

周琴, 史杰玮, 包满珠, 等. 矮牵牛 *PhSPL9b* 基因的克隆及功能分析[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(3): 240-248.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.03.025

矮牵牛 *PhSPL9b* 基因的克隆及功能分析

周琴^{1,2}, 史杰玮², 包满珠², 刘国锋³

1. 湖北生态工程职业技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070;
3. 广州市林业和园林科学研究院, 广州 510405

摘要 为研究 SPL (SQUAMOSA-promoter binding protein-like) 转录因子在矮牵牛成花转换中的作用, 克隆矮牵牛 *PhSPL9b* 基因, 并将该基因对应的 miR156/157 靶位点进行点突变获得 *rPhSPL9b*, 将 *PhSPL9b* 和 *rPhSPL9b* 分别构建超量表达载体, 转化矮牵牛和拟南芥, 最终获得拟南芥 35S::*PhSPL9b* 与 35S::*rPhSPL9b* 转基因植株以及矮牵牛 35S::*PhSPL9b* 转基因植株。研究结果显示, 过表达 *PhSPL9b* 和 *rPhSPL9b* 导致拟南芥莲座叶显著减少, 花期明显提前, 其中 35S::*rPhSPL9b* 转基因表型更为明显; 过表达 *PhSPL9b* 促进矮牵牛提前开花。RT-PCR 和 qRT-PCR 分析结果显示, 表型明显的转基因株系中, *PhSPL9b* 基因表达量均显著高于对照。转录激活实验结果表明, *PhSPL9b* 是一个具有转录激活活性的转录因子。以上结果表明, 矮牵牛 *PhSPL9b* 基因对开花时间具有重要调控作用, 其功能具有保守性, 同时, 它可能是通过转录激活下游基因的表达而影响植物开花。

关键词 矮牵牛; *PhSPL9b*; 超量表达; 开花; 转录激活特性

中图分类号 S681.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)03-0240-09

开花是高等植物从营养生长到生殖生长状态的转变, 这一过程决定植物能否成功繁殖子代^[1-2]。植物的开花受多种外界因素和内部因素的综合调控, 这些调控途径既可以单独发挥作用, 也存在大量的交叉整合, 通过基因之间的相互促进和抑制, 形成自我调控、正向反馈调控、负向反馈调控等不同的调控模式, 最终绘制出一个复杂而严谨的基因调控网络。近年来, 研究人员已经在许多植物中开展开花相关基因的研究, 如改变园艺植物的开花时间或延长整个花期, 解决杂交育种过程中花期不遇等问题^[2]。此外, 开花基因会影响植物的花序结构, 而花序结构对粮食、经济作物的产量具有重要的调控作用^[3]。因此, 研究开花基因在植物中的作用, 对园艺作物与经济作物的产量提高及观赏植物的花期调控都具有重要的指导意义。

SPL (SQUAMOSA-promoter binding protein-like) 是植物中特异的一类转录因子, 在植物营养生长和生殖生长过程中发挥着重要作用^[4-7]。近年来, *SPL* 家族基因的功能在许多植物中被广泛报道, 其

中 *SPL9* 亚家族成员的功能研究较多且深入。如在拟南芥中, 过表达 *AtSPL9* 和 *AtSPL15*, 影响花芽发育和开花^[6], 此外, *SPL9* 响应生长素信号并抑制拟南芥侧根的发育^[4]。Xie 等^[8]发现 *AtSPL9* 和 *AtSPL15* 与光信号转导所必需的转录因子 FHY3 (FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL 3) 和 FAR1 (FAR-RED-IMPAIRED RESPONSE 1), 以及独脚金内酯信号通路关键抑制因子 SMXL6/SMXL7/SMXL8 (SUPPRESSOR OF MORE AXILLARY GROWTH2-LIKE) 相互作用, 并利于 BRC1 (BRANCHED 1) 的转录激活, 最终促进拟南芥分枝。Yu 等^[9]发现 *SPL9* 可直接靶向 TCL1 (TRI-CHOMELESS 1) 和 TRY (TRIPTYCHON) 调控拟南芥表皮毛的发育。Cui 等^[10]研究表明 miR156/157 可直接调控 *SPL9*, 进而负调节花青素的积累。此外, *SPL9* 可直接调控 CBF2 (C-REPEAT BINDING FACTOR 2) 提高植物的抗寒性^[11]。在水稻中, IPA1 (ideal plant architecture 1) 数量性状位点关联的 OsSPL14 (*AtSPL9/15* 的同源蛋白) 通过改变水稻株

收稿日期: 2024-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31772345); 广东省自然科学基金项目 (2019A1515011840)

周琴, E-mail: 1648516802@qq.com

通信作者: 刘国锋, E-mail: gzifla_lgf@gz.gov.cn

型最终影响水稻的产量^[12];在大豆中,GmSPL9d (AtSPL9/15的同源蛋白)与WUS(WUSCHEL)互作协调调控大豆的分枝结构,最终影响大豆的产量^[13]。

