北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

转录因子*CmHAT1*调控板栗体细胞胚胎发育的功能研究

孙芝林 刘冰 李晓伟 田玉珍 张卿 曹庆芹

Functional research of transcription factor *CmHAT1* regulating the development of somatic embryo in *Castanea mollissima*

Sun Zhilin, Liu Bing, Li Xiaowei, Tian Yuzhen, Zhang Qing, Cao Qingqin

引用本文:
孙芝林, 刘冰, 李晓伟, 田玉珍, 张卿, 曹庆芹. 转录因子*CmHAT1*调控板栗体细胞胚胎发育的功能研究[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(5):73–81. doi: 10.12171/j.1000–1522.20230215
Sun Zhilin, Liu Bing, Li Xiaowei, Tian Yuzhen, Zhang Qing, Cao Qingqin. Functional research of transcription factor *CmHAT1* regulating the development of somatic embryo in *Castanea mollissima*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(5):73–81. doi: 10.12171/j.1000–1522.20230215

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230215

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

杉木体细胞胚胎发生胚性愈伤组织诱导条件的优化

Optimization of induction conditions for embryogenic callus of somatic embryogenesis in *Cunninghamia lanceolata*

北京林业大学学报, 2020, 42(2): 79–86. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20190196

果生炭疽菌转录因子CfHac1的BRLZ结构域生物学功能研究

Functional analysis of BRLZ motif of the transcription factor CfHac1 in *Colletotrichum fructicola*

北京林业大学学报, 2021, 43(9): 70–76. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210087

油松大孢子叶球发生发育的形态与解剖学观察

Morphologic and anatomical observations in the process of ovulate strobilus generation and development in *Pinus tabuliformis*

北京林业大学学报, 2017, 39(6): 1–12. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20160411

胡杨bZIP转录因子*PebZIP*26和*PebZIP*33基因的克隆及功能分析

Cloning and functional analysis of *PebZIP*26 and *PebZIP*33 transcription factors from *Populus euphratica*

北京林业大学学报, 2017, 39(7): 18–30. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170109

转录组分析氧化胁迫对毛白杨悬浮细胞生长发育的影响

Effects of oxidative stress on growth and development of suspension cells of *Populus tomentosa* by transcriptome analysis

北京林业大学学报, 2019, 41(9): 90–98. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20190157

文冠果*LEC*1基因的克隆及表达分析

Cloning and expression analysis of *LEC*1 gene from *Xanthoceras sorbifolia* embryos

北京林业大学学报, 2018, 40(1): 8–16. https://doi.org/10.13332/j.1000–1522.20170314

DOI:10.12171/j.1000−1522.20230215

转录因子 *CmHAT*1 调控板栗体细胞胚胎发育的功能研究

孙芝林[1,2] 刘 冰[2] 李晓伟[2] 田玉珍[2] 张 卿[2] 曹庆芹[2]
（1. 北京林业大学生物科学与技术学院，北京 100083；2. 北京农学院植物科学技术学院，北京 102206）

摘要:【目的】体细胞胚胎发生是板栗有效的离体再生方法。然而，目前板栗体细胞胚胎由于发育慢、再生效率低等问题，制约了板栗体细胞胚胎的再生进程，难以在后续基因功能验证和新种质创制过程中发挥作用。本文旨在通过研究 HD-ZIP Ⅱ 基因家族成员 *CmHAT*1 在板栗体细胞胚胎发育过程中的作用，进一步加速板栗体细胞胚胎的发育进程。**【方法】**利用生物信息学的方法鉴定了板栗 HD-ZIP Ⅱ 基因家族成员，并分析了该家族成员在板栗体细胞胚胎不同发育时期的表达情况，筛选调控体细胞胚胎发育的关键候选基因 *CmHAT*。进一步通过烟草亚细胞定位实验、荧光定量和遗传转化方法，研究关键基因 *CmHAT* 的亚细胞定位和基因功能。**【结果】**(1)板栗 HD-ZIP Ⅱ 基因家族有 7 个成员，大部分 CmHD-ZIP Ⅱ 成员在板栗体细胞胚胎发育时期均有表达，其中 *CmHAT*1 在愈伤组织时期表达较低，在球形胚时期表达上调，心形胚时期表达最高，而在子叶形胚时期表达下调，因此筛选出 *CmHAT*1 作为调控体细胞胚胎发育的关键候选基因。(2)CmHAT1 定位在细胞核；与转化空载体相比，过表达 *CmHAT*1 使体细胞胚胎数量显著减少，体细胞胚胎体积显著增大，而沉默 *CmHAT*1 后体细胞胚胎的表型没有显著性差异。**【结论】**在同等质量的愈伤诱导体细胞胚胎的情况下，过表达 *CmHAT*1 后可以调控板栗体细胞胚胎的数量和体积，影响体细胞胚胎的发育。本研究为进一步优化板栗再生体系和遗传转化体系奠定了基础，为利用体细胞胚胎系统创制板栗新种质提供了科学依据。

关键词：板栗；*CmHAT*1；体细胞胚胎发育；功能研究
中图分类号：S664.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1000−1522(2024)05−0073−09
引文格式：孙芝林，刘冰，李晓伟，等. 转录因子 *CmHAT*1 调控板栗体细胞胚胎发育的功能研究［J］. 北京林业大学学报，2024，46(5)：73−81. Sun Zhilin, Liu Bing, Li Xiaowei, et al. Functional research of transcription factor *CmHAT*1 regulating the development of somatic embryo in *Castanea mollissima*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(5): 73−81.

Functional research of transcription factor *CmHAT*1 regulating the development of somatic embryo in *Castanea mollissima*

Sun Zhilin[1,2] Liu Bing[2] Li Xiaowei[2] Tian Yuzhen[2] Zhang Qing[2] Cao Qingqin[2]
(1. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. College of Plant Science and Technology, Beijing Key Laboratory for Agricultural Application and New Technique, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract:［**Objective**］Somatic embryogenesis is an effective approach to in vitro regeneration of Chinese chestnut. However, the slow development of somatic embryos and the low reproduction efficiency of somatic embryos in *Castanea mollissima*, which had limited the regeneration process of somatic embryo of Chinese chestnut, and it is difficult to provide technical support for the verification of gene function and the creation of new germplasm. The purpose of this study was to investigate the role of *CmHAT*1, a member of HD-ZIP Ⅱ gene family, in the development of somatic embryo, and to further accelerate the development of somatic embryo in Chinese chestnut.［**Method**］The bioinformatics analysis was used to identify the

收稿日期: 2023−09−04 **修回日期:** 2023−11−14
基金项目: 北京市教委–市自然基金委联合资助项目(KZ20231002035)。
第一作者: 孙芝林，博士生。主要研究方向：板栗体细胞胚再生体系和遗传转化体系的优化。Email：18811770274@163.com 地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学。
责任作者: 曹庆芹，博士，教授。主要研究方向：板栗生物技术。Email：caoqingqin@bua.edu.cn 地址：102206 北京市昌平区回龙观镇北农路 7 号。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

