

蕙兰 B 类 MADS-box 基因的克隆及表达分析

向 林, 秦德辉, 李小白, 李伯钧, 郭方其, 吴 超, 孙崇波*

(浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

摘 要: 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术从蕙兰 (*Cymbidium faberi*) 中分离到 3 个 B 类 MADS-box 基因 *CfGLO*、*CfDEF1* 和 *CfDEF2*, 分别编码 210、222 和 227 个氨基酸。系统进化树分析显示, *CfGLO* 属于 *PI/GLO* 类基因, *CfDEF1* 和 *CfDEF2* 分别属于 *PaleoAP3* 组基因的 *PeMADS2* 类基因和 *PeMADS3* 类基因。RT-PCR 和实时荧光定量表达分析表明, *CfDEF1* 在 2、3 轮花器官侧瓣、唇瓣和蕊柱中强烈表达, 在萼片中不表达; *CfDEF2* 在 1、2、3 轮花器官中都表达, 在营养组织中不表达; 而 *CfGLO* 在所有组织中都表达, 说明 3 个基因在蕙兰花器官的形成过程中可能扮演着不同的角色。此外, 3 个基因都在蕙兰幼嫩子房中有表达, 显示其可能在蕙兰子房的形成过程中起一定作用。

关键词: 蕙兰; B 类 MADS-box 基因; 花; 发育; 实时荧光定量表达

中图分类号: S 682.31

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 12-2333-09

Cloning and Expression Analysis of B Class MADS-box Genes from *Cymbidium faberi*

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

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

Abstract: In this study, three B-class genes, *CfGLO*, *CfDEF1* and *CfDEF2* were isolated from *Cymbidium faberi* by RT-PCR and RACE-PCR techniques. Sequence analysis showed that *CfGLO*, *CfDEF1* and *CfDEF2* encode a putative protein of 210, 222, 227 amino acids, respectively. Phylogenetic tree analysis indicated that *CfGLO* belong to *PI/GLO* clade, and *CfDEF1* and *CfDEF2* belong to *PeMADS3* clade and *PeMADS2* clade of MADS-box gene family, respectively. RT-PCR and real-time quantitative PCR demonstrated that *CfDEF1* was strongly expressed in 2, 3 whorls organ, i.e. lips, petals and column, while absent in whorl 1 (sepals); *CfDEF2* was expressed in whorls 1, 2 and 3, while absent in vegetative tissues; Whereas *CfGLO* was expressed in all tissues. The results suggested that the three genes may play different roles in floral organs formation of *C. faberi*. In addition, the three genes all expressed in immature ovary, the results displayed that they may regulate the ovary development of *C. faberi*.

Key words: *Cymbidium faberi*; B class MADS-box gene; flower; development; real-time quantitative PCR

收稿日期: 2011-07-07; 修回日期: 2011-10-24

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3110438); 浙江省花卉产业重点科技创新团队项目 (2009R50034)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chongpo1230@sina.com)

多数高等植物的花从外向内由 4 轮花器官, 即第 1 轮的萼片、第 2 轮的花瓣、第 3 轮的雄蕊群和第 4 轮的雌蕊群组成, 但部分植物的花在进化过程中形成了独特的花型。蕙兰 (*Cymbidium faberi*) 是兰科兰属地生种类的主要种之一, 花形特异, 花的第 1 轮为花瓣状的萼片, 第 2 轮为两片侧瓣和中间高度特化的唇瓣, 第 3 轮的雄蕊群和第 4 轮的雌蕊群合生形成高度特化的蕊柱, 所以其花器官的形成机理比其它植物更为复杂。Coen 和 Meyerowitz (1991) 根据对拟南芥和金鱼草的研究提出了经典的花发育 ABC 模型, 其中 B 类基因属于 MADS-box 基因家族, 在花瓣和雄蕊的发育过程中起着重要作用。金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 中 B 类基因包括 *DEFICIENS* (*DEF*) 和 *GLOBOSA* (*GLO*) 两类基因, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中这两类基因相应地称之为 *APETALA3* (*AP3*) 和 *PISTILLATA* (*PI*) (Goto & Meyerowitz, 1994)。目前已经从许多植物中分离出 *DEF* 和 *GLO* 类基因 (Goto & Meyerowitz, 1994; Hsu & Yang, 2002; Tsai et al., 2004; Xu et al., 2006; Kim et al., 2007; Mondragon-Palomino & Theissen, 2008; Chang et al., 2010; Sirisawat et al., 2010)。

通过对姬蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*)、鹭兰 (*Habenaria radiata*)、鸽石斛 (*Dendrobium crumenatum*)、细茎石斛 (*D. moniliforme*) 及文心兰 (*Oncidium Gower Ramsey*) 等的研究认为, 兰花花被的形成受几个 *DEF* 类基因和 *GLO* 类基因的相互作用调控 (Hsu & Yang, 2002; Tsai et al., 2004; Xu et al., 2006; Kim et al., 2007; Mondragon-Palomino & Theissen, 2008; Chang et al., 2010; Sirisawat et al., 2010)。

