

# 矮牵牛 *PhNAL1b* 基因的克隆及功能分析

姚许蓉, 刘同瑞, 董丽丽, 邓新义\*

安徽农业大学 园艺学院, 安徽 合肥 230036

姚许蓉, 刘同瑞, 董丽丽, 邓新义. 矮牵牛 *PhNAL1b* 基因的克隆及功能分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(2): 869-880.

YAO Xurong, LIU Tongrui, DONG Lili, DENG Xinyi. Cloning and functional characterization of *PhNAL1b* from *Petunia×hybrida* cv. Mitchell Diploid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(2): 869-880.

**摘要:** *NAL1* (narrow leaf 1) 基因在植物的分枝发育中具有重要作用, 但在矮牵牛中研究较少。为了研究矮牵牛中 *NAL1* 基因的功能, 本研究从矮牵牛 (*Petunia×hybrida* cv. Mitchell Diploid) 中克隆了 *PhNAL1b* 基因, 该基因全长 1 767 bp, 编码 588 个氨基酸, 含有 Peptidase S64 结构域。*PhNAL1b* 启动子区域含有多个生长素、茉莉酸、脱落酸和光响应元件。表达分析显示 *PhNAL1b* 在根中的表达量最高, 花中的表达量最低, 且去顶以及细胞分裂素均能够抑制其转录。亚细胞定位分析表明 *PhNAL1b* 定位于细胞核中, 为核蛋白。利用病毒诱导基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 技术抑制 *PhNAL1b* 的表达, 引起了矮牵牛分枝数目显著增加、株高降低。上述结果表明 *PhNAL1b* 在调控矮牵牛分枝发育中具有重要作用。本研究为揭示 *NAL1* 基因调控矮牵牛分枝发育的机理奠定了基础, 并为株型改良提供了基因资源。

**关键词:** 矮牵牛; 分枝发育; *PhNAL1b*; 表达分析; 亚细胞定位; 功能研究

## Cloning and functional characterization of *PhNAL1b* from *Petunia×hybrida* cv. Mitchell Diploid

YAO Xurong, LIU Tongrui, DONG Lili, DENG Xinyi\*

School of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

**Abstract:** *Narrow leaf 1 (NAL1)* plays an important role in plant branching, while little is known about the roles of this gene in petunias. In this study, *PhNAL1b* was cloned from

资助项目: 安徽省中央引导地方科技发展专项资金(202007d06020021); 油茶生态种植及产供销一体化关键技术研发与示范项目

This work was supported by Anhui Province Central Guiding the Local Science and Technology Development Special Fund (202007d06020021) and the Key Technology Research and Demonstration of Oil Tea Ecological Planting and Production Supply Marketing Integration.

\*Corresponding author. E-mail: xydeng2001@163.com

Received: 2024-06-05; Accepted: 2024-08-29; Published online: 2024-08-30

*Petunia*×*hybrida* cv. Mitchell Diploid, with a total length of 1 767 bp, encoding a protein composed of 588 amino acid residues and containing the peptidase S64 domain. The *PhNAL1b* promoter region contained several elements involved in the responses to auxin, jasmonic acid, abscisic acid, and light. The expression analysis showed that *PhNAL1b* had the highest expression level in roots and the lowest expression level in flowers, and its transcription could be inhibited by decapitation and cytokinin. The subcellular localization analysis showed that PhNAL1b was located in the nucleus and was a nuclear protein. Virus-induced gene silencing was employed to downregulate the expression of *PhNAL1b*, which resulted in significant increases in branch number and plant height. The results indicated that *PhNAL1b* played an important role in regulating the branching of petunias. This study lays a foundation for revealing the mechanism of *NAL1* in regulating branch development and provides genetic resources for plant architecture improvement.

**Keywords:** *Petunia hybrida*; shoot branching; *PhNAL1b*; expression analysis; subcellular localization; functional research

分枝是影响农作物生产量和生产质量的重要性状之一。因此,培育理想株型的植株在实际农业生产中具有重要意义。矮牵牛是重要的观赏植物,同时也是优异的模式植物。因栽培生产中需要多次去顶促进分枝,导致生产成本增加,因此分枝发育是矮牵牛重要的研究方向之一。

植物的分枝发育过程受到多种因素的影响,如激素、环境和基因等,但其中最为重要的是植物本身的遗传特性<sup>[1]</sup>。随着分枝发育研究的逐步深入,多个功能相关基因被鉴定出来,如 *PAE12*<sup>[2]</sup>、*OsSTP15*<sup>[3]</sup>、*BRC1/TBI*<sup>[4]</sup>、*TIE1*<sup>[5]</sup>、*SPL13*<sup>[6]</sup>、*CRY1*<sup>[7]</sup>、*FHY3*<sup>[8]</sup>、*SLB1*<sup>[9]</sup>、*HXK1*<sup>[10]</sup>、*RLB*<sup>[11]</sup>、*TNI*<sup>[12]</sup>等。

*NAL1* 基因编码一种类似胰蛋白酶的丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶,最初作为影响维管束发育导致叶片变窄的基因被鉴定出来,后被证明可以通过调节叶片发育和生长素运输相关基因(*OSHB*、*YABBY*、*PIN-FORMED*)以及 *CROWN ROOTLESS* 基因的表达影响叶片和不定根的发育<sup>[13]</sup>,并通过对细胞分裂的调节来控制叶宽和株高<sup>[14]</sup>。近年来研究发现,*NAL1* 的突变导致株高

降低、圆锥花序变小、叶片变窄厚、叶色深绿<sup>[15]</sup>;*NAL1* 的等位基因突变体 *m625* 表现出叶片和茎中厚壁组织和细胞壁较薄、叶片中脉木质化细胞壁减少的表型<sup>[16]</sup>;*NAL1* 能够在细胞核中与 AP2/ERF 型转录因子 FZP 相互作用并促进其降解,从而调节 FZP 依赖性基因的表达,最终影响水稻穗部形态和籽粒产量<sup>[17]</sup>;*NAL1* 还通过调节 *ARFs*、*SAURs*、*PMA*s、伸展蛋白和细胞壁相关基因的表达,控制细胞扩增,调节叶片形状<sup>[18]</sup>,并通过调节参与光合器、细胞周期以及赤霉素和油菜素内酯信号通路的基因来调控植物株型<sup>[15]</sup>。上述研究结果表明 *NAL1* 具有多效性,参与植物的多个发育过程。

本研究克隆了 *PhNAL1b* 基因全长序列,并对其氨基酸序列进行了分析,检测了 *PhNAL1b* 在不同组织及不同处理条件下的表达特性,分析了 PhNAL1b 的亚细胞定位,并构建了病毒沉默载体瞬时转化矮牵牛,对矮牵牛 *PhNAL1b* 基因的功能进行了初步研究。本研究的结果丰富了矮牵牛的分枝发育机理,并为后续利用分子生物学改良植物株型奠定了基础。

