北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

无患子*SmCYCD3;2*基因的克隆与功能研究

高亚娇 赵国春 贾黎明 陈仲

Cloning and functional studies on *SmCYCD3;2* gene in *Sapindus mukorossi*

Gao Yajiao, Zhao Guochun, Jia Liming, Chen Zhong

引用本文:
高亚娇, 赵国春, 贾黎明, 陈仲. 无患子*SmCYCD3;2*基因的克隆与功能研究[J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(12):87–96. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250125
Gao Yajiao, Zhao Guochun, Jia Liming, Chen Zhong. Cloning and functional studies on *SmCYCD3;2* gene in *Sapindus mukorossi*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(12):87–96. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250125

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250125

您可能感兴趣的其他文章
Articles you may be interested in

紫花苜蓿*MsGOLS2*基因的克隆及功能鉴定
Cloning and functional identification of *MsGOLS2* gene in *Medicago sativa*
北京林业大学学报, 2025, 47(6): 111–122. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240433

毛白杨碱性/中性转化酶基因*PtoNIN1*的克隆与功能研究
Cloning and functional study of the alkaline/neutral invertase gene *PtoNIN1* in *Populus tomentosa*
北京林业大学学报, 2023, 45(5): 35–46. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20220171

花楸树热激蛋白*SpHSP70–3*基因克隆与功能分析
Cloning and functional analysis of heat shock protein *SpHSP70–3* gene from *Sorbus pohuashanensis*
北京林业大学学报, 2022, 44(9): 52–61. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210235

‘84K’杨组氨酸激酶基因*PaHK3a*的表达及功能分析
Expression and function analysis of histidine kinase gene *PaHK3a* of poplar ‘84K’
北京林业大学学报, 2021, 43(2): 46–53. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200070

山新杨谷胱甘肽S–转移酶编码基因*PdbGSTU*功能分析
Functional analysis of encoding gene *PdbGSTU* for glutathione S–transferase in *Populus davidiana* × *P. bolleana*
北京林业大学学报, 2024, 46(8): 68–78. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240020

山新杨*PdaGLK1*基因在盐胁迫响应中的功能研究
Functional study of *PdaGLK1* gene in salt stress response of *Populus davidiana* × *Populus alba* var. *pyramidalis*
北京林业大学学报, 2025, 47(7): 11–20. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20240440

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250125

无患子 *SmCYCD*3;2 基因的克隆与功能研究

高亚娇 赵国春 贾黎明 陈 仲
（北京林业大学林学院，林木资源高效生产全国重点实验室，国家能源非粮生物质原料研发中心，省部共建森林培育与保护教育部重点实验室，北京 100083）

摘要:【目的】探究无患子 *SmCYCD*3;2 基因在花性别分化过程中的作用，为提高无患子花雌雄比提供有价值的参考基因，进而为通过分子设计育种提高无患子果实产量奠定理论基础。**【方法】**克隆无患子 *SmCYCD*3;2 基因，对其进行多序列比对和系统发育进化分析，利用实时荧光定量 PCR（RT-qPCR）分析其在不同器官中的表达模式。构建过表达载体并异源转化拟南芥，对比观察其生长表型，并对其成熟花药进行亚历山大染色，采用花粉萌发法观测花粉活力和体外花粉萌发情况，借助扫描电镜观察花药及花粉的形态及表面特征。**【结果】**（1）*SmCYCD*3;2 基因序列全长为 1 092 bp，编码 364 个氨基酸，与毛果杨亲缘关系较近。（2）RT-qPCR 分析发现，*SmCYCD*3;2 基因在无患子雌花中表达量最高，叶片次之，雄花中表达量较低。（3）与野生型植株相比，转基因拟南芥表现出一系列显著的生长表型变化：生长速度减慢，株高明显降低，叶片出现卷曲现象，且每个茎节处略有弯曲。此外，其花器官表型也发生了显著变化，具体表现为雌蕊伸长，雄蕊数量减少且变短，花粉活性降低，果荚短小。（4）在转基因拟南芥植株中，细胞周期相关基因（*AtCYCDs*）和促进雌蕊伸长发育的基因（*AtCRC*）的表达水平显著上调，与雄蕊发育相关的基因（*AtAP*3、*AtPI*、*AtAMS* 和 *AtDEL*）以及与茎、叶发育相关的基因（*AtPIN*）的表达水平显著下调。**【结论】***SmCYCD*3;2 基因能够调控茎、叶发育，促进雌蕊伸长，抑制雄蕊发育，在无患子性别分化过程中发挥重要作用，研究结果为 *CYCD*3 基因的功能解析提供了新的见解，为提高无患子花雌雄比、提高果实产量奠定了前期理论基础。

关键词：无患子；细胞周期蛋白；性别分化；基因克隆；功能研究；基因表达
中图分类号：S792.99 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2025)12−0087−10
引文格式：高亚娇，赵国春，贾黎明，等. 无患子 *SmCYCD*3;2 基因的克隆与功能研究［J］. 北京林业大学学报，2025，47(12)：87−96. Gao Yajiao, Zhao Guochun, Jia Liming, et al. Cloning and functional studies on *SmCYCD*3;2 gene in *Sapindus mukorossi*［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(12): 87−96.

Cloning and functional studies on *SmCYCD*3;2 gene in *Sapindus mukorossi*

Gao Yajiao Zhao Guochun Jia Liming Chen Zhong
(School of Forestry, State Key Laboratory for Efficient Production of Forest Resources, Key Laboratory of Silviculture and Conservation of the Ministry of Education, National Energy R&D Center for Non-Food Biomass, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: ［**Objective**］To investigate the role of *Sapindus mukorossi SmCYCD*3;2 gene in flower sex differentiation, to provide valuable reference genes for improving the female-to-male ratio of *S. mukorossi* flowers, and then to lay a solid theoretical foundation for improving *S. mukorossi* fruit yields through molecular design breeding. ［**Method**］The *SmCYCD*3;2 gene of *S. mukorossi* was cloned, subjected to multiple sequence comparison and phylogenetic evolutionary analysis, and its expression pattern in different organs was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). We constructed

收稿日期: 2025−04−15 **修回日期:** 2025−06−04
基金项目: 福建省科技计划（2023N3005），国家自然科学基金项目（32371857），国家重点研发计划（2023YFD2201103）。
第一作者: 高亚娇。主要研究方向：用材林与能源林培育理论与技术。Email: gyj05122150@163.com 地址：100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学林学院。
责任作者: 陈仲，教授。主要研究方向：林木栽培生理及功能基因组学。Email: zhongchen@bjfu.edu.cn 地址：同上。
本刊网址: http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

overexpression vectors and heterologously transformed *Arabidopsis thaliana* to compare its growth phenotypes, stained its mature anthers with Alexandrium staining, observed pollen viability and in vitro pollen germination using the pollen germination assay, and observed the morphology and surface features of anthers and pollen with the aid of scanning electron microscopy. [**Result**] (1) The full length of *SmCYCD*3;2 gene sequence was 1 092 bp, encoding 364 amino acids, and it is closely related to *Populus trichocarpa*. (2) RT-qPCR analysis revealed that the expression of *SmCYCD*3;2 gene was highest in female flowers of *S. mukorossi*, followed by leaves, and the lower expression was found in male flowers. (3) Compared with wild-type plants, transgenic *A. thaliana* exhibited a series of significant growth phenotypic changes: growth rate was slowed down, plant height was significantly reduced, and leaves appeared curled and slightly bent at each stem node. In addition, the floral organs phenotype also underwent significant changes, which were characterized by elongated pistils, reduced and shorter stamens, reduced pollen activity, and ultimately shorter fruit pods. (4) In transgenic *A. thaliana* plants, the expression of cell cycle-related genes (*AtCYCDs*) and genes promoting gynoecium elongation and development (*AtCRC*) were significantly up-regulated, while the expression of genes related to stamen development (*AtAP*3, *AtPI*, *AtAMS*, and *AtDEL*) as well as genes related to stem and leaf development (*AtPIN*) were significantly down-regulated. [**Conclusion**] The *SmCYCD*3;2 gene is able to regulate the development of stem and leaf, promote pistil elongation and inhibit the stamen development, which plays an important role in sex differentiation. The results of the study provide new insights into the functional resolution of *CYCD*3 gene, and lay a pre-theoretical foundation for improving the female-to-male ratio of flowers and increasing fruit yield of *S. mukorossi*.

