

桂花 *OfFCA* 基因的克隆及在花芽分化时期的表达分析

吴 琪, 吴鸿飞, 周敏舒, 徐倩霞, 杨丽媛, 赵宏波, 董 彬

(浙江农林大学 风景园林与建筑学院, 浙江 杭州 311300)

摘要:【目的】桂花 *Osmanthus fragrans* 是著名的香化植物, 其花芽分化受到环境温度影响。研究环境温度对桂花花芽分化的影响对桂花的花期调控具有重要的指导意义。【方法】以桂花品种‘堰虹桂’*O. fragrans* ‘Yanhonggui’为材料, 采用石蜡切片观察其花芽分化进程, 运用聚合酶链式反应和实时荧光定量技术对影响温度 *FCA* (*FLOWERING LOCUS CA*) 基因分别进行克隆及表达特异性分析。【结果】克隆得到 *OfFCA* cDNA 序列长为 1 319 bp, 其开放阅读框为 864 bp, 编码 287 个氨基酸。序列比对及进化分析发现: *OfFCA* 与木犀科 Oleaceae 油橄榄 *Olea europaea* 和胡麻科 Pedaliaceae 芝麻 *Sesamum indicum* 的 *FCA* 相似度较高, 同源性可达 68% 以上。在桂花花芽分化的不同时期, 无论叶还是花芽中, 19 ℃环境低温下 *OfFCA* 基因的表达水平均显著高于 25 ℃常温生长条件下的表达水平。【结论】桂花 *OfFCA* 基因响应环境相对低温的变化, 参与桂花的花芽分化, 使桂花的花期提前。图 6 参 23

关键词: 林木育种学; 桂花; *FCA* 基因; 花芽分化; 基因表达

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2020)02-0195-06

Cloning and expression analysis of *OfFCA* gene at flower bud differentiation stages in *Osmanthus fragrans*

WU Qi, WU Hongfei, ZHOU Minshu, XU Qianxia, YANG Liyuan, ZHAO Hongbo, DONG Bin

(School of Landscape Architecture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans*) is widely used in gardening as a fragrant plant. Its flower bud differentiation is significantly affected by ambient temperature. This research aims to find out the working mechanism of ambient temperature on the flower bud differentiation to help regulate flowering period of sweet osmanthus. [Method] Gene *FCA* (*FLOWERING LOCUS CA*) was studied using *O. fragrans* ‘Yanhonggui’ as the material, the process of flower bud differentiation was observed by paraffin section, and *OfFCA* was cloned and expression analysis was made by PCR and real-time PCR. [Result] The sequence length of *OfFCA* cDNA obtained by cloning was 1 319 bp, the Open Reading Frame (ORF) length was 864 bp, and 287 amino acids were encoded. Amino acid sequence alignment and evolutionary analysis showed that *OfFCA* was similar in *FCA* to *Olea europaea*, Oleaceae and *Sesamum indicum*, Pedaliaceae, with a homology of over 68%. The real time PCR demonstrated that the expression of *OfFCA* gene was higher at the low temperature (19 ℃) treatment than control temperature (25 ℃) in both leaves and flower buds at different flower bud differentiation stages. [Conclusion] Our work lay a foundation for the studying of regulating flowering time of *O. fragrans* by ambient temperature. [Ch, 6 fig. 23 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Osmanthus fragrans*; *FCA* gene; flower bud differentiation; gene expression

开花是植物生命周期中的重要发育阶段, 受自身遗传和外界环境因素的影响^[1]。*FCA* (*FLOWERING LOCUS CA*) 参与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 开花调控, 通过多腺苷酸化 (polyadenylation) 和介导 FLC

收稿日期: 2019-05-14; 修回日期: 2019-09-18

基金项目: 浙江省教育厅一般项目(Y201839931); 浙江农林大学科研发展基金项目(2017FR016)

