

欧洲千里光 *SvAPETALA1* 基因的克隆及功能分析

郝燕敏, 陈柯俐, 冯丽君, 李菲菲, 崔敏龙, 朴春兰

(浙江农林大学 园艺科学学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】花器官发育是影响花观赏价值的重要因素, *AP1* 类基因调控植物花器官的形成。研究菊科 Asteraceae 欧洲千里光 *Senecio vulgaris* 的 *SvAP1* 基因在花器官形成中的重要作用, 旨在探究菊科复杂花序结构产生的调控机制。【方法】以欧洲千里光为材料克隆获得了 *SvAP1* 基因, 通过多序列比对、构建系统进化树、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应、构建超表达载体、组织学染色观察等方法与技术, 对 *SvAP1* 基因进行功能预测与分析。【结果】*SvAP1* 基因开放阅读框长度为 705 bp, 编码 234 个氨基酸。多序列比对与系统进化分析显示: *SvAP1* 基因属于 MADS-box 基因 *AP1* 类亚家族, C 末端具有 paleoAP1 保守基序 (motif)。欧洲千里光组织特异性表达分析表明: *SvAP1* 基因在营养器官和花序中都有表达。转基因龙葵 *Solanum nigrum* 的形态学观察和石蜡切片技术分析显示: 与野生型龙葵相比, 转基因龙葵雌蕊发育异常, 表现为子房膨大且雌蕊状组织增多。【结论】欧洲千里光 *SvAP1* 基因在龙葵中的超表达影响雌蕊发育, 与 ABC 模型中 A 类基因超表达对植物花器官发育造成的影响存在差异, 即转基因龙葵雄蕊无明显变化且雌蕊未转变为萼片状或叶片状器官。这可能与欧洲千里光花器官调节机制和花序结构的复杂性有关。由此可知, 欧洲千里光 *SvAP1* 基因可能作为花器官特征基因在花器官形成中具有重要作用。图 6 表 1 参 35

关键词: 欧洲千里光; 转基因龙葵; *SvAPETALA1*; 花器官发育

中图分类号: S943.2 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)04-0821-09

Cloning and functional analysis of *SvAPETALA1* in *Senecio vulgaris*

HAO Yanmin, CHEN Keli, FENG Lijun, LI Feifei, CUI Minlong, PIAO Chunlan

(College of Horticulture Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Floral organ development is an important factor affecting the ornamental value of flowers, and *APETALA1* (*AP1*) genes regulate the formation of floral organs. This study aims to explore the important role of *SvAP1* gene of *Senecio vulgaris* (Asteraceae) in floral organ formation, so as to reveal the regulatory mechanism of the complex inflorescence structure in Asteraceae. [Method] *SvAP1* gene was cloned from *S. vulgaris*. The function of *SvAP1* gene was predicted and analyzed by multiple sequence alignment, phylogenetic tree construction, qRT-PCR, overexpression vector construction, and histological staining observation. [Result] The open reading frame (ORF) of *SvAP1* gene was 705 bp in length, and encoded 234 amino acids. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that *SvAP1* gene belonged to *AP1* subfamily of MADS-box gene, and the C-terminus had a conserved motif of paleoAP1. Tissue specific expression analysis of *S. vulgaris* showed that *SvAP1* gene was expressed in both vegetative organs and inflorescences. Morphological observation and paraffin section analysis of transgenic *Solanum nigrum* showed that compared with wild *S. nigrum*, the pistil development of transgenic *S. nigrum* was abnormal, which was characterized by enlarged ovary and increased pistil-like tissue. [Conclusion] The overexpression of *SvAP1*

收稿日期: 2021-09-14; 修回日期: 2022-03-15

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划重大项目 (2019BFG02011)

作者简介: 郝燕敏 (ORCID: 0000-0002-0402-6705), 从事植物花器官发育研究。E-mail: 1833620856@qq.com。通信作者: 朴春兰 (ORCID: 0000-0001-9593-8023), 助理研究员, 从事生物技术与分子育种研究。E-mail: chunlan_piao@zafu.edu.cn

gene in *S. nigrum* affects the pistil development, which is different from the effect of over expression of class A gene in ABC model on floral organ development, that is, the stamens of transgenic *S. nigrum* have no obvious changes and the pistils aren't transformed into sepal or leaf-like organs, which may be related to the complexity of the floral organ regulation mechanism and the inflorescence structure of *S. vulgaris*. In conclusion, *SvAP1* gene may play an important role in floral organ formation as a characteristic gene of floral organ. [Ch, 6 fig. 1 tab. 35 ref.]

Key words: *Senecio vulgaris*; transgenic *Solanum nigrum*; *SvAPETALA1*; floral organ development

花发育是植物生长发育阶段的重要组成部分,过程虽然复杂,但十分有序。花发育的整个过程不仅受到光照、温度和湿度等外源因素的影响,而且内源基因的相互作用也是决定开花调节机制的关键性因子^[1-2]。MADS-box 基因是一种植物特有的转录调控因子,在所有器官的形态发生乃至植物整个生命周期中发挥作用,例如:叶形态发生,花和果实发育以及种子发育^[3]。其中, *APETALA1* (*AP1*) 类基因除了作为花分生组织特征基因^[4],还表现为花器官特征基因,通过调控花器官的分化影响花发育^[5-6]。反映这一特性的是 ABC 模型, A 类基因控制萼片和花瓣的形成, B 类基因控制花瓣和雄蕊的形成, C 类基因控制雄蕊和心皮的形成^[7]。*AP1* 基因作为 A 类基因,调控萼片和花瓣的分化,并且与 C 类基因相互拮抗^[8-9]。由于 *AP1* 类基因在花发育调控网络中的重要作用,使得不同物种中 *AP1* 类基因的研究更具有意义与价值。目前,在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[8]、金鱼草 *Antirrhinum majus*^[5] 和番茄 *Solanum lycopersicum*^[10] 等植物中,对 *AP1* 类基因功能进行了较深入的研究,但是在菊科 Asteraceae 植物中的研究还有限。菊科植物具有典型的头状花序^[11],花序外侧舌状花两侧对称,缺乏功能性雄蕊,而中央的管状花则是辐射对称的两性花,形态结构复杂。特殊的花序结构不仅提升了虫媒传粉的效率,也增强了菊科植物的观赏价值^[12]。近年来,对于菊科植物,例如菊花 *Chrysanthemum morifolium*^[13]、非洲菊 *Gerbera hybrida*^[14] 和向日葵 *Helianthus annuus*^[15] 等的研究表明:复杂的头状花序对于研究花器官发育的遗传调控具有重要意义。因此,本研究克隆了菊科欧洲千里光 *Senecio vulgaris* 的 *SvAP1* 基因。由于菊科植物遗传转化体系较为复杂、转化周期长且转化效率低,故将 *SvAP1* 基因异源转化茄科 Solanaceae 龙葵 *Solanum nigrum* 中进行功能预测与分析,旨在为菊科植物 *AP1* 类基因的分子机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

