

秋石斛 *DenTFL1* 基因的克隆与表达分析

莫顺金^{1,2}, 李政铨³, 于晓云^{1,2}, 陆顺教^{1,2}, 廖 易^{1,2}, 易双双^{1,2*}

1. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业农村部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室/海南省热带作物资源遗传改良与创新重点实验室, 海南海口 571101; 2. 海南省热带观赏植物种质资源创新利用工程技术研究中心, 海南儋州 571737; 3. 海南大学热带农林学院, 海南儋州 571737

摘 要: *TFL1* 基因属于磷脂酰乙醇胺结合蛋白 (phosphatidylethanolamine-binding protein, PEBP) 家族成员, 与植物开花调控密切相关。为探究秋石斛中 *TFL1* 基因的功能, 本研究基于花序发育转录组数据库克隆了 1 个秋石斛 *TFL1* 同源基因 *DenTFL1*, 并对其进行生物信息分析、蛋白结构和亚细胞定位预测以及表达模式的分析。结果表明: 秋石斛 *DenTFL1* 基因 cDNA 全长 522 bp, 编码 173 个氨基酸; *DenTFL1* 蛋白分子式为 $C_{870}H_{1354}N_{246}O_{249}S_6$, 分子量为 19.43 kDa, 理论等电点 (pI) 为 7.82, 蛋白具有亲水性, 结构稳定; *DenTFL1* 蛋白不含有信号肽和跨膜结构域, 预测该蛋白定位于细胞质, 其二级结构以无规则卷曲为主, 占比 61.85%, 还含有 23.70% 的延伸链, 14.45% 的 α -螺旋, 三维结构模型与二级结构基本一致。蛋白保守结构域分析结果显示, *DenTFL1* 含有 PEBP 保守结构域。根据氨基酸序列比对和系统进化树分析发现, *DenTFL1* 基因与金钗石斛、球花石斛中的同源基因亲缘关系较近且蛋白序列的一致性较高, 进化较为保守。蛋白质互作网络预测结果显示, 秋石斛 *DenTFL1* 蛋白主要与 AT5G63440、LFY、SOC1、AGL24、AGL8 等蛋白发生互作。实时定量 PCR 结果表明, *DenTFL1* 基因在秋石斛不同生长发育阶段的各个组织部位均有表达, 其中在幼苗和成熟株的茎以及花柄中的表达量最高, 在幼苗的根以及中苗的叶片和根中的表达量则相对较低; 在花序发育的不同阶段均有较高的表达量 (除了长度为 3.0 cm 的花序之外), 在发育后期的花苞和成熟花各轮花器官中高表达, 而在发育早期的各轮花器官中的表达量相对较低。本研究为进一步揭示 *TFL1* 基因在秋石斛中花期调控提供一定的理论依据。

关键词: 秋石斛; *DenTFL1*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S682.31 文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of *DenTFL1* Gene in *Dendrobium* Hybrid

MO Shunjin^{1,2}, LI Zhengqi³, YU Xiaoyun^{1,2}, LU Shunjiao^{1,2}, LIAO Yi^{1,2}, YI Shuangshuang^{1,2*}

1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation of Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Hainan Engineering Technology Research Center of Tropical Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization, Danzhou, Hainan 571737, China; 3. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: Gene *TFL1* belongs to the phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP) family and is closely related to plant flowering regulation. To explore the functions of *TFL1* gene in *Dendrobium* hybrid, based on the transcriptome data of floral in *Dendrobium* hybrid, a *TFL1* gene was cloned and named *DenTFL1*. And the bioinformatic analysis protein structure and subcellular localization prediction, expression patterns analysis were done to explored the functional of *DenTFL1*. The results showed that the full length of *DenTFL1* cDNA sequence was 522 bp, encoding 173 amino acids. Bioinformatics analysis showed that the molecular formula of *DenTFL1* was $C_{870}H_{1354}N_{246}O_{249}S_6$, the theo-

收稿日期 2024-11-26; 接受日期 2024-12-05

基金项目 海南省重大科技计划项目 (No. ZDKJ2021015); 海南省自然科学基金项目 (No. 322QN395); 现代农业产业技术体系建设专项 (No. CARS-23-G60)。

作者简介 莫顺金 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 花卉遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 易双双 (YI Shuangshuang), E-mail: yishuang8410@163.com。

retical relative molecular mass of the protein was 19.43 kDa, and the theoretical isoelectric point was 7.82, and the protein was hydrophilic and structurally stable. Subcellular prediction showed that it was located in the cytoplasm, without signal peptide and transmembrane domain. The secondary structure was dominated by 61.85% of random curl, also contained 23.70% of the extended chain, 14.45% of α -helix. The three-dimensional structural model was basically consistent with the secondary structure. The conserved domain analysis showed that *DenTFL1* had a conserved PEBP domain and amino acid sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *DenTFL1* was closely related to *D. nobile* and *D. thyrsiflorum*. The constructed protein network showed that *DenTFL1* mainly interacted with AT5G63440, LFY, SOC1, AGL24, AGL8. Expression analysis showed that *DenTFL1* was expressed in all tissues of different development stages of *Dendrobium* hybrid, and had the highest expression level in the stems of young and mature plantlet and the flower stalks, and had a lower expression level in the roots of young plantlet and the leaves and roots of medium plantlets. Moreover, it had a high expression in different development stage of inflorescence except 3.0 cm long inflorescence. It also showed high expression in 7.0 mm and 9.0 mm width floral bud and the tissues of fully open flower, but expressed lower in the tissues of early development stages of floral bud. The research could provide a reference for the flowering regulation of *Dendrobium* hybrid, and add relevant information for the study of *TFL1*.

