

李 慧,李 爱,彭立新,等. 杨树 *EBP1* 基因的克隆与表达载体构建[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):14-17.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.005

杨树 *EBP1* 基因的克隆与表达载体构建

李 慧,李 爱,彭立新,阎国荣

(天津农学院园艺园林学院,天津 300384)

摘要:器官大小是植物形态的重要表现特征之一,也是决定一些作物或经济植物产量和品质的重要因素。研究证实,草本植物如拟南芥中 *EBP1* 类转录因子可从细胞数量和体积 2 个方面同时调控植物器官大小,但该基因在木本植物杨树中的结构及功能仍未知。本研究依托杨树全基因组及 EST 数据信息,采用生物信息学方法结合基因同源序列克隆,首次对杨树中的 *EBP1* 全长 cDNA 进行克隆及序列分析,同时成功构建了用于遗传转化的过表达载体。

关键词:杨树;*EBP1* 基因;克隆;表达载体;构建;基因序列分析;蛋白同源性比对

中图分类号: Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0014-03

自然界中植物种类繁多,形态各异,其中器官大小是造成植物形态多样性的主要因素之一。不同植物间器官大小可能存在显著差异,但就同一物种内相同基因型的不同植物个体而言,在相同的生长环境下它们的器官大小基本一致,表明植物各器官最终大小的形成受到严格的遗传调控^[1]。因此,近年来从不同植物中挖掘参与器官大小发育调控的基因或转录因子并揭示其调控机制的研究备受关注,并已在拟南芥和一些农作物如水稻、玉米、油菜、番茄、马铃薯等中取得了长足的研究进展^[1-2]。有研究发现,在外界生长条件一致的情况下,植物各器官的最终大小在细胞水平上受细胞数量和大小的协同控制^[3]。因此,分离、克隆参与调控植物细胞数量和大小基因并阐释其功能是揭示植物器官大小发育控制机制的关键。目前,在拟南芥等草本植物中已有多个相关基因和转录调控因子被成功分离和克隆。有研究表明,*AINTEGUMENTA* (*ANT*)^[4]、*ANGUSTIFOLIA3* (*AN3*)^[5]、*GROWTH - REGULATING FACTOR5* (*AtGRF5*)^[5]、*GRF - INTERACTING FACTOR* (*GIF*)^[6-7]、*JAGGED* (*JAG*)^[8]、*STRUWWELPETER* (*SWP*)^[9]、*SWELLMAP1* (*SMPI*)^[10]、*KLUH* (*KLU*)^[11]、*EBP1*^[12] 及 *Auxin - Regulated Gene involved in Organ Size* (*ARGOS*)^[13-14] 等主要通过正向调控细胞增殖能力控制器官内细胞数量,进而影响器官大小。这些基因的异位过表达可通过延长细胞增殖时间导致植物器官变大,而突变则会导致植株器官整体变小。另外,还有一些基因通过调控细胞大小来影响器官的大小,如 *ARGOS - LIKE* (*ARL*)^[15]、*ROTUNDIFOLIA3* (*ROT3*)^[16]、*AtGRF1/2*^[17]、*BIGPETAL*^[18]、*AtTOR*^[19]、*ORGAN SIZE RELATED1* (*OSRI*)^[20] 等,其中拟南芥中 *EBP1* 被证实对植物细胞数量和大小均能发挥正向调控作用^[12]。拟南芥 *EBP1* 是和人类

的 *ErbB-3* 表皮生长因子受体结合蛋白同源的一个基因,与核糖体的生物合成相关,该基因在进化上具有较高的保守性。目前除在拟南芥外,在沙冬青和马铃薯中也有该基因序列的相关报道,但该基因在其他植物中的功能仍未知,特别是在木本植物中,尚未有该基因的相关报道。因此,本研究对杨树中 *EBP1* 基因进行克隆,并对其表达载体进行构建。相关研究对进一步揭示杨树 *EBP1* 的功能具有重要意义,同时对采用基因工程等手段提高林木产量和品质具有潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黑杨 (*Populus nigra*), 种植于南开大学校园内;pEASY-T1 载体,购于北京全式金生物技术有限公司;植物表达载体 pBI121、农杆菌 LBA4404,均由笔者所在实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 黑杨总 RNA 提取及反转录 采用改良的 CTAB 法提取黑杨叶片总 RNA,以 Oligo dT (18) 为逆转录引物,在 M-MLV 作用下逆转录成 cDNA。

