

莲雾调控开花基因 *SsSOC1* 的克隆及表达分析

杨胤延¹, 孙东宇^{1*}, 蔡昕成¹, 胡志群¹, 吴国麟^{2**}, 周碧燕^{1**}

1. 农业农村部华南地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室/华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642; 2. 珠海市现代农业发展中心, 广东珠海 519000

摘要: *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) 是植物中的一个开花时间调节因子, 属于 MADS-box 转录因子家族, 在植物从营养生长向生殖生长的转变中发挥关键作用。*SOC1* 参与多种生物过程, 包括花器官发育、开花时间控制以及对环境刺激和激素信号的响应。本研究通过遮荫和喷施乐斯本的方式对莲雾进行催花处理, 统计处理后的叶芽和花芽数量以及成花枝率, 同时, 利用课题组现有的莲雾转录组进行分析, 筛选出调控莲雾开花的候选基因 *SsSOC1*, 并通过实时荧光定量 PCR 技术研究遮荫处理和喷施乐斯本药剂处理下莲雾不同时期和组织中 *SsSOC1* 表达量的差异。结果显示: 经过遮荫处理的莲雾树体芽点、叶片、叶尖以及叶柄中的 *SsSOC1* 基因表达量显著增加, 其中叶尖的相对表达量最高。本研究成功克隆了莲雾黑糖芭品种的 *SsSOC1* 基因, 并利用生物信息学方法对其进行启动子分析、蛋白理化性质分析、保守功能域的预测和序列比对。结果表明: *SsSOC1* 基因的开放阅读框长度为 654 bp, 共编码 217 个氨基酸, 其编码蛋白的理论等电点为 9.37, 分子式为 $C_{1076}H_{1794}N_{322}O_{334}S_{10}$, 分子量为 24.91 kDa, 带正电荷氨基酸残基总数 (Lys+Arg) 为 40, 带负电荷氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 32, 脂肪系数为 80.64, 总平均亲水性系数 (GRAVY) 为 -0.729, 不稳定系数为 66.17; 莲雾 *SsSOC1* 蛋白结构不含 β -折叠, 不属于分泌蛋白与膜结构蛋白, 亚细胞定位显示其主要存在于细胞核中, 属于不稳定的亲水性碱性蛋白, 该蛋白具有 MADS_MEF2_like 和 K-Box 保守结构域, 同时隶属于 MADS 超级家族和 K-Box 超级家族, 该结构域的起止氨基酸位点为第 3~75 位和第 88~171 位, 符合 MADS 蛋白家族与 K-Box 家族的典型结构特征; 系统进化树分析显示, 莲雾 *SsSOC1* 序列与油叶蒲桃的同源性最高; 通过花序侵染法将 *SsSOC1* 基因转化拟南芥, 发现 35S::*SsSOC1* 表现出早花表型, 莲座叶数量比野生型要少。本研究初步确定了 *SsSOC1* 基因在成花方面的重要作用, 并揭示莲雾遮荫与成花相关的内在调控机理, 为莲雾生产提供指导意义, 以及为莲雾反季节栽培技术改良提供理论依据。

关键词: 莲雾; 成花; *SsSOC1*; 基因克隆; 转录活性分析; 表达模式分析

中图分类号: S432.1 文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of the Flowering Gene *SsSOC1* in Wax Apple

YANG Yinyan¹, SUN Dongyu^{1*}, CAI Xincheng¹, HU Zhiquan¹, WU Guolin^{2**}, ZHOU Biyan^{1**}

1. Key Laboratory of Horticultural Crop Biology and Germplasm Creation in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 2. Center for Modern Agricultural Development, Zhuhai, Guangdong 519000, China

Abstract: *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) is a flowering time regulator in plants. It belongs to the MADS-box transcription factor family and plays a crucial role in the transition from vegetative to reproductive growth in plants. *SOC1* is involved in various biological processes, including flower organ development, flowering time control, and response to environmental stimuli and hormone signals. In this study, shading and application of

收稿日期 2024-10-30; 接受日期 2024-11-13

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32072515); 广州市重点研发计划项目 (No. 202206010023)。

作者简介 杨胤延 (2002—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 热带果树栽培生理; *同等贡献作者: 孙东宇 (1997—), 男, 博士研究生, 研究方向: 热带果树栽培生理。 **通信作者 (Corresponding author): 吴国麟 (WU Guolin), E-mail: 1293831688@qq.com; 周碧燕 (ZHOU Biyan), E-mail: zhoubiyan@scau.edu.cn。

Lorsben were used for flower induction in wax apple, and the number of leaf buds, flowers, and the rate of flowering shoots were recorded after treatment. Additionally, the existing transcriptome data of wax apple in our research group were analyzed to identify the candidate gene *SsSOC1* involved in regulating flowering in wax apple. The differential expression of *SsSOC1* in different stages and tissues of wax apple under shading and Lorsben treatment was studied using qPCR. The results showed that the expression of the *SsSOC1* gene significantly increased in the buds, leaves, leaf tips, and petioles of wax apple treated with shading, with the highest relative expression in the leaf tips. In this study, the *SsSOC1* gene from Hei Tang Ba Bi wax apple was successfully cloned, and its promoter analysis, physicochemical properties of the protein, prediction of conserved functional domains, and sequence alignment were performed using bioinformatics methods. The open reading frame of the *SsSOC1* gene in wax apple was found to be 654 bp, encoding a protein of 217 amino acids. The theoretical isoelectric point of the protein was 9.37, with a molecular formula of $C_{1076}H_{1794}N_{322}O_{334}S_{10}$ and a molecular weight of 24.91 kDa. The protein contained 40 positively charged amino acid residues (Lys+Arg) and 32 negatively charged amino acid residues (Asp+Glu). The protein had a fat coefficient of 80.64, a grand average of hydropathicity (GRAVY) of -0.729 , and an instability coefficient of 66.17. The protein structure lacked β -folds and did not belong to secretory or membrane proteins. Subcellular localization analysis indicated that the protein was mainly present in the nucleus and belonged to an unstable hydrophilic basic protein. The *SsSOC1* protein in wax apple possessed conserved domains including MADS_MEF2_like and K-Box and belonged to the MADS superfamily and K-Box superfamily. The analysis identified the amino acid positions 3 to 75 and 88 to 171 as the start and end sites of the conserved domains, respectively, conforming to the typical structural features of the MADS protein family and the K-Box family. The evolutionary tree showed the highest homology between the *SsSOC1* sequence in wax apple and *Syzygium oleosum*. By floral dip transformation, the *SsSOC1* gene was introduced into *Arabidopsis*, and it was found that the 35S::*SsSOC1* line exhibited an early flowering phenotype and a reduced number of rosette leaves compared to the wild type. This study preliminarily elucidated the important role of the *SsSOC1* gene in flowering in wax apple and attempted to reveal the intrinsic regulatory mechanism of shading-induced flowering, providing guidance for wax apple production and theoretical basis for improving out-of-season cultivation techniques.

