

绿竹花发育相关基因 *BoAP3* 的克隆与分析

朱龙飞, 徐英武, 林新春

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: MADS-box 基因家族在决定花分生组织特性和花器官发育过程中起着重要的作用。以绿竹 *Bambusa oldhamii* 开花试管苗花芽为植物材料, 采用 cDNA 末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 技术, 获得了 1 条 MADS-box 基因家族的基因, 命名为 *BoAP3*。序列分析结果表明: *BoAP3* 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度为 654 bp, 编码 218 个氨基酸, 具有典型的植物 MADS-box 蛋白结构, 其编码肽链包含了 MADS 区、K 区、I 区和 C 区。*BoAP3* 与小麦 *Triticum aestivum*, 水稻 *Oryza sativa* 等 AP3-like 同源基因所编码的氨基酸同源性达到 80% 以上。定量聚合酶链式反应 (PCR) 结果表明: *BoAP3* 基因在开花试管苗的花芽中表达量是不开花试管苗营养芽表达量的 8.1 倍, 表明该基因可能参与了花器官的发育。图 4 参 14

关键词: 林木遗传学; 绿竹; *BoAP3*; MADS-box

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2013)06-0839-05

Cloning and analysis of the flowering-related gene, *BoAP3*, in *Bambusa oldhamii*

ZHU Longfei, XU Yingwu, LIN Xinchun

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: MADS-box family genes play important roles in the determination of floral meristem identity and the development of floral organ identity. Here we reported a full length MADS-box gene obtained from the flower bud of *Bambusa oldhamii*. It was named as *BoAP3* based on sequence similarity. DNA sequence analysis showed that the *BoAP3* was 654 bp length and contained an open reading frame (ORF) encoding a protein of 218 amino acids that shared over 80% homology with *Oryza sativa* and *Triticum aestivum* of *APETALA3* homologues. The protein showed a typical MADS-box gene structure containing MADS domain, K domain, I region and C terminus. Quantitative real-time PCR analysis revealed that the expression level of *BoAP3* in flower buds was 8.1 times higher than in vegetative shoots, suggested that *BoAP3* may be involved in floral organ development. [Ch, 4 fig. 14 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Bambusa oldhamii*; *BoAP3*; MADS-box

MADS-box 基因家族是一类转录因子, 最先从酵母的转录因子 *MCM1*、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 AG 基因、金鱼草 *Antirrhinum majus* 的 *DEF(DEFICIENS)* 基因和人的转录因子 *SRF(SRF4)* 中鉴定出来, 在决定植物开花时间和花形态建成中均起着非常重要的作用^[1-3]。通过对拟南芥和金鱼草的研究, Bowman 等^[4]提出了花器官发育的 ABC 模型, 将同源异型基因分成 A, B 和 C 等 3 类。花器官的性质便是由这 3 类同源异型基因所决定。A 类基因独自作用形成萼片, A 类和 B 类基因共同作用形成花瓣, B 类和 C 类基因共同作用形成雄蕊, C 类基因独自作用形成雌蕊。*APETALA3(AP3)/DEFICIENS(DEF)* 为

收稿日期: 2012-11-21; 修回日期: 2013-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31000295); 国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2012CB723008)

作者简介: 朱龙飞, 从事植物分子生物学研究。E-mail: longfzhu@163.com。通信作者: 林新春, 教授, 博士, 从事植物分子生物学研究。E-mail: lxc@zafu.edu.cn

植物花器官发育 B 类基因, 调控植物雄蕊的发育^[5], *AP3* 及其同源基因根据其编码的蛋白质 C 端一段特异序列的不同可以分为 3 个基因系: *paleoAP3* 系, *eu-AP3* 系和 *TM6* 系^[6]。近年来, *AP3* 同源基因在很多物种中都得到了相关报道^[7], 但在竹子中没有这类报道。竹类植物是多年生植物, 也是重要的经济植物, 竹子开花会造成竹林成片死亡的现象, 对生态环境和社会经济带来很大的影响, 因此, 对竹子开花的研究具有十分重要的意义。本实验以绿竹 *Bambusa oldhamii* 组培苗为实验材料, 利用 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE) 技术获得了 *BoAP3* 基因的 cDNA 全长, 利用生物信息学对其进行了分析, 同时也对其表达模式进行了分析, 旨在为进一步研究竹类花发育的分子调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

绿竹花芽和营养芽分别来自浙江农林大学组培室继代 1 周的开花试管苗和营养试管苗^[8], 长度为 1 cm 左右。采用 Trizol 法提取其总核糖核酸 (RNA), -70 °C 保存备用。

