浙 江 农 林 大 学 学 报, 2011, **28**(6): 900 – 906 Journal of Zhejiang A & F University

# 文心兰花发育相关基因 OAP3 的克隆与表达分析

徐小雁<sup>1,2</sup>、田 敏<sup>1</sup>、王彩霞<sup>1</sup>、龙明华<sup>2</sup>

(1. 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所,浙江 富阳 311400; 2. 广西大学 农学院,广西 南宁 530003)

摘要:为研究兰花 MADS-box 基因的表达与花器官发育之间的关系,以文心兰'百万金币'*Oncidium* 'Milliongolds'为 材料,通过 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)方法克隆到 1 个花发育相关的 MADS-box 基因,命 名为 *OAP* 3 (GenBank 登录号为 GU644447)。该基因全长 799 bp,编码 204 个氨基酸,具有典型的 MADS 结构域和K 结构域,与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等物种的 *AP* 3-like 同源基因所编码的氨基酸同源性达到 50%~78%。进化树 分析表明: *OAP* 3 属于花器官发育 B 类基因,但该基因却不存在 B 类基因 C-端共有的结构域。逆转录聚合酶链式 扩增反应(qRT-PCR, quantitative RT-PCR)表达分析表明:从抽花开始,随花芽的生长,该基因相对表达丰度呈明显上升 趋势; *OAP* 3 在文心兰萼片、花瓣、唇瓣、雄蕊、雌蕊以及营养器官叶片和花茎中都表达。图 5 表 1 参 17 关键词:分子生物学;文心兰;花器官形成;MADS-box基因;*OAP* 3 基因;qRT-PCR 中图分类号:Q781;S682.31 文献标志码;A 文章编号:2095-0756(2011)06-0900-07

## Cloning and expression analysis of a flowering-related gene, OAP 3, in Oncidium

XU Xiao-yan<sup>1,2</sup>, TIAN Min<sup>1</sup>, WANG Cai-xia<sup>1</sup>, LONG Ming-hua<sup>2</sup>

Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China; 2.
 Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530003, Guangxi, China)

Abstract: To investigate the expression pattern of MADS-box gene during the development of the orchids flower, the floral organ identity gene OAP 3 with a MADS-box motif was cloned from an orchid plant through the RT-PCR, *Oncidium* 'Milliongolds' (GenBank accession No.GU644447). Then a sequence analysis and a phylogenetic analysis were conducted along with a quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The full length cDNA of OAP 3 was 799 bp with an open reading frame (ORF) encoding 204 amino acids. The deduced amino acids sequence contained a typical MADS domain and a K domain, and the sequence analysis indicated that OAP 3 shared 50%–78% homology in the amino acid sequence with *Arabidopsis thaliana* and other species of APETALA3 homologues. The phylogenetic analysis suggested that OAP 3 belonged to the B gene, but four consensus motifs identified in the C-terminal region of the B group genes were absent in the OAP 3 gene. The qRT-PCR analysis showed that OAP 3 mRNA increased with flower bud development, as well as in all four floral organs, vegetative leaves, and shoots. [Ch, 5 fig. 1 tab. 17 ref.] Key words: molecular biology; *Oncidium* 'Milliongolds'; floral initiation; MADS-box genes; OAP 3 gene;

Key words: molecular biology; *Oncidium* 'Milliongolds'; floral initiation; MADS-box genes; *OAP* 3 gene; qRT-PCR

ABC模型通过3类同源异型基因的相互作用预测了植物花器官的形成<sup>11</sup>,从模式植物拟南芥Arabidopsis thaliana中已经分离出的这类同源异型基因有APETALA1(AP1), APETALA2(AP2), APETALA3(AP3),

作者简介:徐小雁,从事作物细胞工程与生物技术研究。E-mail: xuxiaoyan\_hope@163.com。通信作者:田敏,副 研究员,博士,从事园林花卉育种及生物技术研究。E-mail: tmin115@163.com

收稿日期: 2010-12-17; 修回日期: 2011-03-24

基金项目:国家林业局引进国际先进农业科学技术计划("948"计划)项目(2008-4-25);浙江省花卉产业创新团队 项目(2009R50034)