根据进化分析, *DEF* 类基因可以分为 4 大类 (Mondragon-Palomino & Theissen, 2008), 并且同一类的表达模式基本相同。目前已克隆的第 1 类 *PeMADS2* 类基因包括姬蝴蝶兰的 *PeMADS2*、文心兰的 *OMADS5* 等; 第 2 类 *OMADS3* 类基因包括文心兰的 *OMADS3* 和姬蝴蝶兰的 *PeMADS5* 等, 这两类基因在兰花的两轮花被片中都表达, 说明这两类基因控制兰花花被片的形成; 第 3 类 *PeMADS3* 类基因包括姬蝴蝶兰的 *PeMADS3*、细茎石斛的 *DMAP3B* 等, 它们只在侧瓣和唇瓣中表达, 但不在外轮花被片中表达, 说明兰花内轮花被片是由第 1 类、第 2 类及第 3 类基因共同表达调控而形成的; 而第 4 类 *PeMADS4* 类基因只在唇瓣中表达, 因此兰花唇瓣是由这 4 类基因共同表达调控而形成的。进一步的试验也表明 4 个 *DEF* 类基因和 1 个 *GLO* 基因的相互作用可能控制兰花萼片、侧瓣和唇瓣的形成 (Tsai et al., 2004; Kim et al., 2007; Mondragon-Palomino & Theissen, 2008), 然而其准确的机理还不十分清楚, 需要通过更多的研究来了解 B 类基因的调控作用。

为了研究 B 类 MADS-box 基因在蕙兰花发育中的作用, 了解其花被片的形成机理, 本研究中利用 RT-PCR 结合 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术从蕙兰中获得了 3 个 B 类 MADS-box 基因 *CfGLO*、*CfDEF1* 和 *CfDEF2*, 并对其在蕙兰不同组织中的表达进行了分析。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作出进一步的阐释, 为揭示蕙兰花发育机理奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以种植于浙江省农业科学院园艺研究所花卉中心大棚内蕙兰品种‘大一品’为试验材料。采集 5 mm 长的花芽和花蕾刚刚绽开时的花瓣、萼片、唇瓣、蕊柱、子房以及幼嫩的根和叶, 立即冻存于液氮中, 带回实验室保存在 -70 °C 的冰箱中备用。

1.2 总 RNA 的提取和 B 类 MADS-box 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 SMARTer™

RACE cDNA Amplification Kit 合成 cDNA 第 1 链, 以反转录模板直接进行 PCR 反应。

为了克隆蕙兰 B 类 MADS-box 基因, 根据此类基因的保守区域设计引物进行 PCR 扩增, 扩增 *DEF1* 基因上游引物 DEF1-1 为: 5'-ATAGAGATAAAGAAGATAGA-3', 下游引物 DEF1-2 为: 5'-TTTGCTCAAGACCGCGCAG-3'; 扩增 *DEF2* 基因上游引物 DEF2-1 为: 5'-GATYGAGATWAAGAAGAT-3', 下游引物 DEF2-2 为: 5'-TYTGCTCAAGACCGCGCA-3'; 扩增 *GLO* 基因的上游引物 GLO-1 为: 5'-ATCAGCGTGCTCTGCGA-3', 下游引物 GLO-2 为: 5'-AGTTCTCTCATACTCCC-3'。PCR 扩增条件为: 94 °C 变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 54 ~ 44 °C 复性 30 s, 每 5 个循环退火温度下降 2 °C, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 35 个循环后 72 °C 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 RACE 引物, *DEF1* 基因 3'RACE 引物 DEF1-3: 5'-TTACTGTAGCCCTTCTACTGATCTT-3'; 巢式引物 DEF1-4: 5'-AGGCAGAGGAATGGGGAAGAGTT-3'; 5'RACE 引物 DEF1-5: 5'-TGCCCTCTAACTCTTCCCCATTC-3'; 巢式引物 DEF1-6: 5'-CCATGCCAGTCAC AATCTGGTACTTC-3'。

DEF2 基因 3'RACE 引物 DEF2-3: 5'-GTATTGTAGTCCAACCACTGACACC-3'; 巢式引物 DEF2-4: 5'-TCAGGCAGAGGATGGGGGAGGAC-3'; 5'RACE 引物 DEF2-5: 5'-CCGCAGTAAGTTCCTGTGGTTT-3'; 巢式引物 DEF2-6: 5'-TTATGCCGGACACCTGCTGGTAACGA-3'。

GLO 基因 3'RACE 引物 GLO-3: 5'-TGAGTATTGTAGCCCCTCCACCA-3'; 巢式引物 GLO-4: 5'-CTCGGGCAAGAACTCTGGGACGC-3'; 5'RACE 引物 GLO-5: 5'-ATTCTGGAGCGTTTCCTCAATCGG-3'; 巢式引物 GLO-6: 5'-CTCAAGTTCTCGTGTTTTGCGTCC-3'; 以之前反转录的 cDNA 为模板, 采用 Clontech 公司的 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒进行 3'端和 5'端的 RACE 扩增。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

对于获得的基因全长 cDNA 序列, 先在 <http://au.expasy.org/tools/dna.html> 进行开放阅读框的分析; 用 ProtParam 软件分析 DEF 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 软件进行显示。运用 BLAST 搜索同源基因, 使用 ClustalX 1.83 软件对搜索得到基因的 cDNA 序列进行多重序列比对, 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 & Nei, 1987)。

