

菊花花发育基因 *CmCO* 和 *CmFT* 的克隆与表达分析

田素波, 林桂玉, 郑成淑*, 孙霞, 任洪艳, 温立柱

(山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018)

摘要: 利用同源序列法结合 RACE 技术从菊花‘神马’品种 [*Chrysanthemum morflorum* (Ramat.) Kitam. ‘Jinba’] 中分离了开花时间相关的 *CO* (*CONSTANS*) 和 *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) 同源基因, 并命名为 *CmCO* (基因登录号 JF488070) 和 *CmFT* (基因登录号 JF488071)。 *CmCO* 和 *CmFT* 分别编码 382 和 174 个氨基酸。蛋白比对发现, *CmCO* 蛋白包含具有典型的 *CO* 同源蛋白结构, 包含 B-box1, B-box2, CCT 结构域及 COOH 区域。 *CmFT* 所推测的氨基酸序列包含 *FT* 类蛋白保守基序和两个关键性氨基酸残基。 同源性分析表明, *CmCO* 与草莓 (*Fragaria × ananassa*) *FaCO* 同源性最高, 为 65.8%, 与豌豆 (*Pisum sativum*) *PsCOL*、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *AtCO* 同源性分别为 62.0% 和 55.6%。 *CmFT* 与向日葵 (*Helianthus annuus*) *HaFT2* 基因同源性最高, 为 93.7%, 与葡萄 (*Vitis vinifera*) *VvFT* 和拟南芥 *AtFT* 的同源性分别为 85.1% 和 74.0%。进化树聚类分析表明, *CmCO* 和 *CmFT* 蛋白分别与向日葵 *HaCO* 和 *HaFT2* 遗传距离最近。RT-PCR 表明, 长日照下的菊花叶片中几乎检测不到 *CmCO* 和 *CmFT*, 而在短日照下, *CmCO* 在花芽分化启动期 (I) 表达, 总苞鳞片分化前期 (II) 有所下降随后又迅速升高; *CmFT* 在 *CmCO* 之后表达, 之后持续高表达。选择小花原基分化前期 (IV) 对菊花叶片、花芽和茎等不同组织器官 *CmCO* 和 *CmFT* 表达进行分析, 结果表明, *CmCO* 在叶片中表达量最高, 花芽次之, 茎最低; *CmFT* 在花芽中表达量最高, 叶片次之, 茎最低。由此推测 *CmCO* 和 *CmFT* 的表达与光周期诱导菊花成花密切相关。

关键词: 菊花; 光周期; 开花; *CO*; *FT*

中图分类号: S 682.1[†]

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 06-1129-10

Cloning and Expression of *CmCO* and *CmFT* of Floral Development Genes in *Chrysanthemum*

TIAN Su-bo, LIN Gui-yu, ZHENG Cheng-shu*, SUN Xia, REN Hong-yan, and WEN Li-zhu

(College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: The genes of *CO* (*CONSTANS*) and *FT* (*FLOWERING LOCUS T*), which related to flowering time were isolated from *Chrysanthemum morflorum* (Ramat.) Kitam. ‘Jinba’ by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE), and named it *CmCO* (GenBank accession No. JF488070) and *CmFT* (GenBank accession No. JF488071) respectively. *CmCO* and *CmFT* encoded 382 and 174 amino

收稿日期: 2011-03-09; 修回日期: 2011-04-30

基金项目: 教育部留学回国人员基金项目 (23406); 山东省自然科学基金项目 (2009ZR09003)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zcs@sdau.edu.cn)

acids respectively. Alignment analysis showed that CmCO protein had typical structures of CO homologous protein, including B-box1, B-box2, CCT domain and COOH region. The deduced amino acid sequence of CmFT contained FT-like protein's conserved motifs and two critical amino acid residues. Homologous analysis showed that the homology of CmCO compared with FaCO (*Fragaria × ananassa*) was the highest by 65.8%, and with PsCOL (*Pisum sativum*) and AtCO (*Arabidopsis thaliana*) were by 62.0% and 55.6%. The homology of CmFT compared with HaFT2 (*Helianthus annuus*) was the highest by 93.7%, and with VvFT (*Vitis vinifera*) and with AtFT (*Arabidopsis thaliana*) were 85.1% and 74.0%. Evolutionary tree clustering analysis indicated that the genetic distances between CmCO protein and HaCOL (*Helianthus annuus*) and HaFT2 were the shortest respectively among others. RT-PCR analysis showed that expression of CmCO and CmFT in the leaves of chrysanthemum almost didn't observed under long-day conditions, but under short-day conditions, CmCO expressed at initial stage of floral bud differentiation (I), then decreased at the stage of involucre primordial differentiation (II) followed by a quick rise. CmFT expressed followed by the CmCO expression, and then kept to high expression. The expression of CmCO and CmFT at the leaves, floral buds and stems of chrysanthemum at initial stage of floret primordial differentiation (IV) indicated that the expression of CmCO in leaves of chrysanthemum was the highest, and it in the floral buds lower, and it in stems the lowest. The expression of CmFT in the floral buds was the highest, and in the leaves lower, and in stems the lowest. The results presumed that the expressions of CmCO and CmFT were related with flowering of chrysanthemum induced by photoperiods.

Key words: chrysanthemum; photoperiod; flowering; CO; FT

开花是植物从营养生长向生殖生长的转变过程。开花相关基因的表达是实现这一转变的基础,环境因子以及细胞自身的生长状况对这些基因的表达起着调控作用(Yasushi & Weigel, 2007)。菊花(*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)属于短日照植物,对光周期信号非常敏感,并对其作出适应性反应(王文莉等, 2010)。FT是光周期途径植物开花时间关键基因,其表达产物可能就是开花刺激物质,即开花素(florigen)(Abe et al., 2005; Laurent et al., 2007),目前已在地被菊中分离出FT同源基因(潘才博等, 2010),并把拟南芥FT基因转入菊花证明其表达可促进菊花提早开花(姜丹等, 2010)。而FT的表达直接受生物节律钟调控的CO基因所调节(田素波等, 2010)。已有研究表明,长日照条件下拟南芥CO高表达时,FT表达增加,促进开花(Suarez-Lopez et al., 2001)。水稻的CO同源基因Hd1,在短日照下促进FT同源基因Hd3a的表达,促进开花;而在长日条件下抑制Hd3a的表达,则延迟开花(Kojima et al., 2002)。Böhlenius等(2006)研究CO和FT的关系表明,无论长日照或是短日照,CO/FT基因组合在毛白杨开花诱导中共同起着重要的调控作用。本试验中试图克隆菊花中CO和FT基因,并分析其在光周期诱导菊花开花过程中的时空表达模式,旨在深入研究CO和FT基因功能,为通过转基因技术调节菊花花期和培育菊花新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其处理

