

文心兰生物钟基因 *OnELF3* 克隆与表达分析

谭玉荣^{1,2,3}, 裴小华^{1,2}, 翟珂^{1,2}, 吴双^{1,2}, 李梦桃^{1,2}, 蒙青长^{1,2}, 宋灏明^{1,2},
杨玉靖^{1,2}, 潘英文⁴, 谢光明^{1,2,5}, 李秀梅⁵, 刘进平^{1,2*}

1. 海南大学南繁学院(三亚南繁研究院), 海南三亚 572024; 2. 海南大学热带农林学院, 海南儋州 571737; 3. 广西壮族自治区农业科学院, 广西南宁 530007; 4. 海南出入境检验检疫局热带植物隔离检疫中心, 海南海口 570311; 5. 五指山万泉园艺有限公司/海南省五指山市中山镇红山农场, 海南五指山 572216

摘要: *ELF3* 是重要的生物钟基因, 调节光信号的输入与昼夜节奏输出, 参与调控植物的重要过程。为了了解其在文心兰花瓣衰老启动中的调控作用, 本研究对 *OnELF3* 基因进行克隆和表达分析。结果表明: 利用转录组文库中的 *ELF3* 基因序列, 从文心兰花瓣中扩增得到 *OnELF3* 基因 (GenBank 登录号: OL613896); *OnELF3* 基因全长 2208 bp, 编码 735 个氨基酸。亚细胞定位表明其在细胞核中表达。同源序列比对与系统发育树分析显示 *OnELF3* 与铁皮石斛兰和蝴蝶兰亲缘关系最近。原核表达分析表明, *OnELF3* 基因能原核表达出功能蛋白。该基因在长光照、全光照及全黑暗条件下表达模式与其作为生物钟基因功能一致。实时荧光定量分析表明, *OnELF3* 基因在绽口期和盛开期表达量最高, 表明 *OnELF3* 基因可能在开花和花衰老启动中均发挥作用。本研究为进一步鉴定 *OnELF3* 基因在开花和花衰老启动中的功能奠定基础。

关键词: 文心兰; 花衰老; *ELF3* 基因; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: S31 文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of the Biological Clock Gene *OnELF3* in *Oncidium*

TAN Yurong^{1,2,3}, PEI Xiaohua^{1,2}, ZHAI Ke^{1,2}, WU Shuang^{1,2}, LI Mengtao^{1,2}, MENG Qingchang^{1,2},
SONG Haoming^{1,2}, YANG Yujing^{1,2}, PAN Yingwen⁴, XIE Guangming^{1,2,5}, LI Xiumei⁵, LIU Jinping^{1,2*}

1. School of Breeding and Multiplication (Sanya Institute of Breeding and Multiplication), Hainan University, Sanya, Hainan 572024, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 3. Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China; 4. Post-entry Quarantine Station for Tropical Plant, Hainan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou, Hainan 570311, China; 5. Wuzhishan Wanquan Horticulture Co., Ltd. / Hongshan Farm, Zhongshan Town, Wuzhishan, Hainan 572216, China

Abstract: *ELF3* is an important biological clock gene that regulates the input of light signal and the output of circadian rhythm, participating in modulation of many important processes of plants. In order to understand its regulation in the initiation of petal senescence of *Oncidium*, we conducted cloning and expression analysis of *OnELF3* in *Oncidium*. *OnELF3* (GenBank accession number: OL613896) was isolated from the *Oncidium* petals. *OnELF3* had a length of 2208 bp and encoded a protein of 735 amino acids. Subcellular localization showed its expression in the nucleus. Homologous sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *OnELF3* was closest to the counterparts of *Dendrobium candidum* and *Phalaenopsis*. Prokaryotic expression analysis showed that the cloned *OnELF3* was capable of prokaryotic expression of functional proteins. Its expression patterns under long day, full light, and full darkness conditions were consistent with its function as a circadian clock gene. Real time fluorescence quantitative analysis showed that the expression of *OnELF3* was the highest in cracked buds and full-open flowers, indicating that *OnELF3*

收稿日期 2024-09-05; 修回日期 2024-09-28

基金项目 五指山市科技项目 (No. WZSKJXM202203); 国家自然科学基金项目 (No. 31560573)。

作者简介 谭玉荣 (1994—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 作物遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 刘进平 (LIU Jinping), E-mail: liu3305602@163.com。

may play a role in both flowering and flower senescence initiation. This study would lay a foundation for further functional identification of *OnELF3* in the initiation of flower senescence.