矮牵牛(*Petunia hybrida*)为茄科碧冬茄属的一、二年生草本花卉,花色绚丽、株型丰富、花期长,被誉为“花坛之王”。目前对矮牵牛的研究主要集中在花器官发育方面^[14-16],而对开花分子机理的研究极为有限。Morel等^[17]发现矮牵牛AP1/SQUA亚家族的4个成员PFG、FBP26、FBP29和euAP1都能调控开花,但作用程度存在差异;Preston等^[18]研究发现*PhSBP1*(*PhSPL3*)和*PhSBP2*(*PhSPL4c*)不同程度地促进矮牵牛成花转换,且*PhSBP1*加速叶片的萌发。课题组前期研究发现miR156/157靶向部分*PhSPLs*基因调控矮牵牛和拟南芥开花^[19-20],但具体是通过靶向哪个或者哪些*PhSPLs*基因调控开花尚不明确。因此,为了深入研究*PhSPL9b*转录因子在矮牵牛成花转换中的作用,本研究克隆了*PhSPL9b*基因,对其基因结构和转录激活特性进行分析,构建相关载体分别转化矮牵牛和拟南芥,以期揭示*PhSPL9b*在矮牵牛成花转换中的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以矮牵牛W115株系(*Petunia hybrida* var. Mitchel diploid)和野生型(Col-0生态型)拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为试验材料。矮牵牛种植于华中农业大学花卉基地温室,常规管理。拟南芥种植于光照培养箱(光照强度2 000 lx、16 h光照/8 h黑暗,温度21~22℃,湿度75%)。

1.2 *PhSPL9b*相关表达载体的构建

根据矮牵牛基因组和转录组数据鉴定的*PhSPLs*基因^[19],设计并合成特异引物,以矮牵牛不同组织部位的混样cDNA为模板,用高保真酶扩增并克隆*PhSPL9b*基因。PCR反应条件为98℃ 2 min; 32~35循环:98℃ 10 s, 55~60℃ 15 s, 72℃ 1 min; 总延伸72℃ 10 min, 保温4℃ 10 min。测序无误后,使用*Sal* I和*Bam* H I分别双酶切含有*PhSPL9b*的pMD18-T和植物表达载体pCambia2300,用T4 DNA连接酶将目的基因连接到植物表达载体,构建35S:: *PhSPL9b*表达载体。同时,利用重叠延伸PCR法将*PhSPL9b*的miR156/157靶位点进行点突变,由GGTGCTCTCTCTCTTCTGTCA突变成

GGAGCGCTATCACTGCTTTCC,构建35S:: *rPhSPL9b*表达载体,具体操作和PCR反应条件同上。

以35S:: *PhSPL9b*质粒为模板,设计并合成含*Eco*R I和*Bam* H I酶切位点的特异引物克隆*PhSPL9b*基因。测序无误后,使用*Eco*R I和*Bam* H I分别双酶切含有*PhSPL9b*的pMD18-T与酵母表达载体pGADT7和pGBKT7,用T4 DNA连接酶将双酶切后的表达载体与目的基因连接,构建pGADT7-*PhSPL9b*和pGBKT7-*PhSPL9b*表达载体。

所有构建的质粒都通过PCR检测筛选及双酶切进行验证。所用引物见表1。

1.3 遗传转化及转基因植株的鉴定

将*PhSPL9b*和*rPhSPL9b*基因表达载体质粒分别电转化至GV3101和AGL0农杆菌,通过花序侵染法和叶盘转化法分别转化拟南芥和矮牵牛,最终获得转基因植株,具体操作方法参照Zhou等^[19-20]。获得转化株系后,利用2×CTAB法提取转化植株叶片DNA,用特异引物35S-F和*PhSPL9b*-R(short)进行PCR检测,筛选转基因阳性株系。

1.4 转基因植株表型鉴定

在拟南芥转基因株系中,根据转基因植株的表型,每个载体各选择3个符合3:1分离比的T₂代转基因株系,将其后代在长日照植物光照培养箱中培养。当植株抽薹1 cm高时,统计分析每个株系35株转基因植株(T₃代)的表型,如开花时间、莲座叶数目和茎生叶数目。

在矮牵牛转基因株系中,每个载体各选择3株表达量不同的T₀代转基因植株,将其后代在长日照条件下种植。经PCR鉴定后,每个转基因株系各统计25株转基因植株(T₁代)的表型,如开花时间、植株高度、叶片长宽比、叶片节间距、花朵直径和分枝数。

1.5 转基因植株*PhSPL9b*基因表达量分析

在拟南芥中,选取同一时期CK(空载pCAMBIA2300转化Col-0)未开花时的幼苗和T₃代35S:: *PhSPL9b*和35S:: *rPhSPL9b*抽薹的转基因植株;在矮牵牛中,选取同一时期CK未开花时的顶芽和T₂代35S:: *PhSPL9b*已分化出花序的顶芽,分别通过RT-PCR和qRT-PCR检测*PhSPL9b*在不同转基因株系中的表达情况。每个株系3个生物学重复。qRT-PCR的反应体系为10 μL:1 μL稀释10倍的反转录产物(cDNA),5.0 μL 2×SYBR Mixture,0.2 μL