试验于2009年3—7月在山东农业大学园艺实验站和山东农业大学园艺科学与工程学院实验中心进行。取菊花品种‘神马’(*Chrysanthemum moriflorum* ‘Jinba’)扦插苗定植于花盆中(1盆1株),在长日照条件下经过35 d营养生长后,挑选生长健壮、长势一致的植株分两组,分别放进两个人工

气候室中, 进行长日照 (16 h/8 h, LD) 和短日照 (8 h/16 h, SD) 处理, 昼/夜温 22 °C/18 °C; 相对湿度 65%; 光照强度 $110 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。处理后, 每隔 2~3 d 切取顶芽, 在解剖镜下剖芽观察并结合徒手切片, 用生物倒置显微镜观察花芽形态分化进程。由于个体间花芽形态分化差异, 每次取 5 个芽观察, 以出现频率 3 次以上的形态作为该阶段某一个花芽形态分化时期。菊花花芽分化分为 7 个时期 (王文莉 等, 2010): 花芽分化启动期 (I)、总苞鳞片分化前期 (II)、总苞鳞片分化后期 (III)、小花原基分化前期 (IV)、小花原基分化后期 (V)、花瓣分化前期 (VI) 和花瓣分化后期 (VII), 分别从长日照和短日照处理植株中取生长点和第 5~6 节位成熟叶片; 另在 IV 期分别取叶片、花芽和茎段 (第 5~6 节位)。样品立即用液氮速冻, 置于 -80 °C 冰箱备用。

1.2 RNA 提取和纯度检测

总 RNA 分离用 Trizol 试剂盒说明书进行。分别取上述材料各 50~100 mg 用液氮研磨后, 加入 1 mL Trizol 缓冲液, 按其说明书进行。最后 RNA 溶于 20 μL DEPC H_2O 中, 用 DNase I (Promega) 处理后, 取各时期叶片和顶芽总 RNA 各 1 μL 混合 (用于基因克隆)、取各时期叶片总 RNA 各 1 μL (用于不同花芽分化期表达分析)、取 IV 期叶片、花芽和茎段总 RNA 各 1 μL (用于不同组织器官表达分析), 用于 cDNA 合成。cDNA 第一链合成采用 Oligo dt (18) 和 M-MLV 逆转录酶 (Promega), 反应体系按照其说明书进行。用琼脂糖凝胶电泳和 eppendorf 生物分光光度计分析纯度和产量。

1.3 菊花 *CmCO* 和 *CmFT* 基因克隆及全长的获得

取上述 cDNA 作为模板, 用于基因扩增。根据 *CO* 类似基因保守区序列设计一对引物 CO-F1: 5'-ATBCAYTCCGCWAAAYCC-3' 和 CO-R1: 5'-TCTGGHACMABWCYRACATCC-3', 以 cDNA 第一链作模板进行 PCR 扩增。扩增产物回收、纯化, 连接 pMD-18 载体 (TaKaRa), 转化大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆并测序 (北京华大公司)。根据获得序列, 设计 3' RACE 3 个正向引物。CO-rF1-3': 5'-AGCGTAGTGCCAGTTGGAGGT-3'; CO-rF2-3': 5'-TGAGGCTTCAAATG GTGGCTA-3'; CO-rF3-3': 5'-CAGATGCCAACGCAACTTACTC-3'。按 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 (TaKaRa) 说明书进行操作, 获得 3'端序列。将保守区序列和 3' RACE 序列进行拼接, 按 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 说明书设计两个反向引物。CO-r3-5': 5'-TGACCC TTGGGGAAAAACCT-3'; CO-r4-5': 5'-CGTAGACCCTGAAATAGGAATAACC-3', 获得 5'端序列。根据 3'端和 5'端拼接序列设计两条特异引物 CO-F: 5'-ATGTTGAAACAAGAG AGTAAC-3'; CO-R: 5'-AACCAAACTGGAAAGTTTGC-3'。进行 PCR 扩增, 克隆、测序, 获得该基因全长序列。

扩增 *CmFT* 的引物为 FT-F: 5'-TCCCGTTTTTACATAATGCC-3' 和 FT-R: 5'-AATATGATGTGCGTG CTTTC-3', 进行 PCR 扩增, 克隆、测序, 获得该基因全长序列。

1.4 序列比较和分子进化树构建

得到的序列去除载体序列后用 BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源序列分析, 用 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Clustalw/>)、MEGA 4.0 和 DNAMAN 进行多序列比对和构建分子进化树。

1.5 RT-PCR 分析

从长日照和短日照处理的不同花芽分化期叶片、花芽以及茎 (仅在小花原基分化前期) 中提取总 RNA 后, 分别合成 cDNA 第 1 链, 扩增 *CmCO* 基因的引物为片段 CO-F1: 5'-CCCAAGGGTCAGAC GGAA-3' 和片段 CO-R1: 5'-TGAAGCCTCATAACATCCC-3'; 扩增 *CmFT* 基因的引物即为扩增全长的引物, 然后用对应于 *CmCO* 和 *CmFT* 的引物组合进行 RT-PCR 分析, PCR 反应条件同上。用菊花

Actin(AB205087)基因作对照。扩增 *Actin* 基因的引物为 Actin-F: 5'-AACTGGCATTGTGTTGGATTCTG-3'和 Actin-R: 5'-CCAATCATAGACGGCTGGAAAA-3'。PCR 反应的退火温度为 54 ℃。重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取和检测

经电泳检测,所提取 RNA 的 28S 和 18S 条带清晰,说明 RNA 完整性良好,纯度高。用 Actin-F、Actin-R 对 cDNA 进行 PCR 扩增均得到 359 bp 的产物,说明反转录得到的 cDNA 第 1 链结果良好。

