

研究报告

A Letter

春兰 *AGL6* 基因的克隆及实时定量表达分析

孙崇波^{1,2} 向林^{1*} 施季森² 胡凤荣² 郭方其¹ 秦德辉¹

¹ 浙江省农业科学院园艺所, 杭州, 310021; ² 南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 南京, 210037

* 通讯作者, regia.chyu@yahoo.com.cn

摘 要 本研究采用 RT-PCR 结合 RACE 技术从春兰(*Cymbidium goeringii*)中分离到一个 *AGL6* 基因。序列分析表明, 该基因含有一个 729 bp 长的开放阅读框(ORF), 共编码 242 个氨基酸。系统进化树分析显示, 该基因属于 MADS-box 基因家族 AP1/AGL9 组的 *AGL6* 同源基因, 其编码的蛋白与其它植物 *AGL6* 类蛋白具有较高的同源性, 命名为 *CgAGL6* (基因登录号为 HM208533)。实时荧光定量表达分析表明, *CgAGL6* 基因春兰不同组织中均有表达, 其中在唇瓣、花芽和子房中的表达量较高, 在花瓣和萼片中的表达量次之, 在根、叶和蕊柱中的表达量最低, 显示了 *CgAGL6* 基因可能在春兰成花转变和花器官的形成过程中起着重要作用。

关键词 春兰, *AGL6* 基因, 实时荧光定量表达, 花发育

Cloning and Real-time Expression Analysis of *AGL6* Gene from *Cymbidium goeringii*

Sun Chongbo¹ Xiang Lin^{1*} Shi Jisen² Hu Fengrong² Guo Fangqi¹ Qin Dehui¹

¹ Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, 310021; ² Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology, Nanjing Forestry University, Ministry of Education, Nanjing, 210037

* Corresponding author, regia.chyu@yahoo.com.cn

DOI: 10.3969/mpb.008.000939

Abstract In this research, a novel *AGL6* gene was isolated from *Cymbidium goeringii* by RT-PCR and RACE-PCR techniques. Sequence analysis showed the gene contained an open reading frame of 729 bp encoding a putative protein of 242 amino acids. Homology analysis showed that the deduced protein was high identity with other *AGL6* proteins from different species, named *CgAGL6* (GenBank accession No. HM208533). Phylogenetic tree analysis also indicated that *CgAGL6* belongs to *AGL6* clade of AP1/AGL9 subfamily. Real-time quantitative PCR demonstrated that *CgAGL6* was expressed in all plant tissues, highly expressed in lips, young buds and ovary, much lower in petals and sepals, and lowest in root, leaves and columns. These results displayed that *CgAGL6* may regulate the flower transition and formation of *C. goeringii*.

Keywords *Cymbidium goeringii*, *AGL6* gene, Real-time quantitative PCR, Floral development

继植物花器官发育的 ABC 模型提出之后(Coen and Meyerowitz, 1991), 又有学者提出了 ABCDE 模型, 并认为 A、B、C、D、E 五类功能基因共同作用来控制植物花器官的形成(TheiBen, 2001; TheiBen and Saedler, 2001)。因这些基因中的多数所编码的蛋白质 N 端都包含一个 DNA 结合保守区, 因此又被称为 MADS-box 基因(Schwarz-Sommer et al., 1990)。然而对参与花发育过程的 MADS-box 基因的研究多集

中在双子叶植物上, 对单子叶植物花发育的研究则主要集中在水稻(*Oryza sativa*)和玉米(*Zea mays*)等禾本科植物上。

AGL6 (*AGAMOUS like 6*)及其同源基因都属于 MADS-box 家族 E 类基因的 AP1/AGL9 组, 目前已从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米(*Zea mays*)、灌状买麻藤(*Gnetum gnemon*)、文心兰(*Oncidium* ssp.)、黑麦草(*Lolium perenne*)和小麦(*Triticum aestivum*)等多

种植物中得以克隆(Ma et al., 1991; Mena et al., 1995; Becker et al., 2003; Hsu et al., 2003; Zhao et al., 2006)。其中拟南芥 *AGL6* 在 4 轮花器官和胚珠中表达(Ma et al., 1991), 玉米 *AGL6* 直系同源基因 *ZAG3* 也显示出花特异的表达模式(Mena et al., 1995)。Hsu 等(2003)又分别在文心兰(*Oncidium Gower Ramsey*)花分生组织、唇瓣和心皮中检测到 *AGL6* 类基因 *OMADS1* 的表达, 但在营养叶、雄蕊、萼片和花瓣中并没检测到其表达。但总体而言, 对 *AGL6* 基因及其同源基因的功能了解仍甚少。

