

墨兰 CsSVPs 的基因克隆和表达分析

王翊冰^{1,2}, 陆楚桥¹, 林增裕¹, 杨凤玺^{1*}, 王亚琴^{2*}

1. 广东省农业科学院环境园艺研究所/广东省园林花卉种质创新综合利用重点实验室, 广东广州 510640; 2. 华南师范大学生命科学学院, 广东广州 510631

摘 要: 墨兰作为一种重要的观赏花卉, 在其花发育过程中需要经历漫长的低温休眠时间才能开花。SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) 基因是植物开花途径中的关键调控因子, 在植物休眠开花中发挥着重要作用。本研究以小香墨兰为材料, 克隆 3 个 SVP 同源基因, 分别命名为 CsSVP1、CsSVP2 和 CsSVP3。生物信息学分析结果表明, 3 个 CsSVP 基因全长分别为 651、687、714 bp, 分别编码 216、228、237 个氨基酸, 均含有保守的 MADS-box 和 K-box 结构域。氨基酸序列比对和系统进化分析结果显示, CsSVP1 与春兰 CgSVP 相似性最高, CsSVP2 与扇形文心兰 EpMADS18 相似性最高, CsSVP3 与秋石斛 DhcSVP 相似性最高。CsSVP1 与春兰 CgSVP 亲缘关系较近; CsSVP2 与扇形文心兰 EpMADS18 亲缘关系较近, 而 CsSVP3 与秋石斛 DhcSVP 亲缘关系较近。启动子顺式元件分析表明, CsSVPs 基因含有许多光响应、激素响应及其他元件。qRT-PCR 结果表明, 3 个 CsSVPs 基因在墨兰根、茎、叶、花、果各组织中均有表达, 其中 CsSVP1、CsSVP3 基因的表达模式相似, 均在叶、茎中积累, 在花和果中表达量显著下降; 而 CsSVP2 则在果中的表达量最高, 其次在叶、茎和花中均有明显表达。同时检测其不同花器官中的表达情况发现, 3 个 CsSVPs 均在萼片中表达量最高。不同花发育时期的表达结果显示, CsSVP2 基因在发育早期 (S₁) 阶段表达量最高, 随着花器官的发育其表达量下降, 在成熟的花朵 (S₅) 时期表达量最低。CsSVP1 和 CsSVP3 在花器官中的整体表达水平不高, 其中 CsSVP1 的表达量在 S₂ 时期最高, 在 S₅ 时期表达量最低; 而 CsSVP3 则在 S₂ 时期表达量最低, 在花发育后期表达量持续升高。低温处理发现, CsSVP1 和 CsSVP2 在低温处理后的表达量略有提升, CsSVP3 则显著下降; 而在 ABA 的处理中, 仅 CsSVP1 的表达受到明显抑制, CsSVP2、CsSVP3 则无响应。这些结果表明不同的 CsSVP 基因其功能存在差异, 在兰花低温休眠促进开花过程中可能发挥不同作用, 为进一步解析墨兰 SVP 基因在花发育过程中的具体功能提供实验依据。

关键词: 墨兰; SVP; 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 CsSVP Genes in *Cymbidium sinense*

WANG Yibing^{1,2}, LU Chuqiao¹, LIN Zengyu¹, YANG Fengxi^{1*}, WANG Yaqin^{2*}

1. Institute of Environmental Horticulture, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Guangdong Provincial Key Laboratory for Innovative and Comprehensive Utilization of Garden Flower Germplasm, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 2. College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China

Abstract: As an important ornamental flower, *Cymbidium sinense* needs to undergo a long period of low temperature dormancy during its flower development to achieve flowering. SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) is a key regulator in plant flowering pathway and plays an important role in plant dormancy and flowering. In this study, three SVP homologous genes, named CsSVP1, CsSVP2 and CsSVP3, were cloned from Xiaoxiang. The results of bioinformatics analysis showed that the full-length of the three CsSVPs genes were 651 bp, 687 bp and 714 bp, encoding 216, 228 and

收稿日期 2025-07-21; **接受日期** 2025-08-28

基金项目 广东省农业科学院中青年学科带头人培养计划项目 (No. R2023PY-JG023); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设 (No. 2024CXTD12)。

作者简介 王翊冰 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 观赏植物分子育种。*通信作者 (Corresponding author): 杨凤玺 (YANG Fengxi), E-mail: yangfengxi@gdaas.cn; 王亚琴 (WANG Yaqin), E-mail: wangyaqin@m.scnu.edu.cn。

237 amino acids, respectively, and all of them contained conserved MADS-box and K-box domains. Amino acid sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *CsSVP1* had the highest similarity with *CgSVP*, *CsSVP2* and *CsSVP3* had the highest similarity with *EpMADS18* and *DhcSVP*, respectively. *CsSVP1* was closely related to *CgSVP* of *C. goeringii*. *CsSVP2* was closely related to *EpMADS18*, while *CsSVP3* was closely related to *DhcSVP*. Promoter cis-element analysis showed that the *CsSVPs* gene contained many light response, hormone response and other elements. The results of qRT-PCR showed that the three *CsSVPs* genes were expressed in roots, stems, leaves, flowers and fruits of *C. sinense*. The expression patterns of *CsSVP1* and *CsSVP3* genes were similar, which were accumulated in leaves and stems, and the expression levels in flowers and fruits were significantly decreased. The expression of *CsSVP2* was the highest in fruit, followed by leaves, stems and flowers, suggesting that their biological functions may be quite different. At the same time, the expression in different floral organs was detected, and it was found that the three *CsSVPs* had the highest expression in sepals. Furthermore, the expression of *CsSVP2* gene in different flower development stages was also detected. It was found that the expression level of *CsSVP2* gene was the highest in the S₁ stage of early development, and decreased with the development of flower organs, and the expression level was the lowest in the S₅ stage of mature flowers. The overall expression levels of *CsSVP1* and *CsSVP3* in floral organs were not high. The expression level of *CsSVP1* was the highest in S₂ period and the lowest in S₅ period. The expression level of *CsSVP3* was the lowest in S₂ period, and the expression level continued to increase in the late stage of flower development. In addition, low temperature treatment found that the expression of *CsSVP1* and *CsSVP2* increased slightly after low temperature treatment, while *CsSVP3* decreased significantly. In ABA treatment, only the expression of *CsSVP1* was significantly inhibited, while *CsSVP2* and *CsSVP3* did not respond. The results suggest that different *CsSVPs* genes have different functions and may play different roles in the process of low temperature dormancy promoting flowering of orchids, which would provide an experimental basis for further analysis of the specific functions of *SVP* genes in the process of flower development.

Keywords: *Cymbidium sinense*; *SVP*; gene cloning; expression analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.12.004

墨兰 (*Cymbidium sinense*) 是兰科 (Orchidaceae) 兰属 (*Cymbidium*) 多年生草本植物, 主要分布于中国南部及亚洲热带地区^[1], 通常在每年 1—3 月开花, 因此也被称为“报岁兰”^[2]。墨兰具有极高的欣赏和药用价值, 深受世界各国人民喜爱。然而, 其幼年期长达 4 a 且花期休眠长达半年以上, 生长周期限制了其产业化的大规模应用。因此, 了解墨兰开花休眠过程的关键调控机制对缩短其开花年限具有重要的理论意义及潜在的经济价值^[3-5]。

SHORT VEGETATIVE PHASE (*SVP*) 作为 MADS-box 基因家族的重要成员, 在调控植物开花时间和花器官分化进程中发挥着关键作用^[6]。*SVP* 主要在营养组织中表达, 能够整合内外源和环境信号, 调控植物从营养生长到生殖生长的转变^[7-9]。*SVP* 能够与春化途径的关键调控因子 *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) 互作, 形成蛋白二聚体, 抑制 *FT* 的表达^[10]。同时, *SVP* 也能够直接与 *FT* 和 *SOC1* 启动子中的 CArG 基序结合, 抑制其转录, 从而抑制生殖发育和成花转变^[11]。尽管 *SVP* 在控制植物物种间的成花转变和花发育中具有保守作用, 但不同物种之间或同一物种内

的 *SVP* 同源基因之间也存在功能多样性^[12]。如拟南芥 *SVP* 基因家族主要包括 *SVP* 和 *AGL24*, 二者在成花转变过程中的作用相反, *SVP* 是开花抑制因子, 而 *AGL24* 是开花促进因子^[13]; 在拟南芥中过表达百合 *LfSVP* 基因会延迟拟南芥开花并导致花器官缺陷^[14]; 而过表达竹子 *SVP* 同源基因 *PvSVP1*, 则会导致早期开花并产生异常的花瓣和萼片^[15]。除调控植物开花时间及花器官分化外, *SVP* 在多年生植物芽休眠和春化过程的调控中亦具有重要生物学功能。研究表明, 水仙 *SVP* 同源基因 *NSVP1* 可通过与开花信号通路相关基因互作, 在休眠诱导时维持抑制开花状态, 而在休眠解除时解除抑制, 从而实现对休眠周期与花发育进程的精准调控^[16]。此外, 李子 *SVP* 同源基因 *DAM* 基因家族不仅参与休眠诱导和解除过程, 还在花器官发育进程中发挥重要调控作用^[17]。

