

桃PEBP基因家族全基因组鉴定及桃TFL1基因功能分析

谭彬^{1,2a}, 魏鹏程^{1a}, 栗焕楠¹, 连晓东¹, 陈谭星¹,
郑先波^{1,2}, 程钧^{1,2}, 王伟^{1,2}, 王小贝^{1,2}, 冯建灿^{1,2*}

(¹河南农业大学园艺学院, 郑州 450002; ²河南省果树瓜类生物学重点实验室, 郑州 450002)

摘要:【目的】通过生物信息学分析明确磷脂酰乙醇胺结合蛋白(phosphatidyl ethanolamine-binding proteins, PEBP)家族在桃基因组中的分布、结构及进化特征, 并解析桃PEBP蛋白家族成员 *PpTFL1* 基因功能, 为后续利用分子手段调控桃开花时间提供理论依据。【方法】以拟南芥6个PEBP蛋白的氨基酸序列为参考序列, 检索桃基因组中的PEBP基因家族成员, 并对其进行生物信息学分析; 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法检测 *PpTFL1* 基因在桃不同组织中的表达量, 构建 *PpTFL1* 过表达载体转化拟南芥。【结果】从桃全基因组鉴定出5个PEBP蛋白家族基因, 均由4个外显子和3个内含子组成。5个桃PEBP蛋白中都包含PEBP保守基序和决定FT/TFL1功能的关键氨基酸位点; 桃PEBP蛋白基因家族可分为TFL1-like、MFT-like 和 FT-like 三个亚族。克隆获得 *PpTFL1* 基因编码序列(CDS), 片段大小为519 bp; qRT-PCR结果表明, *PpTFL1* 在‘中油桃14号’茎尖的表达量最高; 与野生型相比, 5个转 *PpTFL1* 的转基因拟南芥阳性株系均表现花期推迟; *PpTFL1* 在5个转基因植株中均有表达, 但不同单株间表达量有差异。【结论】*PpTFL1* 基因过表达导致拟南芥花期推迟, 表明 *PpTFL1* 基因参与花期调控。

关键词:桃; PEBP基因家族; TFL1; 基因功能; 开花时间

中图分类号:S662.1

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2020)10-1443-12

Genome-wide identification of PEBP gene family and functional analysis of TFL1 gene in peach (*Prunus persica*)

TAN Bin^{1,2a}, WEI Pengcheng^{1a}, LI Huannan¹, LIAN Xiaodong¹, CHEN Tanxing¹, ZHENG Xianbo^{1,2}, CHENG Jun^{1,2}, WANG Wei^{1,2}, WANG Xiaobei^{1,2}, FENG Jiancan^{1,2*}

(¹College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China; ²Henan Key Laboratory of Cucurbit Biology, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract:【Objective】The objective of this study was to analyze the distribution, structure and evolution of PEBP (phosphatidyl ethanolamine-binding proteins) protein family in peach (*Prunus persica*) genome by bioinformatics. Moreover, the function of *PpTFL1* gene belonging to PEBP family was also analyzed. This study provided the theoretical basis of regulation of flowering time by using molecular technique in peach.【Methods】The peach PEBP proteins were identified from peach whole genome in phytozome V12.1 database using six reported PEBP proteins in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Several sorts of informatic software, including GSDS, ProtParam, Expasy, DNAMAN, MEGA 6.0 and PlantCARE, were used to analyze the chromosome location, gene structure, physicochemical properties of protein, multiple sequence alignment, the phylogenetic tree and the *cis*-acting element of promoter in

收稿日期:2020-08-04 接受日期:2020-08-31

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD1000101);河南省现代农业产业技术体系建设专项(S2014-11-G02);河南省高等学校青年骨干教师培养计划(2019GGJS044);河南省高校科技创新团队支持计划(19IRTSTHN009);河南省重点研发与推广专项(科技攻关202102110048)

作者简介:谭彬,教授,博士,研究方向为果树生物技术与遗传育种。Tel:15890665701,E-mail:btan@henau.edu.cn。a为共同第一作者。

*通信作者 Author for correspondence. Tel:13703958518,E-mail:jcfeng@henau.edu.cn

PpPEBP gene family, respectively. The *PpTFL1* was cloned by RT-PCR and the relative expression of *PpTFL1* in different tissues of ‘Zhongyoutao 14’ was detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The overexpression vector of *PpTFL1* was constructed and introduced into *Arabidopsis* using floral dip method by *Agrobacterium*-mediated transformation. Different transgenic lines and the relative expression of *PpTFL1* and *AtLFY1* were verified by PCR and qRT-PCR, respectively. The flowering time and phenotype of five transgenic lines were observed.【Results】Five PEBP protein family genes were identified from the whole peach genome and unevenly distributed on chromosomes 2, 5, 6 and 7. PpPEBP proteins were all basic amino acids and hydrophobic proteins, four of which were unstable proteins except PpBFT. Five *PpPEBPs* owned similar gene structure, all composed of four exons and three introns. The PEBP consensus motif and critical amino acid [Tyr85(Y)/His88(H) and Gln140(Q)/Asp144(D)], which are responsible for the function of FT/TFL1, were present in five PpPEBPs. The results of evolutionary analysis with other seven plant species showed that PpPEBPs could be divided into three subclasses, including TFL1-like, MFT-like and FT-like. Two monocotyledonous plant species, rice (*Oryza sativa*) and maize (*Zea mays*) tend to be clustered together, while PpPEBPs was clustered together with another five dicotyledonous plant species, including apple (*Malus × domestica*), grape (*Vitis vinifera*), cotton (*Gossypium raimondii*), strawberry (*Fragaria ananassa*) and *Arabidopsis*. Meanwhile, the PpPEBPs and MdPEBPs were firstly clustered together due to peach and apple belonging to Rosaceae. The *cis*-acting elements of promoter analysis showed that five *PpPEBPs* promoters contained elements related to light signal, abscisic acid and gibberellin. And the number of light signal was the most. The results also indicated that PpPEBPs were affected by environmental conditions and several hormones, such as light, temperature, drought stress, gibberellin, abscisic acid, salicylic acid, etc.. The coding sequences (CDS) of cloned *PpTFL1* were 519 bp, which encoded 172 amino acids. The results of qRT-PCR showed that the expression of *PpTFL1* was the highest in apex of ‘Zhongyoutao 14’ and significantly higher than that in other tissues. While the expression of *PpTFL1* was the lowest and had no significant difference among flowers, young leaves and fruits. The tissue expression results indicated that *PpTFL1* expression was tissue-specific. Five transgenic *Arabidopsis* lines with *PpTFL1* verified by PCR were obtained. L1 and L2 delayed flowering for 19 d compared to wild type, while L3, L4 and L5 failed to bolt after continuous cultivation for 10 d. qRT-PCR analysis of different transgenic lines indicated that *PpTFL1* was indeed expressed in five transgenic plants, while the expression was significantly different among different plants. The relative expression of *PpTFL1* was the highest in L4 and significantly higher than that in other plants, which was the lowest in L1. Moreover, the relative expression of *AtLFY1* in WT was obviously higher than five transgenic lines. And the relative expression of *AtLFY1* in L5 was lower than other four transgenic lines, which had no obvious difference. Based on the results of phenotype and qRT-PCR analysis of different transgenic lines, it was suggested that *TFL* was a key gene involved in repressing flowering and maintaining the inflorescence meristem by preventing the expression of *LFY*.【Conclusion】Five *PpPEBPs* classified into TFL1-like, MFT-like and FT-like subclasses were identified from the peach genome. *PpTFL1* expression had tissue specificity. Overexpression of *PpTFL1* resulted in delayed flowering in *Arabidopsis*. It was suggested that *PpTFL1* was involved in the regulation of flowering, which provided the theoretical basis of regulation of flowering time by using molecular technique in peach.