Key words: *Sapindus mukorossi*; cell cycle proteins; sex differentiation; gene cloning; functional studies; gene expression

植物的性别表现形式多样，在漫长的进化过程中，植物通过性别分化形成性别差异。高等植物的性别分化一般是指雌雄同株（monoecy）和雌雄异株（dioecy）植物雌花和雄花的分化。花作为植物繁殖后代的生殖器官，其性别分化影响着果实和种子的产量与品质[1]。植物性别分化受核心基因的精确调控[2]，近年来，已在多个物种中鉴定出一系列关键性别决定基因，其通过复杂网络调控植物性别发育进程。现有研究多集中于雌雄同株的草本植物，如黄瓜（*Cucumis sativus*）[3]、甜瓜（*Cucumis melo*）[4]等；而木本植物的性别分化研究相对匮乏，而且主要集中在形态学、激素调控、细胞水平等方面，缺乏较完整的性别决定模型。

细胞周期是细胞生命活动的基础，其通过精确调控细胞分裂与增殖，维持细胞数量平衡和器官正常发育。植物细胞由于细胞壁的存在，在组织和器官内无法移动，其分裂及增殖活动中的时空调控直接影响组织和器官的形态建成，而该过程与细胞周期密切相关。细胞分裂周期的有序进行离不开细胞周期蛋白（cyclin）的调控。目前，根据氨基酸序列的差异将细胞周期蛋白分为 A、B、C、D、H、L、T 等不同类型，其中 A、B、C、D 类已经在拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）[5]、玉米（*Zea mays*）[6]、苜蓿（*Medicago truncatula*）[7]、番茄（*Solanum lycopersicum*）[8]等物种中鉴定出来。D 型细胞周期蛋白（CYCD）可与周期蛋白依赖激酶（cyclin-dependent kinase，CDK）结合形成复合体，调控细胞分裂间期 G1/S 期的转换及有丝分裂的启动，进而影响细胞大小、数量以及器官的形成。目前 CYCD 可划分为 7 个亚类（D1 ~ D7）[9]，其中 D3 亚类的 *CYCD*3 是促进细胞周期 G1/S 转换的关键基因，深入研究其功能对揭示植物发育调控机制具有重要意义。

植物中 *CYCD*3 基因不仅可以影响植物茎、叶等营养器官的生长，也调控着花、果实、种子等生殖器官的发育。在拟南芥中过量表达 *AtCYCD*3;1 改变了其叶片形态和结构，叶表皮细胞数量增加，叶片向内轴卷曲，不能正常形成明显的海绵状和栅栏状叶肉层；叶片细胞过度分裂，表皮由大量小且未完全分化的多角形细胞组成，细胞分化受到抑制[10]。在水稻中过表达 *OsCYCD*3;1 促进了其分枝形成，推测其可能通过调节细胞分裂来维持腋生分生组织（axillary meristems，AMS）和茎顶端分生组织（shoot apical meristem，SAM）的活动[11]。在拟南芥的胚和胚乳中过表达 *CYCD*3;1 会引起细胞增殖异常，增加败育种子的比例[12]；而 *cycd*3;1 突变体花瓣细胞大小增加，细胞数量不变，导致器官变大[13]。此外，*CYCD*3 基

因的表达还可以影响拟南芥雌配子体的细胞分裂[14]以及雌蕊中、外侧组织的分化[15]。综上，*CYCD*3 在调节植物花器官形态以及花瓣、雌雄蕊和种子的发育过程中均发挥重要作用。然而，*CYCD*3 基因的研究大多集中于拟南芥、水稻等草本植物的生长发育过程中，其在木本植物中的功能研究较少，其是否在性别分化过程中发挥作用更是未见报道。

无患子是新兴的木本工业原料树种，其果实富含油脂和皂苷，具有很高的经济价值[16]，但在生产上还存在着果实产量低、质量差等问题。无患子属于雌雄同株异花植物，雌雄比约为 1∶10，雌花少，坐果率较低，提高雌雄比可以有效地提高果实产量，从而取得更高的经济效益[17]。因此，研究无患子花性别分化对提高无患子果实产量及其产业发展具有重要的理论和实践意义。课题组前期转录组数据表明 *SmCYCD*3;2 基因在无患子雌花苞和雌蕊中高表达，表现出明显的偏雌特性，推测其可能在无患子性别分化和花发育过程中发挥重要作用[18]。因此，本研究拟在无患子中克隆 *SmCYCD*3;2 基因，对其进行序列比对、系统发育和表达规律分析，并通过拟南芥异源过表达进一步探究该基因在性别分化中的功能。研究结果将为解析 *CYCD*3 基因在植物性别分化过程中的功能提供新的见解，为通过分子设计育种促进无患子高产优质奠定前期基础，并且将为其他木本植物性别分化调控机制的研究提供重要参考。

1　材料与方法

1.1　植物材料

本研究中无患子材料包括根、茎、叶片、雌花和雄花，均采自福建省三明市建宁县无患子国家级林木种质资源库（26°53′N，116°47′E）。选择树体生长状况相近、嫁接年份一致、健康、连年开花量较大且连年开花规律稳定的 9 株无性系进行样品采集，3 棵树混为一个生物学重复，共 3 个生物学重复。从 4 月初花序抽出后开始观察花发育动态（二级花序轴开始发育—花开放），前期每天采样 1 次，在开花前 10 d 每天采集 2 次，开花前 5 d 密集观察采样[19]。采集的样品经液氮速冻后，−80 ℃ 保存备用。拟南芥种子 Columbia（Col-0）为本实验室保存。

1.2　研究方法

1.2.1　总 RNA 提取以及反转录 cDNA

采用 RNA 提取试剂盒 Universal Plant Total RNA Isolation Kit RC411（南京诺维赞有限公司）提取无患子不同组织部位（根、茎、叶片、雌花和雄花）的总 RNA，使用 NanoDrop 8000（美国赛默飞世尔科技公司）检测样品浓度，TianScript II RT Kit（南京诺维赞有限公司）合成 cDNA。cDNA 保存于−20 ℃ 冰箱，用于后续基因克隆和荧光定量 PCR（RT-qPCR）实验。

