

山核桃 *FLOWERING LOCUS C* 同源基因鉴定与表达分析

杨希宏, 黄有军, 陈芳芳, 黄坚钦

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 根据本课题组对山核桃 *Carya cathayensis* 花芽 454 测序获得的 *CcFLC* 基因的 2 个开放阅读框(ORF)分别设计引物并进行聚合酶链式反应(PCR)扩增, 获得开放阅读框大小分别为 639 bp 和 612 bp, 编码 212 个和 203 个氨基酸, GenBank 登录号分别为 JQ829074 和 JQ829075, 都具有典型的 MADS-box 结构域, 核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 78%和 67%, 5'端高度同源, 3'端差异较大。与太行花 *Taihangia rupestris* 和梨 *Pyrus pyrifolia* 等物种的 *FLC*-like 基因的氨基酸序列同源性达到 40%~57%。氨基酸疏水性分析显示, 它们的羧基端都是疏水性氨基酸, 而氨基端是亲水性氨基酸, 大部分氨基酸残基是疏水性的。实时定量 PCR 结果显示: *CcFLC* 基因的 2 个开放阅读框在山核桃的营养枝的幼茎、幼叶、顶芽, 以及短果枝的雌花芽和雄花芽中都有表达, 但相对表达量存在较大差异, 同一组织中 ORF1 的表达丰度明显高于 ORF2。ORF1 表达量在茎中最高, 但在叶和雄花芽的表达量最低; ORF2 在雌花芽中相对表达量最高, 茎中表达量最低。图 7 参 23

关键词: 植物学; 山核桃; *CcFLC*; 序列分析; 表达分析

中图分类号: S664.1; Q943

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2013)01-0001-08

Identification and expression of *FLOWERING LOCUS C* homologous genes in *Carya cathayensis*

YANG Xihong, HUANG Youjun, CHEN Fangfang, HUANG Jianqin

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Based on two open reading frames (ORFs) of *Carya cathayensis FLOWERING LOCUS C (CcFLC)* genes which were acquired from 454 sequencings of *Carya cathayensis* buds, primers were designed and amplified with polymerase chain reaction (PCR). An amino acid hydrophobicity analysis was also conducted. Acquired the sequencing revealed 639 bp and 612 bp, coded 212 amino acids and 203 amino acids, and GenBank accession numbers of JQ829074 and JQ829075, respectively. These had typical MADS-box structures with a nucleotide homology of 78% and an amino acid homology of 67%. The 5' end homology was high, but there was a big difference in the 3' end. Compared to amino acids coded from the *FLOWERING LOCUS C (FLC)*-like genes of *Taihangia rupestris* and *Pyrus pyrifolia*, the two ORFs were 40%~57% similar. Amino acid hydrophobicity analysis showed that carboxyl terminals were hydrophobic amino acid and amino terminals were hydrophilic amino acid with most amino acid residues being hydrophobic. Results of the Real-time PCR showed that the two ORFs of the *CcFLC* gene were expressed in the stem, young leaf, terminal bud, female flower, and male flower of *C. cathayensis*, but their relative expression for the same tissue was higher for ORF1 than ORF2. ORF1 was maximum in the stem, but minimum in the leaf and male flower; whereas ORF2 was maximum in the female flower and minimum in the stem. [Ch, 7 fig. 23 ref.]

Key words: botany; *Carya cathayensis*; *CcFLC*; sequence analysis; expression analysis

收稿日期: 2012-03-01; 修回日期: 2012-04-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31170637); 浙江省自然科学基金资助项目(Z307534)

作者简介: 杨希宏, 从事分子生物学研究。E-mail: xihong0408@163.com。通信作者: 黄坚钦, 教授, 博士, 从事植物发育生物学研究。E-mail: huangjq@zafu.edu.cn

植物成花是营养生长向生殖生长转变的过程,这一转变主要由外界环境因子和植物自身内环境以及植物特异基因启动表达决定^[1]。*FLOWERING LOCUS C(FLC)*是调控植物开花时间的开关基因,它属于MADS-box 家族编码一种新的蛋白转录因子,对开花具有抑制作用^[2-3]。在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 调控开花途径有光周期途径,春化途径和自主、赤霉素(GA)和 FRI 依赖途径^[4-5]。在拟南芥早花生态型和晚花生态型植株中, *FLC* 编码的产物完全一致,但它们生长习性不同,前者无需低温就能开花,而后者需要低温处理才能开花。这种差异可能是由于 *FLC* 等位基因内含子 1 的差异引起的, *FLC* 内含子 1 中含有重要的开花表达和调控序列,在早花生态型 *FLC* 内含子 1 中插入了 1 个独立的转座子,可能破坏了 *FLC* 的功能^[6]。植物中 *FLC* 通常存在多个同源基因,如不结球白菜 *Brassica campestris* 有 *BcFLC1*^[7], *BcFLC3*^[8]等。山核桃 *Carya cathayensis* 是重要的用材树种和生态经济树种。由于雌雄花器官发育存在时空差异,雄花芽发育期导致雌花芽大量脱落,直接影响了山核桃的产量。*FLC* 作为春化作用调控开花时间的关键基因,对植物开花控制起决定性的作用。为了更好地研究 *FLC* 对山核桃成花的调控,本实验对山核桃雌花芽 454 测序获得的 2 个完整 *FLC* 开放阅读框(ORF)从序列同源性和表达水平上开展分析对比,研究这 2 个 *FLC* 同源基因一级结构和二级结构的组成和特性差异,用实时定量聚合酶链式反应(PCR)技术研究它们在生殖转变阶段的不同时期、不同组织上的表达差异,为进一步利用该基因开展山核桃花芽分化调控机理提供理论依据和借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