1.2 绿竹 *AP3* 基因的克隆与序列分析

按照 Reverse Transcription System (日本 TAKARA 公司) 反转录试剂盒说明书合成花芽 cDNA 第 1 链。通过网络搜索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), 根据禾本科 Poaceae *AP3*-like 同源基因序列由 Primer 5.0 设计一段保守序列引物, 上游引物为 5'-CGGGGATCATGAAG AAGGCG-3', 下游引物为 5'-TCATACTGCTCGATCCATAG-3', 由中国上海生工生物工程技术有限公司合成。根据扩增的保守序列设计 RACE 引物, 3'RACE 第 1 轮引物为 5'-TGATATCTGTGCCTGGG CTG-3', 第 2 轮引物为: 5'-TAG-GCTGGTCCCGATGCCCT-3'。5'RACE 第 1 轮引物为 5'-CCATCATCATGTTCTCCTCC-3', 第 2 轮引物为 5'-CGCACGGGATCATGAAGAA-3'。根据 RACE 结果设计开放阅读框 (open reading frame, ORF) 引物, 上游引物为 5'-ATGGGGCGCGGCAAG-3', 下游引物为 5'-TTAACCGAGGCGCAGGTCGC-3'。聚合酶链式反应 (PCR) 扩增目的条带采用凝胶回收试剂盒 (中国上海生工) 回收。将回收条带插入 pMD-20T 载体 (日本 TAKARA 公司), 热激法转化 DH5 α (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, 利用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 (图 1), 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 MEGA 4.0 软件构建系统进化树。

1.3 绿竹 *BoAP3* 基因的定量表达分析

以提取的绿竹开花试管苗的花芽和不开花试管苗的营养芽为材料, 提取总 RNA, 参照试剂说明书分别进行反转录, 利用 ABI7500 定量聚合酶链式反应 (PCR) 仪对绿竹上述部位 *AP3* 基因的表达进行定量分析。以绿竹 *Actin* 基因为内标, ABI-7500 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s, 59 °C 退火 1 min, 40 个循环。*Actin* 上游引物为 5'-TGAGCTTCCTGATGGG CAAG-3', 下游引物为 3'-CCTGATA TCCACGTCGCACTT-5'。*BoAP3* 上游引物为 5'-GG AGGTTCCGCCACAGGAA-3', 下游引物为 5'-GCTCCTGCTGCAGG-TTCT-3'。

```

1 ATGGGGCGGGCAAGATCGAGATAAAGCGGATCGAGAAACGGACCAACAGGCAGGTGACC
1 M G R G K I E I K R I E N A I N R Q V I
61 TACTCCAAGCGCGCACGGGCATCATGAAGAAGCGCGGGAGCTCACCGTGTCTGGGAC
61 Y S K R R I G I M K K A R E L I V L C D
121 GCCCAGGTGCGCATCATGTTCTCCTCCACCGGCAAGTACCAAGAGTTCGACGCCA
121 A Q V A I I M F S S I G K Y H E F C S P
41 GGCACAGATATCAAGGGGATCITTTGACCGCTACCGAGCGCCATCGGGACCAGCCTATGG
181 G T D I K G I F D R Y Q Q A I G T S L W
61 ATCGAGCAGTACGAGAAATATGCGCGCACCGCTGAGCCATCTCAAGGACATCAATCGAAAC
241 I E Q Y E N M Q R T L S H L K D I N R N
81 CTACGACCGGATCAGGCAAGGATGGGTGAAGATCTGGAACGGGCTGGAGTTTGAACGAG
301 L R T E I R Q R M G E D L D G L E F D E
101 CTGCGGGTCTTGAGCAAAATGTCGACACCGCTTTGAAGGAGGTTGCGCACAGGAAGTAT
361 L R G L E Q N V D T A L K E V R H R K Y
121 CATGTGATCACACACAGACTGAAACCTACAAGAAGAGGTGAAGCAOCCGTAACGAGGCA
421 H V I T I Q T E T Y K K K V K H A Y E A
141 TACAAGAACTGCAGCAGGAGCTGGGCATGCGGAGGACCCCGGTTCCGGGTTCCGTTGGAC
481 Y K N L Q Q E L G M R E D P A F G F V D
161 AACATGGCGGCGCGGATGGGACGGGCGGGCGGACATGTAOCCAGCTTCCGGGTG
541 N M A A A G W D G A A A D M Y A S F R V
181 GTGCCGAGCCAGCCAACTGCACCGCATGGCTACGGGCACTGGGCTCGGCTCGGTTAA
601 V P S Q P N L H G M A Y G D L R L G *
201