Chinese chestnut HD-Zip gene family, the expression of the family members was analyzed in different developmental stages of Chinese chestnut somatic embryo, and the key candidate gene *CmHAT* was screened for regulating somatic embryo development. Further, the subcellular localization and gene function of *CmHAT* were analyzed by tobacco subcellular localization experiment, RT-qPCR and genetic transformation. [**Result**] (1) There were 7 members of the Chinese chestnut HD-ZIP Ⅱ gene family, most *CmHD-ZIP* Ⅱ members were expressed in somatic embryo development of Chinese chestnut. *CmHAT*1 was lowly expressed in callus, up-regulated in globular embryos, highly expressed in heart embryo, and down-regulated in cotyledonary embryo. Therefore, *CmHAT*1 was selected as a candidate gene for regulating somatic embryo development. (2) CmHAT1 was localized in the nucleus, compared with empty vector transformation, overexpression of *CmHAT*1 significantly reduced the number of somatic embryos and increased the volume of somatic embryos, while there was no significant difference in phenotype of somatic embryos after *CmHAT*1 silencing. [**Conclusion**] In the case of somatic embryos induced by callus of the same quality, overexpression of *CmHAT*1 can regulate the number of somatic embryo and the volume of somatic embryo, affecting the development of somatic embryo in Chinese chestnut. This study lays a solid foundation for the establishment of regeneration system and genetic transformation system, and accelerates the creation of new and excellent germplasm of Chinese chestnut.

Key words: Chinese chestnut; *CmHAT*1; somatic embryo development; functional research

中国板栗(*Castanea mollissima*)，简称板栗，为壳斗科(Fagaceae)栗属(*Castanea*)植物，具有重要的经济和生态价值。除了中国板栗外，世界上还有其他栗属植物，包括欧洲栗(*C. sativa*)、日本栗(*C. crenata*)和美洲栗(*C. dentata*)等[1]。板栗与其他栗属植物相比，具有广泛的环境适应性和很强的抗逆性，因此常作为育种亲本选育优良的新种质[2−4]。

体细胞胚胎发生具有高全能性和遗传稳定性的优点[5−6]，可为板栗新种质的创制提供一种重要的生物技术工具。体细胞胚胎发生是植物体细胞在生长素和细胞分裂素等激素的作用下，离体再生出完整植株的过程[7]。其中，草莓树(*Arbutus unedo*)[8]、葡萄(*Vitis vinifera*)[9−10]、核桃(*Juglans regia*)[11]和柑橘(*Citrus sinensis*)[12]等果树和作物均利用体细胞胚胎建立了再生体系。同时，在栗属植物的组织培养过程中，美洲栗[13]、欧洲栗[14]和板栗[1,15]先后利用体细胞胚胎建立了再生体系和遗传转化体系。在我们前期的研究中，板栗体细胞胚胎再生体系[1]和遗传转化体系已建立[4,15]。但目前板栗体细胞胚胎发育缓慢，严重制约了板栗体细胞胚胎再生进程，难以为后续基因功能的验证和新种质的创制提供技术支持，因此急需对板栗体细胞胚胎发育进程进行深入的研究。

HD-Zip(Homeodomain-leucine zipper)是植物中一类重要的转录因子，在调节植物的生长发育、应对各种生物和非生物胁迫中发挥着至关重要的作用[16−18]。目前研究发现，HD-Zip Ⅱ 家族成员在植物的胚胎和体细胞胚胎发生过程中具有重要的作用。其中在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中，HD-Zip 成员 *AtHAT*3 和 *AtHAT*4 与生长素介导的胚胎发育过程存在联系[19]。在油棕(*Elaeis guineensis*)中，HD-Zip Ⅱ亚类转录因子 *EgHOX*1 在胚胎发生早期高度表达[20]，HD-zip Ⅱ成员 *EgHAT*9、*EgHOX*3 和 *EgHAT*4 在油棕体胚发生的过程中表达上调[21]，推测其可能参与了胚胎发生的过程。在葡萄中，除了 *VvHDZ*02 外，HD-Zip Ⅱ的其他成员在原胚团和鱼雷形胚时期都有较高的表达[22]。*CsHB*1 在柑橘体细胞胚胎诱导过程中表达上调，且在胚胎发生能力强的柑橘品种中表达量高于难以形成体细胞胚胎的品种，表明 *CsHB*1 基因可能与胚性愈伤组织诱导能力有关[23]。

前期研究中已经完成了对不同发育时期板栗体细胞胚胎的转录组测序，发现 HD-Zip Ⅱ家族中的 *CmHAT*1 在心形胚时期表达量最高。基于前期研究基础，推测 *CmHAT*1 可能具有调节体细胞胚胎发育的能力。本文通过生物信息学分析、过表达和沉默 *CmHAT*1 和烟草亚细胞定位等实验，鉴定 *CmHAT*1 调控板栗体细胞胚胎发育的功能，为优化板栗体细胞胚胎再生体系奠定了基础，同时扩充了我们对 *CmHAT*1 转录因子功能的认知。本文的研究结果有望促进板栗规模化种苗的生产，同时为建立稳定高效的遗传转化体系奠定了坚实基础，为板栗优异种质创制提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 植物材料与培养条件

试验所用的愈伤组织材料由‘燕山红栗’(*Castanea mollissima* ‘Yanshanhongli’)幼胚的胚尖诱导而来[1]。

其中培养温度为 23～25 ℃，黑暗培养。液体悬浮培养用到的振荡摇床转速设置为 100 r/min，培养过程中用到的培养基包括愈伤增殖培养基 E1 和发育培养基 E2[24]。

1.2　板栗 HD-ZIP 基因家族分析

用 MEGA 7 软件比较了板栗和拟南芥的 HD-ZIP 蛋白序列，用邻接（Neighbor-Joining，NJ）构建系统进化树。从板栗数据库（http://castaneadb.net/）中获取 CmHD-ZIP Ⅱ在染色体上的位置信息，并利用 Tbtools 软件作图得到其在染色体上的分布情况。板栗体细胞胚胎不同发育时期的转录组数据从 NCBI SRA Database（PRJNA772286）中下载。