Key words: Peach; PEBP gene family; *TFL1*; Gene function; Flowering time

高等植物的生命周期可以分为幼年期、成年营养期和成年生殖期三个时期。不同植物幼年期的长短不一,尤其是多年生木本果树的童期长短差别很大。童期是影响果树育种进程和早期丰产的重要因素^[1]。如何有效缩短童期、提早开花结果是多年生木本果树研究的一个热点。植物从幼年期向成年期的转变本质上是特异基因在特定时间和空间顺序表达的结果^[2],研究和解析这些基因的功能及调控模式对培育短童期种质具有重要意义。磷脂酰乙醇胺结合蛋白(phosphatidyl ethanolamine-binding proteins, PEBP)是一类进化上较为保守的蛋白,广泛存在于植物、动物和微生物中^[3]。在植物中,PEBP蛋白家族基因主要参与植物从营养生长向生殖生长的转变及植物的形态建成过程^[4-8]。目前PEBP蛋白家族基因鉴定已在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[3]、水稻(*Oryza sativa*)^[9]、棉花(*Gossypium hirsutum*)^[10]、大豆(*Glycine max*)^[11]、玉米(*Zea mays*)^[12]、苹果(*Malus × domestica*)^[13]、葡萄(*Vitis vinifera*)^[14]、草莓(*Fragaria ananassa*)^[15]、郁金香(*Tulipa gesneriana*)^[16]、百合(*Lilium longiflorum*)^[16]和月季(*Rosa chinensis*)^[17]等植物中完成。模式植物拟南芥中包含6个PEBP蛋白家族成员,分别为FT(FLOWERING LOCUS T)、TFL1(TERMINAL FLOWER1)、MFT(MOTHER OF FT and TFL1)、TSF(TWIN SISTER OF FT)、ATC(ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS)和BFT(BROTHER OF FT AND TFL1)^[3]。其中FT和TFL1基因在控制植物开花过程中的研究较多且相对较为透彻。尽管FT和TFL1蛋白的氨基酸相似度超过98%,这两个基因在控制植物开花过程中却发挥着相反的作用:FT通过介导光周期和温度信号进而启动植物开花,而TFL1抑制开花^[18-22]。桃(*Prunus persica*)是一种重要的落叶经济类果树,我国桃产量和面积均居世界首位。桃全基因组测序的完成为在全基因组水平进行家族基因鉴定和基因功能分析提供了可能^[23],对桃PEBP基因家族的鉴定及功能分析,有利于解析桃生长发育及开花的分子机制,并为利用这类基因调节桃开花时间、缩短育种周期等奠定理论基础。笔者利用生物信息学的方法对桃全基因组PEBP蛋白家族基因进行鉴定和基因结构分析,对PpPEBP蛋白进行保守基序和进化分析,并对其启动子顺式作用元件进行鉴定;同时对鉴定到的PpTFL1基因的组织表达特性及基因功能进行

分析,研究结果为后续利用分子手段调控桃开花及种质创制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 试验所用‘中油桃14号’(5 a生)采自河南农业大学毛庄科教园区桃种质资源圃。‘中油桃14号’采样部位分别为茎尖、花、胚、嫩叶、成熟叶、果实。于2017年4月5日采集整花,6月10日分别采集成熟果实、嫩叶、成熟叶及茎尖。所有样品采集后均用液氮速冻,随后带回实验室保存于-80℃冰箱,用于后续基因克隆及表达分析等试验。*PpTFL1*基因功能验证采用野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)。

1.1.2 菌株及载体 pClone007-T载体、大肠杆菌感受态DH5α、农杆菌菌株GV3101均购买于武汉擎科创新生物科技有限公司,购回后均保存于-80℃冰箱;过表达载体pSAK277由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 桃PEBP基因家族成员鉴定 从拟南芥TAIR数据库(<http://www.arabidopsis.org/>)下载拟南芥6个PEBP家族成员蛋白序列,分别为AtFT(AT1G65480)、AtTFL1(AT5G03840)、AtTSF(AT4G20370)、AtBFT(AT5G62040)、AtMFT(AT1G18100)和AtATC(AT2G27550),以6个拟南芥PEBP的氨基酸序列为参考序列,在Phytozome V12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中检索桃基因组中可能的PEBP基因家族成员。根据数据库给出的功能注释筛选PEBP基因并进行命名。

1.2.2 桃PEBP基因家族相关生物信息学分析

在Phytozome V12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)获取所有桃PEBP基因的物理位置、mRNA及内含子与外显子区域等信息;利用在线软件GSDS(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)绘制基因结构图;同时运用ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)在线网站预测各蛋白的氨基酸数、分子质量、理论等电点、不稳定指数、脂溶指数和总平均疏水性;采用DNAMAN进行蛋白多序列比对分析。分别下载单子叶植物中的水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)和双子叶植物中的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、苹果(*Malus × domestica*)、葡萄(*Vitis vi-*

nifera)、草莓(*Fragaria ananassa*)和棉花(*Gossypium raimondii*)的PEBP基因家族蛋白序列,使用MEGA 6.0软件构建系统进化树,采用邻接法(Neighbor-joining, NJ),进化标准Bootstrap值设置为1 000。利用PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对鉴定出的桃PEBP基因启动子上游2 kb区域的顺式作用元件进行分析。

1.2.3 *PpTFL1*基因克隆 根据获得的桃*PpTFL1*基因(Prupe.7G112600)的CDS序列(coding sequence, 编码序列),利用Primer premier 5.0软件设计PCR扩增特异性引物(表1,*PpTFL1*-F1和*PpTFL1*-R1),使用柱式植物总RNA抽提纯化试剂盒(上海生工)提取‘中油桃14号’叶片RNA,再用PrimeScriptTM RT reagent Kit试剂盒(北京宝日医生物技术)将其反转录为cDNA,以反转录得到的cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系为:

cDNA 1 μL, PrimeSTAR Max Premix(2×)12.5 μL, 上下游引物各1 μL, ddH₂O补足至25 μL。PCR反应程序为:98 °C 3 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 72 °C 40 s, 35个循环; 68 °C延伸3 min, 4 °C保存。PCR产物使用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒(上海生工)进行切胶回收。回收产物连接至pClone007-T载体后转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,具体步骤如下:(1)连接:pClone007 Blunt Vector 1 μL, PCR产物4 μL, 25 °C反应30 min;(2)转化:50 μL大肠杆菌DH5α感受态加入5 μL连接产物,轻弹混匀,冰上静置30 min, 42 °C热激75 s,立即置于冰上2 min,加入500 μL LB培养基, 220 r·min⁻¹, 37 °C活化1 h;(3)涂板:取200 μL菌液涂布于含氨苄青霉素的LB培养基上,37 °C倒置培养8~10 h;(4)阳性克隆检测:挑取单克隆进行PCR验证,将阳性菌落活化培养后送至北京擎科生物技术有限公司进行测序验证。