山核桃试验材料采自临安市板桥村,选取 1 株生长旺盛的山核桃树,从 2010 年 11 月至 2011 年 4 月中旬进行采样,前期间隔 7~15 d,后期间隔 7 d,分别采取其营养枝的幼茎、幼叶、顶芽,以及短果枝的雌花芽和雄花芽,立即用液氮保存并带回实验室放置 -70 ℃ 冰箱中保存,用于核糖核酸(RNA)提取,并记录采样当天的温度(图 1)。*Taq* DNA 聚合酶,限制性内切酶,胶回收试剂盒和反转录试剂盒,PM19-T 载体,标记物(marker),SYBR Green I Premix Ex *Taq* 均购自 TAKARA 生物公司,大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 由亚热带森林培育国家重点实验室培育基地保存,X-Gal, IPTG 和氨苄青霉素(Amp)购自上海生工。

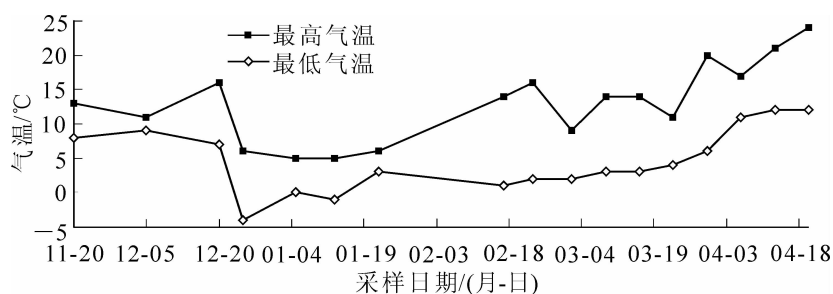


图 1 山核桃组织不同日期采样温度记录

Figure 1 Temperature record of the different tissues and time of *Carya cathayensis*

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与反转录 cDNA 合成 采用改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取山核桃不同组织的总 RNA,用 10 g·L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测,使用 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver2 反转录试剂盒合成 cDNA。

1.2.2 聚合酶链式反应(PCR)扩增与测序 根据本课题组对山核桃雌花芽 454 测序获得的 *CcFLC* 基因 2 个 ORF 序列分别设计 PCR 引物,ORF1 上游引物 F1: 5'-ATGGGAAGGGGAAAAGTGCAG-3'和下游引物 F2: 5'-TTAAAACAGATGGAGCATGGCC-3'; ORF2 上游引物 F3: 5'-ATGGGAAGGGGAAAAGGTGC-3'和下游引物 F4: 5'-TTAAAACAGATTAAGCAAGGTTTCTTG-3',并由上海生工合成。以山核桃 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃, 30 s; 59 ℃(57 ℃) 退火 45 s; 72 ℃, 1.30 min; 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min; 4 ℃, ∞。反应体系为: cDNA(0.15 μg·L⁻¹)模板 2 μL, 10 × PCR buffer(无 Mg²⁺)5 μL, 25 mmol·L⁻¹ 氯化镁 4 μL, 10 mmol·L⁻¹ 脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP) 1 μL, 上

游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, 下游引物($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$, *Taq* DNA 聚合酶 $0.5 \mu\text{L}$, 重蒸水(ddH_2O) $50 \mu\text{L}$ 。PCR 产物经胶回收纯化与 PMD19-T 载体连接转化到大肠埃希菌经过蓝白斑筛选, 提取质粒酶切鉴定后, 送上海生工测序。

1.2.3 *CcFLC* 基因序列分析 测得 *CcFLC* 序列利用美国国立生物技术信息中心(NCBI)搜索进行 Blast 同源性比对和氨基酸序列推导; 借助 ExPASy 数据库中的 ProParam 在线工具分析其编码蛋白的理化性质和亲疏水性; 用 Clustalx 1.83 软件进行蛋白序列比对; 用 MAGA4.0 软件构建系统进化树。

1.2.4 *CcFLC* 基因组织特异性表达 以 PCR 扩增测得的 *CcFLC* 基因保守序列设计实时定量 PCR 引物, ORF1 上游引物 F5: 5'-ATTGCTGTCCGCCAGAGTGC-3' 和下游引物 F6: 5'-TGCTGTTGTCGTTGAG-GTTC-3'; ORF2 上游引物 F7: 5'-CGCACTACGAAGAGGAAAAGC-3' 和下游引物 F8: 5'-CAGATTAAG-CAAGGTTTCTTGG-3'。以本课题组提供的 Actin 为内参, 其定量引物序列为 actinL: 5'-GCTGAACGGGA AATTGTC-3', actinR: 5'-AGAGATGGCTGGAAGAGG-3'。在 Bio-RAD 荧光定量 PCR 仪上进行, 并分析实验数据。

