

CsAHL25通过影响CsHBI、LEC1/B3基因表达 调控柑橘体细胞胚发生

叶长宁^{1,3}, 徐梦梦^{1,3}, 刘兰兰^{1,3}, 付玉洁^{1,3}, 葛晓霞^{2,3*}

(¹华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070; ²华中农业大学科学技术发展研究院
期刊中心, 武汉 430070; ³武汉生物工程学院应用生物技术研究中心, 武汉 430415)

摘要:【目的】基于柑橘体细胞胚发生相关基因CsHBI的启动子筛选其上游转录因子, 以期为柑橘体细胞胚发生分子机制研究提供可靠的候选基因。【方法】利用CsHBI启动子(-1018~-558 bp)进行酵母单杂筛库实验, 筛选出CsHBI上游转录因子CsAHL25; 利用亚细胞定位实验, 确定CsAHL25在细胞中的位置; 通过酵母单杂点对点、双荧光素酶实验验证CsAHL25对CsHBI表达的影响; 利用qRT-PCR探究CsAHL25基因在柑橘体细胞胚诱导过程中的表达模式; 在柑橘愈伤组织中瞬时表达该基因, 并检测体细胞胚发生相关基因的表达变化。【结果】CsAHL25在柑橘体细胞胚诱导过程中呈现先上升后下降的表达模式, 该蛋白定位在细胞核中, 能与CsHBI启动子结合并下调CsHBI的表达。瞬时表达CsAHL25会导致CsHBI表达量下调, 及CsABI3、CsFUS3、CsLECI、CsLIL等促进体细胞发生的LEC1/B3基因表达量上调。【结论】CsAHL25能直接下调CsHBI的表达, 并使LEC1/B3基因表达量上升。CsAHL25可能通过调整CsHBI、LEC1/B3基因的表达促进体细胞胚发生。

关键词: 柑橘; 体细胞胚发生; HD-ZIP; AT-HOOK

中图分类号: S666

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2024)04-0579-11

CsAHL25 regulates citrus somatic embryogenesis by affecting the expression of CsHBI and LEC1/B3 genes

YE Changning^{1,3}, XU Mengmeng^{1,3}, LIU Lanlan^{1,3}, FU Yujie^{1,3}, GE Xiaoxia^{2,3*}

(¹College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; ²Journal Center of Academy of Science and Technology Development, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; ³Center of Applied Biotechnology, Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan 430415, Hubei, China)

Abstract: 【Objective】Somatic embryogenesis (SE) is widely used in the conservation and utilization of plant germplasm resources. However, there is significant variation in the somatic embryogenesis (SE) capacity of calls derived from different citrus varieties. Furthermore, their SE capacity gradually diminishes during culture, posing a significant hindrance to the conservation and utilization of citrus germplasm resources. CsHBI, an HD-ZIP II gene associated with enhancing SE, was isolated from a citrus variety exhibiting robust SE capabilities. In this study, we harnessed the promoter of CsHBI (*pCsHBI*) to search for upstream transcription factors to provide reliable candidate genes for the study on plant somatic embryogenesis. 【Methods】To identify the upstream transcription factors of CsHBI, we cloned *pCsHBI* (-1018 to -558 bp) into pAbAi and utilized a yeast one-hybrid (Y1H) assay to obtain the candidate transcription factor CsAHL25 from a yeast library. Using SMART, candidate genes were analyzed for domains and named based on annotations in the Citrus Pangenome Breeding Database. The expression pattern of this gene was measured by qRT-PCR in various somatic embryo developmental stages of citrus, aiming to deduce the function of CsAHL25. The gene was cloned and inserted into pRI121, trans-

收稿日期: 2023-12-10 接受日期: 2024-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872084); 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T2021039)

作者简介: 叶长宁, 男, 硕士, 主要从事果树学研究。E-mail: yechangning@webmail.hzau.edu.cn

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 027-87287364, E-mail: gexiaoxia15@mail.hzau.edu.cn

ferred into GV3101 and Marker mixed annotated *Nicotiana benthamiana*. After 2 d, the localization in the cells was observed using the laser scanning confocal microscopy. *CsAHL25* was cloned and inserted into pGADT7 and transfected into Y1HGold with *pCsHBI*-AbAi for the Y1H assay. A Y1H assay was performed to determine whether the two were complementary or not based on the growth of the yeast cells in the screening medium. The gene was cloned and inserted into the overexpression vector pC-MBAI1300-35S, and *pCsHBI* (-2377-0 bp) was cloned and inserted into pGreenII 0800-LUC. The two vectors were then separately transferred into GV3101 and mixed to transiently transform *N. benthamiana*, with empty vector used as a control. After 2 d, the fluorescence of LUC was observed using an *in vivo* Plant Fluorescent Imaging System, and the LUC/REN ratio was calculated. This was followed by a comparison with the control to determine the role of this gene in the downstream gene regulation of *pCsHBI*. To explore the function of this gene, we transiently expressed the gene in the callus of *Citrus sinensis* 'Next', and qRT-PCR was used to detect the expression of somatic embryogenesis-related genes. **【Results】** A candidate transcription factor, named *CsAHL25*, which is involved in the regulation of *CsHBI* expression, was identified from the results of Y1H screening. Sequence analysis revealed that *CsAHL25* possesses a type I AT-HOOK domain and a type A PPC domain and belongs to the AHL15-29 subfamily of AT-HOOK. Subcellular localization analysis demonstrated that, similar to other AHL transcription factors, *CsAHL25* is a nucleus-localized transcription factor. *CsAHL25* exhibited high expression levels at 60 d and 120 d of somatic cell embryo induction. The expression pattern of *CsAHL25* suggested that this gene may play a role in SE. The Y1H results showed that yeast cells containing *CsAHL25* and *pCsHBI* were able to grow well in SD-Leu/ABA²⁰⁰, indicating that *CsAHL25* was bound to *pCsHBI*. The results of plant fluorescent imaging indicated that 1300+*pCsHBI*-LUC exhibited higher LUC values than *CsAHL25*-1300+*pCsHBI*-LUC. The LUC/REN results were consistent with the Plant Fluorescent Imaging outcomes, with the strongest LUC-related activity observed in 1300+*pCsHBI*-LUC. These results showed that *CsAHL25* was bound to the integral *pCsHBI* and repressed its transcription. To further investigate the function of *CsAHL25* during SE, we performed transient transfection of *CsAHL25* in the callus of *C. sinensis* 'Anliucheng', and then analyzed gene expression by using qRT-PCR. The results showed that the expression of *CsHBI* was significantly downregulated, while the *LEC1/B3* genes promoting somatic embryogenesis, such as *CsLEC1*, *CsLIL*, *CsFUS3* and *CsABI3*, were significantly upregulated. **【Conclusion】** The results of this study indicated that *CsAHL25* was an upstream transcription factor of *CsHBI*, which can inhibit *CsHBI* expression, and transient expression of *CsAHL25* can cause upregulation of the expression of *LEC1/B3* genes. Based on the expression pattern of *CsAHL25*, we studied the functions of *HD-ZIP*, *LEC1/B3* and *AHL25* in relation to citrus somatic embryogenesis. Finally, we hypothesized that *CsAHL25* regulated citrus somatic embryogenesis.