PISTILLATA (PI), AGAMOUS(AG)等<sup>[2]</sup>。这些基因除了 APETALA2(AP2),都是 MADS-box 基因家族,因此 MADS-box 基因在花发育过程中起关键作用<sup>[2-3]</sup>。到目前为止,对参与花发育过程的 MADS-box 基因的 研究多集中在拟南芥,矮牵牛 Petunia hybrida,金鱼草 Antirrhina majus,水稻 Oryza stative 和玉米 Zea mays<sup>[4]</sup>等模式植物,关于兰花 MADS-box 基因的研究报道较少<sup>[5]</sup>。兰科 Orchidaceae 属于世界 4 个特大科 之一,起源古老,进化速率极其不同步,是种子植物系统发育在单子叶植物中的一个高峰,具有典型性和代 表性<sup>[6]</sup>。兰花花器官结构高度特化——一片花瓣变异为唇瓣,雌雄蕊合在一起成为蕊柱。因此其花器官 的形成可能具有独特的调控机制,这为研究 ABC 功能基因提供了新的平台和视角,并可能会拓展经典 ABC 功能基因概念的外延。文心兰 Oncidium 具有典型的兰科植物的花器官特征,如较大的唇瓣,明显 的合蕊柱等,为研究花发育基因在兰科植物中的功能提供较为理想的试验材料,本研究应用逆转录聚合 酶链式反应扩增(RT-PCR,reverse transcription polymerase chain reaction),克隆到文心兰 Oncidium 中的 1 个 MADS-box 基因,并通过 qRT-PCR (quantitative RT-PCR) 检测该基因在花芽不同发育时期和不同器官 的表达特性,旨在为进一步研究兰花花器官发育的分子调控机制奠定基础,为兰花分子育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 *OAP*3 基因克隆样品 文心兰'百万金币'*Oncidium* 'Milliongolds'在浙江富阳绿园园艺公司种苗基 地常规种植。待长出花芽, 取 5~10 mm 的花芽液氮速冻,并于-80 ℃保存。

1.1.2 不同生长阶段和组织器官样品 于 2010 年 6-8 月,在富阳绿园苗圃选取生长势相同且已抽出花茎的文心兰 '百万金币'植株,统一进行水肥管理。从花芽抽出开始到花苞裂开之前,在同一生长势上隔 3 d 取样 1 次,测量花芽直径,重复 6~12 个·次<sup>-1</sup>。开花期摘取同一植株上的第 2 功能叶、花茎及完全开放的花朵,分别剥取花萼、花瓣、唇瓣、雄蕊及子房(图 1),液氮速冻存放于-80 ℃冰箱。



A.花枝形态







C.合蕊柱结构

图 1 文心兰'百万金币'形态和花结构图 Figure 1 Flower of Oncidum 'Milliongolds'

#### 1.2 总 RNA 的提取及基因全长克隆

总 RNA 提取依照柱式植物 RNAout 2.0 (中国北京天恩泽公司)的操作说明书进行。按照 Reverse Tran scription System(美国 Promaga 公司)反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。通过网络搜索(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/),根据兰科 *AP* 3-like 同源基因序列由 Primer 5.0 设计引物 OF 和 OR(表 1),由上海生工生物工程技术有限公司合成。聚合酶链式反应(PCR)扩增目的条带采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(美国爱思进公司)回收。将回收条带插入 pGEM-TEasy 载体(美国 Promaga 公司),热激法转化 *Escherichia coli* DH5α(日本 Takara 公司),在氨苄青霉素平板上进行蓝白斑筛选,挑取正向克隆,摇菌过夜,AxyPrep 质粒提取试剂盒提取质粒,酶切鉴定送到中国上海生工生物工程服务有限公司测序。测序结果在美国国 立生物技术信息中心(NCBI)网站上 BLAST 比对,用 DNAMAN 软件进行序列氨基酸编辑,CLUSTAL 软件采用 Neighbor-Joining (NJ)分析方法进行系统进化分析,在此基础上用 MEGA4 构建分子进化树。

