

荔枝果皮 *MADS*-box 基因的克隆与初步表达分析

肖 靖^{1,2}, 赖 彪^{1,2}, 赵志常^{1,2}, 秦永华^{1,2}, 胡桂兵^{1,2*}

1 华南农业大学园艺学院, 广东广州 510642

2 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东广州 510642

摘 要 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术从‘糯米糍’荔枝果皮中克隆到了 1 个 1 208 bp 的 *MADS*-box 基因, 命名为 *LcMADS9*。该基因包含 1 个 738 bp 的完整的开放阅读框, 编码 245 个氨基酸, 具有典型的 *MADS*-box 基因结构, 其编码的蛋白与其它植物的 *MADS*-box 蛋白有较高的一致性, 其中与欧洲白桦(*Betula pendula*)的同源性高达 80%。系统发育树分析结果表明, *LcMADS9* 基因属于 *MADS*-box 基因家族中 *API/SQUA*-like 亚家族。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, 该基因在叶片、果皮和花中均有表达, 而在根、茎和果肉中几乎没有表达。

关键词 荔枝; 果皮; *MADS*-box; 克隆; 表达分析

中图分类号 Q78

文献标识码 A

Cloning and Expression of *MADS*-box Gene from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Pericarps

XIAO Jing^{1,2}, LAI Biao^{1,2}, ZHAO Zhichang^{1,2}, QIN Yonghua^{1,2}, HU Guibing^{1,2}

1 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

2 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China

Abstract A *MADS*-box gene, which is 1 208 bp long named *LcMADS9*, was cloned from the pericarp of ‘Nuomici’ litchi cultivar by using RT-PCR and RACE technique. This gene contained an ORF of 738 bp encoding 245 putative amino acid residues, had the typical *MADS*-box genetic structure. Homology analysis of putative amino acid residues showed that *LcMADS9* had high homology to other *MADS*-box proteins from different species, especially 80% similarity to *Betula pendula*. Phylogenetic analysis indicated that *LcMADS9* belonged to a subfamily *API/SQUA*-like of the *MADS*-box. *LcMADS9* was expressed by the real-time PCR analysis in leaves, pericarps and flowers, almost no expression in roots, stems and flesh.

Key words Litchi; Pericarp; *MADS*-box; Cloning; Expression analysis

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2012.03.009

MADS-box 是一个数量庞大、存在极广的基因家族, 其命名源于最初发现的 4 个家族成员: 酿酒酵母 *MCMI*、拟南芥 *AG*、金鱼草 *DEF* 和人类 *SRF*。这类基因所编码的蛋白质是一类转录因子, 前人通过对其调控作用的研究, 提出了花器官发育的 ABCDE 模型^[1-4], 因其在植物花器官发育过程中发挥着重要的作用, *MADS*-box 基因一直都受到研究人员的关注, 近年来陆续从葡萄^[5]、柿^[6]、枸杞^[7]、油桃^[8]、甜樱桃^[9]等植物的花器官中分离得到了各种 *MADS*-box 基因。

研究结果表明, 拟南芥中 *MADS*-box 基因超过 100 个, 其在花器官的发育中发挥着重要作用, 但拟南芥中还有超过 80% 的 *MADS*-box 基因功能是未知的^[10], 因此越来越多的研究人员开始关注 *MADS*-box 基因在花器官发育以外的功能。近年来

已不断发现其在植物营养生长向生殖生长的转化^[11]、花色素苷合成^[12-14]、植物抗逆性^[15-16]、芽的休眠^[17]、果实的发育^[18]等方面发挥着重要的作用。

目前, 有关荔枝 *MADS*-box 基因的研究主要是在荔枝花器官发育调控方面^[19-20]。本研究以荔枝果皮为材料, 克隆了 1 个 *MADS*-box 基因, 并采用实时荧光定量 PCR 对其表达情况进行了初步分析, 旨在为进一步探究 *MADS*-box 基因在调控植物花器官发育以外的功能和机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以华南农业大学园艺学院荔枝种质资源圃种植的 10 年生‘糯米糍’荔枝成年树为试验材料。于抽梢期取 5 个不同发育阶段叶片, 叶片 : 紫红色

收稿日期: 2011-12-22

修回日期: 2012-03-08

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(No. nycytx-32); 国家自然科学基金项目(No. 30971985)。

作者简介: 肖 靖(1988年—), 男, 硕士研究生。研究方向: 果树生态生理。*通讯作者: 胡桂兵, E-mail: guibing@scau.edu.cn。