Key words: *Citrus*; Somatic embryogenesis; HD-ZIP; AT-HOOK

植物体细胞胚发生是植物体细胞形成胚胎的过程,其发育过程与合子胚相似,均会经历球形胚、鱼雷形胚、子叶形胚等发育阶段^[1]。随着体细胞胚诱导技术的发展,该技术已经成为植物种质资源保存与创制、重要经济植物大规模生产的重要技术手段之一^[2]。柑橘是中国的重要经济作物,近年来,柑橘的种质资源发掘和遗传改良研究为中国柑橘产业发展提供了有力支持^[3]。随着诱导出来的柑橘品种的

胚性愈伤越来越多,利用体细胞进行柑橘种质资源的保存和育种已成为柑橘种质资源利用的重要手段^[3-4]。然而不同柑橘品种的体细胞胚发生能力有着巨大的差异,部分品种至今无法获得胚性愈伤^[5],这对柑橘种质资源保存和育种造成阻碍,因此研究柑橘体细胞胚发生机制有着重要的生物学意义和应用价值。

在体细胞胚发生的过程中,转录因子可以通过

影响信号转导调控体细胞胚发生^[6]。前期研究表明, *LEC*^[7-9]、*FUS*^[10-12]、*ABI*^[13]、*HD-ZIP*^[14-16]转录因子在拟南芥、龙眼、冷杉、柑橘、油棕、紫花苜蓿等多种植物体细胞胚发生过程中起重要作用。其中 *HD-ZIP* 转录因子是一类植物特有的转录因子,具有亮氨酸拉链(*ZIP*)和与之紧密结合的同源结构域,根据 *HD-ZIP* 结构域的同源性、蛋白结构和功能可以将 *HD-ZIP* 转录因子分为4类,其中存在 *CPSCE* 结构域的 *HD-ZIP* 蛋白被归类于 II 型 *HD-ZIP* 蛋白^[17]。在植物胚胎发育的过程中, II 型 *HD-ZIP* 具有调控生长素转运、维持分生组织、保持植物细胞全能性和控制子叶发育的功能^[18-19]。

AT-HOOK 是一类能与 DNA 序列中富含 AT 序列区域结合的转录因子^[20]。其蛋白包含 *AT-HOOK* 结构域与 *PPC* 结构域两种保守结构,根据保守结构域的数量和种类可以将 *AT-HOOK* 转录因子分为两个亚家族,其中 I 型 *AT-HOOK* 蛋白(*AHL15-29*)包含一个 I 型 *AHL* 结构域和一个 A 型 *PPC* 结构域^[21-22]。该亚家族成员 *AHL15*、*AHL19*、*AHL20* 是作用在植物胚胎发生早期的重要转录因子, I 型 *AT-HOOK* 基因的表达受生长素和 *BBM* 转录因子的调控,且具有促进植物体细胞胚发生的功能^[23]。虽然前人研究已证实 I 型 *AT-HOOK* 转录因子具有促进植物胚胎发生的作用,然而 I 型 *AT-HOOK* 转录因子调控体细胞发生的分子机制仍未被报道。

在对柑橘体细胞胚发生的研究中,前人分离并鉴定出促进柑橘体细胞胚发生的 II 型 *HD-ZIP* 转录因子 *CsHBI*^[24-25]。为了探索柑橘体细胞胚发生相关基因 *CsHBI* 的上游调控网络,笔者对调控 *CsHBI* 基因表达的转录因子进行挖掘,发现一个属于 I 型 *AT-HOOK* 亚家族的基因 *CsAHL25*,并对其功能进行初步验证,完善 *AT-HOOK* 转录因子的调控网络,为柑橘体细胞胚发生研究提供潜在的候选基因,以期推进柑橘体细胞胚发生的分子机制研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

MT 培养基继代保存的纽荷尔脐橙(*Citrus sinensis* ‘Newhall’)、暗柳橙(*C. sinensis* ‘Anlicheng’)胚性愈伤组织。

1.2 *CsHBI* 启动子片段诱饵菌株 *AbA* 表达水平检测

根据距 *CsHBI* 基因-1018~-558 bp 的启动子片

段序列和 *pAbAi* 载体序列设计引物(表1),使用 *Phanta Max* 聚合酶(诺唯赞,南京)从暗柳橙 DNA 中扩增目的片段,使用 *ClonExpress*[®] II 同源重组试剂盒(诺唯赞,南京)将目的片段克隆到 *pAbAi* 载体中,用 *BstB* I 限制性内切酶(新景,杭州)酶切后,使用酵母转化试剂盒(酷来搏,北京)将载体转入 *Y1H Gold* 酵母细胞中,获得含有 *pCsHBI-AbAi* 的酵母细胞。使用 0.9% 的 NaCl 溶液悬浮酵母细胞($OD_{600}=0.002$),取 100 μ L 悬浮菌液分别涂在 0、50、100 $ng \cdot mL^{-1}$ *AbA* 的培养基上,30 $^{\circ}C$ 倒置培养 2~3 d,筛选最适浓度作为酵母单杂筛库和酵母单杂点对点实验的 *AbA* 浓度。

1.3 酵母单杂筛选 *CsHBI* 的上游转录因子

使用酵母转化试剂盒(酷来搏,北京)将各体细胞胚诱导时期的暗柳橙愈伤组织 cDNA 混合文库质粒转入含有 *pCsHBI-AbAi* 的 *Y1H Gold* 酵母细胞中,使用 SD/-Leu/*AbA*²⁰⁰ 培养基筛选阳性克隆,使用 *Taq* 酶(翌圣,上海)进行阳性克隆鉴定,将鉴定片段大小 500~2000 bp 的 PCR 产物进行测序后,使用 CPBD 数据库(*Citrus Pan-genome to Breeding Database*, <http://citrus.hzau.edu.cn/>)进行比对,分析候选蛋白。

1.4 *CsAHL25* 结构域分析

参考 CPBD 数据库中甜橙二代基因组注释数据和使用 SMART (SMART: Main page) 工具分析 *CsAHL25* 蛋白的氨基酸序列以确定其结构域。

1.5 *CsAHL25* 系统发育树建立

使用 NCBI (<https://ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 下载拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)的 I 型 *AT-HOOK* 氨基酸序列。使用 MEGA X 软件将拟南芥、水稻的 *AT-HOOK* 和 *CsAHL25* 的氨基酸序列进行多序列比对,利用邻接法构建进化树, Bootstrapping 参数值设置为 1000 次,使用 iTOL 网站 (<https://itol.embl.de/>) 进行数据可视化分析。

1.6 RNA 的提取以及 cDNA 合成

收集甘油培养基($20 mL \cdot L^{-1}$)诱导 0 d (ALC 0 d)、60 d (ALC 60 d)、120 d (ALC 120 d) 的暗柳橙愈伤组织,使用 RN38 EASY spin plus 植物 RNA 提取试剂盒(艾德莱,北京)提取组织 RNA 后,用 RT SuperMix 反转录试剂盒(诺唯赞,南京)合成 cDNA。