兰科(Orchidaceae)是单子叶植物中一个十分进化的支系, 是被子植物中仅次于菊科与豆科的第 3 大科, 许多种类均是著名的观赏花卉。目前对兰科植物花发育相关的基因的研究多集中在蝴蝶兰(*Phalaenopsis* spp.)、文心兰(*Oncidium* spp.)及石斛兰(*Dendrobium* spp.)等产自国外的兰花种类上(Tsai et al., 2004; Chang et al., 2009; Xu et al., 2006), 而对中国兰尤其是中国兰的地生种类的研究几乎处于空白。春兰(*Cymbidium goeringii*)是中国兰地生种类的主要种之一。其花具有典型的轮状结构, 基本与双子叶植物花的结构组成一致, 而且其又具有高度特化的唇瓣, 为研究花发育基因在单子叶植物中的功能提供了较为理想的实验材料。本研究以春兰为材料, 利用 RT-PCR 结合 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术获得了一个与花发育相关的 *AGL6* 基因, 并对其进行了表达分析。通过本研究, 期望对花发育 ABCDE 模型在单子叶植物中的体现做出进一步的阐释, 为揭示春兰花发育机理奠定理论基础, 同时也为中国兰花的遗传改良开辟一条新途径。

1 结果与分析

1.1 *CgAGL6* 基因全长 cDNA 的克隆

以春兰花芽 RNA 为模板进行反转录, 再以反转录产物 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得部分片段, 测序分析表明, 获得了 *AGL6* 基因的部分序列。根据所得序列设计 3'RACE 和 5'RACE 特异引物, 按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 的说明书进行 cDNA 末端扩增, 测序后将两端拼接在一起就得到基因全长 cDNA 序列(图 1)。BLASTX 的结果显示, 全长 cDNA 与不同物种 *AGL6* 基因有较高的同源性, 因此, 我们将基因命名为 *CgAGL6*, GenBank 登录号为 HM208533。*CgAGL6* 基因含有一个 729 bp 长的开放阅读框, 共编码 242 个氨基酸, 分子

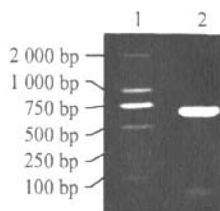


图 1 春兰 *AGL6* 基因全长扩增

注: 1: 分子量标记 DL2000; 2: *AGL6* 基因

Figure 1 Amplification profile of the putative full-length fragment of *AGL6* gene from *C. goeringii*

Note: 1: DL2000 DNA Marker; 2: *AGL6* gene

量为 27.9 kD, 预测等电点为 9.23。

1.2 *CgAGL6* 基因序列分析

CgAGL6 蛋白与我们从蕙兰(*C. faberi*)克隆的 *AGL6* 基因蛋白(GenBank 登录号为 HM208534)高度同源, 同源性为 99%, 仅有第 130 位和 144 位的氨基酸存在差异, 与 API/AGL9 组的其它蛋白比较也均具有较高的同源性。与文心兰(*Oncidium* spp.) *OMADS7* 和 *OMADS1* 以及石刁柏(*Asparagus officinalis*)、番红花(*Crocus sativus*)、风信子(*Hyacinthus orientalis*)、水仙(*Narcissus tazetta*)、蜡梅(*Chimonanthus praecox*)和早花百子莲(*Agapanthus praecox*)的 *AGL6* 同源基因分别有 92%、63%、82%、82%、79%、78%、77%和 78%的同源性(图 2)。*CgAGL6* 蛋白与其它 MADS-box 基因蛋白一样含有典型 MADS-box 和 K 结构域, 并在 C 端含有特有的 SEP/AGL6 保守结构域(图 2)。

系统进化树分析表明 API/AGL9 亚族分为 *AGL6*、SEP 和 API 三个分支, 其中 *AGL6* 与 SEP 分支为姊妹关系。*AGL6* 分支又进一步分为 4 个组, 即单子叶植物组、木兰组、双子叶植物组和裸子植物组。*CgAGL6* 属于 *AGL6* 分支的单子叶植物组(图 3), 与蕙兰(*C. faberi*)的 *CfAGL6* 和文心兰(*Oncidium*)的 *OMADS7* 关系最近, 与它植物 *AGL6* 类基因的高度相似性, 表明 *CgAGL6* 为 *AGL6* 的同源基因。

1.3 *CgAGL6* 基因在不同器官的表达分析

为了确定 *CgAGL6* 基因在春兰不同部位的表达差异, 提取了花芽、花瓣、萼片、唇瓣、蕊柱、子房、根、叶的 RNA, 以 18S rRNA 为对照, 进行实时荧光定量表达分析。结果表明(图 4), *CgAGL6* 基因在花芽中的表达量最高, 在子房和唇瓣中的表达量次之, 在花瓣和萼片中的表达量相近, 约为花芽表达量的 70%, 在根和叶中的表达量很少, 只有花芽表达量的 2%左右。