未展开叶片；叶片₁：紫红色完全展开的叶片；叶片₂：紫红色褪去开始转绿的叶片；叶片₃：完全转绿的浅绿色叶片；叶片₄：成熟深绿色叶片。于盛花期后 30 d 开始，每隔 7 d，取不同发育阶段果皮，直至果实达到上市采摘要求为止，共计 5 次，分别编号：果皮₁、果皮₂、果皮₃、果皮₄、果皮₅。此外，取根、茎、花以及果肉。以上所有样品均取自同一单株。样品采集后立即用液氮速冻，置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取与 cDNA 第一条链的合成 以‘糯米糍’荔枝果皮为材料，总 RNA 的提取过程依照北京天恩泽基因科技有限公司柱式植物 RNAout 操作说明书进行。cDNA 第一条链的合成依照 Promiga 公司 Land M-MLV RT Kit 操作说明书进行。

1.2.2 荔枝果皮 *MADS-box* 基因的克隆 *MADS-box* 基因片段的克隆：参照已知文献中^[20]设计的 *MADS-box* 基因的简并引物 MADS-F 和 MADS-R (表 1)，以‘糯米糍’荔枝果皮 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。反应体系：10×PCR buffer 2.5 μL，dNTPs 0.5 μL，上游引物 0.5 μL，下游引物 0.5 μL，cDNA 1 μL，ExTaq 0.25 μL，ddH₂O 20 μL。PCR 扩增条件：94 °C 预变性 10 min，94 °C 变性 30 s，50 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 90 s，共进行 35 个循环，最后 72 °C 后延伸 10 min。回收扩增产物，克隆到 pMD19-T 载体上，转入大肠杆菌 DH5α 菌株，鉴定后进行测序，通过 NCBI 中 BLASTx 对所获得的片段进行同源性搜索与比对。

MADS-box 基因 3' 和 5'RACE：根据所得片段序列，分别设计 3' 和 5'RACE 引物 MADS-3race 和 MADS-5race (表 1)。具体的扩增过程依照 Clontech 公司 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 操作说明进行。回收扩增产物，克隆到 pMD19-T 载体上，转入大肠杆菌 DH5α 菌株，鉴定后进行双向测序、拼接。

MADS-box 基因 cDNA 全长的克隆：根据 RACE 拼接所得的序列，设计上下游引物 MADS-F-1 和 MADS-R-1 (表 1)，以‘糯米糍’荔枝果皮 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增。反应体系：10×PCR buffer 2.5 μL，dNTPs 0.5 μL，上游引物 0.5 μL，下游引物 0.5 μL，cDNA 1 μL，ExTaq 0.25 μL，ddH₂O 20 μL。PCR 扩增条件：94 °C 预变性 10 min，94 °C 变性 30 s，55 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 90 s，共进行 35 个循环，最后 72 °C 后延伸 10 min。回收扩增产物，克隆到

pMD19-T 载体上，转入大肠杆菌 DH5α 菌株，鉴定后进行双向测序。通过 NCBI 中 BLASTx 进行同源性搜索与比对，利用 Clustal X 软件进行同源性分析。使用 MEGA 5 软件 UPGMA 法构建系统发育树。
1.2.3 荔枝果皮 *MADS-Box* 基因实时荧光定量 PCR 分析 提取‘糯米糍’荔枝不同组织以及同一组织的不同发育阶段的 RNA，反转录成 cDNA 第一链，根据 *MADS-Box* 基因非保守的 C 区设计特异性引物 MADS-QF 和 MADS-QR (表 1)，以荔枝 *actin* 作为内参引物，采用 SYBR green 荧光定量 PCR 技术分析该基因在不同组织和同一组织不同发育阶段的表达情况。具体过程依 TaKaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) 操作说明书进行。

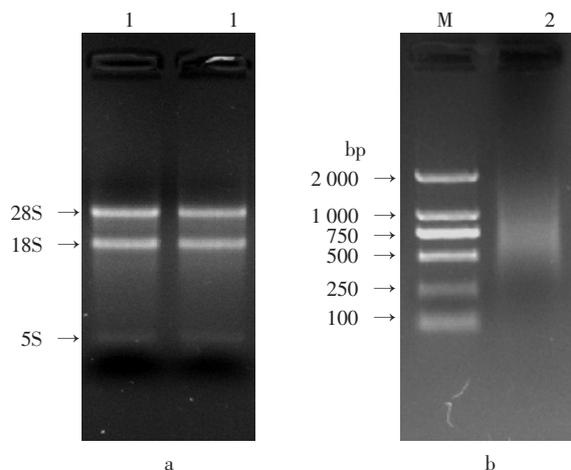
表 1 引物代码与引物序列

引物	序列
MADS-F	5'-GTGATGCWGAGGTTGSTTTGA-3'
MADS-R	5'-AGCWGGTTRTTTTGCTCCTCG-3'
MADS-3race	5'-CACATTCGGACAAGAAAGAACCAACTC-3'
MADS-5race	5'-AAACCTCCACCCCTTGCTTTTCAG-3'
MADS-F-1	5'-AAAACCACCTTTGATAGGAAGACACC-3'
MADS-R-1	5'-ACTGTGAACATAGTGATACAAACCC-3'
MADS-QF	5'-CCACTATTCTTTTAGGGCAG-3'
MADS-QR	5'-GCAGCAACCTCTTTACATCA-3'