1.3　*CmHAT1* CDS 序列的克隆

利用 OMEGA 公司生产的 Plant RNA Kit 试剂盒提取板栗愈伤组织 RNA，利用 Thermo Fisher 公司生产的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒获得 cDNA。采用软件 Primer5 设计引物：上游引物（5′—3′）为 ATGGGTGAGAAAGGTTCTAGC，下游引物（5′—3′）为 TTACGATCGCGATGCGGG。引物序列由上海生物公司工程有限公司合成，利用 Thermo Fisher 公司生产的 Phusion DNA Polymerase 扩增目的基因片段。扩增体系为：5 × Phusion Green Buffer 10 μL，10 μmol/L Forward Primer 2 μL，10 μmol/L Reverse Primer 2 μL，10 mmol/L dNTPs 5 μL，Phusion DNA Polymerase 0.5 μL，模板 cDNA 50 ng，水补齐 50 μL。PCR 反应条件为：98 ℃ 30 s，98 ℃ 10 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，32 个循环；72 ℃ 2 min，16 ℃ 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物，胶回收目的片段，连接 PMD-19T，利用 DH5α 进行转化，测序校正序列，最后获得板栗 *CmHAT1* 的 CDS 序列。

1.4　*CmHAT1* 过表达载体的构建

通过无缝克隆的方法将 *CmHAT1* 的 CDS 片段（去掉终止密码子）连接到 Super1300 载体，选择酶切位点 *Xba* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ，其中接头上游引物（5′—3′）为 CTCGATACACCAAATCGACTCTAGAATGGGTGAGAAAGGTTCTAGC，下游引物（5′—3′）为 CTCGCCCTTGCTCACCATGGTACCCGATCGCGATGCGGG。反应体系为：2 × Uniclone Seamless Cloning Mix 5 μL，Super1300 线性化载体 50～200 ng，插入 *CmHAT1* CDS 片段 10～200 ng，最后用 ddH_2O 补齐 10 μL。混匀 50 ℃ 反应 15 min。

1.5　*CmHAT1* 沉默载体的构建

设计入门载体 pDONE221 上的引物，用于目的片段的克隆，获得干扰片段 296 bp；接头上游引物（5′—3′）为 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGTGAGAAAGGTTCTAG，下游引物（5′—3′）为 GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATCCACTGTTGATGATGCTG，进行 BP 反应。再通过 LR 反应连接到 pK7GWIWG2（Ⅱ）RR-277 沉默载体上。反应体系为：AttB-PCR product 20～60 ng，载体 pDONE221 150 ng，Gateway BP Clonase Ⅱ 1 μL，用水补齐 5 μL。混匀 25 ℃ 反应 3 h。添加蛋白酶 K 1 μL，37 ℃ 10 min 终止反应，转化 DH5α 菌株。

1.6　*CmHAT1* 的蛋白信号肽和跨膜结构域的预测与分析

使用 SignalP 4.1 在线工具对 *CmHAT1* 基因编码的蛋白信号肽进行预测，利用 TMHMM 对 *CmHAT1* 基因编码的蛋白序列的跨膜结构域进行预测。

1.7　*CmHAT1* 的亚细胞定位

将重组成功的质粒利用热激法转入农杆菌 GV3101 中，待菌液 OD_{600}=0.8 时，侵染生长状况良好的烟草植株，过夜暗培养后，光照培养 2～3 d。将注射的烟草叶片室温下放在 DAPI 溶液中避光 30 min。使用激发波长为 488 nm 的扫描电子显微镜检测叶片中增强型绿色荧光蛋白（EGFP）的存在，并拍照。

1.8　根癌农杆菌转化法侵染板栗愈伤组织

将带有目的基因特异片段的重组质粒导入农杆菌 GV3101。选取生长状态良好的胚性愈伤作为侵染材料，共培养 2 d 后，把板栗愈伤铺平到含有 50 mg/L 头孢霉素 500 μmol/L 特美汀的 E1 抑菌培养基上，23～25 ℃，暗培养 7 d。之后转移到筛选培养基上培养，直到表达绿色荧光蛋白的愈伤组织出现[25]。

1.9　转基因材料体细胞胚胎数量和体积的表型分析

取转基因和对照胚性愈伤组织约 0.1 g，转移至 100 mL E1 液体培养基，液体悬浮培养 1 周。将悬浮培养物依次通过 40 目（孔径 425 μm）和 100 目（孔径 150 μm）钢筛，取 100 目上直径为 150～425 μm 的胚性愈伤组织 0.1 g，转移至 100 mL E2 液体培养基，相同条件悬浮培养 1 周，设置 3 次生物学重复。悬浮培养物经过 100 目（孔径 150 μm）钢筛，分别取 0.1 g 用于观察、统计和拍照，0.1 g 转移至 100 mL E2 液体培养基用于继续培养，0.1 g 用于后续的荧光定量分析。同样设置 3 次生物学重复。体视显微镜（ZEISS SteREO Discovery. V20，Germany）用于观察统计体细胞胚胎数量并拍照[4]，并通过 ImageJ 软件测量每个体细胞胚胎直径。对转基因和对照胚性愈伤组织的体细胞胚胎数量进行表型分析。

1.10　*CmHAT1* 基因荧光定量 PCR 分析

利用 IDT 在线软件（https://sg.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/）设计 *CmHAT1* 基因特异

性引物，上游引物为(5′—3′)为 CTCGTGGAAGC GATGATGAA，下游引物(5′—3′)为 TGCTTCGGGT TGAGAGTATTG。内参基因上游引物(5′—3′)为 AACCATGTTCCCTGGTATTG，下游引物(5′—3′)为 CGTACTCACCCTTGGAAATC。反应体系为：95 ℃ 3 min 预变性，95 ℃ 10 s 变性，62 ℃ 30 s 退火，设置为 39 个循环。