2 结果与分析

2.1 *CcFLC* 基因 cDNA 序列测序与分析

以山核桃 cDNA 为模板, 用引物 F1, F2 和引物 F3, F4 分别对 *CcFLC* 的 2 个保守结构域进行 PCR 扩增, 通过测序获得了 *CcFLC* 的 2 个 ORF 序列(GenBank 登录号分别为 JQ829074, JQ829075), 长度分别为 639 bp 和 612 bp, 并各含 1 个 TAA 终止密码子, 编码 212 个和 203 个氨基酸(图 2)。Blasnt 比对结果显示, 这 2 个 ORF 在核苷酸和氨基酸水平上同源性分别是 78% 和 67%, 5'端具有高度保守性, 3'端序列差异较大。对这 2 个基因进行保守结构域功能分析, 发现该 2 个 ORF 具有典型的 MADS-box 结构域, 其蛋白都属于典型的 MIKC 型 MADS-box 基因蛋白, 具有 2 个保守结构域, 即 MADS-box 和 K-box(图 3)。其中 ORF1 编码蛋白的 1~70 位氨基酸和 ORF2 编码蛋白的 1~73 位氨基酸是 MADS 结构域, 蛋白中分别是 12 个氨基酸 K-box(AA112~123)和 9 个氨基酸 K-box(AA118~131)。ORF1 的 MADS 区和 K 区之间为 42 个氨基酸的 I 区, ORF2 的 MADS 区和 K 区之间为 45 个氨基酸的 I 区, I-box 和 3'端均不保守, 表明它们都属于 MADS-box 家族中的成员。蛋白理化性质分析显示, 它们的相对分子量分别为

```

1 atgggaaggggaaagtgcagatgaacgaatcgaggacaagacgagccggcaagtgcg
  M G R G K U Q M K R I E D K T S R Q U T
61 ttctcgaagcggagggcggtgatgaagaaggctcggaactcgccgtgctctgcgac
  F S K R K G G L M K K A R E L A U L C D
121 gtggagggtcgctgatgatattctccgaccgagggtctacgagttctctagtgtc
  U E U A L M I F S D R G R L Y E F S S A
181 gagagtattggaaaaatcctggagcggtataggatcatgtagaagaagaattgctgtc
  E S I G K I L E R Y R I H U E E E I A U
241 cgcagagtgctgagaaaggaaaggatgatgctggtctccagggtcaacagatggac
  R Q S A E K G K R Y D A G F P G Q Q M D
301 actagcccgcaacaaagatacaaaaggtaccttgaagagcaaaacatcgagagaagac
  T S P Q K I Q R Y L E E Q N I E E K N
361 ataatagaacttacacagctcgagaagaactggatattgaggcaaacagattc
  I I E L T Q L E K E L D M I L R Q T R F
421 aaaaagacacagctaatgatggaagctgtaaaagcgtgcaggatgagcaacagaatctg
  K K T Q L M M E A U K A L Q D E Q Q N L
481 agaagagagaagactcaagtggaggaggagatggcagcaatgaagagtgcagaaacctc
  R R E K K T Q U E E E M A M K S D Q N L
541 aacgacaaccaccaagcatgctctggaaccggagtcaccccatgcccaacgactac
  N D N H Q S H A L E P E S N P H A N D Y
601 accctcacttcaggaggccatgctccatctgttttaa 639
  T P H F Q E A H L F *

```

CcFLC OPF1 编码的氨基酸

```

1 atgggaaggggaaagggtgcagctgaagagaattgaggacaagagcagtcggcaagtgc
  M G R G K U Q L K R I E D K S S R Q U T
61 ttctcgaagcggagagcggtgatgaagaaggctcgagagctcgagtgctgtgcgac
  F S K R K S G L I K K A R E L G U L C D
121 gtggagggtggcgtcgatcttctccgaccaaggcaggctctatgaattctctagcgc
  U E U A L U I F S D Q G R L Y E F S S A
181 gagagctcttggaaacatcctcgagcggtatagaagacatgtagaagaagaatcgctgc
  E S L G N I L E R Y R R H U E E E I A U
241 cgcaggagttctgagctagaaaagacgcatcatgctgactgcccgtggtcttcagatggc
  R R S S E L E K T H H A D G P G L Q M G
301 gctagggccactggaatgatacaaaaggtaccttgaagaacagaatattcaagagaaacc
  A R P L E M I Q R Y L E E Q N I Q E K T
361 ttgatagaactcactcacttagagatagaactggatgagatattgagagaaaccagattc
  L I E L T H L E I E L D E I L R E T R F
421 agaaagacacagctaatgattgaagctataaaagcgcactacgaagaggaaagcagctg
  R K T Q L M I E A I K A H Y E E E K Q L
481 agacaagagaagacactgtagcaggaggagatggtagcaatgatgagtgagaaccatgtc
  R Q E K T L I E E E M U A M M S E N H U
541 ctgagactggaactggagcccaaacgcccgtgcccctccactccaagaacacctgtctt
  L R L E L E P N N A R A P P L Q E T L L
601 aatctgttttaa 612
  N L F *

```

CcFLC OPF2 编码的氨基酸

图 2 *CcFLC* 编码区核苷酸序列及其氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *CcFLC*

50 453.4 D 和 23 823.5 D, 等电点(PI)为 5.17 D 和 5.96 D。蛋白质疏水性分析, 发现 *CcFLC* 的 2 个 ORF 编码的蛋白质都有较强的亲水性, 在羧基端主要是疏水性氨基酸, 而氨基端主要是亲水性氨基酸, 大部分氨基酸残基是疏水性氨基酸(图 4)。蛋白跨膜区分析显示, 它们都没有跨膜结构域, 推测不可能是膜结合蛋白或定位于膜上。