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取和 cDNA 第一条链的合成

采用柱式植物 RNAout 提取‘糯米糍’荔枝果皮总 RNA 后，取 5 μL 点样于 1.2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。从图 1-a 可以看出，28S rRNA



M. DNA Marker; 1. 荔枝果皮总 RNA; 2. 反转录合成的 cDNA

图 1 提取的荔枝果皮总 RNA 和反转录合成的 cDNA 电泳图

与点样孔之间无明显亮带,说明无DNA污染;28S rRNA和18S rRNA条带清晰明亮,并且5S rRNA可见,说明提取的总RNA完整,无降解,适宜进行后续的cDNA第一条链的合成。

采用Promiga Land M-MLV RT Kit进行cDNA第一条链的合成后,取5 μ L点样于1.2%的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。从图1-b可以看出,cDNA呈弥散条带,主要集中在750 bp左右,说明反转录效率较高,适宜进行后续的实验。

2.2 *LcMADS9* 基因的克隆与序列分析

根据已知文献中^[14]设计的 *MADS*-box 基因简并引物 *MADS*-F 和 *MADS*-R,进行PCR扩增(图2-a),克隆测序后得到一段长度为397 bp的片段,经NCBI在线比对后发现该片段与其它植物的 *MADS*-box 基

因序列有较高的同源性,推测该片段为荔枝果皮 *MADS*-box 基因片段之一。进而设计特异引物 *MADS*-3race 和 *MADS*-5race 进行3'和5'RACE扩增(图2-b),克隆测序后分别获得619 bp的3'端序列和488 bp的5'端序列,将所得片段序列和RACE序列拼接之后得到了1个1208 bp含起始和终止密码子的 *MADS*-box 基因序列。根据拼接所得序列,设计特异引物 *MADS*-F-1 和 *MADS*-R-1,进行RT-PCR扩增(图2-c),克隆测序后获得长度为1018 bp的片段,比对后发现与拼接所得序列基本一致。通过NCBI在线比对与其它植物的 *MADS*-box 基因序列有较高的同源性,可以确认所获得的基因为荔枝果皮 *MADS*-box 基因之一,命名为 *LcMADS9*。

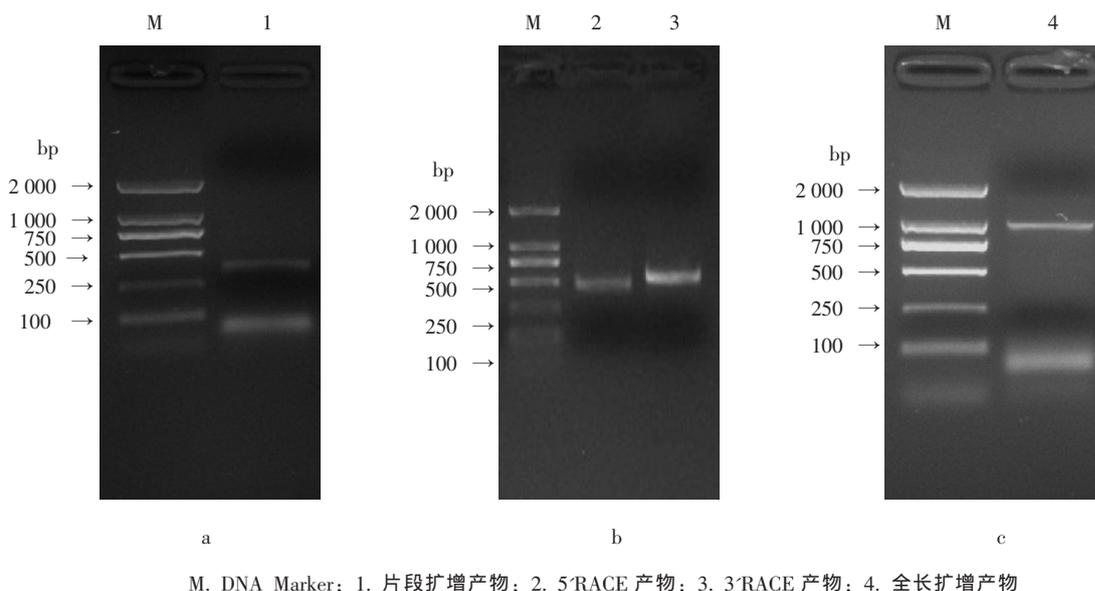


图2 PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

采用ORF Finder(Open Reading Frame Finder)分析,结果表明, *LcMADS9* 基因包含1个738 bp的完整的开放阅读框,编码1个含245个氨基酸的蛋白质(图3),推定的分子量为28.40 ku,推测的等电点为9.21。