1.11 数据统计分析

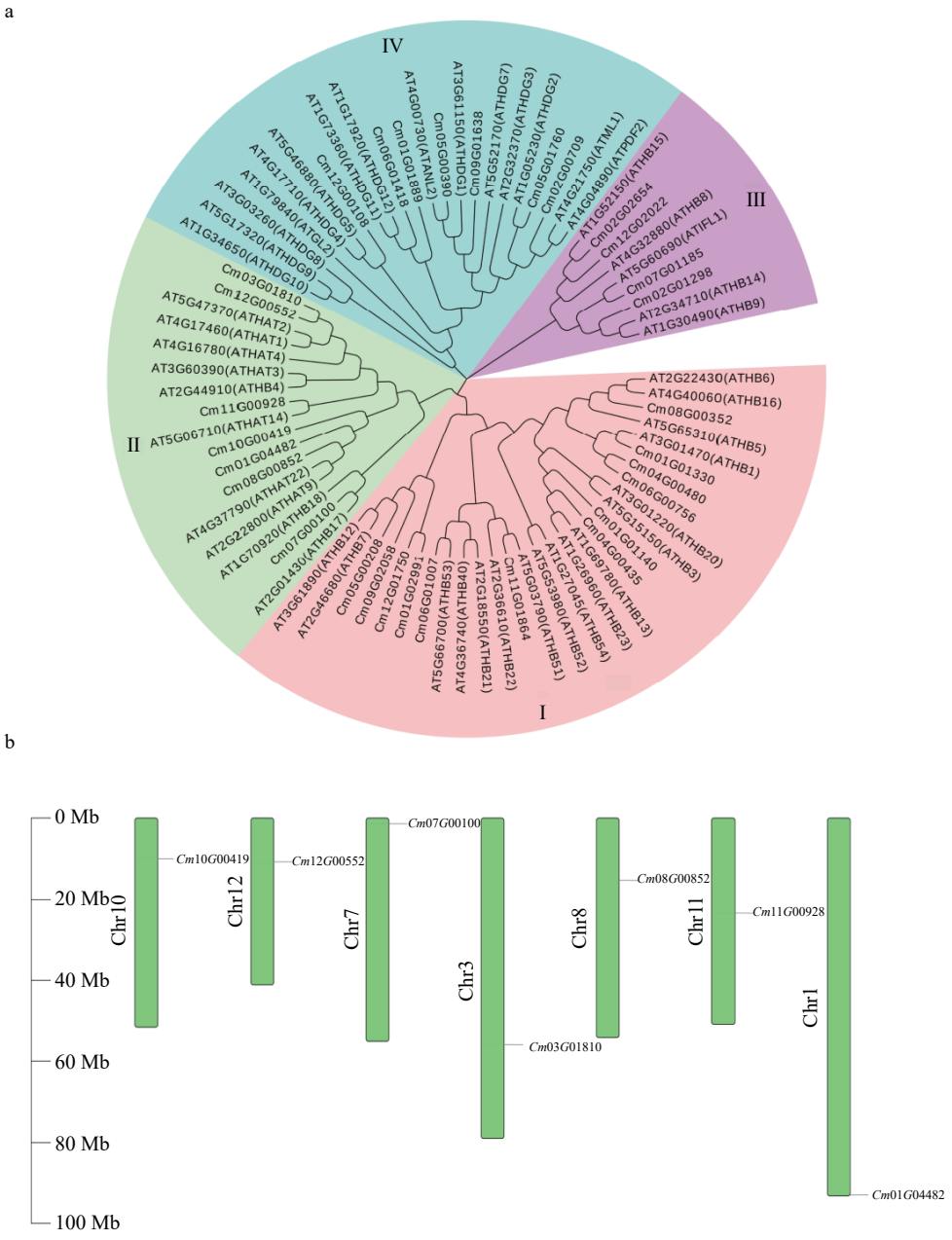
每 0.1 g 胚性愈伤组织产生的体细胞胚胎数量 = 胚性培养物总质量/0.1 × 每 0.1 g 胚性培养物中的体细胞胚胎数量。基因相对表达量通过 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 算法来计算[26]。

通过 Excel、SPSS Statistics 19 和 GraphPad Prism 6 对实验数据进行统计、单因素方差分析和绘图。

2 结果与分析

2.1 CmHD-Zip Ⅱ的基因家族鉴定与分析

利用 MEGA X 对 CmHD-Zip 蛋白序列进行系统发育分析。将 CmHD-Zip 蛋白序列与拟南芥的 HD-Zip 蛋白进行聚类，图 1a 显示：HD-Zip 家族蛋白共聚为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4 类，其中在 HD-Zip Ⅱ类蛋白中鉴定出 7 个 CmHD-Zip 序列。根据在板栗数据库中得到的 *CmHDZ*s 基因组注释文件，用 TBtools 软件分析了板栗 7 个 HD-Zip Ⅱ家族成员在染色体



AT. 拟南芥；Cm. 板栗。AT, *Arabidopsis thaliana*; Cm, *Castanea mollissima*.

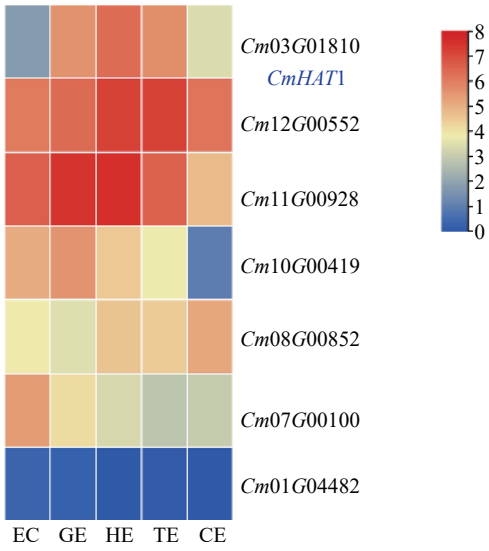
图 1 板栗 HD-ZIP 蛋白家族系统进化树(a)和 *HD-ZIP* Ⅱ基因在板栗染色体上的分布(b)

Fig. 1 Phylogenetic tree of HD-ZIP gene family (a) and the chromosome distribution of the *HD-ZIP* Ⅱ genes in the Chinese chestnut (b)

上的具体位置，图 1b 显示，这 7 个成员分别分布在 7 条不同的染色体上。

2.2　*CmHD-Zip* Ⅱ基因在不同体胚发育时期的表达特性

利用前期获得的板栗体细胞胚胎不同发育时期的转录组数据，分析 7 个 *CmHD-Zip* Ⅱ基因在板栗胚性愈伤、球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶形胚中的表达特点。图 2 显示：除 *Cm*01*G*04482 在体细胞胚胎表达中较低之外，*CmHD-Zip* Ⅱ大部分基因在板栗的体细胞胚胎中表达量高。其中，*Cm*10*G*00419 基因在板栗胚性愈伤、球形胚、心形胚和鱼雷形胚均有表达，在子叶形胚中表达量下降。然而，*Cm*03*G*01810 在板栗的愈伤组织时期表达量较低，随着体细胞胚胎发育成球形胚、心形胚和鱼雷形胚时表达量升高，在心形胚时期表达最高，但到子叶形胚时表达又开始下降（图 2）。因此，我们推测 *Cm*03*G*01810 可能具有调节体细胞胚胎发育的能力，故选取 *Cm*03*G*01810 作为调控体细胞胚胎发育的关键候选基因，通过系统进化树的聚类分析，发现 Cm03G01810 与拟南芥 AtHAT1 同源关系近，将其命名为 CmHAT1，进行下一步的分析。



EC. 胚性愈伤；GE. 球形胚；HE. 心形胚；TE. 鱼雷形胚；CE. 子叶形胚。EC, embryogenic calli; GE, globular embryos; HE, heart embryos; TE, torpedo embryos; CE, cotyledonary embryos.

