

# 苹果 *LEAFY* 同源基因的 cDNA 克隆与表达分析

曹秋芬<sup>1</sup> 和田雅人<sup>2</sup> 孟玉平<sup>1</sup> 黄 静<sup>1</sup> 孙 毅<sup>1</sup> 王果萍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 山西省农业科学院生物技术研究中心, 太原 030031; <sup>2</sup> 日本国农业技术研究机构果树研究所, 盛岗市 020-0123)

**摘 要:** 从苹果的果台枝顶芽中克隆了两个长约 1.4 kb 的 cDNA 片段, 分别定名为 *AFL1* 和 *AFL2*。它们的碱基序列在编码区有 90% 的同源性, 但在 3' 末端非编码区仅有约 60% 的同源性。它们表达的肽链氨基酸序列与小叶杨、大豆、矮牵牛等有 70% 以上的同源性, 与番茄、金鱼草、拟南芥有近 70% 的同源性, 证明它们是 *LFY* 的同源基因。RT-PCR 的结果表明, 生长期 *AFL2* 在萼片、子房、根、茎、叶以及果台枝顶芽中都有表达, 而 *AFL1* 只在果台枝顶芽中表达; 在不同发育时期的果台枝顶芽中, *AFL1* 在顶芽停止营养生长转向生殖生长以后才清晰表达, 而 *AFL2* 在生长期 6~10 月都有表达。因此认为苹果中的这两个 *LFY* 同源基因虽有共同的起源, 但是在功能上存在差异, 在花和营养组织的发育中起不同的作用。DNA 印迹分析表明, 在苹果属及近缘的梨属植物中 *LFY* 同源基因是多拷贝的。

**关键词:** 苹果; 基因; *LEAFY*; 克隆; 表达

**中图分类号:** S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 03-0267-05

近几年对拟南芥的研究证明, 在成花过程中有几个关键的基因控制着花的发育, 其中之一的 *LEAFY* (*LFY*) 是从营养生长向生殖生长转变时必需的<sup>[1]</sup>。将 35S 启动子下的 *LFY* 导入拟南芥使其超量表达, 会引起提早成花, 并使所有的侧枝转变成单花<sup>[2]</sup>。*LFY* 的这种活性在其他植物, 如小叶杨、柑橘中也得到了类似的结果, 即促进了成花和产生异位花<sup>[3,4]</sup>。苹果“童期”较长, 育成一个品种要耗时 10~20 年, 能否使苹果自发提早开花一直是果树研究上的一大课题。本研究试图克隆苹果中 *LFY* 的同源基因, 并分析它在不同组织、器官以及不同发育时期的表达模式, 通过模式植物拟南芥解析它在植物体内的生理功能, 为有效提早苹果开花提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试材料采自日本国农业技术研究机构果树研究所苹果研究部 (日本盛岗市) 成年大树。苹果属 (*Malus* Mill.) 选用苹果种 (*Malus pumila* Mill.) 栽培品种‘红玉’ (Jonathan) 和野生种圆叶海棠 [*Malus prunifolia* (Willd.) Borkh.]; 梨属 (*Pyrus* L.) 选用秋子梨 (*Pyrus ussuriensis* Maxim) 栽培品种‘红梨’。采集上述植物所需组织、器官样本, 用液态氮速冻后, 保存在 -80℃ 条件下。

### 1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的克隆

生长期 6~8 月每隔 2 周采集果台枝 (大部分果台枝发育成花芽) 顶部 0.5~1.0 cm 的组织, 用 CTAB-based 的方法<sup>[5]</sup>提取总 RNA 混和后, 用寡聚 (dT) 引物反转录, 构建 cDNA 文库。根据拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *LFY* 和金鱼草 (*Antirrhinum majus*) *FLO*<sup>[6]</sup>的 cDNA 保守序列设计引物 6S (5'-CA-GAGGGAGCACCCGTTTCATTGTGAC-3') 和 10A (5'-GACGCAAGCTTTGCTTGGGAGACATACCA-3'), 并以构建的 cDNA 文库为模板, 用 LA-PCR 克隆试剂盒 (TaKaRa) 进行 PCR 反应, 反应条件为 95℃ 10 min 热变性后, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 40 次。将得到的 440 bp cDNA 片段与带有 *EcoR* I (TaKaRa) 酶切点的接头连接, 进而连接到 pBluescript II SK<sup>+</sup> (Stratagene, La Jolla, Calif) 载体的

