



王少坤, 李静如, 刘晨, 义鸣放, 吴健. 唐菖蒲蛋白磷酸酶 *GhPP2C1* 基因功能及其对 ABA 的响应[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(03): 113-124.
WANG Shaokun, LI Jingru, LIU Chen, YI Mingfang, WU Jian. The function of Protein phosphatase gene *GhPP2C1* in *Gladiolus* and the response of ABA[J].
Journal of China Agricultural University, 2024, 29(03): 113-124.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.03.10

唐菖蒲蛋白磷酸酶 *GhPP2C1* 基因功能及其对 ABA 的响应

王少坤 李静如 刘晨 义鸣放 吴健*

(中国农业大学园艺学院/花卉发育与品质调控北京市重点实验室, 北京 100193)

摘要 为探究唐菖蒲 *GhPP2C1* (Protein phosphatase 2C1) 的功能及对脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 的响应, 以唐菖蒲 'Rose Supreme' 为试材, 利用同源克隆的方法获得 ABA 信号转导过程中的关键蛋白磷酸酶基因 *GhPP2C1*, 利用实时荧光定量分析、亚细胞定位和启动子 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 染色等方法检测其对 ABA 的响应情况; 对其启动子序列进行响应元件分析; 在拟南芥中异源过表达 *GhPP2C1* 基因, 对转基因株系进行 ABA 敏感性测定、株型分析及下游基因表达情况分析。结果表明: 1) *GhPP2C1* 的表达在 ABA 处理的诱导下显著上调。2) *GhPP2C1* 定位于细胞质中, 可被 ABA 处理诱导入核。3) *GhPP2C1* 基因启动子包含 ABA、赤霉素 (Gibberellins, GAs)、干旱和低温相关响应元件。在烟草叶片和拟南芥根尖中, *GhPP2C1* 启动子活性可被 ABA 激活。4) 在拟南芥中异源过表达 *GhPP2C1* 基因导致 ABA 信号通路中下游基因的表达量显著下降并出现分枝数、株高和种荚数量明显增加的表型。综上, 推测唐菖蒲 *GhPP2C1* 可能通过减弱 ABA 信号传导, 促进种子休眠解除, 且在植株营养生长过程中也发挥作用。

关键词 唐菖蒲; *GhPP2C1*; 脱落酸; 异源转化拟南芥

中图分类号 S682.2+4

文章编号 1007-4333(2024)03-0113-12

文献标志码 A

The function of Protein phosphatase gene *GhPP2C1* in *Gladiolus* and the response of ABA

WANG Shaokun, LI Jingru, LIU Chen, YI Mingfang, WU Jian*

(College of Horticulture/Beijing Key Laboratory of Development and Quality Control of Ornamental Crops, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract In order to explore the function of *GhPP2C1* (Protein phosphatase 2C1) in *Gladiolus* and its response to abscisic acid (ABA), the key protein phosphatase gene *GhPP2C1* in ABA signal transduction was obtained using homologous cloning method using *Gladiolus* ('Rose Supreme') as the sample. RT-qPCR, subcellular localization and promoter GUS staining were performed to detect its response to ABA. The response element of the promoter sequence was analyzed. *GhPP2C1* gene was overexpressed in *Arabidopsis*, the transgenic lines were tested for ABA sensitivity, and downstream genes expression and phenotype were analyzed. The results were as follows: 1) The expression of *GhPP2C1* was significantly upregulated by ABA treatment. 2) *GhPP2C1* was localized in the cytoplasm and could be induced into the nucleus under induction of ABA treatment. 3) The *GhPP2C1* promoter fragment contained some responsive elements, such as ABA, gibberellins (GAs), dehydration and cold. The *GhPP2C1* promoter activity was activated by ABA in *N. benthamiana* leaves and *Arabidopsis* roots. 4) In *Arabidopsis*, heterologous overexpression of *GhPP2C1* resulted in a significant decrease in the expression of downstream genes in

收稿日期: 2023-08-11

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(31701952)

第一作者: 王少坤 (ORCID: 0009-0002-1685-1945), 硕士研究生, E-mail: wangshaokun@cau.edu.cn

通讯作者: 吴健 (ORCID: 0000-0001-8582-302X), 教授, 主要从事球根花卉的繁育和休眠解除基础研究, E-mail: jianwu@cau.edu.cn

ABA signaling pathway and a significant increase in branch number, plant height and seed pod number. In conclusion, *GhPP2C1* might promote seed dormancy release by participating in reducing ABA signal transduction, and might also play a role in plant vegetative growth.

Keywords *Gladiolus*; *GhPP2C1*; abscisic acid; heterologous transformation of *Arabidopsis*

休眠是植物在进化过程中形成的抵御不良外界环境的一种生存策略,也是选育园艺作物的关键性状。植物休眠得不到充分解除,直接影响后期的生长发育等过程,导致花芽无法正常分化、出现盲花、花期延迟和花葶无法伸长等问题,严重损害园艺作物的产量和经济价值^[1]。常见的休眠器官(组织)包括种子、茎尖和芽等^[2]。

唐菖蒲(*Gladiolus hybridus*)为鸢尾科唐菖蒲属球根植物,是世界六大切花之一^[1]。球茎是其唯一商品化繁殖材料,在国内有2种植模式:在凌源等北方地区,露地春季种植,夏季开花,用于自然花期切花生产;在福建和广州等南方地区,秋季温室种植,春节及情人节前后收获,用于反季节切花生产。但球茎具有休眠的特性,休眠期长达2~4个月,极大地限制了周年切花生产^[3]。新鲜收获的球茎需在阴凉通风处放置1个月,再将球茎放置2~5℃冷库中贮藏2个月完全打破休眠后再播种^[4]。所以,探索调控唐菖蒲球茎休眠解除的分子机制,促进其休眠解除是亟待解决的问题。

脱落酸(ABA)参与植物休眠状态的建立和维持,是抑制唐菖蒲球茎休眠解除的关键内源激素^[5-6]。研究表明,在低温促进唐菖蒲球茎休眠解除过程中,*GhTCP19*水平升高,抑制ABA合成关键酶*GhNCED*基因(*NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE*)的转录,降低了内源ABA的合成,ABA含量下降,ABA信号基因*GhABI5*的表达也被显著抑制^[7]。在此过程,球茎中细胞分裂素合成限速酶*GhIPT*基因(*Isopentenyl transferases*)的转录增加,细胞分裂素含量上升,诱导细胞周期蛋白基因*GhCYCA3*; 1(*CYCLOIDEA*)、*GhCYCB1*; 2和*GhCYCD6*的表达,促进细胞分裂,ABA与细胞分裂素拮抗调控球茎休眠解除^[7]。此外,前期研究发现*GhbZIP30*和*GhCCCH17*也参与负调控ABA代谢基因的表达,降低内源ABA含量^[8]。转录因子*GhBPC2*(*BASIC PENTACYSTEINE 2*)可参与招募组蛋白,通过表观修饰降低*GhABI5*位点的H3K4me3修饰和提高H3K27me3修饰水平抑制*GhABI5*的转录,阻断ABA的信号转导,进而促进球茎休眠解除^[9]。