### 1.3 实时荧光定量 PCR 检测基因的表达

根据蝴蝶兰 Phalaenopsis hybrida 和其他单子叶植物 ACTIN 基因的保守区设计了文心兰的简并引物 ACTINF 和 ACTINR,并克隆得到 623 bp 的片段,根据这段序列(GenBank 登录号为 HQ316804)设计了荧 光定量内参引物,Q-ACTF 和 Q-ACTR(表 1)。设计 OAP 3 基因序列特异引物 Q-OAPF 和 Q-OAPR(表 1), 荧光定量所用引物送大连宝生物公司合成。按照试剂盒 SYBR Premix Ex Taq<sup>™</sup>(日本 Takara 公司)操作说 明,在应用生物系统公司(ABI)的 7300 实时定量 PCR 扩增仪上完成,以上实验重复 3 次。通过扩增曲线 和熔解曲线,确定引物的特异性。利用 StepOne 生物软件和 Microsoft Excel 分析处理实验结果,参照 ABI 公司提供的 2<sup>-ΔΔ<sup>c1</sup></sup>计算方法计算相对表达量。

表 1	研究所用引物
-----	--------

in this study	used	Primers	Fable 1
in this study	used	Primers	Fable 1

引物名称	序列(5'-3')	用途
OF	5'-TCATTATAGAACAACACTCGGG-3'	基因克隆
OR	5'-TCACAGGACAAATGTAGGGG - 3'	基因克隆
ACTINF	5'-ATTATGTTYGAGACHTTYAA -3'	基因克隆
ACTINR	5'-ACYTTVAYYTTCATGCTGC-3'	基因克隆
Q-OAPF	5'-TATCAGCAAGTTACCGGCTTTG-3'	qRT-PCR 表达分析
Q-OAPR	5'-TCCCCTTTCCTCTGCCTTATC-3'	qRT-PCR 表达分析
Q-ACTF	5'-AATGTGCCTGCTATGTATGTTGCT-3'	qRT-PCR 内参基因
Q-ACTR	5'-GGGCATATCCTTCGTAGATTGGT-3'	qRT-PCR 内参基因
OK ACTINF ACTINR Q-OAPF Q-OAPR Q-ACTF Q-ACTR	5'-ATTATGTTYGAGACHTTYAA -3' 5'-ACYTTVAYYTTCATGCTGC-3' 5'-TATCAGCAAGTTACCGGCTTTG-3' 5'-TCCCCTTTCCTCTGCCTTATC-3' 5'-AATGTGCCTGCTATGTATGTTGCT-3' 5'-GGGCATATCCTTCGTAGATTGGT-3'	<ul> <li>基因克隆</li> <li>基因克隆</li> <li>qRT-PCR 表达分析</li> <li>qRT-PCR 表达分析</li> <li>qRT-PCR 丙参基因</li> <li>qRT-PCR 内参基因</li> </ul>

## 2 结果与分析

#### 2.1 OAP3基因的克隆与序列分析

测序结果表明: 克隆得到 1 个与文心兰花发育相关的 MADS-box 基因,并命名为 *OAP* 3 (图 2), Gen-Bank 登录号为 GU644447。 该基因全长 799 bp,包括 1 个 612 bp 的 coding sequence (CDS)框,编码 1 个长度为 203 个氨基酸,分子量为 23 661.1 D 的蛋白质,理论等电点为 9.49。其中,碱性氨基酸(K和R) 37 个,酸性氨基酸(D和E)28 个,疏水氨基酸(A, I, L, F, W及V)67 个,极性氨基酸(N, C, Q, S, T及Y)71 个,分别占总氨基酸的 18.3 %, 13.8%, 33%, 34.97%。在美国生物信息中心(NCBI)网站 BLAST