CgAGL6	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSA	1
CfAGL6	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSA	1
OMADS7	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSA	1
AoMADS	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSA	1
HoMADS	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSA	1
CsAGL6a	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSA	1
NiMADS	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSA	1
ApSEP1	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSA	1
CpAGL6	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSV	1
OMADS1	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSP	1
AtSEP4	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSS	1
PhFBP4	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSS	1
AmDEFH49	MGRGRVELKRIENKINRQVTFSSKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIIFSSRGKLYEFGSS	1
MADS-box domain		
CgAGL6	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
CfAGL6	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
OMADS7	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
AoMADS	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
HoMADS	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
CsAGL6a	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
NiMADS	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
ApSEP1	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
CpAGL6	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
OMADS1	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
AtSEP4	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
PhFBP4	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
AmDEFH49	GT--CKTLERYQSSCLNSQATNSIDRETQS--WYQEVSKLKSFKFESLQRSRHNLLGEDLGF	61
K-domain		
CgAGL6	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
CfAGL6	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
OMADS7	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
AoMADS	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
HoMADS	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
CsAGL6a	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
NiMADS	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
ApSEP1	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
CpAGL6	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
OMADS1	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
AtSEP4	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
PhFBP4	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
AmDEFH49	LNVKELQQLERQLSALSQARQK--TQIMLDQMEELRKK--ERQLGEINKQLKMKLEAGGG	118
SEP/AGL6 motif		
CgAGL6	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
CfAGL6	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
OMADS7	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
AoMADS	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
HoMADS	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
CsAGL6a	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
NiMADS	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
ApSEP1	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
CpAGL6	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
OMADS1	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
AtSEP4	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
PhFBP4	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
AmDEFH49	SLRLMVGSS--WESDAVVEG--NAFQMHPPYQSSSLECEPTLHIG--YHHYVP	176
CgAGL6	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
CfAGL6	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
OMADS7	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
AoMADS	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
HoMADS	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
CsAGL6a	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
NiMADS	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
ApSEP1	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
CpAGL6	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
OMADS1	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
AtSEP4	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
PhFBP4	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221
AmDEFH49	PETVLPFRPGVENNFNMLGWML	221

图2 *CgAGL6* 基因与 AP1/AGL9 组蛋白之间的比较

注: 蕙兰的 *CfAGL6* (HM208534), 石刁柏的 *AoMADS* (AAQ83835), 风信子的 *HoMADS* (AAT88088), 番红花的 *CsAGL6a* (ABK3528-1), 水仙的 *NiMADS* (ABX47015), 早花百子莲 *ApSEP1* (BAC66964), 蜡梅的 *CpAGL6* (ACN88212), 拟南芥的 *AtSEP4* (NP_178466), 矮牵牛的 *PhFBP4* (AAK21247) 以及金鱼草的 *AmDEFH49* (CAA64741), 文心兰的 *OMADS1* 和 *OMADS7* 序列来自文献 (Hsu et al., 2003 和 Chang et al., 2009); 黑框表示保守的 SEP/AGL6 motif; 下划线表示 MADS-domain 和 K-domain

Figure 2 Comparisons of the *CgAGL6* amino acid sequences and AP1/AGL9 group proteins

Note: *CgAGL6* sequence was aligned with AP1/AGL9 group proteins from *C. faberi* (HM208534), *Asparagus officinalis* (AAQ83835), *Hyacinthus orientalis* (AAT88088), *Crocus sativus* (ABK35281), *Narcissus tazetta* (ABX47015), *Agapanthus praecox* (BAC66964), *Chimonanthus praecox* (ACN88212), *Arabidopsis thaliana* (NP_178466), *Petunia hybrida* (AAK21247), *Antirrhinum majus* (CAA64741) and *Oncidium Gower Ramsey* using ClustalW (Hsu et al., 2003; Chang et al., 2009); The highly conserved SEP/AGL6 motif of AGL6 homologs is indicated in black column; The MADS-box domain at the N terminus and the K-box domain in the middle region are underlined, respectively

