

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.01.013

# 馥郁滇丁香 *LgFKF1* 基因的克隆及 节律表达分析

万友名, 马 宏, 刘雄芳, 张 序, 安 静, 刘秀贤, 李正红\*

(中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

**摘要:** [目的] 研究馥郁滇丁香 *LgFKF1* 基因的结构特点及其在特异组织中的节律表达特征, 探索其在成花调控过程中的作用。[方法] 采用 RACE 技术克隆获得馥郁滇丁香 *LgFKF1* 基因的 cDNA 全长序列, 利用生物信息学方法对获得的基因核苷酸序列及编码蛋白质序列进行分析, 利用 qRT-PCR 技术对特异组织的节律表达模式进行分析。[结果] 序列分析表明: *LgFKF1* 基因 cDNA 全长为 2 271 bp, 开放阅读框为 1 917 bp, 编码一个 638 个氨基酸的蛋白质; 推导的氨基酸序列与扁果树、软枝黄蝉、纳塔尔倒吊笔、马利筋的 *FKF1* 蛋白具有较高同源性, 达 92.59%; 预测 *LgFKF1* 蛋白属于不稳定的亲水性蛋白, 定位在细胞核, 无信号肽和跨膜区; 结构主要由无规则卷曲结构、 $\alpha$  螺旋结构、扩展长链和  $\beta$ -转角构成; 遗传进化关系与扁果树最亲近。qRT-PCR 分析表明: *LgFKF1* 在诱导光周期下处理 7 d 时较非诱导光周期下的表达量高, 而诱导光周期下处理 10 d 后其表达量则低于非诱导光周期的表达。一天中, *LgFKF1* 在各组织中均有表达, 且以叶片中的相对表达量较高。*LgFKF1* 因组织不同在不同的时间呈现出单峰和双峰表达, 其中, 根、芽及花蕾中均在夜间 23:00 出现单峰表达; 茎、叶及开放的花朵中在不同时间出现双峰表达, 茎在晚上 20:00 和凌晨 5:00, 叶在凌晨 2:00 和早上 8:00, 开放花朵在夜间 23:00 和凌晨 5:00。[结论] 从馥郁滇丁香中克隆获得了 *LgFKF1* 基因, 其编码的蛋白序列与其它植物的 *FKF1* 具有较高的同源性。*LgFKF1* 基因的表达受光周期影响, 在诱导光周期下, 不同的组织呈现出不同的表达模式, 其中, 仅叶片中的 1 个表达峰值出现在白昼, 其余组织中的表达峰值均出现在夜间。在各组织中, 叶片中的表达量较高。*LgFKF1* 基因的特异组织节律表达有助于为其生物学功能的进一步研究提供参考依据。

**关键词:** 馥郁滇丁香; *LgFKF1* 基因; 克隆; 节律表达

**中图分类号:** S718.46

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2020)01-0099-08

植物可通过感知光周期的昼夜变化和季节日照时间的长短, 来调节启动开花的时间<sup>[1-2]</sup>, 这是内部节律基因与外部环境信号参与时间调控机制相互作用的结果<sup>[3]</sup>。*FKF1* 是在研究晚花突变体时发现的蓝光特异性光受体基因<sup>[4-5]</sup>, 它受昼夜节律钟和光信号调控, 位于开花促进基因 *CO*、*FT* 的上游<sup>[3]</sup>。在蓝光介导下, *FKF1* 能与 GI 蛋白发生互作形成 *FKF1*-GI 复合物, 该复合物能通过泛素化途径的

26S 蛋白酶复合体降解 *CO* 的抑制因子 CDF1, 进而正向调节 *CO* 的转录水平<sup>[4, 6-7]</sup>; 另外, *FKF1* 还能与开花促进基因 *CO* 直接互作并稳定 *CO* 的表达<sup>[8-9]</sup>。因此, 在光周期途径中, *FKF1* 在应答光信号、节律信号以及调控下游开花促进基因 *CO* 上起着重要的作用。目前, 有关 *FKF1* 基因的研究主要集中在 1 年生草本植物中, 而在多年生木本植物中的研究相对较少。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

