

甜樱桃 *MADS* box 基因的克隆与表达分析

林苗苗, 赵长竹, 姜建福, 顾 红, 陈锦永, 方金豹*

(中国农业科学院郑州果树研究所, 中国农业科学院果树生长发育与品质控制重点开放实验室, 郑州 450009)

摘 要: 以甜樱桃 ‘拉宾斯’ (*Prunus avium* L. ‘Lapins’) 为试材, 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆获得 1 个与花发育相关的 *MADS* box 基因, 命名为 *PaMADS3*, 其在 GenBank 中的登录号为 HQ229605。 *PaMADS3* 基因全长 1 095 bp, 包含 1 个 723 bp 的开放阅读框, 推断其编码 240 个氨基酸。序列分析表明: *PaMADS3* 蛋白与拟南芥中的 SEP 蛋白高度同源。组织特异性表达显示 *PaMADS3* 基因在花瓣、雄蕊、心皮中表达。实时定量 RT-PCR 分析表明, 花芽露绿期的离体枝条经过 15 和 25 °C 处理后, 其雌蕊中 *PaMADS3* 基因在 25 °C 的表达量高于在 15 °C 的表达量。

关键词: 甜樱桃; 花发育; *MADS* box; 克隆; 表达

中图分类号: S 662.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 08-1462-07

Cloning and Expression Analysis of *MADS* box Gene in Sweet Cherry (*Prunus avium*)

LIN Miao-miao, ZHAO Chang-zhu, JIANG Jian-fu, GU Hong, CHEN Jin-yong, and FANG Jin-bao*

(Key Laboratory for Fruit Tree Growth, Development and Quality Control, Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, China)

Abstract: A *MADS* box gene was isolated from the floral bud of sweet cherry (*Prunus avium* L. ‘Lapins’) by using RT-PCR and RACE approaches, the gene was named *PaMADS3* (The accession number in GenBank: HQ229605). The full length cDNA of *PaMADS3* is 1 095 bp, with an ORF of 723 bp encoding 240 putative amino acid residues. Sequence analysis indicated that *PaMADS3* shared highly homology with *Arabidopsis* SEP gene. Tissue specific analysis showed that *PaMADS3* expressed in petal, stamen, and carpel. Real-time RT-PCR revealed that when the shoots were treated with 15 °C and 25 °C, respectively, the expression of *PaMADS3* was increased in carpel under the temperature of 25 °C.

Key words: sweet cherry; flower development; *MADS* box; cloning; expression

露地春季高温、设施栽培中管理失误引起的高温, 被认为是引起甜樱桃胚珠结构异常、坐果困难的重要原因 (Beppu et al., 2001), 这也是甜樱桃在南方地区 (如长江三角洲地区) 引种试栽的一大难题 (王世平等, 2004)。甜樱桃属于完全花, 具有典型的花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊四轮结构。目前通过对模式植物如拟南芥、金鱼草、矮牵牛突变体及其基因功能分析, 提出花器官发育的 ABC 模型 (Coen & Meyerowitz, 1991; Weigel & Meyerowitz, 1994)。随着研究的深入, 在矮牵牛中发

收稿日期: 2011-05-17; 修回日期: 2011-07-19

基金项目: ‘十一五’ 国家科技支撑计划项目 (2006BAD07B06-10); 中国农业科学院果树生长发育与品质控制重点开放实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fangjinbao@caas.net.cn)

现控制胚珠发育的 D 功能基因 (Colombo et al., 1995; Rounsley et al., 1995), 以及在花瓣、雄蕊、心皮的正常发育所必须的 *SEP1*、*SEP2*、*SEP3*, 即 E 类基因, 因此花发育模型被完善为 ABCDE 模型 (Theissen, 2001; Eckardt, 2003; Ferrario et al., 2003)。

