



刘艳洁,赵晓冰,王枫,等. 细胞分裂素受体基因 *SIHK4* 突变对番茄开花时间的影响[J]. 南京农业大学学报,2024,47(3):424-434.
LIU Yanjie,ZHAO Xiaobing,WANG Feng,et al. Effects of cytokinin receptor gene *SIHK4* mutation on flowering time of tomato[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(3):424-434.

细胞分裂素受体基因 *SIHK4* 突变对番茄开花时间的影响

刘艳洁,赵晓冰,王枫,丁静*

(南京农业大学作物遗传与种质创新利用全国重点实验室/园艺学院,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]本研究旨在解析细胞分裂素受体基因 *SIHK4* 突变对番茄开花时间的影响,为揭示细胞分裂素途径调控植物开花的分子机制奠定基础。[方法]以细胞分裂素受体基因 *SIHK4* 的 2 个纯合突变株系 *shhk4-4* 和 *shhk4-5* 及野生型 (WT) 番茄为材料,统计各株系开花时间,并在发芽 26 d 后取植株茎尖进行石蜡切片显微观察、响应细胞分裂素的荧光信号检测以及转录组测序等分析。[结果]*shhk4-4* 和 *shhk4-5* 突变体的始花节位与 WT 相同,但始花时间分别比 WT 晚 6 和 4 d。与 WT 相比,*shhk4-5* 茎尖花分生组织分化推迟,细胞显著减小,细胞数目略少;*shhk4-4* 与细胞分裂素响应启动子 *TCSn* 驱动的绿色荧光蛋白基因 *GFP* 过表达株系的杂交 F_1 代茎尖中,响应细胞分裂素的 *GFP* 荧光信号显著减弱;*shhk4-5* 茎尖中细胞周期正调控基因 *Cyclin-B1-2* 表达下调,开花正调控基因 *FUL2*、*SOC1* 表达上调,而花发育基因 *AGL12* 和 *AGL19* 表达下调,开花调控相关基因的表达变化趋势与 *shhk4-5* 开花推迟的性状变化不完全一致。差异表达基因 (DEG) 的功能分析显示,57.6% 具有功能注释的 DEG 是富集于光合作用、呼吸作用、蛋白合成和代谢等相关通路中的结构基因,其中 88.2% 在 *shhk4-5* 茎尖中的表达下调,表明 *shhk4* 茎尖的细胞活性很可能弱于 WT。[结论]细胞分裂素受体 *SIHK4* 的功能缺失导致 *shhk4* 茎尖细胞分裂素信号减弱,花分生组织细胞减小,活性降低,分化延后,进而导致 *shhk4* 开花推迟。*SIHK4* 是番茄开花时间的正调控因子。

关键词:番茄;细胞分裂素受体;*SIHK4*;开花时间

中图分类号:S641.2

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)03-0424-11

Effects of cytokinin receptor gene *SIHK4* mutation on flowering time of tomato

LIU Yanjie,ZHAO Xiaobing,WANG Feng,DING Jing*

(State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement and Utilization/
College of Horticulture,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China)

Abstract:[Objectives] This study aimed to analyze the effects of mutation of cytokinin receptor gene *SIHK4* on flowering time of tomato, and to lay a foundation for elucidating molecular mechanisms of the regulation of cytokinin pathways on plant flowering. [Methods] Two homozygous mutant lines *shhk4-4* and *shhk4-5* of cytokinin receptor gene *SIHK4* and wild-type (WT) tomato plants were used as materials. The flowering time of each line was analyzed. The shoot apices of plants at 26 days after germination were analyzed by microscopic observation of paraffin sections, detection of cytokinin-responsive fluorescence signals and transcriptome sequencing. [Results] *shhk4-4* and *shhk4-5* mutant plants had the same number of internodes as WT plants when the first flowers opened, but the time from germination to flowering for *shhk4-4* and *shhk4-5* was 6 and 4 days later than WT plants, respectively. Compared with WT plants, the differentiation of *shhk4-5* floral meristem was delayed; the sizes of cells in the *shhk4-5* floral meristems decreased significantly while the cell number was slightly smaller; and the cytokinin-responsive fluorescence signals were significantly reduced in the shoot apices of the F_1 hybrids of *shhk4-4* and the transgenic line with a *GFP* gene driven by the cytokinin-sensor promoter *TCSn*. In the *shhk4-5* shoot apices, expression of *Cyclin-B1-2*, a positive regulatory gene for cell cycle, was down-regulated; the expression of *FUL2* and *SOC1*, positive regulatory genes for flowering, was up-regulated, while expression of floral homeotic genes *AGL12* and *AGL19* was down-regulated, in comparison to those in WT shoot apices. The expression variation trends of the genes related to flowering regulation were not completely consistent with the trait change of *shhk4-5* with delayed flowering time. The functional analyses of differentially expressed genes (DEG) showed that 57.6% of the DEG with functional annotation were structural genes enriched in the pathways related to photosynthesis, respiration, protein synthesis and metabolism, etc. Therein, 88.2% of these DEG showed down-regulated expression in *shhk4-5* compared to those in WT shoot apices, indicating that the cell activities in *shhk4*

收稿日期:2023-05-04

基金项目:国家自然科学基金项目(31972371);江苏高校优势学科建设工程项目

*通信作者:丁静,副教授,博士,主要从事园艺植物生理和生物技术研究,E-mail:jdjing@njau.edu.cn。

shoot apices were likely weaker than those in WT. [Conclusions] Loss-of-function mutations of cytokinin receptor *SIHK4* led to weaker cytokinin signaling in *slhk4* shoot apices, decreased size, reduced activity and delayed differentiation of the cells in *slhk4* floral meristems, and thus delayed flowering time of *slhk4* plants. *SIHK4* was a positive regulator of flowering time in tomato.

Keywords: tomato; cytokinin receptor; *SIHK4*; flowering time

基于长日照植物拟南芥相关研究,已发现调控植物开花时间的6条主要途径,包括3条外部途径(光周期调控、春化作用、环境温度途径)和3条内源途径(自主途径、年龄途径以及赤霉素途径)^[1-3]。开花时间是影响番茄产量和品质的重要因素之一^[4]。番茄作为日中性植物,对光周期不敏感^[4],其开花调控机制与拟南芥不完全相同。通过对突变体和转基因株系等材料的研究,已鉴定出一系列调控番茄开花的关键基因。如番茄 *SFT* (*single flower truess*) 是拟南芥 *FT* (*flowering locus T*) 的直系同源基因,其功能缺失会导致番茄开花延迟,花器官变小^[5]。FA (*falsiflora*) 蛋白与拟南芥中 *LFY* (*leafy*) 直系同源,是番茄开花的正调控因子^[6],且在开花调控途径中与 *SFT* 是平行关系^[6]。MADS-Box 是调控花发育和开花时间最重要的基因家族。番茄 MADS-Box 基因家族中的 SP (*self-pruning*) 蛋白具有延迟开花的功能^[4,7]; *SOC1* (*suppressor of over-expression of constans 1*) 蛋白是启动开花的关键一环^[6]; *J2* (*jointless 2*)/*SIMBP21*、*TM3*、*STM3* (*sister of TM3*) 等参与花序分枝的调控^[8]; *AG* (*agamous*) 亚家族也已被证明在雄蕊、心皮和胚珠等生殖器官发育中起关键作用^[9]。

激素是植物开花时间的重要调控因子。赤霉素 (*gibberellin*) 具有促进花发育的功能,番茄赤霉素合成基因突变体开花延迟^[10]。水杨酸 (*salicylic acid*) 也具有促进成花的作用,外施水杨酸可以抑制拟南芥 *FLC* (*flower locus C*, 拟南芥开花抑制因子) 基因的表达,使拟南芥开花提前^[11]。生长素 (*IAA*) 参与植物开花调控的相关途径,拟南芥生长素信号基因 *AtIAA7* 突变体在短日照下开花延迟^[12]。

