

# 资阳香橙砧木 *CjSPL* 基因家族鉴定及表达模式分析

彭洪娴<sup>#</sup>, 邱洁雅<sup>#</sup>, 惠秋玲, 徐媛媛, 淳长品, 凌丽俐, 曹立, 何义仲, 彭良志, 付行政<sup>\*</sup>

西南大学柑桔研究所 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712

彭洪娴, 邱洁雅, 惠秋玲, 徐媛媛, 淳长品, 凌丽俐, 曹立, 何义仲, 彭良志, 付行政. 资阳香橙砧木 *CjSPL* 基因家族鉴定及表达模式分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 625-639.

PENG Hongxian, QIU Jieya, HUI Qiuling, XU Yuanyuan, CHUN Changpin, LING Lili, CAO Li, HE Yizhong, PENG Liangzhi, FU Xingzheng. Identification of *CjSPL* gene family in Ziyang Xiangcheng rootstock and expression pattern analysis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 625-639.

**摘 要:** 鳞片启动子结合类蛋白 squamosa promoter binding protein-like, SPL)家族是一类参与调控植物生长发育以及响应环境胁迫的重要转录因子,但在柑橘等多年生果树中的研究较少。本研究以柑橘一种重要的砧木——资阳香橙(*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka)为材料,基于 plantTFDB 转录因子数据库和甜橙基因组数据库鉴定并克隆出资阳香橙 15 个 *SPL* 家族基因,命名为 *CjSPL1*–*CjSPL15*。序列分析表明, *CjSPLs* 的开放阅读框(open reading frame, ORF)长度为 393–2 865 bp,编码 130–954 个氨基酸;系统进化树将 15 个 *CjSPLs* 分为 9 个亚家族;基因结构和保守结构域分析预测出 20 个不同的保守 motif 和 SBP 基本结构域;启动子顺式作用元件分析预测出 20 种启动子元件,其中包含植物生长发育、非生物胁迫及次生代谢物相关元件。通过实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)分析了 *CjSPLs* 在干旱、盐和低温胁迫下的表达模式,较多 *CjSPLs* 在胁迫处理后显著上调表达。本研究为后续深入研究柑橘及其他果树 *SPL* 家族转录因子功能提供参考。

**关键词:** 资阳香橙; *SPL* 基因家族; 非生物胁迫; 表达模式

资助项目: 国家自然科学基金(32072550); 国家重点研发计划(2018YFD1000300); 国家现代农业(柑橘)产业技术体系建设专项(CARS-26)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072550), the National Key Research and Development Program of China (2018YFD1000300), and the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-26).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: fuxingzheng@cric.cn

Received: 2022-08-23; Accepted: 2022-10-25; Published online: 2022-10-31

# Identification of *CjSPL* gene family in Ziyang Xiangcheng rootstock and expression pattern analysis

PENG Hongxian<sup>#</sup>, QIU Jieya<sup>#</sup>, HUI Qiuling, XU Yuanyuan, CHUN Changpin, LING Lili, CAO Li, HE Yizhong, PENG Liangzhi, FU Xingzheng<sup>\*</sup>

National Citrus Engineering Research Center, Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China

**Abstract:** Squamosa promoter binding protein-like (SPL) family is a group of important transcription factors involved in the regulation of plant growth and development and the response to environmental stress, but there are few studies in perennial fruit trees such as citrus. In this study, Ziyang Xiangcheng (*Citrus junos* Sib.ex Tanaka), an important rootstock of Citrus, was used as the material for analysis. Based on plantTFDB transcription factor database and sweet orange genome database, 15 *SPL* family members were genome-widely identified and cloned from Ziyang Xiangcheng, and named *CjSPL1*–*CjSPL15*. Sequence analysis showed that the open reading frame (ORF) length of *CjSPLs* ranged from 393 bp to 2 865 bp, encoding 130–954 amino acids. Phylogenetic tree divided 15 *CjSPLs* into 9 subfamilies. Gene structure and conserved domain analysis predicted 20 different conserved motifs and SBP basic domains. Analysis of *cis*-acting promoter elements predicted 20 different promoter elements, including those related to plant growth and development, abiotic stress and secondary metabolites. The expression patterns of *CjSPLs* under drought, salt and low temperature stresses were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and many *CjSPLs* were significantly up-regulated after stress treatment. This study provides a reference for further study on the function of *SPL* family transcription factors in citrus and other fruit trees.

**Keywords:** Ziyang Xiangcheng; *SPL* gene family; abiotic stress; expression pattern

转录因子是启动下游靶基因表达的开关,参与动植物生长发育、逆境应答等一系列生物学过程的响应和调控<sup>[1]</sup>。鱗片(squamosa)启动子结合类蛋白(squamosa promoter binding protein-like, *SPL*)家族成员是植物特有的一类转录因子,最早由 Klein 等<sup>[2]</sup>在金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)中发现 2 个被推定为转录因子的蛋白分子 SBP1 和 SBP2,这 2 个蛋白分子在离体条件下可以与花分生组织特征基因 *SQUAMOSA* 启动子序列元件相互作用。之后,通常把含有 SBP 结构域的蛋白归为一类转录因子,隶属于 *SPL* 家族。SBP

结构域由约 78 个氨基酸残基组成,含有 3 个重要的功能性基序:锌指 1 (zinc finger 1, Zn1)、锌指 2 (zinc finger 2, Zn2)和核定位信号区(NLS)<sup>[3]</sup>,经预测锌指结构域位于 N 端,核定位信号区位于 C 端<sup>[4]</sup>,其 N 端和 C 端分别用于 GTAC 碱基序列结合和蛋白入核转运<sup>[5-7]</sup>。

目前,已在多种植物中分析和鉴定出 *SPL* 家族基因,且不同植物中 *SPL* 基因数目存在差异,如拟南芥中有 17 个<sup>[8]</sup>,水稻中有 19 个<sup>[9]</sup>,番茄中有 16 个<sup>[10]</sup>,丹参中有 15 个<sup>[11]</sup>,陆地棉中有 30 个<sup>[12]</sup>,桃中有 25 个<sup>[13]</sup>,菠萝中有 16 个<sup>[14]</sup>,

葡萄中有 45 个<sup>[15]</sup>, 甜橙中鉴定出 15 个<sup>[16]</sup>, Shalom 等<sup>[17]</sup>在克里曼丁橘中也鉴定出 15 个。

大量研究表明, SPL 家族在植物的生长发育和逆境应答中发挥重要功能。Wang 等<sup>[18]</sup>发现, 拟南芥 *SPL2* 通过调控下游基因 *AS2* 来维持植物花器官和果实的正常发育; 在拟南芥中过表达 *SPL7* 和 *SPL8* 促进了植株开花<sup>[19]</sup>; Unte 等<sup>[20]</sup>发现 *SPL8* 可以影响植物花的雄蕊丝伸长; 番茄 *SiSPL* 基因参与调控果实的成熟<sup>[21]</sup>; 拟南芥和水稻中的 *SPL10* 都参与调控植株毛体的形成<sup>[22]</sup>, 马铃薯 *StSPL9* 可以调控侧根发育<sup>[23]</sup>。此外, SPL 家族成员参与植物逆境胁迫也有较多相关报道。例如, 拟南芥 *AtSPL1* 和 *AtSPL12* 通过 ABA 信号通路响应高温胁迫<sup>[24]</sup>; 水稻中 *OsSPL10* 负调控其耐盐性<sup>[25]</sup>, *OsSPL3* 响应干旱胁迫<sup>[26]</sup>; 苹果中 *miR156-MdSPL3* 模式通过直接调控 *MdWRKY33* 基因的表达响应植物盐胁迫<sup>[27]</sup>; 白桦 *BpSPL9* 基因响应盐旱胁迫<sup>[28]</sup>; 茶树 *CsSBP12* 响应低温胁迫并影响花青素的积累<sup>[29]</sup>。

柑橘是世界第一大宗水果, 也是我国种植面积和产量第一的水果, 其营养成分丰富, 不论是鲜果出售或是加工产品都深受消费者的喜爱。柑橘树体是由地下部的砧木和地上部的接穗组成<sup>[30-31]</sup>。砧木不仅影响果实品质, 还极大影响果树抗病、抗旱、抗盐、抗低温等抗逆性<sup>[32-35]</sup>。资阳香橙(*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka)是近年来柑橘中被广泛应用的新型砧木, 耐盐碱、生长势强<sup>[36-38]</sup>, 对该砧木抗性机制的研究, 有助于发掘重要抗性基因。本文以资阳香橙为材料, 从全基因组范围对资阳香橙 *SPL* 家族基因进行鉴定和克隆, 从结构和进化角度探讨资阳香橙 *SPL* 基因的潜在功能, 分析其在不同非生物胁迫下的表达模式, 以深入了解和认识 *SPL* 基因家族在资阳香橙逆境响应中的作用, 为柑橘抗性基因的挖掘和抗性机制的解析奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料 with 处理