Keywords: wax apple; flowering; *SsSOC1*; gene cloning; transcriptional activity analysis; expression pattern analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.03.005

莲雾 [*Syzygium samarangense* (Bl.) Merr.et Perry] 是桃金娘科蒲桃属常绿果树, 又名洋蒲桃, 被誉为“水果皇帝”, 以其清甜的口味和高水分含量而深受东南亚地区消费者的喜爱^[1]。莲雾最先被引进我国台湾, 目前在广东、广西、福建等地大规模种植^[2]。莲雾具有一年多次开花结果的特点, 但主要开花结果时期在夏季。南方夏季高温多雨, 容易遭受到病虫害的侵袭, 导致果实品质参差不齐, 而且夏季水果大量上市, 价格不具优势, 因此科研人员对莲雾的产期调节技术开展了较多研究^[3]。

对于大多数植物而言, 遮荫会导致光线不足, 限制植株的生长和发育, 导致徒长和过度的营养生长, 从而引起营养器官与生殖器官之间的竞争, 不利于开花。然而, 对于莲雾来说, 遮荫处理却具有促进开花的作用^[4]。遮荫处理可以使莲雾的叶芽和花芽进入休眠状态, 控制新梢的生长抽生, 减少整个树体养分的消耗, 提高莲雾的开花率^[5]。早期的研究者对莲雾的印度红品种进行了产期调控实验^[6], 通过喷施莲雾促花灵、多效唑和催花

剂, 结合环剥、遮荫、断根等措施, 实现了印度红莲雾反季节开花, 并获得了比正造果更好的品质和更高的经济效益。研究发现, 乐斯本可以促进莲雾提前开花, 但其促进莲雾开花的机制并未明晰。最近, 一些学者开始对莲雾的基因组学进行研究, 挖掘与莲雾生长发育相关的基因, 但这些基因大多数与莲雾果实成熟相关^[7-8], 有关莲雾开花相关基因的研究报道较少。

SOC1 (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*) 及其同源基因编码 MADS-box 家族转录因子^[9], 影响植物的成花过程。*SOC1* 通常作为生殖阶段转换的潜在标记基因^[10], 在拟南芥中, *AtSOC1* 过表达的植株表现出早花的现象, 并且相较于野生型植株, *AtSOC1* 过表达的植株莲座叶数量较少, 表明 *SOC1* 在调控拟南芥开花中起重要作用。*SOC1* 通过多种途径促进植物开花^[11], 它整合来自长日照、自主和春化途径的多种开花信号并参与花发育^[12-13]。此外, 它还整合了来自植物年龄和赤霉素的开花信号^[14], 是植物开花信号的重要整合子。在光周期途径中, *CO*

(*CONSTANS*) 并不直接作用于 *SOC1*, 而是激活 *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) 后再调控 *SOC1*^[15]。

研究发现, 即使关闭 *FT* 与 *SOC1* 之间的作用通路, 赤霉素途径仍能激活 *SOC1*^[16]。目前对于莲雾 *SOC1* 基因的功能分析未见报道。为此, 本研究开展 *SsSOC1* 基因的功能分析, 为进一步研究 *SsSOC1* 在莲雾成花等方面的功能提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试材料为 8 年生黑糖芭比莲雾品种, 采自广州市天河区华南农业大学果园 (23°9'40"N, 113°21'18"E)。转基因实验用材料为哥伦比亚野生型拟南芥 (*Columbia-0*)。

1.1.2 菌株及载体 植物双元表达载体 pGreenII-35S-C1 由高用顺老师惠赠; pMD18-T 购自 TaKaRa 公司; 大肠杆菌菌株 DH5α、根癌农杆菌菌株 GV3101 购自上海唯地生物技术有限公司购。

1.1.3 主要试剂 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (RNA prep Pure)、植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; RNA 反转录试剂盒[HiScript® II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)]、同源重组试剂盒 (ClonExpress® II One Step Cloning Kit) 购自诺唯赞 (南京) 公司; qPCR 试剂 (Hieff UNICON® Power qPCR SYBR Green Master Mix)、菌落 PCR 鉴定试剂 (Hieff® PCR Master Mix) 购自翌圣生物科技 (上海) 有限公司; PCR 高保真酶 (PrimeSTAR® Max DNA Polymerase) 购自宝生生物工程 (大连) 有限公司; 限制性内切酶、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan)、利福平 (Rif)、LB 培养基、Glufosinate Ammonium 10% Solution (Basta) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.1.4 引物 内参基因选用 *β-actin* 基因, 使用 Primer Premier 5.0 (Premier 公司) 软件设计引物 (表 1), 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。qRT-PCR 采用 LightCycler® 480 Real-Time PCR system 仪器 (Roche, Basel, Switzerland)。荧光定量采用艾科瑞 (湖南) 生物的 SYBR Green Pro TagHS 预混型 qPCR 试剂盒。

表 1 本试验所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
β-actin-F	CTCAATCCCAAGGCGAATA
β-actin-R	ACGACCACTGGCATAAAGG
SsSOC1-qRT-F	CAGCATGAACGAAACCAT
SsSOC1-qRT-R	TCATTTGCTCTTTGTGGG
SsSOC1-pMD18-T-F	ATGGTGAGAGGGAAGACCC
SsSOC1-pMD18-T-R	TTAATTCTGAAATGGCAGG
SsSOC1-C1-F	gtcgacggatcgcataagcttATGGTGA-GAGGGAAGACCC
SsSOC1-C1-R	gatttcagcgaattatctagaTTAATTCTGAAAT-GGCAGG
35S-F	GACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTC
35S-R	CCTTATCGGGAAACTACTCACAC

注: 小写字母代表线性化载体重叠序列。
Note: The lowercase letters represent an overlapping sequence of linearized vector.