植物花发育过程中的大多数基因都属于 *MADS* box 基因, *MADS* box 基因编码的蛋白质作为转录因子在花器官和果实发育过程中发挥着重要的调控作用 (Jack, 2004)。研究表明, *SEP* 类蛋白在控制胚珠发育中是至关重要的, *SEP* 基因表达量降低可导致胚珠发育异常 (Favaro et al., 2003)。同时, 温度可以影响 *MADS* box 基因的调控作用, 高温或低温引起 *MADS* box 基因表达量发生变化 (Lozano et al., 1998; Sablowski & Meyerowitz, 1998)。为了弄清 *MADS* box 基因家族对甜樱桃花芽分化, 特别是对雌器官发育的影响, 本试验中以甜樱桃品种 ‘拉宾斯’ 花芽为材料, 采用 RACE 技术克隆 *PaMADS3* 基因, 通过定量 RT-PCR 对其进行了表达分析。

1 材料与方法

1.1 植物材料

以中国农业科学院郑州果树研究所实验园内的 6 年生盛果期 ‘拉宾斯’ 甜樱桃 (*Prunus avium* L. ‘Lapins’) 为试材, 2009 年 9 月取雌蕊分化后期的花芽, 进行基因克隆。2010 年 4 月取盛花期花朵的萼片、花瓣、雄蕊、雌蕊进行组织特异性表达分析。2010 年 3 月取经不同温度处理的离体水培枝条盛花后雌蕊进行实时 RT-PCR。所有材料均用液氮处理, -80°C 冻存备用。

1.2 cDNA 制备和 *PaMADS3* 基因克隆与序列分析

以雌蕊分化后期的花芽为材料, 采用 CTAB 方法提取总 RNA, cDNA Synthesis kit (MBI) 合成 cDNA, 根据多种植物 *MADS* box 基因核酸保守区, 参照李属植物密码子偏爱性, 设计 PCR 扩增引物 PaS3F1 和 PaS3R1 (表 1)。PCR 反应体系为 25 μL 。循环参数为: 94°C , 10 min; 94°C , 30 s; 55°C , 30 s; 72°C , 1 min; 34 个循环。回收目的片段, 连接到 pMD-19T 载体上, 转入大肠杆菌 DH5 α 菌株, 进行克隆、测序、分析。根据上步所得 cDNA 片段序列,

设计 3' 端和 5' 端引物 GSP1 和 GSP2 (表 1), 按 Clontech 公司 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification kit 操作说明进行反应, 回收扩增产物, 克隆到 pMD-19T 载体上, 转入大肠杆菌 DH5 α 菌株, 鉴定后进行双向测序、拼接得到 *PaMADS3* 基因全长。通过 NCBI 中 BLASTx 对 *PaMADS3* 进行同源性搜索与比对, 利用 Clustal X 软件进行同源性分析。使用 MEGA 软件 NJ 法构建系统发育树 (Saitou & Nei, 1987)。

1.3 *PaMADS3* 组织特异性分析

提取萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊总 RNA, cDNA Synthesis Kit (MBI) 合成 cDNA。所用引物为 PaS3F1 和 PaS3R1 (表 1), 采用内参基因 *EF-1 α* 为阳性对照。PCR 反应体系为 25 μL 。循环参数为: 94°C , 10 min; 94°C , 30 s; 55°C , 30 s; 72°C , 45 s; 34 个循环。

表 1 引物代码与引物序列
Table 1 Primer code and sequence

引物 Primer	序列 Sequence
PaS3F1	5'-ggAgAgTggAgCTgAAgAgg-3'
PaS3R1	5'-ggTATCCAATCTGTAACgTCgg-3'
GSP1	5'-TggAgCTgAAgAggATTgAgA-3'
GSP2	5'-TCTCTggTgCTCCATAgTTgC-3'
PaS3F2	5'-CAATATCAGTggTCACAgCaggTC-3'
PaS3R2	5'-ggCTgCTCTCCATACACACTTTT-3'
EF-1 α F	5'-TTCTTgATTgCCACACTTCTCAC-3'
EF-1 α R	5'-ggCTCCTTCTCAATCTCCTTACC-3'

