

萝卜全基因组中 SPL 基因家族成员的鉴定与分析

刘婷婷¹, 李晓曼¹, 张晓辉¹, 王海平¹, 阳文龙¹, 宋江萍¹, 贾会霞¹, 刘同金^{1,2}, 李锡香¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所/农业农村部园艺作物生物学与遗传改良重点实验室,

北京 100081; ² 金陵科技学院园艺园林学院, 南京 210038)

摘要: SQUAMOSA 启动子结合类蛋白 (SPL) 基因家族, 作为一类在植物中广泛存在的转录因子, 在植物生长发育、信号转导及生理生化过程等方面具有重要作用。本研究通过生物信息学方法, 从萝卜基因组中鉴定出分布于 8 条染色体上的 26 个 SPL 基因, 并将其按照所处染色体位置命名为 *RsSPL1*~*RsSPL26*。其氨基酸数目在 139~1021 aa, 蛋白分子量在 16167.7~112219.48 Da, 等电点分布在 5.77~9.67, 外显子数量从 2 到 11 个不等。microRNA 结合位点预测发现 12 个 *RsSPL* 含有 miR156 的结合位点, 11 个 *RsSPL* 含有 miR157 的结合位点。对它们在不同组织和发育时期的表达模式研究发现, 该基因家族成员具有一定的时空表达差异性, 且同一个亚家族的成员具有相似的表达模式。本研究为萝卜 SPL 基因家族的功能研究奠定了基础。

关键词: 萝卜; SPL 基因家族; 基因组分布; 生物学特点; 基因表达

Genome-wide Identification and Analysis of SPL Gene Family in Radish

LIU Ting-ting¹, LI Xiao-man¹, ZHANG Xiao-hui¹, WANG Hai-ping¹, YANG Wen-long¹,
SONG Jiang-ping¹, JIA Hui-xia¹, LIU Tong-jin^{1,2}, LI Xi-xiang¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Laboratory of Biology and
Genetics Improvement of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081;

² College of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038)

Abstract: SQUAMOSA promoter binding protein-like (SPL) gene family, as a class of transcription factors present widely in plants, has been shown to play important biological roles in plant growth, development, signal transduction, physiological and biochemical processes. In this study, 26 SPL genes from the radish genome have been identified using bioinformatic approach, and they are designated *RsSPL1*~*RsSPL26* according to their locations on eight chromosomes. The amino acids encoded by SPL genes are variable from 139 to 1021 aa, with the protein molecular weight ranged from 16167.7 to 112219.48 Da and an isoelectric point of 5.77 to 9.67. Radish SPL genes contain 2 to 11 exons. MicroRNA target prediction suggested that 12 *RsSPL* genes contained complementary sequence of miR156 and 11 *RsSPL* genes contained complementary sequence of miR157. The expression patterns of *RsSPL* genes in different tissues and development stages showed spatial and temporal

收稿日期: 2020-12-04 修回日期: 2021-01-21 网络出版日期: 2021-02-22

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20201204002>

第一作者研究方向为蔬菜种质资源, E-mail: liutingliu1996@126.com

通信作者: 李锡香, 研究方向为蔬菜种质资源, E-mail: lixixiang@caas.cn

刘同金, 研究方向为蔬菜种质资源与分子生物学, E-mail: tongjinliu@163.com

基金项目: “十三五”国家重点研发计划 (2016YFD0100204-02); 国家自然科学基金 (31772303); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (IVF-BRF2019001, IVF-BRF2020001); 中国农业科学院创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS)

Foundation projects: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0100204-02), National Natural Science Foundation of China (31772303), Special Fund for Basic Scientific Research of Central Public Welfare Scientific Research Institutes (IVF-BRF2019001, IVF-BRF2020001), the Science and Technology Innovation Program of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-IVFCAAS)

differences, and the same subfamily members showed similar expression patterns. Thus, these results provided insights for the functional characterization of the *SPL* genes family in radish.

Key words: radish; *SPL* gene family; genomic distribution; biological characteristics; gene expression

SPL (SQUAMOSA promoter binding protein-like) 是广泛存在于绿色植物中的一类转录因子。最早被报道的是金鱼草中的 *SBP1* 和 *SBP2*, 它通过结合 *MADS-box* 基因 *SQUAMOSA* 的启动子而调控花发育^[1-2]。此后, 拟南芥^[3]、水稻^[4]、番茄^[5]、枣^[6]、草莓^[7]、菠萝^[8]和桃^[9]等多种植物的 *SPL* 基因被陆续分离鉴定。研究表明, *SPL* 转录因子在植物生长发育、信号转导及响应生物和非生物胁迫等方面具有重要作用^[10-13]。*RNAi* 沉默 *MsSPL9* 的苜蓿植株比野生型植株具有更强的耐旱性, 且花青素含量增加, 表明 *MsSPL9* 可能通过调控花青素的生物合成而影响苜蓿的耐旱性^[13]。*SPL3/4/5* 通过与 *APETALA1*、*LEAFY* 和 *FRUITFULL* 的启动子结合, 从而通过 FT-FD 复合物介导它们的激活, 在长日照条件下诱导拟南芥开花^[14]。过表达 *SPL3* 能够加速拟南芥开花进程^[15-17]。水稻 *OsSPL14* 激活 *DEP1* 等产量相关基因, 使植株非生产性分蘖减少、穗粒增多, 从而提高产量^[18]。*SPL7* 和 *SPL8* 通过调控 *SEPALLATA3* 和 *MADS32* 的上调表达而诱导柳枝稷从幼年期向成年期转变^[12]。植物中大部分的 *SPL* 基因受非编码单链 RNA 分子 *miR156* 调控^[19-21]。*miR156* 的靶基因 *SPL9* 通过破坏 MYB-bHLH-WD40 蛋白复合体的稳定性抑制花青素生物合成基因的表达, 负调控花青素的积累^[11, 22]。拟南芥 *miR156* 的靶基因 *SPL9* 和 *SPL15* 能够促进其由营养生长向生殖生长转变^[23]。在大豆中过表达 *GmmiR156* 能够显著降低 *GmSPL3/9* 的转录表达水平, 从而使开花时间推迟、生育期变长^[24]。

随着植物全基因组测序与生物信息学的发展, *SPL* 基因家族在许多物种中得到了鉴定与分析, 如拟南芥^[3]、水稻^[4]、番茄^[5]、枣^[6]、草莓^[7]、菠萝^[8]和桃^[9]。萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 是我国的重要蔬菜作物, 已经完成基因组测序, 但 *SPL* 基因家族的全基因组鉴定尚未见有研究报道。本研究采用生物信息学的方法, 在萝卜基因组中共鉴定出 26 个 *SPL* 基因家族成员, 并对其蛋白理化性质、保守基序、基因结构、染色体定位、顺式作用元件、表达及 *miRNA* 结合位点进行了预测和分析, 研究结果将为萝卜 *SPL* 基因的生物功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 萝卜 *SPL* 基因家族成员的鉴定和特征分析

萝卜 XYB36-2 全基因组测序由中国农业科学院蔬菜花卉研究所完成^[25]。我们将其蛋白序列构建本地数据库。由 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 查找并下载 SBP 保守结构域的 HMM 文件 (PF03110), 使用 HMMER3.0 程序搜索萝卜 XYB36-2 蛋白序列数据库。同时从 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 网站下载拟南芥 *SPL* 基因家族 16 个成员的蛋白质序列, 在萝卜 XYB36-2 的蛋白质数据库中执行本地 blast 搜索。合并以上检索结果, 并利用 HMMER 网站 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) 的 hmmscan 工具和 NCBI Conserved Domain Search 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 确认是否含有完整 SBP 结构域。

应用在线程序 WebLogo3 (<http://weblogo.threeplusone.com/>) 分析 SBP 保守结构域。使用 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测 *SPL* 蛋白的亚细胞定位。利用 ExPASy Proteomics Server (https://web.expasy.org/compute_pi/) 分析 Rs*SPL* 蛋白质的长度、分子质量和等电点。