2C型蛋白磷酸酶(PP2C)是可以催化丝氨酸和苏氨酸残基脱去磷酸基团的蛋白磷酸酶,在各种植物中广泛分布。如马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)^[10]、香蕉(*Musa nana* Lour.)^[11]、棉花(*Gossypium* spp.)^[12]、玉米(*Zea mays* L.)^[13]和小麦(*Triticum aestivum* L.)^[14]等。PP2C可以打破休眠,促进萌发,在ABA信号转导途径中,PP2C作为负调控因子发挥作用^[15]。如在唐菖蒲球茎解除休眠的过程中,*GhPP2C1*负调控*GhABI5*的转录^[16]。此外,低温贮藏也诱导百合‘黄精’(*Polygonatum sibiricum*)种子中*PsPP2C*高表达,缩短并打破其生理休眠,促进幼苗形态建立^[17]。在水稻中过表达PP2C的K亚家族成员*OsPP45*可以降低水稻种子萌发和根系生长中对ABA的敏感性。*OsPP45*可以与*OsDMI3*相互作用,通过去磷酸化使*OsDMI3*失活,抑制ABA信号通路转导^[18]。同样,研究表明水稻中*OsABI-LIKE2*和*OsPP2C108*^[19-20],小麦的*TaPP2Ca10*^[14],玉米中A类PP2C成员*ZmPP2C-A1*、*ZmPP2C-A2*和*ZmPP2C-A6*都能够调控ABA介导的种子休眠^[21],降低种子对ABA的敏感性,促进种子萌发。

近年来,*GhPP2C1*在唐菖蒲球茎休眠中的功能已经有了初步验证,沉默*GhPP2C1*抑制芽和根的伸长,抑制球茎休眠解除^[13]。但是*GhPP2C1*的功能及其对ABA的响应尚不完善。本研究通过同源克隆、实时荧光定量分析、亚细胞定位、启动子β-葡萄糖苷酸酶(GUS)染色、启动子响应元件分析和基因表达分析等方法旨在深入了解球茎休眠解除过程中*GhPP2C1*对ABA的响应及功能分析,以期为基因工程手段改良休眠性状和新品种选育奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为唐菖蒲(*Gladiolus hybridus*)品种‘超级玫瑰’(‘*Rose Supreme*’)完全休眠解除的籽球,种植于中国农业大学科学园。秋季地上部枯萎后收获地下新球茎及籽球,室温晾晒4周,转入4℃冷库低温处理4周,使籽球处于浅休眠,备用。

用H₂O、100 μmol ABA处理浅休眠籽球,在0、

6、12、24 和 48 h 分别取样(0.5 g 新鲜重量)提取 RNA,反转录后利用实时荧光定量 PCR 检测 *GhPP2C1* 在 ABA 处理不同时间下的表达水平。

用低温处理 8 周完全解除休眠的籽球(直径 0.8~1.0 cm)诱导愈伤。籽球用 75% 酒精清洗 1 min,用 1% 次氯酸钠溶液洗涤 30 min,在超净工作台内用无菌蒸馏水清洗 5 次。将芽和根切除,球茎切成 2.0~3.0 mm 厚的薄片,倒置在愈伤诱导培养基(4.43 g/L MS(Murashige and Skoog)基本培养基+6 mg/L 噻苯隆(Thidiazuron)+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂(pH 5.8)),在 22 ℃黑暗条件下培养约 1 个月。将愈伤从茎盘上切下,放置在含 10 μmol ABA 的愈伤诱导培养基上分别处理 0、6、12 和 48 h 并取样(0.5 g 新鲜重量),液氮冷冻后在-80 ℃下储存;然后提取 RNA,反转录后利用实时荧光定量 PCR 检测 *GhPP2C1* 在 ABA 处理不同时间后的表达水平。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)以哥伦比亚生态型 *Columbia*(*Col*)种子为试验材料。将种子消毒(在超净工作台中用 1% 次氯酸钠溶液洗涤 15 min,无菌

水冲洗 5 次)后使用固体培养基(4.43 g/L MS 基本培养基+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂(pH 5.8))培养,培养条件为光照 16 h,光强:120~150 μmol/(m²·s),黑暗 8 h,温度 22 ℃。

烟草为本氏烟(*Nicotinan benthamiana*),将种子播种在 1/2 体积草炭和 1/2 体积蛭石的基质中,待长出 2 片子叶后移栽,在 22 ℃,16 h 光周期的温室

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 *GhPP2C1* 表达分析

使用 Vazyme RC401 植物总 RNA 提取试剂盒(富含多糖多酚)提取唐菖蒲籽球和愈伤总 RNA。利用 Vazyme 的反转录试剂盒 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)获得 cDNA。将反转录的 cDNA 模板稀释至 300 ng/L,进行实时荧光定量 PCR。设计 *GhPP2C1*-qRT 定量引物(表 1),检测 ABA 处理小籽球 0~48 h 和愈伤 0~24 h 后 *GhPP2C1* 的表达情况。以 *GhACTIN* 基因(NCBI 登录号:JF831193.1)作内参。荧光定量

表 1 本研究引物及其序列信息
Table 1 Primers and sequences information in this study

引物 Primer	上游引物(5'-3') Forward sequence (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse sequence (5'-3')
LAD1-1	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNGGAA	
LAD1-2	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBNBNNGGTT	
LAD1-3	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCVNVNNNCCAC	
LAD1-4	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNBNNCCAA	
LAD1-5	ACGATGGACTCCAGAGCGGCCGCBDBNBNNCGGT	
AC1	ACGATGGACTCCAGAG	
<i>GhPP2C1</i> -HiR1		TCACCATCATCATCCCTGGACACG
<i>GhPP2C1</i> -HiR2		TCGGAATCCACGGCATCAGCCATCAG
<i>GhPP2C1</i> -HiR3		CCGAGCTCCACAACCGGGTTGTTG
<i>GhPP2C1</i> -CDS	ATGGAGGAAATGACATTGTCTCTGC	TTAAGGTCTGCTCTTGAACCTTCTC
<i>GhPP2C1</i> - <i>Sal</i> I-F	ACGCGTCGACATGGAGGAAATGACATTGTC	
	TCTGC	
<i>GhPP2C1</i> - <i>Spe</i> I-R		GGACTAGTTTAAAGGTCTGCTCTTGA
		ACTTTCTC
<i>GhPP2C1</i> -PRM- <i>Hind</i> III-F	CCCAAGCTTAGATTAAGAGTATGGAGTAT	
	AC	
<i>GhPP2C1</i> -PRM- <i>Sma</i> I-R		TCCCCGGGCCCTTCCC CTCCTCAAG
		ATA
<i>GhPP2C1</i> -qRT	CGAGATCGTGTCCAGGGATG	ACCCCACTGCTAATGACAGC
M13	GTTGTAAAACGACGGCCAGT	GTCATAGCTGTTTCCTGTGT

PCR反应条件和体系参考吴健^[1]方法,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量数据分析。

1.2.2 克隆 *GhPP2C1* 启动子

*GhPP2C1*启动子的克隆采用Hightail-PCR的方法^[22]。第一轮的上游引物为LAD1-1、LAD1-2、LAD1-3、LAD1-4和LAD1-5,第二、三轮的上游引物为AC1,三轮的下游引物分别为*GhPP2C1*-HiR1、*GhPP2C1*-HiR2和*GhPP2C1*-HiR3。分别取第一、二轮产物稀释40倍作为第二、三轮的模板。使用琼脂糖凝胶电泳对第二、三轮的产物进行检测,根据已知的条带大小差异,切胶回收,连接PMD18-T载体后,次日进行菌落PCR鉴定(表1),将阳性菌斑送去测序。