2.2 *CmCO* 基因克隆及序列分析

利用引物 CO-F1 和 CO-R1, 以上述的 cDNA 为模板进行扩增, 获得 575 bp 保守中间片段(图 1)。经 BLAST 分析, 发现该片段与大多数 *CO* 类似基因高度同源。用引物 CO-F1-3'和 CO-F2-3'进行 3'RACE, 获得了该基因 199 bp 3'端序列; 用引物 CO-F2-3'和 CO-F3-3'再次进行 3'RACE, 获得了该基因 350 bp 3'端序列, 与已知片段进行拼接, 获得了 *CO* 类似基因 3'端部分蛋白编码序列。通过 5'RACE 获得了 460 bp 5'端序列。

测序结果表明, 该序列中 1 149 bp 的开放阅读框编码 382 个氨基酸(图 2)。

通过氨基酸序列比对(图 3)发现, *CmCO* 中含有两个完整的 B-box, 属于 *CO* 基因家族的第 1 类。其具有完整的植物 *CO* 蛋白的结构, 含有 B-box1、B-box2、CCT 结构域及 COOH 区域 4 个高度保守的区域, 其中两个 B-box 与 CCT 结构域组成了典型的锌指结构。B-box 和 CCT 结构域中含有 *CO* 功能必不可少的氨基酸残基, 同时 CCT 结构域中还含有核定位信号。同源性比对表明, *CmCO* 基因与草莓 (*Fragaria × ananassa*) 基因同源性最高, 为 65.8%, 与豌豆 (*Pisum sativum*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 同源性依次为 62.0%和 55.6%。

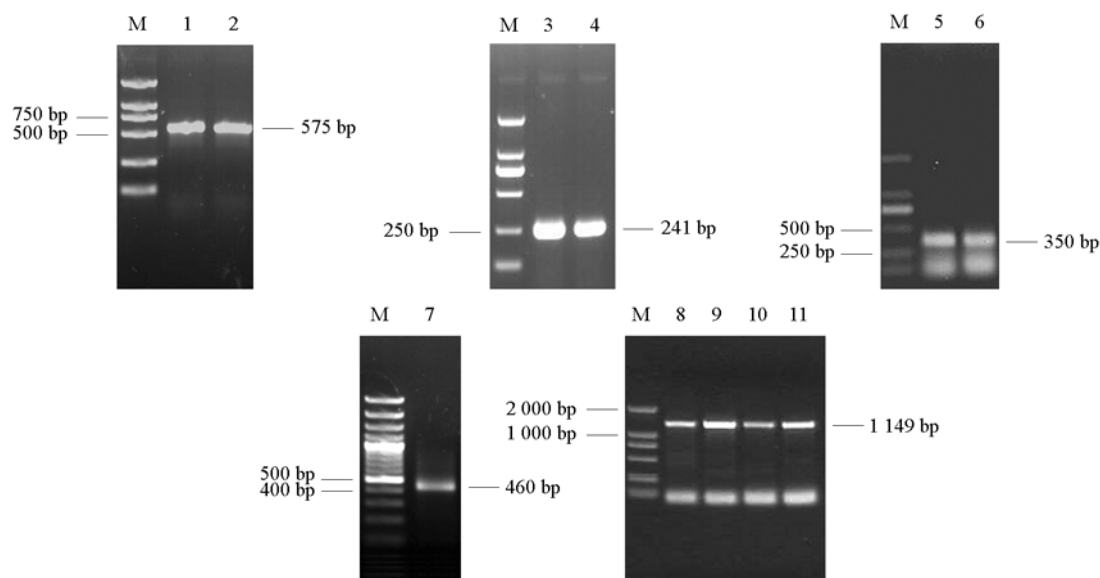


图 1 *CmCO* 基因的中间片段、3' RACE、5' RACE 和全长扩增

M: DNA marker; 1, 2: 中间片段扩增产物; 3~6: 3' RACE 扩增产物;
7: 5' RACE 扩增产物; 8~11: *CmCO*。

Fig. 1 Amplification of the middle fragment, 3' end, 5' end and full length of *CmCO* cDNA

M: DNA marker; 1, 2: PCR products of the middle fragment; 3~6: PCR products of 3' RACE;
7: PCR product of 5' RACE; 8~11: *CmCO*.