作为主要植物激素之一,细胞分裂素 (*cytokinin*) 在植物生长发育过程中起着非常重要的作用,如调节细胞的分裂与分化、茎和根的生长、顶端优势、果实和种子发育、植物衰老、营养信号传递以及对生物和非生物胁迫的响应等^[13-16]。拟南芥具有3个跨膜细胞分裂素受体 *AHK2* (*Arabidopsis histidine kinase 2*)、*AHK3* 和 *AHK4*。受体识别细胞分裂素后,其激酶结构域的保守组氨酸发生磷酸化^[17-18],并通过 *AHP* (*Arabidopsis histidine phosphotransfer*) 蛋白作为中间体,将磷酸基团转移至 B 型响应调节因子 *type-B ARR* (*Arabidopsis response regulator*)。type-B *ARR* 调控下游基因表达,进而调节植物生长发育^[17]。3个细胞分裂素受体基因具有不同的表达模式,其中 *AHK4* 在根的维管系统中表达;*AHK3* 在地上部表达;*AHK2* 在各部位中均有微弱表达^[19]。研究表明,细胞分裂素参与调控花分生组织细胞的分裂与分化。例如,拟南芥细胞分裂素降解基因 *AtCKX3* 和 *AtCKX5* 的双基因突变体具有膨大的花序和花分生组织^[20];而 *AtCKX* 过表达拟南芥则开花推迟^[21]。目前,细胞分裂素及其受体在番茄开花调控中的作用还未见报道。因此,本研究以前期已经获得的番茄细胞分裂素受体基因 *SIHK4* 的突变株系^[22]为材料,从形态、细胞及分子等层面解析 *SIHK4* 功能缺失对番茄开花时间的影响,为阐明细胞分裂素及其受体在番茄等日中性植物开花中的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及生长条件

植物材料包括:1)以番茄品种‘Micro-Tom’(野生型,WT)为试验材料,利用 CRISPR/Cas 基因编辑技术构建的细胞分裂素受体基因 *SIHK4* 的纯合突变体 *slhk4-4*、*slhk4-5*。具体构建方法参照陈兆玉等^[22]的研究。以 *SIHK4* 起始密码子的 A 为第1位核苷酸计算,*slhk4-4* 突变体在 sgRNA2 靶点处缺失了 *SIHK4* CDS 第700~703 bp 的4个核苷酸 AACC,而 *slhk4-5* 突变体分别在 sgRNA1 和 sgRNA2 靶点处 *SIHK4* CDS 的第601和704位,插入了1个核苷酸 C 和 G。2)基于番茄品种‘Micro-Tom’的 *TCSn::GFP* (细胞分裂素响应启动子 *TCSn* 驱动的 *GFP* 绿色荧光蛋白基因)纯合转基因株系 W20。W20 株系的具体构建方法参照樊俊苗^[23]的研究。*TCSn* 是人工合成的启动子,被广泛应用于检测植物体内细胞分裂素响应的分布和强弱^[24]。杂交 F₁ 代株系 WT×W20 和 *slhk4-4*×W20 是分别以 WT、*slhk4-4* 株系为母本,W20 为父本杂交获得的。全部试验材料均种植于生长室中,生长室环境条件为:16 h 光照 (24 °C)/8 h 黑暗 (19 °C),其中光照强度为 200 μmol·m⁻²·s⁻¹,湿度 60%。

将 WT、*shk4-4* 和 *shk4-5* 种子置于培养皿中的湿润滤纸上,在 28 °C 黑暗条件下催芽 3 d。待种子的胚根长至 1 cm 左右,播种于盛有营养土的育苗盆中。育苗 10 d 后,选取长势一致的番茄苗定植于 10 cm×10 cm 方形花盆中。

1.2 茎尖切片

在种子发芽后 26 d,选取代表性 WT 和 *shk4-5* 植株,切取 5 mm 茎尖,用福尔马林-乙酸-乙醇 (FAA) 固定液分别保存于 2 mL 离心管中。植物组织样品由南京市烁朴生物公司进行精修、脱水、石蜡包埋、显微切片、番红固绿染色等处理。

使用显微镜 (OLYMPUS) 观察处理后的切片,选取代表平均水平的切片,送至武汉塞维尔公司进行扫描。使用 3DHISTECH's Slide Converter 软件观察图像,采用 Image J 软件统计细胞数目并测量细胞大小。

1.3 番茄茎尖总 RNA 提取

取发芽 26 d WT 和 *shk4-5* 植株 5 mm 左右的茎尖,置于 2 mL RNA-free 离心管中液氮冷冻。每个株系取 3 个生物学重复,每个重复 25~30 个茎尖。采用高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (上海浦迪生物科技有限公司) 提取茎尖 RNA,具体步骤详见说明书。所有步骤均需在冰上操作,防止 RNA 降解。

1.4 转录组测序 (RNA-seq) 分析

将 WT 和 *shk4-5* 茎尖 RNA 送至华大基因公司进行 RNA-seq 测序。使用 hisat2 软件将测序所得 reads 拼装到番茄 SL4.0 版本参考基因组上,合并所有序列后用 stringtie 拼装转录本。人工校正软件输出的转录本 (去除过长或重复的转录本,保留新的基因和新的可变剪接转录本),获得新的全基因组注释信息。以新的注释信息为基础,使用 featureCounts 软件计算每个基因的 reads 数目。为排除重复序列的干扰,匹配至多个基因的 reads 不予统计。使用 R 语言中的 edgeR 程序进行差异表达基因检验,标准化方法为 TPM (transcripts per million) 法。

以发现错误率 (false discovery rate, FDR) ≤ 0.05 为筛选标准获得差异表达基因 (differentially expressed genes, DEG),并对全部 DEG 进行 GO (gene ontology) 富集分析和 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 通路分析。将 SL4.0 版本番茄蛋白组序列上传至 EMBL (<http://eggnog-mapper.embl.de/>) 创建 GO 和 KEGG 背景文件,利用 TBTOOLS 软件对 DEG 进行分析。以 FDR ≤ 0.05 为标准进行筛选,获得 DEG 富集的 GO 组别和 KEGG 通路。使用微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 中的富集气泡图和 BP、CC、MF 三合一选项分别对 KEGG 和 GO 分析结果作图。将所选基因的 TPM 值取对数 (以 2 为底),用 TBTOOLS 软件绘制 DEG 表达热图。

1.5 RNA 反转录与实时荧光定量 PCR

使用试剂盒 HiScript II QRT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper, Vazyme) 进行 RNA 反转录,具体步骤详见说明书。反转录所得 cDNA 置于 -20 °C 冰箱保存备用。使用 ChamQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒 (Vazyme) 进行实时荧光定量 PCR 试验,具体步骤详见说明书。试验设置 3 次技术重复,3 个生物学重复,所用内参基因及目标基因相对表达量的计算采用陈兆玉等^[22]的方法。目标基因 qPCR 引物序列详见表 1。

表 1 本试验所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in the experiment

基因名称 Gene name	基因号 Gene ID	正向引物序列 Forward primer sequences (5'→3')	反向引物序列 Reverse primer sequences (5'→3')
<i>J2</i>	Solye12g038510	TTACGCATCTTTGGACCCGA	GTGTGCCCAAATCCTCTCCA
<i>SAMT</i>	Solye09g091550	GGGTTGTCTTCTGGAGCGA	CCTAACGATCGAAAAATCGCGT
<i>SICAB-6</i>	Solye12g009200	AGGGTCGTAGATGGGCTGAT	GTCGGGTGATCCTCTTCCC
<i>SICHI17</i>	Solye02g082930	CAACCAGGCTACGGTGTTCAT	CCCCGGAGCAACATTAGTA
<i>SICRF4</i>	Solye03g007460	TCCGGCCAGGTTTCATGTTTC	TCGCCCTGACATTCTCAAC
<i>SIHK4</i>	Solye04g008110	GGTGGAGCCTTCGATGTTGA	TCACCATTGGGGTCTCGGTG
<i>SIIPT3</i>	Solye01g080150	ACCCTGATGGCGATTACACG	TTTGAAGCATCTTGTCCCGAGT
<i>SIIPT4</i>	Solye09g064910	TGGTGGATCAAGGAATGGTGG	AGTTTGCCTGTCCACGGAAT
<i>SIRR-A2</i>	Solye03g113720	TCGGTGTGAGCAAGATCCC	CAGCTTAACAGGCTTCAGGAGA
<i>SIRR-A3</i>	Solye05g006420	GAAGCCGGTGAAATTGGCAG	GGTGAAGCCGAGAGAGTTGG
<i>SIRR-A4</i>	Solye06g048600	GCAGAGGAAAAAGAGGCAGAG	AGTGAGATGCTGCTGCCATAA

