

春兰 *GLO* 基因的克隆和实时定量表达分析

向林, 李伯钧, 秦德辉, 郭方其, 吴超, 孙崇波*

(浙江省农业科学院 园艺研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术从春兰 (*Cymbidium goeringii*) 中分离到一个 *GLO* 基因。该基因含有一个 630 bp 的开放阅读框 (ORF), 共编码 210 个氨基酸。系统进化树分析显示, 该基因属于 B 类 MADS-box 基因的 PI/*GLO* 家族, 其编码的蛋白与其他植物 PI/*GLO* 类蛋白具有很高的同源性, 命名为 *CgGLO* (登录号 HM106984)。实时荧光定量表达分析表明, *CgGLO* 主要在第二轮花器官唇瓣和花瓣中表达, 在萼片、子房和叶片中表达较少, 在蕊柱和根中表达量最少, 这种表达模式支持了 van Tunen 对 ABC 模型的修正, 也显示了 *CgGLO* 基因可能在春兰花器官以及子房的形成过程中起着重要作用。

关键词: 春兰; ABC 模型; *GLO* 基因; 实时荧光定量表达

中图分类号: S 682.31

文献标志码: A

文章编号: 1004-1524(2011)03-0517-06

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

XIANG Lin, LI Bo-jun, QIN De-hui, GUO Fang-qi, WU Chao, SUN Chong-bo*

(Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: In this study, a novel *GLO* gene was isolated from *Cymbidium goeringii* by RT-PCR and RACE-PCR techniques. Sequence analysis showed the gene contained an open reading frame of 630 bp encoding a putative protein of 210 amino acids. Homology analysis showed that the deduced protein showed high identity with other PI/*GLO* proteins from different species, named *CgGLO* (GenBank accession number HM106984). Phylogenetic tree analysis also indicated that the B-functional gene *CgGLO* belongs to PI/*GLO* clade of MADS-box gene family. Real-time quantitative PCR demonstrated that *CgGLO* was strongly expressed in 2 whorls organ, i. e. lips and petals, much lower in ovary, leaves and sepals, and lowest in root and columns. It supported the modified ABC model by van Tunen. These results also displayed that *CgGLO* might regulate the floral organ identity and ovary development of *C. goeringii*.

Key words: *Cymbidium goeringii*; ABC model; *GLO* gene; Real-time quantitative PCR

多数高等植物的花均由萼片、花瓣、雄蕊群和雌蕊群四轮花器官组成, 而这些花器官则是在多个基因的共同调控下发育形成。1991年, Coen 和 Meyerowitz^[1] 提出了著名的 ABC 模型, 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^[2]。

PISTILLATA/GLOBOSA (PI/*GLO*) 类基因属于 B 类 MADS-box 基因, 目前已从金鱼草 (*Antirrhinum majus*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*)、郁金香 (*Tulipa gesneriana*)、芦笋 (*Asparagus officinalis*)、姬蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equetis*)、麝香百合 (*Lilium longiflorum*) 等植物中克隆出来^[3-9]。在双子叶植物中, 拟南芥的 *PI* 基因在第二轮和第三轮花器官中均表达,

收稿日期: 2010-11-01

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3080378); 浙江省科技计划项目 (2009C32058); 浙江省花卉产业科技创新团队项目 (2009R50034)

作者简介: 向林 (1980-), 男, 湖南岳阳人, 博士, 助理研究员, 主要从事观赏园艺分子育种研究。E-mail: regia.chyu@yahoo.com.cn; Tel: 0571-86404336

* 通讯作者, 孙崇波, E-mail: chongpo74@sina.com.cn

在花发育早期的第四轮花器官中也表达^[4], 金鱼的 *GLO* 基因与拟南芥的 *PI* 基因表达模式相似^[3]。在单子叶植物中, 水稻和芦笋的 *GLO* 基因与拟南芥的 *PI* 基因表达模式也相似^[5,7]; 而郁金香和麝香百合的 *GLO* 基因的表达模式则不同, 它们不仅在第二轮和第三轮花器官中表达, 在第一轮花器官中也有较高水平的表达, 同时, 在心皮和茎中都有部分表达^[6,9]。