1 ATGTTGAAACAAGAGAGTAACATTAACGCTAGTGGAGCGAACAGTTGGGCACGACTCTGTGACACATGCCGGTCAGCTCCCTGCACCGGTGATTGCGGA
 1 M L K Q E S N I N A S G A N S W A R L C D T C R S A P C T V Y C R
 100 GCAGATTCTGCTACTTGTGCGCCGGCTGTGATGCCATGTTACAGCTGCCAATCGTTGCTTCCCGCCATAAACCGCTCAGGGTCTGCGAGGCGGTG
 26 A D S A Y L C A G C D A H V H A A N R V A S R H K R V R V C E A C
 199 GAGCGTCTCAGCTGCTTTTATGTAAGGCAGATGACGCTCTCTTTTGACCCGCTGTGATGAGATATCTACTCTGCAAAACCTCTGACGACGCG
 51 E R A P A A F L C K A D A A S L C T A C D A D I H S A N P L A R R
 298 CACCAACGTGTCCCGTTATTCCTATTCAGGGTCTACGATGAATCTCAAGGCAAGTTTTTCCCAAGGGTCAGACGGAACGTGTAATAAAGAAGAA
 76 H Q R V P V I P I S G S I Y E S Q G R F F P Q G S D G T V N K E E
 397 GAAGACGAAGCAGCTGCTGCTGCTATTCGATACCTCTGCTAAACAAACAAACAAAGAAATACGAACGAGTTTTGTTTATGAGAGGGGGGT
 126 E D E A A S W L L F D T P A K N N Q N Q E Y T N E F L F N G E G G
 496 GTAGTGAGTATTTGGATCTTGGACTACAATCTTGTCAAGATCTCAGTTTGTGATGATCATAATGCAATAATTGCAATTGATGATGACTAT
 151 V D E Y L D L V D Y N S C Q D T Q F S D D H K C N N L Q F N D D Y
 595 AAGTATCAGATGATGTTACTAATTATAGTAAGGATATGCGGAAGTATGGCAGAGGTGATGCAGATAGCGTAGTGCCAGTTGGAGGTGGAGAGGTAAG
 176 K Y T N D V T N Y S K D M R K Y G R G D A D S V V P V G G E A K
 694 AAGGAGCATCAAAATTATGATCTTCAACATCAAAAATTCAATTGGATGTGATTATGAGGCTTCAATGGTGGCTACAGCTACCTGCTTCA
 226 K E H Q I Y D L N F Q H Q K F Q L G C D Y E A S N G G Y S Y P A S
 793 CGTGGCTATAGTGTTCATGTCATCCTGGATGTGGAGTAGTACCAGAATCTTCAATCTCAAGTTCAAGATCTCAAAAGGGACAACTGACTTATTC
 251 R G H S V S M S S L D V G V V P E S S I S S S R S S K G T T D L F
 892 TCAGGTACTTCAATTGAGATGCCAACGCAACTTACTCCGTTAGACAGAGAGGCAAGATCTTGTGTTACAGGGAAGAAAGAAACAAGAAATTTGAG
 276 S G T S I Q M P T Q L T P L D R E A R V L S Y R E K K K T R K F E
 991 AAAACGATTAGGTACGATCTAGAAAAGCGTATGAGAAACAAAGGCC TAGGATCAAGGCCGTTTCTCAAGCGCAACAAATGTTGATGTGAGGTTGAGT
 326 K T I R Y A S R K A Y A E T R P R I K G R F S K R T N V D V E V D
 1090 CAAATGTTTTCGACAACTTAATGACAGAAGCGGATATGTAATGTTCCCTCGTTTAAATGATGTTAGGAGCAATAGATGCCAATATGTAACGTG
 351 Q M F S T T L M T E G G Y C I V P S F *
 1189 TTTTTCATTCAAGTCATGAGGTTATATAGTAAATCTCGTAACGTATGTTCAACGCTTCTCATTTCCTAAATGCAAGCAAACTTCCAGTTTGG
 1288 TT

图2 菊花 *CO* 基因全长 cDNA 核苷酸序列及推导氨基酸序列

* 代表终止密码子。

Fig. 2 The full length cDNA nucleotide acid sequence and deduced amino acid sequence of *CmCO* gene of chrysanthemum

* Stop codon is indicated by asterisk.

草莓	<i>Fragaria × ananassa</i> – FaCOMLKEESNG. AAANSV.....CTICRSAPCHV.....CHACSAYLSCCLATI.....HANRVASRHERVSVCE.....CERAPAAFLC	74
豌豆	<i>Pisum sativum</i> – PsCOLMLECKHITTTTAT. VRSATVTRICCTICRSAPCHV.....CHACSAYLSCCLATI.....HANRVASRHERVSVCE.....CERAPAAFLC	79
菊花	<i>Chrysanthemum</i> – CmCOMLCESINASGNSV.....CTICRSAPCHV.....CHACSAYLSCCLATI.....HANRVASRHERVSVCE.....CERAPAAFLC	75
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i> – AtCOMLCESINISGSEN.....CTICRSAPCHV.....CHACSAYLSCCLATI.....HANRVASRHERVSVCE.....CERAPAAFLC	75
B-box1 CX2C X8 C X7 CX2C X4H X8 H CX2C X8 C			
草莓	<i>Fragaria × ananassa</i> – FaCOLADASLQCTCDALHSANPLARRHQRVPIPIISGCCIAVGSPTAITTEGFLS.....CEGDEEVMEDEEEDFAASVL	148
豌豆	<i>Pisum sativum</i> – PsCOLLADASLQSSCDALHSANPLARRHQRVPIPIISGCCIAVGSPTAITTEGFLS.....CEGDEEVMEDEEEDFAASVL	158
菊花	<i>Chrysanthemum</i> – CmCOLADASLQCTCDALHSANPLARRHQRVPIPIISGSTVES.....CGREFP.....QGSDEGTVNKEEEDFAASVL	140
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i> – AtCOLADASLQCTCDALHSANPLARRHQRVPIPIISNFSMTITHEGSEKNTLPEKRLVVDCEEGEGCKLAKENASVL	155
X7 CX2C X4H X8 H B-box2			
草莓	<i>Fragaria × ananassa</i> – FaCOLLNPVN.....SNNHNSNNNPNNNNGHFLGVE.....DEYLLVMSNSSEDCNQSGTTATN.....DQHNVCVPHK	213
豌豆	<i>Pisum sativum</i> – PsCOLLLNPVN.....SNNHNSNNNPNNNNGHFLGVE.....DEYLLVMSNSSEDCNQSGTTATN.....DQHNVCVPHK	231
菊花	<i>Chrysanthemum</i> – CmCOLFTPAK.....NNQNE. YTNELHNGGG.....DEYLLVMSNSSEDCNQSGTTATN.....DQHNVCVPHK	205
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i> – AtCOLFTPAK.....NNQNE. YTNELHNGGG.....DEYLLVMSNSSEDCNQSGTTATN.....DQHNVCVPHK	206
CCT domain			
草莓	<i>Fragaria × ananassa</i> – FaCOISLGGDSVVE. VCYGGKVTCAACCKNH.....QLGNESSKAAACD.....SLSHTSVSSNDVCVVPSTLM	281
豌豆	<i>Pisum sativum</i> – PsCOLCCRCHYGVPCNNVGSVVPVQCCLNF.....QLGNESSKAGESNGASISCSNVSSNDVCVVPSTLM	300
菊花	<i>Chrysanthemum</i> – CmCONYSKDMRTGRGLAESVVPVGGGEAKKHCIYELNFGCHKF.....QLGNESSKAGESNGASISCSNVSSNDVCVVPSTLM	283
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i> – AtCOSYGGERVVE.....LKELESRCHECHNCH.....QENRYGSSGTHNNG.....SINNAVYSSNDVCVVPSTLM	270
COOH region			
草莓	<i>Fragaria × ananassa</i> – FaCOSEMS. VCHFTPKCTILDFNGTICMP.....TCLSPNREARVLYREKRTKFEKTI.....RYASRKAYAE.....RPRNCRFPKR	358
豌豆	<i>Pisum sativum</i> – PsCOLREATTMYSRPSKGTILDFSAPIICML.....SHFSPNREARVLYREKRTKFEKTI.....RYASRKAYAE.....RPRNCRFPKR	378
菊花	<i>Chrysanthemum</i> – CmCOISSSSSSKGTILDFSGTICMP.....TCLTPNREARVLYREKRTKFEKTI.....RYASRKAYAE.....RPRNCRFPKR	356
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i> – AtCOCVTILASHTPTKGTIVCCPLDASCMITVITCLSPNREARVLYREKRTKFEKTI.....RYASRKAYAE.....RPRNCRFPKR	348
草莓	<i>Fragaria × ananassa</i> – FaCOEIEVEVITQFSTLUNGCTCYGIVPVS	384
豌豆	<i>Pisum sativum</i> – PsCOLEVEAEVITQFSTLUNGCTCYGIVPVS	404
菊花	<i>Chrysanthemum</i> – CmCONVTVEVITQFSTLUNGCTCYGIVPVS	382
拟南芥	<i>Arabidopsis thaliana</i> – AtCOEIEAEVITQFSTLUNGCTCYGIVPVS	373

