

# 毛白杨*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*基因的 克隆和表达模式分析

赵田芸<sup>1</sup> 杨雄<sup>2</sup> 杨晓宇<sup>1</sup> 陈仲<sup>2</sup> 安新民<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>北京林业大学林木育种国家工程实验室, 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083;

<sup>2</sup>北京林业大学林学院, 北京 100083)

**摘要** 以毛白杨为材料, 利用同源基因克隆法设计引物, 分别以毛白杨基因组DNA和RNA为模板, 分离克隆了毛白杨中*TFL1*(*TERMINAL FLOWER 1*)基因两个成员, 分别命名为*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*。序列分析发现, *PtTFL1.1*序列全长976 bp, 编码区长度为525 bp, 可编码174个氨基酸; *PtTFL1.2*序列全长1 090 bp, 编码区长度为522 bp, 可编码173个氨基酸。二者都包含4个外显子和3个内含子, 具有*TFL1*的典型保守的PEBP结构域, 所推测的氨基酸序列具有*TFL1*特异关键的His88(H)和Asp141(D)氨基酸残基。同源蛋白比对结果显示, *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*与拟南芥、葡萄、柑橘、苹果等物种中的*TFL1*蛋白同源性都在80%以上。系统进化分析表明, *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*都属于FT/*TFL1*家族中的*TFL1*亚家族。荧光定量PCR实验表明, *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*的表达模式存在差异, *PtTFL1.1*在茎中的表达量要高于根和叶, 在不同生长时期的花芽中, 随着季节光照时间的递减, 表达量呈现明显下降趋势, 推测毛白杨中*PtTFL1.1*能通过响应日照长短, 参与调控开花的光周期途径, *PtTFL1.1*可能是花的诱导初期主要的开花调控子; 而*PtTFL1.2*在根茎叶以及各个时期的花芽中表达量都极低, 且未检测到差异性变化。这些研究有助于探索*TFL1*在毛白杨花发育以及开花调控过程的重要作用, 也将为后期深入研究毛白杨成花调控的分子机制奠定一定基础。

**关键词** 毛白杨; 开花; 基因克隆; 表达模式; *TFL1*

## Cloning and Expression Patterns of *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2* in *Populus tomentosa*

ZHAO Tianyun<sup>1</sup>, YANG Xiong<sup>2</sup>, YANG Xiaoyu<sup>1</sup>, CHEN Zhong<sup>2</sup>, AN Xinmin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>National Engineering Laboratory for Tree Breeding, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; <sup>2</sup>College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract** Designing primers by homologous cloning and using genomic DNA and cDNA from *Populus tomentosa* as templates respectively, the paper cloned and isolated two members of *TFL1*, named *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2*. Sequence analysis indicated that the full length of *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2* were 976 bp and 1 090 bp, and the coding sequence length were 525 bp and 522 bp, encoding 174 and 173 amino acids respectively. Both of them contained four exons, three introns and conserved PEBP domain. The predicted amino acid sequences both

收稿日期: 2019-12-11 接受日期: 2020-04-03

转基因生物新品种培育重大专项(批准号: 2018ZX08020002-002-004)、国家自然科学基金(批准号: 31570661)和国家林业局科技发展中心项目(批准号: KJZXSA2018030)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-62336248, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

Received: December 11, 2019 Accepted: April 3, 2020

This work was supported by the National Key Program on Transgenic Research (Grant No.2018ZX08020002-002-004), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31570661), and the State Forestry Administration Science and Technology Development Center Project of China (Grant No.KJZXSA2018030)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-62336248, E-mail: anxinmin@bjfu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5268>

had critical His88 (H) and Asp141 (D) residues. Homologous protein blast analysis showed that the *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2* shared more than 80% homology in amino acid sequence with *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), grape (*Vitis vinifera*), citrus (*Citrus clementina*), apple (*Malus domestica*), and others. Phylogenetic analysis indicated that *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2* belonged to TFL1 clade in FT/TFL1. qRT-PCR suggested that expression patterns of *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2* were different. In *PtTFL1.1*, the expression level was higher in stem than root and leaf. In addition, with the seasonal photoperiod shortened, the expression of floral buds from different growth periods appeared to an obvious decreased tendency. The paper predicted that *PtTFL1.1* could participate in photoperiod flowering regulation pathway by responding to daylength and it might be a major floral regulator in early floral induction. However, low differential expression of *PtTFL1.2* was examined, no matter with the root, stem, leaf and the floral buds from different periods. The research would contribute to exploring the significant role of *TFL1* in floral development and floral time regulation in *P. tomentosa*, which would also lay a foundation for the further study on molecular mechanism of floral regulation in *P. tomentosa*.

**Keywords** *Populus tomentosa*; flowering; gene cloning; expression pattern; *TFL1*

开花是植物生长周期中一个非常关键的事件,是营养生长向生殖生长过渡的重要标志。研究表明,开花由外部的环境因子和内部的开花调控基因共同控制。模式植物拟南芥的研究发现,花发育主要包括成花诱导、花的发端、花器官发育3个过程,有6种调控途径参与其中,分别是光周期、春化、温度、赤霉素、自主、年龄途径,各个途径相互交叉协作形成一个复杂的网络,共同对植物开花时间进行调控<sup>[1-2]</sup>。在长期的进化过程中,精确的开花时间是植物不断适应外部环境变化的基础。在农作物中,植物在合适的时间成花是种子产量的保证;在林木中,开花时间将决定童期的长短,与木材积累和果实的产量息息相关<sup>[3-7]</sup>。而作为典型的多年生木本植物,杨树的生长发育过程一直是研究的热点。根据前人的研究,杨树在7~10年的童期结束后实现第一次开花,之后每年花芽经过诱导、花器官发育阶段之后,随着光周期变短、温度降低进入休眠,当冬季持续的低温使休眠解除后,在春季开花<sup>[8-10]</sup>。

在开花时间和花器官发育的调控过程中,FT(FLOWERING LOCUS T)和TFL1(TERMINAL FLOWER 1)都发挥着关键的作用,是磷酸乙醇胺结合蛋白(PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE-BINDING PROTEIN, PEBP)家族的重要成员,他们通过竞争结合bzip转录因子FD(FLOWERING LOCUS D)来调控开花时间<sup>[11]</sup>。不同于FT在长日照条件下对成花的促进作用,*TFL1*是一个开花抑制基因,是植物花序分生组织特异性基因,在维持营养生长和花序无限生长过程中发挥重要作用<sup>[12-13]</sup>。在拟南芥中,*tfl-1*突变体与野