表1 *PpTFL1*克隆、表达及功能分析所用引物

Table 1 Primers used for cloning, expression and functional analysis of *PpTFL1*

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Application
<i>PpTFL1</i> -F1	ATGGCAAGAATATCTGAGCCTCTG	克隆
<i>PpTFL1</i> -R1	CTAGCGTCTCTAGCTGCCGTTT	Gene cloning
<i>PpTFL1</i> -F2	CCGCTCGAGATGGCAAGAACATCTGAGCCTCTG	表达载体
<i>PpTFL1</i> -R2	TGCTCTAGACTAGCGTCTCTAGCTGCCGTTT	Expression vector
<i>PpTFL1</i> -F3	GACAGATATTCCGGGCACACAG	表达分析
<i>PpTFL1</i> -R3	ACGGCAGCGACAGGAGGACC	Expression analysis
<i>PpGAPDH</i> -F	GACTTCATTGGTGACAGCAGGT	桃内参基因
<i>PpGAPDH</i> -R	CGGGATTAGAGAGTGGATGC	Constitutive control in peach
<i>AtLFY</i> -F	ATAACGGCAACGGAGGTAGTGGT	表达分析
<i>AtLFY</i> -R	TGTAACTCGCTCCTGATTTCTCGC	Expression analysis
<i>AtUBC</i> -F	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	拟南芥内参基因
<i>AtUBC</i> -R	TTGTGCCATTGAATTGAACCC	Constitutive control in <i>Arabidopsis</i>

1.2.4 pSAK277-35S::PpTFL1过表达载体构建 利用Primer premier 5.0设计含*Xho* I和*Xba* I酶切位点的引物*PpTFL1*-F2和*PpTFL1*-R2(引物序列见表1),以测序正确的pClone007-*PpTFL1*质粒为模板进行PCR扩增,PCR反应体系和反应程序同1.2.3。将PCR产物切胶回收、连接转化及克隆测序,步骤同1.2.3。将测序正确的阳性菌液提取质粒,使用NEB公司的限制性内切酶*Xho* I和*Xba* I对pSAK-277载体进行双酶切。酶切反应体系:质粒(pSAK-277载体)15 μL, *Xho* I 1 μL, *Xba* I 1

μL, Cut Smart Buffer 1 μL, ddH₂O补足至50 μL, 37 °C酶切4 h。酶切过的产物用SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒(上海生工)进行产物纯化,-20 °C保存。连接:使用NEB公司的T4连接酶进行连接反应。反应体系如下:pSAK-277载体纯化产物2 μL, 目的基因3 μL, T4 DNA Ligase Reaction Buffer(10×)2 μL, T4连接酶1 μL, ddH₂O补足至20 μL, 16 °C连接10~12 h。转化、涂板和阳性克隆检测同1.2.3。将检测无误的菌液提取质粒并于-20 °C保存。

1.2.5 *PpTFL1*基因组织特异性表达分析 对‘中油桃14号’的茎尖、花、胚、嫩叶、成熟叶、果实分别进行检测, 目的基因*PpTFL1*(*PpTFL1*-F3和*PpTFL1*-R3)和内参基因*GAPDH*引物见表1, 每个样品3次重复, 利用 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。使用荧光定量试剂盒为SYBR Select Master Mix(Applied Biosystems, Madrid, CA, USA), 平台为ABI PRISM 7500 FAST Sequence Detection System(Applied Biosystems, Madrid, CA, USA)。实时荧光定量PCR反应体系为: 模板(cDNA)1 μL, SYBR Select Master Mix 10 μL, 上下游引物各1 μL, 用超纯水补足至20 μL。反应条件: 50 °C 2 min; 95 °C 2 min; 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 40个循环。

1.2.6 *PpTFL1*遗传转化拟南芥及其鉴定分析 将成功构建的pSAK277-35S::*PpTFL1*过表达载体转化农杆菌GV3101菌株^[24], 将含有重组质粒的农杆菌接种于含有50 mg·L⁻¹壮观霉素和50 mg·L⁻¹利福平的YEB液体培养基中, 培养至菌液浑浊, 用重悬液(含2.2 g·L⁻¹的1/2MS盐、50 g·L⁻¹蔗糖和500 μL·L⁻¹表面活性剂Silwet L-77)重悬至菌液OD₆₀₀=0.8~1.0, 使用蘸花法转化拟南芥^[25], 待果荚成熟时收取T₀代种子。将T₀代拟南芥种子晾干后, 在超净工作台内用6.25%的次氯酸钠消毒3~4 min, 用无菌蒸馏水反复清洗4~6次, 之后播种于含有50 mg·L⁻¹卡那霉素的

MS培养基上。4 °C春化2 d后将其置于24 °C, 16 h光照/8 h黑暗条件下培养1周后进行移栽。当抗性植株生长至3周左右时, 采取拟南芥的叶片用CTAB法^[26]进行基因组DNA提取, 以DNA为模板进行PCR扩增, PCR反应体系和反应程序参照1.2.3。对经PCR检测呈阳性的植株开花时间进行观察; 以拟南芥*UBC*基因为内参^[27](引物见表1), 分别对野生型和阳性植株进行qRT-PCR分析(*PpTFL1*和*AtLFY1*), 反应体系和反应程序参照1.2.5。

1.3 数据统计与分析

利用SPSS 17.0软件对数据进行显著性分析, 采用Excel 2010进行数据统计和作图。

2 结果与分析

2.1 桃PEBP基因家族鉴定

通过比对分析, 从桃基因组中共鉴定出5个PEBP家族基因, 分别为*PpTFL1*(Prupe.7G112600)、*PpFT*(Prupe.6G364900)、*PpMFT*(Prupe.5G230900)、*PpBFT*(Prupe.2G291900)和*PpCEN*(Prupe.6G128400), 其中*PpBFT*、*PpMFT*和*PpTFL1*分别位于第2、5和7号染色体上, 而*PpCEN*和*PpFT*共同位于第6号染色体上。*PpTFL1*和*PpMFT*编码区长度相同, 均为519 bp; *PpFT*、*PpBFT*和*PpCEN*编码区长度相同, 均为525 bp(表2)。

表2 PpPEBP家族成员蛋白质理化性质
Table 2 Physicochemical property of PpPEBPs

基因 Gene	基因登录号 Gene ID	编码区长度 CDS/bp	氨基酸数量 Amino acid number	等电点 Theoretical pI	分子质量 Molecular mass/Da	不稳定指数 Instability index	脂溶指数 Aliphatic index	总平均疏水指数 Average of hydro- pathicity, GRAVY
<i>PpTFL1</i>	Prupe.7G112600	519	172	8.52	19 425.14	45.07	73.02	-0.292
<i>PpFT</i>	Prupe.6G364900	525	174	7.72	19 593.22	42.11	79.37	-0.352
<i>PpMFT</i>	Prupe.5G230900	519	172	8.79	18 813.74	41.63	84.30	-0.072
<i>PpBFT</i>	Prupe.2G291900	525	174	8.82	19 703.49	39.11	70.52	-0.430
<i>PpCEN</i>	Prupe.6G128400	525	174	9.52	19 543.42	40.43	79.43	-0.321

对鉴定到的5个桃PEBP家族成员的蛋白质理化性质进行分析, 结果显示, *PpTFL1*和*PpMFT*编码氨基酸数目为172; *PpFT*、*PpBFT*和*PpCEN*编码氨基酸数目均为174。PpPEBPs蛋白的等电点为7.72~9.52, 均为碱性氨基酸。蛋白分子质量为18 813.74~19 703.49 Da, 不稳定指数为39.11~45.07, 除*PpBFT*外(不稳定指数小于40, 为稳定蛋白), 其余4个均为不稳定蛋白。该家族成员总平均疏水指数均为

