

刘珊珊,段奥其,谭杉杉,等. 胡萝卜开花抑制子基因 *DcFLC* 的克隆与表达模式[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(9): 1731-1738.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.09.017

胡萝卜开花抑制子基因 *DcFLC* 的克隆与表达模式

刘珊珊¹, 段奥其¹, 谭杉杉¹, 邓元杰¹, 王广龙², 刘 慧¹, 孙 森³, 徐志胜¹, 熊爱生¹

(1.南京农业大学园艺学院/作物遗传与种质创新利用全国重点实验室/农业农村部华东地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室,江苏 南京 210095; 2.淮阴工学院生命科学与食品工程学院,江苏 淮安 223003; 3.盐城师范学院海洋与生物工程学院,江苏 盐城 224002)

摘要: 开花是植物由营养生长向生殖生长转变的重要标志。开花抑制子基因 *FLC* 是植物春化作用的关键调节基因。为了探明 *FLC* 基因在胡萝卜花发育过程中的作用,本研究以黑田五寸胡萝卜为试验材料,克隆得到胡萝卜 *DcFLC* 基因的编码序列(CDS),并利用实时荧光定量 PCR 技术(RT-qPCR)分析盛花期黑田五寸胡萝卜各组织及不同发育状态花中 *DcFLC* 基因的相对表达量。结果表明,*DcFLC* 基因的开放阅读框(ORF)长度为 660 bp,编码 219 个氨基酸。*DcFLC* 的相对分子量为 2.454×10^4 ,理论等电点为 9.15,是一个亲水性蛋白质。基于 *FLC* 编码的蛋白质氨基酸序列,胡萝卜与拟南芥、结球白菜、油菜、萝卜、杧果、白桦、可可、龙眼、葡萄、核桃等物种的遗传距离较远。盛花期胡萝卜肉质根、叶片和叶柄中 *DcFLC* 基因的表达量高于茎和花中 *DcFLC* 基因的表达量;花中开花抑制子基因 *DcFLC* 的相对表达量随着花的发育呈现先上升后下降再上升的变化趋势。本研究结果为胡萝卜 *FLC* 基因的利用和耐抽薹胡萝卜品种选育提供依据。

关键词: 胡萝卜; 开花抑制子基因 *DcFLC*; 表达分析; 花发育

中图分类号: S631.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)09-1731-08

Cloning and expression profiles of flowering suppressor gene *DcFLC* in *Daucus carota*

LIU Shanshan¹, DUAN Aoqi¹, TAN Shanshan¹, DENG Yuanjie¹, WANG Guanglong², LIU Hui¹, SUN Miao³, XU Zhisheng¹, XIONG Aisheng¹

(1.College of Horticulture, Nanjing Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement and Utilization/Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops in East China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China; 2.School of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China; 3.School of Marine and Biological Engineering, Yancheng Teachers University, Yancheng 224002, China)

Abstract: Flowering is an important symbol of the transformation of plants from vegetative growth to reproductive growth.

收稿日期:2023-09-26

基金项目:国家自然科学基金项目(32072563、32102369);江苏省自然科学基金项目(BK20211366);江苏高校优势学科建设项目(PAPD)

作者简介:刘珊珊(2000-),女,安徽淮北人,硕士研究生,主要从事蔬菜遗传育种研究。(E-mail)2022104058@stu.njau.edu.cn

通讯作者:熊爱生,(E-mail) xiongaisheng@njau.edu.cn

The flowering suppressor gene *FLC* is a key regulator of plant vernalization. In order to explore the role of *FLC* gene in the development of carrot flowers, the coding sequence (CDS) of *DcFLC* gene was cloned from Kurodagosun carrot, and the relative expression of *DcFLC* gene in different tissues and flowers with different developmental states of Kurodagosun carrot at full-bloom stage was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) in this study. The re-

sults showed that the open reading frame (ORF) of *DcFLC* gene was 660 bp in length, encoding 219 amino acids. The relative molecular weight of *DcFLC* was 2.454×10^4 , and the theoretical isoelectric point was 9.15. It was a hydrophilic protein. Based on the amino acid sequence of the protein encoded by *FLC*, the genetic distance between carrot and *Arabidopsis thaliana*, Chinese cabbage, rapeseed, radish, mango, birch, cocoa, longan, grape and walnut was far. The expression of *DcFLC* gene in carrot fleshy roots, leaves and petioles was higher than that in stems and flowers at full-bloom stage. With the development of flowers, the relative expression of flowering suppressor gene *DcFLC* in flowers showed a trend of increasing first, then decreasing and then increasing. The results of this study provide a basis for the utilization of carrot *FLC* gene and the breeding of bolting-resistant carrot varieties.

Key words: carrot; flowering suppressor gene *DcFLC*; expression analysis; flower development

植物的开花时间对新品种繁育十分重要^[1]。植物开花受日长、温度等外界环境条件和自身激素水平、营养水平、基因型等内部因素共同控制。外界途径包括光周期途径 (Photoperiods pathway)、春化途径 (Vernalization pathway) 和温度途径 (Ambient temperature pathway) 等; 内在途径包括赤霉素途径 (Gibberellin pathway)、年龄途径 (Aging pathway)、自主途径 (Autonomous pathway)、脱落酸途径 (Abscisic acid pathway, ABA pathway) 和油菜素甾醇途径 (Brassinosteroids pathway, BR pathway) 等^[2-8]。这些途径共同构成植物的开花调控网络, 调控植物的开花过程。调控过程中涉及的基因主要有 *FT*^[9]、*SOC1*^[10]、*FLC*^[11] 等。