Keywords: *Oncidium*; flower senescence; *ELF3* gene; gene cloning; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.02.005

文心兰 (*Oncidium*) 花型酷似娉婷起舞的女郎, 又名跳舞兰、舞女兰; 又似飞翔的蝴蝶, 因此又名金蝶兰。文心兰因其别致优美的花型、亮黄鲜艳的花色, 为极具观赏价值的重要切花类型^[1]。花衰老不仅是重要的植物生理过程, 也是影响文心兰这类切花商品价值的一个十分重要的指标。研究文心兰花衰老的分子机制, 不仅有助于了解植物器官的衰老与调控, 也有助于从分子水平上控制花衰老, 从根本上解决切花保鲜问题^[2-11]。

EARLY FLOWERING3 (*ELF3*) 是生物钟 (circadian clock) 基因, 而生物钟是生物为适应外界变化的内在昼夜节奏, 参与调控几乎所有的植物的重要过程^[12-16]。*ELF3* 作为生物钟核心振荡器中晚间复合体 (evening complex, EC) 即 *ELF3-ELF4-LUX ARRHYTHMO* (*LUX*) 的重要组成部分, 调节光信号的输入与生物钟的输出, 不仅控制下胚轴伸长生长与植物开花时间^[17-20], 还在植物耐盐性^[21]和叶片衰老^[22]方面发挥重要作用。文心兰花发育和衰老过程的转录组研究表明, *ELF3* 基因还可能参与文心兰花瓣衰老的启动调控^[23]。

本研究从文心兰中克隆到生物钟基因 *OnELF3* 的全长序列, 并对其进行蛋白质分析、亚细胞定位分析, 以及其在不同花发育时期和昼夜中的表达分析, 研究结果为研究 *OnELF3* 基因功能鉴定及其在文心兰花瓣衰老启动的调控中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为南茜黄金 3 代文心兰鲜切花, 购自海南省出入境检验检疫局热带植物隔离检疫中心。亚细胞定位表达载体 pCAMBIA1300、原核表达载体 pET-30a、农杆菌菌株 GV3101、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 及本生烟草均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 *OnELF3* 基因的克隆与生物信息学分析 参照 CTAB 法提取文心兰花瓣总 RNA^[24]。利用 1% 浓度凝胶电泳检测 RNA 条带的完整性, 并利用微

量分光光度计测量 RNA 浓度。按照 TaKaRa 反转录试剂盒 (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser) 合成 cDNA 第 1 条链。根据转录组测序获得的序列设计引物 *OnELF3*-F/R (表 1), 以获得的文心兰 cDNA 为模板扩增 *OnELF3* 基因 CDS 区 (去掉终止密码子), 将获得的片段纯化后连接 T 载体, 菌落检测正确后测序, 便于后续实验。

以扩增得到的正确的序列在 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线软件上预测氨基酸序列; 通过 ExPASy 服务器的 ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件对预测的氨基酸序列进行理化性质分析; 利用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 在线软件对氨基酸序列的信号肽进行预测; 用 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/cgi-bin/PlantmPLoc.cgi>) 在线软件预测 *OnELF3* 蛋白亚细胞定位。以预测到的 *OnELF3* 蛋白序列在 NCBI 数据库中作 Blast 检索, 并使用 MEGA 6 软件构建系统进化树。

1.2.2 *OnELF3* 的亚细胞定位分析 利用 Primer 5.0 软件设计 *OnELF3* 基因带有 p1300 载体多克隆酶切位点的引物 *OnELF3*-1300-F/R (表 1)。以含有目的片段的 T 载体质粒为模板克隆目的条带, 采用酶切酶连法构建亚细胞定位载体 35S::*OnELF3*:GFP, 将构建好的载体质粒转化到农杆菌 GV3101 中。采用瞬时表达的方法, 将含有亚细胞定位载体 35S::*OnELF3*:GFP 的农杆菌注射到生长期为 1 个月的烟草叶片背部, 28 °C 弱光培养 3 d 后剪取叶片, 利用激光共聚焦荧光显微镜分析基因的定位情况。

1.2.3 *OnELF3* 基因的原核表达分析 利用 Primer 5.0 软件设计 *OnELF3* 基因带有 pET30a 载体多克隆酶切位点的引物 *OnELF3*-30a-F/R (表 1)。以含有目的片段的 T 载体质粒为模板克隆目的条带, 构建亚细胞定位载体 T7 promoter::*OnELF3*:His-Tag, 将构建好的载体质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中。0.8 mol/L IPTG, 37 °C 诱导 pET30a 和 *OnELF3*-pET30a 表达 0、1、2、3 h 后收集菌液进行 SDS-PAGE 电泳分析; 0.8 mol/L