1.7 实时荧光定量 PCR 分析

使用 Primer Premier 5 软件设计 *CsAHL25* 基因

表1 引物列表
Table 1 List of primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'–3') Primer sequence (5'–3')	用途 Purpose
pCsHBI-AbAi-F	aaatgatgaattgaaaagcttCCCACGTAAACTGGTGG	酵母单杂 Yeast one-hybrid
pCsHBI-AbAi-R	atacagagcacatgcctcagCAGTCGCATCTTCATTCCAGTAAG	
pGADT7-CsAHL25-F	gccatggaggccagtgaaatcATGTCAGGGTATGTTTCATCAGCTG	酵母单杂 Yeast one-hybrid
pGADT7-CsAHL25-R	acgattcatctgcagctcagCTAGAATGGTGGCTGCCTTGTAAG	
pGreenII 0800-LUC-pCsHBI-F	ccgctctagaactagGGTCGTCCTAATTGCGGCG	双荧光素酶 Dual-Luc reporter
pGreenII 0800-LUC-pCsHBI-R	cggtatcgataagctTGTGGGTCTATCATTTGTGTGG	
pCAMBIA1300-35s-CsAHL25-F	cggggatcctctagatgcacATGTCAGGGTATGTTTCATCAGCTG	双荧光素酶 Dual-Luc reporter
pCAMBIA1300-35s-CsAHL25-R	atacgaacgaaagctctcagCTAGAATGGTGGCTGCCTTGTAAG	
pRI121-CsAHL25-F	ttgatacatatgcccgtcagcATGTCAGGGTATGTTTCATCAGCTG	亚细胞定位 Subcellular localization
pRI121-CsAHL25-R	gtcaccatgaattggatccCTAGAATGGTGGCTGCCTTGTAAG	
CsActin-F	CCAAGCAGCATGAAGATCAA	荧光定量实验 qRT-PCR
CsActin-R	ATCTGCTGGAAGGTGCTGAG	
CsAHL25-F	AGGGTATGTTTCATCAGCTGTTG	荧光定量实验 qRT-PCR
CsAHL25-R	CACCGCCTGAACCAGAA	
CsHBI-F	GCAGAAGGAAGTGCAAGAGC	荧光定量实验 qRT-PCR
CsHBI-R	CAGCAGCAGAAGGAGATTACGATG	
CsLECI-F	GCTTCCATTGCAGTCACTGCTA	荧光定量实验 qRT-PCR
CsLECI-R	TGGCTATCGGCATGTATTGG	
CsLIL -F	TGTAATCATCGAAGCCCAGCTT	荧光定量实验 qRT-PCR
CsLIL -R	GAGCAACGCAAGACCATTACC	
CsFUS3 -F	CCGGCATGTCGTTTATTTATGAC	荧光定量实验 qRT-PCR
CsFUS3 -R	GAACCCCCAAAAATCCA	
CsABI3-F	GGTGACACAGCAGCCGACC	荧光定量实验 qRT-PCR
CsABI3-R	TGCAACCCTGCGGCACAGAC	

注:小写字母表示同源重组接头。

Note: Small letters indicate homologous recombination junctions.

的定量引物(表1),以 *Actin* 基因作为内参基因。使用 LC480 实时荧光定量仪器(Roched, 美国)和 qPCR Master Mix 试剂盒(诺唯赞, 南京)进行 qRT-PCR 试验。

1.8 CsAHL25 亚细胞定位分析

根据 *CsAHL25* CDS 序列和 pRI121 载体序列设计引物(表1),从暗柳橙胚性愈伤组织 cDNA 中扩增序列,将去除终止密码子的 *CsAHL25* CDS 序列克隆到 pRI121 载体中,获得 pRI121-CsAHL25-GFP 重组蛋白质粒后转入 GV3101 农杆菌中。将含有 pRI121-CsAHL25-GFP 农杆菌液和核定位 marker H2B-RFP 菌液混合后注射烟草叶片,2 d 后利用 TCS SP8 激光共聚焦显微镜(Leica, 德国)观察荧光信号并拍照。

1.9 酵母单杂验证 *CsAHL25* 与 *CsHBI* 启动子互作
将 *CsAHL25* CDS 序列克隆到 pGADT7 载体中

(引物见表1),获得猎物载体 pGADT7- *CsAHL25* 并转入含有 *pCsHBI-AbAi* 的酵母细胞中。以空载猎物载体为阴性对照、*pAbAi-P53+pGADT7-P53* 为阳性对照,将获得的阳性菌株按照 10^{-1} 梯度稀释并分别接种在 SD/-Leu、SD/-Leu/AbA²⁰⁰ 培养基上,通过观察酵母的生长状态判断 *CsAHL25* 转录因子和 *CsHBI* 启动子的互作情况。

1.10 LUC 活体成像、双荧光素酶验证 *CsAHL25* 对 *CsHBI* 启动子活性的影响

将 *CsHBI* 启动子(-2377~0 bp)克隆到 pGreen II 0800-LUC 载体中(引物见表1),获得报告子载体 pGreen II 0800-LUC- *pCsHBI* 并转入 GV3101 (pSoup) 农杆菌中,将 *CsAHL25* CDS 序列克隆到 pCAMBIA1300-35S 载体中作效应子(引物见表1),并转入 GV3103 农杆菌中。以报告子空载 pGreen II 0800-LUC、效应子空载 pCAMBIA1300-35S 作为对

照,使用烟草瞬时注射将报告子、效应子菌液按体积比1:5混合后注射到烟草叶片中,2 d后使用荧光素钾盐试剂盒(翌圣,上海),通过 NightSHADE LB 985 植物活体成像系统(Berthold、德国)观察其LUC荧光强度并拍照,使用双荧光素酶试剂盒(翌圣,上海),通过 Infinite® 200 多功能酶标仪(TECAN,瑞士)检测其双荧光素酶活性,计算LUC/REN的比值,得到LUC的相对活性。通过LUC荧光强度和LUC/REN的相对比值判断 *CsAHL25* 转录因子对 *CsHBI* 启动子活性的影响。

1.11 *CsAHL25*瞬时超量表达分析

参考张印^[26]的方法使用农杆菌介导法将 pCAMBIA1300-35s-*CsAHL25* 农杆菌转入纽荷尔脐橙的愈伤组织中,以转 pCAMBIA1300-35s 载体的愈伤组织为空白对照,在含有 AS 的 MT 培养基上培养 3 d 后,提取愈伤组织的 RNA 进行荧光定量试验(引物见表1)。

1.12 数据分析

利用 GraphPad 8 软件、采用 *t*-test 进行显著性分析并作图。

2 结果与分析

2.1 *CsHBI*上游转录因子的筛选

为了筛选调控 *CsHBI* 表达的转录因子,利用 *CsHBI* 启动子片段(-1018~-558 bp)作为诱饵进行酵母单杂筛库实验。酵母 AbA 本底表达水平检测表明,在 SD/-Ura/AbA¹⁰⁰ 固体培养基上,含有 *pCsHBI*-AbAi 的 Y1H Gold 酵母细胞无法正常生长(图1),最终确定 200 ng·mL⁻¹ 作为酵母单杂筛库的 AbA 质量浓度值。酵母单杂筛库结果表明,共获得 56 个酵母克隆,使用 PCR 鉴定后得到 39 个插入片段大小在 500~2000 bp 之间,且条带单一的 cDNA 片段。测序结果使用 CPBD 数据库进行 Blastx 比对分析,去除假阳性克隆后,初步获得 21 个可能与 *CsHBI* 启动