2.2 PaMADS3 氨基酸同源性分析

PaMADS3 基因含有 1 个 723 bp 的 ORF, 编码 240 个氨基酸 (图 1), 分子量 27.5 kD, 等电点 8.79, 是一个碱性蛋白。

利用 NCBI 中的 BLASTx 工具把 *PaMADS3* 核酸序列翻译成氨基酸序列并进行同源性比对 (图 2), 结果表明, *PaMADS3* 与 ABCDE 模型中的 E 类蛋白有较高的同源性, 其中与桃 (*Prunus persica*) PrpMADS5 蛋白的同源性高达 99%, 与苹果 (*Malus domestica*) MdMADS18 蛋白的同源性为 92%, 与葡萄 (*Vitis vinifera*) VvMADS4 蛋白的同源性为 90%。

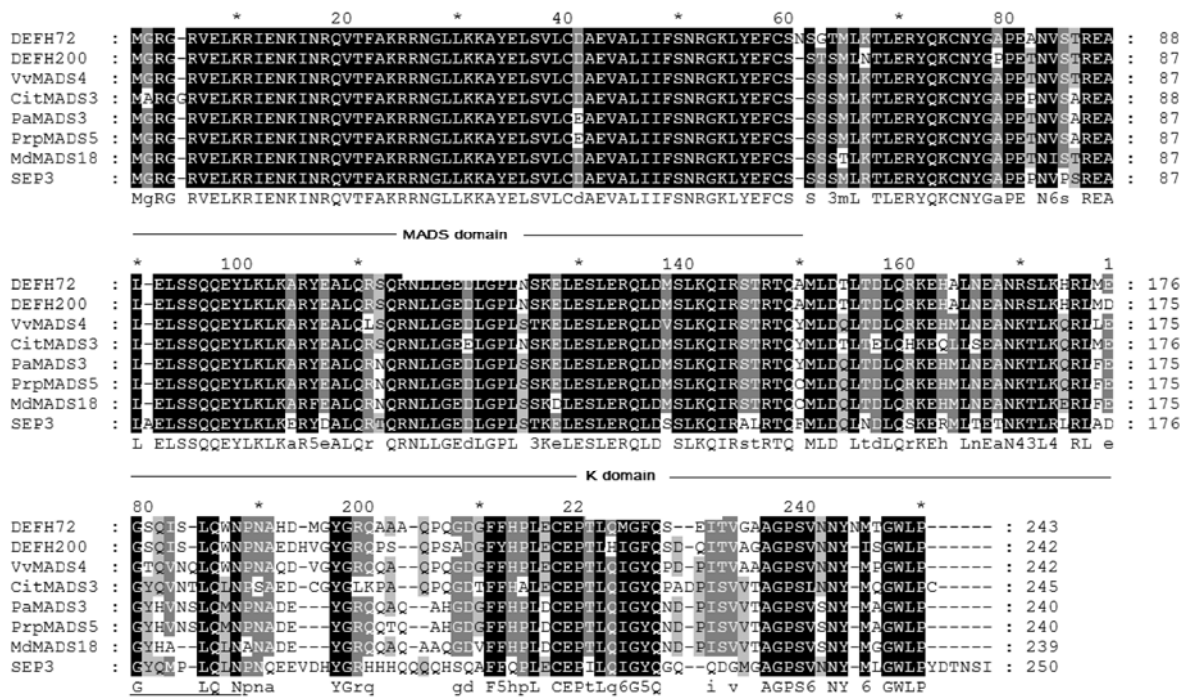


图 2 *PaMADS3* 蛋白与其他植物 *MADS* box 蛋白的序列比对

GenBank 登录号: 拟南芥 SEP3 NP850953; 金鱼草 DEFH72 CAA64742J; 金鱼草 DEFH200 CAA64743;
葡萄 VvMADS4 AAM21344; 柑橘 CitMADS3 BAF34912;
桃 PrpMADS5 ABO27621; 苹果 MdMADS18 ADL36740。

Fig. 2 Alignment of *PaMADS3* protein with other *MADS* box proteins

The GenBank accession No. *Arabidopsis thaliana* SEP3: NP850953; *Antirrhinum majus* DEFH72: CAA64742J; DEFH200: CAA64743;
Vitis vinifera VvMADS4: AAM21344; *Citrus* CitMADS3: BAF34912; *Prunus persica* PrpMADS5 ABO27621;
Malus domestica MdMADS18 ADL36740.

