

重瓣山茶花‘金盘荔枝’C 功能基因 *CjAGL6* 的全长克隆与表达分析

孙迎坤^{1,2} 李纪元¹ 殷恒福^{1*} 范正琪¹ 周兴文¹

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 富阳 311400; 2. 青岛农业大学, 青岛 266109)

摘要 MADS-box 基因家族在调控植物的花器官发育中发挥了重要作用。为研究 AG 类基因对于山茶花重瓣花形成的作用, 采用同源克隆的方法, 从山茶花重瓣花品种‘金盘荔枝’(*Camellia japonica* ‘Jinpanlizhi’) 的发育早期花芽中分离到了 888 bp 的山茶花 AG 基因完整全长序列, 命名为 *CjAGL6*, GenBank 登录号 JX657333。其中开放阅读框长度为 747 bp, 5′非编码区长 37 bp, 3′非编码区长 141 bp。氨基酸序列分析显示, *CjAGL6* 基因编码的蛋白质含有 248 个氨基酸, 与猕猴桃(*Actinidia chinensis*)、黑柿(*Diospyros digyna*) 等植物的蛋白同源性都在 76% 以上。同时, *CjAGL6* 基因编码的蛋白含有重瓣花特有的保守区起始氨基酸序列及显著差异的单个氨基酸。相对荧光定量 PCR 结果表明, 该基因在‘金盘荔枝’花芽不同发育时期的表达量为: 花芽发育后期 > 花芽发育中期 > 花芽发育早期 > 现蕾期, 表达总体趋势为先渐次升高而后急剧降至最低; 不同花器官中 *CjAGL6* 基因在花柱中的表达量最高, 其次为瓣化雄蕊、雄蕊上部 and 子房, 在萼片和瓣化萼片中的表达量最低, 总的趋势是在内轮花器官表达量高, 在外轮花器官中的表达量低。重瓣花形成是多基因协同作用的结果, *CjAGL6* 基因可能在调控山茶花重瓣花形成中发挥一定的功能。

关键词 ‘金盘荔枝’; *CjAGL6* 基因; 序列分析; 相对荧光定量; 表达

中图分类号: S718.46 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2013.03.013

Cloning and Expression Analysis of C Function *CjAGL6* Gene cDNA from *Camellia japonica* ‘Jinpanlizhi’

SUN Ying-Kun^{1,2} LI Ji-Yuan¹ YIN Heng-Fu^{1*} FAN Zheng-Qi¹ ZHOU Xing-Wen¹

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400; 2. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

Abstract MADS-box gene family has played important roles in the floral organs development. In order to investigate the function of A-class genes for double flower development in *Camellia japonica*, a 888 bp full-length cDNA sequence of AG homologous gene was cloned from early flower bud of *C. japonica* ‘Jinpanlizhi’, named *CjAGL6* (GenBank accession JX657333). It contains an opening reading frame of 747 bp, a 5′-untranslated region (UTR) of 37 bp, a 3′-UTR of 141 bp. Amino acids sequence alignment showed that *CjAGL6* gene encodes the protein with 248 amino acids, and the homology is more than 76% with *Actinidia chinensis* and *Diospyros digyna*. Real-time PCR analysis showed that the relative expression level of this gene was as follows: later flower bud > medium flower bud > early flower bud > squaring stage, it increased slowly at the initial stage and then sharply decreased to the lowest. In different floral organs of ‘Jinpanlizhi’, the highest expression was in style, next in petalody stamens, upper stamens and ovary, the lowest in sepals and petalody sepals. The tendency was the high expression in inter floral organs and the low in outer floral organs. The forming of double flower is the synergistic result of multiple genes. *CjAGL6* gene may have some functions in this process.

Key words *Camellia japonica*; *CjAGL6* gene; sequence analysis; real-time PCR; expression

山茶花 (*Camellia japonica*) 隶属山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*), 花色艳丽, 花容娇美, 枝叶常绿, 既适合于家庭盆栽, 也可用于园林绿化观赏, 深受世人喜爱。作为名贵的观赏植物, 山

基金项目: 国家十二五科技支撑课题 (2012BAD01B07); 国家国际科技合作计划项目 (2011DFA30490)

第一作者简介: 孙迎坤 (1977—), 女, 讲师, 博士研究生, 主要从事观赏植物分子育种研究和园林设计。

* 通信作者: E-mail: hfyin@sibs.ac.cn

收稿日期: 2012-11-27

茶花型变化丰富,雄蕊瓣化的重瓣花表型居多。重瓣花的形成是多因素影响、多条途径调控的综合结果,其中控制花器官发育的 MADS-box 基因家族在被子植物花期调控、花器官进化和多样性等方面起着关键性作用,对于重瓣花的形成有重要影响作用^[1~4]。

主要由 MADS-box 基因家族所调控的花发育特征模型最初是在上世纪初由 Coen 等提出的 ABC 模型^[5~7]。1995 年,Colombo 等将此模型发展为“ABCD 模型”,至本世纪初最终发展为目前较完善的“ABCDE”模型^[8~10]。多数研究认为,A 类基因单独调控萼片的特征;A 和 B 类基因共同调控花瓣的特征;B 和 C 类基因一起控制雄蕊的特征;C 类基因单独控制心皮的特征,D 类基因控制胚珠的发育,E 类基因参与调控四轮花器官和花分生组织的决定性发育。

目前已经从不同植物物种中分离出了大量的花同源异型 MADS-box 基因,其包括 4 个亚家族(subfamily),分别为 A 类的 *AP1/FRUITFULL* (*FUL*)-like、B 类的 *AP3/PI-like* 和 *DEF/GLOBOSA* (*GLO*)-like、C 和 D 类的 *AG-like* 以及 E 类的 *SEPALLATA* (*SEP*)-like^[11~13]。MADS box 基因是一类非常重要的转录调控因子,具有多内含子基因结构,内含子的位置和长度保守性较高。属于 MADS-box 基因家族中 C 类基因的植物中的 *AG* 类基因,具有典型的 MIKC 型结构^[14]。其中,处于 N 末端或靠近 N 末端位置的由大约 60 个氨基酸组成的 MADS box 结构域高度保守,可以与特异 DNA 结合,并具有蛋白质二聚化等功能;由约 30 个氨基酸组成的 I 区是保守性较低,可决定转录因子与 DNA 的特异性结合;具有 70 个氨基酸的 K 区中度保守,可参与蛋白质间的相互作用;主要由疏水氨基酸组成的 C 末端区域序列和长度都最不稳定,主要在转录激活和蛋白复合体形成中发挥重要功能^[17~19]。