# 1 材料与方 法

## 1.1 材 料

本研究以矮牵牛品种 *Petunia*×*hybrida* cv. Mitchell Diploid 为实验材料。矮牵牛和本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 均种植于 10 cm×10 cm 的方形盆中, 置于组织培养室中培养, 培养条件设置为: 温度(23±2) °C, 光照强度 100 mmol/(m<sup>2</sup>·s), 光周期 16 h/8 h (光/暗)。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 *PhNAL1b* 的克隆及生物信息学分析

分别使用 RNAprep Pure Plant Plus (北京擎科生物科技股份有限公司) 和 Prime Script<sup>TM</sup> RT (Takara 公司) 试剂盒提取矮牵牛总 RNA, 并反转录获得 cDNA。根据拟南芥 *NAL1* 序列, 在 NCBI 数据库中 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查找茄科 *NAL1* 基因, 随后使用茄科 *NAL1* 基因序列在矮牵牛基因组数据库中 (<https://solgenomics.net/>) 搜索矮牵牛 *NAL1* 基因。根据获得的序列设计上下游引物 NAL1b-F/NAL1b-R 扩增目的基因(表 1), 并将扩增产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序, 以确定 *PhNAL1b* 的序列。

利用 DNAMAN 7.0 软件进行多序列比对;

使用在线软件 Pfam 进行保守结构域的鉴定; 蛋白质序列的生化特性通过 ExPASy 上的 ProParam 在线工具进行分析; 分别使用 ExPASy-ProtScale 和 SOPMA 软件分析蛋白质的亲水性和二级结构。

### 1.2.2 多序列比对和系统发育分析

从 NCBI 数据库获取大豆、葡萄、水稻、和大麻等的 NAL1 氨基酸序列。使用 DNAMAN 7.0 软件对氨基酸序列进行相似度比对。使用 MEGA 7.0 软件, 采用邻接(neighbor-joining)法构建系统发育树, bootstrap 检验次数为 1 000, 并选择 Poisson Model 和 Pairwise Deletion 进行分析。

### 1.2.3 *PhNAL1b* 基因启动子的克隆及顺式作用元件分析

根据已经公布的矮牵牛基因组序列, 查找 *NAL1* 启动子序列, 设计引物 NAL1b-pro-F/NAL1b-pro-R, 利用 TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit (TaKaRa 公司) 提取矮牵牛 DNA。以 DNA 为模板, 使用高保真 DNA 聚合酶(TOYOBO 公司)进行扩增, 将扩增产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序, 最终获得 *PhNAL1b* 启动子序列。使用 PlantCARE 在线软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 *PhNAL1b* 基因启动子顺式作用元件。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Application
NAL1b-F	ATGGATAAACTGGATTTAAGATTCA	Full length amplification of <i>PhNAL1b</i>
NAL1b-R	TCAAGACTGTTTCCTTTTCT TTGAT	
NAL1b-pro-F	GTGGCAAGGTGCAGGAGGTAGAGAG	Promoter sequence amplification of <i>PhNAL1b</i>
NAL1b-pro-R	ACTAATTCAATCGATTTGAACAGCA	
NAL1-R-SL	AGACTGTTTCCTTTTCT TTGAT	Subcellular localization of <i>PhNAL1b</i>
NAL1b-RT-F	GGCATTCCATAGCAAAAAGCTT	Quantitative real-time PCR
NAL1b-RT-R	CATCACACCAAACACCACCTG	
NAL1b-vigs-F	CGGAATTTCGATTCAATCACTCTGGATCTGTTC	Amplification of virus silencing fragment
NAL1b-vigs-R	CGGGATCCGTACCAAGACTAAAGCGACGCAA	
GAPDH-F	CAAGGCTGGAATTGCTTTGAG	Amplification of reference gene
GAPDH-R	CACCACTTTACTCCACTGATGCA	

### 1.2.4 不同组织及不同处理下 *PhNAL1b* 基因的表达分析

以 75 d 株龄矮牵牛为实验材料, 采集花、叶腋、叶、茎和根, 分别提取 RNA 并进行反转录, 用于组织特异性表达分析。以 60 d 株龄矮牵牛为实验材料, 第一组进行去顶处理, 6 h 后取顶端下的第 1 个腋芽, 提取 RNA 并进行反转录; 第二组对完整植株自上向下的第 4 个腋芽施加 6-苄氨基嘌呤(6-benzyl aminopurine, 6-BA)。6-BA 浓度为 50  $\mu\text{mol/L}$ , 施加量为 10  $\mu\text{L}$ 。6 h 后对处理的腋芽取样, 提取 RNA 并进行反转录; 第三组作为对照植株, 取自上向下的第 4 个腋芽, 提取 RNA 并进行反转录。

设计引物 NAL1b-RT-F/NAL1b-RT-R (表 1), 检测 *PhNAL1b* 的表达水平, 以 *PhGAPDH* 作为内参。PCR 扩增程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火延伸 20 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 40 个循环。采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法进行相对定量计算<sup>[19]</sup>。每个处理设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复。

### 1.2.5 亚细胞定位分析

设计引物 NAL1b-F/NAL1-R-SL, 以矮牵牛 cDNA 为模板, 用高保真 KOD DNA 聚合酶扩增不含有终止密码子的 *PhNAL1b* 序列(表 1)。使用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 重组试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)将扩增片段连接到 pSuper1300 载体, 筛选得到阳性克隆。随后将含有 pSuper1300-*PhNAL1b*-eGFP 的质粒转化到根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 中, 获得阳性克隆。挑取阳性克隆加入 100 mL LB [含 100  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素(kanamycin, kan)+50  $\mu\text{g/mL}$  利福平(rifampicin, rif)]培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养, 将浑浊菌液移入 50 mL 的离心管中, 5 000 r/min 离心收集菌体, 倒掉上清液, 使用侵染液(5 mg/mL 葡萄糖, 500 mmol/L 2-(N-吗啉基)乙磺酸, 20 mmol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1 mol/L

乙酰丁香酮)悬浮农杆菌菌体至  $OD_{600}=0.8-1.0$ 。对生长 4 周龄的烟草叶片背面注射菌液, 黑暗中放置 24 h, 再在正常条件下培养 24 h, 取注射叶片用激光共聚焦显微镜观察荧光<sup>[20]</sup>。将含有空载的农杆菌注射烟草作为对照, 含有细胞核 marker 的农杆菌注射烟草作为细胞核标记。