本研究以资阳香橙为材料, 种子采集于西南大学柑桔研究所 948 果园, 参照张晓勇<sup>[39]</sup>的方法对种子进行催芽和水培培养。选取水培培养 30 d 左右生长一致的资阳香橙实生苗进行干旱、低温及盐处理。干旱处理时, 将实生苗放在实验台面上进行自然脱水, 在脱水后 0、1、6、12 h 取资阳香橙苗叶片样品放入液氮速冻; 盐处理和低温处理时, 将正常营养液水培的实生苗分别转移到添加 250 mmol/L 的 NaCl 营养液中和 4 °C 冰箱中进行处理, 在盐处理后 0、0.25、4、9 d 取叶片样品放入液氮速冻, 在低温处理后 0、0.5、4、9 d 取叶片样品放入液氮速冻; 所有经液氮速冻后的样品, 放入-80 °C超低温冰箱保存。每种处理设 3 个重复, 每个重复 9 株水培苗。

### 1.2 甜橙 SPL 家族成员鉴定

首先在 plantTFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org/download.php>)转录因子数据库下载拟南芥 SPL 家族成员的氨基酸序列(*AtSPLs*), 然后提交到甜橙基因组数据库(<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/download/index.php>)进行比对, *E*-value 设定为 1e-5, 得到候选的甜橙 SPL 家族成员氨基酸序列, 去除重复序列后再提交到 NCBI 保守结构域数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)进行比对, 验证得到氨基酸序列是否含有 SBP 特征结构域。经过去重和结构域分析, 最终获得 15 个甜橙 SPL 家族成员, 命名为 *CsSPLs*。

### 1.3 资阳香橙 *SPL* 家族基因 CDS 序列克隆

采用植物总 RNA 提取试剂盒(Cat#DP432, Tiangen Biotech Co., Ltd. Beijing)提取资阳香橙根部总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 用反转录试剂盒 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Cat#6210A, TaKaRa Bio Co., Ltd. Beijing)合成

资阳香橙 cDNA。根据 *CsSPLs* 的编码序列 (coding sequence, CDS) 序列设计引物 (NMDCX0000145), 以资阳香橙 cDNA 为模板 PCR 扩增资阳香橙 *SPL* 家族基因全长序列。上述扩增产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证条带大小后, 使用天根 DNA 产物纯化试剂盒 (Cat#DP204, Tiangen Biotech Co., Ltd. Beijing) 对目的条带进行回收并连接到 PGBO 载体, 每个 *SPL* 基因挑选 5 个阳性单克隆送测序, 将测序一致性高的序列确定为资阳香橙 *SPL* 基因序列并命名为 *CjSPLs*。

#### 1.4 *SPL* 家族成员多序列比对和系统发育树的构建

将 *AtSPLs*、*CsSPLs* 和 *CjSPLs* 的氨基酸序列利用 MUSCLE 软件<sup>[40]</sup>进行多序列比对, 比对结果通过 TrimAL 软件<sup>[41]</sup>剪裁对齐, 然后提交到 IQ-Tree 软件<sup>[42]</sup>进行进化树的构建, 所有步骤均采用默认参数进行。

#### 1.5 *SPL* 基因保守基序、基因结构和启动子元件分析

通过在线预测工具 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 对拟南芥、甜橙、资阳香橙的 *SPLs* 氨基酸序列进行分析, 预测其保守基序, 保守基序分析查找的数量值设为 20, 其他运行参数设置为默认, 预测结果用 TBtools 软件<sup>[43]</sup>进行可视化。基因结构分析是通过甜橙基因组提取基因结构注释文件, 并获取 *SPL* 家族成员在染色体上的分布信息。为预测 *SPL* 基因启动子元件, 从甜橙基因组数据库 (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/download/index.php>) 提取 *CsSPLs* 基因上游 2 000 bp 的序列作为启动子序列, 然后将提取得到的序列提交至 Plantcare 进行启动子元件预测 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)。使用 TBtools 对上述步骤获得的信息进行基因结构信息分析和可视化分析。

#### 1.6 *CjSPLs* 在不同胁迫处理下的表达分析

采用植物总 RNA 提取试剂盒 (Cat#DP432, Tiangen Biotech Co., Ltd. Beijing), 提取资阳香橙干旱、盐和低温处理样品总 RNA, 再用反转录试剂盒 HiScript II Q RT Super Mix for qPCR (+gDNA wiper) (Cat#R222-01, Vazyme Biotech Co., Ltd. Nanjing) 合成 cDNA。qRT-PCR 引物使用 NCBI Primer-BLAST 进行设计, 以 *actin* (Cs1g05000) 为内参基因 (NMDCX0000145)。参照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Cat#Q771-02, Vazyme Biotech Co., Ltd. Nanjing) 试剂盒方法, 在仪器 Bio-Rad CFX Connect Real Time system 上完成实时荧光定量 PCR 反应, 最后用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *CjSPLs* 家族基因的相对表达量, 采用 Excel 统计数据及作图, SPSS 软件分析基因表达量间的差异显著性 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

#### 2.1 *CjSPL* 家族成员鉴定与克隆

以拟南芥已知的 17 个 *SPL* 基因 (*AtSPLs*) 为参考序列, 与甜橙基因组数据库进行序列比对, 去除重复序列后获得 15 个候选基因序列, 将其提交到 NCBI 数据库进行保守结构域分析表明均含有 SBP 结构域, 因此将此 15 条序列确定为甜橙 *SPL* 家族成员。根据上述序列与 *AtSPLs* 的相似性, 将鉴定的 15 个甜橙 *SPL* 家族基因命名为 *CsSPL1*–*CsSPL15* (表 1)。为进一步获得资阳香橙中 *SPL* 基因序列, 根据 *CsSPLs* 序列设计全长引物, 以资阳香橙 cDNA 为模板进行了 PCR 扩增并测序。将资阳香橙中扩增出的 15 个 *SPL* 基因对应命名为 *CjSPL1*–*CjSPL15*。如表 1 所示, *CjSPLs* 和 *AtSPLs* 的序列相似性为 33.29%–61.64%, *CjSPLs* 的 ORF 长度为 393 bp–2 865 bp, 编码 130–954 个氨基酸, 等电点在 5.99–11.50 之间, 分子量为 14.73–118.51 kDa; 其中蛋白序列最长的为 *CjSPL14*, 其次是 *CjSPL1*, 最短的是 *CjSPL5*。

表 1 资阳香橙 SPL 转录因子家族成员信息

Table 1 The information of SPL transcription factor family in Ziyang Xiangcheng

Gene name	Gene ID	BLAST to	BLAST to <i>Arabidopsis</i>	Identity (%)	ORF length (bp)	Mw (kDa)	pI
		<i>Citrus sinensis</i>					
<i>CjSPL1</i>	NMDCN00011S2	Cs9g01380	AT2G47070	54.5	2 613	97.0	9.9
<i>CjSPL2</i>	NMDCN00011S3	Cs7g10830	AT5G43270	50.8	1 350	49.3	6.9
<i>CjSPL3</i>	NMDCN00011S4	Cs2g05730	AT2G33810	46.0	432	21.6	11.5
<i>CjSPL4</i>	NMDCN00011S5	Cs2g23550	AT1G53160	54.0	570	21.1	9.1
<i>CjSPL5</i>	NMDCN00011S6	Cs1g07620	AT3G15270	46.3	393	14.7	8.8
<i>CjSPL6</i>	NMDCN00011S7	Cs5g12260	AT1G69170	36.2	1 674	61.2	8.8
<i>CjSPL7</i>	NMDCN00011S8	Cs9g05200	AT5G18830	61.0	2 397	88.6	6.7
<i>CjSPL8</i>	NMDCN00011S9	Cs1g03630	AT1G02065	47.5	987	36.8	9.0
<i>CjSPL9</i>	NMDCN00011SA	Cs1g03640	AT2G42200	38.6	1 170	43.2	6.5
<i>CjSPL10</i>	NMDCN00011SB	Oange1.1t02265	AT1G27370	38.4	1 161	40.7	9.3
<i>CjSPL11</i>	NMDCN00011SC	Cs7g11770	AT1G27360	35.7	1 521	56.6	8.4
<i>CjSPL12</i>	NMDCN00011SD	Orange1.1t01758	AT3G60030	33.3	1 503	55.0	6.0
<i>CjSPL13</i>	NMDCN00011SE	Orange1.1t02597	AT5G50570	52.0	1 134	41.7	6.6
<i>CjSPL14</i>	NMDCN00011SF	Orange1.1t04043	AT1G20980	61.5	2 865	118.5	8.1
<i>CjSPL15</i>	NMDCN00011SG	Cs7g10990	AT3G57920	37.7	939	34.2	9.3