自 1990 年 Yanofsky 等首次在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中克隆了 *AG* 同源异型基因以来,截止目前已有 30 多种植物的 *AG* 同源基因被克隆,包括模式植物烟草(*Nicotiana tabacum*)和多种木本植物,如桃(*Prunus persica*)、桦树(*Betula pendula*)等^[20~21]。尽管这些基因在序列上有差异,但功能上都对于花器官发育等起着重要的调控作用,但花型多变的山茶花中 *AG* 基因的研究尚未见报道。鉴于此,本研究从已发表的 *AG* 基因保守区中克隆了一个同源基因 *CjAGL6* 全长,对该

基因进行了相关生物学信息分析,并研究了其在重瓣山茶花品种花芽不同发育阶段及各类花器官部位的表达特性,旨在探讨山茶 *CjAGL6* 基因对于花发育和重瓣花形成的具体功能,并为促进山茶花及其他观赏植物重瓣花育种工作进展提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

实验所用的植物材料为山茶花托桂型品种‘金盘荔枝’(*C. japonica* ‘Jinpanlizhi’),采自浙江金华物种园和中国林科院亚林所茶花保存圃。采集时间为 2011 年 11 月~2012 年 2 月,样品为处于不同发育时期的花芽(发育早期花芽 $D \leq 3$ mm,发育中期花芽 $D = 4 \sim 7$ mm,发育后期花芽直径 $D = 7 \sim 9$ mm、现蕾期)、花器官各部分(萼片、花瓣上和下部、去除花药的雄蕊上部和下部、瓣化萼片、瓣化雄蕊、花柱、子房),锡箔纸包裹后立即投入液氮中速冻暂存,带回后于 -70°C 冰箱存放。

植物总 RNA 提取试剂盒 RNAout 2.0 和 RNAase 固相清除剂均购自北京天恩泽基因公司,T4 DNA 连接酶及 T easy vector 购自美国 Promega 公司。常用的限制性内切酶、高保真酶 Prime STAR HS DNA Polymerase、荧光定量反转录 SYBR® Prime Script RT reagent Kit With gDNA Eraser 和染料法 PCR 反应试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II 购自宝生物工程大连有限公司,大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、cDNA 第一链合成试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司。质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒及荧光定量耗材购自美国 Axygen 公司。PCR 引物由上海生工生物工程公司合成,测序由杭州华大基因公司进行。

1.2 实验方法

1.2.1 同源扩增引物设计

查找 GenBank 所公布的 *AG* 近缘物种同源基因的完整 mRNA 和 CDS 序列信息,分析此类基因的保守区,用 Premier 5.0 软件设计正向(P-1)和反向引物(P-2),经 PCR 扩增获取基因在‘金盘荔枝’中的保守片段并进行测序确认;根据测序目的序列设计 3'和 5'RACE 扩增的特异引物 GSP1、GSP2;然后根据保守区、3'和 5'RACE cDNA 序列的拼接结果,设计全长扩增特异引物 P-3 和 P-4(表 1)。

表 1 山茶花 *CjAGL6* 基因克隆及表达分析引物Table 1 Primer sequences of cloning and expression of *CjAGL6* gene in *C. japonica*

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	用途 Function
P-1	CACCGGATCGGTGGCAGAAATTAATGC	保守区片段序列扩增 Conservative region sequence amplification
P-2	GGATCGGATTCGGTAATACTTCTCTC	
GSP1	GACCTTGTCTTCTCTCTGGAGCGATGA	3'RACE 扩增 3'RACE amplification
GSP2	GTTACCCCTTCTCAACCAATCCCA	5'RACE 扩增 5'RACE amplification
P-3	GAGAGATGGGTAGAGGAAGACTAG	全长序列扩增 Full-length sequence amplification
P-4	GTGTATCTGAGAGGAGTTCAAAGCA	
18S-1	GACTCAACACGGGGAAACTTACC	内参基因扩增 Reference gene amplification
18S-2	CAGACAAATCGCTCCACCAAC	
Y-1	GAGGTATCGAAGTTAAGGGCAA	实时定量 PCR Real-time PCR
Y-2	GTCCTTCTGTCTGGAGCGATG	

1.2.2 cDNA 全长扩增

样品‘金盘荔枝’花器官各部位的总 RNA 依据植物 RNAout1.2 试剂盒进行操作,所提取的 RNA 应用 cDNA 第一链合成试剂盒反转录为 cDNA。采用同源克隆方法,用上表中引物 P-1、P-2 进行扩增,扩增条件为: 94℃, 5 min; 94℃, 30 s, 54℃, 30 s, 72℃, 50 s, 30 cycles; 72℃, 7 min。目的片段进行凝胶回收,连接 pGEM®-T Easy Vector,转化 *E. coli* DH5 α ,经鉴定的阳性单克隆测序得到基因保守区片段。设计特异性引物 GSP1、GSP2,根据 SMARTTM RACE cDNA Amplification 试剂盒说明书分别进行 cDNA 末端扩增,得到相应的 3'和 5'序列,结合中间保守区序列进行 cDNA 全长电子拼接,用引物表 1 中 P-3、P-4 引物,以反转录的‘金盘荔枝’小花芽总 cDNA 为模板扩增,扩增产物测序并对其结果在 GenBank 中进行 Blast 分析。