1	TCA	тта	TAG	AAC	AAC	ACT	CGG	GTG	TTC	TGA	GAA	AGA	GAT	AAG	AAA	AAA	ААА	AGG	TGA	АТТ
61	TGT	GCT	GAA	GCA	ATC	GGG	AGA	GGA	AAG	АТА	GAG	АТА	AAG	AAG	АТА	GAA	ААТ	CCA	ACA	AGC
1					м	G	$\mathbf{R}$	G	к	Ι	$\mathbf{E}$	Ι	к	к	Ι	Е	N	$\mathbf{P}$	т	S
121	AGG	CAA	GTA	ACT	TAC	TCA	AAG	AGG	CGA	стт	GGA	АТА	ACG	АЛА	AAA	GCC	ATG	GAA	TTA	ACA
17	R	Q	v	т	¥	S	к	R	R	L	G	Ι	т	к	к	А	м	$\mathbf{E}$	L	т
181	GTG	стс	TGC	GAC	GCI	AAG	GTI	TCT	СТС	ATC	ATG	TTC	TCA	AGO	тст	Gec	AAG	тта	TCT	GA T
57	v	L	С	D	А	к	v	s	L	Ι	м	F	s	s	s	G	к	L	s	D
241	TAC	TGC	AGC	CCI	TCT	ACA	GAA	ATC	AAA	GAI	GTG	TTT	CAG	AGG	TAT	CAG	CAA	GTT	ACC	GGC
77	Y	С	s	Р	s	т	$\mathbf{E}$	Ι	к	D	v	F	Q	R	¥	Q	Q	v	т	G
301	ттт	GAT	ATC	TGG	GAI	GCC	CAA	TAC	CAG	AGG	ATC	CAG	AGT	ACT	CTG	ATG	AAT	CTG	AGG	GAA
97	F	D	Ι	W	D	A	Q	¥	Q	R	м	Q	s	т	L	м	N	L	R	$\mathbf{E}$
361	ATT	AAT	CAT	AAA	CTT	CAG	ATG	GAG	АТА	AGG	CAG	AGG	ААА	GGG	GAG	AAT	стб	GAA	GGA	TTG
117	I	н	н	к	L	Q	м	$\mathbf{E}$	Ι	R	Q	R	к	G	Е	N	L	$\mathbf{E}$	G	L
421	GAT	GTT	AAG	GAG	CTO	CGC	GGI	CTT	GAG	CAA	AAA	TTG	GAA	GAG	TCG	ATT	AAG	ATC	GTT	CGG
137	D	v	к	$\mathbf{E}$	L	R	G	L	$\mathbf{E}$	Q	к	L	$\mathbf{E}$	$\mathbf{E}$	s	Ι	к	Ι	v	R
481	GAG	AGA	AAG	TAT	CAT	GTG	ATC	GCT	ACG	CAA	ACA	GAC	ACT	TAC	AAG	AAA	AAG	стс	AGG	AGC
157	$\mathbf{E}$	R	к	¥	н	v	Ι	A	т	Q	т	D	Т	Y	к	к	к	L	R	s
541	ACT	AGA	GAA	ATC	TAC	ACA	ACC	ста	TTG	AAT	GAG	CTG	GAG	GTT	GAT	GAT	GAG	AAT	CAA	CAG
177	т	R	Е	м	Y	т	т	L	L	N	$\mathbf{E}$	L	$\mathbf{E}$	v	D	D	$\mathbf{E}$	N	Q	Q
601	CGC	AGT	TTT	TAT	GCA	GAA	GAI	CTT	AGT	GGT	GTO	TAC	TAA	AGI	GCA	ATC	TCA	ATG	GCG	АА Т
197	R	s	F	Ι	A	Е	D	L	s	G	v	Y	N	S	A	Ι	s	м	A	N
661	CAG	AGG	GTA	GCA	CAT	TGC	TTA	TAA	ACA	TGT	TCA	AGA	TCT	TGT	CCA	CAT	GCA	ATG	TAA	GAT
207	Q	R	v	A	н	С	L	*									statistics and the second		1.025560.50	1
721	TAT	TTC	TCA	ACA	CAT	TTC	GTA	GAC	CAG	TAA	TTT	TTC	TGG	TCC	TTG	ACA	CGG	GGA	GTG	TAG
781	GCC	ccc	TAC	ATT	TGI	сст	G													
			推测	的氨	基酸	亨列り	人单字	符表	示列	在 DI	NA 序	列的	下面	: * 쿡	長示终	上子				
					图 2	$0_{1}$	AP3	cDN	NA 🗲	≧长2	りまし ひっちょう ひっちょう ひっちょう ひっちょう しんしょう しんしょ しんしょ	定氨	基酸	序列	J					

Figure 2 cDNA sequence and putative amino acid sequence of OAP 3

在线对 OAP 3 所编码的氨基酸进行保守结构域分析发现, OAP 3 蛋白含典型的 MADS 结构域(MADS-MEF2-like)和 K 结构域(K-box),这 2 个保守结构域是 MADS-box 基因家族的典型特征。