### 1.2.6 病毒诱导基因沉默载体的构建与转化

设计分别含 *EcoR* I 和 *Bam*H I 这 2 个酶切位点的上下游引物 NAL1b-vigs-F/NAL1b-vigs-R, 以矮牵牛茎组织的 cDNA 为模板, 用高保真 KOD DNA 聚合酶扩增 *PhNAL1b* 片段(表 1), 并进行琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收获得目的基因产物。对目的片段产物和 pTRV2 载体分别进行 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min 后, 将酶切产物纯化并使用 Nanodrop 测定其浓度。将纯化后的基因目的片段和载体产物用 T4 DNA 连接酶按照比例进行连接。将连接产物转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ , 经抗性筛选获得阳性克隆, 最终得到 pTRV2-*PhNAL1b* 重组质粒, 采用冻融法将其转化到 GV3101 菌株中。参照 Broderick 等<sup>[21]</sup>的方法, 瞬时转化矮牵牛叶片。10 d 后检测 *PhNAL1b* 表达水平, 40 d 后, 对分枝数目和株高进行统计分析。

### 1.2.7 统计分析

使用 Excel 2022 对数据进行整理, Tukey 检验用于统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PhNAL1b* 基因的克隆

在矮牵牛基因组数据库中搜索获得矮牵牛 *NAL1* 基因序列, 设计上下游引物, 以矮牵牛 cDNA 为模板, 用高保真 KOD DNA 聚合酶进行扩增并测序, 最终获得长度为 1 767 bp 的序列(图 1)。使用 NCBI 数据库中的 blast 功能进行序列比对, 初步判断获得的序列为 *PhNAL1* 基因, 并将其命名为 *PhNAL1b*。

## 2.2 NAL1 系统发育树分析

将 *PhNAL1b* 与拟南芥、水稻、大豆、葡萄、萝卜、君迁子等物种的 NAL1 蛋白共同构建系统发育树(图 2), 结果显示 *PhNAL1b* 与大豆 NAL1 同源性最高, 亲缘关系较近, 而与大麻、蕨麻亲缘关系较远。

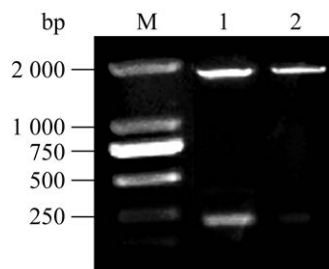


图 1 *PhNAL1b* 基因的扩增

Figure 1 Amplification of *PhNAL1b*. M: DL2000; Lane 1-2: *PhNAL1b*.

## 2.3 *PhNAL1b* 理化性质分析

矮牵牛 *PhNAL1b* 全长共 1 767 bp, 编码 1 个包含 588 个氨基酸的蛋白质。利用在线软件 Protparam 对矮牵牛 *PhNAL1b* 蛋白理化性质进行分析, 推测 *PhNAL1b* 的分子式为  $C_{2833}H_{4458}N_{796}O_{876}S_{14}$ , 相对分子量为 64 kDa, 等电点为 5.26, 其理论半衰期大约为 30 h, 不稳定参数为 43.15, 因此推测该蛋白质性质不稳定。*PhNAL1b* 蛋白中氨基酸含量相对最多的是 Leu (10.0%, 59 个)和 Gly (9.9%, 58 个), 含量相对最少的是 Trp (1.0%, 6 个)和 Met (1.0%, 6 个)。Asp+Glu (带负电荷氨基酸)共 70 个, Arg+Lys (带正电荷氨基酸)共 53 个。总平均亲水性 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.269, 脂肪族氨基酸指数为 86.70, 推测 *PhNAL1b* 为亲水性蛋白。利用 SOPMA 网站对

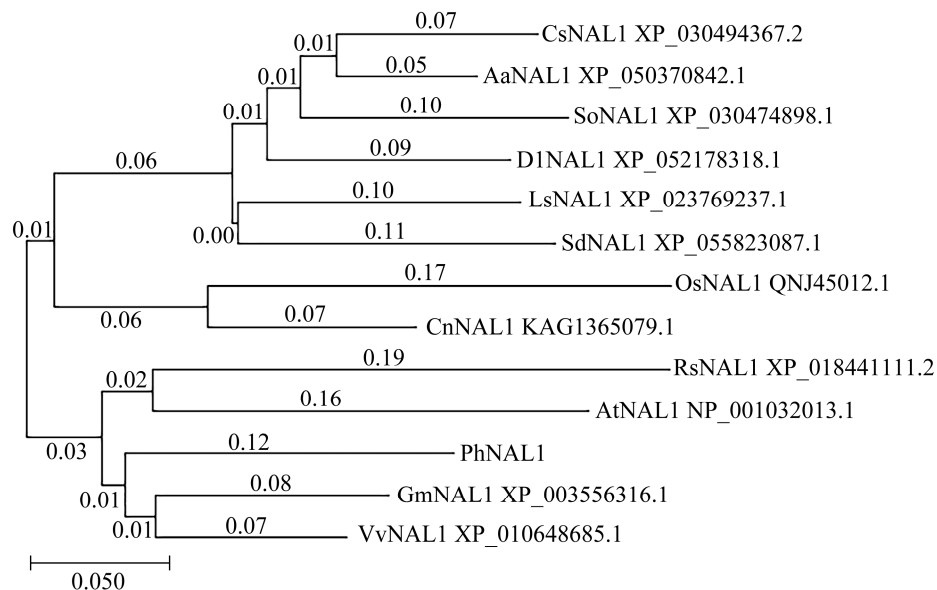


图 2 NAL1 系统发育树分析 Cs: 大麻; Aa: 蕨麻; So: 蒲桃; Dl: 君迁子; Ls: 莴苣; Sd: 欧白英; Os: 水稻; Cn: 椰子; Rs: 萝卜; Gm: 大豆; Vv: 葡萄; At: 拟南芥。

Figure 2 Phylogenetic tree analysis of NAL1. Cs: *Cannabis sativa*; Aa: *Argentina anserina*; So: *Syzygium oleosum*; Dl: *Diospyros lotus*; Ls: *Lactuca sativa*; Sd: *Solanum dulcamara*; Os: *Oryza sativa*; Cn: *Cocos nucifera*; Rs: *Raphanus sativus*; Gm: *Glycine max*; Vv: *Vitis vinifera*; At: *Arabidopsis thaliana*.