负值, 说明桃PEBP蛋白家族成员均为疏水蛋白(表2)。

2.2 桃PEBP基因家族基因结构

对鉴定到的5个桃PEBP家族基因进行基因结构分析, 结果显示, 5个*PpPEBP*基因结构相似, 均由4个外显子和3个内含子组成; 其差异主要在两端非编码区和内含子部分, 表明桃*PpPEBP*家族基因在进化上十分保守(图1)。

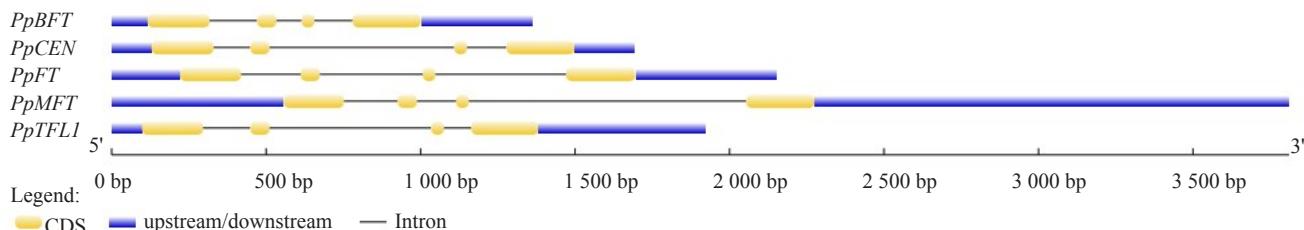


图 1 桃 PEBP 家族基因结构

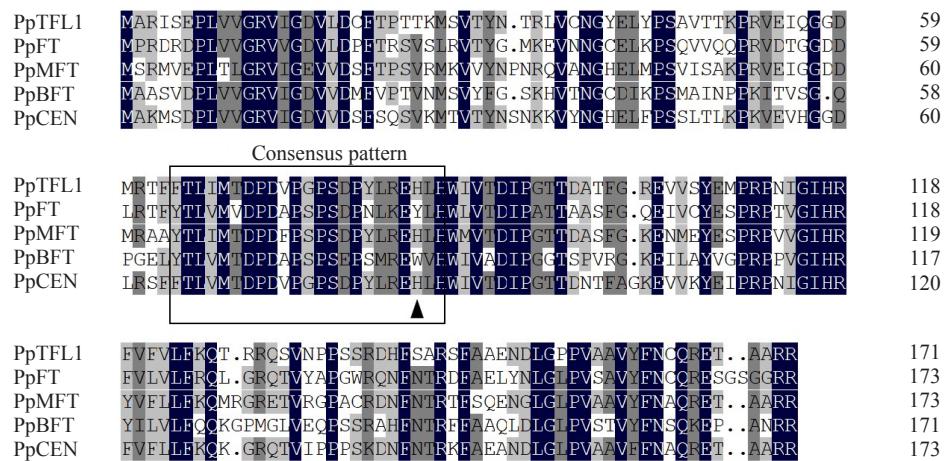
Fig. 1 The gene structure of PEBP family in *Prunus persica*

2.3 桃 PEBP 基因家族蛋白多序列比对和系统进化分析

对 5 个桃 PEBP 蛋白家族成员氨基酸序列进行比对分析(图 2),结果表明,桃 PEBP 蛋白中都存在 PEBP 保守基序。此外,决定 FT/TFL1 功能的关键氨基

酸位点有两个:一个是 Tyr85(Y)/His88(H),该位点在 PpTFL 中为 H,在 PpFT 中为 Y;另一个是 Gln140(Q)/Asp144(D),该位点在 PpTFL 中为 D,在 PpFT 中为 Q。

分别将 2 个单子叶物种(水稻和玉米)和 5 个双



Consensus pattern. PEBP 家族蛋白保守序列;三角形代表决定 FT/TFL 功能的关键氨基酸位点 Tyr85(Y)/His88(H) 和 Gln140(Q)/Asp144(D)。

Consensus pattern. The consensus pattern of PEBP family; Triangle represents amino acids Tyr85(Y)/His88(H) and Gln140(Q)/Asp144(D).

图 2 桃 PEBP 基因家族氨基酸序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of PEBP gene family in *Prunus persica*

子叶物种(拟南芥、苹果、葡萄、草莓和棉花)中的 PEBP 基因家族蛋白序列与桃中的 5 个 PEBP 蛋白序列结合构建系统进化树。结果发现,PEBP 蛋白基因家族可分为 TFL1-like、MFT-like 和 FT-like 三个亚族,其中 PpTFL1、PpCEN 和 PpBFT 同属于 TFL1-like 亚族,PpMFT 属于 MFT-like 亚族,PpFT 属于 FT-like 亚族。在这 3 个亚族中,TFL1-like 亚族成员最多,MFT-like 亚族成员数量最少。MFT-like 和 FT-like 亚族都分为两个簇,分别对应于单子叶植物和双子叶植物;TFL1-like 亚族中,同属于单子叶植物的水稻和玉米聚为一族,其中 PpTFL1 和 PpBFT 分别与同属于蔷薇科的苹果的 MdTFL1a/MdTFL1b 和 Md-

BFT 首先聚类在一起,类似的现象也存在于 PpFT、PpMFT 和 PpCEN 中。表明在每个亚族中,大多数具有相同植物科的物种倾向于在同一分支中分组(图 3)。

2.4 桃 PEBP 基因家族启动子元件分析

对桃 PEBP 蛋白基因家族的启动子顺式作用元件进行分析,结果表明,5 个 *PpPEBPs* 基因启动子中顺式作用元件数量为 15~27;*PpPEBPs* 基因的顺式作用元件中有光信号相关元件、干旱诱导相关元件、防御和应激相关元件、低温反应相关元件和分生组织相关元件,此外还发现与生长素、水杨酸、脱落酸和赤霉素相关的顺式作用元件,5 个 *PpPEBPs* 基因