```

虚线代表MADS盒, 实线代表K区, MADS盒和K区之间为I区, 双线代表C区。

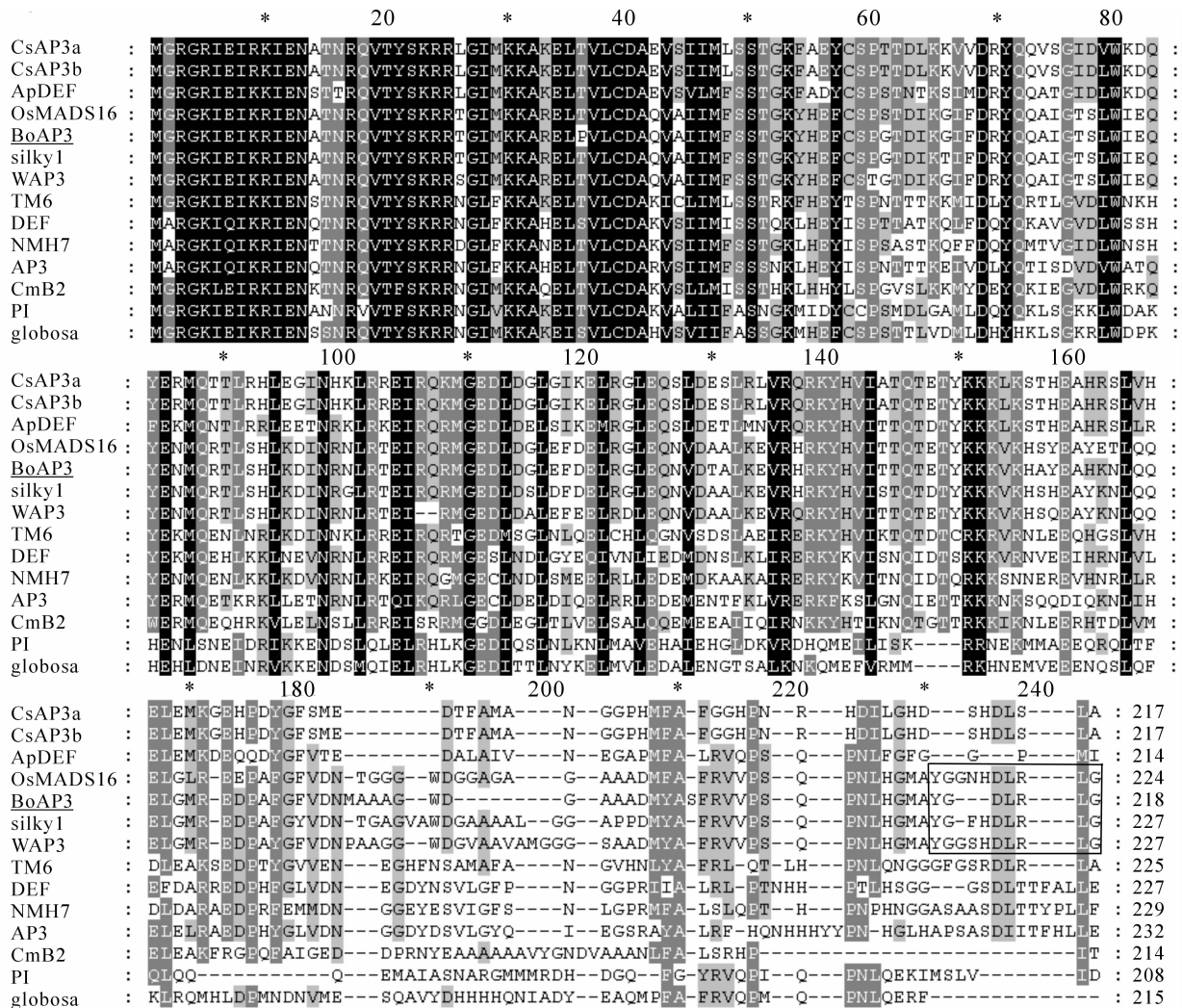
图 1 *BoAP3* 推定氨基酸序列

Figure 1 Putative amino acid sequence of *BoAP3*

2 结果与分析

2.1 *BoAP3* 序列分析

以禾本科保守序列设计引物扩增得到了 180 bp 的片段，3'RACE 扩增得到了 750 bp 的片段，5'RACE 扩增得到了 300 bp 的片段，将 5'RACE 和 3'RACE 获得的序列进行拼接，结果显示：该 cDNA 全长为 998 bp，含有 1 个完整的 ORF 序列，长度为 654 bp。核苷酸序列比对结果发现，该序列为 *AP3* 同源基因，该基因与水稻 *Oryza sativa*，小麦 *Triticum aestivum*，玉米 *Zea mays* 等植物的 *AP3* 基因序列有很高的同源性。DNAMAN 分析显示，该片段编码 218 个氨基酸，蛋白分子量约为 25.04 kD，等电点为 8.97。Blastp 结果显示：该蛋白属于 MADS-box 家族，具有植物 MADS-box 蛋白典型的特征，其编码肽链包含 2 个保守区(MADS 盒和 K 区)和 2 个非保守区(I 区和 C 区)(图 1)，氨基酸序列与来自其他单子叶植物的某些 MADS 盒基因高度同源，与水稻 *OsMADS16*，玉米 *silky1* 以及小麦 *WAP3* 一致性(identity) 分别为 83.54%，82.72% 和 82.30%，与拟南芥 *AP3* 的一致性为 43.62%。在 MADS 盒和 K 区的氨基酸序列非常保守(图 2)。