

引用格式: 张雅楠, 徐婷婷, 许好标, 等. 陆地棉早花基因 *GhPRR9* 的功能分析及验证[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(1): 74–85. ZHANG Ya'nan, XU Tingting, XU Haobiao, et al. Functional analysis and validation of early flowering gene *GhPRR9* in *Gossypium hirsutum*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2025, 42(1): 74–85.

陆地棉早花基因 *GhPRR9* 的功能分析及验证

张雅楠¹, 徐婷婷², 许好标², 喻树迅¹

(1. 浙江农林大学 现代农学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】研究早花基因 *GhPRR9* 在陆地棉 *Gossypium hirsutum* 生长发育过程中的功能, 为培养早熟棉品种提供理论依据。【方法】从全基因组筛选鉴定陆地棉 GhPRR 亚家族成员并研究其结构和表达特征; 使用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 *GhPRR9* 在不同品种、不同组织及 1 d 内的表达差异; 在烟草 *Nicotiana tabacum* 叶片中采用瞬时转化法进行亚细胞定位; 分段克隆 *GhPRR9* 基因启动子并构建 β -葡萄糖苷酶基因 (GUS) 植株进行染色实验; 构建拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 过表达株系, 统计开花表型及相关基因表达量; 进行病毒诱导沉默 (VIGS) 实验并观察开花时间差异。【结果】生物信息学分析显示: 陆地棉 GhPRR 亚家族 14 个成员多数定位于细胞核, 结构较为保守且主要在开花前的茎叶中集中表达。RT-qPCR 分析显示: 陆地棉 *GhPRR9* 表达量与品种早熟性呈正向相关, 在花器官中更高, 且在 1 d 内呈周期变化。烟草瞬时转化表明: 陆地棉 *GhPRR9* 分布在细胞核。GUS 染色结果显示: 启动子上游 500~2 000 bp 内可能存在关键调控元件。拟南芥过表达株系可观察到早花。VIGS 实验显示: 基因沉默导致开花时间延迟。【结论】基因 *GhPRR9* 对陆地棉早花性状有正向调控作用, 在一定程度上能促进陆地棉生长。图 5 表 2 参 55

关键词: 陆地棉; 家族分析; *GhPRR9*; 功能验证; 早花

中图分类号: S330 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)01-0074-12

Functional analysis and validation of early flowering gene *GhPRR9* in *Gossypium hirsutum*

ZHANG Ya'nan¹, XU Tingting², XU Haobiao², YU Shuxun¹

(1. College of Advanced Agricultural Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;

2. College of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective is to study the function of early flowering gene *GhPRR9* in the growth and development of *Gossypium hirsutum* (cotton), so as to provide theoretical basis for cultivating early maturing cotton cultivars. [Method] Members of GhPRR subfamily were identified by genome-wide screening and the structure and expression characteristics were studied. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analyze the expression of *GhPRR9* among different varieties, tissues and within a single day. Subcellular localization was performed in *Nicotiana tabacum* (tobacco) leaves by transient transformation method. The promoter of the gene was cloned and β -D-glucosidase (GUS) plants were constructed for staining experiment. The overexpression lines of *Arabidopsis thaliana* were constructed to analyze the flowering phenotype data and related gene expression. Virus induced silencing (VIGS) experiment was performed to observe the difference in flowering time. [Result] Bioinformatics analysis showed that most of the 14 members of the GhPRR subfamily were located in the nucleus, with a relatively conserved structure and mainly

收稿日期: 2024-03-31; 修回日期: 2024-06-21

基金项目: 棉花生物育种与综合利用全国重点实验室开放课题 (CB2023A09)

作者简介: 张雅楠 (ORCID: 0009-0009-5970-2633), 从事棉花早花生理生化代谢调控研究。E-mail: citsurubisco@foxmail.com。通信作者: 喻树迅 (ORCID: 0000-0002-9715-3462), 研究员, 博士, 从事棉花遗传育种研究。E-mail: yushuxun@zafu.edu.cn

expressed in stems and leaves before flowering. RT-qPCR analysis indicated that the expression level of *GhPRR9* was positively correlated with early maturity of cultivars, higher in flower organs, and exhibited a periodic change within one day. Transient transformation of tobacco revealed that *GhPRR9* was distributed in the nucleus. GUS staining suggested that there might be key regulatory elements in the promoter within 500–2 000 bp upstream. Early flowering was observed in *A. thaliana* overexpressed strains. VIGS experiment revealed that gene silencing led to delayed flowering. [Conclusion] Gene *GhPRR9* has a positive regulatory effect on the early flowering of upland cotton and can promote its growth and development. [Ch, 5 fig. 2 tab. 55 ref.]

Key words: *Gossypium hirsutum*; family analysis; *GhPRR9*; functional verification; early blossoming

陆地棉 *Gossypium hirsutum* 是主要的经济作物之一，在经济发展过程中占有重要地位。而今因优质耕地面积减少导致的粮棉争地问题日益突出，中国陆地棉产区又整体呈现西北内陆棉区面积不断扩大，黄河、长江棉区面积持续减少的趋势^[1]。在西北内陆地区栽培早熟棉能充分发挥其可晚播的特点，减少因早春干燥、降温，以及晚霜等原因造成的育苗病虫害，降低杀虫剂施用量^[2]，增加霜前开花率并改善陆地棉品质^[3]。因此，筛选早熟棉对提高耕地利用效率具有重要意义^[4]。

植物从生理生长转向生殖生长的过程为开花^[5]，受环境激素影响^[6]，目前较为广泛的调控开花途径是光周期途径、春化途径、自主途径及年龄途径等^[7]。自主及春化途径主要通过开花抑制基因 *FLC* 位点进行^[8]，*FLC* 调控 *FT* 和 *SOC1* 抑制开花^[9]，受光周期途径正向调控^[10]，可被 *FLD* 等通路抑制^[11]。光周期靠 *CO/FT* 表达改变模式^[12]。*CO* 是光周期的核心基因^[13]，其蛋白有 2 个锌指结构域正向调控 *FT*^[14–15]，N 端蛋白控制光稳定，C 端 CCT 区域用于核定位^[16]。对拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 研究表明：*CCA1/LHY* 在 *TOC1* 上游调控光形态建成抑制其节律^[17–18]。激活 *CCA1/LHY* 和 *TOC1* 翻译组蛋白可调控昼夜节律^[19]。*RVE8/LCL5* 也可通过结合 *TOC1* 启动子调节昼夜节律^[20]，节律核心基因限制 *TOC1* 的降解^[21]。*TOC1* 和 *CCA1* 的 mRNA 转录水平受 *Hesp* 调控^[22]。

PRR 亚家族成员是生物钟重要组分。中心环 *CCA1* 和 *LHY* 通过结合启动子负调控 *TOC1(APRR1)*^[23]。*CCA1* 和 *LHY* 是 *PRR9*、*PRR7* 的正调控因子^[24]，也可能是 *PRR5* 的正调控因子。3 个 *PRR* 基因通过结合启动子负调控 *CCA1* 和 *LHY*^[25]。*PRR5* 促进 *TOC1* 积累使其稳定^[26]，*PRR3* 和 *PRR5* 阻断 *TOC1* 与 *ZTL* 互作使其稳定^[24]。对玉米 *Zea mays* 研究表明：*PRR* 家族成员参与包括光响应在内的多种信号传导^[27]。对大豆 *Glycine max* 研究表明：*PRR* 家族 CCT 结构缺失与无意义突变影响开花时间^[28]。对大白菜 *Brassica pekinensis*^[29]、大豆突变体^[30] 研究也表明：*TOC1* 可控制早花，参与非生物胁迫应答^[31]。