2.3 PaMADS3 蛋白的系统发育分析

选取 *MADS* box 基因的 4 个亚家族 (即 A、B、C/D、E 类基因家族) 中的典型 *MADS* box 基因, 利用 MEGA 软件, 构建系统进化树 (图 3)。

系统进化关系分析表明: *PaMADS3* 编码蛋白与 ABCDE 模型中的 *SEP-like* (E 类) 基因编码蛋白同源性较高, 与金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 中的 *DEFH72* 编码蛋白亲缘关系最近。 *PaMADS3* 应属于 E 类 *MADS* box 基因。

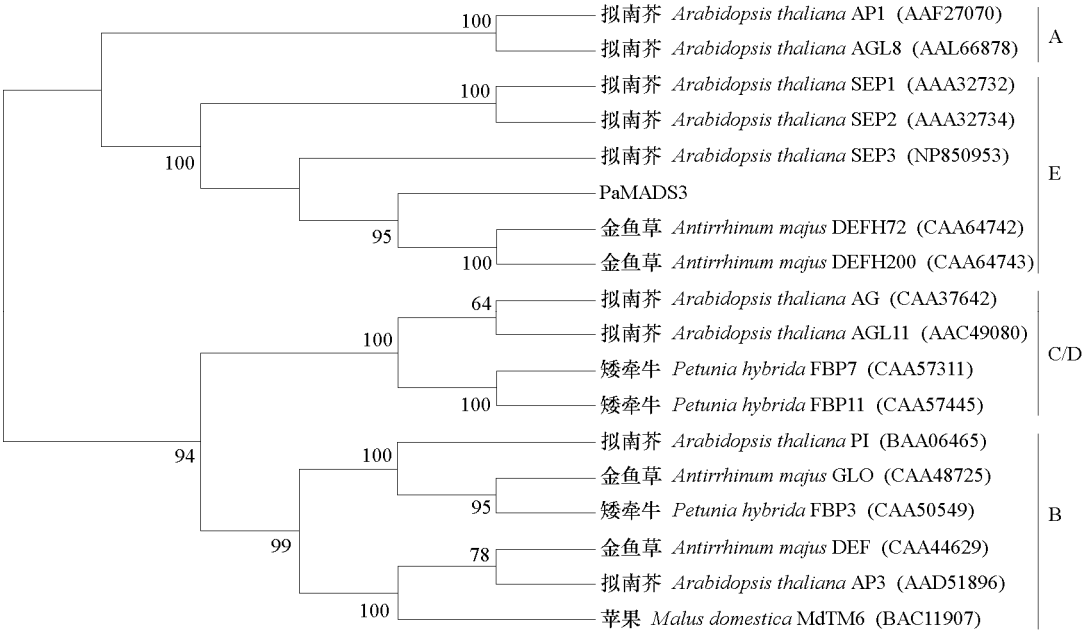


图 3 PaMADS3 蛋白的系统进化分析

接点部位的值代表 1 000 次重复的靴带值。

Fig. 3 Phylogenetic tree of PaMADS3 protein sequences with known MADS box protein sequences

Values at nodes indicate bootstrap percentages.