1.4 基因表达分析

分别取 0.1 g 花芽、花瓣、萼片、唇瓣、蕊柱、子房、根和叶, 按照北京天恩泽基因公司 RNAout 2.0 试剂盒说明书提取总 RNA。分别以 200 ng RNA 为模板, 按照天根生化科技 (北京) 有限公司的 Quantscript RT Kit 说明书进行反转录, 反转录后的 cDNA 储存于 -20 °C 备用。根据蕙兰已有的 18S rRNA 序列和克隆的基因序列设计表达引物, 用 18S rRNA 基因作为内标。18S rRNA 基因引物序列: 上游引物: 5'-TGCCGTTTCCCTGTTGATTC-3', 下游引物: 5'-TGCTGCCTTCCTTGGATGTG-3'。DEF1 基因引物序列: 上游引物: DEF1-7 5'-GCAGGTGTCCGGCATAAATC-3', 下游引物: DEF1-8 5'-TCTGCCTGATCTCCCTTCTCA-3'; DEF2 基因引物序列: 上游引物: DEF2-7 5'-TGGCTGATTACTGTAGCCCTTCTA-3', 下游引物: DEF2-8 5'-GTGTATTTTGCATCCTCTCATATTGAG-3'。GLO 基因引

物序列: 上游引物: GLO-7 5'-GTGTTTCGGAATAAACAGATGGACTT-3', 下游引物: GLO-8 5'-TACTCCCTTCCATTGCCAATTG-3'。退火温度 50 °C, 共 35 个循环, 每组处理重复 3 次, 用凝胶成像软件量化图片中 PCR 产物, 文中显示具有代表性的一组电泳图片。之后采用荧光染料法对上述样品进行实时荧光定量表达分析。

20 μ L 反应体系包括 9 μ L 2.5 $\times$ Sybr Green mix, 9 μ L ddH₂O, 1 μ L cDNA, 1 μ L 引物混合物(正向引物和反向引物, 10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)。反应程序为: 95 °C 3 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 循环 40 次, 每个处理 3 次重复, 整个过程在 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 $Rel. Exp = 2^{-\Delta\Delta Cq}$, 其中 $\Delta Cq = Cq(CgGLO) - Cq(18s RNA)$, $\Delta\Delta Cq = (\text{各植物组织 } \Delta Cq) - (\text{花芽 } \Delta Cq)$ (Bustin et al., 2009)。

2 结果与分析

2.1 蕙兰两个 DEF 基因和一个 GLO 基因全长 cDNA 的克隆

以蕙兰花芽 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 DEF 和 GLO 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得到基因全长 cDNA 序列(图 1)。

BLASTX 的结果显示, 全长 cDNA 与其它兰科植物 DEF 类和 GLO 类基因具有 90% 以上的同源性, 因此, 将基因分别命名为 CfDEF1、CfDEF2 和 CfGLO。CfDEF1 全长 918 bp, 含有长度为 666 bp 的开放阅读框, 编码 222 个氨基酸, 分子量 25.6 kD, 预测等电点为 9.04, GenBank 登录号为 HM208535。CfDEF2 全长 873 bp, 含有 681 bp 开放阅读框, 编码 227 个氨基酸, 分子量 26.6 kD, 预测等电点为 8.98, GenBank 登录号为 HM208536。CfGLO 含有 630 bp 长的开放阅读框, 共编码 210 个氨基酸, 分子量为 24.5 kD, 预测等电点为 9.39, GenBank 登录号为 HQ164433。

2.2 基因序列分析

利用推测的 CfDEF 和 CfGLO 蛋白序列进行 BLASTP 分析, 得到一些来自不同物种的同源蛋白序列。使用 ClustalX 1.83 和 Boxshade 3.21 软件进行氨基酸水平的序列比对显示, CfDEF1 氨基酸序列与单子叶植物盔状爪唇兰的 GgDEF2、文心兰的 OMADS9、姬蝴蝶兰的 PeMADS3、秋石斛的 DhAP3 有 95% 左右的同源性; CfDEF2 氨基酸序列则与 GgDEF1、OMADS5、鸢尾石斛的 DcAP3A、大花蕙兰的 ChAP3 具有 88%~94% 的同源性(图 2)。

此外, CfDEF1 与 CfDEF2 的氨基酸序列 C 末端与其它单子叶植物的 AP3/DEF 氨基酸序列一样, 含有 PI-derived 结构域(FxFRLOPSQPNLH)和 PaeloAP3 结构域(YGxHDLRLA) (Kramer et al., 1998), 说明 CfDEF1 与 CfDEF2 都属于 PaleoAP3 类基因, 但是两者的氨基酸序列只有 65% 的同源

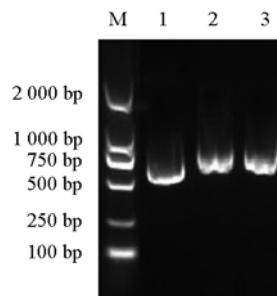


图 1 蕙兰 DEF 和 GLO 基因全长扩增

Fig. 1 Amplification profile of the putative full-length fragment of DEF and GLO genes from *C. faberi*