兰花在开花前通常需经历季节性休眠, 其休眠解除依赖于低温积累或特定环境信号, 以确保开花与季节同步^[18]。如蝴蝶兰需低于 26 °C 的温度条件, 杓兰属则需经历 5 °C 或零下的春化作用。值得注意的是, 部分兰花种类则需通过高温信号打破休眠, 如某些石斛品种在高温下开花; 文心

兰则需持续 30 ℃ 高温激活热应激响应以及抗坏血酸通路以诱导开花^[19]。在此过程中, *SVP* 被认为是兰花开花调控的重要候选基因^[20]。然而, 墨兰中尚未有对 *SVP* 家族基因的报道, 其在开花诱导、休眠及花发育进程中的作用还不清楚。因此, 本研究以小香墨兰为材料, 克隆 3 个墨兰 *CsSVP* 基因, 通过生物信息学对其进行分析, 同时利用 RT-qPCR 方法检测 *CsSVPs* 在墨兰不同器官、不同花组织部位和不同花发育时期的表达情况, 为进一步研究 *CsSVP* 基因在墨兰花发育过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为小香墨兰品种, 均来自广东省农业科学院环境园艺研究所。挑选 3 株长势较好的墨兰, 采集其根、茎、叶、花、果、成熟花器官及不同发育时期的花芽, 用液氮速冻, -80 ℃ 保存备用。主要试剂: 反转录试剂 [All-in-One First-Strand Synthesis MasterMixz (with dsDNase)], 实时荧光试剂 [2×SYBR Green qPCR Premix (Universal)] 购自广州欣凯莱生物技术有限公司; DH5α 化学感受态细胞购自生工生物工程技术(上海)股份有限公司; RNA 提取试剂盒 (FastPure Universal Plant Total RNA Isolation Kit)、高保真酶 (2×Phanta Flash Master Mix)、产物纯化试剂盒 (FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit) 和克隆载体试剂盒 (5 min TA/Blunt Cloning Kit) 均购自南京诺维赞公司; 引物及测序由杭州有康生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 墨兰总 RNA 提取 使用 RNA 提取试剂盒提取墨兰根、茎、叶、花、果、成熟花器官 (萼片、唇瓣、花瓣和合蕊柱) 以及不同花发育时期花芽的总 RNA, 用超微量分光光度计测 RNA 浓度, 并使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度。

1.2.2 *CsSVPs* 克隆 基于已发表的墨兰全基因组序列信息^[21], 发现 3 个 *SVP* 基因, 分别命名为 *CsSVP1*、*CsSVP2* 和 *CsSVP3*。通过 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 数据库设计克隆特异引物 (表 1), 并以墨兰品种小香花芽的 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 产物经回收纯化后, 连接到克隆载体上并转化到化学感受态中培养, 测序成功后提取质粒, 保存备用。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
pCsSVP1-F	ATGACGACGGCAAGGCA
pCsSVP1-R	TCACTTCCAACCAGCACATG
pCsSVP2-F	ATGGCGAGGGAGAAGATAAAGATAAG
pCsSVP2-R	CTACAGTTTCAAGAGAAAAGAAGAGAAACGC
pCsSVP3-F	ATGGCGCGAGAGAAGATAAAG
pCsSVP3-R	TCATTTCACATAGAAGAAAAGGGC

1.2.3 *CsSVPs* 生物信息学分析 使用 Expasy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 和 MEME (<https://meme-suite.org/meme/index.html>) 在线软件分析 *CsSVPs* 的理化性质和保守基序; 使用 SOPMA (<https://prabi.ibcp.fr/html/site/web/app.php/home>) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线软件预测 *CsSVPs* 蛋白二级结构和三级结构; 使用 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 在线软件预测可能与 *CsSVPs* 发生互作的蛋白质; 使用 DNAMAN 软件进行多序列比对, 并使用 MEGA 11.0 软件构建系统进化树。

1.2.4 *CsSVPs* 启动子顺式元件分析 根据墨兰基因组数据库获取 *CsSVPs* 的启动子序列 3000 bp。使用 PlantCARE (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 PlantPan3.0 (<http://plantpan.itsps.ncku.edu.tw/promoter.php>) 在线软件预测顺式作用元件和结合位点, 使用 Tbttools 软件进行可视化绘图。

1.2.5 *CsSVPs* 时空表达分析 使用 RT-qPCR 方法分析 *CsSVPs* 在墨兰不同器官 (根、茎、叶、花、果)、不同花发育阶段 (花芽分化初期 *S*₁、花芽分化发育期 *S*₂、花梗伸长期 *S*₃、排铃期 *S*₄ 和开花期 *S*₅)、开花期 (*S*₅) 不同花组织部位 (萼片、花瓣、唇瓣、合蕊柱) 的表达模式, 利用墨兰 *β-actin* 作为内源参考, 引物见表 2。设置 3 个生物学重复, 结果采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算。

1.2.6 *CsSVPs* 在不同温度以及 ABA 处理下的表达分析 选取 6 株生长状态一致的墨兰分成 2 组, 分别置于白天 30 ℃/晚上 25 ℃和白天 15 ℃/晚上 10 ℃的环境中处理, 每个处理各 3 株, 处理前取 1 次叶片样品, 标记为 CK, 每隔 10 d 取 1 次叶片样品, 共取 4 次, 每次取样设置 3 个生物学重复。ABA 处理: 选取生长状况一致的墨兰叶片, 擦净后, 使用 10 mg/L ABA 浸泡处理 8 h, 处理

表 2 实时荧光定量 PCR 反应引物
Tab. 2 Primers for real-time fluorescent quantitative PCR reaction

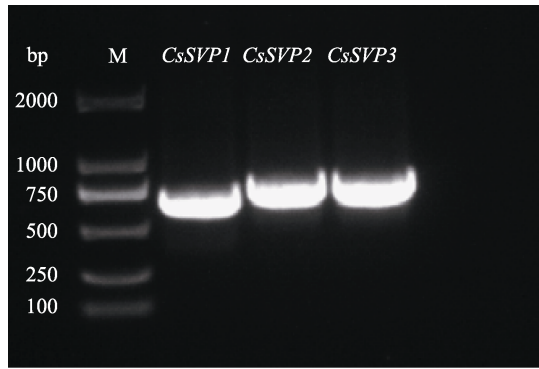
引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
Csactin-qRT-F	CAATGAGCTTCGTGTTGCCC
Csactin-qRT-R	GATACGAACCAAGTTGTGCGG
CsSVP1-qRT-F	AGGGCGAGCAAATTATGGAG
CsSVP1-qRT-R	TCGTTTTACGAGAGTTCCC
CsSVP2-qRT-F	GGCTCATCGTCTTCTCGGCTA
CsSVP2-qRT-R	GAGTTGCTTCGGTCACTTGCTT
CsSVP3-qRT-F	AACGCAACAGCAAGACAAGTGA
CsSVP3-qRT-R	ACCGACATCAGCATCACAGAGA

组设置 3 个生物学重复,均放置于室温避光处理。以上样品均用液氮保存,提取 RNA,以反转录合成的 cDNA 为模板,墨兰 β -actin 为内参,进行 RT-qPCR 实验,结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。

2 结果与分析

2.1 CsSVPs 全长克隆

以墨兰小香的花芽 RNA 为模板,反转录得到 cDNA,基于已发表的墨兰全基因组序列信息设计 SVP 特异性引物,进行 PCR 扩增,经连接、转化、测序后得到 3 个 *CsSVP* 基因序列,将其命名为 *CsSVP1*、*CsSVP2*、*CsSVP3*,全长分别为 651、687、714 bp (图 1)。



M: DL2000 DNA marker.

