

11 条白桦 *BpSPL* 家族基因的生物信息学和表达分析

宁 坤, 杨 洋, 马述山, 李慧玉*

(林木遗传育种国家重点实验室 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: [目的] 研究白桦中 *SPL* 转录因子的基因序列特征及其在不同时期不同组织中的表达规律。 [方法] 依据白桦 45 个转录组测序结果, 共获得 12 条全长 *SPL* 基因, 依次命名为白桦 *BpSPL1*-*BpSPL12*, 对其中 11 条 *BpSPL* 进行了生物信息学及基因表达特征分析。 [结果] 生物信息学分析发现, 11 条 *BpSPL* 均含有 1 个高度保守的 SBP 结构域, 且基因长度差异较大, 含有 2~10 个不等数目的外显子, 系统进化分析发现 11 条白桦 *SPL* 分属于六大类 *SPL* 蛋白; qRT-PCR 分析结果显示, 白桦 *BpSPL* 基因在不同时期的叶、顶芽、茎、雄花序中表达变化显著, 多数 *SPL* 基因在顶芽中 7 月 5 日和 8 月 20 日至 9 月 20 日时期表达较高, 除 *BpSPL1* 基因外在雄花序从 6 月份到 9 月份的生长阶段中, *SPL* 的表达水平呈现逐渐升高的总体趋势。 [结论] *BpSPL* 基因可能参与到了白桦顶芽和雄花序的生长发育过程。

关键词: 白桦; *BpSPL* 基因家族; 生物信息学; 基因表达

中图分类号: S792.153

文献标识码: A

Bioinformatics and Expression Analysis of 11 *BpSPLs* in *Betula platyphylla* Suk.

NING Kun, YANG Yang, MA Shu-shan, LI Hui-yu

(Key Laboratory of Tree Genetic Improvement and Biotechnology, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] To analyze the sequence features and gene expression rules in different tissues and periods of *SPL* transcription factor from *Betula platyphylla* Suk. [Method] Based on 45 transcriptome databases of Birch, 12 *BpSPL* genes were obtained and named as *BpSPL1*-*BpSPL12*, of which 11 genes were analyzed. [Result] Bioinformatics analysis showed that all the 11 *BpSPLs* contained a highly conserved SBP domain, their lengths exhibited a high diversity and owned 2~10 numbers of exon in genetic sequences. Phylogenetic analysis showed that the 11 Birch *SPL* proteins belonged to six major categories. The qRT-PCR results suggested that the expression levels of the 11 *BpSPL* genes changed significantly in different periods and different tissues (leaves, terminal buds, stems, male inflorescences). In terminal buds, most *BpSPL* genes were up-regulated on July 5 and August 20 to September 20. In male inflorescences, with the exception of *BpSPL1* which was down-regulated or unchanged, all the other *BpSPL* genes exhibited a gradual increasing pattern from June to September (the growth stage). [Conclusion] This study suggested that these *BpSPL* genes may be involved in the growth and development of birch terminal buds and male inflorescences.

Keywords: *Betula platyphylla* Suk.; *BpSPL* gene family; bioinformatics; gene expression

收稿日期: 2015-08-26

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题—“水曲柳和白桦珍贵用材林定向培育技术研究示范”(2012BAD21B02)。

作者简介: 宁 坤(1987—), 男, 河北秦皇岛人, 硕士研究生, 主要研究方向: 林木基因工程育种。

* 通讯作者: 李慧玉, 女, 副教授, 主要研究方向: 林木基因工程育种。

SPL (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE) 基因编码高等植物所特有的转录因子,其典型特征是含有一个高度保守的 SBP (Squamosa promoter Binding Protein) 结构域。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh) 中研究发现, *SPL* 基因是花时调控的关键基因。 *AtSPL3* 编码的蛋白能够识别花分生组织特征基因 *API* (*SQUA* 的同源基因) 的启动子,调控 *API* 的表达,从而控制植物成花过程。拟南芥中过量表达 *AtSPL3* 会引起提前开花,因而被认为是调控开花的重要因子^[1]。 *AtSPL8* 不仅影响花药的发育而且参与调控 GA 的合成^[2],而 *AtSPL14* 作为负调控因子影响营养生长和开花的转换过程^[3]。拟南芥 *SPL* 基因家族成员的多条基因上具有 microRNA156 的识别序列,其表达受到 miR156 的调控^[4-6]。miR156 介导的 *SPLs* 基因表达被认为是调控植物开花的内源性途径^[7]。最新研究报道证实,拟南芥 17 条 *AtSPL* 基因中 11 条受到 microRNA156 调控 (*AtSPL2*、3、4、5、6、9、10、11、13 和 15a/b)^[8-11]。 *SPL* 基因除了参与花时调控外,还参与叶片的形成与发育、表皮毛的形成与分布^[12]、果实的成熟^[13]、花器官的形成与发育^[14]、植株的形态建成^[15]、孢子发生、激素调节^[3] 以及植物的抗逆胁迫信号响应等^[11] 过程。

SPL 转录因子为多基因家族,目前,在拟南芥中共发现了 17 个 *SPL* 基因,水稻中已鉴定出 19 个 *SPL* 基因^[10-11,16]。此外,大多数物种的基因组测序工作尚未完成,所以 *SPL* 基因的数量、结构及生物学功能尚有待进一步研究。

