

异源表达牡丹*PsSPL*基因影响拟南芥营养生长与开花时间

王艳艳, 管世铭, 盖树鹏, 刘春英, 战新梅, 张玉喜*

青岛农业大学生命科学院/山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109

摘要: 课题组前期已经获得了牡丹(*Paeonia suffruticosa*) *SQUAMOSA*启动子结合蛋白基因(*PsSPL*)的全长cDNA, 本研究在此基础上, 实时定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)分析*PsSPL*基因在初花期牡丹的营养器官根、茎、叶和花器官花瓣、萼片、雄蕊中的表达特性, 结果表明*PsSPL*基因在根中表达水平最高, 在茎、花瓣和叶中次之, 在雄蕊和萼片中表达水平最低。本文构建了牡丹*PsSPL*基因的超表达载体并在野生型拟南芥中异源表达, 分析鉴定了3个转基因株系。通过表型观察分析, 发现异源表达*PsSPL*基因的拟南芥开花时间较野生型提前了约3 d, 莲座叶减少了2~3片。PCR结果表明*PsSPL*基因通过促进*LFY*基因从而促进开花提前, 同时发育早期的根长增长, 营养生长结束后株高增高。可见, *PsSPL*基因的功能不是单一的, 它在植株营养生长和生殖生长等方面都发挥了重要作用。

关键词: *PsSPL*; 表达模式; 异源表达; 开花时间; 营养生长

在绿色植物中, *SQUAMOSA promoter-binding protein-like (SPL)*是一类非常特殊的转录因子, 最早是从植物金鱼草(*Antirrhinum majus*)的花序cDNA文库中筛选到, 因为能够识别和结合花器官属性基因*SQUAMOSA (SQUA)*的启动子而得名(Huijser等1992)。迄今为止, 人们已从许多植物如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Cardon等1997)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*) (Zhang等2015)、葡萄(*Vitis vinifera*) (Hou等2013)、番茄(*Solanum lycopersicum*) (Ferreira e Silva等2014)、白桦(*Betula platyphylla*) (张妍等2012)和玉米(*Zea mays*) (Hultquist和Dorweiler 2008)中分离出了多个*SPL*基因家族成员。在植物生长发育的整个过程中, *SPL*基因都发挥着重要的调控作用, 它参与发育阶段的转变、植株的孢子发生、外界胁迫应答、形态建成、花和果实发育、激素信号转导等多个生理生化过程(Gou等2011), 并且在调控生物和非生物胁迫过程中起着重要作用(肖桂青等2015)。

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为芍药科(Paeoniaceae)芍药属的多年生落叶灌木, 因其花大色艳、花香扑鼻而被国人喜爱。牡丹产业是山东菏泽和河南洛阳等牡丹产地的重要农业支撑产业, 但因花期较短影响了其观赏性和经济效益。如何使整个花期延长, 除了花卉生产实践中根据不同气候、温度和湿度等有效方法来处理, 通过转基因技术使开花提前或延后也是一种取之有效的方法。本课题组通过高通量测序, 拼接后得到了15 284个非冗余的牡丹基因序列(Gai等2012), 通过芯片分析筛选到牡丹休眠解除过程中差异表达的

转录因子176个(Gai等2013), 其中包括*SPL*家族成员, 进而通过cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术得到了*PsSPL*基因的全长cDNA。一般来说, 木本植物的分子生物学研究远远落后于模式植物, 重要原因是模式植物更容易分离其基因进行功能分析, 而木本植物生命周期长, 且目前的转基因系统也不完善, 因此对多年生木本植物牡丹的开花时间调控的分子机制仍然知之甚少。在前期研究的基础上, 本研究实时定量分析了其在初花期不同组织中的表达模式; 构建了牡丹*PsSPL*基因的超表达载体并在野生型拟南芥中异源表达, 以研究牡丹*PsSPL*基因的功能。研究结果为进一步探讨*SBP-box*基因家族调控牡丹开花时间的分子机理提供理论参考, 为培育早花品种提供候选基因。