陆地棉中开花相关基因大多数属于光周期和生物钟相关途径^[32]。前人对陆地棉中光周期通路 *CO*^[33]、*FT*^[34]，赤霉素途径 *FPP1*^[35]、*SPL3*^[36] 和部分 *MADS-box*^[37–38] 家族基因进行研究，说明研究开花通路相关基因具有重要意义。结合生物信息学分析的基因功能研究有助于更好地理解基因功能^[39–40]。本研究将从陆地棉群体高密度遗传图谱^[41]及数量性状基因座 (QTL) 定位^[42]中发掘陆地棉中拟南芥 *TOC1(APRR1)* 的同源基因 *GhPRR9* 进行家族分析和功能验证，预测 *GhPRR9* 的结构及可能行使的功能，并对 *GhPRR9* 功能加以验证，为培育早熟棉提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 生物信息学分析

陆地棉全基因组数据下载于 Cottongen^[43]，拟南芥全基因组数据下载于 TAIR^[44]，水稻 *Oryza sativa*、草棉 *Gherbaceum*、可可 *Theobroma caca*、玉米、大豆、毛果杨 *Populus trichocarpa* 基因组数据下载于 Phytozome^[45]。

根据拟南芥 PRR 亚家族的定义，在 Pfam 上获得 CCT (PF06203) 和 REC (PF00072) 结构域隐马模型，用 HMMER 扫描整个陆地棉基因组取交集，利用在线工具^[46]鉴别所筛选出的基因是否同时包含 CCT 和 REC 结构域，最终得到 *GhPRR* 家族基因成员。使用 ExPASy 网站^[47]分析工具和 WoLF 对家族成员进行蛋白理化性质分析。

用 MEGA^[48] 对 8 个物种的 PRR 亚家族蛋白进行多序列比对, 邻接法 JTT 模型构建系统进化树, 校验重复 100 次。用 DNAMAN 进行保守序列比对和绘制。

利用 TBtool^[49] 软件制作染色体定位图和 domain 结构; 使用 MEME^[50] 网站分析家族成员所含 Motif 并进行可视化。使用 Plant Care^[51] 分析 GhPRR 亚基因家族上游 2 000 bp 顺式启动子元件, 使用 TBtools 进行可视化。在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中下载陆地棉相关的表达数据 (序列号: PRJNA490626, 编号: 490626), 用 TBtools 绘制热图。

1.2 拟南芥阳性植株构建

提取陆地棉标准系 ‘TM-1’ 花蕾 RNA, 并用试剂盒 (CAT#037A) 反转录得到底物。使用 Primer 5 设计引物并扩增目标片段。使用 TaKaRa 纯化试剂盒 (9761) 纯化片段, pMD18-T Vector Cloning Kit (CAT# 6011) 连接 T 载。热激法转化 *DH5a* 感受态菌株, 活化涂板后挑单菌落进行菌液 PCR 分析, 选取合理条带单克隆测序。

以 T 载为模板克隆片段并连接至过表达载体, 热激转化农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, 筛选阳性单克隆后取带花序的健康拟南芥提前剪下角果。浸入活化农杆菌液侵染 1 min, 沥干后黑暗 1 d 正常培养, 收集种子为 T₀ 代。消毒播种 T₀ 代种子至相应抗性培养基上, 其中, 正常生长幼苗转入正常条件培养。筛选并验证拟南芥的阳性植株, 成熟后收取 T₁ 代种子, 如此培养至 T₃ 代。

1.3 启动子分析及 GUS 染色

从陆地棉基因组中提取 *GhPRR9* 起始密码子上游 2 000 bp 片段并预测顺式启动子元件。从陆地棉标准系 ‘TM-1’ 叶片 DNA 中分别克隆以起始编码为原点, 长 500、1 000、1 500 和 2 000 bp 的片段, *Xcm I* 酶切链接载体 pCXGUS-P, 热激法转入大肠埃希菌 *Escherichia coli*, 测序无误后将质粒转入农杆菌中侵染拟南芥得到种子。在卡那霉素培养基上播种筛选阳性植株培养至开花, 取相关组织染色并观察。

1.4 烟草瞬时转化

将完成转化的表达载体以及绿色荧光蛋白 (GFP) 空载体通过热激法转入农杆菌菌株 GV3101。培养后离心收集菌体重新悬浮, 注射幼嫩烟草下表皮。注射后的烟草黑暗培养 1 d 后恢复正常光照周期。取下表皮制成临时切片, 在激光共聚焦显微镜 (LSM880) 下观察记录影像。

1.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析

相对定量使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法, 内参基因为 *GhHistone3* (陆地棉) 和 *AtUBQ5* (拟南芥)。扩增程序为 95 °C 30 s, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 共 40 个循环。

陆地棉时空表达分析取样: 选取 4 个品种陆地棉材料的不同器官组织, 每个品种 20 株随机取样, 混合研磨。日周期节律分析: 取三叶期的陆地棉标准系 ‘TM-1’ 植株, 在人工气候室中培养 1 周后, 隔 4 h 取 1 次顶芽, 重复 3 株混样研磨。

1.6 病毒诱导沉默 (VIGS) 株系的构建

用 SGN VIGS Tool 设计最佳 VIGS 片段。以测序正确的 T 载为模板进行扩增, *SpeI* 和 *AseI* 酶切位点链接到 pCLCrVA 载体并转化至农杆菌 LBA4404 中。pCLCrVA-*GhPRR9*、pCLCrVA、pCLCrVA-PDS 重悬液分别与 pCLCrVB 的重悬液按体积比 1:1 混合均匀。

选取子叶完全展平, 第 1 片真叶尚未完全显形的健康植株进行注射。侵染后的陆地棉设置辅助对照、沉默株、烟草花叶病毒株和空白对照植株, 避光培养 1 d 后转入正常光照培养至开花, 记录现蕾开花时间。

2 结果与分析

2.1 陆地棉 GhPRR 亚家族基因特性分析

2.1.1 陆地棉 GhPRR 亚家族成员鉴定及定位分析 在陆地棉全基因组中共鉴定到 14 个 PRR 亚基因家族成员, 分别命名为 GhPRR1~GhPRR14 (表 1)。理化性质分析显示: PRR 亚家族成员蛋白有 552~775 个氨基酸, 相对分子量为 60.76~85.30 kDa, 平均等电点为 6.77, 酸性蛋白 8 个, 碱性蛋白 6 个。亚细胞定位结果显示: 有 11 个蛋白定位于细胞核中, 2 个定位于叶绿体, 1 个定位于内质网。