白桦 (*Betula platyphylla* Suk.) 是我国东北地区蓄积量最大的乡土速生阔叶树种,雌雄同株异花,且花发育存在越冬宿存的现象^[17]。白桦花发育模式与草本植物相比存在明显的差异,可能由其所特有的花发育基因调控路径所致^[18]。因此以花时调控中关键基因 *SPL* 为研究对象,探索 *SPL* 基因的功能,将有助于揭示木本植物的成花机理。本研究通过对获得的 11 条白桦 *BpSPL* 基因进行生物信息学分析,了解其基本特征;采用 qRT-PCR 进行该基因家族的时空表达分析,研究其在不同组织部位不同时期的表达特征,为深入研究白桦 *BpSPL* 基因的功能提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 白桦 *BpSPL* 基因的获得 根据白桦 45 个转录组测序结果进行数据分析,并结合 NCBI 上已有

物种 *SPL* 基因的比对结果,最终从转录组测序结果中找到 12 条白桦 *SPL* 基因,依次命名为白桦 *BpSPL1-12*。我们对其中的 11 条 *SPL* 基因进行了后续分析。

1.1.2 植物材料 采自东北林业大学林木遗传育种试验基地 10 年生的白桦实生苗,6 月 5 日至 9 月 20 日,每隔 15 天取材一次,每次取材均选取相同 3 株白桦中部的不同花序、叶片、嫩茎、顶芽,分别混样用于基因表达分析。因雌、雄花序存在着越冬宿存的现象,从经历越冬后的第二年 4 月 5 日至 4 月 15 日,每隔 5 天开始采取雄花序和雌花序,植物材料经液氮速冻后,放入 -80°C 超低温冰箱保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 白桦 *BpSPL* 基因的生物信息学分析 利用 NCBI 在线寻找程序 (ORF finder) 确定该基因的开放读码框;NCBI 的 Conserved Domains 在线序列工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测保守区及蛋白质的基本结构域;在线计算蛋白质的分子量和理论等电点 (<http://web.expasy.org/protparam/>);利用 Gene Structure Display Server 进行外显子和内含子的预测;用 BioEdit 中的 ClustalW 进行保守结构域的氨基酸多序列比对;选取白桦、拟南芥、水稻和杨树的 *SPL* 氨基酸序列进行系统进化树分析,具体的基因名和序列信息参考 Salinas 等^[19] 的研究;在 NCBI、Rice Genome Annotation Project 和 Plant TFDB 数据库搜索已知的 *SPL* 蛋白质序列,使用 MEGA 5.1 绘制系统发育进化树,Bootstrap 分析进行 1 000 个重复,以默认参数构建邻接树 (Neighbor-joining tree, NJ-tree),借助 MEGA 软件完成作图^[20]。

1.2.2 白桦 *BpSPL* 基因的实时定量 PCR 分析 以熟龄白桦 6 月 5 日、6 月 20 日、7 月 5 日、7 月 20 日、8 月 5 日、8 月 20 日、9 月 5 日和 9 月 20 日的叶、顶芽、茎、雄花序和经历越冬后 4 月 5 日、4 月 10 日和 4 月 15 日雄花序和雌花序的 cDNA 为模板,进行实时定量 PCR 扩增,检测白桦 *BpSPL* 基因的表达情况,分别选用 α -Tubulin 作为内参基因,对照样为每个基因各个部位的第一个时间点(叶,顶芽,茎,雄花序为 6 月 5 日;雌花序为 4 月 5 日),所有试样进行三次重复,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法进行基因的相对定量分析,因差值较大,作图时取 \log_2 为值^[21-22]。根据 *BpSPL* 特异序列设计上下游定量引物,本研究选用的内参基因及其引物序列见表 1。

表1 白桦 *BpSPL* Realtime-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
<i>BpSPL1</i>	F-primer:5'-GAGGAGCTTATGGAGGAGGAGG-3'
	R-primer:5'-GGAACCTGCTGCATTGCTGG-3'
<i>BpSPL2</i>	F-primer:5'-TCTCCGAGTCGAATCGGAGC-3'
	R-primer:5'-CCAAGCTCCTCCCTTTTGAGG-3'
<i>BpSPL3</i>	F-primer:5'-CCACGCAGTAGATGACATGG-3'
	R-primer:5'-AATACAGGAGCTGAACCTGG-3'
<i>BpSPL4</i>	F-primer:5'-GACGCAGATCTGATTGCAGC-3'
	R-primer:5'-AGGAGCTGCATCAGAAAGC-3'
<i>BpSPL5</i>	F-primer:5'-CCGACAAACAATCACTTCCTCG-3'
	R-primer:5'-CATGGTTCCAATTAAGAGCAAAC-3'
<i>BpSPL6</i>	F-primer:5'-CCACTTCTGCCAAAGCAATGG-3'
	R-primer:5'-GGGTAGACGAGTGAAC TAGAGAA-3'
<i>BpSPL7</i>	F-primer:5'-CGTGGACTTGTGTCCAGACTCG-3'
	R-primer:5'-AGATGGAATCTGCTGCACTGC-3'
<i>BpSPL8</i>	F-primer:5'-GGAGATTGCTTCAGTCATATGATGG-3'
	R-primer:5'-TGCTTCCTGTTGCAGTACTATCTCC-3'
<i>BpSPL10</i>	F-primer:5'-CCAACAATGTAGCAGATCCATTCC-3'
	R-primer:5'-TCATAGCTTCTGCTTCACTTCTGG-3'
<i>BpSPL11</i>	F-primer:5'-CCAGAAGATGCTGAAGAAGGAGG-3'
	R-primer:5'-TGCATTGCTGACAAAACCTCTGC-3'
<i>BpSPL12</i>	F-primer:5'-GCTGCTGCTAAATTTGACATGG-3'
	R-primer:5'-CTGTGTTGCATCCAGCTCG-3'
α -Tubulin	F-primer:5'-GCACTGGCCTCCAAGGAT-3'
	R-primer:5'-TGGGTGCTCAATGTCAAGG-3'