1.2 方法

1.2.1 遮荫处理后莲雾花芽、成花枝率及枝梢长度的统计 为了探究遮荫处理对黑糖芭比莲雾树体成花的影响, 分别记录未经遮荫处理[对照组, 光合有效外辐射 (PAR_e): (1448.9±41.3)μmol/(m²·s), 0%遮荫率]与经过遮荫处理[处理组, PAR_e: (145.2±12.1)μmol/(m²·s), 90%遮荫率]在解除遮荫处理后 21 d 时的花芽数、成花枝率 (以成花枝的数量除莲雾树体总成熟枝数) 以及枝梢长度。

1.2.2 遮荫对莲雾 *SsSOC1* 基因表达水平的影响分析 在遮荫期间, 每隔 3 d 采集 1 次芽点 (在对照组中为叶芽, 处理组中为花芽)、叶片、叶尖以及叶柄。采集后的各个组织立即用液氮进行冷冻处理, 于-80 °C 冰箱保存, 之后进行 RNA 提取再反转录为 cDNA。利用 qRT-PCR 技术进行 *SsSOC1* 基因不同组织的表达模式分析。反应体系: cDNA 稀释模板 3 μL, Primer F (0.25 μmol/L) 1 μL, Primer R (0.25 μmol/L) 1 μL, SYBR Green PCR Master mix 5 μL。反应程序参照 qPCR 试剂 (Hieff UNICON® Power qPCR SYBR Green Master Mix) 说明书。

1.2.3 生物信息学分析 基于转录组筛选出合适的序列, 在 NCBI 数据库使用 ORF finder 工具找到最长开放阅读框 (ORF), 根据最长 ORF 区设计引物进行克隆测序。利用在线工具 (表 2) 对 *SsSOC1* 进行生物信息学分析。通过 NCBI 数据库

的 BLAST 功能筛选与 *SsSOC1* 基因相似的不同于莲雾的其他物种中的 *SOC1* 基因, 获得其蛋白质序列, 利用 MEGA 7.0 软件中的 NJ 法对其构建进化树, 其中 bootstrap 设置为 1000, 用以验证可信度。

表 2 本试验所用在线工具网站

Tab. 2 Website of the online tools used in this experiment

在线工具名称 Online tools name	网址 Website	用途 Usage
ProtParam	https://web.expasy.org/protparam/	蛋白分析
ProtScale	https://web.expasy.org/protscale/	蛋白亲/疏水分析
Prabi	https://prabi.ibcp.fr/	蛋白二级结构分析
Swiss modle	https://swissmodel.expasy.org/	蛋白三级结构预测
NCBI CD Search	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi	蛋白保守结构域分析
SignalP 4.1	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1	蛋白信号肽预测
TMHMM 2.0	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0	蛋白跨膜区域检测
Wolf psort	https://wolfsort.hgc.jp/	蛋白亚细胞定位检测

1.2.4 目的基因克隆及载体构建 使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取莲雾总 RNA, 得到 RNA 样品后, 取 1 μL 样品使用 Thermo scientific NanoDrop 2000 测定总 RNA 浓度及纯度。取 2 μL 样品通过琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性和浓度。用 RNA 反转录试剂盒进行反转录获得 cDNA, 用于基因扩增。利用课题组现有的莲雾转录组查找到 *SsSOC1* 序列 (Unigene0006265) 后, 于 Primer Premier 5.0 软件设计 *SsSOC1* 的扩增引物 (*SsSOC1*-pMD18-T-F, *SsSOC1*-pMD18-T-R, 表 1)。以反转录后所得 cDNA 为模板, PCR 扩增 *SsSOC1* 编码区片段, 反应体系: 2 $\times$ PCR buffer for KOD FX 25 μL , 2 mmol/L dNTPs 10 μL , 10 pmol/ μL 正/反引物各 1.5 μL , Template cDNA 1 μL , KOD FX (1.0 U/ μL) 1 μL , ddH₂O 补充至 50 μL 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 35 个循环。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物 2 μL 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测确定目的片段大小后, 采用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收。目的片段经过回收后采用同源重组试剂盒与 pMD18-T 载体连接, 连接后均匀涂布于含 100 mg/mL Amp 抗性的 LB 固体培养基上, 平

板倒置, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h。使用无菌的枪头将单个菌落挑至 20 mL 灭菌水中混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。取 1 μL 作为 PCR 模板, 进行菌液 PCR 及电泳鉴定, 将含有目的基因片段加入含 100 mg/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 振荡培养 8 h 后, 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。测序验证后用质粒提取试剂盒提取 pMD18-T-*SsSOC1* 质粒。以 pMD18-T-*SsSOC1* 载体质粒为模板, 使用引物 (*SsSOC1*-C1- F/*SsSOC1*-C1-R) 对其进行 PCR 扩增, 使用 *Hind* III 和 *Xba* I 限制性内切酶对 pGreen II-35S-C1 载体进行酶切。以未酶切质粒为对照采用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。随后进行切胶回收。纯化后的目的基因片段与线性化功能载体使用同源重组试剂盒将 pGreenII-35S-C1 载体与 *SsSOC1* 基因片段连接。反应体系: *SsSOC1* 基因片段 100 ng, pGreenII-35S-C1 线性化载体 100 ng, 5 $\times$ CE II Buffer 4 μL , ddH₂O 补充至 20 μL 。反应程序为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 0 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。随后转化至 DH5 α , 挑取单克隆菌落进行菌落 PCR 鉴定, 鉴定完成后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 测序正确的菌株进行扩大培养, 抽提质粒保存。

1.2.5 农杆菌介导的拟南芥过表达实验 取 100 ng pGreenII-35S-C1-*SsSOC1* 质粒加入 50 μL 农杆菌感受态 (GV3101) 中, 拨打混匀, 冰上静置 5 min, 液氮 5 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 冰浴 5 min; 加入 700 μL 无抗生素的 LB 液体培养基, 于 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 振荡培养 3 h; 6000 r/min 离心 1 min; 留取 100 μL 左右上清液轻轻吹打重悬, 将菌块涂布于含 Rif 25 mg/L+Kan 50 mg/L 的 LB 平板上倒置, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d。挑取单克隆菌落进行菌落 PCR 鉴定, 最后将检测正确的农杆菌保存于 10% 甘油中, 并于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用花序浸染法^[17]进行拟南芥的遗传转化, 含有重组质粒的上述甘油农杆菌, 在含有 Rif 25 mg/L+Kan 50 mg/L 的 LB 平板上划线, 于 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 振荡培养 16 h。吸取 4 mL 摇浓的菌液加入到 200 mL 含相应抗生素的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min, 培养至 OD₆₀₀=1.0; 5000 r/min 离心 10 min, 收集细胞并悬浮于 0.5% 蔗糖渗透培养液 (含有 0.02% Silwet-77), 调整 OD₆₀₀=0.8; 将盛花期拟南芥花完全浸入农杆菌悬浮液中侵染 2 min, 放入黑色托盘中, 置于黑暗环境下避光培养 24 h 后于正常光照下培养。

1.2.6 阳性苗的鉴定 将收取到的 T_0 代种子经过 4℃ 低温浸泡后均匀播撒在花盘中, 在生长条件为 23℃, 长日照 (16 h/8 h) 培养室中培养。培养至 1 周左右时 (子叶展平), 喷施 0.1% Basta 进行筛选。取叶片组织提取 DNA 和 RNA, 随后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳和定量 PCR 的测定, 对检测正确的阳性苗和野生型植株进行跟踪观察, 待拟南芥抽薹开花长至 1 cm 时, 统计所需天数以及莲座叶数量。