Keywords: *Dendrobium* hybrid; *DenTFL1*; gene cloning; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.04.003

秋石斛, 也被称为蝴蝶石斛, 是兰科 (Orchidaceae) 石斛属多年生草本植物, 具有重要观赏价值。海南处于热带地区, 凭借其优越的气候及地理优势, 是热带花卉的主产区, 也是我国秋石斛的主要产地^[1]。近年来, 秋石斛的栽种面积逐年扩大, 每年的秋石斛出货量也不断增多^[2]。我国引入秋石斛栽植时间较晚, 但是近年来秋石斛盆花生产发展速度快, 具有很高的研究价值和商业前景。秋石斛花期集中在秋季, 国内花卉消费呈现节日消费的特点, 如在春节、情人节等节日前后市场需求较大, 秋石斛自然花期和市场需求旺季不遇, 导致花卉的商品价值大大降低, 严重影响了秋石斛产业发展。使用植物生长调节剂可以诱导秋石斛提前开花^[3], 但是会造成花朵数量减少甚至畸形等不利影响^[4]。作为观花植物, 秋石斛的成花状况是影响产业发展中的关键因素, 成花质量直接关系到秋石斛的观赏价值。随着分子生物学的发展, 兰花在分子育种方面也进行了深入的研究^[5], 有效调控秋石斛花期使之能按需开花是目前秋石斛生产急需解决的关键问题之一。目前关于秋石斛开花相关基因研究较少, 本研究对调控秋石斛花期相关的 *DenTFL1* 基因进行克隆和表达分析, 以期为秋石斛花期调控提供有效的理论依据。

前人研究发现植物的开花途径主要有 6 种, 即光周期途径 (photoperiod pathway)、春化途径 (vernalization pathway)、自主途径 (autonomous pathway)、赤霉素途径 (gibberellin pathway)、环境温度途径 (ambient temperature pathway) 和年

龄途径 (age pathway)^[6]。各调控途径的不同通路在植物体内交汇后, 共同作用将开花信号传递给一系列成花/抑花因子, 如 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) 和 *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*)^[7], 开花调节因子被激活后共同调控植物的花期^[8]。这 2 个调节因子均属于 PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) 家族成员^[9]。尽管 *FT-like* 基因与 *TFL1-like* 基因在序列上展现出高度同源性, 但二者却具有拮抗功能^[10]。具体而言, *FT-like* 基因对开花过程具有促进作用, 而 *TFL1-like* 基因则起到抑制开花的作用^[11]。在拟南芥中, *FT* 蛋白与 *bZIP* 转录因子 *FD* 蛋白结合形成 *FT/FD* 蛋白复合物, 诱导开花基因表达, 促进拟南芥开花, 而 *TFL1* 基因表达时, *TFL1* 蛋白也可以与 *FD* 蛋白结合, 但是 *TFL1/FD* 复合物产生开花抑制基因, 从而抑制拟南芥的开花^[12]。迄今为止, 开花抑制因子 *TFL1* 同源基因被发现存在于番茄^[13]、玉米^[14]、龙胆^[15]、菊花^[16]、水仙^[17]以及藏红花^[18]等植物中。*TFL1* 基因在秋石斛中的作用机理并不明确, 本研究基于花序发育转录组数据库, 克隆秋石斛开花关键基因 *DenTFL1*, 分析预测其蛋白结构和系统进化关系等, 并通过实时定量 PCR 分析基因表达特性, 为秋石斛开花调控提供有效的理论依据。

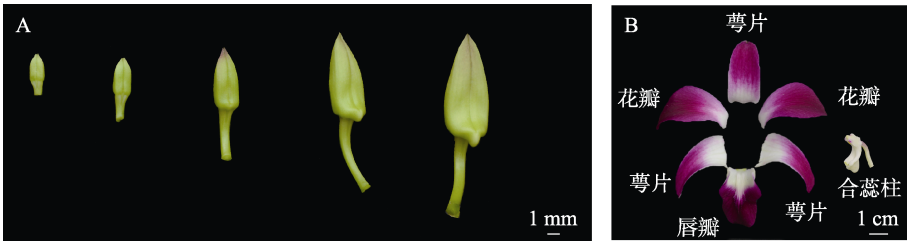
1 材料与方法

1.1 材料

秋石斛三亚阳光 (*Dendrobium* hybrid, Sonia Hiasakul) 采自中国热带农业科学院热带作物品种

资源研究所热带兰花资源圃(儋州)。分别采取幼苗期茎(YS)、幼苗期根(YR)、幼苗期叶(YF)、中苗期茎(MS)、中苗期根(MR)、中苗期叶(MF)、成熟期茎(MaS)、成熟期根(MaR)、成熟期叶(MaF)及成熟的花梗(Ped)、花柄(Sta)等部位,同时采集长度分别为1、3、5、7、9 cm的花序(1FB、3FB、5FB、5FB、9FB),直径分别为1、3、5、7、9 mm的花苞(1F、3F、5F、7F、

9F),以及直径为3、5、7 mm花苞和完全开放花朵的萼片(3S、5S、7S、FS)、花瓣(3P、5P、7P、FP)、唇瓣(3L、5L、7L、FL)、合蕊柱(3C、5C、7C、FC)等花器官(图1)。选择生长状态一致的中苗,在48 h内每2 h采集中苗叶片。采样时设置3个重复,取样后立刻剪碎,用锡纸包裹后放入液氮中,于-80 ℃冰箱保存备用。所采样品用于RNA的提取、基因克隆及表达分析。



A: 不同发育阶段的花苞(1、3、5、7、9 mm); B: 花器官。
A: The different development stages flower bud (1, 3, 5, 7, 9 mm); B: Floral organs.