图3 *CmCO* 基因的推测氨基酸序列与其他植物 CO 蛋白的多序列比对Fig. 3 Alignment s of the *CmCO* deduced amino acid sequences with those of other plants

系统进化树分析表明, 菊花 *CmCO* 与向日葵 (*Helianthus annuus*) *HaCOL* 亲缘关系最近, 与大豆 (*Glycine max*) 和豌豆 (*Pisum sativum*) *PsCOL* 亲缘关系较近, 与黑麦草 (*Lolium perenne*) *LpCOL* 和版纳龙竹 (*Dendrocalamus xishuangbannaensis*) *DxCOL* 亲缘关系最远。

2.3 *CmFT* 基因克隆及序列分析

利用引物 FT-F 和 FT-R, 以上述不同花芽分化期的叶片和顶芽混合组织的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到 *CmFT* 全长序列, 长度为 608 bp (图 4)。该基因序列中 525 bp 的开放阅读框可编码 174 个氨基酸 (图 5)。

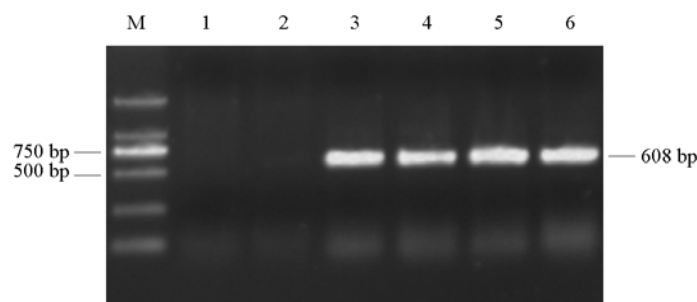


图 4 *CmFT* 基因全长扩增

M. DNA marker; 1, 2. 单引物扩增产物; 3~6. *CmFT*。

Fig. 4 Amplification of the full length of *CmFT* cDNA

M. DNA marker; 1, 2. PCR product of single primer; 3 - 6. *CmFT*.

```

1  TCCCGTTTTTACATAATGCCGAGGGATAGGAAATCATTGGTTGTTGGACGTGTAATTGGC
1      M P R D R K S L V V G R V I G
61  GATGTTCTTGATAGTTTCACCAAGTCAATCAACCTCTCTGTGTCTATAATGATAGGGAA
21  D V L D S F T K S I N L S V S Y N D R E
121 GTTGCTAACGGGTGTGAGCTAAAACCTCTAAGGTTGTGAACCAACCGAGAGTTGATATC
41  V A N G C E L K P S K V V N Q P R V D I
481 GGAGGTGATGATATGCGCGCATTTACACATTAGTGATGGTAGATCCTGATGCTCCAAGT
61  G G D D M R A F H T L V M V D P D A P S
241 CCTAGTGACCTAACTTAAGGGAATACCTTACTGTTGTTACTGATATTCCAGCGACA
81  P S D P N L R E Y L H W L V T D I P A T
301 ACAGGAGCACAGTTTGGTCAAGAAATTGTGTGCTATGAGAGCCCAAGGCCATCAATGGGA
101 T G A Q F G Q E I V C Y E S P R P S M G
361 ATTCATCGCATGGTTTTTGTGCTATTCGGCAATTGGGTCGACAACTGTGTACGCCCA
121 I H R M V F V L F R Q L G R Q T V Y A P
421 GGATGGCGCCAGAACTTCAACACCAAGACTTTGCGGAGCTCTACAACCTCGGATCTCCA
141 G W R Q N F N T K D F A E L Y N L G S P
481 GTAGCCGCGGTTATTTTAAGTGTCAACGGGAAAGTGATTGTTGGTGACGACGGAGATAA
161 V A A V Y F N C Q R E S G F G G R R R *
541 GATATATGGAATGTCATGCCATGCACATGACGTTACAAATACATATT GAAAGCACGCAC
601 ATCATATT
  
```

图 5 菊花 *FT* 基因全长 cDNA 核苷酸序列及推导氨基酸序列

* 代表终止密码子。

Fig. 5 The full length of cDNA nucleotide acid sequence and deduced amino acid sequence of *CmFT* gene of chrysanthemum

* Stop codon is indicated by asterisk.