1.2.3 山茶花 *CjAGL6* 基因编码蛋白质的生物信息学分析

登录 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站,在线 Blast 进行 *CjAGL6* 基因的同源序列分析,采用 ORF Finder 分析该基因的 cDNA 开放阅读框。采用瑞士生物信息学研究所(<http://cn.expasy.org>) 提供的 Prot Param 软件进行 *CjAGL6* 蛋白质的相关生物信息学分析,包括氨基酸数目和组成、蛋白质相对分子量、理论等电点、稳定性、平均可塑性参数等;运用 Prot Scale 等软件分析此基因特定的 α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲、延伸链和疏水性等。应用 SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod>) 的 Homology modeling 同源建模系统预测 *CjAGL6* 蛋白质的三维结构特征。利用 DNAMAN 4.0 软件进行氨基酸序列比对、系统发育树构建等分析。

1.2.4 *CjAGL6* 基因在‘金盘荔枝’花器官不同部位中的相对荧光定量表达

分别提取‘金盘荔枝’4 个不同发育时期的花芽以及花器官不同部位(萼片、花瓣、雄蕊、瓣化萼片、瓣化雄蕊、花柱、子房等)的总 RNA,反转录酶合成 cDNA 第一链。以山茶花 18S rRNA (GenBank 登录号 U42815.1) 作内参,其特异引物为 18S-1、18S-2,荧光定量引物为 Y-1、Y-2。反应在实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7300)上进行,采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂,反应程序设定为 95℃, 30 s; 95℃, 5 s; 60℃, 31 s, 40 个循环。每个试验 3 个重复,每个样品 3 次重复,利用相应实时荧光定量 PCR 仪 Sequence Detection software 软件和 Excel 表进行 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法数据分析。

2 结果与分析

2.1 ‘金盘荔枝’RNA 提取及 *CjAGL6* 基因全长 cDNA

‘金盘荔枝’花芽发育早期总 RNA 提取如图 1 所示,28S 亮度约为 18S 的 2 倍,且条带亮度大于 DL 2000 Marker 的 750 bp 标准条带,说明所提取的 RNA 完整度好,质量和浓度较高。

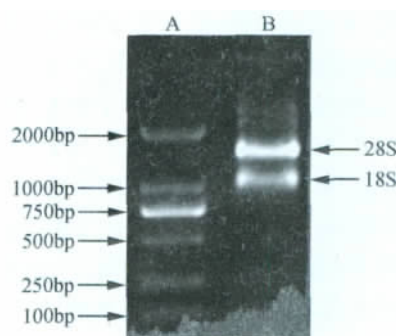


图 1 ‘金盘荔枝’花芽发育早期总 RNA 提取

A. DNA 分子量标准 DL2000; B. RNA 样品

Fig. 1 Total RNA extraction of early flower bud from *C. japonica* ‘Jinpanlizhi’ A. DL2000 Marker; B. RNA sample

运用 *CjAGL6* 基因保守区的引物 P-1 和 P-2 (表 1),以反转录的‘金盘荔枝’cDNA 为模板进行 PCR 扩增,测序后获得长为 189 bp 的目的片段(图 2:1)。将该片段所编码的蛋白进行 NCBI 在线比

对分析,发现其与半支莲(*Lobelia erinus*)、玫瑰(*Rosa rugosa*)、草莓(*Fragaria ananassa*)等多个物种 AGAMOUS-like 转录因子(AG1 类)基因编码的蛋白同源性高达 85% 以上。根据扩增得到的同源特异片段序列和 RACE 扩增特异引物 GSP1、GSP2 进一步扩增,测序验证后分别获得山茶花 AG 同源基因的 3' 和 5' 末端序列(图 2:2 和图 2:3),结合已经得到的 RT-PCR 扩增 cDNA 目的序列进行电子拼接,获得 888bp 的基因序列全长,将该基因命名为 *CjAGL6*, Genbank 登录号为 JX657333。将全长序列在 ORF finder 中分析开放阅读框(Open reading frame, ORF) 信息,得到该基因的保守区序列,结合电子拼接的 cDNA 全长,利用在 3' 非编码区(UTR) 与 5'UTR 区域设计的全长特异扩增引物,PCR 扩增后得到 770 bp 的目的基因序列(图 2:4),测序验证表明该序列与 *CjAGL6* 基因的电子拼接结果一致。

2.2 山茶花 *CjAGL6* 基因 cDNA 核苷酸序列分析

利用 NCBI 提供的 ORF Finder 软件,对山茶花 *CjAGL6* 基因序列分析表明山茶花 *CjAGL6* 基因的 ORF 长度为 747 bp, 5'UTR 长 37 bp, 3'UTR 长 141 bp, 终止密码子为 TGA, 全长序列包含了典型的 Poly

(A) 结构。这些结果表明本实验所克隆到的 *CjAGL6* 基因包含一个完整开放阅读框, 序列完整(图 3)。NCBI 序列在线比对分析结果显示, 该基因与猕猴桃(*Actinidia chinensis*)、黑柿(*Diospyros digyna*)、番木瓜(*Carica papaya*)、八角枫(*Alangium platanifolium*) 等多个物种的 MADS 基因家族中的同类基因相似性达 82% 以上。

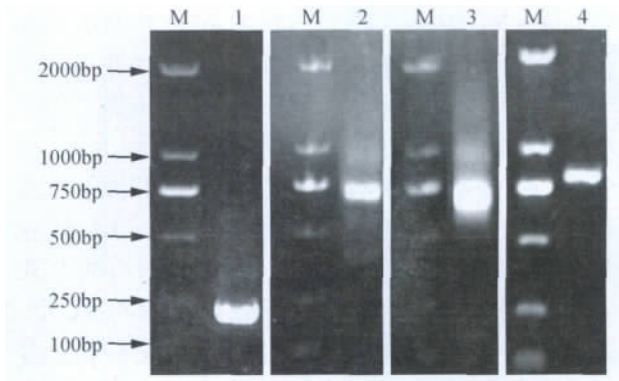


图 2 山茶花 *CjAGL6* 基因 PCR 扩增结果 M. DNA 分子量标准 DL2000; 1. *CjAGL6* 基因特异片段; 2. 3'RACE 扩增产物; 3. 5'RACE 扩增产物; 4. *CjAGL6* 基因全长扩增产物