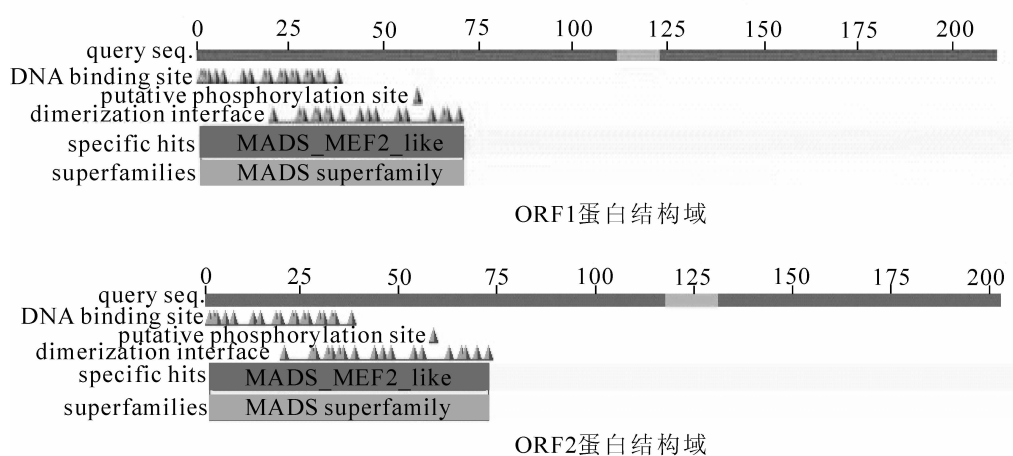


图 3 *CcFLC* 蛋白的功能结构域分析

Figure 3 Function structural domain analysis of *CcFLC*

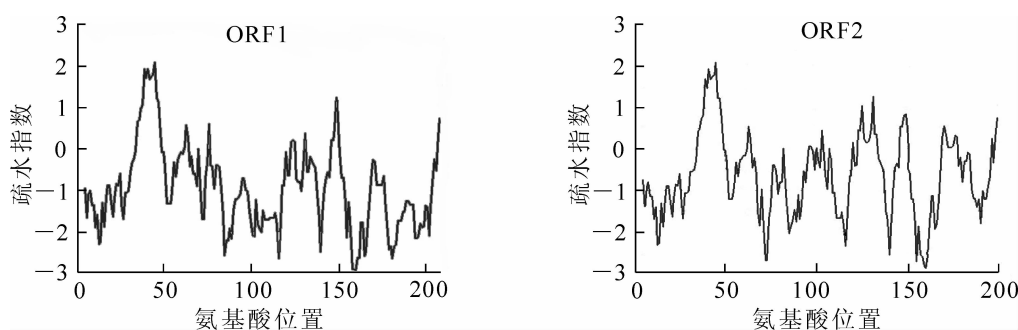


图 4 *CcFLC* 的疏水性分析

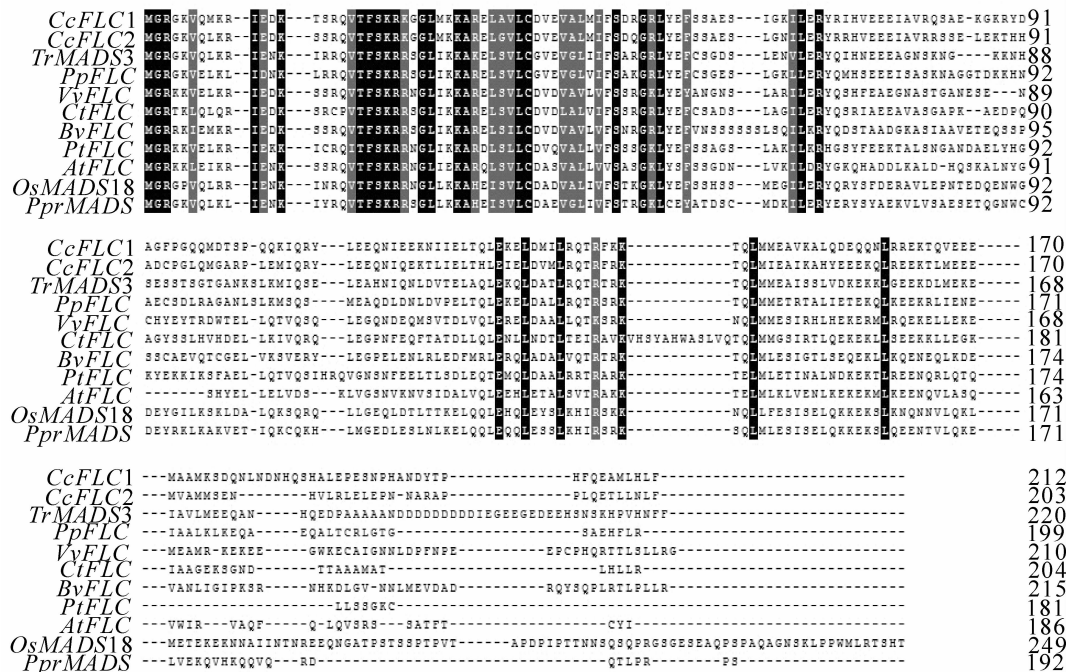
Figure 4 Hydrophobicity analysis of *CcFLC*

2.2 山核桃 *CcFLC* cDNA 序列同源性分析

在 NCBI(美国国立生物技术信息中心)上搜索已报道其他物种同源序列与 *CcFLC* 的 2 个 ORF 编码的蛋白序列进行比对(图 5)。结果显示: ORF1, ORF2 与太行花 *Taihangia rupestris* ABO61200.1(*TrMADS3*), 梨 *Pyrus pyrifolia* BAI99733.1(*PpFLC*), 葡萄 *Vitis vinifera* BAI99733.1(*VvFLC*), 柑橘 *Citrus trifoliata* ACB 72864.1(*CtFLC*), 杨树 *Populus trichocarpa* XP_002303784.1(*PtFLC*), 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* ACL93428.1(*AtFLC*), 水稻 *Oryza sativa* AAF04972.1(*OsMADS18*), 毛竹 *Phyllostachys edulis* ACO53802.1(*PprMADS*)和甜菜 *Beta vulgaris* ABC55428.1(*BvFLC*)等植物 FLC 氨基酸序列同源性高达 68%~78%。ORF1 和 ORF2 氨基酸序列与太行花 ABO61200.1(*TrMADS3*)和梨 BAI99733.1(*PpFLC*)的亲缘关系最近, 与太行花 *TrMADS3* 氨基酸同源性分别为 53%和 57%, 与梨 *PpFLC* 的同源性分别为 52%和 56%; 与水稻 AAF04972.1(*OsMADS18*)同源性只有 39%~40%。由此可见, 比对的物种间该基因编码的氨基酸序列在进化过程中存在一定差异。