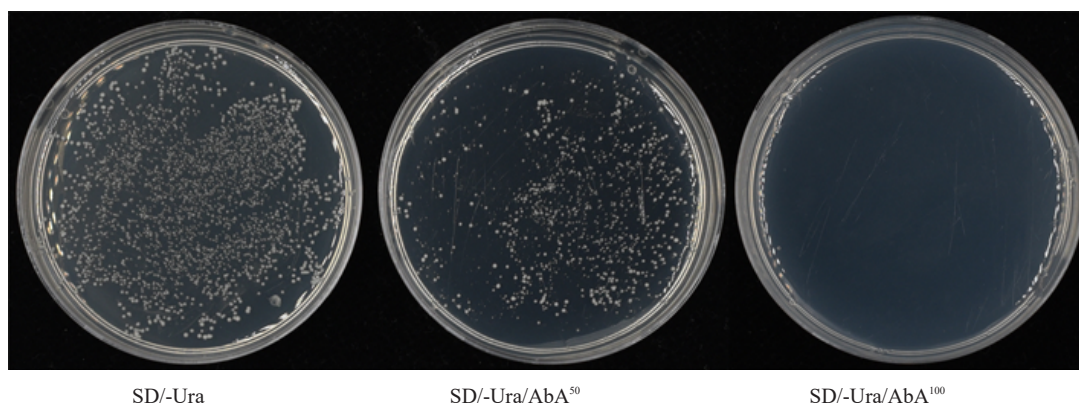


图1 *pCsHBI*-AbAi 诱饵酵母 AbA 本底表达水平检测
Fig. 1 Test of bait *pCsHBI*-AbAi yeast strain for AbA expression

子片段结合的蛋白(表2),包括含有 AT-HOOK 结构域的核定位蛋白、含有 RING 指和 CHY 锌指结构的蛋白1、晚期胚胎发生丰富蛋白D-7等。

2.2 *CsAHL25*基因系统发育与表达模式分析

根据阳性克隆出现次数和相关报道,选择注释为含有 AT-HOOK 结构域的核定位蛋白 *Cs8g_pb000150* 进行研究。*Cs8g_pb000150* 基因 CDS 长度为 918 bp,编码 305 个氨基酸,进一步分析发现在其 61~77 aa 处存在一个 I 型 AHL 结构域、89~214 aa 处存在一个 A 型 PPC 结构域(图2-A),其结构域具有 I 型 AT-HOOK 转录因子的特征。该蛋白与拟南芥、水稻 I 型 AT-HOOK 转录因

子进化关系分析表明,该蛋白与 AtAHL25、OsAHL25 在同一个进化支中(图2-B)。根据 CPBD 数据库注释与进化分析将该蛋白命名为 *CsAHL25*。

qRT-PCR 检测 *CsAHL25* 基因在体细胞胚诱导过程中的表达模式,发现在暗柳橙愈伤生胚诱导过程中,*CsAHL25* 的相对表达量随着诱导时间的延长呈先上升后下降的趋势(图2-C),其表达模式暗示 *CsAHL25* 基因可能在柑橘的体细胞诱导过程中发挥作用。

2.3 *CsAHL25*蛋白定位分析

为了检测 *CsAHL25* 蛋白在细胞中的定位情况,在烟草叶片中瞬时表达 *CsAHL25*-GFP 荧光蛋白和 H2B-RFP 核 marker 蛋白,激光共聚焦观察发现与空载

表 2 *CsHBI* 启动子酵母单杂筛库结果Table 2 Results of yeast one-hybrid screening for *CsHBI* promoter

登录号 Accession No.	注释 Annotation	阳性克隆数 Number of positive clones
Cs8g_pb000150	含有 AT-HOOK 结构域的核定位蛋白 AT-HOOK motif nuclear-localized protein	4
Cs3g_pb014090	B 亚型高迁移率族蛋白 High mobility group B protein	2
Cs2g_pb007850	含有 TK 结构域的蛋白 Transketolase, pyrimidine binding domain	1
Cs6g_pb007410	PAP2 家族 C 端相关结构域 PAP2 superfamily C-terminal	1
CsUn_pb000280	铜离子转运家族相关蛋白 Copper transport protein family-related	1
Cs5g_pb005000	真核翻译起始因子 5A Translation initiation factor 5A family member	1
Cs8g_pb017030	ScHsp26_like 蛋白伴侣 ScHsp26_like chaperones	1
Cs7g_pb017400	类线粒体糖蛋白家族蛋白 Mitochondrial glycoprotein family protein-like	1
Cs2g_pb029570	锚蛋白重复序列 Ankyrin repeat	1
Cs2g_pb013930	假定真核翻译起始因子 2 的 beta 亚基 Eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit, putative	1
Cs7g_pb002840	赤霉素调节蛋白 3 Gibberellin-regulated protein 3	1
Cs5g_pb004180	假定硝化酶相关蛋白 Nitrilase-associated protein, putative	1
Cs4g_pb023850	含有 RING 指和 CHY 锌指结构的蛋白 1 RING finger and CHY zinc finger domain-containing protein 1	1
Cs6g_pb009980	假定含有 R3H 单链条核酸结合结构域的蛋白, 片段 Putative single-stranded nucleic acid binding R3H (Fragment)	1
Cs9g_pb012570	Dip2/Utp12 家族蛋白 Dip2/Utp12 Family	1
Cs2g_pb010780	A 亚型 HMG-Y 相关蛋白 HMG-Y-related protein A	1
Cs9g_pb008950	乌头碱水解酶家族蛋白 Homoaconitate hydratase family protein	1
Cs1g_pb024640	类 SKP1 蛋白 1A SKP1-like protein 1A	1
Cs1g_pb018690	60S 核糖体蛋白 L26-1 60S ribosomal protein L26-1	1
Cs9g_pb012560	晚期胚胎发生丰富蛋白 D-7 Late embryogenesis abundant protein D-7	1
Cs2g_pb024540	类 GRPs A3 蛋白 Glycine-rich protein A3-like	1

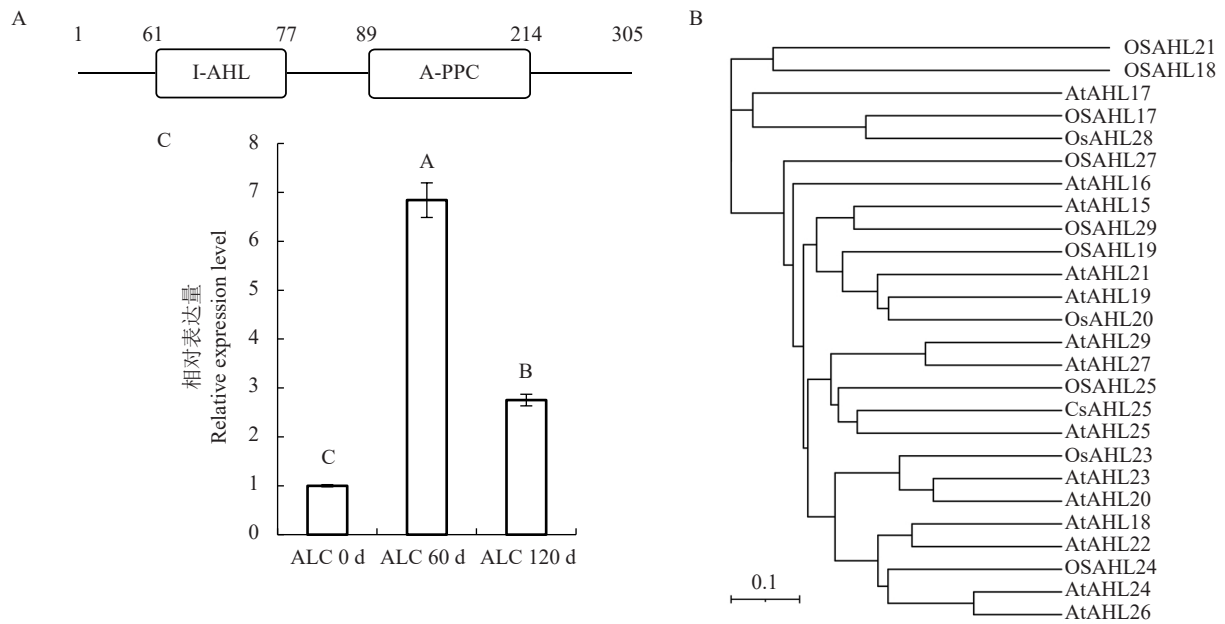
对照组相比, CsAHL25-GFP 荧光信号集中在细胞核中, 并与核 marker (H2B-RFP) 荧光信号均重叠 (图 3), 结果表明 CsAHL25 蛋白定位于细胞核中, 具有 AT-HOOK 转录因子的定位特征。