材料与方法

1 总RNA提取、第一链cDNA合成、反转录PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)反应和实时定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)

以四、五年生生长健壮的牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)品种‘鲁荷红’(青岛农业大学植物生理研究室提供)为实验材料, 待日最低温度达到10°C时, 取牡丹花芽液氮速冻, -80°C保存备用。于4月中下旬, 取初花期牡丹的营养器官(根、茎和

收稿 2016-03-24 修定 2016-07-26

资助 国家自然科学基金(31471908和31372104)。

* 通讯作者(E-mail: zhang-yuxi@163.com)。

叶)和花器官(萼片、花瓣和雄蕊)液氮冷冻后 -80°C 保存备用。总RNA的提取采用原平皓生物公司EasySpin植物RNA快速提取试剂盒。RT-PCR用第一链cDNA利用反转录试剂盒(M-MLV Re-

verse Transcriptase, TaKaRa)中的随机引物合成。利用引物对AtLFYF和AtLFYR, 通过RT-PCR进行拟南芥开花途径下游基因*AtLFY*的扩增, *actin*基因做内参(引物序列见表1)。

表1 引物、序列及退火温度

Table 1 Primers, sequences and their annealing temperatures

引物	序列(5'→3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	扩增目的
PsSPLZTF	CCCCGGGATGGACGTGAGCA	58	<i>PsSPL</i> 的ORF扩增
PsSPLZTR	CGAGCTCTTATCTGATCTGGAAATGATTGTAA	58	<i>PsSPL</i> 的ORF扩增
AtLFYF	TTGTGGGTATGAAGGACGAG	55	开花基因 <i>AtLFY</i> 的扩增
AtLFYR	TTGGGAGAGAGCATCAAGAG	55	开花基因 <i>AtLFY</i> 的扩增
PsSPLF1	CAGCGGTTTTGTCAGCAATGTA	55	<i>PsSPL</i> 的定量分析
PsSPLR1	GTAACGCCACTTTCTTTGATGGA	55	<i>PsSPL</i> 的定量分析
PsActinF	GAGAGATTCCGTTGCCCTGA	55	内参
PsActinR	CTCAGGAGGAGCAACCACC	55	内参

*Sma*I或*Sac*I酶切位点用下划线标识。

qPCR用第一链cDNA的合成依照M-MLV Reverse Transcriptase试剂盒说明书进行, cDNA产物用EASY dilution (TaKaRa)稀释 $10\times$ 作为模板, 分别设定3个生物学重复。20 μL 的PCR反应体系根据SYBR Premix DimerEraser试剂盒(TaKaRa)配制, 反应在TP800型实时荧光定量PCR仪(TaKaRa)上进行, 反应条件为: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 共45个循环。设置在延伸收集荧光信号。*actin*为内参, 数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法(Livak和Schmittgen 2001)。

2 *PsSPL*-pBI121超表达载体的构建

根据前期研究结果得到的*PsSPL*基因(GenBank登记号: KP314264)完整编码区(549 bp, 编码182个氨基酸)设计引物PsSPLZTF和PsSPLZTR(引物序列见表1), 利用其进行*PsSPL*基因编码框的扩增, 将扩增产物回收后连接到pMD18-T simple载体, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株, 筛选阳性重组子, 经PCR检测和测序鉴定无误后, 提取质粒, 经*Sma*I和*Sac*I双酶切pMD18-T simple重组质粒与pBI121空载体连接, 测序鉴定无误, 构建*PsSPL*-pBI121超表达载体。

3 蘸花法转染拟南芥

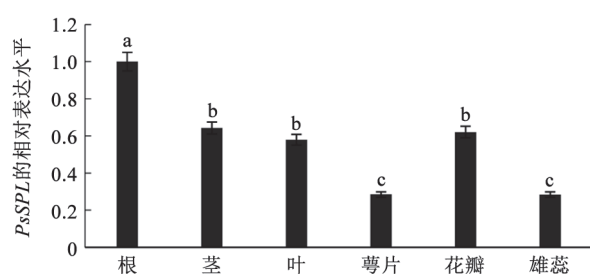
采用蘸花法(Clough和Bent 1998)转染野生型拟南芥(Columbia型), 混合收获 T_0 代种子。 T_0 代种子经 $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素(kanamycin, Kan)的MS固