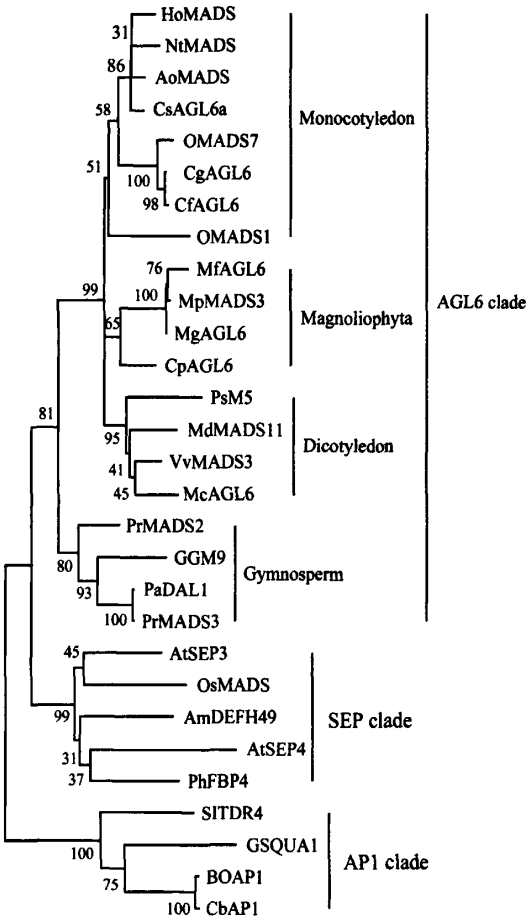


图3 *CgAGL6* 及其它 AP1/AGL9 组蛋白的基因进化树分析
注: 除了图2中用于多序列比对的部分基因序列外, 其它序列来源为: 拟南芥的 *AtSEP3* (NP_564214), 花椰菜的 *BOAP1* (CA-A86024), 芥菜的 *CbAP1* (ACD76816), 非洲菊的 *GSQUA1* (CAA08805), 灌状买麻藤的 *GGM9* (CAB44455), 广玉兰的 *Mg-AGL6* (AAY25579), 皱叶木兰的 *MpMADS3* (BAB70738), 苹果的 *MdMADS11* (CAA04325), 含笑的 *MfAGL6* (AAP83381), 苦菜的 *McAGL6* (ABE03878), 水稻的 *OsMADS* (AAB50180), 挪威云杉的 *PaDAL1* (CAA56864), 辐射松的 *PrMADS2* (AAD09207), *PrMADS3* (AAB58907), 豌豆的 *PsM5* (AAX69067), 番茄的 *SITDR4* (CAA43169), 葡萄 *VvMADS3* (AAM21343)。各节点处数字表示 bootstrap 值(重复1000次)
Figure 3 Phylogenetic tree analysis of AP1/AGL9-like proteins including *CgAGL6*
Note: The AP1/AGL9-like genes are from *Arabidopsis thaliana* (NP_564214) *Brassica oleracea* (CAA86024), *Capsella bursa* (ACD76816), *Gerbera hybrid* (CAA08805), *Gnetum gnemon* (CAB-44455), *Magnolia grandiflora* (AAY25579), *Magnolia praecocissima* (BAB70738), *Malus domestica* (CAA04325), *Michelia figo* (AAP83381), *Momordica charantia* (ABE03878), *O. stativa* (AAB-50180), *Picea abies* (CAA56864); *Pinus radiata* (AAD09207, AAB-58907); *Pisum sativum* (AAX69067); *Solanum lycopersicum* (CAA43169) and *Vitis vinifera* (AAM21343). The numbers at node represent the bootstrap values (with 1 000, respectively)

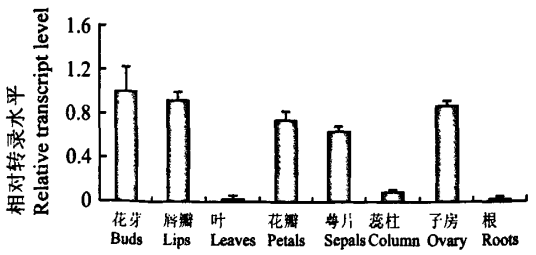


图4 *CgAGL6* 基因在春兰各器官以及花芽中的表达情况
Figure 4 Real-time quantitative PCR analysis of *CgAGL6* mRNA expression in the flower buds, lips, leaves, petals, sepals, column, ovary and roots of *C. goeringii* plants

2 讨论

研究表明被子植物中大多数 MADS-box 基因参与花发育的不同阶段, 相互之间可能形成复杂复合物并构成复杂的网络来决定花原基和器官的特征以及调节花发育的整个过程(Jack, 2004; Tan and Swain, 2006)。如果能克隆和鉴定出一些花发育相关基因, 并对这些基因的表达、功能、调控方式等方面进行深入研究, 将对揭开植物基因作用途径的花发育调控机理起着至关重要的作用。本研究利用同源序列法结合 RACE 技术从春兰中克隆出了一个 MADS-box 基因 *CgAGL6*。将 *CgAGL6* 与其它物种植物的 MADS-box 基因进行比较分析后, 结果显示 *CgAGL6* 与其它植物的 *AGL6* 类基因具有较高的同源性, 如 *CgAGL6* 蛋白与文心兰 *OSMADS7* 蛋白同源性高达 92%, 与风信子 *HoMADS* 也有 79% 的同源性, 并且在 *CgAGL6* 蛋白 C 端含有 SEP/AGL6 保守结构域, 而在进化树分析中, *CgAGL6* 也与其它植物种类的 *AGL6* 类基因关系密切, 这些结果说明 *CgAGL6* 可能是春兰中的 *AGL6* 同源基因。

对 *CgAGL6* 基因在春兰不同组织中的表达进行分析, 结果表明 *CgAGL6* 具有种子植物 *AGL6* 类基因共有的表达特性, 它们在花器官和花芽中都大量表达(Mouradov et al., 1998; Boss et al., 2002; Hsu et al., 2003; Carlsbecker et al., 2004; Chang et al., 2009; Rijpkema et al., 2009; Ohmori et al., 2009)。根据 *AGL6* 基因特异性的表达模式初步可以推断该类基因具有控制开花时间和花器官发生的基本功能。

尽管 *AGL6* 类基因的表达都具有花特异性, 但是其在花器官中的表达模式在同一分类群中具相似性, 而在不同类群之间却存在着某些差异。双子叶植物中, 矮牵牛的 *Pmads4* 和 *PhAGL6* 以及拟南芥的 *AGL6/AGL13* 均以花器官轮特异的方式在 4 轮花器官表达(Ma et al., 1991; Tsuchimoto et al., 2000; Rijpkema et al., 2009)。在裸子植物的 *AGL6* 类基因