续表 1 Table 1 continued

基因名称 Gene name	基因号 Gene ID	正向引物序列 Forward primer sequences (5'→3')	反向引物序列 Reverse primer sequences (5'→3')
<i>SOC1</i>	Solyc02g005110	AGATTCTAGATGAAGCTGCTGCT	TTTGATATCTCGCTACCATCTGT
<i>TM5</i>	Solyc05g015750	CTATGGCCGGCAAACAACCTC	AACCAGCCAGCCATGTAGTT

Note: *J2*; Jointless 2; *SAMT*; S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase; *SICAB-6*; *Solanum lycopersicum* chlorophyll a-b binding protein 6; *SlChi17*; *Solanum lycopersicum* chitinase 17; *SICRF4*; *Solanum lycopersicum* cytokinin response factor 4; *SHK4*; *Solanum lycopersicum* histidine kinase 4; *SLIPT3/4*; *Solanum lycopersicum* isopentenyltransferase 3/4; *SIRR-A2/A3/A4*; *Solanum lycopersicum* type-A response regulator 2/3/4; *SOC1*; Suppressor of over-expression of constans 1; *TM5*; MADS-box protein 5.

1.6 蛋白保守结构域预测

将目标基因蛋白序列提交至 InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 进行蛋白保守结构域预测。若目标基因蛋白与拟南芥中已知功能的某基因家族蛋白具有相同的保守结构域组成,且蛋白长度大于 100 aa,则认为目标基因属于该基因家族。

2 结果与分析

2.1 WT 和 *shhk4* 突变体开花时间分析

种植 WT 和 *shhk4* 突变株系 *shhk4-4*、*shhk4-5*,并观察各株系的开花时间,结果发现 WT 和 *shhk4* 突变体的始花节位,即第一穗花之前的真叶数目相同,均在长出第 7 片真叶后开第一朵花。但 2 类株系的始花时间不同。WT 在发芽后约 28 d 形成肉眼可见的花苞,44 d 左右开第一朵花;*shhk4-4* 和 *shhk4-5* 突变体在发芽后约 33 d 长出花苞,44 d 时第一穗花的花苞较小,尚未发育成熟(图 1-a)。直至 50 和 48 d 左右,*shhk4-4* 和 *shhk4-5* 突变体分别开第一朵花(图 1-b)。在相同生长环境下,*shhk4* 突变体的开花时间比 WT 显著推迟。

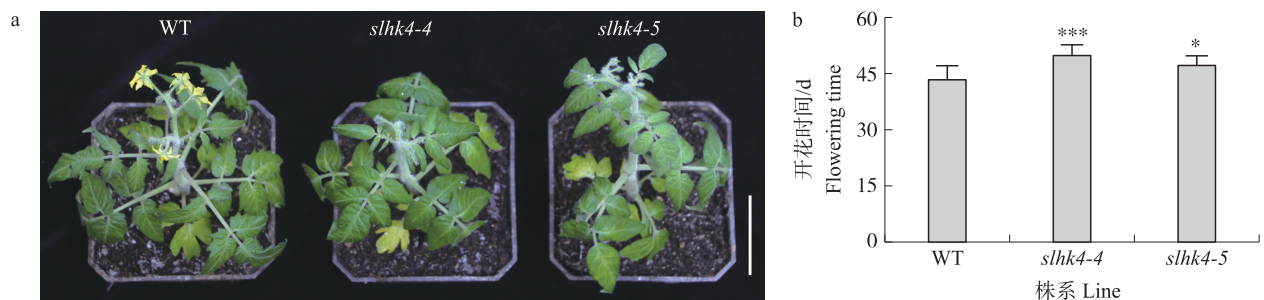


图 1 WT 和 *shhk4* 突变体植株始花时间比较

Fig. 1 Comparison of days to first inflorescence in WT and *shhk4* mutant plants

a. WT 第一穗花开放时各株系花器官状态(标尺:5 cm); b. 各株系开花时间统计($n \geq 8$)。

a. Floral organ status in each line when WT flowers in the first inflorescence opened(scale:5 cm); b. Flowering time statistics for each line($n \geq 8$).

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. The same as follows.

2.2 WT 和 *shhk4* 突变体茎尖细胞比较

为了解析 *shhk4* 突变体开花时间晚于 WT 的原因,首先于发芽 26 d (WT 长出花苞前)取 WT 和 *shhk4-5* 茎尖进行切片观察。由图 2-a 可见:26 d 时 WT 茎尖顶端花芽的花萼已完全覆盖花分生组织,花瓣原基分化较为明显;而 *shhk4-5* 顶端花芽的花萼上方未完全覆盖花分生组织,花瓣原基刚刚分化。此外,与 WT 相比,*shhk4-5* 花分生组织细胞的排列更加整齐紧凑。对 WT 和 *shhk4-5* 茎尖花分生组织中心区域(图 2-a 圆圈内)细胞数目与细胞大小的分析显示,WT 花分生组织中心区的平均细胞数目为 80 个,而 *shhk4-5* 为 66 个,略少于 WT;WT 的平均细胞面积为 $76.2 \mu\text{m}^2$,而 *shhk4-5* 为 $44.1 \mu\text{m}^2$,极显著小于 WT ($P < 0.001$,图 2-b)。这些结果说明,与 WT 相比,*shhk4-5* 的茎尖花分生组织较小,分化较晚。由此推测,*shhk4* 突变体花分生组织中细胞的分裂和分化能力可能较弱。

2.3 WT 和 *shhk4* 突变体茎尖响应细胞分裂素的荧光信号分析

分别以 WT 和 *shhk4-4* 为母本,与 *TCSn::GFP* 纯合转基因株系 W20 杂交,获得杂交 F_1 代株系 WT \times W20 和 *shhk4-4* \times W20。观察发芽 26 d 的 WT \times W20 和 *shhk4-4* \times W20 茎尖,结果(图 3)发现 WT \times W20 顶端花芽的花萼已明显分化,而 *shhk4-4* \times W20 顶端花芽尚处于花萼原基的分化阶段(图 3-b)。这说明,与 *shhk4* 纯合突变株系花芽分化晚于 WT 类似,*shhk4-4* \times W20 的花芽分化同样晚于 WT \times W20。观察 WT \times W20 和

slhk4-4×W20 茎尖的 GFP 荧光分布发现,GFP 蛋白在幼嫩的茎和叶原基中表达相对较强,而在茎尖花芽中表达相对较弱(图 3-a)。不过,WT×W20 顶端花芽及其花分生组织中 GFP 荧光信号仍显著强于 *slhk4-4*×W20(图 3-b)。相对荧光值分析显示,WT×W20 顶端花芽中的 GFP 荧光均值为 19.9,而 *slhk4-4*×W20 中为 7.2,比 WT×W20 显著降低了 63.8%(图 3-c)。以上结果表明,*slhk4* 突变体花分生组织中的细胞分裂素信号强度弱于 WT。