生型相比,*tfl-1*突变体开花时间提前,无限花序转变成有限花序<sup>[14]</sup>。在金鱼草的*tfl-1*突变体中,同样也发生了花序结构的改变<sup>[15]</sup>。之后,在一些相关的转基因实验中,*TFL1*的功能得到进一步的验证:在水稻中过表达*TFL1*的同源基因*RCN1*(RICE CENTRORADIALIS HOMOLOGS 1)和*RCN2*(RICE CENTRORADIALIS HOMOLOGS 2),出现开花时间延迟的现象,除此之外,分支增多,花序更加密集<sup>[16]</sup>。在玉米中,在过表达*TFL1*的转基因株系中,同样也出现了开花时间延迟和花序结构改变的性状变化<sup>[17]</sup>。通过RNAi手段,对梨和苹果中的*TFL1-1*和*TFL1-2*基因表达进行干扰,开花时间明显提前<sup>[18-19]</sup>。在草莓中,*TFL1*也可以通过响应光周期途径来调控正确的开花时间<sup>[20]</sup>。此外,在杨树的休眠调控过程中,过表达*TFL1*可以改变蓄冷量的积累,从而延迟萌芽的时间<sup>[21]</sup>。以上研究说明,*TFL1*不仅在在调控童期时间、维持花序生长过程中发挥重要作用,也关乎植物开花时间的精准调控和休眠过程的顺利转化。

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr., *P. tomentosa*)是我国乡土树种,广泛地应用于城乡绿化、木材生产、纸浆造纸等方面,具有极高的经济价值和生态价值。但是其童期较长,一般5~10年,极大地限制了育种改良工作的进行。同时,童期的长短也与木材的积累息息相关,这涉及到毛白杨体内营养生长和生殖生长之间的平衡。另外,每年春天开花期间,成年雌株飞絮和雄株散粉造成的污染,不管是对交通、环境还是人类的健康都产生了负面影响<sup>[22-24]</sup>。因此,我们亟需探索毛白杨的开花分子机制,从而缩短其

育种周期,促进木材积累,解决飞絮造成的污染。除此之外,毛白杨是雌雄异株植物,其性别分化的分子机制尚未清楚,只能通过花器官形态区分雄株雌株。通过克隆其成花基因,对雌雄花之中不同时期的表达进行分析,也可能是目前性别分化研究的一个有效手段<sup>[25-26]</sup>。因此,本实验在毛白杨中对 *TFL1* 进行克隆和表达分析,旨在探索及验证 *TFL1* 在毛白杨成花、花器官发育以及开花调控过程的重要作用,为后期深入研究毛白杨成花调控的分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

本实验中共涉及3种植物材料,毛白杨雌、雄株来源于北京林业大学苗圃,生长状况良好且一致,毛白杨TC1521无性系组培苗取自北京林业大学林木育种国家工程实验室。组培苗用于根茎叶DNA和RNA的提取,雌雄株选取不同季节光照自然条件下4个生长时期的侧生花芽样品,4个生长时期涵盖花的诱导、花的发端、器官发生期3个关键过程,具体采样时间为2017年7月20日、8月20日、9月20日、10月20日,采集样品进行RNA的提取。

### 1.2 毛白杨总DNA的提取

通过CTAB法对毛白杨TC1521组培苗叶片进行基因组DNA的提取, DNA经凝胶电泳检测质量后,作为PCR反应模板。

### 1.3 毛白杨总RNA的提取及cDNA第一链的合成

选取正常生长的TC1521组培苗,利用改良的CTAB法进行根茎叶的总RNA的提取,利用GoS-

cript™逆转录系统(Promega A5000)分别对不同样品总RNA,进行cDNA第一链合成。然后将第一链cDNA稀释10倍作为PCR反应的模板。

### 1.4 毛白杨 *PtTFL1.1* 和 *PtTFL1.2* 基因 DNA 序列和 cDNA 序列的克隆

鉴于毛白杨的基因组数据尚未发布,所以我们参照与毛白杨亲缘关系较近的模式植物毛果杨(*Populus trichocarpa*, *P. trichocarpa*)的基因组数据库,参考毛果杨中 *TFL1* 的同源基因 *PtTFL1.1* (Potri.004G203900) 和 *PtTFL1.2* (Potri.009G165100) 的基因序列,利用DNA-MAN软件设计目的基因的扩增引物(表1)。分别以基因组DNA和稀释的cDNA为模板,进行PCR的扩增。反应体系为20 μL: 2.0 μL 10× PCR缓冲液、1.6 μL dNTPs (2 mmol/L)、0.4 μL上游引物、0.4 μL下游引物、2.0 μL模板、0.4 μL LA Taq DNA聚合酶、13.2 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR循环条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 进行34个循环; 72 °C延伸7 min, 最后在4 °C保存。然后将其送至北京睿博兴科生物技术有限公司进行序列测定。

### 1.5 基因序列生物信息学分析

1.5.1 基因结构与染色体定位 利用在线网站 Gene Structure Display Server对 *PtTFL1.1* 和 *PtTFL1.2* 进行基因结构的绘制,利用Phytozome 12(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中的毛果杨数据库,通过在线网站MapGene2Chrom Web v2进行毛果杨中 *TFL1* 基因染色体定位图的绘制。

1.5.2 蛋白质分子特征 利用在线网站ExPASy网站(<https://web.expasy.org/protparam/>)中的ProtParam工具预测 *PtTFL1.1* 和 *PtTFL1.2* 蛋白分子量和等电

表1 用于毛白杨 *PtTFL1.1* 和 *PtTFL1.2* 基因克隆和荧光定量PCR分析的引物

Table 1 Primers used for the cloning and qRT-PCR analysis of *PtTFL1.1*, *PtTFL1.2*

引物名称	引物序列(5'→3')	说明
Prime name	Prime sequence (5'→3')	Description
<i>PtTFL1.1</i> -F	ATG GCA AAG ATG TCA GAG CCT	<i>PtTFL1.1</i> DNA, cDNA cloning
<i>PtTFL1.1</i> -R	TCA ACG TTT CCT CGC CG	<i>PtTFL1.1</i> DNA, cDNA cloning
<i>PtTFL1.2</i> -F	ATG GCA AAT CTG TCG GAT C	<i>PtTFL1.2</i> DNA, cDNA cloning
<i>PtTFL1.2</i> -R	TCA ACG TCT CCT TGC AGC	<i>PtTFL1.2</i> DNA, cDNA cloning
<i>TFL1.1</i> -F	AGG GAG GTG GTG AGC TAT GA	<i>PtTFL1.1</i> qRT-PCR analysis
<i>TFL1.1</i> -R	AGA AGA CAG CTG CTA CAG GC	<i>PtTFL1.1</i> qRT-PCR analysis
<i>TFL1.2</i> -F	GCT ATG AGA TGC CAA GGC CT	<i>PtTFL1.2</i> qRT-PCR analysis
<i>TFL1.2</i> -R	GCA GCT GTT TCC CTT TGA GC	<i>PtTFL1.2</i> qRT-PCR analysis
<i>Actin</i> -F	CTC CAT CAT GAA ATG CGA TG	qRT-PCR analysis
<i>Actin</i> -R	TTG GGG CTA GTG CTG AGA TT	qRT-PCR analysis