中, 灌状买麻藤的 *GGM9* 和 *GGM11*, 挪威云杉的 *DAL1* 以及辐射松的 *P-MADS2* 和 *P-MADS3* 均在幼年向成熟转化的芽、珠鳞、小孢子叶中表达, 而 *P-MADS3* 也在针叶原基的原始细胞中表达(Winter et al., 1999; Tandre et al., 1995; Mouradov et al., 1998), 因此, 它们的主要功能也是与幼年向成熟转化、雌雄生殖器官发育有关。在单子叶植物中, 与 *CgAGL6* 同源性极高的文心兰 *OSMADS7* 基因在花芽、萼片、花瓣、唇瓣、蕊柱和心皮中都有表达(Chang et al., 2009), 风信子的 *HoAGL6* 也在花芽、花被、心皮和胚珠中都有表达(Fan et al., 2007), 这与 *CgAGL6* 基因的表达模式是一致的。文心兰的另一个 *AGL6* 类基因 *OMADS1* 的表达与 *CgAGL6* 基因部分相似, 在花瓣和心皮中表达, 而在花萼和雄蕊中无表达, 这可能是因为 *AGL6-like* 基因在进化过程中经过突变而改变了部分氨基酸序列, 产生了不同的分支, 从而改变了部分功能(Hsu et al., 2003)。由上可知, *AGL6* 类基因在各类花器官或同功器官中均有表达, 但在不同的植物类群之间又存在一定的差异, 这些表达模式的差异可能是为了满足在不同植物中塑造不同花结构发育的需要而产生的。

前人研究结果发现文心兰 *OMADS1* 和 *OSMADS7* 基因(Hsu et al., 2003; Chang et al., 2009)、矮牵牛的 *PhAGL6* 基因在子房中表达(Rijpkema et al., 2009), 而本研究也证实了 *CgAGL6* 基因在子房中大量表达, 从以上结果推测 *AGL6* 基因除了在控制开花时间和花器官的发生过程中起作用外, 同时也在子房发育过程中起作用。此外有研究表明风信子 *HoAGL6* 通过促进 *SOC1* 和 *LFY* 的表达来调节开花时间, 以及通过激活 *AG* 和 *SEPI* 参与了花器官发育(Fan et al., 2007), 文心兰 *OMADS1* 通过激活 *FT* 和 *SOC1* 来影响开花转化, 并影响花器官形成(Hsu et al., 2003)。*CgAGL6* 基因在春兰中如何行使其功能我们今后将对其做进一步研究。

3 材料与方法

3.1 材料

以种植于浙江省农业科学院园艺所花卉中心温室内的春兰品种‘苍岩素’为实验材料, 采集 5 mm 长的花芽、花蕾、刚刚绽开时的花瓣、萼片、唇瓣、蕊柱、子房、根、叶立即冻存于液氮中, 带回实验室保存在 -70℃ 的冰箱中备用。

3.2 总 RNA 的提取和 *AGL6* 基因的克隆

采用北京天恩泽基因公司 RNAout 2.0 试剂盒

提取春兰‘苍岩素’花芽总 RNA, 用美国 Clontech 公司 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 合成 cDNA 第一链, 以反转录模板直接进行 PCR 反应。

根据 *AGL6* 基因的保守区域设计引物进行 PCR 扩增, 上游引物 AGL6-1 为: 5'-GAGGGAGAGTTGA GCTGAAGAGG-3', 下游引物 AGL6-2 为: 5'-GCTG CMRAAYTCATARAGCTT-3'。PCR 扩增条件为: 94℃ 变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 52~42℃ 复性 30 s (每进行 5 个循环退火温度下降 2℃), 72℃ 延伸 1 min, 总共进行 35 个循环后再 72℃ 延伸 8 min。

PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳回收, 连接到 pMD18-T 载体上, 热激转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选。选取白色菌落进行液体培养, PCR 检测阳性克隆, 送上海英骏生物技术公司测序。

根据扩增产物的测序结果设计: 3'RACE 引物 AGL6-3: 5'-TCCAAGCGTAGAAATGGTCTCCTC-3'; 巢式引物 AGL6-4: 5'-GCGACGCAGAGGTAATC AT-3'; 5'RACE 引物 AGL6-5: 5'-TGATTAGGGCT ACCTCTGCGTCG-3'; 巢式引物 AGL6-6: 5'-CTTG AGGAGACCATTCTACGCTTG-3'。

采用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒进行 3' 端和 5' 端的 RACE 反应。将 3' 端和 5' 端的 RACE 反应产物分别回收, 连接 pMD182T 载体, 转化测序。拼接后获得基因全长。

3.3 序列分析

对于获得基因的全长 cDNA 序列, 先在 <http://au.expasy.org/tools/dna.html> 进行开放阅读框的分析; 之后用 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/prot-param.html>) 软件来分析 *AGL6* 蛋白的基本性质, 再使用 ClustalX 1.83 软件进行氨基酸水平的序列比对, 用 Boxshade 3.21 软件(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) 进行显示。然后运用 Blast 搜索(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 基因的同源基因, 使用 ClustalX 1.83 软件对搜索得到的基因进行多重序列比对, 再使用 MEGA4 软件中的邻位相连法进行系统发生树的构建, 并进行 Bootstrap 检测(Saitou and Nei, 1987)。

