

杨树 C2H2 型锌指转录因子 PtrZAT11 在木材形成中的功能

李沃森 翟睿 赵晴 赵金凤 孟德恺 陈艳杰 李爽 周晨光*

(林木遗传育种全国重点实验室(东北林业大学), 哈尔滨 150040)

摘要 为探究 C2H2 型锌指转录因子 PtrZAT11 在杨树木材形成过程中的分子功能, 本研究通过 RT-qPCR 分析 *PtrZAT11* 在毛果杨(*Populus trichocarpa*) 不同茎节木质部的表达模式, 利用 PEG 介导的原生质体瞬时转化系统观察 PtrZAT11-GFP 融合蛋白的亚细胞定位, 采用 CRISPR-Cas9 技术创制 *PtrZAT11* 及其同源基因 *PtrZAT11h* 的双突变体, 并对突变体进行生长指标测定及茎解剖结构分析。结果表明: *PtrZAT11* 在次生长阶段的茎节中显著高表达, 其蛋白定位于细胞核。与野生型相比, *ptrzat11 ptrzat11h* 双突变体株高增加约 31.5%, 茎节数量显著增多, 但地径和节间长度无显著差异; 突变体第 12 茎节木质部环带宽度及木质部细胞面积占比均显著降低, 单位面积纤维细胞数量减少、导管细胞数量增多。PtrZAT11 作为核定位转录因子, 参与杨树木材形成过程, 通过影响木质部细胞的分化数量来调控木质部组织结构, 并可能协调植株初生生长与次生长之间的平衡。

关键词 PtrZAT11 转录因子; 次生木质部; 木材形成; 杨树

中图分类号: S792.11; Q943.2 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2026.04.009

The Role of the Poplar C2H2 Zinc Finger Transcription Factor PtrZAT11 in Wood Formation

LI Wosen ZHAI Rui ZHAO Qing ZHAO Jinfeng
MENG Dekai CHEN Yanjie LI Shuang ZHOU Chenguang*

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract This study aimed to investigate the molecular function of the C2H2-type zinc finger transcription factor PtrZAT11 in the process of wood formation in poplar. The expression pattern of *PtrZAT11* in the xylem at different stem internodes of *Populus trichocarpa* was analyzed by RT-qPCR. The subcellular localization of the PtrZAT11-GFP fusion protein was observed using a PEG-mediated protoplast transient transformation system. A double mutant of *PtrZAT11* and its homologous gene *PtrZAT11h* was generated using CRISPR-Cas9 technology. Growth parameters and stem anatomical structures of the mutant were subsequently analyzed. The results indicated that *PtrZAT11* was significantly highly expressed in stem internodes during the secondary growth stage, and its protein was localized in the nucleus. Compared with the wild type, the *ptrzat11 ptrzat11h* double mutant exhibited an approximately 31.5% increase in plant height and a significant increase in the number of stem internodes, while no significant differences were observed in ground diameter or internode length. In the 12th internode of the mutant, the width of xylem ring and proportion of xylem cell area were significantly reduced. Additionally, the number of fiber cells per unit area decreased, whereas the number of vessel cells increased. As a nuclear-localized transcription factor, PtrZAT11 participates in wood formation in poplar by influencing the differentiation quantity of xylem cells to regulate xylem tissue organization. It may also coordinate the balance between primary and secondary growth in poplar.

Key words PtrZAT11 transcription factor; secondary xylem; wood formation; poplar

基金项目: 国家重点研发计划青年科学家项目 (2021YFD2200700)。

第一作者简介: 李沃森(2001—), 男, 硕士研究生, 主要从事毛果杨转录因子调控木材形成的功能研究。

* 通信作者: E-mail: zhouchenguang@nefu.edu.cn。

收稿日期: 2026年3月3日。

木材作为地球上最重要的可再生资源之一,在人类社会发展和生态系统中占据着不可替代的核心地位。木材形成是木本植物生长发育的核心过程之一,其主要涉及维管形成层的持续分裂与分化,最终形成次生木质部这一复杂的生物学结构。这一过程不仅直接影响植物的机械支撑、水分运输和养分储存等功能,更是森林生态系统生物量和碳汇的主要来源^[1-2]。木材形成受到严格的遗传调控和环境影响,其分子机制的研究对理解林木生长发育规律及进行林木遗传改良具有重要意义^[3]。

在木材形成的复杂调控网络中,转录因子发挥着至关重要的作用^[4]。已知NAC、MYB、bHLH、WRKY和C2H2锌指蛋白等家族,通过形成复杂的层级调控网络,分别调控木质部细胞分化的启动、次生壁合成,影响木质素、纤维素和半纤维素的生物合成等过程,精确控制木材形成过程^[5-12]。其中,C2H2型锌指蛋白是植物中最大的转录因子家族之一,其成员通过保守的C2H2结构域与DNA特异性结合^[13],参与植物生长发育、激素响应、逆境适应等过程^[14]。IDD类型的C2H2锌指转录因子PagIDD15A,被证实正向调控杨树(*Populus*)次生壁加厚和木质素合成^[11]。茶树(*Camellia sinensis*)中的一个C2H2家族成员CsWIP3,过表达该基因会显著增加木质素的积累^[12]。该家族中属于C1-2i亚类的ZAT(zinc finger of *Arabidopsis thaliana*)转录因子ZAT11作为转录抑制子,负调控镍离子耐受性并参与调节氧化应激诱导的细胞程序性死亡^[15-16];与之相反,拟南芥的ZAT6作为正调控因子协调磷稳态与根发育^[17];而ZAT10则展现出复杂的功能可塑性,其功能获得与功能缺失突变体均能增强植物对非生物胁迫的耐受性,提示其可能作为枢纽因子整合多重信号^[18]。这些研究表明,即使在同一亚类中,C2H2锌指转录因子也可扮演正调控因子、负调控因子甚至双重调控因子等角色,其功能高度依赖于具体的生物学过程与遗传背景。

在木材形成过程中,ZAT14亚家族作为C2H2型锌指蛋白的重要成员,在木质部发育中的调控作用已被进一步揭示。该亚家族包含ZAT14、ZAT5、ZAT14L和ZAT15四个同源基因,均在拟南芥的木质部细胞中特异性表达。遗传学证据显示,zat多突变体呈现出明显的原生木质部导管发育不连续的表型,异位木质部形成显著减少且根

