浙江农林大学学报,2017,34(3):421-426

Journal of Zhejiang A & F University

doi:10.11833/j.issn.2095-0756.2017.03.006

毛竹 PheMADS15 基因的克隆及功能分析

程占超,马艳军,侯 丹,刘 俊,高 健

(国际竹藤中心 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验, 北京 100102)

摘要:以毛竹 Phyllostachys edulis 花为材料,通过聚合酶链式反应(PCR)克隆技术从毛竹中分离得到 1 个含完整编码区的 cDNA,长 603 bp,编码 200 个氨基酸。命名为 PheMADS15(GenBank 登记号: KU721916)。对 PheMADS15进行分析表明,该基因具有典型的 MADS-box 基因结构域,与拟南芥 Arabidopsis thaliana 的 A 类基因 API 编码蛋白的同源性为 58.65%。通过实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)克隆技术检测了 PheMADS15 在毛竹花芽、苞片、颖片、耧片、雄蕊、雌蕊和幼胚中的相对表达量。分析表明: PheMADS15 基因在毛竹花发育的初期表达量最高,主要在花芽中表达,可能参与毛竹成花转变过程。图 4 参 20

关键词: 林木育种学; 毛竹; PheMADS15; MADS-box

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2017)03-0421-06

Isolation and functional analysis of the *PheMADS*15 gene in *Phyllostachys edulis*

CHENG Zhanchao, MA Yanjun, HOU Dan, LIU Jun, GAO Jian

(Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, International Center for Bamboo and Rattan, State Forestry Administration, Beijing 100102, China)

Abstract: As a kind of transcription factors, MADS-box genes play significant roles during floral development, but their identification and functions in *Phyllostachys edulis* remain unclear. Here, we performed functional analysis of the *PheMADS*15 gene in *Ph. edulis*. *PheMADS*15 cDNA was isolated from *Phyllostachys edulis* by polymerase chain reaction (PCR) (GenBank accession No. KU721916). This study also used a quantitative real-time, polymerase chain reaction (qRT-PCR) and a homology analysis. Results showed that the gene was 603 bp and encoded a protein of 200 aa, which had a typical MADS-box motif. The homology analysis showed that *PheMADS*15 shared 58.7% similarity with the floral meristem identity gene *AP*1 indicating that it belonged to A function genes. The qRT-PCR detected expression of *PheMADS*15 in the floral bud, glume, lemma, palea, lodicule, stamen, pistil, and young embryo. Additionally, *PheMADS*15 had the highest expression level in the initial-phase of flower development, especially in the floral bud formation stage. These results suggest that *Phe-MADS*15 might participate in regulating flower development of *Ph. edulis*. [Ch, 4 fig. 20 ref.]

Key words: forest tree breeding; Phyllostachys edulis; PheMADS15; MADS-box

毛竹 Phyllostachys edulis 作为经济竹种,经济价值高,生产潜力大,在中国工农业生产和国民经济中占有重要的地位。毛竹营养生长周期长,开花时期不确定,并且开花后集体死亡,导致竹林面积减少,对经济发展和生态环境造成重大损失和破坏。近几年竹子频繁的开花,科研人员不断尝试各种试验手段来探究竹子开花的机制,竹子开花生物学和生殖生物学研究又成为人们关注的重点。近年来,花器

收稿日期: 2016-06-14; 修回日期: 2016-07-31

基金项目: 国家高技术研究发展计划("863" 计划)项目(2013AA102607-4); 国家自然科学基金资助项目 (31570673)

作者简介:程占超,博士,从事林木遗传育种研究。E-mail: chengzhan_chao@126.com。通信作者:高健,研究员,博士,博士生导师,从事林木遗传育种研究。E-mail: gaojian@icbr.ac.cn