图 1 CsSVPs 基因克隆

Fig. 1 Cloning of *CsSVP* genes

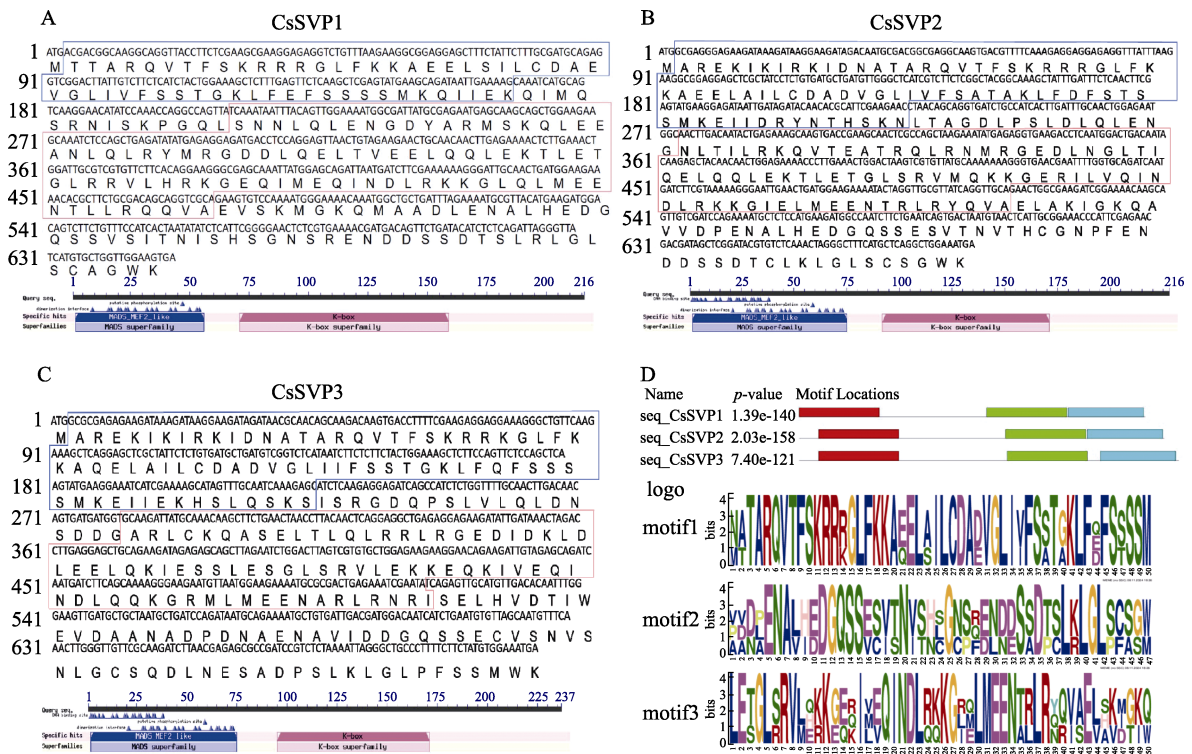
2.2 CsSVPs 生物信息学分析

将克隆得到的 *CsSVPs* 的核苷酸序列翻译成氨基酸序列,发现 *CsSVP1*、*CsSVP2*、*CsSVP3* 分别编码 216、228、237 个氨基酸 (表 3)。*CsSVPs* 氨基酸序列理化性质分析结果显示, *CsSVP1* 和 *CsSVP3* 为不稳定蛋白 (不稳定指数大于 40), *CsSVP1* 和 *CsSVP3* 为酸性蛋白,而 *CsSVP2* 为碱性蛋白,三者均为亲水蛋白, *CsSVP1* 的亲水性比较强 (表 3)。*Blastp* 在线分析 3 个 *CsSVPs* 蛋白结构域结果显示, *CsSVP1*、*CsSVP2*、*CsSVP3* 都拥有保守的 MADS-box 结构域和 K-box 结构域 (图 2A~图 2C)。使用 MEME 软件对 *CsSVP1*、*CsSVP2*、*CsSVP3* 蛋白中的保守 motif 进行预测,得到 3 个 *CsSVP* 蛋白基序的分布图,结合获得的 3 个 *CsSVP* 蛋白结构域图可知, motif1 和 motif2 分别对应 MADS 和 k-box 结构域 (图 2D)。使用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 软件对 3 个 *CsSVP* 蛋白的二级、三级结构进行预测发现, 3 个 *CsSVP* 蛋白均由 α -螺旋、延伸链、 β -转角及不规则卷曲组成,其中 α -螺旋占比最大, β -转角占比最小 (表 4)。挑选一致性分别为 71.96%、72.37%和 76.72% 的序列构建 *CsSVPs* 蛋白三级结构,三者的全球模型质量估计指数都比较接近,最高的是 *CsSVP2* (图 3A)。蛋白互作预测结果显示, *CsSVPs* 可能与其他开花相关蛋白 GI、ADO3、TSF、VRN1、MSI4、TFL1、ELF3、LFY、FRI、K7J8.9 等相互作用 (图 3B)。

利用 DANMAN 软件对墨兰和多个物种 SVP 同源蛋白的氨基酸序列进行比对,结果表明, *CsSVP1* 与春兰 *CgSVP* 的相似性最高 (90.13%), *CsSVP2* 与扇形文心兰 *EpMADS18* 相似性最高 (88.26%), *CsSVP3* 与和秋石斛 *DhcSVP* 相似性最高 (86.08%) (图 4)。为进一步分析 *CsSVPs* 蛋白的系统进化情况,从 NCBI 数据库中挑选多条与 *CsSVPs* 氨基酸序列具有一定同源性的氨基酸序列,使用最大似然法 (ML) 构建系统发育进化树 (图 5)。*CsSVPs* 与其他兰科植物均聚类在

表 3 CsSVPs 的理化性质
Tab. 3 Physical and chemical properties of *CsSVP* genes

基因名称 Gene name	氨基酸长度 Amino acid length	分子量 Molecular weight/Da	不稳定指数 Instability index	等电点 pI	亲水系数 Gravy	分子式 Formula
<i>CsSVP1</i>	216	24 467.73	67.17	6.36	-0.660	C ₁₀₄₂ H ₁₇₂₈ N ₃₁₂ O ₃₄₃ S ₁₁
<i>CsSVP2</i>	228	25 652.27	38.37	8.29	-0.540	C ₁₁₀₆ H ₁₈₃₇ N ₃₂₇ O ₃₆₃ S ₉
<i>CsSVP3</i>	237	26 578.13	52.53	5.46	-0.550	C ₁₁₄₁ H ₁₈₉₂ N ₃₃₄ O ₃₇₅ S ₉

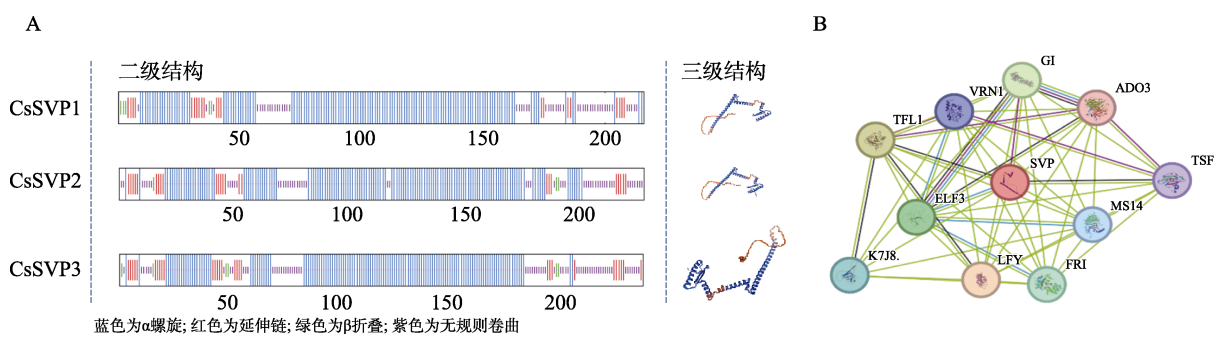


A: CsSVP1 的氨基酸序列和保守结构域；B: CsSVP2 的氨基酸序列和保守结构域；C: CsSVP3 的氨基酸序列和保守结构域；D: CsSVPs 蛋白基序分布。
A: The amino acid sequence and conserved domains of CsSVP1; B: The amino acid sequence and conserved domains of CsSVP2; C: The amino acid sequence and conserved domains of CsSVP3; D: The protein motif distribution of CsSVPs.