2.3 不同物种 *FLC* 基因系统进化分析

应用 MEGA 4.0 对 *CcFLC* 的 2 个 ORF 与其他物种 MADS-box 基因家族编码的氨基酸序列进行系统进化树聚类分析(图 6)。结果表明: *CcFLC* 基因的 2 个 ORF 聚类在同一个分支上, 但它们编码的氨基酸序列进化距离不同步, 后与太行花 ABO61200.1 和梨 BAI99733.1 聚为一类, 亲缘关系最近; 其次是葡萄和柑橘, 与波喜荡草 *Posidonia oceanica* AEP40955.1(*PoFLC*)进化距离较远, 表明该基因的 2 个 ORF 编码的氨基酸序列在进化过程中可能存在种属差异性。



山核桃 *Carya cathayensis* ORF1(*CcFLC1*)和 ORF2(*CcFLC2*), 太行花 *Taihangia rupestris* ABO61200.1(*TrMADS3*), 梨 *Pyrus pyrifolia* BAI99733.1(*PpFLC*), 葡萄 *Vitis vinifera* XP-002676141.1(*VvFLC*), 柑橘 *Citrus trifoliata* ACB72864.1(*CtFLC*), 杨树 *Populus trichocarpa* XP_00233662.1(*PtFLC*), 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* ACL93428.1(*AtFLC*), 水稻 *Oryza sativa* AAF04972.1(*OsMADS18*), 毛竹 *Phyllostachys edulis* ACO53802.1(*PprMADS*), 甜菜 *Beta vulgaris* ABC55428.1(*BvFLC*)

图 5 不同物种 *FLC* 基因编码的氨基酸序列的同源性比较

Figure 5 Alignment of predicted amino acid sequences of *FLC* gene from different plants

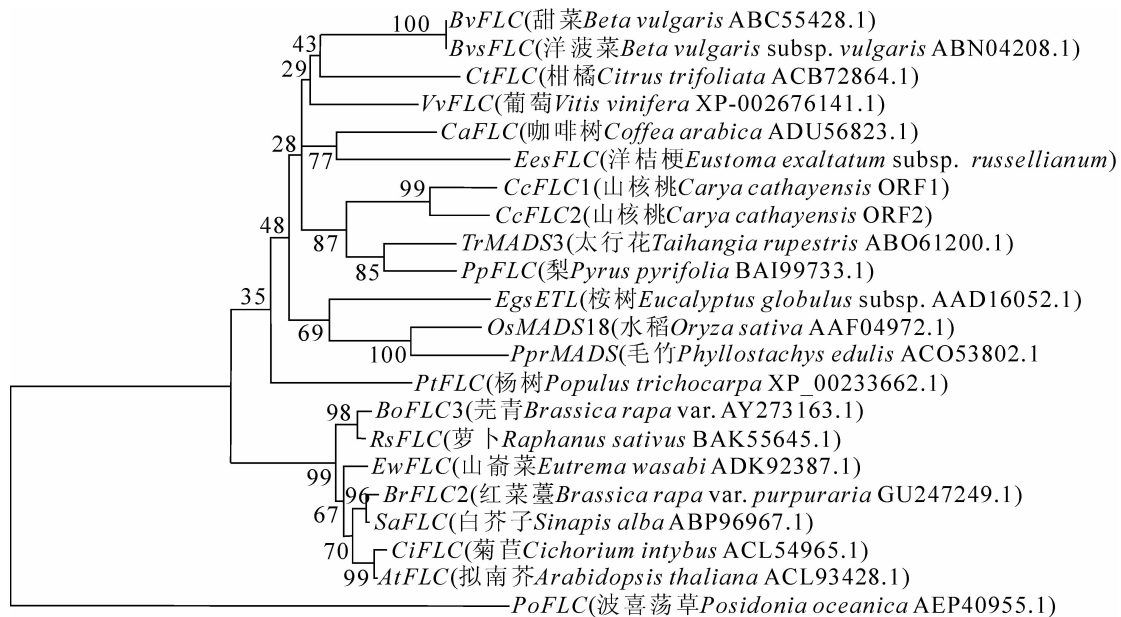


图 6 不同物种 *FLC* 基因编码的氨基酸序列系统进化分析

Figure 6 Phylogenetic tree of the deduced coding amino acids sequences of *FLC* gene from different plants

2.4 *CcFLC* 基因在不同组织中的表达分析

CcFLC 基因 2 个荧光定量 PCR 分析的结果如图 7 所示, ORF1 和 ORF2 在山核桃的营养枝幼茎、幼叶、顶芽, 以及短果枝的雄花芽和雌花芽中均有表达, 但相对表达量存在较大差异, ORF2 的表达水平较低, ORF1 则有较高的表达量。在山核桃整个经历低温过程中, ORF1 在雄花芽的表达量高达其他组织 2~3 倍, 并且在 1 月 13 日雄花芽出现表达高峰, 1 月 5 日在茎、顶芽和雌花芽表达达到高峰, 此阶

