

# 日本晚樱花器官特征基因*ClAP1* 的克隆与表达分析

刘志雄<sup>1,2</sup>, 王莹<sup>1</sup>, 吕小蒙<sup>1</sup>, 陆海<sup>1</sup>, 李凤兰<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; <sup>2</sup>长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434025)

**摘要:** 用同源克隆的方法和 3' RACE 技术, 从日本晚樱 (*Prunus lannesiana*) 中克隆得到了 1 个 *API* 同源基因 *ClAP1* 的 cDNA 全长。其 cDNA 全长 1 005 bp, 包括 1 个编码 238 个氨基酸共 717 bp 的开放阅读框。序列比对和分子系统发生分析表明, *ClAP1* 是拟南芥的 *API* 同源基因, 其蛋白质的 C 末端具有一个保守的 euAPI 模体。半定量 RT-PCR 分析表明, *ClAP1* 在 3 个日本晚樱品种 ‘大岛’、‘一叶’ 和 ‘普贤像’ 的萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊中均有表达, 在叶中不表达, 属参与花发育的转录因子, 但其表达模式与拟南芥的 *API* 有一定差别。

**关键词:** 樱花; 日本晚樱; *MADS-box* 基因; 花器官特征决定基因; 花发育

**中图分类号:** S 685

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 04-0649-06

## Cloning and Expression Analysis of a Floral Organ Identity Gene *ClAP1* from *Prunus lannesiana*

LIU Zhi-xiong<sup>1,2</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, Lü Xiao-meng<sup>1</sup>, LU Hai<sup>1</sup>, and LI Feng-lan<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Biological Science and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; <sup>2</sup>College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

**Abstract:** *MADS-box* genes encode transcriptional regulators that are critical for flowering and floral organogenesis. To find genes involved in the floral organogenesis of cherry blossom (*Prunus lannesiana*), cDNAs for one *MADS-box* genes, *ClAP1*, was cloned using homologous cloning and 3'-RACE method based on the sequence database of NCBI. The full length of *ClAP1* cDNA is 1 005 bp, containing an open reading frame (ORF) of 717 bp and coding for a polypeptide of 238 amino acid residues. Subsequently, sequence comparison and phylogenetic analysis revealed that *ClAP1* was highly homologous to protein *API* in *Arabidopsis* and belonged to the euAPI clade of class A. However, semiquantitative RT-PCR analysis showed that *ClAP1* was expressed in sepal, petal, stamen and carpel of three cherry blossom cultivars ‘Makino’, ‘Hisakura’ and ‘Albo-rosea’, which was slightly different from the expression pattern of *API*.

**Key words:** *Prunus* spp.; *Prunus lannesiana*; *MADS-box* gene; floral organ identity gene; flower development

收稿日期: 2009 - 10 - 27; 修回日期: 2010 - 03 - 16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571473); 国家林业局 ‘948’ 项目 (99417)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lifl@bjfu.edu.cn)

花是园林植物最具观赏价值的器官, 其在多变的外形下又重复着相对简单模式, 加之丰富的变异类型, 使花成为研究器官形态建成和组织发育模式的理想材料 (Krizek & Fletcher, 2005)。在花发育研究方面, ABCE 模型较成功地解释了花器官的形态建成, 它包含功能部分重叠又相互作用的 A、B、C 和 E 共 4 类花器官特征决定基因, 其中 A + E 决定萼片的发生, A + B + E 决定花瓣的特征, B + C + E 决定雄蕊的发育, C + E 决定心皮的发育 (Coen & Meyerowitz, 1991; Honma & Goto, 2001; Theissen, 2001)。*APETALA1* (*API*) 同源基因属 A 类基因, 在花发育中参与调控花分生组织特征决定和花原基的形成, 维持萼片和花瓣的正常发育 (Okamuro et al., 1993), 并在被子植物不同的辐射类群中呈现出一定的功能分化 (Litt & Irish, 2003)。

日本晚樱 (*Prunus lannesiana*) 是蔷薇科著名的观赏花木。目前有关樱花 *API* 同源基因的研究未见报道。深入研究参与花被特征决定的 *API* 同源基因表达模式和功能, 不仅有助于解析樱花萼片和花瓣形态建成的分子机制, 同时也可作为观赏植物花型的定向遗传改良和品种创新提供新的理论依据和基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2008 年 4 月初采集日本晚樱单瓣品种 ‘大岛’ (*P. lannesiana* ‘Makino’)、重瓣品种 ‘一叶’ (*P. lannesiana* ‘Hisakura’) 和 ‘普贤像’ (*P. lannesiana* ‘Albo-rosea’) 的幼叶、花芽、萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊, 立即置于液氮中速冻, 于 -80 °C 低温冰箱保存备用。‘大岛’ 采自中国农业大学校园, ‘一叶’ 采自北京清华园, ‘普贤像’ 采自北京林业大学校园。