2.2 CjSPL 家族系统进化树分析

如图 1 所示, 通过 IQ-tree 构建拟南芥、甜橙和资阳香橙 SPL 家族进化树, 结果表明 CjSPLs 和 CsSPLs 被分为 9 个亚族, 而 AtSPLs 分在除第 7 亚族外的其他 8 个亚族。其中 3 种植物的 SPL7 单独聚为第 1 亚族; AtSPL13 和 CjSPL13、CsSPL13、CjSPL15 和 CsSPL15 聚为第 2 亚族; 3 种植物的 SPL2、SPL6、SPL11 和 AtSPL10 聚成第 3 亚族; 第 4 亚族含有 AtSPL9、AtSPL15、CsSPL10 和 CjSPL10; AtSPL8、CsSPL8、CjSPL8 组成第 5 亚族; 第 6 亚族由 3 种植物的 SPL3、SPL4、SPL5 构成; CsSPL9 和 CjSPL9 单独构成第 7 亚族; AtSPL14、CsSPL14、CjSPL14 和 AtSPL16 组成第 8 亚族; 3 种植物的 SPL1 和 SPL12 聚为第 9 亚族。9 个亚族中, 成员占比最多的是第 3 亚族, 占比最少的是第 7 亚族, 仅由 CjSPL9 和 CsSPL9 两个成员单独构成。从进化关系上看, CjSPLs 与对应的 CsSPLs 关系最近, 编号相同的 AtSPL、CsSPL 和 CjSPL 同源关系较近且一般处在同一亚族, 在生物学上

可能有相似的功能。

2.3 CjSPL 保守基序和保守结构域分析

如图 2 所示, 对甜橙和资阳香橙 SPLs 的氨基酸序列进行多序列比对, 表明它们的 SBP 结构域由 79 个氨基酸组成且高度保守, 部分位点上的氨基酸序列一致性达到 80% 以上。例如, CsSPLs 的 SBP 结构域中有 51 个位点的氨基酸一致性达到 80%, CjSPLs 中有 47 个位点氨基酸一致性达到 80%。另外, CsSPLs 和 CjSPLs 的 SBP 结构域保守氨基酸位点都含有第 2、7、24、27 位的 CCCH (Zn1), 第 43、46、50、62 位的 CCHC (Zn2) 和第 59、60、63、64、65、72、73、74、75 位的 KR7K (NSL), 且 NSL 的 C 端与 Zn2 有部分重合。虽然甜橙和资阳香橙多数 SPL 的 SBP 结构域序列高度保守, 但也发现 CsSPL1 和 CjSPL1 的氨基酸序列保守性较低。CsSPL1 的 SBP 结构域氨基酸序列与其他 14 个 CsSPLs 的一致性仅 38%, 只在 Zn2、NSL 功能性结构基序上表现出保守性; CjSPL1 的 SBP 结构域氨基酸序列保守性最低, 只在 NSL 区域的 63、65 位

点上表现出保守性。

为进一步了解 SPLs 家族成员的生物学功能多样性, 对 AtSPLs、CsSPLs 和 CjSPLs 的氨基酸序列进行了保守 motif 的预测。如图 3A 所示, 在 AtSPLs、CsSPLs 和 CjSPLs 中共预测出 20 个不同的保守 motif; 其中 motif 1、motif 3 和 motif 4 除不存在于 CsSPL1 和 CjSPL1 之中, 在其他 SPLs 中均含有此 3 个 motif, 且所处位置与 SBP 结构域的位置相同(图 3B), 由此推测这 3 个 motif

是 SBP 结构域的 3 个特征基序; motif 2 只出现在第 1、8 亚族和第 9 亚族 SPLs 中, motif 19 只存在于第 8 亚族, 而 motif 20 只出现在第 9 亚族。另外, 第 8、9 亚族 SPLs 包含的 motif 种类和数量最多, 而第 6 亚族最少。保守结构域预测表明, 除 CsSPL1 和 CjSPLs1 外, 其他 SPLs 均都含有完整的 SBP 结构域; 另外, 在 AtSPL1、AtSPL12 和 AtSPL14 的 3'端包含一个由重复锚蛋白构成的 Ank-2 结构域, 而在其他 SPLs 中缺乏。

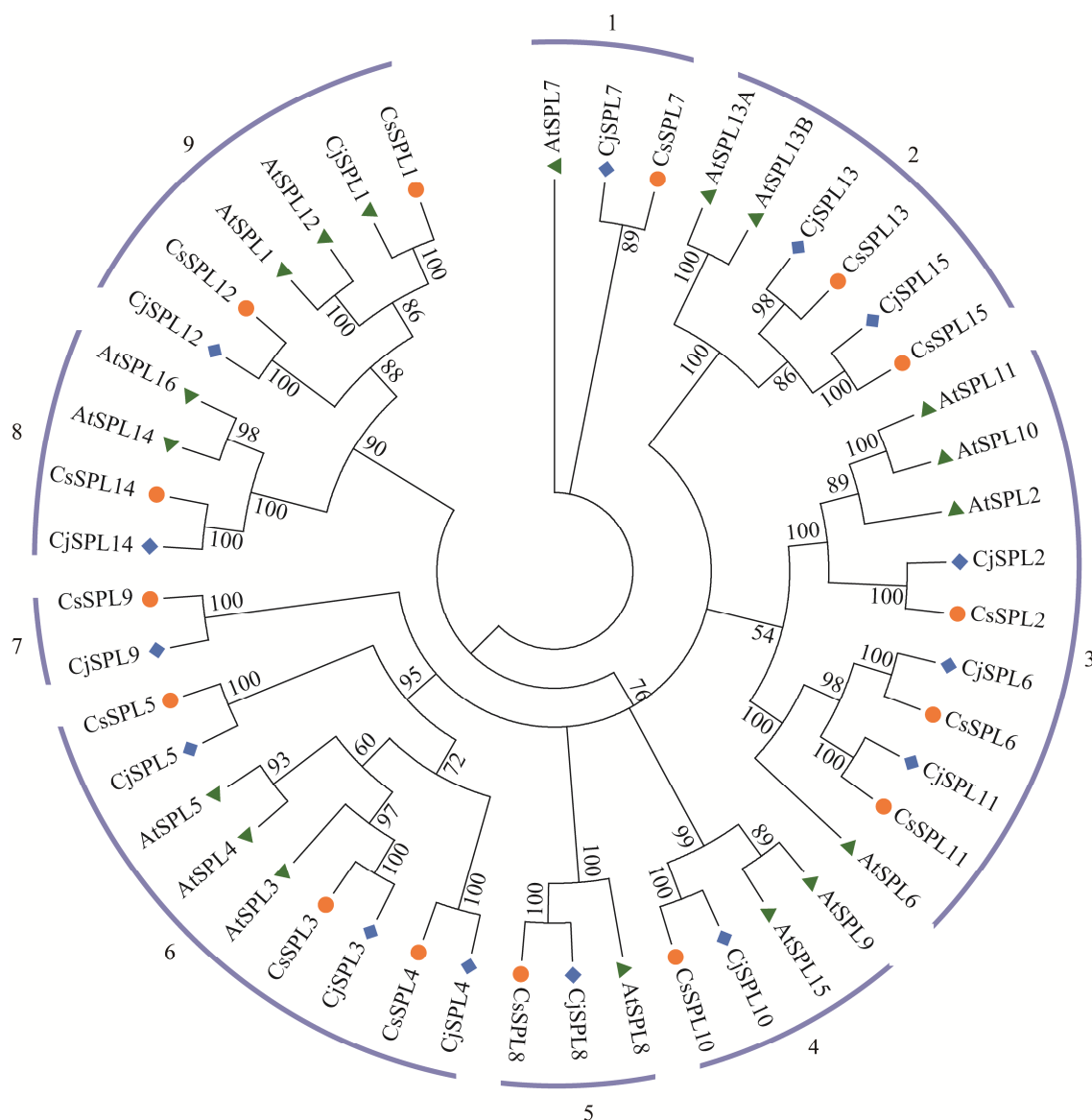
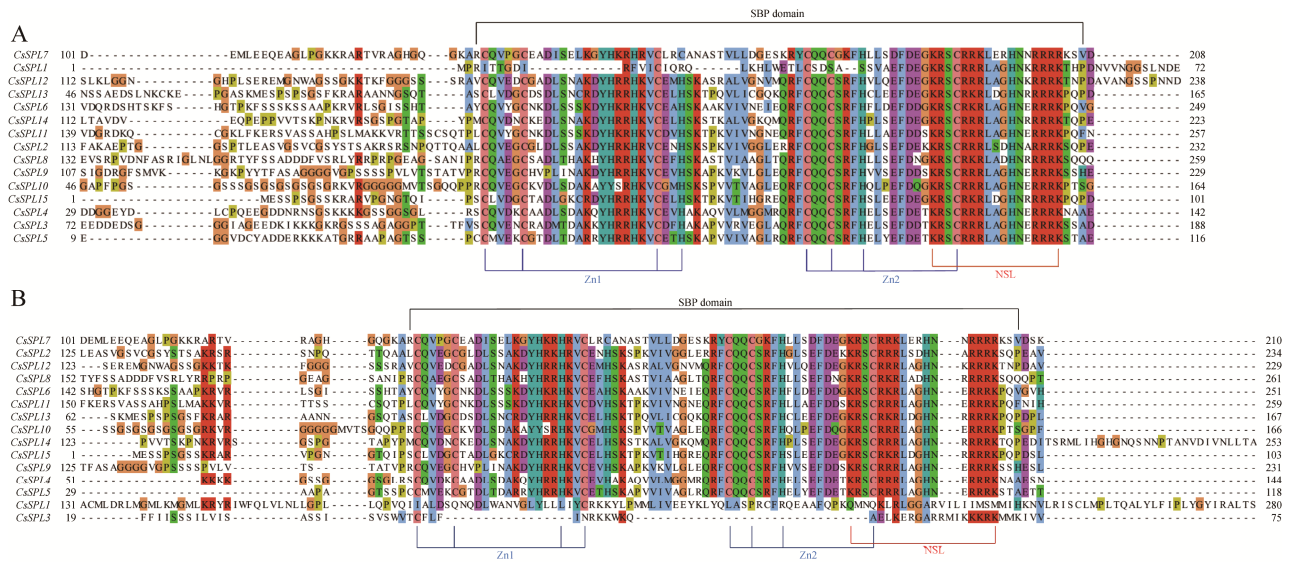
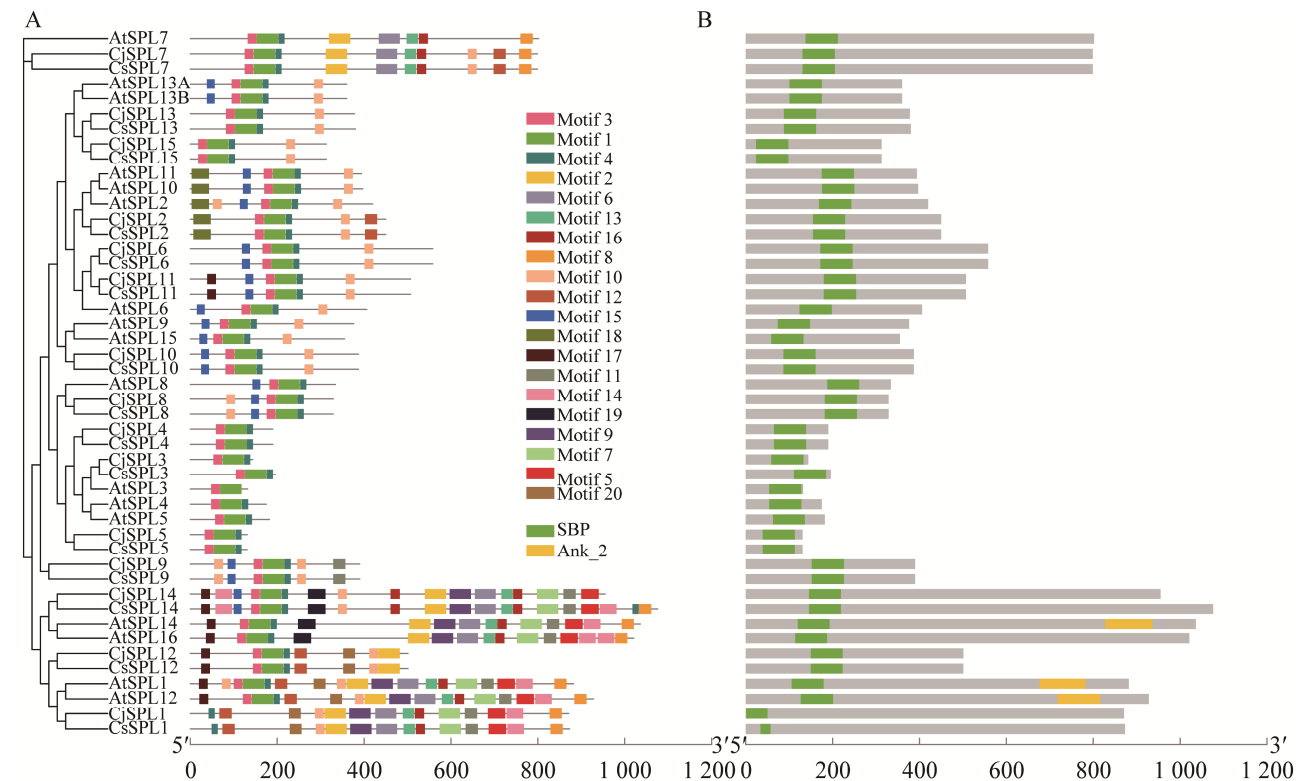