点, 利用在线分析软件Pfam进行蛋白结构域的预测, 利用TMHMM在线分析工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测跨膜结构, 通过SignalP-5.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/zai/>)进行信号肽预测, 通过Plant-mPLoc Server (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)在线软件进行亚细胞定位预测。

1.5.3 同源关系与进化关系分析 通过NCBI网站利用blastp工具将*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*的氨基酸序列与其他物种进行同源比对, 选择同源性较高的物种利用DNAMAN软件进行多序列比对。利用MEGA 7.0软件分析系统进化关系, 采用Neighbor-Joining(NJ)算法的Poisson模型, 选取Completed deletion模式构建系统进化树, 重复1 000次。

## 1.6 毛白杨*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*基因表达模式分析

采用Prime 5.0软件, 根据已经克隆出的*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*的基因序列, 设计特异性引物, 以毛白杨*Actin*作为内参基因(AY261523.1), 将反转录好的根茎叶及不同时期花芽的cDNA稀释20倍作为模板, 进行qRT-PCR, 反应体系为20  $\mu$ L, 具体包括: 2 $\mu$ L cDNA模板、上下游引物各0.4  $\mu$ L、10  $\mu$ L荧光染料SYBR Green (TaKaRa生物公司)、8.2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应程序为: 95  $^{\circ}$ C预变性10 s; 95  $^{\circ}$ C变性5 s, 58  $^{\circ}$ C退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C延伸 15 s, 进行40个循环, 每个反应重复3次。根据溶解曲线检测产物特异性, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*相对于内参基因*Actin*的表达量。

## 2 结果

### 2.1 毛白杨*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*基因DNA序列和cDNA序列的克隆

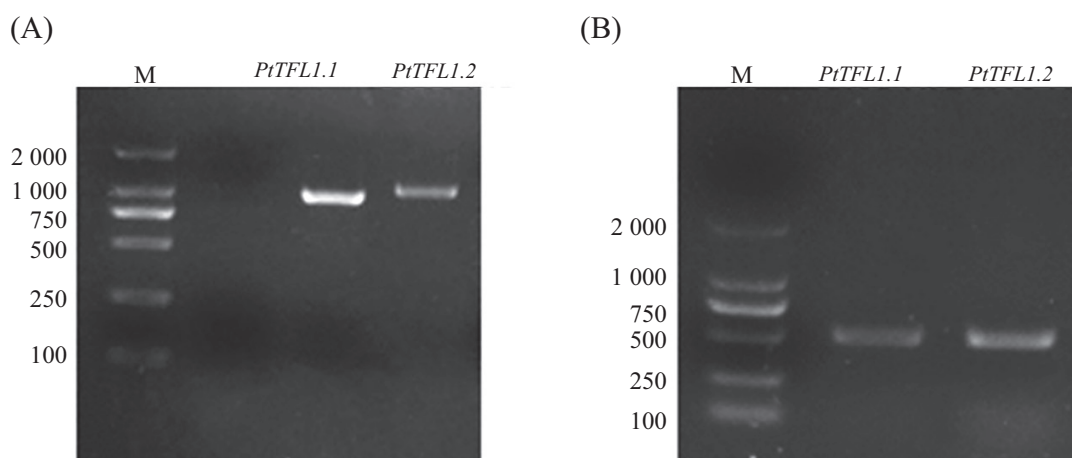
以毛白杨的基因组DNA为模板, 利用设计的特异引物, 对目的片段进行PCR扩增, 通过1.2%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 结果发现, *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*均得到1 000 bp左右的条带, 如图1A所示, 测序结果显示, *PtTFL1.1*序列全长为976 bp, Genbank登录号为MT178240; *PtTFL1.2*序列全长为1 090 bp, Genbank登录号为MT178241。

将反转录好的cDNA稀释10倍作为模板, 对目的基因的编码序列进行PCR扩增, 通过1.2%琼脂糖凝胶电泳检测, 得到500 bp左右的条带, 如图1B所示, 测序结果表明, *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*编码区序列长度分别为525 bp和522 bp。

综合全长序列和编码序列的结果, 发现*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*均含4个外显子、3个内含子, 分别编码174、173个氨基酸。

### 2.2 *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*基因生物信息学分析

2.2.1 基因结构与染色体定位 利用在线网站Gene Structure Display Server对*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*进行基因结构的绘制, 结果如图2A所示, 毛白杨中*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*均含有4个外显子和3个内含子。利用Phytozome v12中的毛果杨数据库, 进行*TFL1*基因染色体定位的分析。如图2B所示, 毛果杨中的*PtTFL1.1*(Potri.004G203900)和*PtTFL1.2*(Potri.009G165100)分别定位于4号染色体



A: *PtTFL1.1*、*PtTFL1.2* DNA序列扩增; B: *PtTFL1.1*、*PtTFL1.2* cDNA序列扩增; M: DL2000 marker。

A: DNA sequence amplification of *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2*; B: cDNA sequence amplification of *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2*; M: DL2000 marker.