在 NCBI 上查找已经克隆出来的 11 个不同物种的 *AP3* 同源基因，采用 clustalx 对这些基因作氨基酸序列比对，采用 NJ 法构建系统进化树(mega 4.0)分析显示，*BoAP3* 与小麦 *AP3* 关系最近，其次为水稻 *AP3*，与金鱼草 *DEF* 同源基因进化关系最远，序列分析表明 *BoAP3* 蛋白属于 *paleoAP3*



其他物种蛋白登陆号：CsAP3a(AY948339)，CsAP3b(AY948340)，NMH7(L41727)，OsMADS16 (NM_001065095)，TM6(DQ539417)，AP3(NM_115294)，ApDEF(AB177941)，CMB2(L40405)，*silky1*(NP_001104951.1)，WAP3(BAD15367)，DEF(X62810)，PI(NM_122031)，*globosa*(CAA48725)。黑色矩形框代表 *paleoAP3* 基序。

图 2 *BoAP3* 与其他物种相关 MADS 区蛋白氨基酸序列比较

Figure 2 Amino acid sequence comparison of *BoAP3* and the related MADS domain proteins of other species

oAP3系(图3)。

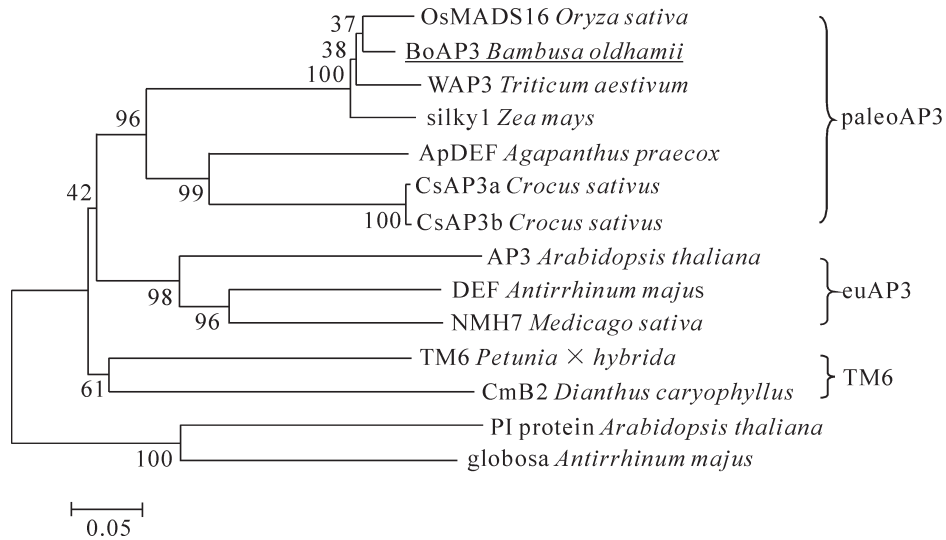


图3 基于MADS盒基因氨基酸序列构建的系统树分析

Figure 3 Phylogenetic analysis based on the amino acid sequence of MADS-box genes

2.2 BoAP3 表达分析

2.2.1 标准曲线的制作 使用PCR产物作为模板,逐级稀释10.0倍,做6个梯度,制作Actin和BoAP3的标准曲线。Actin和BoAP3的扩增曲线 R^2 分别为1.000和0.998,表明模板重复性好,所采用的PCR体系和热循环体系条件可以得到稳定的实验结果。