Fig. 2 PCR amplification of *CjAGL6* gene in *C. japonica*

M. DL2000 Marker; 1. *CjAGL6* cDNA fragment; 2. 3'RACE product; 3. 5'RACE product; 4. full length of *CjAGL6*

```

1  GTGTTTTTTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAATGGGTAGAGGAAGAGTAGAGCTAAAGAGGATAGAGAACAAGATCAATCGTCAA
    M G R G R V E L K R I E N K I N R Q
92  GTGACTTTCTCAAAGAGAAGGAATGGTTTGCTCAAGAAAGCTTATGAGCTCTCTGTCTCTGCGACGCTGAAGTGGCTCTCATCATCTTC
    V T F S K R R N G L L K K A Y E L S V L C D A E V A L I I F
182 TCCAGCCGCGGAAGCTCTATGAGTTCGGCAGCGCTGGTATGACCAAAACCTGGAGAGGTACCAACATTGCAACTTTAATCCTCATGAC
    S S R G K L Y E F G S A G M T K T L E R Y Q H C N F N P H D
272 AACAGTGTGGAACGGGAAACGCAGAGCTGGTACCAGGAGGTATCGAAGTTAAGGGCAAAGTTCGAATCCCTTCAGCGCACTCAAAGGCAC
    N S V E R E T Q S W Y Q E V S K L R A K F E S L Q R T Q R H
362 TTGCTTGGAGAAGATCTTGGACCACTAAGTGTGAAAGAGTTGCAAAATCTTGAGAAACAACCTCGAAGGAGCGCTTGCAAACTAGGCAA
    L L G E D L G P L S V K E L Q N L E K Q L E G A L A Q T R Q R
452 AGAAAGACACAGATAATGGTAGAACAAATGGAAGAGCTCAGGCAAAAGGAGCGTCAGCTTGGAGATATGAACAAACAGCTCAAGATTAAG
    K T Q I M V E Q M E E L R Q K E R Q L G D M N K Q L K I K
542 GTTTCCTAGAGTTATCATCGCTCCAGACAGAAGGACAAGGTCTTGGACCCCTTCCATGCTCATGGAATCCTACTAATGCATCAACTGGA
    V S L E L S S L Q T E G Q G L G P L P C S W N P T N A S T G
632 AACACCAGCTTCTCTGTTCAACCTTCTCAACCCAAATCCCATGGACTGTGACAATGAACTGTCTTACAAATAGGGTACCAACACTATGTA
    N T S F S V H P S Q P N P M D C D N E T V L Q I G Y Q H Y V
722 GCTGGTGAATCATCTGTTCCAAGGACCATGGCTGGTGACATAGTCCAGGGTGGGTGCTTTGAACTCCTCTCAAATACACATATATATAA
    A G E S S V P R T M A G D I V Q G W V L
812 TATGACTTTATATATAATTGCTGAATTATTTATGTTTGTGTACCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

图 3 *CjAGL6* 基因 cDNA 核苷酸序列分析 第 38 ~ 40 个碱基为起始密码子; 第 782 ~ 784 个碱基为终止密码子; 最后一行显示 Poly(A) 结构

Fig. 3 Nucleotide sequence analysis of cDNA in *CjAGL6* gene The 38 - 40 nucleotides is initiation codon; the 782 - 784 ones is termination codon; there are Poly (A) construction in last line.

2.3 山茶花 *CjAGL6* 基因编码的蛋白质结构及功能位点分析

利用 ORF Finder 和 Primer 5.0 软件分析 *CjAGL6* 基因的 38 ~ 784 bp 之间的开放阅读框,结果显示其编码一条含有 248 个氨基酸的蛋白质。EXPASy ProtParam 在线分析显示该蛋白的分子量为 28.21 kD,理论等电 (PI) 为 8.83,分子式为 $C_{1225}H_{1978}N_{362}O_{380}S_{11}$,原子总数 3956,平均亲水指数为 -0.682,不稳定系数 38.72,为稳定亲水性蛋白。

Phyl lyon-gerland 信息库分析得知,山茶花 *CjAGL6* 基因编码蛋白质二级结构以 α -螺旋为主,占 46.77%,决定着蛋白质骨架的稳定性;其次为无规则卷曲,达 39.92%,与蛋白质功能相关;延伸链占 13.31%;无 β -转角等其他区域,这与同属的山茶花 B 功能基因编码蛋白的预测结果基本一致^[2]。蛋白质分子的多肽链在各种二级结构的基础上再折叠卷曲构成特有的较稳定的空间结构,决定着蛋白质的生物学活性和理化性质。对蛋白质三级结构的预测与研究,可以更深入了解基因所编码蛋白质的功能与结构之间的关系。*CjAGL6* 基因预测的编

码蛋白质三级结构如图 4 所示, α -螺旋构成了蛋白质的主要骨架,这与二级结构分析结果相符合。利用 NCBI 的 Conserved Domain Search 进行保守域在线分析,结合其它 AG 类基因的分析结果,发现 *CjAGL6* 基因编码的蛋白含有特有的 MADS box 结构域高度保守区域和 K box 域,属于典型的 Type II 类型的 MADS-box 蛋白(图 5)。

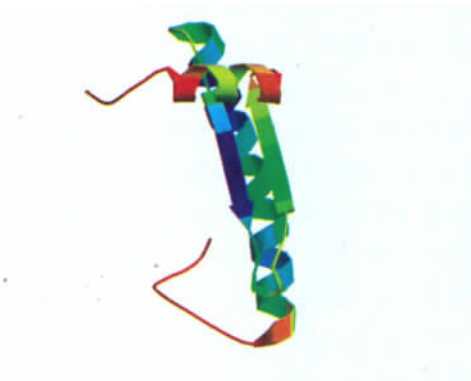


图 4 *CjAGL6* 基因推导的编码蛋白质三级结构
Fig. 4 Tertiary structure of coded protein from *CjAGL6* gene

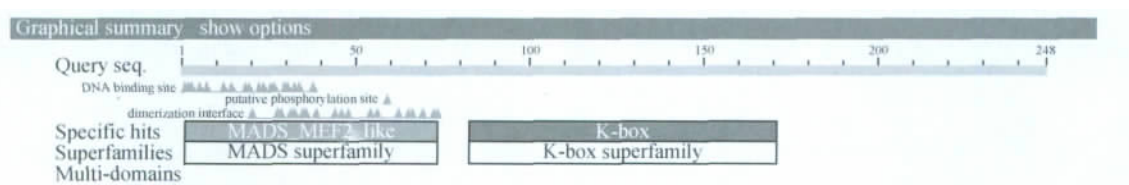


图 5 *CjAGL6* 基因编码蛋白的保守域