实时定量 PCR 反应体系为:SYBR[®] Premix Ex-Taq[™] II (2 ×) 10 μ L, 上下游引物各 0.8 μ L (10 μ mol · L⁻¹), 水 6 μ L, 模板 2 μ L, Rox Dye II 0.4 μ L, 循环反应参数为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 34 s, 循环 40 次, 绘制溶解曲线, 温度由 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 至 95 $^{\circ}$ C 15 s 止。以上反应在 ABI PRISM[®] 7 500 荧光定量 PCR 仪上完成。

2 结果与分析

2.1 白桦 *BpSPL* 基因的生物信息学分析

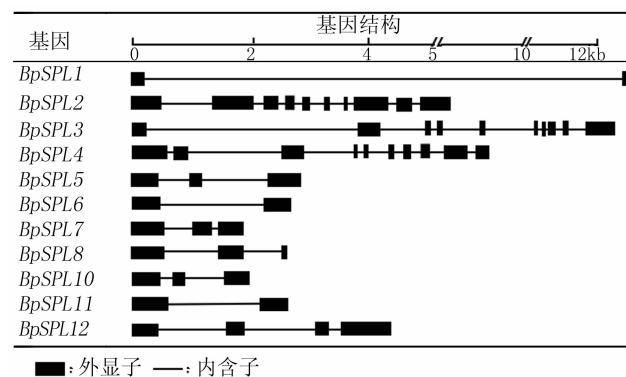
2.1.1 白桦 *BpSPL* 基因的特性分析 11 条白桦 *BpSPL* 基因的 5'UTR 长度在 18 ~ 2 121 bp 之间, 3'UTR 长度在 115 ~ 606 bp 之间, ORF 长度范围在 405 ~ 3 249 bp 之间, 编码的氨基酸数目在 134 ~ 1 082 个之间, 相对分子质量在 15.46 ~ 119.67 kD 之间, 理论等电点的范围在 6.13 ~ 9.38 之间。可见白桦 11 条 *BpSPL* 基因序列长度差异较大, 这一差别可能导致其具有不同的功能, 暗示着 *SPL* 基因可能参与不同的生物学过程(表 2)。

2.1.2 外显子和内含子的预测 利用白桦 *BpSPL*

表2 白桦 *BpSPL* 基因特性分析

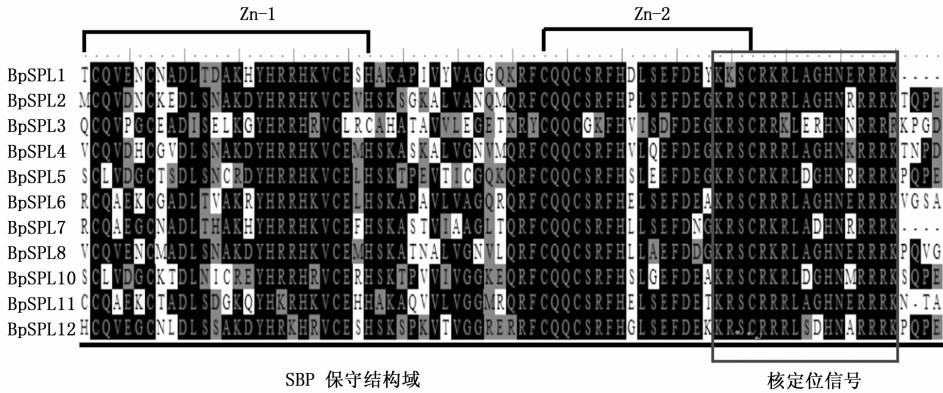
基因	5'UTR /bp	3'UTR /bp	ORF /bp	氨基酸数目	分子量/kD	理论等电点 pI
<i>BpSPL1</i>	41	306	405	134	15.46	6.39
<i>BpSPL2</i>	625	606	3 249	1 082	119.67	8.23
<i>BpSPL3</i>	405	470	2 403	800	89.01	6.13
<i>BpSPL4</i>	2 121	202	3 006	1 001	110.53	6.13
<i>BpSPL5</i>	646	161	1 170	389	42.50	8.44
<i>BpSPL6</i>	18	144	537	178	20.01	9.38
<i>BpSPL7</i>	185	115	930	309	34.32	9.26
<i>BpSPL8</i>	593	270	1 593	530	58.30	7.55
<i>BpSPL10</i>	308	538	1 173	390	42.82	8.01
<i>BpSPL11</i>	318	323	528	175	19.96	9.05
<i>BpSPL12</i>	232	387	1 437	478	52.96	7.32