图 2 CsSVPs 的保守结构域
Fig. 2 Conserved domain of CsSVP proteins

表 4 CsSVPs 的二级结构比例、三级结构一致性与全球模型质量估计
Tab. 4 Secondary structure proportion, tertiary structure consistency and global model quality estimation of CsSVP proteins

蛋白质 Protein	二级结构 Secondary structure				三级结构 Tertiary structure	
	α 螺旋 Alpha helix	延伸链 Extended strand	β 转角 Beta turn	无规则卷曲 Random coil	一致性 Seq identity	全球模型质量估计 GMQE
CsSVP1	63.89%	9.72%	2.31%	24.07%	71.96%	0.77
CsSVP2	63.60%	10.53%	1.32%	24.56%	72.37%	0.78
CsSVP3	57.38%	12.24%	2.95%	27.43%	76.72%	0.76



A: CsSVPs 的二级结构和三级结构；B: CsSVPs 蛋白互作关系预测。
A: The secondary and tertiary structures of CsSVP proteins; B: Prediction of the interaction relationships of CsSVP proteins.
图 3 CsSVPs 蛋白结构与蛋白互作关系预测
Fig. 3 Prediction of protein structure and protein interaction relationship of CsSVP proteins

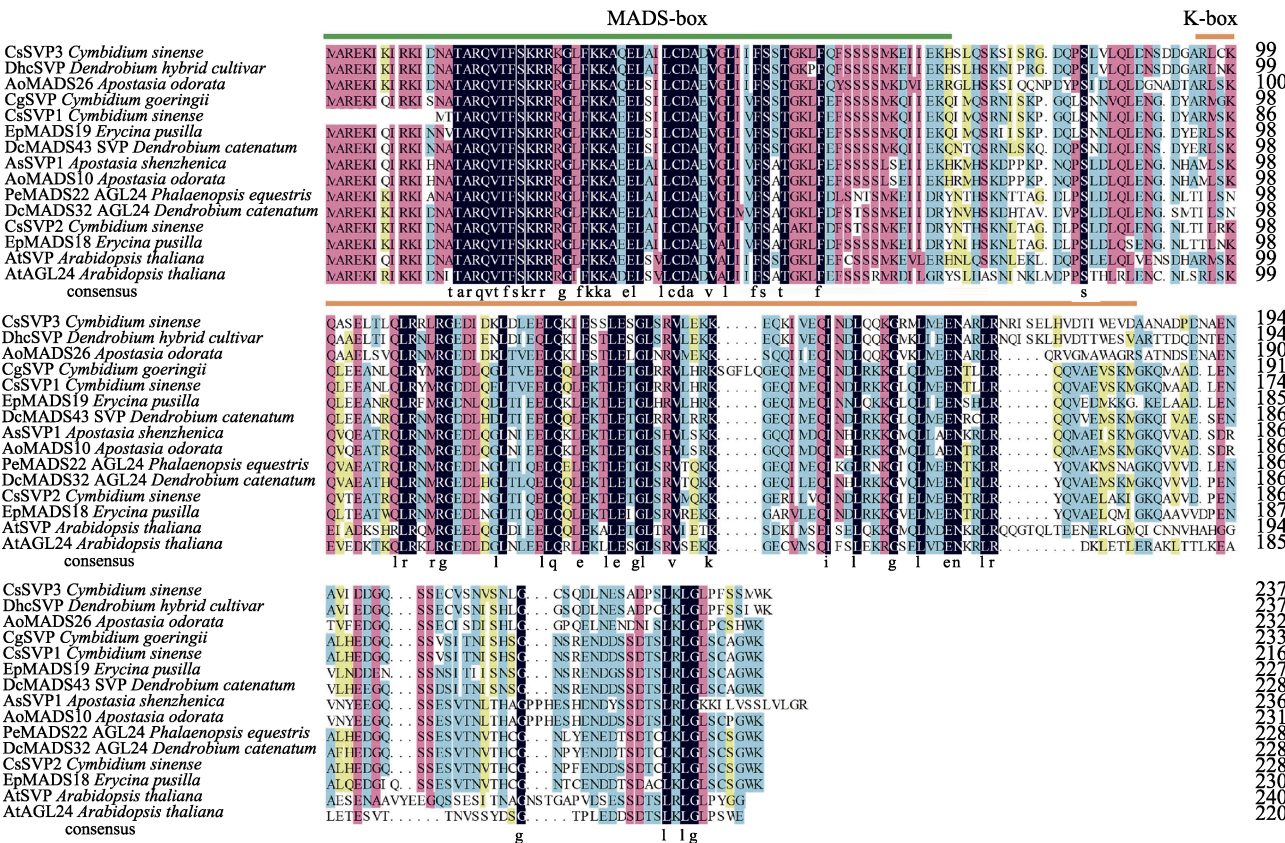


图 4 CsSVPs 氨基酸多序列比对

Fig. 4 Amino acid multiple sequence alignment of CsSVP proteins

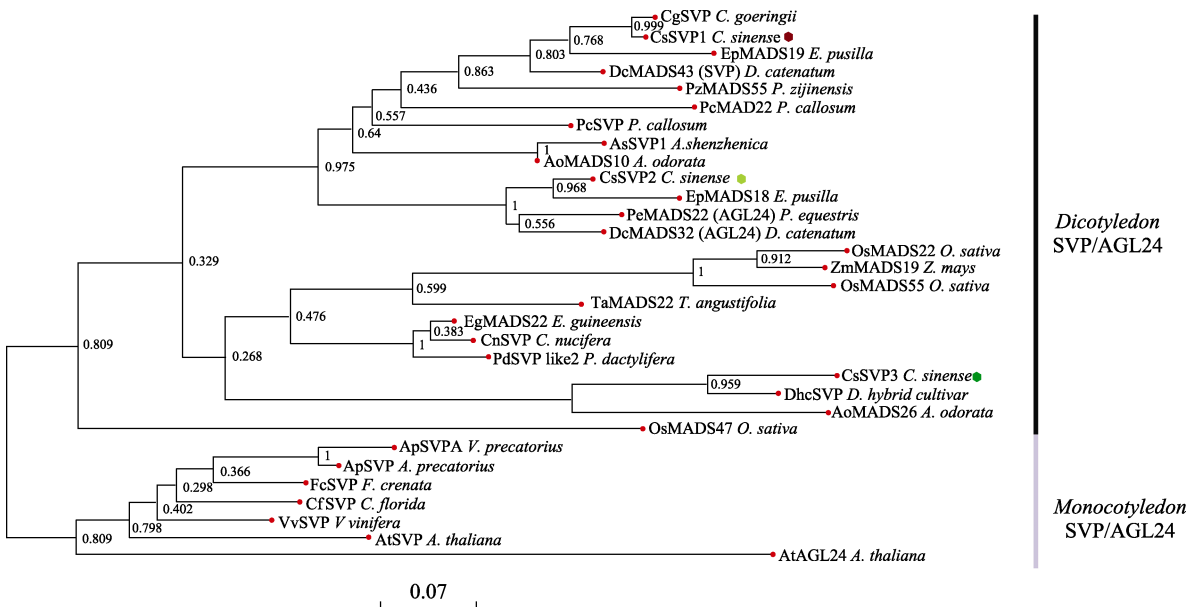


图 5 CsSVPs 系统发育进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of CsSVPs

单子叶 SVP/AGL24 的进化支上, CsSVP1 与春兰 CgSVP 亲缘关系最近, CsSVP2 与扇形文心兰 EpMADS18 亲缘关系较近, 而 CsSVP3 与秋石斛 DhcSVP 亲缘关系较近。

2.3 CsSVPs 启动子顺式元件分析

根据墨兰基因组参考序列, 得到 CsSVPs 基因 CDS 编码区前 3000 bp 的启动子区域。利用 PlantCARE 软件预测其进行顺式元件和结合位

点，在 3 个 *CsSVPs* 基因启动子中共鉴定出 44 种核心元件（图 6），根据功能可分为光响应元件（Box4、GATA-motif、G-box、TCT-motif、MRE、Gap-box、GT1-motif、AT1-motif、TCCC-motif、I-box、chs-CMA1a、AE-box、LAMP-element）、激素响应元件（ERE、as-1、CGTCA-motif、TGACG-motif、ABRE、P-box、TCA-element、TATC-box、AuxRR-core、TGA-element、CCGTCC motif、CCGTCC-box）、以及植物生长发育和胁迫响应等元件（MYC、MYB、STRE）、其中，光响应元件占比最大，为 30%，其次是激素响应元件。另外，在 *CsSVP1* 和 *CsSVP2* 中均有低温响应元件（DRE core）。

ABRE、P-box、TCA-element、TATC-box、AuxRR-core、TGA-element、CCGTCC motif）以及植物生长发育和胁迫响应等元件（MYC、MYB、STRE），其中，光响应元件占比最大，为 30%，其次是激素响应元件。另外，在 *CsSVP1* 和 *CsSVP2* 中均有低温响应元件（DRE core）。