官发育研究的快速发展为竹类的花发育研究提供了借鉴和基础,尤其是模式植物拟南芥 Arabidopsis thaliana,金鱼草 Antirrhinum majus,矮牵牛 Petunia hybrida 等开花调控基因及其功能的研究。通过对拟南芥和金鱼草中同源异型突变体进行系统的遗传学分析^[2-4],提出了花器官 ABC 模型的假说。在植物中,A 类基因能够控制花萼形成,A 类和 B 类基因能够共同控制花瓣的形成,B 类和 C 类基因共同决定雄蕊的发生和发育,而 C 类基因则控制植物心皮的行成。反向遗传学研究显示,D 类基因和 E 类基因的同源基因同样在调控花形态建成方面起重要作用,D 类基因调控胚珠的形成和发育^[5-7],而 E 类基因在所有花器官的形成中起着调控作用^[8-10]。在花发育调控中大部分基因属于 MADS-box 基因家族,该家族基因拥有典型的 MADS-box 保守结构域,是一类重要的转录因子,主要在植物花器官的发育及开花时间的调控上起作用。目前,从麻竹 Dendrocalamus latiflorus 和绿竹 Bambusa oldhamii 中已经分离了与竹子花发育密切相关的 MADS-box 基因,并对其功能进行初步了分析^[11-12],但是对于毛竹 MADS-box 基因的相关报道比较少,研究人员曾对毛竹的 E 类基因 PeMA DS1 进行了初步的鉴定与分析^[13]。本研究以毛竹花样品为研究材料,首次克隆了 1 个 A 类的 MADS-box 基因 PheMA DS15,并对该基因与麻竹、拟南芥和水稻 Oryza sativa 等不同物种同源基因亲缘关系进行了分析,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)研究它在毛竹不同组织上的表达差异,初步鉴定了 PheMA DS15 的功能,为竹子开花和育种奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和主要试剂

PheMADS15 基因克隆的材料为毛竹的花穗,毛竹开花实验地位于广西壮族自治区桂林市,位于南岭山系的西南部。该毛竹林属于自然生长状态。以毛竹花器官分离出的花芽、苞片、颖片、稃片、浆片、雄蕊、雌蕊和幼胚为模板,共计8个样品,用于克隆和组织特异性表达分析。

TA 克隆 T-esay Vector, *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司, 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。转 化用的感受态来自天根公司 DH5α 大肠埃希菌 *Escherichia coli*。Trizol 试剂购自 Life 公司, 反转录试剂 盒购自 Promega 公司。SYBR Green I Master 试剂盒购自 Roche 公司。根据毛竹的 *TIP*41 作为内参,用于qRT-PCR 分析。聚合酶链式反应(PCR)引物均由金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 Trizol 试剂盒提取毛竹花的总核糖核酸(RNA) 选取生长良好的毛竹花穗,通过 Trizol 法提取花样品的总 RNA,用于 *PheMADS*15 基因的克隆。

1.2.2 PCR 扩增 PheMADS15 的全长序列 根据毛竹基因组数据库的 PheMADS15 cDNA 序列设计 PCR 引物,PheMADS15-F: 5'-AGTTGAACTGAAGAGGATTGAG-3'; PheMADS15-R: 5'-CTAAAGAACCCAACCAAGCATG-3', 引物由金唯智生物科技有限公司合成。以毛竹花 cDNA 为模板,进行 PCR。反应体系 50.0 μL: 5.0 μL 10.0×长和精确聚合酶链式反应(LA PCR)缓冲液(加镁离子优化),8.0 μL 三磷酸碱基脱氧核苷酸 (dNTPs) (2.5 mmol·L⁻¹),5.0 μL PheMADS15-F (5.0 mmol·L⁻¹),5.0 μL PheMADS15-R (5.0 mmol·L⁻¹),2.0 μL 模板,24.5 μL 双蒸水和 0.5 μL 长和精确脱氧核糖核酸(LA DNA)聚合酶。反应程序为 94 ℃预变性 5 min;然后按下列循环参数进行扩增反应:94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,经过 30 个循环后,72 ℃ 10 min,16 ℃保温。PCR 扩增产物进行电泳检验,回收目的 DNA 片段,与 T-easy 克隆载体连接,将 PCR 连接产物热激转化到 DH5α 感受态细胞,最后涂含 Amp 的 Luria-Bertani(LB)培养基平板,过夜 37 ℃培养,然后挑取单克隆进行菌落 PCR 反应。取 1.0 μL 菌液,通过引物 PheMADS15-F 和 PheMADS15-R 验证,PCR 反应程序同上。将检测正确的阳性克隆菌液测序并保菌。

1.2.3 实时定量 PCR 分析 根据 Trizol 试剂提取毛竹花样品的总 RNA。通过 NanoDrop Spectrophotometer ND-100 测定提取的总核糖核酸(RNA)的浓度,然后进行电泳检测。根据 Promega 胶回收试剂盒说明书,取 1.0 μ g RNA 于 0.2 μ L 离心管(EP)中,70 μ C 解育 10 μ min,短暂离心后,置于冰上;准备一个 20.0 μ L 的反应体系:4.0 μ L 25 μ L 26 μ L 27 μ L 28 μ L 29 μ L 29 μ L 29 μ L 29 μ L 20 μ L 25 μ L 20 μ L 25 μ L 20 μ L