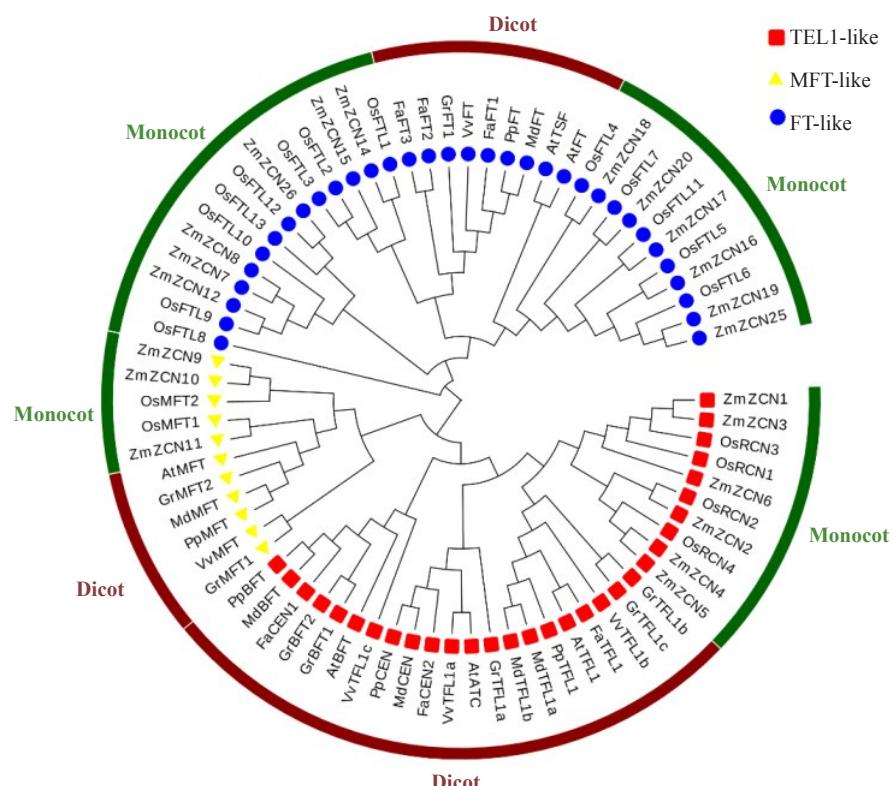


图 3 桃、苹果、拟南芥、草莓、葡萄、棉花、水稻和玉米 PEPB 蛋白基因家族系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of PEBP family in *Prunus persica* (Pp), *Malus × domestica* (Md), *Arabidopsis thaliana* (At), *Fragaria ananassa* (Fa), *Vitis vinifera* (Vv), *Gossypium raimondii* (Gr), *Oryza sativa* (Os) and *Zea mays* (Zm)

启动子中均包含光信号、水杨酸相关和赤霉素相关顺式作用元件,且光信号相关顺式作用元件数量最多(8~19),而与低温反应和生长素相关顺式作用元件最少(表3)。基于上述结果推测,PpPEBP蛋白基

因家族成员不仅受到光、温、干旱胁迫等环境条件的影响，还受到脱落酸、水杨酸和赤霉素等多种激素的影响，从而共同调控桃开花等相关过程的生长发育。

表 3 *PpPEBP* 基因启动子的顺式作用元件
Table 3 Predicted *cis*-elements in the promoter of the *PpPEBP*

基因 Gene	光信号相关 Circadian-related	干旱诱导相关 Drought induced-related	防御和应激相关 Defense is related to stress	低温反应相关 Low temperature-related	分生组织相关 Meristem-related	生长素相关 Auxin-related	水杨酸相关 Salicylic acid-related	脱落酸相关 Abscisic acid-related	赤霉素相关 Gibberellin-related
<i>TFL1</i>	8	2	1	-	-	-	1	2	1
<i>FT</i>	13	1	-	-	1	-	-	1	1
<i>MFT</i>	11	-	-	1	1	-	-	3	1
<i>BFT</i>	19	-	1	-	-	-	1	5	1
<i>CEN</i>	11	2	1	-	-	1	2	8	1

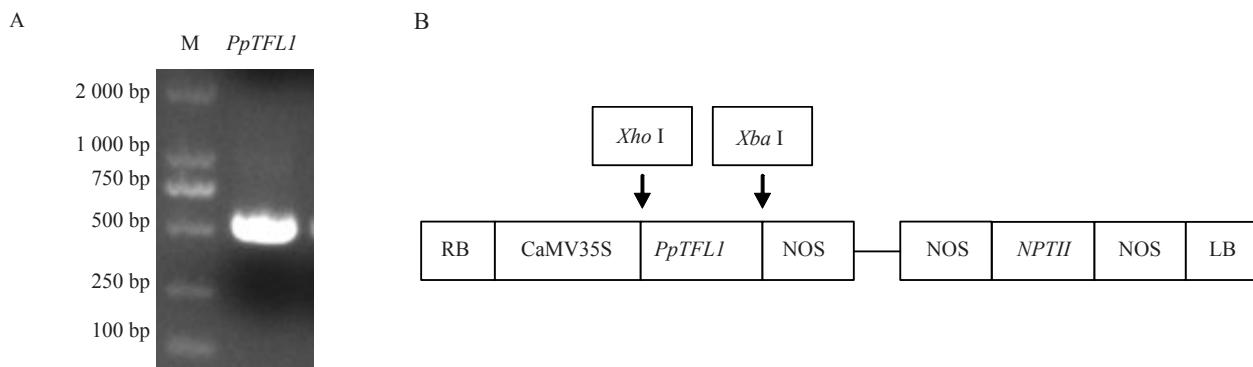
2.5 *PpTFL1* 克隆及过表达载体构建

以‘中油桃 14 号’叶片 cDNA 为模板, 经过 PCR 扩增, 获得一个 500~750 bp 大小的片段(图 4-A)。对此片段进行克隆测序比对, 确定此片段为 *PpTFL1* 基因, 其片段大小为 519 bp, 编码 172 个氨基酸。利用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Xba* I 将 *PpTFL1* 切下, 与相同酶切位点的 pSAK-277 载体连接后, 对获得的植物

过表达载体单克隆进行菌落PCR及测序验证,结果表明,*PnTFI1*基因整合到了pSAK277载体上(图4-B)。

2.6 *PpTFL1*组织表达分析

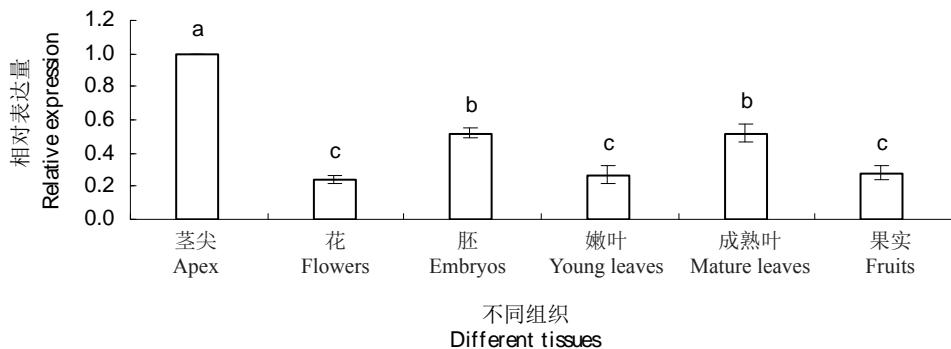
qRT-PCR 结果表明, *PpTFL1* 在桃茎尖、嫩叶、成熟叶、花、胚、果实中均有表达,但是表达量有差异(图5)。*PpTFL1* 在茎尖的表达量最高,且显著高于其他部位;其次为成熟叶和胚;在花、嫩叶和果实中



A. *PpTFL1* 的 PCR 扩增;B. pSAK277-35S::*PpTFL1* 载体图;M. DNA marker DL2000。
A. PCR amplification of *PpTFL1*; B. Vector map of pSAK277-35S::*PpTFL1*; M. DNA ladder DL2000.

图 4 桃 *TFL1* 克隆及过表达载体 pSAK277-35S::*PpTFL1*

Fig. 4 Cloning of *PpTFL1* and T-DNA of pSAK277-35S::*PpTFL1*



不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同。

Different small letters mean significant differences ($p < 0.05$). The same below.