图 1 荧光定量 PCR 样品
Fig. 1 Sample for real-time PCR

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与基因克隆 使用天根 RNAprep Pure Plant Plus Kit 试剂盒提取秋石斛 RNA,将质量合格的 RNA 逆转录为 cDNA,于-20 ℃冰箱保存备用。以三亚阳光秋石斛转录组中得到的 *DenTFL1* 基因序列为依据,使用 Primer Premier 5 软件设计引物(表 1),用反转录的花苞 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。用胶回收试剂盒对目的片段进行回收,利用热激法将得到的胶回收产物与大肠杆菌感受态细胞 DH5α 连接,挑选单菌落进行菌液 PCR 检测,并挑选阳性菌测序。

1.2.2 生物信息学分析 利用 ExPasy-ProtParam (<https://www.expasy.org/resources/protparam>) 在线软件分析蛋白的理化性质;利用 ExPASy-protscale 预测分析蛋白的亲水性;利用 WoLF PSORT(<https://wolfpsort.hgc.jp/>) 和 Cell ploc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 在线软件预测 DenTFL1 蛋白的亚细胞定位;利用 SOPMA (https://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)、SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 在线软件预测蛋白的二级结构及三维空间结构;利用 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 在线软件预测蛋白跨膜

区;利用 SignalP-6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>) 在线软件预测蛋白信号肽;通过 NCBI 数据库的 BLAST 工具获得 DenTFL1 蛋白的同源序列,并用 DNAMAN 软件进行比对分析,使用 MEGA-11 软件构建系统进化树。

1.2.3 *DenTFL1* 基因的表达分析 以三亚阳光秋石斛的不同组织为材料分析秋石斛 *DenTFL1* 基因的组织表达特性。使用吐露港的 2×Q3 SYBR qPCR Master mix 试剂盒,CFX96 Touch 仪器进行荧光定量 PCR 检测。实验设置 3 次生物学重复,*DenTFL1* 基因的相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。*DenTFL1* 基因的荧光定量 PCR 引物见表 1,使用秋石斛 *β-actin* 基因作为内参^[19]。计算结果使用 Origin 2024 软件制图。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'~3') Primer sequence (5'~3')	用途 Function
DenTFL1-F	ATGGCCAGAGCAGTGGAGCCTCTT	基因克隆
DenTFL1-R	TTAACGTCTCCTAGACGCCGTCTC	
q-DenTFL1-F	GTGGAGCCTCTTGTGTGTTGG	qPCR
q-DenTFL1-R	TCAGTGGTGCCTGGGATGT	
β-Actin-F	GTCAGGGACATCAAGGAGAAG	
β-Actin-R	TGGGCACCTAAATCTCTCAGC	

2 结果与分析

2.1 *DenTFL1* 基因克隆

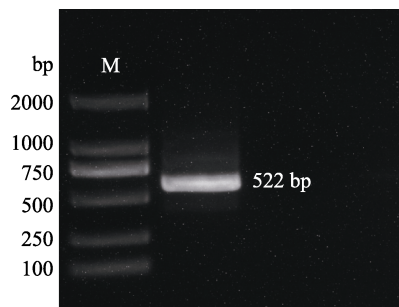
以秋石斛花苞 cDNA 为模板, 设计特异性引物, PCR 成功扩增出目的基因 *DenTFL1* (图 2), 经测序获得 522 bp 的序列。

2.2 *DenTFL1* 蛋白的生物信息学分析

理化性质分析结果显示, *DenTFL1* 蛋白包含 173 个氨基酸, 分子量为 19.43 kDa, 分子式简写为 $C_{870}H_{1354}N_{246}O_{249}S_6$, 理论等电点 (pI) 为 7.82; 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys) 为 2 个, 带负电荷的残基总数 (Asp+Glu) 为 20 个; 缬氨酸在氨基酸序列中占比最高 (13.3%), 其次为精氨酸 (9.2%); 蛋白不稳定系数达 39.91, 推测其为稳定碱性蛋白。总亲水性平均值 (GRAVY) 为 -0.257, 推测 *DenTFL1* 蛋白属于亲水蛋白 (图 3)。保守结构域数据库 (CDD) 预测结果显示, *DenTFL1* 蛋白属于 PEBP 超家族。SignalP 6.0 预测结果显示, Sec/SPI 为 0.0004, 其它类型蛋白占比为 0.9996, 表示 *DenTFL1* 蛋白可能不具有信号肽。TMHMM 2.0 软件分析该蛋白质不含跨膜结构域, 推测该蛋白属于非分泌性蛋白。使用 WoLF PSORT 和 Cell-PLoc 2.0 在线软件预测结果均表明 *DenTFL1* 蛋白可能定位于细胞质。

DenTFL1 蛋白由 3 种构象组成, 其中无规则卷曲 (random coil) 占比最高, 为 61.85%; 其次是延伸链 (extended strand), 占比 23.7%; α -螺旋 (alpha helix) 占比仅有 14.45% (图 4A)。使

用 SWISS-MODEL 软件以匹配度最高的水稻 PEBP 家族 Os02g0531600 蛋白为模板建模, 得到 TFL1 蛋白三级结构模型 (图 4B), 与二级结构基本一致, *DenTFL1* 蛋白三级结构中同样含有较多的无规则卷曲。



M: DL2000 DNA marker.

图 2 *DenTFL1* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR amplification product of *DenTFL1*

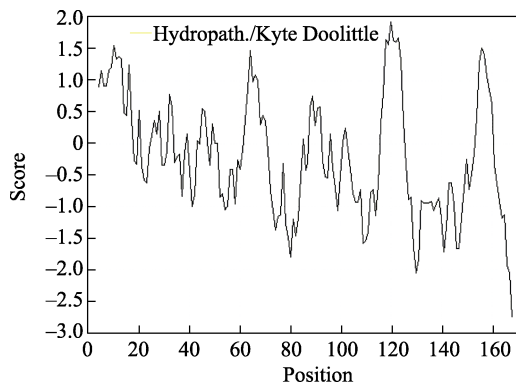
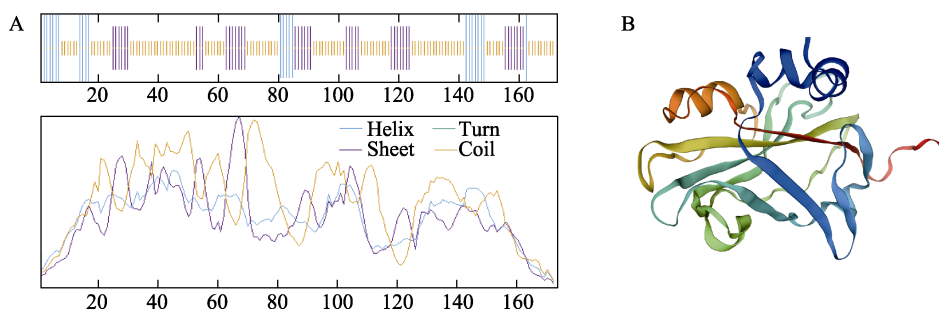