2.2.2 BoAP3在花芽和营养芽中的表达水平 以同时继代1周的花芽试管苗的花芽和营养芽试管苗的营养芽cDNA为模板,以Actin为内参,研究BoAP3基因在花芽和营养芽中的相对表达情况(图4)。每个模板和引物组合做3个重复。每个引物和模板组合的 C_t 值的标准误差较小,表明重复性好,且Actin和BoAP3引物扩增的 C_t 值均落在标准曲线 C_t 值的区间。定量结果表明:BoAP3在花芽的表达量明显比营养芽高,是营养芽表达量的8.1倍。

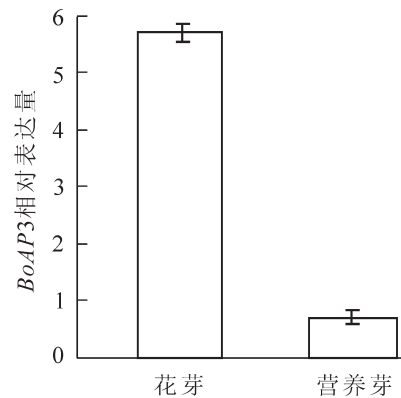


图4 BoAP3基因在绿竹花芽和营养芽中的表达水平

Figure 4 Expression level of BoAP3 gene in flower buds and vegetative shoots of *Bambusa oldhamii*

3 结论与讨论

为了探讨MADS-box基因调节竹类花器官发育的作用,克隆得到绿竹中的AP3-like基因并命名为BoAP3,该基因具有MADS-box中B类基因的结构特征。依据基因C端序列的不同,AP3-like基因分为3个基因系,分别是paleoAP3系,eu-AP3系和TM6系。本研究中分离的BoAP3蛋白质序列与paleoAP3系最相近,具有paleoAP3基序(YGx-HDLRLA)^[9-10](图2),BoAP3与小麦、水稻等AP3-like同源基因所编码的氨基酸同源性达到80%以上,且在系统进化树上聚为一类。综上所述,可以确定BoAP3是B类AP3-like基因。

到目前为止,已经从多个物种中克隆得到了花发育相关的B类基因(图3),其表达模式有着显著的差异。拟南芥中,AP3基因在花器官发育的第2轮和第3轮表达^[11],而在金鱼草中DEF基因在花器官发育4轮中都有表达,在非花组织不表达^[12],玉米的silky1基因在花器官所有部位表达^[13],荧光定量PCR结果可以看出,绿竹开花试管苗花芽的表达量是不开花试管苗营养芽表达量的8.1倍,这一结果表

明 *BoAP3* 与花器官发育有密切关系。

参考文献:

- [1] MANDEL M A, YANOFSKY M F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1998, **337**: 522 – 524.
- [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] BECKER A, THEISSEN G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, **29**(3): 464 – 489.
- [4] BOWMAN J L, SMYTH D R, MEYEROWITZ E M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis* [J]. *Development*, 1991, **112**: 1 – 20.
- [5] WEIGEL D, MEYEROWITZ E M. The ABCs of floral homeotic genes: review [J]. *Cell*, 1994, **78**: 203 – 209.
- [6] GEMMA D M, IRVIN P, EYAL E, *et al.* Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development [J]. *Plant Cell*, 2006, **18**: 1833 – 1845.
- [7] ZAHN L M, LEEBENS-MACK J, de PAMPHILIS C W, *et al.* To B or 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.
- [8] LIN Xinchun, HUANG Lichun, FANG Wei, *et al.* Understanding bamboo flowering based on large-scale analysis of expressed sequence tags [J]. *Gen Mol Res*, 2010, **9**(2): 1085 – 1093.
- [9] 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 lineage [J]. *Genetics*, 1998, **149**: 765 – 783.
- [10] 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.
- [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] SOMMER H, BELTRAN J P, HUIJSER P, *et al.* Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors [J]. *EMBO J*, 1990, **9**(3): 605 – 613.
- [13] AMBROSE B A, LERNER D R, CICERI P, *et al.* Molecular and genetic analyses of the *Silky1* gene reveal conservation in floral organ specification between eudicots and monocots [J]. *Mol Cell*, 2000, **5**(3): 569 – 579.
- [14] 徐小雁, 田敏, 王彩霞, 等. 文心兰花发育相关基因 *OAP3* 的克隆与表达分析[J]. 浙江农林大学学报, 2011, **28**(6): 900 – 906.
XU Xiaoyan, TIAN Min, WANG Caixia, *et al.* Cloning and expression analysis of a flowering-related gene, *OAP3*, in *Oncidium* [J]. *J Zhejiang A & F Univ*, 2011, **28**(6): 900 – 906.