作者简介: 吴琪, 从事园林植物遗传育种研究。E-mail: wuqi0811@outlook.com。通信作者: 董彬, 博士, 从事园林植物遗传育种及开花性状的分子机制等研究。E-mail: dongbin@zafu.edu.cn

(FLOWERING LOCUS C)染色质的组蛋白去甲基化(demethylation)调控开花^[2-4]。拟南芥的 *fca* 突变后会抑制开花促进因子 *FT* (FLOWERING LOCUS T) 和 *SOC1* (SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS) 的表达, *fca* 突变体在不同光周期下均表现出晚花表型^[5]。另外, *FCA* 可以激活 *LFY* (LEAFY) 和 *AP1* (APETALA1) 的活性促进拟南芥开花^[6]。将水稻 *Oryza sativa* 和巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* 的 *FCA* 基因转入拟南芥 *fca* 突变体, 会导致晚花性状出现逆转和恢复^[7-8]。由此可见, *FCA* 在植物花期调控方面发挥着重要作用。环境温度影响植物开花时间。植物 *FCA* 基因是温敏途径(thermosensory pathway)中的重要基因, 可响应温度变化调控植物的花芽分化^[9]。与 16 ℃相比, 23 ℃可促进拟南芥 *FCA* 的转录, 使 *FCA* 蛋白水平升高, *fca* 突变体对温度不敏感^[10]。*FCA* 通过诱导 *FT* 表达在高温下促进拟南芥开花^[11]。与 1 年生拟南芥相比, 一些多年生植物对温度变化的反应及其对开花的影响表现出多样性。例如, 在多年生拟南芥的 1 个祖先近源种 *Boechera stricta* 中, 与 18 ℃相比, 25 ℃处理下开花延迟^[12]; 同样, 在菊花 *Chrysanthemum morifolium* 中, 也发现夏季温度升高能延迟菊花开花^[13]。目前, 对环境温度调控其开花的机理主要集中于模式植物中, 木本植物种类繁多, 且开花差异很大, 关于木本植物中如何响应环境温度变化调控开花的机理仍不清楚。本研究通过对桂花 *Osmanthus fragrans* *OfFCA* 基因的同源克隆和定量聚合酶链式反应(PCR), 分析 *OfFCA* 在不同温度下桂花不同花芽分化时期不同组织中的表达情况, 初步探究 *OfFCA* 参与桂花花芽分化的调控作用, 为桂花的花期调控、遗传改良以及新品种培育提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

从浙江农林大学桂花种质资源圃中, 选取株龄相同且生长一致的桂花‘堰虹桂’ *O. fragrans* ‘Yanhonggui’, 分别于 19 和 25 ℃处理。当处理 0、10、20、30、40、50 和 60 d 时, 分别采集‘堰虹桂’的叶和花芽, 一部分进行显微解剖结构观察; 另一部分液氮处理后-80 ℃冻存, 用于基因克隆和定量 PCR 分析。

1.2 方法

1.2.1 石蜡切片制作 石蜡切片制作参照刘涛等^[14]的方法。主要步骤包括: ①固定。采用体积比为 18:1:1 的 700 mL·L⁻¹ 乙醇、冰乙酸和甲醛将不同时期桂花的样品固定 24 h 以上。②切片。将经过脱水、透明、渗蜡、包埋等处理材料进行切片, 厚度约 12 μm。③染色及观察。固绿染色后用中性树脂封片, 风干后, 于显微镜(Axio Imager 2, 日本)下观察。

1.2.2 RNA 提取及反转录 取花芽分化时期约 0.5 g 的花芽或叶片, 按照 RNApure Plant Kit 试剂盒说明书提取 RNA, RNase-free DNase I (Takara)去除 DNA。cDNA 反转录参照 Reverse Transcriptase M-MLV(Takara, 大连)说明书, 产物储存于-20 ℃备用。