1.2.3 *GhPP2C1*的亚细胞定位

设计带有*SalI*和*SpeI*两个限制性内切酶位点的引物*GhPP2C1-SalI*-F和*GhPP2C1-SpeI*-R,以经测序矫正的pMD18-T-*GhPP2C1*质粒为模版,PCR扩增*GhPP2C1*片段。使用*SalI*和*SpeI*内切酶分别对PCR产物和载体pCambia1300-GFP进行双酶切,利用T4-DNA连接酶连接,构建过表达载体pCambia1300-*GhPP2C1*-GFP,并转入农杆菌GV3101中,经PCR扩增鉴定阳性克隆。挑取阳性克隆进行过夜摇菌,将菌液6 000 r/min室温离心5 min后使用重悬液(10 mmol MgCl₂、10 mmol MES pH 5.8和200 μ mol Acetosyringone/AS)重悬至OD₆₀₀=0.7~0.8,与P19等体积混合黑暗静置3 h。选择生长到六叶期的本氏烟注射,2 d后将注射部位的烟草叶片用圆形打孔器取样,平铺在含在100 μ mol ABA的MS培养基上,另一组平铺在MS培养基上,22 $^{\circ}$ C黑暗培养12 h。用共聚焦激光显微镜Zeiss 710(激发光波长为488 nm)检测GFP荧光信号。

1.2.4 农杆菌介导的拟南芥转化及ABA胁迫处理

设计特异引物*GhPP2C1*-PRM-*HindIII*-F和*GhPP2C1*-PRM-*SmaI*-R,克隆启动子片段后,构建表达载体pCambia1391-*GhPP2C1pro*-GUS。根据吴健^[1]方法,用农杆菌介导的花序侵染法转化拟南芥,筛选鉴定获得转基因拟南芥植株。分别将萌发后的野生型和3个转基因纯合株系的拟南芥转移至含有不同浓度(0、0.5、1.0、3.0、50、100、150 μ mol) ABA的MS培养基上,放到光照培养箱(光照16 h,黑暗8 h,温度22 $^{\circ}$ C)内垂直培养,7 d后观察表型并

统计。将筛选出的T₃代纯合体植株播种于MS培养基中,春化后将萌发7 d的转基因拟南芥植株分别浸没在2、20和200 μ mol ABA溶液和H₂O中48 h后,利用吴健^[1]方法进行GUS组织化学染色。在显微镜下观察GUS表达的部位,用体视显微镜拍照。

1.2.5 农杆菌介导的烟草叶片瞬时过表达及ABA胁迫处理

将表达载体pCambia1391-*GhPP2C1pro*-GUS转入农杆菌GV3101中,瞬时侵染烟草叶片(方法同亚细胞定位),侵染后将烟草叶片平铺在含在200 μ mol ABA的MS培养基上,另一组平铺在MS培养基上,22 $^{\circ}$ C黑暗培养24 h后进行GUS组织化学染色。在显微镜下观察GUS的染色情况,用体视显微镜拍照。

2 结果与分析

2.1 ABA诱导 *GhPP2C1* 的表达情况分析

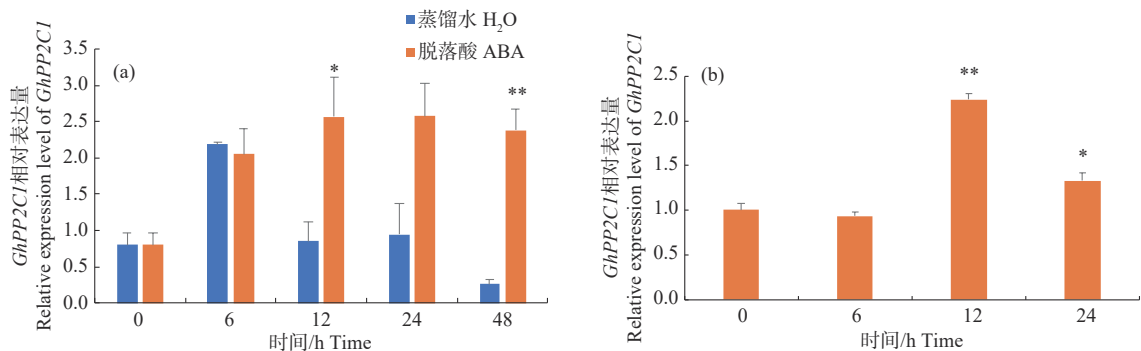
ABA处理籽球12 h后,*GhPP2C1*的表达水平相比H₂O处理显著上调($P<0.05$);处理48 h后,*GhPP2C1*的表达水平与H₂O处理相比差异极显著($P<0.01$,图1(a))。同样,在愈伤中也进行*GhPP2C1*基因的表达量分析(图1(b))。用10 μ mol ABA处理0、6、12和24 h后进行荧光定量检测,发现在处理12 h后*GhPP2C1*基因的表达水平显著上调,与籽球中结果一致。上述结果表明,ABA可显著诱导*GhPP2C1*的表达上调,*GhPP2C1*可能参与调控ABA信号转导,进而调控球茎休眠解除。

2.2 ABA诱导 *GhPP2C1* 入核

为进一步探究*GhPP2C1*的功能,观察其亚细胞定位。结果表明,*GhPP2C1*定位在细胞质中(图2)。此外,本研究在分析*GhPP2C1pro*时,发现其启动子序列中有ABA响应元件(图3)。因此,为了验证*GhPP2C1*可能被ABA诱导入核的猜想,在农杆菌侵染烟草后2 d将烟草圆片放置在100 μ mol ABA的MS培养基上,用共聚焦显微镜进行观察。结果显示,空载35S:*GFP*定位在细胞核和细胞质中;*GhPP2C1*蛋白经过ABA处理后,部分*GhPP2C1*从细胞质被诱导入核。根据上述结果猜测,当ABA积累时,*GhPP2C1*被诱导入核,参与调控ABA信号相关基因的转录,影响唐菖蒲球茎休眠解除。

2.3 *GhPP2C1* 基因启动子响应元件分析

为了更好的探究*GhPP2C1*与ABA的关系,本



柱状图为 3 个生理重复的平均值±标准误。数据采用 Student's *t*-test 分析(*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)。图 5、7、8 和 9 同。
The bars represent the mean±SD of three biological replicates. Data were analyzed by using Student's *t*-test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$). The same as Figure 5, 7, 8 and 9.

图 1 ABA 处理后 *GhPP2C1* 在籽球(a)和愈伤(b)中的表达量

Fig. 1 The expression of *GhPP2C1* in cornels (a) and calli (b) under ABA treatments

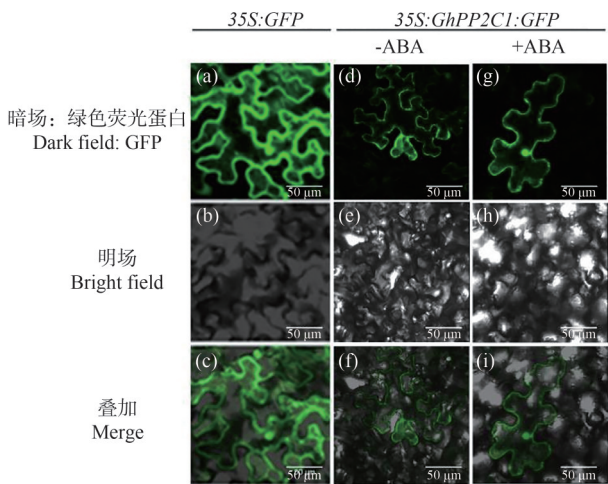


图 2 *GhPP2C1* 在烟草叶片中的亚细胞定位及
对 ABA 的响应

Fig. 2 Subcellular localization of *GhPP2C1* in *N. benthamiana* leaves and its response to ABA

研究分析了其启动子中的响应元件。首先,采用 HighTail-PCR 的方法,以唐菖蒲品种‘*Rose Supreme*’的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,获得 1 477 bp 启动子序列。利用 PlantCARE 网站分析其启动子中包含的顺式作用元件。结果显示,