将欧洲千里光和龙葵种子均在 25 ℃、光周期 16 h (白天)/8 h (黑夜) 条件下播种于人工气候室。取欧洲千里光和龙葵的不同组织样品,包括新鲜的根、茎、叶和花完全展开时期的花序等,所有样品标记分装后置于液氮中速冻,保存于-80 ℃ 备用。

1.2 基因克隆

取欧洲千里光花完全展开时期约 0.1 g 的花序为材料,利用 Eastep® Super 总 RNA 提取试剂盒(普洛麦格生物产品有限公司,上海)提取总 RNA,并用质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳和超微量紫外分光光度计 (NanoDrop2000, 赛默飞世尔科技公司,美国) 对 RNA 样品的完整性和浓度进行检测。利用反转录试剂盒 *EasyScript*® First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (全式金生物技术有限公司,北京),参照说明书合成 cDNA,产物储存于-20 ℃ 备用。

将欧洲千里光早期头状花序样品材料送至上海翰宇生物科技有限公司获得转录组数据。根据欧洲千里光转录组数据分析得到 *SvAP1* 基因序列。利用美国国家生物技术信息中心 (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Primer-BLAST 设计特异性引物,并在正向和反向引物中分别添加 *Xba* I 和 *Sac* I 限制性内切酶酶切位点及保护碱基,特异性引物 *SvAP1*-F 和 *SvAP1*-R 由杭州有康生物科技有限公司合成(表 1)。以欧洲千里光 cDNA 为模板,进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增。PCR 扩增体系为: 97 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 40 s, 59 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 次循环; 72 ℃ 总延伸 10 min。PCR 扩增片段经切胶回收纯化后连接至 pEASY-T1 Simple 载体 (全式金生物技术有限公司,北京),并转化大肠埃希菌

Escherichia coli DH5 α 感受态细胞中 (唯地生物技术有限公司, 上海), 根据蓝白斑筛选以及菌落 PCR 验证, 测序获得目的基因。

1.3 序列比对及系统进化树构建

将目的基因在 NCBI 网站上进行 blastx 检索, 下载各物种中与 *SvAP1* 同源性较高基因氨基酸 FASTA 格式文件; 利用 ClustalX(2.1)^[16] 及 MEGA-X(10.1.8)^[17] 软件, 采用邻接法 (neighbor-joining, NJ), 校验参数 Bootstrap 为 1 000 次, 进行多序列比对以及系统进化树的构建, 并用 GeneDoc(2.7.0) 软件对多序列比对进行修饰美化。

1.4 组织特异性表达分析

分别提取欧洲千里光的不同组织 (根、茎、叶和花序) 的 RNA 并反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。根据引物设计原则设计特异引物 *qSvAP1-F*、*qSvAP1-R*, 内参基因引物为 *Sv18s-F*、*Sv18s-R* (表 1), 参照 qPCR 试剂盒 *TransStart*[®] Tip Green qPCR SuperMix (全式金生物技术有限公司, 北京) 说明书, 反应体系为: cDNA (稀释 10 倍) 1 μ L, 2 \times *TransStart*[®] Tip Green qPCR SuperMix 5 μ L, 上下游引物 (10 μ m \cdot L⁻¹) 各 0.2 μ L, 双蒸水 3.6 μ L, 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 共进行 40 个循环。试验设置 3 个重复反应, 并采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算各部位 *SvAP1* 的相对表达量, 通过 SPSS 19.0^[18] 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 默认置信区间为 95%。

1.5 超表达载体的构建及农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导转化龙葵

应用 *Xba* I 和 *Sac* I 限制性内切酶酶切 pBI121 超表达载体与 pEASY-T1Simple-*SvAP1* 重组质粒, 将酶切后的目的片段与载体片段进行酶连, 将酶连产物转化至大肠埃希菌感受态 DH5 α 中, 挑选单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 提取质粒并进行单双酶切检验后转化到农杆菌 GV3101 中, PCR 鉴定获得阳性菌落, 然后采用农杆菌介导的叶盘法进行龙葵的遗传转化。

表 1 基因克隆与分子鉴定所用引物序列

Table 1 Primer sequences for gene cloning and molecular identification

引物名称	正向(反向)引物序列(5'→3')	引物名称	正向(反向)引物序列(5'→3')
<i>SvAP1-F</i>	AATCTAGAAATGGGGCGGGGAAGGGTGA	<i>NPT II-R</i>	GTGGTCGAATGGGCAGGTAG
<i>SvAP1-R</i>	AAGAGCTCTTACTTGTTCATGAGATGAAT	<i>qSvAP1-F</i>	GTTGTGTGATGCTGACGTGG
<i>Sn18s-F</i>	CGCGCGCTACACTGATGTATTCAA	<i>qSvAP1-R</i>	GCGTGTCCAGAGTCCAGTT
<i>Sn18s-R</i>	TACAAAGGGCAGGGACGTAGTCAA	<i>Sv18s-F</i>	ATAGCAGAACGACCTGTGAA
<i>NPT II-F</i>	AGATGGATTGCACGCAGGTTCC	<i>Sv18s-R</i>	GAAGCAAGATCCAACGCAAT