### 1.2 RNA分离和cDNA合成

采用 CTAB 法 (杜希华 等, 2003) 提取日本晚樱 6 种器官 (幼叶、花芽、萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊) 的总 RNA。用 M-MLV 逆转录酶 (TaKaRa 公司) 合成第一链 cDNA, 反应体系和操作按说明书进行。

### 1.3 日本晚樱*API* 同源基因*ClAPI* 的克隆

根据 NCBI 上已有的植物 *API* 同源基因和相关的 EST 序列。直接设计 3' -RACE 引物 5'-ATCGTAACTGTTATCATGGGAAGG-3', 使用 3' -full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行 *ClAPI* 基因 3' 端的克隆, 操作按说明书进行。再根据获得的 3' -RACE 序列的非翻译区和其他蔷薇科植物 *API* 同源基因 5' 端非翻译区的保守序列设计上下游引物 *API*F (5' -TAAAGAGGCAGGAGGTGCAAG-3') 和 *API*R (5' -GGATTGCGACCACATACCTT-3'), 获取基因的全长。PCR 反应体系为 25  $\mu$ L, 包括花芽的 cDNA 模板 2  $\mu$ L, 2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP 0.5  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 0.5  $\mu$ L, 10  $\times$  *Ex Taq* buffer 2.5  $\mu$ L, *Ex Taq* 酶 (5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.7  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 57 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环后 72 °C 继续延伸 10 min。扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳后回收目标片段, 然后克隆在 pMD18-T 载体 (TaKaRa 公司) 上, 鉴定后对其进行两端测序, 从而克隆出 *ClAPI* 基因。所有引物均由 Invitrogen 公司合成, DNA 测序由奥科生物公司完成。

### 1.4 蛋白质序列比对及系统发生分析

将基因 *ClAPI* 的 cDNA 序列和开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 编码的氨基酸序列在

EBI 数据库中进行 BLAST 分析。用 ClustalW 程序 (Thompson et al., 1994) 将 *CIAP1* 推导的氨基酸序列同 NCBI 上 AP1 同源蛋白序列 PpMADS1 (桃 *Prunus persica*, ABU63953)、MdAP1 (苹果 *Malus × domestica*, ACD69426)、EjAP1 (枇杷 *Eriobotrya japonica*, AAX14151)、PpAP1 (砂梨 *Pyrus pyrifolia*, ABP93402)、TrAP1 (太行花 *Taihangia rupestris*, ABB59990)、RhAP1 (现代月季 *Rosa hybrida*, ACS74806)、ZjAP1 (枣 *Ziziphus jujuba*, ACG70964)、AP1 (拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, NP\_177074)、MiAP1 (芒果 *Mangifera indica*, ACS45102)、CsAP1 (橙 *Citrus sinensis*, AAR01227)、HaAP1 (美洲矾根 *Heuchera americana*, AAP83372)、PaAP1 (美洲商陆 *Phytolacca americana*, AAP83384) 和 VvAP1 (葡萄 *Vitis vinifera*, XP\_002263170) 的进行多重比较。用 MEGA4.0 软件 (Tamura et al., 2007), 选择连接近邻算法 NJ (Neighbour joining) 构建系统进化树 (Saitou & Nei, 1987)。

### 1.5 半定量 RT-PCR 与组织表达模式分析

用半定量 RT-PCR 技术检测 *CIAP1* 在 3 个日本晚樱品种叶、花芽 4 轮花器官的表达水平和表达的组织特异性。上下游引物分别为 RTAP1F (5'-GAGGAACCAGCTGGACCTTAC-3') 和 RTAP1R (5'-GGATTGCGACCACATACCTT-3'), 通过 NCBI 上樱花 *ACTIN* 基因的 EST 序列设计内参引物, *Clactin-F* (5'-TGTGAGTCACACTGTGCCAA-3') 和 *Clactin-R* (5'-GCAGCTTCCATTCCAATGAG-3')。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环后 72 °C 继续延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后经凝胶成像仪成像, 用软件 AlphaEaseFC 4.0 分析该基因在花芽 4 轮花器官中表达的丰度和组织特异性。以 *CIAP1* 和 *ACTIN* 的平均积分光密度值 (MOD) 的比值作为表达水平的直观指标, 3 次重复, 数据经反正切变换后用 SPSS 13.0 进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CIAP1* 基因全长 cDNA 序列的克隆