M. DL2000 DNA marker; 1. CfGLO; 2. CfDEF1; 3. CfDEF2.

性(图2)。在 I 结构域内,所有 AP3/DEF 蛋白具有高度保守的(H/Q)YEXM 序列(Kramer et al., 1998)。在 CfDEF1 和 CfDEF2 氨基酸序列的 83~87 位也具有 QYEKM 和 QYERM 的保守序列。CfGLO 蛋白与芳香缙草、红门兰、盔状爪唇兰、长叶美洲兜兰、球花石斛、蝴蝶兰等兰科植物的 PI/GLO 蛋白都有 90% 以上的同源性,并且其 C 端具有典型的 PI 结构域(图2),结果表明 CfGLO 属于 B 类 MADS-box 基因的 PI/GLO 家族。

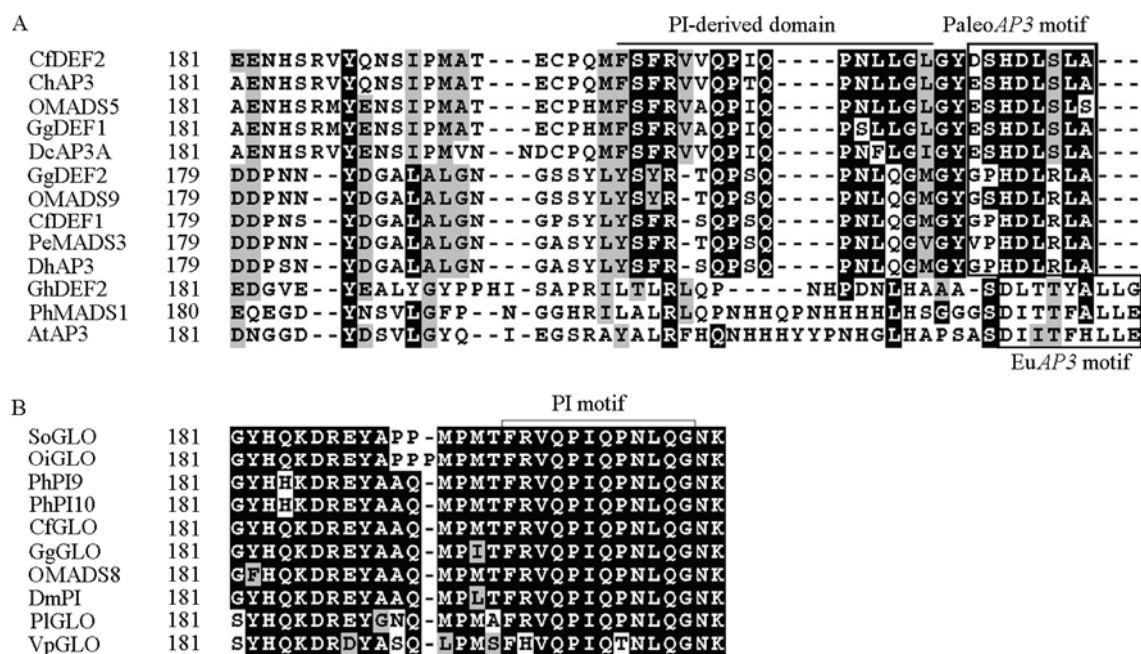


图2 CfDEF1、CfDEF2 以及 CfGLO 与其它植物的 AP3/DEF 和 PI/GLO 氨基酸序列同源比较

A. AP3/DEF 类氨基酸序列同源比较; B. PI/GLO 类氨基酸序列同源比较。各序列为盔状爪唇兰的 GgDEF1、GgDEF2 和 GgGLO (ACR16036、ACR16038 和 ACR16039)、文心兰的 OMADS5、OMADS9 和 OMADS8 (ADJ67234、ADJ67235 和 ADJ67236)、姬蝴蝶兰的 PeMADS3 (AAR26629)、秋石斛的 DhAP3 (ACJ66727)、大花蕙兰的 ChAP3 (ABG78568)、鹤石斛的 DcAP3A (AAZ95248)、非洲菊的 GhDEF2 (CAA08803)、矮牵牛的 PhMADS1 (Q07472)、拟南芥的 AtAP3 (AAM64919)、蝴蝶兰的 PhPI9 和 PhPI10 (AAV28175 和 AAV28490)、芳香缙草的 SoGLO (ACR16053)、红门兰的 OiGLO (BAI78360)、细茎石斛的 DmPI (ABW96391)、长叶美洲兜兰的 PIGLO (ACR16048)、香荚兰的 VpGLO (ACR16057)。

PI-derived domain 用上划线表示。黑色框表示 PaleoAP3 结构域和 EuAP3 结构域以及 PI 结构域。

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of C-terminal regions of CfDEF1, CfDEF2 and CfGLO from *Cymbidium faberi* with those of AP3/DEF and PI/GLO orthologs from other plant species

A. CfDEF1 and CfDEF2 sequences were aligned with AP3/DEF from *Gongora galeata* (GgDEF1, ACR16036; GgDEF2, ACR16038; GgGLO, ACR16039); *Oncidium Gower Ramsey* (OMADS5, ADJ67234; OMADS9, ADJ67235; OMADS8, ADJ67236); *Phalaenopsis equestris* (PeMADS3, AAR26629); *Dendrobium hybrid* (DhAP3, ACJ66727); *Cymbidium hybrida* (ChAP3, ABG78568); *Dendrobium crumenatum* (DcAP3A, AAZ95248); *Gerbera hybrida* (GhDEF2, CAA08803); *Petunia hybrida* (PhMADS1, Q07472); *Arabidopsis thaliana* (AtAP3, AAM64919); B. CfGLO sequence was aligned with PI/GLO from *G. galeata* (GgGLO, ACR16039); *Oncidium Gower Ramsey* (OMADS8, ADJ67236); *P. hybrida* (PhPI9, AAV28175; PhPI10, AAV28490); *Spiranthes odorata* (SoGLO, ACR16053); *Orchis italica* (OiGLO, BAI78360); *Dendrobium moniliforme* (DmPI, ABW96391); *Phragmipedium longifolium* (PIGLO, ACR16048); *Vanilla planifolia* (VpGLO, ACR16057) using ClustalW.