加不含核酸酶的水到 20.0 μL。混匀后进行反转录反应。使用 Oligo (dT)15 引物时,42 ℃孵育 15 min,95 ℃,5 min,然后转入 0~5 ℃放置 5 min。得到的 cDNA 用于下一步的 qRT-PCR 反应的模板。其反应体系为 20.0 μL体系,包括 2.0 μL 的反转录的 cDNA,10.0 μL 的 2×SYBR Green I Mastermix,各 0.4 μL的上下游引物,加双蒸水至反应总体积为 20.0 μL,重复 3 次·处理-¹。反应条件:95 ℃预变性 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 40 个循环。qRT-PCR 使用仪器的是 Roche LightCycler[®] 480。

1.2.4 *PheMADS*15 基因全长序列分析 *PheMADS*15 基因的开放读码框(ORF)由美国生物技术信息中心 (NCBI)ORF-finder(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html)来鉴定;通过 DNAMAN 和 MAGE 6.0 软件来分析该基因的同源性;用 ExPASY(http://web.expasy.org/compute_pi/)分析氨基酸的相对分子质量和等电点等理化性质。

2 结果

2.1 毛竹花总 RNA 的提取

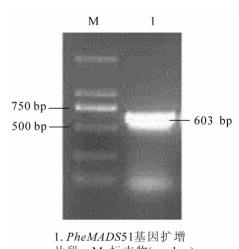
用 Trizol 试剂提取毛竹总核糖核酸(RNA), 测得 RNA 样品的光密度为 $1~103.0~\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将提取到的 RNA 作为模板,于-20~C冰箱保存,用于后续 PCR 扩增。

2.2 PheMADS15 基因全长的克隆

以毛竹花 cDNA 为模板,以 PheMADS15-F 和 Phe-MADS15-R 为引物,PCR 扩增 PheMADS15 的全长,PCR 产物经过电泳检测,在 603 bp 处有一条明亮的条带(图 1),与基因组数据的片段大小保持一致,初步判定为目的基因片段。测序的结果表明,该目的基因与毛竹基因组数据库中的cDNA 序列完全一致。命名为 PheMADS15(GenBank 登记号:KU721916)。

2.3 PheMADS15 基因和编码蛋白序列分析

用 DNAMAN 软件和 NCBI 的 Blast 在线软件分析测序结果,该基因开放阅读框(ORF)的核酸序列及推导出的氨基酸序列(图 2)。结果表明:毛竹 PheMADS15 基因序列含有 1个 603 bp 的开放阅读框,编码 200 个氨基酸。用 ExPASY (http://web.expasy.org/compute_pi/)分析该基因序列编码的蛋白。该蛋白氨基酸的相对分子量为 23.48 kD,理论等电点为 8.98。



1. PheMADS51基因扩增 片段; M. 标志物(marker) (D2000 DNA梯度标志物)。

图 1 毛竹 PheMADS15 基因片段电泳图 Figure 1 Electrophoresis of the amplification fragment of PheMADS15 gene of Phyllostachys edulis

2.4 进化树分析

通过 MAGE 6.0 运用 Neighboro-Joining 方法构建毛竹与其他物种间的系统进化树。对 *PheMADS*15 基因编码的蛋白质进行系统进化分析(图 3),对比麻竹(AAR32118.1),水稻(AAF19047.1),二穗短柄草 *Brachypodiumdistachyon*(NP_001288319.1),玉米 *Zea mays*(ACG35179.1),小米 *Setaria italica*(XP_004981740.1),高梁 *Sorghum bicolor*(AAB5018.1.1),小麦 *Triticumaestirum*(ABF57926.1),大麦 *Hordeum vulgare*(AAW82994.1)和拟南芥(AT1G69120),毛竹与麻竹中的 *DlMADS*1和水稻中 *OsMADS*14比较近。这些 MADS-box 基因都与拟南芥的 *AP*1 同源。

2.5 PheMADS15 组织特异性表达

提取的总 RNA 电泳检测结果表明,提取的毛竹花的总 RNA 结构完整,光密度为 1 103.0 ng·L⁻¹,可以用于定量 PCR 分析。用反转录的毛竹花组织 cDNA 模板进行 qRT-PCR,以 TIP41 作为内参, Phe-MADS15 在毛竹 8 个样品中进行表达量检测(图 4)。结果显示: PheMADS15 的表达量在花蕾中最高,其次是苞片,接着是颖片,而表达量最低是雌蕊,其次是浆片,接着是幼胚。在毛竹花发育的过程中, PheMADS15 主要在花初期表达量高,随着毛竹花的不断发育,表达量逐渐减少。