体培养基培养, 选取 T_1 代转基因阳性植株, 利用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取基因组DNA(Jhala等2015), 利用引物对PsSPLZTF和PsSPLZTR进行PCR检测。提取转基因阳性植株和野生型拟南芥的RNA(方法同上), 反转录成cDNA, 利用引物对PsSPLZTF和PsSPLZTR检测目的基因在转基因植株中的表达情况, 之后继续进行 $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的Kan筛选和RT-PCR鉴定, 获得纯合体植株用于表型鉴定。将同时期收获的野生型和纯合体 T_3 代种子经过 4°C 处理3 d打破休眠后, 点种于MS固体培养基上, 光照培养箱(22°C , 16 h光/8 h暗)内垂直生长13 d, 每天记录拟南芥的主根长度。把MS固体培养基上正常生长10 d的幼苗移植于营养土(每株系20棵), 在长日照条件下(22°C , 16 h光/8 h暗)培养, 统计开花时间和株高。开花时间统计有两个指标: 从播种到抽薹1~2 cm的时间及此时莲座叶的数目。数据利用Excel进行统计分析。

实验结果

1 *PsSPL*基因在牡丹初花期不同组织中的表达模式

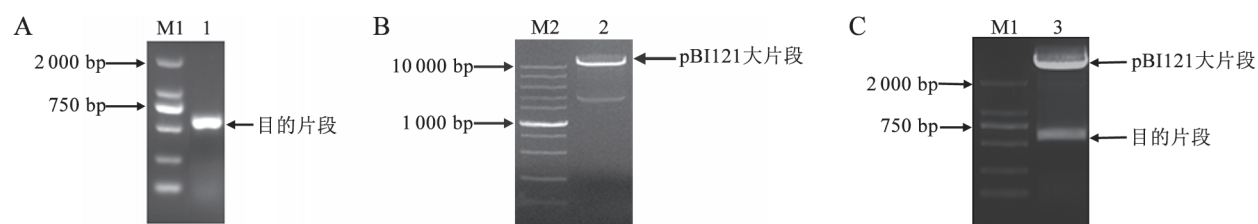
实时定量PCR分析*PsSPL*基因在初花期牡丹的营养器官根、茎、叶和花器官花瓣、萼片、雄蕊中的表达特性(图1), 结果表明*PsSPL*基因在牡丹初花期的不同组织中均有表达, 但表达水平存在一定差

图1 *PsSPL*在初花期牡丹不同组织中的表达模式Fig.1 The relative expression levels of *PsSPL* in different tree peony tissues at the early stage of flowering

异, 其中在营养器官的根中表达水平最高, 在茎、花瓣和叶中次之, 在雄蕊和萼片中表达水平最低。

2 *PsSPL*-pBI121超表达载体的构建

根据已获得的*PsSPL*基因全长cDNA序列设计引物, 利用引物对*PsSPL*ZTF和*PsSPL*ZTR扩增*PsSPL*基因的完整编码框, 如图2-A所示, 编码区共549 bp。回收PCR产物, 将回收产物与pMD18-T simple载体连接, 经测序无误后, 用*Sma*I和*Sac*I将pMD18-T simple载体的重组质粒双酶切, pBI121空质粒进行双酶切(图2-B), 回收目的片段与pBI121

图2 *PsSPL*完整编码框的扩增(A)、pBI121空质粒载体(B)和*PsSPL*-pBI121超表达质粒载体(C)的*Sma*I/*Sac*I双酶切Fig.2 Amplification of coding region of *PsSPL* (A), and double digests of *Sma*I and *Sac*I of pBI121 vector (B) and *PsSPL*-pBI121 over-expression vector (C)