1.2.2 引物设计及同源克隆 以拟南芥及其他草本植物中已经报道的 *EBP1* 基因 DNA 及 cDNA 序列为种子序列,利用 Blast 序列比对软件搜索杨树基因组及 EST 数据库,获得杨树中候选 *EBP1* 基因序列。随后根据筛选,获得的杨树中 *EBP1* 候选序列设计引物,进行扩增,并对扩增结果进行测序验证。进一步对 NCBI 数据库中收集的杨树 *EBP1* 相关 EST 序列进行分析,结合测序结果,对杨树中 *EBP1* 基因全长 cDNA 序列进行克隆及序列分析。

1.2.3 杨树 *EBP1* 表达载体构建及分子鉴定 根据已获得的杨树 *EBP1* 候选基因全长 cDNA 序列,设计带有酶切位点的全长 cDNA 扩增引物,对 *EBP1* 全长 cDNA 进行扩增及 T-A 克隆。挑取含有杨树 *EBP1* 全长 cDNA 的阳性克隆,放大培养并提取质粒,通过双酶切获得带有黏性末端的 *EBP1* 全长 cDNA 序列。进而与经过相同双酶切的植物表达载体 pBI121 采用 T₄ 连接酶进行连接,最终获得 *EBP1* 重组表达载体。将重组载体转入大肠杆菌感受态细胞,在 LB + 卡那霉素 (Kan) 板上筛选阳性克隆进行菌液 PCR 和酶切验证,进而获

收稿日期:2014-05-25

基金项目:天津市高等学校科技发展基金(编号:20120619);天津市应用基础与前沿技术研究计划(编号:14JCQNJC15000)。

作者简介:李 慧(1981—),女,河北廊坊人,硕士,讲师,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:lihui@tjau.edu.cn。

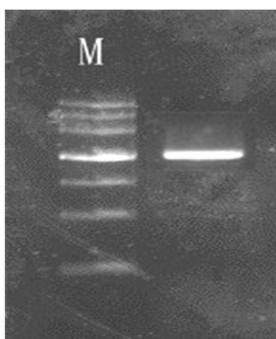
通信作者:阎国荣,博士,教授,主要从事植物资源学研究。E-mail:yangguorong@eyou.com。

得插入方向和序列完全正确的阳性克隆。随后将该阳性克隆放大培养,采用质粒提取试剂提取重组质粒,并采用冻融法将该重组质粒导入农杆菌 LBA4404 感受态细胞,在 YEB + 链霉素(str) + 利福平(Rif)板上筛选阳性克隆进行菌液 PCR 验证。

2 结果与分析

2.1 杨树 *EBP1* 基因的克隆

根据序列同源性分析结果,设计引物对 *EBP1* - 1F:5' - ATGTCGTCAGACGACGAGA - 3' 和 *EBP1* - 1R:5' - TTCCTA-GACGGCGGTGG - 3',以黑杨 cDNA 为模板对杨树中 *EBP1* 候选基因进行克隆。扩增结果显示,黑杨中 *EBP1* 候选基因全长 cDNA 约为 1.2 kb(图 1)。将获得的 cDNA 通过 T - A 克隆方法,连入 pEASY - T 载体,挑取阳性克隆进行测序。测序结果显示,杨树中 *EBP1* 基因全长 cDNA 序列长度为 1 215 bp,将其命名为 *PtEBP1*。



M—marker III
图1 *PtEBP1* 全长 cDNA 扩增结果

2.2 杨树 *PtEBP1* 的生物信息学分析

根据测序结果,对获得的 *PtEBP1* 进行进一步的序列分析。同源性比对结果显示,*PtEBP1* 与已报道的沙冬青和马铃薯 *EBP1* 基因具有较高的同源性,其中与沙冬青 *EBP1* 蛋白序