收稿日期: 2019-04-18 修回日期: 2019-06-22

基金项目: 云南省科技厅重点研发项目 (2018BB012); 云南省技术创新人才培养对象 (2016HB007); 国家林业局林业公益性行业科研专项经费面上项目 (201404705); 中国林科院基本科研业务费专项项目 (CAFYBB2017MB014)

\* 通讯作者: 李正红, 研究员, 博士生导师, 主要从事野生花卉资源收集、保存与利用。E-mail: LZH4949@163.com

*na* (Linn.) Heynh.)<sup>[5,7]</sup>、大豆 (*Glycine max* (Linn.) Merr.)<sup>[10]</sup> 中, *fkf1* 突变体会延迟开花, 而过量表达则引起提前开花。在水稻 (*Oryza sativa* Linn.) 中, *FKF1* 的调控功能仍不清楚, 它不受光周期影响就能促进开花, 可能是一种自主的成花启动因子, 也可能是通过其特异的功能来调控水稻特异基因 *Ehd2*、*Ghd7*、*Ehd1* 的表达<sup>[11]</sup>。因此, *FKF1* 基因在不同光周期类型的植物中存在功能差异。

馥郁滇丁香 (*Luculia gratissima* (Wall.) Sweet) 属于典型的短日照多年生木本植物<sup>[12]</sup>, 是一种具有较高观赏价值的木本花卉, 既可盆栽又可园林配置<sup>[13]</sup>。本课题组在前期的转录组测序中鉴定出馥郁滇丁香 *FKF1* 的同源基因, 并发现其相对于非诱导光周期, 在诱导光周期下呈显著下调表达, 这与报道的草本植物的光周期成花表达模式相反。本研究根据转录组的信息, 利用 RACE 技术克隆获得 *LgFKF1* 基因的 cDNA 全长序列, 并对其进行生物信息学分析; 同时, 利用 qRT-PCR 对 *LgFKF1* 在特异组织中的节律表达进行分析, 旨在为进一步研究 *FKF1* 的生物学功能提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料准备

以馥郁滇丁香品种‘香妃’扦插苗为试材。于 2016 年 12 月 15 日扦插, 当生根的幼苗新长出 2~3 个茎节时, 去除所有植株的顶端分生组织, 并移入非诱导光周期 (22:00~2:00 暗中断补光, 光照强度为  $1.8 \sim 2.3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 的温室中培养; 同时, 在自然环境中放置部分植株设为对照。当对照植株出现花芽分化后, 开始进行诱导光周期 (光照/黑暗为 10 h/14 h) 处理。

### 1.2 材料处理

1.2.1 基因克隆 根据前期的转录组测序结果为依据, 选取诱导光周期处理 7、10、13、19 d 4 个时间点取样。每个时间点随机选 10 株单株, 每个单株取主枝上的 1 个芽, 共 10 个芽, 采集的样品液氮速冻后 -80℃ 保存。等量混合 4 个时间点的样品进行 cDNA 全长序列克隆。

1.2.2 光周期表达分析 参照万友名等<sup>[12]</sup> 的方法, 将非诱导光周期中培养的植株移入诱导光周期中进行诱导处理。自处理开始, 每隔 3~5 d 随机选取 10 株植株, 每株采集健壮主枝上的顶芽

1 个, 共 10 个芽混合为 1 个样, 重复 3 次。与此同时, 每次都采用相同的方法在非诱导光周期中采集样品设为对照。每次在上午 9:00—11:30 采样。采样自诱导光周期处理开始至花蕾现蕾。所有样品采集后液氮速冻并保存在 -80℃ 冰箱中用于 qRT-PCR 分析。然后, 根据万友名等<sup>[12]</sup> 的形态学观察结果, 选取诱导光周期处理 7 d (未分化期)、10 d (总苞原基分化期)、13 d (花序原基分化期)、19 d (小花原基分化期) 4 个时间点的样品及其对照样品进行 qRT-PCR 分析, 共 24 个样。

1.2.3 特异组织表达分析 于‘香妃’的盛花期, 选取一天 24 h, 从早 8:00 开始, 每隔 3 h 从种植条件一致的同一批试验材料中分别采集根 (T1)、茎 (T2)、叶 (T3)、营养芽 (T4)、着色期花蕾 (T5)、露白期花蕾 (T6) 及开放的花朵 (T7) 1 次, 每次每个组织取 300~500 mg, 重复 3 次。所有样品采集后立即液氮速冻并保存于 -80℃ 冰箱中用于 qRT-PCR 分析。