M1: DL2000 Marker; M2: DL10000 Marker; 1: *PsSPL*编码区扩增片段; 2: pBI121载体大片段; 3: *PsSPL*-pBI121过表达质粒载体的*Sma*I/*Sac*I双酶切。

的大片段, 利用T₄连接酶将二者连接, 经双酶切鉴定(图2-C)、菌落PCR和测序鉴定成功筛选得到*PsSPL*-pBI121超表达载体。

3 转*PsSPL*基因拟南芥的表型鉴定

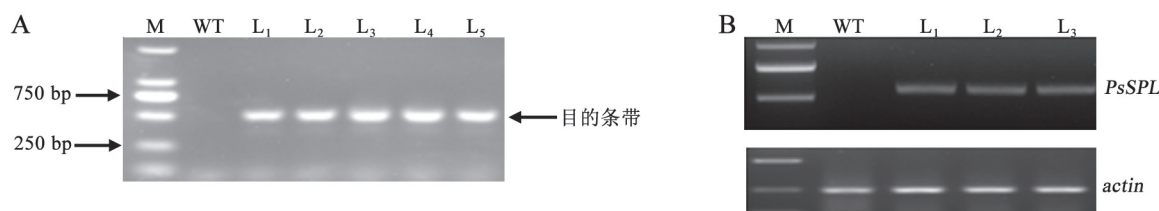
3.1 转*PsSPL*基因植株的筛选

将构建的*PsSPL*基因超表达载体转入根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105菌株, 利用蘸花法转化野生型拟南芥, 收取转*PsSPL*基因T₀代拟南芥的种子, 用Kan固体培养基进行筛选, 挑选根系发达, 生长状态良好的绿色幼苗, 移到营养土中继续培养。提取5个转*PsSPL*基因T₁代拟南芥

叶片的基因组DNA, 利用引物*PsSPL*ZTF和*PsSPL*ZTR进行PCR检测, 结果表明野生型拟南芥中无特异性条带, 而转*PsSPL*基因的植株中有约600 bp的目的条带(图3-A), 说明*PsSPL*基因已经插入拟南芥基因组。之后选取其中3株(L₁、L₂和L₃)提取RNA, 反转录成cDNA进行RT-PCR鉴定(图3-B), 结果显示, 外源基因*PsSPL*在所检测的3个株系中都得到表达。

3.2 *PsSPL*转基因植株的莲座叶

将野生型和转基因T₃代纯合体种子在MS固体培养基上正常生长10 d的幼苗移植到营养土中,

图3 野生型和*PsSPL*转基因拟南芥的qPCR (A)和RT-PCR (B)鉴定Fig.3 qPCR and RT-PCR of wild and *PsSPL*-transgenic *A. thaliana* plants

M: DL2000 Marker; WT: 野生型拟南芥, 图4~6和表2同; L₁~L₅: *PsSPL*转基因拟南芥的5个株系。

继续生长18 d后(茎高约1 cm), 转基因植株的莲座叶已经全部展开, 统计并记录其莲座叶的数目。结果表明, *PsSPL*转基因拟南芥株系的莲座叶形态与野生型拟南芥相比并没有明显的差异, 但转基因拟南芥莲座叶数目少于野生型, 平均比野生型少2~3片(图4)。

3.3 *PsSPL*转基因拟南芥的开花时间分析及下游开花基因*LFY*的表达

选取同时期移入营养土中的T₃代*PsSPL*转基因型和野生型拟南芥各20株, 分别统计每株拟南



图4 野生型和*PsSPL*转基因拟南芥植株的莲座叶数目
Fig.4 Number of rosette leaves of wild and *PsSPL*-transgenic *A. thaliana* plants