图 1 资阳香橙 CjSPL、甜橙 CsSPL 和拟南芥 AtSPL 家族系统进化分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of the CjSPL, CsSPL and AtSPL family.

图2 甜橙 *CsSPLs* (A)和资阳香橙 *CjSPLs* (B)氨基酸序列比对Figure 2 Amino acid sequence alignment of *CsSPLs* (A) and *CjSPLs* (B).图3 资阳香橙 *CjSPL*、甜橙 *CsSPL* 和拟南芥 *AtSPL* 家族保守基序(A)和结构域分析(B)Figure 3 Conserved motif (A) and domain analysis (B) of *CjSPL*, *CsSPL* and *AtSPL* family.



## 2.4 *CjSPL* 基因结构和启动子顺式作用元件分析

由于资阳香橙还没有完成基因组测序,本研究通过分析与其亲缘关系较近的 *CsSPLs* 家族基因的序列结构和启动子元件来推测对应的 *CjSPLs* 序列结构和启动子元件,以期预测它们的潜在功能。根据提取的 *CsSPLs* 基因结构注释文件,用软件进行可视化得到 *CsSPLs* 基因结构,如图 4A 所示。除 *CsSPL12* 外,其他 14 个基因成员均含有 5' UTR 和 3' UTR;在外显子数量上, *CsSPL1*、*CjSPL13* 和 *CsSPL14* 的外显子数量最多(10 个),而 *CsSPL3* 和 *CsSPL5* 的外显子数量最少(2 个)。如图 4B 所示,15 个 *CsSPLs* 启动子中共预测出 20 种启动子元件,其中 *CsSPL15* 含有种类最多的 16 种启动子元件,而 *CsSPL6* 含有种类最少的 9 种启动子元件;在这 20 种启动子元件中,包括植物生长发育相关元件(如响应脱落酸、生长素和分生组织表达的元件)、非生物胁迫相关元件(如响应低温、干旱、厌氧等的元件)、次生代谢物相关的元件(如响应水杨酸、茉莉酸、光敏下类黄酮合成的元件);所有 *CsSPLs* 都含有核心启动子元件、启动子和增强子,这些启动子元

件均起到启动激活或增强基因转录的功能。另外,全部 *CsSPLs* 成员都含有光反应元件。同时,我们也注意到,某些启动子元件只存在于单个 *CsSPL* 基因的启动子序列中,如仅有 *CsSPL10* 的启动子序列含有响应栅栏叶肉细胞的元件。

## 2.5 *CjSPLs* 在干旱、盐和低温胁迫下的表达模式

前人研究表明 *SPL* 家族基因在植物非生物逆境中发挥重要功能,本研究利用 qRT-PCR 分析了 *CjSPLs* 在干旱、盐和低温下的表达模式,以初步分析不同成员的潜在功能。如图 5 所示,在干旱胁迫下, *CjSPL2*、*CjSPL3*、*CjSPL5*、*CjSPL7*、*CjSPL8* 和 *CjSPL12* 的表达量在多个处理时间点相较于 0 h 对照呈显著增加趋势,且 *CjSPL2*、*CjSPL3* 和 *CjSPL8* 的表达呈现出随处理时间延长逐渐上升的规律,表明这些基因可能积极响应柑橘干旱胁迫;另外, *CjSPL1*、*CjSPL4* 和 *CjSPL14* 仅在干旱处理 1 h 时显著上升,这些基因可能在干旱早期发挥调控作用; *CjSPL13* 表达虽然显著上升,但各时间点表达量极低。 *CjSPL6*、*CjSPL9*、*CjSPL10*、*CjSPL11* 和 *CjSPL15* 表达水平总体变化不明显,这些基因可能在干旱