1.2 *RsSPL* 基因系统进化树的构建

光皮桦、花生、小立陶宛蕨和小麦的 *SPL* 家族基因蛋白质序列下载于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 麻风树、条叶蓝芥和拟南芥的 *SPL* 家族基因蛋白质序列下载于 Plant TFDB (<http://planttfdb.gao-lab.org/>), 莱茵衣藻和葡萄的 *SPL* 家族基因蛋白质序列来源于 Tan 等^[26]。使用 clustal X 软件对这些基因的 SBP 蛋白进行多重序列比对, 使用 MEGA7 软件邻接法 (NJ, Neighbor-Joining) 构建系统进化树, 校验参数 Bootstrap 重复 1000 次。

1.3 *RsSPL* 基因的结构、保守基序分析及染色体定位

利用在线基因结构显示软件 GSDS (<http://gsds.gao-lab.org/>) 比对 Rs*SPL* 的编码序列与基因组序列, 确定基因内含子与外显子的结构并绘制基因结构图。利用 TBtools 软件^[27]和 XYB36-2 基因组 GFF 文件绘制染色体定位图。利用 MEME (

meme-suite.org/index.html) 对 RsSPL 蛋白质序列保守基序进行分析, 参数设置为基序长度 8~150 个氨基酸, 寻找 12 个基序。

1.4 RsSPL 家族基因 miR156/157 结合位点的预测

利用 Sun 等^[21]发表的心里美萝卜 miRNA 数据, 在 psRNA Target (<http://plantgmn.noble.org/psRNATarget/home>) 对 RsSPL 编码区及其上下游 500 bp 的 miRNA 结合位点进行预测。利用 TBtools 将预测结果进行可视化。

1.5 RsSPL 家族基因启动子顺式作用元件分析

选取 RsSPL 基因起始密码子上游 2000 bp 作为启动子区域, 利用 PlantCARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 的 ‘Search for CARE’ 工具预测 RsSPL 基因启动子区的顺式作用元件。利用 TBtools 对生成的结果进行可视化分析。

1.6 RsSPL 基因家族表达分析

基于本实验室测序完成 XYB36-2 萝卜 (白皮白肉) 的 6 个不同组织 (愈伤、肉质根、叶、茎、花和角果)、XYB36-2 萝卜和心里美萝卜 (绿皮红肉) 5 个不同发育时期 (芽期、破肚期、肉质根膨大前期、膨大盛期和成熟期) 的肉质根的转录组数据^[28], 进行 RsSPL 基因家族的表达分析。RsSPL 基因家族成员表达量经 \log_2 均一化处理, 利用 TBtools 进行转录组数据表达热图的绘制。

2 结果与分析

2.1 萝卜全基因组 RsSPL 基因家族鉴定与特征分析

利用 HMMER3.0 程序在 XYB36-2 蛋白质数据库中找到 28 个 RsSPL 具有 SBP 保守结构域, 其中 26 个 RsSPL 具有完整 SBP 保守结构域。利用拟南芥 SPL 基因家族成员序列在萝卜数据库 XYB36-2 蛋白质数据库中进行比对, 得到 26 个 RsSPL 基因。其中, 25 个蛋白序列含有完整的 SBP 结构域。合并上述结果, 最终得到 26 个萝卜 SPL 基因家族成员。按照染色体所在位置先后, 将其分别命名为 RsSPL1~RsSPL26, 其中 4 个 RsSPL 还具有锚蛋白 ANK 结构域 (图 1、表 1)。

26 个 RsSPL 蛋白分子量为 16167.70~112219.48 Da, 氨基酸数量范围为 139~1021 aa, 理论等电点为 5.77~9.67 (表 1)。亚细胞定位预测显示, 26 个 RsSPL 均定位于细胞核。

2.2 RsSPL 基因家族进化树分析

为了解 SPL 基因的系统进化关系, 对来源于拟南芥 (*AtSPL*, 16 个)、条叶蓝芥 (*TpSBP*, 11 个)、萝

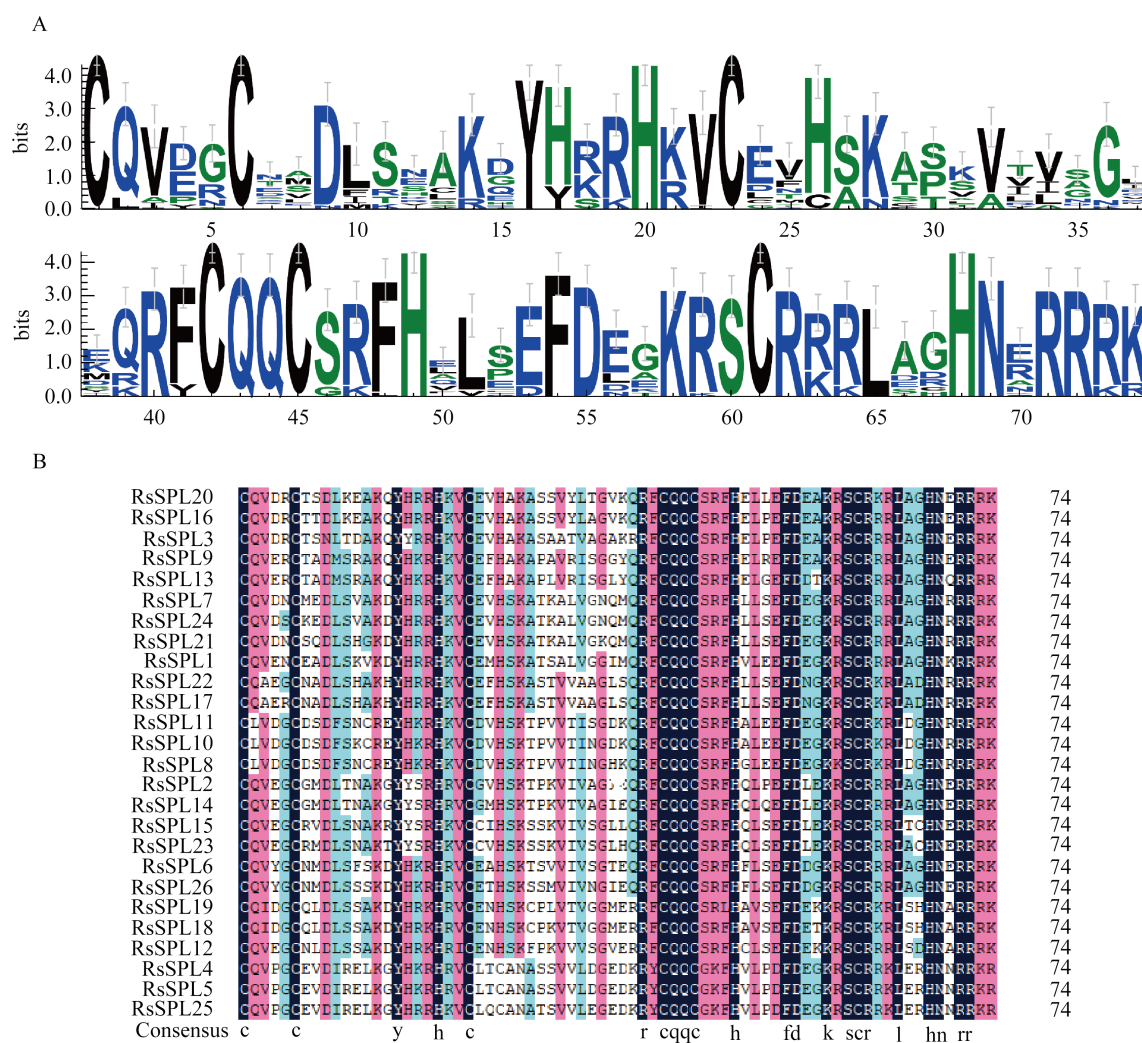
卜 (*RsSPL*, 26 个)、光皮桦 (*BISBP*, 18 个)、麻风树 (*JcSBP*, 11 个)、葡萄 (*VvSBP*, 18 个)、花生 (*AhSPL*, 13 个)、小麦 (*TaSPL*, 14 个)、小立陶宛藜 (*PpSBP*, 12 个) 和莱茵衣藻 (*CrSPL*, 7 个) 的共 146 个 SBP 保守结构域的蛋白序列构建系统进化树。由图 2 可以看出, 萝卜与拟南芥、条叶蓝芥的 SBP 蛋白序列聚在一起, 同源性最高; 光皮桦、麻风树和葡萄三者的 SBP 蛋白序列聚在一起; 花生的 SBP 蛋白序列与光皮桦、麻风树和葡萄三者距离较近; 小麦的 SBP 蛋白序列与萝卜、拟南芥、条叶蓝芥、光皮桦、麻风树、葡萄、花生 7 种植物距离较远; 莱茵衣藻 SBP 蛋白序列与其他物种的 SBP 蛋白序列进化树距离最远, 小立陶宛藜次之。根据进化树结果将 RsSPL 基因家族分为 6 个亚家族并命名为 G1~G6 (图 2), 同一分组的 RsSPL 基因家族成员亲缘关系较为相近, 其中 G1 亚家族包含的 RsSPL 成员数量最多, 共 9 个; 其次是 G2 亚家族, 包含 5 个 RsSPL 成员; G5 亚家族包含 4 个 RsSPL 成员; G4 和 G6 亚家族各包含 3 个 RsSPL 成员; G3 亚家族包含 2 个 RsSPL 成员。