2.4 PaMADS3 的组织特异性分析

组织特异性分析表明, PaMADS3 在花瓣、雄蕊、心皮中表达, 在萼片中不表达 (图 4)。PaMADS3 基因的表达情况与同源性较高的拟南芥 SEP3 各组织的表达情况一致, 进一步说明其应属于 E 类基因。

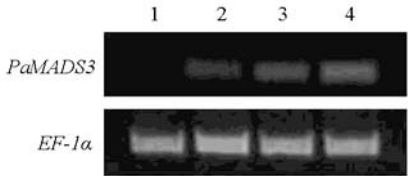


图 4 ‘拉宾斯’甜樱桃 PaMADS3 基因 RT-PCR 表达分析

1. 萼片; 2. 花瓣; 3. 雄蕊; 4. 心皮。

Fig. 4 RT-PCR analysis of PaMADS3 gene in ‘Lapins’ sweet cherry

1. Sepal; 2. Petal; 3. Stamen; 4. Carpel.

2.5 温度处理对 PaMADS3 基因表达的影响

25 ℃处理的枝条花期明显早于 15 ℃处理 (图 5), 但 25 ℃处理的枝条花的花梗、花瓣、雌蕊都显著小于 15 ℃处理的。15 ℃和 25 ℃处理的花器显著小于露地植株活体枝条上的花器 (表 2)。

在经过 15 ℃和 25 ℃温度处理后, PaMADS3 的表达量发生变化, 在 25 ℃时 PaMADS3 的表达量大于在 15 ℃时 PaMADS3 的表达量, 但都小于在露地植株活体枝条上花中 PaMADS3 的表达量 (图 6)。



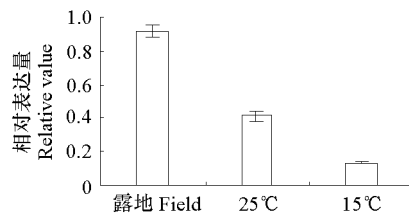
图 5 温度处理对花期的影响

Fig. 5 Effects of temperature treatment on florescence

表 2 温度处理对花器大小的影响

Table 2 Effects of temperature treatment on flower dimension

处理 Treatment	花梗/cm Peduncle	花瓣/cm Petal	雌蕊/cm Pistil
25 °C	0.729 ± 0.181 c	0.767 ± 0.149 c	0.943 ± 0.134 c
15 °C	1.105 ± 0.235 b	1.115 ± 0.264 b	1.141 ± 0.158 b
露地 Field	3.024 ± 0.434 a	1.607 ± 0.120 a	1.470 ± 0.118 a

图 6 ‘拉宾斯’甜樱桃 *PaMADS3* 基因在不同温度下的实时定量 RT-PCR 分析Fig. 6 Expression analysis of *PaMADS3* by real-time RT-PCR in ‘Lapins’ sweet cherry treated with different temperature

3 讨论

本试验中依据 *MADS* box 基因家族在 *MADS* 区域的高度保守性序列设计引物, 采用 RT-PCR 和 RACE 的技术快速分离 *MADS* box 基因, 分离出一个与花发育相关的 *MADS* box 基因, 其推测的蛋白质具有完整的 *MADS* 区和 K 区, 表明他们是典型的 *MADS* box 基因。同源分析的结果表明, *PaMADS3* 与桃 *PrpMADS5* 基因、葡萄 *VvMADS4* 基因有较高的同源性, 桃 *PrpMADS5* 可使开花时间提前 (Xu et al., 2008), 葡萄 *VvMADS4* 基因在花和果实中都表达, 并且在果实中的表达量非常高 (Paul et al., 2002)。本试验中的 *PaMADS3* 在花瓣、雄蕊、心皮 3 轮中表达 (图 3), 这与 SEP 类基因的表达模式一致 (Eckardt, 2003)。

研究表明, 在 15 °C 和 25 °C 的温度处理后, 25 °C 的开花时间明显提前, 但花器官变小, 胚珠发育异常 (Beppu et al., 2001)。本研究中不同温度处理是在培养箱中利用离体枝条进行的, 从花器官发育情况看, 15 °C 处理的比 25 °C 处理的花器官要大, 这与 Beppu 等 (2001) 的报道一致。但在温度相近时, 露地栽培的植株上花器明显大于水培离体枝条上的, 结果表明, 除温度之外, 尚有其他因素影响花器的发育。