BLAST 分析表明, 菊花 *CmFT* 基因编码氨基酸序列与地被菊 (*Chrysanthemum morifolium*) *CmFT*、向日葵 (*Helianthus annuus*) *HaFT2*、葡萄 (*Vitis vinifera*) *VvFT* 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *AtFT* 等大多数双子叶植物 *FT* 类似基因的同源性可达 74%。通过氨基酸序列比对 (图 6) 发现菊花

CmFT 中包含区分 FT 和 TFL1 蛋白的关键氨基酸残基酪氨酸 (Y)、谷氨酰胺 (Q)，且具有 FT 类蛋白的两个保守基序即 14 个保守氨基酸序列 (LGRQTVYAPGWRQN) 和 LYN/IYN 三联体 (Ahn et al., 2006)。

进一步分析菊花 *CmFT* 与其它双子叶植物 FT 类似蛋白的进化关系，结果表明，*CmFT* 与同属于菊科的向日葵 *HaFT2* 基因聚为一类，遗传距离最近，与牵牛 (*Ipomoea nil*) *InFT1* 遗传距离较远。

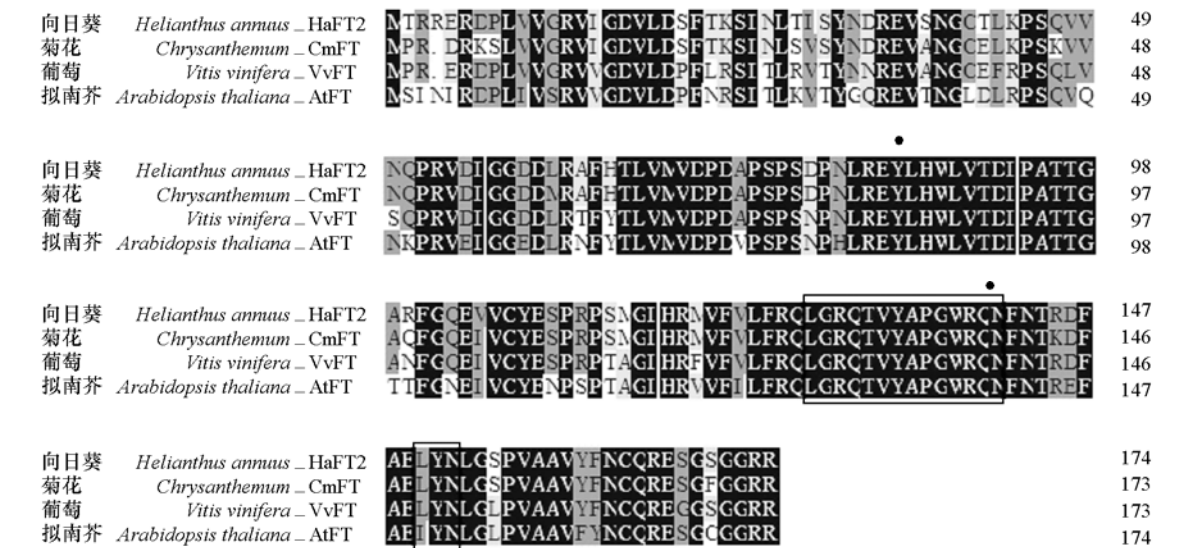


图 6 *CmFT* 与不同植物 FT 蛋白家族部分氨基酸序列比对分析

• 代表区分 FT 和 TFL1 蛋白的关键氨基酸残基，黑色框表示鉴别 FT 基因的保守基序。

Fig. 6 Comparison of partial proteins with *CmFT* homologous proteins of different plants

• Circular indicate amino acids that are critical to define FT or TFL1-like proteins.
Black box mean identifying the conservative base of *FT* gene sequences.

2.4 *CmCO* 和 *CmFT* 基因在菊花不同花芽分化期表达分析

在长日照下 *CmCO* 和 *CmFT* mRNA 几乎未检测到 (菊花 β -actin 为内参基因)。在短日照下，菊花花芽分化启动期 (I) 检测到 *CmCO* 表达，之后在总苞分化前期 (II) 和总苞分化后期 (III) *CmCO* 表达下调，在小花原基分化前期 (IV) 和小花分化后期 (V) 高丰度表达，之后花瓣分化前期 (VI) 和花瓣分化后期 (VII) 表达量逐渐下降；而 *CmFT* 在 I 期未检测到，在 II 期发现有所表达，之后从 IV 期开始表达迅速上调，直到 VII 期均高丰度表达 (图 7)。

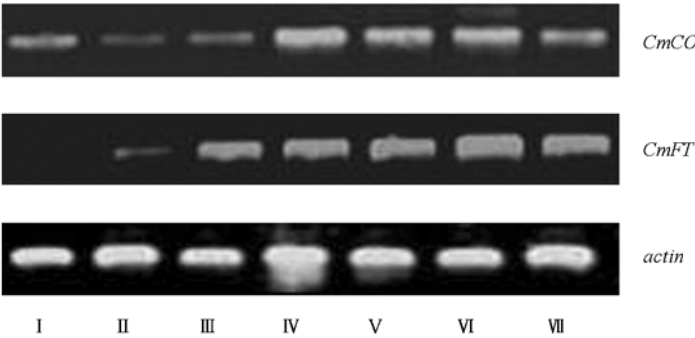


图 7 菊花花芽分化期叶片中 *CmCO* 和 *CmFT* 的 RT-PCR 分析

Fig. 7 RT-PCT analysis of genes of *CmCO* and *CmFT* of chrysanthemum

2.5 *CmCO* 和 *CmFT* 基因在菊花不同组织器官中的表达分析

由于在小花原基分化前期(IV) *CmCO* 和 *CmFT* mRNA 表达量均较高,因此,选择此时期对叶片、花芽和茎中 *CmCO* 和 *CmFT* 基因进行了半定量表达分析(图 8),结果表明,长日照处理的菊花叶片、花芽和茎中的 *CmCO* 和 *CmFT* mRNA 表达丰度均极低(菊花 β -actin 为内参基因);短日照处理的菊花叶片、花芽和茎中 *CmCO* mRNA 表达量存在明显的差异,叶片中 *CmCO* 表达量最高,花芽次之,茎中的表达量最低;*CmFT* mRNA 表达量在叶片、花芽和茎中也存在差异,花芽中 *CmFT* 表达量最高,叶片次之,茎的表达量最低。

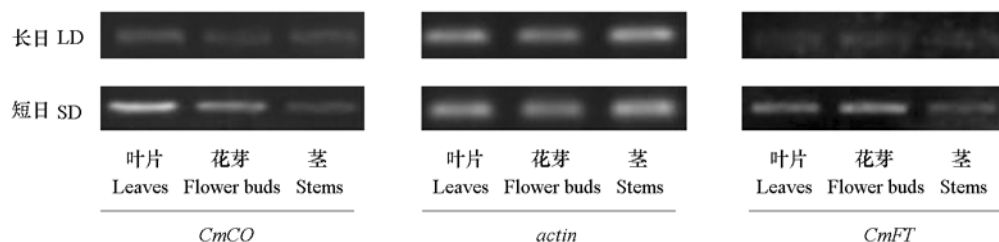


图 8 *CmCO* 和 *CmFT* 基因在菊花叶片、花芽和茎中的 RT-PCR 分析

Fig. 8 RT-PCR analysis of genes of *CmCO* and *CmFT* in the leaves, flower buds and stems of chrysanthemum