### 1.3 RNA 的提取及反转录

样品经液氮研磨后, 按照生工生物工程 (上海) 公司提供的柱式植物总 RNA 抽提纯化试剂盒 (SKB8661) 说明书操作提取总 RNA。利用第一链 cDNA 合成试剂盒 (RevertAid Premium Reverse Transcriptase) (Thermo Scientific™ EP0733) 按说明书操作将提取的 RNA 反转录成 cDNA。

### 1.4 基因克隆

以转录组测序结果为基础, 经信息分析获得与 *FKF1* 功能相似的 Unigene 片段, 并命名为 *LgFKF1*。采用 Primer premier 5.0 软件设计引物 (表 1)。然后, 以合成的 cDNA 为模板, 利用 LA Taq (TaKaRa DRR02AG) 进行 PCR 扩增, 具体方法按照说明书操作。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 33 个循环, 72℃ 修复延伸 7 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。采用柱式 DNA 胶回收试剂盒 (生工 B518131) 回收目的条带。回收的目的片段连接 pGM-T 载体后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 37℃ 过夜培养, 筛选阳性克隆送至生工生物工程 (上海) 公司测序。

### 1.5 生物信息学分析

克隆拼接获得的序列经 NCBI 的 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析翻

表 1 *LgFKF1* 克隆及 qRT-PCR 的引物Table 1 Primers for *LgFKF1* cloning and qRT-PCR

引物 primer	序列 sequence
5 <sup>'</sup> adaptor	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGCC CCCCCCCCCCC
3 <sup>'</sup> adaptor	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTT TTTTTTTTTTTTTTTT
5-3'outer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAAC
5-3'inner	GCTACGTAACGGCATGACAGTG
FKF1-F1	TACATGAGCTATGCTTAGCCAGCAGACAG
FKF1-F2	ACAGCTTAAAGCCACGCTACGTCTTCAA
FKF1-R1	GCTCCAAAGCATCCGATACCACGA
FKF1-R2	GCGTCGTAATGGGATACAAGAAATTTCTCA
FKF1-RT1	GTAACCTGGATATGACGCAC
FKF1-RT2	TGTATCCCAATTATGTGTGTA
Actin F	CATAGTTGAACCACCCTGAGC
Actin R	TGCCCGATGGACAAGTTATT
FKF1 F	CGTGGTATCGGATGCTTTG
FKF1 R	CTGAGCACGAGGGTCTCTAAAT

译成氨基酸序列, 然后, 通过 BLAST (<http://b-last.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行蛋白序列的同源性比对, 同时, 选取部分相似度高的同源蛋白序列利用 DNAMAN5.1 软件进行同源性比对; 利用 ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 在线工具软件预测分析蛋白的理化性; 利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>) 进行亲/疏水性预测分析; 利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白的信号肽; 利用 PROTPROT (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) 建立蛋白跨膜结构模型; 利用 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)) 在线软件分析蛋白的二级结构组成; 利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 同源建模方法得到蛋白的三维预测模型; 利用 ProtComp9.0 (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>) 进行亚细胞定位预测; 利用 MEGA 5.0 软件构建蛋白系统进化树。

## 1.6 基因 qRT-PCR 分析

总 RNA 的提取及 cDNA 反转录同上, 引物详见表 1。以 cDNA 为模板, *LgACT* 为内参基因, 在 LightCycler480 II 上按照罗氏公司的 SG Fast

qPCR Master Mix (2×) (B639271) 说明书进行 qRT-PCR 反应。反应体系为: SybrGreen qPCR Master Mix (2×) 10 μL, 上、下游引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 0.4 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.2 μL, cDNA 模板 2 μL, 总体积共 20.0 μL。反应条件为: 95℃ 预变性 90 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 20 s, 40 个循环。所有样品反应设 3 次技术重复。

利用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算基因的表达量。采用 Excel2010 和 SPSS16.0 进行数据整理及绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因克隆

