

文心兰侧花瓣转录组分析与调控唇瓣化变异相关转录因子的挖掘

曾思娴^{1,3}, 余让才^{1,3}, 范燕萍^{2,3*}

1. 华南农业大学生命科学学院, 广东广州 510642; 2. 华南农业大学林学与风景园林学院, 广东广州 510642; 3. 华南农业大学花卉研究中心, 广东广州 510642

摘要: 文心兰因其独特的花型和艳丽的颜色是市场上重要的鲜切花。文心兰花瓣极易产生花型多样性, 为了探究调控文心兰侧花瓣唇瓣化的分子机制, 对柠檬绿文心兰 (*Oncidium flexuosum* 'Honey Angel') 及其侧花瓣唇瓣化变异种 (突变体) 的侧花瓣进行 RNA 提取和转录组分析。测序结果共获得 45 525 415 个高质量 reads, 鉴定出 52 253 个 unigenes。利用 NR、Swissprot、PFAM、GO、NT、KO、KOG 七大数据库分别进行基因功能注释, 分别注释到 31 828、23 174、21 369、21 367、20 830、10 523、6465 条 unigenes。经表达量比较, 在柠檬绿文心兰和突变体之间获得差异表达基因 3120 条。GO 功能富集分析显示, 共有 1537 条差异表达基因注释到生物过程、细胞组分和分子功能 3 个功能群组。KEGG 功能富集分析显示, 将 690 个差异表达基因富集到不同的代谢通路, 其中代谢途径富集的基因最多。兰花唇瓣器官发育的研究更多地集中在 MADS-box 基因家族中, 在该转录组数据中不仅筛选到 5 个显著差异表达 MADS-box 基因家族成员, 还挖掘到其他可能与文心兰唇瓣发育相关的 NAC、TCP、MYB 及 WRKY 等转录因子。运用 RT-qPCR 对这些转录因子基因进行表达量验证, 定量结果与 RNA-seq 数据一致, 且这些转录因子大部分在文心兰唇瓣化侧花瓣中具有高表达, 说明其可能正向调控着文心兰唇瓣器官的发育。综上所述, 本研究挖掘到大量参与文心兰唇瓣化变异的关键转录因子, 为兰花唇瓣发育分子机制及调控网络研究提供参考依据。

关键词: 文心兰; 唇瓣化; 转录组测序; 差异表达基因

中图分类号: S432.1 文献标志码: A

Transcriptome Analysis of Lateral Petals of *Oncidium* and Mining of Transcription Factors Related to The Regulation of Labialization Variation

ZENG Sixian^{1,3}, YU Rangcai^{1,3}, FAN Yanping^{2,3*}

1. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 2. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 3. Flower Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, 510642, China

Abstract: *Oncidium* is an important fresh-cut flower in the market because of its unique flower pattern and brilliant color. The petals of *Oncidium* are highly susceptible to flower diversity. RNA extraction and transcriptome analysis were performed on the lateral petals of *O. flexuosum* 'Honey Angel' and variants with two lateral petals converted into lips to explore the molecular mechanism regulating the labialization of *Oncidium* lateral petals. A total of 45 525 415 high-quality reads were obtained from the sequencing results and 52 253 unigenes were identified. The seven databases of NR, Swissprot, PFAM, GO, NT, KO and KOG were used to annotate gene functions and annotated to 31 828, 23 174,

收稿日期 2023-08-01; 修回日期 2023-10-15

基金项目 全国农业科技现代化先行县建设项目 (从化区)。

作者简介 曾思娴 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 观赏植物生物技术。*通信作者 (Corresponding author): 范燕萍 (FAN Yanping), E-mail: fanyanping@scau.edu.cn。

21 369, 21 367, 20 830, 10 523, 6465 unigenes. Upon expression comparison, 3120 differential genes were obtained between *O. flexuosum* 'Honey Angel' and the mutant. A total of 1537 differentially expressed genes were annotated into three functional groups: biological processes, cellular components and molecular functions. KEGG functional enrichment analysis enriched 690 differentially expressed genes into different metabolic pathways, with the most genes enriched by metabolic pathway. To date, the study of lip formation in orchids has focused more on the MADS-box gene family, not only five significantly differentially expressed MADS-box genes were screened in this transcriptome data, but also other transcription factor such as NAC, TCP, MYB and WRKY that may be related to the lip formation in *Oncidium* were also discovered. RT-qPCR was used to verify the expression of key genes, and the quantitative results were consistent with RNA-seq data, most of the genes were highly expressed in the lip-like lateral petals, indicating that the genes may positively regulate the development of the lip of *Oncidium*. In summary, this study excavated a large number of key transcription factors involved in the variation of labialization in *Oncidium*, which would provide a certain reference for the study of the molecular mechanism and regulatory network of lip formation of orchid.