The PI-derived domain is indicated on top of the columns.

The PaleoAP3 and EuAP3 domains and PI motif are indicated in black column, respectively.

为了进一步研究 CfDEF1、CfDEF2 和 CfGLO 与其他 B 类 MADS-box 基因的关系,进行了系统进化分析(图3)。分析显示 B 类 MADS-box 基因分成 PI/GLO 和 AP3/DEF 两个分支,其中 AP3/DEF

分支又分成 PaleoAP3 和 EuAP3 两个组, 而 PaleoAP3 组又分成 *PeMADS2* 类基因、*OMADS3* 类基因、*PeMADS3* 类基因、*PeMADS4* 类基因 4 个组。CfDEF1、CfDEF2 和 CfGLO 在图中以三角形标示, 分别归类于 *PeMADS3* 类基因组、*PeMADS2* 类基因组以及 *PI/GLO* 组 (图 3)。

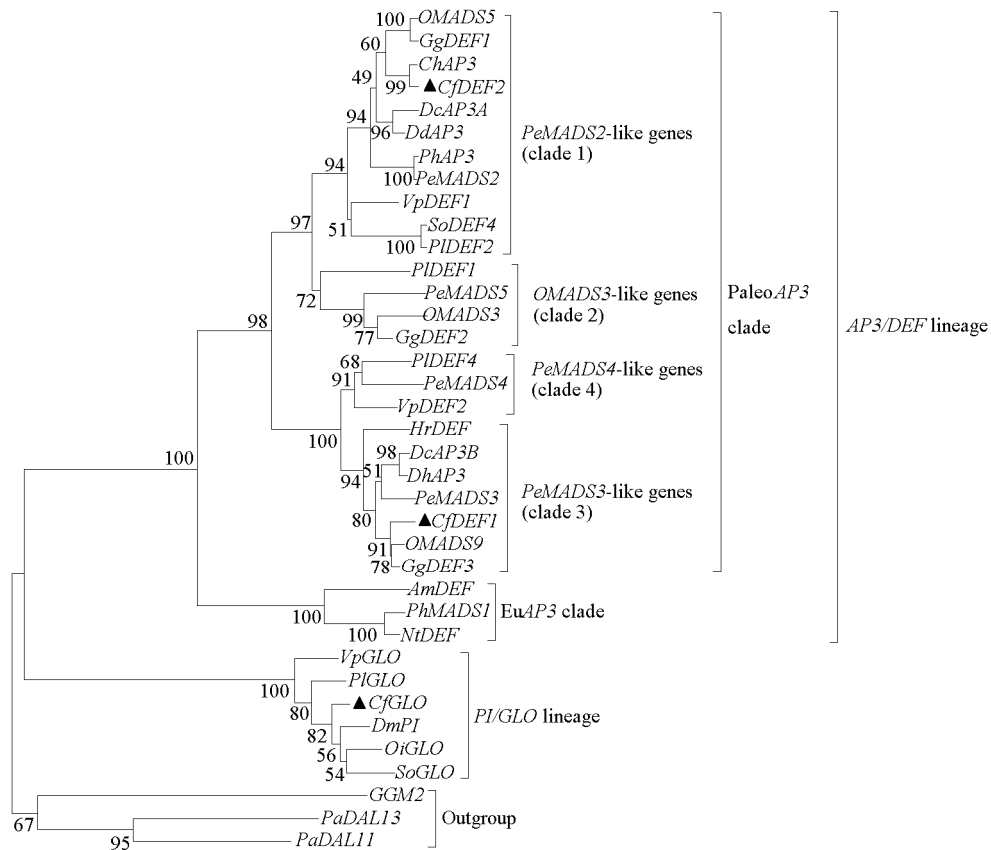


图 3 不同植物 AP3/DEF 类和 PI/GLO 类 MADS-box 基因系统进化树

系统进化树分析涉及的基因序列如下: 文心兰的 *OMADS3*, *OMADS5*, *OMADS9* (AY196350, HM140840, HM140841)、盔状爪唇兰的 *GgDEF1*, *GgDEF2*, *GgDEF3* (237701150, 237701152, 237701154)、大花蕙兰的 *ChAP3* (DQ683575)、鸢尾科的 *DcAP3A* 和 *DcAP3B* (DQ119838, DQ119839)、齿瓣石斛的 *DdAP3* (GU126414)、秋石斛的 *DhAP3* (EU927372)、细茎石斛的 *DmPI* (EU056326)、姬蝴蝶兰的 *PeMADS2*, 3, 4, 5 (AY378149, AY378150, AY378147, AY378148)、蝴蝶兰的 *PhAP3* (AY771993)、香荚兰的 *VpGLO* (FJ804118) 和 *VpDEF1*, 2 (FJ804115, FJ804116)、芳香缙草的 *SoGLO* (FJ804114) 和 *SoDEF4* (FJ804113)、长叶美洲兜兰的 *PiGLO* (FJ804109) 和 *PIDEF1*, 2, 4 (FJ804105, FJ804106, FJ804108)、鹭兰的 *HrDEF* (218118129)、红门兰的 *OiGLO* (290350877)、矮牵牛的 *PhMADS1* (22664)、烟草的 *NtDEF* (1370275)、金鱼草的 *AmDEF* (16017)、欧洲云杉的 *PaDAL11* 和 *PaDAL13* (AF158539, AF158543)、灌状买麻藤的 *GGM2* (5019428)。

各节点处数字表示 bootstrap 值 (重复 1 000 次)。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of AP3/DEF-like and PI/GLO-like MADS-box genes in plant species

The B group MADS-box genes listed in the tree are as follows: *Oncidium Gower Ramsey* (*OMADS3*, AY196350; *OMADS5*, HM140840; *OMADS9*, HM140841); *Gongora galeata* (*GgDEF1*, 237701150; *GgDEF2*, 237701152; *GgDEF3*, 237701154); *Cymbidium hybrida* (*ChAP3*, DQ683575); *Dendrobium