春兰 (*Cymbidium goeringii*) 是兰科兰属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, 但又具有高度特化的唇瓣和蕊柱, 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。目前, 对兰科植物花发育相关基因的研究多集中在蝴蝶兰 (*Phalaenopsis* ssp.)、石斛兰 (*Dendrobium* ssp.) 及文心兰 (*Oncidium* ssp.) 等产自国外的兰花种类上^[10-12], 而对中国兰, 尤其是中国兰地生种类的研究几乎处于空白。

本研究利用 RT-PCR 结合 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术从春兰中获得了一个与花发育相关的 *GLO* 基因, 并对其进行了初步的表达分析。期望通过本研究对花发育 B 类基因在单子叶植物中的表达模式做出进一步的阐释, 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 材料与方 法

1.1 材 料

以种植于浙江省农业科学院园艺所花卉中心大棚内春兰品种‘苍岩素’为试验材料, 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。

1.2 总 RNA 的提取和 *GLO* 基因的克隆

采用北京天恩泽基因公司 RNAout 2.0 试剂盒提取总花芽 RNA, 用美国 Clontech 公司 SmarterTM 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 *GLO* 基因的保守区域设计引物进行 PCR 扩增, 上游引物 GLO-1 为: 5'-ATCAGCGT-GCTCTGCGA-3', 下游引物 GLO-2 为: 5'-AGT-

TCTCTCATACTCCC-3'。PCR 扩增条件为: 94℃ 变性 4 min, 94℃ 变性 30 s, 54 ~ 44℃ 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 DH5 α 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 GLO-3 5'-TGAGTATTGTAGC-CCCTCCACCA-3'; 巢式引物 GLO-4 5'-CTCGGGCAAGAACTCTGGGACGC-3'; 5'RACE 引物 GLO-5 5'-ATTCTGGAGCGTTTCTCAATCGG-3'; 巢式引物 GLO-6 5'-CTCAAGTCTCGTGTTTTCGCTCC-3';

采用 Clontech 公司的 SmarterTM 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 pMD18-T 载体, 转化测序。拼接后获得基因全长。

1.3 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/protparam.html>) 软件分析 GLO 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 (网址 http://www.ch.emblnet.org/software/BOX_form.html) 进行显示。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^[13]。

1.4 *CgGLO* 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 Quant-script 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'-TGCCGTTCCCTGTTGATTC-3',

下游引物:5'-TGCTGCCTTCCTGGATGTG-3'

GLO 基因引物序列:

上游引物: *GLO*-7 5'-GTGTTCGGAATAAA-CAGATGGACTT-3',

下游引物: *GLO*-8 5'-TACTCCCTTCCATTGCCAATTG-3';

PCR 体系组成为: 9 μ L 2.5 \times Sybr Green mix, 0.5 μ L 引物 *GLO*-7 (10 μ mol \cdot L⁻¹), 0.5 μ L 引物 *GLO*-8 (10 μ mol \cdot L⁻¹), 50 ng 各时期 cDNA 模板或 1 μ L 标准样模板系列稀释样, 加去离子水补足 20 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min 下循环 40 次, 每个处理重复 3 次, 在 IQ5 荧光定量 PCR 仪 (BioRad 公司) 上进行。数据通过 Sequence Detector Version 1.3.1 输出, 并转换为 Excel 格式, 再分析。按相对定量法计算基因的表达量。目的基因相对表达量 $Rel. Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta Ct = Ct (CgGLO) - Ct (18s RNA)$, $\Delta\Delta Ct = (各植物组织 \Delta Ct) - (花芽 \Delta Ct)$ 。