将转录组获得的 *LgFKF1* 核心序列与克隆的 5xRACE 序列、3xRACE 序列 (图 1) 比对拼接后, 获得 *LgFKF1* 的 cDNA 全长序列。利用 DNAMAN5.1 软件对序列分析表明: 该序列片段大小为 2 271 bp, A、C、G、T 碱基含量分别为 26.9%、18.5%、26.1%、28.5%。经 NCBI 的 ORF Finder 软件分析, *LgFKF1* 基因开放阅读框为 1 917 bp, 编码一个 638 个氨基酸的蛋白质 (图 2A)。将翻译成氨基酸的序列用 BLASTp 比对表明: 该序列与扁果树 (*Kaliphora madagascariensis* AML77708.1)、软枝黄蝉 (*Allamanda cathartica* AML77851.1)、纳塔尔倒吊笔 (*Wrightia natalensis* AML76886.1)、马利筋 (*Asclepias curassavica* AML76817.1) 的 FKF1 一致性较高, 达 92.59% (图 2B)。

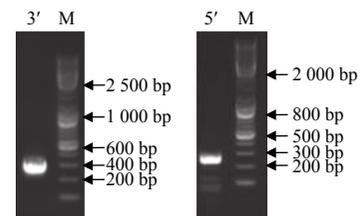


图 1 馥郁滇丁香 *LgFKF1* 基因的 PCR 扩增  
Fig. 1 PCR amplification of *LgFKF1* in *L. gratissima*

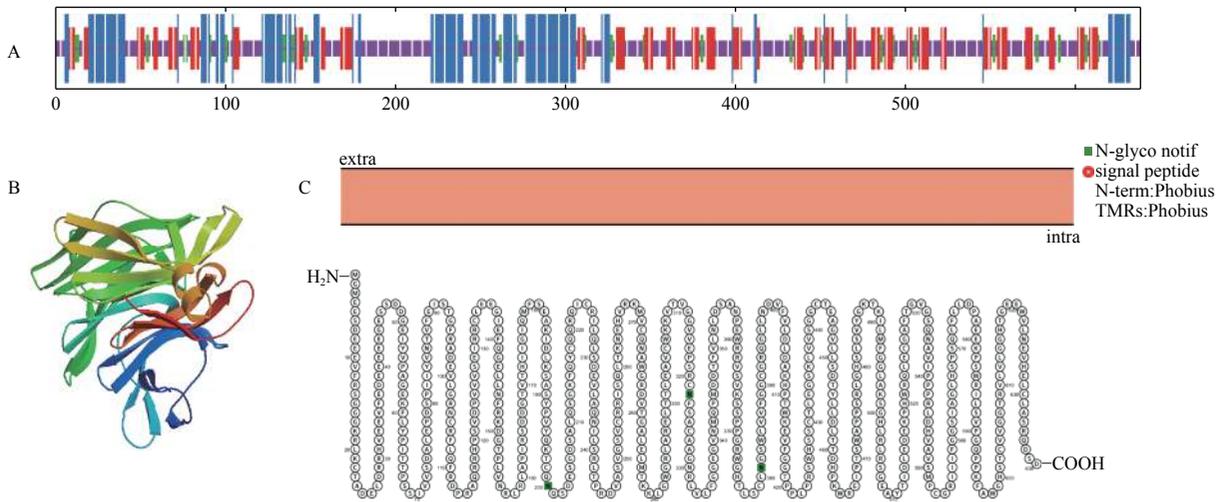
### 2.2 蛋白序列分析

在线工具 ProtParam 蛋白理化性分析表明: 蛋白质分子式为 C<sub>3101</sub>H<sub>4889</sub>N<sub>881</sub>O<sub>942</sub>S<sub>28</sub>, 相对分子量为 70.483 kD, 等电点 (pI) 5.63, 不稳定指数为 49.94, 推测属于不稳定蛋白, 酸性氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 84, 碱性氨基酸残基总数 (Arg+Lys) 为 69, 平均亲水系数 (GRAVY) 为 -0.294, 脂肪系数为 83.97。



蛋白的三维预测建模发现: 三级结构由  $\alpha$  螺旋、扩展长链和无规则卷曲构成 (图 3B), 与二级结构预测的结果基本一致。SignalP4.1 Server 预测表明: 不存在信号肽。PROTTER 预测表明: 无跨膜结构区 (图 3C), 说明该蛋白属于非分泌蛋白, 在细胞质中合成后不被转运; 软件 ProtScale 预测蛋白亲/疏水性结果表明: 蛋白亲水性氨基酸均占 65%, 疏水性氨基酸均占 35% (图 4), 由此说明, 亲水区域分布面积较广, 所占比例较高; 疏水区域分布面积较少, 所占的比例较低, 因此, 推

