

RNA m⁶A 去甲基化酶 ALKBH9B 在杨树木材发育中的功能研究

姚凤鸽, 卢孟柱, 张进*

省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江农林大学, 浙江杭州, 311300

摘要:【目的】m⁶A (N⁶-adenosine methylation) 修饰是广泛存在于 mRNA 上的甲基化修饰, 其由甲基转移酶 (Writers)、去甲基化酶 (Erasers) 和 m⁶A 识别蛋白 (Readers) 三部分组成, 有研究报道在木材发育过程中, 发现与木材形成相关的基因中有很多基因的转录本中含有 m⁶A 修饰, 这表明 m⁶A 修饰在该过程中起着重要作用。但是, *ALKBH9B* 作为 m⁶A 修饰去甲基化过程中的关键基因在杨树木材发育过程中的功能仍有待探索。【方法】本研究以 84K 杨 (*Populus alba* × *P. glandulosa*, ‘84K’) 为材料, 通过对杨树不同组织部位提取 RNA 进行荧光定量 PCR 和构建 *P_{PagALKBH9B}::GUS* 载体进行基因表达模式分析; 构建 *35S::PagALKBH9B-GFP* 融合表达蛋白载体, 通过农杆菌介导的瞬时转化烟草观察该基因编码蛋白的亚细胞定位情况; 构建 *35S::PagALKBH9B* 和 *Crispr/Cas9* 的 *PagALKBH9B* 基因编辑载体, 通过叶盘法转化杨树获得稳定遗传的过表达和基因编辑株系; 通过酵母双杂交、双分子荧光互补和双荧光素酶互补实验寻找 *PagALKBH9B* 的互作蛋白, 解释该基因的功能; 通过 m⁶A-seq 寻找该基因对木材发育相关过程中的哪些基因进行去甲基化修饰, 从而分析影响其木材发育的作用机制。【结果】通过荧光定量 PCR 发现 *PagALKBH9B* 在杨树的形成层及靠近韧皮部的区域表达较高, 并且通过对 *P_{PagALKBH9B}::GUS* 转基因杨树进行 GUS 染色对其切片观察后得到了验证, 而且通过瞬时表达烟草观察发现该基因编码蛋白的亚细胞定位于细胞质; 通过前期酵母双杂交筛选库实验初步得到了可能互作的蛋白 (HsfB3a、HsfB3b 和 MYB3), 为进一步探究 *PagALKBH9B* 的作用机制提供了思路; 在对得到的 *Pagalkbh9b-KO* 和 *PagALKBH9B-OE* 株系在温室培养七周后观察, *Pagalkbh9b-KO* 株系相比野生型株高较高, 而过表达株系与之相反; 对这些株系的第 15 节间切片观察后发现 *KO* 株系与野生型相比木质部占比减小, 导管个数变少, 而单个导管面积增大, 而 *OE* 株系与野生型相比木质部占比无显著变化, 但导管个数增多, 而单个导管面积减少。此外, 前期研究发现 *PagALKBH9B* 可能参与叶片愈伤不定芽诱导过程, 且可能受 *WOX11/12a* 调控, 所以也对转基因株系的叶片进行愈伤诱导, 在培养 4 天和 8 天后发现 *Pagalkbh9b-KO* 株系相比野生型诱导愈伤的能力更快, 而 *PagALKBH9B-OE* 株系相比野生型无显著变化。【结论】*PagALKBH9B* 在叶片诱导成为愈伤的过程中起到抑制作用, 可能是由于 *PagALKBH9B* 对形成愈伤相关的某些基因去除甲基化修饰而导致这些基因失去功能, 该基因缺失后, 相关基因恢复甲基化修饰, 使愈伤组织更早向初生生长状态转换, 缩短了无性繁殖育种进程。

关键词: 银腺杨 84K; m⁶A 修饰; *PagALKBH9B*; 木材发育