利用NCBI对 *LcMADS9* 氨基酸序列进行同源性比对,结果表明, *LcMADS9* 所编码的蛋白质与其它植物的 *MADS*-box 蛋白有较高的一致性,其中与欧洲白桦(*Betula pendula*) *MADS5* 蛋白的同源性高达80%,与蓖麻(*Ricinus communis*) *MADS*蛋白、

油桃(*Prunus persica*) *MADS6* 蛋白、苹果(*Malus × domestica*) *MdMADS2* 蛋白同源性分别为77%、76%、74%,与欧洲越橘(*Vaccinium myrtillus*) *TDR4* 蛋白的同源性也达62%(图4)。

蛋白结构域分析表明, *LcMADS9* 蛋白具有典型的植物 *MADS*-box 蛋白结构。其编码肽链具有两个保守结构域,即 *MADS* 区(第1~60位)和 *K* 区(第75~169位), *MADS* 区和 *K* 区之间为14个氨基酸的间区(*I* 区),而 *C* 区包含了76个氨基酸,属于 *MIKC* 型。

```

1 atgggggtgtatacacacacaaatacaccagacgagacacagaccactccgaatttgc ttcacaatcaaaaccactttgtaggaagacaccat
97 ctctctctctttcactctttctgcatttgtgaggtgggggtggtggtgggggtctgagtttgtgatcttcatc[atg]gggagaggtcgggtgcag
M G R G R V Q
193 ctgaagaggatagagaacaagatcaacagacaggtgactttctctaagagaaggtctggcttgttgaagaaagc taatgagatctcagtgctttgt
L K R I E N K I N R Q V T F S K R R S G L L K K A N E I S V L C
289 gatgctgaggctgc tttgatcgtcttctctaccaaaaggaaagc tcttgaatac gccaccgattcttgc atggaagaaatccttgaaggatgag
D A E V A L I V F S T K G K L F E Y A T D S C M E R I L E R Y E
385 agatattcttataatgataggcagcttattgccaatgagatagaaccacagaaatggaagctggactctggaacatgcaaacgtaagaaaggggtg
R Y S Y N D R Q L I A N E I E P Q N G S W T L E H A K L K A R V
481 gaggttttgc aaagaaatcaaaagcattacatgggtgaagatcttggactc tctaagtc tcaaaagac ttaaaagttggagcagcagcttgattct
E V L Q R N Q K H Y M G E D L D S L S L K E L Q S L E Q Q L D S
577 gctcttaaacacattcggacaagaaagaaaccaac tcatgttgaatccatttcggacctcagaaaaaggacaaatattgc aagagcaaaataac
A L K H I R T R K N Q L M F E S I S D L Q K K D K L L Q E Q N N
673 ttgcttgc taaaaaggtgaaagaaaggagaagacaatcacc aacacaatgggagcagcaaaatcctggcccgaactcgtccactattctt
L L A K K V K E K E K T I T Q Q Q W E Q Q N P G P N S S T I L
769 ttaggcagccacctcagtccttaacaatagtgcaacttac caaatggcaaggaccagcggaggcgatgatgatgagactccacaaaatcgagct
L G Q P P Q S L N N S A T Y Q M A R T S G G D D D E T P Q N R A
865 aatacaatcttgccccatggatgcttcgcaaccttaacgaa[taag]agagcacaactcattcttctagtagtatgcaacattttatctaaagt
N T I L P P W M L R N L N E -
961 agactaatatacatatggatgactcgtatattttatggcttagtgatgtaagaggttgc tgcacatggttatatttagtataacgcataataatca
1057 tataagggtttgtatcacatgttccagatttcaaaatcagacc tttgtatgattgtatacaccatgaccacaac taaaatgcaagatat
1153 aagaaaatgaaacgttgcggtgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

方框中 ATG 为起始密码子；方框中 TAA 为终止密码子；单下划线为 MADS 区；双下划线为 K 区。

图 3 *LcMADS9* 基因核苷酸序列及其推导出的氨基酸序列

荔枝 MADS9	MGRGRVQLKRIENKINRQVTF SKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLF EYATDSOMER	65
欧洲白桦 MADS5	MGRGRVQLKRIENKINRQVTF SKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLF EYSTDSOMER	65