3 讨论

已有大量研究表明, *CO* 基因是光周期调节植物开花途径的下游关键性基因之一,其表达受生物钟的调节(Liu et al., 2001)。虽然拟南芥、豌豆和草莓等植物表现为不同的光周期习性,但它们都有 *CO* 同源基因,而且在 CCT 基序和 B-box 型锌指结构处高度保守(Yasue et al., 2003)。B-box 保守区是一类锌指结构,常与其它的 motif 结合共同起作用,如 RING zinc finger、NHL motif、RFP domain 等, CCT domain 结构含有丰富的基本氨基酸,其后端区域含有核定位信号(Putterill et al., 1995)。本试验克隆的菊花 *CmCO* 基因也具有完整的两个 B-box 型锌指蛋白结构、CCT 基序和 COOH 结构域,这说明菊花中克隆的 *CmCO* 是一个具有生物功能的受生物钟调节的 *CO* 类似基因,并编码一个完整的转录因子(Robson et al., 2001)。

Kobayashi 等(1999)研究表明, *FT* 为编码磷脂酰乙醇胺结合蛋白(PEBP)的基因家族成员,该家族可分为两个亚家族(*FT/TFL*)。在拟南芥中共有 6 个成员,除 *FT* 外,还包括 *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*、*TWIN SISTER OF FT (TSF)*、*ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS (ATC)*、*BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)* 和 *MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT)* (Yamaguchi et al., 2005)。FT 和 TFL1 蛋白在开花中扮演相反的功能(Ahn et al., 2006)。FT 可促进拟南芥提前开花,而 *TFL1* 则延迟开花(Mimida et al., 2001)。FT 和 TFL1 蛋白有 59% 同源性,但在 PEBP 域中仅改变一个关键氨基酸就能使 FT 与 TFL1 功能互相转换(Hanzawa et al., 2005)。本试验克隆得到的菊花 *CmFT* 与大多数双子叶植物 *FT* 类似基因的同源性较高,氨基酸序列中包含区分 FT 和 TFL1 蛋白的关键氨基酸残基和保守基序,系统进化分析进一步说明菊花 *CmFT* 属于 *FT* 亚家族成员, *CmFT* 的激活可以促进菊花提早开花(郭春晓等, 2009)。

Kojima 等(2002)研究表明,水稻中 *CO* 同源基因 *Hd1*,在短日照下促进水稻中 *FT* 同源基因 *Hd3a* 的表达,从而促其提早开花;而在长日条件下抑制 *Hd3a* 的表达,从而延迟开花。Hayama 等(2007)研究表明,牵牛中 *FT* 同源基因,在短日照下被激活,长日照下几乎检测不到。本试验结

果表明, 长日照下 *CmCO* 和 *CmFT* mRNA 几乎未检测到, 在短日条件下表达量明显增加, 这说明 *CmCO* 和 *CmFT* 与短日照促进菊花开花密切相关; 而且在短日照下, *CmCO* 首先表达 (I 期), 而 *CmFT* 延迟表达 (II 期), 这一结果推测在菊花叶片中可能先启动 *CmCO*, 再由 *CmCO* 激活 *CmFT* 的表达, 从而引起菊花开花 (Suarez-Lopez et al., 2001; Kojima et al., 2002; 田素波 等, 2010)。王文莉等 (2010) 研究菊花花芽分化期叶片 Ca^{2+} 含量的动态变化结果表明, 在花芽未分化期叶片 Ca^{2+} 含量较低, 此时, 亚细胞定位观察也发现 Ca^{2+} 沉淀主要分布在液泡、细胞壁和细胞间隙中, 细胞质内积累较少; 而在花芽分化启动期叶片 Ca^{2+} 水平迅速提高并达到高峰, 之后有所下降并保持稳定水平, 同时电镜观察到 Ca^{2+} 沉淀在细胞质内大量积累。本研究在花芽未分化和花芽分化启动期均未检测到 *CmFT* 表达, 在总苞分化前期微弱表达, 之后从总苞分化后期开始表达迅速上调, 直到 VII 期均高丰度表达。这可能说明在菊花花芽分化过程中 Ca^{2+} 信号的传递在先, *CmFT* 基因表达在后。本研究中菊花的 *CmFT* 基因表达趋势与大麦 (*Hordeum vulgare*) *HvFT4* 在长日照下的表达趋势 (Faure et al., 2007) 相似; 与大豆 (*Glycine max*) 随着短日照处理时间的延长 *GmFT* 表达增加的趋势 (沙爱华 等, 2006) 相同。但 *CmCO* 在总苞分化前期 (II) 和总苞分化后期 (III) 出现表达下降, 之后再回升, 而 *CmFT* 从 III 期开始才迅速增加。这种菊花 *CmCO* 和 *CmFT* 表达的不同步性之间的关系及其机制还需要进一步研究。

本试验还选择短日条件下 *CmCO* 和 *CmFT* 表达量均较高的小花原基分化前期 (IV) 观察了菊花 *CmCO* 和 *CmFT* mRNA 在叶片、花芽和茎中的表达差异。结果表明, 短日条件下, *CmCO* 在叶片中表达量最高, 茎中较弱, 这与叶雪凌等 (2008) 研究番茄 *SlCOI* 在叶片中高表达, 在茎中表达丰度低的结果相同。*CmFT* 则在花芽中表达量最高, 叶片次之, 茎中最低, 这与 Fan 等 (2010) 研究的 *SlFT* 在不同组织中的表达特性一致, 而与潘才博等 (2010) 研究的 *FT* 类似基因在菊花不同组织中的 mRNA 转录水平稍有不同, 原因可能与菊花品种或试材所取时期的差异有关。另外, 本试验发现 *CmCO* 不仅在叶片中高表达, 而且在花芽中也有所表达, 并在茎中还有微弱表达, 说明不同植物种类 *CO* 类似基因在不同器官的表达差异较大, 其机理需进一步研究。