说明: 下划线标记处为特异性引物限制性内切酶酶切位点

1.6 转基因龙葵筛选及分子鉴定

利用特异性引物 *SvAP1-F*、*SvAP1-R* (表 1) 进行 PCR 以及 RT-PCR 反应, 对转基因龙葵进行进一步的鉴定及表达分析。采用十二烷基苯磺酸钠 (SDS) 法提取野生型及转基因龙葵基因组 DNA, 使用卡那霉素引物 *NPT II-F*、*NPT II-R* 及特异性引物 *SvAP1-F*、*SvAP1-R* (表 1) 进行 PCR 检测; 提取野生型及转基因龙葵幼嫩叶片的 RNA, 反转录后得到 cDNA。以此为模板, 使用内参引物 *Sn18s-F*、*Sn18s-R* 以及特异性引物 *SvAP1-F*、*SvAP1-R* (表 1), 进行半定量 RT-PCR 反应。反应体系为: 97 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。

1.7 转基因龙葵雌蕊组织学染色观察

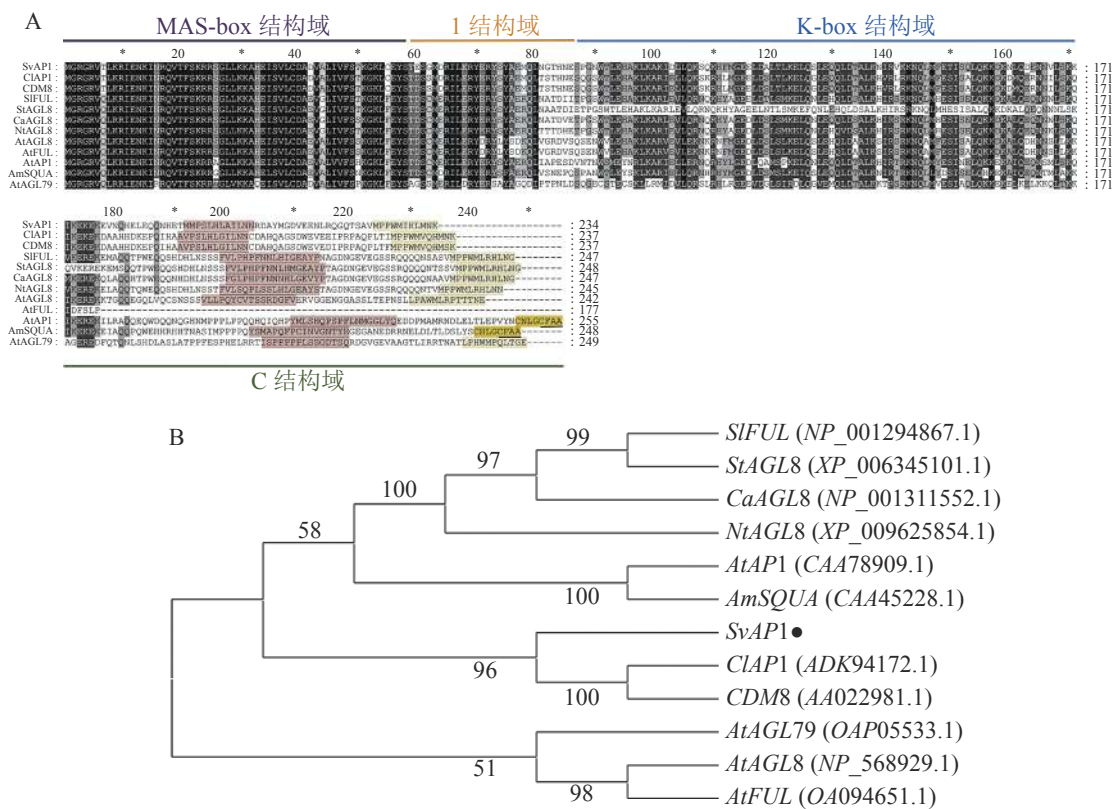
解剖盛花期野生型及转基因龙葵花器官, 以雌蕊为材料, 进行纵向石蜡切片, 探究其内部结构的变化。石蜡切片制作参照祁宏英等^[19] 的方法。主要步骤包括: ①材料固定。利用真空泵将材料中的气体去除后将其放入 FAA 固定液 (无水乙醇、冰醋酸、甲醛和双蒸水体积比为 10:1:2:7) 固定 24.0 h 以上。②脱水、透明。固定材料取出后用体积分数为 50% 乙醇溶液冲洗, 然后在一系列由低到高体积分数的乙醇溶液中逐级脱水, 每级 1.5 h, 纯浓度 1.0 h。将脱尽水的材料按照不同比例的无水乙醇和二甲苯逐级过渡到纯二甲苯溶液, 使得材料中的无水乙醇被二甲苯替代达到透明的效果, 每级 1.0 h。③浸蜡。二甲苯后加入少量碎蜡, 放入 45 $^{\circ}$ C 恒温箱过夜, 次日早上继续加入碎蜡, 6.0 h 后移至 60 $^{\circ}$ C 恒温箱, 换

入熔融的纯蜡，之后每日早晚各换入1次纯蜡，让石蜡慢慢渗透到材料中。换2~3 d效果较好。④包埋、切片、粘片。将融化的石蜡迅速加入包埋框中，放入材料。调整轮转式切片机(RM2235，徕卡显微系统有限公司，上海)，切片厚度为8 μm，将切好的蜡带依次放入载玻片上，置于42 ℃恒温箱中烘干。⑤海氏铁矾-苏木精染色法染色及观察。经过脱蜡后采用海氏铁矾-苏木精染色法进行染色，并脱水、透明、树脂封片，用显微镜(EX20，舜宇仪器有限公司，宁波)观察。