I-III: *PsSPL*转基因拟南芥的3个株系; 表2和图5、6同。

芥开花时间(表2和图5-A)。结果显示, T₃代*PsSPL*转基因植株开花时间均显著早于野生型, 野生型拟南芥的平均开花时间为23.55 d, 而*PsSPL*转基因拟南芥的平均开花时间为20.65、20.45和21.45 d, 开花时间提前约2~3 d。不同的转基因株系均表现为开花时间提前, 转基因株系I、II与转基因株系III差异显著。由此推测, *PsSPL*基因参与开花进程并促进该进程发生, 使开花时间提前。

为研究*PsSPL*基因在拟南芥中的作用机制, 利用引物对AtLFYF和AtLFYR对*AtSPL*基因下游靶基因*AtLFY*进行RT-PCR扩增, 结果表明, 转基因型植株与野生型植株相比, 下游开花基因*AtLFY*的转录水平提高(图5-B), 暗示*PsSPL*基因可能通过促进下游开花基因*LFY*的表达使开花时间提前。

3.4 *PsSPL*转基因植株的根长和株高统计

以同时期收获的转基因型和野生型拟南芥种子, 4°C条件下打破休眠, 点种于MS固体培养基上垂直培养3 d, 挑选生长情况一致的幼苗, 摆放在无菌的MS培养基上继续垂直培养10 d, 观测其根系的生长情况(表2和图6-A)。观察和统计结果表明*PsSPL*转基因株系的主根长度显著长于同时期的野生型拟南芥, 由此可见*PsSPL*基因促进了拟南芥生长早期主根的生长和伸长。

将野生型和转基因拟南芥植株从MS固体培

表2 野生型和*PsSPL*转基因拟南芥的表型统计

Table 2 The phenotype statistics of wild and *PsSPL*-transgenic *A. thaliana* plants

植株	植株总数	莲座叶数	开花时间/d	株高/cm	主根长/cm
WT	20	11.20±0.40 ^a	23.55±0.58 ^a	15.41±0.32 ^c	1.14±0.15 ^d
I	20	8.15±0.36 ^c	20.65±0.57 ^c	18.54±0.23 ^a	1.85±0.08 ^a
II	20	8.25±0.43 ^c	20.45±0.49 ^c	18.49±0.13 ^a	1.77±0.10 ^b
III	20	9.20±0.40 ^b	21.45±0.49 ^b	17.71±0.18 ^b	1.63±0.08 ^c

同列数据用不同小写字母标识表示差异显著($P<0.05$)。



图5 野生型和*PsSPL*转基因植株开花时间(A)及下游开花基因*AtLFY*的表达(B)

Fig.5 The flowering time (A) and the expression of *AtLFY*, a downstream flowering gene (B), in wild and *PsSPL*-transgenic *A. thaliana* plants

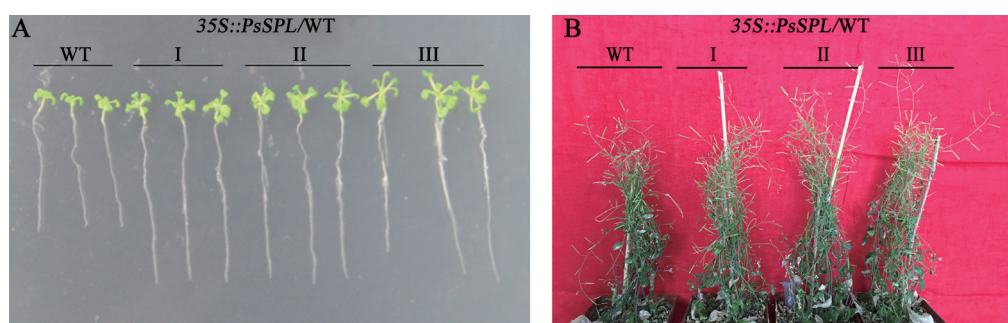


图6 野生型和*PsSPL*转基因拟南芥的主根长度(A)和营养生长结束时的株高(B)

Fig.6 The main root lengths of wild and *PsSPL*-transgenic *A. thaliana* plants, and plant heights of wild and *PsSPL*-transgenic *A. thaliana* after completing vegetative growth