Keywords: *Oncidium*; labialization; transcriptome sequencing; differentially expressed genes

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.05.002

兰科植物因其独特的花型倍受人们喜爱, MADS-box 转录因子是花的起始和发育过程中的关键调控成分, 在参与花器官的发育、开花时间的调节等过程中均起着重要作用^[1]. ABCDE 模型由 MADS-box 基因家族中的五类同源基因组成, 这些基因通过相互作用共同决定花器官身份^[2]. 因此, 大多数关于兰花花器官发育的研究都集中在这些 ABCDE 基因上, 而关于调控兰花唇瓣发育的其他转录因子及下游相关调控网络仍不清晰, 因此, 探究其他相关调控机制对兰花植物分子育种具有重要意义。

文心兰是兰科文心兰属植物, 因其独特的花型和艳丽的颜色是世界上具有较高观赏价值的切花品种^[3]. 在长期的文心兰生长进化过程中, 极易产生花型多样性, 这种花型多样性主要体现在唇瓣的变化上, 使其具有更高的观赏价值和生物学价值^[4]. 因此揭示文心兰唇瓣多样性形成机制显得极其重要。“花被密码模型”是目前被广泛接受的兰花花器官发育模型, 该模型中, 不同 MADS-box 基因分别组成唇瓣复合物和萼片/花瓣复合物, 这 2 种蛋白复合物相互竞争决定兰花花器官身份形成^[5], 而文心兰花瓣形态结构多样化的其他调控网络研究仍鲜有报道。本研究以柠檬绿文心兰 (*Oncidium. flexuosum* 'Honey Angel') 和其侧花瓣唇瓣化变异种 (突变体) 为材料, 对 2 种侧花瓣进行 RNA 转录组测序, 通过 MADS-box 及其他转录因子的差异表达挖掘调控文心兰唇瓣化变异关键转录因子, 为建立文心兰唇瓣化变异调控关系网络, 培育花型独特兰花新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为种植在华南农业大学花卉研究中心种质资源圃中生长健壮的柠檬绿文心兰侧花瓣发生唇瓣化变异种 (突变体), 对照为柠檬绿文心兰 (图 1)。对 2 种侧花瓣表皮细胞观察, 发现在 8 mm 花蕾时期表皮细胞数目差异最大, 因此在 9 月和 10 月采集 8 mm 花蕾并分离其侧花瓣迅速置于液氮中冻存, 然后保存于 -80 °C 冰箱, 用于后续转录组测序及相关试验。

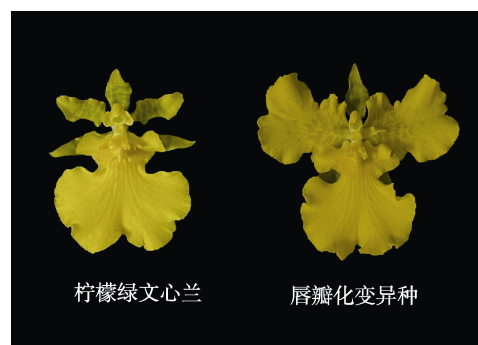


图 1 柠檬绿文心兰和唇瓣化变异种花朵

Fig. 1 Pictures of *O. flexuosum* 'Honey Angel' and labialized varieties flowers

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取、文库构建与转录组测序

(1) 总 RNA 提取。使用天根多糖多酚试剂盒 (QIAGEN, Germany) 提取柠檬绿文心兰和唇瓣化变异种的侧花瓣组织样品的总 RNA, 并检测其总量和完整性。RNA 提取与检测均委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

(2) 文库构建、质检与测序。选取符合质量

标准的总 RNA 通过 Oligo(dT)磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA。随后在 NEB Fragmentation Buffer 中用二价阳离子将得到的 mRNA 随机打断,按照 NEBNext[®] Ultra[™] RNA Library Prep Kit for Illumina[®]试剂盒说明书进行 cDNA 文库的构建。文库构建完成后,使用 Qubit 2.0 Fluorometer 荧光分光光度计进行初步定量,随后使用 Agilent 2100 bioanalyzer 生物分析仪对文库的 insert size 进行检测,通过 RT-qPCR 对文库有效浓度进行准确定量,以保证文库质量。把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后,使用 Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, USA) 测序平台进行转录组测序。

1.2.2 测序数据分析 (1) 数据质控与转录本拼接。为了保证数据分析的质量和可靠性,将测序获得的原始数据 (raw reads) 进行过滤,去除带接头 reads、含 N 碱基的 reads、低质量 reads (Q 值 < 20), 经过原始数据过滤、测序错误率检查、GC 含量分布检查,获得后续分析使用的高质量 clean reads。使用 Trinity 程序将 clean reads 进行拼接,对拼接获得的转录本去除冗余以 Corset 层次聚类后得到最长 Cluster 序列进行后续分析。

(2) unigene 功能注释。得到拼接转录本后,将转录本通过 NCBI Blastx 后比对到蛋白质的 7 个数据库[Nr、Nt、Pfam、KOG、Swissprot、KEGG、GO, ($E\text{-value} \leq 0.000001$)], 获得与目标序列相似度最高的蛋白质,并对其 unigenes 进行功能注释。