GhPP2C1 的启动子中包含转录起始、激素和非生物胁迫等顺式作用元件(图 3)。其中,G-box 是植物中普遍的受信号诱导的顺式作用元件;GATA box 可能与组织特异表达相关,暗示着 *GhPP2C1* 可能在特异的组织器官中表达。激素响应元件包含 ABA 响应元件 ABRE/ATCONSensus (5'-YACGTGGC-3')、MYC/CONSensusAT (5'-CANNTG-3') 和赤霉素响应元件 CARE/OSREP1 (5'-CAACTC-3')。非生物胁迫元件包含干旱响应元件 MYBCORE (5'-CNGTTR-3')、MYB1AT (5'-WAACCA-3') 和低温响应元件 LTRE/OREAT COR15 (5'-CCGAC-3')。以上结果表明, *GhPP2C1* 可能受激素、干旱和低温等非生物胁迫诱导表达,在多个生物过程中发挥着重要作用。

2.4 ABA 对 *GhPP2C1* 启动子活性的影响

为了深入研究 ABA 是否影响 *GhPP2C1* 启动子活性,本研究构建了 *GhPP2C1**pro*-GUS 载体,转化至拟南芥 *Col* 中进行异源稳定表达及在烟草叶片进行瞬时表达。在烟草中,对照组中 GUS 表达较弱,ABA 处理后烟草叶片中的 GUS 活性显著提高(图 4(a))。说明在烟草叶片中 ABA 可以激活

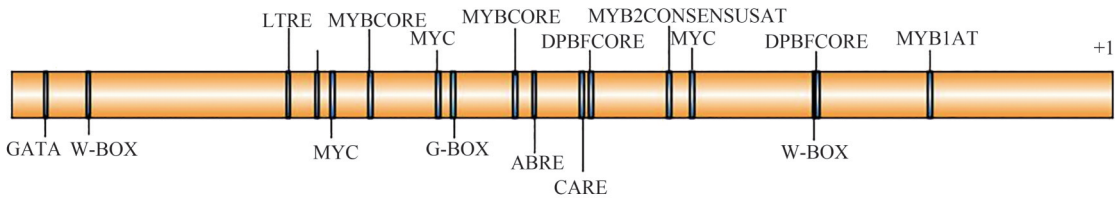
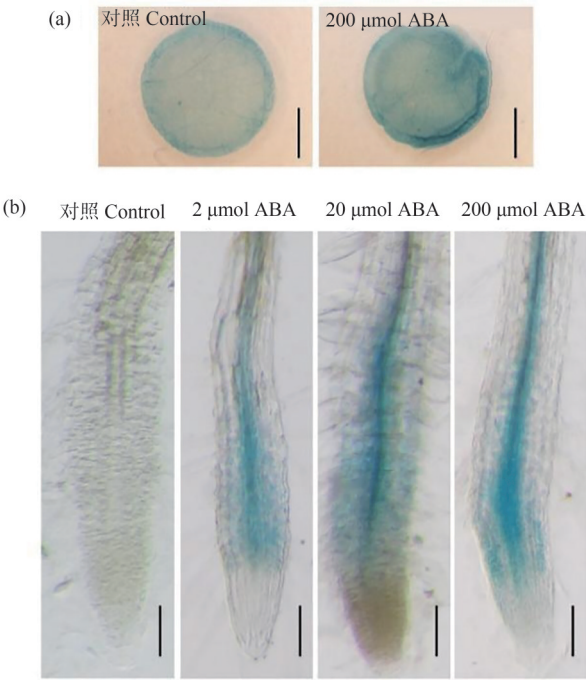


图 3 *GhPP2C1* 启动子顺式作用位点的示意图

Fig. 3 Schematic diagram of the *cis*-elements of the *GhPP2C1* promoter

*GhPP2C1*启动子活性。*GhPP2C1pro*-GUS异源表达拟南芥被放置在不同浓度的ABA溶液和H₂O中处理。结果显示,对照组GUS活性微弱,随着ABA浓度的升高,GUS活性增强,且集中在根尖维管束部位(图4(b))。以上结果推测,*GhPP2C1*启动子活性不仅可以受ABA诱导上调,并且可能在特异的组织器官中表达。



(a)烟草叶片GUS染色;(b)拟南芥根尖GUS染色。标尺为50 μm。
(a) GUS staining of *N. benthamiana* leaves. (b) GUS staining of the *Arabidopsis* root tips. Bar=50 μm.

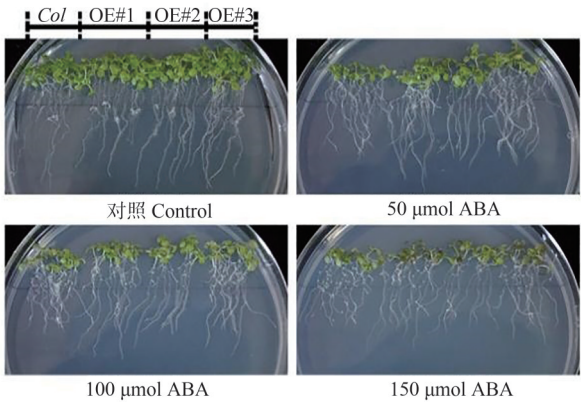
图4 ABA对*GhPP2C1*启动子活性的分析

Fig. 4 The effect of ABA on the promoter activity of *GhPP2C1*

2.5 35S:*GhPP2C1*异源过表达拟南芥对ABA的敏感性分析

为了深入研究*GhPP2C1*的生物学功能,本研究将35S:*GhPP2C1*(OE#1、OE#2和OE#3)株系和野生型(*Col*)拟南芥种植在含不同浓度ABA的MS培养基上垂直培养,7 d后观察表型并测量根长(图5)。结果表明,在不同浓度ABA的培养基中,*Col*和过表达*GhPP2C1*株系均可生长。在含有50 μmol ABA的培养基上,*Col*、OE#2和OE#3株系的根均被显著抑制生长,但OE#1株系表现出对ABA的低敏感性。在含有100 μmol ABA的培养基上,OE#1和OE#3株系的根长与野生型相比显著

增长。在150 μmol ABA的培养基上,野生型的根长被显著抑制,3个过表达株系对ABA的敏感性显著低于野生型。



(a) 过表达*GhPP2C1*转基因拟南芥株系生长情况
(a) The phenotype of transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing *GhPP2C1*