FLC 作为高等植物特有的一类转录因子基因, 属于 *MADS* 家族基因, 控制着植物的开花时间, 是重要的开花抑制子基因^[12]。Michaels 等^[13] 研究发现 *AtFLC* 基因能调控拟南芥开花时间和春化过程, *AtFLC* 基因高表达量的拟南芥植株开花时间明显推迟, 而 *AtFLC* 基因突变体则开花提前^[13]。茶树 *CsFLC* 基因在花器官发育过程中高表达, 说明 *CsFLC* 基因可正向调节茶树花的发育^[14]。芸薹属叶菜类植物中的 *BrFRI* 基因能激活 *BrFLC* 基因, 且 *BrFLC* 旁系同源基因的表达水平与冷处理后的开花天数呈正相关^[15]。

胡萝卜 (*Daucus carota*) 是伞形科胡萝卜属二年生草本植物, 富含多种维生素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素以及可溶性糖、纤维素、蛋白质、矿物质等多种营养物质^[16], 是全球十大蔬菜作物之一。栽培过程中, 胡萝卜易受长日照和早春低温的影响而提前抽薹, 从而导致肉质根木质化, 降低胡萝卜的品质和产量^[17]。耐抽薹胡萝卜品种的选育已成为胡萝卜产业健康发展的重要基础。加强胡萝卜开花抑制子基因 *DcFLC* 表达特征的研究对该基因的利用和耐抽薹胡萝卜品种选育有重要意义。

本研究从黑田五寸胡萝卜品种中克隆得到 *MADS*-box 转录因子基因 *DcFLC*, 并对其进行生物信息学分析, 通过实时荧光定量 PCR 分析盛花期胡萝卜各组织中 *DcFLC* 的相对表达量及不同发育状态花中 *DcFLC* 基因的表达量变化特征, 为耐抽薹胡萝卜品种选育提供理论支撑。

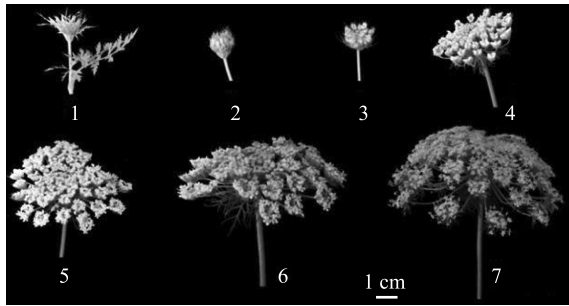
1 材料与方法

1.1 试验材料及处理

以黑田五寸胡萝卜品种为试验材料, 2021 年 9 月播种于南京农业大学人工气候室。共种植 5 盆, 每盆 3 株。人工气候室内温度设置为 25 °C (光期 12 h)/20 °C (暗期 12 h), 光照度 300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ^[18]。2022 年 1 月胡萝卜苗移至室外生长, 5 月胡萝卜抽薹开花。胡萝卜开花后 20 d 选取健壮且长势一致的 9 棵胡萝卜植株对叶片、叶柄、茎、根以及不同开放程度的花等进行取样, 且重复 3 次。其中, 花序的开放程度如图 1 所示。取样后样品立即用液氮速冻, 并保存于 -80 °C 冰箱。

1.2 *DcFLC* 基因克隆

胡萝卜总 RNA 提取和 cDNA 的合成按照多糖多酚植物 RNA 提取试剂盒 (RNA simple total RNA Kit, 上海浦迪生物科技有限公司产品) 和反转录试剂盒 (Prime Script RT reagent Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 操作说明进行。根据拟南芥 *AtFLC* 的碱基序列在胡萝卜数据库^[19] 中检索得到胡萝卜 *DcFLC* 基因碱基序列。根据胡萝卜 *DcFLC* 基因碱基序列, 使用 Primer premier 5.0 软件设计全长引物 (表 1), 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。使用 Prime STAR Max Premix 试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司产品] 并根据试剂盒使用说明, 采用 30 μL 体系进行 PCR 扩增。扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收, 回收产物送通用生物 (安徽) 股份有限公司进行测序。



1~7 代表取样花的花序开放程度。

图 1 不同开放程度的胡萝卜花序形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of carrot inflorescences at different opening degrees

1.3 生物信息学分析

基于 NCBI 数据库,利用 Blast 工具获得拟南芥、结球白菜、油菜、萝卜、杧果、白桦、可可、龙眼、葡萄、核桃及胡萝卜等物种 *FLC* 基因碱基及其编码的氨基酸序列;利用 BioXM 2.6 软件获得胡萝卜和其他物种 *FLC* 基因编码蛋白质的相对分子量、等电点、酸性氨基酸比例和碱性氨基酸比例。使用 NCBI 的保守结构域数据库(CDD)对 *DcFLC* 蛋白的保守结构域预测;利用 DNAMAN 6.0 完成不同物种 *FLC*

蛋白氨基酸序列的比对;利用 Expasy 在线网站(<https://web.expasy.org/protscale/>)对 *DcFLC* 蛋白进行亲疏水性分析;利用 MAGE 7.0 完成不同物种系统进化树的构建^[20];使用 SOPMA 在线网站(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)和 SWISS MODEL 网站(<https://swissmodel.expasy.org/>)分析 *DcFLC* 蛋白的二级结构和三级结构;使用 STRING 网站(<https://cn.string-db.org/>)进行胡萝卜 *DcFLC* 蛋白互作预测^[21]。

1.4 胡萝卜 *DcFLC* 基因的表达模式分析

以胡萝卜 *DcActin* 基因 (GenBank No. XM_017371101.1)作为内参基因^[22],采用 BioRad CFX96 Real-time System 和 BioRad CFX Manager 进行胡萝卜样本的实时荧光定量 PCR 分析,所用引物序列如表 1。实时荧光定量 PCR 总体积为 20.0 μ L,包括 ddH₂O 7.2 μ L、SYBR Premix *Ex Taq* 10.0 μ L、正向引物和反向引物各 0.4 μ L 及 2.0 μ L 稀释 15 倍后的 cDNA 模板。扩增程序按照 SYBR Premix *Ex Taq* 酶的使用说明书设置。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算胡萝卜 *DcFLC* 基因的相对表达量^[23],使用 SPSS 27 和 GraphPad Prism 软件进行基因数据分析及作图。