测 *LgFKF1* 蛋白为亲水性蛋白。在线软件 ProtComp 9.0 预测亚细胞定位在细胞核中的可能性最大, 为 9.92。蛋白系统进化分析 (图 5) 表明: *LgFKF1* 蛋白与扁果树 (*Kaliphora madagascariensis* AML77708.1) 亲缘关系最近, 软枝黄蝉 (*Allamanda cathartica* AML77851.1)、纳塔尔倒吊笔 (*Wrightia natalensis* AML76886.1)、马利筋 (*Asclepias curassavica* AML76817.1) 次之, 与舞草 (*Codariocalyx motorius* AML78631.1)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris* XP-007160435.1) 最远。



注: A: 二级结构。蓝色表示  $\alpha$  螺旋, 紫色表示无规则卷曲, 红色表示延伸链, 绿色表示  $\beta$  转角; B: 三级结构; C: 跨膜结构模型

Notes: A: Secondary structure. The blue stands for alpha helix, the purple stands for random coil, the red stands for extended strand, and the green stands for beta turn; B: Three-dimensional structure; C: Transmembrane model

图 3 *LgFKF1* 蛋白序列的预测分析

Fig. 3 Prediction analysis of *LgFKF1* protein sequence

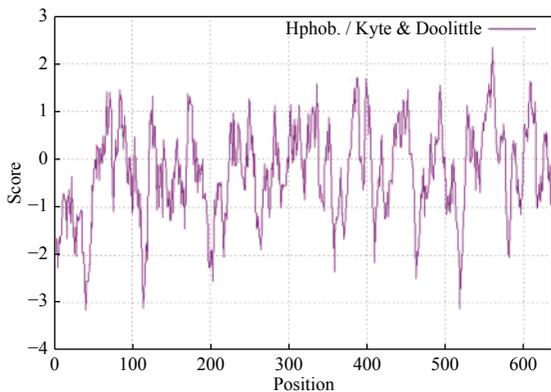


图 4 *LgFKF1* 蛋白的亲疏水性预测结果

Fig. 4 Bioinformatic prediction for hydrophilicity/hydrophobicity of *LgFKF1* protein

## 2.3 特异组织节律表达分析

2.3.1 不同光周期的表达分析 在短日照诱导光周期处理 7 d 时, *LgFKF1* 较长日照非诱导光周期的

表达量高, 之后, 在处理 10、13、19 d 的表达量均低于长日照的表达量, 并且在成花形态发生明显转变时 (即花序原基分化期, 短日照处理 13 d) 表达量达最低 (图 6)。由此说明, *LgFKF1* 在成花转变状态下呈下调表达, 这与转录组测序的结果一致。

2.3.2 特异组织表达分析 一天 24 h 中, *LgFKF1* 基因在各组织中的表达分析 (图 7) 表明: 在根中, 14:00 为一天中表达量最低点, 之后逐渐升高, 并于 23:00 达到最高峰, 随后又波动降低; 在茎中, 8:00 为一天中表达量最低点, 随后逐渐升高, 并于 20:00 达到第 1 个高峰后又逐渐降低直至 2:00, 之后又开始升高, 并于 5:00 达到与第一个峰值相当的第 2 个高峰, 随后又降低进入下一轮循环; 在叶中, 8:00 为一天中表达最高峰, 11:00 为