图 2　*CmHD-ZIP* Ⅱ基因家族成员在板栗体细胞胚胎不同发育阶段的表达量

Fig. 2　Expression levels of *CmHD-ZIP* Ⅱ gene family in different developmental stages of somatic embryos

2.3　*CmHAT1* 基因的克隆和生物信息学分析

以板栗胚性愈伤组织的 cDNA 为模板，克隆获得 *CmHAT1* 序列，其中 *CmHAT1* CDS 序列长度为 972 bp（图 3a），编码 323 个氨基酸，分子质量为 36.1 kDa。利用 TMHMM 对 *CmHAT1* 基因编码的蛋白序列的跨膜结构域进行预测发现，CmHAT1 无跨膜结构域（图 3b）。利用 SignalP 4.1 在线工具对 *CmHAT1* 基因编码的蛋白信号肽进行预测发现：CmHAT1 蛋白不含信号肽，预测其含有信号肽的概率为 0.363（图 3c）。

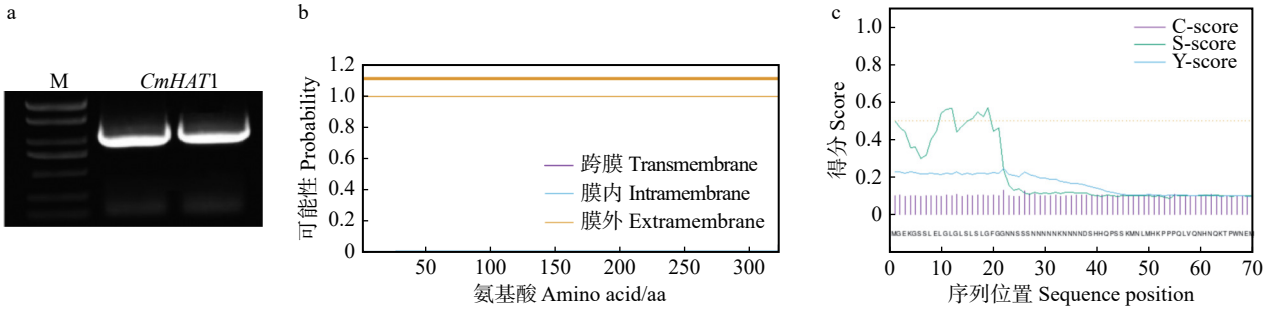
2.4　CmHAT1 在烟草中的亚细胞定位

为进一步验证 CmHAT1 在细胞中的定位，构建了表达载体 35S::CmHAT1-GFP，利用烟草瞬时转化系统对 CmHAT1 进行亚细胞定位分析。烟草亚细胞定位实验结果表明：转化空载 35S::GFP 的烟草叶片下表皮细胞中，绿色荧光分布于细胞质和细胞核中，而转化重组载体 35S::CmHAT1-GFP 的烟草叶片下表皮细胞中，绿色荧光集中分布在细胞核（图 4），说明 CmHAT1 定位在细胞核。

2.5　过表达 *CmHAT1* 调控板栗体细胞胚胎发育进程

克隆 *CmHAT1* 编码区 972 bp 序列，去掉终止密码子，构建双元表达载体 35S::CmHAT1-GFP，转化农杆菌 GV3101，侵染板栗愈伤组织，经抗生素筛选，获得了 *CmHAT1* 过表达胚性愈伤组织（图 5a）。荧光定量 PCR 结果表明，*CmHAT1* 在过表达胚性愈伤组织中的表达量显著高于空载转化的愈伤组织（图 5b）。

连续 2 周的体细胞胚胎表型观察（图 5c，图 5e）



a. *CmHAT1* 基因的克隆；b. CmHAT1 蛋白跨膜结构域预测；c. CmHAT1 蛋白信号肽预测。a, cloning of *CmHAT1* gene; b, transmembrane domain of CmHAT1 predicted by TMHMM; c, prediction signal peptide of CmHAT1 by signalIP.

图 3　*CmHAT1* 基因的克隆和生物信息学分析

Fig. 3　Cloning and bioinformatics analysis of *CmHAT1* gene

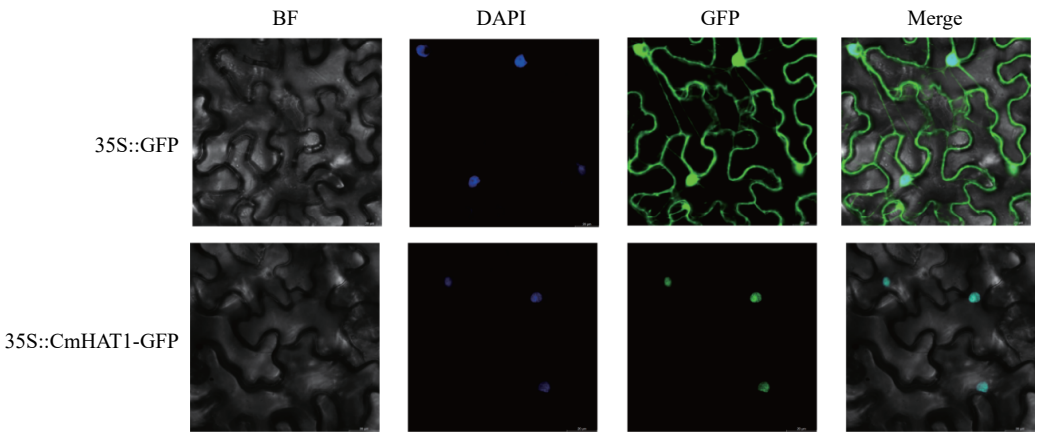
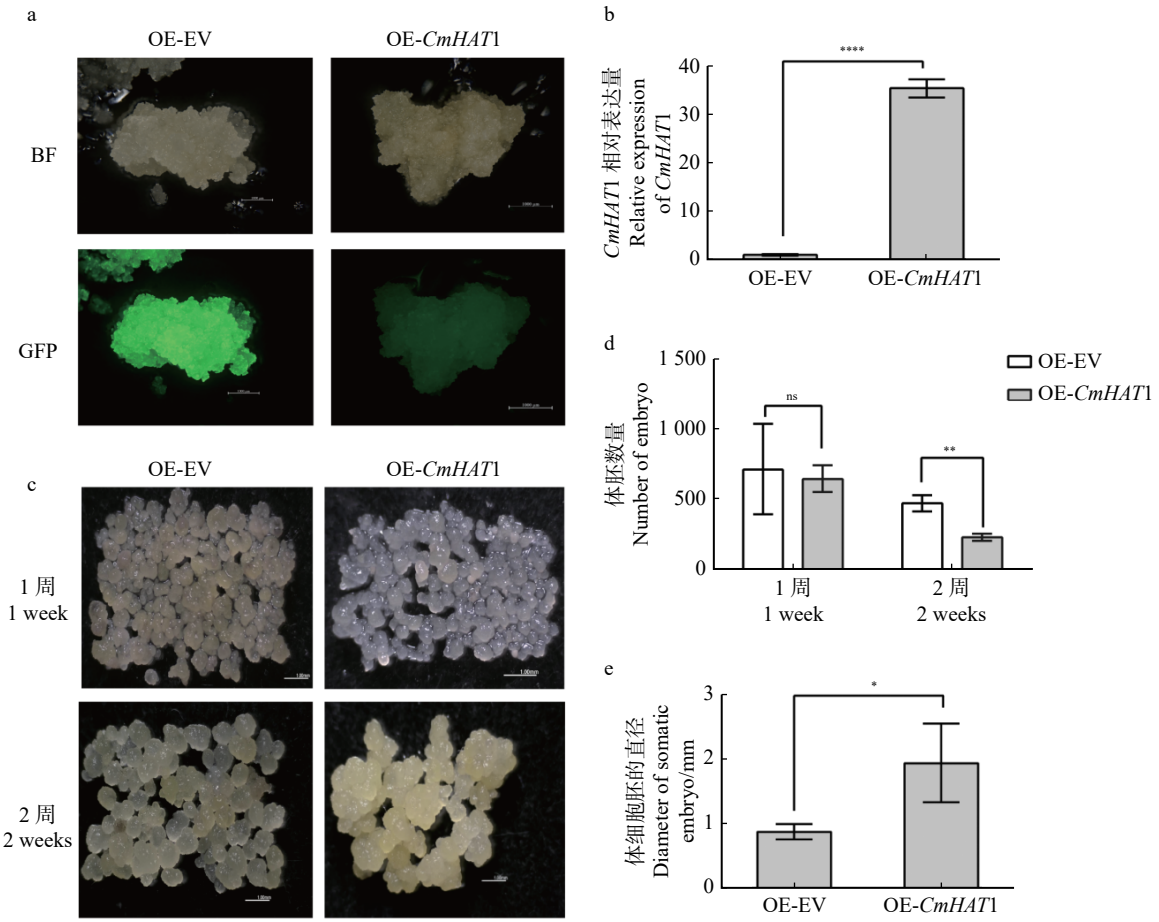