表 1 用于基因克隆和实时荧光定量 PCR 的引物

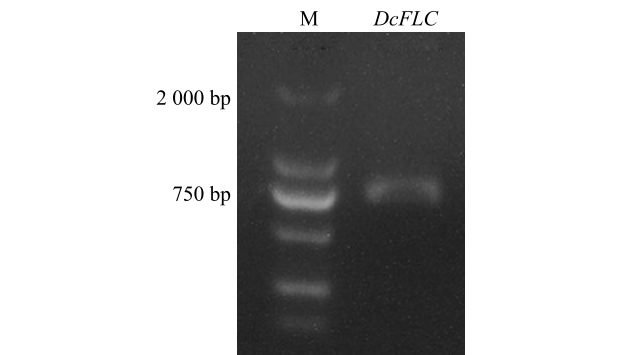
Table 1 Primers used for gene cloning and real-time fluorescence quantitative PCR analysis

引物名称	目的	引物(5'→3')
<i>DcFLC</i> -F	基因克隆	TTTACAATTACCATGGGATCCATGGGGAGAAAGAAGCTAGAAAT
<i>DcFLC</i> -R		ACCGATGATACGAACGAGCTCCTAACCAAGCAACATAAGTGTCTC
<i>DcFLC</i> -RT-F	表达量分析	TCCTCATTCTCAGCTCAGTCA
<i>DcFLC</i> -RT-R		GCACAAGATCAGCCACAGAGA
<i>DcActin</i> -F	表达量分析	CGGTATTGTGTTGACTCTGCTGAT
<i>DcActin</i> -R		CAGCAAGGTCAAGACGAGTATGG

2 结果与分析

2.1 胡萝卜 *DcFLC* 基因的克隆与序列分析

克隆得到的胡萝卜 *DcFLC* 基因通过琼脂糖凝胶电泳后,检测得到单一明亮的目的条带(图 2)。胡萝卜 *DcFLC* 基因编码蛋白的开放阅读框(ORF)长度为 660 bp,编码 219 个氨基酸(图 3)。*DcFLC* 蛋白包含 MADS-MEF2-like 和 K-box 两个结构域,属于典型的 MADS-box 家族蛋白(图 4)。胡萝卜 *DcFLC* 蛋白氨基酸序列的亲疏水性如图 5 所示。*DcFLC* 的大部分氨基酸为亲水性氨基酸。



M:2 000 bp DNA marker;*DcFLC*:克隆 *DcFLC* 基因得到的 PCR 产物。

图 2 胡萝卜 *DcFLC* 基因的克隆

Fig.2 Clone of the carrot *DcFLC* gene

```
1  ATGGGGAGAAAGAAGCTAGAAATCAAGCGAATCGAAGATAAGTGCAATCGACAAGTCACT
   M G R K K L E I K R I E D K C N R Q V T
61  TTCTOCAAGCGAAGAACAGGACTGCTCAAGAAAGCTAAACAGCTCTCTATTCTCTGCGAC
   F S K R R T G L L K K A K Q L S I L C D
121  GCGGAGTCGGTGTATTATTGCTCCAAACGCGGCAAGCTCTACGAATTCTCCACGGC
   A R V G V I I R S N R G K L Y E F S H A
181  CCCAGGTGCAGTAGTTTGGATGCAATTCTTCAAAAATATCATGATGTCACTAGTGATGAT
   P R C S S L D A I L Q K Y H D V T S D D
241  GCAAAAGAAGCAACGGGAGTCTATGAACCTAAGAATTCAAAATATTACGAGGAAATCAG
   A K E A T G V Y E P K N S K Y S R G N Q
301  GCAAATGGAGATCTTTTAOCAAGAGTTCAAAGGTACTTGGCTGAACCTTGATTAGACCAG
   A N G D L L P R V Q R Y L A E L D L D Q
361  TTCTCTGTGGCTGATCTTGTGCAACTAGAGAAAGAACTGGGAAGTGCCTGGTACAAAACG
   F S V A D L V Q L E K E L G T A L V Q T
421  ATAGCAGCAAAGATCTCTGCCAATACGGGCTGATGATGGAACCAATAAGAACACTTCAA
   I A A K I S A N T R L M M E P I R T L Q
481  GAAAAGGCAAATTTGCTGAAAGAAGAAATGACGTCCTGGCGCAGCAGATTGCTGCAATG
   E K A N L L K E E N D V L A Q Q I A A M
541  GTGAAGCAAAACATAGCCAAGAAGGAGAAAAGCGAAGAGGTTGGTTCAGAGTTATGCAAC
   V K Q N I A K K E K S E E V G S E L C N
601  CTTTCAGATACTGAGACTCATCATGCCAACCAGGCGAGACACTTATGTTGCTTGTTAG
   L S D T E T H H A P P G E T L M L L G *
```

图 3 胡萝卜 *DcFLC* 基因编码的蛋白质氨基酸序列
Fig.3 Amino acid sequence of the protein encoded by *DcFLC* gene in carrot