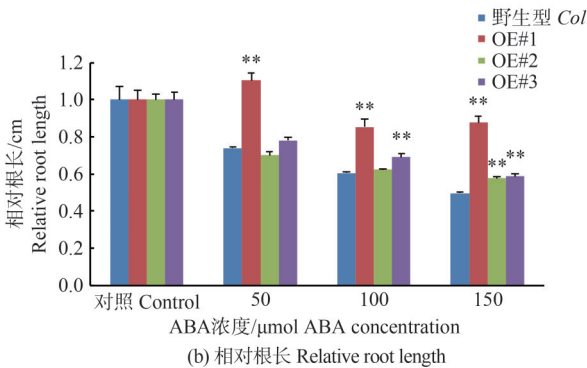
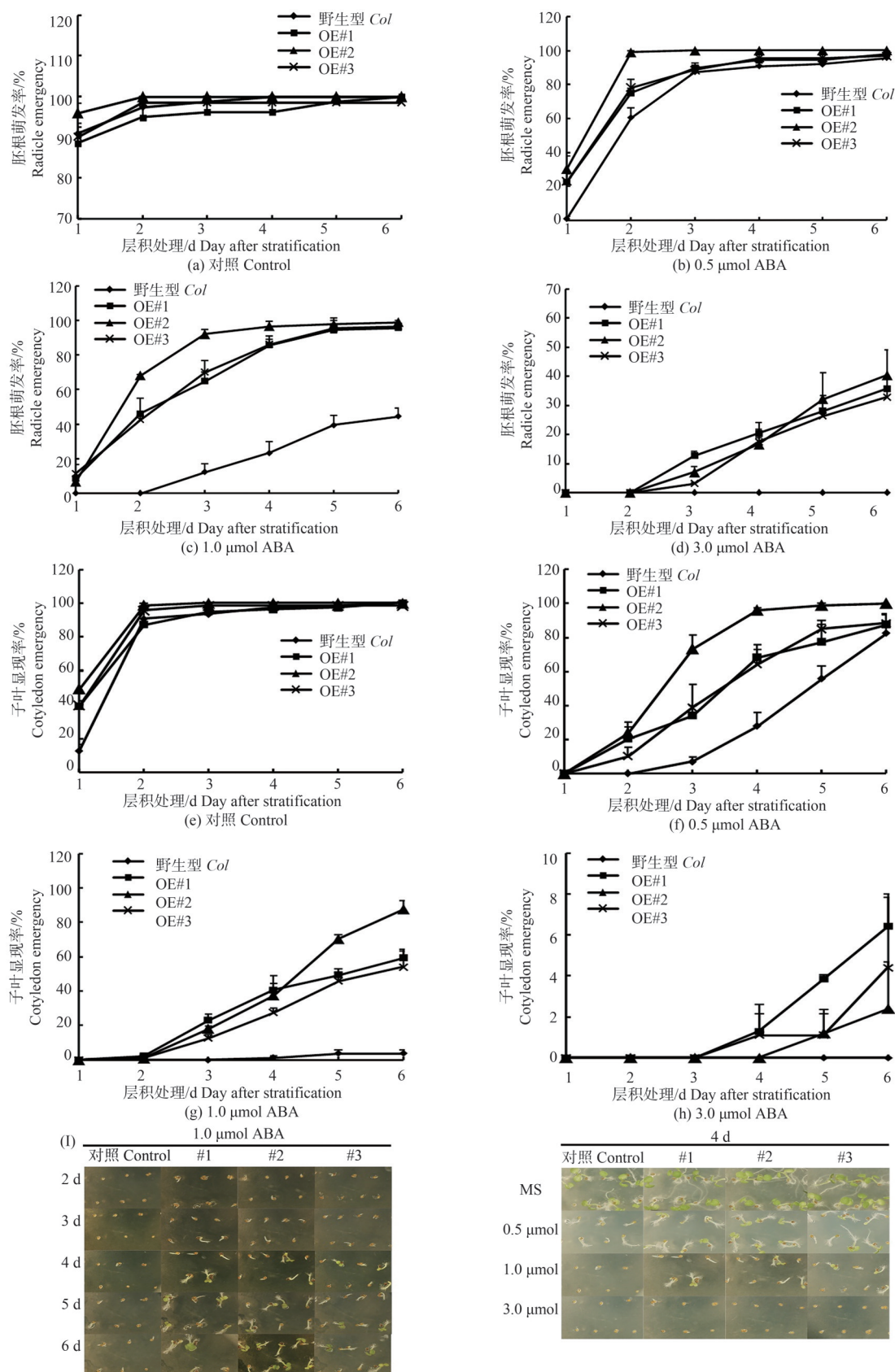


图5 不同浓度ABA处理过表达*GhPP2C1*转基因拟南芥株系的根长

Fig. 5 Root length of transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing *GhPP2C1* under different concentrations of ABA treatment

接着用0.5、1.0和3.0 μmol ABA处理过表达野生型拟南芥的种子,观察胚根伸出和子叶显现的情况(图6)。未施加ABA时,转基因株系与野生型的胚根伸出和子叶显现情况并无太大差异,仅在层积处理后恢复生长1 d时,OE株系子叶显现率明显高于野生型。施用0.5 μmol ABA后,所有转基因株系胚根的萌发率和子叶显现率均高于野生型,表现出对ABA的弱敏感性。施用1.0 μmol ABA后,所有转基因株系的胚根都正常伸出且发生率高于野生型;生长6 d后,野生型拟南芥的胚根伸出率约为40%,远低于转基因株系(胚根伸出率90%以上);野生型子叶几乎不能显现,而转基因株系的子叶显现率可达60%以上。施用3.0 μmol ABA后,转基因和野生型拟南芥的胚根和子叶生长情况都

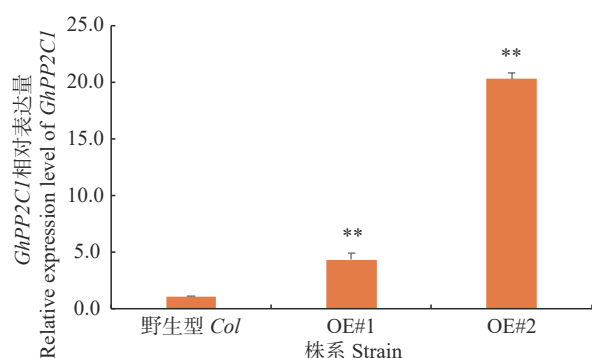
图6 ABA处理过表达 *GhPP2C1* 转基因拟南芥株系的种子萌发情况Fig. 6 The effect of ABA on seed germination of transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing *GhPP2C1*

受到不同程度的抑制;生长6 d后,野生型拟南芥的萌发完全被抑制,胚根无法伸出以及子叶无法显现;而转基因株系的胚根伸出率可达40%左右,子叶显现率为5%左右。根据上述结果,推测 *GhPP2C1* 可能负调控 ABA 的信号传导,正调控球茎休眠解除。

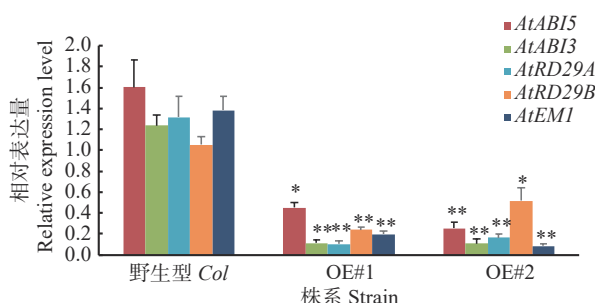
2.6 *GhPP2C1* 调控 ABA 信号通路基因表达分析

在拟南芥中过表达 *GhPP2C1* 后,ABA 信号通

路中下游基因 *AtABI5*、*AtABI3*、*AtEM1*、*AtRD29A* 和 *AtRD29B* 的表达量显著下降,其中在 OE#1 和 OE#2 株系中 *AtABI3* 和 *AtRD29A* 的表达量下降最显著(图7)。此外,在唐菖蒲的愈伤中过表达 *GhPP2C1* 后,检测 *GhABI5* 的表达量也显著下降(图8)。综上,推测 *GhPP2C1* 可能是通过负调控 ABA 信号传导,进而增强对 ABA 的敏感性。



(a) 过表达 *GhPP2C1* 转基因拟南芥株系中 *GhPP2C1* 表达量
(a) The expression of *GhPP2C1* in transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing *GhPP2C1*



(b) 过表达 *GhPP2C1* 转基因拟南芥株系中 ABA 信号通路相关基因表达量
(b) The expression of ABA signaling genes in transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing *GhPP2C1*

图7 过表达 *GhPP2C1* 转基因拟南芥株系中 ABA 信号通路相关基因表达

Fig. 7 The expression of ABA signaling genes in transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing *GhPP2C1*