表 1 GhPRR 亚家族蛋白理化性质

Table 1 Physicochemical properties of protein in GhPRR subfamily

蛋白名称	染色体位置	等电点	分子量/kDa	氨基酸/个	亚细胞定位	亲水性
GhPRR1	ChrA03	5.49	53.53	487	细胞核	-0.876
GhPRR2	ChrA05	7.32	76.62	696	细胞核	-0.725
GhPRR3	ChrA05	8.07	81.80	743	叶绿体	-0.738
GhPRR4	ChrA05	8.55	60.76	552	细胞核	-0.834
GhPRR5	ChrA09	6.33	73.66	669	内质网	-0.592
GhPRR6	ChrA11	6.53	68.72	625	细胞核	-0.565
GhPRR7	ChrA11	5.16	73.11	665	细胞核	-0.688
GhPRR8	ChrA11	6.84	82.54	750	细胞核	-0.689
GhPRR9	ChrD03	5.66	61.96	563	细胞核	-0.743
GhPRR10	ChrD09	7.11	85.30	775	叶绿体	-0.677
GhPRR11	ChrD11	7.56	70.20	638	细胞核	-0.692
GhPRR12	ChrD11	5.62	72.77	661	细胞核	-0.622
GhPRR13	ChrD11	7.91	76.08	691	细胞核	-0.680
GhPRR14	ChrD12	6.67	70.92	645	细胞核	-0.742

用 TBtools 绘制出染色体定位图 (图 1A), 可观察到 GhPRR 家族基因保守分布在染色体两端, 14 个成员分布在 8 条染色体上, A 亚族 8 个, D 亚族 6 个, 其中 Chr A05、Chr A11、Chr D11 染色体上分别拥有 3 个该家族的基因, 其余染色体均为 1 个, 表明 GhPRR 亚家族在陆地棉 AD 亚基因组上呈现不完全均匀分布。

2.1.2 陆地棉 GhPRR 亚家族进化树及蛋白序列对比 从水稻、拟南芥、玉米、草棉、可可、大豆、毛果杨中分别鉴定出 5、6、9、9、24、35、49 个 PRR 亚家族成员, 与陆地棉 GhPRR 亚家族成员蛋白构建系统进化树 (图 1B)。聚类结果显示: 陆地棉 GhPRR 亚家族进化关系最接近的物种是草棉和可可。不同物种中该基因家族成员的数量差异较为明显, 也体现出 PRR 家族成员在不同物种中的多样性。

多重序列比对 (图 1C) 显示: 陆地棉 GhPRR 亚家族蛋白共有 4 处位点保守性较强, 其中有 2 个高度保守的 g 位点, 说明该家族拥有 2 段特征结构域 (REC 与 CCT)。

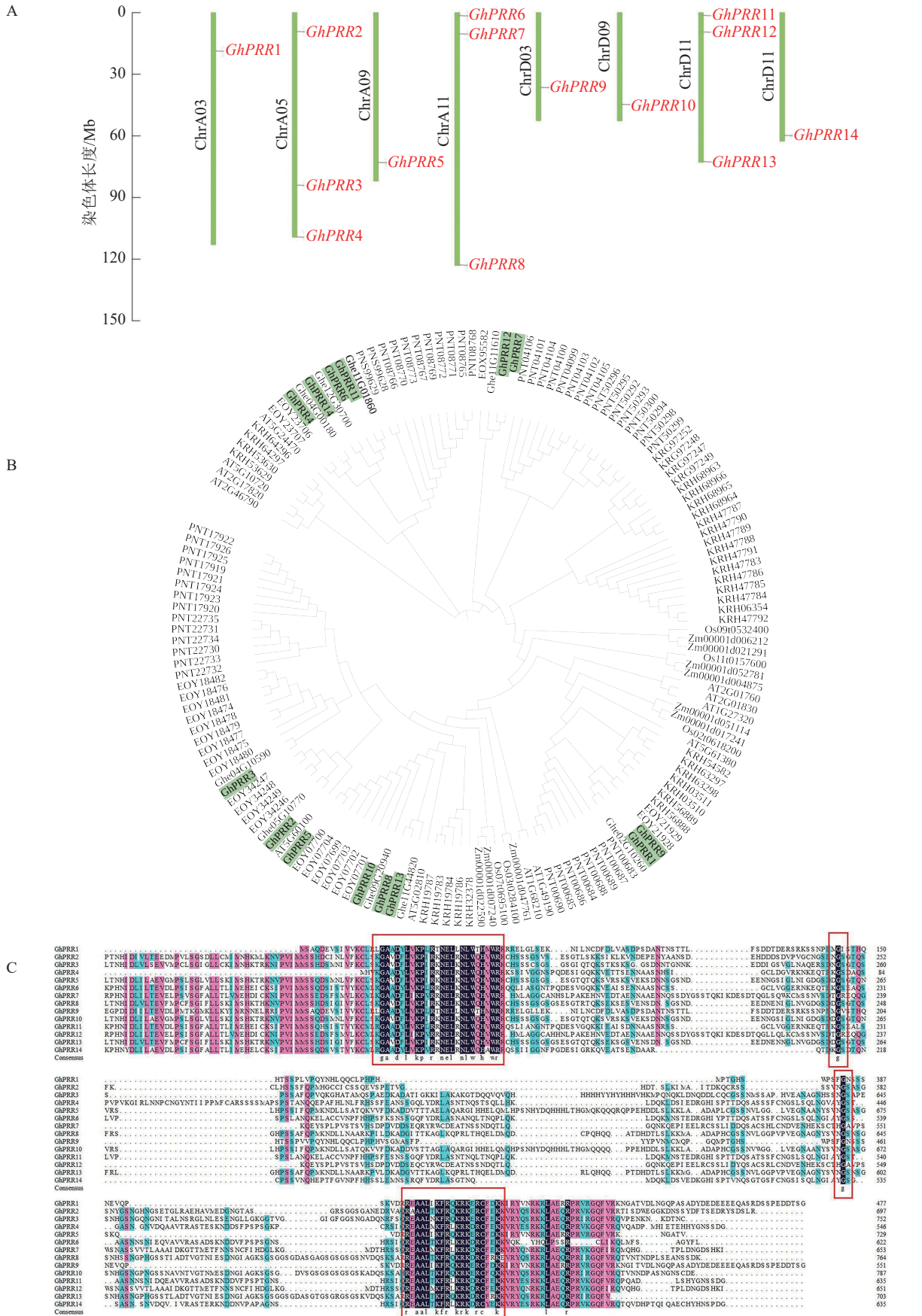
2.1.3 陆地棉 GhPRR 亚家族成员结构分析 蛋白结构分析显示: 14 个蛋白均含有 CCT 结构域 (图 2A)。GhPRR6、GhPRR1、GhPRR2、GhPRR4、GhPRR8 和 GhPRR13 含有 REC 超家族结构域 (cl19078), 其余成员含有 psREC_PRR 结构域 (cd17852, 属 cl19078 超家族), 亚家族成员有一定的保守性, REC 结构域主要功能为核酸识别, CCT 结构域主要标志转录因子, 以上 2 个结构的保守性显示了该家族成员的功能。

MEME 分析共得到 5 个保守基序 (图 2B)。除 GhPRR5 外其余成员均含有 Motif 2 和 Motif 5。GhPRR1 仅有 Motif 1, 没有 Motif 3 和 Motif 4, GhPRR4 没有 Motif 1、Motif 3 和 Motif 4, 其余成员都拥有 Motif 1、Motif 3 和 Motif 4。

基因结构 (图 2C) 显示: 该亚家族成员 *GhPRR1* 外显子最少 (5 个), *GhPRR2* 最多 (11 个), 其中, 5 个成员有 8 个外显子, 3 个成员有 9 个外显子, 2 个成员有 7 个外显子, 2 个成员有 6 个外显子。最长外显子在 3'端较为保守, 结构相似度和进化关系基本一致。