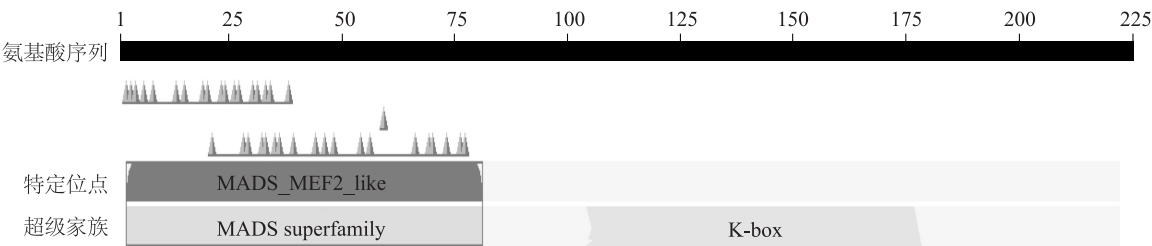


图 4 胡萝卜 *DcFLC* 蛋白结构域预测
Fig.4 Prediction of the domain of carrot *DcFLC* protein

DcFLC 的氨基酸残基数为 219, 相对分子量为 2.454×10^4 , 理论等电点为 9.15, 酸性氨基酸和碱性氨基酸比例分别为 24% 和 18%。拟南芥、结球白菜、油菜、萝卜、杧果、白桦、可可、龙眼、葡萄、核桃等物种 *FLC* 蛋白的氨基酸残基数为 163~210, 相对分子量为 $1.837 \times 10^4 \sim 2.449 \times 10^4$, 理论等电点为 6.27~10.35。酸性氨基酸比例 22%~28%, 碱性氨基酸比

例 17%~20% (表 2)。上述不同物种 *FLC* 蛋白氨基酸序列总体相似度为 58.12% (图 6)。

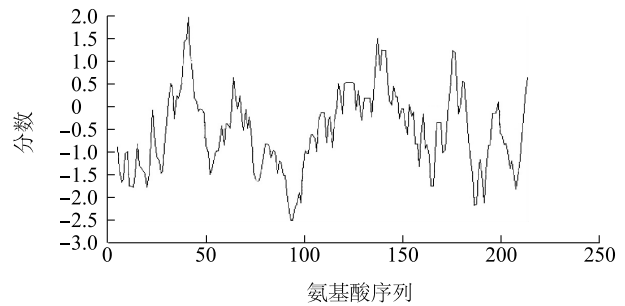
2.2 胡萝卜 *DcFLC* 蛋白的二级结构及三级结构

胡萝卜 *DcFLC* 蛋白的二级结构中 α 螺旋 (Alpha helix) 占比高达 60.73%, 延伸主链 (Extended strand) β 转角 (Beta turn) 和无规则卷曲 (Random coil) 占比分别为 12.33%、4.57% 和 22.37%。*Dc-*

FLC 蛋白的三级结构主要由螺旋和折叠组成(图 7)。

2.3 胡萝卜 *DcFLC* 蛋白的互作

胡萝卜 *DcFLC* 蛋白潜在的互作关系如图 8 所示。从图中可以看出, *DcFLC* 与调节胡萝卜开花的 SVP、GI、FT 和 FRI 等转录因子存在相互作用。SVP (Short vegetative phase) 是植物中 MADS-box 转录因子家族成员, 通过脱落酸 (ABA) 代谢调控植物开花过程。*DcFLC* 蛋白可通过与 SVP 转录因子互作, 实现对胡萝卜开花的调控。



分数>0 为疏水性, 分数<0 为亲水性。

图 5 胡萝卜 *DcFLC* 蛋白氨基酸序列中氨基酸的亲疏水性

Fig.5 The analysis of hydrophobicity and hydrophilicity properties of amino acid sequence of *DcFLC* in carrot

表 2 不同物种 FLC 蛋白氨基酸组成及理化性质

Table 2 Amino acid composition and physicochemical properties of FLC proteins from different species

物种	登录号	氨基酸残基数	相对分子量 ($\times 10^4$)	理论等电点	氨基酸比例 (%)	
					酸性氨基酸	碱性氨基酸
萝卜 (<i>Raphanus sativus</i>)	AAP31676.1	197	2.194	9.66	22	18
杧果 (<i>Mangifera indica</i>)	QKN22745.1	191	2.209	9.65	25	20
白桦 (<i>Betula platyphylla</i>)	AGC94569.1	208	2.386	9.42	23	19
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_196576.1	196	2.187	8.45	24	17
结球白菜 (<i>Brassica rapa</i>)	ABO40820.1	196	2.193	9.76	23	19
油菜 (<i>Brassica napus</i>)	AFU61563.1	163	1.837	8.24	24	19
可可 (<i>Theobroma cacao</i>)	XP_007043954.2	198	2.297	6.37	28	17
龙眼 (<i>Dimocarpus longan</i>)	AHZ89709.1	191	2.156	10.35	22	18
葡萄 (<i>Vitis vinifera</i>)	NP_001268057.1	210	2.449	6.37	28	18
核桃 (<i>Juglans regia</i>)	AHF20809.1	203	2.378	6.27	25	19