基因的开放阅读框(ORF)和对应的基因组序列, 通过 Gene Structure Display Server 进行基因外显子和内含子的预测, 结果显示(表 3): 11 条白桦 *BpSPL* 基因由不等数目的外显子和内含子串联排布, 相互之间差别较大。其中 *BpSPL2*、3、4 基因分别含有 10 个外显子, *SPL12* 基因含有 4 个外显子, *BpSPL5*、7、8、10 分别含有 3 个外显子, *BpSPL1*、6、11 则分别含有 2 个外显子。

表3 白桦 *BpSPL* 基因结构分析

2.1.3 白桦 *BpSPL* 蛋白保守结构域的同源性分析

对白桦 11 条 *BpSPL* 保守结构域的氨基酸进行多序列比对分析, 结果显示(图 1): 白桦 SBP-Box 结构域在进化上是高度保守的, 11 条 *BpSPL* 的氨基酸序列都具有 SBP 结构域特有的两个锌指结构, Zn-1 结构是由 27 个氨基酸所组成, Zn-2 结构是由 20 个氨基酸所组成^[23], SBP-DBD 区的 C 端(即第二个锌-结合区)包含有一个核定位信号, 核定位信号均位于 SBP 结构域内部, 是由 17 个氨基酸所组成的区域, 用于调控转录因子进入到细胞核内, SBP-DBD 一部分与其核定位区重叠(KRSC), 能够专一识别并结合 GTAC 核模序(motif), 所以 SBP 家族的转录因子不但

图1 白桦 *BpSPL* 蛋白保守域的序列比对

能正确地与目标 DNA 结合,还能在核定位信号(NLS)的帮助下顺利进入核区^[2]。

2.1.4 SPL 蛋白的系统进化树分析 对白桦 11 条 *BpSPL* 与水稻的 18 条、拟南芥 16 条、杨树 9 条 *SPL* 氨基酸序列进行了进化分析,同时选取了白桦 *BpTCP1* 和 *BpTCP2* 作为外类群基因,结果可以看出:这些 *SPL* 蛋白大致可以分为 6 种类型, I 型 *SPL* 蛋白:其中有 8 条 *SPL* 蛋白含有锚蛋白重复包含域或锚蛋白重复域,这一类型当中 *SPL* 氨基酸的长度较大; II 型 *SPL* 蛋白:受 miR156 所调控,它们的长度大多集中在 200 ~ 600 个氨基酸之间; III 型 *SPL* 蛋白:大部分受 miR156 调控的,各蛋白之间长度差异较小; IV 型 *SPL* 蛋白:均不受 miR156 调控; V 型: *SPL* 蛋白长度相对较短,除了一条 Potri. 011G116800. 1 不受 miR156 调控外,其余都受 miR156 所调控; VI 型里面是 3 条不受 miR156 调控的较长序列。白桦 *BpSPL2*、4、8 归属于 I 型 *SPL* 蛋白, *BpSPL10*、5 归属于 II 型 *SPL* 蛋白, *BpSPL12* 归属于 III 型 *SPL* 蛋白, *BpSPL7* 归属于 IV 型 *SPL* 蛋白, *BpSPL1*、6、11 归属于 V 型 *SPL* 蛋白, *BpSPL3* 归属于 VI 型 *SPL* 蛋白,选取亲缘关系较远的外类群基因 *BpTCP1* 和 *BpTCP2* 则独立成为一支。上述所有的 54 条 *SPL* 蛋白中都含有典型的 SBP 结构域,并且长度较大的氨基酸序列均不受 miR156 所调控的。

2.2 *BpSPL* 基因在白桦中的表达分析

利用 qRT-PCR 的方法研究白桦 *BpSPL* 基因在不同组织部位、不同时期的表达情况,通过对 11 白桦 *BpSPL* 基因的表达情况进行聚类分析,从叶、顶芽、嫩茎、雌花、雄花的聚类结果中可以看出:

在叶中, *BpSPL4* 在除 7 月 20 日和 8 月 5 日外的整个生长季主要呈现上调表达的趋势; *BpSPL3* 在生长旺季(7 月 5 日至 8 月 5 日)表达量下降,其他时

间点上调表达;其余 9 条 *BpSPL* 基因在整个生长季主要呈现下调表达的趋势。

在顶芽中,可以将 *SPL* 基因的表达归为 4 类:第一类的 *BpSPL8*、10、12,除 6 月 20 日、7 月 20 日和 8 月 5 日表达下调外,其他时间点均上调表达,其中 8 月 20 日的表达量达到最高峰,分别上调 2³、2⁴、2⁶ 倍;第二类: *BpSPL4* 在 7 月 20 日后期表达上调,8 月 5 日的表达量达到最高值 2³;第三类: *BpSPL1* 在整个生长季除 7 月 5 日和 9 月 5 日变化不显著,其余时期的表达均下调,9 月 20 日的表达量达到最低峰,下调 2³;第四类:其余 6 条 *BpSPL* 基因在 7 月 5 日和 8 月 20 日至 9 月 20 日显著上调表达,上调 2⁵ ~ 2⁹ 倍。

在茎中, *BpSPL4* 除 7 月 20 日和 8 月 5 日两个时期外,其他时期均上调表达,7 月 5 日的表达量达到最高值 2³; *BpSPL3* 在 7 月 5 日至 8 月 5 日的表达水平显著下调,下调 2³ ~ 2⁵,其余时期均上调表达,8 月 20 日的表达量达到最高值 2³;其余 9 条 *BpSPL* 表整体呈现出表达下调的趋势,7 月 5 日至 8 月 5 日和 9 月 5 日、9 月 20 日表达显著下调,其中 7 月 20 日的表达量达到最低峰,下调 2³ ~ 2⁹ 倍。

