

# 蕙兰 B 类 MADS-box 基因的克隆及表达分析

向 林, 秦德辉, 李小白, 李伯钧, 郭方其, 吴 超, 孙崇波\*

(浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

**摘 要:** 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术从蕙兰 (*Cymbidium faberi*) 中分离到 3 个 B 类 MADS-box 基因 *CfGLO*、*CfDEF1* 和 *CfDEF2*, 分别编码 210、222 和 227 个氨基酸。系统进化树分析显示, *CfGLO* 属于 *PI/GLO* 类基因, *CfDEF1* 和 *CfDEF2* 分别属于 *PaleoAP3* 组基因的 *PeMADS2* 类基因和 *PeMADS3* 类基因。RT-PCR 和实时荧光定量表达分析表明, *CfDEF1* 在 2、3 轮花器官侧瓣、唇瓣和蕊柱中强烈表达, 在萼片中不表达; *CfDEF2* 在 1、2、3 轮花器官中都表达, 在营养组织中不表达; 而 *CfGLO* 在所有组织中都表达, 说明 3 个基因在蕙兰花器官的形成过程中可能扮演着不同的角色。此外, 3 个基因都在蕙兰幼嫩子房中有表达, 显示其可能在蕙兰子房的形成过程中起一定作用。

**关键词:** 蕙兰; B 类 MADS-box 基因; 花; 发育; 实时荧光定量表达

**中图分类号:** S 682.31

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 12-2333-09

## Cloning and Expression Analysis of B Class MADS-box Genes from *Cymbidium faberi*

XIANG Lin, QIN De-hui, LI Xiao-bai, LI Bo-jun, GUO Fang-qi, WU Chao, and SUN Chong-bo\*

(Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

**Abstract:** In this study, three B-class genes, *CfGLO*, *CfDEF1* and *CfDEF2* were isolated from *Cymbidium faberi* by RT-PCR and RACE-PCR techniques. Sequence analysis showed that *CfGLO*, *CfDEF1* and *CfDEF2* encode a putative protein of 210, 222, 227 amino acids, respectively. Phylogenetic tree analysis indicated that *CfGLO* belong to *PI/GLO* clade, and *CfDEF1* and *CfDEF2* belong to *PeMADS3* clade and *PeMADS2* clade of MADS-box gene family, respectively. RT-PCR and real-time quantitative PCR demonstrated that *CfDEF1* was strongly expressed in 2, 3 whorls organ, i.e. lips, petals and column, while absent in whorl 1 (sepals); *CfDEF2* was expressed in whorls 1, 2 and 3, while absent in vegetative tissues; Whereas *CfGLO* was expressed in all tissues. The results suggested that the three genes may play different roles in floral organs formation of *C. faberi*. In addition, the three genes all expressed in immature ovary, the results displayed that they may regulate the ovary development of *C. faberi*.

**Key words:** *Cymbidium faberi*; B class MADS-box gene; flower; development; real-time quantitative PCR

收稿日期: 2011-07-07; 修回日期: 2011-10-24

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3110438); 浙江省花卉产业重点科技创新团队项目 (2009R50034)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chongpo1230@sina.com)

多数高等植物的花从外向内由 4 轮花器官, 即第 1 轮的萼片、第 2 轮的花瓣、第 3 轮的雄蕊群和第 4 轮的雌蕊群组成, 但部分植物的花在进化过程中形成了独特的花型。蕙兰 (*Cymbidium faberi*) 是兰科兰属地生种类的主要种之一, 花形特异, 花的第 1 轮为花瓣状的萼片, 第 2 轮为两片侧瓣和中间高度特化的唇瓣, 第 3 轮的雄蕊群和第 4 轮的雌蕊群合生形成高度特化的蕊柱, 所以其花器官的形成机理比其它植物更为复杂。Coen 和 Meyerowitz (1991) 根据对拟南芥和金鱼草的研究提出了经典的花发育 ABC 模型, 其中 B 类基因属于 MADS-box 基因家族, 在花瓣和雄蕊的发育过程中起着重要作用。金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 中 B 类基因包括 *DEFICIENS* (*DEF*) 和 *GLOBOSA* (*GLO*) 两类基因, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中这两类基因相应地称之为 *APETALA3* (*AP3*) 和 *PISTILLATA* (*PI*) (Goto & Meyerowitz, 1994)。目前已经从许多植物中分离出 *DEF* 和 *GLO* 类基因 (Goto & Meyerowitz, 1994; Hsu & Yang, 2002; Tsai et al., 2004; Xu et al., 2006; Kim et al., 2007; Mondragon-Palomino & Theissen, 2008; Chang et al., 2010; Sirisawat et al., 2010)。