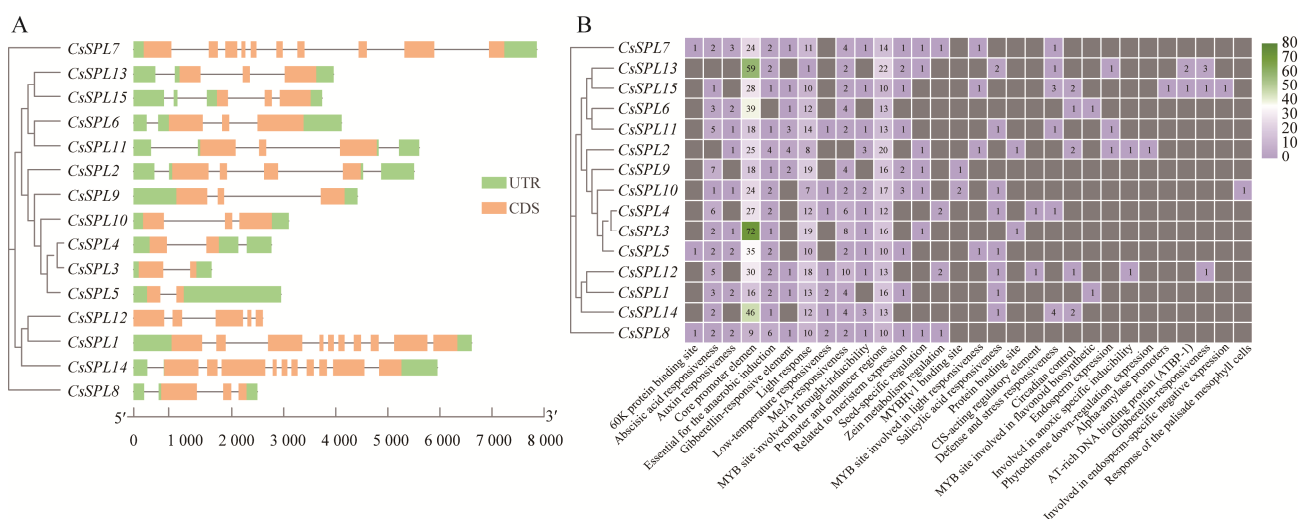


图 4 甜橙 *CsSPL* 基因结构(A)及其启动子顺式作用元件分析(B)

Figure 4 Analysis of *CsSPL* genes structure (A) and *cis*-acting elements of their promoters (B).



胁迫下不发挥主要功能。如图 6 所示, 在盐胁迫下, 除 *CjSPL6*、*CjSPL10*、*CjSPL11* 和 *CjSPL13* 的表达变化不明显外, 其他 *CjSPL* 基因均显著上调表达, 其中 *CjSPL2*、*CjSPL3*、*CjSPL4*、*CjSPL5*、*CjSPL7*、*CjSPL8* 的表达量随处理时间延长逐渐增加, 这些基因可能在盐胁迫中发挥重要调控作

用。在低温胁迫下 *CjSPL1*、*CjSPL3*、*CjSPL4*、*CjSPL7*、*CjSPL8* 的表达量在处理 4 d 及之后的时间点与 0 d 相比显著上升; *CjSPL2*、*CjSPL9*、*CjSPL12*、*CjSPL14*、*CjSPL15* 的表达量在低温处理 9 d 时才发生显著增加; *CjSPL6*、*CjSPL10*、*CjSPL11*、*CjSPL13* 的表达变化不明显(图 7)。

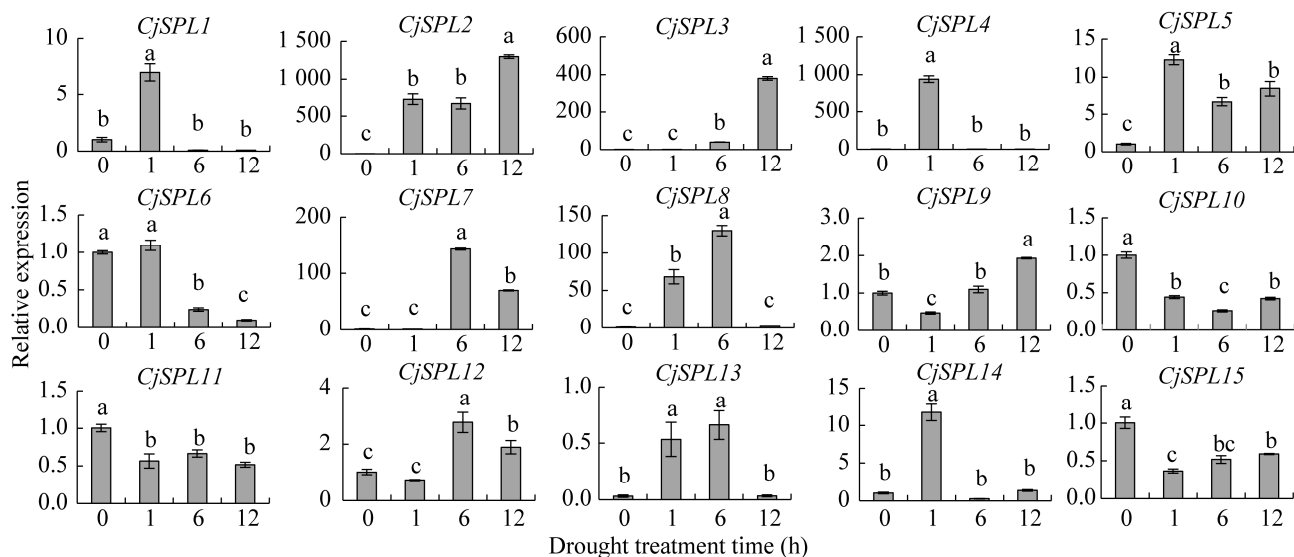


图 5 *CjSPL* 基因在干旱胁迫下的表达

Figure 5 Relative expression of *CjSPL* genes under drought stress. Different lowercase letters indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

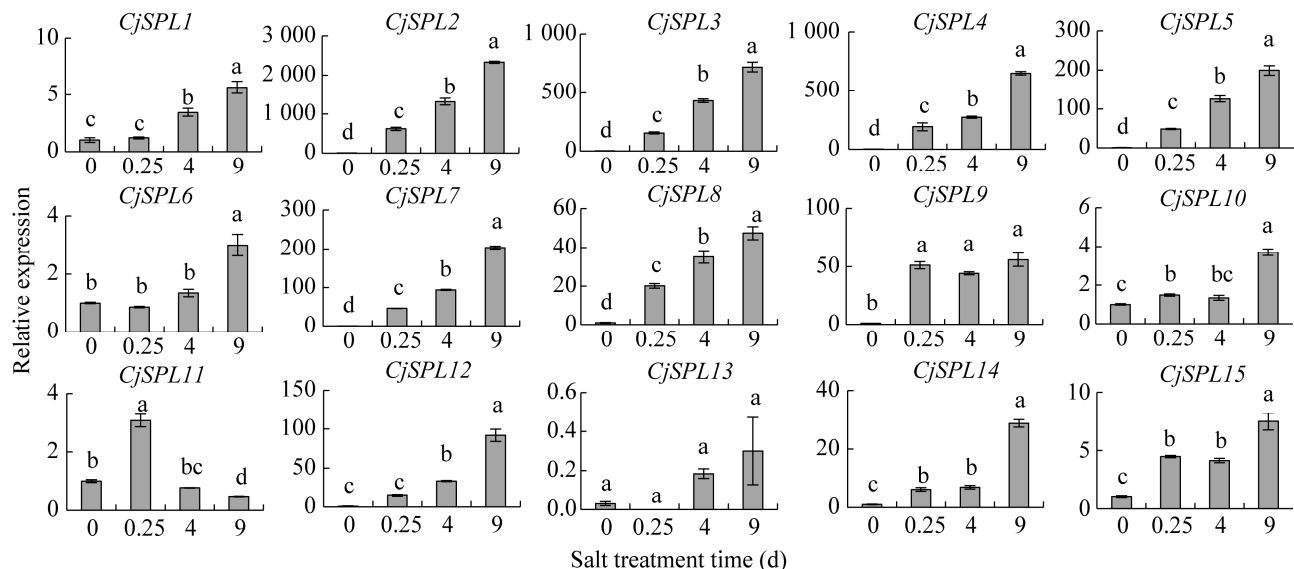


图 6 *CjSPL* 基因在盐胁迫下的表达

Figure 6 Relative expression of *CjSPL* genes under salt stress. Different lowercase letters indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