2.2 OAP3氨基酸序列同源性比较与系统进化树分析

为了研究基因 OAP 3 与其他植物中 MADS-box 基因的关系,以 OAP 3 推定的氨基酸序列和其他物种 B 类基因的氨基酸序列进行了比对分析(图 3),同时做了系统进化树,并归纳了部分基因的表达部位(图 4)。序列比对发现该序列与蝴蝶兰 PeMADS5 的氨基酸序列同源性高达 78%,与单子叶植物水稻 MADS16 和百合 Lilium longiflorum LMADS1 的氨基酸序列同源性均为 62%,明显高于与双子叶植物拟南芥 AP 3 (50%)和金鱼草 DEF(50%)的同源性。

目前,分离到的 B 类 MADS-box 基因基本上分为 *AP* 3-like 和 *PI* 亚类,其中 *AP* 3-like 亚类包括 *eu-AP* 3,*TM*6 和 *paleoaAP* 3 几个系。系统进化树分析表明 *OAP* 3 属于 *paleoAP* 3 系(图 4)。从图 3 中可以 看出: PI 类基因编码的蛋白质如拟南芥 PI,玉米 SILKY1 和金鱼草 GLO 的 C 端存在明显的 PI 基序 MPFxFRVQPxQPNLQE<sup>[7]</sup>;大多数 *AP* 3-like 基因编码的蛋白中如拟南芥 AP3,水稻 *MADS*16 和百合 *LMA DS*1 中发现 PI 功能域(FxFRLOPSQPNLH)<sup>[8-9]</sup>;在高等双子叶植物 *AP*3-like 家族基因 *euAP* 3 系发现 *euAP* 3 功能域(D(*I*)ITTFALLE);在低等双子叶和单子叶 *AP* 3-like 亚族 *paleoAP* 3 系发现 *paleoAP* 3 基序(YGx-HDLRLA)<sup>[8-9]</sup>。和大多数 B 功能基因不同,*OAP* 3 基因 C 端缺乏这 4 个保守结构,这和 *TM*6 系中的康乃 馨 *Dianthus caryophyllus CMB*2 相似。

	MADS-box	
OAP3 MADS16 LMADS1 GDEF1 TM6 CMB2 AP3 DEF PAP3 PI GLO SILKY1	M RGK       I       I       NP       SR       VT       SKRRIG       VICDA       SKRSDX       P         M RGK       I       INS       R       VT       SKRRIG       VICDA       A       KI       P         M RGK       I       INS       R       VT       SKRRIG       VICDA       A       KI       P         M RGK       I       INS       R       VT       SKRRIG       VICDA       KI       SKRIF       P         M RGK       I       INS       R       VT       SKRRIG       VICDA       KI       KI       SKRIF       I       P         M RGK       I       INS       R       VT       SKRRIG       VICDA       KK       II       P         M RGK       I       INS       R       VT       SKRRIG       VICDA       TK       F         M RGK       I       INO       R       VT       SKRRIG       SKK       II       P         M RGK       I       INO       R       VT       SKRRIG       SKK       II       P         M RGK       I       INO       R       VT       SKRRIG       VICDA       NKK       SK	
OAP3 MADS16 LMADS1 GDEF1 TM6 CMB2 AP3 DEF PAP3 PI GLO SILKY1	ZI DVF RY QVT F WDA R STONN ENHK OM K.G. G FEG VVK DI GIF RY QAI TS VIE N RESK DINN T CM.G DD FD DT KIF RY QLS I VSA K N NNH SINGN K S M.G DD IN NTT MY QY STV F SS K KEYK JTNNK R VIG DG MM NTT MY QY STV F VSS K F KEYK JTNNK R T G SS ILQ VSL RMY ZY KIE V WRK R ENNR F ENNR TSNK R T.G SS ILQ NTT EV LY TIS V WRK R ECHRK LINSL R SR M.G C DJ 1Q TAT QLF QY KAV V SSS K EHKK NMNNN R M.G SNN YZ DI GIY RY VVI M NAA R N KH NM KNN R M M.G SNN YZ TILVDML HY KLS KR WDPKH H NEINR KENDS QI LLK.G SNO LK K TTIVDML HY KLS KR WDPKH H NEINR KENDS QI LLK.G NTT YK K ADMIN	$   \begin{array}{r}     119 \\     119 \\     120 \\     119 \\     11$
OAP3 MADS16 LMADS1 GDEF1 TM6 CMB2 AP3 DEF PAP3 PI GLO SILKY1	G VKLES I F A STANDARD Y ASTR MYTTLLN EVD ENCO G NV AA Z H S STANDARD Y ASTR MYTTLLN EVD ENCO G NV AA Z H S STANDARD STANDARD GLC Z. A G NV AA Z H S STANDARD STANDARD GLC Z. A G NV AA Z H S STANDARD Y STANDARD C CH GNVSDS AZ Z STANDARD K STANDARD Y CH GNVSDS AZ Z STANDARD STANDARD C SA EMATLL S STANDARD T NNS G LQKN I H EL. KFR.G Q C R EMATLL S KS GN I T NNS G LQKN I H EL. KFR.G Q C N I DM NS.LL S KS SN I STANDARD H DMKENN MA AI HG DK D GME ISK NELMAA EQRQ I FF QQMHLD M MA AI HG DK D GME ISK HNEMV ENQS QFK RQMHLD M C G NV AA Z H H S STANDARD Y H SH AYKN QQZ GMRD.A	176 175 176 176 176 176 176 176 176 172 172 175
OAP3 MADS16 LMADS1 GDEF1 TM6 CMB2 AP3 DEF PAP3 PI GLO SILKY1	VIDUAL VISAIS.MADORVAHCL. W.FIDIG.C.VISAIS.MADORVAHCL. W.FIDIG.C.VISAIS.MADORVAHCL. YITGEG.D.C.COMPACTION OF A STREAM OF A	201 221 222 222 222 212 222 212 222 201 212 201 212 201 212 201 212 201 212 201 212 201 212 212