表 1 试验所用引物
Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	用途 Usage
PhSPL9b-F	GTAATGAATAGGCACTTGACGTCAG	<i>PhSPL9b</i> 全长克隆
PhSPL9b-R	GGCCATTCGTCGATAGAGCC	Full-length clone of <i>PhSPL9b</i>
rPhSPL9b-F1	CAGAAATGGAACATAAGTTCAGTTTC	<i>rPhSPL9b</i> 第一段克隆
rPhSPL9b-R1	GGAAAGCAGTGATAGCGCTCCACTGGAGCCTGAGGCTCC	First segment clone of <i>rPhSPL9b</i>
rPhSPL9b-F2	GGAGCGCTATCACTGCTTTCCAATCGGTCCTGGGAAT-CAAG	<i>rPhSPL9b</i> 第二段克隆
rPhSPL9b-R2	GGCCATTCGTCGATAGAGCC	Second segment clone of <i>rPhSPL9b</i>
PhSPL9b-F(<i>Eco</i> R I)	CCGGAATTCATGAATAGGCACTTGACGTC	<i>PhSPL9b</i> 克隆,下划线为酶切位点
PhSPL9b-R(<i>Bam</i> H I)	CGGGATCCTTAAAGAGTCCAGTGAACAT	Full-length clone of <i>PhSPL9b</i> with underscores as cleavage sites
M13-F	AGCGGATAACAATTTTCACACAGG	大肠杆菌菌落阳性检测
M13-R	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Positive test for <i>E. coli</i> colonies
AD-F	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC	
AD-R	GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGATT	酵母菌落阳性检测
BD-F	TCATCGGAAGAGAGTAG	Positive test for yeast colonies
BD-R	GAGTCACTTTAAAATTTGTAT	
35S-F	ACGCACAATCCCACTATCCTTC	转基因植株阳性检测
PhSPL9b-R(short)	CAACCTTCAACTTGACATCTAGGTG	Positive test for transgenic plants
PhEF1 α -F	CCTGGTCAAATTGGAAACGG	
PhEF1 α -R	CAGATCGCCTGTCAATCTTGG	
AtEF1 α -F	GCAAGATGGATGCCACTACCC	RT-PCR 及 qRT-PCR 内参引物
AtEF1 α -R	AGTGGGAGACGAAGGGGCT	Primers of actin genes by RT-PCR and qRT-PCR
qPhSPL9b-F	TTCCTTCAGGAGACTGTTTCCCT	
qPhSPL9b-R	CTGCTGCTAGCTTCATTTCCTTTAA	

上游特异引物和 0.2 μ L 下游特异引物(10 μ mol/L), 0.2 μ L ROX, 3.4 μ L ddH₂O。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 40 次循环, 以拟南芥 *AtEF1 α* 和矮牵牛 *PhEF1 α* 作为内参基因^[21]。

1.6 矮牵牛 PhSPL9b 转录激活特性分析

将 pGBKT7-*PhSPL9b* 和 pGADT7、pGADT7-*PhSPL9b* 和 pGBKT7、pGBKT7-53 和 pGADT7-T (阳性对照) 及 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T (阴性对照) 组合分别转化酵母菌株 AH109, 经 SD/−Trp/−Leu 筛选及阳性检测后, 再在 SD/−Trp/−Leu/−His/−Ade 筛选。将各组合的阳性菌落在 SD/−Trp/−Leu 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C 220 r/min 孵育 24 h, 稀释后使其 OD₆₀₀=1, 菌液经 3 500 r/min 室温离心 4 min 后弃上清, 用 ddH₂O 重悬菌体, 吸打混匀后将菌液稀释成 5 个浓度梯度, 即 10¹、10⁰、10^{−1}、10^{−2} 和 10^{−3}, 每个浓度梯度的菌液各取 6 μ L 点于 SD/−Trp/−Leu/−His/−Ade/X- α -gal (16 ng/ μ L) 固体培养基, 30 $^{\circ}$ C 遮光倒置孵育 3~5 d, 检测 PhSPL9b 的转录激活特性。

2 结果与分析

2.1 *PhSPL9b* 的基因结构

序列分析结果显示, *PhSPL9b* 基因编码区长度为 1 125 bp, 编码 374 个氨基酸。与矮牵牛基因组数据^[22] 比对发现, *PhSPL9b* 含有 3 个外显子, 2 个内含子(图 1)。

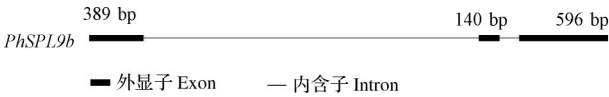


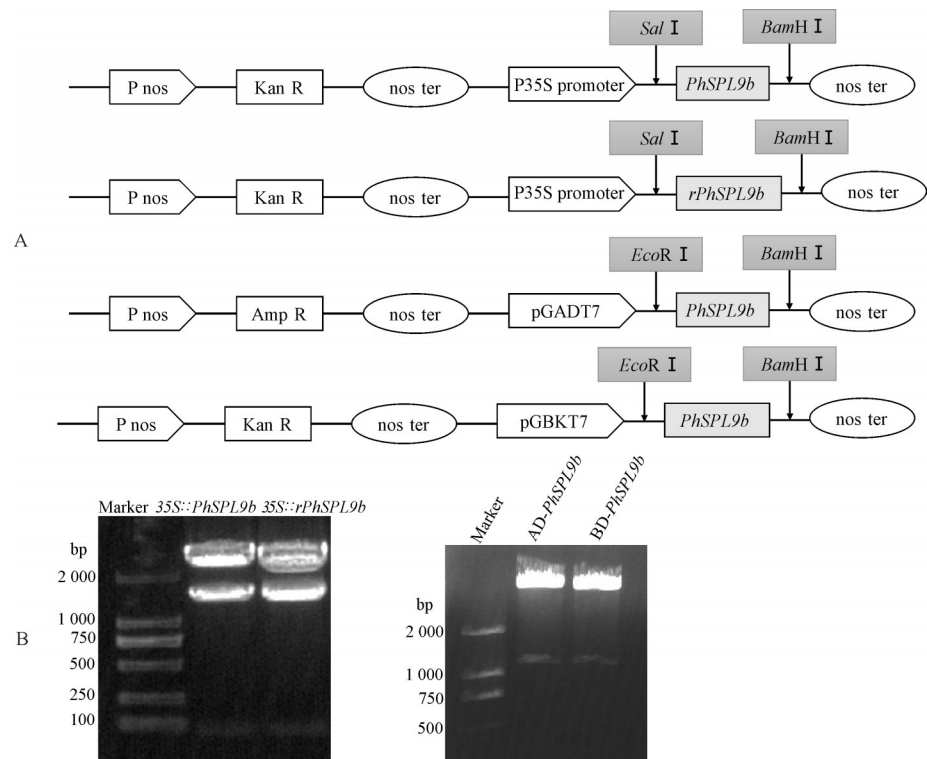
图 1 *PhSPL9b* 基因结构图
Fig. 1 Structure of *PhSPL9b* gene