收稿日期: 2002-07-03; 修回日期: 2002-10-17

基金项目: 山西省科技攻关项目 (021034); 国家人事部留学人员择优资助项目

*EcoR* I 酶切位点, 然后转化大肠菌 DH5 $\alpha$ , 并涂布在含有 50 mg/mL Amp, IPTG 和 X-gal (Promega) 的 LB 平板上, 选择白色菌落。用 PCR 法确定带有目的长度 cDNA 片段的菌落, 提取质粒并测定碱基序列, 试剂用 Thermo sequenase premixed cycle sequence kit (Amersham, Buckinghamshire, U.K.), 测序仪用 Hitachi SQ5500 (Hitachi, Japan)。3' 末端扩增: 根据得到的 440 bp cDNA 片段, 设计了特异性引物 6S 和 3SP2 (5'-TCCAGAA-CATTGCCAAGGAG-3'), 分别与盒式引物 (Cassette primer) C1 和 C2 进行 PCR 扩增。C2 和 3SP2 之间得到了 600 bp 的 cDNA 片段, 并克隆到 pBluescriptII SK<sup>+</sup> 的 *EcoR* V (TaKaRa) 酶切位点。经测序获得了两个 cDNA 同源片段。5' 末端扩增: 方法同上, 在 C1 和 C2 与 10A、5SP2 (5'-CAATGACCACAAGAGGCTTG-3'), 5SP3 (与 3SP2 相同)、5SP4 (与 6S 相同) 之间进行 PCR 扩增, 获得了 C2 与 5SP4 之间约 750 bp 的 cDNA 片段, 并测序。全长 cDNA 的扩增: 从建立的 cDNA 文库中用共同引物 AFLF (5'-GTGGAAATATGGATCCAGATGCC -3') 分别同 AFL1R (5'-TTCATTCAGTCTGCCCTAGCC -3'), AFL2R (5'-TCAAACCTCTCTGTCAGAACTGGC-3') 进行 PCR 扩增, 获得了两个约 1.4 kb 的 cDNA, 并将其克隆到 pBluescriptII SK<sup>+</sup> 的 *EcoR* V 酶切位点, 从两个方向测定全序列后分别定名为 AFL1 和 AFL2。

### 1.3 不同发育时期及不同组织、器官的 RT-PCR 分析

不同发育时期的 RT-PCR 分析, 是在生长期 6~10 月份, 每隔 2 周采集 '红玉' 的顶芽; 组织、器官包括根、茎、叶、果台枝顶芽 (同上 1.2), 花的萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊; 提取上述样品的总 RNA, 用 RT-PCR HIGH 试剂盒 (Toyobo, Tokyo, Japan) 进行反转录, 合成第 1 条 cDNA, 具体操作如下: 即 5 $\times$  Rtase buffer (4  $\mu$ L), Random primer (1  $\mu$ L), dNTPs (2  $\mu$ L), Rnase inhibitor (1  $\mu$ L), Total RNA (1  $\mu$ g), M-MLV Rtase (2  $\mu$ L), 最后用 Rnase free H<sub>2</sub>O 添加至 20  $\mu$ L。反应条件为 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 反应结束后保存在 4 $^{\circ}$ C。取上述反转录液 2  $\mu$ L, 用 AFL1 和 AFL2 的共同引物 3SP2, 分别与 AFL1 的特异性引物 AFL1R 和 AFL2 的特异性引物 AFL2R 用 AmpliTaq 酶 (PE Biosyste-me, Japan) 进行 PCR 反应, 3SP2-AFL1R 引物扩增出 532 bp 的片段, 3SP2-AFL2R 引物扩增出 368 bp 的片段。PCR 的条件是, 95 $^{\circ}$ C 热变性 10 min 后, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 40 个循环。取 5  $\mu$ L 的反应液, 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离后在 1  $\mu$ g/mL 溴化乙锭 (EB) 溶液中染色。