图1 毛白杨*PtTFL1.1*、*PtTFL1.2*基因的克隆

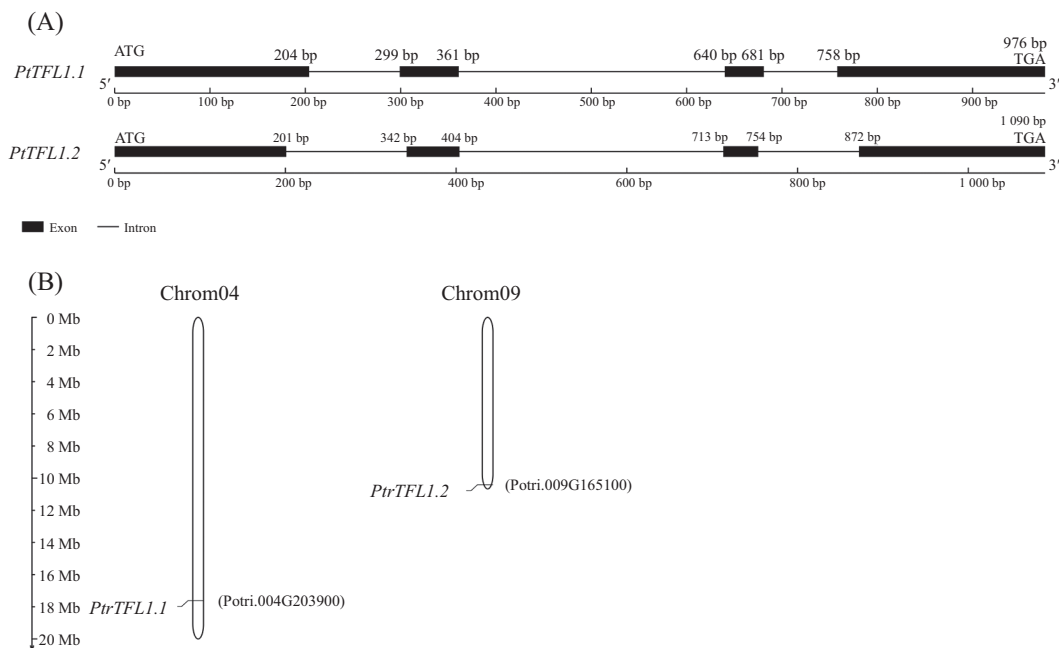
Fig.1 Cloning of *PtTFL1.1*, *PtTFL1.2* from *P. tomentosa*

和9号染色体上。

**2.2.2 蛋白质分子结构** 通过ExPASy网站中的ProtParam工具对基因编码的蛋白质进行特性分析,结果如表2所示, PtTFL1.1的氨基酸数目为174, 分子量为19 762.62 kDa, 理论等电点为9.26, 不稳定系数为40.26, 为不稳定蛋白; 而PtTFL1.2的氨基酸数目为173, 分子量为19 645.28 kDa, 理论等电点为8.02, 不稳定系数为36.36, 与PtTFL1.1不同, 其为稳定蛋白, 二者理论等电点都大于7, 所以*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*基因编码的皆为碱性蛋白。其他分析表明: PtTFL1.1和PtTFL1.2蛋白中未发现跨膜结构, 也不存在信号肽结构。在亚细胞定位预测中, PtTFL1.1和PtTFL1.2均被定位在细胞质中, 在蛋白库中相似比对上CEN(CENTRORADIALIS)蛋白进一步鉴定了我们的两个目的基因属于CEN亚家族。利用在线分析软件Pfam对*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*基因进行蛋白结构域的预测, 结果发现, 二者皆有一个与磷酸乙醇

胺结合蛋白相关的PBP结构域。在PtTFL1.1蛋白中, PBP结构域位置在27~163 aa; 在PtTFL1.2中, PBP结构域位置显示在27~162 aa中。

**2.2.3 同源基因分析及多序列比对** *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*核苷酸序列的相似性为72.26%, 编码区序列相似性为89.33%, 氨基酸相似性为90.8%, 通过NCBI网站中的blastp工具将PtTFL1.1和PtTFL1.2的氨基酸序列与其他物种进行同源比对, 结果发现PtTFL1.1与黑杨(*P. nigra*)、毛果杨(*P. trichocarpa*)、胡杨(*P. euphratica*)、香脂杨(*P. balsamifera*)、草莓(*Fragaria x ananassa*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、月季(*Rosa chinensis*)、橡胶(*Hevea brasiliensis*)、柑橘(*Citrus clementina*)、木薯(*Manihot esculenta*)的同源性分别为: 97.13%、96.55%、95.40%、90.80%、86.21%、82.76%、84.48%、87.93%、81.71%、87.43%。PtTFL1.2相对应的同源性分别为: 88.51%、89.08%、87.93%、97.11%、86.13%、83.24%、83.24%、



A: *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*的基因结构; B: 毛果杨中*PtrTFL1.1*和*PtrTFL1.2*在染色体上的位置。

A: gene structure of *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*; B: chromosome position of *PtrTFL1.1* and *PtrTFL1.2* in *P. trichocarpa*.

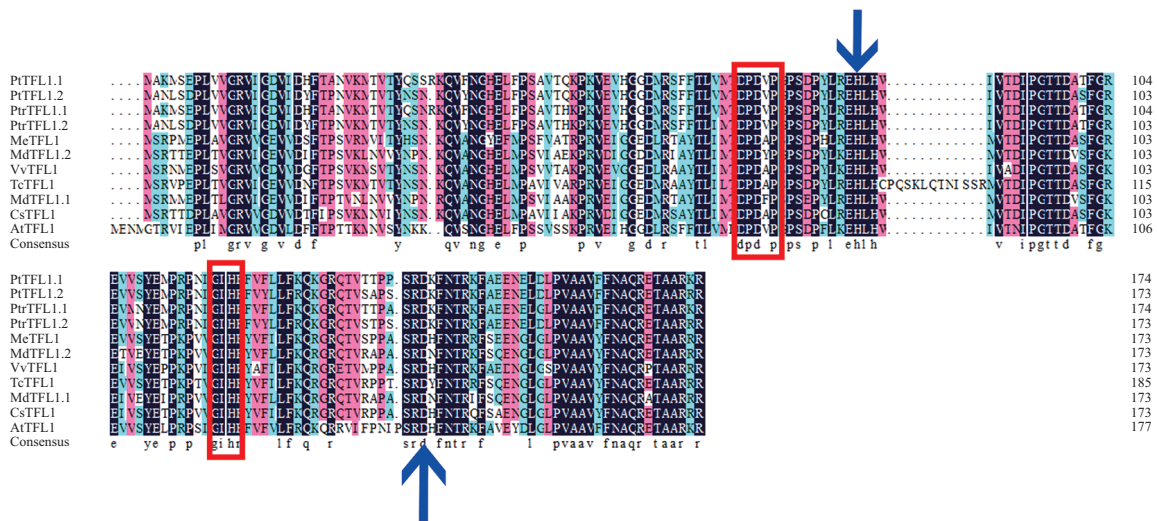
图2 杨树TFL1基因结构及染色体定位

Fig.2 Gene structure and chromosomal location of poplar TFL1

表2 *PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*编码蛋白分子特征

Table 2 The analysis of characteristics of proteins encoded by *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2*

蛋白	分子量	等电点	化学式	不稳定系数	保守域
Protein	Molecular weight	Theoretical pI	Formula	Instability index	Conserved domain
PtTFL1.1	19 762.62 kDa	9.26	C <sub>887</sub> H <sub>1384</sub> N <sub>248</sub> O <sub>253</sub> S <sub>6</sub>	40.26	27-163
PtTFL1.2	19 645.28 kDa	8.02	C <sub>879</sub> H <sub>1361</sub> N <sub>247</sub> O <sub>256</sub> S <sub>5</sub>	36.36	27-162



红色框标识的是D-P-D-X-P和G-X-H-R特异性基序; 蓝色箭头标识的是特异氨基酸。

The red frames indicate the D-P-D-X-P and G-X-H-R specific motifs; the blue arrows indicate specific amino acids.