1.3 数据处理

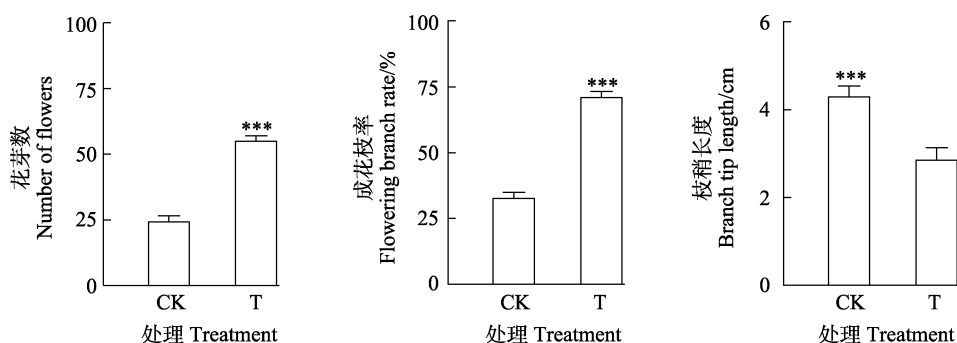
使用 Excel、SPSS (v 26.0) 软件进行统计分

析和差异显著性分析, 使用 GraphPad Prism (v 8.0.2) 软件制图。

2 结果与分析

2.1 遮荫处理对莲雾成花的影响

遮荫处理对莲雾树体中的花芽数、成花枝率及新梢长度有着显著的影响 (图 1), 经过遮荫处理 (T) 的花芽数比未经遮荫处理 (CK) 高 123.39%。同时, 处理组的成花枝率比对照组高 115.06%。而处理组莲雾树体的新梢长度明显短于对照组, 表明一定程度的遮荫处理会减短新梢长度。



***表示处理和对照间在 $P \leq 0.001$ 水平上差异极显著, $n=4$ 。

*** indicates extremely significant difference between treatment and control at the $P \leq 0.001$ level, $n=4$.

图 1 遮荫处理对莲雾成花的影响

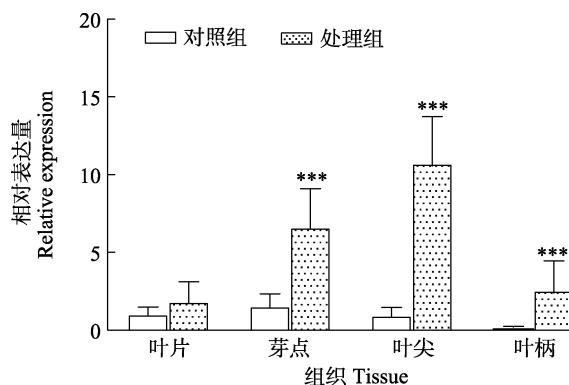
Fig. 1 Effects of shading treatment on flowering in wax apple

2.2 遮荫处理对莲雾不同组织部位中 *SsSOC1* 基因表达水平的影响

在对照组的各个组织中, *SsSOC1* 的相对表达量差异不大, 且数值较低。但遮荫处理组莲雾的芽点、叶片、叶尖以及叶柄中的 *SsSOC1* 相对表达量均增加, 其中, 叶尖中的 *SsSOC1* 相对表达量最高, 是对照组的 10 倍; 叶柄中的 *SsSOC1* 相对表达量与对照组之间差异最大, 是对照组的 14 倍; 处理组花芽中的 *SsSOC1* 相对表达量是对照组叶芽的 4 倍 (图 2)。

2.3 *SsSOC1* 基因的克隆

本研究从黑糖芭比莲雾叶片中提取总 RNA, 并用 1% 浓度的琼脂糖胶检测其质量, 胶图显示质量良好 (图 3A)。反转录成 cDNA 后, 以其为模板, 用 PCR 扩增出 *SsSOC1* 编码区序列, 获得全长 654 bp 的目的基因 (图 3B)。为验证得到的 *SsSOC1* 序列的准确性, 将扩增的 *SsSOC1* 编码区序列与 pMD18-T 载体进行连接并测序, 测序结果发现扩增获得的基因序列与转录组中对应的基因序列完全一致 (Unigene0006265), 成功得到目的基因