DcFLC	MGRKKLEIKRTEKCNQVTFSEKRRFTGLIKKAKQLSLICDARVGVIIIRNRGKLYEFESHAPRCSSSIDALIQKYHLVTSDDAKEATGVYEPKNS.KYSRGNQANGDIIFRV	109
AtFLC	MGRKKLEIKRTEKSSRQVTFSEKRRNGLIEKARQLSVLCDSVALIVVSSAGRLYESSG...DNIIVKILDRYGKQHADDLKA.LDHQ.....SKALNYGSHYELIELV	100
JrFLC	MGRGRVQIKRTEKSSRQVTFSEKRRGGLMKKAREIAVLCDVEVALVIFSDRGLYEFSSA...ESIGKILERYRTHVEEIIAVRRSSELEKTHHADCFGLQMGARFEMI	107
BnFLC	MGRKKLEIKRTEKSSRQVTFSEKRRNGLIEKARQLSVLCDSVALIVVSSAGRLYESSG...DNIIVKILDRYGKQHADDLKA.LDRQ.....SKALDCGSHHIELV	100
VvFLC	MGRKKVEIKRTEKSSRQVTFSEKRRNGLIKKARELSVLCDDVAVLVFSSRGKLYEYANG...NSIARILERYQSHFEAEGNASTGANSESENCHYEYT..RDWTELLCTV	105
DIFLC	MGRKKLQIKRTEKSSRQVTFSEKRRFTGLIKKAREIAVLCDVDAVLVIFSSRGKLYEFSSA...NSIPLSLDRYRSRFEFEALAVNSVN.AEGSQSKHSSLHSHAQLCIV	106
BrFLC	MGRKKLEIKRTEKSSRQVTFSEKRRNGLIEKARQLSVLCDSVALIVVSSAGRLYESSG...DNIIVKILDRYGKQHADDLKA.LDLQ.....SKAFKYGSHHIELV	100
TcFLC	MGRGRVQIKRTEKSSRQVTFSEKRRSGLIKKARELSVLCDEIALVIFSSRGKLYEFSSA...DGLTKILERYRCHYECESEASKDVN.....EALRSHTTELLHIV	98
BpFLC	MGRKKVILIKRTEKSSRQVTFSEKRRNGLMKARELSVLCDDVQVALVIFSSRGKLYEYCSG...NSI GKILHEHRSRLKGEMKASEGLNDIESYHFESASQCCHVEIKLV	107
MiFLC	MGRKKVQIKRTEKSSRQVTFSEKRRSGLIKKARELSVLCDDVDAVLVIFSSRGKLYEFCST...DSEANFEERYQSHSGEEALASKGEN.AEVSNFEYASISYSHAELLIV	106
RsFLC	MGRKKLEIKRTEKSSRQVTFSEKRRSGLIEKARQLSVLCDSVALIVVSSAGRLYESSG...DNIIVKILDRYGKQHADDLKA.LDLQ.....SKSLSYGSHNELIELV	101
DcFLC	CRYIAELILDQFVSADIVQLIEKELGTALVQIIAAKISANTLMEPIRTIQEKANLIKPEENVLAQQIAAMVKQNIKKKEKSEEVGSELNLSDTETHAPPGETIMLIG	219
AtFLC	DSKIVGSNVKNVSIDALVQLIEHLEIALSVTRARK...TEMLKIVENLKEKEKMKIBENQVLASQMEKNHVGAAEAE.MEMSPAGQISDN.....LP.VITLPLIN	196
JrFLC	CRYIEEQNIQKTIIEITHIEIDVILRQTRFRK...TCLMIEAIKAHYEEKQIRBEKTLMEEMAAAMS...EDHVLRLLEFPNNARAPP.....LQE.TILNIF	203
BnFLC	ESKIEESNVDNVSGSIVQLIEHLEIALSVTRARK...TEMLKIVENLKEKEKMKIBENHVLASQ.....SKAFKYGSHHIELV	163
VvFLC	CSQIEGQNDQMSVTDIVQLIEHLEIALSVTRARK...NCLIMMESIRHLHEKERMLRQEKELLEKEAMEAMRKE.KEEGWKECAIGNLDPFNPEEPCHQR.ITLSILR	209
DIFLC	CRQIEGQNFQMTVTCLVQLIEKQLDAALITQTRARK...TCLIMMESIVILHEKERALRBEKERLESEIAALKN...GTTTSGGAMA.....TILSLIK	191
BrFLC	ESKIVESNSD.VSVDSIVQLIEHLEIALSVTRARK...TEMLKIVDSLKEKEKMKIBENQVLASQMEKNLAGAKACKMEMSPG.QISDIN.....RP.VITRLIY	196
TcFLC	CSQIEEENVEQLSLMDIVNLEKQLDMALSETTRARK...TCLIMMESITLQEKELIRAEENELLEREISAMEK..NEDEGNEVVIGFSNHQHLG...NLRCQ.QTILSLIQ	198
BpFLC	CKQIEGPNIEGLNVTDIAQLIEHCENAAITYTRSK...TCLIMMESITLHEKERMLRBEENELLEREIASMKN...SEGRTEVLMGLSMHENS.LPHPRCP.ETLSILP	208
MiFLC	CRQIEGPKFEQLITVTDIVHLEKQENAKTSQTRARK...TEMLMDTIMILQDEKKQRENTILRREIAELEK...ENCRRTARAMA.....TILHLIR	191
RsFLC	ESKIVESNVG.VSVDAIVQLIEHLEIALSVTRARK...TEMLKIVDSLKEKEKMKIBENKVLAQMEKNLAGAEADNMEIARA.QISDIN.....LP.VITLPLIN	197

RsFLC: 萝卜 FLC 蛋白; MiFLC: 杧果 FLC 蛋白; BpFLC: 白桦 FLC 蛋白; TcFLC: 可可 FLC 蛋白; BrFLC: 结球白菜 FLC 蛋白; DIFLC: 龙眼 FLC 蛋白; VvFLC: 葡萄 FLC 蛋白; BnFLC: 油菜 FLC 蛋白; JrFLC: 核桃 FLC 蛋白; AtFLC: 拟南芥 FLC 蛋白; DcFLC: 胡萝卜 FLC 蛋白。

图 6 不同物种 FLC 蛋白氨基酸序列对比

Fig.6 Alignment of amino acid sequences of FLC proteins from different species

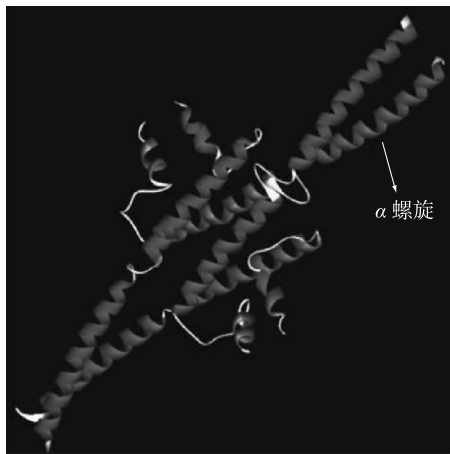


图 7 胡萝卜 DcFLC 蛋白的三级结构模型
Fig.7 The tertiary structure model of DcFLC protein from carrot