PtrTFL1.1 (*Populus trichocarpa*, Potri.004G203900.1); PtrTFL1.2 (*Populus trichocarpa*, Potri.009G165100.1); MeTFL1 (*Manihot esculenta*, Manes.14G027800.1); MdTFL1.1 (*Malus domestica*, MDP0000812208); MdTFL1.2 (*Malus domestica*, MDP0000867916); VvTFL1 (*Vitis vinifera*, GSVIVT01010598001); TcTFL1 (*Theobroma cacao*, Thecc1EG015117t1); CsTFL1 (*Citrus clementina*, Ciclev10006042m); AtTFL1 (*Arabidopsis thaliana*, AT5G03840.1).

图3 *PtTFL1.1*、*PtTFL1.2*与其他物种氨基酸序列比对

Fig.3 Amino acid sequence alignment of *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2* with those of other species

89.60%、84.00%、90.53%。选取同源性相对较高7个物种毛果杨、葡萄、可可(*Theobroma cacao*)、苹果(*Malus domestica*)、木薯、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、柑橘, 利用DNAMAN软件进行多序列比对, 结果如图3所示, 发现毛白杨*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*氨基酸序列拥有PEPB蛋白的D-P-D-X-P和G-X-H-R特异性基序, 第88位有区别于FT蛋白的组氨酸(His)和141位天冬氨酸(Asp)。

**2.2.4 系统进化分析** 为了研究毛白杨中*PtTFL1.1*与*PtTFL1.2*和其他植物TFL1/FT家族蛋白的遗传进化关系, 利用MEGA 7软件构建蛋白进化树。如图4所示, TFL1/FT家族编码的蛋白聚为4大类, TFL1-clade、BFT-clade、FT-clade、MFT-clade。其中毛白杨中的TFL1.1与TFL1.2分别和毛果杨中的PtrTFL1-1/CEN1和PtrTFL1-2/CEN2遗传距离最近, 与拟南芥、柑橘、葡萄中的TFL1同源蛋白同属于TFL1-clade, 初步确定毛白杨中的*PtTFL1.1*与*PtTFL1.2*属于TFL1亚家族。另外, TFL1并没有根据物种各自聚类, 而是不同物种来源的基因交错的聚在一起, 说明TFL1保守度不高, 进化过程中分化较大, 进化速度比较快。

### 2.3 基因表达模式分析

提取毛白杨根、茎、叶, 以及分别取于7~10月

4个生长时期的雌、雄花芽的总RNA, 采用SYBR染料法进行qRT-PCR分析。根茎叶组织差异表达分析结果如图5A所示, 毛白杨*PtTFL1.1*在茎中的表达量相对较高, 而在根和叶中相对表达量比较低; 而*PtTFL1.2*在根茎叶中, 检测到的表达量都比较低。另外, 我们检测了*PtTFL1.1*在不同生长期雌雄花芽中的表达, 如图5B所示, 发现*PtTFL1.1*呈现规律性变化, 具体表现为: 随着花芽发育, 季节光照时间递减, 雌、雄花芽的*PtTFL1.1*表达量不断降低, 且雌花芽的表达量在不同的时期都显著高于雄花芽。

## 3 讨论

FT/TFL1家族成员基因含有PEBP保守结构域, 在植物的成花转变过程中起着关键的调控作用, 具有重要的研究价值。相关成员最初在拟南芥中被发现, 拟南芥基因组中共包含6个FT/TFL1基因家族成员, 包括FT(*FLOWERING LOCUS T*)、TSF(*TWIN SISTER OF FT*)、TFL1(*TERMINAL FLOWER1*)、BFT(*BROTHER OF FT AND TFL1*)、ATC(*ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOGUE*)、MFT(*MOTHER OF FT AND TFL1*)<sup>[13]</sup>。而在谷子、葡萄、龙胆、毛竹等大多植物中, FT/TFL1基因家族大致被分为3个亚家族, FT、TFL1和MFT, 而在苹果、番茄以及本实验中