IPTG pET30a 和 *OnELF3*-pET30a 表达 3 h 进行 Western Blotting 分析。

1.2.4 *OnELF3* 基因的表达模式分析 生物钟节律表达分析取样：将 150 枝文心兰花枝平均分到 3 个量杯中，对文心兰切花进行 2~3 d 的暗处理、全光照和长光照处理后，从早上 6: 00 开始时每隔 2 h 采 1 次样，采样时根据转录组数据选择采集盛开花瓣（盛开前期、盛花期及衰老初期 3 个时期中在盛花期表达量最高），连续采样 72 h，液氮速冻后保存于-80 ℃冰箱。文心兰切花不同

发育时期表达分析取样：根据文心兰南茜品种花的形态变化特征，将其花发育分为花苞期（A）、绽口期（B）、半开放期（C）、盛开前期（D）、盛花期（E）、衰老初期（F）、衰老期（G）等 8 个不同的时期^[25]，在同一时间点采集不同时期的花瓣，装于无 RNA 酶的离心管中，于-80 ℃冰箱保存备用。取样结束后提取花瓣 RNA，反转录为 cDNA。以文心兰肌动蛋白基因为内参基因，设计 *OnELF3* 基因荧光定量 PCR 的引物 *OnELF3*Q-F/R（表 1）。

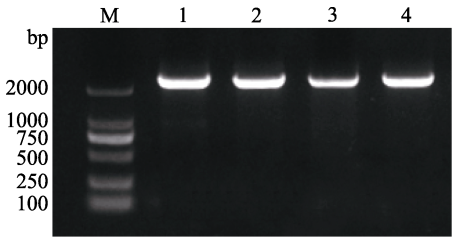
表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'）Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>OnELF3</i> -F	GATTGCACGGTGAGATTTAG	扩增 CDS 区全长
<i>OnELF3</i> -R	CTGAGTGATACTGTGGGGATT	
<i>OnELF3</i> -1300-F	<u>GGAATTC</u> GATTGCACGGTGAGATTTAG	构建亚细胞定位载体
<i>OnELF3</i> -1300-R	<u>CGGGATCC</u> CTGAGTGATACTGTGGGGATT	
<i>OnELF3</i> -30a-F	<u>GGGGTACC</u> GATTGCACGGTGAGATTTAG	构建原核表达载体
<i>OnELF3</i> -30a-R	<u>CGGGATCC</u> CTGAGTGATACTGTGGGGATT	
<i>OnELF3</i> Q-F	CCTTATCATCGCCTGGGCTACTT	荧光定量 PCR
<i>OnELF3</i> Q-R	GACGGACGCTCCTTACAGTGCT	

2 结果与分析

2.1 *OnELF3* 基因 CDS 区序列克隆与生物信息学分析

据转录组测序结果得到 *OnELF3* 基因的 mRNA 序列，设计特异性引物扩增出 2432 bp 序列，根据 NCBI 数据库 Blast 分析得到 *OnELF3* 基因的开放阅读框全长为 2208 bp（GenBank 登录号：OL613896）。根据该开放阅读框设计特异性引物扩增得到 *OnELF3* 的 CDS，长度为 2240 bp（图 1）。



M: DL 2000 DNA marker; 1-4: *OnELF3*.

图 1 文心兰 *OnELF3* PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplified products of *OnELF3* in *Oncidium*

利用 PtpParam 软件预测分析 *OnELF3* 基因的编码蛋白，表明 *OnELF3* 蛋白分子量大小为

80.70 kDa，等电点为 8.22，不稳定系数为 54.07，属于不稳定蛋白，易降解。Signal P4.1 Server 软件预测 *OnELF3* 蛋白无信号肽，不是分泌蛋白。Plant-mPLOC 软件预测 *OnELF3* 蛋白定位在细胞核上。利用 NCBI 分析 *OnELF3* 保守结构域，结果显示，未找到与 *OnELF3* 基因编码的蛋白相对应的已知结构域，但与其他物种的 *ELF3* 蛋白的结构域分析结果一致，因此，认为克隆到的基因的确是 *ELF3* 基因。利用 DNAMAN 软件对 *OnELF3* 氨基酸与其他 9 种植物的 *ELF3* 氨基酸序列进行同源序列比对发现，这 10 个植物的 *ELF3* 存在保守的部分序列，*OnELF3* 蛋白与铁皮石斛、蝴蝶兰等兰科植物的 *ELF3* 蛋白同源性在 63%~81%之间，与其他物种的 *ELF3* 蛋白同源性在 40%~50%之间（图 2）。