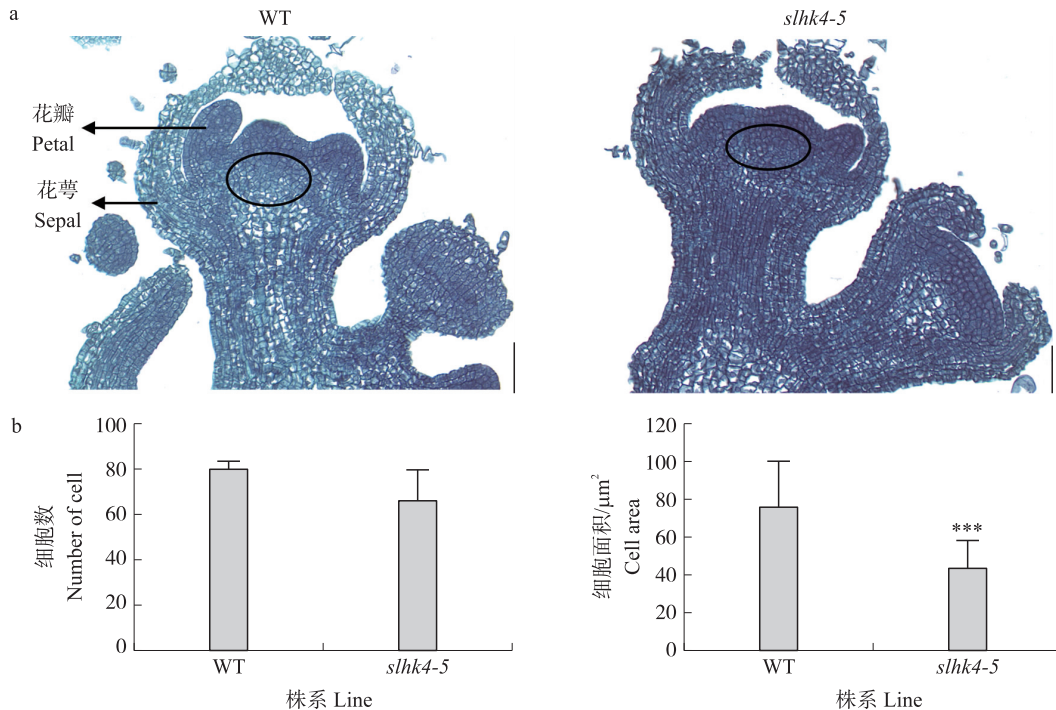


图 2 WT 和 *slhk4* 突变体茎尖细胞比较

Fig. 2 Comparison of cells in WT and *slhk4* mutant shoot apices

a. 发芽 26 d 的 WT 和 *slhk4-5* 茎尖切片(圆圈所示为进行细胞大小和数目分析的花分生组织中心区域;标尺:50 μm); b. 花分生组织中心区域细胞数目和细胞大小比较($n=3$)。

a. Cross section of WT and *slhk4-5* shoot apices at 26 d after germination(the circle indicates the center of floral meristem for analyzing cell size and number;scale:50 μm); b. Comparison of cell size and cell number in the center of floral meristem($n=3$).

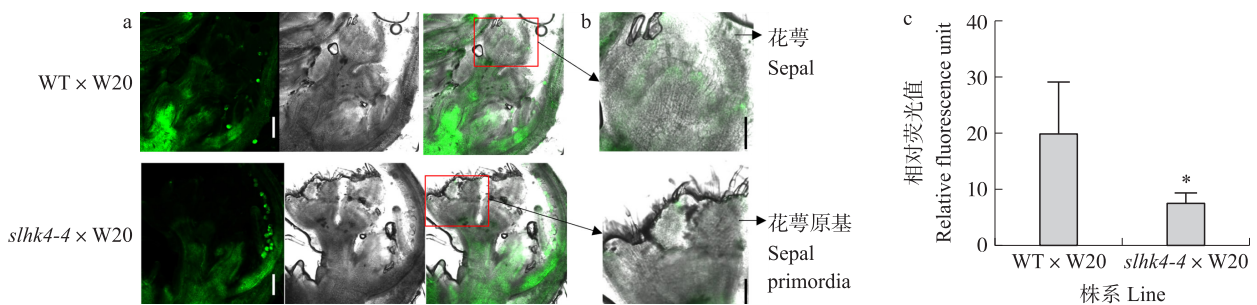


图 3 WT 和 *slhk4* 突变体茎尖响应细胞分裂素的荧光信号比较

Fig. 3 Comparison of cytokinin-responsive fluorescence signals in WT and *slhk4* mutant shoot apices

a. 发芽 26 d WT×W20 和 *slhk4*×W20 茎尖中响应细胞分裂素的 GFP 荧光信号(标尺:200 μm); b. 茎尖花分生组织中响应细胞分裂素的 GFP 荧光信号(标尺:50 μm); c. 相对荧光值分析($n\geq 6$)。

a. Cytokinin-responsive GFP fluorescence signals in WT×W20 and *slhk4-4*×W20 shoot apices at 26 d after germination (scale: 200 μm); b. Cytokinin-responsive GFP fluorescence signals in floral meristems at shoot apices(scale:50 μm); c. Analysis of relative fluorescence units($n\geq 6$).

2.4 WT 与 *slhk4* 突变体茎尖差异表达基因(DEG) 分析

取发芽 26 d WT 和 *slhk4-5* 植株的茎尖进行转录组测序分析。以番茄 SL4.0 基因组注释信息及测序所得拼接转录本为基础,在 WT 茎尖中共检测到 22 159 个表达基因(以 TPM>0.3 为筛选标准),而在 *slhk4-5* 中检测到 22 460 个表达基因,略多于 WT。

2.4.1 细胞分裂素相关基因的转录组与 qPCR 分析 根据番茄 SL4.0 基因组注释信息、已有文献报

道^[25-29]及蛋白保守结构域检验等分析,鉴定得到番茄基因组中参与细胞分裂素主要途径的基因,包括细胞分裂素合成基因 *SIPT* 27 个,*SILOG* 10 个,降解基因 *SICKX* 9 个,受体基因 *SIHK* 3 个,响应调节因子基因 *SIRR* 25 个,以及应答因子基因 *SICRF* 9 个。分析 WT 和 *slhk4-5* 茎尖转录组中这些基因的表达,结果(图 4-a)发现,与 WT 相比 *slhk4-5* 中仅受体基因 *SIHK4* 的表达量具有显著变化,下降 39.5%,说明 *SIHK4* 的移码突变对其表达水平造成了影响;其余基因的表达均无明显变化。选取其中部分基因进行 qPCR 验证,发现 qPCR 结果与转录组数据一致,*slhk4-5* 中的 *SIHK4* 表达比 WT 中显著下调 48.3%,其他基因的表达均与 WT 无明显差异(图 4-b)。由此推测,*slhk4* 突变体茎尖中的细胞分裂素主要通路很可能并未发生表达水平的显著变化。