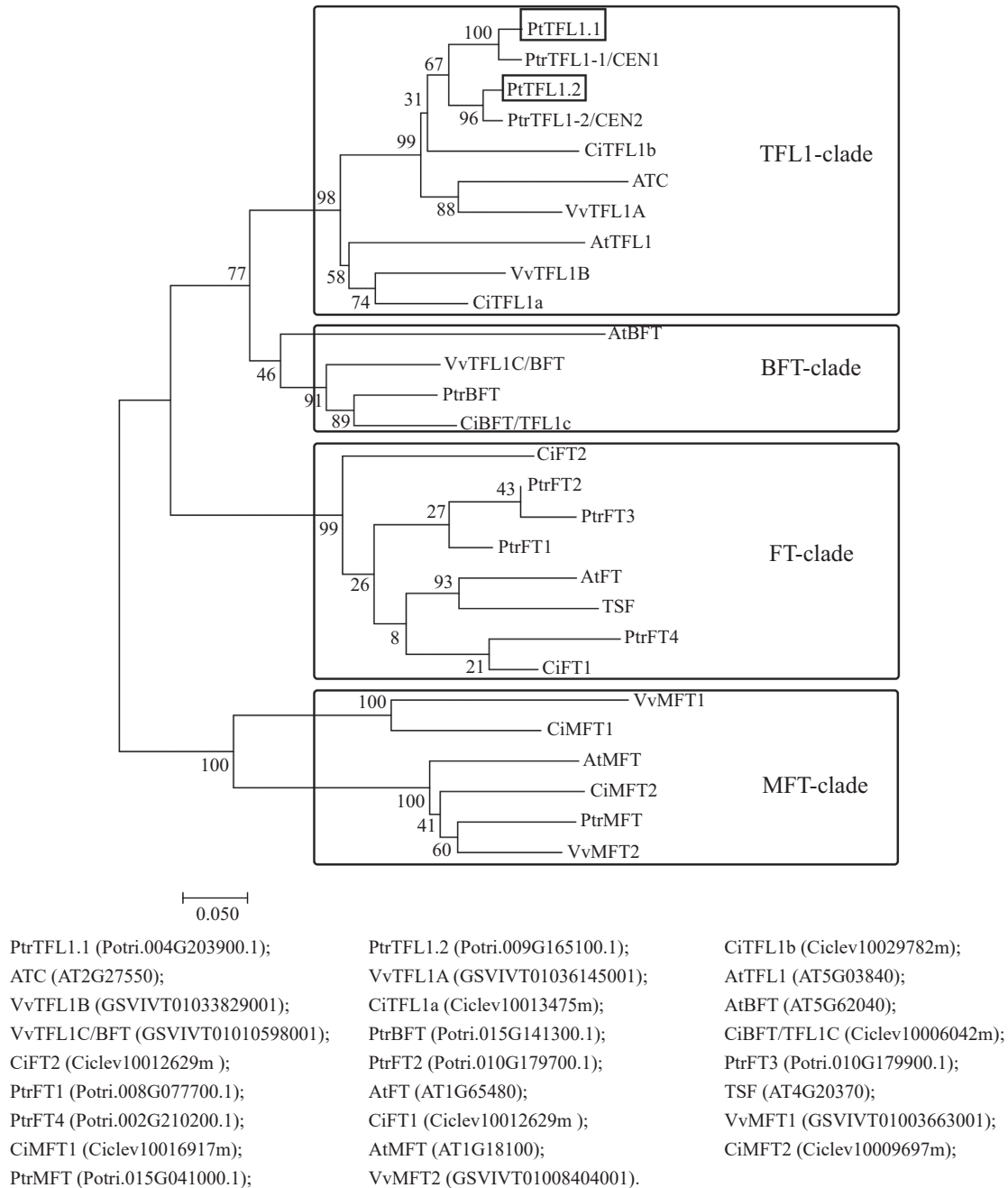


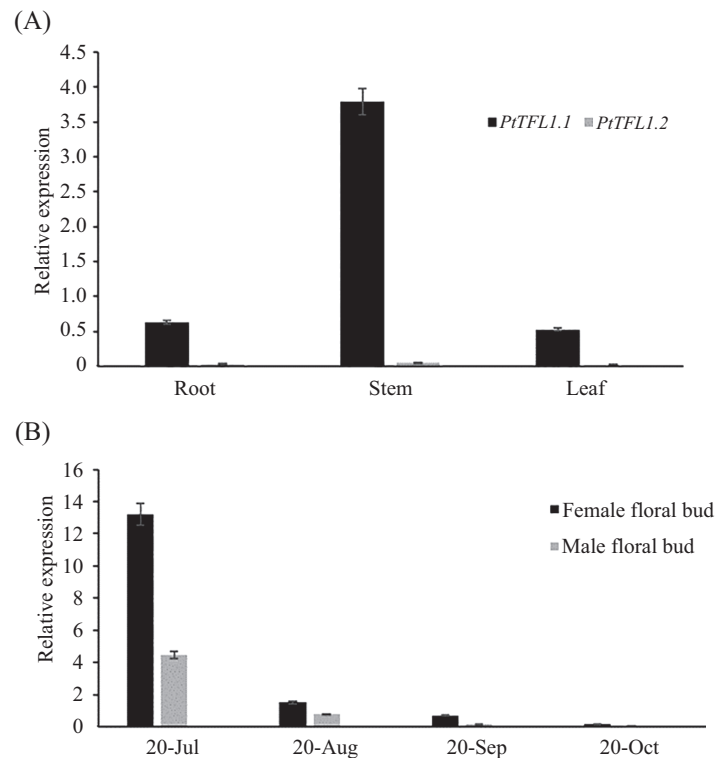
图4 PtTFL1.1和PtTFL1.2与其他物种FT/TFL1蛋白系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of PtTFL1.1 and PtTFL1.2 and the members of FT /TFL1 proteins in other species

的杨树中, BFT成员被成功地从TFL1亚家族中分离出来, 推测TFL1亚家族相对其他成员进化潜力更丰富<sup>[27-32]</sup>。通过近几年的成花研究, 柑橘、大麦、番茄、兰花、桃、黑樱桃、黄瓜、苹果等多个物种中的FT/TFL1基因家族成员逐步被分离得到<sup>[28,33-39]</sup>。FT和TFL1通过竞争结合bzip(basic leucine zipper)蛋白来调控开花时间<sup>[40]</sup>, FT/TFL1的比例与开花时间和植物形态建成息息相关<sup>[41]</sup>。FT在长日照条件下促进开花提前, 而TFL1和FT基因功能相反, 通过抑制开花途径中的促

进子LFY(LEAFY)及花分生组织基因API(APETALA1)的表达来延迟开花, 这种蛋白功能的不同是由各亚族氨基酸残基的不同决定的。FT和TFL蛋白同源性比较高, 不过, FT蛋白中含有Tyr85(Y)和Gln140(Q)特异氨基酸, 这也是区别TFL1蛋白的关键氨基酸, 而TFL1中则具有保守的His88(H)和Asp144(D)氨基酸残基。本文毛白杨中TFL1相对应的氨基酸残基为His88(H)和Asp141(D)。HANZAWA等<sup>[42]</sup>发现, 将FT蛋白中的Tyr85(Y)和TFL中的His88(H)氨基酸互





A: *PtTFL1.1* 和 *PtTFL1.2* 在各组织中的表达; B: *PtTFL1.1* 在不同时期雌雄花芽中的表达。

A: expression patterns of *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2* in different tissues; B: expression patterns of *PtTFL1.1* in female and male floral buds in different periods.