2.1.4 陆地棉 GhPRR 亚家族启动子顺式元件分析 使用 Plant Care 对陆地棉 GhPRR 亚家族成员上游 2 000 bp 顺式启动子元件进行分析 (图 2D) 发现: 主要存在三类顺式元件, 一是生长发育响应元件, 如光响应元件、生物钟控件; 二是激素响应元件, 如赤霉素、脱落酸等响应元件; 三是非生物胁迫元件, 如逆境、盐胁迫等响应元件。其中光响应元件最多 (184 个), 其次为赤霉素响应元件 (28 个)。说明该亚家族成员主要参与光响应和赤霉素通路。

2.1.5 陆地棉 GhPRR 亚家族成员表达分析 利用公开的转录组数据对陆地棉 GhPRR 亚家族成员进行组



A. 亚家族成员染色体定位; B. 亚家族成员进化关系, 高亮部分为该亚家族基因成员; C. 亚家族成员多序列对比, 红框圈出的部分表示高度保守位点。

图1 陆地棉 GhPRR 亚家族成员定位及多重序列对比
Figure 1 Mapping and multiple sequence comparison of GhPRR subfamily members in cotton

织表达分析 (图 2E) 发现：不同成员组织表达水平差异较大。其中茎叶和花药中表达量最高的是 *GhPRR4*，最少的分别是 *GhPRR8*、*GhPRR3* 和 *GhPRR2*。*GhPRR13* 和 *GhPRR9* 在花丝、花苞、花萼中表达量较高，*GhPRR2* 和 *GhPRR6* 最少。根中 *GhPRR13* 表达量最多，*GhPRR7* 最少，雌蕊花托中 *GhPRR13* 表达量最高，*GhPRR12* 和 *GhPRR2* 最少。*GhPRR4*、*GhPRR11* 和 *GhPRR6* 可能主要作用于维管组织，*GhPRR13* 和 *GhPRR9* 可能作用于花器官组织。

时间表达模式分析 (图 2F) 显示：除 *GhPRR7*、*GhPRR12*、*GhPRR2*、*GhPRR3* 和 *GhPRR10* 外，*GhPRR* 亚家族其他成员表达量均呈现开花前 3 d 至开花后 1 d 逐渐增加，开花后 3~5 d 逐渐降低的趋势，说明其可能集中在开花前和开花时发挥作用。*GhPRR7* 主要作用在开花后 5 d 及之后，*GhPRR12* 和 *GhPRR2* 可能较少参与开花过程。胚珠中 *GhPRR13* 表达量在第 10 天达到顶峰，说明它在胚珠发育前期可能发挥着一定的作用，*GhPRR10*、*GhPRR5*、*GhPRR9*、*GhPRR18*、*GhPRR3*、*GhPRR4* 和 *GhPRR14* 也呈现相似的趋势，说明这些基因可能拥有类似的作用模式。纤维发育期间，*GhPRR13*、*GhPRR10* 和 *GhPRR4* 表达量较高，说明这些基因可能参与纤维发育调控。时间模式上，*GhPRR13* 在 10~25 d 纤维中表达量持续下降，而 *GhPRR10* 和 *GhPRR4* 则表现出持续上升的趋势，可知 *GhPRR10* 和 *GhPRR4* 可能参与纤维发育的后期调控，而 *GhPRR13* 则参与早期的纤维发育调控。丰富的时空表达说明陆地棉 *GhPRR* 家族成员广泛参与到开花前后、胚珠和纤维的发育过程中。

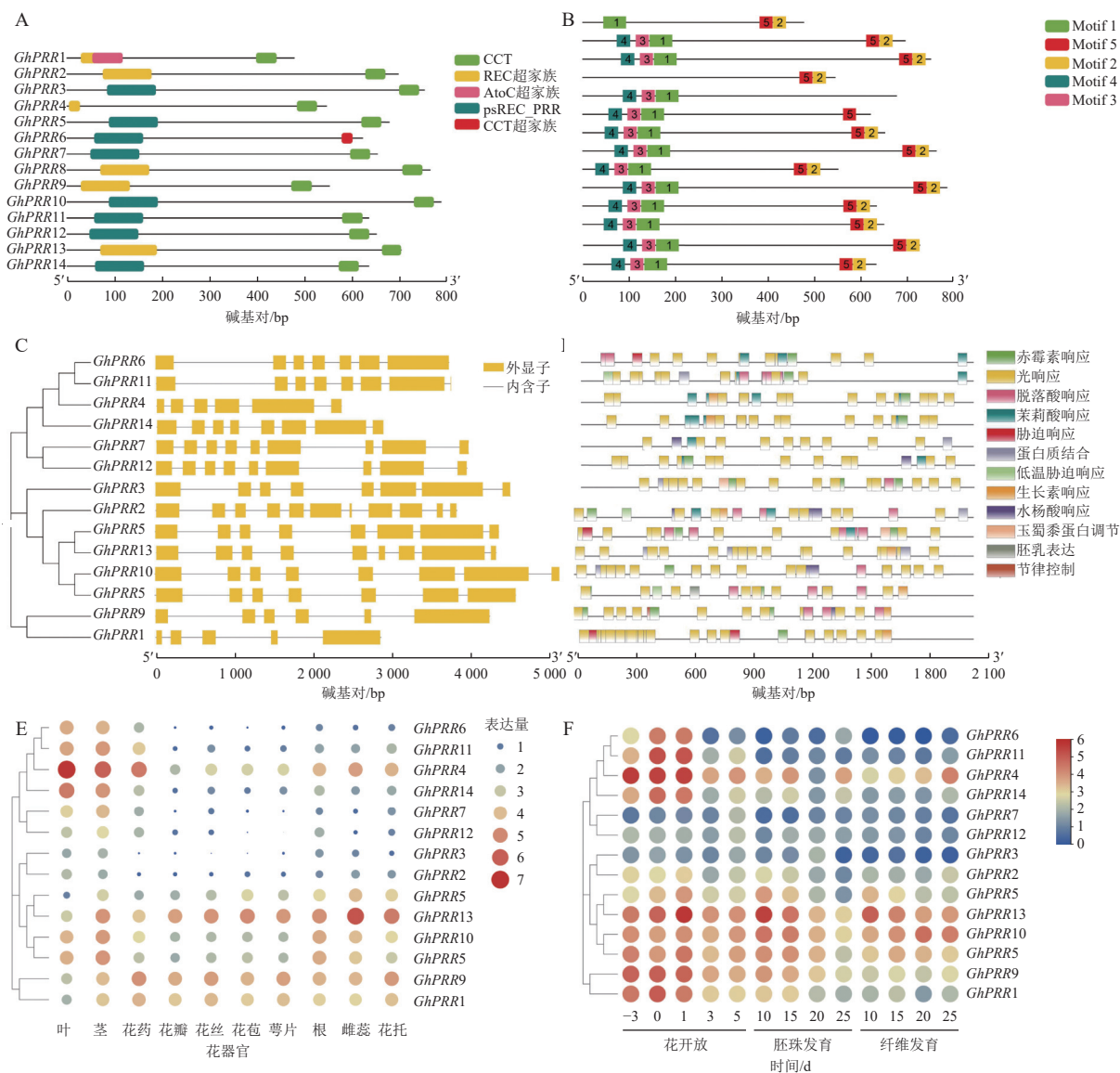


图 2 陆地棉 *GhPRR* 亚家族成员结构 (A~D) 及时空表达量 (E~F) 分析

Figure 2 Structure (A–D) and spatiotemporal expression (E–F) of *GhPRR* subfamily members in cotton