***表示处理和对照间在 $P \leq 0.001$ 水平上差异极显著, $n=4$ 。

*** indicates extremely significant difference between treatment and control at the $P \leq 0.001$ level, $n=4$.

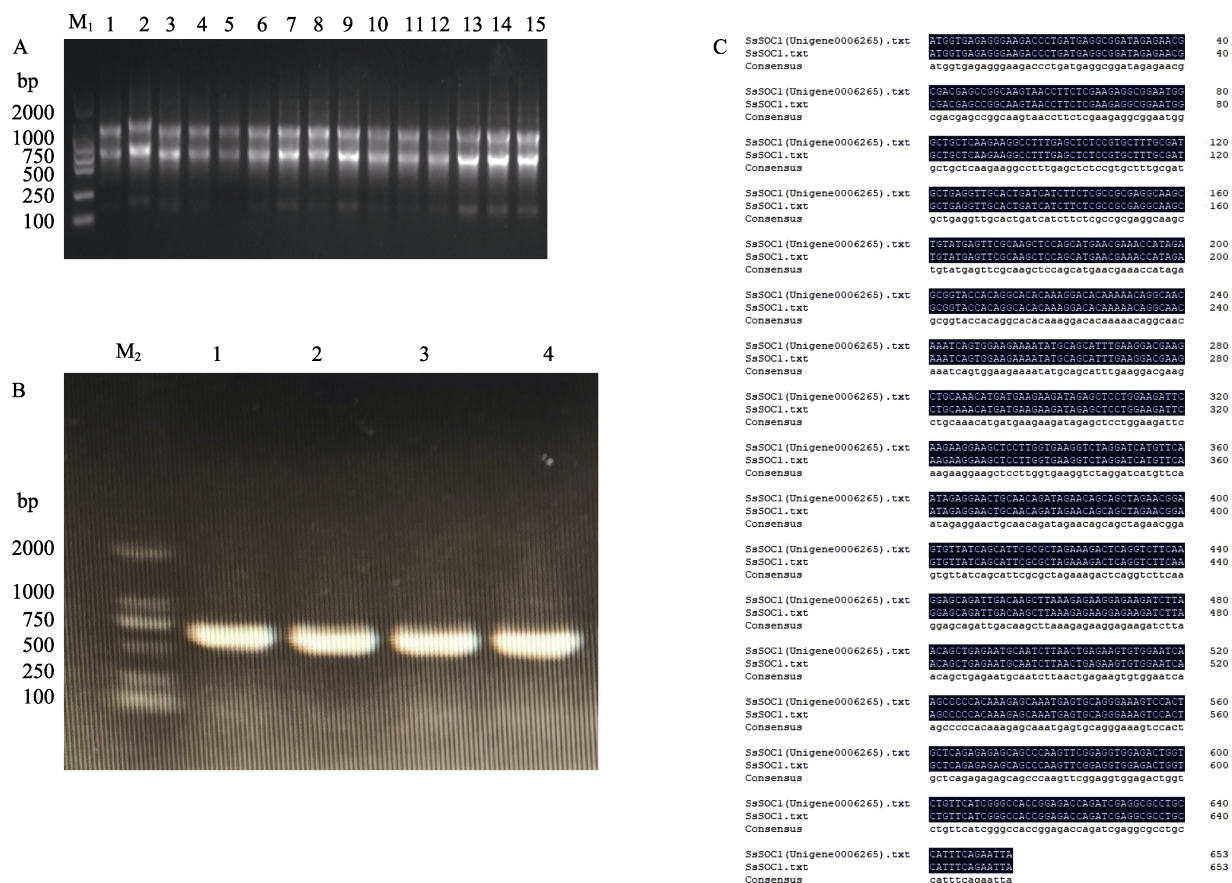
图 2 遮荫期间 *SsSOC1* 表达模式分析

Fig. 2 Analysis of *SsSOC1* expression patterns during the shading period

SsSOC1 (图 3C)。

2.4 *SsSOC1* 蛋白序列结构分析

利用相关在线工具对莲雾的 *SsSOC1* 蛋白进行生物信息学分析, 结果显示, *SsSOC1* 蛋白的理论等电点为 9.37, 分子式为 $C_{1076}H_{1794}N_{322}O_{334}S_{10}$, 分子量为 24.91 kDa, 带正电荷氨基酸残基总数



A: 莲雾 RNA 质量分析图, M₁: DL2000 DNA marker; B: *SsSOC1* 基因 PCR 扩增电泳图, M₂: DL2000 DNA marker; C: *SsSOC1* 基因序列比对图。

A: Wax apple RNA quality analysis gel, M₁: DL2000 DNA marker; B: *SsSOC1* gene PCR amplification gel, M₂: DL2000 DNA marker; C: *SsSOC1* gene sequence alignment figure.

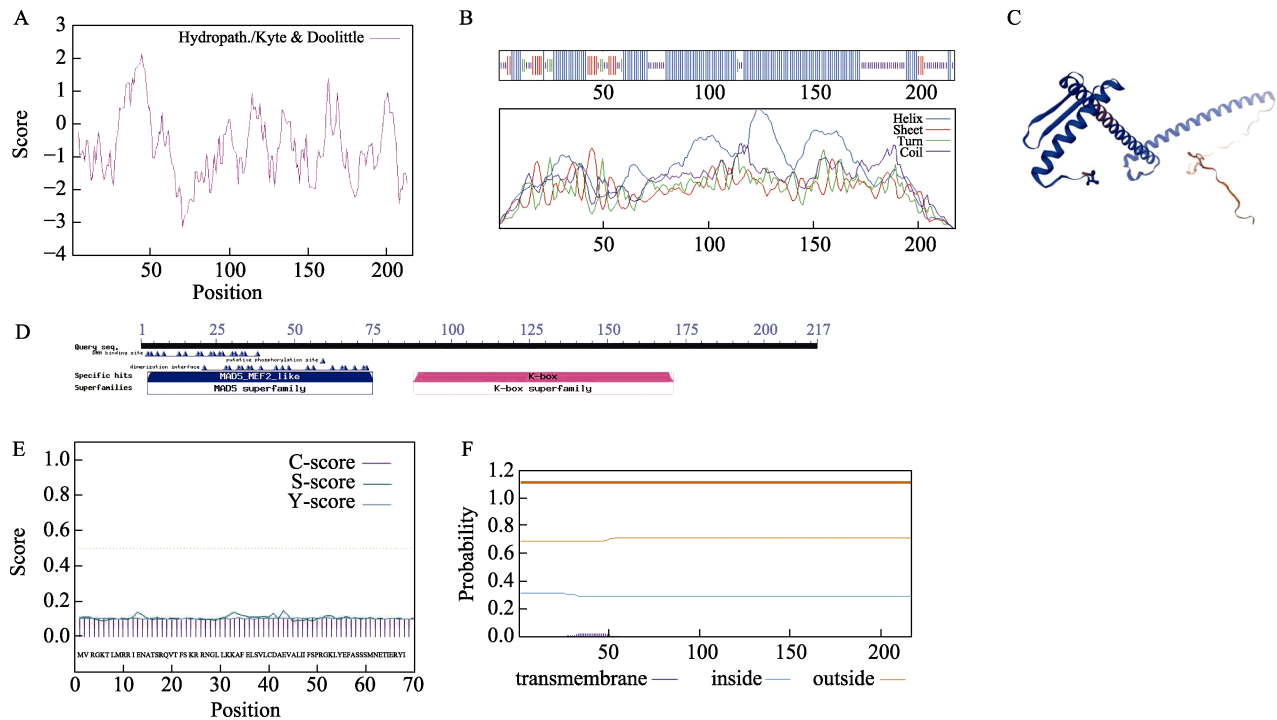
图 3 *SsSOC1* 基因克隆

Fig. 3 Cloning of the *SsSOC1* gene

(Lys+Arg) 为 40, 带负电荷氨基酸残基数 (Asp+Glu) 为 32, 脂肪系数为 80.64, 总平均亲水性系数 (GRAVY) 为 -0.729, 不稳定系数为 66.17; *SsSOC1* 蛋白亲水性最低点值为 -3.144, 疏水性最高点值为 2.122 (图 4A), 推测该蛋白为亲水性蛋白; *SsSOC1* 蛋白二级结构中 α -螺旋占比最高, 为 60.83%, 延伸链和无规则卷曲占比分别为 9.22%、25.81%, 无 β -折叠 (图 4B), *SsSOC1* 蛋白质三级结构的预测见图 4C; *SsSOC1* 蛋白具有 MADS_MEF2_like 和 K-Box 保守结构域, 同时隶属于 MADS 超级家族和 K-Box 超级家族, 该结构域的起止氨基酸位点为第 3~75 位和第 88~171 位, 符合 MADS 蛋白家族与 K-Box 家族的典型结构特征 (图 4D); *SsSOC1* 蛋白的信号肽预测显示 *SsSOC1* 蛋白不含信号肽 (图 4E); *SsSOC1* 蛋白的跨膜区域检测和亚细胞定位预测结果显示, 该蛋白不是分泌蛋白与膜结构蛋白, 定位于细胞核中 (图 4F)。