PhNAL1b 的二级结构进行分析,发现该蛋白序列主要包含  $\alpha$ -螺旋(alpha-helix, Hh)、延伸链(extended strand, Ee)、 $\beta$ -折叠(beta turn, Tt)和无规卷曲(random coil, Cc)这 4 种结构,其中  $\alpha$ -螺旋有 155 个氨基酸(26.36%),延伸链有 116 个

氨基酸(19.73%), $\beta$ -折叠有 38 个氨基酸(6.46%),无规卷曲有 279 个氨基酸(47.45%)。使用 DNAMAN 7.0 软件将 PhNAL1b 和其他物种的 NAL1 蛋白序列进行比对,结果显示矮牵牛的 PhNAL1b 含有 Peptidase S64 结构域(图 3)。

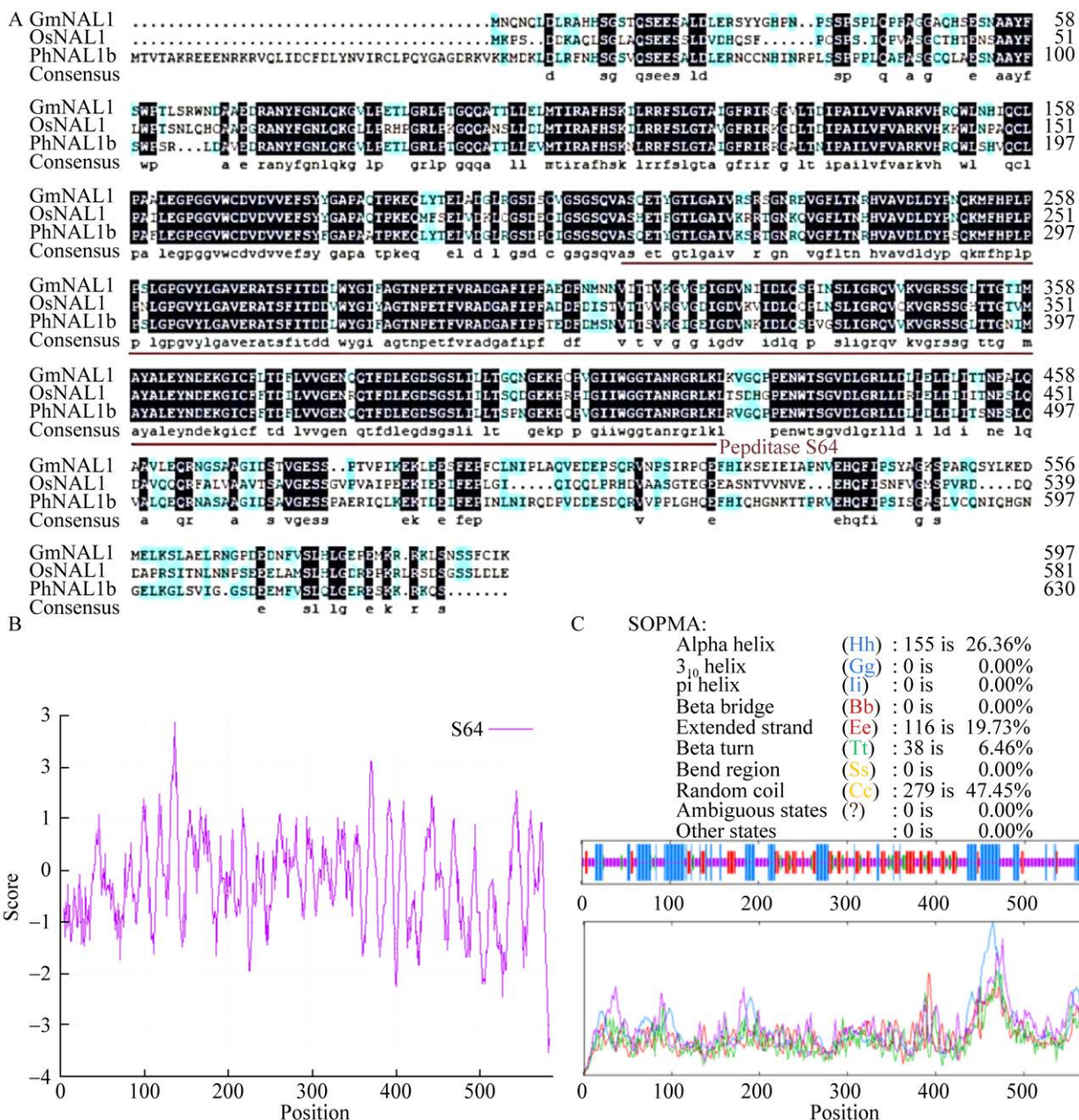


图 3 PhNAL1b 序列分析 A: 不同物种的 NAL1 序列比对。红线为 Peptidase S64 结构域。B: PhNAL1b 蛋白的亲水区、疏水区预测。C: PhNAL1b 蛋白二级结构图。

Figure 3 Sequence analysis of PhNAL1b. A: Sequence alignment of NAL1 from different species. The Peptidase S64 domain was marked with the red line. B: Prediction of hydrophilic and hydrophobic regions of PhNAL1b. C: Secondary structure diagram of PhNAL1b.

## 2.4 *PhPAY1b* 启动子顺式作用元件分析

克隆 *PhPAY1b* 转录起始位点上游 2 009 bp 的启动子序列, 利用 PlantCARE 软件进行顺式作用元件分析。结果表明, 整个启动子区域含有 32 个 CAAT-box 顺式作用元件和 36 个 TATA-box 核心启动元件, 多个光响应元件 Box 4、TCT-motif、GT1-motif、G-box, 生长素响应元件 TGA-element, 厌氧诱导元件 ARE, 参与茉莉酸反应的顺式作用元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif, 脱落酸调控元件 ABRE (表 2)。这表明 *PhPAY1b* 的转录可能受到光、厌氧和多种激素等因素的诱导。

表 2 *PhPAY1b* 启动子区域反式作用元件分析

Table 2 Analysis of *cis*-elements of *PhPAY1b* promoter region

<i>cis</i> -Element	Sequence	Predictive function	Quantity
ABRE	ACGTG	Response element for abscisic acid	10
ARE	AAACCA	Response element for anaerobic induction	10
Box 4	ATTAAT	Response element for light	15
CGTCA-motif	CGTCA	Response element for methyl jasmonate	5
GT1-motif	GGTTAA/GGTTAAT	Response element for light	13
G-Box	CACGTT	Response element for light	5
G-Box	CACGAC	Response element for light	22
TCT-motif	TCTTAC	Response element for light	6
TGA-box	TGACGTAA	Response element for auxin	32
TGA-element	AACGAC	Response element for auxin	24
TGACG-motif	TGACG	Response element for methyl jasmonate	7

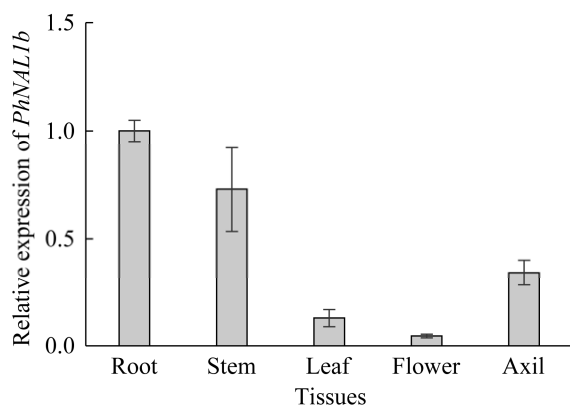


图 4 *PhNAL1b* 在矮牵牛不同组织中的表达分析  
Figure 4 Expression analysis of *PhNAL1b* in different tissues of petunia.