中出现木质部间隙细胞,证明这些ZATs在维持木质部正常发育中发挥了重要作用;在转录调控层级上,ZATs作用于木质部分化关键因子VND7的下游,同时受到根尖分生组织因子PLT2的负调控。分子机制研究^[19]表明,ZAT14蛋白能够直接结合多个扩张蛋白基因(*EXPA1*、*EXPA10*、*EXPA14*)的启动子并抑制其转录,通过调控细胞壁松弛过程来确保木质部导管的正常连续分化。然而,该亚类转录因子如何在林木木材形成过程中进行精细调控?其具体功能和分子机制仍是一个亟待探索的重要问题。

本研究在前期通过对毛果杨(*Populus trichocarpa*)不同发育阶段茎干组织的转录组分析,发现了一个在次生长阶段显著高表达的C2H2型锌指转录因子基因*PtrZAT11*。为进一步探究*PtrZAT11*在杨树木材形成中发挥的功能,本研究通过分子克隆、基因表达分析、亚细胞定位、基于CRISPR-Cas9系统的基因编辑及表型分析,系统研究*PtrZAT11*及其同源基因在杨树生长及木材形成中的分子功能,旨在为深入理解树木木材形成的分子过程提供理论支撑,并为木材性状的分子育种提供候选基因和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为毛果杨无性系Nisqually-1,取自林木遗传育种全国重点实验室(东北林业大学)。组培苗接种于WPM固体培养基(含有2.5%蔗糖和0.5%琼脂,pH=5.8),在25℃、光照16 h/黑暗8 h的组培室中培养。待幼苗生根且生长健壮后,移栽至温室环境下生长,生长条件为25℃、光照16 h/黑暗8 h。

1.2 *PtrZAT11* 基因序列分析与克隆

根据前期转录组数据结果,从Phytozome 14网站(<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)下载*PtrZAT11*基因(Potri.010G209400)转录序列,以及与其同一性大于60%的基因氨基酸序列。基于毛果杨ZAT蛋白的全长氨基酸序列进行多序列比对(ClustalW),采用MEGA 12软件的最大似然法(ML)构建系统发育树,Bootstrap重复次数为1 000次。

以毛果杨野生型(WT)茎干组织为材料,提取总RNA,并反转录获得cDNA,以cDNA为模板,设计特异性引物(表1)扩增*PtrZAT11*的CDS序列,

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化,并连接至 pENTR/TOPO 载体中,利用热激法转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞,筛选阳性克隆后进行测序验证。

表 1 引物信息
Table 1 Primer sequences information

引物用途 Usage of primers	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')
<i>PtrZAT11</i> 基因克隆 Cloning of <i>PtrZAT11</i> gene	PtrZAT11-F	ATGAAGAGAGGTCTGCACGA
	PtrZAT11-R	CTAAAAGAAACAATTGACCATAG
<i>PtrZAT11</i> 基因表达模式检测 Detection of <i>PtrZAT11</i> gene expression patterns	RT-18S-F	CGAAGACGATCAGATACCGTCCTA
	RT-18S-R	TTTCTCATAAGGTGCTGGCGGAGT
	RT-PtrZAT11-F	GCAATAGGCAATCCCATCG
	RT-PtrZAT11-R	TCTTCACGACAGGAACTGCT
亚细胞定位载体构建 Construction of subcellular localization vector	pUC19-PtrZAT11-F	CTAGTCTAGAATGAAGAGAGGTCTGCACG
	pUC19-PtrZAT11-R	CTAGCTCGAGAAAGAAACAATTGACCATAGGA
双突变体载体构建 Construction of double mutant vector	gRNA-PtrZAT11-F	GATTGAGAGATTGATAGCATAACCA
	gRNA-PtrZAT11-R	AAACTGGTTATGCTATCAATCTCTC
转基因鉴定 Transgenic identification	M13-F	GTAAAACGACGGCCAG
基因编辑鉴定 Identification of gene editing	CRISPR-PtrZAT11-F	CGTATCCATCAAGTACAAGGG
	CRISPR-PtrZAT11-R	GGCTTTGCTGGCGATTGAGT
	CRISPR-PtrZAT11h-F	CCATCGAGTCAAGGGCACAA
	CRISPR-PtrZAT11h-R	AGCACTCGTGTGTTTTAGGC

1.3 *PtrZAT11* 基因表达特性分析

为分析 *PtrZAT11* 在毛果杨茎干发育过程中的表达特征,采集毛果杨 WT 第 1~8 茎节的木质部组织,提取总 RNA 并反转录为 cDNA,以毛果杨 18S 作为内参基因,每个样品设置 3 个生物学重复和 2 个技术重复,利用 RT-qPCR 对 *PtrZAT11* 的表达水平进行检测。

1.4 *PtrZAT11* 基因瞬时表达载体构建及亚细胞定位分析

将 *PtrZAT11* 的 CDS 序列构建至 pUC19-35S-GFP 载体,与融合 GFP 表达。利用氯化铯溴化乙锭超高速梯度密度离心法提取高纯度、高浓度的质粒。利用毛果杨木质部原生质体瞬时转化体系^[20],将 pUC19-35S-PtrZAT11-GFP 和 pUC19-35S-H2A-mCherry 共同转入杨树原生质体中进行瞬时表达。利用激光共聚焦显微镜观察 GFP 和 mCherry 荧光信号分布情况,以确定 PtrZAT11 蛋白的亚细胞定位特征。

1.5 双突变体制制

通过 CRISPR-P 2.0 网站(<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>)对 *PtrZAT11* 及其同源基因 *PtrZAT11h* 进行 gRNA 序列设计,选取的是 2 条基因靠近起始子一端相同的 20 bp 基因序列,即使用

的是 1 条 gRNA 靶向 2 条同源基因,构建 CRISPR-Cas9 载体(pEgP237)。利用毛果杨稳定遗传转化系统进行载体遗传转化,使用卡那霉素进行抗性筛选。利用基因组 PCR 进行抗性生根苗的转基因检测。分别在 *PtrZAT11* 和 *PtrZAT11h* 的 gRNA 区域前后各 200 bp 设计特异性引物,对转基因苗和 WT 基因组 DNA 进行 PCR 扩增,将 PCR 产物送测,测序结果使用 EditCo 网站(<https://ice.editco.bio/#/>)进行基因编辑分析。

1.6 双突变体表型分析

选取温室生长 90 d 和 120 d 的 WT 与 *ptrzat11 ptrzat11h* 双突变体植株进行拍照,并对其株高、茎节数量、茎节长度和不同茎节直径进行测量。选取温室生长 120 d 的 WT 和双突变体植株,分别对其第 2、4、6、8、10 和 12 茎节进行取材,每节茎段均切成 2 cm 厚度,使用预冷的 FAA 固定液固定样品,而后进行脱水和浸蜡,之后再进行包埋、切片,切片厚度为 16 μm,用番红固绿染料对切片进行染色处理,染色后的切片用中性树脂封片。使用 M8 数字扫描显微成像系统(Precipoint,德国)和 View Point 软件对石蜡切片进行扫描观察和统计分析。野生型和转基因株系分别选取 3 张第 12 茎节切片,每张切片统计木质部细胞的宽度和面积占比,