2.3 RsSPL 家族基因的结构及保守基序分析

基因结构分析发现亲缘关系较为相近的成员其基因结构和保守基序也较为相似, 如 RsSPL1、RsSPL21 和 RsSPL24, 同属于 G5 亚家族, 均有 10 个外显子且外显子长度相似, 说明亲缘关系较近的 RsSPL 基因的基因结构具有较强的保守性。

RsSPL 家族基因外显子数量为 2~11 个。G5 亚家族 (RsSPL1、RsSPL7、RsSPL21 和 RsSPL24) 和 G6 亚家族 (RsSPL4、RsSPL5 和 RsSPL25) 的 7 个成员外显子数最多, 多为 10~11 个。G2 亚家族 (RsSPL3、RsSPL9、RsSPL13、RsSPL16 和 RsSPL20) 的 5 个成员外显子数量最少, 均为 2 个。G1、G3 和 G4 亚家族的成员中除 G1 的 RsSPL26、G3 的 RsSPL22 和 G4 的 RsSPL11 含有 2 个外显子外, 其他均含有 3 个外显子。

保守序列指的是具有高度相似性或同一性的分子序列, 高度保守的 DNA 序列可能具有功能性价值。对萝卜 SPL 基因家族成员进行保守基序分析发现, 同一亚家族成员其保守基序也具有相似性。外显子数目最多的 G5 亚家族中所含的基序种类也最多。G2 亚家族所含的基序种类最少, 只含有 Motif 1, 其外显子数目也最少。26 个 RsSPL 蛋白均含有 Motif 1 (SBP) 保守结构域 (图 3、表 2), 说明 SBP 结构域在萝卜 SPL 蛋白中的保守性最强。除共有基序外, 各组基序还具有一定的特异性。Motif 3、Motif 4 和 Motif 8 仅存在于 G5 亚家族,



A: RsSPL 蛋白的 SBP 保守结构域序列,字母的高低表示氨基酸出现的频率;

B: RsSPL 蛋白的 SBP 保守结构域序列比对

A: Sequence of the SBP conserved domain of RsSPL protein, the height of each letter presents the relative frequency of amino acid.

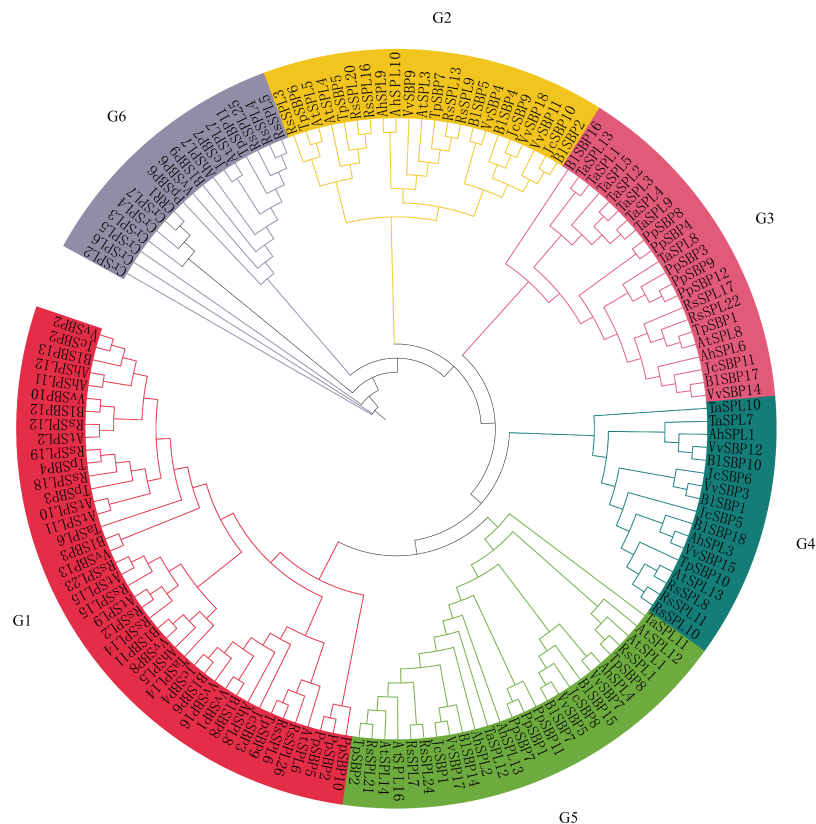
B: Sequence alignment of the SBP conserved domain of RsSPL protein

图 1 RsSPL 蛋白的 SBP 保守结构域

Fig.1 The SBP conserved domain of RsSPL protein

表 1 RsSPL 基因家族成员
Table 1 The RsSPL gene family members

基因号 Gene ID	基因名称 Gene name	染色体 Chromosome distribution	位置 Location	结构域 Domains	氨基酸数量 Length of aa	分子量 (Da) Molecular weight	等电点 Isoelectric point	拟南芥同源基 因 Homologue of <i>AtSPL</i>
<i>Rsa10009888</i>	<i>RsSPL1</i>	R01	378176~381723	SBP, ANK	924	102421.95	5.77	<i>AtSPL1</i>
<i>Rsa10039188</i>	<i>RsSPL2</i>	R01	2370040~2372445	SBP	369	40072.01	8.62	<i>AtSPL9</i>
<i>Rsa10034853</i>	<i>RsSPL3</i>	R01	47780818~4778145	SBP	179	20501.79	9.39	<i>AtSPL5</i>
<i>Rsa10023288</i>	<i>RsSPL4</i>	R02	20636369~2064033	SBP	784	87998.72	7.93	<i>AtSPL7</i>
<i>Rsa10023290</i>	<i>RsSPL5</i>	R02	20644332~2064668	SBP	421	47196.65	5.82	<i>AtSPL7</i>
<i>Rsa10004455</i>	<i>RsSPL6</i>	R02	28672660~2867423	SBP	339	38649.84	8.74	<i>AtSPL6</i>
<i>Rsa10030713</i>	<i>RsSPL7</i>	R02	38689695~3869342	SBP, ANK	971	106719.44	8.64	<i>AtSPL16</i>
<i>Rsa10032369</i>	<i>RsSPL8</i>	R03	7690596~7691893	SBP	340	37117.04	6.45	<i>AtSPL13</i>
<i>Rsa10016970</i>	<i>RsSPL9</i>	R03	9341338~9342148	SBP	139	16167.70	7.64	<i>AtSPL3</i>
<i>Rsa10021443</i>	<i>RsSPL10</i>	R03	22424914~2242718	SBP	349	38097.28	7.09	<i>AtSPL13</i>
<i>Rsa10021442</i>	<i>RsSPL11</i>	R03	22430992~2243208	SBP	337	37270.47	6.76	<i>AtSPL13</i>
<i>Rsa10021537</i>	<i>RsSPL12</i>	R04	20136820~2014022	SBP	433	48226.71	7.96	<i>AtSPL2</i>
<i>Rsa10004936</i>	<i>RsSPL13</i>	R04	37866369~3786689	SBP	142	16503.12	6.96	<i>AtSPL3</i>
<i>Rsa10011266</i>	<i>RsSPL14</i>	R04	41305992~4130864	SBP	377	41343.20	8.41	<i>AtSPL9</i>
<i>Rsa10004652</i>	<i>RsSPL15</i>	R04	48965756~4896857	SBP	310	34542.59	9.21	<i>AtSPL15</i>
<i>Rsa10027473</i>	<i>RsSPL16</i>	R05	9296098~9297033	SBP	180	20570.03	9.61	<i>AtSPL4</i>
<i>Rsa10030109</i>	<i>RsSPL17</i>	R05	19503443~1950539	SBP	337	37395.03	8.84	<i>AtSPL8</i>
<i>Rsa10008900</i>	<i>RsSPL18</i>	R05	24485502~2448683	SBP	370	41649.26	8.77	<i>AtSPL11</i>
<i>Rsa10008901</i>	<i>RsSPL19</i>	R05	24487257~2448991	SBP	369	41324.88	7.24	<i>AtSPL10</i>
<i>Rsa10009118</i>	<i>RsSPL20</i>	R06	1169204~1170183	SBP	179	20498.00	9.67	<i>AtSPL4</i>
<i>Rsa10038396</i>	<i>RsSPL21</i>	R06	18624612~1862842	SBP, ANK	1012	112219.48	8.66	<i>AtSPL14</i>
<i>Rsa10012660</i>	<i>RsSPL22</i>	R06	21736761~2173839	SBP	355	39888.13	8.84	<i>AtSPL8</i>
<i>Rsa10029494</i>	<i>RsSPL23</i>	R07	9430443~9431737	SBP	328	36495.73	9.03	<i>AtSPL15</i>
<i>Rsa10034085</i>	<i>RsSPL24</i>	R07	17453103~1745752	SBP, ANK	1021	112093.07	8.78	<i>AtSPL16</i>
<i>Rsa10015223</i>	<i>RsSPL25</i>	R07	24339235~2434336	SBP	731	81673.27	7.40	<i>AtSPL7</i>
<i>Rsa10024465</i>	<i>RsSPL26</i>	R09	31973645~3197504	SBP	325	37267.49	8.99	<i>AtSPL6</i>