## 2.5 *PhNAL1b* 基因的组织特异性表达分析

利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测 *PhNAL1b* 基因在矮牵牛不同组织中的表达水平, 结果如图 4 所示, *PhNAL1b* 基因在根、茎、叶、叶腋、花中均有一定的表达, 表达水平从高到低依次为: 根>茎>叶腋>叶>花。茎、叶腋、叶片和花中 *PhNAL1b* 基因的表达水平分别为根中的 7/10、1/10、1/20 和 1/3, 提示 *PhNAL1b* 基因可能在矮牵牛的根发育中发挥重要作用。

## 2.6 去顶及 6-BA 抑制 *PhNAL1b* 基因的表达

为研究移除生长素源(去顶)及细胞分裂素对 *PhNAL1b* 的调控, 分别对 60 d 大小的矮牵牛进行去顶和在腋芽施加 6-BA 处理, 6 h 测后检测 *PhNAL1b* 的表达水平。结果如图 5 所示, 去顶后 *PhNAL1b* 的表达水平降低为对照的 1/2, 6-BA 使得 *PhNAL1b* 的表达水平约降低至对照的 14%, 说明去顶及 6-BA 均能显著抑制 *PhNAL1b* 基因的表达。

## 2.7 PhNAL1b 蛋白的亚细胞定位分析

WOLF PSORT (<http://wolfsort.org/>)预测显示 PhNAL1b 蛋白定位于细胞核,为进一步证实其定位,构建 pSuper1300-PhNAL1b-eGFP 载体,并将构建好的载体瞬时转化烟草,以空载

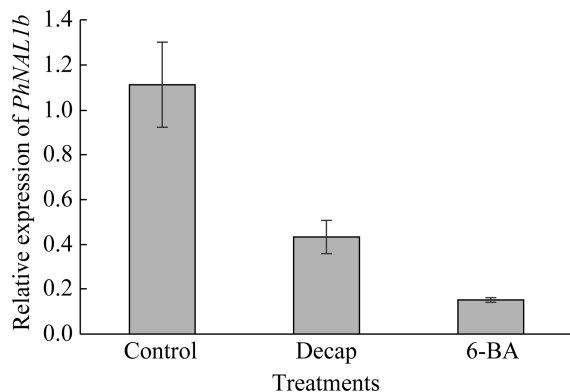


图 5 *PhNAL1b* 基因在不同处理下的表达分析 Decap 表示去顶。

Figure 5 The expression analysis of *PhNAL1b* under different treatments. Decap represents decapitation.

pSuper1300-eGFP 作为对照。结果显示,对照在整个细胞里均能观察到绿色荧光,而转化了 pSuper1300-PhNAL1b-eGFP 的烟草只在细胞核内观测到绿色荧光,同时,以 NLS-mCherry 作为细胞核标记的红色荧光也在细胞核中被观测到(图 6),上述结果表明 PhNAL1b 定位在细胞核。

## 2.8 *PhNAL1b* 沉默对矮牵牛分枝表型的影响

为研究 *PhNAL1b* 的功能,构建 pTRV2-*PhNAL1b* 载体,并将构建好的载体瞬时转化矮牵牛,7 d 后检测 *PhNAL1b* 的表达量,并于注射 30 d 后观察植株表型。结果显示,病毒沉默使得 *PhNAL1b* 的表达水平降低为对照的 1/3,同时,矮牵牛分枝数目由对照植株的 3.5 增加到 6.6。而株高则由对照植株的 66.5 cm 降低到 21.5 cm(图 7),说明 *PhNAL1b* 表达水平的降低导致矮牵牛分枝数目增加和株高降低,*PhNAL1b* 能够负调控矮牵牛分枝发育。

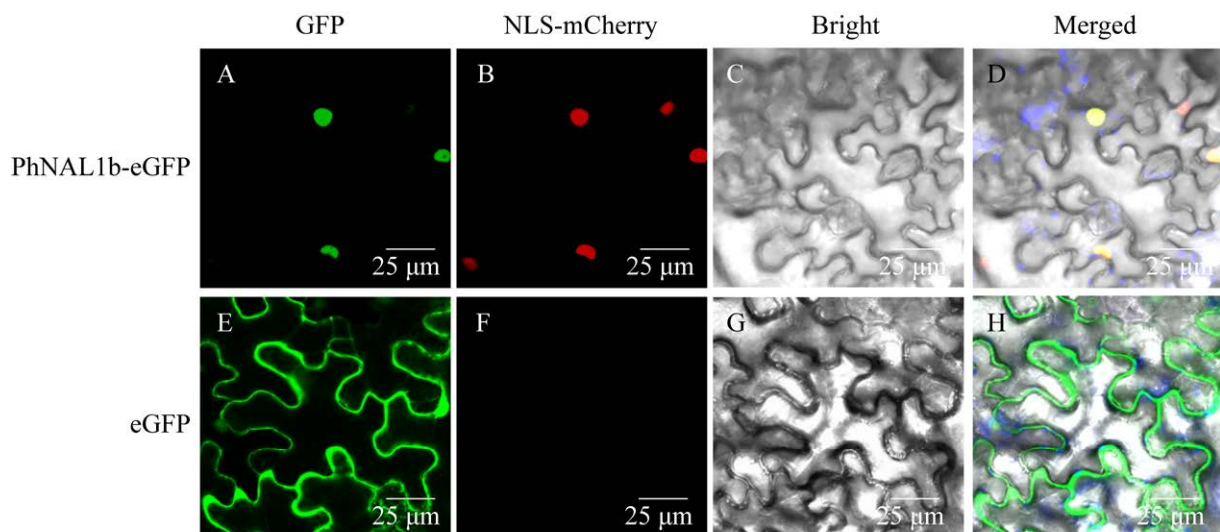


图 6 *PhNAL1b* 蛋白的亚细胞定位 A, E: PhNAL1b-eGFP 和 eGFP (control) 的绿色荧光; B: NLS-mCherry 红色荧光; C, G: PhNAL1b-eGFP 和 eGFP 明场; D, H: PhNAL1b-eGFP 和 eGFP 不同场的融合图片; F: 暗场。Bar=25  $\mu$ m。

Figure 6 Subcellular localization of PhNAL1b. A, E: Green fluorescence images of PhNAL1b-eGFP protein and eGFP (control); B: Red fluorescence image of NLS-mCherry; C, G: Bright field images of PhNAL1b-eGFP and eGFP; D, H: The combined images of PhNAL1b-eGFP and eGFP; F: Dark field. Bar=25  $\mu$ m.