段是山核桃休眠的最高时期,表明 *FLC* 作为抑制成花基因,在山核桃休眠期表达量最高,抑制了雌花芽的发育,延迟开花。随着温度的升高,ORF1 的表达才出现下降的趋势,但是3月16日在茎表达量又出现表达高峰,可能抑制开花基因积累于此,正向调控其表达,使之表达量增强,但具体原因还需进一步研究。ORF2 在不同组织中从11月开始一直呈下调表达趋势,但在雄花芽、茎、幼叶和顶芽中的表达差异不显著;在雌花芽中表达量最高,可能抑制雌花芽的发育。山核桃雌花芽最佳发育时期是3月中下旬,在这一阶段,ORF1 和 ORF2 的表达逐渐呈下降趋势,这说明它们的表达量与长期的低温处理呈明显的相关性。

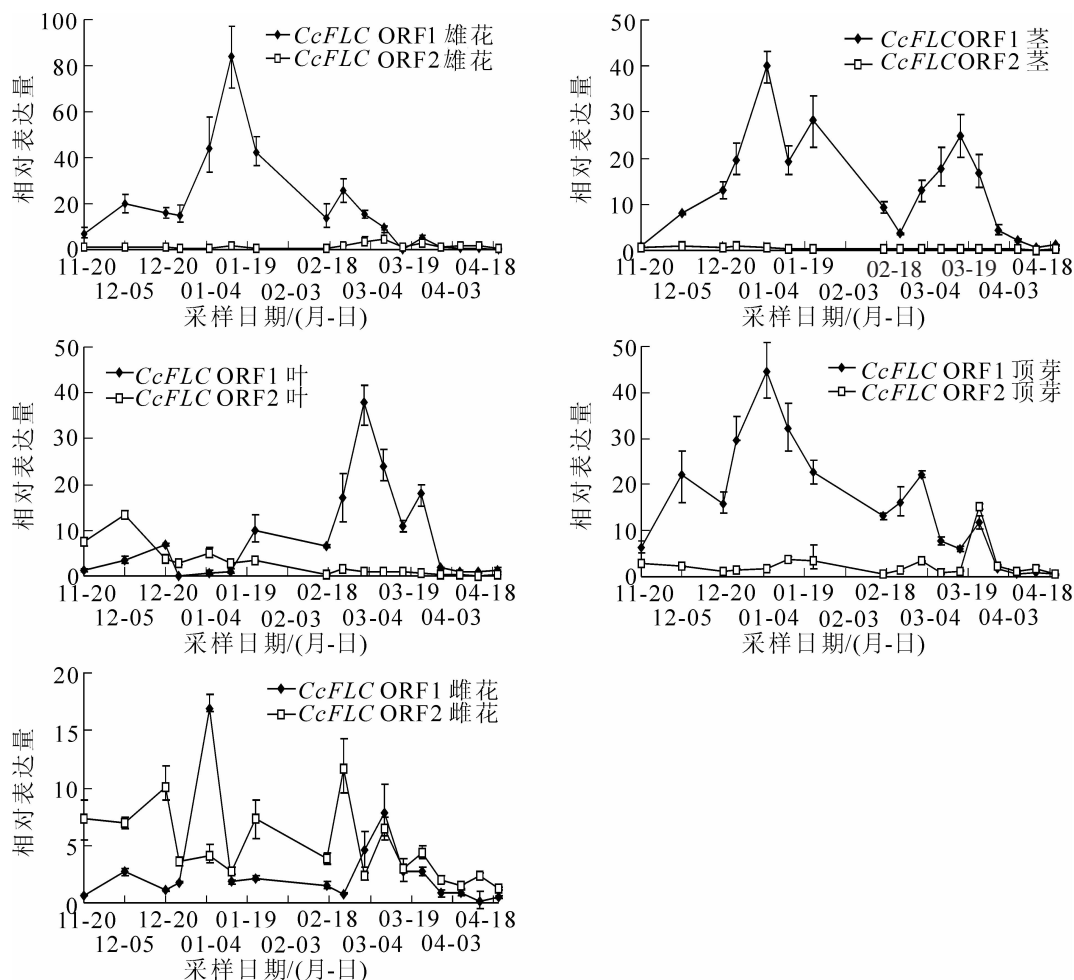


图7 *CcFLC* 基因2个开放阅读框(ORF)相同组织表达量的比较

Figure 7 Relative expression of two ORF from *CcFLC* gene in the same tissue

3 讨论

FLC 是多种开花途径的交汇点,对花分生组织特性基因 *LFY* 起抑制作用,通过抑制 *FT* 和 *SOC1* 基因的表达抑制植物开花。植物只有通过低温处理抑制 *FLC* 的转录及蛋白质的表达水平才能促进开花。低温处理时间越长, *FLC* 的表达越弱。本试验以山核桃不同组织为材料,从中获得 *CcFLC* 2个ORF序列。相关研究表明,其他物种也存在多个 *FLC* 相关基因序列。如李勇^[9]在红菜薹 *Brassica campestris* 中也克隆到 *BrpFLC1*, *BrpFLC2* 和 *BrpFLC3* 等 *FLC* 同源基因, Schranz 等^[10]在甘蓝 *Brassica rapa* 中分离出3种 *FLC* 同源基因 *BoFLC1*, *BoFLC2* 和 *BoFLC3*。本研究通过山核桃 *CcFLC* 的2个ORF核苷酸和氨基酸序列的同源性及其编码氨基酸疏水性/亲水性预测结果,推测山核桃 *CcFLC* 也可能以多个同源形式存在,因此,还需要进一步对 *CcFLC* 基因进行染色体定位验证。