并在每张切片木质部内随机选取3个等面积视野,统计单位面积(mm^2)内导管细胞和纤维细胞的数量及单个导管细胞孔径面积(μm^2)。

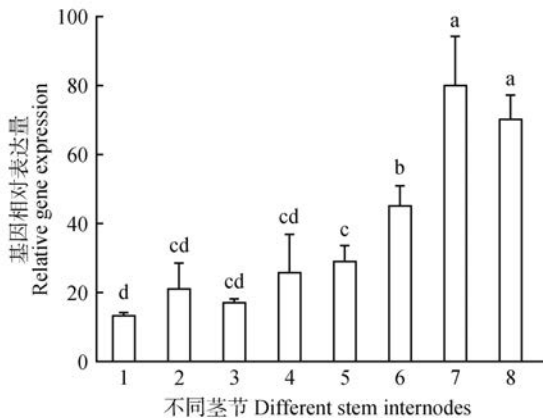
1.7 引物合成及数据处理

引物合成(表1)由黑龙江箭速基因科技有限公司完成,样品测序由吉林省库美生物科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 *PtrZAT11* 基因表达分析

为了挖掘参与毛果杨木材形成的关键调控因子,本研究前期通过对毛果杨野生型(WT)不同发育阶段茎干木质部的转录组测序进行基因筛选,获得了一个在次生生长阶段显著高表达的C2H2型锌指转录因子*PtrZAT11*。为了进一步确定该转录因子在毛果杨植株茎干发育不同阶段的表达特征,本研究收集了毛果杨WT植株第1~8茎节的木质部组织进行RT-qPCR检测。结果显示,*PtrZAT11*在第1~5茎节维持相对较低的表达量,从第6茎节开始,随着次生木质部的发育,其表达水平显著升高(图1)。以上结果表明,*PtrZAT11*在毛果杨次生木质部发育(木材形成)过程中发挥着潜在的重要作用。



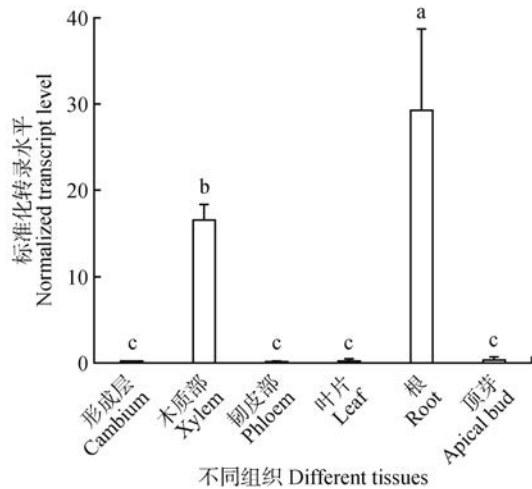
横坐标1~8表示毛果杨自上而下的第1至第8茎节。误差线为3个生物学重复的标准误;不同小写字母表示经单因素方差分析(ANOVA)及事后多重比较检验后,在 $P<0.05$ 水平差异显著。

The numbers 1 to 8 on the horizontal axis represented stem internodes 1 to 8 from the apex to the base of *P. trichocarpa*. Error bars indicated the standard error (SE) calculated from three biological replicates; different lowercase letters indicated significant differences ($P<0.05$) determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparison tests.

图1 *PtrZAT11* 在毛果杨不同茎节木质部表达特性分析

Fig.1 Expression pattern analysis of *PtrZAT11* in xylem of different stem internodes of *P. trichocarpa*

为了进一步验证*PtrZAT11*的功能相关性,结合本研究前期的毛果杨不同组织转录组数据^[21],对*PtrZAT11*基因的组织表达特征进行了分析。结果显示,*PtrZAT11*基因在木质部和根中的表达水平明显高于茎维管组织形成层、韧皮部、叶片和顶芽(图2)。综合其在木质部发育梯度中的差异表达特征及组织特异性表达模式,推测*PtrZAT11*转录因子可能在毛果杨木材形成过程中发挥一定的调控作用。



误差线为3个生物学重复计算的标准误;不同小写字母表示经单因素方差分析(ANOVA)及多重比较检验后差异显著($P<0.05$)。

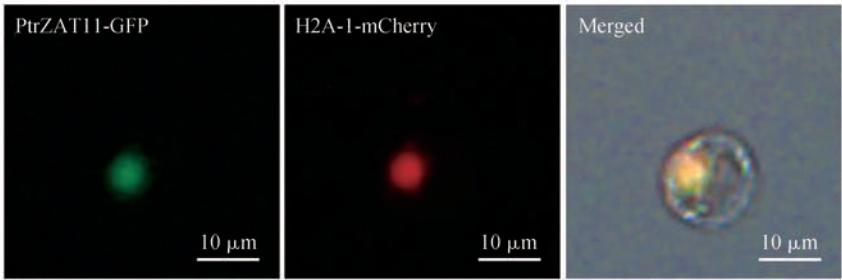
Error bars indicated the standard error (SE) calculated from three biological replicates; different lowercase letters indicated significant differences ($P<0.05$) determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by multiple comparison tests.

图2 *PtrZAT11* 在毛果杨各组织的表达模式分析

Fig.2 Expression pattern analysis of *PtrZAT11* in various tissues of *P. trichocarpa*

2.2 毛果杨*PtrZAT11*亚细胞定位

为了对*PtrZAT11*功能进一步分析,通过基因克隆和测序验证,获得了*PtrZAT11*基因540 bp的CDS序列。为了分析*PtrZAT11*蛋白的亚细胞定位特征,构建了35S启动子驱动*PtrZAT11*与绿色荧光蛋白基因(GFP)融合表达的瞬时表达载体pUC19-35S-*PtrZAT11*-GFP。利用PEG介导的毛果杨木质部原生质体瞬时转化系统结合激光共聚焦显微镜观察,得到的结果显示,*PtrZAT11*-GFP融合蛋白的绿色荧光信号主要分布于细胞核区域(图3)。以上结果表明,*PtrZAT11*蛋白定位于细胞核,其亚细胞定位特征符合转录因子的一般特性。



PtrZAT11-GFP 为 PtrZAT11 的定位(绿色);H2A-1-mCherry 为核心组蛋白变体 H2A.1 染色质标记(红色),为核定位对照;Merged 为合并图像,显示 PtrZAT11 与染色质的空间关系。

PtrZAT11-GFP showed the localization of PtrZAT11 (green); H2A-1-mCherry, a core histone variant H2A.1 chromatin marker(red), served as a nuclear localization control; Merged image showed the spatial relationship between PtrZAT11 and chromatin.