3.4 *CgAGL6* 基因的实时荧光定量表达分析

采用北京天恩泽基因公司 RNAout 2.0 试剂盒提取, 分别提取春兰‘苍岩素’的花瓣、萼片、唇瓣、蕊柱、子房、根和叶的 RNA, 用天根生化科技(北京)有限公司的 Quantscript RT Kit 进行反转录, 之后荧光染料法进行实时荧光定量表达分析。根据春兰已有

的 18S rRNA 序列和克隆基因序列, 结合实时荧光定量 PCR 原理设计引物, 用 18S rRNA 基因作为内标。

18S rRNA 基因引物序列: 上游引物: 5'-TGC-CGTTTCCCTGTTGATTC-3'; 下游引物: 5'-TGCT-GCCTTCCTTGGATGTG-3'。

AGL6 基因引物序列: 上游引物: AGL6-7: 5'-A GGCCAGGCAAAGAAAGACA-3'; 下游引物: AGL 6-8: 5'-GCCTTCAACCACAGCATCAGA-3'。

反应程序为: 95℃ 3 min, 然后 95℃ 15 s, 60℃ 1 min 循环 40 次, 每个处理重复 3 次, 数据通过 Sequence Detector Version 1.3.1 输出, 并转换为 Excel 格式, 再分析。整个过程在 IQ5 荧光定量 PCR 仪 (BioRad 公司) 上进行。

参考文献

- Becker A., Saedler H., and Theissen G., 2003, Distinct MADS-box gene expression patterns in the reproductive cones of the gymnosperm *Gnetum gnemon*, *Development Genes and Evolution*, 213(11): 567-572
- Boss P.K., Sensi E., Hua C., Davies C., and Thomas M.R., 2002, Cloning and characterization of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development, *Plant Science*, 162(6): 887-895
- Carlsbecker A., Tandre K., Johanson U., Englund M., and Engström P., 2004, The MADS-box gene *DALI* is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*), *Plant J.*, 40(4): 546-557
- Chang Y.Y., Chiu Y.F., Wu J.W., and Yang C.H., 2009, Four orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *API/AGL9*-like MADS box genes show novel expression patterns and cause different effects on floral transition and formation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiology*, 50(8): 1425-1438
- Coen E.S., and Meyerowitz E.M., 1991, The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development, *Nature*, 353: 31-37
- Fan J.H., Li W.Q., Dong X.C., Guo W., and Shu H.R., 2007, Ectopic expression of a hyacinth *AGL6* homolog caused earlier flowering and homeotic conversion in *Arabidopsis*, *Science in China Series C: Life Sciences*, 50(5): 676-689
- Hsu H.F., Huang C.H., Chou L.T., and Chang H.Y., 2003, Ectopic expression of an orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AGL6*-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology*, 44(8): 783-794
- Jack T., 2004, Molecular and genetic mechanisms of floral control, *The Plant Cell*, 16: S1-S17
- Ma H., Yanofsky M.F., and Meyerowitz E.M., 1991, *AGLI-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes, *Genes Development*, 5: 484-495
- Mena M., Mandel M.A., Lerner D.R., Yanofsky M.F., and Schmidt R.J., 1995, A characterization of the MADS-box gene family in maize, *Plant J.*, 8: 845-854
- Mouradov A., Glassick T.V., Hamdorf B.A., Murphy L.C., Marla S.S., Yang Y., and Teasdale R.D., 1998, Family of MADS-box genes expressed early in male and female reproductive structure of monterey pine, *Plant Physiol.*, 117: 55-61
- Ohmori S., Kimizu M., Sugita M., Miyaoc A., Hirochikac H., Uchidaa E., Nagatob Y., and Yoshidaa H., 2009, *MOSAIC FLORAL ORGANS1*, an *AGL6-Like* MADS box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice, *The Plant Cell*, 21(10): 3008-3025
- Rijkema A.S., Zethof J., Gerats T., and Vandenbussche M., 2009, The petunia *AGL6* gene has a *SEPALLATA*-like function in floral patterning, *Plant J.*, 60(1): 1-9
- Saitou N., and Nei M., 1987, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology Evolution*, 4(4): 406-425
- Schwarz-Sommer Z., Huijser P., Nacken W., Saedler H., and Sommer H., 1990, Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*, *Science*, 250(4983): 931-936
- Tan F.C., and Swain S.M., 2006, Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants, *Physiologia Plantarum*, 128(1): 8-17
- Tandre K., Albert V.A., Sundas A., and Engström P., 1995, Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms, *Plant Molecular Biology*, 27(1): 69-78
- TheiBen G., 2001, Development of floral organ identity: stories from the MADS house, *Current Opinion in Plant Biology*, 4(1): 75-85
- TheiBen G., and Saedler H., 2001, Plant biology: floral quartets, *Nature*, 409: 469-471
- Tsai W.C., Kuoh C.S., Chuang M.H., Chen W.H., and Chen H.H., 2004, Four DEF-like MADS box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* orchid, *Plant and Cell Physiology*, 45(7): 831-844
- Tsuchimoto S., Mayama T., van der Krol A., and Ohtsubo E., 2000, The whorl-specific action of a petunia class B floral homeotic gene, *Genes to Cells*, 5(2): 89-99
- Winter K.U., Becker A., Münster T., Kim J.T., Saedler H., and Theissen G., 1999, MADS-box genes reveal that gnephytes are more closely related to conifers than to flowering plants, *Proc.Nat. Acad. Sci., USA*, 96(13): 7342-7347
- Xu Y.F., Teo L.L., Zhou J., Kumar P.P., and Yu H., 2006, Floral organ identity genes in the orchid *Dendrobium crumenatum*, *Plant J.*, 46(1): 54-68
- Zhao T., Ni Z., Dai Y., Yao Y.Y., Nie X.L., and Sun Q.X., 2006, Characterization and expression of 42 MADS-box genes in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Molecular Genetics and Genomics*, 276(4): 334-350