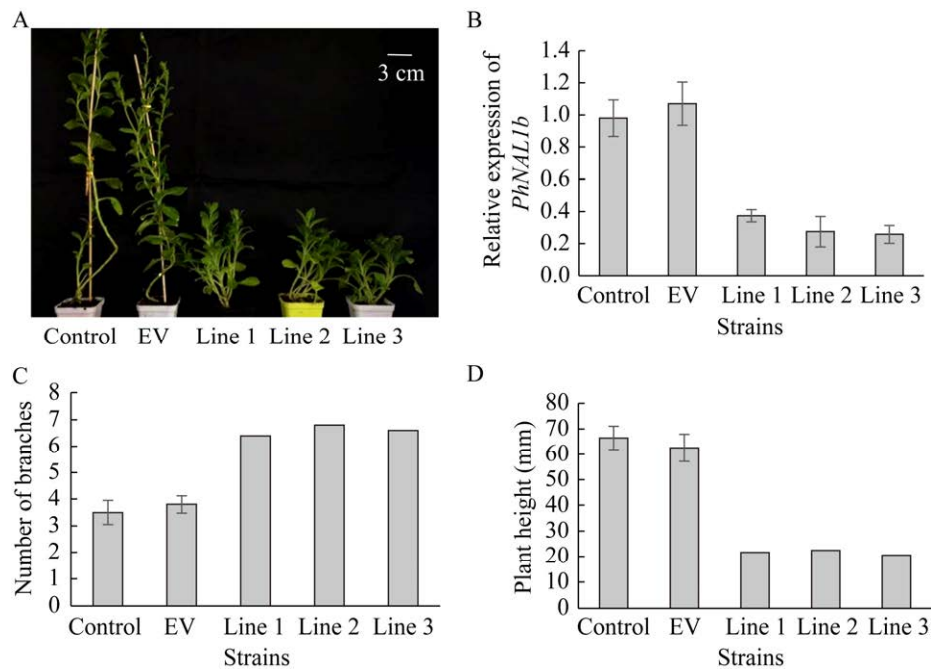


图 7 矮牵牛 *PhPNALb* 病毒沉默植株基因表达及表型分析 A: *PhNAL1b* 病毒沉默植株与对照植株的表型对比。Bar=3 cm。B: *PhNAL1b* 的转录水平检测。C: *PhNAL1b* 病毒沉默与对照植株的分枝数目比较; D: *PhNAL1b* 病毒沉默与对照植株的株高对比。

Figure 7 Gene expression and phenotype analysis of *PhPNALb*-virus silenced petunia plants. A: Phenotype comparison of plants infiltrated with pTRV2-*PhNAL1b* and the control. Bar=3 cm. B: Detection of transcription level of *PhNAL1b*. C: Branch number comparison of plants infiltrated with pTRV2-*PhNAL1b* and the control. D: Plant height comparison of plants infiltrated with pTRV2-*PhNAL1b* and the control.

### 3 讨论与结论

观赏植物如矮牵牛、多头切花菊、地被菊等在栽培中需通过去顶促进花头增多,以增加观赏效果。由于目前尚未有有效的应用于株型调控的化学药剂,人力操作是唯一有效的解决方式,但这大大提高了生产成本,制约了产业的规模化生产。因此,培育具有不同分枝特性的新品种对矮牵牛的高效生产具有重要意义。

*NAL1* 在水稻中被认为是一个具有较高育种价值的多效性基因,随着 *NAL1* 多个等位基因 *QTL FLAG LEAF WIDTH (qFLW)*<sup>[22]</sup>、*GREEN FOR PHOTOSYNTHESIS (GPS)*<sup>[23]</sup>、*SPIKELET NUMBER (SPIKE)*<sup>[24]</sup>、*LSCHL4*<sup>[25]</sup>、*SSI*<sup>[26]</sup>被发

现, *NAL1* 在植物生长发育中的功能被逐步发现,如调节叶片发育、作物产量、根系结构、光合作用速率、叶绿素含量等<sup>[27-30]</sup>。近年来,有研究发现 *NAL1/PAY1 (PLANT ARCHITECTURE AND YIELD 1)*参与调控水稻的分蘖,该基因突变导致株高降低,分枝增多,分枝角度增大。*NAL1/PAY1* 的过表达使得植株株高增加、分枝数目减少、茎秆变粗、分枝角度减小<sup>[31]</sup>。为在重要的观赏植物矮牵牛中对该基因的功能进行研究,克隆了 *NAL1* 的同源基因 *PhNAL1b*,该基因编码 588 个氨基酸,而水稻和大豆 *NAL1* 分别编码 582 个和 598 个氨基酸。*PhNAL1b* 与水稻、大豆 *NAL1* 的相似性分别为 60.12%、

72.59%，均在 N 端含有 Peptidase S64 结构域，该结构域可以切割蛋白质中的肽键并在各种发育过程中发挥作用<sup>[32]</sup>，说明 PhNAL1b 与水稻 NAL1 相同，作为一种丝氨酸蛋白酶起着调控作用。

对 *PhNAL1b* 启动子的分析发现其启动子上含有光响应元件、脱落酸响应元件、生长素应答元件、茉莉酸甲酯响应元件等多个顺式作用元件，提示其可能参与生长素等激素调控的生长发育过程。而对于 *PhNAL1b* 是否确实受上述激素的调控，需后续利用 qRT-PCR 进一步验证。*PhNAL1b* 在被检测的各个组织中均有表达，说明 *PhNAL1b* 具有组成型表达的特点，提示其广泛参与矮牵牛各器官生长发育、形态建成等。*PhNAL1b* 在矮牵牛根中表达量最高，花中的表达量最低，这与水稻中 *NAL1/PAY1* 在叶片中表达水平最高的表达特性不同<sup>[31]</sup>，推测可能与不同物种中基因功能的部分差异有关。*PhNAL1b* 在根中表达水平最高，结合水稻 *NAL1* 被证明参与调控不定根发育<sup>[13]</sup>，提示 *PhNAL1b* 可能在矮牵牛根系发育中具有重要作用。去顶被认为是移除了生长素源，并通过激活多个下游路径引起腋芽萌发。细胞分裂素是调控分枝发育的重要激素，是生长素的第二信使，能够直接促进腋芽萌发<sup>[33]</sup>。去顶和 6-BA 处理均显著抑制了 *PhNAL1b* 的表达，说明去顶和 6-BA 能够通过调控 *PhNAL1b* 的表达影响矮牵牛的腋芽萌发。亚细胞定位显示 *PhNAL1b* 定位于细胞核中，这与水稻 *NAL1/PAY1* 定位于细胞核中的结果相同<sup>[31]</sup>，提示 *NAL1* 在不同物种中的作用机制存在一定的保守性。