蓖麻 MADS	MGRGRVQLKRIENKINRQVTF SKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLF EYSTDSOMER	65
油桃 MADS6	MGRGRVQLKRIENKINRQVTF SKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLF EYSTDSOMER	65
苹果 MADS2	MGRGRVQLKRIENKINRQVTF SKRRSGLMKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLF EYSNDSOMER	65
欧洲越橘 TDR4	MGRGRVQMKRIENKIVSRQVTF SKRRSGLLKKAHEISVLCDAEVALIVFSTKGKLF EYSTHSSMES	65
consensus	mgrgrrvq krienk rqvtfskrr gl kka eisvvlcdaevali fstkgklfey s me	
荔枝 MADS9	ILERYERYSYNDPQLIANEIEPQNGSWLLEHAKLKRVEVLQRNQKEHYMGEDLLDSL SLKELQSL E	130
欧洲白桦 MADS5	ILERYERYSYADPQLIANDLE.QNGSWLLEHAKLKRVEVLQRNQKEFVGEDLLDSL SLKELQNL E	129
蓖麻 MADS	ILERYERYSYAEFQLIATDTE.TNGSWLLEHAKLKRVEVLQRNQKEHFVGEDLDLTLTKLQNL E	129
油桃 MADS6	ILERYERYSYSERQLIANDHE.STGSWLLEHAKLKRVEVLQRNCSHFVGEDLLQSL SLKELQNL E	129
苹果 MADS2	ILERYERYSYTFEQLIANDNE.STGSWLLEHAKLKRVEVLQRNQREHYMGEDLLQSL SLKELQNL E	129
欧洲越橘 TDR4	ILEKYESYSYAEFQLIVATNSE.SQTNWLEVEKLRKRVEVLQRNIREHYVGEDLDLTLTLRELQSV E	129
consensus	ile ye ysy ql a e w le klkar evlqrn h ge l l l lq e	
荔枝 MADS9	QQLD SALKHIFRFRKNQLMFESI SDLQKKDKLLQE QNNMLLAKKVKEREKTTITQQQQ...WEQQNPG	192
欧洲白桦 MADS5	QQLD SALKHIFRFRKNQLMYESI SELQKKDKALQE QNNVLAKKVKEREKELAQQAQ...WEQQSHT	191
蓖麻 MADS	QQIDSALKHIFRFRKNQLMYESI SELQKKDKALQE QNNQLAKKVKEREKAKAQQTQ...WEQQNQG	191
油桃 MADS6	QQLD SALKHIFRFRKNQVMYESI SELQKKDKALQE QNNMLLAKKVKEREKALAPQAESWEQQVQNG	194
苹果 MADS2	QQLD SALKHIFRFRKNQVMYESI SELQKKDKALQE QNNMLLAKKVKERENAVAQAQ...LEHVQEQR	192
欧洲越橘 TDR4	QQIDTALKRIFRFRKNQLVHESI SDLQKKDKLLQE QNNQLAKKI KENKTLAERAEQQNQGGSSS	194
consensus	qq d alk r knq esis lq k k lqe qnn lakk ke e q	
荔枝 MADS9	.PNSSTILLGQPPQSSLNNS.ATYQMAR...TSGGDDDET...PQNRANTILPPWMLRNLN	244
欧洲白桦 MADS5	.LDSVPSLLPQPIQSSLNI.GGSQQAR...GNRVDDEGT...PPHRANALLPPWMLRHLN	243
蓖麻 MADS	.VDSSPVLPPQPIQSMNIR.STHPAR...GSTGEDETT...PIHNRANALLPAWMLLTHFN	243
油桃 MADS6	.LDCSSTLLPEALQSLNFG.SGSNYQGI RN.DGSGGDHEDE.NETPTANRENTLLPPWMLRHLN	254
苹果 MADS2	.LNSSSSLLPRAIQSLNFG.SGSNYQAIRSSEGIPGDNQYGDDETPPHRPNMLLPAWMLRHLN	254
欧洲越橘 TDR4	.TLVLPQLPPQPPQPPRPRPPPFHSLTIGGPFQARGTGDGG...AQSHPPSNTLMPWMLRHGN	254
consensus	l q n p wml n	

欧洲白桦 MADS5(CAA67969)；蓖麻 MADS(XP_002514623)；油桃 MADS6(CAJ28929)；苹果 MADS2(ABB22023)；欧洲越橘 TDR4(ACR19996)。

图 4 *LcMADS9* 蛋白与其它植物 MADS-box 蛋白的序列比对

2.3 *LcMADS9* 蛋白的系统进化树分析

被子植物中的 *MADS*-box 基因家族可以分为 12 个主要的亚家族，其中涉及花器官发育的基因分属 4 个亚家族：*API/SQUA*-like、*AP3/PI*-like、*AG*-like、*SEP*-like^[21]。为了确定 *LcMADS9* 的进化地位，选取拟南芥、矮牵牛、金鱼草等植物的 *MADS*-box 基因家族这 4 个亚家族的典型基因进行系统进化树分析(表 2)。