根据 NCBI 上已有的植物 AP1 同源基因保守区设计引物, 直接用 3'-RACE 技术, 克隆得到了包括 polyA 尾的大小为 950 bp 的 3' cDNA 序列。再根据 3' cDNA 序列的非翻译区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 和其他蔷薇科植物 5'-UTR 的保守序列设计引物, 克隆得到了完整的 *CIAP1* 基因全长 cDNA。结果表明, *CIAP1* 基因全长 cDNA 序列 1 005 bp, 包括 66 bp 的 5'-UTR、221 bp 的 3'-UTR 和 717 bp 的 ORF, 编码 238 个氨基酸和 1 个终止密码子。通过 NCBI 网站的 BLAST 比对及序列分析, 它与 MADS-box 基因家族中 *euAP1* 进化系基因的同源性最高, 命名为 *CIAP1*, GenBank 登录号为 GQ267074。

### 2.2 蛋白质序列比对及分子系统发生分析

蛋白质序列同源比对发现, *CIAP1* 的 C 末端结构域有 1 个高度保守的 euAP1 模体 (euAP1 motif) (图 1)。*CIAP1* 与桃的 AP1 同源蛋白 PpMADS1 序列相似性高达 97.90%, 与拟南芥的 AP1 相似性也达到 66.80%。

分子系统发生分析 (图 2) 表明, 日本晚樱的 *CIAP1* 和桃的 PpMADS1 聚于进化树的一个分支, 亲缘关系最近, 与枇杷、苹果和砂梨的亲缘关系次之, 与太行花和现代月季的亲缘关系相对较远, 但这些蔷薇科植物共同聚于一个大的分支, 与其他物种区别开来。这与传统分类学所得的结果基本相符。

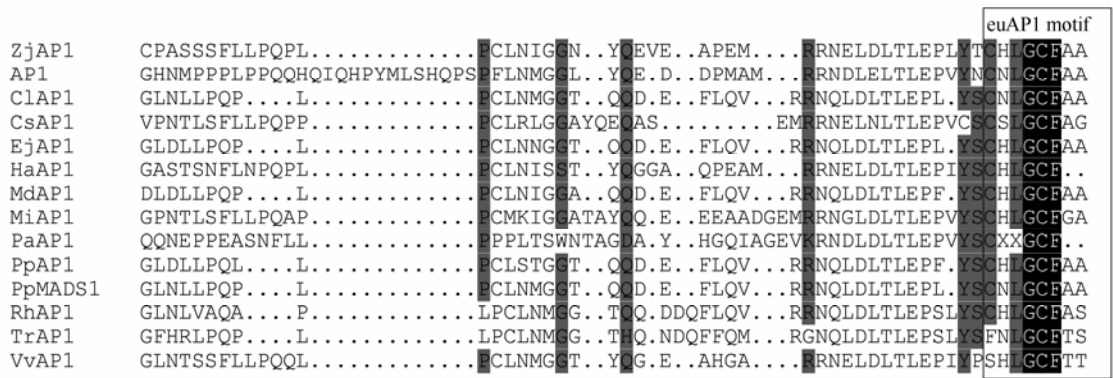


图 1 *ClAP1* 基因所编码氨基酸 C 末端结构域 BLAST 分析及 euAP1 模体

Fig. 1 Alignment of the C-terminal domain of the predicted amino acid sequence of *ClAP1* with the most similar sequences identified in BLAST and euAP1-motif characteristic of AP1-like sequences are boxed

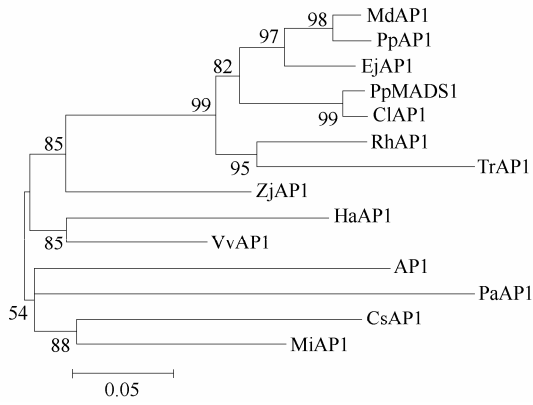


图 2 *ClAP1* 蛋白与其他物种的 AP1 同源蛋白的分子系统发生分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *ClAP1* with other AP1-like MADS-box proteins