病毒诱导基因沉默 (virus-induced gene silencing, VIGS) 技术能够在较短时间内进行基因功能的验证，已在研究多种植物的分枝发育过程中应用，如紫薇 (*Lagerstroemia fauriei* × *L.*

*indica*)<sup>[34]</sup>、烟草<sup>[35]</sup>、棉花 (*Gossypium hirsutum*)<sup>[36]</sup>、石斛 (*Dendrobium catenatum*)<sup>[37]</sup> 等。对矮牵牛 *PhNAL1b* 基因进行 VIGS 后，发现相对于对照植株，*PhNAL1b* 表达水平显著降低，同时伴随着矮牵牛分枝数目增多，株高降低，说明 *PhNAL1b* 基因的沉默激活了下游路径，最终引起分枝数目的改变。在水稻中的研究显示，*NAL1/PAY1* 通过影响生长素极性转运活性和改变内源吲哚-3-乙酸的分布来调控水稻分蘖数目；也有研究表明 *NAL1* 能够促进 *OsTPR2* 的降解，进而影响下游激素通路，如 *NAL1-OsTPR2* 调节了生长素和独角金内酯相关基因 *PIN1b*、*ERF3*、*CKX4*、*SLR1*、*DEP1* 和 *CKX9* 的表达<sup>[38]</sup>。后续将通过转录组测序及酵母双杂等实验进一步分析矮牵牛 *PhNAL1b* 激活的调控分枝发育的下游路径。本研究为进一步揭示 *NAL1* 调控植物分枝发育的机理提供了实验依据，也为优良株型的分子育种提供了基因资源。

## REFERENCES

- [1] TEICHMANN T, MUHR M. Shaping plant architecture[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 233.
- [2] FAN NN, SU LT, LV AM, WEN WW, GAO L, YOU XK, ZHOU P, AN Y. PECTIN ACETYLESTERASE12 regulates shoot branching via acetic acid and auxin accumulation in alfalfa shoots[J]. *Plant Physiology*, 2024, 195(1): 518-533.
- [3] LI MJ, LI HY, ZHU QD, LIU D, LI Z, CHEN HF, LUO JS, GONG P, ISMAIL AM, ZHANG ZH. Knockout of the sugar transporter *OsSTP15* enhances grain yield by improving tiller number due to increased sugar content in the shoot base of rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *The New Phytologist*, 2024, 241(3): 1250-1265.
- [4] WANG M, LE MOIGNE MA, BERTHELOOT J, CRESPEL L, PEREZ-GARCIA MD, OGÉ L, DEMOTES-MAINARD S, HAMAMA L, DAVIÈRE J M, SAKR S. BRANCHED1: a key hub of shoot branching[J]. *Frontiers in plant science*, 2019, 10: 76.
- [5] YANG Y, NICOLAS M, ZHANG JZ, YU H, GUO DS, YUAN RR, ZHANG TT, YANG JZ, CUBAS P, QIN GJ. The TIE1 transcriptional repressor controls shoot branching by directly repressing BRANCHED1 in *Arabidopsis*[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(3): e1007296.
- [6] GAO RM, GRUBER MY, AMYOT L, HANNOUFA A. SPL13 regulates shoot branching and flowering time in