图5 *PtTFL1.1* 和 *PtTFL1.2* 组织特异性表达

Fig.5 Specific expression of *PtTFL1.1* and *PtTFL1.2* in different tissues

换可以使2个蛋白的功能产生互换,说明Tyr85(Y)和His88(H)这两个氨基酸在FT和TFL1蛋白发挥功能的过程中起着决定性的作用。

TFL1亚家族是FT/TFL1家族中一个重要成员,其大多成员结构比较保守,均由4个外显子、3个内含子组成。对拟南芥、金鱼草、玉米、苹果等植物的研究发现,*TFL1*基因在花发育和开花时间调控过程中发挥抑制作用,过量表达*TFL1*基因使营养生长期延长,延迟开花<sup>[14-15,17,19]</sup>。同时,*TFL1*基因也是植物花序分生组织特异性基因,在维持花序生长过程中也发挥重要作用。因此,推测*TFL1*通过抑制开花来维持植物营养生长,延长童期,从而为植物提供时间积累足够的营养来保证后期顺利开花结果,这与萱草中*HkTFL1*可以维持童期生长的研究结果相似<sup>[43]</sup>。另外,现代玫瑰和林地草莓中*TFL1*功能异常导致持续开花表型的出现,这也间接地支持了*TFL1*在维持营养生长过程中发挥作用的推断<sup>[44]</sup>。本实验在毛白杨中分离得到的*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*含有典型的PEBP保守结构域,属于FT/TFL1家族。通过同源性分析发现,*PtTFL1.1*

和*PtTFL1.2*与黑杨、毛果杨、胡杨、香脂杨、草莓、葡萄、月季、橡胶、柑橘、木薯等物种中TFL1蛋白的同源性比较高,都在80%以上,具有TFL1特有的关键的His88(H)和Asp144(D)保守残基。通过系统进化分析发现,*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*都被聚于TFL1亚家族。荧光定量PCR结果显示,*PtTFL1.1*在茎中表达量比较高,在根叶中表达量比较低。而*PtTFL1.2*,在根、茎、叶中基本上都不表达。*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*表达模式的差异,说明*TFL1*的不同同源基因功能产生了分化,这一模式也在其他物种中被发现,例如在橡胶中*HbTFL1-1*和*HbTFL1-2*只在3个月的幼苗的根中表达,而*HbTFL1-3*在幼苗的茎尖中表达量更高;水稻中的*Oscen1*在组织中呈组成型表达,*Oscen2*主要在根和黄花苗中表达,*Oscen3*在叶片中表达微弱,在其他组织中表达量比较高,而*Oscen4*在叶片和叶鞘中不表达,在花序和绿色嫩苗中微量表达,主要在根、茎和黄花苗中表达<sup>[45-46]</sup>。本研究中的毛白杨中*PtTFL1.1*和*PtTFL1.2*表达模式不同,推测这两个基因在调控成花的过程中扮演者不同的角色,相对



*PtTFLI.2*, *PtTFLI.1*可能发挥着更重要的作用,但具体的功能机制需要下一步的转基因实验验证与研究。

对草莓研究发现, *TFLI*通过参与光周期途径来抑制开花,本研究选取自然生长条件下毛白杨雌雄株不同发育时期的花芽,对*PtTFLI.1*基因进行表达模式分析<sup>[20]</sup>。结果发现,随着季节光照时间的缩短,花芽的生长由诱导期过渡到发端期,*PtTFLI.1*的表达量从较高水平急剧下降。初步推测在毛白杨中花芽诱导前期,*PtTFLI.1*高表达量对营养生长起到一个延长作用,保证植物体在进入生殖生长前积累足够的营养;当逐渐进入花的发端期,逐渐降低的*PtTFLI.1*表达量可能促进了某些开花促进子的表达,如*API*、*LFY*,从而进一步促进发端期和花器官分化时期的发生。在苹果、梨、八倍体草莓的花芽研究中,*TFLI*在花的诱导期到花的发端期过程中表达量均降低,推测*TFLI*在花的诱导期发挥一个主要的调控作用,这与我们的结果一致<sup>[31,47-49]</sup>。而在这整个过程中,光照时间是主要的外界调控因素,所以推测在毛白杨*PtTFLI.1*通过参与光周期途径对开花时间进行调控,但具体相关的上下游基因和作用机制尚不清晰,有待之后对其他光周期基因继续分析研究。另外,在4个时期,雌花芽的*PtTFLI.1*的表达量均高于雄花芽,表明毛白杨中*PtTFLI.1*可能涉及到雌雄差异,但是杨树中的性别分化机制还未明确,所以后期还需要大量的探索与验证。本文对毛白杨中*PtTFLI*进行克隆分离,并对其表达模式进行分析,为深入了解*TFLI*基因功能及开花机制奠定了基础,希望能为加快育种改良、解决飞絮问题等方面提供借鉴与帮助。

### 参考文献 (References)

- [1] WELLMER F, RIECHMANN J L. Gene networks controlling the initiation of flower development [J]. Trends Genet, 2010, 26(12): 519-27.
- [2] TAN F C, SWAIN S M. Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants [J]. Physiol Plant, 128(1): 8-17.
- [3] AMASINO R. Seasonal and developmental timing of flowering [J]. Plant J, 2010, 61(6): 1001-13.
- [4] AMASINO R M. Control of flowering time in plants [J]. Curr Opin Genet Dev, 1996, 6(4): 480-7.
- [5] ANDRES F, COUPLAND G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues [J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(9): 627-39.
- [6] BERNIER G, PERILLEUX C. A physiological overview of the genetics of flowering time control [J]. Plant Biotechnol J, 2005, 3(1): 3-16.
- [7] KOORNNEEF M, ALONSO-BLANCO C, PEETERS A J, et al. Genetic control of flowering time in arabidopsis [J]. Annu Rev Plant Biol, 1998, doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.345.
- [8] CHEN Z, YANG X, SU X, et al. A comprehensive gene network for fine tuning floral development in poplar [J]. Genes Genom, 39(7): 793-803.
- [9] ALBA, LLORET, MAR A, et al. Modulation of dormancy and growth responses in reproductive buds of temperate trees [J]. Front Plant Sci, 2018, doi: 10.3389/fpls.2018.01368.
- [10] MAURYA J P, BHALERAO R P. Photoperiod- and temperature-mediated control of growth cessation and dormancy in trees: a molecular perspective [J]. Ann Bot, 2017, doi: 10.1093/aob/mcx061.
- [11] WICKLAND D P, HANZAWA Y. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER1* gene family: functional evolution and molecular mechanisms [J]. Mol Plant, 2015, 8(7): 983-97.
- [12] BRADLEY D, RATCLIFFE O, VINCENT C, et al. Inflorescence commitment and architecture in arabidopsis [J]. Science, 1997, 275(5296): 80-3.
- [13] KOBAYASHI Y, KAYA H, GOTO K, et al. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals [J]. Science, 1999, 286(5446): 1960-2.
- [14] SHANNON S, MEEKS-WAGNER D R. A mutation in the arabidopsis *TFL1* gene affects inflorescence meristem development [J]. Plant Cell, 3(9): 877-92.
- [15] BRADLEY D, CARPENTER R, COPSEY L, et al. Control of inflorescence architecture in antirrhinum [J]. Nature, 379(6568): 791-7.
- [16] NAKAGAWA M. Overexpression of *RCN1* and *RCN2*, rice *TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS* homologs, confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice [J]. Plant J, 2002, 29(6): 743-50.
- [17] DANILEVSKAYA O N, MENG X, ANANIEV E V. Concerted modification of flowering time and inflorescence architecture by ectopic expression of *TFL1-like* genes in maize [J]. Plant Physiol, 2010, 153(1): 238-51.
- [18] FREIMAN A, SHLIZERMAN L, GOLOBOVITCH S, et al. Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis* L.) genotype by RNAi silencing of *PcTFL1-1* and *PcTFL1-2* [J]. Planta, 2012, 235(6): 1239-51.
- [19] FLACHOWSKY H, SZANKOWSKI I, WAIDMANN S, et al. The *MdTFL1* gene of apple (*Malus x domestica* Borkh.) reduces vegetative growth and generation time [J]. Tree Physiol, 2012, 32(10): 1288-301.
- [20] RANTANEN M, KUROKURA T, JIANG P, et al. Strawberry homologue of *TERMINAL FLOWER1* integrates photoperiod and temperature signals to inhibit flowering [J]. Plant J, 2015, 82(1): 163-73.
- [21] MOHAMED R, WANG C T, MA C, et al. Populus *CEN/TFL1* regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in *Populus* [J]. Plant J, 2010, 62(4): 674-88.
- [22] AN X M, WANG D M, WANG Z L, et al. Isolation of a *LEAFY* homolog from *Populus tomentosa*: expression of *PtLFY* in *P. tomentosa* floral buds and *PtLFY-IR*-mediated gene silencing in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Plant cell reports, 2011, 30(1): 89-100.
- [23] YE M, CHEN Z, SU X, et al. Study of seed hair growth in