研究结果表明，*LcMADS9* 基因所编码的蛋白与 *AtAPI*、*AtCAL*、*AtAGL8*、*AtAGL79* 等 *MADS*-box 基因家族里的 *API/SQUA*-like 亚家族基因所编码的蛋白聚成一类，其中与 *AtAGL8* 蛋白亲缘关系最近，属于 *API/SQUA*-like 亚家族，在花发育模型中属于 A 类基因。另外值得一提的是，*VmTDR4*、*IbMADS10* 也归属 *API/SQUA*-like 亚家族(图 5)。

表 2 用于构建系统进化树的氨基酸序列及其序列号

基因名	物种	登录号	基因名	物种	登录号
<i>API</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA78909	<i>AGL9</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAB67832
<i>CAL</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_564243	<i>GLO</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	CAA48725
<i>AGL8(FUL)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q38876	<i>DEF</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	CAA44629
<i>AGL79</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAN52802	<i>DEFH72</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	CAA64742
<i>PI</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_197524	<i>DEFH200</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	CAA64743
<i>AP3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_191002	<i>SQUA</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	CAA45228
<i>AGL1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_001078311	<i>DEF28</i>	<i>Antirrhinum majus</i>	AAK72467
<i>AGL5</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_850377	<i>FBP3</i>	<i>Petunia × hybrida</i>	CAA50549
<i>AG</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_567569	<i>PFG</i>	<i>Petunia × hybrida</i>	AAF19721
<i>AGL11</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q38836	<i>FBP26</i>	<i>Petunia × hybrida</i>	AAF19164
<i>SEP1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_568322	<i>TDR4</i>	<i>Vaccinium myrtillus</i>	ACR19996
<i>SEP2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_186880	<i>MADS10</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	DQ342339
<i>AGL3</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	P29383	<i>MADS4</i>	<i>Betula pendula</i>	CAA67968
<i>AGL6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_182089			

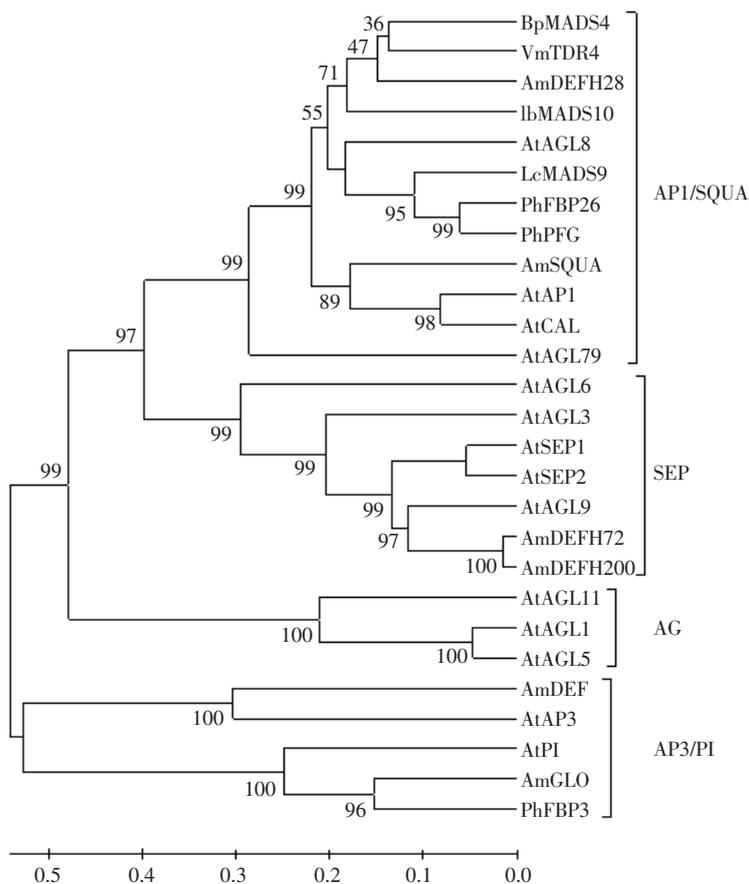


图 5 *LcMADS9* 基因编码蛋白的系统进化树分析

2.4 *LcMADS9* 的荧光定量 PCR 分析

不同组织间的实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *LcMADS9* 基因在叶片(叶片)、果皮(果皮)、花中大量表达, 而在根、茎、果肉中几乎不表达(图 6)。进一步分析结果表明, *LcMADS9* 基因在果皮和叶片的不同发育时期表达量也存在差别, 其表达量随着叶片的发育而逐渐升高, 而随着果皮的成熟有下降的趋势(图 7)。

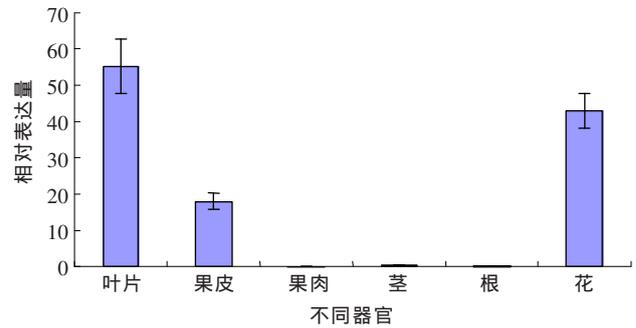


图 6 *LcMADS9* 在不同器官间的实时荧光定量 PCR 表达分析

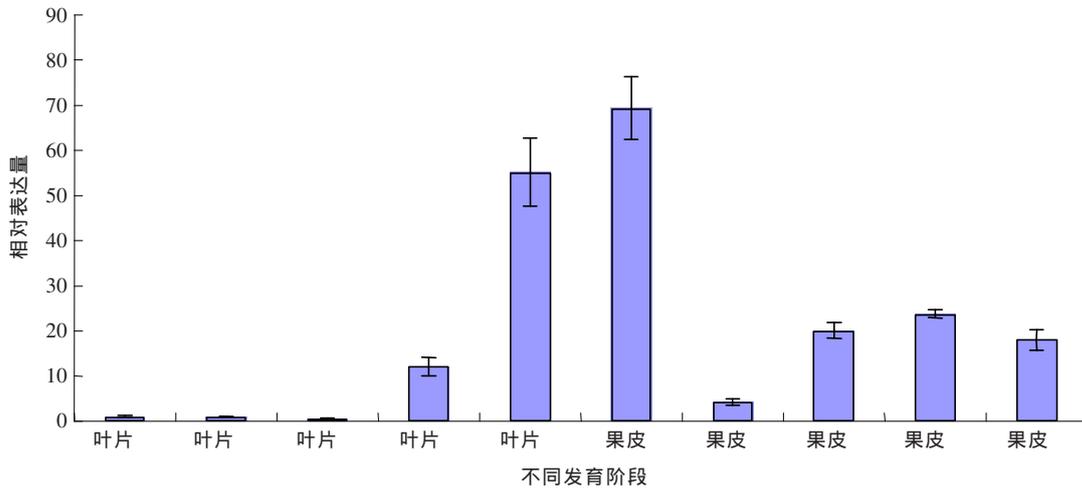


图 7 *LcMADS9* 在叶片和果皮不同发育阶段的实时荧光定量表达 PCR 分析

3 讨论