1.2.3 桂花 *OfFCA* 基因的克隆 通过前期转录组获得的 *FCA* 基因 Unigene 片段设计特异性引物(*FCA*-F: GCTATTCTGGAGGAGTT; *FCA*-R: CTTGTCTTGCCTAGTTGTC), 以反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系如下: 上下游定量引物(10 μmol·L⁻¹)各 1 μL, cDNA 1 μL, 2×SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)10 μL 和双蒸水 7 μL。PCR 反应条件为: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min; 35 次循环; 72 ℃延伸 10 min; 4 ℃保存备用。PCR 反应产物经 10 mg·g⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测后回收, 纯化, 连接到 pMD18-T 载体, 转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆, 经 PCR 鉴定后送上海生工生物科技公司测序。

1.2.4 桂花 *OfFCA* 基因及其编码蛋白的生物信息学分析 将克隆得到的 *OfFCA* 基因用 DNAMAN 软件进行多重比对序列, 使用 MEGA 7.0 软件 Neighbor-Joining 法构建系统发育树; 利用 MultiLoc 2 软件 (<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2>) 进行亚细胞定位预测; 在线工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 SignalP 5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 分析 *OfFCA* 蛋白跨膜结构域、信号肽预测; 利用 ExPASy 工具中的 SOPMA 软件预测蛋白质二级结构, 用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 对三级结构进行预测。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 设计 *OfFCA* 荧光定量引物, 送上海生工生物科技公司合成。荧光定量 PCR

反应体系为: SYBR Premix Ex *Taq* II 10.0 μL, 上下游定量引物(*OfFCA*-F: AGCATGTGTGTCCTGATG-GA; *OfFCA*-R: GCTTATGATGCACCGGTTGT)各 0.8 μL(10 μmol·L⁻¹), cDNA 2.0 μL, 双蒸水补齐至 20.0 μL。反应程序如下: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 30 s, 60 °C 15 s。3 次生物学重复。采用 2^{-ΔΔCT} 法^[15]计算 *OfFCA* 的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 桂花 *OfFCA* 基因克隆及序列分析

同源克隆获得桂花 *OfFCA* 基因 cDNA 序列, 长度为 1 319 bp(图 1), 开放阅读框为 864 bp, 编码 287 个氨基酸, 基因登录号为 MK737873。通过 DNAMAN 软件比对发现: *OfFCA* 与旋花科 Convolvulaceae 矮牵牛 *Ipomoea nil* 的 IpFCA-like、茄科 Solanaceae 马铃薯 *Solanum tuberosum* 的 SoFCA-like、胡麻科 Pedaliaceae 芝麻 *Sesamum indicum* 的 SeFCA-like 及玄参科 Scrophulariaceae 沟酸浆 *Erythranthe guttata* 的 EryFCA 和烟草 *Nicotiana attenuata* 的 NiFCA-like 较为相似, 其氨基酸序相似度分别为 76%、69%、68%、68% 和 68%(图 2)。

2.2 桂花 *OfFCA* 编码蛋白的生物信息学分析

ExPASy 软件结构域预测发现: *OfFCA* 蛋白具有典型的 RRM 基序和 WW 结构域(图 2), 其相对分子质量为 70.6 kD, 理论等电点值为 5.12。*OfFCA* 蛋白不存在信号肽, 亚细胞定位预测显示: *OfFCA*