2.4 CsAHL25 转录因子与 *CsHBI* 启动子互作分析

为了确认 CsAHL25 转录因子与 *CsHBI* 启动子的结合, 使用酵母单杂点对点实验对 CsAHL25 转录因子与 *pCsHBI* 启动子片段 (-1018~-558 bp) 的结合

进行验证, 含有 pGADT7-CsAHL25 和 *pCsHBI*-AbAi 质粒的酵母细胞和阳性对照能在互作筛选培养基 (SD/-Leu/AbA²⁰⁰) 上正常生长, 阴性对照无法正常生长 (图 4-A), 结果表明在酵母细胞中, CsAHL25 具有结合 *pCsHBI* 启动子片段的能力。

为了进一步验证 CsAHL25 转录因子与 *pCsHBI* 启动子 (-2377~0 bp) 的互作, 进行植物活体成像实验和双荧光素酶实验, 验证其互作关系。植物活体



A. *CsAHL25* 蛋白结构域分析; B. *CsAHL25* 和拟南芥、水稻中 I 型 AT-HOOK 蛋白系统发育分析; C. *CsAHL25* 基因在暗柳橙愈伤组织不同体细胞胚诱导时期中的表达量。ALC 0 d、ALC 60 d、ALC 120 d 分别表示未诱导的愈伤组织、生胚诱导后 60 d 和 120 d 的愈伤组织。不同大写字母表示不同组织间差异极显著 ($p < 0.01$)。

A. Analysis of the structural domains of *CsAHL25*; B. Phylogenetic analysis of *CsAHL25* and the type I AT-HOOK family in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*; C. The expression of *CsAHL25* gene in *C. sinensis* ‘Anliucheng’ callus at different SE stage. ALC 0 d, ALC 60 d, ALC 120 d refer to callus without induction, 60 d and 120 d after the induction to callus. Different capital letters indicate extremely significant differences among different calli ($p < 0.01$).

图 2 *CsAHL25* 蛋白结构域、系统发育分析与体细胞胚诱导时期中 *CsAHL25* 的表达模式
Fig. 2 Structural domains of the *CsAHL25* protein, phylogenetic analysis and expression pattern of *CsAHL25* in the induction of somatic embryos

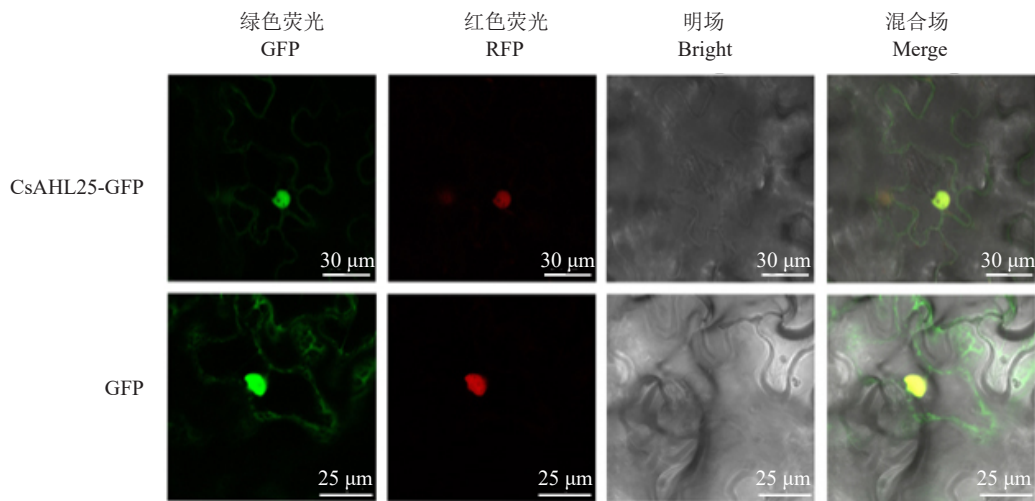
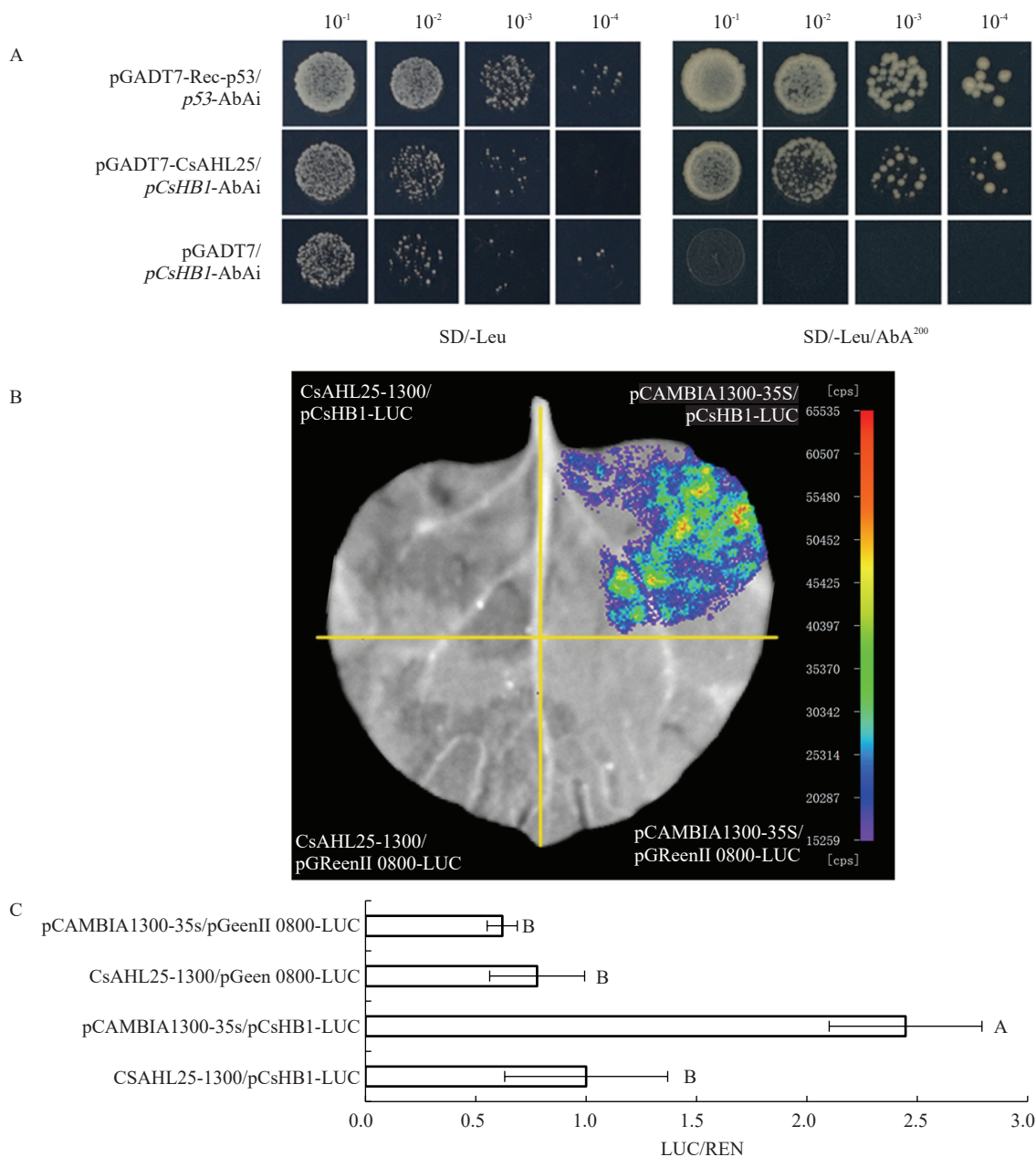