利用 MEGA 6 软件对 *OnELF3* 与 NCBI 数据库 Blast 检索到的蛋白序列构建系统进化树。结果显示，文心兰 *OnELF3* 蛋白与铁皮石斛兰和蝴蝶兰 *ELF3* 亲缘关系最近（图 3）。

2.2 *OnELF3* 在烟草表皮细胞中的亚细胞定位

将含有 *OnELF3* 基因的重组质粒农杆菌悬浮液注射到烟草叶片中，使其在烟草表皮细胞中表

OnELF3 基因原核表达经 SDS-PAGE 电泳分析, 结果显示, *OnELF3*-pET30a 与空载 pET30a 相比, 条带较深, 大小与预测的蛋白大小一致(图 5A)。Western Blot 验证结果表明, 重组蛋白 *OnELF3*-pET30a 诱导成功, 重组蛋白 *OnELF3*-pET30a 可被特异性抗体识别, 得到与预测时大小一致的单一蛋白条带(图 5B)。上述结果说明本研究成功克隆了 *OnELF3* 基因并能原核表达出功能蛋白。

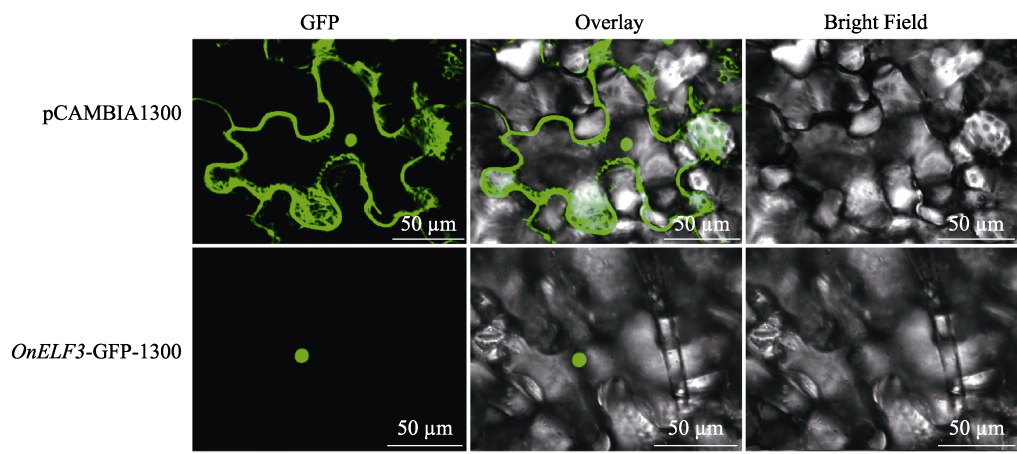
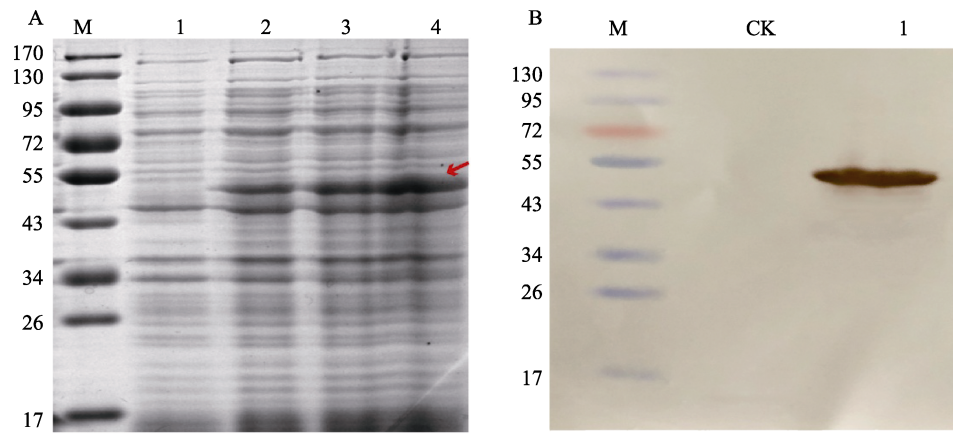


图 4 *OnELF3* 在烟草表皮细胞中的亚细胞定位
Fig. 4 Subcellular localization of *OnELF3* in tobacco epidermal cells