2.2 *GhPRR9* 基因启动子和表达特性分析

使用 Plant Care 在线工具对该基因上游 2 000 bp 进行启动子顺式元件分析 (表 2), 发现拟南芥 *AtTOC1* 的同源基因 *GhPRR9* 上存在着大量的光响应元件, 说明光对该基因的转录有着重要的调控作用。除此之外, 在 *GhPRR9* 基因的启动子区域还存在茉莉酸等激素响应元件, 说明该基因可能参与激素相关通路的调节。

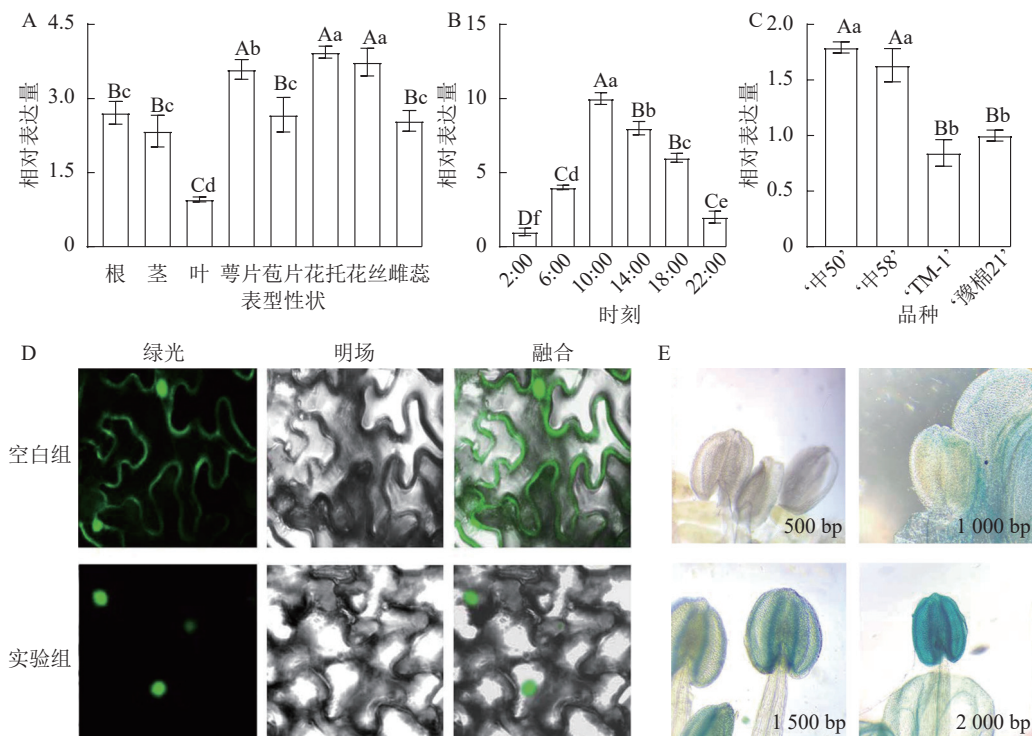
表 2 *GhPRR9* 启动子顺式元件预测

Table 2 Cis-acting element prediction of *GhPRR9* promoter

名称	起始位置/bp	所在链	功能	名称	起始位置/bp	所在链	功能
ARE	43	-	厌氧胁迫响应	TATA-box	635	-	核心元件
P-box	1 121	-	赤霉素响应	TATA-box	636	-	核心元件
G-box	167	+	光响应	Sp1	1 057	-	光响应
G-box	1 070	+	光响应	G-Box	1 009	-	光响应
A-box	882	-	顺式调节	ABRE	168	+	脱落酸响应
TCCC-motif	871	+	光响应	TGACG-motif	878	+	茉莉酸响应
CAAT-box	249	+	增强区域	TGACG-motif	1 991	-	茉莉酸响应
CAAT-box	354	+	增强区域	Box II	1 007	-	光响应
AE-box	535	-	光响应	Box 4	419	+	光响应
GATA-motif	710	+	光响应	MRE	1 513	-	光响应MYB结合
ATCT-motif	1 343	-	光响应	CGTCA-motif	878	-	茉莉酸响应
TATA-box	634	-	核心元件				

对陆地棉标准系 ‘TM-1’ 进行荧光定量分析 (图 3A) 表明: *GhPRR9* 在花丝、萼片、花托中表达量较高, 叶片最低, 表明 *GhPRR9* 可能更多参与陆地棉的生殖生长。

对在人工光照条件下陆地棉三叶期标准系 ‘TM-1’ 顶芽隔 4 h 取样并进行荧光定量分析 (图 3B) 表明: *GhPRR9* 在光照开始后逐渐积累, 并在中午达到顶峰, 之后慢慢下降, 在光周期内的表达呈现出一



A~C中不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$); D是放大800倍的图; E是放大80倍的图, 500 bp表示自转录起始位点开始上游500 bp长度的片段, 其余标注同理。

图 3 基因 *GhPRR9* 的时空表达量、亚细胞定位和启动子染色

Figure 3 Spatial and temporal expression of *GhPRR9* gene, subcellular localization and promoter staining

定的周期性。

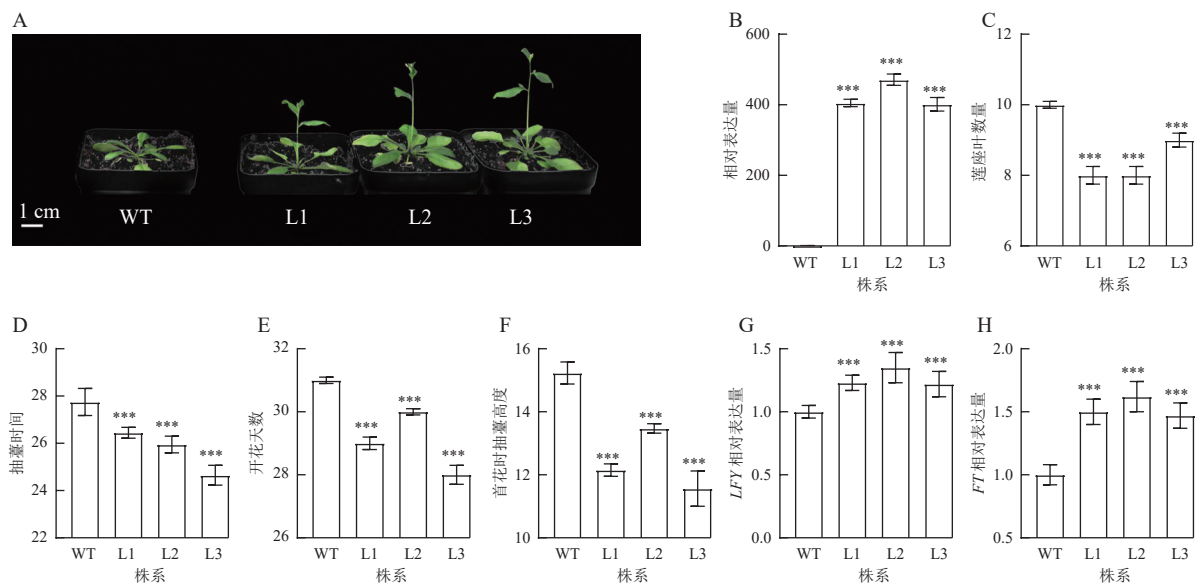
进一步对 *GhPRR9* 早熟品种‘中 50’‘ZHONG 50’、‘中 58’‘ZHONG 58’和晚熟品种‘TM-1’、‘豫棉 21 号’‘YM21’的表达量分析发现：*GhPRR9* 在早熟品种中表达量显著高于晚熟品种 (图 3C)，说明 *GhPRR9* 和早熟性状呈正向相关。