2.2 *PhSPL9b* 表达载体的构建

经 PCR 扩增、测序、双酶切、连接等步骤, 完成植物表达载体 35S::*PhSPL9b* 和 35S::*rPhSPL9b*、酵母表达载体 pGADT7-*PhSPL9b* 和 pGBKT7-*PhSPL9b* 的构建(图 2A)。双酶切验证结果表明, 所有载体均构建成功(图 2B)。

2.3 *PhSPL9b* 转基因植株表型鉴定

将 35S::*PhSPL9b* 和 35S::*rPhSPL9b* 载体分别

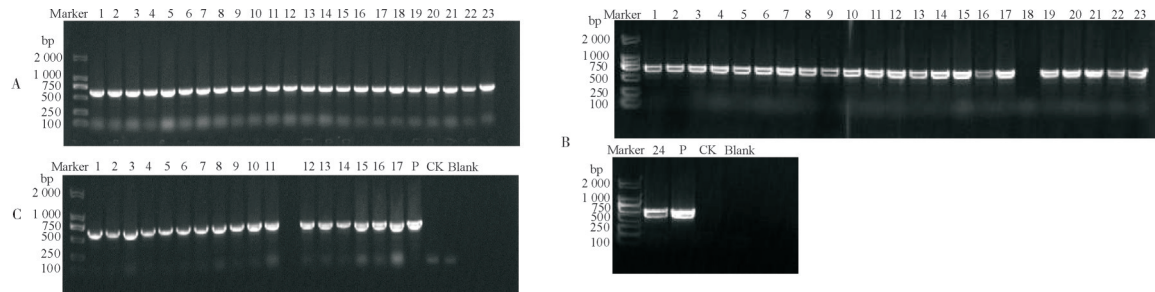


A: *PhSPL9b* 相关表达载体结构示意图 Schematic diagram of expression vector of *PhSPL9b*; B: *PhSPL9b* 相关表达载体双酶切检测图 Double digestion diagram of expression vectors of *PhSPL9b*.

图2 *PhSPL9b*相关表达载体构建

Fig. 2 Construction of *PhSPL9b* expression vectors

电转化至农杆菌GV3101和AGL0,通过花序侵染法转化拟南芥和叶盘法转化矮牵牛。经Kan筛选和PCR检测,获得42个拟南芥35S::*PhSPL9b*转基因株系(图3A)和34个矮牵牛转基因株系(图3B);获得39个拟南芥35S::*rPhSPL9b*转基因株系(图3C),但未能获得矮牵牛转化株系。



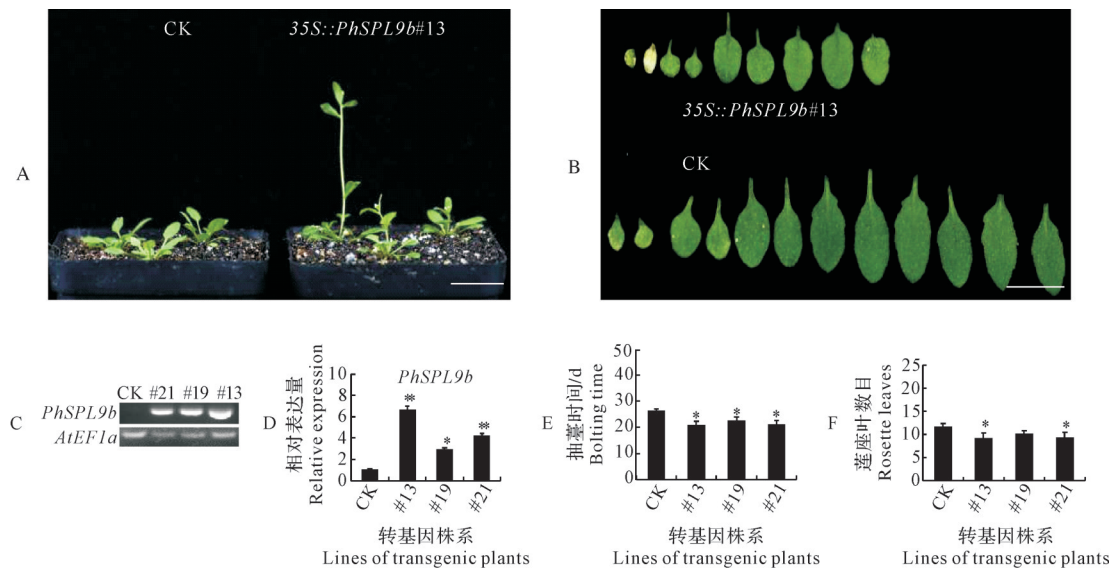
A: 1~23, 拟南芥35S::*PhSPL9b*转基因株系35S::*PhSPL9b Arabidopsis* transgenic lines; B: 1~24, 矮牵牛35S::*PhSPL9b*转基因株系35S::*PhSPL9b* transgenic petunia lines. C: 1~17, 拟南芥35S::*rPhSPL9b*转基因株系35S::*rPhSPL9b Arabidopsis* transgenic lines. P: 质粒阳性对照 Plasmid positive control; CK:空载阴性对照 Negative control; Blank:空白对照 Blank control.