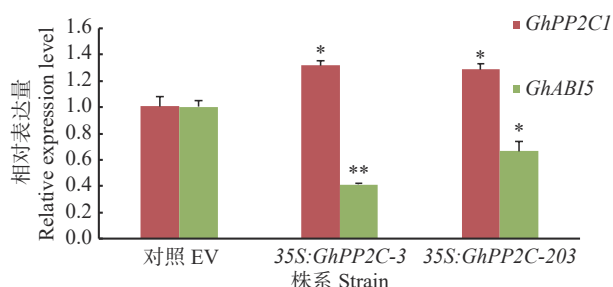


图8 唐菖蒲愈伤中瞬时过表达 *GhPP2C1* 抑制 *GhABI5* 表达

Fig. 8 Transiently overexpression of *GhPP2C1* reduces *GhABI5* expression in calli

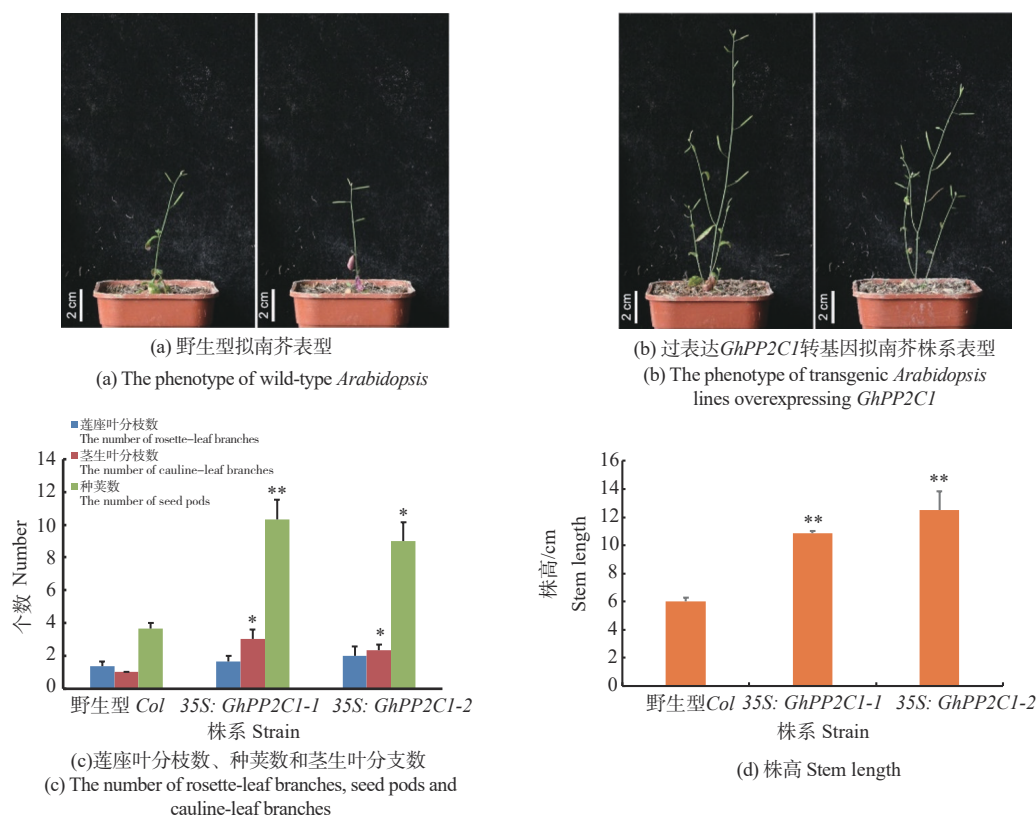
2.7 35S:GhPP2C1 过表达株系株型分析

为了探究 *GhPP2C1* 是否具有多种生物学功能,本研究观察 35S:GhPP2C1 过表达株系的表型并统计数据(图9)。结果表明,与野生型相比,35S:GhPP2C1 过表达株系表现出分枝数目显著增加、株高显著增高和种荚的数量增多等表型,推测 *GhPP2C1* 基因可能参与调控生长发育等多个过程中。

3 讨论与结论

3.1 *GhPP2C1* 受 ABA 诱导且负调控 ABA 信号通路

高等植物中 PP2C 家族在调节植物生长发育、响应生物和非生物胁迫等方面具有重要作用。前人研究表明,在唐菖蒲小籽球贮藏期间 ABA 的含量先升高后降低,施用低浓度的 ABA 促进 *GhPP2C1* 显著上调^[16]。此外,在水稻和鸢尾的研究发现,ABA 可以诱导 PP2C 基因的高表达,PP2C 基因的表达水平呈现先升高随后下降的趋势^[23-24]。ABA 水稻浸根处理 24 h 后 *OsBIPP2C1* 表达量最大^[23]。施用 ABA 后山毛榉种子 *FsPP2C1* 的表达量显著升高^[25]。PP2C 也被报道广泛参与 ABA 调控的各种信号途径中,包括 ABA 诱导的种子萌发/休眠和幼苗根系的伸长等^[26]。本研究表明,外施 ABA 显著诱导唐菖蒲球茎和愈伤中 *GhPP2C1* 表达上调,在处理的 12 h 达到最高峰。并且,在 *GhPP2C1* 的异源过表达拟南芥中检测到 *AtABI5*、*AtABI3*、

图9 过表达 *GhPP2C1* 转基因拟南芥株系株型Fig. 9 Phenotypes of transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing *GhPP2C1*

AtEM1、*AtRD29A* 和 *AtRD29B* 的表达量显著下降。结合前人的研究结果推测 *GhPP2C1* 可能通过参与 ABA 信号转导途径来调控球茎休眠解除。

3.2 ABA 可诱导 *GhPP2C1* 入核且激活其启动子活性

前人研究表明,植物 PP2C 蛋白羧基端具有行使催化功能的结构域,氨基端延伸区有跨膜区域和激酶互作区域^[27]。*AtABI1* 有核定位信号(Nuclear localization signal, NLS)^[28]。山毛榉 *FsPP2C2* 定位于细胞质中,外源施用 ABA 可以诱导其入核^[29]。推测 *GhPP2C1* 与拟南芥 *AtABI1* 在羧基端的氨基酸序列具有相似性,可被 ABA 诱导入核后发挥功能。本研究表明,*GhPP2C1* 定位于细胞质中,外施 ABA 诱导其入核发挥功能,但 ABA 是如何诱导其入核有待进一步验证。

有研究发现,在花生中 PP2C 同源基因 *Aradu. P2C14*、*Aradu. YH8NY*、*Araip. CC2EP* 和 *Araip. 6KE2F* 的启动子上有响应赤霉素元件 WRKY71OS、响应种子萌发的元件 POLASIG1、响应 ABA 信号转导的元件 ABRE3HVA22 及响应植物激素合成元

件 GADOWNAT 等^[30]。在谷子的 *PP2C* 基因启动子中发现有多个响应 ABA、干旱和低温等元件,此外还有 MYB、MYC 和 WRKY 类转录因子的结合元件^[31]。在木薯 *MePP2C24* 的启动子上也发现 ABA 响应元件^[32]。本研究表明,*GhPP2C1* 基因启动子序列中有 ABA、GATA box 及低温等顺式作用元件,结合前人的研究结果,表明非生物胁迫可能调控 *GhPP2C1* 启动子的活性。本研究还发现该序列中有 CAAT box 和 TATA box,这些元件可以调控转录起始精确度和效率。

本研究还发现,在拟南芥和烟草中 ABA 处理促进 *GhPP2C1* 启动子活性在根尖和叶片中表达,也验证了本研究中 *GhPP2C1* 启动子区域存在 ABA 顺式作用元件的研究结果。推测 *GhPP2C1* 被 ABA 诱导入核来调控 ABA 相关基因的表达,进而参与调控球茎休眠解除,还需进一步验证分析。