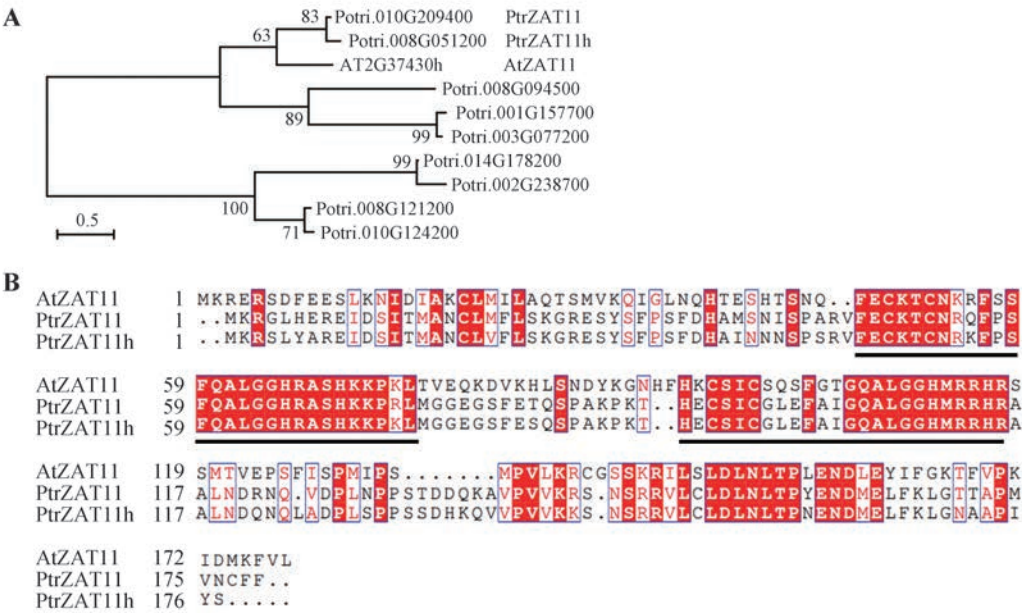
图3 PtrZAT11亚细胞定位分析

Fig.3 Subcellular localization analysis of PtrZAT11

2.3 毛果杨 *PtrZAT11* 及其同源基因突变体的获得

为了分析 *PtrZAT11* 在毛果杨次生长过程中的功能,本研究利用 CRISPR-Cas9 基因编辑系统对 *PtrZAT11* 进行毛果杨功能突变体的创制。利用 *PtrZAT11* 的氨基酸序列进行同源基因分析,查找到 8 个与之序列同一性大于 60.0% 的基因。将拟南芥的 *AtZAT11* 一同进行进化树分析,结果表明,

PtrZAT11 具有一个旁系同源基因(图 4A),序列同源分析进一步表明,*PtrZAT11* 与该基因的氨基酸序列相似度为 95.4%,二者均包含典型的锌指(zinc finger)结构域,将该旁系同源基因命名为 *PtrZAT11h*(图 4B)。为避免潜在的功能冗余引起单突变体表型不显著,本研究对 *PtrZAT11* 和 *PtrZAT11h* 进行了双突变体的创制。



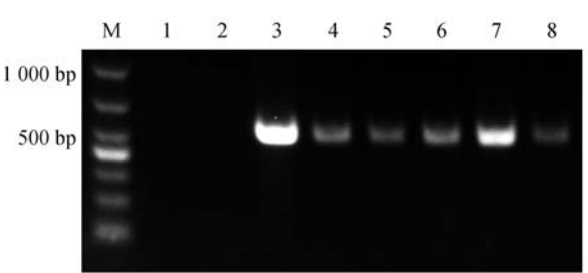
A.各分支节点标注为 Bootstrap 支持率(%),拟南芥 *AtZAT11* 作为参考序列纳入分析;B.红色底纹表示氨基酸序列完全一致,蓝色方框内的红色字母表示氨基酸具有相似的物理化学性质,序列下方黑色加粗实线表示锌指结构域。

A.Bootstrap support values(%) were indicated at each branch node, with *Arabidopsis thaliana* *AtZAT11* included as a reference sequence in the analysis; B. Red shading indicated completely identical amino acid residues; red letters within blue boxes indicated amino acids with similar physicochemical properties; the bold black line below the sequence indicated the zinc finger domain.

图4 PtrZAT11系统发育及序列分析

Fig.4 Phylogenetic and sequence analysis of PtrZAT11

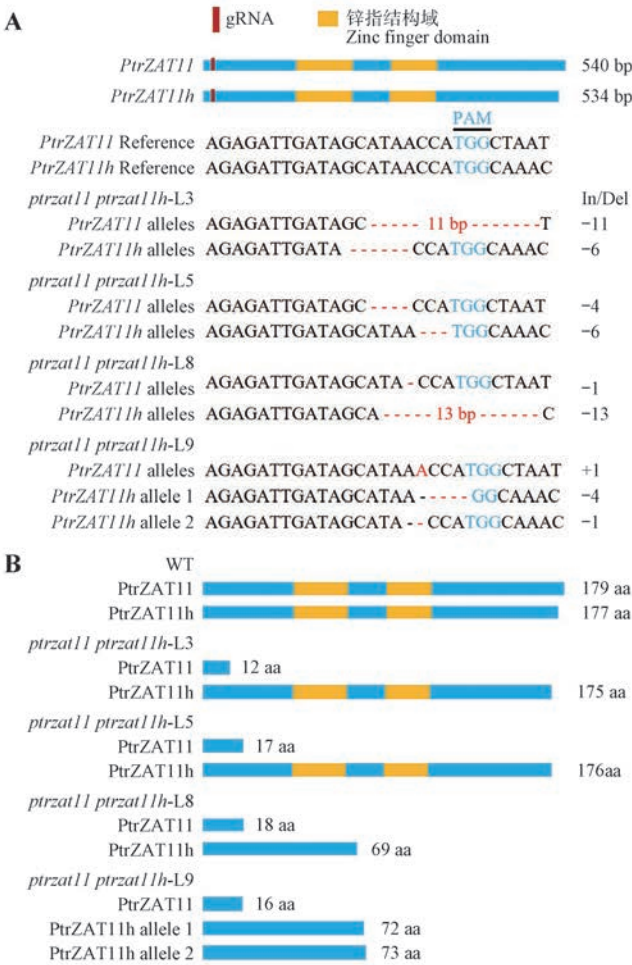
利用 CRISPR-Cas9 系统进行 *PtrZAT11* 和 *PtrZAT11h* 的双突变体创制,首先分别对 2 条基因进行 gRNA 设计,选取 2 条基因靠近起始子一端的相同的 20 bp 基因序列,构建 pEgP237 载体。其次利用毛果杨稳定遗传转化体系获得了抗性筛选植株,对其进行叶片基因组 DNA 的 PCR 鉴定,结果表明,成功获得 5 株转基因植株(图 5)。进一步的 *PtrZAT11* 及其同源基因 *PtrZAT11h* 靶位点的测序鉴定结果表明,共获得 4 株 *ptrzat11 ptrzat11h* 双突变体(图 6)。其中,4 个突变体靶点处均插入或缺失不同数量的碱基,导致 *ptrzat11 ptrzat11h*-L8 和 L9 株系在 *PtrZAT11* 和 *PtrZAT11h* 蛋白翻译中提前终止,理论上最终缺失了 C2H2 家族的典型锌指结构域;L3 和 L5 株系缺失了 *PtrZAT11* 的锌指结构域,但 *PtrZAT11h* 仍保留绝大部分正常序列,未造成移码突变。因此,本研究选取突变体中的 *ptrzat11 ptrzat11h*-L9 进行后续研究。