1.2.3 差异表达基因筛选及富集分析 利用 RSEM (RNA-seq by Expectation Maximization) 软件^[6]对基因在不同样本之间进行定量分析,并使用 DESeq2 软件对原始的 read count 进行标准化处理,通过统计学模型进行假设检验概率 ($P\text{-value}$) 计算后进行 FDR 矫正获得 padj 值。为了得到显著差异表达基因,将筛选条件设为 $\text{padj} < 0.005$ 且差异倍数 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 。分别使用 GSeq^[7]和 KOBAS 软件进行差异表达基因的 GO 和 KEGG 的富集分析,当 $\text{padj} < 0.05$ 时,为显著富集。

1.2.4 差异表达基因的 RT-qPCR 验证 以柠檬绿文心兰及其唇瓣化变异种为材料,基于转录组数据分析,筛选出与唇瓣变异相关的差异转录因子基因进行 RT-qPCR 验证。提取 8 mm 花蕾期柠檬绿和唇瓣化变异种文心兰的侧花瓣的 RNA,利

用湖南艾克瑞生物工程有限公司的 Evo M-mlV 反转录试剂盒合成 cDNA 单链。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,委托上海生物工程有限公司合成引物。RT-qPCR 反应体系和程序按照 Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix (Low Rox Plus) 试剂盒操作说明进行,参考文心兰属植物相关研究以 Actin 为内参基因^[8],通过 Applied Biosystems ABI7500 荧光定量 PCR 仪检测 10 个相关转录因子基因的相对表达量,每个样品设置 3 个生物学重复,反应结束后确认扩增曲线和熔解曲线,使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相关基因在不同样品中的表达情况。

2 结果与分析

2.1 转录组测序质量分析

取柠檬绿文心兰和唇瓣化变异种 8 mm 花蕾时期侧花瓣进行转录组测序。测序共获得 46 436 745 个 raw reads,原始数据过滤后获得 45 525 415 个高质量 clean reads。经质量评估,数据整体测序错误率不超过 0.03%, Q_{20} 碱基百分比 (测序错误率不小于 1%) 分布在 96.61%~98%之间, Q_{30} (测序错误率小于 0.1%) 介于 91.63%~94.25%之间, GC 含量介于 45.92%~46.67%之间,表明测序质量较好,可用于后期数据分析。

2.2 转录组 unigenes 功能注释

将高质量 clean reads 进行拼接后共获得 52 253 个 unigenes,利用 NR、Swissport、PFAM、GO、NT、KO、KOG 等 7 个常用蛋白质数据库进行比对及基因功能注释,根据比对蛋白数据库的序列同源性结果可知,至少在 1 个数据库注释成功的 unigenes 有 36 118,占 69.12%,其中与 NR 数据库匹配的 unigenes 数目最多为 31 828 条,占 60.91%;其次为 Swissport 数据库 23 174 条 (占 44.34%), PFAM 数据库 21 369 条 (占 40.89%), GO 数据库 21 367 条 (占 40.89%), NT 数据库 20 830 条 (占 39.86%), KO 数据库 10 523 条 (占 20.13%), KOG 数据库 6465 条 (占 12.37%);在以上 7 个数据库中都注释成功的 unigenes 数目为 3549 条,占 6.79%。

2.3 文心兰侧花瓣差异表达基因分布

对 2 种侧花瓣的 unigenes 表达量进行比较,以 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1$ 且 $\text{padj} < 0.05$ 作为筛选基准,在 2 种侧花瓣中共检测到差异表达基因 (differentially expressed gene, DEG) 3120 条,其中与柠檬绿文心兰相比,在突变体侧花瓣中上调

表达的 DEG 有 1526 条,下调表达的 DEG 有 1594 条 (图 2)。

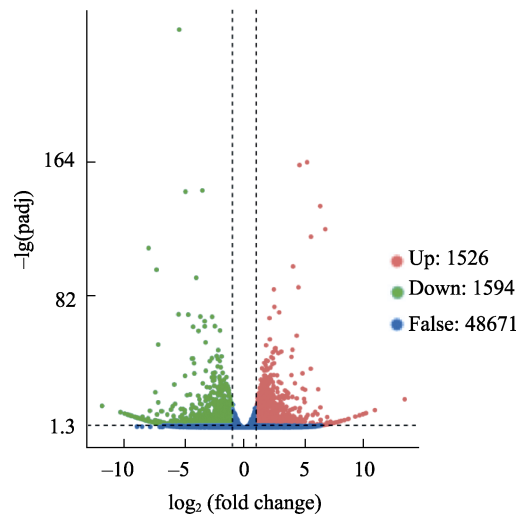


图 2 文心兰侧花瓣转录组差异表达基因火山图
Fig. 2 Volcanoplot of differentially expressed genes in transcriptome of *Oncidium* lateral petals