M: 预染蛋白 Marker SM0671 10–170 kDa; 1–4: 0.8 mmol/L IPTG 诱导 *OnELF3*-pET30a 表达 0、1、2、3 h; 红色箭头指向目的蛋白。
M: PageRuler prestained protein ladder SM0671 10–170 kDa; 1–4: *OnELF3*-pET30a expressed after 0 h, 1 h, 2 h, 3 h respectively with 0.8 mmol/L IPTG induction; The red arrow points to the target protein.
图 5 重组蛋白 *OnELF3*-pET30a 的 SDS-PAGE 电泳分析 (A) 与 Western Blot 验证 (B)
Fig. 5 SDS-PAGE analysis (A) and Western Blot analysis (B) of *OnELF3*-pET30a

2.4 *OnELF3* 基因的生物钟节律表达分析

为确定 *OnELF3* 基因的表达是否受生物钟的影响, 利用实时荧光定量表达分析对 *OnELF3* 基因在长光照 (LD)、全光照 (LL) 及全黑暗 (DD) 条件下的表达进行定量分析。结果表明, *OnELF3* 基因只在长光照条件下呈节律性振荡表达, 在 22:00 和 6:00 分别有 1 个高峰值, 在全光照与全黑暗条件下表现出节律不齐 (图 6)。

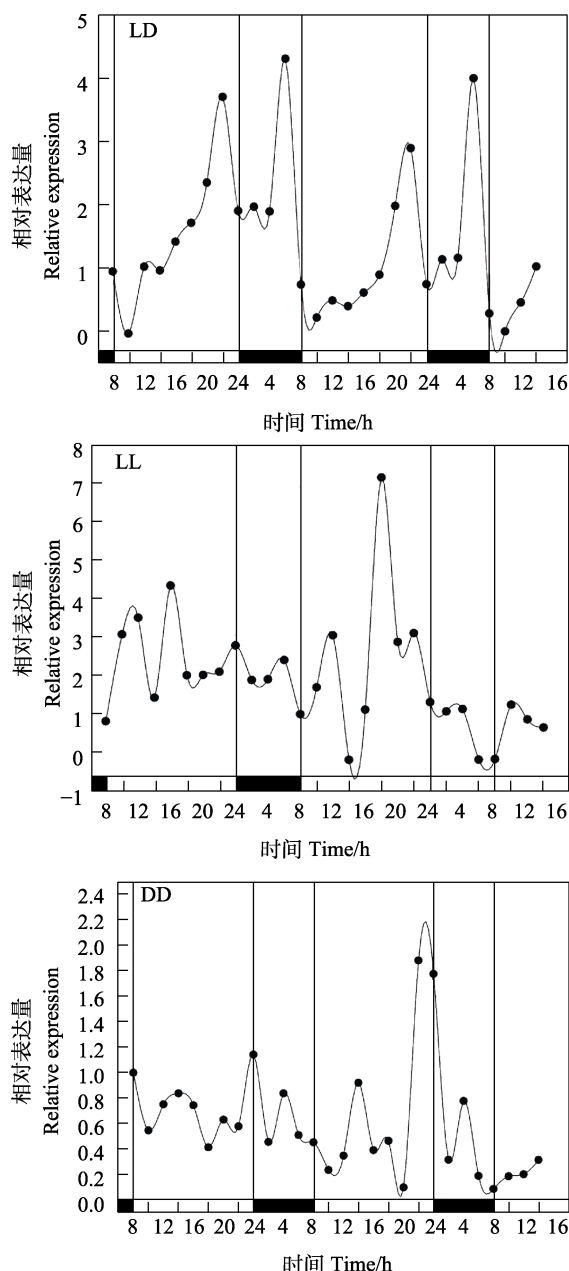
2.5 *OnELF3* 基因在文心兰不同花期花瓣中的表达分析

对 *OnELF3* 在文心兰切花发育各个时期的花瓣实时荧光定量分析表明, *OnELF3* 基因在绽口期表达量达到最高值, 之后表达量下降, 在盛花期上升到第二高峰值, 之后表达量下降, 在衰老

期达到最低值 (图 7)。

3 讨论

本研究克隆到 1 个文心兰生物钟基因 *OnELF3*, 保守结构域分析发现其无已知功能的结构域; 亚细胞定位分析发现, *OnELF3* 定位于细胞核。与拟南芥^[26]的研究结果一致, *ELF3* 编码无已知功能结构域的植物特异性核蛋白。在拟南芥中, *ELF3* 是生物钟晚间阶段转录翻译反馈环的重要成员, 呈现 24 h 节律性振荡, 并在傍晚出现表达峰。本研究结果显示, 在长日照条件下, *OnELF3* 呈 24 h 节律性振荡表达, 出现 2 个表达峰, 这与拟南芥中 *ELF3* 在傍晚出现 1 个表达峰有所不同, 说明不同植物间生物钟基因的节律表



坐标轴下方的黑色矩形代表正常条件下的黑暗时间，白色代表光照时间。

The black rectangle below the axis represents dark time under normal conditions, and white represents light time.