At: 拟南芥; Tp: 条叶蓝芥; Rs: 萝卜; Bl: 光皮桦; Jc: 麻风树; Vv: 葡萄; Ah: 花生; Ta: 小麦; Pp: 小立陶宛蕨; Cr: 莱茵衣藻
 At: *Arabidopsis thaliana*, Tp: *Thellungiella parvula*, Rs: *Raphanus sativus*, Bl: *Betula luminifera*, Jc: *Jatropha curcas*, Vv: *Vitis vinifera*,
 Ah: *Arachis hypogaea*, Ta: *Triticum aestivum*, Pp: *Physcomitrium patens*, Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*

图 2 不同物种 SPL 基因家族进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of SPL family members of different species



A: *RsSPL* 系统进化树; B: *RsSPL* 基因结构图; C: *RsSPL* 蛋白保守基序分布图。G1~G6 表示 *RsSPL* 所属的亚家族
 A: Phylogenetic tree of *RsSPL*, B: The gene structure of *RsSPL*, C: Conserved motif distribution of *RsSPL* protein.

G1-G6 represent the subfamily to which *RsSPL* belongs

图 3 *RsSPL* 基因家族成员基因结构和保守基序

Fig.3 The gene structures and conserved motifs of *RsSPL*

Motif 5、Motif 6、Motif 7 和 Motif 9 仅存在于 G6 亚家族, Motif 10 仅存在于 G4 亚家族, 这些特殊基序可能与 SPL 家族基因功能的多样性有关。

2.4 RsSPL 基因家族成员的染色体分布

为了解 RsSPL 基因家族成员在萝卜基因组染色体中的分布, 根据 XYB36-2 萝卜基因组 GFF 文件绘

制染色体定位图, 结果表明: RsSPL 基因家族成员在萝卜基因组各个染色体上分布不均匀, 染色体 R02、R03、R04 和 R05 各有 4 个 *RsSPL* 基因, R01、R06 和 R07 各有 3 个 *RsSPL* 基因, R09 仅有 1 个 *RsSPL* 基因, R08 上无 *RsSPL* 基因分布 (图 4)。

表 2 RsSPL 蛋白保守基序序列及其分布
Table 2 Conserved motif sequence and their distribution of RsSPL protein

基序 Motif	保守基序序列 The sequence of conserved motif	宽度 Width	数目 Sites	E 值 E-value
1	QTPRCQVEGCTADLSNAKDYHRRHKVCEVHASKASKVTVSGLEQRFCCQCSRFFHLLSEFDEGKRSCRRR LAGHNERRRKPKQ	80	26	9.7e ⁻¹³⁷³
2	KAESGSDRSPSSAYDTQDRTGRIVFKLYDKBPAZFPGLRTZIFQWLANIPSELESYIRPGCVILTUYIAMP EIAWEKL	80	7	3.5e ⁻²¹¹
3	KKFIFLPNITGPGGITPLHLAASTSGSDDMIDILTNDPQEIGLSSWNTLIDATGQTPFSYAAMRNNHSYNSLV ARKLADK	80	4	1.2e ⁻⁰⁸⁸
4	DSEFWSNTRFLVNTGRQLASHKHGRIRLSKSWRTLSSPELITVSPVAVVAGEETTLVVRGRSLTNDGISIRC AHMGNYTSM EVTGTAHRSSKFDELNVNRFKVN	104	4	3.5e ⁻⁰⁷⁹
5	PPPPMIATQQPTQSESYSPDES GSGSDRVRKRDRPLLCSNFVQGMVPCSCPELDQKLEEAELPKRKR VR	72	3	2.0e ⁻⁰⁶³
6	YLDEFILKPGKMLFGRGSM TVYLNMMIFRGSTLKRVDVKLES PKLQFVYPTCFEAGKPIELIVCGLNLVQ PKCRFLVSFAGKYLP HNYSVVPAGQDGKRSCNNKLYRINIVNSDPNLF GPAFVEVENESGLSNFIPLIGD KAICSEMK	150	2	6.9e ⁻⁰⁶⁰
7	KQQQVLSQNDNSVIDVDDGKDNTCSSDQRVEQEASLICEDWNIP TQGSVPCPGSINADNFVPVTGSGEA QPDEGMNDT	78	3	3.1e ⁻⁰⁷³
8	GSRRLFPTPIIHSMLAVATVCVCVCFMHAFPIV	34	4	2.9e ⁻⁰⁴⁰
9	VKKMEPD SLIHCKCDCDVRLLENMNLARKQQSHEDLKLDPVTSVCCCESSFQKDIPSRVLNFNQEPEA GLGCKERIRAASPDAGGKETDPLLNKEVIMNVNDIGDWPRKSCIPRQSAQTCSRQT VFFIATFVVCFAV CVVJYHPNKV	149	2	5.0e ⁻⁰⁴⁰
10	CERMTSCVHSDCALSLSPSSSTPHLLQPPLPLSQEAVETVFNQSGLFENASAVSDG	59	3	6.1e ⁻⁰³⁹
11	RQYLEVENGRAYDSFPLHIW	21	7	1.6e ⁻⁰³¹
12	SSSFSFGLKLGRRIYFEDGAG	21	11	1.2e ⁻⁰²⁹