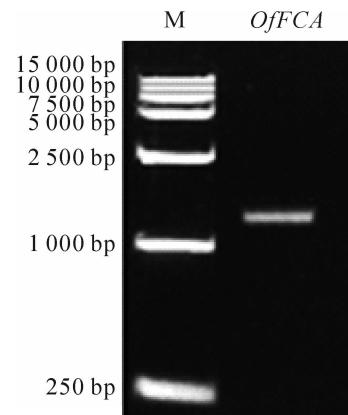
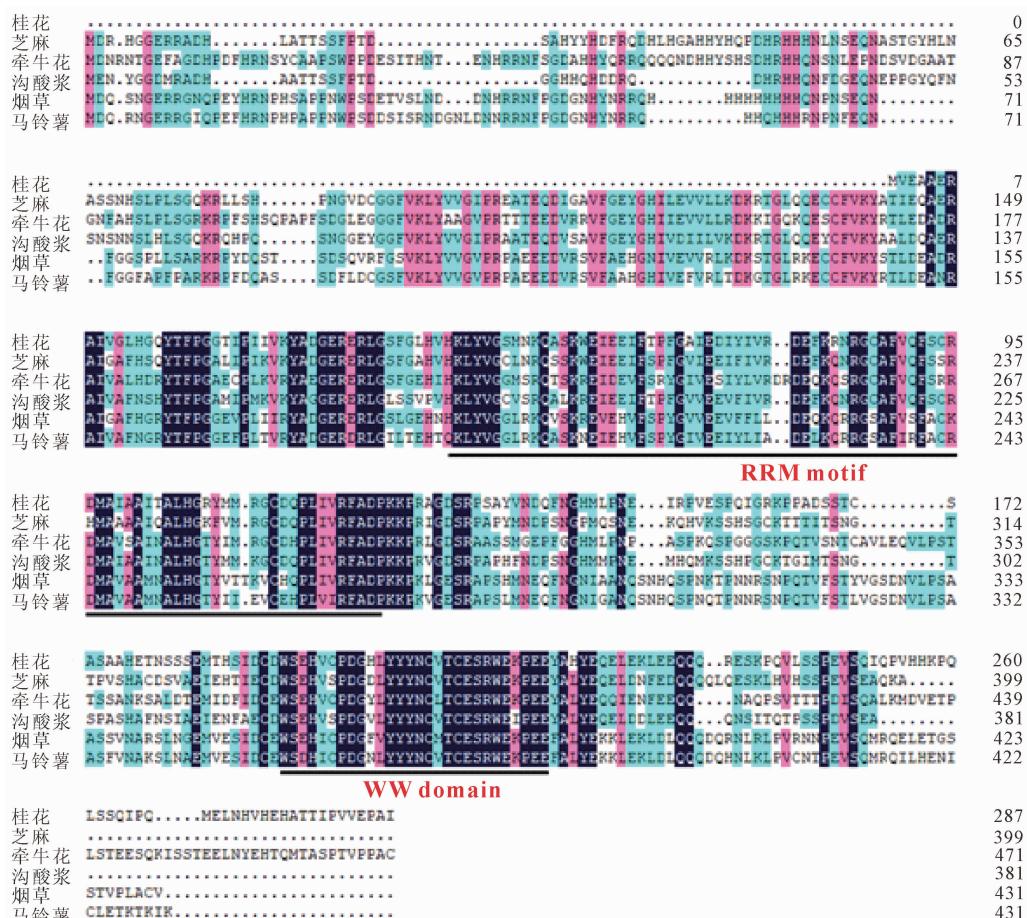


图 1 桂花 *OfFCA* PCR 电泳图
Figure 1 Electrophoretogram of *OfFCA* gene



芝麻(XP_011079531.1); 牵牛花(XP_019164202.1); 沟酸浆(XP_012834351.1); 烟草(XP_019254118.1); 马铃薯(XP_006358348.1)

图 2 *OfFCA* 与其他物种同源蛋白氨基酸序列比对

Figure 2 Comparative analysis of *OfFCA* protein sequence

蛋白定位于细胞质。蛋白结构三级如图3所示。亲水性指数(GRAVY)为-0.565, 表明OffCA具有较好的亲水性。

2.3 桂花OffCA系统进化树分析

用MEGA7.0构建‘堰虹桂’与其他物种FCA之间的系统发育树(图4)。结果显示：OffCA与木犀科Oleaceae油橄榄*Olea europaea*的OfFCA和胡麻科芝麻的SeFCA具有较近的亲缘关系。