培养基上移植到营养土中,从第35日开始统计转基因植株与野生型植株的株高,此时野生型拟南芥植株平均高度约为12 cm,而转基因拟南芥植株平均高度约为14 cm。当野生型和转基因型拟南芥的营养生长结束时,转基因型较野生型拟南芥的株高平均高约2~3 cm (表2和图6-B),推测*PsSPL*基因可能促进拟南芥茎的生长。

讨 论

以往研究报道了*SPL*基因的功能,其参与了植物生长发育的许多生理过程,包括植物形态建成(Jiao等2010)、孢子发生(Unte等2003)、成花过程、果实发育和成熟(Manning等2006)、信号转导(Zhang等2007)、叶片的发育(Wu和Poethig 2006)、抗性(Stone等2005)等。本研究利用qPCR分析*PsSPL*基因在初花期牡丹的营养器官和花器官中的表达特性,结果表明*PsSPL*基因在营养器官的根中表达水平最高,在茎、花瓣和叶中次之,在雄蕊和萼片中表达水平最低。Yang等(2008)发现所有的*SPL*基因在拟南芥的花器官和营养器官中均有表达。宋长年等(2010)发现两个*SPL*基因在营养器官和花器官中的表达水平存在一定差异,暗示了两个*SPL*基因对枳(*Poncirus trifoliata*)的营养与生殖器官发育都有作用,但作用大小可能不同。本文研究结果暗示*PsSPL*基因既参与了牡丹营养器官的发育,又参与了花器官的发育。为了进一步研究其功能,我们将*PsSPL*基因转入拟南芥中,结果表明过表达*PsSPL*基因后,拟南芥的莲座叶数目减少,开花时间提前,这与拟南芥(Wang等2008; Schwarz等2008)、番茄(Salinas等2012)、玉

米(Chuck等2010)等的同源基因具有类似的功能。在拟南芥中过量表达*AtSPL3*基因引起植株幼年期缩短,使开花期提前(Guo和Zhu 2008)。白桦树的*BpSPL1*基因与拟南芥的*AtSPL3*基因具有很高的同源性,能特异结合*BpMADS5*基因的启动子,参与调节花的发育(Lännpää等2004)。*SPL*基因在植物开花调控网络中则处于中心地位,能够整合赤霉素(gibberellin, GA)和光周期两条花发育的途径。本研究中,通过分析转基因型植株与野生型植株中下游开花基因*AtLFY*的表达量,发现转基因植株中其表达水平升高,暗示了*PsSPL*基因通过促进下游基因*AtLFY*的表达使开花时间提前,该结果与拟南芥中*AtSPL3*的功能相同,其直接激活花分生组织基因*LFY*,从而调控开花时间(Yamaguchi等2009)。研究结果揭示了*PsSPL*基因在从营养生长到开花过程中通过促进*LFY*基因起着促进开花的作用,是调控植物体开花过程的重要因子。*SPL*的基因家族中,各个成员之间起着不同的作用。在植物茎的分生组织中,*SPL*基因既可以通过*FUL*基因调控*API*基因的表达,也可以直接调控于*API*基因(Birkenbihl等2005)。白桦树的*BpSPL1*基因能特异结合*BpMADS5*基因的启动子,参与调节花的发育(Lännpää等2004)。拟南芥的*SPL8*基因影响花药的发育(Unte等2003),*SPL14*作为负调控因子影响营养生长到开花的转换过程(Wu和Poethig 2006),*SPL9*的功能缺失导致营养生长时期叶原基形成间隔期变短,以及花序结构的改变和分支增强(Chuck等2010)。该研究统计了转基因植株的根长和株高,发现转基因植株与野生型相比,主根和茎要显著长于野生型拟南芥。这些研究结果说明

*PsSPL*基因不仅参与开花过程,也影响了营养器官的生长和发育。本研究为进一步探讨*PsSPL*基因调控牡丹营养器官和花器官发育以及开花时间过程中的分子机制提供了理论参考。