CLUSTAL 软件采用 Neighbor-Joining(NJ)分析方法进行系统进化分析,在此基础上用 MEGA4 构建出 各个基因的氨基酸序系统进化树并在进化树旁边标出各个基因的表达部位(图 4)。从图 4 中可以看出 B 类基因的表达模式存在着物种特异性<sup>[10]</sup>。总的来说,*PI* 类基因在花瓣和雄蕊中都发现有表达,但非洲菊 *Gerbera hybrida GGLO*1 和拟南芥 *PI* 在子房中也见表达,水稻 *OsMADS*4 在萼片和子房中都表达,但 PI 亚类基因在非花组织中不表达。AP 3-like 亚类基因大部分在萼片、花瓣、雄蕊和子房中表达,但不同系的表达模式还是存在一定差异: euAP 3 系在非花组织未见表达,但 TM6 系中的非洲菊 GDEF1 和番茄 Lycopersicon esculentum TM6 除了在花器官中表达外,在非花组织中也见表达, paleoaAP 3 系主要是在花器官中表达。



B 族氨基酸进化树采用 NL 方法获得。来自文心兰百万金币的 B 类基因 OAP3 用方框标出。用 Bootstrap 进行检测,并重复 1000 次。注:N-非花组织,S-萼片,P-花瓣,St-雄蕊,C-心皮。√代表表达。

### 图 4 B 类氨基酸系统进化树分析与部分基因表达模式

Figure 4 Phylogenetic analysis and part expression pattern of plant B group MADS-box genes

## 2.3 OAP3在组织器官和不同发育时期的表达模式

为了解 OAP 3 开花前在花器官发育过程中的表达规律及开花期在不同组织器官中的表达模式,分别收集了直径 1.0 mm(花蕾原基分化期), 1.8 mm(花被原基分化期), 3.0 mm(合蕊柱及花粉块分化期), 5.0 mm(花器官原基快速分裂增殖期), 9.0 mm(花器官特征形成期)这 5 个不同发育时期的花芽及开花期不同的组织器官,分别提取其总 RNA,合成 cDNA 第 1 链,以 ACTIN 为内参基因,进行 qRT-PCR 分析,结果见图 5。从图中可以发现:随着花器官的发育,OAP 3 表达丰度呈递增趋势,在花芽直径 3.0 mm 前,变化趋势较缓和,之后表达量显著增加。直径 9.0 mm 大小的花芽中 OAP 3 基因的表达量是直径1.0 mm 花芽的 2 倍多。组织器官的表达模式研究发现,OAP 3 在花器官各部位以及营养器官茎和叶都有表达,并且表达量明显不同,在唇瓣中表达丰度最高,其次是叶片和萼片,在雄蕊、子房和茎中的