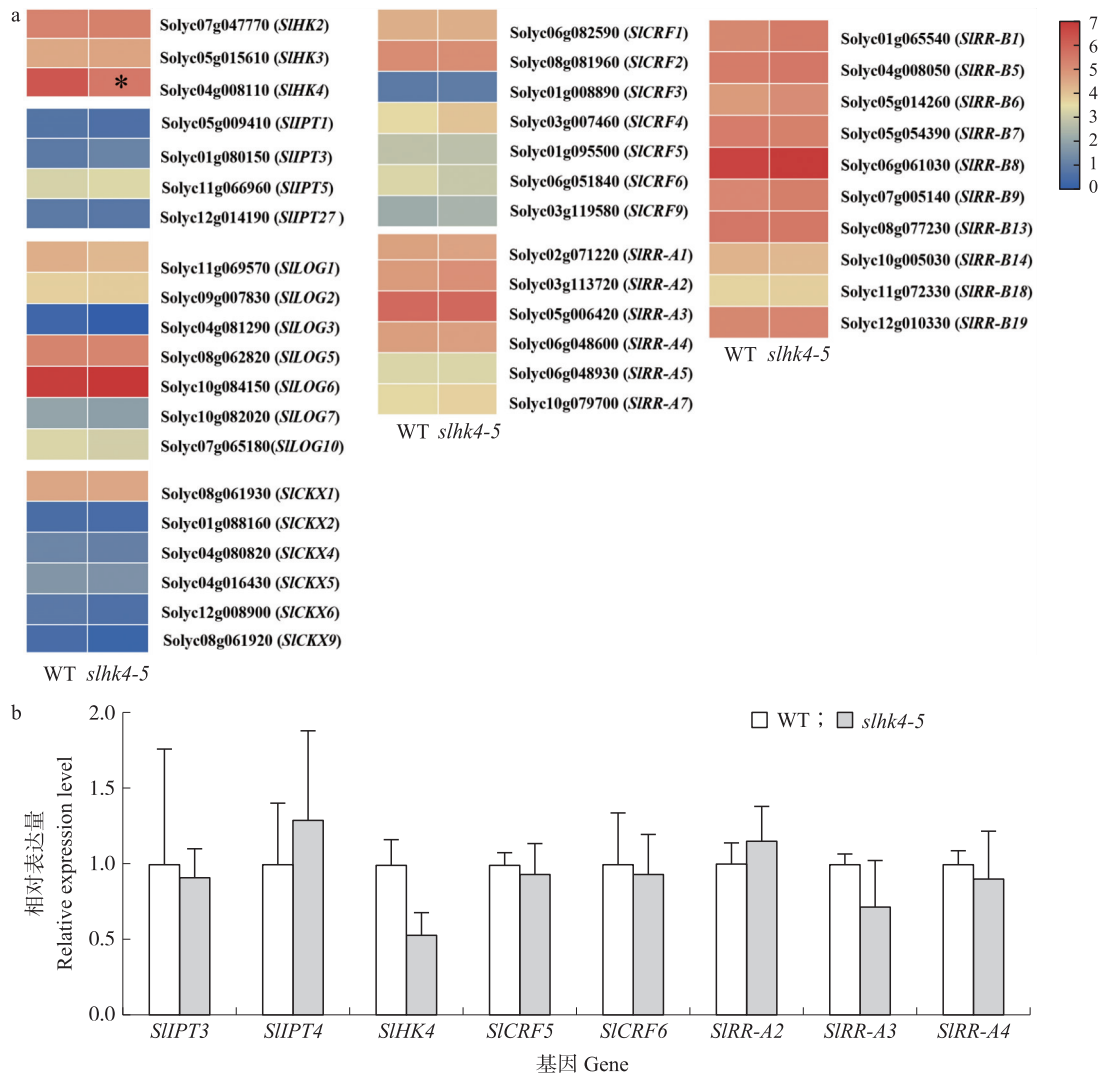


图 4 细胞分裂素相关基因的转录组分析与 qPCR 分析

Fig. 4 Transcriptome and qPCR analyses of cytokinin-related genes

a. 细胞分裂素相关基因热图(*, FDR ≤ 0.05); b. 细胞分裂素相关基因 qPCR 表达分析。

a. Heat map of cytokinin-related genes(*, FDR ≤ 0.05); b. qPCR expression analysis of cytokinin-related genes.

2.4.2 开花调控相关基因的转录组与 qPCR 分析 分析 WT 和 *slhk4-5* 茎尖转录组中开花调控相关基因的表达,包括番茄 SL4.0 基因组注释为 MADS-Box 的全部基因以及文献报道中影响番茄开花时间的其他关键基因^[5-7]。结果(图 5-a)显示,仅 4 个基因在 *slhk4-5* 与 WT 之间存在表达差异,其中,开花正调控因子 *FUL2* 和 *SOC1* 的表达在 *slhk4-5* 中分别显著上调了 2.2 和 5.7 倍,而调控番茄雄蕊、心皮等花器官发育的 AG 亚家族成员 *AGL12* 与 *AGL19* 的表达,则分别在 *slhk4-5* 中显著下调了 64.2% 和 54.9%。其余基因中,*J2*、*TM3*、*TM5* 和 *TM29* 等在 *slhk4-5* 中略有下调,但与 WT 中表达的差异并不显著;而 *FUL1* 等其他 *MADX-Box* 基因的表达在 WT 与 *slhk4-5* 之间基本没有差异。qPCR 检测结果与转录组分析的趋势一致,与 WT 相比,*slhk4-5* 中 *SOC1* 的表达显著上调了 3.3 倍;*J2* 和 *TM5* 的表达分别下调了 26.4%、35.3%,但差异

不显著(图 5-b)。绝大多数花发育及开花调控相关基因的表达在 *slhk4-5* 与 WT 茎尖中没有显著差异,而极少数有显著差异基因的表达变化趋势与 *slhk4-5* 开花时间推迟的性状变化并不完全一致。这说明, *slhk4-5* 开花时间推迟可能不是由直接调控开花的基因表达变化导致的。

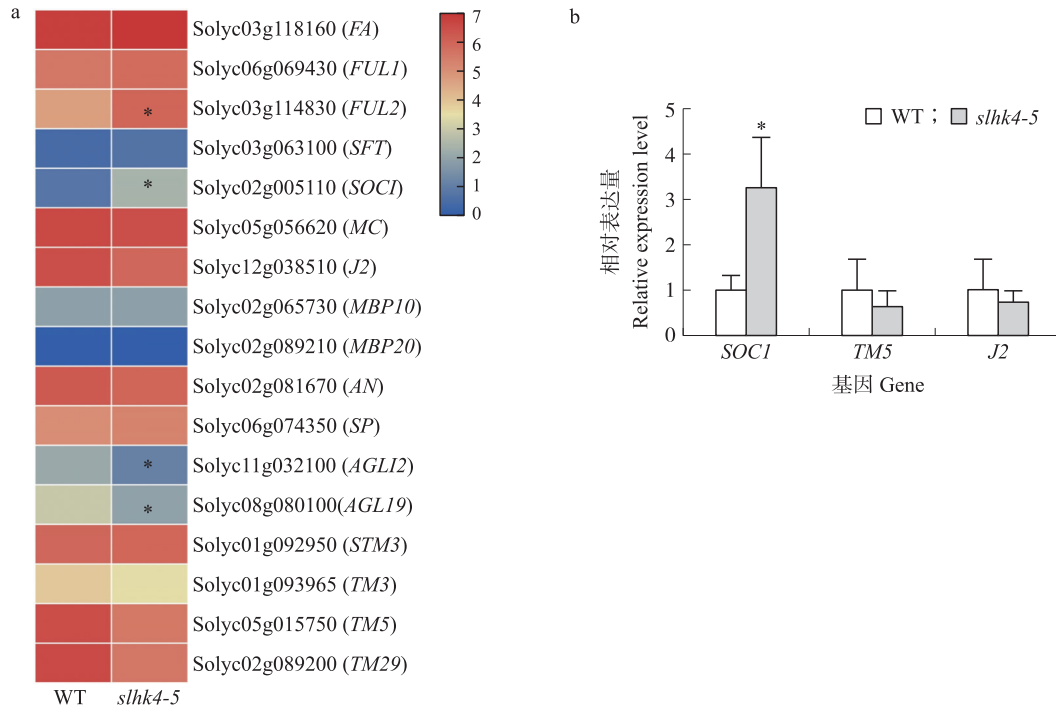


图 5 开花调控相关基因的转录组与 qPCR 分析

Fig. 5 Transcriptome and qPCR analyses of genes involved in regulation of flowering

a. 代表性开花调控相关基因表达热图 (*, FDR ≤ 0.05); b. 开花调控相关部分基因的 qPCR 分析。

a. Heat map of representative genes involved in regulation of flowering (*, FDR ≤ 0.05); b. qPCR analysis of part of genes involved in regulation of flowering.

2.4.3 DEG 的功能分析及 qPCR 表达验证 以 $FDR \leq 0.05$ 为筛选标准,在 WT 与 *slhk4-5* 茎尖转录组中共鉴定得到 535 个 DEG。其中, *slhk4-5* 中表达上调的基因为 252 个,下调表达的基因 283 个,下调基因约占 52.9%,略高于上调基因。对全部 DEG 进行 GO 富集分析,结果(图 6-a)显示,共有 113 个 DEG 存在 GO 注释,分别富集在 57 个组中,包括生物过程类 (biological process) 25 个组,细胞组分类 (cellular component) 19 个组和分子功能类 (molecular function) 13 个组。其中,细胞组分类富集的 DEG 最多,共 72 个;分子功能类富集的 DEG 最少,仅 23 个。不过,分子功能类中富集程度高于平均水平的组多于其他 2 个大类,如脂肪酸连接酶活性 (fatty acid ligase activity)、碳水化合物磷酸酶活性 (carbohydrate phosphatase activity) 和辅酶 A 连接酶活性 (COA-ligase activity) 等组,表明 *slhk4-5* 与 WT 可能在这些功能组别中存在差异。此外,在 19 个细胞组分类的组中,有 10 个与叶绿体或质体相关,而其中富集的 DEG,有 77.2% 的表达在 *slhk4-5* 中显著下调,说明 *slhk4-5* 茎尖细胞叶绿体/质体的发育或功能很可能弱于 WT。生物过程类的组中,多磷酸酯的合成/代谢过程 (polyphosphate biosynthetic/metabolic process) 和嘌呤核苷酸、嘌呤核糖核苷酸合成过程 (purine nucleotide/ribonucleotide biosynthetic process) 的 DEG 富集程度在 25 个组中最高。参与这些过程的 DEG 中,有 80.0% 在 *slhk4-5* 中的表达显著低于 WT,例如,ATP 合成酶 γ 亚基 (ATP synthase γ -subunit, gATPp2) 的编码基因 Solyc02g080540 在 *slhk4-5* 中的表达比 WT 中显著下降 22.4%。这些结果表明, *slhk4-5* 茎尖细胞在 ATP 等多磷酸酯及核酸合成等方面的活性很可能弱于 WT。