2.4 差异表达基因的 GO 功能分析

将检测到的 DEG 进行 GO 功能富集分析,以注释其生物学功能。共有 1537 条差异表达基因注释到细胞组分 (cellular component, CC)、生物学过程 (biological process, BP) 和分子功能 (molecular function, MF) 3 个功能群组。其中差异表达基因更多富集在生物学过程功能中,主要途径包括生物学过程功能中的碳水化合物代谢过程 (carbohydrate metabolic process)、脂质代谢过程 (lipid metabolic process) 和含核碱基化合物分解代谢过程 (nucleobase-containing compound catabolic process); 在细胞组分功能上,主要富集在核质 (nucleoplasm) 和染色体 (chromosome) 中; 分子功能中差异基因重点富集在氧化还原酶活性 (oxidoreductase activity) 和裂解酶活性 (lyase activity) 上 (图 3)。

2.5 差异表达基因的 KEGG 富集分析

将差异表达的基因进行 KEGG 富集分析,结果发现在 2 种侧花瓣中有 690 个差异表达的基因在 KEGG 途径中显著富集,KEGG 富集的前 20 个途径如图 4 所示,其中代谢途径 (metabolic pathways)、次生代谢物的生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites) 和抗生素生物合成 (biosynthesis of antibiotics) 是富集差异表达基因个数较多的通路。

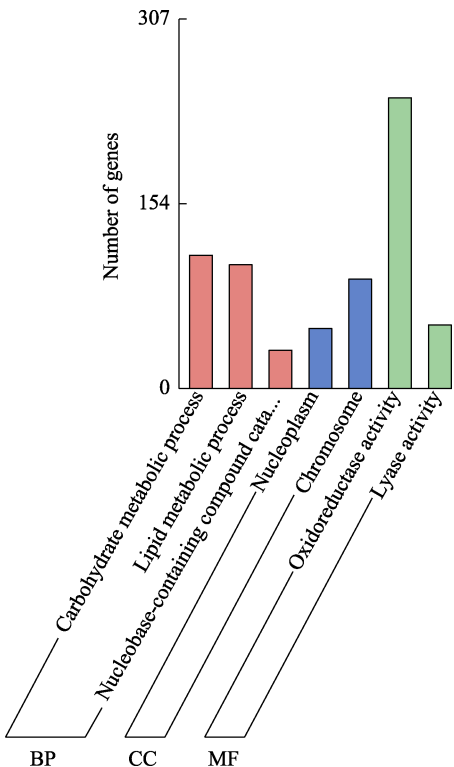


图 3 文心兰侧花瓣差异表达基因 GO 功能富集
Fig. 3 GO functional enrichment of differentially expressed genes in *Oncidium* lateral petals

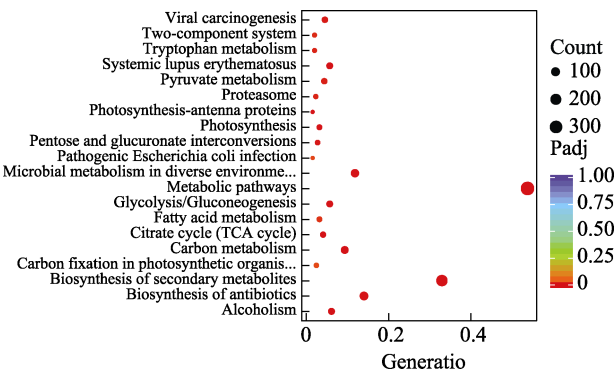


图 4 文心兰侧花瓣差异表达基因的 KEGG 富集通路
Fig. 4 KEGG enrichment pathway of DEG in *Oncidium* lateral petals

2.6 文心兰唇瓣化变异相关基因的挖掘与分析

MADS-box 基因是一类广泛存在于植物中且被证明在兰花花器官发育中具有极其重要的调控作用。为了挖掘文心兰唇瓣化变异相关调控基因,首先从差异表达基因中重点关注 MADS-box 转录因子,在该转录组中共挖掘 5 个存在显著差异 (以 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 为筛选依据) 的 MADS-box 基因 (*MADS1*、*MADS10*、*MADS11*、*MADS7*、*MADS5*)。在植物中 MADS-box 基因主要通过调节其他基因的转录来发挥作用^[9]。因

此,也对文心兰的侧花瓣转录组测序结果进行其他转录因子的数据分析,发现存在差异表达的其他转录因子主要包括 WRKY、TCP、NAC、MYB 等(表 1)。

将 MADS1、MADS10、MADS11、MADS7、MADS5、TCP1、TCP2、NAC1、MYB1 蛋白与其他物种同源蛋白序列构建进化树,结果表明,MADS-box 蛋白与扇叶文心兰(*Erycina pusilla*)的 MADS-box 亲缘关系最近,聚为一类,其次与

铁皮石斛(*Dendrobium catenatum*)亲缘关系较近;NAC 与铁皮石斛(*Dendrobium catenatum*)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*)亲缘关系较近,聚为一类;TCP 与蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*)、蕙兰(*Cymbidium faberi*)亲缘关系最近,聚为一类;MYB 与建兰(*Cymbidium ensifolium*)亲缘关系最近,聚为一类,其次与扇叶文心兰(*Erycina pusilla*)、铁皮石斛(*Dendrobium catenatum*)亲缘关系较近(图 5)。