图 5 桃 *TFL1* 在桃不同组织表达分析

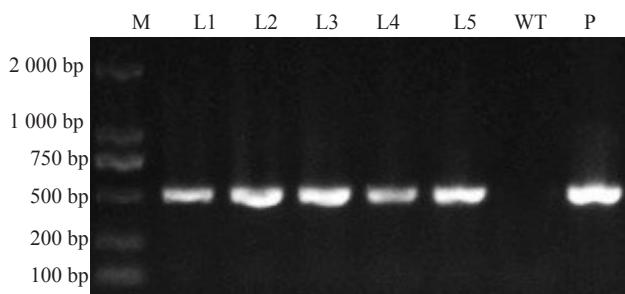
Fig. 5 Expression analysis of *PpTFL1* in different tissues of peach

表达量最低,且相互之间差异不显著,表明 *PpTFL1* 表达具有组织特异性。

2.7 *PpTFL1* 转基因拟南芥鉴定和表型分析

用含有 pSAK277-35S::*PpTFL1* 过表达载体的农杆菌菌液侵染野生型拟南芥花序,收取的种子经 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素抗性培养基筛选培养。提取培养 4 周的 kan 阳性拟南芥植株叶片 DNA,用 *PpTFL1* 基因的特异引物进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测,发现 5 株植株中均能够扩增出与质粒 DNA 相同大小的目的条带,而野生型拟南芥植株 DNA 和空白对照均没有扩增出相应的条带(图 6),证明 *PpTFL1* 基因已经整合到野生型拟南芥基因组中。

与野生型相比,5 个 35S::*PpTFL1* 的 T₀ 代拟南芥植株均表现花期延迟(图 7-A~B),其中单株 1(L1) 和单株 2(L2) 在常规培养条件下(16 h 光照+8 h 黑暗,26 °C)表现为能够抽薹开花,其开花时间较 WT 推迟 19 d;而单株 3(L3)、单株 4(L4) 和单株 5(L5)



L1~L5. 不同转基因植株;P. 质粒阳性对照;WT. 野生型拟南芥;M. DL2000 Marker。

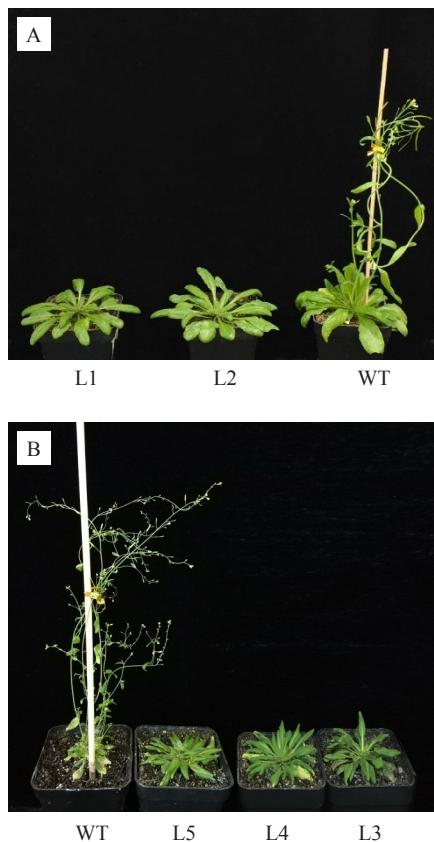
L1~L5. Different transgenic plants; P. Plasmid control; WT. Wild type *Arabidopsis*; M. DL2000 Marker.

图 6 *PpTFL1* 转基因拟南芥 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR identification of *PpTFL1* transgenic *Arabidopsis*

在常规培养条件下继续培养 10 d 后,仍不能抽薹开花;且与 WT 相比,三个转基因单株叶片狭长,且叶片数量多。

为了证明 *PpTFL1* 基因在转录水平是否表达,



L1~L5. *PpTFL1* 转基因植株; WT. 野生型拟南芥。

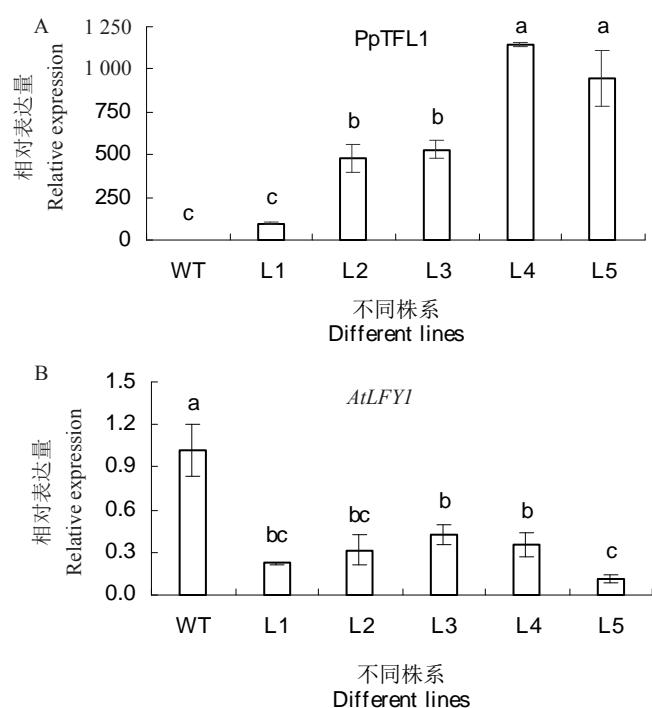
L1-L5. Transgenic *Arabidopsis* with *PpTFL1*; WT. Wild type *Arabidopsis*.

图 7 *PpTFL1* 转基因拟南芥表型
Fig. 7 Phenotype of transgenic *Arabidopsis* with *PpTFL1*

分别提取野生型和5个转基因拟南芥植株的RNA反转录成cDNA后进行qRT-PCR检测,结果表明,*PpTFL1*基因在5个转基因植株中均有表达,但不同单株间表达量有差异(图8-A)。*PpTFL1*基因在L4和L5的表达量最高,显著高于其他转基因植株;在L1的表达量最低。此外,对不同转基因单株中的*AtLFY1*基因的相对表达量进行qRT-PCR检测(图8-B),发现*AtLFY1*基因在5个转基因植株中的相对表达量显著低于WT,且在L5中的相对表达量最低,推测*PpTFL1*基因可能通过抑制*LFY1*基因的表达抑制拟南芥从营养生长向生殖生长的转变,进而导致转基因拟南芥花期推迟。

3 讨论

PEBP蛋白家族基因因其含有保守的乙醇胺结构域而得名,其在植物的成花转变、种子发育和萌发、花序结构形成等过程中发挥重要作用^[3]。不同



A. 不同转基因株系 *PpTFL1* 相对表达量分析; B. 不同转基因株系 *AtLFY1* 相对表达量分析; L1~L5. 不同转基因植株; WT. 野生型拟南芥。

A. The relative expression of *PpTFL1* in different transgenic lines;
B. The relative expression of *AtLFY1* in different transgenic lines; L1-L5. Different transgenic plants; WT. Wild type *Arabidopsis*.