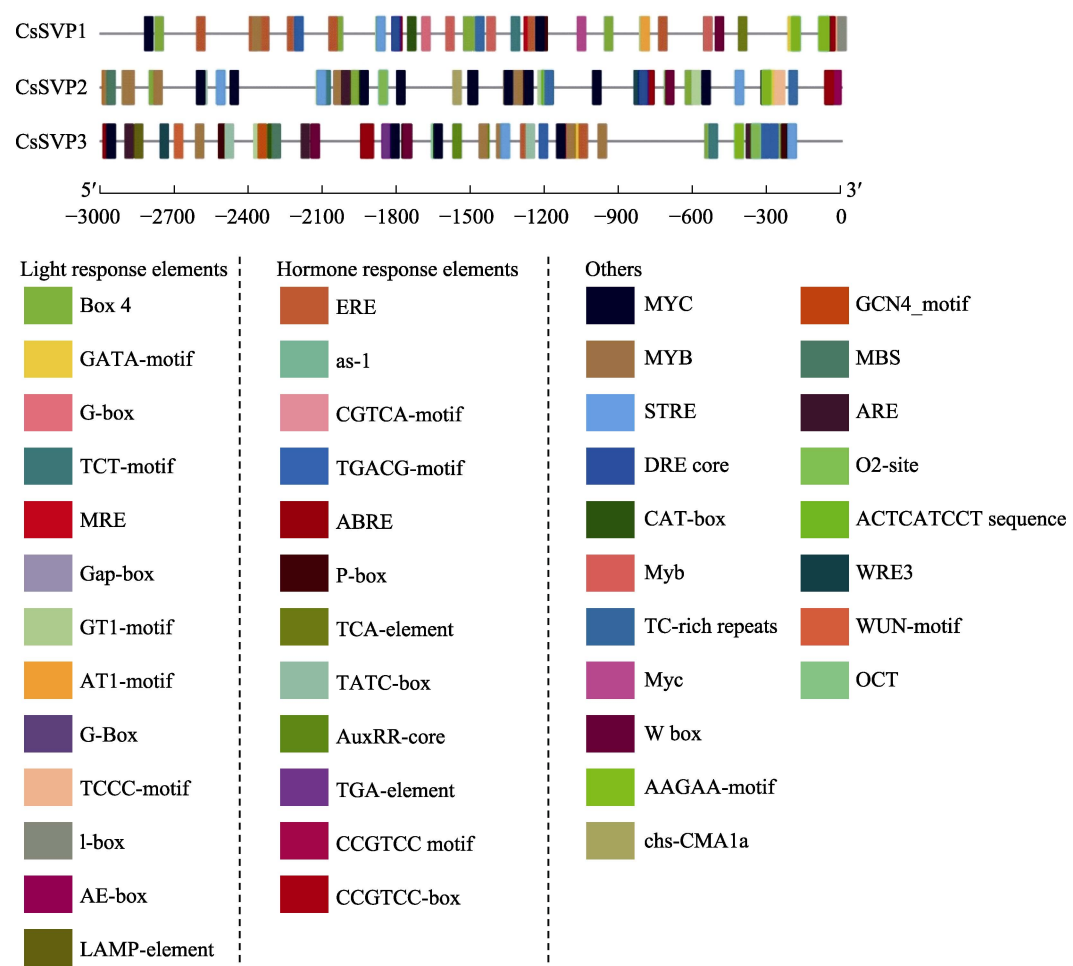
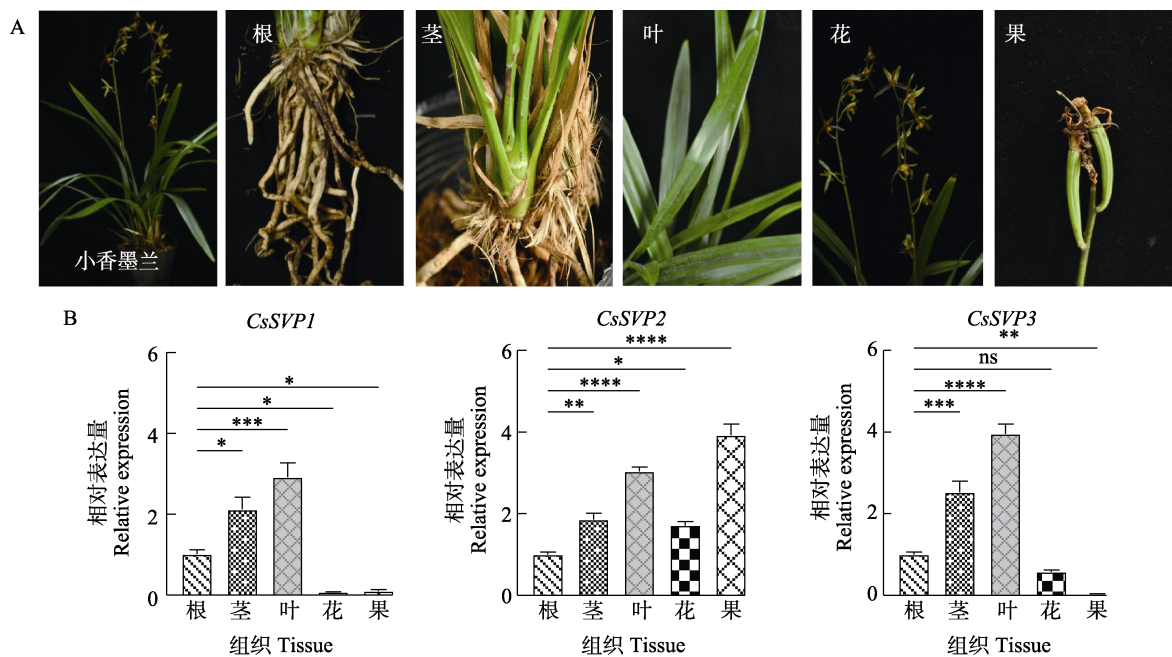


图 6 *CsSVPs* 启动子顺式元件可视化分析
Fig. 6 Visual analysis of cis-elements in *CsSVP* genes promoter

2.4 *CsSVPs* 的时空表达分析

利用 qRT-PCR 方法分析 *CsSVPs* 在墨兰不同组织器官、不同花发育时期和不同花器官的表达特性。结果显示，*CsSVP1* 在叶中相对高表达，是其他组织的 1.4~30 倍，其次是茎，最后是根，在花跟果中的相对表达量显著下降；*CsSVP2* 在果中的表达量最高，是其他组织的 1.3~3 倍，其次是在叶中有较高的转录水平，在茎和花中的表达量较为接近；*CsSVP3* 与 *CsSVP1* 的表达模式相似，其在叶中表达量最高，而在果中的表达量接近于零，在叶中的表达量约是果的 99 倍（图 7）。总

体上看，*CsSVPs* 主要在墨兰营养组织中表达。在不同花发育阶段中，*CsSVP1* 在发育早期 S₁、S₂ 时期的转录水平相对较高，且在 S₂ 时期的表达量达到顶峰，随着花发育时间的推移，其表达量逐渐下降，到成熟花朵（S₅）时期的表达量最低，几乎没有；*CsSVP2* 在发育早期 S₁ 时期的表达量最高，并随着花器官发育，其表达量下降，在成熟花朵 S₅ 时期的表达量最低；*CsSVP3* 在 S₂ 时期的表达量最低，而后逐渐上升，到 S₅ 时期的表达量达到最高（图 8）。以上结果表明 3 个 *CsSVP* 基因在不同花发育阶段差异表达。

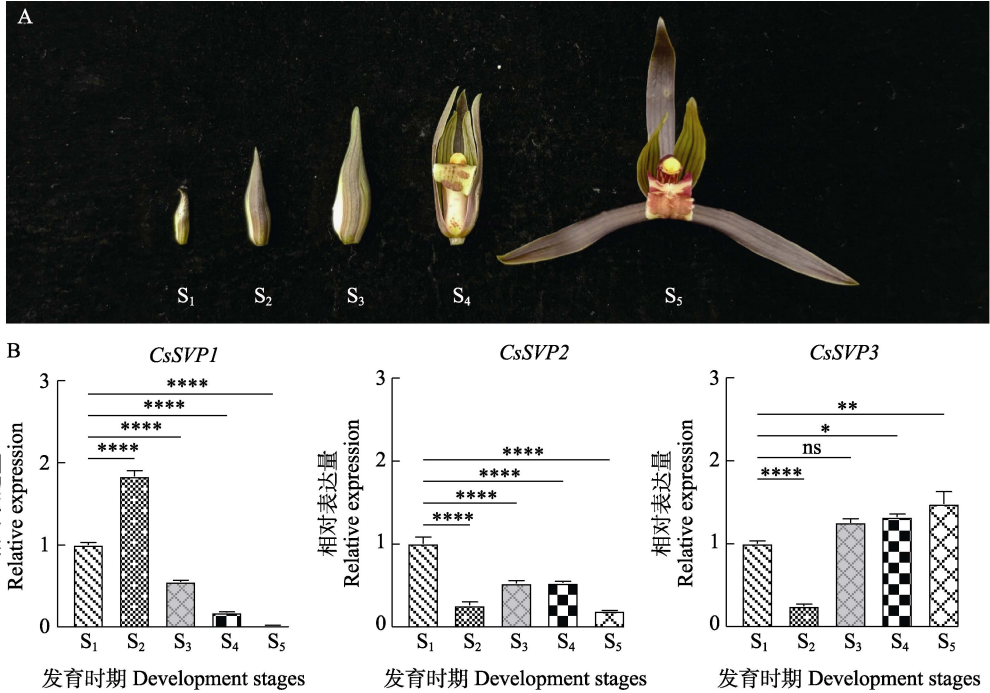


A: 墨兰不同组织器官 (根、茎、叶、花、果); B: *CsSVP1*、*CsSVP2* 和 *CsSVP3* 在墨兰花发育不同阶段的相对表达量。ns 表示差异不显著 ($P>0.05$), *表示差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$), ***表示差异极显著 ($P<0.001$), ****表示差异极显著 ($P<0.0001$)。