API/SQUA-like 亚家族作为 *MADS*-box 基因家族里重要的组成部分, 在调控花器官发育的 ABCDE 模型中归属 A 类基因, 主要调控萼片发育。目前, 从其它植物中克隆的一些 *API/SQUA*-like 亚家族基因, 如 *AtAGL8*、*IbMADS10*、*VmTDR4* 等, 通过对其基因功能的初步研究发现, 其功能不仅仅局限于调控萼片的形成。有报道表明 *AtAGL8* 影响拟南芥叶片的发育^[22-23], 萼片其本质是一种变态叶, 这也就不难理解, 其参与调控叶片的发育。此外, Antonio 等^[12]的研究表明 *IbMADS10* 的表达与花色苷合成过程中的相关酶基因 *CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*ANS* 以及 *UFGT* 的表达具有相似性, 在甘薯中超表达 *IbMADS10* 后发现其愈伤组织花色苷含量显著升高。Laura 等^[14]研究还发现, 在欧洲越橘白色突变体中, *VmTDR4* 和花色苷合成的相关酶基因表达量均显著下降, 利用病毒分别诱导 *VmTDR4* 和花色苷合成的相关酶基因 *CHS* 沉默后发现, *CHS* 沉默后 *VmTDR4* 的表达并未受到影响, 而 *VmTDR4* 沉默后 *CHS* 和 *mMYB2* 的表达量却下降。已有研究结果表明 *AtMYB17* 基因会受到 *MADS*-box 基因家族的 *LEAFY* 和 *AGL15* 的调控^[24],

而 *MYB* 编码的转录因子一个很重要的功能就是调控花色苷的代谢过程。因此, *MADS*-box 基因是有可能通过调控 *MYB* 或者相关酶基因间接或者直接调控花色苷的代谢。

本实验从‘糯米糍’荔枝果皮中克隆得到了 1 个 *MADS*-box 基因, 命名为 *LcMADS9*。系统进化树分析结果表明, *LcMADS9* 就归属于 *MADS*-box 基因家族里的 *API/SQUA*-like 亚家族。荧光定量 PCR 分析结果表明, *LcMADS9* 表达量随着叶片的发育成熟而不断上升, 而随着果皮的成熟有下降的趋势, 这一变化与荔枝叶片和果皮的花色苷代谢具有一定的相似性, 荔枝叶片在其发育过程中伴随着叶绿素的不断合成和花色苷的不断降解, 而果皮的发育过程中却恰恰相反, 因此笔者初步推测 *LcMADS9* 所编码的转录因子可能参与了色素的代谢, 抑制了花色苷的合成或者是促进了叶绿素的合成。此外值得注意的是, 老叶和幼嫩的果皮中 *LcMADS9* 的表达量均高于花中的表达量, 这也说明了 *MADS*-box 基因具有多效性, 既可以在花中表达, 也可以在其它部位表达, 甚至可能还发挥着更为重要的作用, 其具体的功能还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interaction controlling flower development[J]. *Nature*, 1991, 353: 31-37.
- [2] Gerco C Angenent, Lucia Colombo. Molecular control of ovule development[J]. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(7): 228-232.
- [3] Nancy A, Eckardt. *MADS* Monsters: Controlling Floral Organ Identity[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15(4): 803-805.
- [4] Silvia Ferrario, Richard G H Immink, Anna Shechennikova, et al. The *MADS* Box Gene *FBP2* Is Required for *SEPALLATA* Function in *Petunia*[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15: 914-925.
- [5] 宗成文, 房经贵, 陶建敏, 等. 葡萄 *MADS*-box 家族基因保守片段的克隆与序列分析[J]. *果树学报*, 2007, 25(1): 27-32.
- [6] 丁燕, 韩振海, 许雪峰, 等. 棉花发育相关的 *MADS*-box 基因克隆与表达[J]. *园艺学报*, 2007, 34(1): 39-42.
- [7] Zeng S H, Xu Y Q, Wang Y. Isolation and characterization of two *MADS*-box genes from *Lycium barbarum*[J]. *Biologia Plantarum*, 2011, 55(3): 567-571.
- [8] Eleni Tani, Alexios N Polidoros, Emmanouil Fletmetakis, et al. Characterization and expression analysis of *AGAMOUS*-like, *SEEDSTICK*-like, and *SEPALLATA*-like *MADS*-box genes in peach (*Prunus persica*) fruit[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47: 690-700.
- [9] 林苗苗, 赵长竹, 姜建福, 等. 甜樱桃 *MADS* box 基因的克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 2011, 38(8): 1462-1468.