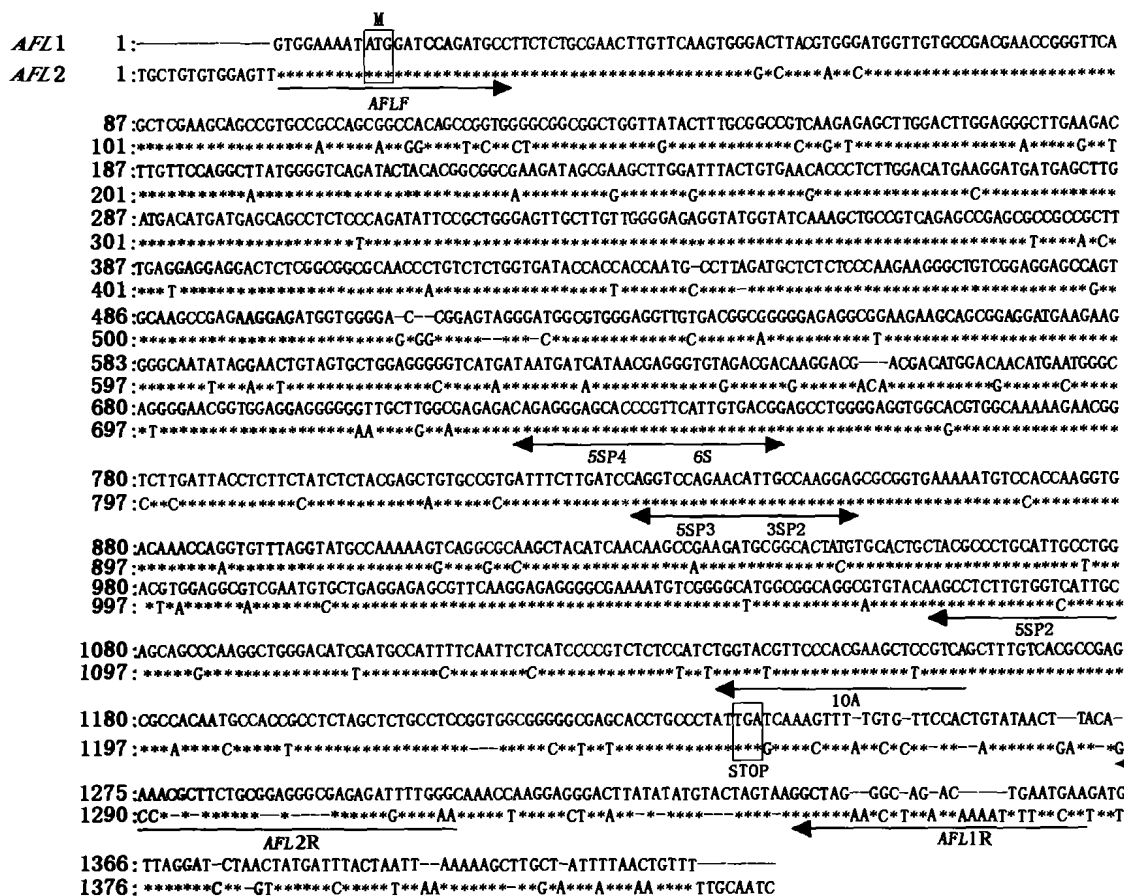
### 1.4 基因组 DNA 的提取及 Southern 印迹分析

采集生长期 '红玉'、圆叶海棠、'红梨' 幼叶, 提取基因组 DNA<sup>[7,8]</sup>。Southern 印迹分析, 用选自 AFL1 和 AFL2 共同的保守区域 6S 和 10A 做一对引物, 用地高辛标记进行 PCR 扩增, 得到的 440 bp (AFL400) 片段作为探针。其 PCR 扩增的条件是, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 循环 40 次。染色体组 DNA 的消化是用限制性内切酶 *Bam*H I, 酶切后取总 DNA 5  $\mu$ g, 用 60 V、50 mA、0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分离后, 印迹到尼龙膜 (Hybond Nt, Amersham) 上。分子杂交是用 DIG EASY HYB 液体在 50 $^{\circ}$ C, 探针浓度 100 ng/mL 的条件下进行 12 h。杂交后的尼龙膜在室温下用 2 $\times$  SSC, 0.1% SDS 冲洗 2 次, 然后在 65 $^{\circ}$ C 条件下, 用 0.5 $\times$  SSC, 0.1% SDS 洗 2 次, 各 15 min, 化学发光检测按照制造商的说明用 CDP<sup>star</sup> 进行, 用 X 光胶片显影。