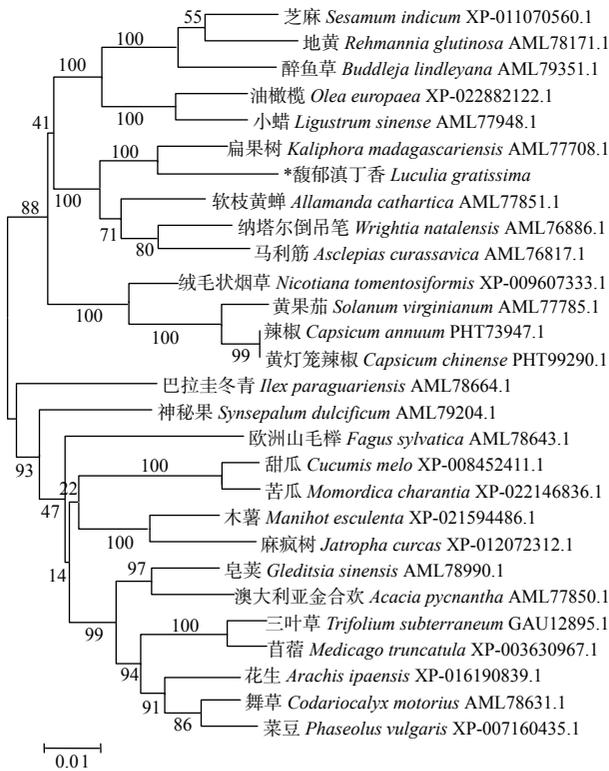


图5 LgFKF1蛋白的进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of LgFKF1 protein

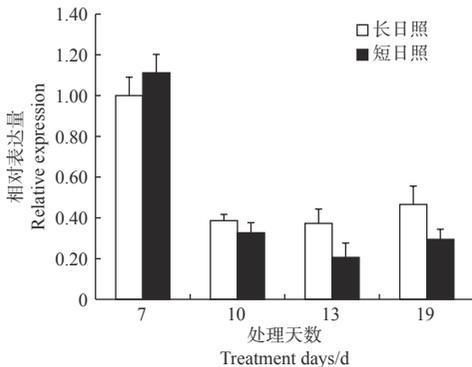


图6 LgFKF1在不同光周期下的表达

Fig. 6 Expression of LgFKF1 under different photoperiods

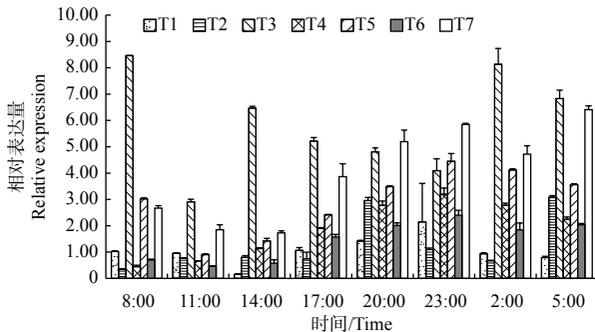


图7 LgFKF1的时空表达

Fig. 7 Spatio-temporal expression of LgFKF1

一天中表达的最低峰,之后在 14:00 回升后又逐渐降低直至 23:00,随后又在 2:00 升高达到第二个高峰后再次降低进入下一轮循环;在顶芽中,8:00 为一天中表达最低点,之后逐渐升高,直至 23:00 达到最高峰,随后逐渐降低进入下轮循环;在着色期和露白期花蕾中,表达规律基本一致,即 11:00 为一天中表达最低点,之后逐渐升高,直至 23:00 达到一天中最高峰后又逐渐降低进入下轮循环;在开放花朵中,14:00 为表达最低点,之后逐渐升高,直至 23:00 后小幅度降低后又在 5:00 升高到一天中的最高峰,随后降低进入下轮循环。总体看, *LgFKF1* 一天 24 h 内在各组织中在 20:00—5:00 期间的表达量较高,而在 11:00—14:00 期间的表达量较低。从各组织的平均表达情况看,平均表达量由高到低的顺序依次为:叶>开放花朵>着色期花蕾>顶芽>露白期花蕾>茎>根。

### 3 讨论

本研究中,同源性比对结果显示, *LgFKF1* 与扁果树、软枝黄蝉、纳塔尔倒吊笔、马利筋的 *FKF1* 具有较高的同源性,而与研究成熟的拟南芥、水稻等草本模式植物的 *FKF1* 比对则没有达到较高的同源性。然而,与 *LgFKF1* 同源性较高的这些物种的 *FKF1* 生物学功能研究目前未见报道。因此,推测 *LgFKF1* 由于序列结构有别于草本模式植物,其功能也可能与草本模式植物存在差异。另外,生物信息学分析表明, *LgFKF1* 蛋白具有不含信号肽,无跨膜结构,属于非分泌型亲水蛋白,亚细胞预测定位在细胞核,符合拟南芥<sup>[14]</sup>、大豆<sup>[10]</sup> *FKF1* 蛋白的特征,满足 *FKF1* 基因发挥转录调控作用的要求。