- Medicago sativa*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2018, 96(1/2): 119-133.
- [7] ZHAI HW, XIONG L, LI HY, LYU XG, YANG GD, ZHAO T, LIU J, LIU B. Cryptochrome 1 inhibits shoot branching by repressing the self-activated transcription loop of PIF4 in *Arabidopsis*[J]. *Plant Communications*, 2020, 1(3): 100042.
- [8] XIE YR, LIU Y, MA MD, ZHOU Q, ZHAO YP, ZHAO BB, WANG BB, WEI HB, WANG HY. *Arabidopsis* FHY3 and FAR1 integrate light and strigolactone signaling to regulate branching[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1955.
- [9] YIN PC, MA QX, WANG H, FENG D, WANG XB, PEI YX, WEN JQ, TADEGE M, NIU LF, LIN H. small leaf and bushy1 controls organ size and lateral branching by modulating the stability of big seeds1 in *Medicago truncatula*[J]. *The New Phytologist*, 2020, 226(5): 1399-1412.
- [10] BARBIER FF, CAO D, FICHTNER F, WEISTE C, PEREZ-GARCIA MD, CARADEUC M, Le GOURRIEREC J, SAKR S, BEVERIDGE CA. HEXOKINASE1 signalling promotes shoot branching and interacts with cytokinin and strigolactone pathways[J]. *The New Phytologist*, 2021, 231(3): 1088-1104.
- [11] WANG HM, TONG XH, TANG LQ, WANG YF, ZHAO J, LI ZY, LIU XX, SHU YZ, YIN M, ADEGOKE TV, LIU WN, WANG S, XU HY, YING JZ, YUAN WY, YAO JL, ZHANG J. rlb (rice lateral branch) recruits prc2-mediated h3k27 tri-methylation on *OsCKX4* to regulate lateral branching[J]. *Plant Physiology*, 2022, 188(1): 460-476.
- [12] DONG CH, ZHANG LC, ZHANG Q, YANG YX, LI DP, XIE ZC, CUI GQ, CHEN YY, WU LF, LI Z, LIU GX, ZHANG XY, LIU CM, CHU JF, ZHAO GY, XIA C, JIA JZ, SUN JQ, KONG XY, LIU X. *Tiller Number1* encodes an ankyrin repeat protein that controls tillering in bread wheat[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 836.
- [13] CHO SH, YOO SC, ZHANG HT, LIM JH, PAEK NC. Rice *NARROW LEAF1* regulates leaf and adventitious root development[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 32(1): 270-281.
- [14] JIANG D, FANG JJ, LOU LM, ZHAO JF, YUAN SJ, YIN L, SUN W, PENG LX, GUO BT, LI XY. Characterization of a null allelic mutant of the rice *NALI* gene reveals its role in regulating cell division[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118169.
- [15] SUBUDHI PK, GARCIA RS, CORONEJO S, de LEON TB. A novel mutation of the *NARROW LEAF 1* gene adversely affects plant architecture in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(21): 8106.
- [16] WANG Y, XU WX, LIU Y, YANG J, GUO X, ZHANG JR, PU JS, CHEN NG, ZHANG WF. Identification and transcriptome analysis of a novel allelic mutant of *NALI* in rice[J]. *Genes*, 2024, 15(3): 325.
- [17] HUANG YY, ZHAO SS, FU YC, SUN HD, MA X, TAN LB, LIU FX, SUN XY, SUN HY, GU P, XIE DX, SUN CQ, ZHU ZF. Variation in the regulatory region of *FZP* causes increases in secondary inflorescence branching and grain yield in rice domestication[J]. *The Plant Journal*, 2018, 96(4): 716-733.
- [18] LIN LH, ZHAO YF, LIU F, CHEN Q, QI JC. Narrow leaf 1 (*NAL1*) regulates leaf shape by affecting cell expansion in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 516(3): 957-962.
- [19] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [20] HOSHIKAWA K, FUJITA S, NA RH, EZURA K, YAMAMOTO T, NONAKA S, EZURA H, MIURA K. Efficient transient protein expression in tomato cultivars and wild species using agroinfiltration-mediated high expression system[J]. *Plant Cell Reports*, 2019, 38(1): 75-84.
- [21] BRODERICK SR, JONES ML. An optimized protocol to increase virus-induced gene silencing efficiency and minimize viral symptoms in *Petunia*[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 32(1): 219-233.
- [22] CHEN ML, LUO J, SHAO GN, WEI XJ, TANG SQ, SHENG ZH, SONG J, HU PS. Fine mapping of a major QTL for flag leaf width in rice, qFLW4, which might be caused by alternative splicing of *NAL1*[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(5): 863-872.
- [23] TAKAI T, ADACHI S, TAGUCHI-SHIOBARA F, SANOH-ARAI Y, IWASAWA N, YOSHINAGA S, HIROSE S, TANIGUCHI Y, YAMANOUCHE U, WU JZ, MATSUMOTO T, SUGIMOTO K, KONDO K, IKKA T, ANDO T, KONO I, ITO S, SHOMURA A, OOKAWA T, HIRASAWA T, YANO M, KONDO M, YAMAMOTO T. A natural variant of *NALI*, selected in high-yield rice breeding programs, pleiotropically increases photosynthesis rate[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3: 2149.
- [24] FUJITA D, TRIJATMIKO KR, TAGLE AG, SAPASAP MV, KOIDE Y, SASAKI K, TSAKIRPALOGLOU N, GANNABAN RB, NISHIMURA T, YANAGIHARA S, FUKUTA Y, KOSHIBA T, SLAMET-LOEDIN IH, ISHIMARU T, KOBAYASHI N. *NALI* allele from a rice Landrace greatly increases yield in modern *indica* cultivars[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(51): 20431-20436.
- [25] ZHANG GH, LI SY, WANG L, YE WJ, ZENG DL, RAO YC, PENG YL, HU J, YANG YL, XU J, REN DY, GAO ZY, ZHU L, DONG GJ, HU XM, YAN MX, GUO LB, LI CY, QIAN Q. *LSCHL4* from Japonica cultivar, which is allelic to *NALI*, increases yield of *indica* super rice 93-11[J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(8): 1350-1364.
- [26] XU JL, WANG Y, ZHANG F, WU Y, ZHENG TQ, WANG YH, ZHAO XQ, CUI YR, CHEN K, ZHANG Q, LIN HX, LI JY, LI ZK. SS1 (*NALI*)- and SS2-Mediated genetic networks underlying source-sink and yield traits in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132060.
- [27] TAGUCHI-SHIOBARA F, OTA T, EBANA K, OOKAWA T, YAMASAKI M, TANABATA T, YAMANOUCHE U, WU JZ, ONO N, NONOUE Y,

- NAGATA K, FUKUOKA S, HIRABAYASHI H, YAMAMOTO T, YANO M. Natural variation in the flag leaf morphology of rice due to a mutation of the *NARROW LEAF 1* gene in *Oryza sativa* L[J]. *Genetics*, 2015, 201(2): 795-808.
- [28] LI XK, GUO ZL, LV Y, CEN X, DING XP, WU H, LI XH, HUANG JP, XIONG LZ. Genetic control of the root system in rice under normal and drought stress conditions by genome-wide association study[J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(7): e1006889.
- [29] WANG QX, XIE WB, XING HK, YAN J, MENG XZ, LI XL, FU XK, XU JY, LIAN XM, YU SB, XING YZ, WANG GW. Genetic architecture of natural variation in rice chlorophyll content revealed by a genome-wide association study[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(6): 946-957.
- [30] YANO K, YAMAMOTO E, AYA K, TAKEUCHI H, LO PC, HU L, YAMASAKI M, YOSHIDA S, KITANO H, HIRANO K, MATSUOKA M. Genome-wide association study using whole-genome sequencing rapidly identifies new genes influencing agronomic traits in rice[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(8): 927-934.
- [31] ZHAO L, TAN LB, ZHU ZF, XIAO LT, XIE DX, SUN CQ. *PAY1* improves plant architecture and enhances grain yield in rice[J]. *The Plant Journal*, 2015, 83(3): 528-536.
- [32] HEDSTROM L. Serine protease mechanism and specificity[J]. *Chemical Reviews*, 2002, 102(12): 4501-4524.
- [33] MÜLLER D, LEYSER O. Auxin, cytokinin and the control of shoot branching[J]. *Annals of Botany*, 2011, 107(7): 1203-1212.
- [34] LI SZ, ZHENG TC, ZHUO XK, LI ZJ, WANG J, CHENG TR, ZHANG QX. Isolation of the crape myrtle *Decreased Apical Dominance* gene *LfiDAD2* and characterization of its function in the control of axillary branching[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 262: 109055.
- [35] QI XL, LIU CL, SONG LL, QIN TF, LI M. Functional characterization of *PaCYP724B1* involved in shoot branching in sweet cherry (*Prunus avium* L.)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 258: 108770.
- [36] DIAO YY, ZHAN JJ, ZHAO YY, LIU LS, LIU PP, WEI X, DING YP, SAJJAD M, HU W, WANG P, GE XY. *GhTIE1* regulates branching through modulating the transcriptional activity of TCPs in cotton and *Arabidopsis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1348.
- [37] HAN YL, ZHANG JC, ZHANG SQ, XIANG LJ, LEI ZH, HUANG QX, WANG HZ, CHEN T, CAI MH. *DcERF109* regulates shoot branching by participating in strigolactone signal transduction in *Dendrobium catenatum*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2024, 176(2): e14286.
- [38] LI WJ, YAN JJ, ZHANG Y, ZHANG F, GUAN ZY, YAO YL, CHANG Y, TU HF, LI XK, WANG HJ, XIONG HY, LAI XL, YIN P, XIONG LZ. Serine protease NAL1 exerts pleiotropic functions through degradation of TOPLESS-related corepressor in rice[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(7): 1130-1142.