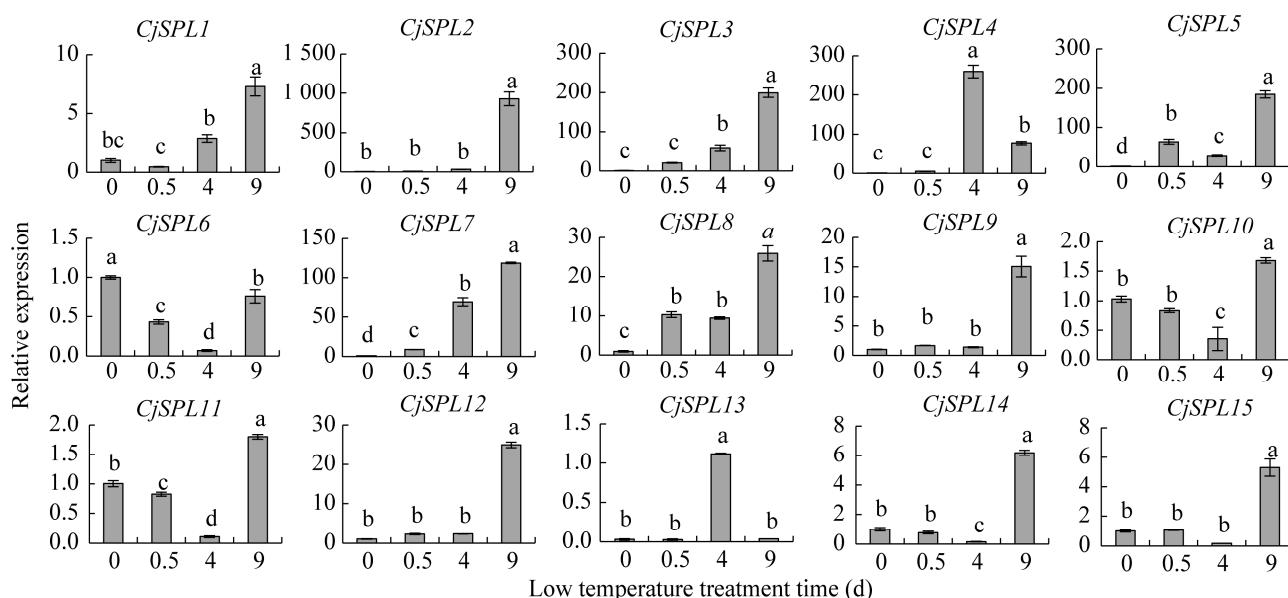


图7 *CjSPL* 基因在低温胁迫下的表达

Figure 7 Relative expression of *CjSPL* genes under low temperature stress. Different lowercase letters indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

### 3 讨论与结论

*SPL* 基因家族在植物生长发育、响应生物和非生物胁迫的过程中发挥着重要作用,已在多种植物中被鉴定和研究<sup>[7-8,16]</sup>。在本研究中,共鉴定出 15 个 *CjSPL* 基因,并通过生物信息学分析明确了 *CjSPL* 基因家族成员的氨基酸、分子量、等电点等信息。通过与拟南芥及甜橙的 *SPL* 基因家族成员构建系统进化树,将 15 个 *CjSPLs* 分为 9 个亚家族。根据前人研究结果,不同植物的 *SPL* 家族基因数量存在差异,如拟南芥有 17 个成员<sup>[8]</sup>,水稻有 19 个<sup>[9]</sup>,番茄有 16 个<sup>[10]</sup>,克里曼丁橘鉴定出 15 个<sup>[17]</sup>。本研究以甜橙的全基因组数据作为参考,我们在甜橙中鉴定出了 15 个 *SPL* 基因与前人的研究结果一致<sup>[16,44]</sup>;根据甜橙 *CsSPLs* 基因设计引物,我们在资阳香橙中扩增出了 15 条相应的 *SPL* 基因全长序列。比较 *CsSPLs* 和 *CjSPLs* 的核苷酸序列发现,两者的序列相似性很高,其中 *CjSPL2*、*CjSPL4*、*CjSPL8*、

*CjSPL10* 和 *CjSPL15* 与对应的 *CsSPLs* 序列完全一致;但是 *CjSPL1* 与 *CsSPL1* 的序列差异较大,前者比后者多了 30 个碱基的插入;*CjSPL3* 比 *CsSPL3* 以及 *CjSPL14* 比 *CsSPL14* 各少了 6 个碱基(NMDCX0000146)。另外, *CjSPL5*、*CjSPL6*、*CjSPL7*、*CjSPL9*、*CjSPL11*、*CjSPL12*、*CjSPL13* 与对应的 *CsSPLs* 存在部分位点的单个碱基差异。将 *CjSPLs* 与 *AtSPLs* 进行比对,发现其序列相似性在 33.29%–61.64%之间,其中 *CjSPL14* 和 *AtSPL14* 的序列相似性最高,达到了 61.64%,其次是 *CjSPL7* 和 *AtSPL7*,两者相似性达到 61%。前人研究发现, *AtSPL14* 在拟南芥中的错误表达能够使其抵御细胞程序性死亡<sup>[45]</sup>; *AtSPL7* 参与调控植物的生长发育和响应非生物胁迫过程,例如过表达 *AtSPL7* 会促进拟南芥的开花, Cu 缺乏诱导 *AtSPL7* 表达<sup>[46]</sup>。因此,我们可以推测与 *AtSPL7*、*AtSPL14* 序列相似的 *CjSPL7*、*CjSPL14* 可能具有类似的功能。从进化树分析上来看,处于同一亚族的 *SPL* 基因可能具有相同功能,例

如第 6 亚族的 *AtSPL3*、*AtSPL4* 和 *AtSPL5* 基因在拟南芥中都参与调控植物的成花诱导<sup>[47]</sup>, 第 3 亚族的 *AtSPL2* 和 *AtSPL11* 都参与调控植株的耐热性<sup>[48]</sup>。因此, 结合前人研究结果我们推测处于同一亚族的 *CjSPLs* 可能具有与 *AtSPLs* 相似的功能。

结构域和 motif 的种类和数量可以从侧面反应该基因的生物功能多样性, 具有相同种类和数量 motif 的基因功能可能相似。SBP 结构域在 SPL 中高度保守, 前人对 52 个物种的 SBP 结构域进行多序列比对分析发现最保守的氨基酸残基是第 4、9、26、45 和 48 位的半胱氨酸和第 29 和 52 位的组氨酸, 这些氨基酸用于配位两个锌离子<sup>[7]</sup>。根据 *CjSPLs* 的序列分析结果, 除 *CjSPL1* 外, 其他 *CjSPLs* 都含有上述 7 个保守的氨基酸位点, 即含有完整的 SBP 结构域, 该结果暗示 *CjSPL1* 可能具有与其他 *CjSPLs* 不同的功能。从 motif 分析上来看, *CjSPL14* 包含的 motif 种类最多(17 种), 表明该基因可能参与多种生物学功能; 与前人研究结果一致, 本研究也发现位于同一亚族的基因含有大致相同的 motif<sup>[49]</sup>, 如位于第 6 亚族的 *CjSPL3*、*CjSPL4*、*CjSPL5* 均只含有 motif1、3、4, 是 *CjSPLs* 中含有基序最少的, *CjSPL13* 和 *CjSPL15* 同属于第二亚族, 均含有 motif1、3、4、10, 这些含有相同 motif 的基因成员可能具有类似的功能。

对基因启动子顺式作用元件和基因表达模式的分析, 有助于揭示基因的潜在功能。本研究从 15 个 *CsSPL* 基因启动子中预测出 20 种顺式作用元件, 不仅包含植物生长发育相关的脱落酸、生长素和分生组织表达的元件, 还有与非生物胁迫相关的响应低温、干旱等的元件。顺式作用元件预测发现, 除 *CsSPL1*、*CsSPL6*、*CsSPL9* 和 *CsSPL13* 启动子不含干旱响应元件, 其他 *CsSPLs* 都含有此元件; qRT-PCR 结果表明

*CjSPL6* 和 *CsSPL9* 对干旱响应不明显, *CsSPL13* 在干旱下表达量极低, *CsSPL1* 仅在 1 个时间点上上调表达; 干旱胁迫下 qRT-PCR 结果较好印证了启动子顺式作用元件的预测结果。前人研究发现, 拟南芥在干旱、盐胁迫下生长时, 体内的 miR156 表达量增加, 导致下游靶基因 *SPL9* 的表达降低<sup>[50]</sup>; 木薯在受到干旱胁迫时 *MESPL9* 的表达量下降, 抑制 *MESPL9* 的活性提高了转基因木薯的抗旱能力<sup>[51]</sup>; 苜蓿适度提高 miR156 转录水平足以通过沉默 *SPL13* 和增加 *WD40-1* 表达来增强其抗旱能力<sup>[52]</sup>。中国野生葡萄 *VpSBP16* 基因通过调节 ROS 和 SOS 信号网络增强了转基因拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性<sup>[53]</sup>。结合本研究结果及这些前人研究证据, 可以推测 *CjSPL* 基因在柑橘干旱胁迫应答中可能发挥重要作用。*CsSPL1*、*CsSPL4*、*CsSPL8*、*CsSPL10*、*CsSPL11*、*CsSPL12* 和 *CsSPL14* 被预测含有低温响应元件; qRT-PCR 结果也显示 *CjSPL1*、*CsSPL4*、*CsSPL8*、*CsSPL12* 和 *CsSPL14* 的表达量在低温胁迫处理下不同程度显著升高, 暗示这些 *CjSPLs* 可能在柑橘低温胁迫中发挥调控作用。虽然本研究没有直接预测到 *CsSPLs* 启动子响应盐胁迫的顺式作用元件, 但表达分析表明大部分 *CjSPLs* 在盐胁迫下显著上调表达。前人也有较多研究证明植物 *SPLs* 在盐胁迫中的作用, 如苹果 *MDSPL13* 过表达能增强其耐盐性, 通过靶向 *MdWRKY100* 正向调节苹果的耐盐性<sup>[54]</sup>; 水稻 *OsSPL1* 负调控其耐盐性<sup>[55]</sup>; 葡萄 *VpSBP3* 在转基因拟南芥中负向调控盐胁迫<sup>[56]</sup>; 烟草 *NtabSPL6* 转入拟南芥提高了拟南芥对盐胁迫的耐受能力<sup>[57]</sup>。