在雄花序中, *BpSPL1* 在整个生长季下调表达,9 月 5 日至第二年的 4 月 15 日中,除 4 月 5 日变化不明显外,其余时期均下调表达,其中 4 月 15 日的表达量达到最低值 2⁶; *BpSPL6* 在 6 月 20 日至 8 月 5 日表达显著上调,9 月 20 日至第二年的 4 月 15 日下调,下调 2³ ~ 2¹⁰ 倍,其中 4 月 10 日的表达量达到最低峰,下调 2¹⁰;其它 9 条 *BpSPL* 的表达方式较为相似,在 6 月 20 日至 9 月 5 日多数时期均显著上调,上调 2³ ~ 2⁹ 倍,而在第二年 4 月份的发育时期表达水平相对较低,多数为下调表达,只有 *BpSPL3* 在 4 月 5 日和 4 月 10 日上调表达变化不明显,4 月

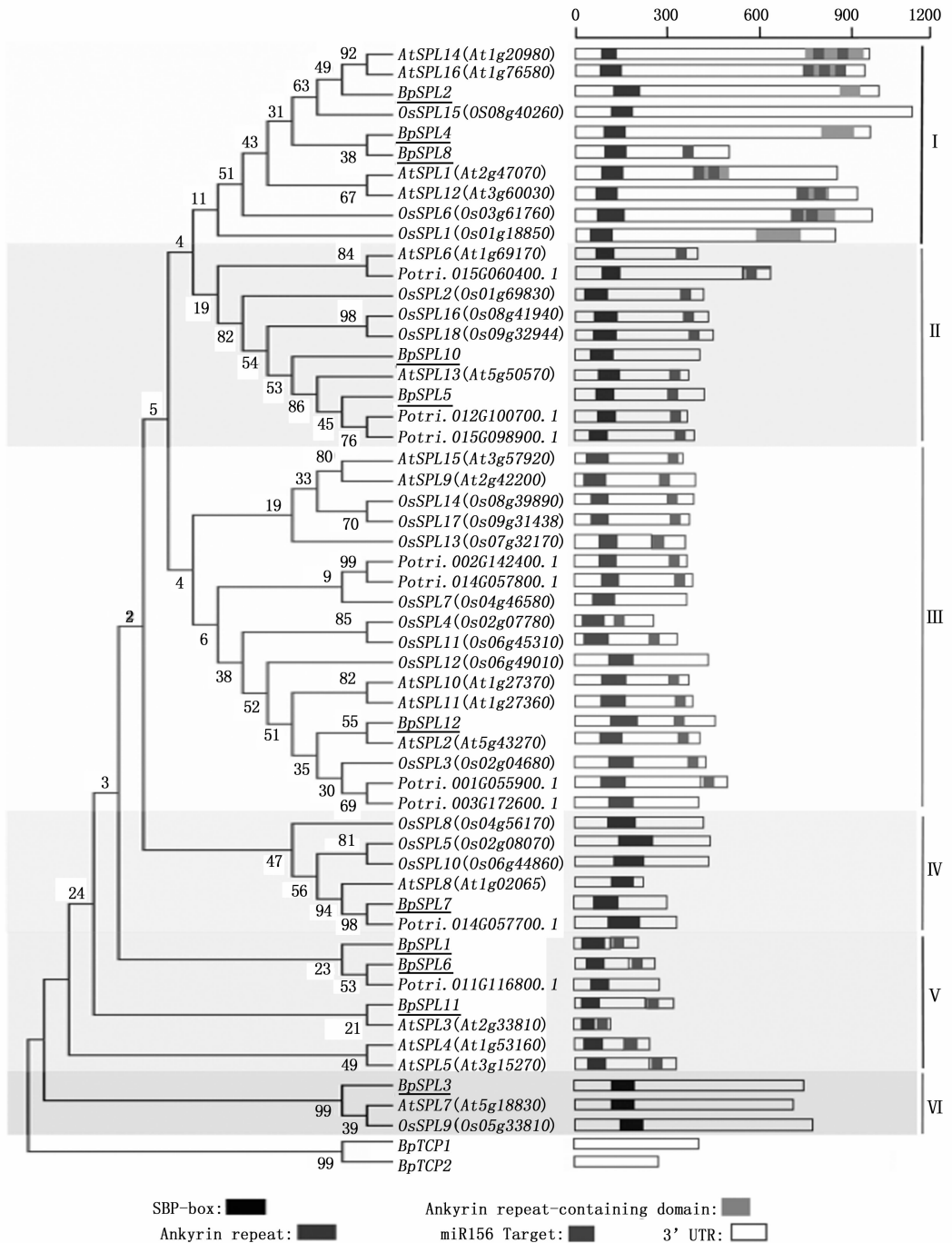


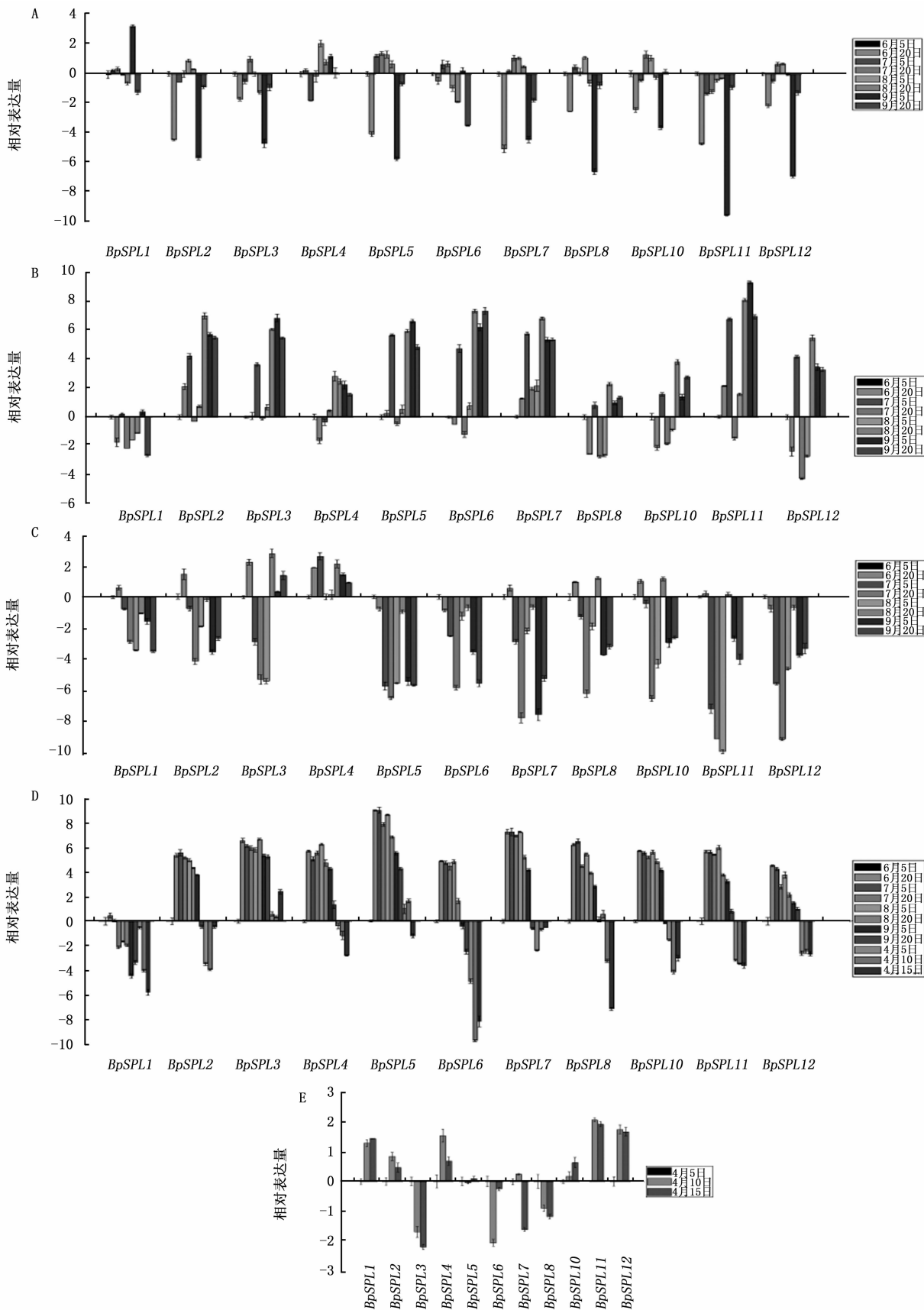
图2 白桦 BpSPL 与其它植物 SPL 的氨基酸序列进化分析