列的同源性为 89%,与马铃薯 *EBP1* 蛋白同源性为 87%(图 2)。保守结构域分析结果显示 *PtEBP1* 含有 1 个 PA2G4 - like - domain,这个结构域属于 APP_MetAP 超家族(图 3)。由此推测杨树 *PtEBP1* 基因应属于转录因子 APP_MetAP 超家族的一个成员。

steBP1	.MSDDEREERELDLTISPEVVTYKKA AEIVNKALQIVLSE	39
amEBP1	.MSDDEREERELDLTISPEVVTYKKA AEIVNKALQIVLSE	39
ptEBP1	MSDDEREERELDLTISPEVVTYKKA AEIVNKALQIVLSE	40
Consensus	sdderee eldl spevvtkyk aaeivnkali se	
steBP1	CKPKKIVDI CEKGDAITREQICGNMYKNVKKIERGVAFP	79
amEBP1	CKPKKIVDI CEKGDSYIREQICGNMYKNVKKIERGVAFP	79
ptEBP1	CKPKKIVDI CEKGDSYIREQICGNMYKNVKKIERGVAFP	80
Consensus	ckpk kivd cekgd i eq gn yknv kiergvafp	
steBP1	TCISVNNVTCHFSPLASDEITVEEGDIIKIDMGCHIDGFI	119
amEBP1	TCISVNNVTCHFSPLASDEITVEEGDIIKIDMGCHIDGFI	119
ptEBP1	TCISVNNVTCHFSPLASDEITVEEGDIIKIDMGCHIDGFI	120
Consensus	tc svnnvtchf splasde eegd kidm chidgfi	
steBP1	AVVGHTHVLEHGSPVTGRAADVIAAANTA AEVALRLVRPGK	159
amEBP1	AAVAHTHVLEHGSPVTGRAADVIAAANTA AEVALRLVRPGK	159
ptEBP1	AVVGHTHVLEHGSPVTGRAADVIAAANTA AEVALRLVRPGK	160
Consensus	a v hthvl gpvtgraadvi aanta aeavalrlvrpgk	
steBP1	KNSDVTIAIQKVAAYDCKIVEGVLSHQKQFVIDGNKVW	199
amEBP1	KNKDVTIAIQKVAAYDCKIVEGVLSHQKQFVIDGNKVW	199
ptEBP1	KNKDVTIAIQKVAAYDCKIVEGVLSHQKQFVIDGNKVW	200
Consensus	kn dvt aigkvaaydckivegvlshq kqfvidgnkv	
steBP1	LSVSNPDTRVDAEAEFEENEVYSIDITVSTGCGKPKLLDEK	239
amEBP1	LSVSNPDTRVDAEAEFEENEVYSIDITVSTGCGKPKLLDEK	239
ptEBP1	LSVSNPDTRVDAEAEFEENEVYSIDITVSTGCGKPKLLDEK	240
Consensus	ls snpdtrvd aeefeenevy di tstg gkpklldek	
steBP1	QTTIYKRAVDKSYLKMKS RFI FSEINCKFPIMPFSARA	279
amEBP1	QTTIYKRAVDKSYLKMKS RFI FSEINCKFPIMPFSARA	279
ptEBP1	TTTIYKRAVDKSYLKMKS RFI FSEINCKFPIMPFSARA	280
Consensus	ttiikravdk y lkmk srifi fseinqkfpimpf ar	
steBP1	IEEKRARLGLVECVNHLLQPYFVLHEKPGDVAHIKFTV	319
amEBP1	.IEEKRARLGLVECVNHLLQPYFVLHEKPGDVAHIKFTV	318
ptEBP1	IEEKRARLGLVECVNHLLQPYFVLHEKPGDVAHIKFTV	320
Consensus	eekrarlglvecvnh llqpyfvlhekp gdvahikftv	
steBP1	LLMPNGSDRVTSHVLQELQPTKTIDTPEIRALALCTKT	359
amEBP1	LLMPNGSDRVTSHVLQELQPTKTIDTPEIRALALCTKT	356
ptEBP1	LLMPNGSDRVTSHVLQELQPTKTIDTPEIRALALCTKT	359
Consensus	llmpngsdr ts lqelqptkt pei a lal tkt	
steBP1	KKKGGGKKKKKKKGDKVEEASQAEPMEG	387
amEBP1	KKKGGGKKKKKKKGDKVEEASQAEPMEG	393
ptEBP1	KKKGGGKKKKKKKGDKVEEASQAEPMEG	399
Consensus	kkkgg gkkkk k	
steBP1		
amEBP1	GATA	403
ptEBP1		
Consensus		