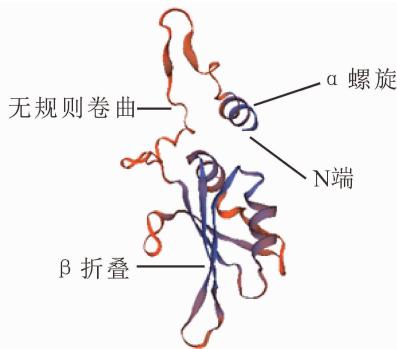


图3 桂花OffCA蛋白三级结构预测

Figure 3 Tertiary structure prediction for OffCA protein

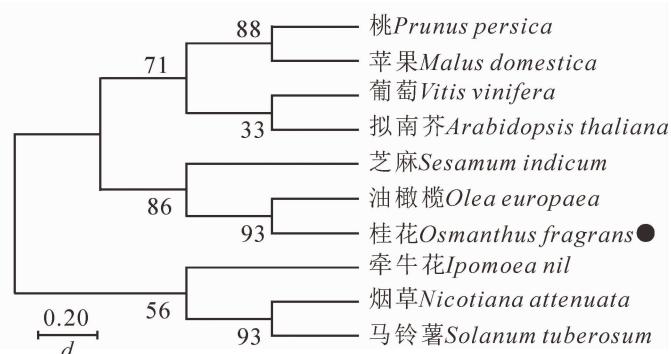
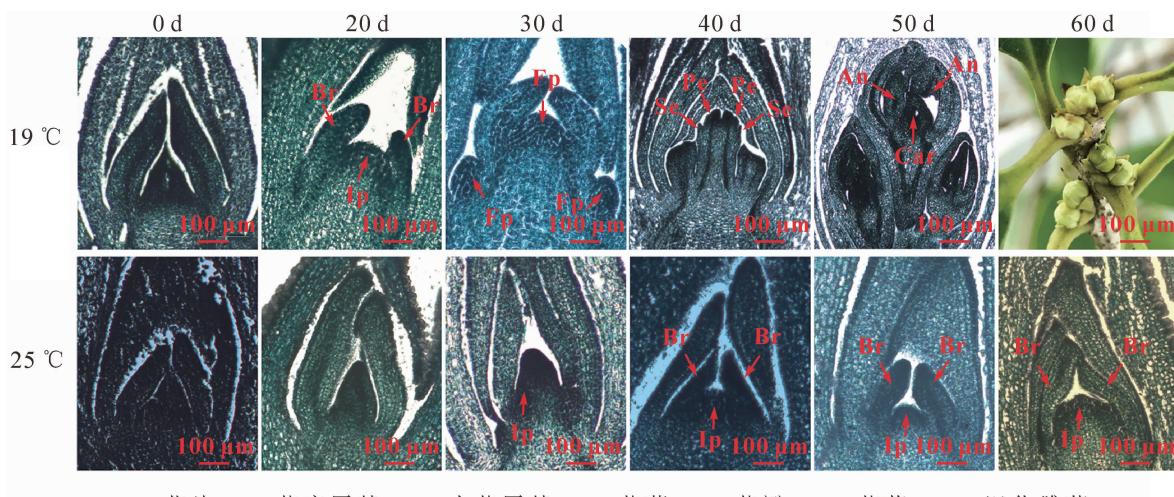


图4 桂花OffCA系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree based on OffCA gene

2.4 不同温度下桂花花芽分化进程及OffCA表达特性分析

通过对不同温度下‘堰虹桂’不同花芽分化时期的石蜡切片发现：19℃处理约20 d后，‘堰虹桂’进入花序分化期，约30 d后进入小花分化期，40 d左右进入花萼和花瓣分化期，50 d后进入雄蕊分化期和雌蕊退化分化期。但在25℃处理下，‘堰虹桂’在30 d左右进入花序原基分化期且一直处于该时期(图5)，花芽分化进程显著延迟。以上现象说明低温19℃能够显著促进‘堰虹桂’的花芽分化进程，从而促进开花时间提前。