A: Different tissues and organs (roots, stems, leaves, flowers, fruits) of *C. sinense*; B: The relative expression levels of *CsSVP1*, *CsSVP2* and *CsSVP3* at different stages of flower development in *C. sinense*. ns indicates no significant ($P>0.05$), * indicates significant difference ($P<0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$), *** indicates extremely significant difference ($P<0.001$), **** indicates extremely significant difference ($P<0.0001$).

图 7 *CsSVPs* 在墨兰不同组织器官的表达模式

Fig. 7 Expression patterns of *CsSVP* genes in different tissues and organs of *C. sinense*



A: 墨兰不同花发育阶段; B: *CsSVP1*、*CsSVP2* 和 *CsSVP3* 在墨兰花发育不同阶段的相对表达量。ns 表示差异不显著 ($P>0.05$), *表示差异显著 ($P<0.05$), **表示差异极显著 ($P<0.01$), ****表示差异极显著 ($P<0.0001$)。

A: Different flower development stages of *Cymbidium sinense*; B: The relative expression levels of *CsSVP1*, *CsSVP2* and *CsSVP3* at different flower development stages of *C. sinense*. ns indicates no significant ($P>0.05$), * indicates significant difference ($P<0.05$), ** indicates extremely significant difference ($P<0.01$), **** indicates extremely significant difference ($P<0.0001$).

图 8 *CsSVPs* 在墨兰不同花发育阶段的表达模式

Fig. 8 Expression patterns of *CsSVP* genes at different flower development stages of *C. sinense*

墨兰花器官的表达谱分析结果（图 9）显示，*CsSVP1* 基因在墨兰萼片中的相对表达量较高，在花瓣和唇瓣中的表达量几乎没有；*CsSVP2* 基因在萼片中的表达量较高，其次是合蕊柱；*CsSVP3* 基因在萼片中的表达量较高，其次是花瓣，在唇瓣中的表达量较低。说明 *CsSVPs* 主要在外轮花器官中表达。

2.5 *CsSVPs* 在低温和 ABA 处理下的表达分析

对墨兰进行高、低温处理，分析 3 个 *CsSVP* 基因的表达模式。由图 10 可知，经过高温和低温处理，整体上 *CsSVP1* 和 *CsSVP2* 的表达模式有相同之处，在同一时间点的低温处理表达量均高于高温处理，但具体来看，*CsSVP1* 和 *CsSVP2* 的表达有所差异，*CsSVP1* 在高温处理后的表达量均低于 CK，而在低温处理后的表达量均高于 CK，并且在 10 d 时的表达量达到最高。*CsSVP2* 在高温处理后的表达量除 20 d 外，均低于 CK，在低温处理后的表达量随着时间的延长而逐渐下降，从 10 d 的高于 CK 逐渐减少到 40 d 的低于 CK。而在高温和低温的处理下，*CsSVP3* 的转录水平受到显著抑制。墨兰叶片经 ABA 处理后，*CsSVP1* 的

表达量下降，*CsSVP2* 的表达量与 CK 基本一致，而 *CsSVP3* 的表达量略微下降。

3 讨论

对于观赏植物来说，其连续开花能力与商业和观赏价值紧密相关，而墨兰幼年期长，开花期短，并且一年一花，极大程度地影响了其商业和观赏价值^[22]。植物从营养生长向生殖生长转变，需要经过光周期途径、年龄途径、赤霉素途径、自主途径、春化途径以及环境温度途径等 6 个途径^[23]，而 *SVP* 能够在环境温度途径和春化途径中通过与不同的转录因子发挥作用，从而影响植物开花。

在多种植物中 *SVP* 含有 1 到多个同源基因。如拟南芥 *SVP* 基因有 2 个转录本^[24]；水稻 *SVP* 的同源基因有 3 个，分别为 *OsMADS22*、*OsMADS55* 和 *OsMADS47*^[25-26]；野蔷薇和月月粉中含有 5 个 *SVP* 同源基因^[27]；而桂花中含有 7 个 *SVP* 同源基因^[28]。已发布的墨兰全基因组序列显示，墨兰中有 3 个 *SVP* 同源基因，本研究将其分别命名为 *CsSVP1*、*CsSVP2* 和 *CsSVP3*，发现

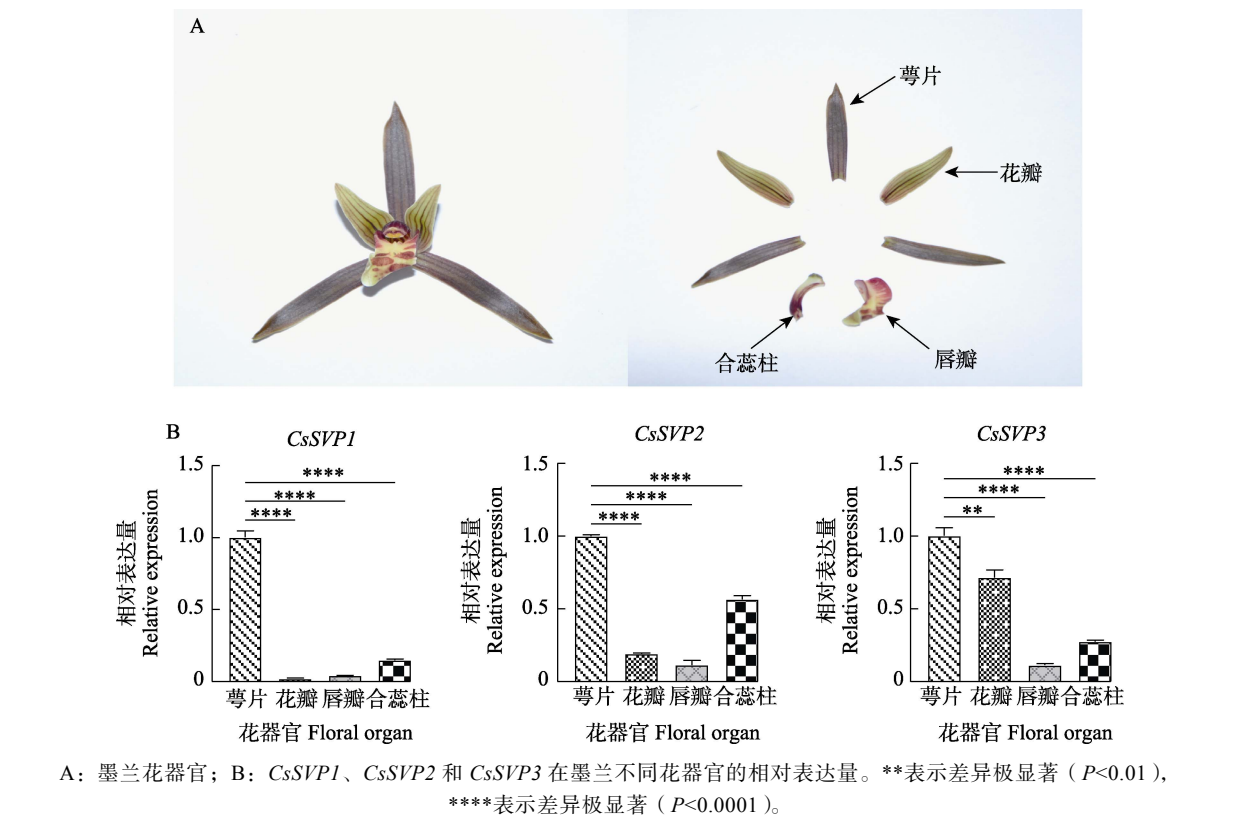


图 9 *CsSVPs* 在墨兰不同花器官的表达模式

Fig. 9 Expression patterns of *CsSVPs* in different floral organs of *C. sinense*