2.5 *SsSOC1* 蛋白同源序列比对及系统进化分析

通过 NCBI 数据库中的 BLAST 功能对 *SsSOC1* 的氨基酸序列与油叶蒲桃 (*Syzygium oleosum*)、大桉 (*Eucalyptus grandis*)、银叶玫瑰木 (*Rhodamnia argentea*)、胡桃 (*Juglans regia*)、欧洲榛 (*Corylus avellana*)、小果胡桃与核桃杂交种 (*Juglans microcarpa* × *Juglans regia*)、枣 (*Ziziphus jujuba*)、欧洲凯木 (*Alnus glutinosa*)、美国山核桃 (*Carya illinoensis*)、可可 (*Theobroma cacao*)、杨梅 (*Morella rubra*)、石榴 (*Punica granatum*)、白栎 (*Quercus lobata*)、榴莲 (*Durio zibethinus*)、山核桃 (*Carya cathayensis*)、川桑 (*Morus notabilis*) 等 16 种植物的 SOC1 氨基酸序列进行比对分析, 结果显示, 莲雾 *SsSOC1* 蛋白序列与油叶蒲桃的同源性最高, 相似度高达 99.08%, 而与川桑的蛋白序列同源性最低, 相似度只有 78.24% (图 5A)。利用 MEGA 7 软件构建



A: *SsSOC1* 蛋白的亲/疏水性分析; B: *SsSOC1* 蛋白的二级结构分析; C: *SsSOC1* 蛋白的三级结构预测; D: *SsSOC1* 蛋白的保守结构域分析; E: *SsSOC1* 蛋白的信号肽预测; F: *SsSOC1* 蛋白的跨膜区域检测和亚细胞定位分析。

A: Hydrophobicity analysis of *SsSOC1* protein; B: Secondary structure analysis of *SsSOC1* protein; C: Conserved domains of *SsSOC1* protein; D: Tertiary structure prediction of *SsSOC1* protein; E: Signal peptide prediction analysis of *SsSOC1* protein; F: Transmembrane region detection and subcellular localization analysis of *SsSOC1* protein.

图4 *SsSOC1* 蛋白的生物信息学分析

Fig. 4 Bioinformatics analysis of *SsSOC1* protein

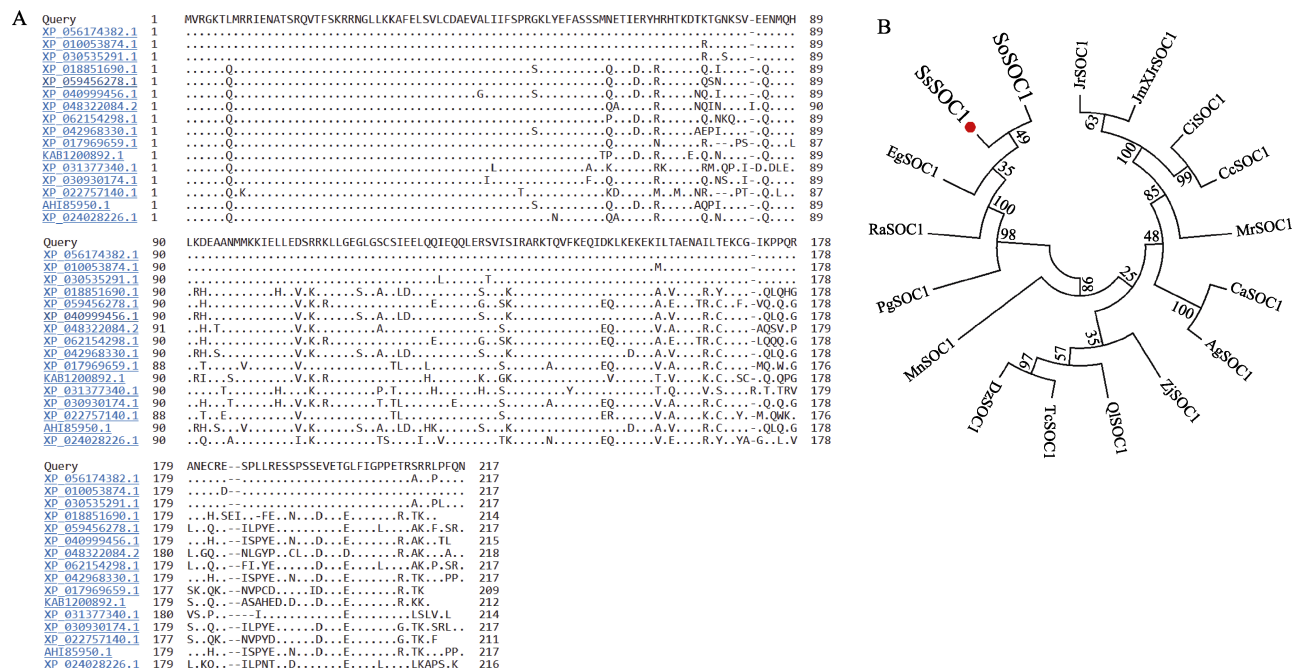


图5 *SsSOC1* 蛋白同源序列比对 (A) 及系统进化分析 (B)

Fig. 5 Alignment of homologous sequences (A) and phylogenetic analysis (B) of *SsSOC1* protein

SsSOC1 氨基酸序列与以上 16 个物种的 *SOC1* 氨基酸序列的系统进化树 (图 5B), 发现莲雾与油

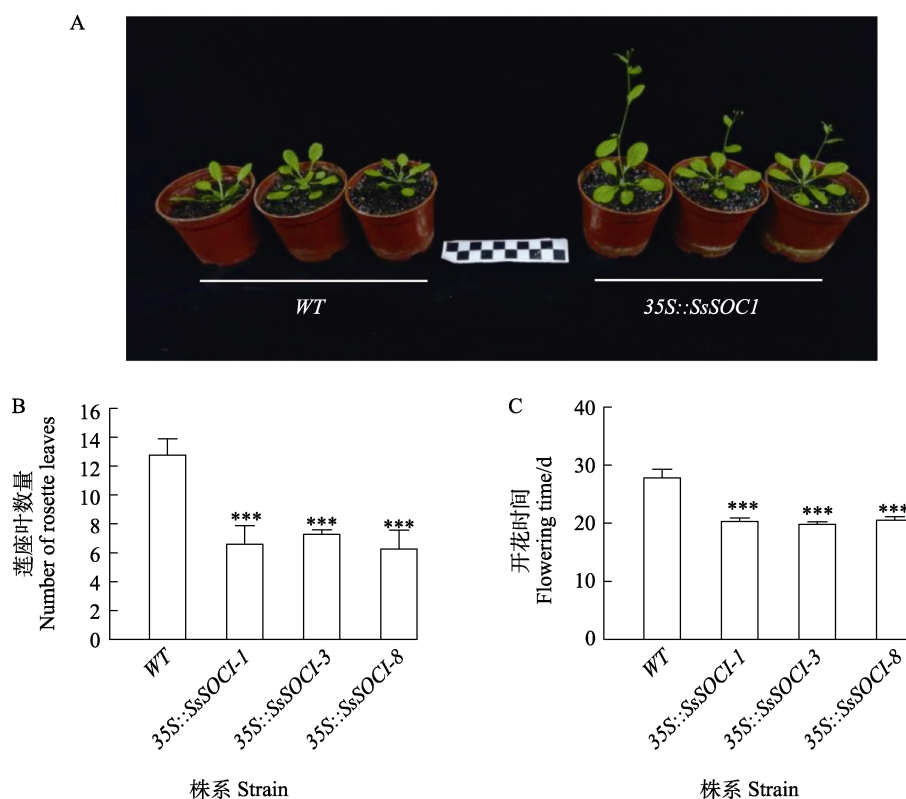
叶蒲桃聚于同一分支, 亲缘关系相比其他物种最近, 而与小果胡桃与核桃杂交种、胡桃的亲缘关