图3 *PhSPL9b*转基因植株阳性检测

Fig. 3 Positive detection of *PhSPL9b* transgenic plants

表型统计发现,在拟南芥转基因植株中,36株35S::*PhSPL9b*转基因T₁代植株和29株35S::*rPhSPL9b*转基因T₁代植株表现出早花表型,其中35S::*PhSPL9b*转基因植株的平均提前开花时间为4.9 d,35S::*rPhSPL9b*转基因植株的平均提前开花时间为8.1 d。如图4和表2所示,35S::*PhSPL9b*转基因株系#13、#19和#21株系有明显的早花表型,同时莲座叶数目显著减少,其中#13株系开花时间提前5.6 d, #19株系开花时间提前4.0 d, #21株系开花时间提前5.3 d。35S::*rPhSPL9b*转基因株系中, #8、#12和#26株系有明显的早花表型,且莲座叶数目也显著减少(图5和表2),但茎生叶数目与CK相比无

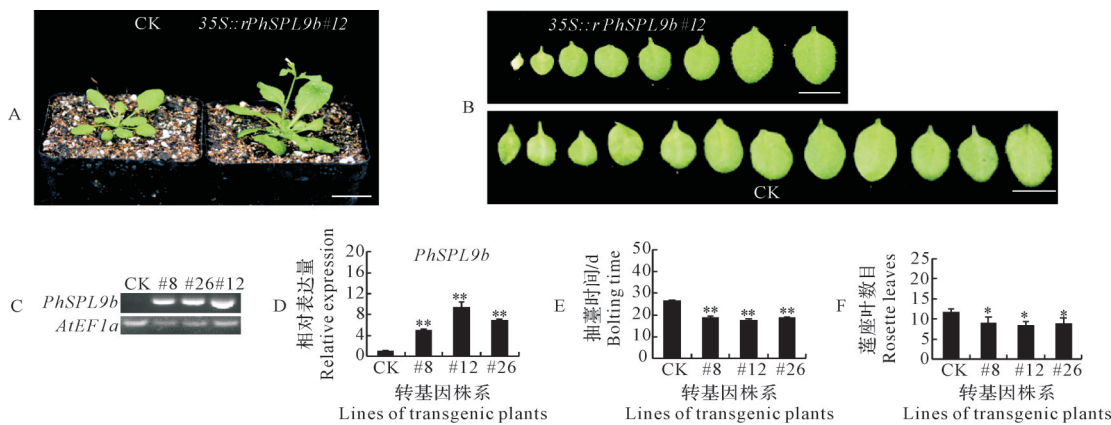
显著差异,其中#8株系开花时间提前7.5 d,#12株系开花时间提前8.9 d,#26株系开花时间提前7.8 d。RT-PCR和qRT-PCR结果显示,与CK相比,拟南芥转基因株系中*PhSPL9b*的表达量均被上调,且表达量越高,早花表型越明显。由此可见,*PhSPL9b*和*rPhSPL9b*超量表达后,均可促进拟南芥开花,且35S::*rPhSPL9b*转基因株系的表型比35S::*PhSPL9b*转基因株系更明显。



A~B: 转基因植株表型 (标尺=10 mm) Phenotype of transgenic plants about 3-weeks-old (scale=10 mm); C~D: 转基因株系中*PhSPL9b*基因的表达量 Expression level of *PhSPL9b* in transgenic lines; E~F: 转基因株系的抽薹时间和莲座叶数量 Bloting time and number of rosette leaves in transgenic lines.*和**分别表示在0.05和0.01水平上差异显著,下同。* and ** indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels, the same as follows.

图4 *PhSPL9b*超量表达拟南芥表型分析

Fig. 4 Phenotypes of the transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *PhSPL9b*

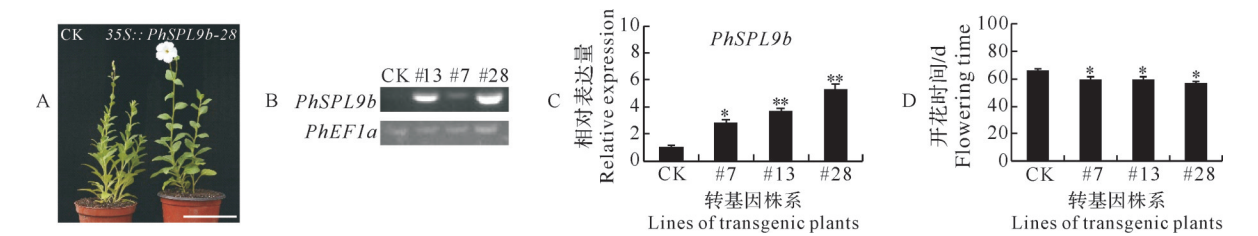


A~B: 转基因植株表型 (标尺=10 mm) Phenotype of transgenic plants about 3-weeks-old (scale=10 mm); C~D: 转基因株系中*PhSPL9b*基因的表达量 Expression level of *PhSPL9b* in transgenic lines; E~F: 转基因株系的抽薹时间和莲座叶数量 Bloting time and number of rosette leaves in transgenic lines.

图5 *rPhSPL9b*超量表达拟南芥表型分析

Fig. 5 Phenotypes of the transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *rPhSPL9b*

在矮牵牛转基因植株中,27株T₀代35S::*PhSPL9b*转基因植株的开花时间较CK提前,开花时间平均提前7.6 d。如图6和表3所示,转基因株系#7、#13和#28有明显的早花表型,但株高、叶片长宽比、分枝数、叶片节间距和花朵直径与CK均没有显著性差异。其中#28株系早花表型最显著,开花时间提前9.2 d,#7株系开花时间提前6.6 d,#13株系开花时间提前7.1 d。RT-PCR和qRT-PCR结果显示,*PhSPL9b*的表达量在转基因植株中显著高于CK(图6)。



A: 转基因植株表型 Phenotype of transgenic plants about 10-weeks-old (scale=10 mm); B~C: 转基因株系中 *PhSPL9b* 的表达量 Expression level of *PhSPL9b* in transgenic lines; D: 转基因株系的开花时间 Flowering time of transgenic lines.