表达量较少且相对一致。

## 3 讨论

为了探讨 MADS-box 基因调节兰花花器官发育的作用, 克隆得到文心兰 MADS-box 中的 AP 3-like 基 因并命名为 OAP 3, 该基因具有 MADS-box 中 B 类基因的结构特征。B 类基因基于其序列多态性分为 PI 亚类和 AP 3-like 亚类。依据基因序列的不同, AP 3-like 基因分为 3 个类型,分别是 paleoAP 3 系, eu-AP 3 系和 TM6 系。其中 paleoAP 3 主要包括从低等真双子叶植物,木兰类双子叶植物和单子叶植物中 鉴定的 AP 3 同源基因; euAP 3 包括从大多数真双子叶植物中分离到的 AP 3 基因; TM6 包括从高等真 双子叶植物中分离到的其他 AP 3 基因<sup>[8]</sup>。本研究中分离的 OAP 3 蛋白质序列与 paleoAP 3 系最相近(图3), 但同时, OAP 3 也具有一些 TM6 系的特征,如在 MADS 盒区域和 TM6 系蛋白序列高度相似,相似率高 达 81.7%。在这个区域, OAP 3 与 TM6 系的非洲菊 GDEF1 和番茄 TM6 蛋白分别有 11 个和 14 个氨基酸; 在 paleoAP 3 中, OAP 3 与百合 LMADS1 和水稻 MADS16 蛋白分别有 11 个和 15 个氨基酸; 与 euAP3 系 中拟南芥 AP 3 和金鱼草 DEF 蛋白分别有 15 和 16 个氨基酸(图 3)。OAP 3, GDEF1 和 TM6 之间高度特 化的 MADS 盒表明: OAP 3 与 B 类基因 TM6 系也很相近。另外 2 个发现也可以证实这个结论:在 TM6 系的康乃馨 CMB2 蛋白<sup>[8]</sup>的 C-端发现与 OAP 3 蛋白一样,缺失保守结构(PI 基序, EuAP3 和 paleoAP 3 基序)(图 3); OAP 3 的表达模式和已报道的一些 TM6 系基因尤其是非洲菊 GDEF1 的表达模式非常相 似,即在所有花结构和叶中都表达<sup>[9]</sup>。综上所述,可以确定 OAP 3 是 B 类 AP 3-like 基因。

到目前为止,已经从非洲菊<sup>[9]</sup>,拟南芥<sup>[11]</sup>,矮牵牛 Petunia × hybrida<sup>[12-13]</sup>,百合 Lilium longiflorum<sup>[14]</sup>等 多种植物中克隆得到了花发育相关的 B 类基因(图 4),其表达模式有明显差异。在拟南芥中,AP3 基因 在花瓣雄蕊,心皮中表达;金鱼草 DEF 基因在它所有花器官中表达,在非花组织不表达;非洲菊 GDEF1 在非花组织和花器官都表达;玉米的 SILKY1 基因在花器官所有部位表达<sup>[10]</sup>,其他被子植物如百 合、郁金香 Tulipa gesneriana 同兰花一样,具有形态一致的萼片与花瓣。研究发现,B 类基因也在它们的 萼片中表达<sup>[9,15-16]</sup>。荧光定量 PCR 结果可以看出,随着花器官的生长发育,OAP3 的表达量也呈上升趋 势,特别是花芽直径达 3 mm 以后,上升更明显(图 5);而且 OAP 3 基因不仅在雄蕊和花瓣中表达,还 在其他部位如茎、叶、萼片、唇瓣和子房中表达,且在唇瓣中的表达丰度最高。这一结果表明 OAP 3 在花分生组织和花序组织中都表达,与花器官发育有密切关系。在蝴蝶兰中也发现 B 基因在萼片、花 瓣、雄蕊、唇瓣、子房中表达的情况,与我们的结果一致<sup>[17]</sup>。据本课题组对文心兰花形态指标的研究发 现,文心兰花芽直径 1.0 mm 处在花蕾原基分化期,1.8 mm 主要处在花被原基分化期,直径 3.0 mm 处在 合蕊柱及花粉块形成期,花芽直径 5~9 mm 生长期间,花器官原基快速分裂增殖期,特别是唇瓣和雄 蕊,各花器官原基逐渐具有相应的器官特征。花芽直径 3.0 mm 后,OAP3 表达丰度的显著增加可能主 要是因为唇瓣和合蕊柱的生长发育。OAP 3 基因在唇瓣中的高表达是否与唇瓣的特化有关,还有待于进 一步的研究。 参考文献:

- [1] COEN E S, MEYEROWITZ E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development [J]. Nature, 1991, 353; 31 37.
- [2] ROUNSLEY S D, DITTA G S, YANOFSKY M F. Diverse roles for MADS-box genes in Arabidopsis development[J]. Plant Cell, 1995, 7: 1259 – 1269.
- [3] THEIBEN G, BECKER A, DIROSA A, *et al.* A short history of MADS-box genes in plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, **42**: 115 149.
- [4] 郭斌,陈东红,戴薇,等.蝴蝶兰花发育相关基因 *pPI*9 的克隆与表达分析 [J]. 复旦学报,2006,45 (3):277 - 278.

GUO Bin, CHEN Donghong, DAI Wei, et al. Cloning and expression analysis of a *Phalaenopsis* flowering related gene pPI9 [J]. J Fudan Univ Nat Sci, 2006, 45 (3): 277 – 278.

- [5] YU H, GOH C J. Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the API/AGL9 subfamily during floral transition [J]. Plant Physiol, 2000, 123: 1325 – 1336.
- [6] 吴征镒, 路安民, 汤彦承, 等. 中国被子植物科属综论[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 275.
- [7] YANG Yingzhen, FANNICG L, JACK T. The Kdomain mediates heterodimerization of the Arabidopsis floral organ identity proteins, APETALA3 and PISTILLATA [J]. Plant J, 2003, 33: 47 – 59.
- [8] KRAMER E M, DORIT R L, IRISH V F. Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: duplication and divergence within the APETALA3 and PISTILLATA MADS-box gene lineages [J]. Genetics, 1998, 149: 765 - 783.
- [9] YU Deyue, KOTILAINEN M, PÖLLÄNEN E, *et al.* Organ identity genes and modified patterns of flower development in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) [J]. *Plant J*, 1999, **17**: 51 62.
- [10] ZAHN L M, LEEBENS-MACK J, de PAMPHILIS C W, et al. To B not to B a flower: the role of DEFICIENS and Globosa orthologs in the evolution of the angiosperms [J]. J Heredity, 2005, 96 (3): 225 240.
- [11] JACK T, BROCKMAN L L, MEYEROWITZ E M. The homeotic gene APETALA3 of Arabidopsis thaliana encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens [J]. Cell, 1992, 68 (4): 683 - 697.
- [12] van der KROL A R, BRUNELLE A, TSUCHIMOTO S, et al. Functional analysis of petunia floral homeotic MADS box gene PMADS1 [J]. Genes Dev, 1993, 7: 1214 – 1228.
- [13] ANGENENT G C, FRANKEN J, BUSSCHER M, et al. The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity [J]. Plant Cell, 1995, 7 (11): 1859 – 1868.
- [14] TZENG T Y, YANG C H. A MADS box gene from lily (*Lilium longiflorum*) is sufficient to generate dominant negative mutation by interacting with *PISTILLATA* (*PI*) in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42 (10): 1156 1168.
- [15] WINTER K U, BECKER A, MUNSTER T, et al. MADS-box genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants [J]. Proc Natl A cad Sci USA, 1999, 96: 7342 - 7347.
- [16] KANNO A, SAEKI H, KAMEYA T, et al. Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*) [J]. Plant Mol Biol, 2003, 52 (4): 831 – 841.
- [17] MONDRAGÓN-PALOMINO M, THEIβEN G. MADS about the evolution of orchid flowers[J]. Trends Plant Sci, 2008, 13 (2): 51 – 59.