KEGG 通路分析显示,共有 59 个 DEG 富集于 39 条 KEGG 通路中(图 6-b)。根据所涉及的功能,这些通路可主要分为 6 大类,包括:线粒体及呼吸作用相关通路、叶绿体及光合作用相关通路、转录和翻译及氨基酸和蛋白合成/代谢相关通路、脂类代谢相关通路、植物激素相关通路以及其他通路(图 7-a—f)。共 34 个结构基因富集在前 4 个通路中,其中 30 个在 *slhk4-5* 中的表达显著低于 WT。例如,三羧酸循环中催化形成乙酰 CoA 的 ATP 柠檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase, ACL) 的 A-2 亚基编码基因 Solyc04g039670 (图 7-a)、叶绿素 a-b 结合蛋白 (chlorophyll a-b binding protein, CAB) 的编码基因 Solyc12g009200 (图 7-b)、

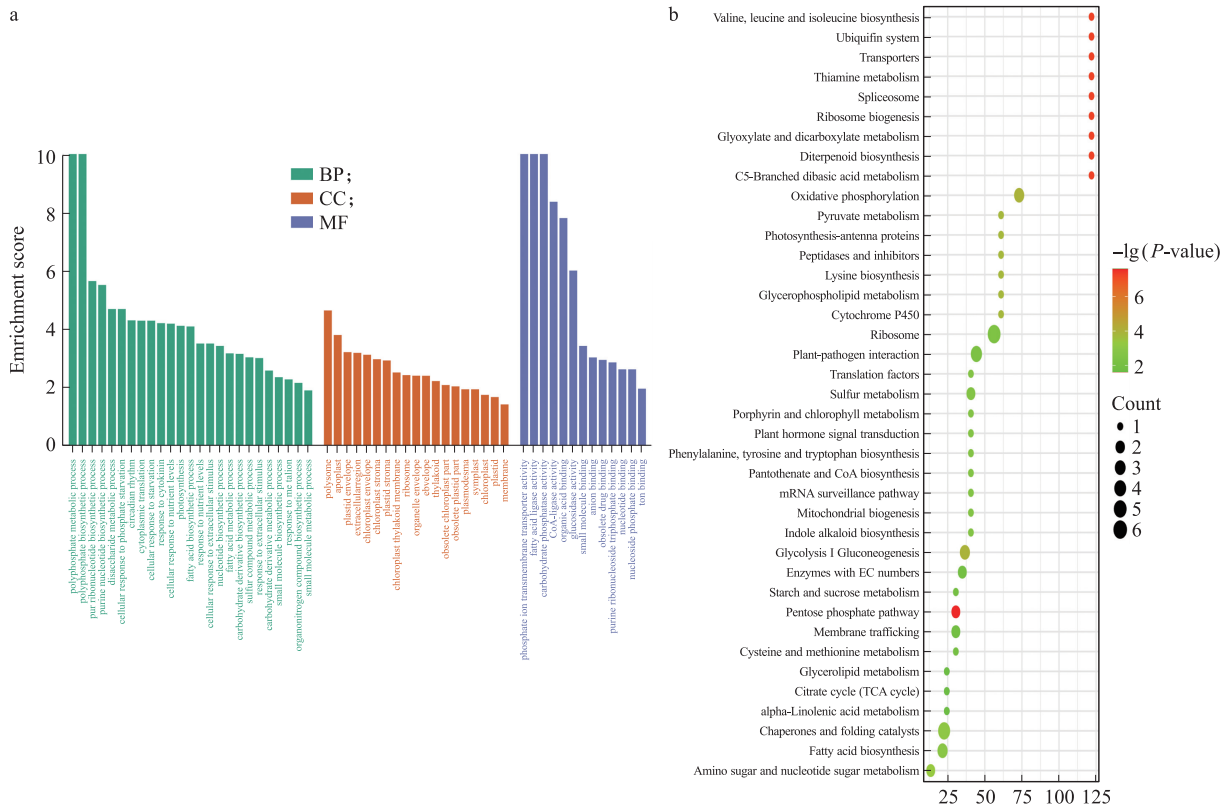


图 6 WT 和 *slhk4* 突变体茎尖差异表达基因 (DEG) 的 GO 富集和 KEGG 通路分析

Fig. 6 GO enrichment and KEGG pathway analyses of differentially expressed genes (DEG) between WT and *slhk4* mutant shoot apices

a. GO 富集分析 (纵坐标为富集程度); b. KEGG 通路分析 (横坐标为富集程度)。

a. GO enrichment analysis (the vertical indicates the degree of enrichment); b. KEGG pathway analysis (the horizontal indicates the degree of enrichment). BP:生物过程 Biological process; CC:细胞组分 Cellular component; MF:分子功能 Molecular function.

半胱氨酸合成酶 (cysteine synthase) 基因 Solyc01g094790 (图 7-d) 等。其他通路中的结构基因 DEG, 如促进水杨酸合成的 *S*-腺苷-*L*-蛋氨酸依赖的甲基转移酶 (*S*-adenosyl-*L*-methionine-dependent methyltransferase, SAMT) 基因 Solyc09g091550 (图 7-e)、参与氨基糖及核苷糖代谢的几丁质酶 (chitinase) 基因 Solyc02g082930 (图 7-f) 等, 在 *slhk4-5* 中的表达也显著低于 WT。qPCR 试验的结果与转录组分析一致 (图 7-h)。这些结果表明, *slhk4-5* 茎尖细胞在光和呼吸作用、蛋白合成/代谢等基础物质代谢与能量转换方面的活性很可能弱于 WT。此外, 细胞周期正调控蛋白 cyclin-B1-2 的编码基因 Solyc02g089820、负调控因子 cyclin-dependent kinase inhibitor 的编码基因 Solyc02g090680 和 Solyc03g044480 在 *slhk4-5* 中的表达也均低于 WT (图 7-g), 但负调控因子的编码基因在 WT 和 *slhk4-5* 茎尖中的表达量很低, 所起的作用可能有限。综上, DEG 的 KEGG 通路分析结果进一步支持了 GO 富集分析所得推测: *slhk4-5* 茎尖细胞的生理活性与功能很可能低于 WT。这可能是导致 *slhk4-5* 开花时间晚于 WT 的原因。

3 讨论

开花时间是影响番茄产量和采收期的重要农艺性状^[4]。本研究发现, 与 WT 相比, 细胞分裂素受体突变体 *slhk4* 茎尖的细胞分裂素信号减弱, 花分生组织细胞减小, 细胞数目略少, 花器官分化较晚, 始花时间显著推迟。已有文献表明, 细胞分裂素是开花的正调节因子^[21]。拟南芥细胞分裂素受体基因 *ahk2 ahk3 cre1* 突变体开花严重推迟, 甚至被完全抑制^[30]。但是, 单个拟南芥细胞分裂素受体基因的突变体, 包括 *SlHK4* 在拟南芥中的直系同源基因 *AHK4* 的功能缺失突变体, 其开花时间均未发生显著变化^[30]。*TCSn* 是响应细胞分裂素信号的人工启动子, *TCSn::GFP* 的表达可用于检测植物体内细胞分裂素信号的分布和强弱^[24]。本研究对茎尖细胞分裂素响应荧光信号的观察显示, *slhk4-4*×W20 茎尖的细胞分裂素响应荧光显著弱于 WT×W20, 表明 *slhk4* 突变体茎尖中的细胞分裂素信号途径很可能弱于 WT, 从而导致开花时间推迟。