图 6 *PhSPL9b* 超量表达矮牵牛表型分析

Fig. 6 Phenotypes of the transgenic petunia plants overexpressing *PhSPL9b*

表 2 *PhSPL9b* 和 *rPhSPL9b* 超量表达拟南芥表型分析
Table 2 Phenotypes of the transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing *PhSPL9b* and *rPhSPL9b*

株系 Lines	莲座叶数目 Rosette leaves No.	茎生叶数目 Cauline leaves No.	抽薹时间/d Bolting time
CK	11.57±0.80	2.14±0.17	26.27±0.78
PhSPL9b#13	9.03±1.21*	2.03±0.23	20.72±1.53*
PhSPL9b#19	9.96±0.78	2.24±0.34	22.31±1.76*
PhSPL9b#21	9.29±1.13*	2.15±0.21	20.98±1.62*
rPhSPL9b#8	8.86±1.53*	2.34±0.36	18.76±0.82**
rPhSPL9b#12	8.14±1.23*	2.37±0.10	17.37±0.62**
rPhSPL9b#26	8.73±1.51*	2.28±0.42	18.45±0.74**

注：*和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平上差异显著，下同。Note:
* and ** indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels, the same as follows.

2.4 矮牵牛 *PhSPL9b* 的转录激活特性分析

将质粒组合 pGBKT7-*PhSPL9b*+pGADT7、

pGADT7-*PhSPL9b*+pGBKT7、pGBKT7-53+pGADT7-T（阳性对照）及 pGBKT7-Lam+pGADT7-T（阴性对照）分别转化到酵母菌株 AH109，结果发现，阳性对照 pGBKT7-53+pGADT7-T 和 pGBKT7-*PhSPL9b*+pGADT7 共转后的酵母单菌落在 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 上正常生长，并在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 上发生显色反应（蓝色），而 pGADT7-*PhSPL9b*+pGBKT7 和 pGBKT7-Lam+pGADT7-T（阴性对照）共转后的酵母单菌落在 SD/-Trp/-Leu 上正常生长，但在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 不能正常生长，也不能在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal 上发生显色反应（图 7）。因此，推断 *PhSPL9b* 是一个转录激活子，可通过激活下游基因的表达而发挥其功能。

表 3 *PhSPL9b* 超量表达矮牵牛表型分析

Table 3 Phenotypes of the transgenic *Petunia* plants overexpressing *PhSPL9b*

株系 Lines	开花时间/d Flowering time	植株高度/cm Plant height	叶片长宽比 Leave length/width ratio	节间距/cm Internode length	花朵直径/cm Flower diameter	分枝数 Number of branches
CK	65.81±1.64	60.81±2.59	2.34±0.17	3.02±0.23	5.31±0.11	2.13±0.21
PhSPL9b#7	59.23±4.32*	62.42±3.12	2.29±0.32	2.92±0.25	5.33±0.32	2.36±0.23
PhSPL9b#13	58.72±3.57*	62.73±2.43	2.30±0.16	3.07±0.31	5.30±0.41	2.30±0.16
PhSPL9b#28	56.63±2.90*	63.63±3.31	2.36±0.25	2.89±0.28	5.24±0.37	2.18±0.34

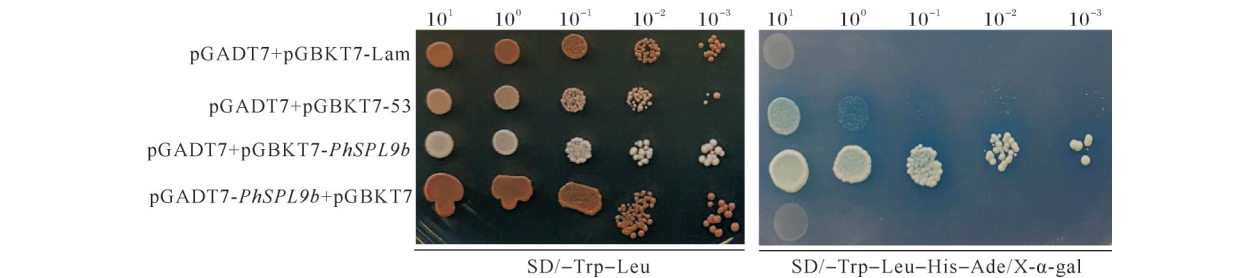


图 7 *PhSPL9b* 转录激活特性分析

Fig. 7 Analysis of transcriptional activation characteristics of *PhSPL9b*

3 讨论

开花是观赏植物的重要性状,决定着观赏植物的品质和经济价值^[23],研究开花基因在植物中的功能,并应用到实际育种中,具有重要的现实意义。SPL是植物特异的转录因子家族,在高等植物成花转换及生长发育过程中扮演着重要角色。近年来,关于SPL基因功能的研究在模式植物如拟南芥、水稻和番茄中成果颇丰,但在矮牵牛中关于SPL功能的研究相对较少。在拟南芥、水稻和番茄等植物中研究发现,SPL基因家族成员根据其系统进化关系均分为8个亚家族^[6, 24]。笔者所在课题组前期研究发现,矮牵牛SPL基因家族成员也被分为8个亚家族,且同一亚家族成员具有相似的基因结构^[19],推测同一亚家族成员中矮牵牛*PhSPLs*和拟南芥*AtSPLs*可能具有相似的功能;同时,课题组研究发现miR156/157靶向部分*PhSPLs*调控矮牵牛和拟南芥开花^[19-20],但具体是通过靶向哪个或者哪些*PhSPLs*基因调控开花尚不明确。