M. DNA 分子质量标准物 DL1000; 1. ddH₂O 为模板的阴性对照;2.野生型毛果杨叶片 DNA 为模板的阴性对照;3. pEgP237-PtrZAT11 转化质粒为模板的阳性对照;4~8. 抗性植株叶片 DNA 为模板的样品。
M. DNA marker DL1000; 1. Negative control using ddH₂O as template; 2. Negative control using genomic DNA from wild-type *P. trichocarpa* leaves as template; 3. Positive control using the pEgP237-PtrZAT11 plasmid as template; 4~8. Samples using genomic DNA from leaves of resistant plants as template.

图 5 转基因植株 PCR 鉴定

Fig.5 PCR identification of transgenic plants



A. *ptrzat11 ptrzat11h* 双突变体植株测序鉴定; B. 双突变体植株 *PtrZAT11* 和 *PtrZAT11h* 氨基酸序列示意图。
A. Sequencing identification of *ptrzat11 ptrzat11h* double mutant plants; B. Schematic diagram of the amino acid sequences of *PtrZAT11* and *PtrZAT11h* in the double mutant plants.

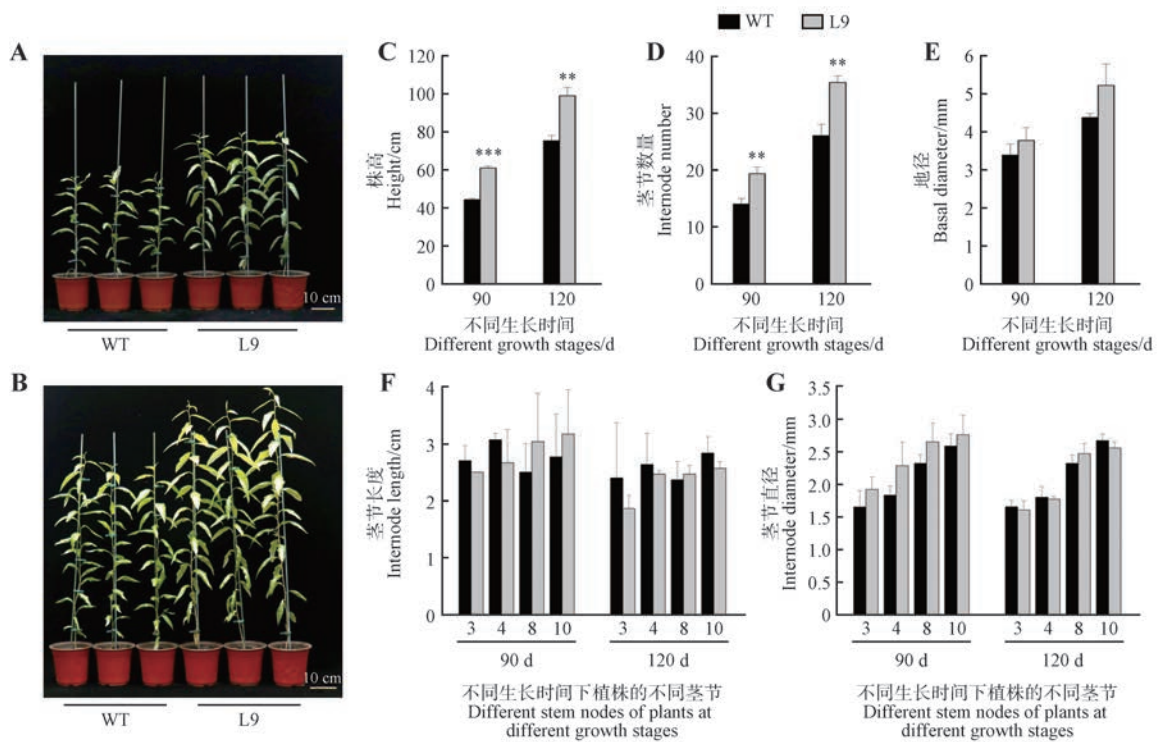
图 6 *PtrZAT11* 与同源基因双突变体植株的鉴定

Fig.6 Identification of double mutant plants of *PtrZAT11* and its homologous gene

2.4 *ptrzat11 ptrzat11h* 突变体植株生长表型观测及分析

为了评估 *PtrZAT11* 功能缺失对毛果杨的生长及木质部发育的影响,本研究对生长 60 d 和 120 d 的 WT 与 *ptrzat11 ptrzat11h*-L9 植株进行了生长指标检测和组织解剖分析。与 WT 相比, *ptrzat11 ptrzat11h* 突变体植株表现出显著的纵向生长优势(图 7A、7B),4 月龄时其株高平均增加约 31.5%

(图 7C),且总茎节数量显著多于 WT(图 7D)。突变体与 WT 的地径并无显著差异(图 7E)。对第 3、4、8、10 茎节的长度和直径进行测量,结果显示,突变体在特定节间位的长度及直径与 WT 无显著差异(图 7F、7G)。以上生长指标结果表明, *PtrZAT11* 与同源基因缺失引起的植株株高增加,源于茎节数量增多。