crumenatum* (*DcAP3A*, DQ119838; *DcAP3B*, DQ119839); *D. devonianum* (*DdAP3*, GU126414); *D. hybrid* (*DhAP3*, EU927372); *D. moniliforme* (*DmPI*, EU056326); *Phalaenopsis equestris* (*PeMADS2*, AY378149; *PeMADS3*, AY378150; *PeMADS4*, AY378147; *PeMADS5*, AY378148); *P. hybrida* (*PhAP3*, AY771993); *Vanilla planifolia* (*VpGLO*, FJ804118; *VpDEF1*, FJ804115; *VpDEF2*, FJ804116); *Spiranthes odorata* (*SoGLO*, FJ804114; *SoDEF4*, FJ804113); *Phragmipedium longifolium* (*PiGLO*, FJ804109; *PIDEF1*, FJ804105; *PIDEF2*, FJ804106; *PIDEF4*, FJ804108); *Habenaria radiata* (*HrDEF*, 218118129); *Orchis italica* (*OiGLO*, 290350877); *Petunia hybrida* (*PhMADS1*, 22664); *Nicotiana tabacum* (*NtDEF*, 1370275); *Antirrhinum majus* (*AmDEF*, 16017); *Picea abies* (*PaDAL11*, AF158539; *PaDAL13*, AF158543); *Gnetum gnemon* (*GGM2*, 5019428).

The numbers at node represent the bootstrap values (with 1 000 replicates).

2.3 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 在蕙兰不同组织的表达分析

采用半定量 RT-PCR 对 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 进行组织特异性表达分析 (图 4), 结果表明 *CfDEF1* 主要在第 2 轮的侧瓣和唇瓣以及第 3 轮的蕊柱中表达, 在营养组织叶片和根以及第 1 轮的萼片中都不表达; *CfDEF2* 则在 1、2 轮花器官中表达, 在蕊柱、叶片和根中不表达; *CfGLO* 在所有花器官及其它组织中都表达。

进一步的实时荧光定量表达分析将各基因在花芽中的表达量设为 1, 结果与半定量 RT-PCR 结果基本一致 (图 5), *CfDEF1* 在唇瓣和侧瓣的表达量最高, 在蕊柱中表达量次之, 在子房中表达较低, 约为唇瓣和侧瓣的表达量的 24%; *CfDEF2* 在侧瓣中表达量最高, 在萼片中表达量次之, 在唇瓣、子房中表达量较低, 与半定量 RT-PCR 表达不一样的是在蕊柱中也有少量表达, 约为侧瓣表达量的 3%; *CfGLO* 在唇瓣和侧瓣中表达量最高, 在叶、子房和萼片中表达较低, 在蕊柱和根中的表达量最低, 约为唇瓣和侧瓣表达量的 7%。

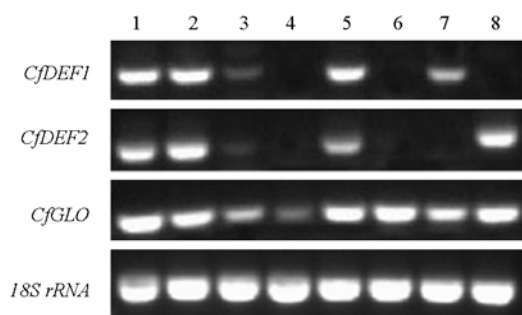


图 4 半定量 RT-PCR 检测 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 在蕙兰不同组织以及花芽中的表达情况

1. 花芽; 2. 侧瓣; 3. 子房; 4. 根; 5. 唇瓣; 6. 叶片; 7. 蕊柱; 8. 萼片。

Fig. 4 Expression of *CfDEF1*, *CfDEF2* and *CfGLO* genes in different tissues of *C. faberi* by semi-quantitative RT-PCR