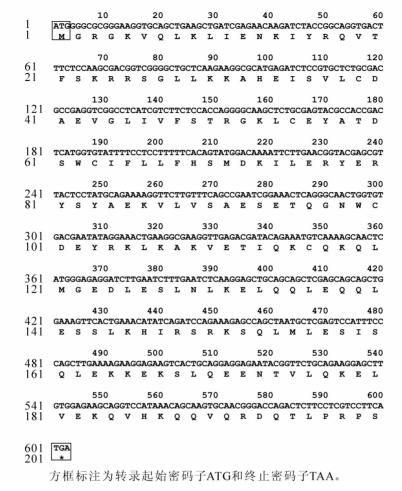


图 2 PheMADS15 编码区核酸序列及其氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide and predicted amino acid sequence of PheMADS15

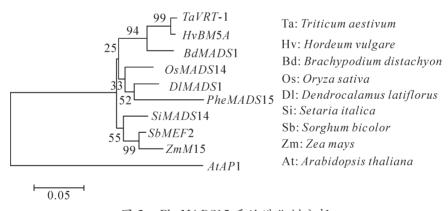


图 3 PheMADS15 系统进化树分析

Figure 3 Phylogenetic tree analysis of PheMADS15

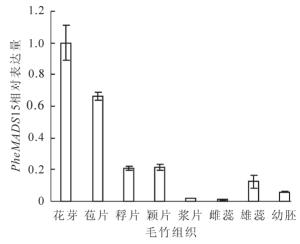
3 讨论

毛竹是中国重要的经济竹种,具有非常独特的性质,在中国具有广泛的栽植面积和非常高的经济价值。目前,竹子造林主要以无性繁殖为主,开花无规律,花粉活性极低,杂交育种进展缓慢,严重阻碍了毛竹新品种培育。现代分子生物学理论和实验技术的快速发展,为阐明竹子开花分子机制奠定了基础,有望突破常规育种的局限性,并加速育种进程。本研究对 PheMADS15 基因与其他物种的同源基因构建的进化树进行分析,结果表明:毛竹与麻竹的亲缘关系极为相近,其次和水稻的 OsMADS14 相近,而与玉米的亲缘关系较远,这与之前的报道大体一致。稻亚科 Ehrhartoideae 和竹亚科 Bambusoideae 有

着比较近的基因序列结构和亲缘关系,在早期,水稻与竹类植物都同属竹亚科[14-15]。

毛竹 PheMADS15 基因编码的蛋白质与其他物种的 MADS-box 有着较高的同源性,尤其是与来自麻竹的 DlMADS1^[16]同源性更高,表明毛竹与麻竹在进化中可能处于比较相近的位置,进而也证明毛竹的 MADS-box 基因在进化上是相当保守的。 Phe-MADS15 基因编码蛋白序列与水稻和拟南芥 A 类基因同处于一个进化树分支中,推测该基因为 A 类的功能基因。

A 类功能基因在花发育过程中起着重要的调节作用。在拟南芥中,AP1 主要在花分生组织的初期高量表达,过表达能提前使植物开花^[17-19],在开花诱导中起着重要的作用。在水稻中,*OsMADS*14 过表达导致水稻提前开花^[20]。毛竹的 *PheMADS*15 与拟南芥的 AP1 以及水稻的 *OsMADS*14 在一个进化枝



表达量内参为TIP41,误差线为3次实验重复误差值。

图 4 PheMADS15 在毛竹不同组织中特异性表达 Figure 4 Relative expression of PheMADS15 in different tissues of Phyllostachys edulis

上。*PheMADS*15 在毛竹花的初期表达量比较高,尤其是在花芽中。推测 *PheMADS*15 在毛竹开花诱导方面可能起着重要的作用,但 *PheMADS*15 在竹子中调控开花的机制仍是未知的。以上结果为竹子开花提供了有用的信息。