表 1 文心兰唇瓣化侧花瓣变异差异表达转录因子

Tab. 1 Differentially expressed transcription factors associated with labialization variation in *Oncidium* lateral petals

基因 ID Gene ID	标签 Annotation	功能基因 Description	Log ₂ (fold change)
Cluster-10510.4816	ADJ67237.1	MADS1; MADS box transcription factor 1	13.467
Cluster-10510.1587	ADJ67240.1	MADS10; MADS box transcription factor 10	6.4071
Cluster-10510.27791	ADJ67241.1	MADS11; MADS box transcription factor 11	1.8286
Cluster-10510.12679	ADJ67239.1	MADS7; MADS box transcription factor 7	-1.1659
Cluster-10510.13070	ADJ67234.1	MADS5; MADS box transcription factor 5	-2.5449
Cluster-10510.24492	AVO00700.1	WRKY1; WRKY transcription factor 28-like	-2.1117
Cluster-10510.12328	ATU32558.1	TCP1; TCP-like protein	1.3815
Cluster-10510.9271	ATU32522.1	TCP2; TCP1-like protein	1.3949
Cluster-10510.1026	XP_020697724.1	NAC1; NAC domain-containing protein	2.4272
Cluster-10510.15575	PKU72007.1	MYB1; Myb-related protein 305	-6.3881

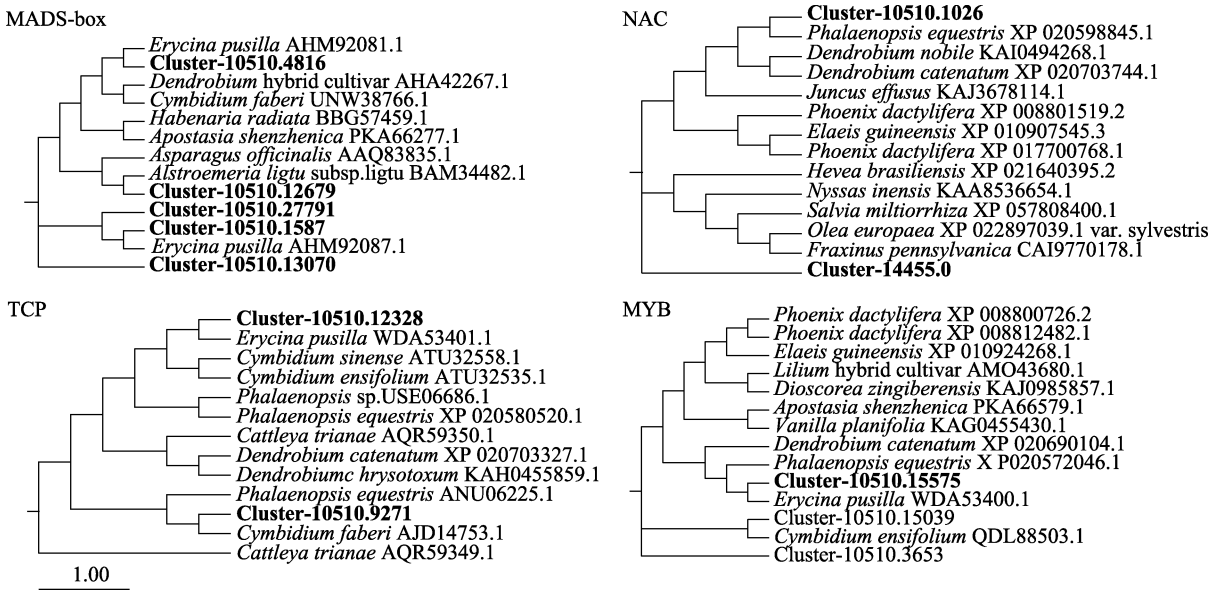


图 5 文心兰侧花瓣差异转录因子进化树分析

Fig. 5 Evolutionary tree analysis for differentially expressed transcription factors of *Oncidium* lateral petals

2.7 转录组测序 RT-qPCR 验证

为了验证文心兰侧花瓣转录组测序数据的真实性,共选择 10 个差异表达基因,通过 RT-qPCR 的方法检测其在花蕾期阶段的侧花瓣中的表达水平,与转录组测序获得的基因表达水平相比,二者变化趋势一致(图 6),说明本研究的转录组测序结果具有良好的可靠性。

3 讨论

本研究对柠檬绿文心兰和其侧花瓣唇瓣化变异种花蕾期侧花瓣进行 RNA 测序和转录组分析,共获得 52 253 个 unigenes。利用 NR、Swissprot、PFAM、GO、NT、KO、KOG 七个数据库分别进行基因功能注释,分别注释到 31 828 (60.91%)、23 174 (44.34%)、21 369 (40.89%)、21 367