## 2 结果与分析

### 2.1 AFL1 和 AFL2 的克隆及序列分析

从 '红玉' 苹果顶芽 cDNA 文库中克隆出全长大约 1.4 kb 的 2 个 cDNA 片段, 分别定名为 AFL1 和 AFL2, 它们的碱基序列如图 1 所示。其碱基序列在编码区有 90% 的同源性, 但是在 3' 末端非编码区的同源性较少, 大约 60%。它们的编码区有 1 230 bp, 编码 410 个氨基酸。通过与 GenBank 中收集的 *LEY* 同源基因的氨基酸序列进行同源性比较表明 (如表 1 所示), 其氨基酸序列与小叶杨的 *PTFL*、豌豆的 *PEAFLO*、矮牵牛的 *ALF*、番茄的 *TOFL* 有 70% 的同源性; 与金鱼草的 *FLO*、拟南芥的 *LEY*、蓝桉的 *ELF1* 有 60% 以上的同源性; 而与水稻的 *RFL* 和辐射松的 *NEEDLY* 同源性较低 (50% 左右)。说明我们克隆到的 AFL1 和 AFL2 是 *LEY* 的同源基因。

图 1 *AFL1* 和 *AFL2* 的 cDNA 碱基序列上一行为 *AFL1* cDNA 的碱基序列, 下一行为 *AFL2* cDNA 的碱基序列。Fig. 1 Alignment of nucleotide sequences of *AFL1* and *AFL2* cDNAUpper line shows nucleotide sequences of *AFL1* cDNA, and lower line shows that of *AFL2* cDNA.表 1 *AFL1* 和 *AFL2* 的氨基酸序列与其它植物同源基因的同源性Table 1 Alignment of amino acid sequences of *AFL1* and *AFL2* with other homologues genes

(%)

cDNA	小叶杨 <i>Populus balsamifera</i> (PTFL)	豌豆 <i>Pisum sativum</i> (PEAFLO)	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i> (ALF)	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i> (TOFL)	金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i> (FLO)	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (LFY)	蓝桉 <i>Eucalyptus globulus</i> (ELF1)	水稻 <i>Oryza sativa</i> (RFL)	辐射松 <i>Pinus radiata</i> (NEEDLY)
<i>AFL1</i>	71.5	71.1	71.9	69.7	68.8	62.0	63.1	53.2	46.9
<i>AFL2</i>	72.9	72.3	72.9	70.1	69.3	62.8	64.4	55.6	46.5

## 2.2 *AFL1* 和 *AFL2* 在不同发育时期及不同组织器官的表达

取不同组织及花器官提取总 RNA, 用 *AFL2* 的特异性引物 3SP2-*AFL2*R 进行 RT-PCR 分析的结果表明, *AFL2* 在萼片、子房、根、茎、叶以及果台枝的顶芽内都有表达。而用 *AFL1* 的特异性引物 3SP2-*AFL1*R 进行 RT-PCR 分析的结果表明, 相同材料中 *AFL1* 只在枝条顶芽中有表达; 而增加 PCR 的循环数也不影响以上表达模式 (图 2)。说明根、茎、叶、顶芽及部分花器官的生长发育都需要 *AFL2* 的存在, 而 *AFL1* 是顶芽的发育所必需的。

图 3 表示 RT-PCR 检测到的 *AFL1* 和 *AFL2* 在不同发育时期顶芽中的表达情况。根据显微观察, 苹果顶芽的营养生长从发芽持续到 6 月末左右, 8 月末在芽的顶端开始发生圆锥状突起<sup>[7]</sup>。从顶芽停止生长到圆锥状突起开始出现这个过渡时期大概有一个月, 在这一时期芽的顶端在形态上没有发生特

殊变化。*AFL1* 开始清晰的表达就是在这个时期内;而 *AFL2* 则在整个观察期内都有表达。这些结果表明, *AFL1* 的表达可能具有时空调节性,而 *AFL2* 则属于组成型表达。这种表达上的差异可能反映了它们在生理机能上的差异。

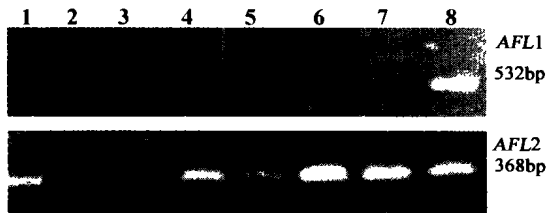


图 2 不同组织 *AFL1* 和 *AFL2*

RNA 的 RT-PCR 分析

1: 萼片; 2: 花瓣; 3: 雄蕊; 4: 子房; 5: 根;  
6: 茎; 7: 叶; 8: 顶芽。

Fig. 2 RT-PCR analysis of *AFL1* and *AFL2*

RNA in various tissues

1: Sepal; 2: Petal; 3: Stamen; 4: Ovary; 5: Root;  
6: Stem; 7: Leaf; 8: Terminal bud.