图2 *PtEBP1* 蛋白同源性比对结果

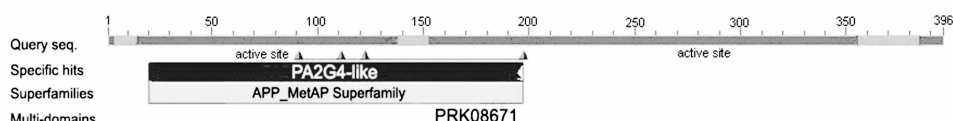
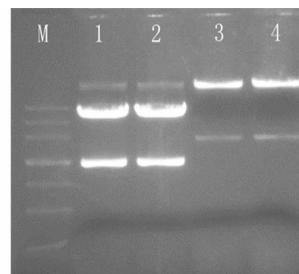


图3 *PtEBP1* 蛋白结构

2.3 *PtEBP1* 表达载体的构建

为对 *PtEBP1* 的功能及作用机制进行探究,本试验进一步对 *PtEBP1* 植物表达载体进行构建。首先通过对 *PtEBP1* 的序列分析,结合 pBI121 载体酶切位点信息,确定选用 *Xba* I 和 *Sac* I 对 pBI121 载体进行切割;随后设计带有 *Xba* I 和 *Sac* I 切割序列的引物 *PtEBP1* - F:5' - TCTAGAATGTCGT-CAGACGACGAGA - 3' 和 *PtEBP1* - R:5' - GAGCTC-CTAGACGGCGGTGG - 3'用于扩增 *PtEBP1*,将扩增序列通过 T - A 克隆方法导入 pEASY - T1 质粒,挑取阳性克隆并提取质粒,对质粒进行 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切消化处理后,获得带有双酶切位点的目的片段,与经过同样双酶切的 pBI121 的载体进行连接(图 4)。

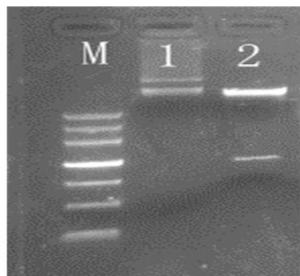


M—marker III; 1~2—双酶切的带有目的基因的 T 载体;
3~4—双酶切的 pBI121 质粒

图4 质粒双酶切结果

上述连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,在含有卡那霉

素抗性的 LB 平板上筛选阳性克隆,PCR 检测显示阳性重组克隆中含有 1.2 kb 的目的片段;阳性重组克隆进一步经过 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切后也能产生 1.2 kb 的目的片段(图 5)。这表明杨树 *EBP1* 基因已成功构建入植物转基因表达载体 pBI121 中。

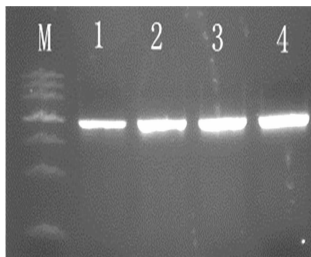


M—marker III; 1—原质粒; 2—双酶切后的检验结果

图5 酶切检验结果

2.4 农杆菌 LBA4404 中表达载体的菌液 PCR 鉴定

采用冻融法将已构建好的表达载体 pBI121 - *PtEBP1* 转化农杆菌(LBA4404)感受态细胞,在含有链霉素和利福平的 YEB 固体培养基上进行筛选。随机挑取 4 个阳性克隆进行菌液 PCR,PCR 扩增产物均为 1.2 kb(图 6),证明表达载体已成功转入农杆菌中。



M—marker III; 1~4—正确克隆

图6 菌液 PCR 结果

3 结论与讨论

EBP1 是拟南芥和人类 ErbB - 3 表皮生长因子受体结合蛋白同源的一个基因,与核糖体的生物合成有关,可以同时控制细胞的分裂和延伸,从细胞数量和体积 2 个方面同时调控植物器官大小。*EBP1* 基因以剂量依赖型方式调节植物器官大小,同时也以生长素依赖形式对细胞周期调节因子进行调控^[12],该基因与蛋白合成密切相关,并参加调控细胞周期,在调节植物器官大小方面具有重要意义。

杨树是重要的用材和绿化树种,具有经济和生态双重价值。但和其他绝大多数木本植物一样,杨树生长周期也较长,遗传背景复杂,很难在短时间内创造出大量突变体。因此,长期以来对杨树等木本植物器官形态建成及生长发育调控机制等基本问题的研究远远落后于拟南芥等草本植物。而 2006 年杨树全基因组测序的完成^[21]及随后不断丰富完善的杨树及其近源种的 EST 数据信息,为采用生物信息学手段结合反向遗传学策略探究杨树生长发育机制等基本问题提供了一条有效途径。