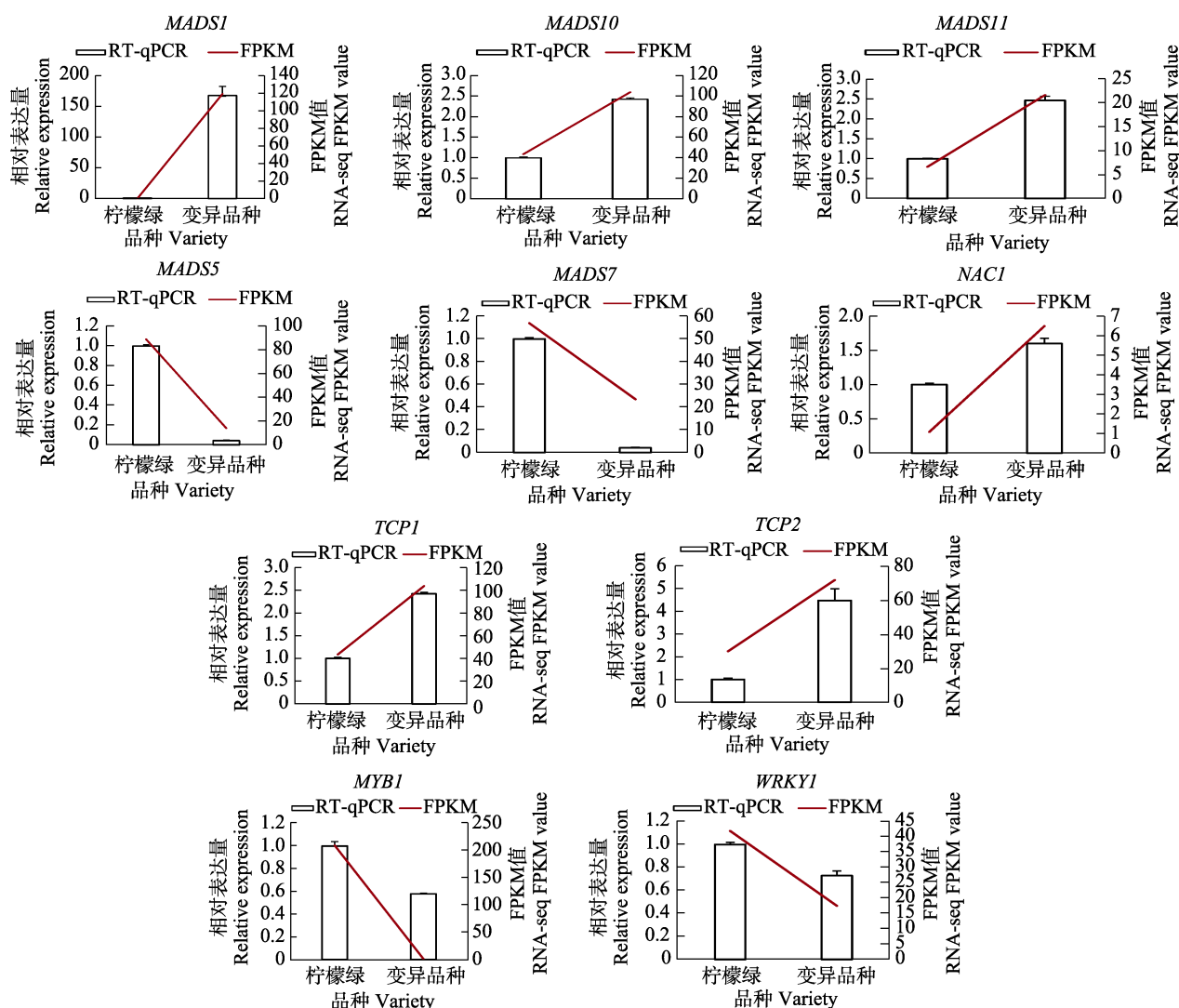


图6 文心兰侧花瓣转录组差异基因 RT-qPCR 验证

Fig. 6 RT-qPCR verification for differentially expressed genes in transcriptome of *Oncidium* lateral petals

(40.89%)、20 830 (39.86%)、10 523 (20.13%)、6465 (12.37%) 条 unigenes, 说明本转录组测序数据质量较高, 为文心兰唇瓣发育相关研究及其分子育种提供理论基础。

检测到差异表达基因 3120 条, 与柠檬绿文心兰相比, 在突变体侧花瓣中上调基因有 1526 条, 下调基因有 1594 条。其中 1537 条差异表达基因经 GO 功能富集分析注释到生物过程、细胞组分和分子功能 3 个功能群组, 经 KEGG 功能富集主要分布在代谢途径、次生代谢物生物合成途径等。表明文心兰唇瓣化变异是一个复杂的过程, 涉及多条代谢通路并受多种转录因子基因共同协调影响。