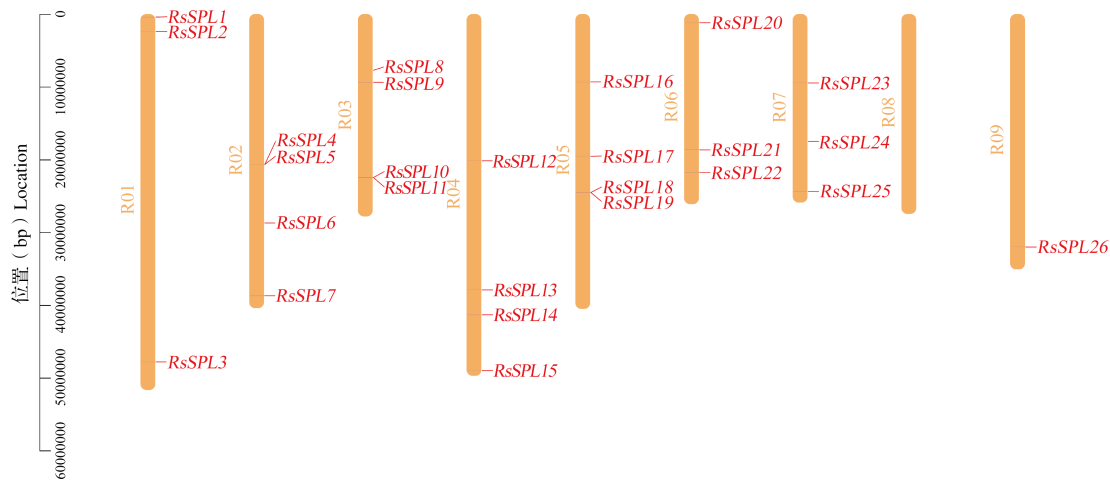
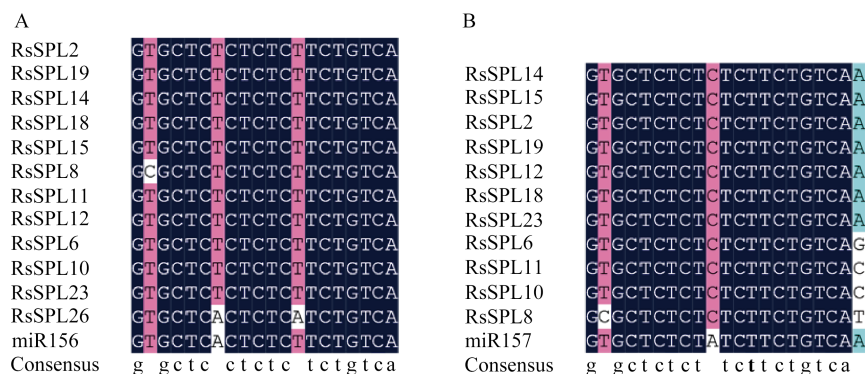


图 4 RsSPL 基因在染色体上的分布
Fig.4 Chromosome distribution of RsSPL genes

2.5 *RsSPL* 家族基因的 miR156/157 作用位点的预测

以心里美萝卜中已知的 miRNA 进行 *RsSPL* 靶位点预测,发现 26 个 *RsSPL* 的编码区上下游 500 bp 均没有 miRNA 的结合位点,而在 26 个 *RsSPL* 的 CDS 区,发现 101 个 miRNA 与 *RsSPL* 有结合位点。以 Expectation < 3 为阈值进行筛选,结果显示,只有 miR156 与 miR157 的 Expectation 小于 3。其中 miR156 在 26 个 *RsSPL* 中有 12 个靶基因,miR157 在 26 个 *RsSPL* 中有 11 个靶基因。miR156 和 miR157 共同靶向的 *RsSPL* 有 *RsSPL2*、*RsSPL6*、

RsSPL8、*RsSPL10*、*RsSPL11*、*RsSPL12*、*RsSPL14*、*RsSPL15*、*RsSPL18*、*RsSPL19* 和 *RsSPL23*,此外 miR156 还靶向 *RsSPL26*。除 *RsSPL8* 与 miR156 在互补配对区有 2 个碱基的差异外,其余 11 个 *RsSPL* 与 miR156 的互补配对区仅有 1 个碱基的差异。*RsSPL14*、*RsSPL15*、*RsSPL2*、*RsSPL19*、*RsSPL12*、*RsSPL18* 和 *RsSPL23* 与 miR157 在互补配对区有 1 个碱基的差异,*RsSPL6*、*RsSPL11* 和 *RsSPL10* 与 miR157 在互补配对区有 2 个碱基的差异,*RsSPL8* 与 miR157 在互补配对区有 3 个碱基的差异(图 5)。



A: miR156 与 *RsSPL* 互补配对结合区序列比对; B: miR157 与 *RsSPL* 互补配对结合区序列比对

A: Sequence alignment of miR156 with their complementary sequences of *RsSPL*; B: Sequence alignment of miR157 with their complementary sequences of *RsSPL*

图 5 miR156 和 miR157 与 *RsSPL* 互补配对结合区的序列比对

Fig.5 Sequence alignment of miR156/miR157 with their complementary sequences of *RsSPL*

2.6 *RsSPL* 基因家族启动子特征分析

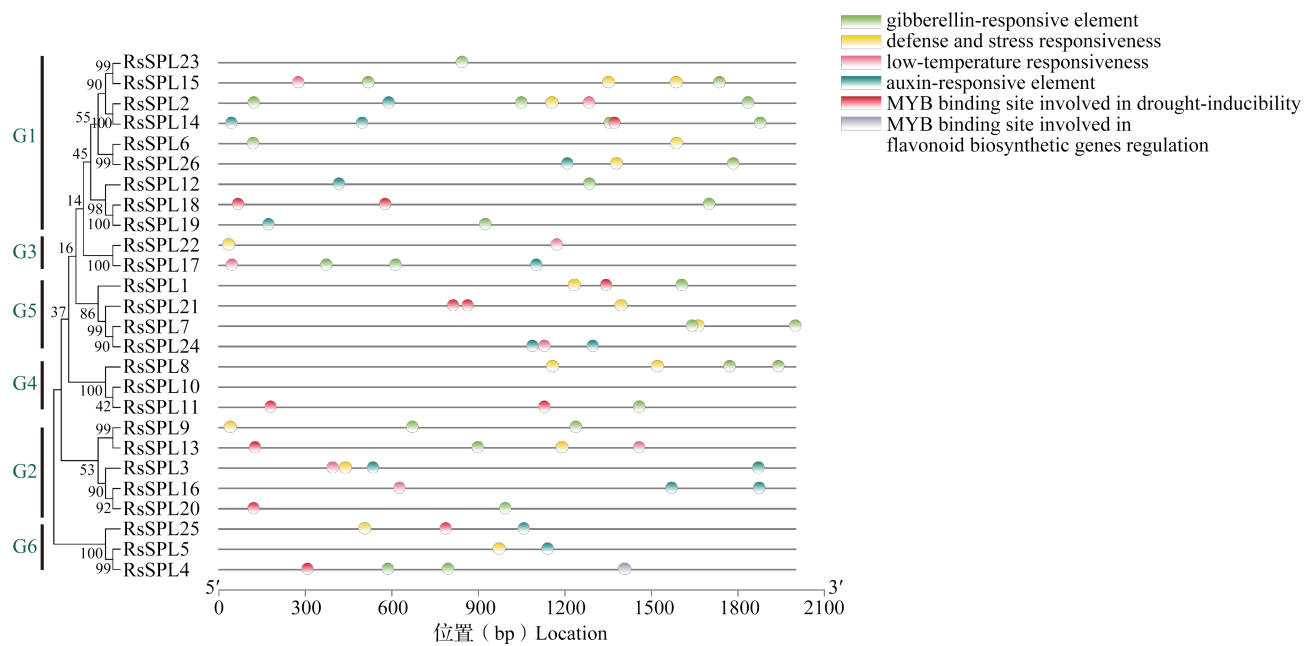
对 *RsSPL* 启动子序列进行顺式作用元件预测,发现 *RsSPL* 基因家族成员启动子区域存在大量的顺式作用元件,包括赤霉素响应、防御和应激响应、低温响应、生长素响应、干旱诱导的 MYB 结合元件、类黄酮生物合成基因调节的 MYB 结合元件(图 6)。其中,类黄酮生物合成基因调节的 MYB 结合元件只在 *RsSPL4* 中存在。

2.7 *RsSPL* 基因家族成员的表达分析

为了明确 SPL 基因家族成员在萝卜不同组织中的表达情况,利用本实验室前期完成的转录组数据,绘制了萝卜 SPL 家族基因的表达热图(图 7)。结果显示:SPL 基因家族的不同成员在萝卜不同组织(愈伤、肉质根、叶片、茎、花和角果)中表达量存在较大差异。从图 7 可以看出,G5~G6 亚家族的 *RsSPL* 成员在萝卜不同组织中的表达量较高,G1~G4 亚家族 *RsSPL* 成员表达量较低。*RsSPL1*、*RsSPL21* 和 *RsSPL24* 这 3