图 4 CmHAT1 的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of CmHAT1



a. 过表达 *CmHAT*1 的转基因愈伤；b. *CmHAT*1 表达量分析；c. *CmHAT*1 基因过表达后的表型分析；d. *CmHAT*1 基因过表达后的体胚数量分析；e. 体细胞胚胎直径的大小分析。OE-EV. 转空载愈伤；OE-*CmHAT*1. 转 *CmHAT*1 愈伤。*代表存在显著性差异（$P < 0.05$），**代表存在非常显著性差异（$P < 0.01$），****代表存在极显著性差异（$P < 0.000\ 1$），ns 分别代表不存在显著性差异（$P > 0.05$）。a, overexpressing *CmHAT*1 calli; b, expression analysis of *CmHAT*1 gene; c, phenotypic analysis after overexpressing *CmHAT*1 gene; d, number analysis of somatic embryos after overexpressing *CmHAT*1 gene; e, diameter analysis of somatic embryo. OE-EV, transgenic empty vector calli; OE-*CmHAT*1, transgenic *CmHAT*1 calli. * indicate statistically significant differences at $P < 0.05$ level, ** indicates statistically significant differences at $P < 0.01$ level, **** indicates statistically significant differences at $P < 0.000\ 1$ level, ns indicates no statistically significant differences ($P > 0.05$).

图 5 过表达 *CmHAT*1 的转基因愈伤综合分析

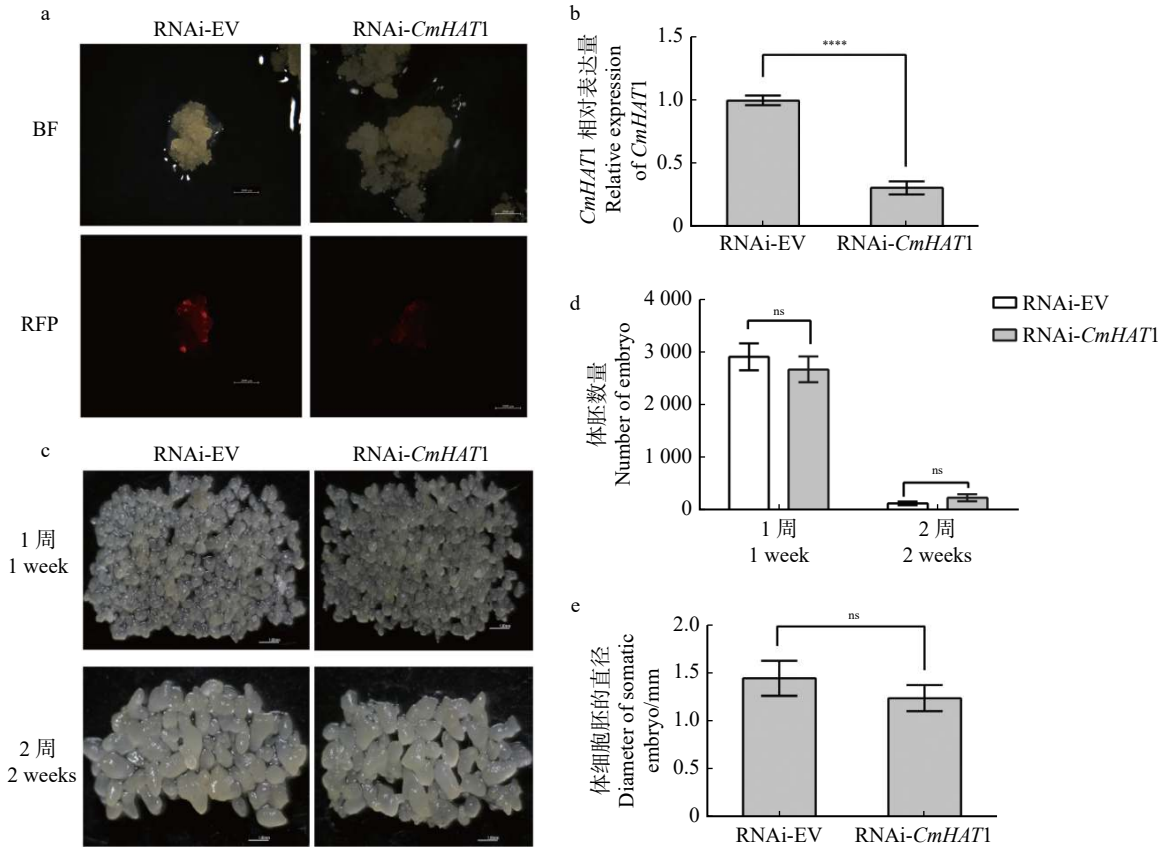
Fig. 5 Comprehensive analysis of transgenic *CmHAT*1 calli

和数量统计（图 5d）后，发现在液体培养的第 1 周，由 *CmHAT*1 过表达愈伤组织发育而来的体细胞胚胎数量与空载相比无显著性差异，但在第 2 周，与空载转化的愈伤组织相比，*CmHAT*1 过表达的体细胞胚胎数量显著减少，而体细胞胚胎体积明显增大（图 5e），以上结果说明过表达 *CmHAT*1 可以调控板栗体细胞