现有的研究揭示了 MADS-box 基因尤其是 B 类 MADS-box 基因在兰花花器官中的重要作用^[10]。

同时, 同源性兰花 Tepal (HOT) 模型可以解释兰花 MADS-box 基因如何调控花器官的发育并推测 B 类基因中的不同基因与其他类别的 MADS-box 基因结合, 以调节萼片、侧花瓣和唇瓣身份的复杂性^[11]。截至目前, B 类 MADS-box 基因通过基因复制事件产生大量同源基因, 有学者从南茜文心兰中分离到 4 个 B 类 MADS-box 基因 (OMADS3、OMADS5、OMADS8 和 OMADS9), 这些基因相互作用形成同源或异源二聚体共同参与调控花被器官的形成, 当 OMADS5 缺失而 OMADS9 存在时会导致大唇瓣以及萼片/侧花瓣唇瓣化突变体的产生^[12]。除了 B 类 MADS-box 基因, “花被密码”模型认为 B 类 AP3 基因与 E 类 AGL6 基因相互组成萼片/侧花瓣复合物和唇瓣复合物, 这 2 种蛋白复合物相互竞争调控着兰花复

杂花被器官的形成^[5]。在蝴蝶兰唇状花瓣突变体中, B 类 MADS-box 基因 (*PeMADS4*) 在 3 个唇瓣状花瓣中具有明显的表达差异^[13], 说明 B 类 MADS-box 基因在蝴蝶兰唇瓣发育中具有重要调控作用。此外, 建兰花器官类型非常多样, 并通过形态学观察和转录组分析发现其花型突变体与 MADS-box 基因的异常表达有关。在建兰唇状花瓣突变体以及唇状萼片突变体中, *CeAP3-3*、*CeAP3-4* 和 *CeAGL6-2* 基因的高表达导致了这种唇瓣突变表型^[14]。上述研究结果进一步证实了“花被密码”模型及该模型在兰科植物的广泛适应性。本研究通过对柠檬绿文心兰和其唇瓣化变异种的侧花瓣进行转录组测序, 从差异基因中筛选到 5 个差异表达 MADS-box 基因 *MADS1*、*MADS10*、*MADS11*、*MADS7*、*MADS5*, 其中 *MADS5* 为 B 类基因且在突变体侧花瓣中下调表达, 这与在南茜文心兰中该基因负向调控唇瓣器官的形成结果一致, 推测其可能参与组成文心兰萼片/侧花瓣复合物促进柠檬绿文心兰正常花瓣的形成。*MADS1*、*MADS10*、*MADS11*、*MADS7* 为 E 类基因且在突变体侧花瓣中上调表达 (除 *MADS7*), 大量研究已经证实 *MADS1* (*AGL6-2*) 参与唇瓣复合物组成并促进文心兰大唇瓣、蝴蝶兰唇瓣状花瓣突变体及建兰花瓣/萼片唇瓣化突变体的产生^[13-15], 其他 E 类基因是否同样参与唇瓣复合物的组成, 与其他调控元件一起共同参与文心兰唇瓣器官的发育还需要通过大量实验进一步证实。

尽管已有研究表明, MADS-box 转录因子在兰花花瓣及唇瓣多样性的形成上扮演着重要的角色, 但该基因家族是如何调控兰花唇瓣多样性形成机理尚不清楚。花器官身份基因的下游靶基因是花器官发生的关键调节因子, 直接或间接作用于花器官组织^[16]。通过高通量测序数据及整合多种生物学数据可以推断出相关的基因表达调控网络。因此, 本研究也对转录组中差异表达的其他转录因子进行分析, 发现 NAC、TCP、MYB、WRKY 等转录因子在文心兰唇瓣发育过程中存在差异表达。有研究发现, 在玫瑰花瓣中 NAC 转录因子控制花朵花瓣中乙烯调节的细胞扩张, 为 NAC 转录因子的功能提供新见解^[17]。在小兰屿蝴蝶兰中, 挖掘到 *PeNAC67* 是调控小兰屿蝴蝶兰唇瓣发育的关键转录因子, 且该基因与唇瓣发育相关的 *MADS3* 基因存在互作, 揭示了兰花唇瓣发育的分子机制^[18]。将蝴蝶兰 TCP 转录因子

PhCYCs 基因在夏堇中进行异源表达, 发现蝴蝶兰 *PhCYCs* 基因在夏堇中能正常转录, 且所有转基因株系分株增多且花型改变, 初步说明蝴蝶兰 TCP 转录因子可能既参与花型发育又调控分枝过程^[19]。植物 MYB 转录因子除了在调控植物花青素生物合成上有重要贡献外, 也有研究发现该基因家族在水稻中会调控花器官和小穗的分化^[20], 而该转录因子在花卉植物花器官形成的相关调控作用尚未见报道。本研究通过转录组分析鉴定出的这些可能调控文心兰唇瓣发育的其他转录因子基因是否会与 MADS-box 转录因子相互作用共同调控文心兰唇瓣器官的发育仍需要通过大量实验进一步深入研究, 以确定其具体功能和调控方式。

因此, 本研究对唇瓣化变异文心兰侧花瓣进行转录组分析, 获得了大量差异表达转录因子, 为深入阐明这些转录因子的功能, 完善文心兰唇瓣发育相关调控网络及分子机理奠定基础。