2 结果与分析

2.1 基因克隆及序列同源性分析

以欧洲千里光的cDNA为模板，经PCR扩增并对扩增片段进行测序，测序结果显示：*SvAP1*基因开放阅读框(ORF)区由705 bp组成，编码234个氨基酸，与转录组数据相一致。从NCBI-blastx筛选出拟南芥、金鱼草、马铃薯 *Solanum tuberosum* 和甘菊 *Chrysanthemum lavandulifolium* 等植物中 *SvAP1* 的同源基因序列，进行同源性分析。结果表明：欧洲千里光 *SvAP1* 与甘菊 *ClAP1* (ADK94172.1) 和菊花 *CDM8* (AAO22981.1) 同源性最高，分别为76.05%和75.21%。进一步分析发现：*SvAP1*具有典型的MIKC型MADS-box基因结构，结构域由MADS-box (M)、Intervening (I)、K-box (K)和C-terminal (C)等4个部分组成。在C末端具有真双子叶植物 *AP1*类基因2个较短且相对保守的基序(motif)，其中之一为paleoAPETALA1 (paleoAP1)蛋白基序，另一个为FUL蛋白基序(图1A)，与 *ClAP1* 和 *CDM8* 保持一致。利用MEGA-X软件构建欧洲千里光 *SvAP1* 氨基酸序列的系统进化树(图1B)，结果显示：*SvAP1*与甘菊 *ClAP1*、菊花 *CDM8*、番茄 *SIFRUITFULLFUL* (*SIFUL*) (NP_001294867.1)、马铃薯 *StAGL8* (XP_006345101.1)、辣椒 *Capsicum annuum CaAGL8* (NP_001311552.1)、绒毛烟草 *Nicotiana tomentosiformis NtAGL8* (XP_009625854.1)、拟南芥 *AP1* (CAA78909.1) 和金鱼草 *SQUAMOSIA* (*SQUA*) (CAA45228.1) 处于同一个分支中，亲缘关系接近。



A. 欧洲千里光 *SvAP1* 氨基酸序列的比对。A 图中粉色阴影为典型 FUL 基序；浅黄色阴影为 paleoAP1 基序；亮黄色阴影为 euAP1 基序；黑色下划线为 CFAA 基序。B. 欧洲千里光与其他物种 *AP1* 类基因系统进化树分析，黑色圆状物所标注基因为目的基因

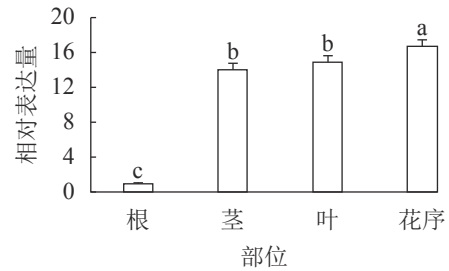
图 1 欧洲千里光 *SvAP1* 氨基酸多序列比对以及系统进化树分析
 Figure 1 Amino acid sequence alignment and phylogenetic tree analysis of *SvAP1* in *S. vulgaris*

2.2 组织特异性表达分析

通过 qRT-PCR 对欧洲千里光不同组织部位的表达水平进行分析。结果表明 (图 2): *SvAP1* 在欧洲千里光茎、叶和花序中都有表达, 其中 *SvAP1* 在花序中的表达水平高于在茎和叶。因此, 初步推测 *SvAP1* 在营养生长和生殖生长中可能都起到一定的调控作用。

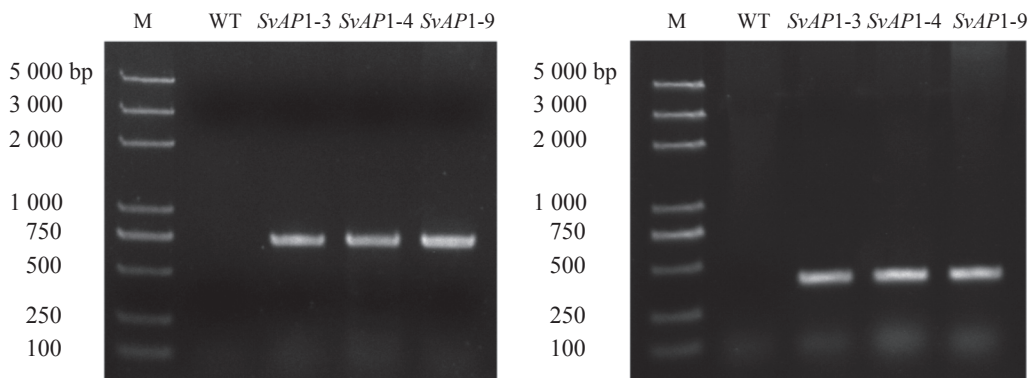
2.3 转基因龙葵筛选、鉴定及形态学观察

为了研究 *SvAP1* 的功能, 通过农杆菌介导的遗传转化获得的 9 个独立抗性植株中, 选取表型变化明显的 3 株抗性植株, 提取 DNA 后进行目的基因和卡那霉素抗性基因的双重扩增。结果显示: 扩增的大小均与预期相符合 (图 3A 和图 3B), 表明筛选出的 3 株抗性植株为转基因抗性植株。以野生型植株 *SvAP1* 表达为对照, 对转基因植株中 *SvAP1* 表达进行 RT-PCR 分析, 结果显示 (图 4A): 相比于对照植株, 3 株转基因抗性植株中的 *SvAP1* 表达量都出现了不同程度的升高。其中, *SvAP1*-3 转基因龙葵中 *SvAP1* 表达量最低, *SvAP1*-4 转基因龙葵 *SvAP1* 表达量较高, *SvAP1*-9 转基因龙葵 *SvAP1* 表达量最高。由此可知: *SvAP1* 在转基因抗性植株中得到了有效表达, 可进行下一步的表型分析。观察筛选到的 3 株表型明显的转基因抗性植株发现: 与同一时期野生型龙葵相比, 转基因龙葵的茎和叶无明显变化, 而花器官发育异常且果实数目减少 (图 4B)。



不同字母代表不同部位间基因表达差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 *SvAP1* 在欧洲千里光不同部位的相对表达
Figure 2 Relative expression of *SvAP1* in different tissues of *S. vulgaris*