4 参考文献

- [1] 袁金玲,傅懋毅,庄金坤,等.几个丛生竹开花授粉特性及麻竹苗期初步选择[J]. 竹子研究汇刊,2005,24 (3):9-13.
 - YUAN Jinling, FU Maoyi, ZHUANG Jinkun, et al. The characteristics of flowering and pollinating of several sympodial bamboos and elementary selection of *Dendrocalamus latiflorus* seedling [J]. J Bamboo Res, 2005, 24(3): 9 13.
- [2] CARPENTER R, COEN E S. Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus* [J]. *Genes Dev*, 1990, **4**(9): 1483 1493.
- [3] 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.
- [4] BOWMAN J L, DREWS G N, MEYEROWITZ E M. Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene AGAMOUS is restricted to specific cell types late in flower development [J]. Plant Cell, 1991, 3(8): 749 758.
- [5] COLOMBO A, HALL P, NAKAMURA S, et al. Intracoronary stenting without anticoagulation accomplished with intravascular ultrasound guidance [J]. Circulation, 1995, 91(6): 1676 1688.
- [6] FAVARO R, PINYOPICH A, BATTAGLIA R, et al. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 2003, 15(11): 2603 2611.
- [7] PINYOPICH A, DITTA G S, SAVIDGE B, et al. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development [J]. Nature, 2003, 424(6944): 85 88.
- [8] PELAZ S, DITTA G S, BAUMANN E, et al. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes [J]. Nature, 2000, 405 (6783): 200 203.
- [9] HONMA T, GOTO K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs [J]. *Nature*, 2001, **409**(6819): 525 529.
- [10] DITTA G, PINYOPICH A, ROBLES P, et al. The SEP4 gene of Arabidopsis thaliana functions in floral organ and meristem identity [J]. Current Biol, 2004, 14(21): 1935 1940.
- [11] 田波. 竹类植物开花时间相关基因的克隆与功能分析[D]. 昆明:中国科学院昆明植物研究所, 2005. TIAN Bo. *Isolation and Characterization of Bamboo Flowering Time Genes* [D]. Kunming: Chinese Academy of Sciences. Kunming Institute of Botany, 2005.
- [12] 高志民,刘颖丽,李雪平,等.一个绿竹 MADS-box 基因的克隆与序列分析[J]. 分子植物育种,2007,5

- (6): 866 870.
- GAO Zhimin, LIU Yingli, LI Xueping, et al. Cloning and sequencing analysis of a flowering-related mads-box gene in Bambusa oldhamii L. [J]. Mol Plant Breed, 2007, 5(6): 866 870.
- [13] 高志民,郑波,彭镇华.毛竹 *PeMADS*1 基因的克隆及转化拟南芥初步研究[J]. 林业科学,2010,46(10):37 -41.
 - GAO Zhimin, ZHENG Bo, PENG Zhenhua. Isolation of *PeMADS*1 gene from *Phyllostachys edulis* and its transformation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Sci Silv Sin*, 2010, **46**(10): 37 41.
- [14] 樊龙江,郭兴益,马乃训. 竹类植物与水稻等其它禾本科作物的系统进化关系及基因序列组成的比较[J]. 林业科学研究,2006,19(2):165-169.
 - FAN Longjiang, GUO Xingyi, MA Naixun. Comparative study on phylogenetics and sequences composition of bamboos and cereals [J]. For Res, 2006, 19(2): 165 169.
- [15] 王海莲,管延安,张华文,等. 高粱基因组学研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, **28**(3): 549 556. WANG Hailian, GUAN Yan'an, ZHANG Huawen, *et al.* Advances in the study on sorghum genomics [J]. *Gen Appl Biol*, 2009, **28**(3): 549 556.
- [16] LIN Erpei, PENG Huazheng, JIN Qunying, et al. Identification and characterization of two bamboo (*Phyllostachys praecox*) AP1/SQUA-like MADS-box genes during floral transition [J]. *Planta*, 2009, **231**(1): 109 120.
- [17] FERRÁNDIZ C, GU Q, MARTIENSSEN R, et al. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER [J]. Development, 2000, 127(4): 725 734.
- [18] SHANNON S, MEEKS-WAGNER D R. A mutation in the *Arabidopsis TFL*1 gene affects inflorescence meristem development [J]. *Plant Cell*, 1991, **3**(9): 877 892.
- [19] WEIGEL D, ALVAREZ J, SMYTH D R, et al. LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis [J]. Cell, 1992, 69(5): 843 859.
- [20] KIM S L, LEE S, KIM H J, et al. OsMADS51 is a short-day flowering promoter that functions upstream of Ehd1, Os-MADS14, and Hd3a [J]. Plant Physiol, 2007, 145(4): 1484 1494.