图 3 *DenTFL1* 蛋白亲疏水性分析

Fig. 3 Hydrophilicity/hydrophobicity analysis of *DenTFL1*



A: 二级结构预测, 黄色、紫色、蓝色分别表示无规则卷曲、延伸链、 α -螺旋; B: 三级结构预测。

A: Prediction of secondary structure, the yellow, purple, blue indicate random coil, extended-strand and α -helix, respectively; B: Prediction of tertiary structure.

图 4 *DenTFL1* 蛋白结构预测

Fig. 4 Structure prediction of *DenTFL1*

2.3 *DenTFL1* 蛋白同源序列比对和系统发育分析

通过 NCBI 数据库查找其它植物中与 *DenTFL1* 蛋白同源的序列, 并用 DNAMAN 软件对其进行

同源性比对, 发现 *DenTFL1* 序列与金钗石斛 (KAI0496869.1)、球花石斛 (KAL0910461.1)、*Masdevallia wendlandiana* (QLM02222.1)、文心兰 (AIU44253.1)、香荚兰 (KAG0489005.1) 等

物种同源基因的氨基酸序列高度相似，同源性分别为 96.53%、94.80%、85.55%、87.86%、85.38%（图 5），说明可能具有相似功能。系统进化树显

示，秋石斛 *DenTFL1* 与金钗石斛的亲缘关系最近，其次是球花石斛，与高粱，油棕亲缘关系较远（图 6）。

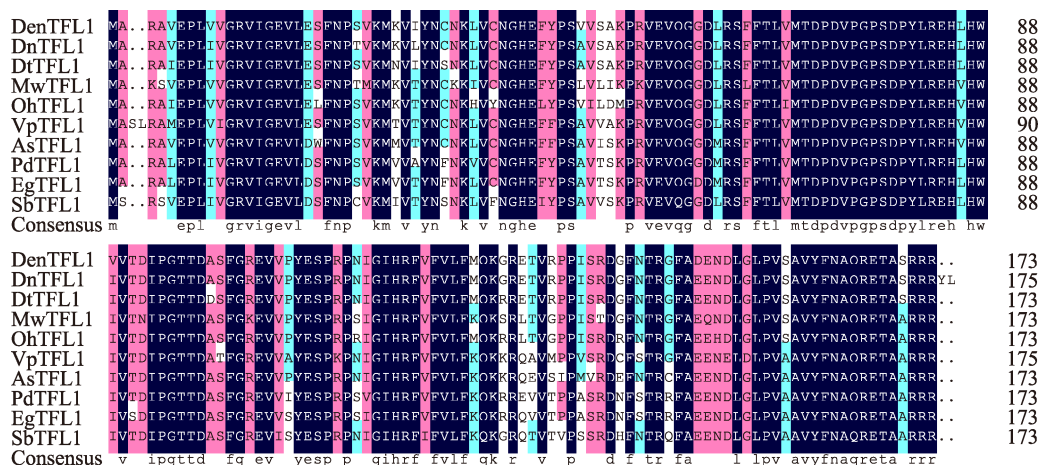


图 5 *DenTFL1* 的氨基酸序列比对

Fig. 5 Comparison on amino acid sequences of *DenTFL1*

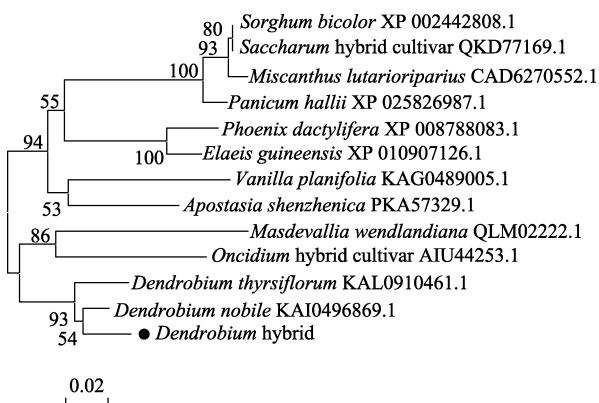


图 6 *DenTFL1* 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of *DenTFL1*

2.4 *DenTFL1* 蛋白互作网络的预测与分析

利用 STRING 软件对秋石斛 *DenTFL1* 进行蛋白质互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建。*DenTFL1* 氨基酸序列与拟南芥 *AtTFL1* 相似性较高，同源性为 69.1%。借助 *AtTFL1* 已知的蛋白互作网络对 *DenTFL1* 的蛋白互作调控机制进行预测发现 (图 7)，聚类系数为 0.891，PPI 富集 P 值为 5.57×10^{-5} ，可能与 *DenTFL1* 存在互相作用的蛋白有 10 个，分别是 *AT5G63440* (0.963)、*LFY* (0.938)、*SOC1* (0.931)、*AGL24* (0.924)、*AGL8* (0.907)、*CAL* (0.905)、*F6I1.13* (0.888)、*DECOY* (0.875)、*AT1G64880* (0.866)、*VIN3* (0.852)。GO 富集分析表明，*DenTFL1* 的互作蛋白主要参与花序分生组织特性的维持，胚胎后发育的正向调控、花朵发育的正向调控等生物过程。