本研究构建35S::*PhSPL9b*和35S::*rPhSPL9b*超量表达载体并转化矮牵牛和拟南芥,结果显示*PhSPL9b*和*rPhSPL9b*超量表达拟南芥后,转基因植株的开花时间显著提前,莲座叶数目减少;35S::*PhSPL9b*矮牵牛转基因植株的开花时间与对照相比也显著提前,这表明*PhSPL9b*对开花时间具有重要的调控作用。Xu等^[6]研究发现,*AtSPL9*和*AtSPL15*在拟南芥中超量表达后,促使拟南芥提前开花。在本研究中,*PhSPL9b*也促进拟南芥和矮牵牛开花,这表明其功能具有保守性。本研究未获得矮牵牛35S::*rPhSPL9*转基因植株,表明矮牵牛中不同基因的转化效率不同,而转化效率和目标基因有关的报道在其他植物中也较常见,如李姝璇^[25]发现不同基因在大豆中的转化效率有显著差异。

基因表达分析研究结果表明,转基因植株的表达量和表型强弱密切相关,且*rPhSPL9b*作用更显著。Xu等^[6]研究发现将*AtSPL9*对应的miR156/157的靶位点突变后,miR156/157不能准确地与*rAtSPL9*靶位点进行互补配对,从而不能识别该靶位点,无法进行*AtSPL9*转录产物的切割,最终导致*AtSPL9*表达量剧增,显著性地促进拟南芥开花^[6],因此推测,*PhSPL9b*靶位点突变后,miR156/157不能对其转录本进行切割,导致*PhSPL9b*表达量剧增,最终显著性地促进拟南芥开花。

转录因子能发挥有效调控的必要前提是具有转录活性^[26]。本研究通过转录激活试验分析发现*PhSPL9b*是一个转录激活子,同时*PhSPL9b*在矮牵牛和拟南芥中超量表达均表现出早花表型,这表明*PhSPL9b*可能是通过转录激活下游基因而调控矮牵牛和拟南芥开花。但*PhSPL9b*是如何调控拟南芥和矮牵牛开花的?其下游靶基因是什么?这些相关的分子调控机制还有待进一步研究。

参考文献 References

- [1] 周琴,张思思,包满珠,等.高等植物成花诱导的分子机理研究进展[J].分子植物育种,2018,16(11):3681-3692. ZHOU Q, ZHANG S S, BAO M Z, et al. Advances on molecular mechanism of floral initiation in higher plants [J]. Molecular plant breeding, 2018, 16 (11): 3681-3692 (in Chinese with English abstract).
- [2] 王云梦,宋贺云,刘娟,等. *FT*和*TFL1*基因调控植物开花的分子机理[J].植物生理学报,2022,58(1):77-90. WANG Y M, SONG H Y, LIU J, et al. Molecular mechanism of *FT* and *TFL1* genes on regulation of plant flowering [J]. Plant physiology journal, 2022, 58 (1): 77-90 (in Chinese with English abstract).
- [3] 张璐,吴菁华,姚馨婷,等.中国水仙*NtTFL1-1*和*NtTFL1-2*基因的克隆和表达[J].应用与环境生物学报,2020,26(2):264-271. ZHANG L, WU J H, YAO X T, et al. Cloning and expression of the *NtTFL1-1* and *NtTFL1-2* genes from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. Chinese journal of applied and environmental biology, 2020, 26 (2): 264-271 (in Chinese with English abstract).
- [4] YU N, NIU Q W, NG K H, et al. The role of *miR156/SPLs* modules in *Arabidopsis* lateral root development [J]. The plant journal, 2015, 83(4):673-685.
- [5] WANG Z S, WANG Y, KOHALMI S E, et al. Squamosa promoter binding protein-like 2 controls floral organ development and plant fertility by activating asymmetric leaves 2 in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant molecular biology, 2016, 92 (6): 661-674.
- [6] XU M L, HU T Q, ZHAO J F, et al. Developmental functions of mir156-regulated squamosa promoter binding protein-like (spl) genes in *Arabidopsis thaliana* [J/OL]. PLoS genetics, 2016, 12 (8): e1006263 [2024-01-24]. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006263>.
- [7] KONG D X, PAN X, JING Y F, et al. *ZmSPL10/14/26* are required for epidermal hair cell fate specification on maize leaf [J]. New phytologist, 2021, 230(4):1533-1549.
- [8] XIE Y R, LIU Y, MA M D, et al. *Arabidopsis FHY3* and