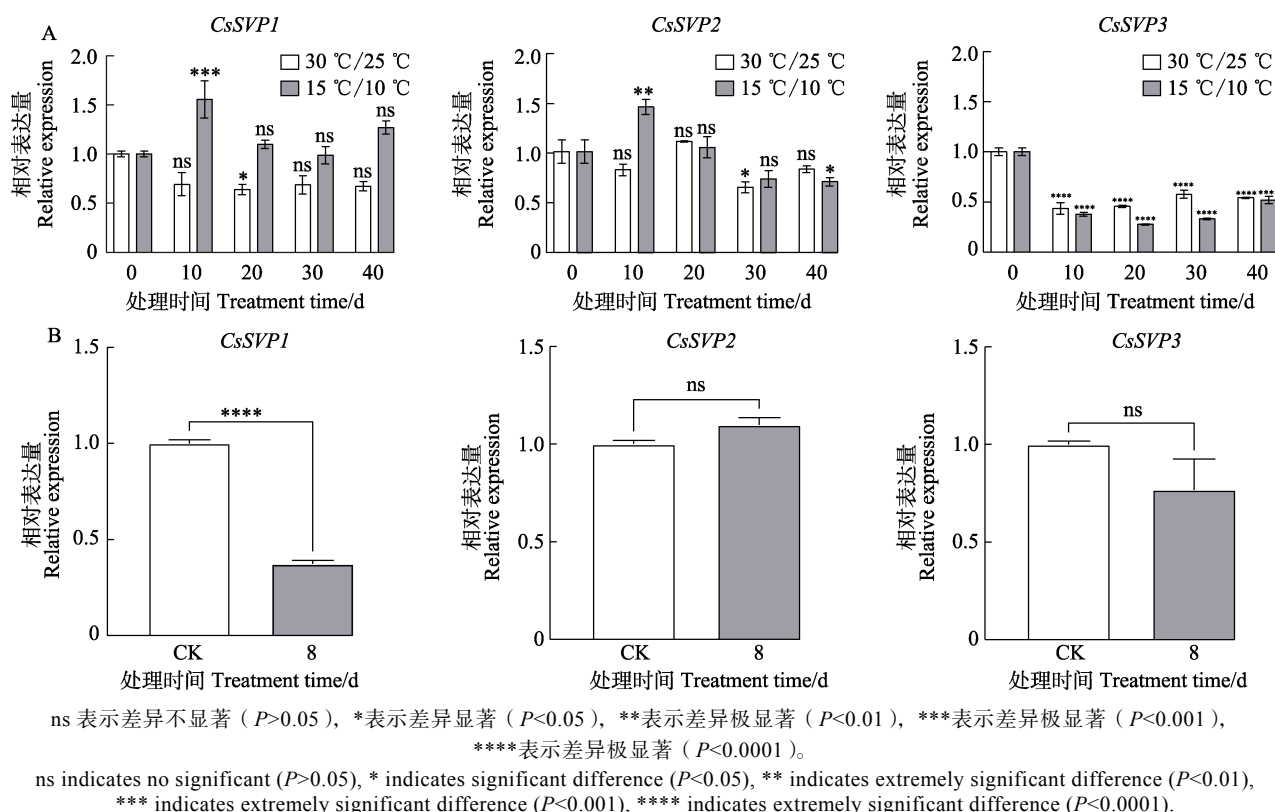


图 10 *CsSVPs* 在不同温度 (A) 和 ABA 处理 (B) 的表达分析

Fig. 10 Expression analysis of *CsSVPs* at different temperatures (A) and ABA treatment (B) wode

CsSVP1、*CsSVP2* 和 *CsSVP3* 的全长为 651、687、714 bp, 分别编码 216、228、237 个氨基酸, 均含有典型的 MADS-box 和 K-box 结构域, 3 个 *CsSVPs* 之间具有高度的保守性。系统进化分析表明, *CsSVP1*、*CsSVP2* 和 *CsSVP3* 分属不同的进化支, 表明墨兰的 SVP 基因家族存在不同的进化轨迹, 其中 *CsSVP1* 与春兰 *CgSVP* 亲缘关系比较近, *CsSVP2* 与扇形文心兰 *EpMADSS18* 亲缘关系比较近, 而 *CsSVP3* 与石斛 *DhcSVP* 亲缘关系更密切。表明 *CsSVPs* 基因在墨兰基因复制中发生了序列分化, 这可能有利于响应复杂多变的环境从而调控墨兰开花。

SVP 是植物中重要的开花抑制因子, 主要在营养生长阶段发挥作用。拟南芥 *SVP* 在营养组织中高表达, 在花和角果中几乎检测不到^[24]; 藏红花 *CsSVP* 也在营养器官中表达, 但在生殖器官中不表达^[29]; 芒果 *MiSVPs*^[30]、枇杷 *EjSVPs*^[31]、水仙 *NSVPI*^[17] 在营养组织中的表达量较高, 在花中略微表达; 萱草 *HkSVP* 在营养组织和花瓣、花梗和果实中的表达量较高, 在雌蕊中检测不到^[32]; 荔枝 *LcSVP2* 在营养组织和雄花中的表达较高, 在雌花和种子中几乎不表达^[33]。本研究发

现 *CsSVP1* 和 *CsSVP3* 同样主要在营养组织中表达, 在花和果中的相对表达量较低; 而 *CsSVP2* 除在营养组织中的表达量较高外, 在花和果中的表达量也比较高, 尤其是果。综合表达模式和调控响应元件分析结果, *CsSVP1* 可能响应低温解除休眠并促进开花, *CsSVP2* 可能参与花器官形成, 而 *CsSVP3* 可能在花发育全过程中发挥协同作用。*CsSVP1* 因其低温诱导特性和 ABA 敏感性, 可能是调控墨兰开花的关键候选基因。

墨兰的花芽生长缓慢, 会进入半休眠状态, 需要一段时间的低温来解除休眠过程, 从而促进花序伸长和开花^[21]。DRE core 是 DRE 功能的核心序列, 能够参与植物对低温、脱水、高盐等胁迫的响应^[34]。本研究发

应。除低温外, 植物激素在成花与休眠调控中也扮演着重要角色。其中, 脱落酸 (ABA) 是经典的开花抑制因子, 主要抑制成花转变, 被认为是休眠调节中必不可少的植物激素, 是种子休眠的中心枢纽^[35]。在墨兰激素相关的 DEGs 中, 生长素、GAs 和 ABAs 是最丰富的基因。当墨兰花芽处于休眠阶段时, 其 ABA 含量显著升高, 而在休眠解除后的快速发展阶段 ABA 含量迅速降低^[18]。*SVL* (*SVP* 同源基因) 可与 ABA 形成正反馈环路, 进而实现休眠维持或抑制^[36]。虽然墨兰与其他多年生草本植物不同, 不含有 *DAM* 基因, 不能调控休眠, 但推测其休眠可能依赖 *SVP* 基因。本研究为探究 ABA 对 3 个 *CsSVP* 基因的影响, 对墨兰叶片进行外源 ABA 处理, 发现 *CsSVP1* 的表达量下降, *CsSVP2* 的表达量基本保持不变, 而 *CsSVP3* 的表达量略微下降。推测 ABA 显著抑制 *CsSVP1* 的表达, 表明 *CsSVP1* 可能受 ABA 负调控, 而 ABA 对 *CsSVP2* 和 *CsSVP3* 无明显影响。

综上所述, 本研究克隆了墨兰的 3 个 *SVP* 基因, 并系统分析了其理化性质与表达模式, 为进一步解析墨兰 *SVP* 基因在花发育过程中的具体功能提供实验依据。