参考文献

- Birkenbihl RP, Jach G, Saedler H, Huijser P (2005). Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains. *J Mol Biol*, 352 (3): 585–596
- Cardon GH, Höhmann S, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P (1997). Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. *Plant J*, 12 (2): 367–377
- Chuck G, Whipple C, Jackson D, Hake S (2010). The maize SBP-box transcription factor encoded by *tasselsheath4* regulates bract development and the establishment of meristem boundaries. *Development*, 137 (8): 1243–1250
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16 (6): 735–743
- Ferreira e Silva GF, Silva EM, da Silva Azevedo M, Guivin MAC, Ramiro DA, Figueiredo CR, Carrer H, Peres LEP, Nogueira FTS (2014). microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. *Plant J*, 78 (4): 604–618
- Gai S, Zhang Y, Liu C, Zhang Y, Zheng G (2013). Transcript profiling of *Paeonia ostii* during artificial chilling induced dormancy release identifies activation of GA pathway and carbohydrate metabolism. *PLoS ONE*, 8 (2): e55297
- Gai S, Zhang Y, Mu P, Liu C, Liu S, Dong L, Zheng G (2012). Transcriptome analysis of tree peony during chilling requirement fulfillment: assembling, annotation and markers discovering. *Gene*, 497 (2): 256–262
- Gou JY, Felippes FF, Liu CJ, Weigel D, Wang JW (2011). Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-targeted SPL transcription factor. *Plant Cell*, 23 (4): 1512–1522
- Guo AY, Zhu QH, Gu X, Ge S, Yang J, Luo J (2008). Genome-wide identification and evolutionary analysis of the plant specific SBP-box transcription factor family. *Gene*, 418 (1): 1–8
- Hou H, Li J, Gao M, Singer SD, Wang H, Mao L, Fei Z, Wang X (2013). Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family genes in grape. *PLoS ONE*, 8 (3): e59358
- Huijser P, Klein J, Lönning WE, Meijer H, Saedler H, Sommer H (1992). Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *EMBO J*, 11 (4): 1239–1249
- Hultquist JF, Dorweiler JE (2008). Feminized tassels of maize *mop1* and *ts1* mutants exhibit altered levels of miR156 and specific SBP-box genes. *Planta*, 229 (1): 99–113
- Jhala VM, Mandaliya VB, Thaker VS (2015). Simple and efficient protocol for RNA and DNA extraction from rice (*Oryza sativa* L.) for downstream applications. *Int Res J Biol Sci*, 4 (2): 62–67
- Jiao Y, Wang Y, Xue D, Wang J, Yan M, Liu G, Dong G, Zeng D, Lu Z, Zhu X, et al (2010). Regulation of *OsSPL14* by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nat Genet*, 42 (6): 541–544
- Länneppää M, Jänönen I, Hölttä-Vuori M, Gardemeister M, Porali I, Sopanen T (2004). A new SBP-box gene *BpSPL1* in silver birch (*Betula pendula*). *Physiol Plant*, 120 (3): 491–500
- Livak J, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet*, 38 (8): 948–952
- Salinas M, Xing S, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P (2012). Genomic organization phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. *Planta*, 235 (6): 1171–1184
- Schwarz S, Grande AV, Bujdoso N, Saedler H, Huijser P (2008). The microRNA regulated SBP-box genes *SPL9* and *SPL15* control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 67 (1): 183–195
- Song CN, Qian JL, Fang JG, Wang HK, Qiu XL, Zhang Z, Zhang XY (2010). Cloning, subcellular localization and expression analysis of *SPL9* and *SPL13* genes from *Poncirus trifoliata*. *Sci Agric Sin*, 43 (10): 2105–2114 (in Chinese with English abstract) [宋长年, 钱剑林, 房经贵, 王化坤, 邱学林, 章镇, 张晓莹(2010). 枳*SPL9*和*SPL13*全长cDNA克隆、亚细胞定位和表达分析. 中国农业科学, 43 (10): 2105–2114]
- Stone JM, Liang X, Nekl ER, Stiers JJ (2005). *Arabidopsis AtSPL14*, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant J*, 41 (5): 744–754
- Unte US, Sorensen AM, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser P (2003). *SPL8*, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15 (4): 1009–1019
- Wang JW, Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D (2008). Dual effects of miR156-targeted *SPL* genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 20 (5): 1231–1243
- Wu G, Poethig RS (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *miR156* and its target *SPL3*. *Development*, 133 (18): 3539–3547
- Xiao G, Lu X, Huang R, Zhang H (2015). Abiotic stresses and hormones responses in expression of three LMM genes in rice. *Mol Plant Breed*, 13 (7): 1462–1468 (in Chinese with English abstract) [肖桂青, 卢向阳, 黄荣峰, 张海文(2015). 3个水稻类病変基因的逆境胁迫及激素响应特征. 分子植物育种, 13 (7): 1462–1468]
- Yamaguchi A, Wu MF, Yang L, Wu G, Poethig RS, Wagner D (2009). The microRNA-regulated SBP-Box transcription factor *SPL3* is a direct upstream activator of *LEAFY*, *FRUITFULL*, and *APETALA1*. *Dev Cell*, 17 (2): 268–278