A. 目的基因 PCR 扩增鉴定

B. 卡那霉素抗性基因 PCR 扩增鉴定

M. 标准分子量 DL2000Plus; WT. 野生型龙葵; *SvAP1*-3、*SvAP1*-4、*SvAP1*-9. 不同株系转基因龙葵

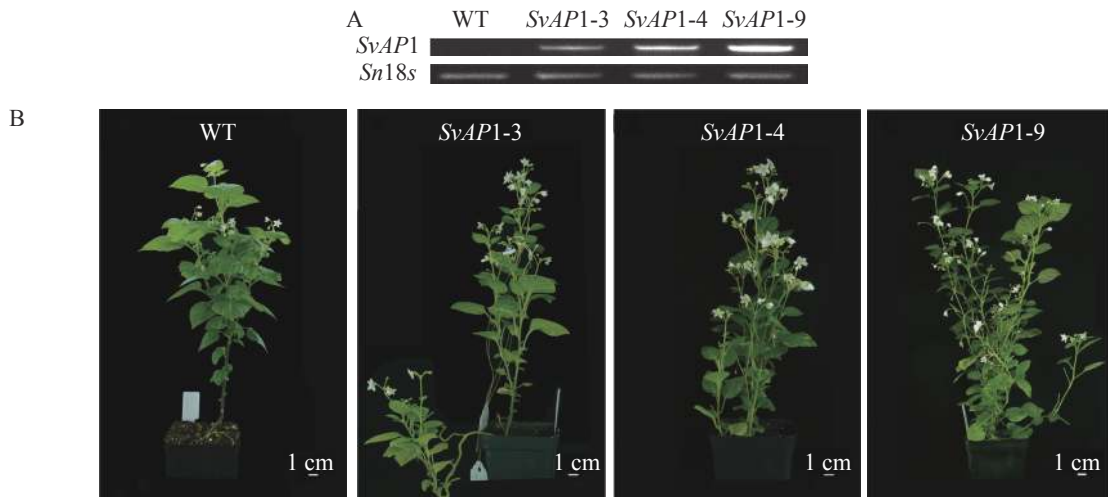
图 3 野生型及转基因龙葵 PCR 检测

Figure 3 PCR detection of wild type *S. nigrum* and different transgenic lines

正常的野生型龙葵花序由外到内依次为 5 个萼片、5 个花瓣、5 个雄蕊以及 1 个雌蕊, 雌蕊被雄蕊包裹于最内轮, 仅柱头部分可见 (图 5A)。形态学观察发现, 转基因龙葵雌蕊发育异常, 其中弱表型 *SvAP1*-3 转基因龙葵花序与野生型无明显差异 (图 5B); 中表型 *SvAP1*-4 转基因龙葵子房明显膨大, 将雄蕊挤压至花瓣一侧, 且雌蕊花柱基部与子房顶部连接处膨胀 (图 5C); 强表型 *SvAP1*-9 转基因龙葵雄蕊被膨大的子房挤压至向花瓣方向倾斜生长, 雌蕊状组织增多 (图 5D)。

2.4 转基因龙葵雌蕊组织学染色观察

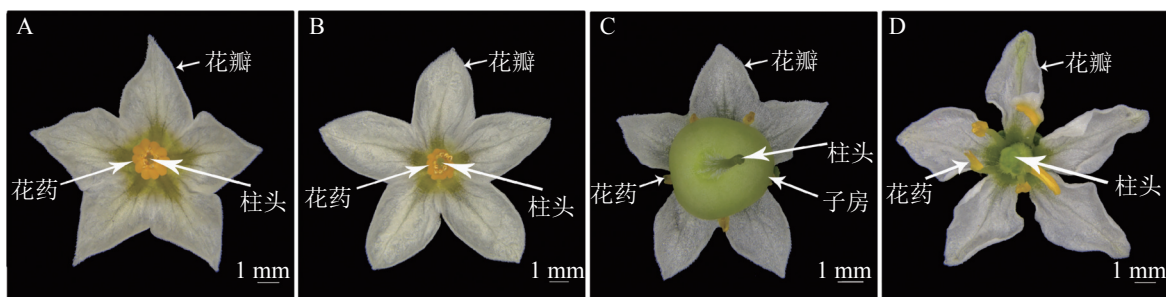
为了进一步探究 *SvAP1* 的异位表达对雌蕊发育的影响, 对野生型及强表型 *SvAP1*-9 转基因龙葵花器官进行解剖, 并对雌蕊进行显微镜观察发现: 野生型龙葵雌蕊包括柱头、花柱和子房, 花柱中部以下被白色绒毛, 基部与卵状子房相连 (图 6A); 强表型 *SvAP1*-9 转基因龙葵花柱数目增多, 子房膨大且有心皮组织增生冲破子房壁暴露于子房顶部, 外侧有花柱包裹 (图 6B)。为了分析转基因龙葵雌蕊内部结构的变化, 对野生型以及强表型转基因龙葵的雌蕊进行纵向石蜡切片观察, 结果显示: 野生型龙葵花柱基部与胎座相连, 两者基本位于子房中轴线处, 卵圆状胚珠经珠柄与胎座相连相对平均分布于胎座两侧 (图 6C); 强表型 *SvAP1*-9 转基因龙葵子房膨大, 子房顶部增生的心皮组织发育较为完全。进一步分析强表型



A. 野生型和转基因龙葵 RT-PCR 分析; B. 野生型和转基因龙葵整体植株观察。WT. 野生型龙葵; *SvAP1-3*、*SvAP1-4*、*SvAP1-9*. 不同株系转基因龙葵, *Sn18s*. 龙葵管家基因

图 4 野生型和转基因龙葵 RT-PCR 及表型分析

Figure 4 RT-PCR and phenotypes analysis of wild type *S. nigrum* and different transgenic lines