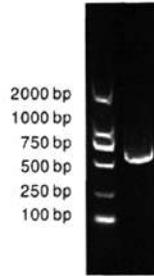
2 结果与分析

2.1 *CgGLO* 基因全长 cDNA 的克隆

以春兰花芽 RNA 为模板进行反转录, 再以反转录产物为模板进行 PCR 扩增, 获得部分片段, 测序分析表明, 获得了 *GLO* 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 SmarterTM 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 *PI/GLO* 基因有较高的同源性, 因此, 我们将基因命名为 *CgGLO*, GenBank 登录号为 HM106984。 *CgGLO* 基因含有 630 bp 的开放阅读框, 共编码 210 个氨基酸, 分子量为 24.5 kD, 预测等电点为 9.39。

2.2 *CgGLO* 基因氨基酸序列分析

CgGLO 基因氨基酸序列与其他 *MADS-box* 基因一样含有典型的 *MADS-box* 和 K 结构域, 并且 C 端具有典型的 PI 结构域 (图 2), 序列同源比较显示, 与芳香缙草、红门兰、盔状爪唇兰、长叶美洲兜兰、香荚兰的 *GLO* 基因分别有 95%, 94%, 97%, 94% 和 91% 的同源性; 与细茎石斛



1. 分子量标记 DL2000; 2. *GLO* 基因。

图 1 春兰 *GLO* 基因全长扩增

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

PI、球花石斛、蝴蝶兰的 *PI9* 和 *PI10* 基因分别有 96%, 95%, 95% 和 94% 的同源性 (图 2)。

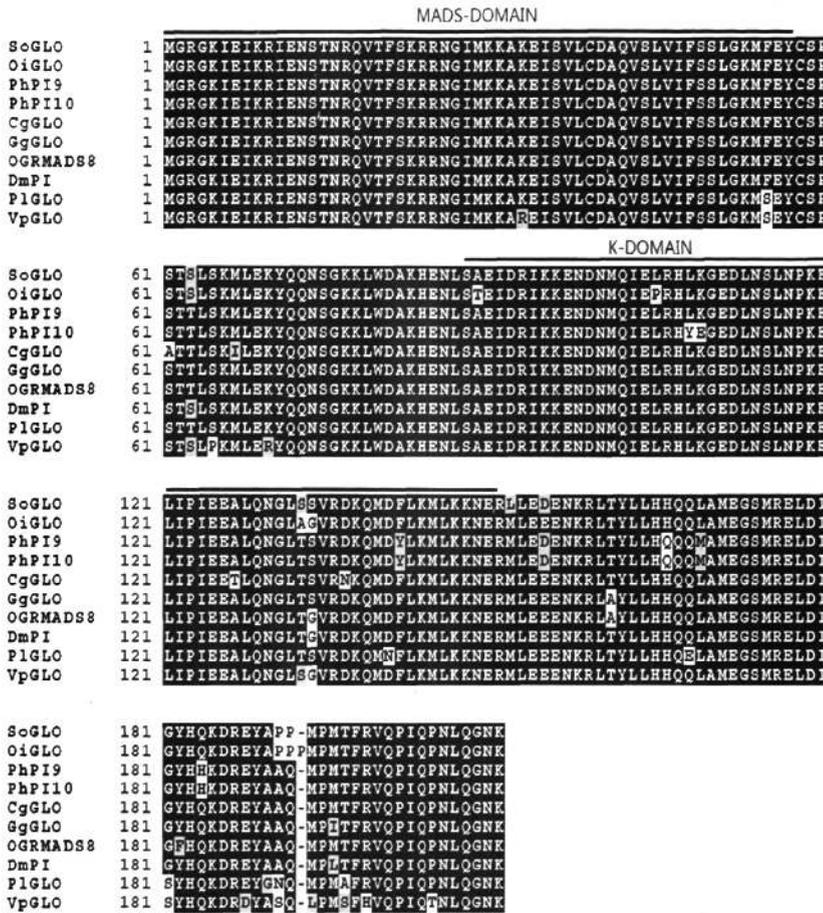
为了进一步研究 *CgGLO* 基因与其他 B 类 *MADS-box* 基因的关系, 我们将 *CgGLO* 氨基酸序列与其他物种的 B 类 *MADS-box* 基因的氨基酸序列进行了系统进化分析 (图 3)。进化树分析显示 B 类 *MADS-box* 基因分成 *PI/GLO* 和 *AP3/DEF* 两个分支, 其中 *PI/GLO* 分支又分成单子叶植物和双子叶植物两个组。 *CgGLO* 在图中以三角形标示, 归类于 *PI/GLO* 分支的单子叶植物组 (图 3), 与兰科其他植物的 *PI/GLO* 类基因关系密切, 这些结果表明 *CgGLO* 属于 B 类 *MADS-box* 基因的 *PI/GLO* 家族。