2.3 半定量RT-PCR与组织表达模式分析

用半定量 RT-PCR 技术检测 *ClAP1* 在 3 个日本晚樱品种 5 种组织中的表达水平和表达的组织特异性, 以樱花的 *ACTIN* 基因作内参。结果 (图 3) 显示, *ClAP1* 在 3 个日本晚樱品种花芽各轮花器官中均有表达, 在叶中不表达。

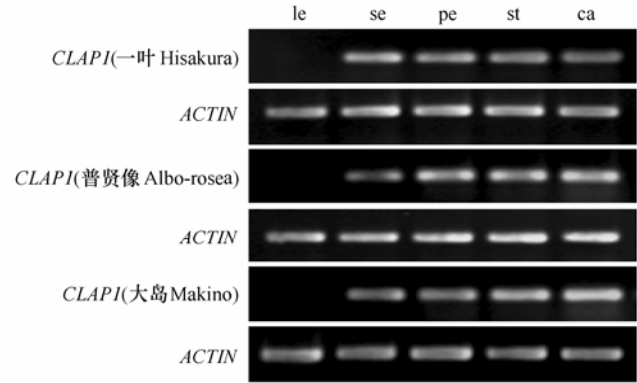


图 3 *ClAP1* 基因在 3 个日本晚樱品种 5 种组织中表达的半定量 RT-PCR 分析

le: 叶; se: 萼片; pe: 花瓣; st: 雄蕊; ca: 心皮。

Fig. 3 Expression analysis of *ClAP1* in leaf, sepal, petal, stamen and carpel of three cherry blossom cultivars by semiquantitative RT-PCR with *ACTIN* as control

le: Leaf; se: Sepal; pe: Petal; st: Stamen; ca: Carpel.

*CIAP1* 在 3 个晚樱品种花芽 4 轮花器官的表达水平如图 4 所示。

进一步对其 *CIAP1* 在同一品种不同器官的表达量进行方差分析, *CIAP1* 分别在‘大岛’、‘普贤像’和‘一叶’不同器官中的表达水平均无显著差异 ( $LSD, P > 0.05$ )。

通过分析 *CIAP1* 在不同品种同轮花器官的表达量发现, 其分别在 3 个品种花芽萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊中的表达量均无显著差异 ( $LSD, P > 0.05$ )。

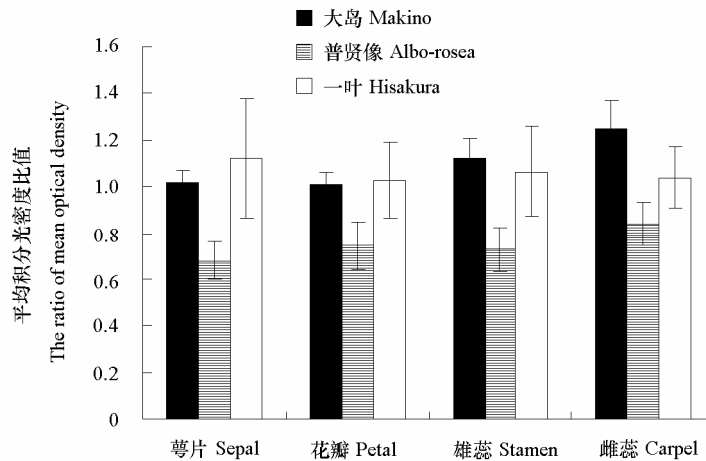


图 4 *CIAP1* 基因在 3 个日本晚樱品种花芽 4 轮花器官中的表达丰度

Fig. 4 Expression abundance of *CIAP1* in sepal, petal, stamen and carpel of Hisakura, Makino and Albo-rosea by semiquantitative RT-PCR with *ACTIN* as control

### 3 讨论

序列同源比对和分子系统发生分析表明, 日本晚樱 *CIAP1* 蛋白具有典型的 *euAP1*-motif, 是拟南芥 *AP1* 的同源蛋白。半定量 RT-PCR 分析表明, *CIAP1* 仅在日本晚樱蕾期花芽的萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊中表达, 在叶中不表达, 且在 4 轮花器官中的表达量并无显著差异。其表达模式同拟南芥的 *AP1* 基因存在一定的差异, 在拟南芥中, *AP1* 在花分生组织分化时开始表达, 当雄蕊原基和心皮原基发生后, 其转录活性主要局限在萼片和花瓣中 (Zahn et al., 2006); 而在鳄梨 (*Persea americana*) 和荷花玉兰 (*Magnolia grandiflora*) 中, *AP1* 同源基因在各轮花器官和叶中均有表达 (Kim et al., 2005)。