A. 野生型龙葵花序; B. *SvAP1-3* 转基因龙葵花序; C. *SvAP1-4* 转基因龙葵花序; D. *SvAP1-9* 转基因龙葵花序

图 5 野生型及转基因龙葵花序

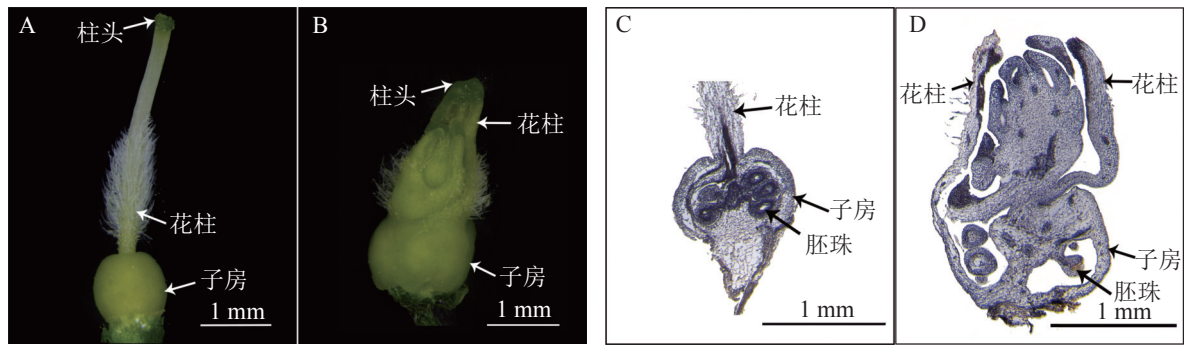
Figure 5 Inflorescence in wild type *S. nigrum* and different transgenic lines

SvAP1-9 转基因龙葵增生的心皮组织细胞结构: 中心部分与子房胎座组织细胞结构相类似, 呈不规则卵圆形紧密分布; 靠近外缘部分细胞明显变小且更加紧凑呈层状排列, 与子房壁细胞结构相类似(图 6D)。由此推测, 强表型 *SvAP1-9* 转基因龙葵增生的心皮组织形成了类似子房的结构。综上所述推测: *SvAP1* 在龙葵中的异位表达对雌蕊发育产生影响, 可能造成子房膨大且花柱与子房数目增多。

3 讨论

花是植物的生殖器官, 被认为是植物进化中重要的形态创新, 花器官的发育对于花形态的建成具有重要作用, 而且受许多调控因子的影响^[20]。菊科独特的头状花序结构使其成为研究植物花器官发育的重要材料。MADS-box 家族基因在调控花分生组织和花器官发育中起着重要作用, 因此其在菊科植物头状花序形成中的调节作用一直是近年来的研究热点^[21]。其中, *AP1* 类基因是花发育调节机制的调控枢纽, 作为花器官特征基因在菊花^[13]和碎米荠 *Cardamine hirsute*^[22]等植物中被研究报道。

真双子叶植物 *AP1* 类基因分为 eu*AP1*、eu*FRUITFULL* (eu*FUL*) 和 *AGAMOUS-like79* (*AGL79*) 等 3 个亚支, 其中 eu*AP1* 分支基因具有 eu*AP1* 蛋白基序, eu*FUL* 与 *AGL79* 分支基因具有 paleo*AP1* 蛋白基序^[23]。本研究所获得的欧洲千里光 *SvAP1* 基因在 C 末端段具有 paleo*AP1* 蛋白基序, 且系统进化关系分析表明: *SvAP1* 与 *CIAP1*、*CDM8*、*SIFUL*、*StAGL8*、*CaAGL8*、*NtAGL8*、*AP1* 和 *SQUA* 位于同一进化枝, 其中与 *CIAP1* 和 *CDM8* 同源性最高。有报道指出: *CDM8*^[13]、*SIFUL*^[24]、*CaAGL8*^[25] 和 *NtAGL8*^[26] 均属于 eu*FUL* 类 *AP1* 分支, *AP1*^[8] 和 *SQUA*^[5] 属于 eu*AP1* 类 *AP1* 分支。综上所述可推测: *SvAP1* 属于 *AP1* 类基因, 即 *SQUA* 亚家族。LITT 等^[23] 认为: 多数具有 paleo*AP1* 蛋白基序的基因表达模式比具有 eu*AP1* 蛋白基序的基因更为广泛, 存在于营养组织和生殖组织, 包括茎、叶、花分生组织、所有花器官



A. 野生型龙葵雌蕊; B. *SvAP1-9* 转基因龙葵雌蕊; C. 野生型龙葵雌蕊石蜡切片; D. *SvAP1-9* 转基因龙葵雌蕊石蜡切片

图 6 野生型和转基因龙葵雌蕊及其石蜡切片

Figure 6 Wild type *S. nigrum* and different transgenic lines pistil and their paraffin section

和果实等。甘菊 *CLAP1* 研究较少，关于同源性较高的 *CDM8*^[13] 研究表明：其在营养器官和生殖器官中都可以检测到表达，主要在茎、叶和花中表达，参与营养生长到生殖生长的调控。为了进一步研究 *SvAP1* 是否具有类似的表达模式，对欧洲千里光进行组织特异性表达分析。qRT-PCR 反应显示：*SvAP1* 基因表达模式比拟南芥 *AP1* 更为广泛，在欧洲千里光茎、叶和花中都可以检测到 *SvAP1* 表达，与 *CDM8* 相类似，可能对营养生长与生殖生长的发育都起到了调控作用。