2.3 *CgGLO* 在不同器官的表达分析

为了确定 *CgGLO* 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、幼嫩子房、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), *CgGLO* 基因在唇瓣中表达量最高, 在花瓣和花芽中表达量次之, 在叶、子房和萼片中表达较低, 在蕊柱和根中的表达量最低, 约为唇瓣表达量的 6%。

3 讨论

以双子叶植物拟南芥和金鱼草为基础的经典 ABC 模型认为 B 类基因一般只在第 2, 3 轮花器官的花瓣和雄蕊中表达, 部分单子叶植物如水稻、芦笋和玉米等的 B 类基因也符合 ABC 的表达模型^[5, 6, 14], 但这并不适用于所有单子叶植物。



芳香授草的 *SoGLO* (ACR16053)、红门兰的 *OiGLO* (BAI78360)、蝴蝶兰的 *PhPI9* (AAV28175)、*PhPI10* (AAV28490)、蟹爪兰唇兰的 *CgGLO* (ACR16039)、文心兰的 *OGRMADS8* (ADJ67236)、细茎石斛的 *DmPI* (ABW96391)、长叶美洲兜兰的 *PIGLO* (ACR16048)、香英兰的 *VpGLO* (ACR16057)。黑色框表示 MADS-box domain 和 K-domain, PI 结构域以下划线表示。

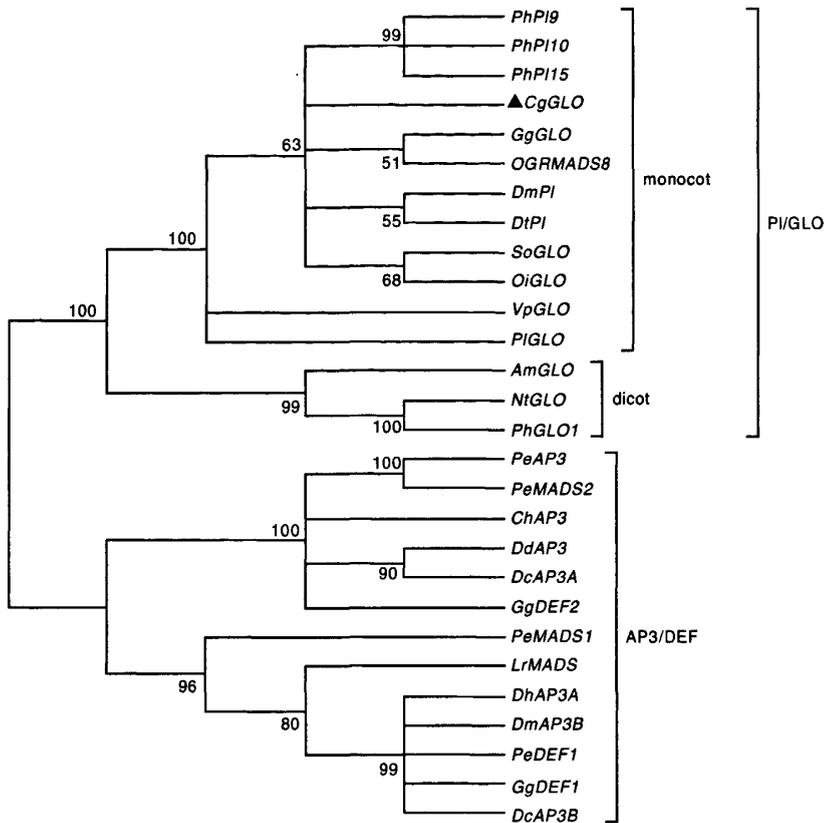
图 2 *CgGLO* 与其他物种 *GLO* 蛋白氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of the predicted amino acid sequences of *C. goeringii* *GLO* and related proteins