个基因在萝卜不同组织中表达模式相同,整体表达量较高,而这 3 个 *RsSPL* 都属于 G5 亚家族,亲缘关系较近。*RsSPL23*、*RsSPL20*、*RsSPL16*、*RsSPL26* 和 *RsSPL3* 在各个样品中整体表达量偏低,其中,*RsSPL23* 和 *RsSPL26* 属于 G1 亚家族,*RsSPL3*、*RsSPL16* 和 *RsSPL20* 属于 G2 亚家族。多个基因在萝卜花器官中具有较高的表达量,包括 *RsSPL9*、*RsSPL13*、*RsSPL2*、*RsSPL14*、*RsSPL15* 和 *RsSPL23*。

对 XYB36-2 和心里美萝卜肉质根 5 个发育时期的 RPKM 值进行分析发现,*RsSPL* 基因家族成员在萝卜肉质根不同发育时期呈显著差异表达(图 8)。*RsSPL1*、*RsSPL21* 和 *RsSPL24* 这 3 个基因在 2 份材料的肉质根的 5 个不同发育时期中,都具有非常高的表达量。但 *RsSPL5* 在心理美萝卜的 5 个发育时期的表达量都低于白萝卜 XYB36-2,*RsSPL12* 和 *RsSPL19* 在 2 种萝卜的 5 个生长时期都呈现出表达量由低到高的表达趋势。

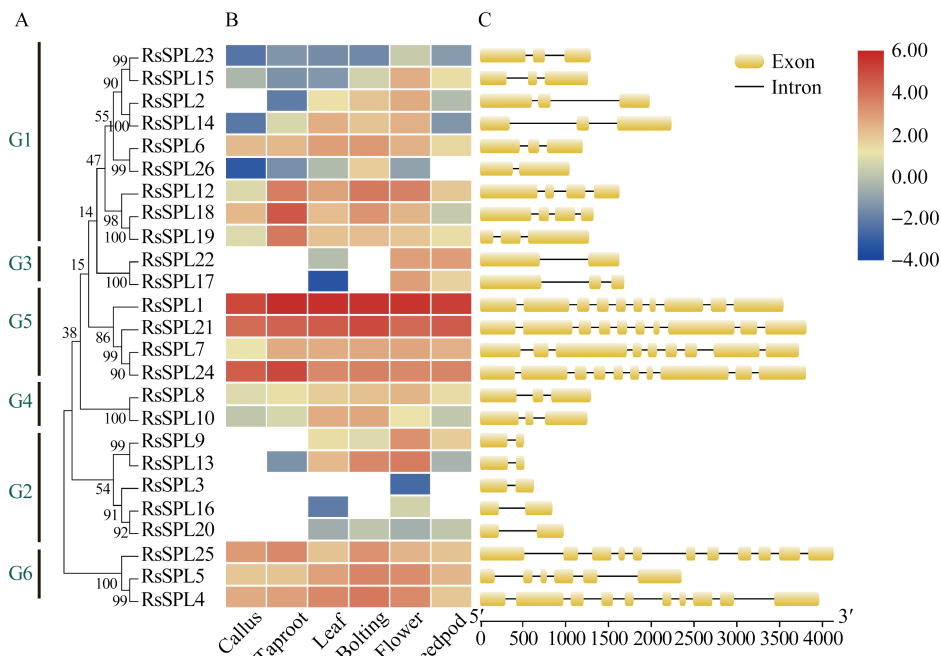


G1~G6 表示 *RsSPL* 所属的亚家族

G1~G6 represent the subfamily to which *RsSPL* belongs

gibberellin-responsive element: 赤霉素响应元件; defense and stress responsiveness: 防御和应激响应元件; low-temperature responsiveness: 低温响应元件; auxin-responsive element: 生长素响应元件; MYB binding site involved in drought-inducibility: 与干旱诱导相关的 MYB 结合位点; MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation: 与类黄酮生物合成基因调控相关的 MYB 结合位点

图 6 *RsSPL* 基因启动子顺式作用元件分布图
Fig.6 Distribution map of promoter *cis*-acting element of *RsSPL* genes



A: 根据 *RsSPL* 蛋白的 SBP 保守结构域构建的进化树; B: *RsSPL* 基因在 XYB36-2 白萝卜不同组织中的表达模式;
C: *RsSPL* 的基因结构

Callus: 愈伤; Taproot: 肉质根; Leaf: 叶; Bolting: 薹; Flower: 花; Seedpod: 角果

Exon: 外显子; Intron: 内含子

A: Phylogenetic tree of the SBP domain of *RsSPL* protein, B: The expression profile of *RsSPL* genes in different tissues of XYB36-2 white radish, C: The gene structure of *RsSPL*

图 7 XYB36-2 白萝卜不同组织中 SPL 基因的差异表达

Fig.7 The expression profile of *RsSPL* genes in different tissues of XYB36-2 white radish

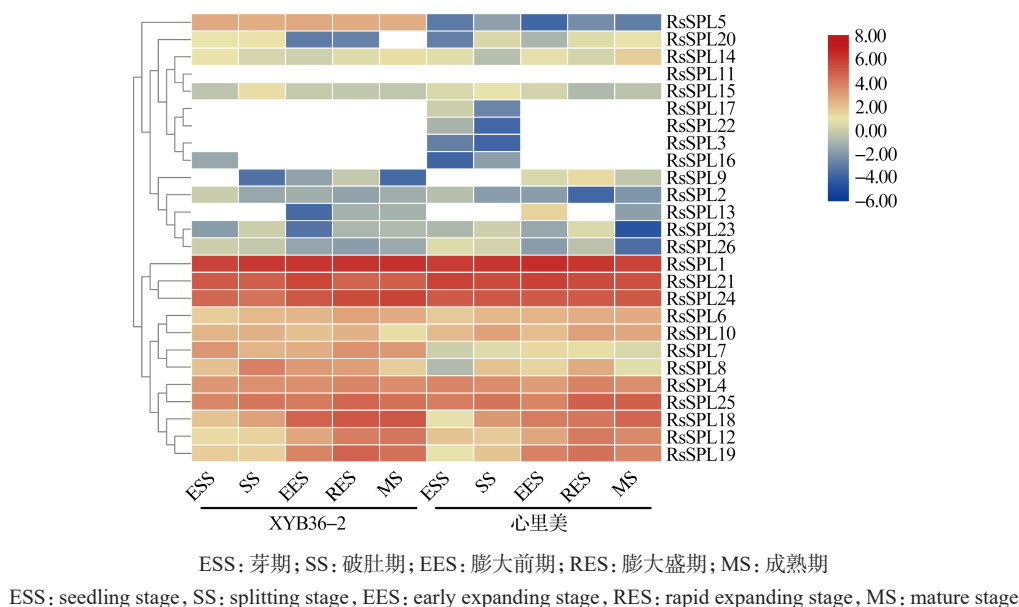


图 8 XYB36-2 白萝卜与心里美萝卜不同发育时期肉质根 *RsSPL* 基因的差异表达

Fig.8 The expression profile of *RsSPL* genes in different growing stage of taproot of XYB36-2 white radish and Xinlimei

3 讨论

SPL 基因家族是高等植物中重要的转录因子,随着植物全基因组测序的发展,研究者们对不同物种的 SPL 基因家族进行了鉴定与分析。但是目前尚未有对萝卜 SPL 基因家族进行鉴定与分析的相关报道。本研究从萝卜全基因组中共鉴定得到 26 个具有完整 SBP 结构域的 *RsSPL* 基因,其家族成员数量较烟草 (32 个)^[29] 少,与白菜 (29 个)^[26]、桃 (25 个)^[9] 接近,比枣 (18 个)^[6]、草莓 (14 个)^[7]、菠萝 (16 个)^[8]、龙眼 (14 个)^[30]、高粱 (19 个)^[31] 多。利用拟南芥的 16 个 *AtSPL* 基因在萝卜蛋白质数据库中进行本地 blast 比对发现:5 个拟南芥 *AtSPL* 基因在萝卜中没有鉴定到同源基因,推测这些基因可能在进化过程中丢失;4 个 *AtSPL* 基因在萝卜中被鉴定到具有 2 个同源基因;1 个 *AtSPL* 基因在萝卜中被鉴定出具有 3 个同源基因,说明在进化过程中这些基因可能出现了基因复制事件。