1. Flower bud; 2. Petal; 3. Ovary; 4. Root; 5. Lip; 6. Leaf; 7. Column; 8. Sepal.

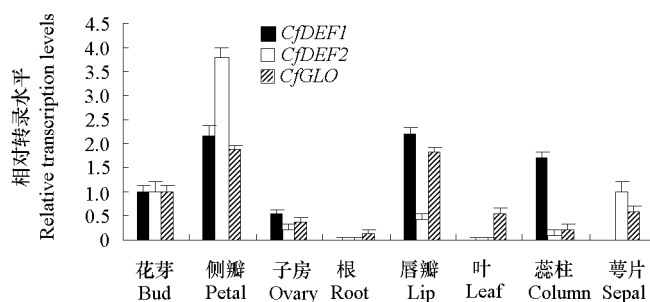


图 5 荧光定量 PCR 检测 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 在蕙兰各组织以及花芽中的表达情况

Fig. 5 Real-time quantitative PCR analysis of *CfDEF1*, *CfDEF2* and *CfGLO* mRNA expression in the flower bud, petal, ovary, root, lip, leaf, column and sepal of *C. faberi*

3 讨论

为了研究 B 类 MADS-box 基因对蕙兰花被形成的调控作用, 2 个 *DEF* 基因和 1 个 *GLO* 基因被克隆出来。序列同源分析以及系统进化分析表明, *CfDEF1*、*CfDEF2* 分别属于兰科植物 *PaleoAP3*

基因的 *PeMADS3* 类基因和 *PeMADS2* 类基因。*CfGLO* 属于 B 类 MADS-box 基因的 *PI/GLO* 类基因 (图 2, 图 3)。

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, 部分花萼与花瓣有明显差异的单子叶植物如水稻 (*Oryza sativa*)、芦笋 (*Asparagus officinalis*) 和玉米 (*Zea mays*) 等的 B 类基因也符合 ABC 的表达模型 (Chung et al., 1995; Munster et al., 2001; Park et al., 2004), 但对于具有花瓣状萼片的单子叶植物却不适用。为此, van Tunen 等 (1993) 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 1 轮中表达。本结果表明, *CfDEF2* 的表达模式与同类 (*PeMADS2* 类) 姬蝴蝶兰的 *PeMADS2*、鸢尾的 *DcOAP3A*、细茎石斛的 *DMAP3A* 一致 (Tsai et al., 2004; Xu et al., 2006; Sirisawat et al., 2010) (图 4, 图 5), 在第 1~3 轮花器官中都表达, 支持了 van Tunen 等 (1993) 对 ABC 模型的修正。

尽管单子叶植物的 *PaeloAP3* 类基因大多数在第 1 和第 2 轮花器官中都表达, 但 *PeMADS3* 类基因如 *PeMADS3*、*DcOAP3B*、*OMADS9*、*DMAP3B*、*HrDEF* 都不在第 1 轮花器官中表达, 这符合经典的 ABC 模型。蕙兰的 *PeMADS3* 类基因 *CfDEF1* 的表达模式与同类基因表达相似, 只在侧瓣和唇瓣中表达 (图 4, 图 5), 说明 *CfDEF1* 可能控制蕙兰侧瓣和唇瓣的形成。另外, *CfDEF2* 在萼片中强烈表达, 而 *CfDEF1* 在萼片中不表达, 这表明 *CfDEF2* 可能对蕙兰萼片的形成具有积极作用, 但是既然 *CfDEF2* 也在侧瓣和唇瓣中都有表达, 却没有将花瓣转化成萼片, 这可能是 *CfDEF2* 的单独存在还不足以促进花瓣向萼片的转化。对鹭兰的研究发现, 正常的鹭兰萼片与花瓣形态不一, *HrDEF* 在正常鹭兰中只在第 2 轮的花瓣中表达, 而在具有花瓣状萼片的鹭兰突变体的第 1 和第 2 轮的花器官中却都有表达, 这说明 *HrDEF* 的差异表达导致了鹭兰萼片和花瓣的差异 (Kim et al., 2007), 从而推测 *PeMADS3* 类基因在兰花的萼片和花瓣的分化过程中起作用 (Mondragon-Palomino & Theissen, 2008)。因此 *CfDEF2* 可能需要与 *CfDEF1* 一起共同作用才能控制蕙兰萼片的形成。

CfGLO 的表达模式也与同类的鸢尾中 *DcOPI*、姬蝴蝶兰中的 *PeMADS6*、麝香百合 (*Lilium longiflorum*) 的 *LLGLO1* 一致 (Tsai et al., 2005; Xu et al., 2006; Wu et al., 2010), 在第 1~3 轮花器官中都表达, 也支持 van Tunen 等 (1993) 对 ABC 模型的修正。并且 *CfGLO* 基因在蕙兰营养器官叶片和根中有少量表达 (图 4, 图 5), 这与其它植物的 B 类 MADS-box 基因, 如郁金香 (*Tulipa gesneriana*) 的 *TGGLO*、油棕 (*Elaeis guineensis*) 的 *EgGLO2* 等的表达一致 (Kanno et al., 2003; Adam et al., 2007), 说明这些基因除了控制花器官的发育外, 可能对营养组织如叶的发育也起作用。

