆杉剥皮再生过程中不同的 APL 在具体的功能上存在差异有关,植物维管组织的发育过程中 APL 基因具有双重功能,可同时促进韧皮部发育和抑制木质部分化^[12]。TcAPL3 抑制表达也许是在促进木质部分化,而不致剥皮再生过程仅仅调控韧皮部分化而使再生的组织畸形发育,是植物损伤后自我调控的一种形式。由于 APL 基因的功能在拟南芥中的研究较为深入,其他物种如杨树只是根据韧皮部增厚的表型而略有涉及并没有精细研究。目前还没有与 TcAPL3 同源性较高的其他物种的 APL 有相似表现的文献报道。

本研究的 3 个基因尽管都是中国红豆杉剥皮再生中重要的 APL 成员,它们在组织表达模式上和剥皮后组织再生表达上存在一定差异,预示其功能更为复杂。已知多个 NAC 基因参与拟南芥和水稻等植物的分生组织产生和器官边界的形成过程^[23-25]。近年在拟南芥 APL 突变体中,发现 NAC45 基因表达量减少,暗示 NAC45 基因依赖

于 APL 基因,为了验证推测,同时用 pAPL (APL-GR 转化 APL 突变体植株)检测到 NAC45 融合蛋白呈上调表达,预示 NAC45 可能是 APL 的直接靶基因^[26],因此,对 TcAPLs 基因功能的深入研究,将对揭示植物维管组织特别是韧皮部发育的分子机制具有重要的意义,这也将是下一步研究的主要方向。

参考文献

- [1] 傅立国,陈潭清,郎 楷,等. 中国高等植物 [M]. 青岛: 青岛出版社, 2000.
- [2] Wani M C, Taylor H L, Wall M E, *et al.* Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, 93(9): 2325-2327.
- [3] McGuire W P. The story of taxol-Nature and politics in tepursuit of an anti-cancer drug [J]. *Science*, 2001, 292: 1073-1074.
- [4] Craag G M, Scheparat S A, Suffness M, *et al.* The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents [J]. *J Nat Prod*, 1993, 56(10): 1657-1668.
- [5] Strobel G A, Stierle A, van Kuijk F J G M. Factors influencing the *in vitro* production of radiolabeled taxol by Pacific yew, *Taxus brevifolia* [J]. *Plant Sci*, 1992, 84: 65-74.
- [6] van Bel A J E. The phloem, a miracle of ingenuity [J]. *Plant Cell Environ*, 2003, 26(1): 125-149.
- [7] Lucas W J, Groover A, Lichtenberger R, *et al.* The plant vascular system: Evolution, development and functions [J]. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55(4): 294-388.
- [8] Baucher M, El Jaziri M, Vandeputte O. From primary to secondary growth: Origin and development of the vascular system [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58: 3485-3501.
- [9] Elo A, Immanen J, Nieminen K, *et al.* Stem cell function during plant vascular development [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, 20(9): 1097-1106.
- [10] Frampton. *Myb Transcription Factors: their Role in growth, differentiation and disease* [M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Springer, 2004.
- [11] Jin H L, Martin C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 41(5): 577-585.
- [12] Bonke M, Thitamadee S, Mähönen A P, *et al.* APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2003, 426: 181-186.
- [13] Truernit E, Bauby H, Dubreucq B, *et al.* High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of

- Phloem development and structure in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(6): 1494-1503.
- [14] Yordanova Y S, Reganb S, Busova V, *et al.* Members of the LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factor family are involved in the regulation of secondary growth in *Populus* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 3662-3677.
- [15] Li Z L, Cui K M, Yu C S, *et al.* Anatomical studies of regeneration after ringing of *Eucommia ulmoides* [J]. *Acta Bot Sin*, 1981, 23: 6-13.
- [16] Wang M J, Qi X L, Zhao S T, *et al.* Dynamic changes in transcripts during regeneration of the secondary vascular system in *Populus tomentosa* Carr, revealed by cDNA microarrays [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 215-219.
- [17] Pang Y, Zhang J, Cao J, *et al.* Phloem transdifferentiation from immature xylem cells during bark regeneration after girdling in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(6): 1341-1351.
- [18] Zhang J, Gao G, Chen J J, *et al.* Molecular features of secondary vascular tissue regeneration after bark girdling in *Populus* [J]. *New Phytol*, 2011, 192(4): 869-884.
- [19] 马 均, 马明东. 曼地亚红豆杉的组织培养快繁技术 [J]. 林业科学, 2007, 43(7): 30-34.
- [20] 阮仁余, 孔建强, 郑晓东, 等. 中国红豆杉细胞色素 P450 还原酶的基因克隆、表达与活性分析 [J]. 遗传, 2010, 32(11): 1187-1194.
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C(T) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] Rubio V, Linhares F, Solano R, *et al.* A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(16): 2122-2133.
- [23] Souer E, vanHouwelingen A, Kloos D, *et al.* The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries [J]. *Cell*, 1996, 85(2): 159-170.
- [24] Vroemen C W, Mordhorst A P, Albrecht C, *et al.* The CUP-SHAPED COTYLEDON 3 gene is required for boundary and shoot meristem formation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(7): 1563-1577.
- [25] Mao C, Ding W, Wu Y, *et al.* Overexpression of a NAC-domain protein promotes shoot branching in rice [J]. *New Phytol*, 2003, 176(2): 288-298.
- [26] Kaori M F, Shri R Y, Satu L *et al.* *Arabidopsis* NAC45/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation [J]. *Science*, 2014, 345(6199): 933-937.