对不同物种的 SPL 家族基因构建进化树发现,萝卜 SBP 蛋白序列与拟南芥和条叶蓝芥二者的 SBP 序列同源性最高,这三者同属于十字花科,说明 SBP 蛋白序列在十字花科内的同源性较高;且萝卜 SBP 蛋白序列与拟南芥、条叶蓝芥、光皮桦、麻风树、葡萄和花生这 6 种双子叶植物的同源性高于小麦这一单子叶植物;光皮桦、麻风树和葡萄三者同源性也较高,这三者均为木本植物;藻类植物莱茵衣藻 SBP 蛋白序列独立为一支,与其他植物 (1 种苔藓类植物和 8 种被子植物) 亲缘关系最远,苔藓

植物小立陶宛藓也与 8 种被子植物亲缘关系较远。以上结果符合物种进化规律,说明根据此进化树对萝卜 SPL 基因家族成员进行亚家族分类方法可靠。

研究表明,植物中许多 SPL 基因家族成员是 miR156/157 的靶基因。例如,拟南芥的大部分 (11/17) 的 SPLs 都含有 miR156/157 结合位点。萝卜中 SPL 基因家族的上游 microRNA 主要是 miR156 和 miR157^[21,32]。本研究发现萝卜 26 个 *RsSPL* 中的 11 个既含有 miR156 也含有 miR157 的靶位点,还有 1 个 *RsSPL* 单独含有 miR156 的靶位点。miR156 的 12 个 *RsSPL* 靶基因所含的外显子数量均为 2~4 个,且序列保守,这与前人研究相符^[33-34],说明 miRNA 与 SPL 家族基因的识别机制在进化的过程中趋于保守。

基因的组织表达模式与其功能特征密切相关。本研究利用萝卜转录组数据分析了 SPL 家族基因在萝卜不同组织 (愈伤、肉质根、叶、茎、花和角果) 和不同时期 (芽期、破肚期、肉质根膨大前期、膨大盛期和成熟期) 的表达情况。从 *RsSPL* 基因家族成员在不同组织中的表达情况发现, G5~G6 亚家族的 *RsSPL* 成员在萝卜不同组织中的表达量较高, G1~G4 亚家族 *RsSPL* 成员表达量较低,而从这些亚家族的外显子数看, G5~G6 亚家族成员外显子数为 10~11 个, G1~G4 亚家族成员外显子数为 2~3 个,即表达量高的成员其外显子数多,表达量低的成员其外显子数少。因此我们初步认为, SPL 基因家族成员的表达量可能与外显子数目呈正相关,而目前尚未见有这方面的文章报道。此外,本研究还发

现表达量高的基因 (*RsSPL1*、*RsSPL21* 和 *RsSPL24*) 均属于 G5 亚家族, 表达量低的基因 (*RsSPL23*、*RsSPL20*、*RsSPL16*、*RsSPL26* 和 *RsSPL3*) 均为 G1 和 G2 亚家族, 即基因家族中属于同一个亚家族的基因具有相似的表达模式, 这一结果与卢平等^[35]报道相符, 初步得出亲缘关系较近的家族成员具有相似的表达模式这一结论。

萝卜 SPL 家族多个基因在萝卜花器官中有较高的表达量。而且, *RsSPL9* 和 *RsSPL13* 是拟南芥 *AtSPL3* 的同源基因, *RsSPL2* 和 *RsSPL14* 是拟南芥 *AtSPL9* 的同源基因, *RsSPL15* 和 *RsSPL23* 是拟南芥 *AtSPL15* 的同源基因, 而 *AtSPL3*、*AtSPL9* 和 *AtSPL15* 被证明参与拟南芥开花过程的调控^[15-17, 23], 因此, 推测这些萝卜中的同源基因, 可能参与了萝卜花器官的形成或具有调控开花的功能。

RsSPL1 在心里美和 XYB36-2 萝卜的不同发育时期以及不同组织中的表达量都非常高, 其可能在萝卜生长中起着至关重要的作用。在拟南芥中, 该基因的同源基因 *AtSPL1* 对拟南芥生殖期的耐热性起重要作用^[36]。

前人研究表明, SPL 基因家族部分成员参与了植物花青素的生物合成的负调控^[22, 37-40]。本研究发现 *RsSPL5* 在心里美萝卜的 5 个时期的表达量均低于白萝卜 XYB36-2, 推测 *RsSPL5* 可能参与萝卜花青素合成调控。

RsSPL12 和 *RsSPL19* 在 2 种萝卜肉质根的 5 个发育时期都呈现出表达量由低到高的表达趋势。研究表明, 拟南芥中 *RsSPL19* 的同源基因 *AtSPL10* 可以维持主根分生组织活性从而使主根增长, 推测 *RsSPL19* 在萝卜中具有同样的作用, 可能与萝卜肉质根膨大相关^[41]。

参考文献

- [1] Huijser P, Klein J, Lönnig W E, Meijer H, Saedler H, Sommer H. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. The EMBO Journal. 1992, 11 (4): 1239-1249
- [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*. Molecular and General Genetics, 1996, 250 (1): 7-16
- [3] Cardon G, Höhmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P. Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. Gene, 1999, 237 (1): 91-104
- [4] Xie K, Wu C, Xiong L. Genomic organization, differential expression, and interaction of *SQUAMOSA* promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. Plant Physiology, 2006, 142 (1): 280-293
- [5] Salinas M, Xing S, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. Planta, 2012, 235 (6): 1171-1184
- [6] Shao F, Lu Q, Wilson I W, Qiu D. Genome-wide identification and characterization of the SPL gene family in *Ziziphus jujuba*. Gene, 2017, 627: 315-321
- [7] Xiong J S, Zheng D, Zhu H Y, Chen J Q, Na R, Cheng Z M. Genome-wide identification and expression analysis of the SPL gene family in woodland strawberry *Fragaria vesca*. Genome, 2018, 61 (9): 675-683
- [8] 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. 分子植物育种, 2020, 18 (20): 6633-6642
- [9] Pan X L, Zhang X M, Xu T T, Hou S G, Zhang H N. Genome-wide identification of SPL gene family and expression profiling during flowering induction in pineapple. Molecular Plant Breeding, 2020, 18 (20): 6633-6642
- [9] 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. 农业生物技术学报, 2020, 28 (9): 1521-1534
- [9] Wang X J, Zhang S Y, Xu Z, Shi P, Kang T Y, Li Q, Zhao C P. Identification of SPL gene family members and correlation analysis between gene expression and fruit development in Peach (*Prunus persica*). Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28 (9): 1521-1534
- [10] Stone J M, Liang X, Nekl E R, Stiers J J. Arabidopsis *AtSPL14*, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant development and sensitivity to fumonisin B1. The Plant Journal, 2005, 41 (5): 744-754
- [11] Cui L G, Shan J X, Shi M, Gao J P, Lin H X. The *miR156-SPL9-DFR* pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. The Plant Journal, 2014, 80 (6): 1108-1117
- [12] Gou J, Tang C, Chen N, Wang H, Debnath S, Sun L, Flanagan A, Tang Y, Jiang Q, Allen R D, Wang Z Y. *SPL7* and *SPL8* represent a novel flowering regulation mechanism in switchgrass. The New Phytologist, 2019, 222 (3): 1610-1623
- [13] Hanly A, Karagiannis J, Lu Q S M, Tian L, Hannoufa A. Characterization of the role of *SPL9* in drought stress tolerance in *Medicago sativa*. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21 (17): 6003
- [14] Jung J H, Lee H J, Ryu J Y, Park C M. *SPL3/4/5* integrate developmental aging and photoperiodic signals into the FT-FD module in Arabidopsis flowering. Molecular Plant, 2016, 9 (12): 1647-1659
- [15] Cardon G H, Höhmann S, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P. Functional analysis of the Arabidopsis thaliana SBP-box gene *SPL3*: a novel gene involved in the floral transition. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 1997, 12 (2): 367-377
- [16] Wu G, Poethig R S. Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by miR156 and its target *SPL3*. Development, 2006, 133 (18): 3539-3547
- [17] Gandikota M, Birkenbihl R P, Höhmann S, Cardon G H, Saedler H, Huijser P. The miRNA156/157 recognition element in the 3'UTR of the Arabidopsis SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology, 2007, 49 (4): 683-693
- [18] Jiao Y, Wang Y, Xue D, Wang J, Yan M, Liu G, Dong G, Zeng D, Lu Z, Zhu X, Qian Q, Li J. Regulation of *OsSPL14* by *OsmiR156* defines ideal plant architecture in rice. Nature