1.2.2　基因克隆

使用在线网站 Primer3plus（https://www.primer3plus.com/）根据无患子 *SmCYCD*3;2（Samuk02G0146500）基因序列设计同源重组特异性引物，引物由睿博兴科生物技术（北京）有限公司合成。以 pCAMBIA1301 载体为骨架，以无患子雌花 cDNA 为模板，使用带有同源臂的 *SmCYCD*3;2 特异性引物（表 1）进行扩增。扩增完成后，使用琼脂糖凝胶电泳进行检测，随后使用凝胶回收试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）进行凝胶回收，并将回收产物委托睿博兴科生物技术（北京）有限公司进行测序。

1.2.3　序列比对和系统发育进化分析

下载拟南芥 CYCD 蛋白序列（https://www.uniprot.org/）作为参考，使用 Blast 将候选蛋白比对到拟南芥参考序列，分析保守结构域，筛选得到无患子 CYCD 家族成员。在 Phytozome v13（https://phytozome-next.jgi.doe.gov/）数据库下载水稻（*Oryza sativa*）、拟南芥、苜蓿、番茄和毛果杨（*Populus trichocarpa*）的 CYCD 蛋白质序列，利用 DNAMAN 对不同物种的 CYCD 蛋白进行多序列比对。利用 MEGA7.0 软件邻接法（neighbor joining，NJ）对不同物种的 CYCD 家族进行系统进化分析，设置参数 bootstrap 值为 1 000。

1.2.4　*SmCYCD*3;2 表达模式分析

以无患子根、茎、叶片、雌花和雄花为实验材料，基于本课题组 Zhao 等[18]对雌花和雄花发育 7 个关键时期（F1 ~ F7）的划分，以及 F4 时期后的雌花和雄花开始有明显差异的结果，雌、雄花分别选取 F4 时期的样品（FF4 和 MF4）来进行 *SmCYCD*3;2 表达模式的分析。提取各器官总 RNA，并反转录进行 RT-qPCR 实验。每个基因使用了 3 个生物重复和 3 个技术重复，以 *SmACTIN*（Samuk13G0061200）基因[20]为内参基因，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量，与前期转录组数据进行比较分析，使用 Student's *t*-text 进行显著性分析。RT-qPCR 所用引物见表 1。

1.2.5　载体构建和遗传转化

本试验采用同源重组法构建载体。利用酶切位点 *Nco*I 和 *Bst*EII 酶切 pCAMBIA1301 质粒后，使用无缝克隆试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司）连接过表达载体 CaMV 35S-pCAMBIA1301-SmCYCD3;2。通过热激法转入 DH5α 感受态，转到大肠杆菌感受态中，挑取单菌落进行菌落 PCR，并进行测序。测序完成后从序列正确的菌液中提取质粒，

表 1 引物序列

Tab. 1 Primers sequences

基因名称(ID号)	上游引物(5′—3′)	下游引物(5′—3′)	用途
*SmCYCD*3;2	AGAACACGGGGGACTCTTGACATGG CTCCACAGCAGCAAT	GGGGAAATTCGAGCTGGTCACCTAG CGAGGAATGGTGAGAAAAT	PCR
*SmCYCD*3;2	CGTGTCTCTCTCTTGCTGCA	CCATGAGTCGTTGGAGCTGT	RT-qPCR
*AtCYCD*1;1(AT1G70210)	TCCGTCGCATGGATTCTCAA	CACGAGAGCCCTGAGACTTG	
*AtCYCD*2;1(AT2G22490)	TCAACTATGGCGGCGGATTT	AGATCAGTGGTCACGTGTCG	
*AtCYCD*3;1(AT4G34160)	CTTCAGCTCGTTTC TGTCGC	TCAATCACGCAGCTTGGACT	
*AtCDKA*1(AT3G48750)	GGAATTGCGTATTGCCACTCTC	GATATTTGGTCTGTGGGGTGCA	
*AtKRP*1(AT2G23430)	AGCTGGAGTTTCGTCAACGTATA	TCTAATGGCTTCTCCTTCTCGA	
AtRBR(AT3G12280)	ACTTGCTCAGCGGACTTCTC	GGGCTCTGGTAAGCATGTGT	
*AtAP*3(AT3G54340)	AGCACATGAGCTCACGGTTT	AGCACGTGACCCTTCGATTT	
AtPI(AT5G20240)	ACGCAAACAACAGAGTGGTG	TTTGGCTGAATCGGTTGCAC	
AtAMS(AT2G16910)	TTGCAGCGACCAGATTGATG	GCAAAGGAGCTTCAAGACGA	
*AtDEL*1(AT3G48160)	ATCTCCCTTGATGACGCTGC	GGGTGACTTCGCTGAACCAT	
*AtPIN*1(AT1G73590)	AAACCACCACGCCGATTACT	CGGCATAAGAAGCAACGAGC	
AtCRC(AT1G69180)	AGAAACCAACCATGACGGCT	TGGATCATGTTGTGGCCTCC	
*AtEF*1α(AT1G07940)	CCAAGTACTCCAAGGCCAGG	GCCTCAAGGAGAGTTGGTCC	

最后将含有目的片段的过表达载体转入根癌农杆菌 GV3101 中。

采用浸花法转化野生型拟南芥，剪除最开始抽薹的花序。用重悬液浸泡未开放花芽 30 ~ 45 s，侵染后将植株置于暗环境中 24 h，提高转化效率。侵染 4 ~ 5 周之后，收获成熟的拟南芥种子。将种子消毒后置于含有潮霉素 B 抗性的 1/2 MS 固体培养基上筛选，生长 7 d 后，将长势与野生型拟南芥相似的幼苗移栽到营养土中，在人工气候室中进行生长培养。培养 7 ~ 10 d 后，取样拟南芥植株叶片，利用 RT-qPCR 检测目的基因的表达量，从而鉴定是否为阳性植株。

1.2.6 转基因拟南芥表型观察

在相同的环境条件下培养 *SmCYCD*3;2 转基因拟南芥与野生型拟南芥，观察对比植株高度、叶片、花器官(雌、雄蕊)形态以及果荚等表型。取 *SmCYCD*3;2 转基因拟南芥及野生型拟南芥的成熟花药进行亚历山大染色，采用花粉萌发法观测花粉活力及体外花粉萌发情况，利用扫描电镜观察花药及花粉的形态及表面特征，并拍照记录。

1.2.7 转基因拟南芥内源基因表达变化分析

取样转基因和野生型拟南芥花序，通过试剂盒提取总 RNA，反转录后利用 RT-qPCR 测定内源基因表达水平，具体包括细胞周期相关基因 *AtCYCD*1;1、*AtCYCD*2;1、*AtCYCD*3;1、*AtCDKA*1、*AtRBR* 和 *AtKRP*1，以及花器官发育相关的基因 *AtAP*3、*AtPI*、*AtAMS*、*AtDEL*、*AtPIN* 和 *AtCRC*，以拟南芥 *AtEF*1*a*(AT1G07940)基因作为内参[21]进行检测，使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因相对表达量，使用 Student's *t*-text 进行显著性分析。RT-qPCR 所用引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 基因克隆

将编号 Samuk02G0146500 基因的氨基酸序列与拟南芥进行同源比对，发现与拟南芥 CYCD3 同源性最高，因而将其命名为 SmCYCD3;2。PCR 扩增显示 *SmCYCD*3;2 基因 CDS 序列长度约为 1 000 bp 左右(图 1)，测序后确定基因长度为 1 092 bp，编码 364 个氨基酸。