2.4 胡萝卜 DcFLC 蛋白的系统进化树

不同物种 FLC 蛋白氨基酸序列系统进化树如图 9 所示。从图中可以看出,拟南芥、结球白菜、油菜和萝卜等十字花科植物 FLC 蛋白遗传距离较小,

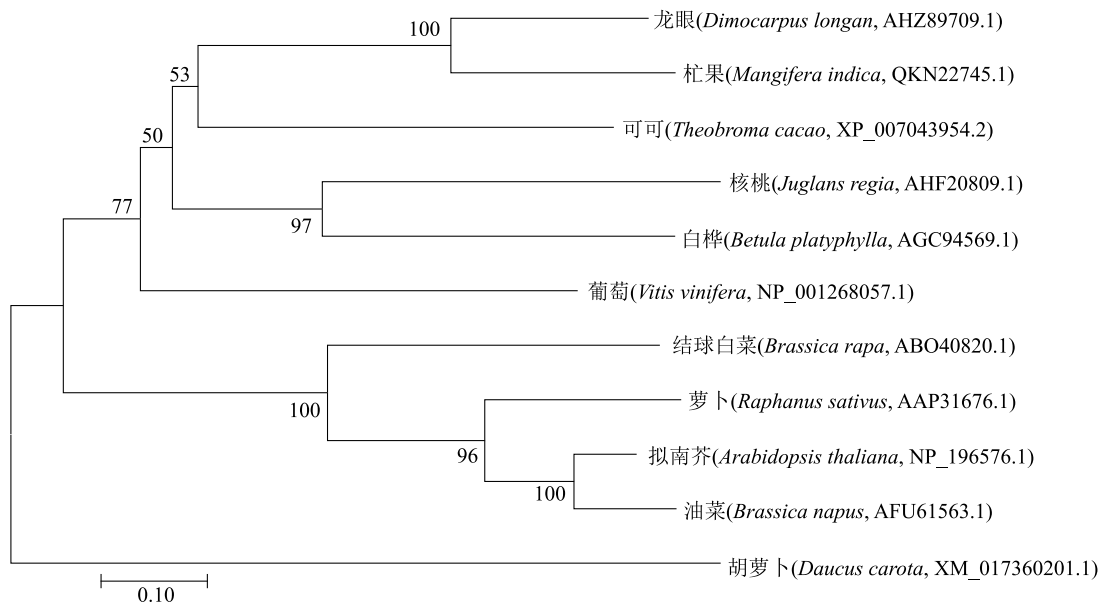
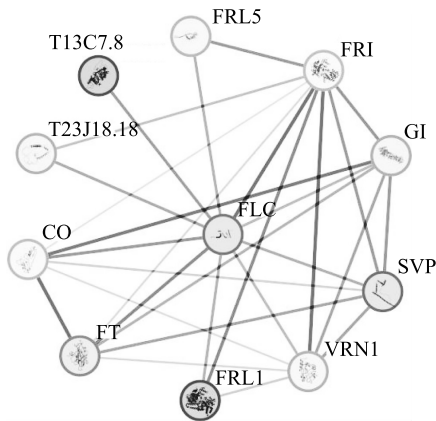


图 9 基于 FLC 蛋白氨基酸序列的不同物种系统进化树
Fig.9 Phylogenetic tree of different species based on amino acid sequences of FLC

2.5 DcFLC 基因在胡萝卜盛开期不同组织以及不同发育状态花中的表达

胡萝卜盛花期不同组织及不同发育状态花中 DcFLC 基因的表达量如图 10 所示。盛花期胡萝卜肉质根、叶片和叶柄中 DcFLC 基因的表达量较

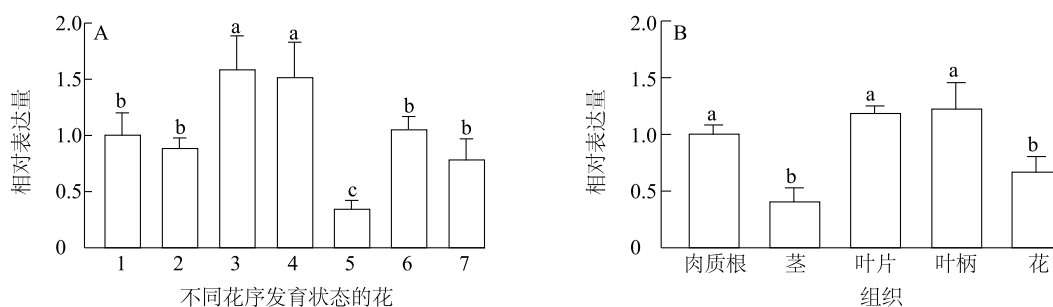
聚为一类。胡萝卜 DcFLC 蛋白与其他植物 FLC 蛋白之间遗传距离相对较远,单独形成一支,说明胡萝卜 DcFLC 蛋白的功能与其他植物可能存在差异。



线的粗细表示蛋白质交互强度。FLC:开花抑制子蛋白;FRI: Frigida 蛋白;FRL1: FRI 类蛋白 1;FRL5: FRI 类蛋白 5;GI: Gigantea 蛋白;SVP:开花抑制蛋白;VRN1:春化相关蛋白;FT:成花素蛋白;CO:B-box 锌指蛋白;T23J18.18:Pliceosome 相关蛋白;T13C7.8:gyp1p 超家族蛋白。

图 8 胡萝卜 DcFLC 蛋白交互网络
Fig.8 Protein-protein interaction network of DcFLC of carrot