A. 3月龄毛果杨野生型植株(WT)与 *PtrZAT11* 双突变体植株(*ptrzat11 ptrzat11h*-L9)生长情况; B. 4月龄 WT 与 *ptrzat11 ptrzat11h*-L9 生长情况; C~G. 3月龄和4月龄 WT 与 *ptrzat11 ptrzat11h*-L9 的株高(C)、茎节数量(D)、地径(E)、茎节长度(F)和茎节直径(G)统计。误差线代表由3个生物学重复计算的标准误;星号代表 *t* 检验结果; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

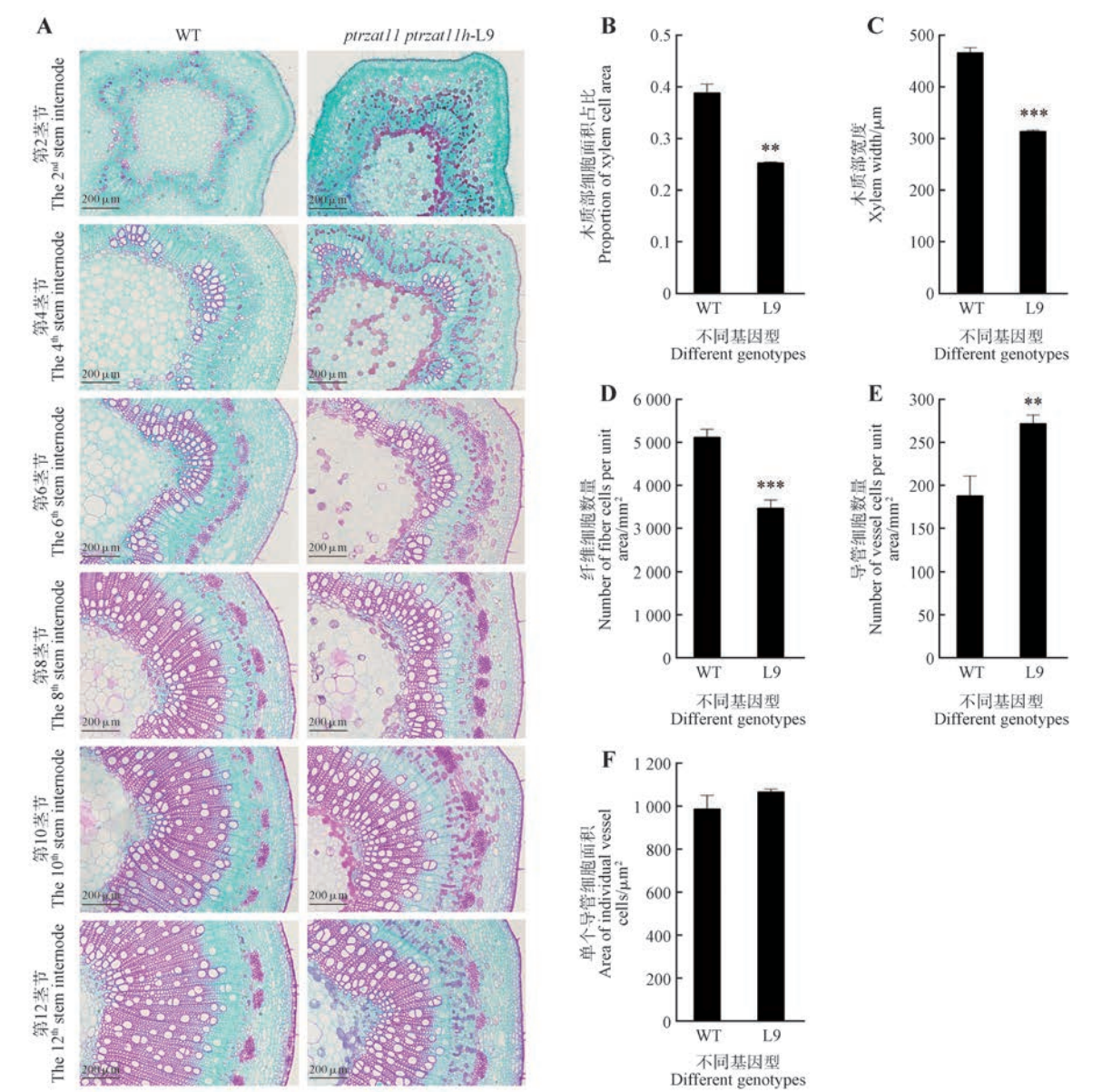
A. Growth phenotype of three-month-old wild-type (WT) *P. trichocarpa* and *PtrZAT11* double mutant plants (*ptrzat11 ptrzat11h*-L9); B. Growth phenotype of four-month-old WT and *ptrzat11 ptrzat11h*-L9 plants; C~G. Statistical analysis of plant height (C), number of stem nodes (D), ground diameter (E), internode length (F), and internode diameter (G) in WT and *ptrzat11 ptrzat11h*-L9 plants at three and four months of age. Error bars represented the standard error calculated from three biological replicates; asterisks indicated the results of Student's *t*-test; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图7 *PtrZAT11* 与同源基因双突变体植株生长表型观察与分析

Fig.7 Observation and analysis of growth phenotypes in double mutant plants of *PtrZAT11* and its homologous gene

采用石蜡切片技术对突变体和 WT 的第 2、4、6、8、10 和 12 茎节进行横切面观察。结果显示,随着茎节的发育,突变体的木质部发育逐渐迟缓(图 8A)。对第 12 茎节的木质部环带宽度和木质部细胞面积占茎干横截面的比例进行统计,发现二者均显著低于 WT(图 8B、8C)。与此同时,对木质部中的纤维细胞和导管细胞进行统计分析,与

WT 相比,突变体木质部中单位面积的纤维细胞数量显著减少(图 8D),单位面积的导管细胞数量显著增多(图 8E)。导管细胞形态特征表明,单个导管细胞的平均横截面积与 WT 相比无显著差异(图 8F)。以上结果说明, *PtrZAT11* 及同源基因的缺失显著改变了次生木质部的组织结构。



A. 4月龄毛果杨野生型植株(WT)与*PtrZAT11*双突变体植株(*ptrzat11 ptrzat11h-L9*)不同茎节的石蜡切片;B~F. WT与*ptrzat11 ptrzat11h-L9*第12茎节细胞面积占茎干横截面的比例(B)、木质部宽度(C)、单位面积的纤维细胞数量(D)、单位面积的导管细胞数量(E)和单个导管细胞面积(F)的统计分析。误差线代表由3个生物学重复计算的标准误差;星号代表*t*检验结果;** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