参考文献

- [1] DRENI L, ZHANG D. Flower development: the evolutionary history and functions of the AGL6 subfamily MADS-box genes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(6): 1625-1638.
- [2] DITTA G, PINYOPICH A, ROBLES P, PELAZ S, YANOFSKY M F. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity[J]. *Current Biology*, 2004, 14(21): 1935-1940.
- [3] 刘晓荣, 王碧青, 朱根发. 文心兰研究进展(综述)[J]. *亚热带植物科学*, 2007(3): 85-90.
LIU X R, WANG B Q, ZHU G F. Research advances of *Oncidium*[J]. *Subtropical Plant Science*, 2007(3): 85-90. (in Chinese)
- [4] RUDALL P J, BATEMAN R M. Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots[J]. *Biological Reviews*, 2002, 77(3): 403-441.
- [5] HSU H, HSU W, LEE Y, MAO W, YANG J, LI J, YANG C. Model for perianth formation in orchids[J]. *Nature Plants*, 2015, 1(5): 15046.
- [6] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12(1): 323.
- [7] YOUNG M D, WAKEFIELD M J, SMYTH G K, OSHLACK A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(2): R14.

- [8] 邓祖丽颖. 文心兰肌动蛋白基因(*Actin*)片段的克隆及表达分析[J]. 安徽农业大学学报, 2016, 43(1): 77-82.
DENG-ZU L Y. Cloning and expression analysis of the *Actin* gene fragment from *Oncidium* 'Sweet Sugar'[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2016, 43(1): 77-82. (in Chinese).
- [9] 曾英, 胡金勇, 李志坚. 植物 MADS 盒基因与花器官的进化发育[J]. 植物生理学通讯, 2001(4): 281-287.
ZENG Y, HU J Y, LI Z J. Plant MADS box genes and evolutionary development of flower organs[J]. Plant Physiology Journal, 2001(4): 281-287. (in Chinese)
- [10] ACETO S, GAUDIO L. The MADS and the beauty: genes involved in the development of orchid flowers[J]. Current Genomics, 2011, 12: 342-356.
- [11] PAN Z, CHENG C, TSAI W, CHUNG M, CHEN W, HU J, CHEN H. The duplicated B-class MADS-Box genes display dualistic characters in orchid floral organ identity and growth[J]. Plant and Cell Physiology, 2011, 52(9): 1515-1531.
- [12] CHANG Y, KAO N, LI J, HSU W, LIANG Y, WU J, YANG C. Characterization of the possible roles for B class MADS box genes in regulation of perianth formation in Orchid[J]. Plant Physiology, 2010, 152(2): 837-853.
- [13] TSAI W C, KUOH C S, CHUANG M H, CHEN W H, CHEN H H. Four *DEF*-like MADS box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* orchid[J]. Plant Cell Physiology, 2004, 45(7): 831-844.
- [14] AI Y, LI Z, SUN W, CHEN J, ZHANG D, MA L, ZHANG Q, CHEN M, ZHENG Q, LIU J, JIANG Y, LI B, LIU X, XU X, YU X, ZHENG Y, LIAO X, ZHOU Z, WANG J, WANG Z, XIE T, MA S, ZHOU J, KE Y, ZHOU Y, LU H, LIU K, YANG F, ZHU G, HUANG L, PENG D, CHEN S, LAN S, PEER Y, LIU Z. The *Cymbidium* genome reveals the evolution of unique morphological traits[J]. Horticulture Research, 2021, 8: 264.
- [15] HSU H, CHEN W, SHEN Y, HSU W, MAO W, YANG C. Multifunctional evolution of B and *AGL6* MADS box genes in orchids[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 902
- [16] CHEN D, YAN W, FU L, KAUFMANN K. Architecture of gene regulatory networks controlling flower development in *Arabidopsis thaliana*[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 4534.
- [17] PEI H, MA N, TIAN J, LUO J, CHEN J, LI J, ZHENG Y, CHEN X, FEI Z, GAO J. An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals[J]. Plant Physiology, 2013, 163(2): 775-791.
- [18] 盖若男. 小兰屿蝴蝶兰 *PeNAC67* 基因克隆以及调控唇瓣发育的分子机理研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2021.
GAI R N. *PeNAC67* gene cloning and molecular mechanisms in development of lip in *Phalaenopsis equestris*[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2021. (in Chinese)
- [19] 廖雪竹. 兰科花卉 *TCP* 基因生物信息学分析及蝴蝶兰 *CYC*-like 基因克隆与功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
LIAO X Z. Bioinformatic analysis of *TCP* genes in Orchidaceae and cloning and functional study of *CYC*-like genes in *Phalaenopsis*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [20] LI Y, ZENG X, LI Y, WANG L, ZHUANG H, WANG Y, TANG J, WANG H, XIONG M, YANG F, YUAN X, HE G. MULTI-FLORET SPIKELET 2, a MYB transcription factor determines spikelet meristem fate and floral organ identity in rice[J]. Plant Physiology, 2020, 184(2): 988-1003.