15 日的表达量达到 2^2 。

在雌花序中, *BpSPL1*、*11*、*12* 在 4 月 10 日和 4 月 15 日均上调表达; *BpSPL2*、*5*、*10* 在 4 月 10 日和 4 月 15 日的表达变化不显著, 尤其是 *BpSPL5* 几乎无变化; *BpSPL3*、*6*、*7*、*8* 在 4 月 10 日和 4 月 15 日呈现表达下调的变化趋势, 除 4 月 15 日的 *BpSPL6* 和 4 月 10 日的 *BpSPL7*, 其余的显著下调表达。

3 讨论

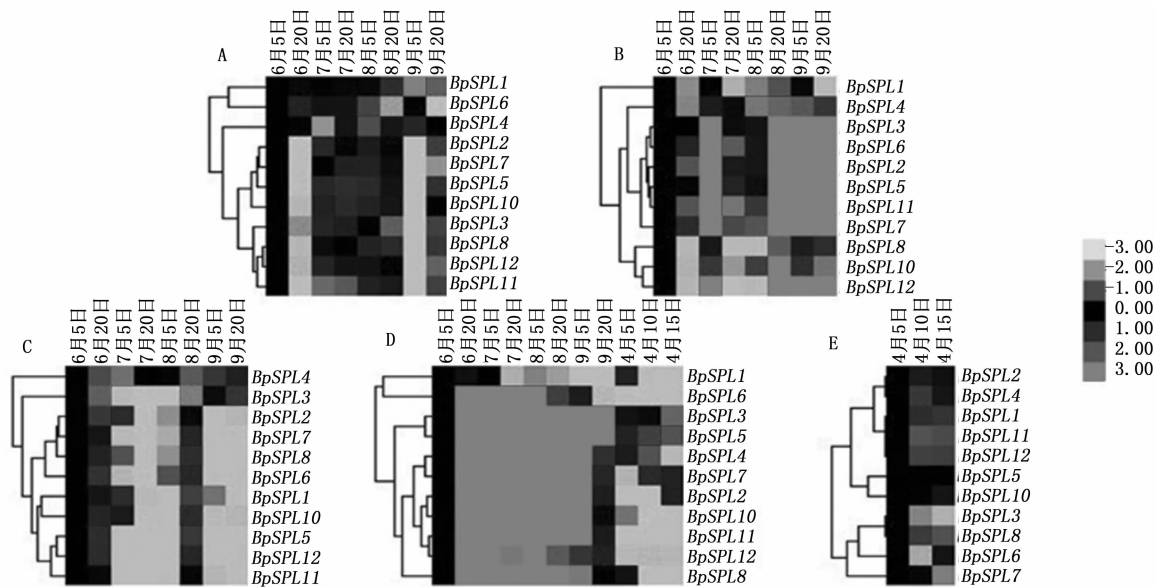
本研究从白桦转录组数据中共找到 12 条 *SPL* 基因, 选取其中的 11 条进行了生物信息学分析, 研究发现, 白桦 BpSPL 蛋白均含有典型的 SBP-Box 结构域, 这一结构普遍存在于目前发现的 SBP 蛋白中^[24]。*SPL* 基因在基因组中由不等数目的外显子和