系则较远。

2.6 *SsSOC1* 基因的功能分析

为了验证莲雾 *SsSOC1* 基因的功能, 本研究构建过表达载体 *35S::SsSOC1*, 并将其转入哥伦比亚野生型拟南芥中, 通过喷施 Basta 和 PCR 鉴定筛选转基因植株, 观察转基因的开花相关表型, 并统计 T_1 和 T_2 代的开花时间和莲座叶数量。通

过观察转基因后代表型, 并与野生型拟南芥 (WT) 进行比较, 发现 *35S::SsSOC1* 株系营养生长期明显短于野生型植株, 并且其抽薹时间显著提前 (图 6A), 在抽薹开花时, 叶片数量与野生型相比明显减少 (图 6B), 成功转入 *SsSOC1* 基因的植株平均提早 8 d 开花 (图 6C)。结果表明成功转入 *SsSOC1* 基因能够使拟南芥的开花时间提前。



A: 表型观察; B: 莲座叶数量; C: 开花时间。

***表示处理和对照间在 $P \leq 0.001$ 水平上差异极显著, $n=20$ 。

A: Phenotypic observation; B: Number of rosette leaves; C: Flowering time. *** indicates extremely significant difference at the $P \leq 0.001$ level, $n=20$.

图 6 *SsSOC1* 基因的功能分析

Fig. 6 Functional analysis of the *SsSOC1* gene

3 讨论

遮荫对莲雾的开花时间已经有相关报道^[18]。目前, 大多数莲雾种植者使用遮荫技术结合化学调控来调节莲雾的开花, 然而这种调控机制的具体原理仍知之甚少。遮荫对植物的生长影响复杂, 不同植物受到的影响也各不相同。遮荫对红椿 (*Toona ciliata*)、香樟 (*Cinnamomum camphora*)^[19] 幼苗和拟单性木兰 (*Parakmeria yunnanensis*)^[20] 不利, 会显著抑制苗高和地径。然而, 对于移栽期的超级水稻, 遮荫后植株高度显著增加^[21]。此外, 遮荫也促进了油茶 (*Camellia oleifera*) 的营养生长^[22]。

本课题组前期已对 *SsSOC1* 基因和 *SsCOPI* 基因进行了基础的功能验证, 并初步探究了遮荫处理对莲雾光合特性的影响^[3]。本研究基于前期研究结果展开更为细致的探索, 重点分析 *SsSOC1* 的结构、特性以及其在莲雾中的具体作用。

SOC1 在对植物成花的过程发挥着重要的作用, 是花器官分生组织形成过程中的关键基因之一, 其能够整合外界以及内在因素等各种信号, 从而激活下游花器官发育相关基因^[23]。经过遮荫处理莲雾的叶片、花芽、叶尖以及叶柄中 *SsSOC1* 相对表达量都增加。其中, 叶尖在处理组中 *SsSOC1*

相对表达量最高, 叶柄中 *SsSOC1* 的相对表达量在处理组与对照组之间的差异最大。

SOC1 基因编码的转录因子, 是典型的 MIKC 蛋白^[24]。本研究克隆了莲雾的 *SOC1* 基因并命名为 *SsSOC1*, 利用 ProtParam、ProtScale 以及 Prabi 等在线工具对 *SsSOC1* 进行生物信息学分析发现, *SsSOC1* 中不存在 β -折叠, α -螺旋占比最高, 其属于不稳定亲水性蛋白质, 不含信号肽且无跨膜结构, 不属于分泌蛋白和膜结构蛋白, 定位于细胞核。保守结构域分析发现 *SsSOC1* 中存在 MADS_MEF2_like 和 K-Box 保守结构域。通过多重序列比对以及构建进化树发现 *SsSOC1* 蛋白与油叶蒲桃 *SOC1* 蛋白的同源性最高, 与其他植物的 *SOC1* 序列同源性均在 75% 以上, 表明 *SOC1* 序列在多数物种中具有着极大的保守性, 这对于今后分析莲雾中 K-box 基因家族具有重要的便利性, 可通过了解其他物种 K-box 基因家族中 *SOC1* 基因的功能机制, 推测莲雾 *SOC1* 基因的详细表达模式和作用机制。

据报道, 过表达 *SOC1* 基因可以促进植株提前开花, 而 *SOC1* 基因突变体则会导致植株开花延迟^[25]。本研究转入 *SsSOC1* 基因的植株开花时间早于野生型植株, 并且莲座叶数量显著少于野生型植株。这成功验证了 *SsSOC1* 基因的转入对提早开花表型的促进作用, 与预期效果一致。

果树的产量在一定程度上决定于当年开花的数量以及质量。莲雾是我国新兴果树品种, 经济效益较高, 但其开花数量及时间的不稳定极大地限制了其经济效益, 本研究能够为今后培育一年内多次开花、反季节开花并且高产、稳产的莲雾品种提供一定的指导, 同时本研究基于莲雾基因组学, 对莲雾中 *SOC1* 基因编码的蛋白特征、进化关系以及其在不同时期不同组织的表达差异进行分析, 初步鉴定了调控莲雾开花的主要基因之一的 *SsSOC1*, 并且对其进行了基因验证得出了较好的实验结果, 为深入揭示莲雾开花结实过程中 *SOC1* 基因的调控机制奠定基础。