A. Paraffin sections of different stem internodes from four-month-old wild-type(WT) *P. trichocarpa* and *PtrZAT11* double mutant plants(*ptrzat11 ptrzat11h-L9*);B~F. Statistical analysis of the proportion of cell area to stem cross-sectional area in the 12th stem node (B), xylem width in the 12th internode(C), the number of fiber cells per unit area (D), the number of vessel cells per unit area (E), and the average area of individual vessel cells(F) in WT and *ptrzat11 ptrzat11h-L9* plants. Error bars represented the standard error calculated from three biological replicates; asterisks indicated the results of Student's *t*-test; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图8 *PtrZAT11*与同源基因双突变体植株茎干表型观察与分析

Fig.8 Observation and analysis of stem phenotypes in double mutant plants of *PtrZAT11* and its homologous gene

3 讨论

本研究利用杨树不同茎节的木质部组织转录组测序数据,筛选得到一个在初生生长阶段表达较低、次生生长阶段表达显著提高的转录因子*PtrZAT11*,通过RT-qPCR验证发现,*PtrZAT11*在毛

果杨不同茎节中的表达呈现明显的动态变化特征,即在第1~5茎节表达量相对较低,从第6茎节开始表达量显著升高。基部茎节通常具有更发达的次生木质部,而顶端茎节则以初生生长为主^[22]。*PtrZAT11*的这种表达模式与次生木质部的发育进

程高度一致,提示其可能在次生木质部发育的特定阶段发挥关键调控作用。调控木材形成过程的一些典型的转录因子同样具有类似的表达模式,例如在杨树的木材形成研究中,*PtrWND1*在基部茎节中的表达量显著高于顶端茎节^[23],*PtrMYB3*和*PtrMYB20*在次生生长旺盛的茎段中表达量最高^[24],84K 杨(*P. alba*×*P. glandulosa*)的第2~7茎节的转录组分析发现次生细胞壁形成相关基因在第7茎节被完全激活,且在次生生长阶段存在大量的差异表达基因^[25],杉木(*Cunninghamia lanceolata*)的*CINAC40*在茎中的表达随木质化程度升高呈现递增趋势^[26]。这些转录因子在树木的不同发育阶段,可能共同构成了木材形成的时空调控网络。

植物生长发育需在初生生长与次生生长之间进行资源的最优分配。初生生长主要由顶端分生组织驱动,表现为茎节的持续产生和株高的增加;次生生长则依赖于维管形成层的活动,通过木质部的不断积累实现茎干的增粗和木材的形成。茎节是初生生长的直接产物,其数量的增多表明顶端分生组织活性的增强,*PtrZAT11*及同源基因的功能缺失导致突变体茎节数量大幅增多,但植株不同茎节的长度与野生型相比没有明显差异。因此,突变体株高的增加可能是由于顶端分生组织产生茎节的频率加快所致。与此同时,突变体的木质部发育迟缓且纤维细胞和导管细胞的组成发生了显著改变。木质部是次生生长的核心产物,其发育迟缓和细胞组成的改变直接反映了次生生长的调控异常。*PtrZAT11*及同源基因的功能缺失所导致的突变体表现出纵向生长加速、径向生长改变的表型特征,表明在野生型毛果杨中,*PtrZAT11*可能通过抑制顶端分生组织的过度活跃来控制初生生长的节奏,同时促进木质部纤维细胞的正常分化以确保次生生长的质量。

已有研究表明,拟南芥 ZAT 转录因子成员 ZAT18 可调控激素信号,该基因的功能丧失可激活生长素和细胞分裂素通路^[27],ZAT6 可直接负调控生长素合成与信号转导^[28]。因此,*PtrZAT11*及同源基因的功能缺失突变体的高生长加速可能与该转录因子调节激素信号的功能相关,这需进一步试验验证。突变体中导管细胞数量增多而纤维细胞数量减少,提示 *PtrZAT11* 可能参与调控木质部细胞的命运分化。木质部由导管细胞、纤维细胞和薄壁细胞等多种细胞类型组成,这些细胞的

分化和比例决定了木材的物理性质和功能特性^[29]。导管细胞主要负责水分运输,纤维细胞提供机械支撑,不同类型细胞的分化受到严格的遗传调控,多个转录因子家族参与这一过程。*PtrZAT11*可能通过直接调控木质部细胞分化相关基因的表达来影响细胞命运决定。虽然突变体中导管细胞数量增加,但单个导管的横截面积并无显著变化,表明 *PtrZAT11* 主要影响细胞分化的数量而非细胞扩张过程,这与已知的木材形成调控机制相符,表明细胞分化数量和细胞扩张是2个相对独立的调控过程^[30]。

植物在生长过程中,通常需要在不同器官和功能之间进行资源分配权衡^[31],如光合产物分配、根系发育、茎干生长和繁殖投入等,这一生长模式的调节涉及转录因子调控、激素信号传导及碳水化合物分配。*PtrZAT11*及同源基因突变导致的植株在初生生长和次生生长过程中的模式改变,反映了 *PtrZAT11* 可能在协调植物资源分配中发挥重要作用。*PtrZAT11*与 *PtrZAT11h*可能是权衡初生和次生生长过程的关键调控因子,二者是否参与激素如赤霉素、生长素和细胞分裂素等通路,尚需后续研究。

杨树不同组织的转录组数据表明,*PtrZAT11*在木质部和根中均呈现高表达特征。根和茎木质部均为植物的输导组织,在结构和功能上具有相似性,都承担着水分和养分运输的重要功能^[32]。木质部与根在发育上存在密切的关联性,根系发育直接影响矿质营养吸收和对地上部分的水分供应,进而影响木质部的形成和功能^[33]。本研究解析了突变体地上部的表型及功能,而植株地下部分是否发生了表型的变化,以及 *PtrZAT11* 在根中的调控作用有待进一步研究。

4 结论

本研究通过对毛果杨 *PtrZAT11* 转录因子在植株发育过程中的表达模式分析、功能缺失突变体的创制及其生长表型和茎组织切片分析,探究了其在木材形成过程中的调控功能。*PtrZAT11*在毛果杨茎干发育过程中呈现从第6茎节开始显著上调的变化趋势,提示其参与木材形成调控过程。利用 CRISPR-Cas9 技术创制的 *ptrzat11 ptrzat11h* 双突变体植株表现出显著的纵向生长加速、径向生长改变的表型,同时植株茎中单位面积内纤维细

胞数量减少、导管细胞数量增多,表明PtrZAT11主要影响木质部细胞分化的数量,可能对木质部细胞的命运分化发挥一定调控作用。综上所述,PtrZAT11作为C2H2型锌指转录因子,通过改变木质部细胞的组织结构来参与杨树木材的形成过程,且可能参与协调杨树初生长与次生长之间的平衡。