作者: [孙崇波](#), [向林](#), [施季森](#), [胡凤荣](#), [郭方其](#), [秦德辉](#), [Sun Chongbo](#), [Xiang Lin](#),
[Shi Jisen](#), [Hu Fengrong](#), [Guo Fangqi](#), [Qin Dehui](#)

作者单位: [孙崇波, Sun Chongbo \(浙江省农业科学院园艺所, 杭州, 310021; 南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 南京, 210037\)](#), [向林, 郭方其, 秦德辉, Xiang Lin, Guo Fangqi, Qin Dehui \(浙江省农业科学院园艺所, 杭州, 310021\)](#), [施季森, 胡凤荣, Shi Jisen, Hu Fengrong \(南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 南京, 210037\)](#)

刊名: [分子植物育种](#)

英文刊名: [MOLECULAR PLANT BREEDING](#)

年, 卷(期): 2010, 08(5)

被引用次数: 9次

参考文献(24条)

1. [Annette Becker; Heinz Saedler; Gunter Theissen](#) [Distinct MADS-box gene expression patterns in the reproductive cones of the gymnosperm Gnetum gnemon](#) [外文期刊] 2003(11)
2. [Boss PK; Sensi E; Hua C; Davies C; Thomas MR](#) [Cloning and characterisation of grapevine \(Vitis vinifera L.\) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development](#) [外文期刊] 2002(6)
3. [Carlsbecker A; Tandré K; Johanson U; Englund M and Engstrom P](#) [The MADS-box gene DALI is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce \(Picea abies\)](#) 2004(04)
4. [Chang Y. Y.; Chin Y. F.; Wu J. W.; Yang C. H](#) [Four orchid \(Oncidiura Gower Ramsey\) AP1/AGL9-like MADS box genes show novel expression patterns and cause different effects on floral transition and formation in Arabidopsis thaliana](#) 2009(08)
5. [Coen E. S.; Meyerowitz E. M](#) [The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development](#) 1991
6. [FAN JinHui, LI WenQing, DONG XiuChun, GUO Wei, SHU HuaiRui](#) [Ectopic expression of a hyacinth AGL6 homolog caused earlier flowering and homeotic conversion in Arabidopsis](#) [期刊论文]-[中国科学C辑\(英文版\)](#) 2007(5)
7. [Hsu HF; Huang CH; Chou LT; Yang CH](#) [Ectopic expression of an orchid \(Oncidium Gower Ramsey\) AGL6-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in Arabidopsis thaliana](#) [外文期刊] 2003(8)
8. [Jack T](#) [Molecular and genetic mechanisms of floral control](#) 2004
9. [Ma H; Yanofsky M. F.; Meyerowitz E. M](#) [A GL1-A GL6, an Arabidopsis gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes](#) 1991
10. [Mena M; Mandel M. A.; Lerner D. R.; Yanofsky M. F and Schmidt R. J](#) [A characterization of the MADS-box gene family in maize](#) 1995
11. [Mouradov A; Glassick T. V.; Hamdorf B. A.; Murphy L. C Marla S. S Yang Y and Teasdale R. D](#) [Family of MADSbox genes expressed early in male and female reproductive structure of monterey pine](#) 1998
12. [Ohmori S; Kimizu M; Sugita M; Miyaoc A, Hirochikac H, Uchidaa E, Nagatob Y, Yoshidaa H](#) [MOSAIC FLORAL ORGANS1, an A GL6-Like MADS box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice](#) 2009(10)
13. [Rijpkema A. S.; Zethof J; Gerats T; Vandenbussche M](#) [The petunia A GL6 gene has a SEPALLA TA-like function in floral patterning](#) 2009(01)