对 *CcFLC* 等2个蛋白功能域分析结果表明:该2个ORF具有典型的MADS-box结构域,其蛋白都属于典型的MIKC型MADS-box基因蛋白,具有2个保守结构域,即MADS-box和K-box。其中ORF1编

码蛋白的 1~70 位氨基酸和 ORF2 编码蛋白的 1~73 位氨基酸是 MADS 结构域，蛋白中部分别是 12 个氨基酸 K-box(AA112-123)和 9 个氨基酸 K-box(AA118-131)。ORF1 的 MADS 区和 K 区之间为 42 个氨基酸的 I 区，ORF2 的 MADS 区和 K 区之间为 45 个氨基酸的 I 区，I-box 和 3' 端均不保守，表明它们都属于 MADS-box 家族中的成员。MADS-box 基因编码一类转录调控因子，是调节植物发育的重要基因，在植物开花时间和花形态建成起决定性作用^[11]。对其亲疏水性分析显示，*CcFLC* 基因 2 个 ORF 的蛋白质具有较强的亲水性，羧基端主要是疏水性氨基酸，而氨基端主要是亲水性氨基酸，大部分氨基酸残基是疏水性的，这与 MADS-box 的基因结构特点 N 端为亲水区、C 端高度疏水相一致，N 端并富含碱性氨基酸。在系统进化上，*CcFLC* 基因 2 个 ORF 聚在同一分支上，但它们的氨基酸序列进化距离不同步；与太行花和梨的进化距离较近；其次是葡萄和柑橘，与桉树进化距离较远，表明该基因在进化过程中可能存在种属差异性。

Real time RT-PCR 分析 *CcFLC* 在不同组织表达差异，结果显示：*CcFLC* 等 2 个 ORF 在山核桃的幼茎、幼叶、顶芽、雌花芽和雄花芽中都有表达，且存在很大差异。在葡萄中 *VvFLC* 在叶片、卷须、休眠芽、花序及果实中也都有表达，且在叶片的表达量最高^[12]。*CcFLC* 的 ORF1 在雄花芽中的表达丰度高于其他组织，这与拟南芥 *FLC* 主要定位在茎尖中的表达模式^[13]不一致，这可能是由于植物外界环境、取材时间及其物种间的差异等因素造成的。随着温度的升高，ORF1 在幼茎、幼叶中的表达出现高峰。茎和叶属于营养器官，大量抑制开花的基因表达物质积累于此，正向调控 *CcFLC* 的表达，使之表达量增强^[14]。花芽成花后，*CcFLC* 基因作为开花抑制因子，mRNA 转录水平受到 *FCA* 和 *FLD* 等基因的抑制^[15-16]而使表达量自然减少，ORF1 的表达水平降低。因此，茎、叶中含量较高，花中含量较低，说明经过长期的低温 *CcFLC* 基因的表达受到抑制，花芽开始分化发育。ORF2 在雌花芽中的表达量最高，可能抑制雌花芽的发育；在幼茎、雄花芽、顶芽和幼叶中的表达最低，且差异不显著，这可能在长期的进化过程中其表达模式和功能发生了变化，也有可能是其调控元件如启动子^[17]等造成的差异，还有待进一步研究。山核桃雌花芽最佳发育时期是 3 月中下旬。在这一阶段，ORF1 和 ORF2 的表达呈逐渐下降趋势，这说明它们的表达量与长期的低温处理呈明显的相关性。

山核桃雌雄同株，雌雄花芽分化存在时空差异。3 月初雌雄花芽开始在短果枝尖端分化，直到 4 月完成授粉。在这一阶段，ORF1 和 ORF2 的表达都呈下降趋势，但在不同组织 ORF1 的表达下降趋势从高到低依次为茎、叶、雌花芽、顶芽、雄花芽。5~6 月底次年雄花芽发育，这一阶段雌花芽大量脱落，之后进入休眠期，次年 4 月初休眠的雄花芽继续发育并授粉。因此，推测山核桃雌雄花芽在发育过程中存在不同的成花途径：雌花芽分化可能与春化有关，而雄花芽发育可能与光照有关。5 月底山核桃叶片接受光周期信号后可能引起 *CO* 的表达，诱导了下游基因 *SOC1* 和 *FT* 的表达，促进花分生组织特异性基因 *LFY* 和 *API* 的表达量增加^[18-21]，从而启动了雄花芽的分化。结合本实验室已经克隆到的山核桃开花相关基因 *CcFT*，*CcAG*，*CcAPI*^[22]，*CcLFY*^[23]的研究，将有助于山核桃花芽分化的分子调控机制的进一步研究，控制雄花芽的分化对提高山核桃产量有着重要的价值和意义。

参考文献：

- [1] MOURADOV A, CREMER F, COUPLAND G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity [J]. *The Plant Cell*, 2002, **14** (supp): 111 - 130.
- [2] MICHAELS S D, AMASINO R M. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering [J]. *Plant Cell*, 1999, **11** (5): 949 - 956.
- [3] SHELDON C C, BURN J E, PEREZ P P, *et al.* The *Arabidopsis* regulated by vernalization and merhylation [J]. *Plant Cell*, 1999, **11**: 445 - 458.
- [4] ENGELMANN K, PURUGGANAN M. The molecular evolutionary ecology of plant development: Flowering time in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Adv Bot Res*, 2006, **44**: 507 - 526.
- [5] MICHAELS S D, BEZERRA I C, AMASINO R M. FRIGIDA-related genes are required for the winter-annual habit in *Arabidopsis* [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004, **101**: 3281 - 3285.
- [6] SHELDON C C, CONN A B, DENNIS E S, *et al.* Different regulatory regions are required for the vernalization-induced repression of *FLOWERING LOCUS C* and for the epigenetic maintenance of repression [J]. *Plant Cell*, 2002,