A:叶 B:顶芽 C:茎 D:雄花序 E:雌花序

注:相对表达量 = 转录水平依据对照每个处理/转录,所有的相对表达水平均为 log2 转化,误差线所示为多次重复的实时 PCR 分析。

图3 白桦 *BpSPL* 基因在不同部位不同时期的表达分析



A:叶 B:顶芽 C:茎 D:雄花序 E:雌花序

图4 白桦 *BpSPL* 基因在同一部位中不同时期的表达聚类分析

内含子串联排布所组成,拟南芥中根据 *SPL* 基因家族的基因组结构特征可将其分成 2 类,第 1 类包括 *AtSPL1*、7、12、14、16,它们含有 10 个及以上的外显子,第 2 类 12 条 *AtSPL* 则含有 2~4 个外显子^[25]。而在白桦的研究中也发现,*BpSPL2*、3、4 含有 10 个外显子,其余 8 条 *BpSPL* 基因则含有 2~4 个外显子。目前所发现的受 miR156/miR157 所调控的陆生植物 *SPL* 基因的识别位点高度保守^[26],靶序列位于基因的 3'端或 3'UTR 区域,在拟南芥中 11 条 *AtSPL* 含有 miR156/miR157 识别位点,其中 *AtSPL3* 的 3'UTR 区域存在 miR156 和 miR157 的调控位点^[9]。11 条白桦 *BpSPL* 基因中有 6 条 (*BpSPL1*、5、6、8、11 和 12) 具有 miR156 识别位点,其中有 3 条 (*BpSPL1*、6 和 11) 序列的 miR156 识别位点是位于基因的 3'UTR 区域。进化树分析发现部分白桦 *BpSPL* 基因在进化上与同为木本的杨树 *SPL* 亲缘关系较近,反应了白桦与杨树间的亲缘关系,伴随双子叶植物的不断进化,相应的 *SPL* 基因可能也存在进一步的功能特化。不同 *BpSPL* 基因在序列长度、基因结构、进化关系等方面具有较大的差异,这暗示着它们可能参与到了多种不同的生理过程。

SPL 基因是植物所特有的一类的转录因子,目前林木中,*SPL* 基因的功能和调控机制仍然不明确,由于缺乏可用转基因平台或突变体,目前对木本植物 *SPL* 基因功能的鉴定大多是通过表达分析来进行研究^[27]。白桦 *BpSPL* 基因在所选取的叶、顶芽、茎、雄花序中的表达均达到了显著变化,在顶芽和雄花序中

从 6 月份到 9 月份的生长阶段,*SPL* 的表达水平呈现逐渐升高的趋势,暗示其可能参与到了顶芽和雄花序的生长发育过程。在不同器官及不同发育时期的荔波连蕊茶 (*C. liponesis* Chang et Xu) 中的 *GA2ox1* 基因均有表达,且表达量有所不同,这与白桦中 *SPL* 基因的表达规律相一致^[28]。已有研究表明,拟南芥中所有的 *AtSPL* 基因在花分生组织和四轮花器官中均表达,在茎、叶和根等营养器官中亦有表达^[16]。研究枳 (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) *PtSPL9* 和 *PtSPL13* 的表达分析,发现两者在叶、茎、根、花、果等各个器官均有表达,在茎和幼果中的表达量最高,推测其可能参与茎和果实的发育相关^[29]。陆地棉 (*Gossypium hirsutum* Linn.) *GhSPL3* 在根、茎、叶、花、顶芽中均有表达,并且在具 3 片真叶的顶芽和花中表达量最高^[30]。这说明 *SPL* 基因的组成性表达在高等植物中可能是保守的,也暗示了其功能的多样性。

4 结论

生物信息学研究发现,白桦 *BpSPL* 蛋白均含有典型的 SBP-Box 结构域。白桦 *BpSPL* 基因由不等数目的外显子和内含子串联排布组成,根据外显子数目可将这些基因大致分为两类:*BpSPL2*、3、4 含有 10 个外显子,其余 8 条 *BpSPL* 基因则含有 2~4 个外显子。11 条白桦 *BpSPL* 基因中有 6 条 (*BpSPL1*、5、6、8、11 和 12) 具有 miR156 识别位点。进化树分析发现部分白桦 *BpSPL* 基因与杨树 *SPL* 基因亲缘关系较近。不同白桦 *BpSPL* 基因在序列长度、基因