BERBEL 等^[27] 认为：*AP1* 基因的“CFAA”基序并非是判断 *AP1* 类基因功能的决定性依据，不同的 C 端基序蛋白也可以发挥 *AP1* 基因相类似功能，“CFAA”只是增强了 *AP1* 类基因的活性，在多个物种中都有被报道，例如豌豆 *Pisum sativum* 的 *PEAM4*^[27]、大豆 *Glycine max* 的 *GmAP1*^[28]、百合 *Lilium longiflorum* 的 *LMADS6*、*LMADS7*^[29] 和绒毛烟草的 *NtAGL8*^[26] 等。因此，具有 paleo*AP1* 蛋白基序的基因也可能作为花器官特征基因影响花器官的发育。例如：LI 等^[30] 发现：从红花玉兰 *Magnolia wufengensis* 中分离出的 *MawuAP1* 影响心皮及果实发育，主要在心皮的膨大中起作用，从而影响果实的发育；孙迎坤等^[31] 发现：山茶花 *Camellia japonica* 的 *CjAPL1* 转化拟南芥的阳性植株花器官发育异常，花柱和雄蕊数增加；邓柠檬等^[32] 发现：金钗石斛 *Dendrobium nobile* 的 *DnAPL1* 在转基因拟南芥中的表达会导致花器官数目增加，且萼片和花瓣形状发生变化。本研究发现：转基因龙葵花雌蕊发育异常，在强表型中可以观察到子房膨大且雌蕊状组织增多。因此推测，*SvAP1* 在花器官形成中具有重要作用，且与 ABC 模型中 A 类基因超表达对于花器官发育造成的影响有所不同。在 ABC 模型中，A 类基因的超表达会抑制 C 类基因的表达，从而对雄蕊与雌蕊的发育产生影响：雄蕊向花瓣同源异形转化且雌蕊转变为萼片状或叶片状器官。在本研究中，*SvAP1* 在龙葵中的超表达同样影响了雌蕊的发育，但呈现出相对不同的表型，且雄蕊的发育无明显变化，这可能与欧洲千里光花器官调控机制与花序结构的复杂性有关。雌蕊的异常发育导致果实发育受到影响，在转基因龙葵中果实数目与同一时期野生型龙葵相比明显变少。

开花植物花调控网络十分庞大，不同基因之间存在较为复杂的相互作用关系。研究表明：在拟南芥中 *AP1* 与 *SEPALLATA3 (SEP3)*^[32]、*AGAMOUS (AG)*^[21]、*FRUITFULL (FUL)*^[33] 和 *UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)*^[34] 等多种花器官发育相关基因存在相互作用，其中部分基因与心皮发育的调控有关。有研究报道：*AP1* 类基因的异位表达可能对内源基因的表达产生了抑制或者促进作用，例如：毛白杨 *Populus tomentosa* 的 *AtAP1M3*^[35] 和山茶花的 *CjAPL1*^[31] 等。因此推测，*SvAP1* 雌蕊发育异常也可能与基因之间的相互作用有关。为了进一步验证 *SvAP1* 的异位表达是否对于其他内源基因的表达产生了影响，从而共同导致雌蕊的变化，还需要进行转基因龙葵相关内源基因的表达分析。

本研究通过异源转化龙葵，初步预测了菊科欧洲千里光 *AP1* 类基因 *SvAP1* 作为花器官特征基因对花器官发育的影响。欧洲千里光组织特异性表达分析显示：*SvAP1* 可能参与了营养生长与生殖生长的调控，其在龙葵中的异位表达却对龙葵的营养生长并没有起到明显的作用，推测这可能与物种之间的差异性有关，因此，为了深入探究 *SvAP1* 基因在欧洲千里光中的作用机制，需要后续研究进一步验证。

4 参考文献

[1] FORNARA F, de MONTAIGU A, COUPLAND G. SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis*[J/OL]. *Cell*, 2010,

- 141(3): e551 [2021-08-10]. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.024.
- [2] WILS C R, KAUFMANN K. Gene-regulatory networks controlling inflorescence and flower development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2017, **1860**(1): 95 – 105.
- [3] SMACZNIAK C, IMMINK R G, ANGENENT G C, *et al.* Developmental and evolutionary diversity of plant MADS domain factors: insights from recent studies [J]. *Development*, 2012, **139**(17): 3081 – 3098.
- [4] CHEN Liyu, NAN Haiyang, KONG Lingping, *et al.* Soybean *AP1* homologs control flowering time and plant height [J]. *J Integr Plant Biol*, 2020, **62**(12): 1868 – 1879.
- [5] HUIJSER P, KLEIN J, LONNIG W E, *et al.* Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus* [J]. *EMBO J*, 1992, **11**(4): 1239 – 1249.
- [6] HE Chunmei, LIU Xuncheng, TEIXEIRA D S J A, *et al.* Transcriptome sequencing and metabolite profiling analyses provide comprehensive insight into molecular mechanisms of flower development in *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) [J]. *Plant Mol Biol*, 2020, **104**(4/5): 529 – 548.
- [7] WANG Lulu, LI Yi, JIN Xingyue, *et al.* Floral transcriptomes reveal gene networks in pineapple floral growth and fruit development [J/OL]. *Commun Biol*, 2020, **3**(1): 500 [2021-08-10]. doi: 10.1038/s42003-020-01235-2.
- [8] MANDEL M A, GUSTAFSON-BROWN C, SAVIDGE B, *et al.* Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* [J]. *Nature*, 1992, **360**(6401): 273 – 277.
- [9] LIU Zhixiong, FEI Yue, ZHANG Kebing, *et al.* Ectopic expression of a *Fagopyrum esculentum* *APETALA1* ortholog only rescues sepal development in *Arabidopsis ap1* mutant [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(8): 2021 [2021-08-10]. doi: 10.3390/ijms20082021.
- [10] YUSTE-LISBONA F J, QUINET M, FERNÁNDEZ-LOZANO A, *et al.* Characterization of vegetative inflorescence (*mc-vin*) mutant provides new insight into the role of *MACROCALYX* in regulating inflorescence development of tomato [J/OL]. *Sci Rep*, 2006, **6**: 18796 [2021-08-10]. doi: 10.1038/srep18796.
- [11] BELLO M A, CUBAS P, ÁLVAREZ I, *et al.* Evolution and expression patterns of *CYC/TB1* genes in *Anacyclus*: phylogenetic insights for floral symmetry genes in Asteraceae [J/OL]. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 589 [2021-08-10]. doi: 10.3389/fpls.2017.00589.
- [12] 陈柯俐, 朴春兰, 郝燕敏, 等. 欧洲千里光 *CYCLOIDEA*(*CYC*) 类 *SvRAY1* 基因的克隆及功能分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2021, **38**(6): 1153 – 1160.
CHEN Keli, PIAO Chunlan, HAO Yanmin, *et al.* Cloning and functional analysis of *CYCLOIDEA*(*CYC*)-like *SvRAY1* gene from *Senecio vulgaris* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2021, **38**(6): 1153 – 1160.
- [13] SHCHENNIKOVA A V, SHULGA O A, IMMINK R, *et al.* Identification and characterization of four chrysanthemum MADS-box genes, belonging to the *APETALA1/FRUITFULL* and *SEPALLATA3* subfamilies [J]. *Plant Physiol*, 2004, **134**(4): 1632 – 1641.
- [14] RUOKOLAINEN S, PENG Yan, BROHOLM S K, *et al.* Characterization of *SQUAMOSA*-like genes in *Gerbera hybrida*, including one involved in reproductive transition [J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2010, **10**: 128 [2021-08-10]. doi:10.1186/1471-2229-10-128.
- [15] SHCHENNIKOVA A V, SHULGA O A, SKRYABIN K G. Ectopic expression of the homeotic MADS-box gene *HAM31*(*Helianthus annuus* L.) in transgenic plants *Nicotiana tabacum* L. affects the gynoecium identity [J]. *Dokl Biochem Biophys*, 2018, **483**(1): 363 – 368.
- [16] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, **23**(21): 2947 – 2948.
- [17] KUMAR S, STECHER G, LI M, *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, **35**(6): 1547 – 1549.
- [18] WANG Enli, ENGEL T. SPASS: a generic process-oriented crop model with versatile windows interfaces [J]. *Environ Model Software*, 2000, **15**(2): 179 – 188.
- [19] 祁宏英, 姚美玲, 徐洪国. 龙葵花芽分化形态解剖学研究 [J]. 北方园艺, 2017(9): 135 – 138.
QI Hongying, YAO Meiling, XU Hongguo. Anatomical and morphological characteristics of development of flower bud differentiation in *Solanum nigrum* L. [J]. *Northern Hortic*, 2017(9): 135 – 138.
- [20] LITT A, KRAMER E M. The ABC model and the diversification of floral organ identity [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, **21**(1): 129 – 137.