### 2.3 *AFL1* 和 *AFL2* 的 Southern 印迹分析

用内切位点较少的限制性内切酶 *BamH* I 对总 DNA 进行消化,用地高辛标记的 *AFL400* PCR 扩增产物作探针,而且在 *AFL1* 和 *AFL2* cDNA 两序列的相对于 *AFL400* 区域内没有 *BamH* I 的酶切位点。图 4 表明,用 *BamH* I 消化后红玉、圆叶海棠、红梨都有 4 条带。这些结果说明,在苹果属中栽培品种红玉,野生种圆叶海棠,以及梨属的栽培品种红梨中 *LFY* 的同源基因是多拷贝的,而且有着相同的拷贝数。

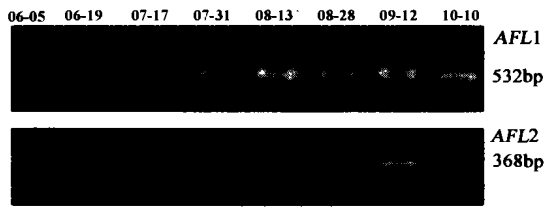


图 3 不同发育时期顶芽 *AFL1*

和 *AFL2* 的 RT-PCR 分析

Fig. 3 RT-PCR analysis of *AFL1* and *AFL2*

RNA in apical meristem at various times

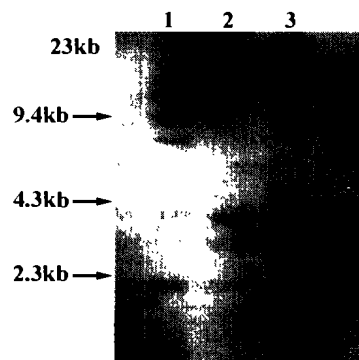


图 4 苹果、圆叶海棠和梨的 Southern 印迹分析

1: 红玉; 2: 圆叶海棠; 3: 红梨

Fig. 4 Southern blot analysis of apple, crab apple and pear

1: Jonathan; 2: Crab apple; 3: Hongli

## 3 讨论

在拟南芥中发现的 *LFY* 基因已经被证明是决定营养生长向生殖生长过渡的一个关键基因,与金鱼草的 *FLO* 是成花的同源基因,其主要在成花的茎顶端分生组织中表达<sup>[1,6]</sup>。该基因发生突变后拟南芥的无限花序转变成了无限伸长的次生枝;而使该基因在 35S 启动子调控下过量表达,则能使花期提早和使所有的侧枝转变为单生花<sup>[2]</sup>。这些研究结果表明,对 *LFY* 或其同源基因表达的调控可以使我们根据需要调节植物的开花时间和程度。

Kotoda<sup>[9]</sup>用 *AFL1* 和 *AFL2* 的共同探针进行的 Northern 印迹也表明, *AFL1* 和 *AFL2* 的 mRNA 在花芽发育的整个时期都有表达,甚至在营养生长时期的 6 月也有表达。与以上结果相同的是,在苹果的顶芽发育过程中 *LFY* 同源基因一直在起作用,但是由于苹果是一个复杂的杂合体植物,我们从其顶芽中克隆的两个 *LFY* 同源基因在顶芽发育的不同时期以及不同组织器官又有各自的特异性表达(图 3)。图 1 中 *AFL1* 和 *AFL2* 的编码区碱基序列有较高的同源性(90%),而非编码区的同源性则在 60% 以下。说明这两个基因虽然有共同的起源,但是在功能及作用的时间、空间上已产生了明显的差异,在花和营养组织的发育中起不同的调控作用。*AFL1* 的表达表现了组织器官和时期的特异性,可能具有时空调节性;而 *AFL2* 在顶芽的整个发育过程及多数组织器官都有表达,属于组成型表达。关于这两个基因在苹果属植物体内的生理功能,还有待进一步探讨。