将未转化的 GFP 质粒和 35S::*GhPRR9*-GFP 质粒分别转入农杆菌 GV3101，并侵染烟草叶片组织，制作表皮切片置于激光共聚焦显微镜下发现：对照组分布于整个细胞中，而 GFP 融合蛋白荧光仅分布于细胞核 (图 3D)。

截取 *GhPRR9* 不同长度的启动子与携带 GUS 报告基因的质粒进行重组，分别转入农杆菌 GV3101 后通过沾花法侵染拟南芥，获得纯合转基因株系染色观察，结果显示上游 500 bp 启动子几乎没有表达 (图 3E)，而上游 2 000 bp 的启动子着色程度最深，说明 *GhPRR9* 启动子上游 500~2 000 bp 内可能存在关键调控元件诱导基因的表达。

2.3 *GhPRR9* 在拟南芥中的功能分析

将拟南芥 *GhPRR9* 过表达株系培养至抽薹，并观察表型性状 (图 4A) 发现：过表达株系 *GhPRR9* 表达量比野生型明显提高 (图 4B)，且转基因过表达株系连座叶数量明显减少 (图 4C)，抽薹时间和开花提前 (图 4D 和图 4E)，首花抽薹高度极显著矮于野生型 (图 4F， $P < 0.01$)，说明 *GhPRR9* 正向调控植物的早花性状。过表达 *GhPRR9* 能促进开花关键基因 *LFY* 与 *FT* 表达 (图 4G 和图 4H)，表明 *GhPRR9* 也可能通过影响关键基因表达调控通路进而影响开花时间。



A为过表达株系表型。WT表示野生型对照株系；L1~L3分别表示不同过表达株系。***表示与对照(野生型)相比差异极显著($P < 0.01$)。

图 4 拟南芥过表达株系的表型及表达量

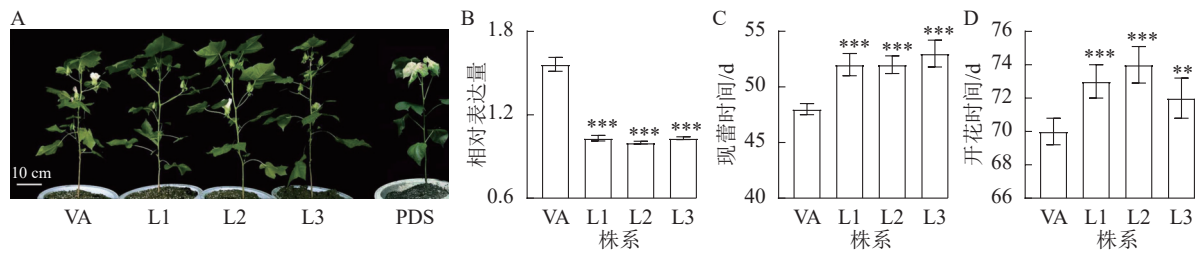
Figure 4 Phenotype and expression levels of *A. thaliana* overexpressed strains

2.4 病毒诱导 (VIGS) 的 *GhPRR9* 基因沉默实验

对 VIGS 沉默株系进行表达量检测发现：沉默株系中，*GhPDS* 株系出现白化表型 (图 5A)，且 *GhPRR9* 的表达量极显著降低 (图 5B， $P < 0.01$)，表明 *GhPRR9* 基因成功得到了沉默。与对照株系相比，沉默株系现蕾时间延迟约 3~4 d，开花时间延迟约 2~5 d，表明沉默 *GhPRR9* 可推迟开花时间，反向证明其调节陆地棉早花的功能。

3 讨论

本研究共鉴定出陆地棉 14 个 *GhPRR* 亚家族成员，成员含有 CCT 和 REC 保守结构域，说明其行使转录因子功能。转录组分析显示：大部分成员主要在开花前的茎叶、纤维发育后期和胚珠发育中期发挥作用，表明大部分成员可能存在功能冗余或协同拮抗作用。启动子元件分析显示：陆地棉 *GhPRR* 亚家



A为沉默株系表型。VA表示对照株系；L1~L3表示沉默株系；PDS表示烟草花叶病毒株。***表示沉默株系与对照株系相比差异极显著 ($P < 0.01$)；**表示沉默株系与对照株系相比差异显著 ($P < 0.05$)。

图5 陆地棉病毒诱导(VIGS)植株的表型及影响

Figure 5 Phenotype and effect of *G. hirsutum* virus induced silencing (VIGS) plants

族可能频繁地参与光感效应相关的生理过程，这与在拟南芥的结果中一致，据此可推测其与拟南芥同源基因作用相似。进化分析表明：陆地棉 *GhPRR* 亚家族成员基因数量多于拟南芥。前人研究也发现：棉花基因组进化加倍使该家族基因得到了扩增^[52]。

对过表达株系研究发现：抽薹日期、开花日期都稍有提前，抽薹高度显著高于同期野生型植株，证明 *GhPRR9* 可以使拟南芥花期提前。构建 GFP 表达载体侵染烟草叶片，表明 *GhPRR9* 蛋白定位于细胞核，与生物信息学分析相互印证，进一步确认该基因行使转录因子的功能。对 *GhPRR9* 基因 1 d 内表达水平分析显示：光暗交替条件下基因表达量存在着周期性变化，按照其表达模式推断该基因在光照开始后积累，中午达到顶峰后慢慢下降，这与拟南芥同源基因的表达模式^[53] 相似，据此推测，陆地棉早花基因 *GhPRR9* 可能与拟南芥中的同源基因行使着类似的功能。陆地棉三叶期叶片的基因表达量结果显示：*GhPRR9* 基因在早熟种中表达量高于晚熟种，据此可推断其与早熟性状有正向关联。构建 VIGS 株系发现：沉默株系高度降低，生育期推迟，反向证明了其促进生育期的功能。启动子分析显示：光和赤霉素可能影响该基因的转录。GUS 染色结果显示：启动子上游 500~2 000 bp 可能存在关键调控元件。有研究显示：陆地棉转录因子与通路主要基因启动子的结合可随温度产生变化^[54]，且同源转录因子可能存在相互调控的作用^[55]。

4 结论

本研究预测了陆地棉 *GhPRR* 亚家族的功能和作用模式，找到拟南芥早花基因 *AtTOC1* 的陆地棉同源基因 *GhPRR9*，并成功克隆，构建遗传转化株系对其功能进行验证显示：*GhPRR9* 对早花性状存在正向促进作用。