3.3 过表达 *GhPP2C1* 降低对 ABA 的敏感性且促进拟南芥生长发育

大量研究表明,ABA 抑制种子萌发,如外源施用 ABA 会显著抑制小麦^[33]、拟南芥^[34]、黄瓜^[35]和水

稻^[36]等植物种子的萌发。*abi1*突变体导致拟南芥对ABA敏感性减弱^[37],*abi2*突变体的PP2C酶活性与野生型相比显著降低^[38]。此外,过表达*MdPP2C-like*的转基因苹果愈伤降低了对ABA的敏感性^[39]。*35S::FsPP2C1*转基因拟南芥种子休眠程度较低,对ABA弱敏感^[25]。本研究也表明,在拟南芥中过表达*GhPP2C1*后,转基因拟南芥可以显著降低对ABA的敏感性。

此外,PP2C家族成员也在植物的生长发育过程中发挥重要作用。研究发现,在水稻中*OsPP2C09*可以正向调控植物生长,在ABA处理后*OsPP2C09*迅速在根系中积累且表达量高于地上部分,促进水稻的生长发育和抵御干旱等非生物胁迫^[40]。Sugimoto等^[41]发现在拟南芥中过表达*AtPP2CF1*后,转基因拟南芥的花序生长加速,并且生物产量增加。本研究结果表明,在拟南芥中过表达*GhPP2C1*能促进分枝数目、株高和种荚数量的增长,显著促进拟南芥的生长发育。推测*GhPP2C1*可促进植株根系和茎的生长进而促进植株吸收水分、养分,对植株生长具有重要作用。

综上所述,本研究表明GhPP2C1在响应ABA信号转导过程中可能参与减弱ABA信号传导,减弱过表达*GhPP2C1*基因的拟南芥株系对ABA的敏感性,促进转基因拟南芥种子的萌发,且对后续转基因拟南芥的营养生长发挥着重要作用。本研究为深入解析唐菖蒲*GhPP2C1*基因的功能奠定了理论基础。

参考文献 References

- [1] 吴健. 唐菖蒲 *GhNCED* 和 *GhABI5* 在调控球茎休眠中的作用机制[D]. 北京:中国农业大学,2016
Wu J. Molecular mechanism of *GhNCED* and *GhABI5* in regulating *Gladiolus* corm dormancy [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [2] Cai F F, Jin X, Tian Y X, Huang Z M, Wang X L, Zhang Y P, Sun Y Q, Shao C S. Molecular regulation of bud dormancy in perennial plants[J]. *Plant Growth Regulation*, 2023: 1-11
- [3] Luo X, Yi J, Zhong X H, Lian Q L, Khan M A, Cao X, Li X X, Gao M W, Wu J, Chen J, Yi M F. Cloning, characterization and expression analysis of key genes involved in ABA metabolism in *Gladiolus* corms during storage[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 143: 115-121
- [4] 李娜, 王飞. 唐菖蒲的繁育技术及病虫害防治[J]. 吉林蔬菜, 2014(3): 51-52
Li N, Wang F. Breeding techniques and pest control of *gladiolus* [J]. *Jilin Vegetable*, 2014(3): 51-52 (in Chinese)
- [5] Horvath D P, Anderson J V, Chao W S, Foley M E. Knowing when to grow: Signals regulating bud dormancy [J]. *Trends in Plant Science*, 2003, 8(11): 534-540
- [6] Wu J, Seng S S, Sui J J, Vonapartis E, Luo X, Gong B H, Liu C, Wu C Y, Liu C, Zhang F Q, He J N, Yi M F. *Gladiolus* hybridus ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (*GhABI5*) is an important transcription factor in ABA signaling that can enhance *Gladiolus* corm dormancy and *Arabidopsis* seed dormancy [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 960
- [7] Wu J, Wu W J, Liang J H, Jin Y J, Gazzarrini S, He J N, Yi M F. *GhTCP19* transcription factor regulates corm dormancy release by repressing *GhNCED* expression in *Gladiolus* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2019, 60(1): 52-62
- [8] Liang J H, Li J R, Liu C, Pan W Q, Wu W J, Shi W J, Wang L J, Yi M F, Wu J. *GhZIP30-GhCCCH17* module accelerates corm dormancy release by reducing endogenous ABA under cold storage in *Gladiolus* [J]. *Plant Cell and Environment*, 2023, 46(7): 2078-2096
- [9] Li J R, Pan W Q, Liang J H, Liu C, Li D Q, Yang Y D, Qu L W, Gazzarrini S, Yi M F, Wu J. BASIC PENTACYSSTEINE2 fine-tunes corm dormancy release in *Gladiolus* [J]. *Plant Physiology*, 2023, 191(4): 2489-2505
- [10] Wang Y F, Liao Y Q, Wang Y P, Yang J W, Zhang N, Si H J. Genome-wide identification and expression analysis of StPP2C gene family in response to multiple stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19(6): 1609-1624
- [11] Hu W, Yan Y, Shi H T, Liu J H, Miao H X, Tie W W, Ding Z H, Ding X P, Wu C L, Liu Y, Wang J S, Xu B Y, Jin Z Q. The core regulatory network of the abscisic acid pathway in banana: Genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress [J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 145
- [12] Shazadee H, Khan N, Wang J J, Wang C C, Zeng J G, Huang Z Y, Wang X Y. Identification and expression profiling of protein phosphatases (PP2C) gene family in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1395
- [13] Fan K, Yuan S N, Chen J, Chen Y R, Li Z W, Lin W W, Zhang Y Q, Liu J P, Lin W X. Molecular evolution and lineage-specific expansion of the PP2C family in *Zea mays* [J]. *Planta*, 2019, 250(5): 1521-1538
- [14] Yu X F, Han J P, Wang E F, Xiao J E, Hu R, Yang G X, He G Y. Genome-wide identification and homoeologous expression analysis of PP2C genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 561
- [15] Singh A, Giri J, Kapoor S, Tyagi A K, Pandey G K. Protein phosphatase complement in rice: Genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 435
- [16] Wu J, Jin Y J, Liu C, Vonapartis E, Liang J H, Wu W J, Gazzarrini S, He J N, Yi M F. *GhNAC83* inhibits corm dormancy release by regulating ABA signaling and cytokinin biosynthesis in *Gladiolus* hybridus [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(4): 1221-1237
- [17] Liao D Q, An R P, Wei J H, Wang D M, Li X N, Qi J J. Transcriptome profiles revealed molecular mechanisms of alternating temperatures in breaking the epicotyl morphophysiological dormancy of *Polygonatum*