Fig. 5 Conserved domains of coded protein from *CjAGL6* gene

2.4 山茶花 *CjAGL6* 基因编码蛋白序列多重比对与同源性分析

利用 NCBI 提供的 Blast 蛋白质序列在线比对表明,在 GenBank 中所登录植物的 *CjAGL6* 同源序列,目前尚没有与山茶花同源性很高的同科同源序列。在同源性大于 76% 的序列中,非洲菊 (*Gerbera hybrid*) 与山茶花同属重瓣花的类型,猕猴桃与山茶花是最近缘的物种,黑柿与山茶花的同源性较高,因此选这 3 个物种与山茶花进行蛋白序列的同源性分析。

从图 6 可见,保守区开始连续箭头所指的包含起始密码子编码的蛋氨酸 (M) 在内的 16 个氨基酸是山茶花和非洲菊特有的,单瓣型的黑柿和猕猴桃都缺失,这表明黑柿和猕猴桃的保守序列不完整,且特异的 16 个氨基酸很可能是导致重瓣花形成的原因。在四处单箭头所指的相应列

里,分别为山茶花和非洲菊特有的异亮氨酸 (I)、缬氨酸 (V)、异亮氨酸 (I) 和谷亮氨酸 (E) 与其他两个物种的特异差异,这也可能是重瓣花型植物与单瓣花植物的蛋白质特异性,为重瓣花的演变提供了分子基础。图中星号所示的 3 列中的谷氨酸 (Q)、苏氨酸 (T) 和天冬氨酸 (D) 皆为山茶花和其他 3 个物种的氨基酸差异,表明 *CjAGL6* 蛋白质同源序列在不同物种中存在着差异性。同时,从图中也可以看出 *CjAGL6* 同源基因编码的蛋白符合 MADS-box 家族的特征,即 MADS box 结构域高度保守,K 区中度保守,I 区是保守性较低,C 末端区域最不稳定。

2.5 山茶花 *CjAGL6* 基因在花器官中的表达分析

2.5.1 山茶花 *CjAGL6* 基因在花芽不同发育时期的表达

采取荧光定量 PCR 的方法对‘金盘荔枝’不同

发育时期花芽中 *CjAGL6* 基因的表达情况测定,内参基因为山茶花的 18S rRNA 基因,分析结果如下图所示(图 7)。从图 6 可知,*CjAGL6* 基因在花芽发育后期(直径约 7~9 mm)的相对表达量最高,是花芽发育早期时期(直径约 3 mm)的 20 倍。其次

为花芽发育中期(直径约 4~7 mm),在花芽发育早期和显色期的表达量最低。*CjAGL6* 基因在 ‘金盘荔枝’ 不同发育时期花芽中的相对表达量差异显著,表达量发展的总体趋势为先逐渐升高而后急剧降低。

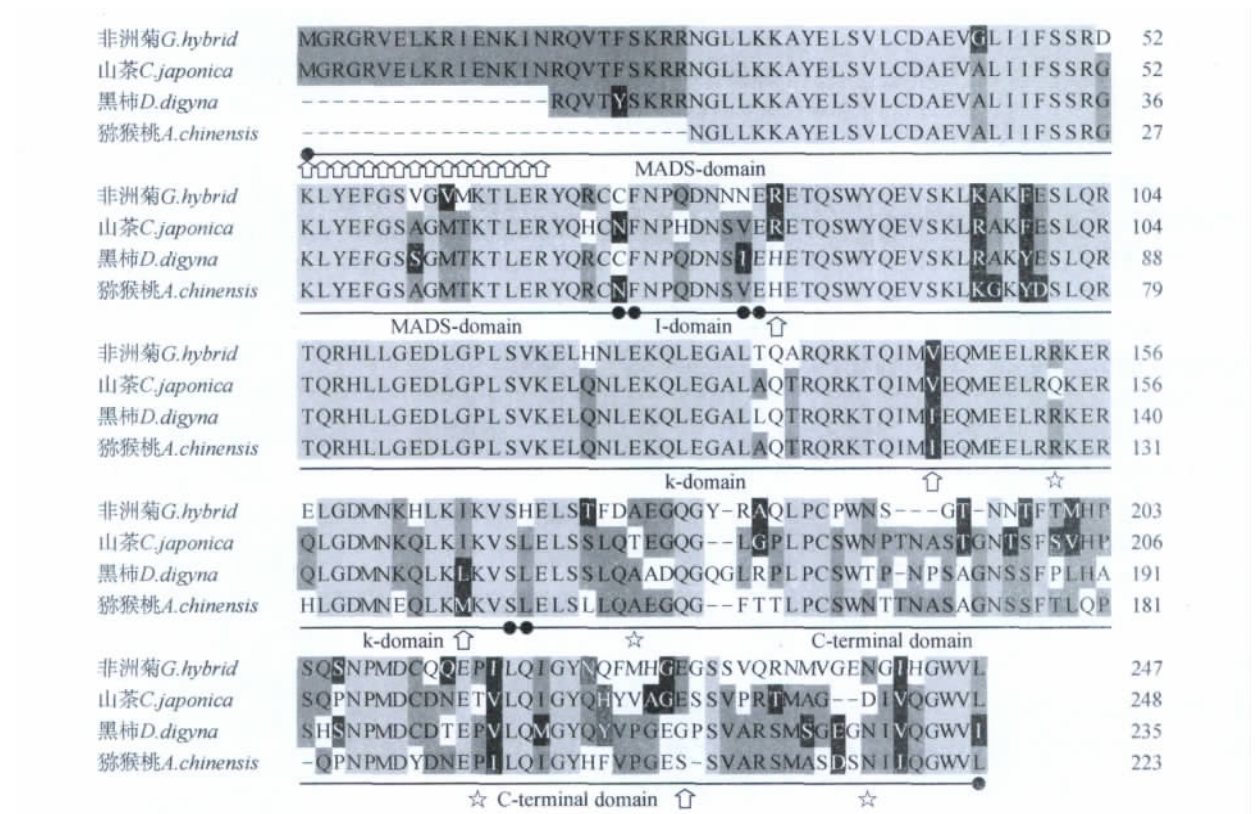


图 6 部分植物 *CjAGL6* 同源基因编码蛋白的同源氨基酸序列分析

Fig. 6 Amino acid sequence alignment with typical plants of coded protein from *CjAGL6* homology genes

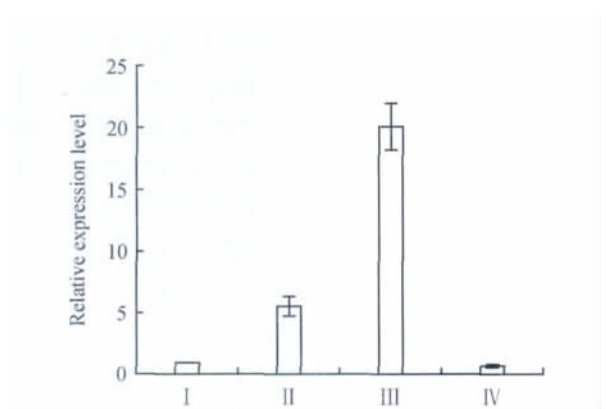


图 7 ‘金盘荔枝’ 花芽不同发育时期 *CjAGL6* 基因的相对表达量 I. 花芽发育早期; II. 花芽发育中期; III. 花芽发育后期; IV. 现蕾期

Fig. 7 Relative expression level of *CjAGL6* gene in different development periods buds of “Jinpanlizhi” I. Early flower bud; II. Medium flower bud; III. Later flower bud; IV. Squaring stage

2.5.2 山茶花 *CjAGL6* 基因在花器官不同部位的表达

对 ‘金盘荔枝’ 花器官不同部位 *CjAGL6* 基因的表达情况也采用上述的荧光定量 PCR 法进行研究,结果如图 8 所示,*CjAGL6* 基因花器官各部位都有不同程度的表达,其中在花柱中的表达量最高,其次为瓣化雄蕊、雄蕊上部和子房,在萼片和瓣化萼片中的表达量最低。

3 讨论

采用同源克隆和 RACE 末端扩增方法,从山茶花重瓣花栽培品种 ‘金盘荔枝’ 的发育早期花芽中分离到了山茶花 *AG* 同源基因全长,命名为 *CjAGL6*,GenBank 登录号 JX657333。该基因全长 888 bp,其中开放阅读框 747 bp,编码 248 个氨基酸的蛋白质,5′UTR 为 37bp,3′UTR 为 141 bp,全长序

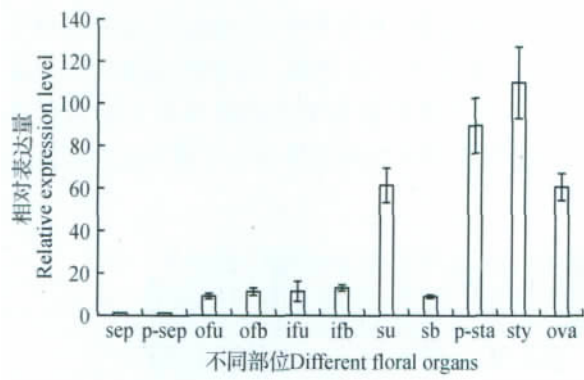


图8 ‘金盘荔枝’花器官不同部位 *CjAGL6* 基因的相对表达量 sep. 萼片; p-sep. 瓣化萼片; ofu. 外轮花瓣上部; ofb. 外轮花瓣下部; ifu. 内轮花瓣上部; ifb. 内轮花瓣下部; su. 雄蕊上部; sb. 雄蕊下部; p-sta. 瓣化雄蕊; sty. 花柱; ova. 子房
Fig. 8 Relative expression level of *CjAGL6* gene in different floral organs of ‘Jinpanlizhi’ sep. Sepal; p-sep. Petalody sepal; ofu. Upper outer flowers; ofb. Bottom outer flowers; ifu. Upper inside flowers; ifb. Bottom inside flowers; su. Upper stamens; sb. Bottom stamens; p-sta. Petalody stamens; sty. Style; ova. Ovary

列完整。*CjAGL6* 基因编码蛋白质二级结构以 α -螺旋为主,其次为无规则卷曲和延伸链,无 β -转角等其他区域,含有 MADS-box 家族特有的 MADS box 结构域高度保守区域和 K box 域。其中,编码区开始的 16 个氨基酸以及保守域中异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)、异亮氨酸(I)和谷亮氨酸(E)等与其他同源性高的单瓣花物种存在特异差异,这可能是导致重瓣花演变形成的原因。

采用荧光定量 PCR 的方法对‘金盘荔枝’不同发育时期花芽中 *CjAGL6* 基因的检测分析知,相对表达量最高由高到低依次为:花芽发育后期、花芽发育中期、花芽发育早期和现蕾期,表达差异显著,表达趋势为先渐次升高至最大,然后急剧降至最低。在花发育过程中,花分生组织最早形成,然后逐渐形成萼片原基、花瓣和雄蕊原基、心皮原基^[23]。由花发育模型知,AG 类基因主要调控雄蕊和花瓣的发育,并在其他花器官发育过程中也有少量表达。因此,随着花芽形态发育过程的进展,*CjAGL6* 基因在不同花器官中的表达得到逐步积累,导致其表达量逐渐上升。至现蕾期时,由于花器官发育完成,*CjAGL6* 转为在特定花器官中表达,又致使 *CjAGL6* 基因的表达量下降。