Br.苞片；Ip.花序原基；Fp.小花原基；Se.花萼；Pe.花瓣；An.花药；Car.退化雌蕊

图5 不同温度处理下‘堰虹桂’花芽分化进程

Figure 5 Flower bud differentiation period of *Osmanthus fragrans* ‘Yanhonggui’ under different temperature treatments

FCA基因是植物响应温度变化调控植物开花的重要基因，对桂花OffCA基因进行定量表达检测发现：无论是在叶还是花芽组织中，OffCA基因在19℃的表达均显著高于25℃(图6)，这说明OffCA基因可响应相对低温19℃的变化，参与调控‘堰虹桂’的花芽分化。

3 讨论

环境温度不同于春化作用和冷胁迫，一般处于该物种生理学和非胁迫温度之间，广泛影响植物的生长发育。不同物种对环境温度的响应具有很大差异，例如，在低温条件下，拟南芥和水稻的开花时间均

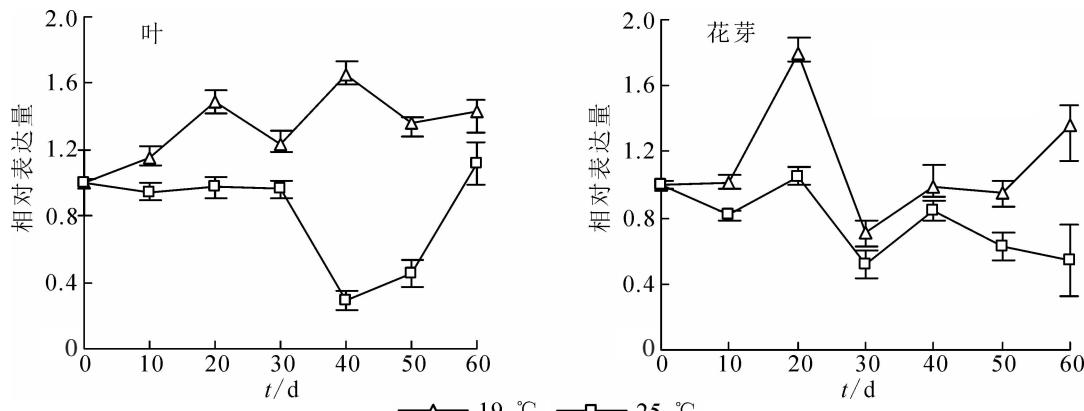


图 6 OfFCA 基因在‘堰虹桂’叶和花芽中的表达变化

Figure 6 Expression pattern of OfFCA in leaf and flower bud at different temperatures

延迟^[16-17],但是在朵丽蝶兰 *Doritaenopsis hybrid* 的研究中,低温能够诱导其成花转变,促进生理生化变化及花芽分化^[18]。同时在烟草的研究中,低温也是促使烟草提前进入花期的重要因素之一^[19]。本研究发现:与正常生长温度 25 °C 相比,相对低温 19 °C 显著促进‘堰虹桂’花芽分化进程,使开花时间提前(图 5)。目前, *FCA* 同源基因在拟南芥等多个物种中已克隆得到,但是至今仍没有桂花 *OfFCA* 基因的相关报道。本研究从桂花秋桂品种‘堰虹桂’中分离得到 1 319 bp 的 *OfFCA* 基因(图 1),其开放阅读框为 864 bp,编码 287 个氨基酸,基因登录号为 MK737873。与其他物种 *FCA* 同源基因类似, *OfFCA* 具有典型的 RRM 基序和 WW 结构域,与矮牵牛 *PtFCA-like* 的同源性最高(76%),且与其他物种包括马铃薯、芝麻、沟酸浆以及烟草的同源性均高达 68% 以上(图 2)。另外, *OfFCA* 基因与木犀科油橄榄 *OeFCA* 和胡麻科芝麻 *SfFCA* 关系最近(图 4)。