为此, van Tunen 等通过对郁金香的研究,对 ABC 模型进行了修正:认为 B 类基因不仅在第 2,3 轮花器官中表达,同时也在第一轮中表达。同为单子叶植物的鸢尾科中 *DcOPI* 基因、姬蝴蝶兰中的 *GLO*-like 基因 *PeMADS6*、麝香百合 *LLGLO1* 基因以及蝴蝶兰中 *pPI9* 基因的表达模式都支持了 van Tunen 等对 ABC 模型的修正^[11,8,9,16]。我们的结果表明, *CgGLO* 主要在第二轮花器官唇瓣和花瓣中表达,在第一轮花器官萼片中表达较少,在蕊柱中表达量很低(图 4),其原因可能是在春

兰中,组成花被的花萼和花瓣特化不明显,而雄蕊和心皮又合成了兰科特有的蕊柱^[17]。这种表达模式同样也支持了 van Tunen 等对 ABC 模型的修正。

CgGLO 基因在春兰营养器官叶片和根中有少量表达(图 4),这与 *DcOPI*, *PeMADS6*, *LLGLO1* 和 *pPI9* 的表达并不一样,它们都只在生殖器官中表达,而在营养器官中不表达^[11,8,9,16],另外,值得注意的是 *CgGLO* 在第三轮花器官蕊柱中也只少量表达(图 4),而其他单子叶植物的同类基因在



蝴蝶兰的 *PhPI15* (AAV28491)、姬蝴蝶兰的 *PeAP3* (AAR26628)、*PeDEF1* (AAR26629)、*PeMADS1* (AAR26626)、*PeMADS2* (AAR26628)、鹤石斛的 *DcAP3A* (AAZ95248)、*DcAP3B* (AAZ95249)、齿瓣石斛 *DdAP3* (ACY68439)、细茎石斛的 *DmAP3B* (ABW96393)、球花石斛的 *DtPI* (AAY86363)、秋石斛的 *DhAP3* (ACJ66727)、金鱼草的 *AmGLO* (Q03378)、烟草的 *NtGLO* (Q03416)、矮牵牛的 *PhGLO1* (AAS46018)、大花蕙兰 *ChAP3* (ABG78568)、盔状爪唇兰的 *GgDEF1* (ACR16038)、*GgDEF2* (ACR16036)、王百合的 *LrMADS* (BAB91550),其余同图2。各节点处数字表示 bootstrap 值(重复 1 000 次)。

图3 *CgGLO* 与其他 B 类 *MADS-box* 基因的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *CgGLO* with other B group *MADS-box* genes

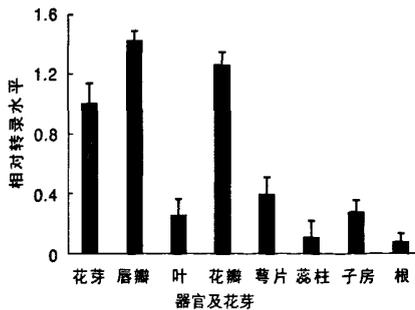


图4 *CgGLO* 基因在春兰各器官以及花芽中的表达情况

Fig. 4 Real-time quantitative PCR analysis of *CgGLO* mRNA expression in the flower buds, lips, leaves, petals, sepals, column, ovary and roots of *C. goeringii* plants