参考文献

- [1] CHEN X Q, LIU Z J, ZHU G H, LANG K Y, TSI Z H, LUO Y B, JIN X H, CRIBB P J, WOOD J J, GALE S W. Flora of China[J]. Biodiversity Heritage Library Field Notes Project, 2006, 13(2): 301-302.
- [2] ZHANG J, WU K, ZENG S, TEIXEIRA d S J A, ZHAO X, TIAN C E, XIA H, DUAN J. Transcriptome analysis of *Cymbidium sinense* and its application to the identification of genes associated with floral development[J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 279-279.
- [3] 何玲, 孙博, 王义琴, 臧睿, 陈宇, 和凤美, 朱永平. 墨兰 *AP3* 基因过表达载体构建及遗传转化铁皮石斛[J]. 湖北农业科学, 2023, 62(7): 157-162.
HE L, SUN B, WANG Y Q, ZANG R, CHEN YU, HE F M, ZHU Y P. Construction of *Cymbidium sinense AP3* gene overexpression vector and genetic transformation of *Dendrobium officinale*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2023, 62(7): 157-162. (in Chinese)
- [4] 黄玮婷, 吴博文, 方中明. 墨兰 FT 同源基因的时空表达及功能分析[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(1): 135-141.
HUANG W T, WU B W, FANG Z M. Temporal and spatial expression and functional analysis of FT homologous genes in *Cymbidium sinense*[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2017, 44(1): 135-141. (in Chinese)
- [5] 陈栋, 操君喜, 朱根发. 国兰产业化现状与发展思路[J]. 中国花卉园艺, 2009(13): 8-10.
CHEN D, CAO J X, ZHU G F. Status and development ideas of Chinese orchid industrialization[J]. China Flower Horticulture, 2009(13): 8-10. (in Chinese)
- [6] GREGIS V, FERNANDO A, SESSA A, GUERRA R F, SIMONINI S, MATEOS J L, TORTI S, ZAMBELLI F, PRAZZOLI G M, BJERKAN K N. Identification of pathways directly regulated by SHORT VEGETATIVE PHASE during vegetative and reproductive development in *Arabidopsis*[J]. Genome Biology, 2013, 14: R56.
- [7] ANDRES F, PORRI A, TORTI S, COUPLAND G. SHORT VEGETATIVE PHASE reduces gibberellin biosynthesis at the *Arabidopsis* shoot apex to regulate the floral transition Fernando Andrés1[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(26): E2760-2769.
- [8] ZHOU C C, LIU H M, WANG H L, NIU S H, EL-KASSABY YA, LI W. Deciphering the role of SVP-like genes and their key regulation networks during reproductive cone development in *Pinus tabulaeformis*[J]. Plant, Cell and Environment, 2025, 48(1): 365-386.
- [9] DE W M, COSTA G V, FANKHAUSER C. Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development[J]. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67(1): 513.
- [10] SEARLE I. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*[J]. Genes and Development, 2006, 20(7): 898-912.
- [11] JANG S, TORTI S, COUPLAND G. Genetic and spatial interactions between FT, TSF and SVP during the early stages of floral induction in *Arabidopsis*[J]. Plant Journal for Cell and Molecular Biology, 2010, 60(4): 614-625.
- [12] 刘世男, 林新春. 植物 *SVP* 基因的研究进展[J]. 生物技术通报, 2014(6): 9-13.
LIU S N, LIN X C. Advance of studies on *SVP* gene in plants[J]. Biotechnology Bulletin, 2014,(6): 9-13. (in Chinese)
- [13] GREGIS V. AGL24, SHORT VEGETATIVE PHASE, and APETALA1 redundantly control AGAMOUS during early stages of flower development in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2006, 18(6): 1373-1382.
- [14] WU X M, LING W, PAN Y S, YANG Z M, MA J, YANG Y J, XIANG W, ZHOU L, SUN M S, CHEN J R, CHEN H X, ZHENG S X, ZENG J G, LI Y F. Functional analysis of a lily SHORT VEGETATIVE PHASE ortholog in flowering

- transition and floral development[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2024, 206: 108-287.
- [15] LIU S, HOU D, VASUPALLI N, LIN X. Overexpression of PvSVP1, an *SVP-like* gene of bamboo, causes early flowering and abnormal floral organs in *Arabidopsis* and rice: PvSVP1 regulates flowering time and floral organ development[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2023, 55(2): 237.
- [16] ZHAO K, ZHOU Y Z, AHMAD S, XU Z D, LI Y S, YANG W R, CHENG T R, WANG J, ZHANG Q X. Comprehensive cloning of *Prunus mume* dormancy associated *MADS-box* genes and their response in flower bud development and dormancy[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 17.
- [17] LI X F, WU W T, ZHANG X P, QIU Y, ZHANG W, LI R, XU J, SUN Y, WANG Y, XU L. Narcissus tazetta *SVP-like* gene NSVP1 affects flower development in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 173: 89-96.
- [18] AHMAD S, LU C Q, GAO J, WEI Y L, XIE Q, JIN J P, ZHU G F, YANG F X. Integrated proteomic, transcriptomic, and metabolomic profiling reveals that the gibberellin-abscisic acid hub runs flower development in the Chinese orchid *Cymbidium sinense*[J]. *Horticulture Research*, 2024, 11(5): uhae073.
- [19] WANG S L, VISWANATH K K, TONG C G, AN H R, JANG S, CHEN F C. Floral induction and flower development of orchids[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 1258.
- [20] JESSICA A R R, MADRIGAL Y, ALZATE J F, PABÓN-MORA N. Evolution and expression of the *MADS-box* flowering transition genes *AGAMOUS-like* 24/*SHORT VEGETATIVE PHASE* with emphasis in selected neotropical orchids[J]. *Cells and Development*, 2021, 168: 203755.
- [21] YANG F X, GAO J, WEI Y L, REN R, ZHANG G Q, LU C Q, JIN J P, AI Y, WANG Y Q, CHEN L J, AHMAD S, ZHANG D Y, SUN W H, TSAI W C, LIU Z J, ZHU G F. The genome of *Cymbidium sinense* revealed the evolution of orchid traits[J]. *Plant Biotechnol Journal*, 2021, 19(12): 2501-2516.
- [22] 任闽. 蔷薇 RmSVP 基因的进化分析及功能鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- REN M. Evolution analysis and function identification of RmSVP genes in *Rosa multiflora*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [23] 周琴, 张思思, 包满珠, 刘国锋. 高等植物成花诱导的分子机理研究进展[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(11): 3681-3692.
- ZHOU Q, ZHANG S S, BAO M Z, LIU G F. Advances on molecular mechanism of floral initiation in higher plants[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(11): 3681-3692. (in Chinese)
- [24] HARTMANN U, HÖHMANN S, NETTESHEIM K, WISMAN E, SAEDLER H, HUIJSER P. Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2000, 21(4): 351-360.
- [25] LEE J H, PARK S H, AHN J H. Functional conservation and diversification between rice OsMADS22/OsMADS55 and *Arabidopsis* SVP proteins[J]. *Plant Science*, 2012, 185/186: 97-104.
- [26] FABIO F, VERONICA G, NILLA P, LUCIA C, MARTIN K. The rice StMADS11-like genes *OsMADS22* and *OsMADS47* cause floral reversions in *Arabidopsis* without complementing the *svp* and *agl24* mutants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(8): 2181-2190.
- [27] 陈慧. 野蔷薇 RmSVPs 对低温的应答及对开花和花器官发育的调控[D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- CHEN H. Low temperature response and flowering and floral organ development regulation of RmSVPs from *rosa multiflora*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [28] 朱益民. 桂花 OfSVP 和扩张蛋白基因在开花过程中的作用[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
- ZHU Y M. The role of OfSVP transcription factors and dilated proteins in *osmanthus fragrans* flowering[D]. Hangzhou: Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2019. (in Chinese)
- [29] HAGHIGHI R, TABATABAEI B E S, MAIBODY S A M M, TALEBI M, RENAULT-MORATA B. A flowering inhibitor of the temperature-dependent pathway in *Crocus sativus* L.[J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47: 2171-2179.
- [30] MO X, LUO C, YU H X, CHEN J W, LIU Y, XIE X J, FAN Z Y, HE X H. Isolation and functional characterization of two *SHORT VEGETATIVE PHASE* homologous genes from mango[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(18): 9802.
- [31] JIANG Y Y, PENG J R, ZHANG Z K, LIN S K, Lin S Q, YANG X H. The role of EjSVPs in flower initiation in *Eriobotrya japonica*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(23): 5933.
- [32] LIU Y Z, GAO Y K, YUAN L, ZHANG Q X. Molecular characterization and expression patterns of the *HkSVP* gene reveal distinct roles in inflorescence structure and floral organ development in *Hemerocallis fulva*[J]. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22: 12010.
- [33] MA M M, ZHANG H F, TIAN Q, WANG H C, ZHANG F Y, TIAN X, ZENG R F, HUANG X M. MIKC type *MADS-box* transcription factor *LcSVP2* is involved in dor-

- mancy regulation of the terminal buds in evergreen perennial litchi (*Litchi chinensis* Sonn)[J]. Horticulture Research, 2024, 11(7): uhae150.
- [34] NARUSAKA Y, NAKASHIMA K, SHINWARI Z K, SAKUMA Y, FURIHATA T, ABE H, NARUSAKA M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses[J]. Plant Journal, 2003, 34(2): 137-148.
- [35] SHU K, LUO X, MENG Y, YANG W. Toward a molecular understanding of abscisic acid actions in floral transition[J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(2): 215-221.
- [36] BUSOV V B. Plant development: dual roles of poplar SVL in vegetative bud dormancy[J]. Current Biology, 2019, 29(2): R68-R70.