在被克隆了 *LFY* 同源基因的植物中, 大部分植物基因组中 *LFY* 同源基因是单拷贝的, 如拟南芥、小叶杨、番茄、豌豆<sup>[2,3,10,11]</sup>; 也有多拷贝的, 如蓝桉<sup>[12]</sup>有 3 个 *LFY* 同源基因, 但它们有两个是不表达的, 并且在它们的编码区域有终止密码子。因此蓝桉中仅有一个基因的功能与 *LFY* 相似。在辐射松<sup>[13,14]</sup>中也有两个 *LFY* 同源基因 *NEEDLY* 和 *PRFL*。本研究中苹果属的栽培品种红玉和野生种圆叶海棠, 梨属的栽培品种红梨都显示了 4 条带, 证明在它们的基因组中 *LFY* 同源基因都是多拷贝的, 而且在成花的调节功能上存在差异。由此可见, *LFY* 的家族基因在二倍体植物中有的是单拷贝, 有的是多拷贝, 这可能与这些植物的起源、进化及其所需的不同生理功能有关。这一问题尚需要进一步研究。

### 参考文献:

- 1 Schultz E A, Haughn G W. *LEAFY* a homeotic gene that regulates in florescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1991, 3: 771 ~ 781
- 2 Weigel D, Alvarez J, Smyth D R, et al. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 1992, 69: 843 ~ 859
- 3 Weigel D, Nillson O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*, 1995, 377: 495 ~ 500
- 4 Leoadro Peña, Mar Martín-Trillo, José Juárez, et al. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* gene in citrus reduces their generation time. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 263 ~ 267
- 5 Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and sufficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rpt.*, 1993, 11: 113 ~ 116
- 6 Coen E S, Romero J M, Doyle S, et al. *Floricaula*: A homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell*, 1990, 63: 1311 ~ 1322
- 7 Murray G C, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucl. Acid Res.*, 1980, 8: 4321 ~ 4325
- 8 Bousquet J, Simmon L, Lalonde M. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Can. J. For. Res.*, 1990, 20: 254 ~ 257
- 9 Kotoda N, Wata M, Komori S, et al. Expression pattern of apple homologues of floral meristem identity genes *LFY* and *AP1* during flower development in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2000, 125 (4): 398 ~ 403
- 10 Molinero-Rosales N, Janilena M, Zurita S, et al. *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant J.*, 1999, 20 (6): 685 ~ 693
- 11 Hofer J, Turner L, Hellens R, et al. *UNIFOLIAULA* regulates leaf and flower morphogenesis in pea. *Cur. Biol.*, 1997, 7: 581 ~ 587
- 12 Southerton S G, Strauss S H, Olive M R, et al. *Eucaryptus* has a function equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*. *Plant Mol. Biol.*, 1998, 37 (6): 897 ~ 910
- 13 Mouradov A, Glassick T, Teasdale R D. *NEEDLY*, a *Pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95: 6537 ~ 6542
- 14 Mellerowicz E J, Horgan K, Walden A, et al. *PRFL*-a *Pinus radiata* homologue of *FLORICAULA* and *LEAFY* is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia. *Planta*, 1998, 206: 619 ~ 629

## Cloning and Expression Analysis of *LEAFY* Homologues Genes from Apple

Cao Qiufen<sup>1</sup>, Wada Masato<sup>2</sup>, Meng Yuping<sup>1</sup>, Huang Jing<sup>1</sup>, Sun Yi<sup>1</sup>, and Wang Guoping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Agri-Biotechnology Research Center of Shanxi Province, Taiyuan 030031, China; <sup>2</sup> Apple Research Center, National Institute of Fruit Tree Science, Shimokuriyagawa, Morioka, 020-0123 Japan)

**Abstract:** Two *LEAFY* like cDNA fragments of in length, *AFL1* and *AFL2* were cloned from the terminal buds of bearing shoot of apple trees. Sequencing analysis showed that the coding regions of *AFL1* and *AFL2* had 90% homology, but the 3' non-coding regions had less than 60% homology. The deduced amino acid sequence of *AFL1* or *AFL2* cDNA had over 70% similarity with *PTFL*, *PEAFLO* and *ALF* genes of poplar, pea and petunia, and less than 70% similarity with *TOFL*, *FLO* and *LFY* genes of tomato, *antirrhinum majus* and *arabidopsis* respectively. RT-PCR analysis showed that *AFL1* expressed only in the terminal buds during the transition period from vegetative to reproductive growth; whereas *AFL2* expressed in the sepal, ovary, root, stem, leaf and the terminal buds between June to Oct. These results might suggest that *AFL1* and *AFL2* had a common origin, and their functions had diverged, so that they appeared to play independent roles in floral and vegetative tissue development. Southern blot analysis showed that there were at least two copies of *LEAFY* homologues genes in *Malus* species and pear.

**Key words:** Apple; Gene; *LEAFY*; Cloning; Expression