在拟南芥中, *AtFKF1* 在长日照下促进开花,短日照下开花表型不明显<sup>[4-5]</sup>;而大豆 *GmFKF1* 转基因植株在长日照下大部分稍微晚花,而过表达植株在短日照下有 50% 以上表现为极早花<sup>[10]</sup>。在本研究中,相对于非诱导光周期, *LgFKF1* 在诱导光周期下除了在较短时间处理上上调表达外,随处理时间延长均下调表达。由此暗示,馥郁滇丁香 *LgFKF1* 在成花状态下处于下调表达,其功能可能与拟南芥、大豆的 *FKF1* 有所不同,值得进一步进行功能验证。

不同植物的 *FKF1* 同源基因节律表达规律不尽相同。在拟南芥中, *AtFKF1* 在长日照下表达峰值

出现在早上 10:00, 在短日照下表达峰值出现在早上 7:00<sup>[15]</sup>; 大豆 *GmFKF1* 的表达在短日照下仅在早上 10:00 达到峰值, 在长日照下仅在早上 12:00 达到峰值<sup>[10]</sup>; 短日照洋葱 (*Allium cepa*) 品种中, *AcFKF1* 在长日照和短日照下的表达都出现在早上 7:00—8:00<sup>[16]</sup>。研究表明, *FKF1* 在许多组织中均有表达, 而以叶片中的表达量最高<sup>[17]</sup>。本研究中, *LgFKF1* 除叶片中在早上 8:00 的表达峰值出现在白昼中, 其余各组织中的表达峰值均出现在夜间, 并且一些组织中还出现表达双峰值, 这与报道的草本植物存在差异。由此推测, 馥郁滇丁香 *LgFKF1* 基因在成花调控中可能具有特异的生物学功能。

## 4 结论

从馥郁滇丁香中克隆获得了 *FKF1* 同源基因 *LgFKF1*, 该基因编码长度为 638 aa 的蛋白质, 具有不含信号肽、无跨膜结构、属于非分泌型亲水蛋白以及亚细胞预测定位在细胞核等特征。随诱导光周期处理时间延长, *LgFKF1* 相对于非诱导光周期呈下调表达; 在诱导光周期下, 根、芽及花蕾中出现单峰表达, 而茎、叶及开放的花朵中出现双峰表达; 除早上 8:00 叶片中的表达峰值出现在白昼, 其余各组织中的表达峰值均出现夜间; 一天中, 叶片中的表达量最高。本研究为 *LgFKF1* 基因生物功能的进一步研究提供参考依据。

## 参考文献:

- [1] Lu S X, Webb C J, Knowles S M, *et al.* CCA1 and ELF3 interact in the control of hypocotyl length and flowering time in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(2): 1079-1088.
- [2] 刘锴栋, 袁长春, 黎海利, 等. 番荔枝节律钟输出基因 *AsGI* 的克隆、亚细胞定位与表达分析 [J]. *园艺学报*, 2015, 42(12): 2395-2404.
- [3] Hayama R, Coupland G. The Molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(2): 677-684.
- [4] Imaizumi T, Schultz T F, Harmon F G, *et al.* FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2005, 309(5732): 293-297.
- [5] Nelson D C, Lasswell J, Rogg L E, *et al.* *FKF1*, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2000, 101(3): 331-340.
- [6] Lee C M, Feke A, Li M W, *et al.* Decoys untangle complicated redundancy and reveal targets of circadian clock F-Box proteins [J]. *Plant Physiology*, 2018, 177(3): 1170-1186.
- [7] Sawa M, Nusinow D A, Kay S A, *et al.* FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2007, 318(5848): 261-265.
- [8] Song Y H, Smith R W, To B J, *et al.* FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering [J]. *Science*, 2012, 336(6084): 1045-1049.
- [9] Song Y H, Estrada D A, Johnson R S, *et al.* Distinct roles of FKF1, GIGANTEA, and ZEITLUPE proteins in the regulation of CONSTANS stability in *Arabidopsis* photoperiodic flowering [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(49): 17672-17677.
- [10] Li F, Zhang X, Hu R, *et al.* Identification and molecular characterization of *FKF1* and *GI* homologous genes in soybean [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79036.
- [11] Han S H, Yoo S C, Lee B D, *et al.* Rice FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (OsFKF1) promotes flowering independent of photoperiod [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2015, 38(12): 2527-2540.
- [12] 万友名, 马宏, 赵振刚, 等. 不同光周期下馥郁滇丁香‘香妃’的成花反应以及花芽分化进程的解剖学研究 [J]. *西北植物学报*, 2018, 38(9): 1659-1666.
- [13] 万友名, 马宏, 刘秀贤, 等. 馥郁滇丁香新品种‘香妃’ [J]. *园艺学报*, 2018, 45(11): 2271-2272.
- [14] Takase T, Nishiyama Y, Tanihigashi H, *et al.* LOV KELCH PROTEIN2 and ZEITLUPE repress *Arabidopsis* photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX1 [J]. *The Plant Journal*, 2011, 67(4): 14.
- [15] Imaizumi T, Tran H G, Swartz T E, *et al.* FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2003, 426(6964): 302-306.
- [16] Taylor A, Massiah A J, Thomas B. Conservation of *Arabidopsis thaliana* photoperiodic flowering time genes in onion (*Allium cepa* L.) [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51(10): 1638-1647.
- [17] 李芳. 大豆 *FKF1* 和 *GI* 基因克隆、表达模式及功能分析 [D]. 北京: 中国农业科学研究院, 2012: 11, 61.