胚胎的发育。

2.6　*CmHAT1* 沉默后的表型分析

选择 *CmHAT1* 特异性片段，构建 RNAi 载体，转化农杆菌 GV3101，侵染板栗愈伤组织，经抗生素筛选，获得了 RNAi-CmHAT1 胚性愈伤组织（图 6a）。通过实时荧光定量 PCR 分析可知，*CmHAT1* 基因沉默后的板栗愈伤组织中 *CmHAT1* 的表达量与空载转化的愈伤组织相比下降了约 60%（图 6b），但 *CmHAT1* 沉默后体细胞胚胎的数量和体积与空载体转化的愈伤组织相比没有显著性差异（图 6c～e）。



a. 沉默 *CmHAT1* 的转基因愈伤；b. *CmHAT1* 基因沉默后的表达量分析；c. *CmHAT1* 基因沉默后的表型分析；d. *CmHAT1* 基因沉默后的体胚数量分析；e. 体细胞胚胎直径的大小分析。RNAi-EV. 转空载沉默愈伤；RNAi-*CmHAT1*. 转 *CmHAT1* 沉默愈伤。a, RNAi-*CmHAT1* calli; b, expression analysis of *CmHAT1* gene after RNAi; c, phenotypic analysis of *CmHAT1* gene after RNAi; d, number of somatic embryos after RNAi of *CmHAT1* gene; e, diameter of somatic embryo. RNAi-EV, transgenic RNAi-empty vector calli; RNAi-*CmHAT1*, transgenic RNAi-*CmHAT1* calli.

图 6　沉默 *CmHAT1* 的转基因愈伤综合分析

Fig. 6　Comprehensive analysis of RNAi-*CmHAT1* calli

3　讨　　论

目前，在许多植物中都已经对 HD-Zip Ⅱ亚家族成员进行了鉴定与功能研究，不同植物中的 HD-Zip Ⅱ亚家族成员数目存在差异，如拟南芥[27]中鉴定出了 10 个成员、玉米[28]有 18 个成员、水稻[29]有 12 个成员、小麦[30]有 17 个成员和甜瓜中有 9 个成员[16]。本研究通过对板栗全基因组的分析，共鉴定出了 7 个 HD-Zip Ⅱ亚家族成员，数量少于上述物种，这种差异可能与植物长期进化过程中基因复制相关。

同时本研究比较了 7 个 *CmHD-Zip* Ⅱ家族成员在板栗胚性愈伤、球形胚、心形胚、鱼雷形胚和子叶形胚中的表达特点，发现 *CmHD-Zip* Ⅱ大部分基因在板栗的体细胞胚胎中均有表达。其中，*CmHAT1* 表达量在板栗的愈伤组织时期表达量较低，而随着体细胞胚胎发育成球形胚、心形胚和鱼雷形胚时升高，推测 *CmHAT1* 在愈伤发育到体细胞胚的过程中起到了重要作用。据报道，在其他的物种中 *HD-Zip* Ⅱ成员与胚胎的发育也有重要的关系，如 *AtHAT3*、*ATHB4*[19]、*CsHB1*、*CsHB20*[23]和 *DLHB4-1*[31]在胚胎发育的过程中都有较高的转录水平。在拟南芥中 *ATHB2*、*HAT3* 和 *ATHB4* 存在功能冗余现象，会影响胚胎发生过程中顶端分生组织的形成[19]。可见，HD-Zip Ⅱ亚家族成员在调节植物胚胎发育过程中的功能是相对保守的。前人研究表明，HD-Zip Ⅱ亚家族成员 AtHAT22[32]、CaHB1[33]、MaHDZⅡ.4 和 MaHDZⅡ.7[34]都定位在细胞核内，本研究通过烟草叶片瞬时转化实验，发现 CmHAT1 定位在细胞核

内，符合转录因子的定位特征，这与其他报道的结果一致。

本文通过转基因实验研究了 *CmHAT*1 对板栗体细胞胚胎发育过程中的影响，RNAi-CmHAT1 体细胞胚胎的平均直径小于空载体转化的愈伤，但差异不显著。RNAi-CmHAT1 的表型效应较小，可能是由于 RNAi-CmHAT1 结构的效率较低，仅能降低原 *CmHAT*1 表达的 60%，还有可能是由于该家族中其他成员与 *CmHAT*1 存在功能冗余，弥补了 *CmHAT*1 沉默后的表型。相比之下，过表达载体 35S::CmHAT1-GFP 诱导 *CmHAT*1 表达水平增加 30 倍，过表达该基因使板栗体细胞胚胎的直径增大，影响板栗体细胞胚胎的发育。因此，*CmHAT*1 对体细胞胚胎发育有明显的影响。

本文针对板栗再生和遗传转化中体细胞胚胎发育慢的限制问题，挖掘了与体细胞胚胎发育相关的转录因子 *CmHAT*1，并研究其对板栗体细胞胚胎发育的影响，为改良板栗遗传转化体系奠定了基础。除了 *CmHAT*1，其他转录因子也已被发现可以影响植物体细胞胚胎发生的过程，如 *SERK*（*Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinases*）[35]、*WUS*（*WUSCHEL*）[36]和 *AP2/ERF* 转录因子家族中的 *BBM*（*BABY BOOM*）[37]，这些基因也可以作为促进板栗体细胞胚胎发生的候选基因。在后续研究中，我们将继续开发高效转基因体系，为创制更多优良种质提供基础。

4 结　　论

通过生物信息学和板栗体细胞胚胎不同发育时期的转录组测序，挖掘调节体细胞胚胎发育关键基因 *CmHAT*1，结合亚细胞定位、荧光定量方法和遗传转化方法，发现 CmHAT1 定位在细胞核；在由同等质量的愈伤诱导体细胞胚胎的情况下，*CmHAT*1 过表达后形成的体细胞胚胎数量显著少于空载体转化的体细胞胚胎数量，但其体积变大，表明 *CmHAT*1 可以调控板栗体细胞胚胎的数量和体积，影响体细胞胚胎的发育。

参 考 文 献

[1] Lu D, Wei W, Zhou W, et al. Establishment of a somatic embryo regeneration system and expression analysis of somatic embryogenesis-related genes in Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2017, 130: 601−616.

[2] Hebard F V. The backcross breeding program of the American chestnut foundation[J]. Journal of the American Chestnut Foundation, 2006, 19: 55−77.

[3] Miller A C, Woeste K E, Anagnostakis S L, et al. Exploration of a rare population of Chinese chestnut in North America: stand dynamics, health and genetic relationships[J]. AoB Plants, 2014, 6: 11−15.

[4] Li X W, Sun Z L, Gao Y R, et al. A strategy for establishing an efficient somatic embryo regeneration system in *Castanea mollissima* Blume[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2022, 150: 299−312.

[5] Verdeil J L, Alemanno L, Niemenak N, et al. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy?[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12: 245−252.

