

纤维素酶 CEL 调控香榧幼果落果的分子机理解析

金曹亮¹, 谢凌浩¹, 索金伟¹, 颜景畏¹, 吴家胜¹, 胡渊渊^{1*}

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

摘要:【目的】香榧在每年4月底至5月中旬常常出现严重的幼果脱落现象,脱落率高达80-90%,对经济造成极大的损失,限制了香榧产业的发展。纤维素酶在植物器官脱落中起重要作用,然而,有关香榧纤维素酶在落果中功能还知之甚少。【方法】本研究基于香榧落果关键期落果与正常果离区的转录组分析,通过系统进化关系分析克隆并鉴定了与香榧落果相关的 *TgCEL* 基因,利用实时荧光定量 PCR 技术,分析该基因在不同源库处理中离区中的表达,运用转基因拟南芥体系、本体瞬时过表达等技术分析其生物学功能;并采用 WGCNA 分析筛选出可能调控 *TgCEL* 的关键候选转录因子,并利用双荧光素酶试验、酵母单杂交、瞬时过表达与抑制及蛋白互作试验、酵母双杂、等试验分析不同转录因子对关键基因的作用效应与调控机制。【结果】1)通过对不同源库处理的落果率及 *TgCEL* 的表达量分析,发现环剥剪叶和乙烯利浸泡处理下香榧落果率显著升高,且其离区的 *TgCEL* 基因均显著上调;进化树分析表明 *TgCEL* 与日本柳杉的纤维素酶聚在一起,亚细胞定位分析表明 *TgCEL* 定位于细胞膜;对香榧种实分别进行瞬时过表达 *TgCEL* 基因和瞬时抑制 *TgCEL* 基因,其落果率也呈显著增加和降低趋势,同时 *TgCEL* 转基因拟南芥,发现其花器官较野生型明显提早脱落。2)利用 WGCNA 筛选出与 *TgCEL* 协同表达的 30 个转录因子,双荧光素酶试验和烟草活体成像表明 *TgERF114.5*、*TgNAC25*、*TgNAMB2*、*TgWRKY11*、*TgWRKY62*、*TgNAC56.1*、*TgMYB44* 对 *TgCEL* 启动子均有激活效应,酵母单杂交试验表明 *TgWRKY11* 和 *TgNAC56.1* 直接结合 *TgCEL* 启动子;且在香榧种实中分别瞬时过表达和瞬时抑制这瞬时抑制 *TgWRKY62*,其 *TgCEL* 的表达量显著上调和下调,落果率也呈相同的变化趋势。3)酵母单杂交试验分析表明 *TgERF114.5* 不直接结合 *TgCEL* 的启动子,*TgWRKY62* 直接结合 *TgGPPS* 的启动子;烟草双荧光素酶混合调控效应分析表明 *TgWRKY62* 和 *TgERF114.5* 可协同激活 *TgCEL* 的启动子活性;蛋白互作试验 LCI 和酵母双杂表明, *TgWRKY62* 与 *TgERF114.5* 存在蛋白间互作作用。【结论】明确了 *TgCEL* 在香榧落果中发挥的关键作用,解析了 *TgWRKY62* 与 *TgERF114.5* 协同激活 *TgCEL* 的转录调控机制。研究结果可为探寻减轻香榧落果、提高产量的调控措施,为促进香榧的高产稳产、可持续发展提供理论依据。