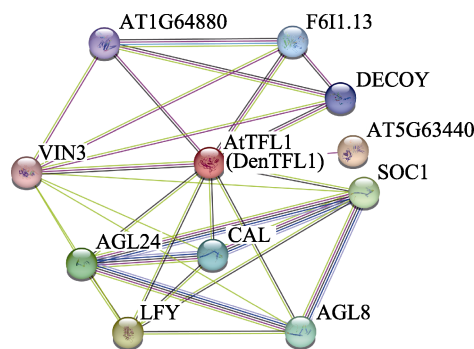


图 7 *DenTFL1* 蛋白互作网络预测

Fig. 7 Interaction network analysis of *DenTFL1*

2.5 *DenTFL1* 基因的表达特性分析

为探究 *DenTFL1* 基因在秋石斛中的表达特性，本研究对秋石斛不同发育阶段的不同组织、不同发育阶段的花序、花苞以及不同发育阶段花器官中的基因表达情况进行分析。不同发育阶段的不同组织表达特性分析结果表明，*DenTFL1* 基因在秋石斛各发育阶段不同组织中均有表达，在幼苗和成熟苗的茎、花柄中高表达，其次是成熟株的根和幼苗的叶片，中苗的茎、根和叶中的表达量均较低 (图 8)。

花序和花苞的表达特性分析 (图 9) 发现，*DenTFL1* 在花序发育的各个阶段均有表达，在长度 1 cm 的花序中的表达量最高，之后表达量迅速下降，在长度 3 cm 的花序中的表达量最低，之后表达量又迅速上升，在长度 5、7、9 cm 的花序中均有较高的表达量。在各个发育阶段的花苞中，

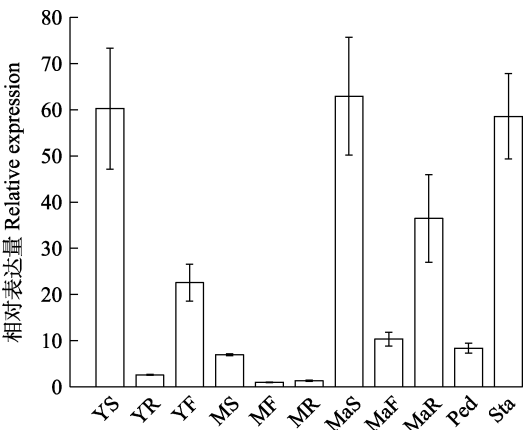


图 8 *DenTFL1* 基因在各发育阶段植株不同组织的表达分析

Fig. 8 Expression analysis of *DenTFL1* in different organ at different development stages

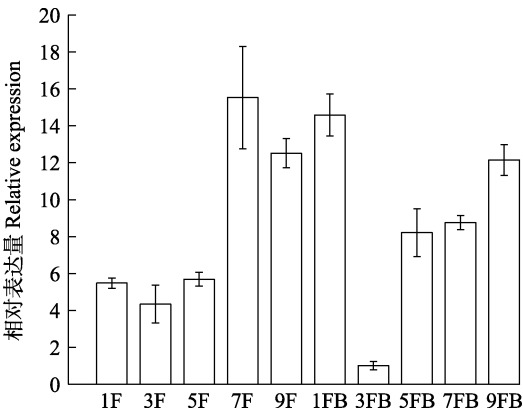


图 9 *DenTFL1* 在不同发育阶段花苞与花序中的表达分析

Fig. 9 Expression analysis of *DenTFL1* in floral and flower bud at different development stages

DenTFL1 主要在花苞发育后期高表达，其中在 7 mm 直径的花苞中的表达量最高，其次是 9 mm 直径的花苞。

在花器官中，完全开放花朵的各个部位 *DenTFL1* 基因表达量明显高于 3、5、7 mm 花苞的花器官。在未成熟时，几个阶段花苞中萼片的基因表达量均较高，当花苞开放时，各个花器官中基因表达量上升，明显高于 3、5、7 mm 花苞，其中唇瓣的表达量最高（图 10）。

为分析 *DenTFL1* 在 48 h 周期内表达变化，选取秋石斛中苗叶片部位进行表达分析。*DenTFL1* 在叶片中的昼夜表达结果显示，*DenTFL1* 在凌晨 6：00—8：00 时，中午 12：00—16：00 时，晚上 18：00—22：00 时的表达量呈先上调后下调的趋势（图 11），具有明显的节律性。

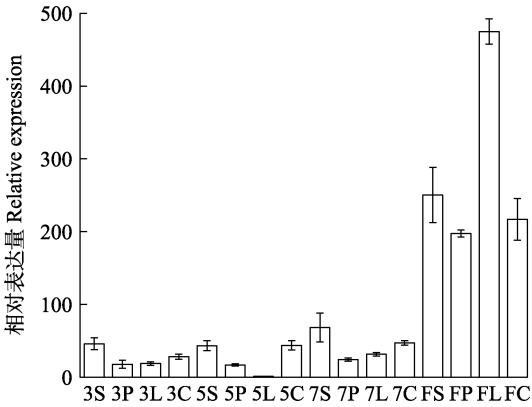


图 10 *DenTFL1* 在各发育阶段花器官中的表达分析

Fig. 10 Expression analysis of *DenTFL1* in floral organs at different development stages