从图 8 知,在‘金盘荔枝’不同花器官中,*CjAGL6* 基因是在花柱中的表达量最高,其次为瓣化雄蕊、雄蕊上部和子房,在萼片和瓣化萼片中的表达

量最低,总的趋势是在内轮花器官中表达量高,在外轮花器官表达量低。目前已经从多个物种中克隆到了 AG 的同源基因,一般来说 AG 类基因相对保守,但部分发生了多重复制导致功能分化和冗余。向林等对蕙兰(*Cymbidium faberi*)中 *CfAG* 基因进行 RT-PCR 分析,表明该基因在花芽、子房和蕊柱中有所表达,但在其它组织中不表达,*CfAG* 可能是在蕙兰的蕊柱、子房的形成过程中发挥作用^[24]。张宪省等对风信子(*Hyacinthus orientalis* ‘white pearl’) *HAG1* 基因的 Northern 杂交结合 PCR 技术分析知,*HAG1* 基因在处于花粉母细胞和单核花粉时期的花器官、低激素浓度条件下可分化再生雄蕊的花芽中表达较多,表明同源异形基因的表达与激素浓度及花器官特征之间存在密切联系^[25]。梅(*Prunus mume*)中 AG 基因主要在萼片和雌雄蕊、果皮、种子等生殖器官中特异性高表达,在叶片和花瓣中不表达^[26]。*CjAGL6* 基因在‘金盘荔枝’的花柱、瓣化雄蕊、雄蕊和子房中也存在不同程度高表达的现象,这既符合 AG 类基因相对保守的特性,显示出此类基因的主要功能,也说明同源基因的表达存在物种差异性。同时,*CjAGL6* 基因在‘金盘荔枝’瓣化雄蕊中的表达量高于雄蕊,且雄蕊上部表达量高于雄蕊下部,说明‘金盘荔枝’内轮瓣化花瓣为雄蕊演变形成,且为自上而下的演变过程,这符合所观察到的瓣化花瓣的现实形态,又为重瓣花的形成提供了分子基础。

吕山花在太行花(*Taihangia rupestris*)中通过原位杂交的方法研究了 AG 同源基因 *TrAG* 的时空表达模式,表明在当雄蕊原基出现前的花发育早期,*TrAG* 没有表达;随后,在雄蕊原基中、即将产生雄蕊和心皮原基的分生组织区域、发育的雄蕊、心皮原基、发育的柱头、花柱以及胚珠中依次进行高表达。这说明 *TrAG* 在太行花中可能具有控制花分生组织及雄蕊和心皮发育的特征^[27]。在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和金鱼草(*Antirrhinum majus*)中,AG 同源基因也有类似的表达特性,即渐次在萼片原基、即将产生雄蕊和心皮原基的分生组织区域、雄蕊和心皮原基、发育的雄蕊和心皮、胚珠中高表达^[28-31]。在矮牵牛花发育的晚期,AG 同源基因 *pMADS3* 在胚珠、输导组织和蜜腺中表达量最高,而 *FBP6* 在柱头、花柱的输导组织中有很高的表达效果^[32-33]。总体来看,AG 类基因在花发育早期,在萼片(原基)中高表达,而后逐渐向内部花器官转移,在花发育后期多在雌蕊(柱头)、心皮中达

到最高表达量,并显示出物种的差异性。*AG* 类基因不仅可以调控植物的开花时间、花分生组织和花器官的发育,还可对植物的开花时间、果实、茎生叶的发育等起调节作用,如拟南芥 *euFU* 型基因 *FRUITFULL*(*FUL*,*AGL8*)^[64~35]。结合 *AG* 类的功能分析,*CjAGL6* 基因对于花器官的发育的调控差异是比较显著的。同时,*CjAGL6* 基因在‘金盘荔枝’雌雄蕊中的高表达和在萼片中的低表达,也证实了 *C* 类基因和 *A* 类基因调控的拮抗性。此外,根据花器官发育的四重奏模型,*E* 类基因也参与四轮花器官的发育。这说明,*CjAGL6* 基因在‘金盘荔枝’花发育时期的表达不是单基因调控的结果,重瓣花的形成也是多基因、多途径共同作用的结果。*CjAGL6* 基因在‘金盘荔枝’瓣化雄蕊中的表达量高于雄蕊以及内轮花瓣中的总体表达量高于外轮花瓣,说明该基因在雄蕊演变为花瓣的过程中具有重要作用,也为重瓣花的雄蕊起源方式提供了参考依据^[64]。进一步研究 *MADS*-box 家族中其他基因的功能及协调作用,将有助于揭示植物重瓣花形成机理,对于植物新品种选育具有重要意义。

参 考 文 献

- Alvarez-Buylla E R, Liljegren S J, Pelaz S, et al. *MADS*-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cell and trichomes [J]. *The Plant Journal*, 2000, 24: 1 – 11.
- Becker A, Theissen G. The major clades of *MADS* – box genes and their role in the development and evolution of flowering plants [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29: 464 – 489.
- Kaufmann K, Melzer R, Theissen G. *MIKC*-type *MADS*-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants [J]. *Genes*, 2005, 347: 183 – 198.
- Hemming M N, Trevaskis B. Make hay when the sun shines: The role of *MADS*-box genes in temperature-dependent seasonal flowering responses [J]. *Plant Science*, 2011, 180(3): 447 – 453.
- Carpenter R, Coen E S. Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus* [J]. *Genes Development*, 1990, 4: 1483 – 1493.
- Bowman J L, Drews G N, Meyerowitz E M. Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development [J]. *The Plant Cell*, 1991, 3: 749 – 758.
- Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development [J]. *Nature*, 1991, 353: 31 – 37.