图 8 *PpTFL1* 转基因拟南芥 qRT-PCR 分析

Fig. 8 The qRT-PCR analysis of *PpTFL1* in transgenic *Arabidopsis*

植物中PEBP蛋白家族基因数量差异较大。拟南芥中鉴定出6个PEBP蛋白家族基因,随后在单子叶植物玉米、水稻中鉴定出的PEBP蛋白家族基因分别为24和19个^[9,11-12],在双子叶植物大豆、棉花、苹果、葡萄、草莓、月季中的数量分别为16、9、7、5、6和8个^[10,12,13-15,17]。与大多数植物相似,本研究鉴定到的5个桃PEBP蛋白家族基因含有4个外显子和3个内含子,且第2个外显子和第3个外显子的长度相对保守;与大多数植物不同的是,月季的PEBP蛋白家族基因外显子数量为2~6个^[17],玉米的1个PEBP基因只含有第4号外显子,而另两个玉米的PEBP基因则由于1号内含子缺失导致1号和2号外显子融合^[12]。此外,对桃PEBP蛋白氨基酸序列分析结果表明,5个桃PEBP蛋白均具有保守的PEBP蛋白基序,决定FT/TFL1功能的关键氨基酸位点在PpFT和PpTFL的差异与拟南芥等物种相同,这两个关键氨基酸的差异可导致FT和TFL两个蛋白功能相反^[4]。

将5个桃PEBP蛋白与水稻、玉米、拟南芥、苹果、葡萄、草莓和棉花中的PEBP基因家族蛋白构建系统进化树,结果表明,桃中的PEBP蛋白家族基因分为FT-like(PpFT)、TFL1-like(PpTFL1、PpCEN和PpBFT)和MFT-like(PpMFT)3个亚家族,与在拟南芥^[2]、玉米^[12]、水稻^[9]、苹果^[13]、葡萄^[14]和棉花^[10]中的分类结果一致,但不同亚族所包含基因数量不同。此外,与不同植物系统进化分析的结果表明,TFL1-like亚族分为3个簇,其中2个对应单子叶植物,另外1个对应双子叶植物;MFT-like和FT-like亚族都分为两个簇,分别对应于单子叶植物和双子叶植物;且同属于蔷薇科的桃和苹果的PEBP家族成员首先聚类在一起,表明桃和苹果的PEBP蛋白家族基因具有较高的相似性和保守性。

本研究发现,桃PEBP蛋白家族基因启动子中具有一些相同的顺式作用元件(光信号相关、赤霉素相关和脱落酸相关),此外,不同PpPEBPs基因启动子中还包含有低温反应相元件、分生组织相关元件等其他顺式作用元件。温度改变(高温和低温)导致猕猴桃(*Actinidia chinensis*)*AcFT*和*AcCEN*表达量改变^[19];在野草莓(*Fragaria vesca*)^[21]中,长日照处理使*FvTFL1*表达被激活,而短日照处理则抑制*FvTFL1*表达进而诱导野草莓开花。光周期和温度等外界环境的变化导致植物PEBP蛋白家族基因表达被激活或抑制,暗示植物PEBP蛋白家族基因通过相应外界环境的变化进而调控植物的开花等生长发育过程。

本研究获得的5个过表达*PpTFL1*基因的转基因拟南芥单株均表现花期推迟现象,这与苹果(*Malus × domestica*)^[28-30]、梨(*Pyrus communis L.*)^[31]、毛竹(*Bambusa oldhamii*)^[32]、橡胶树(*Hevea brasiliensis*)^[33]和梅(*Prunus mume Sieb. Et Zucc.*)^[34]等木本植物中的*TFL1*基因功能相似。过量表达苹果*MdTFL1*基因的转基因拟南芥植株与过表达*AtTFL1*基因的转基因拟南芥植株表型相似,开花明显晚于野生型拟南芥^[28],而沉默*MdTFL1*基因导致转基因苹果童期缩短,在移入温室内8个月开花^[30];沉默梨*PcTFL1*基因导致梨在转入温室内1~8个月开花且能连年开花^[31];毛竹*BoTFL1*基因在花芽中的表达量是叶芽中的3.5倍,与野生型拟南芥相比,过表达*BoTFL1*基因的转基因拟南芥植株花期推迟5~9 d,且花芽和花瓣的形态发生改变,同时功能互补实验

表明*BoTFL1*基因的过表达可以完全回复拟南芥*tf1*突变体表型,表明毛竹*BoTFL1*基因在调控毛竹开花时间和花型方面发挥重要作用^[32];过表达橡胶树*HbTFL1-1*、*HbTFL1-2*和*HbTFL1-3*的转基因拟南芥均表现花期推迟现象,其中转*HbTFL1-3*的拟南芥植株变矮同时叶片卷曲^[33];过表达梅*PmTFL1*的转基因拟南芥植株均出现花期推迟现象,其中高表达*PmTFL1*的植株开花最晚,在播种70 d后开花^[34]。本研究中*PpTFL1*基因在不同转基因拟南芥单株间相对表达量有显著差异,且表达量高的L3、L4和L5单株开花时间明显晚于L1和L2,推测不同转基因单株开花时间差异可能是由于不同单株间*PpTFL1*基因表达量差异导致。过量表达柑橘(*Citrus sinensis*)*CsTFL*基因的拟南芥表现推迟开花时间,且柑橘的童期与*CsTFL*的表达呈正相关^[35]。在拟南芥中,*TFL1*基因主要通过抑制*FT*下游*LEAFY*等基因的表达抑制拟南芥茎端分生组织从营养生长向生殖生长的转变,推迟拟南芥开花^[36]。本研究中5个转基因单株中*AtLFY1*基因的表达量显著低于WT,据此推测外源*PpTFL1*基因的转入抑制了*AtLFY1*基因的表达进而导致拟南芥开花推迟。

4 结 论

从桃基因组中鉴定出5个PEBP蛋白家族基因,均包含4个外显子和3个内含子,可分为TFL1-like、MFT-like和FT-like三个亚族。过表达*PpTFL1*导致拟南芥花期推迟,不同转基因单株开花时间差异与不同单株间*PpTFL1*基因表达量差异有关。*PpTFL1*在花期调控中起重要作用。

参考文献 References:

- [1] 李长龙,李洋,王晶,闫国华,张晓明,段续伟,张开春,李天忠. *TFL1*基因在甜樱桃童期向成年阶段转变过程中的作用[J]. 园艺学报,2015,42(6):1031-1039.
LI Changlong, LI Yang, WANG Jing, YAN Guohua, ZHANG Xiaoming, DUAN Xuwei, ZHANG Kaichun, LI Tianzhong. Functional study of *TFL1* genes in stage transformation in sweet cherry[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(6): 1031-1039.
- [2] 武维华. 植物生理学(3版)[M]. 北京:科学出版社,2018.
WU Weihua. Plant physiology (Version 3)[M]. Beijing: Science Press, 2018.
- [3] KARLGREN A, GYLLENSTRAND N, KALLMAN T, SUNDSTROM J F, MOOTE D, LASCOUX M. Evolution of the PEBP gene family in plants: functional diversification in seed plant