2.2 序列比对和系统发育进化分析

将 SmCYCD3;2 与水稻、拟南芥、苜蓿、番茄和杨树 CYCD3 的氨基酸序列进行比对，发现序列的相似性很高，SmCYCD3;2 靠近 N 末端的氨基酸序列含有与 RBR(retinoblastoma-related protein)结合的

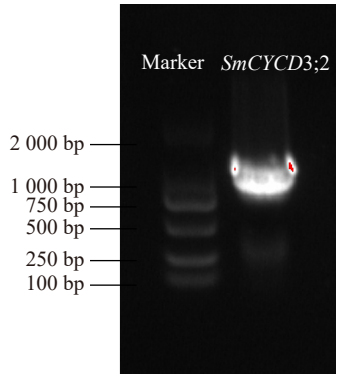


图 1 *SmCYCD*3;2 CDS 序列的克隆

Fig. 1 Cloning of *SmCYCD*3;2 CDS sequences

保守位点 LxCxE，同时包含 Cyclin_N 和 Cyclin_C 两个结构域，符合 CYCD 典型的序列结构特征（图 2）。

为进一步了解 CYCDs 与其他物种的进化关系，构建不同物种之间 CYCD 序列系统进化树，不同物种的 CYCD 蛋白分为 CYCD1、CYCD2/4、CYCD3、CYCD5、CYCD6 和 CYCD7 这 6 个亚类，SmCYCD3;2 属于 CYCD3 亚类；另外，无患子 SmCYCD3;2 与毛果杨 CYCD3 亲缘关系较近（图 3）。

2.3　基因表达模式分析

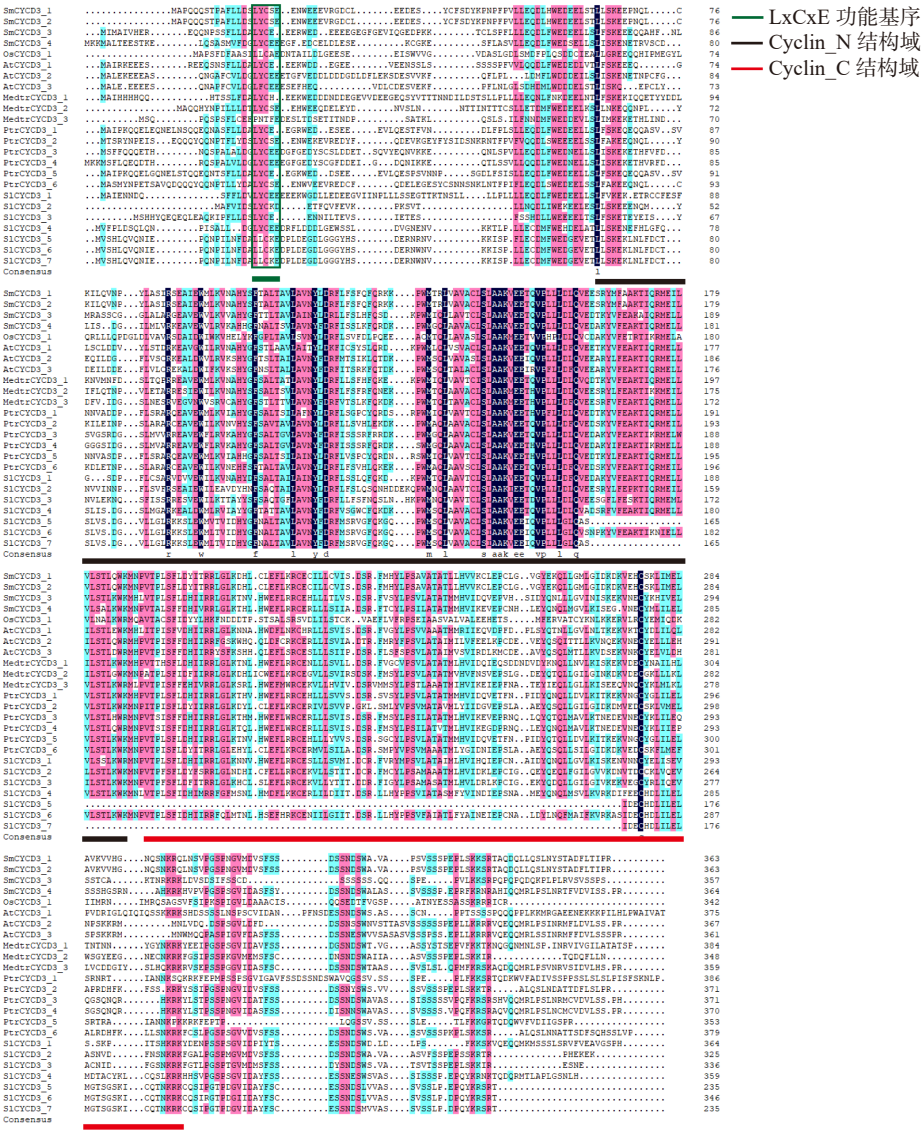
为了探究 *SmCYCD*3;2 在无患子生长和生殖发育过程中的功能，采用 RT-qPCR 方法检测了该基因在无患子根、茎、叶、雌花和雄花 5 个器官中的表达水平，结果（图 4）表明：*SmCYCD*3;2 在雌花中高表达，叶片次之，而在雄花中表达量明显低于雌花，表现出偏雌表达特性，与转录组数据一致。根据 *SmCYCD*3;2 在雌雄花中的表达量差异，推测其可能在无患子性别分化过程中发挥重要作用。

2.4　拟南芥遗传转化与鉴定

构建过表达载体（图 5A），采用农杆菌介导的浸花法侵染拟南芥，利用潮霉素筛选阳性植株，得到 12 个 *SmCYCD*3;2 转基因拟南芥 T3 株系（图 5B）。从中随机选择 3 个株系（L5、L8、L12），提取花序 RNA 进行 RT-qPCR，发现外源 *SmCYCD*3;2 的表达水平显著高于野生型拟南芥（图 5C）。

2.5　过表达 *SmCYCD*3;2 拟南芥表型分析

通过对转基因植株进行表型观察，发现与野生型植株相比，转基因株系的表型均发生了明显变化，具体表现为生长减慢、株高降低、茎生叶片大且卷曲、茎节处弯曲（图 6A，B）。除此之外，8 个转基因株系出现果荚异常的情况，进一步显微镜观察发现，花的



Sm. 无患子 *Sapindus mukorossi*；Os. 水稻 *Oryza sativa*；At. 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*；
Ptr. 毛果杨 *Populus trichocarpa*；Sl. 番茄 *Solanum lycopericum*；Medtr. 苜蓿 *Medicago truncatula*