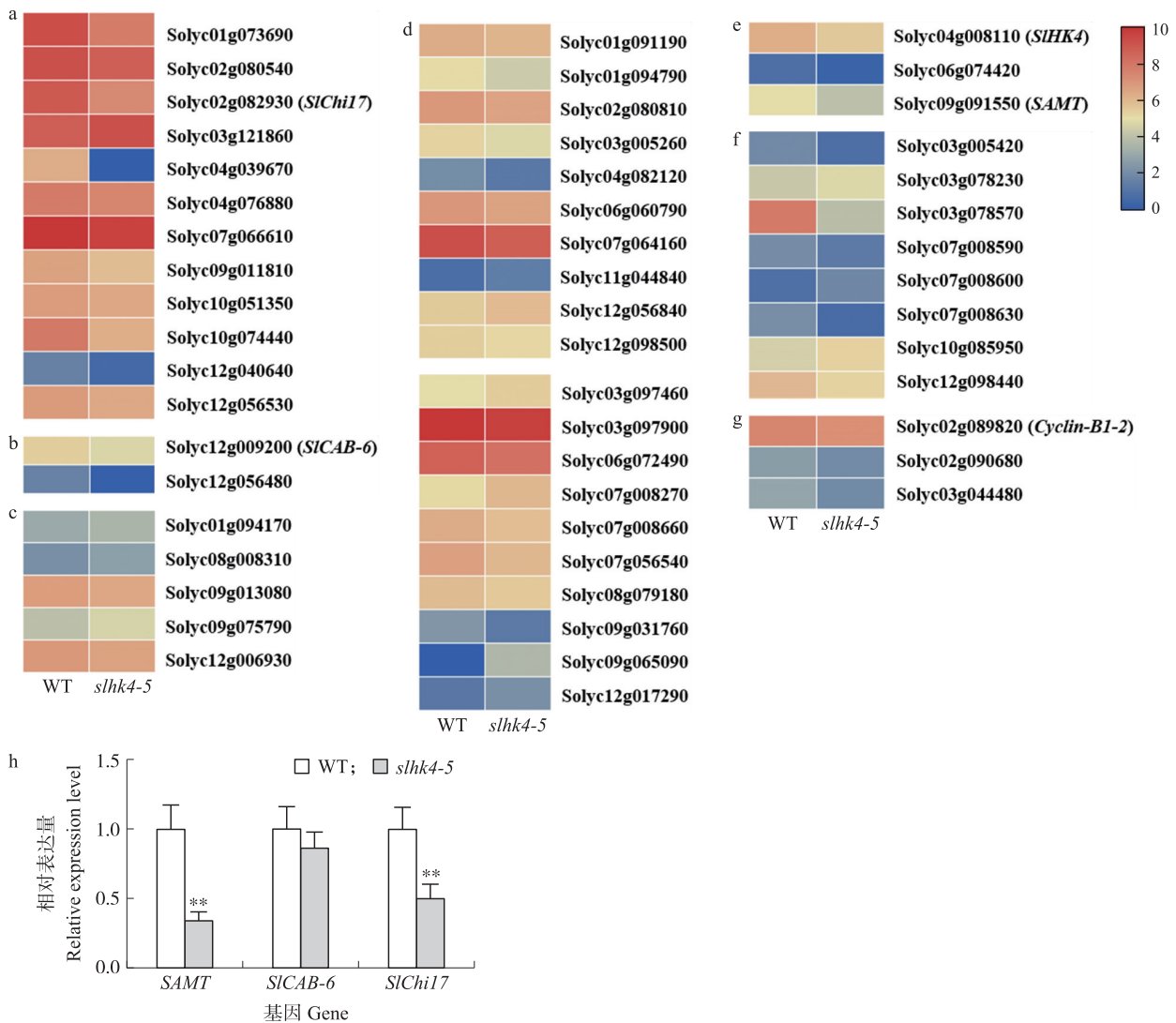


图 7 KEGG 通路富集 DEG 的转录组与 qPCR 分析

Fig. 7 Transcriptome and qPCR analyses of DEG enriched in KEGG pathways

a. 线粒体、呼吸作用通路富集的 DEG; b. 叶绿体、光合作用通路富集的 DEG; c. 脂类代谢通路富集的 DEG; d. 蛋白、氨基酸合成/代谢以及转录翻译通路富集的 DEG; e. 植物激素相关通路富集的 DEG; f. 其他通路富集的 DEG; g. 参与细胞周期调控的 DEG; h. 随机选择 DEG 的 qPCR 分析。 ** $P < 0.01$ 。

a. DEG enriched in the pathways related to mitochondria and respiration; b. DEG enriched in the pathways related to chloroplast and photosynthesis; c. DEG enriched in lipid metabolism; d. DEG enriched in the pathways related to protein and amino acid biosynthesis/metabolism and transcription or translation; e. DEG enriched in phytohormone-related pathways; f. DEG enriched in other pathways; g. DEG involved in regulation of cell cycle; h. qPCR analysis of randomly selected DEG. ** $P < 0.01$.

细胞分裂素促进细胞的生理活性,例如促进玉米、水稻中胚的细胞分裂^[16]以及维持植物茎尖干细胞分裂的活性^[31]。因此,本研究中 *slhk4* 花分生组织中心区细胞显著小于 WT,细胞数略少于 WT,这可能与 *slhk4* 茎尖细胞分裂素信号途径减弱,导致花分生组织细胞分裂分化能力下降有关。WT 与 *slhk4-5* 突变体茎尖转录组 DEG 的功能分析显示,57.6%具有功能注释的 DEG 富集于细胞光合和呼吸作用、蛋白合成/代谢等基础物质代谢与能量转换通路中,且在 *slhk4* 中的表达低于 WT,例如 *ACL* 基因 (Solyc04g039670)、*CAB* 基因 (Solyc12g009200)、*gATPp2* 基因 (Solyc02g080540) 等。在拟南芥中的研究表明,*ACL* 参与柠檬酸循环,催化乙酰 CoA 的形成,其表达下调导致植物细胞和器官变小、生长速率变慢^[32]; *CAB* 参与叶绿体和光合作用相关途径,具有促进细胞中有机物积累的功能^[33]。番茄中的 *ACL*、*CAB* 等基因可能具有与其拟南芥直系同源基因中类似的功能。另外,番茄中的研究表明,*gATPp2* 能够利用光合作用促进 ATP 的合成^[34]。这些基因在 *slhk4* 中的表达下调,意味着 *slhk4* 茎尖细胞的生理活性与功能很可能低于 WT,从而导致花分生组织分裂分化能力下降,开花时间推迟。此外,*slhk4* 突变体的叶片和植株生长也略慢于 WT,开

花前 *shhk4-4* 第7片真叶出现的时间比 WT 晚约 2 d,说明 *shhk4* 茎尖分生组织的活性可能在营养生长阶段已有所降低。单个 *SIHK4* 受体基因的突变即引起 *shhk4* 茎尖细胞活性下降,说明受体 *SIHK4* 在调控番茄茎尖花分生组织细胞活性中具有重要功能。

本研究中,参与细胞分裂素主要途径的基因茎尖转录组与 qPCR 分析显示,与 WT 相比,*shhk4-5* 茎尖中只有受体基因 *SIHK4* 显著下调,而其他基因,如调控内源细胞分裂素含量的 *SUPT*、*SICKX* 等基因,参与细胞分裂素信号途径的 *SIRR*、*SICRF* 等基因的表达均无明显变化。这可能是由于细胞分裂素信号途径的核心转录因子 type-B *SIRR* 仅发生了蛋白磷酸化水平的改变,而未发生基因表达水平的变化。前人研究显示,type-B *SIRR* 基因的表达基本不受细胞分裂素含量变化的影响^[25-26],也与上游细胞分裂素受体基因的表达水平关系不大^[35];type-B *SIRR* 的转录因子活性主要与其蛋白磷酸化水平有关^[13,25,36]。*shhk4-5* 茎尖中 type-B *SIRR* 的磷酸化水平是否发生了变化还有待进一步证实。

另一方面,转录组分析表明,仅 *FUL2*、*SOC1*、*AGL12* 与 *AGL19* 共 4 个开花调控相关基因的表达在 WT 与 *shhk4* 茎尖中具有显著差异。这 4 个基因均为开花正调控因子^[3,9,37];然而,与 WT 相比,*shhk4* 茎尖中 *FUL2* 和 *SOC1* 表达较 WT 上调而 *AGL12* 和 *AGL19* 表达下调,与 *shhk4* 突变体开花时间推迟的性状变化不完全一致。已有研究显示,*FUL2* 的功能丧失会导致番茄的始花节位显著增加^[38]。*shhk4* 突变体的始花节位与 WT 相同,仅始花时间推迟,因此,*FUL2*、*SOC1* 等开花直接调控因子的表达变化很可能不是造成 *shhk4* 开花时间推迟的原因。受体 *SIHK4* 介导的细胞分裂素信号途径是否直接调控这些开花调控基因有待进一步研究。