高,茎和花中的表达量较低。随着花的发育,花中 DcFLC 表达量呈现先上升后下降再上升的趋势,在花序发育的第 3、第 4 阶段表达量较高,第 5 阶段表达量最低,第 3 阶段 DcFLC 表达量是第 5 阶段的 4.5 倍。



A:盛花期不同发育状态胡萝卜花中 *DcFLC* 基因相对表达量,1~7 为不同发育状态花序的花,见图 1;B:盛花期胡萝卜不同组织中 *DcFLC* 基因的相对表达量。柱上不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图 10 盛花期胡萝卜不同组织及不同发育状态花中 *DcFLC* 基因的表达量

Fig.10 Expression levels of *DcFLC* gene in different tissues and flowers with different developmental states of carrot at full flowering stage

3 讨论与结论

FLC 作为调控植物开花的关键基因,与植物发育密切相关。本研究从黑田五寸品种中克隆得到胡萝卜 *DcFLC* 基因,并对其进行生物信息学分析。结果表明 *DcFLC* 基因编码的蛋白质中大部分氨基酸为亲水性氨基酸,胡萝卜与拟南芥、油菜、结球白菜等物种 *FLC* 基因编码的蛋白质的氨基酸构成中酸性氨基酸占比高于碱性氨基酸。MADS 家族蛋白有两种结构类型,I型(SRF)和II型(MEF2),在II型 MADS-box 中存在 1 个特有的 K-box 结构^[24]。胡萝卜 *DcFLC* 蛋白具有典型的 MADS-box 结构域,属于 MADS 家族,同时还具有 K-box 结构,属于 MADS 家族中的II型分支。MADS-MEF2-like 结构位于2~80 氨基酸位点,K-box 结构位于103~176 氨基酸位点,与拟南芥、结球白菜和油菜等植物相似^[25-26]。FLC 蛋白进化关系表明胡萝卜 *DcFLC* 与其他物种 *FLC* 不在同一分支上,亲缘关系较远。同一科植物的 *FLC* 因子聚在同一分支上,如拟南芥、大白菜、油菜和萝卜等十字花科植物,表明同科植物 *FLC* 氨基酸序列同源性比较高。蛋白质互作预测结果表明 *FLC* 与 *SVP* 和 *GI* 之间存在较为明显的互作关系。Mateos 等^[27] 研究证实,拟南芥 *AtSVP* 蛋白与 *AtFLC* 蛋白可形成复合物,抑制拟南芥开花基因的启动和表达。

本研究结果表明,盛花期胡萝卜 *DcFLC* 基因主要在叶片与叶柄中表达,茎和花中表达量相对较低;不同发育状态花中 *DCFLC* 表达量呈先增加后减少再增加的特征,其中在花序发育的第 3、4 阶段表达量较高。盛花期胡萝卜 *DcFLC* 基因在花中表达量相对较低,原因可能是胡萝卜抽薹开花后,开花抑制因子基因 *DcFLC* 的表达水平受到其他基因的抑制而逐渐降

低。Michaels 等^[28] 研究发现,拟南芥茎尖与根尖 *AtFLC* 的表达量较高。结球白菜根、茎、叶片和花等器官中 *BcFLC* 均有表达,且抽薹前 *BcFLC* 基因的表达量高于抽薹后^[29]。营养生长期菊花叶片中 *CmFLC-like1* 基因的表达量较高,根系中较低^[30]。不同杧果品种或同一杧果品种不同组织中 *MiFLC* 基因均有表达,且营养器官中表达量较高,花中表达量较低^[31]。*FLC* 在拟南芥及其异源多倍体中表达方式也存在多样性,拟南芥异源多倍体的花期差异可能与多个 *FLC* 位点的表达多样性和拷贝数相关^[32]。

AtFLC 基因作为拟南芥开花抑制因子基因参与开花途径的调控^[33-34]。当 *AtFLC* 表达水平较低时,拟南芥春化途径加快,开花基因的表达水平提高,从而花期提前^[35]。自主开花途径同样能调节 *AtFLC* 的表达水平,从而影响拟南芥生长发育进程^[34]。低温胁迫能抑制菊花 *CmFLC* 表达水平,且低温持续时间越长,抑制效果越明显^[30]。芍药 *PoFLC* 基因转到拟南芥植株后,异源过表达,转芍药 *PoFLC* 基因的拟南芥植株营养生长期更长,叶片与茎等营养器官更健壮,且抽薹、开花时间明显晚于野生型植株,表明 *PoFLC* 在延迟开花上发挥着重要作用^[36]。本研究通过对胡萝卜 *DcFLC* 基因进行克隆以及表达特性分析,明确了胡萝卜 *DcFLC* 蛋白与其他转录因子的互作关系,但 *DcFLC* 基因对胡萝卜开花的调控机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] AMASINO R. Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories[J]. *Genome Biology*, 2009, 10(7): 228.
- [2] 张艺能,周玉萍,陈琼华,等. 拟南芥开花时间调控的分子基础[J]. *植物学报*, 2014, 49(4): 469-482.
- [3] SRIKANTH A, SCHMID M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, 68