图 2　不同物种 CYCD3 蛋白多序列比对

Fig. 2　Multiple sequence alignment of the CYCD3 protein in different species

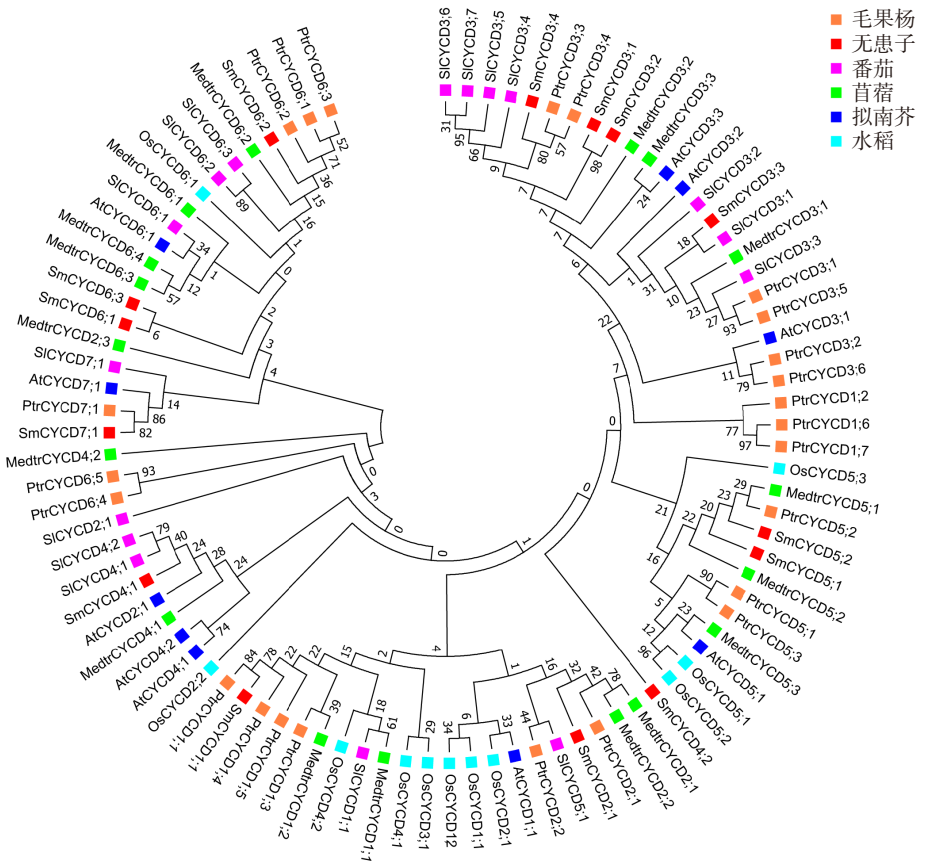
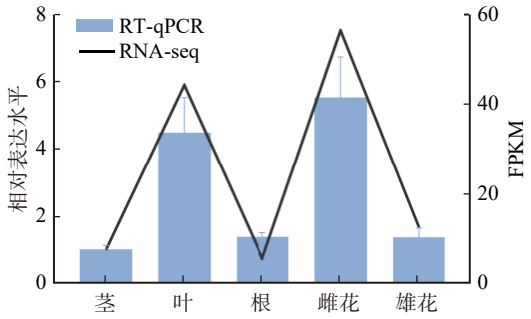


图 3 不同物种 CYCD 的系统发育进化分析

Fig. 3 Phylogenetic evolutionary analysis of different species of CYCD



FPKM 表示 *SmCYCD*3;2 在转录组测序中得到的相对表达量。

图 4 *SmCYCD*3;2 基因在无患子不同器官中的表达量

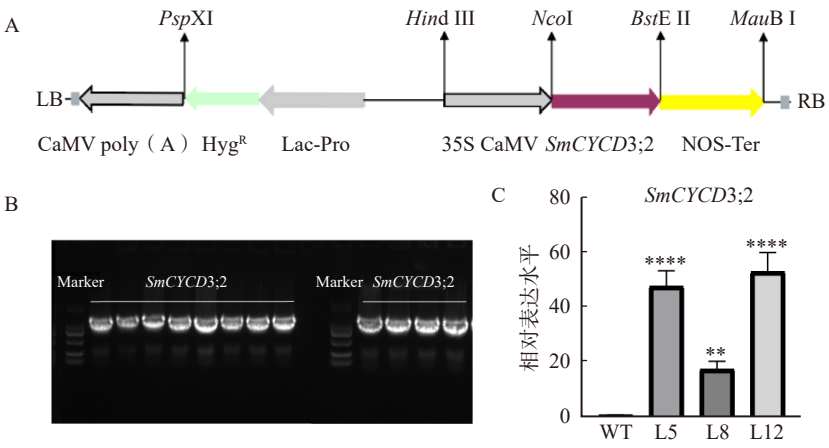
Fig. 4 Expression of *SmCYCD*3;2 gene in different organs of *Sapindus mukorossi*

形态出现异常变化，具体表现为部分花的雄蕊短小、花药内花粉少甚至不开裂，花柱明显伸长，柱头上没有花粉造成授粉失败；部分能正常授粉的花的雄蕊数量减少，出现 5 个雄蕊(图 6C)。对形态上正常的花药和花粉进一步检测花粉萌发活力发现：与野生型拟南芥花粉相比，*SmCYCD*3;2 转基因拟南芥花粉管的萌发短且量少；亚历山大染色显示野生型拟南芥花粉被染成红色，而转基因植株花粉多数染色为绿色，表示花粉无活力(图 6D)。为进一步揭示花粉活力低的原因，通过扫描电镜发现，与野生型相比，转基因拟南芥花粉皱缩扁小(图 6D)，这可能是造成授粉失败、结实率下降的原因。根据其形态变化分为两个类型：Type 1 型(花柱伸长、授粉困难)和 Type 2 型(花药未开裂或花粉少，活力降低)，这些异常花形态最终表现为果荚短小，种子数量变少(图 6D)。

2.6 *SmCYCD*3;2 过表达拟南芥内源相关基因的表达变化

随机选取过表达 *SmCYCD*3;2 基因的 3 个拟南芥株系(L5、L8、L12)，进行 RT-qPCR 测定。结果显示：与野生型相比，转基因拟南芥株系内源细胞周期相关基因 *AtCYCD*1;1、*AtCYCD*2;1 和 *AtCYCD*3;1，调节亚基 *AtCDKA1* 基因的表达水平显著上调；*AtRBR* 基因以及负调控因子 *AtKRP*1 基因的表达量显著下调(图 7)。这表明过表达 *SmCYCD*3;2 基因影响了拟南芥植株细胞周期调控蛋白相关基因的表达水平。