参考文献

- [1] SHÜ Z H, MEON Z, TIRTAWINATA R, THANARUT C. Wax apple production in selected tropical asian countries[J]. Acta Horticulturae, 2008, 773: 161-164.
- [2] 郑加协, 周红玲, 张少平, 郑云云. 漳州莲雾产期调节技术研究[J]. 果树学报, 2016, 33(12): 1517-1522.
- [3] 蔡昕成. 遮阴对莲雾叶片光合特性的影响及 *SsSOC1* 和 *SsCOPI* 的功能验证[D]. 广州: 华南农业大学, 2021.
- [4] 杨军. 黑网遮阴调节莲雾产期技术介绍[J]. 台湾农业探索, 2004(2): 34-35.
- [5] 郑武生. 黑珍珠莲雾产期调节技术[J]. 福建果树, 2009(3): 77-78.
- [6] 刘代兴, 赵志平, 李国华. 印尼红莲雾产期调控试验[J]. 广东农业科学, 2007(2): 39-42.
- [7] 聂珂, 匡凤元, 张坤, 吴光斌, 陈发河. 莲雾果实采后木质素合成相关 MYB 基因家族及其作用分析[J]. 保鲜与加工, 2022, 22(1): 92-101, 109.
- [8] 魏秀清, 许玲, 章希娟, 余东, 陈志峰. 莲雾转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 园艺学报, 2018, 45(3): 541-551.
- [9] HELLIWELL C A, WOOD C C, ROBERTSON M, JAMES P W, DENNISAL E S. The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly *in vivo* with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex[J]. The Plant Journal, 2006, 46(2): 183-192.
- [10] WIGGE P A. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*[J]. Science, 2005, 309(5737): 1056-1059.
- [11] IMMINK R G H, POSÉ D, FERRARIO S, OTT F, KAUFMANN K, VALENTIM F L, DE F S, VANDER W F, ZHENG J X, ZHOU H L, ZHANG S P, ZHENG Y Y. A study on the techniques for producing off-season wax apples in Zhangzhou[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(12): 1517-1522. (in Chinese)
- [12] CAI X C. Effects of shading on photosynthetic characteristics of wax apple leaf and functional verification of *SsSOC1* and *SsCOPI*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [13] YANG J. Introduction of the technique of controlling the birth time of wax apple by shading with black net[J]. Taiwan Agricultural Research, 2004(2): 34-35. (in Chinese)
- [14] LIU D X, ZHAO Z P, LI G H. Off-season production and flower forcing techniques for Indo Red wax apple[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2007(2): 39-42. (in Chinese)
- [15] NIE K, KUANG F Y, ZHANG S, WU G B, CHEN F H. Lignin synthesis related MYB gene family and the function analysis of postharvest wax apple fruits[J]. Storage and Process, 2022, 22(1): 92-101, 109. (in Chinese)
- [16] WEI X Q, XU L, ZHANG X J, YU D, CHENG Z F. Analysis on SSR information in transcriptome and development of molecular markers in wax apple[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2018, 45(3): 541-551. (in Chinese)

- VAN D A D J, SCHMID M, ANGENENT G C. Characterization of *SOC1*'s central role in flowering by the identification of its upstream and downstream regulators[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(1): 433-449.
- [12] 齐联联, 宿强, 张珂. *SOC1* 调控植物开花时间的分子机制[J]. *草业科学*, 2022, 39(1): 149-160.
- QI L L, XU Q, ZHANG K. Molecular mechanism of flowering time regulate by *SOC1*[J]. *Pratacultural Science*, 2022, 39(1): 149-160. (in Chinese)
- [13] 曲雪亭, 刘龙飏, 张旻, 丁兵. 花期调控中 *SOC1* 基因探究进展[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(5): 1537-1547.
- QU X T, LIU L B, ZHANG Y, DING B. Research progress of *SOC1* gene in flowering regulation[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(5): 1537-1547. (in Chinese)
- [14] LEE J, LEE I. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator[J]. *Journal Citation Indicator*, 2010, 61(9): 2247-2254.
- [15] YOO S K, CHUNG K S, KIM J, LEE J H, HONG S M, YOO S J, YOO S Y, LEE J S, AHN J H. *CONSTANS* activates *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* through *FLOWERING LOCUS T* to promote flowering in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(2): 770-778.
- [16] GOCAL G F, SHELDON C C, GUBLER F, MORITZ T, BAGNALL D J, MACMILLAN C P, LI S F, PARISH R W, DENNIS E S, WEIGEL D, KING R W. *GAMYB-like* genes, flowering, and gibberellin signaling in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(4): 1682-1693.
- [17] ZHANG X R, HENRIQUES R, LIN S, LIN S S, NIU Q W, CAI N H. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(2): 641-646.
- [18] SUN D Y, CAI X C, HU C Z, ALI A, YANG Y Y, DU Y Q, WU G L, ZHOU B Y. Effects of shading on photosynthetic characteristics of wax apple leaves[J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2024, 52(1): 13367.
- [19] 梁俊林, 毛绘友, 郭丽, 付杨, 吴福忠, 张健, 刘洋. 遮阴对 3 种珍贵乡土阔叶树种幼苗生长及光合作用的影响[J]. *西北林学院学报*, 2019, 34(4): 57-63.
- LIANG J L, MAO H Y, GUO L, FU Y, WU G Z, ZHANG J, LIU Y. Influence of shading on the seedling growth of three precious native tree species and photosynthesis[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2019, 34(4): 57-63. (in Chinese)
- [20] 韦鹏飞, 严理, 秦武明, 陆海会, 钟源. 不同透光度下云南拟单性木兰生长及生理特性[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(17): 147-151.
- WEI P F, YAN L, QIN W M, LU H H, ZHONG Y. Growth and physiological characteristics of *Parakmeria yunnanensis* under different transmittance[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(17): 147-151. (in Chinese)
- [21] 杨东, 段留生, 谢华安, 黄庭旭. 不同生育期弱光对超级稻 II 优航 2 号产量及品质的影响[J]. *福建农业学报*, 2013, 28(2): 107-112.
- YANG D, DUAN L S, XIE H A, HUANG T X. Effect of light deficiency during different growth stages on grain yield and quality of super-hybrid rice, II youhang 2[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28(2): 107-112. (in Chinese)
- [22] 马锦林. 油茶耐弱光生理特性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2012.
- MA J L. Research on physiological properties of low-light tolerance in oil-tea *Camellia* plantation[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2012.
- [23] SHI Y Y, ZHANG S W, GUI Q L, QING H W, LI M, YI C X, GUO H Q, CHEN H B, XU J Z, DING F. The *SOC1* gene plays an important role in regulating litchi flowering time[J]. *Genomics*, 2024, 116(2): 110804.
- [24] KOU K, YANG H, LI H Y, FANG C, CHEN L Y, YUE L, NAN H Y, KONG L P, LI X M, WANG F, WANG J H, DU H P, YANG Z Y, BI Y D, LAI Y C, DONG L D, CHEN Q, SU T, WANG L S, LI S C, KONG F J. A functionally divergent *SOC1* homolog improves soybean yield and latitudinal adaptation[J]. *Current Biology*, 2022, 32(8): 1728-1742.
- [25] MOON J, SUH S S, LEE H, CHOI K R, LEE I. The *SOC1* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2003, 35(5): 613-623.