环境温度对植物的花芽分化和开花具有重要的影响,其调控机制也存在很大的差异。*FCA* 受转录和转录后调控,在拟南芥中,与 16 °C 相比,23 °C 时 *FCA* 转录和蛋白质水平升高,进而促使成花转变使花期提前^[20]。但在木本植物三叶橙 *Poncirus trifoliata* 中,与 23 °C 相比, *PtFCA1* 在较高的环境温度(27 °C)显著下调,且 35S::*PtFCA1* 回补拟南芥 *fca-1* 突变体花期显著提前^[21]。在桂花中发现,无论在叶和花芽中,19 °C 条件下 *OfFCA* 基因的表达均显著高于 25 °C(图 6)。据此可以推测, *OfFCA* 响应环境温度变化参与桂花的花芽分化并使开花时间提前。在拟南芥等模式植物中,*FCA* 通过抑制 *FLC* 以及 *SVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*) 基因调控 *FT* 和 *SOC1* 的表达来促进花芽分化和开花时间^[22],但是桂花 *OfFCA* 基因是否像模式植物一样,通过直接调控 *FLC* 和 *SVP* 基因的表达进而使 *FT* 和 *SOC1* 蛋白积累促进开花,还有待更进一步的验证。

目前,关于桂花的开花分子机制的报道比较少^[23]。本研究通过对桂花的 *FCA* 基因克隆和表达分析,初步探究 *OfFCA* 影响环境温度变化调控桂花花芽分化的分子机制,对桂花的花期调控、遗传改良以及新品种培育提供一些理论基础。

4 参考文献

- [1] 张艺能,周玉萍,陈琼华,等.拟南芥开花时间调控的分子基础[J].植物学报,2014,49(4): 469–482.
ZHANG Yineng, ZHOU Yuping, CHEN Qionghua, et al. Molecular basis of flowering time regulation in *Arabidopsis* [J]. *Chin Bull Bot*, 2014, 49(4): 469 – 482.
- [2] LIU Fuquan, MARQUARDT S, LISTER C, et al. Targeted 3' processing of antisense transcripts triggers *Arabidopsis FLC* chromatin silencing [J]. *Science*, 2010, 327: 94 – 97.
- [3] LIU Fuquan, QUESADA V, CREVILLÉN P, et al. The *Arabidopsis* RNA-binding protein *FCA* requires a lysine-specific demethylase 1 homolog to downregulate *FLC* [J]. *Mol Cell*, 2007, 28(3): 398 – 407.
- [4] QUESADA V, MACKNIGHT R, DEAN C, et al. Autoregulation of *FCA* pre-mRNA processing controls *Arabidopsis* flowering time [J]. *EMBO J*, 2003, 22(12): 3142 – 3152.
- [5] SUN Fan, LIU Chuanliang, ZHANG Chaojun, et al. A conserved RNA recognition motif (RRM) domain of *Brassica napus* *FCA* improves cotton fiber quality and yield by regulating cell size [J]. *Mol Breed*, 2012, 30(1): 93 – 101.