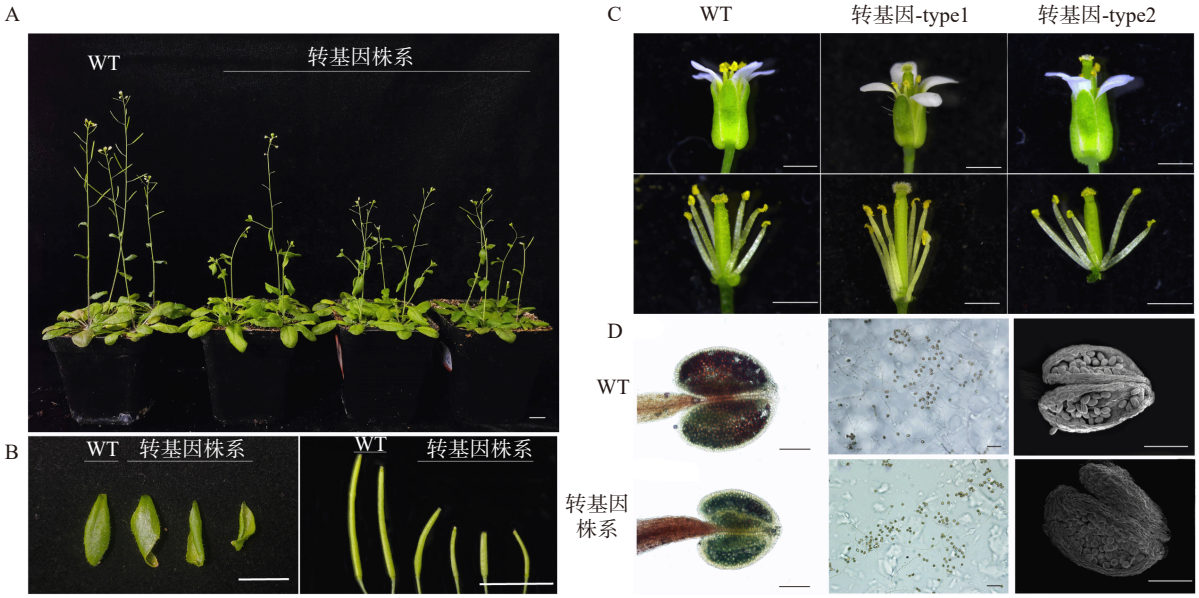
为了进一步探讨转基因拟南芥植株花器官表型变化的内在机制，选取了几个与拟南芥花器官发育相关的基因，测定其表达量变化。结果发现：过表达 *SmCYCD*3;2 基因拟南芥中，与雄蕊及花粉发育相关的基因 *AtAP*3、*AtPI*、*AtAMS* 和 *AtDEL* 基因都显著下调；而促进雌蕊伸长发育的基因 *AtCRC* 显著上调(图 7)。推测 *AtCRC* 的高表达促进了雌蕊的发育，而 *AtAP*3、*AtPI*、*AtAMS* 和 *AtDEL* 基因的低表达导致了雄蕊和花粉的形态异常。同时，根据叶片和茎段的表型变



表示与 WT 相比在 0.01 水平上差异显著，**表示与 WT 相比在 0.000 1 水平上差异显著。下同。

图 5　载体结构示意图（A）及转基因株系鉴定（B～C）

Fig. 5　Schematic diagram of carrier structure (A) and RT-qPCR assay of positive seedlings (B - C)



A. 野生型和 *SmCYCD*3;2 过表达拟南芥整体表型；B. 叶片和果荚表型；C. 花外部和雌雄蕊表型；D. 花药亚历山大染色、花粉萌发以及花药扫描电镜。图 A 和 B 中比例尺为 1 cm；图 C 中比例尺为 500 μm；图 D 中比例尺为 100 μm。

图 6　*SmCYCD*3;2 转基因拟南芥植株表型

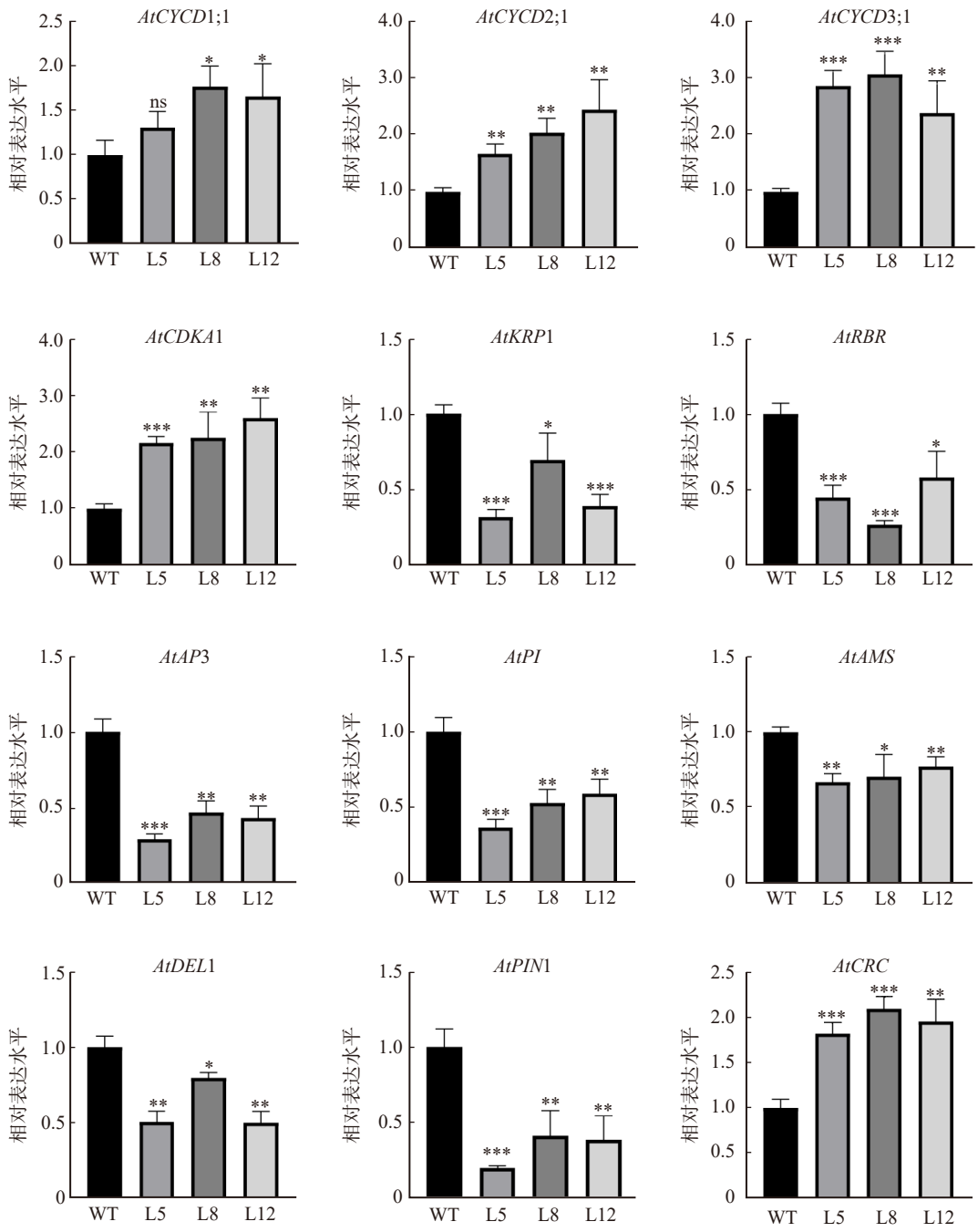
Fig. 6　*SmCYCD*3;2 transgenic *Arabidopsis thaliana* plant phenotypes

化，发现与茎、叶发育相关基因 *AtPIN* 也有下调。

3　讨　　论

植物的生长发育受内外信号的调控，细胞周期蛋白作为重要的体内调控因素，发挥着举足轻重的作用。细胞周期蛋白基因，尤其是 *CYCDs*，在调控细胞大小、数量以及器官的形态建成等方面具有非常重要的功能。而植物花作为繁殖后代的生殖器官，其性别分化直接影响着繁殖效率与遗传特性，这一生物学过程不仅可决定作物的产量潜力和品质特征，还对杂交育种等种子生产技术具有关键调控作用[15]。无患子是新兴的木本工业原料树种，具有很高的经济价值，但其雌花少，坐果率较低，在生产上存在着果实产量低、质量差等问题，鉴定其性别分化基因并探究其作用机制对提高雌雄比，提高果实产量具有重要作用。课题组前期已发现无患子 *CYCDs* 相关基因 *SmCYCD*3;2 在雌花苞和雌蕊中高表达，表现出明显的偏雌特性[18]，推测该基因可能在无患子性别分化过程中发挥作用。本研究中，过表达 *SmCYCD*3;2 的拟南芥出现雌蕊伸长、雄蕊发育异常等表型，这是 *SmCYCD*3;2 在性别分化中发挥功能的直接证据。