- [10] Lucie Parenicová, Stefan de Folter, Martin Kieffer, 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(7): 1538-1551.
- [11] Richard G H Immink, David J Hannapel, Silvia Ferrario, et al. A *petunia MADS* box gene involved in the transition from vegetative to reproductive development[J]. *Development*, 1999, 126: 5117-5126.
- [12] Antonio G Lalusin, Koichi Nishita, Sung-Hyung Kim, et al. A new *MADS*-box gene (*IbMADS10*) from sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) is involved in the accumulation of anthocyanin[J]. *Mol Gen Genomics*, 2006, 275: 44-54.
- [13] 郑亚东, 郭余龙, 陈旭, 等. *GhMADS3* 基因组成型表达对矮牵牛花形和花色的影响[J]. *园艺学报*, 2007, 34(4): 985-990.
- [14] Laura Jaakola, Mervin Poole, Matthew O Jones, et al. A *SQUAMOSA MADS* Box Gene Involved in the Regulation of Anthocyanin Accumulation in Bilberry Fruits[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1619-1629.
- [15] Hill Kristine, Wang Huai, Perry Sharyn E. A transcriptional repression motif in the *MADS* factor *AGL15* is involved in recruitment of histone deacetylase complex components[J]. *The Plant Journal*, 2008, 53: 172-185.
- [16] 陈璟, 李名扬, 闫明旭, 等. 矮牵牛 *PMADS9* 基因的结构特征和 mRNA 的表达分析[J]. *园艺学报*, 2011, 38(1): 108-116.
- [17] Hisayo Yamane, Ryutaro Tao, Tomomi Ooka, et al. Comparative Analyses of Dormancy-associated *MADS*-box Genes, *PpDAM5* and *PpDAM6*, in Low- and High-chill Peaches (*Prunus persica* L.) [J]. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 2011, 80(3): 276-283.
- [18] Graham B Seymour, Carol D Ryder, Volkan Cevik, et al. A *SEPALLATA* gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(3): 1179-1188.
- [19] 禰维言, 李明芳, 郑学勤. 无核荔枝花发育相关 *MADS*-box 基因的克隆及结构分析[J]. *生物技术*, 2005, 15(3): 6-9.
- [20] 禰维言, 郑学勤. 无核荔枝 *MADS* box 基因 *LMADS1* 的表达与转化拟南芥分析[J]. *热带作物学报*, 2006, 27(4): 60-63.
- [21] 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.
- [22] Mandel M A, Yanofsky M F. The Arabidopsis *AGL8 MADS* box gene is expressed in inflorescence meristems and is negatively regulated by *APETALA1*[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1763-1771.
- [23] Gu Q, Ferrándiz C, Yanofsky M F, et al. The *FRUITFULL MADS*-box gene mediates cell differentiation during Arabidopsis fruit development[J]. *Development*, 1998, 125: 1509-1517.
- [24] Zhang Y F, Cao G Y, Qu L J. Characterization of Arabidopsis *MYB* transcription factor gene *AtMYB17* and its possible regulation by *LEAFY* and *AGL15*[J]. *J. Genet. Genomics*, 2009, 36: 99-107.

责任编辑: 沈德发