- FAR1* integrate light and strigolactone signaling to regulate branching[J/OL]. Nature communications, 2020, 11(1): 1955 [2024-01-24]. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15893-7>.
- [9] YU N, CAI W J, WANG S C, et al. Temporal control of trichome distribution by microRNA156-targeted *SPL* genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. The plant cell, 2010, 22(7): 2322-2335.
- [10] CUI L G, SHAN J X, SHI M, et al. The miR156—*SPL9*—*DFR* pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants [J]. The plant journal, 2014, 80(6): 1108-1117.
- [11] ZHAO J L, SHI M, YU J, et al. *SPL9* mediates freezing tolerance by directly regulating the expression of *CBF2* in *Arabidopsis thaliana* [J/OL]. BMC plant biology, 2022, 22(1): 59 [2024-01-24]. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03445-8>.
- [12] YAN Y, WEI M X, LI Y, et al. *MiR529a* controls plant height, tiller number, panicle architecture and grain size by regulating *SPL* target genes in rice (*Oryza sativa* L.) [J/OL]. Plant science, 2021, 302: 110728 [2024-01-24]. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110728>.
- [13] SUN Z X, SU C, YUN J X, et al. Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soya bean plants via the manipulation of *GmmiR156b* [J]. Plant biotechnology journal, 2019, 17(1): 50-62.
- [14] 周琴, 鲁瑞, 张书婷, 等. 一个矮牵牛花器官发育突变体 *aps* 的表型鉴定及遗传分析 [J]. 园艺学报, 2019, 46(2): 317-329. ZHOU Q, LU R, ZHANG S T, et al. Phenotype characterization and genetic analysis of a floral mutant *aps* in petunia [J]. Acta horticulturae sinica, 2019, 46(2): 317-329 (in Chinese with English abstract).
- [15] MOREL P, HEIJMANS K, ROZIER F, et al. Divergence of the floral A-function between an asterid and a rosid species [J]. The plant cell, 2017, 29(7): 1605-1621.
- [16] MOREL P, HEIJMANS K, AMENT K, et al. The floral C-lineage genes trigger nectary development in petunia and *Arabidopsis* [J]. The plant cell, 2018, 30(9): 2020-2037.
- [17] MOREL P, CHAMBRIER P, BOLTZ V, et al. Divergent functional diversification patterns in the SEP/AGL6/AP1 MADS-box transcription factor superclade [J]. The plant cell, 2019, 31(12): 3033-3056.
- [18] PRESTON J C, JORGENSEN S A, OROZCO R, et al. Paralogous *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN—LIKE* (*SPL*) genes differentially regulate leaf initiation and reproductive phase change in petunia [J]. Planta, 2016, 243(2): 429-440.
- [19] ZHOU Q, ZHANG S S, CHEN F, et al. Genome-wide identification and characterization of the SBP-box gene family in *Petunia* [J/OL]. BMC genomics, 2018, 19(1): 193 [2024-01-24]. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4537-9>.
- [20] ZHOU Q, SHI J W, LI Z N, et al. *miR156/157* targets *SPLs* to regulate flowering transition, plant architecture and flower organ size in petunia [J]. Plant & cell physiology, 2021, 62(5): 839-857.
- [21] MALLONA I, LISCHIEWSKI S, WEISS J, et al. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida* [J/OL]. BMC plant biology, 2010, 10: 4 [2024-01-24]. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-4>.
- [22] BOMBARELY A, MOSER M, AMRAD A, et al. Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida* [J/OL]. Nature plants, 2016, 2(6): 16074 [2024-01-24]. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.74>.
- [23] 刘晓芬, 凌晓祺, 向理理, 等. 温度和赤霉素对春兰开花的调控 [J]. 浙江农业学报, 2023, 35(2): 355-363. LIU X F, LING X Q, XIANG L L, et al. Effect of temperature and gibberellin on flowering regulation of *Cymbidium goeringii* [J]. Acta agriculturae Zhejiangensis, 2023, 35(2): 355-363 (in Chinese with English abstract).
- [24] SALINAS M, XING S P, HÖHMANN S, et al. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato [J]. Planta, 2012, 235(6): 1171-1184.
- [25] 李姝璇. 农杆菌介导的大豆遗传转化方法优化及 *KN1* 和 *GID1* 基因对大豆再生和遗传转化效率的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2018. LI S X. Optimization of agrobacterium-mediated genetic transformation of soybean and effects of *KN1* and *GID1* genes on soybean regeneration and genetic transformation efficiency [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [26] DAI X Y, WANG Y Y, YANG A, et al. OsMYB2P-1, an R2R3 MYB transcription factor, is involved in the regulation of phosphate-starvation responses and root architecture in rice [J]. Plant physiology, 2012, 159(1): 169-183.

Cloning and functional analysis of *PhSPL9b* gene in petunia

ZHOU Qin^{1,2}, SHI Jiewei², BAO Manzhu², LIU Guofeng³

1.Hubei Ecology Polytechnic College, Wuhan 430070, China;

2.College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China;

3.Guangzhou Institute of Forestry and Landscape Architecture, Guangzhou 510405, China

Abstract The *PhSPL9b* gene was cloned to study the role of SPL (SQUAMOSA-promoter binding protein-like) transcription factor in the flowering transformation in petunia. Point mutation of the miR156/157 target site corresponding to the *PhSPL9b* gene was conducted to obtain *rPhSPL9b*. The overexpression vectors for *35S::PhSPL9b* and *35S::rPhSPL9b* were constructed and transformed into petunia and *Arabidopsis*. Transgenic plants of *Arabidopsis* overexpressing *PhSPL9b* or *rPhSPL9b* and transgenic plants of petunia overexpressing *PhSPL9b* were obtained. The results showed that overexpression *PhSPL9b* or *rPhSPL9b*, especially *35S::rPhSPL9b*, significantly reduced the number of rosettes and promoted flowering in *Arabidopsis* compared with the control (CK). The phenotype of transgenic *Arabidopsis* with *35S::rPhSPL9b* was more obvious. Overexpression of *PhSPL9b* significantly promoted flowering in petunia. The results of analyses with RT-PCR and qRT-PCR showed that the expression level of *PhSPL9b* in transgenic lines with obvious phenotypes was significantly higher than that in the control. The results of transcription activation showed that *PhSPL9b* was a transcription factor with the function of activating transcription. It is indicated that the *PhSPL9b* gene in petunia plays an important regulatory role in flowering time, and its function is conserved. At the same time, it may affect plant flowering by transcriptionally activating the expression of downstream genes.

Keywords petunia; *PhSPL9b*; overexpression; flowering; characteristics of transcription activation

(责任编辑:葛晓霞)