14. [Saitou N;Nei M The neighbor-joining method:a new method for reconstructing phylogenetic trees](#) 1987(04)
15. [Schwarz-Sommer Z;Huijser P;Nacken W;Saedler H and Sommer H Genetic control of flower development by homeotic genes in Antirrhinum majus](#) 1990(4983)
16. [Tan, FC;Swain, SM Genetics of flower initiation and development in annual and perennial plants](#)[外文期刊] 2006(1)
17. [Tandre K.;Sundas A.;Engstrom P.;Albert VA. CONIFER HOMOLOGUES TO GENES THAT CONTROL FLORAL DEVELOPMENT IN ANGIOSPERMS](#)[外文期刊] 1995(1)
18. [TheiBen G Development of floral organ identity:stories from the MADS house](#) 2001(01)
19. [TheiBen G;Saedler H Plant biology:floral quartets](#) 2001
20. [Tsai W.C;Kuoh C.S;Chuang M.H;Chen W.H and Chen H.H Four DEF-like MADS box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in Phalaenopsis orchid](#) 2004(07)
21. [Tsuchimoto S;Mayama T;van der Krol A;Ohtsubo E The whorl-specific action of a petunia class B floral homeotic gene](#) 2000(02)
22. [Winter K.U;Becker A;Münster T;Kiln J.T;Saedler H, Theissen G MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants](#) 1999(13)
23. [Xu Y;Teo LL;Zhou J;Kumar PP;Yu H Floral organ identity genes in the orchid Dendrobium crumenatum](#) [外文期刊] 2006(1)
24. [Zhao T;Ni ZF;Dai Y;Yao YY;Nie XL;Sun QX Characterization and expression of 42 MADS-box genes in wheat \(Triticum aestivum L.\)](#)[外文期刊] 2006(4)

本文读者也读过(9条)

1. [谢灿, 张劲松, 陈受宜 烟草花发育基因Nfbp6在花粉和胚珠形成过程中的特异表达](#)[期刊论文]-[中国科学C辑](#) 1999, 29(5)
2. [陈小强, 李秀兰, 王春国, 张勇, 宋文芹, 陈瑞阳, Chen Xiaoqiang, Li Xiulan, Wang Chunguo, Zhang Yong, Song Wenqin, Chen Ruiyang 大花蕙兰授粉后子房cDNA差异表达片段序列分析](#)[期刊论文]-[园艺学报](#)2006, 33(4)
3. [刘月学, 胡桂兵, 林顺权, 刘宗莉, 陈厚彬, LIU Yue-xue, HU Gui-bing, LIN Shun-quan, LIU Zong-li, CHEN Hou-bin 枇杷LEAFY同源基因的克隆及序列分析](#)[期刊论文]-[华南农业大学学报](#)2005, 26(2)
4. [张传义 AFL2基因的菊花遗传转化和AFL1基因的原核表达研究](#)[学位论文]2007
5. [杨加付, 饶立兵, 叶子弘, YANG Jia-fu, RAO Li-bing, YE Zi-hong 花椰菜花球球径的发育遗传研究](#)[期刊论文]-[浙江大学学报\(农业与生命科学版\)](#) 2010, 36(1)
6. [罗聪, 何新华, 陈虎, 蒋雅琴, 高美萍, 李杨瑞, Luo Cong, He Xinhua, Chen Hu, Jiang Yaqin, Gao Meiping, Li Yangrui 芒果API同源基因的克隆及其生物信息学分析](#)[期刊论文]-[基因组学与应用生物学](#)2009, 28(5)
7. [许震震, 刘洪科, XU Zhen-huan, LIU Hong-Ke 大花蕙兰研究进展](#)[期刊论文]-[安徽农学通报](#)2008, 14(19)
8. [崔波, 李长看, 马杰, 张仙云, 袁秀云, 叶永忠, Cui Bo, Li Changkan, Ma Jie, Zhang Xianyun, Yuan Xiuyun, Ye Yongzhong 萼脊兰ACC氧化酶基因片段的克隆及其反义基因表达载体的构建](#)[期刊论文]-[生物技术通报](#)2009(12)
9. [吴开云 大花蕙兰抗病转基因体系及相关技术研究](#)[学位论文]2008

引证文献(5条)

1. [李冬梅, 吕复兵, 朱根发, 操君喜, 李伟锋, 孙映波 兜兰DEFICIENS \(DEF\) 一和GLOBOSA \(GLO\) -like基因的克隆及](#)

[表达分析](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#) 2012(02)

2. [黄玮婷](#) [国兰FT基因的克隆和功能分析](#)[学位论文]硕士 2011

3. [秦德辉](#), [向林](#), [李小白](#), [吴超](#), [孙崇波](#) [春兰花发育时期的酵母双杂交文库的构建及评价](#)[期刊论文]-[浙江农业学报](#) 2015(03)

4. [田云芳](#), [蒋素华](#), [袁秀云](#), [马杰](#), [崔波](#) [兰科植物花发育相关基因的研究进展](#)[期刊论文]-[北方园艺](#) 2014(12)

5. [王珍华](#), [胡立霞](#), [钟丹](#), [韩雪](#), [庞基良](#) [AGAMOUS like 6亚家族基因研究进展](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#) 2012(07)

引用本文格式: [孙崇波](#). [向林](#). [施季森](#). [胡风荣](#). [郭方其](#). [秦德辉](#). [Sun Chongbo](#). [Xiang Lin](#). [Shi Jisen](#). [Hu Fengrong](#).
[Guo Fangqi](#). [Qin Dehui](#) [春兰AGL6基因的克隆及实时定量表达分析](#)[期刊论文]-[分子植物育种](#) 2010(5)