结构、进化关系等方面存在较大的差异,这暗示着它们可能参与到了多种不同的生理过程。

白桦*BpSPL*基因在所选取的不同时期的叶、顶芽、茎、雄花序和雌花序中均有表达,且达到了显著差异,自6月份到9月份的生长阶段中,顶芽和雄花序中*BpSPL*的表达水平呈现逐渐升高的变化趋势,暗示*BpSPL*基因可能参与到了顶芽和雄花序的生长发育过程。

参考文献:

- [1] Cardon G H, Höhmann S, Nettesheim K, *et al.* Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene SPL3: A novel gene involved in the floral transition[J]. *The Plant Journal*, 1997, 12(2): 367-377.
- [2] Unte U S, Sorensen A M, Pesaresi P, *et al.* SPL8, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell Online*, 2003, 15(4): 1009-1019.
- [3] Stone JM, Liang X, Nekl ER, *et al.* *Arabidopsis AtSPL14*, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1[J]. *The Plant Journal*, 2005, 41(5): 744-754.
- [4] Nonogaki H. MicroRNA gene regulation cascades during early stages of plant development[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(11): 1840-1846.
- [5] Wang J W, Park M Y, Wang L J, *et al.* miRNA control of vegetative phase change in trees[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(2): e1002012.
- [6] Gou J Y, Felippes F F, Liu C J, *et al.* Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor[J]. *The Plant Cell Online*, 2011, 23(4): 1512-1522.
- [7] Wang J W, Czech B, Weigel D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cell*, 2009, 138(4): 738-749.
- [8] Wu G, Poethig RS. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3[J]. *Development* 2006, 133(18): 3539-3547.
- [9] Gandikota M, Birkenbihl RP, Hhmann S, *et al.* The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings[J]. *The Plant Journal*, 2007, 49(4): 683-693.
- [10] Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, *et al.* Prediction of plant microRNA targets[J]. *cell*, 2002, 110(4): 513-520.
- [11] Schwab R, Palatnik JF, Rieger M, *et al.* Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome[J]. *Developmental cell*, 2005, 8(4): 517-527.
- [12] Klein J, Saedler H, Huijser P. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene SQUAMOSA[J]. *Molecular and General Genetics MGG* 1996, 250(1): 7-16.
- [13] Manning KM, Poole M, Hong Y, *et al.* A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening[J]. *Nature genetics*, 2006, 38(8): 948-952.
- [14] Zhang Y, Schwarz S, Saedler H, *et al.* SPL8, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in *Arabidopsis*[J]. *Plant molecular biology*, 2007, 63(3): 429-439.
- [15] Becraft PW, Bongard-Pierce DK, Sylvester AW, *et al.* The liguleless-1 gene acts tissue specifically in maize leaf development[J]. *Developmental biology*, 1990, 141(1): 220-232.
- [16] Yang J H, Fang Z M, Yu J Q. Relationship between cytoplasmic male sterility and SPL-like gene expression in stem mustard[J]. *Physiol Plantarum*, 2008, 133: 426-434.
- [17] 刘雪梅, 杨传平. 白桦雌雄花发育周期的时序特征[J]. *林业科学*, 2006, (12): 28-32.
- [18] 官民晓, 刘雪梅, 张妍, 等. 白桦 SPL8 转录因子基因的分离及转录表达分析[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2013, 37(3): 17-22.
- [19] Salinas M, Xing S, Hhmann 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.
- [20] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular biology and evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [21] Wang LQ, Qin LP, Liu WJ, *et al.* A novel ethylene-responsive factor from *Tamarix hispida*, ThERF1, is a GCC-box and DRE-motif binding protein that negatively modulates abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2014, 152: 84-97.
- [22] Li HY, Ning K, Song X, *et al.* Molecular Cloning and Expression Analysis of Nine ThTrx Genes in *Tamarix hispida*[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31: 917-924.
- [23] Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, *et al.* A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 337(1): 49-63.
- [24] Guo AY, Zhu QH, Gu XC, *et al.* Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family[J]. *Gene*, 2008, 418, 1-8.
- [25] 李明, 李长生, 赵传志, 等. 植物 SPL 转录因子研究进展[J]. *植物学报*, 2013, 48(001): 107-116.
- [26] Xing S, Salinas M, Hhmann S, *et al.* miR156-targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell Online*, 2010, 22(12): 3935-3950.
- [27] 李玉岭, 周厚君, 林二培, 等. 光皮桦 *BpSPL1* 转录因子基因的克隆, 表达及单核苷酸多态性分析[J]. *林业科学*, 2013, 49(9): 52-61.
- [28] 肖政, 李纪元, 范正琪, 等. 荔波连蕊茶 *GA2ox1* 基因的克隆及表达分析[J]. *林业科学研究*, 2016, 29(1): 41-47.
- [29] 宋长年, 钱剑林, 房经贵, 等. 枳 *SPL9* 和 *SPL13* 全长 cDNA 克隆、亚细胞定位和表达分析[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(10): 2105-2114.
- [30] 李洁, 范术丽, 宋美珍, 等. 陆地棉 *GhSPL3* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. *棉花学报*, 2012, 24(5): 414-419.

(责任编辑:张研)