- sibiricum* seeds[J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 370
- [18] Ni L, Fu X P, Zhang H, Li X, Cai X, Zhang P P, Liu L, Wang Q W, Sun M M, Wang Q W, Zhang A Y, Zhang Z G, Jiang M Y. Absciscic acid inhibits rice protein phosphatase PP45 via H_2O_2 and relieves repression of the Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase DMI3 [J]. *The Plant Cell*, 2019, 31(1): 128-152
- [19] Endo A, Egawa C, Oohashi M, Meguro-Maoka A, Shimosaka E, Sato Y. Ectopic expression of mutated type 2C protein phosphatase OsABI-LIKE2 decreases abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis* and rice [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 12320
- [20] Singh A, Jha S K, Bagri J, Pandey G K. ABA inducible rice protein phosphatase 2C confers ABA insensitivity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0125168
- [21] He Z H, Wu J F, Sun X P, Dai M Q. The maize clade A PP2C phosphatases play critical roles in multiple abiotic stress responses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3573
- [22] Liu Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. *BioTechniques*, 2007, 43(5): 649-656
- [23] 胡学博. 水稻蛋白磷酸酶 2C 基因 *OsBIPP2C1* 和 *OsBIPP2C2* 的克隆鉴定与功能分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2004
- Hu X B. Molecular cloning and functional analysis of *OsBIPP2C1* and *OsBIPP2C2* two novel Protein phosphatase 2C genes in Rice [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004 (in Chinese)
- [24] 倪飞. 鸢尾蛋白磷酸酶 2C(PP2C)基因的克隆和功能分析及拟南芥 PP2C 基因家族的鉴定和基因组学分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009
- Ni F. Cloning and functional analysis of a Protein phosphatase 2C gene (*IrisPP2C1*) in the flower of *Iris tectorum* and genome-wide analysis of PP2C family in *Arabidopsis* [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2009 (in Chinese)
- [25] González-García M P, Rodríguez D, Nicolás C, Rodríguez P L, Nicolás G, Lorenzo O. Negative regulation of abscisic acid signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 plays a role in seed dormancy regulation and promotion of seed germination [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(1): 135-144
- [26] 胡晓丽, 李德全. 植物蛋白磷酸酶 2C(PP2C)及其在信号转导中的作用[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(3): 407-412
- Hu X L, Li D Q. Protein phosphatase 2C in plants and its functions of signal transduction [J]. *Plant Physiology Communications*, 2007, 43(3): 407-412 (in Chinese)
- [27] Stone J M, Collinge M A, Smith R D, Horn M A, Walker J C. Interaction of a protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine-threonine receptor kinase [J]. *Science*, 1994, 266(5186): 793-795
- [28] Moes D, Himmelbach A, Korte A, Haberer G, Grill E. Nuclear localization of the mutant protein phosphatase abil is required for insensitivity towards ABA responses in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2008, 54(5): 806-819
- [29] Lorenzo O, Nicolás C, Nicolás G, Rodríguez D. Molecular cloning of a functional protein phosphatase 2C (FsPP2C2) with unusual features and synergistically up-regulated by ABA and calcium in dormant seeds of *Fagus sylvatica* [J]. *Physiologia Plantarum*, 2002, 114(3): 482-490
- [30] 张紫燕, 王艺喆, 苏良辰. 花生中 4 个蛋白磷酸酶 PP2C 基因的启动子结构及功能分析[J]. 分子植物育种: 1-12
- Zhang Z Y, Wang Y Z, Su L C. Structural and functional analysis of promoters of four Protein phosphatase PP2C genes in Peanut [J]. *Molecular Plant Breeding*: 1-12 (in Chinese)
- [31] 闵东红, 薛飞洋, 马亚男, 陈明, 徐兆师, 李连城, 刁现民, 贾冠清, 马有志. 谷子 PP2C 基因家族的特性[J]. 作物学报, 2013, 39(12): 2135-2144
- Min D H, Xue F Y, Ma Y N, Chen M, Xu Z S, Li L C, Diao X M, Jia G Q, Ma Y Z. Characteristics of PP2C gene family in foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39(12): 2135-2144 (in Chinese)
- [32] 吴春来. 木薯蛋白磷酸酶基因 *MePP2C24/26* 在 ABA 介导的干旱应答中的功能研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2023
- Wu C L. The functions of Protein phosphatase genes *MePP2C24/26* in ABA-mediated drought response in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2023 (in Chinese)
- [33] 孙果忠, 张秀英, 肖世和. 活性氧对 ABA 和水分胁迫抑制的小麦萌发胚内 α -淀粉酶表达的影响[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(4): 50-53
- Sun G Z, Zhang X Y, Xiao S H. Effect of reactive oxygen species on α -amylase expression of germinating wheat embryo treated with ABA and water stress [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2005, 25(4): 50-53 (in Chinese)
- [34] 陈斌卿. 拟南芥 KTN1 负调控 ABA 信号途径参与调节种子萌发的分子机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2020
- Chen B Q. *Arabidopsis* KTN1 negatively regulates ABA signaling pathway for seed germination [D]. Beijing: China Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [35] 管炜, 曹明明, 李淑菊, 王惠哲, 杨瑞环, 邓强. 外源 ABA 抑制黄瓜种子采前瓜内萌发的初步研究[J]. 农业科技通讯, 2016(5): 122-125
- Guan W, Cao M M, Li S J, Wang H Z, Yang R H, Deng Q. Preliminary study on exogenous ABA inhibiting pre harvest germination of cucumber seeds [J]. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 2016(5): 122-125 (in Chinese)
- [36] 周述波, 贺立红, 贺立静, 林伟. ABA 抑制杂交水稻亲本种子萌发的基础生理变化研究[J]. 广东农业科学, 2016, 43(8): 1-5
- Zhou S B, He L H, He L J, Lin W. Study on basic physiological effects of exogenous ABA on germination of hybrid rice parent line seeds [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2016, 43(8): 1-5 (in Chinese)
- [37] Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb A A, Vartanian N, Giraudat J. ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling [J]. *The Plant Cell*, 1999, 11(10): 1897-1909
- [38] Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway [J]. *The Plant Journal*, 2001, 25(3): 295-303
- [39] 张春玲, 周李杰, 王桂荣, 李媛媛, 王小非, 郝玉金. 苹果蛋白磷酸酶基因 MdPP2C-Like 的克隆及其对 ABA 的响应分析[J]. 园艺学报, 2018, 45(7): 1225-1236
- Zhang C L, Zhou L J, Wang G L, Li Y Y, Wang X F, Hao Y J. Molecular cloning of Protein phosphatase gene MdPP2C-like in apple and the response analysis of ABA [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018,

45(7): 1225-1236 (in Chinese)

- [40] Miao J, Li X F, Li X B, Tan W C, You A Q, Wu S J, Tao Y J, Chen C, Wang J, Zhang D P, Gong Z Y, Yi C D, Yang Z F, Gu M H, Liang G H, Zhou Y. OsPP2C09, a negative regulatory factor in abscisic acid signalling, plays an essential role in balancing plant growth and drought tolerance in rice[J]. *New Phytologist*, 2020, 227(5): 1417-1433

- [41] Sugimoto H, Kondo S, Tanaka T, Imamura C, Muramoto N, Hattori E, Ogawa K, Mitsukawa N, Ohto C. Overexpression of a novel *Arabidopsis* PP2C isoform, AtPP2CF1, enhances plant biomass production by increasing inflorescence stem growth [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(18): 5385-5400

责任编辑:董金波



第一作者简介:王少坤,硕士研究生,就读于中国农业大学园艺学院观赏园艺系。在导师指导下主要进行百合小鳞茎的发生发育和唐菖蒲种球休眠解除等研究。在研究生阶段申请专利并授权1项(申请专利号:202110163782.0)。2020—2023年连续3个学年获得中国农业大学硕士二等学业奖学金,2021—2022学年获中国农业大学“三好学生”称号。



通讯作者简介:吴健,博士,教授,副系主任。主要围绕百合和唐菖蒲等球根花卉在种球国产化繁育和贮藏环节的产业问题开展应用基础研究。近年来,荣获国家级青年人才、农业科研杰出人才和北京优秀指导教师等荣誉。主持国家和北京市自然科学基金3项。收集1 000余份种质资源,培育新品种7个,已在北京等地推广,促进了北京花卉企业增收;系统揭示种球繁育中的发育和休眠调控新机制,研究成果在*Nature Plants*、*Plant Cell*、*Plant Physiology*等期刊上发表,共14篇;申请专利3项,已授权2项;研发种球繁育体系1套,助力企业实现了百万粒级种球生产,提高了国产百合市场渗透率;致力于建立优化的种球繁育模式,实现周年切花生产。