- [21] ZHANG Chunling, WEI Ludan, WANG Wenjing, *et al.* Identification, characterization and functional analysis of *AGAMOUS* subfamily genes associated with floral organs and seed development in Marigold (*Tagetes erecta*) [J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2020, **20**(1): 439 [2021-08-10]. doi:10.1186/s12870-020-02644-5.
- [22] MONNIAUX M, MCKIM S M, CARTOLANO M, *et al.* Conservation vs divergence in *LEAFY* and *APETALA1* functions between *Arabidopsis thaliana* and *Cardamine hirsuta* [J]. *New Phytol*, 2017, **216**(2): 549 – 561.
- [23] LITT A, IRISH V F. Duplication and diversification in the *APETALA1/FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: implications for the evolution of floral development [J]. *Genetics*, 2003, **165**(2): 821 – 833.
- [24] SHIMA Y, FUJISAWA M, KITAGAWA M, *et al.* Tomato *FRUITFULL* homologs regulate fruit ripening via ethylene biosynthesis [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, **78**(2): 231 – 237.
- [25] SUNG S K, MOON Y H, CHUNG J E, *et al.* Characterization of MADS box genes from hot pepper [J]. *Mol Cells*, 2001, **11**(3): 352 – 359.
- [26] JANG S, AN K, LEE S, *et al.* Characterization of tobacco MADS-box genes involved in floral initiation [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, **43**(2): 230 – 238.
- [27] BERBEL A, NAVARRO C, FERRÁNDIZ C, *et al.* Analysis of *PEAM4*, the pea *AP1* functional homologue, supports a model for *AP1-like* genes controlling both floral meristem and floral organ identity in different plant species [J]. *Plant J*, 2001, **25**(4): 441 – 451.
- [28] CHI Yingjun, HUANG Fang, LIU Haicui, *et al.* An *APETALA1-like* gene of soybean regulates flowering time and specifies floral organs [J]. *J Plant Physiol*, 2011, **168**(18): 2251 – 2259.
- [29] CHEN Mingkun, LIN I C, YANG C H. Functional analysis of three lily (*Lilium longiflorum*) *APETALA1-like* MADS box genes in regulating floral transition and formation [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, **49**(5): 704 – 717.
- [30] LI Cunjie, CHEN Liyuan, FAN Xiaoning, *et al.* *MawuAP1* promotes flowering and fruit development in the basal angiosperm *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae) [J]. *Tree Physiol*, 2020, **40**(9): 1247 – 1259.
- [31] 孙迎坤, 李纪元, 殷恒福. 山茶花 *CjAPL1* 基因正义表达载体的构建及对拟南芥的转化分析 [J]. 园艺学报, 2014, **41**(4): 789 – 796.
- SUN Yingkun, LI Jiyuan, YIN Hengfu. Sense expression vector construction and analysis of transgenic *Arabidopsis thaliana* with *CjAPL1* gene from *Camellia japonica* [J]. *Acta Horti Sin*, 2014, **41**(4): 789 – 796.
- [32] 邓柠檬, 高兰, 王晨, 等. 金钗石斛 *AP1/FUL* 亚家族基因 *DnAPL1* 的克隆和功能分析 [J]. 植物生理学报, 2020, **56**(9): 1854 – 1862.
- DENG Ningmeng, GAO Lan, WANG Chen, *et al.* Isolation and functional characterization of *DnAPL1*, an *AP1/FUL* subfamily member from *Dendrobium nobile* [J]. *Plant Physiol Commun*, 2020, **56**(9): 1854 – 1862.
- [33] MOREL P, CHAMBRIER P, BOLTZ V, *et al.* Divergent functional diversification patterns in the SEP/AGL6/AP1 MADS-box transcription factor superclade [J]. *Plant Cell*, 2019, **31**(12): 3033 – 3056.
- [34] RISSEUW E, VENGLAT P, XIANG Daoquan, *et al.* An activated form of UFO alters leaf development and produces ectopic floral and inflorescence meristems [J/OL]. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e83807 [2021-09-01]. doi: 10.1371/journal.pone.0083807.
- [35] CHEN Zhong, YE Meixia, SU Xiaoxing, *et al.* Overexpression of *AtAP1M3* regulates flowering time and floral development in *Arabidopsis* and effects key flowering-related genes in poplar [J]. *Transgenic Res*, 2015, **24**(4): 705 – 715.