## REFERENCES

- [1] GOLLDACK D, LÜKING I, YANG O. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular

- transcriptional network[J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(8): 1383-1391.
- [2] 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.
- [3] LI CL, LU SF. Molecular characterization of the *SPL* gene family in *Populus trichocarpa*[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 131.
- [4] CHEN X, ZHANG Z, LIU D, ZHANG K, LI A, MAO L. *SQUAMOSA* promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52(11): 946-951.
- [5] 汪淑雯, 杨爱怡, 王华森, 徐云敏. 黄瓜 miR156/157-SPL 途径基因鉴定和表达分析[J]. *园艺学报*, 2021, 48(11): 2227-2238.
- WANG SW, YANG AY, WANG HS, XU YM. Identification and expression analysis of miR156/157-SPL pathway genes in cucumber[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(11): 2227-2238 (in Chinese).
- [6] YAMASAKI K, KIGAWA T, INOUE M, TATENO M, YAMASAKI T, YABUKI T, AOKI M, SEKI E, MATSUDA T, NUNOKAWA E, ISHIZUKA Y, TERADA T, SHIROUZU M, OSANAI T, TANAKA A, SEKI M, SHINOZAKI K, YOKOYAMA S. 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.
- [7] BIRKENBIHL RP, JACH G, SAEDLER H, HUIJSER P. Functional dissection of the plant-specific SBP-domain: overlap of the DNA-binding and nuclear localization domains[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 352(3): 585-596.
- [8] CARDON G, HÖHMANN S, KLEIN J, NETTESHEIM K, SAEDLER H, HUIJSER P. Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes[J]. *Gene*, 1999, 237(1): 91-104.
- [9] MIURA K, IKEDA M, MATSUBARA A, SONG XJ, ITO M, ASANO K, MATSUOKA M, KITANO H, ASHIKARI M. OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(6): 545-549.
- [10] SALINAS M, XING SP, HÖHMANN S, BERNDTGEN R, HUIJSER P. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato[J]. *Planta*, 2012, 235(6): 1171-1184.
- [11] ZHANG LS, WU B, ZHAO DG, LI CL, SHAO FJ, LU SF. Genome-wide analysis and molecular dissection of the *SPL* gene family in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56(1): 38-50.
- [12] ZHANG XH, DOU LL, PANG CY, SONG MZ, WEI HL, FAN SL, WANG CS, YU SX. Genomic organization, differential expression, and functional analysis of the *SPL* gene family in *Gossypium hirsutum*[J]. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 2015, 290(1): 115-126.
- [13] 汪先菊, 张绍宇, 徐泽, 石佩, 康同洋, 李琴, 赵彩平. 桃 *SPL* 基因家族成员鉴定及其基因表达与果实发育的相关性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(9): 1521-1534.
- WANG XJ, ZHANG SY, XU Z, SHI P, KANG TY, LI Q, ZHAO CP. Identification of *SPL* gene family members and correlation analysis between gene expression and fruit development in peach (*Prunus persica*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(9): 1521-1534 (in Chinese).
- [14] 潘晓璐, 张秀梅, 许婷婷, 侯世贵, 张红娜. 菠萝 *SPL* 基因家族全基因组鉴定及其在开花诱导中的表达分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(20): 6633-6642.
- PAN XL, ZHANG XM, XU TT, HOU SG, ZHANG HN. Genome-wide identification of *SPL* gene family and expression profiling during flowering induction in pineapple[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(20): 6633-6642 (in Chinese).
- [15] 曹雪. 葡萄两个重要 SBP 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2010.
- CAO X. Cloning, subcellular localization and expression analysis of two important *SBP* genes from grape (*V. vinifera*×*V. labrusca*)[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [16] LIU MY, WU XM, LONG JM, GUO WW. Genomic characterization of miR156 and *SQUAMOSA* promoter binding protein-like genes in sweet orange (*Citrus sinensis*)[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: PCTOC*, 2017, 130(1): 103-116.
- [17] SHALOM L, SHLIZERMAN L, ZUR N, DORON-FAIGENBOIM A, BLUMWALD E, SADKA A. Molecular characterization of squamosa promoter binding protein-like (*spl*) gene family from *Citrus* and

- the effect of fruit load on their expression[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 389.
- [18] WANG ZS, WANG Y, KOHALMI SE, AMYOT L, HANNOUFA A. 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.
- [19] GOU JQ, TANG CR, CHEN NC, WANG H, DEBNATH S, SUN L, Flanagan A, Tang YH, Jiang QZ, Allen RD, Wang ZY. SPL7 and SPL8 represent a novel flowering regulation mechanism in switchgrass[J]. *The New Phytologist*, 2019, 222(3): 1610-1623.
- [20] UNTE US, SORENSEN AM, PESARESI P, GANDIKOTA M, LEISTER D, SAEDLER H, HUIJSER P. *SPL8*, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(4): 1009-1019.
- [21] MANNING K, TÖR M, POOLE M, HONG YG, THOMPSON AJ, KING GJ, GIOVANNONI JJ, SEYMOUR GB. 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.
- [22] SHIKATA M, KOYAMA T, MITSUDA N, OHME-TAKAGI M. *Arabidopsis* SBP-box genes *SPL10*, *SPL11* and *SPL2* control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50(12): 2133-2145.
- [23] 罗红玉, 杨江伟, 冯亚, 张欢欢, 刘升燕, 张宁, 司怀军. STTM 技术沉默马铃薯 *Stu-miR156* 对其侧根发育的影响[J]. *园艺学报*, 2021, 48(3): 531-538.
- LUO HY, YANG JW, FENG Y, ZHANG HH, LIU SY, ZHANG N, SI HJ. The effect of *stu-miR156* silencing by STTM technology on potato lateral root development[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(3): 531-538 (in Chinese).
- [24] CHAO LM, LIU YQ, CHEN DY, XUE XY, MAO YB, CHEN XY. *Arabidopsis* transcription factors *SPL1* and *SPL12* confer plant thermotolerance at reproductive stage[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(5): 735-748.
- [25] LAN T, ZHENG YL, SU ZL, YU SB, SONG HB, ZHENG XY, LIN GG, WU WR. *OsSPL10*, a SBP-box gene, plays a dual role in salt tolerance and trichome formation in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Genes Genomes Genetics*, 2019, 9(12): 4107-4114.
- [26] 杨诗勤, 敖雁, 张晔, 冒小妹, 彭运鹏, 张婷婷, 任胜杰. 水稻干旱响应基因 *OsSPL3* 的克隆及功能初步分析[J]. *分子植物育种*, 2022, 1-10.
- YANG SQ, AO Y, ZHANG Y, MAO XM, PENG YP, ZHANG TT, REN SJ. Cloning and functional analysis of rice drought response gene *OsSPL3*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 1-10 (in Chinese).
- [27] 薛浩. *miR156-SPL* 模式调控苹果耐盐性的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士学位论文, 2019.
- XUE H. The study of *miR156-SPL* model regulate apple salt tolerance[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [28] 宁坤. 白桦 *BpSPL9* 基因的功能研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 2015.
- NING K. Function analysis of *BpSPL9* gene in *Betula platyphylla*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Forestry University, 2015 (in Chinese).
- [29] ZHANG DY, HAN ZL, LI JQ, QIN H, ZHOU L, WANG YH, ZHU XJ, MA YC, FANG WP. Genome-wide analysis of the SBP-box gene family transcription factors and their responses to abiotic stresses in tea (*Camellia sinensis*)[J]. *Genomics*, 2020, 112(3): 2194-2202.
- [30] 邱洁雅, 袁梦, 朱攀攀, 凌丽俐, 曹立, 付行政, 彭良志. 不同柑橘砧木对锰过量胁迫的耐受性及生理响应[J]. *植物营养与肥料学报*, 2021, 27(1): 109-121.
- QIU JY, YUAN M, ZHU PP, LING LL, CAO L, FU XZ, PENG LZ. Tolerance and physiological response of citrus rootstock cultivars to manganese toxicity[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(1): 109-121 (in Chinese).
- [31] 王君秀, 袁高鹏, 阮科, 彭良志, 凌丽俐, 付行政, 淳长品. 不同 pH 营养液处理下 3 种柑橘砧木有机酸分泌的差异[J]. *园艺学报*, 2018, 45(6): 1054-1066.
- WANG JX, YUAN GP, RUAN K, PENG LZ, LING LL, FU XZ, CHUN CP. Differences in organic acid secretion of three *Citrus* rootstocks cultivated in nutrient solution with various pH levels[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(6): 1054-1066 (in Chinese).
- [32] 淳长品, 彭良志, 雷霆, 唐海涛, 曹立, 江才伦, 凌丽俐. 不同柑橘砧木对锦橙果实品质的影响[J]. *园艺学报*, 2010, 37(6): 991-996.
- CHUN CP, PENG LZ, LEI T, TANG HT, CAO L, JIANG CL, LING LL. Effects of rootstocks on fruit quality of 'Jincheng' sweet orange[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37(6): 991-996 (in