- 14**: 2527 – 2537.
- [7] 荣子龙, 侯喜林, 史公军, 等. 不结球白菜晚抽薹 *BcFLC1* 基因的克隆及表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2010, **33** (6): 23 – 27.
RONG Zilong, HOU Xilin, SHI Gongjun, *et al.* Cloning and expression analysis of late bolting *BcFLC1* gene from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2010, **33** (6): 23 – 27.
- [8] 荣子龙, 侯喜林, 史公军, 等. 不结球白菜晚抽薹 *BcFLC3* 基因的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2010, **30** (12): 2373 – 2378.
RONG Zilong, HOU Xilin, SHI Gongjun, *et al.* Cloning and expression analysis of late bolting *BcFLC1* gene from *Brassica campestris* ssp. *chinensis* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2010, **30** (12): 2373 – 2378.
- [9] 李勇. 红菜苔春化作用相关基因及其天然早花突变的分子机理研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2009.
LI Yong. *Study on Vernalization-related Genes in Brassica campestris ssp. chinensis L. var. utilis Tsen et Lee (Purple-Flowering Stalk) and Molecular Mechanism of Its Flowering Early* [D]. Chongqing: Chongqing University, 2009.
- [10] SCHRANZ M E, QUIJADA P, SUNG S B, *et al.* Characterization and effects of the replicated flowering time gene *FLC* in *Brassica rapa* [J]. *Genetics*, 2002, **162**: 1457 – 1468.
- [11] SHULGA O A, SHCHENNIKOVA A V, ANGENENT G C, *et al.* MADS-box genes controlling inflorescence morphogenesis in sunflower [J]. *Russ J Dev Biol*, 2008, **39** (1): 4 – 7.
- [12] 宗成文. 葡萄花发育相关基因的克隆与表达特性研究[D]. 江苏: 南京农业大学, 2007.
ZONG Chengwen. *Cloning and Expression of Flower Development Related Genes from Grape (Vitis vinifera × V. labrusca)* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007.
- [13] 汤青林, 宋明, 王小佳, 等. 植物春化记忆与 *FLC* 染色质改变[J]. 西南农业学报, 2008, **21** (2): 503 – 507.
TANG Qinglin, SONG Ming, WANG Xiaojia, *et al.* Plant vernalization memory and chromatin modification of *FLC* [J]. *Southwest China J Agric Sci*, **21** (2): 503 – 507.
- [14] 肖旭峰, 曹必好, 王勇, 等. 菜薹花芽分化及 *BrcuFLC* 基因的克隆与表达[J]. 园艺学报, 2008, **35** (6): 827 – 832.
XIAO Xufeng, CAO Bihao, WANG Yong, *et al.* Study on flower bud differentiation and cloning and expression of *BrcuFLC* in *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* (L.) Makino var. *utilis* [J]. *Acta Horti Sin*, 2008, **35** (6): 827 – 832.
- [15] 刘丽娜, 刘伟, 叶庆生. 春化作用相关基因 *FLC* 的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, **23** (12): 2229 – 2234.
LIU Li'na, LIU Wei, YE Qingsheng. Advances on research of vernalization-related gene *FLC* [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2003, **23** (12): 2229 – 2234.
- [16] CHEN Ruiqiang, ZHANG Suzhi, SUN Shulan, *et al.* Characterization of a new mutant allele of the *Arabidopsis* Flowering Locus D (*FLD*) gene that controls the flowering time by repressing *FLC* [J]. *Chin Sci Bull*, 2005, **50** (23): 2701 – 2706.
- [17] 张睿, 陶建敏, 蔡斌华, 等. 藤稔葡萄花发育相关基因启动子的克隆及功能分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2011, **20** (4): 17 – 23.
ZHANG Rui, TAO Jianmin, CAI Binhua, *et al.* Cloning and function analysis of promoters of flower development related genes of *Citis vinifera* × *V. labrusca* 'Fujiminori' [J]. *J Plant Resour & Environ*, 2011, **20** (4): 17 – 23.
- [18] KRIZEK K, FLETCHER J C. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide [J]. *Nat Rev Gen*, 2005, **6**: 688 – 698.
- [19] KATJA E, JAEGER, ALEXANDER G, *et al.* The control of flowering in time and space [J]. *J Exp Bot*, 2006, **57** (13): 3415 – 3418.
- [20] AHN J H, MILLER D, WINTER V J, *et al.* A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1 [J]. *EMBO J*, 2006, **25** (3): 605 – 614.
- [21] ROBERT S. Flowering and determinacy in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2007, **58** (5): 899 – 907.
- [22] 陈芳芳. 山核桃若干成花基因克隆及时空表达分析[D]. 临安: 浙江农林大学, 2010.
CHEN Fangfang. *Cloning and Expression Analysis of Several Flora Genes in Carya cathayensis Sarg.* [D]. Lin'an: Zhejiang A & F University, 2010.
- [23] 王正加. 山核桃分子标记与开花基因 *CcLFY* 及其启动子克隆的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.
WANG Zhengjia. *Molecular Marker Analysis and Flora Gene CcLFY and Its Promoter Cloning of Carya cathayensis* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2006.