- Populus tomentosa*, an important character of female floral bud development [J]. BMC Genomics, 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-475.
- [24] CHEN Z, RAO P, YANG X, et al. A global view of transcriptome dynamics during male floral bud development in *Populus tomentosa* [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 722.
- [25] AINSWORTH C, CROSSLEY S, CHANAN-WOLLASTON V, et al. Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression [J]. Plant Cell, 1995, 7(10): 1583-98.
- [26] HARDENACK S. Comparison of MADS Box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion [J]. Plant Cell, 6(12): 1775-87.
- [27] CARMEL-GOREN L, LIU Y S, LIFSCHITZ E, et al. The *SELF-PRUNING* gene family in tomato [J]. Plant Mol Biol, 2003, 52(6): 1215-22.
- [28] KOTODA N, HAYASHI H, SUZUKI M, et al. Molecular characterization of *FLOWERING LOCUS T*-like genes of apple (*Malus x domestica* Borkh.) [J]. Plant Cell Physiol, 2010, 51(4): 561-75.
- [29] CARMONA M J, CALONJE M, MARTINEZ-ZAPATER J M. The *FT/TFL1* gene family in grapevine [J]. Plant Mol Biol, 2007, 63(5): 637-50.
- [30] CHARDON F, DAMERVAL C. Phylogenomic analysis of the *PEBP* gene family in cereals [J]. J Mol Evol, 2005, 61(5): 579-90.
- [31] IMAMURA T, NAKATSUKA T, HIGUCHI A, et al. The gentian orthologs of the *FT/TFL1* gene family control floral initiation in gentiana [J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(6): 1031-41.
- [32] YANG Z, CHEN L, KOHNEN M V, et al. Identification and Characterization of the *PEBP* family genes in moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 14998.
- [33] PILLITTERI L J, LOVATT C J, WALLING L L. Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER* homolog and its correlation with juvenility in citrus [J]. Plant Physiol, 2004, 135(3): 1540-51.
- [34] KIKUCHI R, KAWAHIGASHI H, ANDO T, et al. Molecular and functional characterization of PEBP genes in barley reveal the diversification of their roles in flowering [J]. Plant Physiol, 2009, 149(3): 1341-53.
- [35] PNUELI L, CARMEL-GOREN L, HAREVEN D, et al. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1* [J]. Development, 1998, 125(11): 1979-89.
- [36] HUANG W, FANG Z, ZENG S, et al. Molecular cloning and functional analysis of three *FLOWERING LOCUS T (FT)* homologous genes from *Chinese Cymbidium* [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(9): 11385-98.
- [37] CHEN Y, PENG J, THAMMANNAGOWDA S, et al. Characterization of peach *TFL1* and comparison with *FT/TFL1* gene families of the rosaceae [J]. J Am Soc Hortic Sci, 2013, 138(1): 12-7.
- [38] WANG Y, PIJUT P M. Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER 1* homolog from *Prunus serotina* Ehrh [J]. Tree Physiol, 2013, 33(8): 855-65.
- [39] SATO H, HEANG D, SASSA H, et al. Identification and characterization of *FT/TFL1* gene family in cucumber [J]. Breed Sci, 2009, 59(1): 3-11.
- [40] 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): 605-14.
- [41] SHALIT A, ROZMAN A, GOLDSCHMIDT A, et al. The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(20): 8392-7.
- [42] HANZAWA Y, MONEY T, BRADLEY D. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(21): 7748-53.
- [43] LIU Y, GAO Y, YUAN L, et al. Functional characterization and spatial interaction of *TERMINAL FLOWER 1* in *hemerocallis* [J]. Sci Hortic, 253:154-62.
- [44] The *TFL1* homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry [J]. Plant J, 2012, doi: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04776.x .
- [45] ZHANG S, HU W, WANG L, et al. *TFL1/CEN-like* genes control intercalary meristem activity and phase transition in rice [J]. Plant Sci, doi: 10.1016/j.plantsci.2004.10.022.
- [46] ZHENGHONG B, TAHIR A T, HUANG H, et al. Cloning and functional analysis of five *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)/CENTRORADIALIS (CEN)-like* genes from *Hevea brasiliensis* [J]. Physiol Plant, 2018, 166(2): 612-27.
- [47] BAI S, TUAN P A, SAITO T, et al. Repression of *TERMINAL FLOWER1* primarily mediates floral induction in pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) concomitant with change in gene expression of plant hormone-related genes and transcription factors [J]. J Exp Bot, 68(17): 4899-914.
- [48] NAKAJIMA R, OTAGAKI S, YAMADA K, et al. Molecular cloning and expression analyses of *FaFT*, *FaTFL*, and *FaAPI* genes in cultivated strawberry: their correlation to flower bud formation [J]. Biol Plant, 2014, 58(4): 641-8.
- [49] XING L B, ZHANG D, LI Y-M, et al. Transcription profiles reveal sugar and hormone signaling pathways mediating flower induction in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Plant Cell Physiol, 2015, 56(10): 2052-68.