- (12);2013-2037.
- [4] WANG Y, LI L, YE T, et al. The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by *ABI5* in *Arabidopsis* [J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(2): 675-684.
 - [5] SHU K, CHEN Q, WU Y, et al. *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 4* negatively regulates flowering through directly promoting *Arabidopsis FLOWERING LOCUS C* transcription [J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(1): 195-205.
 - [6] XIONG F, REN J J, YU Q, et al. *AtU2AF65b* functions in abscisic acid mediated flowering via regulating the precursor messenger RNA splicing of *ABI5* and *FLC* in *Arabidopsis* [J]. New Phytologist, 2019, 223(1): 277-292.
 - [7] LI Z, OU Y, ZHANG Z, et al. Brassinosteroid signaling recruits histone 3 lysine-27 demethylation activity to *FLOWERING LOCUS C* chromatin to inhibit the floral transition in *Arabidopsis* [J]. Molecular Plant, 2018, 11(9): 1135-1146.
 - [8] BULGAKOV V P, AVRAMENKO T V. Linking Brassinosteroid and ABA Signaling in the Context of Stress Acclimation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(14): 5108.
 - [9] WENKEL S, TURCK F, SINGER K, et al. *CONSTANS* and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006, 18(11): 2971-2984.
 - [10] BOUVERET R, SCHONROCK N, GRUISSEM W, et al. Regulation of flowering time by *Arabidopsis MSII* [J]. Development, 2006, 133(9): 1693-1702.
 - [11] FINNEGAN E J, DENNIS E S. Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at *FLC* is not maintained in mitotically quiescent cells [J]. Current Biology, 2007, 17(22): 1978-1983.
 - [12] 王莹, 穆艳霞, 王锦. *MADS-box* 基因家族调控植物花器官发育研究进展 [J]. 浙江农业学报, 2021, 33(6): 1149-1158.
 - [13] 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.
 - [14] LIU Y, DRENI L, ZHANG H, et al. A tea plant (*Camellia sinensis*) *FLOWERING LOCUS C*-like gene, *CsFLC1*, is correlated to bud dormancy and triggers early flowering in *Arabidopsis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(24): 15711.
 - [15] TAKADA S, AKTER A, ITABASHI E, et al. The role of *FRIGIDA* and *FLOWERING LOCUS C* genes in flowering time of *Brassica rapa* leafy vegetables [J]. Scientific Reports, 2019, 9: 13843.
 - [16] 庄飞云, 欧承刚, 赵志伟. 胡萝卜育种回顾及展望 [J]. 中国蔬菜, 2008(3): 41-44.
 - [17] 鲍生有, 欧承刚, 庄飞云, 等. 胡萝卜春季栽培前期抽茎的调查与分析 [J]. 中国蔬菜, 2010(6): 38-42.
 - [18] 张榕蓉, 王雅慧, 李彤, 等. 胡萝卜 *WRKY69* 基因 (*DeWRKY69*) 的克隆及其对不同植物生长调节剂的响应 [J]. 植物资源与环境学报, 2019, 28(4): 1-10.
 - [19] XU Z S, TAN H W, WANG F, et al. CarrotDB: a genomic and transcriptomic database for carrot [J]. Database, 2014, 2014: bau096.
 - [20] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
 - [21] 刘文艳, 刘春方, 滕瑞敏, 等. 茶树生物钟基因 *CsCCA1* 的鉴定及对光合特性的影响 [J]. 植物生理学报, 2022, 58(3): 554-564.
 - [22] TIAN C, JIANG Q, WANG F, et al. Selection of suitable reference genes for qPCR normalization under abiotic stresses and hormone stimuli in carrot leaves [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117569.
 - [23] SCHAEFFER A A, ARAVIND L, MADDEN T L, et al. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(14): 2994-3005.
 - [24] ALVAREZ-BUYLLA E R, PELAZ S, LILJEGREN S J, et al. An ancestral *MADS-box* gene duplication occurred before the divergence of plants and animals [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(10): 5328-5333.
 - [25] TADEGE M, SHELDON C C, HELLIWELL C A, et al. Control of flowering time by *FLC* orthologues in *Brassica napus* [J]. Plant Journal, 2001, 28(5): 545-553.
 - [26] OKAZAKI K, SAKAMOTO K, KIKUCHI R, et al. Mapping and characterization of *FLC* homologs and QTL analysis of flowering time in *Brassica oleracea* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114(4): 595-608.
 - [27] MATEOS J L, MADRIGAL P, TSUDA K, et al. Combinatorial activities of *SHORT VEGETATIVE PHASE* and *FLOWERING LOCUS C* define distinct modes of flowering regulation in *Arabidopsis* [J]. Genome Biology, 2015, 16: 31.
 - [28] MICHAELS S D, AMASINO R M. Memories of winter: vernalization and the competence to flower [J]. Plant Cell and Environment, 2000, 23(11): 1145-1153.
 - [29] 荣子龙, 侯喜林, 史公军, 等. 不结球白菜晚抽茎 *BcFLC1* 基因克隆及表达分析 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(6): 23-27.
 - [30] 展妍丽, 王萃铂, 开钰莹, 等. 菊花开花抑制基因 *CmFLC-like1* 的克隆及表达特性分析 [J]. 园艺学报, 2015, 42(7): 1347-1355.
 - [31] 祁广俊, 刘德兵, 魏军亚, 等. 芒果 *FLC* 同源基因的克隆和表达分析 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(18): 5951-5957.
 - [32] NAH G, CHEN Z J. Tandem duplication of the *FLC* locus and the origin of a new gene in *Arabidopsis* related species and their functional implications in *allopolyploids* [J]. New Phytologist, 2010, 186(1): 228-238.
 - [33] 袁敏, 邢朝斌, 葛伟娜, 等. 拟南芥开花诱导基因 *FT* 的蛋白表达及纯化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(8): 3053-3056.
 - [34] HE Y H. Control of the transition to flowering by chromatin modifications [J]. Molecular Plant, 2009, 2(4): 554-564.
 - [35] 徐雷, 贾飞飞, 王利琳. 拟南芥开花诱导途径分子机制研究进展 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(5): 1057-1065.
 - [36] FAN M Y, CHEN L F, WANG E R, et al. Identification and characterization of flowering time regulatory gene *FLC* of *Paeonia ostii* 'Fengdan' [J]. Scientia Horticulturae, 2023, 310: 111748.

(责任编辑: 石春林)