第三轮花器官中都大量表达,这似乎体现出春兰的 *GLO* 基因存在一定的特殊性,具体原因需要进一步研究。

此外,*PeMADS6* 基因在姬蝴蝶兰未成熟子房中微量表达,原位杂交 *PeMADS6* 表明对子房的发育起抑制作用,*CgGLO* 基因在春兰幼嫩子房中也有一定的表达,可能在子房的发育过程中也具有功能。另外我们从春兰克隆的 *AGL6* 类基因以及 *AP3/DEF* 基因在子房中也有表达(数据未显示),说明这些基因可能共同调控春兰子房的形成。

参考文献:

- [1] Coen ES, Meyerowitz EM. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development [J]. *Nature*, 1991, 353: 31 - 37.
- [2] Schwarz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W, et al. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus* [J]. *Science*, 1990, 250(4983): 931 - 936.
- [3] Trz? bner W, Ramirez L, Motte P, et al. *GLOBOSA*; a homeotic gene which interacts with *DEFICIENS* in the control of *Antirrhinum* floral organogenesis [J]. *EMBO Journal*, 1992, 11: 4693 - 4704.
- [4] Goto K, Meyerowitz EM. Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA* [J]. *Genes Development*, 1994, 8: 1548 - 1560.
- [5] Chung YY, Kim SR, Kang HG, et al. Characterization of two rice MADS box genes homologous to *GLOBOSA* [J]. *Plant Science*, 1995, 109: 45 - 46.
- [6] 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 Molecular Biology*, 2003, 52: 831 - 841.
- [7] Park JH, Ishikawa Y, Ochiai T, et al. Two *GLOBOSA*-like genes are expressed in second and third whorls of homochlamydeous flowers in *Asparagus officinalis* L [J]. *Plant Cell Physiology*, 2004, 45(3): 325 - 332.
- [8] Tsai WC, Lee PF, Chen HI, et al. *PeMADS6*, a *GLOBOSA/PISTILLATA*-like gene in *Phalaenopsis equestris* involved in petaloid formation, and correlated with flower longevity and ovary development [J]. *Plant Cell Physiology*, 2005, 6(7): 1125 - 1139.
- [9] Wu XP, Shi JS, Xi ML, et al. A B functional gene cloned from lily encodes an ortholog of *Arabidopsis* *PISTILLATA* (PI [J]. *Plant Molecular Biology Report*, 2010, 28: 684 - 691.
- [10] Tsai WC, Kuoh CS, Chuang MH, et al. Four DEF-Like MADS Box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* Orchid [J]. *Plant Cell Physiology*, 2004, 45(7): 831 - 844.
- [11] Xu YF, Teo LL, Zhou J, et al. Floral organ identity genes in the orchid *Dendrobium crumenatum* [J]. *Plant Journal*, 2006, 46: 54 - 68.
- [12] Chang YY, Chiu YF, Wu JW, et al. 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* [J]. *Plant Cell Physiology*, 2009, 50(8): 1425 - 1438.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology Evolution*, 1987, 4: 406 - 425.
- [14] Munster T, Wingen LU, Faigl W, et al. Characterization of three *GLOBOSA*-like MADS box genes from maize: evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses [J]. *Gene*, 2001, 262: 1 - 13.
- [15] van Tunen AJ, Eikelboom W, Angenent GC. Floral organogenesis in *Tulipa* [J]. *Flowering News!*, 1993, 16: 33 - 38.
- [16] 郭滨, 陈东红, 戴薇, 等. 蝴蝶兰花发育相关基因 *pPD9* 的克隆与表达分析 [J]. 复旦大学学报, 2006, 45(3): 277 - 282.
- [17] Theissen G, Becker A, Rosa AD, et al. A short history of MADS-box genes in plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 42: 115 - 149.

(责任编辑 张 韵)