- genetics, 2010, 42 (6): 541-544
- [19] Wu G, Park M Y, Conway S R, Wang J W, Weigel D, Poethig R S. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009, 138 (4): 750-759
- [20] Liu Q, Shen G, Peng K, Huang Z, Tong J, Kabir M H, Wang J, Zhang J, Qin G, Xiao L. The alteration in the architecture of a T-DNA insertion rice mutant *osmtd1* is caused by up-regulation of *MicroRNA156f*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2015, 57 (10): 819-829
- [21] Sun Y, Qiu Y, Duan M, Wang J, Zhang X, Wang H, Song J, Li X. Identification of anthocyanin biosynthesis related microRNAs in a distinctive Chinese radish (*Raphanus sativus* L.) by high-throughput sequencing. *Molecular Genetics and Genomics*, 2017, 292 (1): 215-229
- [22] Gou J Y, Felippes F F, Liu C J, Weigel D, Wang J W. Negative regulation of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* by a miR156-Targeted SPL transcription factor. *The Plant Cell*, 2011, 23 (4): 1512-1522
- [23] Schwarz S, Grande A V, Bujdosó N, Saedler H, Huijser P. The microRNA regulated SBP-box genes *SPL9* and *SPL15* control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67 (1-2): 183-195
- [24] Cao D, Li Y, Wang J L, Nan H Y, Wang Y N, Lu S J, Jiang Q, Li X M, Shi D N, Fang C, Yuan X H, Zhao X H, Li X, Liu B H, Kong F J. GmmiR156b overexpression delays flowering time in soybean. *Plant Molecular Biology*, 2015, 89: 353-363
- [25] Zhang X H, Yue Z, Mei S Y, Qiu Y, Yang X H, Chen X H, Cheng F, Wu Z Y, Sun Y Y, Jing Y, Liu B, Shen D, Wang H P, Cui N, Duan Y D, Wu J, Wang J L, Gan C X, Wang J, Wang X W, Li X X. A *de novo* genome of a Chinese radish cultivar. *Horticultural Plant Journal*, 2015, 1 (3): 155-164
- [26] Tan H W, Song X M, Duan W K, Wang Y, Hou X L. Genome-wide analysis of the SBP-box gene family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*). *Genome*, 2015, 58 (11): 463-477
- [27] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, 13 (8): 1194-1202
- [28] Sun Y, Wang J, Qiu Y, Liu T, Song J, Li X. Identification of 'Xinlimei' radish candidate genes associated with anthocyanin biosynthesis based on a transcriptome analysis. *Gene*, 2018, 657: 81-91
- [29] 刘成, 李晓旭, 苏玉龙, 郭永峰. 普通烟草 SBP 转录因子家族的全基因组鉴定及其进化和表达分析. *中国烟草科学*, 2015, 36 (4): 1-11
- Liu C, Li X X, Su Y L, Guo Y F. Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiling of the SBP transcription factor family in *Nicotiana tabacum*. *Chinese Tobacco Science*, 2015, 36 (4): 1-11
- [30] 路保顺, 朱永静, 张舒婷, 吕煜梦, 李晓斐, 宋雨洋, 赖钟雄, 林玉玲. 龙眼 SPL 基因家族全基因组鉴定及表达分析. *中国农业科学*, 2020, 53 (20): 4259-4270
- Lu B S, Zhu Y J, Zhang S T, Lv Y M, Li X F, Song Y Y, Lai Z X, Lin Y L. Whole-Genome identification and expression analysis of SPL gene family in *Dimocarpus longan*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53 (20): 4259-4270
- [31] 陆业磊, 邓为, 王震, 杜小云, 吕阳, 韩少鹏, 周超, 曾弓剑, 沈祥陵. 高粱 SPL 基因家族的鉴定及表达分析. *生物资源*, 2020, 42 (4): 444-453
- Lu Y L, Deng W, Wang Z, Du X Y, Lv Y, Han S P, Zhou C, Zeng G J, Shen X L. Identification and expression analysis of SPL gene family in *Sorghum bicolor* L. . *Biotic Resources*, 2020, 42 (4): 444-453
- [32] Sun Y Y, Qiu Y, Zhang X H, Chen X, Shen D, Wang H, Li X X. Genome-wide identification of microRNAs associated with taproot development in radish (*Raphanus sativus* L.). *Gene*, 2015, 569 (1): 118-126
- [33] Xing S, Salinas M, Höhmänn S, Berndtgen R, Huijser P. miR156 targeted and nontargeted SBP-box transcription factors act in concert to secure male fertility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2010, 22 (12): 3935-3950
- [34] 王婷, 唐锐敏, 王瑞晋, 贺立恒, 刘霞宇, 刘世芳, 李润植, 贾小云. 三裂叶薯 SPL 基因家族鉴定、表达及 miR156 的调控分析. *植物遗传资源学报*, 2019, 20 (3): 736-749
- Wang T, Tang R M, Wang R J, He L H, Liu X Y, Liu S F, Li R Z, Jia X Y. Genome-wide identification and expression analysis of SPL gene family regulated by miR156 in *Ipomoea triloba*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20 (3): 736-749
- [35] 卢平, 武懿茂, 武强强, 李雪垠. 谷子 bZIP 转录因子家族的全基因组鉴定与生物信息学分析. *山西农业科学*, 2020, 48 (9): 1361-1370, 1430
- Lu P, Wu Y M, Wu Q Q, Li X Y. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of *Setaria italica* bZIP transcription factor family. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2020, 48 (9): 1361-1370, 1430
- [36] Chao L M, Liu Y Q, Chen D Y, Xue X Y, Mao Y B, Chen X Y. *Arabidopsis* transcription factors SPL1 and SPL12 confer plant thermotolerance at reproductive stage. *Molecular Plant*, 2017, 10 (5): 735-748
- [37] Saminathan T, Bodunrin A, Singh N V, Devarajan R, Nimmakayala P, Jeff M, Aradhya M, Reddy U K. Genome-wide identification of microRNAs in pomegranate (*Punica granatum* L.) by high-throughput sequencing. *BMC Plant Biology*, 2016, 16 (1): 122
- [38] Zhao D Q, Xia X, Wei M R, Sun J, Meng J S, Tao J. Overexpression of herbaceous peony miR156e-3p improves anthocyanin accumulation in transgenic *Arabidopsis thaliana* lateral branches. *Biotech*, 2017, 7 (6): 379
- [39] He L H, Tang R M, Shi X W, Wang W B, Cao Q H, Liu X Y, Wang T, Sun Y, Zhang H M, Li R Z, Jia X Y. Uncovering anthocyanin biosynthesis related microRNAs and their target genes by small RNA and degradome sequencing in tuberous roots of sweetpotato. *BMC Plant Biology*, 2019, 19 (1): 232
- [40] Li X Y, Hou Y M, Xie X, Li H X, Li X D, Zhu Y, Zhai L L, Zhang C Y, Bian S M. A blueberry *MIR156a-SPL12* module coordinates the accumulation of chlorophylls and anthocyanins during fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71 (19): 5976-5989
- [41] Barrera-Rojas C H, Rocha G H B, Polverari L, Pinheiro Brito D A, Batista D S, Notini M M, da Cruz A C F, Morea E G O, Sabatini S, Otoni W C, Nogueira F T S. miR156-targeted *SPL10* controls *Arabidopsis* root meristem activity and root-derived *de novo* shoot regeneration via cytokinin responses. *Journal of Experimental Botany*, 2020, 71 (3): 934-950