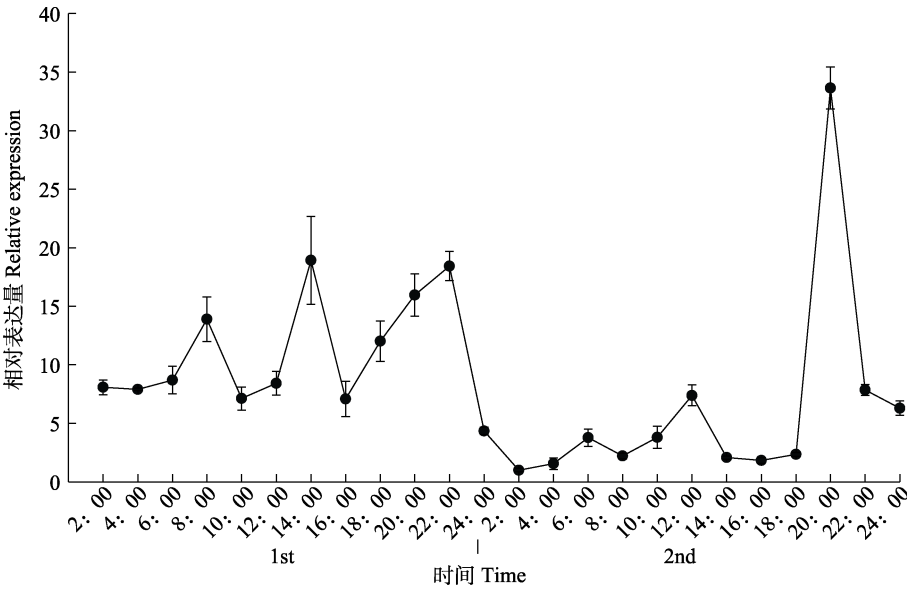


图 11 *DenTFL1* 在叶片中 48 h 内的表达分析

Fig. 11 Expression analysis of *DenTFL1* within 48 hours in leaves

3 讨论

成花转变是有花植物重要的生长阶段,最佳的开花时期对于植物在适宜环境条件下完成生命周期具有重要意义^[20]。花是绝大多数观赏植物最重要的观赏部位,开花的早晚、开花的应节性等都极大地影响观花花卉的价值,而通过花期调控使观花花卉早开花、应节性开花是提高其价值的有效手段之一,对开花调控的分子机制解析是开展花期调控研究的基础。*TFL1* 基因已被证实调控植物的开花时间及植株结构中扮演重要角色^[21]。*TFL1* 是花序分生组织发育的主要负调控因子,可显著延迟开花时间^[22]。苹果中的 *MdTFL1-1* 和 *MdTFL1-2* 在花诱导过程中表达迅速降低,在拟南芥中异位表达会延迟开花时间^[23],矮牵牛中的 *PhTFL1a/c* 都导致拟南芥明显晚花^[24];龙眼中的 *DITFL1-1* 和 *DITFL1-2* 导致烟草和拟南芥开花延迟^[25];在玫瑰中,开花抑制因子 *TFL1* 同源物的缺失会改变开花季节性,引起持续开花^[26]。由此推测,本研究克隆的秋石斛 *DenTFL1* 基因在调控花期方面也有一定的作用。本研究从秋石斛三亚阳光品种中成功分离出 *DenTFL1* 基因,其全长为 522 bp,编码 173 个氨基酸。通过蛋白序列对比研究发现, *DenTFL1* 基因与金钗石斛 (KAI049-6869.1)、球花石斛 (KAL0910461.1) 中的同源基因亲缘关系较近且蛋白序列的一致性较高,推测 *DenTFL1* 基因在这几个物种中的功能具有相似性。利用生物信息学技术分析 *DenTFL1* 蛋白的基本理化性质和二级结构等,推测其为稳定碱性亲水蛋白,且不具有信号肽和跨膜结构域,属于非分泌性蛋白。*DenTFL1* 蛋白可能定位于细胞质,二级结构和三级结构预测结果显示 *DenTFL1* 蛋白有较多的无规则卷曲结构。

植物的开花受多种途径调控,最终整合成一个复杂的调控网络,其中包括许多开花抑制因子和开花促进因子。在植物幼苗时期,开花抑制因子高表达,抑制植物开花,到了中苗期,开花促进因子开始高表达,抑制开花抑制因子的表达,使开花抑制因子表达量降低,从而完成成花转换,最终开花^[27]。而 *TFL1* 是一个开花抑制因子,秋石斛 *DenTFL1* 的时空发育表达特性分析表明,其在幼苗期的茎中具有很高的表达量,而到了中苗之后,表达量明显下降,与开花抑制因子在植物生长发育过程中的表达特性相一致。类似的表达

特性在二球悬铃木 (*Platanus acerifolia*)^[28]、巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)^[29]、三花龙胆 (*Gentiana triflora*)^[15] 等植物中同样存在。表明秋石斛 *TFL1* 的同源基因 *DenTFL1* 同样具有抑制秋石斛开花的功能。

龙眼 *DITFL1-1*、*DITFL1-2* 在拟南芥过表达中出现了花序分支增多的表型,并且转基因拟南芥中的 *AtAP1*、*AtFT*、*AtLFY* 基因表达量显著下调^[25]。*TFL1* 及其同源基因除了具有调控开花的功能之外,在很多物种中也报道了其参与调控植物形态建成及花器官发育的功能,如与 *AGAMOUS* 基因功能互作调控紫花苜蓿的花器官分化和花序发育^[30];与 *AGAMOUS*、*LEAFY* 共同互作调控拟南芥花分生组织的分化^[31],通过转录抑制调控拟南芥的开花时间和花序发育^[12];与 *FT* 互作调控森林草莓 (*Fragaria vesca*) 花序形态建成^[32]。蛋白互作网络的预测结果显示, *DenTFL1* 蛋白与 *LFY*、*AGL24*、*AGL8* 等存在相互作用,并且 GO 富集分析表明这些互作蛋白主要参与花序分生组织特性的维持,花朵发育的正向调控等生物过程。本研究发现 *DenTFL1* 在花序、花苞发育的各个阶段以及花器官发育的各个阶段均有很高的表达量,表明 *DenTFL1* 极有可能也参与了秋石斛花序和花器官分化和发育的调控,但仍需通过进一步的研究验证。