- Colombo L, Franken J, Koetje E, et al. The petunia *MADS* box gene *FBP11* determines ovule identity [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 1859 – 1868.
- Theissen G, Saedler H. Floral quartets [J]. *Nature*, 2001, 409: 469 – 471.
- Ferrario S, Immink R G, Angenent G C. Conservation and diversity in flower land [J]. *Current Opinion Plant Biology*, 2004, 7: 84 – 91.
- Ng M, Yanofsky M F. Function and evolution of the plant *MADS*-box gene family [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2: 186 – 195.
- Becker A, Theissen G. The major clades of *MADS*-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 29: 464 – 489.
- Nam J, dePamphilis C W, Ma H, et al. Antiquity and evolution of the *MADS*-box gene family controlling flower development in plants [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20: 1435 – 1447.
- Parenicova L, de Folter S, Kieffer M, et al. Molecular and phylogenetic analyses of the complete *MADS*-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the *MADS* world [J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 1538 – 1551.
- Zahn L M, Leebens-Mack J, dePamphilis C W, et al. To B or not to B a flower: the role of *DEFICIENS* and *GLOBOSA* orthologs in the evolution of the angiosperms [J]. *Journal of Heredity*, 2005, 96: 225 – 240.
- Kaufmann K, Melzer R, Theissen G. *MIKC* type *MADS* domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants [J]. *Gene*, 2005, 347(2): 183 – 198.
- Melzer R, Wang Y Q, Theissen G. The naked and the dead: the ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(1): 118 – 28.
- Shore P, Sharrocks A D. The *MADS*-box family of transcription factors [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 229(1): 1 – 13.
- Yang Y, Fanning L, Jack T. The K domain mediates hetero dimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, *APETALA3* and *PISTILLATA* [J]. *The Plant Journal*, 2003, 33(1): 47 – 59.
- Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, et al. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors [J]. *Nature*, 1994, 346: 35 – 39.
- Hu M, Labbé H, Martin T, et al. *PpAG1*, a homolog of *AGA*-

- MOUS*, expressed in developing peach flowers and fruit [J]. *Canadian Journal of Botany*, 84(5): 767 – 776.
22. 朱高浦. 山茶花 MADS-BOX 家族 B 类基因克隆及在重瓣花形成中的作用 [J]. 北京: 中国林业科学研究院, 2011.
23. Jofuku K D, den Boer B G, Van Montagu M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2* [J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 1211 – 1225.
24. 向林, 秦德辉, 李伯钧, 等. 蕙兰 *AG* 基因的克隆和表达分析 [J]. *中国观赏园艺研究进展*, 2011: 134 – 138.
25. 张宪省, 李全梓, 李兴国, 等. 风信子 *HAG1* 基因的克隆与表达 [J]. *中国科学(C 辑)*, 2000, 30(4): 376 – 381.
26. 侯计华. 梅 *AGAMOUS* (*AG*) 基因的克隆与表达分析 [J]. 南京: 南京农业大学, 2009.
27. 吕山花. 太行花 MADS-box 基因克隆、表达模式及功能分析 [J]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006.
28. Bowman J L, Smyth D R, Meyerowitz E M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis* [J]. *Development*, 1991, 112: 1 – 20.