- evolution[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(4): 1967-1977.
- [4] YASUSHI K, HIDETAKA K, KOJI G, MASAKI I, ARAKIL T. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals[J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1960-1962.
- [5] PRZEYSLAW P, YVETTE E, BRENDAN L, LAWRENCE D, HARDER E C. Evolution and development of inflorescence architectures[J]. *Science*, 2007, 316(5830): 1452-1456.
- [6] SHALIT A, ROZMAN A, GOLDSHIMID A, TOLDSHIMIDT A. The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(20): 8392-8397.
- [7] LIU Y Y, YANG K Z, WEI X X, WANG X Q. Revisiting the phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) gene family reveals cryptic FLOWERING LOCUS T gene homologs in gymnosperms and sheds new light on functional evolution[J]. *New Phytologist*, 2016, 212(3): 730-744.
- [8] MORAES T S, DORNELAS M C, MARTINELLI A P. FT/TFL1: Calibrating plant architecture[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 97-102.
- [9] CHARDON F, DAMERVAL C. Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(5): 579-590.
- [10] 李超, 张彦楠, 刘焕龙. 亚洲棉和雷蒙德氏棉PEBP家族基因的鉴定及该家族基因在陆地棉组织中表达分析[J]. 作物学报, 2015, 41(3): 394-404.
LI Chao, ZHANG Yannan, LIU Huanlong. Identification of PEBP gene family in *Gossypium arboreum* and *Gossypium raimondii* and expression analysis of the gene family in *Gossypium hirsutum*[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2015, 41(3): 394-404.
- [11] 张礼凤, 徐冉, 张彦威, 戴海英, 王彩洁, 李伟, 张军. 大豆PEBP基因家族的初步分析[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(1): 151-157.
ZHANG Lifeng, XU Ran, ZHANG Yanwei, DAI Haiying, WANG Caijie, LI Wei, ZHANG Jun. Analysis of the PEBP gene family in soybean (*Glycine max*)[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(1): 151-157.
- [12] DANILEVSKAYA O N, MENG X, HOU Z, ANANIEV E V, SIMMONS C R. A genomic and expression compendium of the expanded PEBP gene family from maize[J]. *Plant Physiology*, 2008, 146(1): 250-264.
- [13] MIMIDA N, KOMORI S, SUZUKI A, WADA M. Functions of the apple TFL1/FT orthologs in phase transition[J]. *Scientia Horticulturae*, 2013, 156: 106-112.
- [14] CARMONA M J, CALONJE M, MARTINEZ Z J M. The FT/TFL1 gene family in grapevine[J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63(5): 637-650.
- [15] NAKANO Y, HIGUCHI Y, YOSHIDA Y, HISAMATSU T. Environmental responses of the FT/TFL1 gene family and their involvement in flower induction in *Fragaria ananassa*[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 177: 60-66.
- [16] LEEGGANGERS H, ROSILIO B T, BIGAS N J, RUBIN N, VAN D A D J, NUNEZ D C G F F. *Tulipa gesneriana* and *Lilium longiflorum* PEBP genes and their putative roles in flowering time control[J]. *Plant Cell Physiology*, 2018, 59(1): 90-106.
- [17] 吴高琼, 李淑斌, 王炜佳, 张颖, 唐开学, 王其刚. 中国古老月季‘月月粉’FT/TFL1基因的鉴定与表达分析[J]. 西北植物学报, 2019, 39(10): 1741-1749.
WU Gaoqiong, LI Shubin, WANG Weijia, ZHANG Hao, TANG Kaixue, WANG Qigang. Identification and expression analysis of the FT/TFL1 genes in *Rosa chinensis* ‘Old Blush’[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica*, 2019, 39(10): 1741-1749.
- [18] IGOR K, VIPULA K S, JU H A, NICOLE D, SIOUX K C, JASMINE T, NGUYEN J T, JOANNE C, MARIA J, HARRISON M J, DETLEF W. Activation tagging of the floral inducer FT[J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1962-1965.
- [19] VARKONY G E, MOSS S M, VOOGD C, WANG T, PUTTERILL J, HELLENSELL R P. Homologs of *FT*, *CEN* and *FD* respond to developmental and environmental signals affecting growth and flowering in the perennial vine kiwifruit[J]. *New Phytologist*, 2013, 198(3): 732-746.
- [20] SOHN E J, ROJAS P M, PAN S, CARTER C, SERRANO M A, MADUENO F. The shoot meristem identity gene *TFL1* is involved in flower development and trafficking to the protein storage vacuole[J]. *Proceedings of National Academy of USA*, 2007, 104(47): 18801-18806.
- [21] KOSKELA E A, MOUHU K, ALBANI M C, KUROKURA T, RANTANEN M, SARGENT D J. Mutation in *TERMINAL FLOWER1* reverses the photoperiodic requirement for flowering in the wild strawberry *Fragaria vesca*[J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(3): 1043-1054.
- [22] ZHANG X, AN L, NGUYEN T H, LIANG H, WANG R, LIU X. The cloning and functional characterization of peach *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* homologous genes *PpCO* and *PpFT*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): 1-16.
- [23] VERDE I, ABBOTT A G, SCALABRIN S, JUNG S, SHU S, MARRONI F, ZHEBENTYAYEVA T, DETTORI MT, GRIMWOOD J, ROKHSAR D S. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(5): 487-494.
- [24] 吕西洋, 崔百明, 段琛, 陈英杰, 黄先忠, 郑银英. 棉花DELLA蛋白GhGAI4a基因在拟南芥中功能初步分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2013, 31(5): 529-535.
LÜ Xiyang, CUI Baoming, DUAN Chen, CHEN Yingjie, HUANG Xianzhong, ZHENG Yinying. Functional analysis of cotton DELLA protein GhGAI4a gene in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science Edition)*, 2013, 31(5): 529-535.

- [25] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [26] CLARKM M S. 植物分子生物学实验手册[M]. 顾红雅,瞿礼嘉译. 北京:高等教育出版社,1998.
- CLARKM M S. Plant molecular biology-a laboratory manual [M]. GU Hongya, QU Lijia, Transl. Beijing: Higher Education Press, 1998.
- [27] 李华盛,鹿金颖,潘毅,刘敏. 航天环境对拟南芥幼苗内参基因表达稳定性的影响[J]. 航天医学与医学工程,2014,27(1): 50-53.
- LI Huasheng, LU Jinying, PAN Yi, LIU Min. Effect of space environment on the stability of reference gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. Space Medicine and Medical Engineering, 2014, 27(1): 50-53.
- [28] NOBUHIRO K, MASATO W. *MdTFL1*, a *TFL1-like* gene of apple, retards the transition from the vegetative to reproductive phase in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Science*, 2005, 168(1): 95-104.
- [29] NAOZUMI M, NOBUHIRO K, TAKANORI U, MEGUMI I, YOSHIMICHI H, HIROSHI I, SHIGEKI M, KAZUYUKI A. Four *TFL1_CEN-Like* genes on distinct linkage groups show different expression patterns to regulate vegetative and reproductive development in apple[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50(2): 394-412.
- [30] NOBUHIRO K, Hiroshi I, SAE T, KAZUYUKI A. Antisense expression of *MdTFL1*, a *TFL1-like* gene, reduces the juvenile phase in apple[J]. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 2006, 131(1): 74-81.
- [31] FREIMAN A, SHLIZERMAN L, GOLOBOVITCH S, YABLOVITZ Z, KORCHINSKY R, COHE Y. 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): 1239-1251.
- [32] ZENG H Y, LU Y T, YANG X M, XU Y H, LIN X C. Ectopic expression of the *BoTFL1-like* gene of *Bambusa oldhamii* delays blossoming in *Arabidopsis thaliana* and rescues the *tfl1* mutant phenotype[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14 (3): 9306-9317.
- [33] BI Z, TAHIR A T, HUANG H, HUA Y. Cloning and functional analysis of five *TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS-like* genes from *Hevea brasiliensis*[J]. *Physiologia Plantarum*, 2019, 166(2): 612-627.
- [34] ESUMI T, KITAMURA Y, HAGIHARA C, YAMANE H, TAO R. Identification of a *TFL1* ortholog in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)[J]. *Scientia Horticulturae*, 2010, 125(4): 608-616.
- [35] 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 Physiology*, 2004, 135 (3): 1540-1551.
- [36] WICKLAND D P, HANZAWA Y. The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* gene family: functional evolution and molecular mechanisms[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(7): 983-997.