研究表明, *TFL1* 除了能感受年龄途径、自主途径以及春化途径的开花信号调控植物开花进程之外,也能感受光周期途径的开花信号调控开花进程^[27],如森林草莓的 *FvTFL1* 突变将导致原本长日照抑制开花,短日照促进开花的植株在长日照条件下出现早花的表型^[33],通过整合温度信号和光周期信号来抑制森林草莓的开花^[34],通过感受温度和光周期信号调控黄瓜的有限生长发育^[35]等。本研究中, *DenTFL1* 昼夜节律表达特性分析发现,其具有很明显的昼夜表达规律,表明 *DenTFL1* 可以感受昼夜的光周期信号,从而诱导其表达量的变化,说明 *DenTFL1* 可以通过感受光周期的信号调控秋石斛的开花进程。

本研究克隆了秋石斛 *DenTFL1* 基因,对其进行生物信息学和表达特性分析,为全面深入解析 *DenTFL1* 生物学功能及作用机制提供参考,为后续深入解析其在秋石斛花期调控机制提供理论基础。

参考文献

- [1] 尹俊梅, 陈金花, 杨光穗, 易双双. 海南热带花卉产业科技创新发展现状与建议[J]. 农业科技管理, 2016, 35(5): 57-60.
YIN J M, CHEN J H, YANG G S, YI S S. Discussions on current situation and suggestions of tropical flower industrial scientific and technological innovation in Hainan province[J]. Management of Agricultural Science and Technology, 2016, 35(5): 57-60. (in Chinese)
- [2] 李志晴, 李亚梅, 李崇晖, 尹俊梅. 秋石斛胚性愈伤组织诱导及再生体系的建立[J]. 热带作物学报, 2024, 45(6): 1175-1183.
LI Z Q, LI Y M, LI C H, YIN J M. Establishment of embryogenic callus induction and regeneration system for *Phalaenopsis*-hybrid *Dendrobium*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(6): 1175-1183. (in Chinese)
- [3] NAMBIAR N, SIANG T C, MAHMOOD M. Effect of 6-benzylaminopurine on flowering of a '*Dendrobium*' orchid[J]. Australian Journal of Crop Science, 2012, 2(6): 225-231.
- [4] 张东雪, 廖易, 陆顺教, 李崇辉, 廉华, 尹俊梅. 外施 TDZ 对秋石斛'红霞'生长与开花的影响[J]. 北方园艺, 2017(4): 46-50.
ZHANG D X, LIAO Y, LU S J, LI C H, LIAN H, YIN J M. Effect of spraying TDZ on growth and flowering of *Dendrobium* 'Nopporn pink'[J]. Northern Horticulture, 2017(4): 46-50. (in Chinese)
- [5] BELARMINO M M, MII M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of a *phalaenopsis* orchid[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(5): 435-442.
- [6] 蒋园园. 枇杷成花时间调控的分子机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
JIANG Y Y. Molecular mechanism study on the loquat flowering time regulation[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019. (in Chinese)
- [7] WICKLAND D P, HANZAWA Y. The FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 gene family: functional evolution and molecular mechanisms[J]. Molecular Plant, 2015, 8(7): 983-997.
- [8] 王云梦, 宋贺云, 刘娟, 章明华, 杨美. *FT* 和 *TFL1* 基因调控植物开花的分子机理[J]. 植物生理学报, 2022, 58(1): 77-90.
WANG Y M, SONG H Y, LIU J, ZHANG M H, YANG M. Molecular mechanism of *FT* and *TFL1* genes on regulation of plant flowering[J]. Plant Physiology Journal, 2022, 58(1): 77-90. (in Chinese)
- [9] KARLGREN A, GYLLENSTRAND N, KÄLLMAN T, SUNDSTRÖM J F, MOORE D, LASCOUX M, LAGERCRANTZ U. Evolution of the *PEBP* gene family in plants: functional diversification in seed plant evolution[J]. Plant Physiology, 2011, 156(4): 1967-1977.
- [10] 黄哲瑞, 辛曙丽, 赵添, 刘永华, 朱国鹏. 甘薯 *PEBP* 基因家族鉴定以及影响甘薯块根发育候选 *PEBP* 基因的鉴定[J]. 热带作物学报, 2024, 45(3): 459-472.
HUANG Z R, XIN S L, ZHAO T, LIU Y H, ZHU G P. Identification of *PEBP* gene family in sweet potato and screening of key *PEBP* genes regulating storage root development[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(3): 459-472. (in Chinese)
- [11] KOBAYASHI Y, KAYA H, GOTO K, IWABUCHI M, ARAKI T. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals[J]. Science, 1999, 286(5446): 1960-1962.
- [12] HANANO S, GOTO K. *Arabidopsis* *TERMINAL FLOWER1* is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression[J]. The Plant Cell, 2011, 23(9): 3172-3184.
- [13] 祁世明, 梁燕. 番茄 *SELF-PRUNING* 基因家族及株形调控功能研究进展[J]. 园艺学报, 2020, 47(9): 1705-1714.
QI S M, LIANG Y. Advances in research of the *SELF-PRUNING* gene family and plant architecture regulatory functions in tomato[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2020, 47(9): 1705-1714. (in Chinese)
- [14] 李贺, 郝立冬. 玉米 *PEBP* 基因家族鉴定与表达模式分析 [J/OL]. 分子植物育种, (2023-12-05)[2024-04-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231205.0950.002.html>.
- [15] LI H, HAO L D. Identification and expression pattern analysis of *PEBP* gene family in maize[J/OL]. Molecular Plant Breeding, (2023-12-05)[2024-04-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231205.0950.002.html>. (in Chinese)
- [15] IMAMURA T, NAKATSUKA T, HIGUCHI A, NISHIHARA M, TAKAHASHI H. The gentian orthologs of the *FT/TFL1* gene family control floral initiation in *Gentiana*[J]. Plant and Cell Physiology, 2011, 52(6): 1031-1041.
- [16] GAO Y, GAO Y, WU Z, BU X, FAN M, ZHANG Q. Characterization of *TERMINAL FLOWER1* homologs *CmTFL1c* gene from *Chrysanthemum morifolium*[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 99(6): 587-601.
- [17] 张璐, 吴菁华, 姚馨婷, 王革伏, 张志忠. 中国水仙 *NtTFL1-1* 和 *NtTFL1-2* 基因的克隆和表达[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(2): 264-271.
ZHANG L, WU Q H, YAO X T, WANG G F, ZHANG Z Z. Cloning and expression of the *NtTFL1-1* and *NtTFL1-2* genes from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental, 2020, 26(2): 264-271. (in Chinese)