- Yang JH, Fang ZM, Yu JQ (2008). Relationship between cytoplasmic male sterility and *SPL*-like gene expression in stem mustard. *Physiol Plant*, 133: 426–434
- Zhang X, Dou L, Pang C, Song M, Wei H, Fan S, Wang C, Yu S (2015). Genomic organization, differential expression, and functional analysis of the *SPL* gene family in *Gossypium hirsutum*. *Mol Genet Genom*, 290 (1): 115–126
- Zhang Y, Liu Y, Sun FB, Dai C, Liu XM (2012). Isolation and expression of APETALA2 transcription factor gene in *Betula plaophylla*. *For Res*, 25 (2): 254–260 (in Chinese with English abstract) [张妍, 刘瀛, 孙丰宾, 戴超, 刘雪梅(2012). 白桦APETALA2 (AP2)转录因子基因的分离及其表达. 林业科学研究, 25 (2): 254–260]
- Zhang Y, Schwarz S, Saedler H, Huijser P (2007). SPL8, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 63 (3): 429–439

Heterologous expression of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) *SQUAMOSA* promoter-binding protein-like (*PsSPL*) gene in *Arabidopsis thaliana* affects the vegetative growth and flowering time

WANG Yan-Yan, GUAN Shi-Ming, GAI Shu-Peng, LIU Chun-Ying, ZHAN Xin-Mei, ZHANG Yu-Xi*

College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University / Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: In our recent research, the full-length cDNA sequence of *PsSPL* have been obtained. In this study, the expression pattern of *PsSPL* at the early stage of flowering was analyzed by quantitative real-time PCR (qPCR), and the results show that *PsSPL* was expressed ubiquitously in various organs and tissues, but the expression levels were different, and the transcript of *PsSPL* was the highest in the root, lower in stem, petal and leaf, and the lowest in the stamen and sepal. In addition, the over-expression vector of *PsSPL* gene was constructed and heterologously expressed in wild *Arabidopsis thaliana*. Three transgenic lines were identified. By phenotypic analysis, heterologous expression of the *PsSPL* gene in *A. thaliana* accelerated early flowering for about 3 days and reduced the number of rosette leaves (2~3). The results of PCR indicate that *PsSPL* gene accelerated flowering by promoting the expression of *FLY* gene. In addition, heterologous expression of the *PsSPL* gene in *A. thaliana* promoted main root length at the early stage of growth and increased plant height after completing vegetative growth. Therefore, the *PsSPL* gene is not a single functional gene, and it plays important roles both in vegetative and reproductive growths.

Key words: *PsSPL*; expression pattern; heterologous expression; flowering time; vegetative growth

Received 2016-03-24 Accepted 2016-07-26

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31471908 and 31372104).

*Corresponding author (E-mail: zhang-yuxi@163.com).