从分子机制看，在 *SmCYCD*3;2 过表达植株中，*AtCDKA*1、*AtCYCD*1;1、*AtCYCD*2;1 和 *AtCYCD*3;1 细胞周期相关基因都有不同程度的上调，同时 *AtRBR* 和 *CDK* 的抑制基因 *AtKRP*1 的表达量也显著下调，推测过表达植株中叶片变大卷曲、茎干弯曲的表型可能是源于 *KRP*1 的下调激活并导致了 CYCD/CDK 复合体转录活性的升高，促进 RBR 从 RBR/E2F/DP



*表示与 WT 相比在 0.05 水平上差异显著，***表示与 WT 相比在 0.001 水平上差异显著。

图 7 *SmCYCD*3;2 转基因拟南芥内源相关基因表达量变化

Fig. 7 Expression of endogenous related genes in *SmCYCD*3;2 transgenic *A. thaliana*

复合体中解离，进而抑制了细胞增殖，这与拟南芥 *AtCYCD*3;1 过表达植株叶片向内轴卷曲[10]，杨树 *PtoCYCD*3;3 的过表达植株叶片变大、起皱、茎变粗[22]，以及烟草 *RBR*1 突变体叶片下卷、生长延迟[23]的表型相一致，表明转基因植株的形态变化可能是由于细胞周期相关基因表达模式的改变造成的。拟南芥中 *pin* 突变体主要表现为叶形改变，花原基发育异常，顶端优势丧失，植株发育缓慢[24]，本研究中转基因拟南芥 *AtPIN* 基因的表达量显著降低，这说明可能是由于 *PIN* 基因的表达量降低导致其顶端优势丧失，进而使转基因植株的高度降低。

花发育相关基因的表达量的变化会导致植株表型的显著变化。拟南芥中 *AP*3[25]和 *PI*[26]的功能缺失导致萼片取代花瓣，心皮取代雄蕊。*PIN* 是雄蕊发育所必需的，*pin* 突变体导致胚胎和花器官发育异常[27−28]。*CRC* 基因是拟南芥心皮发育的调节因子之一，*crc*-1 突变体表现短而宽的雌蕊群，两个心皮在顶端不融合，且缺乏蜜腺[29]。敲除或者过表达 *AMS* 均导致拟南芥花粉异常活力降低[30]。在水稻中 *del* 突变体表现出籽粒长宽、结实率降显著低，说明

DEL 的正常表达对籽粒的正常发育至关重要[31]。本研究过表达 *SmCYCD*3;2 植株中，雄蕊发育核心基因 *AtAP*3、*AtPI* 表达量的降低，导致雄蕊发育异常；雄蕊发育必需基因 *AtPIN* 表达量的下调，进一步削弱了雄蕊功能；花粉活力调控基因 *AtAMS* 表达量的降低，直接导致了花粉活性下降；心皮发育关键因子 *AtCRC* 表达量的显著升高，直接驱动了雌蕊伸长；*AtDEL*1 的下调也进一步解释了转基因植株果荚异常以及结实率降低的表型变化。因此，猜测可能是由于 *SmCYCD*3;2 调控了拟南芥中一些调控花发育的基因表达量变化，导致拟南芥花器官形态异常变化，表现出雌蕊伸长、雄蕊数量和花粉活力降低的促雌抑雄趋势。另外，杨树的 *PoptrCYCD*1;1 在烟草中的过表达导致转基因株系的生殖器官形态也发生变化，花大而且颜色浅，果实难成熟，种子发育有缺陷[32]；也出现了瓣变大、花柱变长和子房变大的显著表型变化[33]。这说明，*CYCD* 基因在木本植物中的功能可能具有一定的保守性。

本研究中 *SmCYCD*3;2 基因异源过表达所导致拟南芥的表型变化以及相关内源基因的表达变化已明晰，但是具体的调控机制还不明确。已有研究[34]表明 *SPL* 基因家族在植物花发育中有着重要作用，包括营养生长到生殖生长的转换过程，雄性不育，赤霉素合成，以及花形态发生。拟南芥中 *SPL*9 可以通过富集的 GTAC 基序与 *CYCD*3 启动子结合[35]，*SPL*8 可影响雄蕊花丝伸长过程[36]，这与我们本实验 *SmCYCD*3;2 转基因植株雄蕊花丝变短的表型相似。因此我们推测无患子中的 *SPL* 基因家族某些成员可能与 *SmCYCD*3;2 之间存在着相互作用，共同调控雌雄蕊形态和植株育性。本研究发现 *SmCYCD*3;2 影响了拟南芥中细胞周期相关基因的变化，并可能通过上调 *AtCRC*，下调 *AtAP*3、*AtPI*、*AtPIN* 和 *AtAMS* 的表达水平，正向调控花器官促雌抑雄的发育趋势，研究结果丰富了 *CYCD*3 在调控无患子性别分化中的新功能以及分子调控机理，为提高无患子花雌雄比提供了有价值的参考基因，进而为通过分子设计育种提高无患子果实产量奠定了坚实的理论基础，但是具体的调控机制还需要在本体中进一步探究和完善。未来可深化 *SmCYCD*3;2 与 *SPL* 基因家族的互作机制，解析其在无患子性别分化中的协同调控机制，验证 *SmCYCD*3;2 在无患子本体中的功能，解析其调控网络的物种特异性与保守性。

4　结　　论

本研究针对无患子性别分化调控机制不明、雌雄花比例难以精准调控等关键科学问题，通过基因克隆、表达分析及功能验证，对无患子 *SmCYCD*3;2 基因开展了系统分析，旨在揭示其功能及对性别分化的调控作用。研究得到以下结论。

（1）*SmCYCD*3;2 基因编码区全长 1 092 bp，编码 364 个氨基酸，具有典型 CYCD 结构域，且在雌花中表达量明显高于其他器官。

（2）在拟南芥中过表达 *SmCYCD*3;2 可导致雌蕊伸长，雄蕊数量减少且变短，花粉活性降低，果荚变短小等表型。

（3）*SmCYCD*3;2 过表达显著上调了细胞周期相关基因及雌蕊伸长基因的表达，同时下调了雄蕊和花粉发育相关基因，证实 *SmCYCD*3;2 具有促雌抑雄功能。

研究结果将为无患子性别分化调控机制解析，雌雄花比例精准调控及高产原料林培育提供理论支撑，未来可结合基因编辑技术进一步验证 *SmCYCD*3;2 功能，进而应用于无患子分子育种实践。

参　考　文　献

[1] 王忠. 植物生理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
Wang Z. Plant physiology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000.

[2] 胡青, 高述民, 李凤兰. 植物雌性不育的研究进展 [J]. 北京林业大学学报, 2004, 26(1): 87−91.
Hu Q, Gao S M, Li F L. Advances of research on plant female sterility[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2004, 26(1): 87−91.