29. Savidge B, Rounsley S D, Yanofsky M F. Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 721 – 733.
30. Davies B, Motte P, Keck E, et al. *PLENA* and *FARINELLI*: Redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development [J]. *EMBO Journal*, 1999, 18: 4023 – 4034.
31. Irish V F, Litt A. Flower development and evolution: gene duplication, diversification and redeployment [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2005, 15: 454 – 460.
32. Tsuchimoto S, Van der Krol A R, Chua N H. Ectopic expression of *pMADS3* in transgenic petunia phenocopies the petunia blind mutant [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5: 843 – 853.
33. Kapoor M, Tsuda S, Tanaka Y, et al. Role of petunia *pMADS3* in determination of floral organ and meristem identity, as revealed by its loss of function [J]. *The Plant Journal*, 2002, 32: 115 – 127.
34. Mandel A M, Yanofsky M F. The *Arabidopsis* *AGL8* MADS box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by *APETALA1* [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7: 1763 – 1771.
35. Ferrandiz C, Gu Q, Martienssen R, et al. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER* [J]. *Development*, 2000, 127: 725 – 734.
36. 赵印泉, 刘青林. 重瓣花的形成机理及遗传特性研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2009, 29(4): 832 – 841.



(上接 324 页)

18. Li Q L, Gao X R, Yu X H, et al. Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco [J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25: 1431 – 1436.
19. 曾幼玲, 幸婷, 蔡忠贞, 等. 盐生植物盐爪爪甜菜碱醛脱氢酶基因的克隆及在盐胁迫下的 *BADH* 基因的表达 [J]. *云南植物研究*, 2007, 29(1): 79 – 84.
20. Chen X J, Wang J L, Zhao Y X, et al. The research on cDNA fragment of betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) gene in *Atriplex centralasiatica* Iljin [J]. *Acta Phytophysiol Sin*, 2001, 27(4): 309 – 312.
21. Reda E A Moghaieb, Hirofumi Saneoka, Kounosuke Fujita. Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima* [J]. *Plant Sci*, 2004, (166) 1345 – 1349.
22. Jia G X, Zhu Z Q, Li Y X. Advances in study of betaine and its genetic engineering for salt tolerance improvement of plants [J]. *Chin Bull Bot*, 2002, 19(3): 272 – 279.
23. Li Y X, Chang F Q, Du L Q, et al. Genetic transformation of watercress with a gene encoding for betaine-aldehyde dehydrogenase (*BADH*) [J]. *Acta Bot Sin*, 2000, 42(5): 480 – 484.
24. Guo B H, Zhang Y M, Li H J, et al. Transformation of wheat with a gene encoding for the betaine ldehyde dehydrogenase (*BADH*) [J]. *Acta Bot Sin*, 2000, 42(3): 279 – 283.
25. Yang X H, Liang Z, Lu C M. Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances Photosynthesis against high temperature stress in transgenic tobacco plants [J]. *Plant Physiol*, 2005, 38: 2299 – 2309.
26. Velasco-Garcia R, Villalobos M A, Ramirez-Romero M A, et al. etaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *E. coli*, and regulation by choline and salt [J]. *Arch Microbiol*, 2006, 185(1): 14 – 22.