References

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, 309: 1052 - 1056.
- Ahn J H, Miller D, Winter V J, Banfield M J, Lee J H, Yoo S Y, Henz S R, Brady R L, Weigel D. 2006. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J*, 25: 605 - 614.
- Böhlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Eriksson S, Parcy F. 2006. *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, 312: 1040 - 1043.
- Fan Chun-yuan, Yin Jing-ming, Wang Bing, Zhang Yun-feng, Yang Qing. 2010. Molecular cloning and expression analysis of a *FT* homologous gene from *Solanum tuberosum*. *Agricultural Sciences in China*, 9 (8): 1133 - 1139.
- Faure S, Higgins J, Turner A, Laurie D A. 2007. The *FLOWERING LOCUS T*-like gene family in barley (*Hordeum vulgare*). *Genetics*, 176: 599 - 609.
- Guo Chun-xiao, Tian Su-bo, Zheng Cheng-shu, Wang Wen-li, Sun Xian-zhi. 2009. *FT* gene of flowering determination of plants in photoperiod pathway. *Genomics and Applied Biology*, 28 (3): 613 - 618. (in Chinese)
- 郭春晓, 田素波, 郑成淑, 王文莉, 孙宪芝. 2009. 光周期途径植物开花决定关键基因 *FT*. *基因组学与应用生物学*, 28 (3): 613 - 618.
- Hanzawa Y, Money T, Bradley D. 2005. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 102 (21): 7748 - 7753.
- Hayama R, Agashe B, Luley E, Yano M, Shimamoto K. 2007. A circadian rhythm set by dusk determines the expression of *FT* homologs and the short-day photoperiodic flowering response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19: 2988 - 3000.

- Jiang Dan, Liang Jian-li, Chen Xiao-li, Hong Bo, Jia Wen-suo, Zhao Liang-jun. 2010. Transformation of *Arabidopsis* flowering gene *FT* to from cut chrysanthemum 'Jinba' by *Agrobacterium* mediate. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (3): 441 - 448. (in Chinese)
- 姜 丹, 梁建丽, 陈晓丽, 洪 波, 贾文锁, 赵梁军. 2010. 拟南芥花期基因 *FT* 转化切花菊 '神马'. *园艺学报*, 37 (3): 441 - 448.
- Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 286 (5446): 1960 - 1962.
- Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, Monna L, Sasaki T, Araki T, Yano M. 2002. *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis* *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hdl* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol*, 43: 1096 - 1105.
- Laurent C, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316: 1030 - 1033.
- Liu J, Yu J, McIntosh L, Kende H, Zeevaart J A. 2001. Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering. *Plant Physiol*, 125 (4): 1821 - 1830.
- Mimida N, Goto K, Kobayashi Y, Araki T, Ahn J H, Weigel D, Murata M, Motoyoshi F, Sakamoto W. 2001. Functional divergence of the *TFL1-like* gene family in *Arabidopsis* revealed by characterization of a novel homologue. *Genes Cells*, 6 (4): 327 - 336.
- Pan Cai-bo, Zhang Qi-xiang, Pan Hui-tang, Sun Ming. 2010. Clone and expression analysis of *FLOWERING LOCUS T* in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (5): 769 - 776. (in Chinese)
- 潘才博, 张启翔, 潘会堂, 孙 明. 2010. 菊花 *FT* 类似基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 37 (5): 769 - 776.
- Putterill J, Robson F, Lee K. 1995. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell*, 80 (6): 847 - 857.
- Robson F, Costa M R, Hepworth S R. 2001. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants. *Plant J*, 28 (6): 619 - 631.
- Sha Ai-hua, Cai Shu-ping, Zhang Xiao-jun, Wu Xue-jun, Qiu De-zhen, Zhou Xin-an. 2006. Cloning and expression of *GmCO* and *GmFT* controlling the flowering time of soybean. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26 (10): 1996 - 2000. (in Chinese)
- 沙爱华, 蔡淑平, 张晓娟, 吴学军, 邱德珍, 周新安. 2006. 大豆开花基因 *GmCO* 和 *GmFT* 的克隆及表达. *西北植物学报*, 26 (10): 1996 - 2000.
- Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G. 2001. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, 410: 1116 - 1120.
- Tian Su-bo, Guo Chun-xiao, Zheng Cheng-shu. 2010. Molecular mechanism of controlling flower formation by photoperiod inducement in plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (2): 325 - 330. (in Chinese)
- 田素波, 郭春晓, 郑成淑. 2010. 光周期诱导植物开花的分子调控机制. *园艺学报*, 37 (2): 325 - 330.
- Wang Wen-li, Wang Xiu-feng, Zheng Cheng-shu, Zhu Cui-ying, Lin Gui-yu. 2010. Effects of Ca^{2+} carrier A23187 and Ca^{2+} chelator EGTA on the flower formation of chrysanthemum under photoperiodic induction and the Ca^{2+} distribution and carbohydrate contents in leaves during the flower formation. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 21 (3): 675 - 682. (in Chinese)
- 王文莉, 王秀峰, 郑成淑, 朱翠英, 林桂玉. 2010. A23187 和 EGTA 对光周期诱导菊花成花及其过程中叶片 Ca^{2+} 分布和碳水化合物化合物的影响. *应用生态学报*, 21 (3): 675 - 682.
- Yamaguchi A, Kobayashi Y, Goto K, Abe M, Araki T. 2005. *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. *Plant Cell Physiology*, 46 (8): 1175 - 1189.
- Yasue N, Mayumi K, Takuichi F, Masahiro Y, Yasunari O O. 2003. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice. *Plant J*, 36 (1): 82 - 93.
- Yasushi K, Weigel D. 2007. Move on up, it's time for change: mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev*, 21: 2371 - 2384.
- Ye Xue-ling, Liu Zhi-yong, Wang Xiao-xuan, Du Yong-chen, Guo Yan-mei. 2008. Molecular cloning and expression analysis of a *CONSTANS-like* gene *SICO1* from *Solanum lycopersicum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (11): 1607 - 1612. (in Chinese)
- 叶雪凌, 刘志勇, 王孝宣, 杜永臣, 国艳梅. 2008. 番茄 *CONSTANS* 类似基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 35 (11): 1607 - 1612.