本研究通过克隆获得的杨树 *PtEBP1* 基因应属于转录因

子 APP_MetAP 超家族的一个成员。通过蛋白同源性比对发现,杨树 *PtEBP1* 与已报道的与沙冬青、马铃薯的 *EBP1* 蛋白同源性高达 89%、87%。同时,本研究已将杨树 *PtEBP1* 基因构建入植物转基因表达载体 pBI121 中,并成功转入农杆菌 LBA4404 中,为进一步开展杨树中 *EBP1* 类转录因子的功能研究、深度解析杨树生长发育优势形成的分子基础奠定了重要的基础。

参考文献:

- [1] Krizek B A. Making bigger plants: key regulators of final organ size [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(1): 17 - 22.
- [2] Mizukami Y. A matter of size: developmental control of organ size in plants [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001, 4(6): 533 - 539.
- [3] Breuninger H, Lenhard M. Control of tissue and organ growth in plants [J]. Curr Top Dev Biol, 2010, 91: 185 - 220.
- [4] Mizukami Y, Fischer R L. Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(2): 942 - 947.
- [5] Horiguchi G, Kim G T, Tsukaya H. The transcription factor *AtGRF5* and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 2005, 43(1): 68 - 78.
- [6] Kim J H, Kende H. A transcriptional coactivator, *AtGIF1*, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(36): 13374 - 13379.
- [7] Lee B H, Ko J H, Lee S, et al. The arabidopsis *GRF - INTERACTING FACTOR* gene family performs an overlapping function in determining organ size as well as multiple developmental properties [J]. Plant Physiology, 2009, 151(2): 655 - 668.
- [8] Dinnyen J R, Yadegari R, Fischer R L, et al. The role of *JAGGED* in shaping lateral organs [J]. Development, 2004, 131(5): 1101 - 1110.
- [9] Autran D, Jonak C, Belcram K, et al. Cell numbers and leaf development in *Arabidopsis*: a functional analysis of the *STRUWWELPETER* gene [J]. EMBO Journal, 2002, 21(22): 6036 - 6049.
- [10] Clay N K, Nelson T. The recessive epigenetic swellmap mutation affects the expression of two step II splicing factors required for the transcription of the cell proliferation gene *STRUWWELPETER* and for the timing of cell cycle arrest in the *Arabidopsis* leaf [J]. Plant Cell, 2005, 17(7): 1994 - 2008.
- [11] Anastasiou E, Kenz S, Gerstung M, et al. Control of plant organ size by *KLUH/CYP78A5* - dependent intercellular signaling [J]. Developmental Cell, 2007, 13(6): 843 - 856.
- [12] Horvath B M, Magyar Z, Zhang Y X, et al. *EBP1* regulates organ size through cell growth and proliferation in plants [J]. EMBO Journal, 2006, 25(20): 4909 - 4920.
- [13] Hu Y X, Xie O, Chua N H. The arabidopsis auxin - inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size [J]. Plant Cell, 2003, 15(9): 1951 - 1961.
- [14] Wang B, Zhou X C, Xu F, et al. Ectopic expression of a Chinese cabbage *BrARGOS* gene in *Arabidopsis* increases organ size [J]. Transgenic Research, 2010, 19(3): 461 - 472.

夏海武,曹 慧,王效忠. 桑树白藜芦醇合酶基因全长克隆及序列分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):17-20.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.006

桑树白藜芦醇合酶基因全长克隆及序列分析

夏海武,曹 慧,王效忠

(山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室/潍坊学院,山东潍坊 261061)

摘要:根据已知的其他物种白藜芦醇合酶 cDNA 保守序列设计引物,用 RT-PCR 技术从桑葚中扩增获得白藜芦醇合酶基因部分 cDNA 序列,再用 RACE 技术获得其两端序列,并拼接得到完整的 1 442 bp 白藜芦醇合酶基因。经序列分析发现,桑树白藜芦醇合酶基因开放阅读框长 1 170 bp,编码 389 个氨基酸,氨基酸序列含有芪合酶家族特征信号区 GVLFGFGPGLT 和活性中心序列 GCFAGGTVLR;该基因与花生芪合酶基因的核苷酸序列同源性高达 82.82%,氨基酸序列的同源性高达 87.15%。