5 参考文献

- [1] 喻树迅. 中国棉花产业百年发展历程[J]. 农学学报, 2018, 8(1): 85-91.
YU Shuxun. 100 years of development of China's cotton industry [J]. *Journal of Agriculture*, 2018, 8(1): 85-91.
- [2] 喻树迅, 王寒涛, 魏恒玲, 等. 棉花早熟性研究进展及其应用[J]. 棉花学报, 2017, 29(增刊 1): 1-10.
YU Shuxun, WANG Hantao, WEI Hengling, *et al.* Research progress and application of early maturity in upland cotton [J]. *Cotton Science*, 2017, 29(suppl 1): 1-10.
- [3] 李培良, 雷亚平, 李亚兵, 等. 中国棉花产业发展现状与未来展望[J]. 农业展望, 2016, 12(12): 38-45.
LI Peiliang, LEI Yaping, LI Yabing, *et al.* Development status quo of China's cotton industry and its outlook [J]. *Agricultural Outlook*, 2016, 12(12): 38-45.
- [4] 喻树迅. 我国棉花生产现状与发展趋势[J]. 中国工程科学, 2013, 15(4): 9-13.
YU Shuxun. Present situation and development trend of cotton production in China [J]. *Strategic Study of CAE*, 2013, 15(4): 9-13.
- [5] BÄURLE I, DEAN C. The timing of developmental transitions in plants [J]. *Cell*, 2006, 125(4): 655-664.
- [6] YU Sha, CAO Li, ZHOU Chuanmiao, *et al.* Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants [J/OL]. *eLife*, 2013, 2: e00269 [2024-03-20]. DOI: 10.7554/eLife.00269.
- [7] 刘永平, 杨静, 杨明峰. 植物开花调控途径[J]. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1553-1566.

- LIU Yongping, YANG Jing, YANG Mingfeng. Pathways of flowering regulation in plants [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, **31**(11): 1553–1566.
- [8] HELLIWELL C A, WOOD C C, ROBERTSON M, *et al.* 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.
- [9] SRIKANTH A, SCHMID M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, **68**(12): 2013–2037.
- [10] ANDRÉS F, COUPLAND G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2012, **13**(9): 627–639.
- [11] CHOWDHURY Z, MOHANTY D, GIRI M K, *et al.* Dehydroabietinal promotes flowering time and plant defense in *Arabidopsis* via the autonomous pathway genes FLOWERING LOCUS D, FVE, and RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2020, **71**(16): 4903–4913.
- [12] TURCK F, FORNARA F, COUPLAND G. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, **59**(1): 573–594.
- [13] LI Xu, MA Dingbang, LU S X, *et al.* Blue light- and low temperature-regulated COR27 and COR28 play roles in the *Arabidopsis* circadian clock [J]. *The Plant Cell*, 2016, **28**(11): 2755–2769.
- [14] ROSAS U, MEI Yu, XIE Qiguang, *et al.* Variation in *Arabidopsis* flowering time associated with cis-regulatory variation in *CONSTANS* [J/OL]. *Nature Communications*, 2014, **5**(1): 3651 [2024-03-20]. DOI: [10.1038/ncomms4651](https://doi.org/10.1038/ncomms4651).
- [15] VALVERDE F, MOURADOV A, SOPPE W, *et al.* Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering [J]. *Science*, 2004, **303**(5660): 1003–1006.
- [16] LEE K, MAS P, SEO P J. The EC-HDA9 complex rhythmically regulates histone acetylation at the *TOC1* promoter in *Arabidopsis* [J/OL]. *Communications Biology*, 2019, **2**: 143 [2024-03-20]. DOI: [10.1038/s42003-019-0377-7](https://doi.org/10.1038/s42003-019-0377-7).
- [17] SOY J, LEIVAR P, GONZÁLEZ-SCHAIN N, *et al.* Molecular convergence of clock and photosensory pathways through *PIF3-TOC1* interaction and co-occupancy of target promoters [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, **113**(17): 4870–4875.
- [18] ARANA M V, TOGNACCA R S, ESTRAVIS-BARCALÁ M, *et al.* Physiological and molecular mechanisms underlying the integration of light and temperature cues in *Arabidopsis thaliana* seeds [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2017, **40**(12): 3113–3121.
- [19] DELIS C, KROKIDA A, TOMATSIDOU A, *et al.* AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants [J]. *RNA Biology*, 2016, **13**(1): 68–82.
- [20] HEMMES H, HENRIQUES R, JANG I C, *et al.* Circadian clock regulates dynamic chromatin modifications associated with *Arabidopsis* *CCA1/LHY* and *TOC1* transcriptional rhythms [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2012, **53**(12): 2016–2029.
- [21] FARINAS B, MAS P. Histone acetylation and the circadian clock: a role for the MYB transcription factor *RVE8/LCL5* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, **6**(4): 541–543.
- [22] LEGNAIOLI T, CUEVAS J, MAS P. *TOC1* functions as a molecular switch connecting the circadian clock with plant responses to drought [J]. *The EMBO Journal*, 2009, **28**(23): 3745–3757.
- [23] ITO S, KAWAMURA H, NIWA Y, *et al.* A genetic study of the *Arabidopsis* circadian clock with reference to the TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (*TOC1*) gene [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2009, **50**(2): 290–303.
- [24] PARA A, FARRÉ E M, IMAIZUMI T, *et al.* *PRR3* is a vascular regulator of *TOC1* stability in the *Arabidopsis* circadian clock [J]. *The Plant Cell*, 2007, **19**(11): 3462–3473.
- [25] FUJIWARA S, WANG Lei, HAN Linqi, *et al.* Post-translational regulation of the *Arabidopsis* circadian clock through selective proteolysis and phosphorylation of pseudo-response regulator proteins [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**(34): 23073–23083.
- [26] THAIN S C, VANDENBUSSCHE F, LAARHOVEN L J J, *et al.* Circadian rhythms of ethylene emission in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, **136**(3): 3751–3761.
- [27] WANG Cuiling, WANG Leili, LIU Qingqing, *et al.* Genome-wide identification and characterization of *PRR* gene family and their diurnal rhythmic expression profile in maize [J/OL]. *International Journal of Genomics*, 2022, **2022**: 6941607 [2024-03-20]. DOI: [10.1155/2022/6941607](https://doi.org/10.1155/2022/6941607).