图6 *OnELF3* 基因在不同光照条件下的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *OnELF3* gene in different conditions

达存在一致性与差异性^[27]。

ELF3 在植物中不仅维持生物钟节律性振荡，还在开花调控过程中扮演重要角色^[27]。通过分析 *OnELF3* 基因在花不同发育时期的表达量，发现该基因在花的各个发育时期中均有表达，其中在绽口期的表达量最高，在盛开期出现第二个高峰，这一结果与之前的转录组分析相吻合^[23]，表明

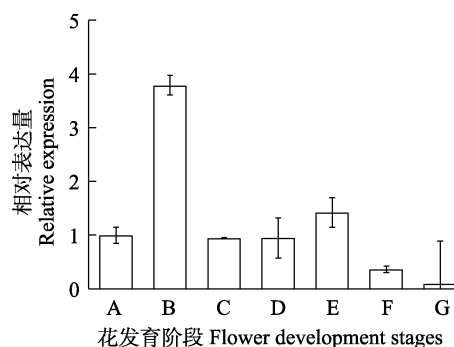


图7 *OnELF3* 基因在花发育和衰老过程中的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *OnELF3* during the *Oncidium* flower development and senescence

OnELF3 基因可能参与开花过程及花衰老的启动。小麦属的 *ELF3* 突变后，突变系比野生型更早开花^[28]；水稻 *ELF3* 抑制 *Ghd7* 的表达，促进水稻开花^[29]；大豆 *ELF3* 与 *LUX1*、*LUX2* 形成复合物，抑制开花抑制因子 *E1* 表达，促使大豆提前开花^[30]。尽管 *ELF3* 在花瓣衰老中的作用尚未见报道，但已有研究表明，*ELF3* 在叶片衰老的调控中起着重要作用^[22, 31-34]。拟南芥 *ELF3* 通过与 *ELF4* 和 *LUX* 组成的晚间复合体 (EC) 直接与 *MYC2* 的启动子结合，对茉莉酸盐 (JA) 诱导的叶片衰老起着负调控作用^[32]；在自然条件下和黑暗诱导条件下的叶片衰老中，*ELF3* 可在转录水平上调控 *PIF4* 和 *PIF5*，不依赖于 EC 而对叶片衰老发挥负调控作用^[33]；在高温条件下，*ELF3* 对 *PIF4* 抑制作用减弱，从而加速叶片衰老^[34]。据此可推测 *OnELF3* 基因在文心兰开花和花衰老启动中发挥作用，但由于开花和花衰老过程中的调控机制十分复杂，*OnELF3* 基因功能仍需进一步研究。

参考文献

- [1] 刘晓荣, 王碧青, 朱根发. 文心兰研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2007, 36(3): 85-90.
LIU X R, WANG B Q, ZHU G F. Research advances of *Oncidium*[J]. Subtropical Plant Science, 2007, 36(3): 85-90. (in Chinese)
- [2] 杨光华, 刘进平. 文心兰 ACC 氧化酶基因 *OnACO1* 克隆与表达分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(4): 693-699.
YANG G H, LIU J P. Cloning and expression analysis of *OnACO1* gene in *Oncidium*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(4): 693-699. (in Chinese)
- [3] YANG G H, LIU J P. Isolation of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene from *Oncidium* Gower Ramsey[J]. Genetics and Molecular Research, 2014, 13(4): 8480-