对兰科植物 *PeMADS2* 类基因在花器官中的表达分析表明, *OMADS5*、*PeMADS2* 以及 *DcOAP3A* 等基因在侧瓣与萼片中的表达量基本一致 (Tsai et al., 2004; Xu et al., 2006; Chang et al., 2010), 而 *CfDEF2* 在这两个花器官中的表达量差别较大 (图 5)。同样, *PI/GLO* 类基因 *OMADS8*、*PeMADS6*、*DMPI* 以及 *DcOPI* 在花瓣与萼片及蕊柱中的表达量基本一致 (Tsai et al., 2005; Xu et al., 2006; Chang et al., 2010; Sirisawat et al., 2010), 而 *CfGLO* 在这 3 个花器官中的表达量差异也较大, 这可能是因为取材是花蕾刚刚绽开时的蕙兰, 此时花瓣、萼片、唇瓣、蕊柱形状和数量已经基本定型了, 所以基因的表达量在部分花器官中开始下降。此外, *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 在蕙兰的幼嫩子房中都有表达, 这与 *DcOAP3A*、*DcOAP3B*、*DcOPI*、*DMAP3A*、*PeMADS6* 的表达类似 (Tsai et al., 2005; Xu et al., 2006; Sirisawat et al., 2010), 说明 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 可能在蕙兰子房的形成过程中扮演了一定的角色。

References

- Adam H, Jouannic S, Orioux Y, Morcillo F, Richaud F, Duval Y, Tregear J W. 2007. Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure. *J Exp Bot*, 58: 1245 – 1259.
- Bustin S A, Benes V, Garson J A, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M W, Shipley G L, Vandesompele J, Wittwer C T. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55 (4): 611 – 622.
- Chang Y Y, Kao N H, Li J Y, Hsu W H, Liang Y L, Wu J W, Yang C H. 2010. Characterization of the possible roles for B class MADS box genes in regulation of perianth formation in orchid. *Plant Physiol*, 152: 837 – 853.
- Chung Y Y, Kim S R, Kang H G, Noh Y S, Park M C, Finkel D, An G. 1995. Characterization of two rice MADS box genes homologous to *GLOBOSA*. *Plant Sci*, 109: 45 – 46.
- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31 – 37.
- Goto K, Meyerowitz E M. 1994. Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev*, 8: 1548 – 1560.
- Hsu H F, Yang C H. 2002. An orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) AP3-like MADS genes regulate floral formation and initiation. *Plant Cell Physiol*, 43: 1198 – 1209.
- Kanno A, Saeki H, Kameya T, Saedler H, Theissen G. 2003. Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). *Plant Mol Biol*, 52: 831 – 841.
- Kim S Y, Yun P Y, Fukuda T, Ochiai T, Yokoyama J, Kameya T, Kanno A. 2007. Expression of a *DEFICIENS*-like gene correlates with the differentiation between sepal and petal in the orchid, *Habenaria radiata* (Orchidaceae). *Plant Sci*, 172: 319 – 326.
- Kramer E M, Dorit R L, Irish V F. 1998. Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: Duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. *Genetics*, 149: 765 – 783.
- Mondragon-Palomino M, Theissen G. 2008. MADS about the evolution of orchid flowers. *Trends Plant Sci*, 13: 51 – 59.
- Munster T, Wingen L U, Faigl W, Werth S, Saedler H, Theissen G. 2001. 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. *Gene*, 262: 1 – 13.
- Park J H, Ishikawa Y, Ochiai T, Kanno A, Kameya T. 2004. Two *GLOBOSA*-like genes are expressed in second and third whorls of homochlamydeous flowers in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Physiol*, 45: 325 – 332.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406 – 425.
- Sirisawat S, Ezura H, Fukuda N, Kounosu T, Handa T. 2010. Ectopic expression of an AP3-like and a PI-like genes from ‘Sekkoku’ orchid (*Dendrobium moniliforme*) causes the homeotic conversion of sepals to petals in whorl 1 and the suppression of carpel development in whorl 4 in *Arabidopsis* flowers. *Plant Biotech*, 27: 183 – 192.
- Tsai W C, Kuoh C S, Chuang M H, Chen W H, Chen H H. 2004. Four *DEF*-like MADS Box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Physiol*, 45 (7): 831 – 844.
- Tsai W C, Lee P F, Chen H I, Hsiao Y Y, Wei W J, Pan Z J, Chuang M H, Kuoh C S, Chen W H, Chen H H. 2005. *PeMADS6*, a *GLOBOSA/PISTILLATA*-like gene in *Phalaenopsis equestris* involved in petaloid formation, and correlated with flower longevity and ovary development. *Plant Cell Physiol*, 6 (7): 1125 – 1139.
- van Tunen A J, Eikelboom W, Angenent G C. 1993. Floral organogenesis in *Tulipa*. *Flowering Newsl*, 16: 33 – 38.
- Wu X P, Shi J S, Xi M L, Luo Z W, Hu X H. 2010. A B functional gene cloned from lily encodes an ortholog of *Arabidopsis PISTILLATA* (PI). *Plant Mol Biol Rep*, 28: 684 – 691.
- Xu Y F, Teo L L, Zhou J, Kumar P P, Yu H. 2006. Floral organ identity genes in the orchid *Dendrobium crumenatum*. *Plant J*, 46: 54 – 68.