- Chinese).
- [33] 朱世平, 陈娇, 马岩岩, 闫树堂, 钟广炎. 柑橘砧木评价及应用研究进展[J]. 园艺学报, 2013, 40(9): 1669-1678.
- ZHU SP, CHEN J, MA YY, YAN ST, ZHONG GY. Advances in the studies on *Citrus* rootstock evaluation and application[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(9): 1669-1678 (in Chinese).
- [34] 袁高鹏, 习建龙, 彭良志, 彭震宇, 张梦娇, 朱春钊, 黄翼, 淳长品. 7种柑桔砧木实生苗生长状况的比较[J]. 中国南方果树, 2015, 44(3): 35-37.
- YUAN GP, XI JL, PENG LZ, PENG ZY, ZHANG MJ, ZHU CZ, HUANG Y, CHUN CP. Comparison of seedling growth of seven citrus rootstocks[J]. South China Fruits, 2015, 44(3): 35-37 (in Chinese).
- [35] 庄伊美, 王仁玟, 谢志南, 陈丽璇, 许文宝. 砧木对椪柑生长结果及叶片矿质成分的影响[J]. 园艺学报, 1993, 20(3): 209-215.
- ZHUANG YM, WANG RJ, XIE ZN, CHEN LX, XU WB. Effects of rootstock on the growth, fruiting and leaf mineral content of ponkan mandarin[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1993, 20(3): 209-215 (in Chinese).
- [36] 郑妮, 曹立, 彭良志, 余歆, 淳长品, 凌丽俐, 付行政, 张文龙, 吴坤明, 冉从洋, 钱春. 资阳香橙×枳 8个杂交后代的耐碱性评价[J]. 果树学报, 2021, 38(3): 352-360.
- ZHENG N, CAO L, PENG LZ, YU X, CHUN CP, LING LL, FU XZ, ZHANG WL, WU KM, RAN CY, QIAN C. Evaluation of alkali tolerance of 8 hybrid rootstock progenies of Ziyang Xiangcheng and Trifoliate Orange[J]. Journal of Fruit Science, 2021, 38(3): 352-360 (in Chinese).
- [37] 朱礼乾, 沈鑫健, 周上铃, 曾瑶, 彭良志, 付行政, 凌丽俐, 淳长品. 氮胁迫对枳和‘资阳香橙’砧木氮代谢及相关基因表达的影响[J]. 果树学报, 2020, 37(4): 449-458.
- ZHU LQ, SHEN XJ, ZHOU SL, ZENG Y, PENG LZ, FU XZ, LING LL, CHUN CP. Effects of nitrogen stresses on the nitrogen metabolism and expression of related genes in *Poncirus trifoliata* and ‘Ziyang Xiangcheng’ (*Citrus junos*) rootstocks[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(4): 449-458 (in Chinese).
- [38] 曹立, 彭良志, 彭爱红, 凌丽俐, 江东, 王福生, 范达, 王军政, 马小焕, 张雯雯, 常青华, 王小雪. 资阳香橙×枳杂种苗鉴定及耐碱株系筛选[J]. 果树学报, 2011, 28(1): 20-25.
- CAO L, PENG LZ, PENG AH, LING LL, JIANG D, WANG FS, FAN D, WANG JZ, MA XH, ZHANG WW, CHANG QH, WANG XX. Preliminary identification of alkali-resistance hybrid seedlings of Junos and Trifoliate orange[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(1): 20-25 (in Chinese).
- [39] 张晓勇. 枳和资阳香橙耐缺铁差异的生理与分子机制[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2020.
- ZHANG XY. Comparison of the differently physiological and molecular mechanisms between trifoliate orange and Ziyang Xiangcheng in response to iron deficiency[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [40] EDGAR RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity[J]. BMC Bioinformatics, 2004, 5: 19.
- [41] CAPELLA-GUTIÉRREZ S, SILLA-MARTÍNEZ JM, GABALDÓN T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses[J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1972-1973.
- [42] NGUYEN LT, SCHMIDT HA, VON HAESELER A, MINH BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. Molecular Biology and Evolution, 2015, 32(1): 268-274.
- [43] CHEN C, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE Y, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [44] 杨杰, 陈蓉, 胡文娟, 吴巧玲, 陈健美, 李兴涛. 甜橙 *SPL* 基因家族的鉴定及其在成花诱导中的表达分析[J]. 西北植物学报, 2022, 42(1): 48-56.
- YANG J, CHEN R, HU WJ, WU QL, CHEN JM, LI XT. Genome-wide identification of *SPL* gene family and expression analysis during flowering induction in *Citrus sinensis*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2022, 42(1): 48-56 (in Chinese).
- [45] LIANG XW, NAZARENS TJ, STONE JM. Identification of a consensus DNA-binding site for the *Arabidopsis thaliana* SBP domain transcription factor, AtSPL14, and binding kinetics by surface plasmon resonance[J]. Biochemistry, 2008, 47(12): 3645-3653.
- [46] BERNAL M, CASERO D, SINGH V, WILSON GT, GRANDE A, YANG HJ, DODANI SC, PELLEGRINI M, HUIJSER P, CONNOLLY EL, MERCHANT SS, KRÄMER U. Transcriptome sequencing identifies SPL7-regulated copper acquisition genes *FRO4/FRO5* and the copper dependence of iron homeostasis in

- Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2012, 24(2): 738-761.
- [47] WU G, POETHIG RS. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3[J]. Development: Cambridge, England, 2006, 133(18): 3539-3547.
- [48] LEI KJ, LIN YM, AN GY. miR156 modulates rhizosphere acidification in response to phosphate limitation in *Arabidopsis*[J]. Journal of Plant Research, 2016, 129(2): 275-284.
- [49] 王光鹏, 刘同坤, 徐新风, 李竹帛, 高瞻远, 侯喜林. 大白菜 LEA 家族基因的鉴定及其部分成员在低温胁迫下的表达分析[J]. 园艺学报, 2022, 49(2): 304-318. WANG GP, LIU TK, XU XF, LI ZB, GAO ZY, HOU XL. Identification of LEA family and expression analysis of some members under low-temperature stress in Chinese cabbage[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(2): 304-318 (in Chinese).
- [50] CUI LG, SHAN JX, SHI M, GAO JP, LIN HX. The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants[J]. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2014, 80(6): 1108-1117.
- [51] LI SX, CHENG ZH, LI ZB, DONG SM, YU XL, ZHAO PJ, LIAO WB, YU X, PENG M. *MeSPL9* attenuates drought resistance by regulating JA signaling and protectant metabolite contents in cassava[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2022, 135(3): 817-832.
- [52] FEYISSA BA, ARSHAD M, GRUBER MY, KOHALMI SE, HANNOUFA A. The interplay between miR156/SPL13 and DFR/WD40-1 regulate drought tolerance in alfalfa[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19(1): 434.
- [53] HOU HM, LI J, GAO M, SINGER SD, WANG H, MAO LY, FEI ZJ, WANG XP. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family genes in grape[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59358.
- [54] MA Y, XUE H, ZHANG F, JIANG Q, YANG S, YUE P, WANG F, ZHANG Y, LI L, HE P, ZHANG Z. The miR156/SPL module regulates apple salt stress tolerance by activating MdWRKY100 expression[J]. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(2): 311-323.
- [55] ZHANG HJ, ZHAI J, MO JB, LI DY, SONG FM. Overexpression of rice sphingosine-1-phosphate lyase gene *OsSPL1* in transgenic tobacco reduces salt and oxidative stress tolerance[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2012, 54(9): 652-662.
- [56] 陈果, 曲衍杰, 任桓质, 于柏, 张玉刚, 祝军, 侯鸿敏. *VpSBP3* 基因负向调控转基因拟南芥盐胁迫抗性[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2021, 38(1): 7-14. CHEN G, QU YJ, REN HZ, YU B, ZHANG YG, ZHU J, HOU HM. *VpSBP3* gene negatively regulates salt stress resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2021, 38(1): 7-14 (in Chinese).
- [57] 张丽. 烟草 *NtabSPL6-2* 和 *NtabSPL6-3* 基因的功能研究[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2019. ZHANG L. Functional research of *NtabSPL6-2* and *NtabSPL6-3* genes in *Nicotiana tabacum*[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2019 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)