- 8488.
- [4] 田晓岩, 石乐松, 潘英文, 刘进平. 文心兰 *OnACO2* 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2015, 13(7): 1602-1610.
TIAN X Y, SHI L S, PAN Y W, LIU J P. Cloning and expression analysis of *OnACO2* gene from *Oncidium* Gower Ramsey[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(7): 1602-1610. (in Chinese)
 - [5] 田晓岩, 杨翠萍, 胡进, 闫冰玉, 巩笑笑, 庄玉粉, 潘英文, 刘进平. 文心兰 *OnERS1* 全长基因克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(4): 1265-1272.
TIAN X Y, YANG C P, HU J, YAN B Y, GONG X X, ZHUANG Y F, PAN Y W, LIU J P. Cloning and expression analysis of *OnERS1* gene from *Oncidium* Gower Ramsey[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(4): 1265-1272. (in Chinese)
 - [6] SHI L S, LIU J P. Molecular cloning and expression analysis of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene from *Oncidium* Gower Ramsey[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 469: 203-209.
 - [7] 杨翠萍, 胡进, 闫冰玉, 巩笑笑, 谭玉荣, 高璇, 王丹, 张恒, 刘进平. 文心兰生物钟相关基因 *PRR7* 克隆与表达分析[J]. 热带作物学报, 2018, 39(8): 1670-1579.
YANG C P, HU J, YAN B Y, GONG X X, TAN Y R, GAO X, WANG D, ZHANG H, LIU J P. Cloning and expression analysis of circadian-associated gene *PRR7* (*pseudo-response regulator7*) from *Oncidium*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(8): 1570-1579. (in Chinese)
 - [8] 闫冰玉, 巩笑笑, 谭玉荣, 王鹏, 李双江, 潘英文, 刘进平. 文心兰 *OnRR9* 基因克隆及表达[J]. 热带生物学报, 2018, 9(4): 393-400.
YAN B Y, GONG X X, TAN Y R, WANG P, LI S J, PAN Y W, LIU J P. Cloning and expression analysis of *OnRR9* gene in *Oncidium*[J]. Journal of Tropical Biology, 2018, 9(4): 393-400. (in Chinese)
 - [9] 闫冰玉, 巩笑笑, 谭玉荣, 王丹, 高璇, 张恒, 李双江, 王鹏, 潘英文, 刘进平. 文心兰 *OnRR10* 基因的克隆及表达分析[J]. 热带生物学报, 2020, 11(3): 287-295.
YAN B Y, GONG X X, TAN Y R, WANG D, GAO X, ZHANG H, LI S J, WANG P, PAN Y W, LIU J P. Cloning and expression analysis of *OnRR10* gene in *Oncidium*[J]. Journal of Tropical Biology, 2020, 11(3): 287-295. (in Chinese)
 - [10] 谭玉荣, 高璇, 王丹, 张恒, 李双江, 王鹏, 李晨, 徐丹, 李梦桃, 潘英文, 刘进平. 文心兰生物钟基因 *OnELF3* 启动子克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(15): 4898-4907.
TAN Y R, GAO X, WANG D, ZHANG H, LI S J, WANG P, LI C, XU D, LI M T, PAN Y W, LIU J P. Cloning and expression analysis of *Oncidium* circadian-clock gene *OnELF3* promoter[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(15): 4898-4907. (in Chinese)
 - [11] YANG C P, TAN Y R, YAN B Y, GONG X X, WANG D, GAO X, ZHANG H, WANG P, LI S J, WANG Y, ZHOU LY, PAN Y W, LIU J P. Molecular characterization of clock-associated *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 9* gene from *Oncidium* 'Gower Ramsey'[J]. Plant Growth Regulation, 2020, 91(3): 371-381.
 - [12] 徐小冬, 谢启光. 植物生物钟研究的历史回顾与最新进展[J]. 自然杂志, 2013, 35(2): 110-126.
XU X D, XIE Q G. The circadian clock in plants[J]. Chinese Journal of Nature, 2013, 35(2): 110-126. (in Chinese)
 - [13] GREENHAM K, MCCLUNG C R. Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants[J]. Nature Reviews Genetics, 2015, 16(10): 598-610
 - [14] SABRINA E S, RUGNONE M L, KAY S A. Light perception: a matter of time[J]. Molecular Plant, 2020, 13(3), 363-385.
 - [15] SU C, WANG Y, YU Y, HE Y, WANG L. Coordinative regulation of plants growth and development by light and circadian clock[J]. aBIOTECH, 2021, 2: 176-189.
 - [16] ZHU X, WANG H. Revisiting the role and mechanism of *ELF3* in circadian clock modulation[J]. Gene, 2024, 913: 148378.
 - [17] ZAGOTTA M T, HICKS K A, JACOBS C I, YOUNG J C, HANGARTER R P, MEEKS-WAGNER D R. The *Arabidopsis* *ELF3* gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering[J]. Plant Journal, 1996, 10(4): 691-702.
 - [18] ZAHO H, XU D, TIAN T, KONG F, LIN K, GAN S, ZHANG H, LI G. Molecular and functional dissection of *EARLY-FLOWERING 3* (*ELF3*) and *ELF4* in *Arabidopsis*[J]. Plant Science, 2021, 303: 110786.
 - [19] BODERN S A, WEISS D, ROSS J J, DAVIES N W, TREVASKIS B, CHANDLER P M, SWAIN S M. *EARLY FLOWERING3* regulates flowering in spring barley by mediating gibberellin production and *FLOWERING LOCUS T* expression[J]. Plant Cell, 2014, 26(4): 1557-1569.
 - [20] PRESS M O, LANCTOT A, QUEITSCH C. *PIF4* and *ELF3* act independently in *Arabidopsis thaliana* thermoresponsive flowering[J]. PLoS One, 2016, 11(8): e0161791.
 - [21] SAKURABA Y, BULBUL S, PIAO W, CHOI G, PAEK N C. *Arabidopsis* *EARLY FLOWERING3* increases salt tolerance by suppressing salt stress response pathways[J]. Plant Journal, 2017, 92(6): 1106-1120.
 - [22] SAKURABA Y, HAN S H, YANG H J, PIAO W, PAEK N