[3] 周赟, 陈宸, 刘晓虹, 等. 黄瓜性别决定研究进展 [J]. 植物生理学报, 2019, 55(7): 902−914.
Zhou G, Chen C, Liu X H, et al. Research progress of sex determination in cucumber[J]. Plant Physiology Journal, 2019, 55(7): 902−914.

[4] 龚浩, 罗剑宁, 罗少波, 等. 黄瓜与甜瓜的性别决定分子机制研究进展 [J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 382−388.
Geng H, Luo J N, Luo S B, et al. Progress of study on the molecular mechanism of sex-determination in melon and cucumber[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(2): 382−388.

[5] Wang G, Kong H, Sun Y, et al. Genome-wide analysis of the cyclin family in arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins[J]. Plant Physiology, 2004, 135(2): 1084−1099.

[6] Hu X, Cheng X, Jiang H, et al. Genome-wide analysis of cyclins in maize (*Zea mays*)[J]. Genetics and Molecular Research: GMR, 2010, 9(3): 1490−1503.

[7] Meng J, Peng M D, Yang J, et al. Genome-wide analysis of the cyclin gene family and their expression profile in *Medicago truncatula*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(24): 9430.

[8] Zhang T, Wang X, Lu Y, et al. Genome-wide analysis of the cyclin gene family in tomato[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 15(1): 120−140.

[9] Vandepoele K, Raes J, de Veylder L, et al. Genome-wide analysis of core cell cycle genes in arabidopsis[J]. Plant Cell, 2002, 14(4):

903−916.

[10] Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, et al. Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in arabidopsis caused by the D-Type cyclin CYCD3[J]. Plant Cell, 2003, 15(1): 79−92.

[11] Ohyama A, Tominaga R, Toriba T, et al. D-type cyclin *OsCYCD*3;1 is involved in the maintenance of meristem activity to regulate branch formation in rice[J]. Journal of Plant Physiology, 2022, 270: 153634.

[12] Collins C, Dewitte W, Murray J A H. D-type cyclins control cell division and developmental rate during arabidopsis seed development[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(10): 3571−3586.

[13] Randall R S, Sornay E, Dewitte W, et al. *AINTEGUMENTA* and the D-type cyclin *CYCD*3;1 independently contribute to petal size control in arabidopsis: evidence for organ size compensation being an emergent rather than a determined property[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(13): 3991−4000.

[14] Zhang J H, Pai Q F, Yue L, et al. Cytokinin regulates female gametophyte development by cell cycle modulation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Science, 2022, 324: 111419.

[15] Cerbantez-Bueno V E, Serwatowska J, Rodríguez-Ramos C, et al. The role of D3-type cyclins is related to cytokinin and the bHLH transcription factor *SPATULA* in arabidopsis gynoecium development[J]. Planta, 2024, 260: 48.

[16] 孙操稳, 贾黎明, 叶红莲, 等. 无患子果实经济性状地理变异评价及与脂肪酸成分相关性 [J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(12): 73−83.
Sun C W, Jia L M, Ye H L, et al. Geographic variation evaluating and correlation with fatty acid composition of economic characters of *Sapindus* spp. fruits[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2016, 38(12): 73−83.

[17] 高媛, 贾黎明, 苏淑钗, 等. 无患子物候及开花结果特性 [J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(6): 34−40,123.
Gao Y, Jia L M, Su S C, et al. Climatic and flowering and fruiting characteristics of *Sapindus mukorossi*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2015, 43(6): 34−40,123.

[18] 赵国春. 无患子花发育及性别分化机理研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2024.
Zhao G C. Study on the mechanism of flower development and sex differentiation in *Sapindus mukorossi*[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2024.

[19] Zhao G C, Gao Y H, Gao S L, et al. The phenological growth stages of *Sapindus mukorossi* according to BBCH scale[J]. Forests, 2019, 10(6): 1−14.

[20] 徐圆圆, 赵国春, 郝颖颖, 等. 无患子 RT-qPCR 内参基因的筛选与验 [J]. 生物技术通报, 2022, 38(10): 80−89.
Xu Y Y, Zhao G C, Hao Y Y, et al. Reference genes selection and validation for RT-qPCR in *Sapindus mukorossi*[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(10): 80−89.

[21] Czechowski T, Stitt M, Altmann T, et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in arabidopsis[J]. Genome Analysis, 2005, 139: 5−17.

[22] Guan C N, Xue Y, Jiang P F, et al. Overexpression of *PtoCYCD*3;3 promotes growth and causes leaf wrinkle and branch appearance in *Populus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(3): 1288.

[23] Desvoyes B, Ramirez-Parra E, Xie Q, et al. Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during arabidopsis leaf development[J]. Plant Physiology, 2006, 140: 67−80.

[24] Adamowski M, Friml J. PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution[J]. Plant Cell, 2015, 27: 20−32.

[25] Jack T, Brockman L L, Meyerowitz E M. The homeotic gene *APETALA*3 of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens[J]. Cell, 1992, 68: 683−697.

[26] Goto K, Meyerowitz E M. Function and regulation of the arabidopsis floral homeotic gene *PISTILLATA*[J]. Genes & Development, 1994, 8: 1548−1560.

[27] Okada K, Ueda J, Komaki M K, et al. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of arabidopsis floral bud formation[J]. Plant Cell, 1991, 3: 677−684.

[28] Bender R L, Fekete M L, Klinkenberg P M, et al. *PIN*6 is required for nectary auxin response and short stamen development[J]. Plant Journal, 2013, 74(6): 893−904.

[29] Bowman J L, Smyth D R. *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains[J]. Development, 1999, 126(11): 2387−2396.

[30] Xu J, Ding Z, Vizcay-Barrena G, et al. *ABORTED MICROSPORES* acts as a master regulator of pollen wall formation in arabidopsis[J]. Plant Cell, 2014, 26(4): 1544−1556.

[31] You J, Chen W B, He Z F, et al. *DEGENERATED LEMMA* (*DEL*) regulates lemma development and affects rice grain yield[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2023, 29(3): 335−347.

[32] 娄玲玲. 杨树 D1 亚类周期蛋白基因 *Poptr;CYCD*1;1 的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
Lou L L. Characterization of expression of D1-type cyclin gene *Poptr; CYCD*1;1 from poplar[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2013.

[33] 代丽娟. 小黑杨 *Poptr;CYCD*1;1 与拟南芥 *CYCD*1;1、*CYCD*2;1、*CYCD*3;1 基因在烟草中的遗传转化 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2017.
Dai L J. The expression of *Poptr; CYCD*1;1 from poplar and *CYCD*1;1, *CYCD*2;1, *CYCD*3;1 from *Arabidopsis thaliana* in *Nicotiana tabacum*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2017.

[34] 张磊. SPL 转录因子研究进展 [J]. 农业与技术, 2022, 42(8): 25−27.
Zhang L. Research progress on SPL transcription factors[J]. Agriculture & Technology, 2022, 42(8): 25−27.

[35] Li X M, Jenke H, Strauss S, et al. Cell-cycle-linked growth reprogramming encodes developmental time into leaf morphogenesis[J]. Current Biology, 2024, 34(3): 541−556.

[36] Xing S, Slinas M, Garcia-Molina A, et al. *SPL*8 and miR156-targeted *SPL* genes redundantly regulate arabidopsis gynoecium differential patterning[J]. Plant Journal, 2013, 75(4): 566−577.

（责任编辑 赵田芸
责任编委 张建国）