## Cloning and Rhythmic Expression Analysis of *LgFKF1* Gene in *Luculia gratissima*

WAN You-ming, MA Hong, LIU Xiong-fang, ZHANG Xu, AN Jing, LIU Xiu-xian, LI Zheng-hong

(Research Institute of Resource Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan China)

**Abstract:** [Objective] To study the regulatory role of *LgFKF1* gene during flowering process of *L.gratissima*, based on the analysis of its gene structural characteristics and rhythmic expression in specific tissues. [Method] The RACE technology was used to clone the full length cDNA of *LgFKF1* gene. Sequence of nucleotides and code of protein were analyzed by using the software of bioinformatics. qRT-PCR was applied in the rhythmic expression analysis of the gene in specific tissues. [Result] The result of sequence analysis showed that the *LgFKF1* cDNA, 2 271 bp in length, has a 1 917 bp open reading frame encoding a putative protein with 638 amino acids. The results of sequence alignment showed that the amino acids sequence was highly homologous with the FKF1 of *Kaliphora madagascariensis*, *Allamanda cathartica*, *Wrightia natalensis* and *Asclepias curassavica*, with the homology of 92.59%. *LgFKF1* protein that had the closest genetic relationship with *K. madagascariensis* was unstable hydrophilic proteins without signal peptide and transmembrane regions, and located in the nucleus, mainly consisted of alpha helix, irregular curling structure and extended long chain. The result of qRT-PCR showed that the expression of *LgFKF1* under inductive photoperiod for 7 days was higher than that under non-inductive photoperiod treatment, but the expression was lower than that under non-inductive photoperiod treatment if inductive photoperiod was more than 10 days. In a day, *LgFKF1* expressed in various tissues, and showed a high transcription level in leaf. For the rhythmic expression of *LgFKF1* in different tissues, one peak value was appeared at 23: 00 in root, leaf bud and flower bud, and two peak values were appeared at 20: 00 and 5: 00 in stem, 2: 00 and 8: 00 in leaf, 23: 00 and 5: 00 in mature flower. [Conclusion] *LgFKF1* was cloned from *L.gratissima*, and its putative protein sequence was highly homologous with the FKF1 of other plants. The expression of *LgFKF1* gene was affected by photoperiod. Under the inductive photoperiod, various tissues showed itself expression pattern. A peak value of *LgFKF1* expression in leaf was only appeared at 8: 00 during the daytime, and the peak values in other tissues were occurred during the night. In these tissues, *LgFKF1* showed higher transcription level in leaf. The rhythmic expression of *LgFKF1* in specific tissues might be helpful to provides some references for further study on its biological function.

**Keywords:** *Luculia gratissima*; *LgFKF1* gene; cloning; rhythmic expression

(责任编辑: 张 研)