图 3 *CsAHL25* 在烟草中的亚细胞定位
Fig. 3 The subcellular localization of *CsAHL25* in *Nicotiana benthamiana*

成像结果显示, pCAMBIA1300-35S 空载+*pCsHBI*-LUC 组合的 LUC 荧光值显著高于 *CsAHL25*-1300+*pCsHBI*-LUC 组合与阴性对照(图 4-B)。双荧光素酶活性测定结果与植物活体成像结果相同, pCAM-

BIA1300-35S 空载+*pCsHBI*-LUC 组合的 LUC 相对活性显著高于 *CsAHL25*-1300+*pCsHBI*-LUC 组合(图 4-C)。上述实验结果表明, *CsAHL25* 转录因子能与 *pCsHBI* 启动子结合并抑制下游基因的表达。



A. CsAHL25 与 *pCsHB1* 启动子酵母单杂互作分析; B. CsAHL25 与 *pCsHB1* 荧光素酶成像实验; C. CsAHL25 与 *pCsHB1* 双荧光素酶实验分析。不同大写字母表示不同组合间的差异极显著 ($p < 0.01$)。

A. Y1H assay of the interaction between CsAHL25 and *pCsHB1*; B. LUC plant fluorescent imaging assay of CsAHL25 and *pCsHB1*; C. The dual-luciferase assay of CsAHL25 and *pCsHB1*. Different capital letters indicate extremely significant difference among different combinations ($p < 0.01$).

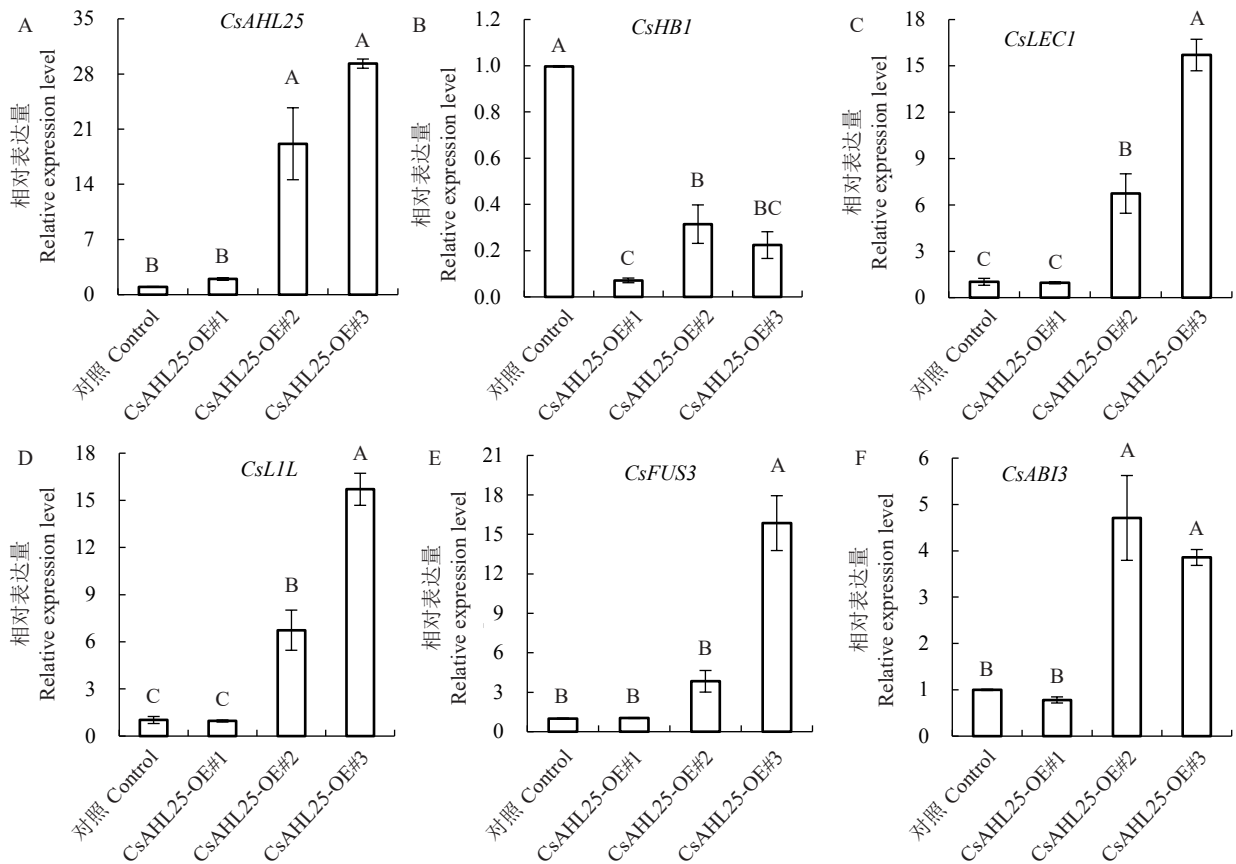
图4 CsAHL25 和 *CsHB1* 启动子互作分析

Fig. 4 The assay of interaction between CsAHL25 and *pCsHB1*

2.5 *CsAHL25* 瞬时表达愈伤系中体细胞胚发生相关基因表达分析

为了进一步探索 *CsAHL25* 基因的功能,在纽荷尔脐橙的愈伤组织中瞬时表达 *CsAHL25*。以转 pCAMBIA1300-35S 空载的愈伤组织为对照,分析已报道的体细胞胚发生相关基因的表达量变化。结果表明, *CsAHL25* 相对表达量均高于或极显著高于

对照组(图 5-A),且 *CsHB1* 表达量均极显著低于对照组(图 5-B)。*CsLECI*、*CsLIL*、*CsFUS3*、*CsABI3* 等参与柑橘体细胞胚发生的 *LECI/B3* 基因相对表达量相较于对照组均显著上升,且其表达量变化趋势与 *CsAHL25* 基本一致(图 5-C~F)。以上结果表明, *CsAHL25* 转录因子能下调 *CsHB1* 表达,并影响 *LECI/B3* 调控网络相关基因表达。



不同大写字母表示不同瞬时表达系间的差异极显著($p < 0.01$)。

Different capital letters indicate extremely significant difference among different lines ($p < 0.01$).