- [28] WANG Peiguo, WANG Liwei, ZHANG Lixin, *et al.* Genomic dissection and diurnal expression analysis reveal the essential roles of the PRR gene family in geographical adaptation of soybean [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**(17): 9970[2024-03-20]. DOI: [10.3390/ijms23179970](https://doi.org/10.3390/ijms23179970).
- [29] 王浩, 卢银, 顾爱侠, 等. 大白菜 *lcc-1* 突变体生物钟核心基因在不同光周期下的表达分析[J]. 河北农业大学学报, 2019, **42**(4): 21–28.
WANG Hao, LU Yin, GU Aixia, *et al.* Expression analysis of key clock genes of *lcc-1* mutant from Chinese cabbage under different photoperiods [J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2019, **42**(4): 21–28.
- [30] 甘卓然, 石文茜, 黎永力, 等. 大豆生物钟基因 *GmLNK1/2*、*GmRVE4/8* 和 *GmTOC1* CRISPR/Cas9 组织表达分析及敲除靶点的鉴定[J]. 作物学报, 2020, **46**(8): 1291–1300.
GAN Zhuoran, SHI Wenqian, LI Yongli, *et al.* Identification of CRISPR/Cas9 knockout targets and tissue expression analysis of circadian clock genes *GmLNK1/2*, *GmRVE4/8*, and *GmTOC1* in soybean [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, **46**(8): 1291–1300
- [31] 刘璇, 张丽, 巩楠, 等. 生物钟对植物非生物胁迫应答调控的进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, **38**(9): 4160–4166.
LIU Xuan, ZHANG Li, GONG Lei, *et al.* Progress of circadian clock regulation of abiotic stress response in plants [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, **38**(9): 4160–4166.
- [32] LI Xiao, WU Yuanlong, CHI Huabin, *et al.* Genome-wide identification and characterization of the genes involved in the flowering of cotton [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, **23**(14): 7940[2024-03-20]. DOI: [10.3390/ijms23147940](https://doi.org/10.3390/ijms23147940).
- [33] YIN Xiaoyu, LIU Ye, ZHAO Hang, *et al.* *GhCOL2* positively regulates flowering by activating the transcription of *GhHD3A* in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J/OL]. *Biochemical Genetics*, 2024[2024-03-20]. DOI: [10.1007/s10528-024-10727-3](https://doi.org/10.1007/s10528-024-10727-3).
- [34] 柳晔. 陆地棉 CO 蛋白对 FT 的调控研究[D]. 曲阜: 曲阜师范大学, 2021.
LIU Ye. *Regulation of CO Protein on FT in Upland Cotton* [D]. Qufu: Qufu Normal University, 2021.
- [35] 张盼, 范术丽, 宋美珍, 等. 陆地棉开花相关基因 *GhFLP1* 的克隆与功能验证[J]. 棉花学报, 2016, **28**(3): 199–207.
ZHANG Pan, FAN Shuli, SONG Meizhen, *et al.* Cloning and functional analysis of the flowering-related gene *GhFLP1* from upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Cotton Science*, 2016, **28**(3): 199–207.
- [36] 李洁, 范术丽, 宋美珍, 等. 陆地棉 *GhSPL3* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[J]. 棉花学报, 2012, **24**(5): 414–419.
LI Jie, FAN Shuli, SONG Meizhen, *et al.* Cloning, subcellular localization and expression analysis of *GhSPL3* gene in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Cotton Science*, 2012, **24**(5): 414–419.
- [37] 张爱, 王彩香, 宿俊吉, 等. 陆地棉 MADS-box 家族基因鉴定及组织特异性表达分析[J]. 棉花学报, 2020, **32**(5): 404–417.
ZHANG Ai, WANG Caixiang, SU Junji, *et al.* Identification of MADS-box family and analysis of tissue specific expression in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Cotton Science*, 2020, **32**(5): 404–417.
- [38] CHENG Xiaoqian, WANG Hantao, WEI Hengling, *et al.* The MADS transcription factor *GhAP1.7* coordinates the flowering regulatory pathway in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J/OL]. *Gene*, 2021, **769**: 145235[2024-03-20]. DOI: [10.1016/j.gene.2020.145235](https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145235).
- [39] 孟超敏, 耿翡翠, 卿桂霞, 等. 陆地棉磷高效基因 *GhMGD3* 的克隆与表达分析[J]. 浙江农林大学学报, 2022, **39**(6): 1203–1211.
MENG Chaomin, GENG Feifei, QING Guixia, *et al.* Cloning and expression of phosphorus efficient gene *GhMGD3* in *Gossypium hirsutum* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, **39**(6): 1203–1211.
- [40] 孟超敏, 耿翡翠, 卿桂霞, 等. 陆地棉低磷胁迫应答基因 *GhGDPD1* 的克隆与表达分析[J]. 浙江农林大学学报, 2023, **40**(4): 723–730.
MENG Chaomin, GENG Feifei, QING Guixia, *et al.* Cloning and expression analysis of low phosphorus stress response gene *GhGDPD1* in *Gossypium hirsutum* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2023, **40**(4): 723–730.
- [41] LI Libei, ZHAO Shuqi, SU Jinji, *et al.* High-density genetic linkage map construction by F₂ populations and QTL analysis of early-maturity traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J/OL]. *PLoS One*, 2017, **12**(8): e0182918[2024-03-20]. DOI: [10.1371/journal.pone.0182918](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182918).

- [42] LI Libei, ZHANG Chi, HUANG Jianqing, *et al.* Genomic analyses reveal the genetic basis of early maturity and identification of loci and candidate genes in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, **19**(1): 109–123.
- [43] YU Jing, JUNG S, CHENG Chunhui, *et al.* CottonGen: the community database for cotton genomics, genetics, and breeding research [J/OL]. *Plants*, 2021, **10**(12): 2805 [2024-03-20]. DOI: [10.3390/plants10122805](https://doi.org/10.3390/plants10122805).
- [44] SWARBRECK D, WILKS C, LAMESCH P, *et al.* The *Arabidopsis* information resource (TAIR): gene structure and function annotation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, **36**(D1): D1009–D1014.
- [45] GOODSTEIN D M, SHU Shengqiang, HOWSON R, *et al.* Phytozome: a comparative platform for green plant genomics [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(D1): D1178–D1186.
- [46] LU Shennan, WANG Jiyao, CHITSAZ F, *et al.* CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, **48**(D1): D265–D268.
- [47] ARTIMO P, JONNALAGEDDA M, ARNOLD K, *et al.* ExPASy: SIB bioinformatics resource portal [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, **40**(W1): W597–W603.
- [48] KUMAR S, STECHER G, LI M, *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, **35**(6): 1547–1549.
- [49] CHEN Chengjie, WU Ya, LI Jiawei, *et al.* TBtools- II : A “one for all, all for one” bioinformatics platform for biological big-data mining [J]. *Molecular Plant*, 2023, **16**(11): 1733–1742.
- [50] BAILEY T L, JOHNSON J, GRANT C E, *et al.* The MEME Suite [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, **43**(W1): W39–W49.
- [51] LESCOT M. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**(1): 325–327.
- [52] WANG Jingjing, DU Zhaohai, HUO Xuehan, *et al.* Genome-wide analysis of PRR gene family uncovers their roles in circadian rhythmic changes and response to drought stress in *Gossypium hirsutum* L. [J/OL]. *PeerJ*, 2020, **8**: e9936 [2024-03-20]. DOI: [10.7717/peerj.9936](https://doi.org/10.7717/peerj.9936).
- [53] RONALD J, DAVIS S J. Making the clock tick: the transcriptional landscape of the plant circadian clock [J/OL]. *F1000Research*, 2017, **6**: 951 [2024-03-20]. DOI: [10.12688/f1000research.11319.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.11319.1).
- [54] LIU Lingyun, JIA Mingzhu, WANG Shengnan, *et al.* Identification and characterization of cotton PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS in temperature-dependent flowering [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, **74**(12): 3765–3780.
- [55] ZHANG Xiaohong, REN Zhongying, HU Genhai, *et al.* Functional divergence of *GhAP1.1* and *GhFUL2* associated with flowering regulation in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J/OL]. *Journal of Plant Physiology*, 2022, **275**: 153757 [2024-03-20]. DOI: [10.1016/j.jplph.2022.153757](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2022.153757).