在已有报道中, 番茄 A 类基因 *TM4*、B 类基因 *TM5* 和 *TM6*、C 类基因 *TGL1* 在低温条件下的表达量增多 (Lozano et al., 1998)。在本研究中, 离体枝条上 *PaMADS3* mRNA 表达有随温度升高的趋势, 即 25 °C 处理的比 15 °C 处理的表达量大。基因的表达量与温度之间的关系与以往报道不

一致, 原因可能是不同基因的表达对温度变化的响应不尽相同。并且, 研究中还观察到, 在相同温度条件下, *PaMADS3* mRNA 在离体培养枝条上的表达和露地栽培的并不一样, 说明, 除温度之外, 还有其他因素对基因的表达产生重要影响。

本试验中分离出 *MADS* box 基因家族中的一个基因, 有待对其功能进一步验证, 其它家族成员的克隆工作也正在进行中, 以期较全面了解 *MADS* box 基因对花芽分化、萌动期至盛花期雌器官的继续发育的调控作用。

References

- Beppu K, Suehara T, Kataoka I. 2001. Embryo sac development and fruit set of Satonishiki sweet cherry as affected by temperature, GA₃ and paclobutrazol. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science*, 70 (2): 157 - 162 .
- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling a flower development. *Nature*, 353 (6339): 31 - 37.
- Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons H J M, Angenent G C, van Tunen A J. 1995. The petunia *MADS* box gene *FBP* II determines ovule identity. *Plant Cell*, 7 (11): 1859 - 1868.
- Eckardt N A. 2003. *MADS* monsters: Controlling floral organ identity. *Plant Cell*, 15: 803 - 805.
- Favaro R, Pinyopich A, Battaglia R, Kooiker M, Borghi L, Ditta G, Yanofsky M F, Kater M M, Colombo L. 2003. *MADS*-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 2603 - 2611.
- Ferrario S, Immink R G, Shchennikova A, Busscher-Lange J, Angenent G C. 2003. The *MADS*-box gene *FBP2* is required for *SEPALLATA* function in petunia. *Plant Cell*, 15 (4): 914 - 925.
- Jack T. 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell*, 16: 1 - 17.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25 (4): 402 - 408.
- Lozano R, Angosto T, Gomez P, Payan C, Capel J, Huijser P, Salinas J, Martinez-Zapater J M. 1998. Tomato flower abnormalities induced by low temperatures are associated with changes of expression of *MADS* box genes. *Plant Physiol*, 17: 91 - 100.
- Paul K Boss, Elisabetta Sensi, Chi Hua, Chris Davies, Mark R Thomas. 2002. Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) *MADS*-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science*, 162: 887 - 895.
- Rounsley S D, Ditta G S, Yanofsky M F. 1995. Diverse roles for *MADS*-box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 7: 1259 - 1269.
- Sablowski R W M, Meyerowitz E W. 1998. Temperature-sensitive splicing in the floral homeotic *apetala3-1* mutant. *Plant Cell*, 10: 1453 - 1463.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (10): 406 - 425.
- Theissen G. 2001. Development of floral organ identity: Stories from the *MADS* house. *Current Opinion of Plant Biology*, 4 (1): 75 - 85.
- Wang Shi-ping, Yuan Cai-xia, Dai Yun-ting, Shu Huan, Yang Tian-yi, Zhang Cai-xi. 2004. Development of flower organs in sweet cherry in Shanghai area. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (3): 357 - 359. (in Chinese)
- 王世平, 袁彩娟, 戴韵婷, 舒 缓, 杨天仪, 张才喜. 2004. 上海地区栽培的欧洲甜樱花器官发育的观察. *园艺学报*, 31 (3): 357 - 359.
- Weigel D, Meyerowitz E M. 1994. The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*, 78: 203 - 209.
- Xu Yong, Zhang Lin, Xie Hua, Zhang Yan-qiu, Oliveira M M, Ma Rong-cai. 2008. Expression analysis and genetic mapping of three *SEPALLATA*-Like genes from peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Tree Genetics & Genomes*, 4 (4): 693 - 703.