参 考 文 献

- [1] Plomion C, Leprovost G, Stokes A. Wood formation in trees[J]. Plant Physiology, 2001, 127(4): 1513-1523.
- [2] Groover A T. What genes make a tree a tree?[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(5): 210-214.
- [3] Ye Z H, Zhong R Q. Molecular control of wood formation in trees[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(14): 4119-4131.
- [4] Demura T, Fukuda H. Transcriptional regulation in wood formation [J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(2): 64-70.
- [5] Zhong R Q, Ye Z H. Transcriptional regulation of lignin biosynthesis[J]. Plant Signaling & Behavior, 2009, 4(11): 1028-1034.
- [6] Yamaguchi M, Mitsuda N, Ohtani M, et al. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN 7 directly regulates the expression of a broad range of genes for xylem vessel formation[J]. The Plant Journal, 2011, 66(4): 579-590.
- [7] Chen H, Wang J P, Liu H Z, et al. Hierarchical transcription factor and chromatin binding network for wood formation in black cottonwood (*Populus trichocarpa*) [J]. The Plant Cell, 2019, 31(3): 602-626.
- [8] Wang Z F, Mao Y L, Guo Y J, et al. MYB transcription factor161 mediates feedback regulation of *secondary wall-associated NAC-Domain1* family genes for wood formation[J]. Plant Physiology, 2020, 184(3): 1389-1406.
- [9] 郭依萍, 刘佳欣, 于颖, 等. 白桦 *BpNAC012* 基因调控白桦木质部发育表达谱分析[J]. 植物研究, 2021, 41(2): 251-261.
Guo Yiping, Liu Jiaxin, Yu Ying, et al. Expression profile analysis of xylem development regulated by *BpNAC012* gene from *Betula platyphylla*[J]. Bulletin of Botanical Research, 2021, 41(2): 251-261.
- [10] Liu H Z, Gao J H, Sun J T, et al. Dimerization of PtrMYB074 and PtrWRKY19 mediates transcriptional activation of *PtrbHLH186* for secondary xylem development in *Populus trichocarpa*[J]. New Phytologist, 2022, 234(3): 918-933.
- [11] Pang H Y, Dai X R, Yan X J, et al. C2H2 zinc finger protein PagIDD15A regulates secondary wall thickening and lignin biosynthesis in poplar [J]. Plant Science, 2024, 346: 112159.
- [12] Zhao Z, Wang X X, Han R, et al. *Camellia sinensis* WIP domain protein 3 (CsWIP3), a C2H2 zinc finger protein, mediates lignin content and regulates plant growth in tea plants[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 307: 142078.
- [13] Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. The zinc finger network of plants [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(7): 1150-1160.
- [14] Englbrecht C C, Schoof H, Böhm S. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome [J]. BMC Genomics, 2004, 5(1): 39.
- [15] Liu X M, An J, Han H J, et al. ZAT11, a zinc finger transcription factor, is a negative regulator of nickel ion tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(12): 2015-2021.
- [16] Qureshi M K, Sujeeth N, Gechev T S, et al. The zinc finger protein ZAT11 modulates paraquat-induced programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2013, 35(6): 1863-1871.
- [17] Devaiah B N, Nagarajan V K, Raghothama K G. Phosphate homeostasis and root development in *Arabidopsis* are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6[J]. Plant Physiology, 2007, 145(1): 147-159.
- [18] Mittler R, Kim Y, Song L H, et al. Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress [J]. FEBS Letters, 2006, 580(28/29): 6537-6542.
- [19] Feng M, Nanda A K, Augstein F, et al. The ZAT14 family promotes cell death and regulates expansins to affect xylem formation and salt tolerance in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2025, 37(12): koaf271.
- [20] Lin Y C, Li W, Chen H, et al. A simple improved-throughput xylem protoplast system for studying wood formation[J]. Nature Protocols, 2014, 9(9): 2194-2205.
- [21] Dai X F, Zhai R, Lin J J, et al. Cell-type-specific PtrWOX4a and PtrVCS2 form a regulatory nexus with a histone modification system for stem cambium development in *Populus trichocarpa*[J]. Nature Plants, 2023, 9(1): 96-111.
- [22] Bhalarao R P, Fischer U. Environmental and hormonal control of cambial stem cell dynamics[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(1): 79-87.
- [23] Zhong R Q, Lee C, Ye Z H. Functional characterization of poplar wood-associated NAC domain transcription fac-

- tors[J]. *Plant Physiology*, 2010, 152(2): 1044-1055.
- [24] McCarthy R L, Zhong R Q, Fowler S, *et al.* The poplar MYB transcription factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the regulation of secondary wall biosynthesis[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(6): 1084-1090.
- [25] Zhang Y H, Chen S, Chen S, *et al.* Transcriptome analysis reveals the developmental dynamic of stem in poplar[J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 222: 119317.
- [26] 刘明彤, 庄和必, 王紫彤, 等. 杉木次生壁发育调控转录因子基因 *CINAC40* 的生物学功能[J]. *林业科学*, 2025, 61(2): 131-141.
- Liu Mingtong, Zhuang Hebi, Wang Zitong, *et al.* Biological functional analysis of transcription factor gene *CINAC40* regulating secondary cell wall development in *Cunninghamia lanceolata* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2025, 61(2): 131-141.
- [27] Li W W, Zhang M, Zhang T Y, *et al.* *Arabidopsis* Cys2/His2 zinc finger transcription factor ZAT18 modulates the plant growth-defense tradeoff[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23): 15436.
- [28] Shi H T, Zhang S M, Lin D Z, *et al.* Zinc finger of *Arabidopsis thaliana* 6 is involved in melatonin-mediated auxin signaling through interacting INDETERMINATE DOMAIN15 and INDOLE-3-ACETIC ACID 17[J]. *Journal of Pineal Research*, 2018, 65(2): e12494.
- [29] Pratt R B, Jacobsen A L. Conflicting demands on angiosperm xylem: tradeoffs among storage, transport and biomechanics[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2017, 40(6): 897-913.
- [30] Bar-On Y M, Phillips R, Milo R. The biomass distribution on earth[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(25): 6506-6511.
- [31] Poorter H, Niklas K J, Reich P B, *et al.* Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control[J]. *New Phytologist*, 2012, 193(1): 30-50.
- [32] Lucas W J, Groover A, Lichtenberger R, *et al.* The plant vascular system: evolution, development and functions[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2013, 55(4): 294-388.
- [33] De Smet I, White P J, Bengough A G, *et al.* Analyzing lateral root development: how to move forward [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(1): 15-20.