- [18] KALIA D, KUMAR J J R. Analysis of *PEBP* genes in saffron identifies a *Flowering Locus T* homologue involved in flowering regulation[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2022, 42(21): 2486-2505.
- [19] 侯天泽, 易双双, 张志群, 王健, 李崇晖. 秋石斛 RT-qPCR 内参基因的筛选与验证[J]. *园艺学报*, 2022, 49(11): 2489-2501.
HOU T Z, YI S S, ZHANG Z Q, WANG J, LI C H. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR in *Phalaenopsis* type *Dendrobium* hybrid[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49(11): 2489-2501. (in Chinese)
- [20] SU J S, JIANG J F, ZHANG F, LIU Y, DING L, CHEN S, CHEN F. Current achievements and future prospects in the genetic breeding of chrysanthemum: a review[J]. *Horticulture Research*, 2019, 6: 109.
- [21] JIN S Y, NASIM Z, SUSILA H, AHN J H. Evolution and functional diversification of *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* family genes in plants[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2021, 109: 20-30.
- [22] YOO S J, CHUNG K S, JUNG S H, YOO S Y, LEE J S, AHN J H. Brother of *ft* and *TFL1* (BFT) has *TFL1*-like activity and functions redundantly with *TFL1* in inflorescence meristem development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2010, 63(2): 241-253.
- [23] ZUO X, XIANG W, ZHANG L, GAO C, AN N, XING L, MA J J, ZHAO C P, ZHANG D. Identification of apple *TFL1*-interacting proteins uncovers an expanded flowering network[J]. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(12): 2325-2340.
- [24] 乌兰. 矮牵牛 FT/TFL1 基因家族分析及其在开花调控中的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
WU L. Genome-wide analysis of FT/TFL1 family genes and the function in flowering regulation of *Petunia hybrida*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [25] 张艺勇, 彭媛, 付志远, 曾黎辉. 龙眼 TFL1 同源基因在拟南芥和烟草中过量表达的功能研究[J]. *园艺学报*, 2019, 46(10): 1936-1946.
ZHANG Y Y, PENG Y, FU Z Y, ZENG L H. Functional analysis of Longan *TFL1* homologous genes by over-expression in *Arabidopsis thaliana* and tobacco[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(10): 1936-1946. (in Chinese)
- [26] IWATA H, GASTON A, REMAY A, THOUROUDE T, JEAUFFRE T, KAWAMURA K, SAINT OYANT L H, ARAKI T, DENOYES B, FOUCHER F. The *TFL1* homologue *KSN* is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry[J]. *The Plant Journal*, 2011, 69(1): 116-125.
- [27] BLÜMEL M, DALLY N, JUNG C. Flowering time regulation in crops-what did we learn from *Arabidopsis*?[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2015, 32: 121-129.
- [28] ZHANG S S, ZHOU Q, YANG X Y, WANG J Q, JIANG J, SUN M M, LIU Y J, NIE C, BAO M Z, LIU G F. Functional characterization of three *TERMINAL FLOWER 1*-like genes from *Platanus acerifolia*[J]. *Plant Cell Reports*, 2023, 42(6): 1071-1088.
- [29] BI Z H, TAHIR A T, HUANG H, HUA Y W. Cloning and functional analysis of five *TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS*-like genes from *Hevea brasiliensis*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2019, 166(2): 612-627.
- [30] ZHU B T, LI H, HOU Y F, ZHANG P C, XIA X Z, WANG N, WNAG H, MYSORE K S, WEM J Q, PEI Y X, NIU L F, LIN H. Agamous and terminal flower controls floral organ identity and inflorescence development in *Medicago truncatula*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2019, 61(8): 917-923.
- [31] PARCY F, BOMBLIES K, WEIGEL D. Interaction of *LEAFY*, *AGAMOUS* and *TERMINAL FLOWER 1* in maintaining floral meristem identity in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 2002, 129(10): 2519-2527.
- [32] LEMBİNEN S, CIESLAK M, ZHANG T, MACKENZIE K, ELOMAA P, PRUSINKIEWICZ P, HYTÖNEN T. Diversity of woodland strawberry inflorescences arises from heterochrony regulated by *TERMINAL FLOWER 1* and *FLOWERING LOCUS T*[J]. *The Plant Cell*, 2023, 35(6): 2079-2094.
- [33] KOSKELA E A, MOUHU K, ALBANI M C, KUOKKURA T, RANTANEN M, SARGENT D J, BATTEY N H, COUPLAND G, ELOMAA P, HYTÖNEN T. Mutation in *TERMINAL FLOWER 1* reverses the photoperiodic requirement for flowering in the wild strawberry *Fragaria vesca*[J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(3): 1043-1054.
- [34] RANTANEN M, KUOKKURA T, JIANG P, MOUHU K, HYTÖNEN T. Strawberry homologue of terminal flower1 integrates photoperiod and temperature signals to inhibit flowering[J]. *The Plant Journal*, 2015, 82(1): 163-173.
- [35] WEN H, PAN J, CHEN Y, CHEN G Q, DU H, ZHANG L Y, ZHANG K Y, HE H, WANG G, CAI R, PAN J S. *TERMINAL FLOWER 1* and *TERMINAL FLOWER 1d* respond to temperature and photoperiod signals to inhibit determinate growth in cucumber[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2021, 44(8): 2580-2592.