图5 *CsAHL25* 瞬时表达愈伤中体细胞胚发生相关基因的表达量

Fig. 5 The expression of genes related to somatic embryogenesis in *CsAHL25* transiently transfected citrus callus

3 讨论

笔者筛选并鉴定到一个直接调控柑橘体细胞发生相关基因 *CsHBI* 的 I 型 AT-HOOK 转录因子 *CsAHL25*。*CsAHL25* 是经过酵母单杂筛库筛选得到的转录因子,是调控 *CsHBI* 表达的候选基因之一。经过酵母单杂点对点和双荧光素酶实验验证,发现 *CsAHL25* 可以直接与 *CsHBI* 启动子结合,进而下调 *CsHBI* 的表达。前期研究发现, I 型 AT-HOOK 转录因子具有调控植物体细胞胚胎发生的功能,通过过表达 *AHL15* 基因,可以诱导拟南芥幼苗直接形成体细胞胚胎,且 *ahl15 ahl19 amiRAHL20* 三重突变的拟南芥植株完全无法诱导出体细胞胚^[22]。本研究中鉴定出的柑橘 I 型 AT-HOOK 转录因子 *CsAHL25*,具有和柑橘体细胞胚发生相关的表达模式,该转录因子能够调控体细胞胚发生相关基因的表达,从而影响柑橘体细胞胚发生,与已报道的

拟南芥 I 型 AT-HOOK 转录因子功能相似。I 型 AT-HOOK 转录因子能够通过调控 *GA3OX1* 基因表达影响 GA 的合成^[27]、通过调控 *PFI* 基因表达影响下胚轴的伸长^[28]、通过调控 *SPL* 基因表达影响植物的寿命^[29]。目前 I 型 AT-HOOK 转录因子促进植物体细胞胚胎发生的分子机制尚未明确,且暂无研究表明 I 型 AT-HOOK 转录因子调控 II 型 HD-ZIP 基因表达,本研究中初步证明, I 型 AT-HOOK 转录因子调控 II 型 HD-ZIP 基因的表达,完善了 I 型 AT-HOOK 转录因子的下游调控网络。

此外,笔者利用瞬时表达实验发现,除了直接下调 *CsHBI* 基因的表达外, *CsAHL25* 还影响了 *LEC1/B3* 基因的表达。瞬时表达 *CsAHL25* 基因会导致 *CsLEC1*、*CsLIL*、*CsFUS3*、*CsABI3* 基因的表达量上升,对体细胞胚发生相关基因呈现不同的调控方式。*LEC1-FUS3-LEC2-ABI3* 基因共同构成一个 *LEC1/B3* 结构域调控网络,该网络通过调控体细胞

胚的形态构成,进而影响植物体细胞胚的发生^[30-32]。前人通过分析柑橘体细胞胚发生过程中基因的表达模式,明确 *LEC1*、*LEC1 Like*、*FUS3*、*ABI3* 等 *LEC1/B3* 调控网络基因在保持柑橘愈伤胚性、促进其胚胎发育中起到了重要的作用^[33-34]。进一步研究发现,在柑橘愈伤组织分化的过程中,*CsFUS3* 基因相对表达量逐渐上升,超表达 *CsFUS3* 会引起愈伤细胞形态变化、激活体细胞胚发生^[35]。过表达 *CsLIL* 基因也能够使柑橘的营养组织产生体细胞胚^[36]。本研究表明,瞬时表达 *CsAHL25* 上调 *LEC1*、*LIL*、*FUS3*、*ABI3* 基因的表达量,说明 *CsAHL25* 可能通过影响 *LEC1/B3* 表达,调控体细胞胚发生的功能。*LEC1/B3* 调控网络基因能够具有细胞发生形态转变、调控体细胞胚形态构建的作用^[32,35],而 II 型 HD-ZIP 基因作用在植物胚胎发生前期,具有维持植物胚胎中干细胞存在的功能^[19,37],二者作用在植物胚胎发生过程中的不同方面,其相互关系尚不明确,有待深入研究。此外,研究发现 *CsFUS3* 基因可以下调细胞中 GA 的含量,导致 ABA/GA 比例上升,从而促进柑橘体细胞胚发育^[35],且 *AHL25* 基因也具有下调植物中 GA 含量的功能^[27],*CsAHL25* 是否可以通过影响柑橘体内 ABA/GA 比例来促进柑橘体细胞胚发生还需进一步探讨。

4 结 论

笔者通过酵母单杂点对点实验、双荧光素酶实验等筛选到柑橘体细胞胚发生相关基因 *CsHBI* 的上游抑制因子 *CsAHL25*,通过瞬时表达 *CsAHL25* 确认其能够下调 *CsHBI* 表达量并上调 *LEC1*、*LEC1 Like*、*FUS3*、*ABI3* 等 *LEC1/B3* 基因相对表达量。笔者认为该基因具有激活柑橘体细胞胚发生的功能,为柑橘体细胞胚发生研究提供了一个潜在的候选基因。

参考文献 References:

- [1] MORDHORST A P, TOONEN M A J, DE VRIES S C, MEINKE D. Plant embryogenesis[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1997, 16(6): 535-576.
- [2] SIDDIQUI Z H, ABBAS Z K, ANSARI M W, KHAN M N. The role of miRNA in somatic embryogenesis[J]. Genomics, 2019, 111(5): 1026-1033.
- [3] 郭文武,叶俊丽,邓秀新. 新中国果树科学研究 70 年: 柑橘[J]. 果树学报, 2019, 36(10): 1264-1272.
GUO Wenwu, YE Junli, DENG Xiuxin. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: Citrus[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(10): 1264-1272.
- [4] 邓秀新. 中国柑橘育种 60 年回顾与展望[J]. 园艺学报, 2022, 49(10): 2063-2074.
DENG Xiuxin. A review and perspective for citrus breeding in China during the last six decades[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(10): 2063-2074.
- [5] 刘丹. 柑橘优异资源胚性愈伤组织诱导及体细胞杂种创制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
LIU Dan. Induction of nucellar embryogenic callus and generation of somatic hybrid by protoplast fusion in citrus[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [6] ELHITI M, STASOLLA C. Transduction of signals during somatic embryogenesis[J]. Plants, 2022, 11(2): 178.
- [7] 蔡英卿, 赖钟雄, 陈义挺, 林玉玲, 李惠华, 张妙霞. 龙眼胚性愈伤组织 *LEC1* 基因 cDNA 克隆以及在体胚发生过程中的表达分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(5): 494-500.
CAI Yingqing, LAI Zhongxiong, CHEN Yiting, LIN Yuling, LI Huihua, ZHANG Miaoxia. Cloning of *LEC1* gene from embryogenic callus and its expression analysis during somatic embryogenesis in longan[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2011, 40(5): 494-500.
- [8] VETRICI M A, YEVTUSHENKO D P, MISRA S. Overexpression of douglas-fir *LEAFY COTYLEDON1 (PmLEC1)* in *Arabidopsis* induces embryonic programs and embryo-like structures in the *lec1-1* mutant but not in wild type plants[J]. Plants, 2021, 10(8): 1526.
- [9] KIM H U, JUNG S J, LEE K R, KIM E H, LEE S M, ROH K H, KIM J B. Ectopic overexpression of castor bean *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* in *Arabidopsis* triggers the expression of genes that encode regulators of seed maturation and oil body proteins in vegetative tissues[J]. FEBS Open Bio, 2013, 4: 25-32.
- [10] LEDWOŃ A, GAJ M D. *LEAFY COTYLEDON1*, *FUSCA3* expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*[J]. Plant Growth Regulation, 2011, 65(1): 157-167.
- [11] WANG F F, PERRY S E. Identification of direct targets of *FUSCA3*, a key regulator of *Arabidopsis* seed development[J]. Plant Physiology, 2013, 161(3): 1251-1264.
- [12] LIU Z, GE X X, QIU W M, LONG J M, JIA H H, YANG W, DUTT M, WU X M, GUO W W. Overexpression of the *CsFUS3* gene encoding a B3 transcription factor promotes somatic embryogenesis in *Citrus*[J]. Plant Science, 2018, 277: 121-131.
- [13] CHEN B J, FIERS M, DEKKERS B J W, MAAS L, VAN ESSE G W, ANGENENT G C, ZHAO Y, BOUTILIER K. ABA signaling promotes cell totipotency in the shoot apex of germinating embryos[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(18): 6418-6436.
- [14] KHIANCHAIKHAN K, AROONLUK S, VUTTIPONGCHAIKIJ S, JANTASURIYARAT C. Genome-wide identification of homeodomain leucine zipper (HD-ZIP) transcription factor, expression analysis, and protein interaction of HD-ZIP IV in oil palm somatic embryogenesis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(5): 5000.