分子系统学分析表明, A 类基因在核心真双子叶植物中有 *euAP1*、*euFUL* 和 *AGL79* 共 3 种主要类型, 并且这 3 种类型的基因是物种在进化过程中通过基因重复事件产生; 在被子植物基部类群和基部真双子叶植物中, A 类基因只有 *FUL*-like 1 种类型 (Shan et al., 2007)。核心真双子叶植物中 *euAP1* 型基因是物种进化过程中由 *euFUL* 或 *FUL*-like 型基因的祖先类型通过基因重复事件产生 (Shan et al., 2007)。

相对原始的被子植物而言, *AP1* 同源基因在拟南芥和樱花中表达范围的缩小很可能源于 *euAP1* 型基因仅拥有 *euFUL* 或 *FUL*-like 基因祖先类型的部分功能。而在核心真双子叶植物中, 樱花 *euAP1* 基因与拟南芥 *euAP1* 基因的表达模式也存在差异, 这种差异一方面可能源于 *AP1* 同源基因在被子植物不同辐射类群中本身的功能分化, 另一方面也可能是因为多年生木本植物与草本植物在花发育调控方面本身存在着差异。

相对草本模式植物而言, 木本植物有着独特的生长发育模式, 其遗传转化试验也相对困难, 使

得本本植物花发育相关方面的研究相对滞后, 樱花 *API* 同源基因在日本晚樱花器官形态建成中具体的生理活性和功能仍有待进一步研究。

## References

- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31 - 37.
- Du Xi-hua, Lu Hai, Gao Shu-min, Li Feng-lan. 2003. Method for RNA isolating from anthers of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. *Journal of Beijing Forestry University*, 25 (1): 10 - 13. (in Chinese)
- 杜希华, 陆 海, 高述民, 李凤兰. 2003. 文冠果花药总 RNA 提取方法研究. *北京林业大学学报*, 25 (1): 10 - 13.
- Honma T, Goto K. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*, 409: 525 - 529.
- Kim S, Koh J, Yoo M J, Kong H Z, Ma Hong, Soltis P S, Soltis D E. 2005. Expression of floral MADS-box genes in basal angiosperms: Implications for the evolution of floral regulators. *The Plant Journal*, 43: 724 - 744.
- Krizek B A, Fletcher J C. 2005. Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide. *Nature Reviews Genetics*, 6: 688 - 698.
- Litt A, Irish V F. 2003. Duplication and diversification in the *APETALA1* / *FRUITFULL* floral homeotic gene lineage: Implications for the evolution of floral development. *Genetics*, 165: 821 - 833.
- Okamuro J K, Bart G W, Jofuku K D. 1993. Regulation of *Arabidopsis* flower development. *The Plant Cell*, 5: 1183 - 1193.
- Shan Hongyan, Zhang Ning, Liu Cuijing, Xu Guixia, Zhang Jian, Chen Zhiduan, Kong Hongzhi. 2007. Patterns of gene duplication and functional diversification during the evolution of the *API/SQUA* subfamily of plant MADS-box genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 26 - 41.
- Saitou N M, Nei M. 1987. Neighbor-joining method. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406 - 425.
- Theissen G. 2001. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 75 - 85.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8): 1596 - 1599.
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673 - 4680.
- Zahn L M, Feng B M, Ma H. 2006. Beyond the ABC-model: Regulation of floral homeotic genes. *Advances in Botanical Research*, 44: 164 - 196.

征订

## 《园艺学报》2009 年增刊——庆祝中国园艺学会创建 80 周年暨第 11 次全国会员代表大会 论文摘要集出版发行

本期论文摘要集共收录果树、蔬菜、西瓜甜瓜和观赏植物方面论文摘要 202 篇, 其中果树 76 篇, 蔬菜 78 篇, 西瓜甜瓜 23 篇, 观赏植物 25 篇, 内容涉及种质资源、遗传育种、分子生物学、栽培技术、生理生化、贮藏保鲜等。每册定价 45 元。欲购者请与《园艺学报》编辑部联系。

编辑部地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部;

邮政编码: 100081; 电 话: (010) 82109523;

E-mail: [yuanyixuebao@126.com](mailto:yuanyixuebao@126.com); 网址: <http://www.ahs.ac.cn>。