综上,本研究发现细胞分裂素受体 *SIHK4* 是番茄开花时间的正调控因子,其功能缺失导致植株茎尖细胞分裂素信号减弱,花分生组织细胞减小,活性下降,分化推迟,进而导致开花时间显著晚于 WT。本研究为解析细胞分裂素途径调控植物开花的分子机制以及阐明番茄开花时间的调控机制奠定了基础。

参考文献 References:

- [1] Wang H X, Yang Y H, Zhang Y Y, et al. Transcriptome analysis of flower development and mining of genes related to flowering time in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(15): 8128.
- [2] Fornara F, de Montaigu A, Coupland G. SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis* [J]. Cell, 2010, 141(3): 550-552.
- [3] Kinoshita A, Richter R. Genetic and molecular basis of floral induction in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany, 2020, 71(9): 2490-2504.
- [4] 杨小凤, 李小蒙, 廖万金. 植物开花时间的遗传调控通路研究进展 [J]. 生物多样性, 2021, 29(6): 825-842.
Yang X F, Li X M, Liao W J. Advances in the genetic regulating pathways of plant flowering time [J]. Biodiversity Science, 2021, 29(6): 825-842 (in Chinese with English abstract).
- [5] Molinero-Rosales N, Latorre A, Jamilena M, et al. SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato [J]. Planta, 2004, 218(3): 427-434.
- [6] Samach A, Lotan H. The transition to flowering in tomato [J]. Plant Biotechnology, 2007, 24(1): 71-82.
- [7] Pnueli L, Carmel-Goren L, Hareven D, et al. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1* [J]. Development, 1998, 125(11): 1979-1989.
- [8] Alonge M, Wang X G, Benoit M, et al. Major impacts of widespread structural variation on gene expression and crop improvement in tomato [J]. Cell, 2020, 182(1): 145-161.
- [9] Dreni L, Kater M M. *MADS* reloaded: evolution of the *AGAMOUS* subfamily genes [J]. New Phytologist, 2014, 201(3): 717-732.
- [10] Hauvermale A L, Ariizumi T, Steber C M. Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression [J]. Plant Physiology, 2012, 160(1): 83-92.
- [11] Khurana J P, Cleland C F. Role of salicylic acid and benzoic acid in flowering of a photoperiod-insensitive strain, *Lemna paucicostata* LP6 [J]. Plant Physiology, 1992, 100(3): 1541-1546.
- [12] Mai Y X, Wang L, Yang H Q. A gain-of-function mutation in *IAA7/AXR2* confers late flowering under short-day light in *Arabidopsis* [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(6): 480-492.
- [13] Hwang I, Sheen J, Muller B. Cytokinin signaling networks [J]. Annual Review of Plant Biology, 2012, 63: 353-380.
- [14] Jameson P E, Song J C. Cytokinin: a key driver of seed yield [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(3): 593-606.
- [15] 李维林, 魏智文, 杨海燕, 等. 细胞分裂素参与氮素调控高等植物侧枝形成和发育的作用机制研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2022, 53(3): 373-383.
Li W L, Wei Z W, Yang H Y, et al. Research on the mechanism of cytokinins involved in nitrogen regulation of lateral branch formation and development in higher plants [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2022, 53(3): 373-383 (in Chinese with English abstract).

- [16] 宋松泉,刘军,杨华,等. 细胞分裂素调控种子发育、休眠与萌发的研究进展[J]. 植物学报,2021,56(2):218-231.
Song S Q,Liu J,Yang H,et al. Research progress in seed development,dormancy and germination regulated by cytokinin[J]. Chinese Bulletin of Botany,2021,56(2):218-231(in Chinese with English abstract).
- [17] Lomin S N,Krivosheev D M,Steklov M Y,et al. Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands[J]. Journal of Experimental Botany,2015,66(7):1851-1863.
- [18] Yamada H,Suzuki T,Terada K,et al. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane[J]. Plant and Cell Physiology,2001,42(9):1017-1023.
- [19] Werner T,Schmülling T. Cytokinin action in plant development[J]. Current Opinion in Plant Biology,2009,12(5):527-538.
- [20] Li D,Liu C,Shen L S,et al. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*[J]. Developmental Cell,2008,15(1):110-120.
- [21] Werner T,Motyka V,Laucou V,et al. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity[J]. The Plant Cell,2003,15(11):2532-2550.
- [22] 陈兆玉,王永,丁静,等. 细胞分裂素受体基因 *SIHK4* 突变对番茄抗旱性的影响[J]. 南京农业大学学报,2022,45(2):235-243. DOI: 10.7685/jnau.202105024.
Chen Z Y,Wang Y,Ding J,et al. Effects of cytokinin receptor gene *SIHK4* mutation on drought resistance of tomato[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2022,45(2):235-243(in Chinese with English abstract).
- [23] 樊俊苗. 细胞分裂素受体 *SIHK4* 调控番茄叶绿素含量和单性结实的功能研究[D]. 南京:南京农业大学,2022.
Fan J M. Regulation of chlorophyll content and parthenogenous fruit set by cytokinin receptor *SIHK4* in tomato [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University,2022(in Chinese with English abstract).
- [24] Liu J C,Müller B. Imaging *TCSn::GFP*, a synthetic cytokinin reporter, in *Arabidopsis thaliana*[J]. Methods in Molecular Biology,2017,1497:81-90.
- [25] Hosoda K,Imamura A,Katoh E,et al. Molecular structure of the GARP family of plant Myb-related DNA binding motifs of the *Arabidopsis* response regulators[J]. The Plant Cell,2002,14(9):2015-2029.
- [26] Kieber J J,Schaller G E. Cytokinins[J]. The Arabidopsis Book,2014,12:e0168.
- [27] Liu H,Chen R,Li H,et al. Genome-wide identification and expression analysis of *SIRR* genes in response to abiotic stress in tomato[J]. Plant Biology,2023,25(2):322-333.
- [28] Rashotte A M,Mason M G,Hutchison C E,et al. A subset of *Arabidopsis* AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(29):11081-11085.
- [29] Shi X L,Gupta S,Rashotte A M. *Solanum lycopersicum* cytokinin response factor(*SICRF*) genes; characterization of *CRF* domain-containing *ERF* genes in tomato[J]. Journal of Experimental Botany,2012,63(2):973-982.
- [30] Riefler M,Novak O,Strnad M,et al. *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism[J]. The Plant Cell,2006,18(1):40-54.
- [31] Yang W B,Cortijo S,Korsbo N,et al. Molecular mechanism of cytokinin-activated cell division in *Arabidopsis*[J]. Science,2021,371(6536):1350-1355.
- [32] Fatland B L,Nikolau B J,Wurtele E S. Reverse genetic characterization of cytosolic acetyl-CoA generation by ATP-citrate lyase in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell,2005,17(1):182-203.
- [33] Bettini P P,Marvasi M,Fani F,et al. Agrobacterium rhizogenes *rolB* gene affects photosynthesis and chlorophyll content in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants[J]. Journal of Plant Physiology,2016,204:27-35.
- [34] Pateraki I,Renato M,Azcón-Bieto J,et al. An ATP synthase harboring an atypical γ -subunit is involved in ATP synthesis in tomato fruit chromoplasts[J]. The Plant Journal:for Cell and Molecular Biology,2013,74(1):74-85.
- [35] Argueso C T,Raines T,Kieber J J. Cytokinin signaling and transcriptional networks[J]. Current Opinion in Plant Biology,2010,13(5):533-539.
- [36] Makino S,Kiba T,Imamura A,et al. Genes encoding pseudo-response regulators; insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and Cell Physiology,2000,41(6):791-803.
- [37] Moon J,Suh S S,Lee H,et al. The *SOCI* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal,2003,35(5):613-623.
- [38] Jiang X B,Lubini G,Hernandes-Lopes J,et al. FRUITFULL-like genes regulate flowering time and inflorescence architecture in tomato[J]. The Plant Cell,2022,34(3):1002-1019.

责任编辑:范雪梅