关键词:桑树;白藜芦醇合酶基因;RT-PCR;RACE 技术;序列分析

中图分类号: Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0017-04

桑葚为桑科落叶乔木桑树(*Morus alba* Linn.)的果实,聚花果,每年 4—6 月份成熟,不同生长环境、不同品种的果实之间存在差异。中国地大物博,桑葚资源丰富,全国各省份均有桑树的分布^[1-2]。桑葚含有丰富的营养物质,具有食用及中药材之用,早在 2 000 多年前,它成为皇帝的御用药品之一。1993 年,国家卫生部把桑葚列为“既是食品又是药品”的农产品之一^[3]。现已证明桑葚具有 6 种防病保健功能,包括抗癌抗诱变、增强免疫力、保驾护航、驻颜抗衰老、促进造血细胞生长、降低血糖血脂等^[4],这些保健功能主要依赖于桑葚中含有的一种叫白藜芦醇的芪类物质,它具有抗氧化及消除自由基功效,有防癌、抗炎、预防心血管疾病、抗衰老等功能^[5-6]。白藜芦醇和其他芪类化合物均属于次生代谢物,其生物合成途径是苯丙氨酸-丙二酸,在白藜芦醇合成全过程中,白藜芦醇合酶(RS)是代谢途径中最后一个起作用的关键酶^[7],也是合成途径中唯一必需的合成酶,它催化 1 分子 4-香豆酰辅酶 A 和 3 分子丙二酰辅酶 A 反应合成白藜芦醇^[8]。

白藜芦醇合成的底物在植物体内广泛存在,白藜芦醇的合成及含量控制主要依赖于白藜芦醇合酶基因的表达状况^[9],但大多数植物不含白藜芦醇合酶或含量很低。目前,虽然发现含有白藜芦醇的植物已有 70 多种,但要从天然植物中提取到高丰度的白藜芦醇比较困难,并且提取成本较高。利用基因工程技术使更多的植物产生白藜芦醇或提高植物体内白藜芦醇的含量,满足人们医疗保健需求具有重要的现实意义。目前,已从松树、花生、葡萄、爬山虎、大黄等植物中分离到白藜芦醇合酶基因,但还没有从桑葚中克隆白藜芦醇合酶基因全长序列的报道。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试材料 桑树接近成熟的果实,采自山东省潍坊市农业科学院。采后洗净,每 2 g 为 1 份,装于 5 mL 离心管中,液氮速冻,保存于 -80 ℃超低温冰箱中待用。

1.1.2 试剂盒、酶和试剂 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒,购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司;cDNA 第一链合成试剂盒,购于 Fermenta 公司;RACE 试剂盒,ClonTech 公司产品;pMD 18-T Vector Kit,Marker (DL2000)、T₄-DNA 连接酶、5.0 U/μL *Taq* DNA polymerase,购于 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司;其他试剂,分析纯,均为国产或进口。

1.1.3 试验用具与耗材的预处理 用于 RNA 提取的研钵、

收稿日期:2014-07-09

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2010CL022);山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室(潍坊学院)开放课题(编号:2012SWKF02)。

作者简介:夏海武(1958—),男,山东潍坊人,博士,教授,从事植物生物技术研究。E-mail:xianghaiwu206@163.com。

[15] Hu Y, Poh H M, Chua N H. The arabidopsis *ARGOS- LIKE* gene regulates cell expansion during organ growth[J]. *Plant Journal*, 2006, 47(1): 1-9.

[16] Kim G T, Tsukaya H, Uchimiya H. The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(15): 2381-2391.

[17] Kim J H, Choi D S, Kende H. The *AtGRF* family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*[J]. *Plant Journal*, 2003, 36(1): 94-104.

[18] Szecsi J, Joly C, Bordji K, et al. *BIGPETALp*, a *bHLH* transcription

factor is involved in the control of *Arabidopsis* petal size[J]. *EMBO Journal*, 2006, 25(16): 3912-3920.

[19] Deprost D, Yao L, Sormani R, et al. The arabidopsis *TOR* kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation[J]. *EMBO Reports*, 2007, 8(9): 864-870.

[20] Feng G, Qin Z, Yan J, et al. Arabidopsis *ORGAN SIZE RELATED1* regulates organ growth and final organ size in orchestration with *ARGOS* and *ARL*[J]. *New Phytologist*, 2011, 191(3): 635-646.

[21] Tuskan G A, Difazio S, Jansson S, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray)[J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1596-1604.