- C. Mutation of rice *Early Flowering3.1* (*OsELF3.1*) delays leaf senescence in rice[J]. *Plant Molecular Biology*, 2016, 92(1/2): 223-234.
- [23] YANG C P, XIA Z Q, HU J, ZHUANG Y F, PAN Y W, LIU J P. Transcriptome analysis of *Oncidium* petals provides new insights into the initiation of petal senescence[J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2019, 94(1): 12-23.
- [24] 石乐松, 刘进平. 文心兰 RNA 不同提取方法比较[J]. *生物技术*, 2012, 22(6): 42-45.
SHI L S, LIU J P. Comparison of different RNA extraction methods of *Oncidium* orchid[J]. *Biotechnology*, 2012, 22(6): 42-45. (in Chinese)
- [25] 石乐松, 孙慧, 田晓岩, 吴繁花, 蔡秀清, 庄玉粉, 刘进平. 文心兰南茜种花发育进程与分期[J]. *热带生物学报*, 2016, 7(4): 440-443, 449.
SHI L S, SUN H, TIAN X Y, WU F H, CAI X Q, ZHUANG Y F, LIU J P. Developmental stages of *Oncidium* Gower Ramsey flower[J]. *Journal of Tropical Organisms*, 2016, 7(4): 440-443, 449. (in Chinese)
- [26] LIU X L, COVINGTON M F, FAMLJAISER C, CHORY J, WAGNER D R. *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB signal transduction pathway[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(6): 1293-1304.
- [27] HICKS K A, ALBERTSON T M, WAGNER D R. *EARLY FLOWERING3* encodes a novel protein that regulates circadian clock function and flowering in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(6): 1281-1292.
- [28] ALVAREZ M A, TRANQUILLI G, LEWIS S, KIPPES N, DUBCOVSKY J. Genetic and physical mapping of the earliness per se locus Eps-A (m) 1 in *Triticum monococcum* identifies *EARLY FLOWERING 3* (*ELF3*) as a candidate gene[J]. *Funct Integr Genomics*, 2016, 16: 365-382.
- [29] SAITO H, OGISO-TANAKA E, OKUMOTO Y, YOSHITAKE Y, IZUMI H, YOKOO T, MATSUBARA K, HORI K, YANO M, INOUE H, TANISAKA T. Ef7 encodes an ELF3-like protein and promotes rice flowering by negatively regulating the floral repressor gene *Ghd7* under both short- and long-day conditions[J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53: 717-728.
- [30] BU T T, LU S J, WANG K, DONG L D, LI S L, XIE Q G, XU X D, CHENG Q, CHEN L Y, FANG C, LI H Y, LIU B H, WELLER J L, KONG F J. A critical role of the soybean evening complex in the control of photoperiod sensitivity and adaptation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118: e2010241118.
- [31] LEE J, KANG M H, KIM J Y, LIM P O. The role of light and circadian clock in regulation of leaf senescence[J]. *Front Plant Science*, 2021, 12: 669170.
- [32] ZHANG Y, WANG Y, WEI H, LI N, TIAN W, CHONG K, WANG L. Circadian evening complex represses jasmonate-induced leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(2): 326-337.
- [33] SAKURABA Y, JEONG J, KANG M Y, KIM J, PAEK N C, CHOI G. Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4636.
- [34] KIM C, KIM S J, JEONG J, PARK E, OH E, PARK Y I, LIM P O, CHOI G. High ambient temperature accelerates leaf senescence via PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 and 5 in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Cells*, 2020, 43(7): 645-661.