- [6] LEE J H, CHO Y S, YOON H S, et al. Conservation and divergence of *FCA* function between *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, **58**(6): 823 – 838.
- [7] MARQUARDT S, BOSS P K, HADFIELD J, et al. Additional targets of the *Arabidopsis* autonomous pathway members, *FCA* and *FY* [J]. *J Exp Bot*, 2006, **57**(13): 3379 – 3386.
- [8] 鲁旭, 孙芳, 华玉伟, 等. 巴西橡胶树 *FCA* 基因的克隆及功能分析[J]. 广东农业科学, 2014, **41**(15): 116 – 120.
- LU Xu, SUN Fang, HUA Yuwei, et al. Cloning and functional analysis of *FCA* gene in *Hevea brasiliensis* [J]. *Guangdong Agric Sci*, 2014, **41**(15): 116 – 120.
- [9] MOON J, LEE H, KIM M, et al. Analysis of flowering pathway integrators in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, **46**(2): 292 – 299.
- [10] JUNG J H, SEO P J, AHN J H, et al. *Arabidopsis* RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering [J]. *J Biol Chem*, 2012, **287**(19): 16007 – 16016.
- [11] BLÁZQUEZ M A, AHN J H, WEIGEL D. A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Genet*, 2003, **33**(2): 168 – 171.
- [12] ANDERSON J T, LEE C R, MITCHELL-OLDS T. Life-history QTLs and natural selection on flowering time in *Boechera stricta*, a perennial relative of *Arabidopsis* [J]. *Evolution*, 2011, **65**(3): 771 – 787.
- [13] NAKANO Y, HIGUCHI Y, SUMITOMO K, et al. Flowering retardation by high temperature in chrysanthemums: involvement of *FLOWERING LOCUS T-like 3* gene repression [J]. *J Exp Bot*, 2013, **64**(4): 909 – 920.
- [14] 刘涛, 任莉萍, 曹沛沛, 等. 菊花不同时期各组织器官石蜡切片制作条件的优化[J]. 南京农业大学学报, 2016, **39**(5): 739 – 746.
- LIU Tao, REN Liping, CAO Peipei, et al. The paraffin section making conditions of chrysanthemum different tissues in different period [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2016, **39**(5): 739 – 746.
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 – 408.
- [16] WIGGE P A. Ambient temperature signalling in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, **16**(5): 661 – 666.
- [17] 宋远丽, 栾维江. 水稻开花的光温调控分子机理[J]. 中国水稻科学, 2012, **26**(4): 383 – 392.
- SONG Yuanli, LUAN Weijiang. Regulatory pathways of rice flowering in different light and temperature conditions [J]. *Chin J Rice Sci*, 2012, **26**(4): 383 – 392.
- [18] 张迟, 周庐萍, 罗小燕, 等. 低温对朵丽蝶兰成花过程中碳水化合物及糖转运蛋白基因表达的影响 [J]. 中国农业科学, 2011, **44**(8): 1670 – 1677.
- ZHANG Chi, ZHOU Luping, LUO Xiaoyan, et al. Relative cold-induced flowering arouse fluctuation on carbohydrates and expression of genes related to sugar transport in *Doritaenopsis hybrid* [J]. *Sci Agric Sin*, 2011, **44**(8): 1670 – 1677.
- [19] 李元元. 低温诱导烟草早花研究与烟草 MADS-box 基因的同源克隆[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
LI Yuanyuan. *Research on Cold Induced Early Flowering and Homologous Cloning of MADS-box Genes in Tobacco* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011.
- [20] CHO H J, KIM J J, LEE J H, et al. SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) protein negatively regulates miR172 transcription via direct binding to the pri-miR172a promoter in *Arabidopsis* [J]. *FEBS Lett*, 2012, **586**(16): 2332 – 2337.
- [21] AI Xiaoyan, ZHANG Jinzhi Z, LIU Tianjia, et al. *PfFCA* from precocious trifoliolate orange is regulated by alternative splicing and affects flowering time and root development in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Tree Genet Genomes*, 2016, **12**(5): 85.
- [22] CAPOVILLA G, SCHMID M, POSÉ D. Control of flowering by ambient temperature [J]. *J Exp Bot*, 2014, **66**(1): 59 – 69.
- [23] 蒋琦妮, 付建新, 张超, 等. 桂花 *OlfAP1* 基因的克隆及表达分析[J]. 浙江农林大学学报, 2019, **36**(4): 664 – 669.
JIANG Qini, FU Jianxin, ZHANG Chao, et al. cDNA cloning and expression analysis of *OlfAP1* in *Osmanthus fragrans* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2019, **36**(4): 664 – 669.