- [15] GE X X, LIU Z, WU X M, CHAI L J, GUO W W. Genome-wide identification, classification and analysis of HD-ZIP gene family in citrus, and its potential roles in somatic embryogenesis regulation[J]. *Gene*, 2015, 574(1):61-68.
- [16] HU X, ZHANG C R, XIE H, HUANG X, CHEN Y F, HUANG X L. The expression of a new HD-Zip II gene, MSHB1, involving the inhibitory effect of thidiazuron on somatic embryogenic competence in alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Jinnan) callus[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34(3):1067-1074.
- [17] TRON A E, BERTONCINI C W, CHAN R L, GONZALEZ D H. Redox regulation of plant homeodomain transcription factors[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(38): 34800-34807.
- [18] TURCHI L, CARABELLI M, RUZZA V, POSSENTI M, SASSI M, PEÑALOSA A, SESSA G, SALVI S, FORTE V, MORELLI G, RUBERTI I. *Arabidopsis* HD-Zip II transcription factors control apical embryo development and meristem function[J]. *Development*, 2013, 140(10):2118-2129.
- [19] ROODBARKELARI F, GROOT E P. Regulatory function of homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP) family proteins during embryogenesis[J]. *The New Phytologist*, 2017, 213(1):95-104.
- [20] PRAVEEN S, PAWAR V, AHLAWAT Y S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Kinnow mandarin[J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2003, 12(2):163-165.
- [21] ARAVIND L, LANDSMAN D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(19):4413-4421.
- [22] ZHAO J F, FAVERO D S, PENG H, NEFF M M. *Arabidopsis thaliana* AHL family modulates hypocotyl growth redundantly by interacting with each other via the PPC/DUF296 domain[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(48):E4688-E4697.
- [23] KARAMI O, RAHIMI A, MAK P, HORSTMAN A, BOUTILLIER K, COMPIER M, VAN DER ZAAL B, OFFRINGA R. An *Arabidopsis* AT-hook motif nuclear protein mediates somatic embryogenesis and coinciding genome duplication[J]. *Nature Communications*, 2021, 12:2508.
- [24] 谢幸男, 赖晓娜, 战爽, 程来超, 许全全, 葛晓霞. 柑橘体细胞胚发生基因 *CsHBI* 特异肽段多克隆抗体的制备及其蛋白动态检测[J]. *果树学报*, 2017, 34(9):1069-1075.
- XIE Xingnan, LAI Xiaona, ZHAN Shuang, CHENG Laichao, XU Quanquan, GE Xiaoxia. Preparation of *CsHBI* polyclonal antibody and its protein dynamic changes during somatic embryogenesis in *Citrus*[J]. *Journal of Fruit Science*, 2017, 34(9): 1069-1075.
- [25] 刘娉婷. 基于柑橘强胚性材料开展 *CsHBI* 促体细胞胚发生方式的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2022.
- LIU Pingting. Study the *CsHBI* promotion of somatic embryogenesis using citrus strong embryogenic materials[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022.
- [26] 张印. 柑橘原花青素积累及 ABA 代谢的调控机制研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2021.
- ZHANG Yin. Research on the regulation mechanism of proanthocyanidin accumulation and ABA metabolism in citrus[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021.
- [27] MATSUSHITA A, FURUMOTO T, ISHIDA S, TAKAHASHI Y. AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of AtGA3ox1 encoding GA 3-oxidase[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(3):1152-1162.
- [28] XIAO C W, CHEN F L, YU X H, LIN C T, FU Y F. Over-expression of an AT-hook gene, AHL22, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71(1):39-50.
- [29] RAHIMI A, KARAMI O, BALAZADEH S, OFFRINGA R. miR156-independent repression of the ageing pathway by longevity-promoting AHL proteins in *Arabidopsis*[J]. *The New Phytologist*, 2022, 235(6):2424-2438.
- [30] HORSTMAN A, LI M F, HEIDMANN I, WEEMEN M, CHEN B J, MUINO J M, ANGENENT G C, BOUTILLIER K. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI₃-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis[J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(2):848-857.
- [31] LOTAN T, OHTO M A, YEE K M, WEST M A L, LO R, KWONG R W, YAMAGISHI K, FISCHER R L, GOLDBERG R B, HARADA J J. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells[J]. *Cell*, 1998, 93(7):1195-1205.
- [32] KWONG R W, BUI A Q, LEE H, KWONG L W, FISCHER R L, GOLDBERG R B, HARADA J J. LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(1):5-18.
- [33] GE X X, CHAI L J, LIU Z, WU X M, DENG X X, GUO W W. Transcriptional profiling of genes involved in embryogenic, non-embryogenic calluses and somatic embryogenesis of Valencia sweet orange by SSH-based microarray[J]. *Planta*, 2012, 236(4): 1107-1124.
- [34] 缪星辰. 椴柑体细胞胚发生关键基因的挖掘与鉴定[D]. 扬州:扬州大学, 2023.
- MIAO Xingchen. Mining and identification of key genes involved in somatic embryogenesis in ponkan[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023.
- [35] 刘政. 柑橘珠心胚起始转录组分析及体细胞胚发生相关基因 *CsFUS3* 功能鉴定[D]. 武汉:华中农业大学, 2015.
- LIU Zheng. Transcriptional analysis of citrus nucellar embryo initiation and functional characterization of *CsFUS3* gene preferentially expressed during somatic embryogenesis[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015.
- [36] ZHU S P, WANG J, YE J L, ZHU A D, GUO W W, DENG X X. Isolation and characterization of LEAFY COTYLEDON 1-LIKE gene related to embryogenic competence in *Citrus sinensis*[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2014, 119(1):1-13.
- [37] TURCHI L, BAIMA S, MORELLI G, RUBERTI I. Interplay of HD-Zip II and III transcription factors in auxin-regulated plant development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(16): 5043-5053.