[6] Ikeuchi M, Iwase A, Rymen B, et al. PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in *Arabidopsis*[J]. Nature Plants, 2015, 1: 15089.

[7] Andrei S, Bozhkov P. Somatic embryogenesis: life and death processes during apical-basal patterning[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65: 1343−1360.

[8] Martins J F, Correia S I, Canhoto J M. Somatic embryogenesis induction and plant regeneration in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.)[J]. Methods in Molecular Biology, 2016, 1359: 329−339.

[9] Das D, Reddy M, Upadhyaya K, et al. An efficient leaf-disc culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.)[J]. Plant Cell Reports, 2002, 20: 999−1005.

[10] Yang X M, An L Z, Xiong Y C, et al. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos and monitoring the genetic fidelity of regenerated plants in grapevine[J]. Biologia Plantarum, 2008, 52: 209−214.

[11] Breton C, Cornu D, Chriqui D, et al. Somatic embryogenesis, micropropagation and plant regeneration of “Early Mature” walnut trees (*Juglans regia*) that flower in vitro[J]. Tree Physiology, 2004, 24(4): 425−435.

[12] Xu Y, Jia H, Wu X, et al. Regulation of nucellar embryony, a mode of sporophytic apomixis in *Citrus* resembling somatic embryogenesis[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2021, 59: 101984.

[13] Maynard C A, Mcguigan L D, Oakes A D, et al. Chestnut, American (*Castanea dentata* (Marsh.) Borkh.)[J]. Methods in Molecular Biology, 2015, 1224: 143−161.

[14] Corredoira E, Valladares S, Allona I, et al. Genetic transformation of European chestnut somatic embryos with a native thaumatin-like protein (*CsTL*1) gene isolated from *Castanea sativa* seeds[J]. Tree Physiology, 2012, 32: 1389−1402.

[15] Sun Z L, Li X, Zhou W, et al. Agrobacterium-mediated genetic transformation of Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume)[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2020, 140: 95−103.

[16] 尹丽娟, 侯尹婕, 潘晓娜, 等. 甜瓜 HD-ZIP 基因家族的鉴定及表达 [J/OL]. 分子植物种, 2024: 1−15[2024−04−14]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230530.1532.004.html.
Yin L J, Hou Y J, Pan X N, et al. Identification and expression analysis of HD-ZIP gene family in melon [J/OL]. Molecular Plant

Breeding, 2024: 1−15[2024−04−14]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230530.1532.004.html.

[17] Ariel F D, Manavella P A, Dezar C A, et al. The true story of the HD-Zip family[J]. Trends in Plant Science, 2007, 12: 419−426.

[18] Romani F, Ribone P A, Capella M. A matter of quantity: common features in the drought response of transgenic plants overexpressing HD-Zip I transcription factors[J]. Plant Science, 2016, 251: 139−154.

[19] Turchi L, Carabelli M, Ruzza V, et al. Arabidopsis HD-Zip Ⅱ transcription factors control apical embryo development and meristem function[J]. Development, 2013, 140: 2118−2129.

[20] Ooi S E, Ramli Z, Syed A S S R, et al. *EgHOX*1, a HD-Zip Ⅱ gene, is highly expressed during early oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryogenesis[J]. Plant Gene, 2016, 8: 16−25.

[21] Khianchaikhan K, Aroonluk S, Vuttipongchaikij S, et al. 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.

[22] Li Z, Zhang C, Guo Y, et al. Evolution and expression analysis reveal the potential role of the HD-Zip gene family in regulation of embryo abortion in grapes (*Vitis vinifera* L.)[J]. BMC Genomics, 2017, 18: 744.

[23] Ge X X, Liu Z, Wu X M, et al. 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: 61−68.

[24] 逯丹. 板栗体细胞胚再生体系建立及体胚发生相关基因的表达分析 [D]. 北京: 北京农学院, 2017.
Lu D. Establishment of a somatic embryo regeneration system and expression analysis of somatic embryogenesis-related genes in chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) [D]. Beijing: Beijing University of Agriculture, 2017.

[25] 周婉. 农杆菌介导的板栗体细胞胚遗传转化体系的建立 [D]. 北京: 北京农学院, 2018.
Zhou W. The establishment of agrobacterium-mediated genetic transformation of somatic embryos in Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume)[D]. Beijing: Beijing University of Agriculture, 2018.

[26] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nature Protocols, 2008, 3: 1101−1108.

[27] Roodbarkelari F, Groot E P. Regulatory function of homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP) family proteins during embryogenesis[J]. New Phytologist, 2017, 213(1): 95−104.

[28] 郝陆洋, 张晓静, 高晨曦, 等. 玉米 HD-Zip 转录因子基因 *Zmhdz*6 的克隆与功能分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2022(3): 23.
Hao L Y, Zhang X J, Gao C X, et al. Cloning and functional analysis of HD-Zip transcription factor gene *Zmhdz*6 in maize[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2022(3): 23.

[29] Li Y, Yang Z, Zhang Y, et al. The roles of HD-ZIP proteins in plant abiotic stress tolerance[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1027071.

[30] Yue H, Shu D, Wang M, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the HD-Zip gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Genes, 2018, 9(2): 70.

[31] 张春渝, 徐小萍, 陈晓慧, 等. 龙眼体胚发生过程 HD-Zip 全基因组与生物功能分析 [J]. 园艺与种苗, 2019, 39(6): 27−32.
Zhang C Y, Xu X P, Chen X H, et al. Enome-wide and biological function analysis of HD-Zip during somatic embryogenesis in longan[J]. Horticulture & Seed, 2019, 39(6): 27−32.

[32] Liu T, Longhurst A D, Talavera-Rauh F, et al. The *Arabidopsis* transcription factor ABIG1 relays ABA signaled growth inhibition and drought induced senescence[J]. Elife, 2016, 5: e13768.

[33] Yang Q, Xiang W, Li Z, et al. Genome-wide characterization and expression analysis of HD-ZIP gene family in *Dendrobium officinale*[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 797014.

[34] Oh S K, Yoon J, Choi G J, et al. *Capsicum annuum* homeobox 1 (*CaHB*1) is a nuclear factor that has roles in plant development, salt tolerance, and pathogen defense[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 442: 116−121.

[35] Li H, Cai Z, Wang X, et al. *SERK* receptor-like kinases control division patterns of vascular precursors and ground tissue stem cells during embryo development in *Arabidopsis*[J]. Molecular Plant, 2019, 12: 984−1002.

[36] Zuo J, Niu Q, Frugis G, et al. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal, 2002, 30: 349−359.

[37] Horstman A, Li M, Heidmann I, et al. The *BABY BOOM* transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis[J]. Plant Physiology, 2017, 175(2): 848−857.

（责任编辑　范　娟　赵田芸
责任编委　卢孟柱）