通过对姬蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*)、鹭兰 (*Habenaria radiata*)、鸽石斛 (*Dendrobium crumenatum*)、细茎石斛 (*D. moniliforme*) 及文心兰 (*Oncidium Gower Ramsey*) 等的研究认为, 兰花花被的形成受几个 *DEF* 类基因和 *GLO* 类基因的相互作用调控 (Hsu & Yang, 2002; Tsai et al., 2004; Xu et al., 2006; Kim et al., 2007; Mondragon-Palomino & Theissen, 2008; Chang et al., 2010; Sirisawat et al., 2010)。

根据进化分析, *DEF* 类基因可以分为 4 大类 (Mondragon-Palomino & Theissen, 2008), 并且同一类的表达模式基本相同。目前已克隆的第 1 类 *PeMADS2* 类基因包括姬蝴蝶兰的 *PeMADS2*、文心兰的 *OMADS5* 等; 第 2 类 *OMADS3* 类基因包括文心兰的 *OMADS3* 和姬蝴蝶兰的 *PeMADS5* 等, 这两类基因在兰花的两轮花被片中都表达, 说明这两类基因控制兰花花被片的形成; 第 3 类 *PeMADS3* 类基因包括姬蝴蝶兰的 *PeMADS3*、细茎石斛的 *DMAP3B* 等, 它们只在侧瓣和唇瓣中表达, 但不在外轮花被片中表达, 说明兰花内轮花被片是由第 1 类、第 2 类及第 3 类基因共同表达调控而形成的; 而第 4 类 *PeMADS4* 类基因只在唇瓣中表达, 因此兰花唇瓣是由这 4 类基因共同表达调控而形成的。进一步的试验也表明 4 个 *DEF* 类基因和 1 个 *GLO* 基因的相互作用可能控制兰花萼片、侧瓣和唇瓣的形成 (Tsai et al., 2004; Kim et al., 2007; Mondragon-Palomino & Theissen, 2008), 然而其准确的机理还不十分清楚, 需要通过更多的研究来了解 B 类基因的调控作用。

为了研究 B 类 MADS-box 基因在蕙兰花发育中的作用, 了解其花被片的形成机理, 本研究中利用 RT-PCR 结合 cDNA 末端快速扩增 (RACE) 技术从蕙兰中获得了 3 个 B 类 MADS-box 基因 *CfGLO*、*CfDEF1* 和 *CfDEF2*, 并对其在蕙兰不同组织中的表达进行了分析。期望通过本研究对花发育 B 类基因在单子叶植物中的表达模式作出进一步的阐释, 为揭示蕙兰花发育机理奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以种植于浙江省农业科学院园艺研究所花卉中心大棚内蕙兰品种‘大一品’为试验材料。采集 5 mm 长的花芽和花蕾刚刚绽开时的花瓣、萼片、唇瓣、蕊柱、子房以及幼嫩的根和叶, 立即冻存于液氮中, 带回实验室保存在 -70 °C 的冰箱中备用。

### 1.2 总 RNA 的提取和 B 类 MADS-box 基因的克隆

采用北京天恩泽基因公司 RNAout 2.0 试剂盒提取总花芽 RNA, 用美国 Clontech 公司 SMARTer™

RACE cDNA Amplification Kit 合成 cDNA 第 1 链, 以反转录模板直接进行 PCR 反应。

为了克隆蕙兰 B 类 MADS-box 基因, 根据此类基因的保守区域设计引物进行 PCR 扩增, 扩增 *DEF1* 基因上游引物 DEF1-1 为: 5'-ATAGAGATAAAGAAGATAGA-3', 下游引物 DEF1-2 为: 5'-TTTGCTCAAGACCGCGCAG-3'; 扩增 *DEF2* 基因上游引物 DEF2-1 为: 5'-GATYGAGATWAAGAAGAT-3', 下游引物 DEF2-2 为: 5'-TYTGCTCAAGACCGCGCA-3'; 扩增 *GLO* 基因的上游引物 GLO-1 为: 5'-ATCAGCGTGCTCTGCGA-3', 下游引物 GLO-2 为: 5'-AGTTCTCTCATACTCCC-3'。PCR 扩增条件为: 94 °C 变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 54 ~ 44 °C 复性 30 s, 每 5 个循环退火温度下降 2 °C, 72 °C 延伸 1 min, 共进行 35 个循环后 72 °C 延伸 8 min。

PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳回收, 连接到 pMD18-T 载体上, 热激转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选。选取白色菌落进行液体培养, PCR 检测阳性克隆, 送上海英骏生物技术公司测序。

根据扩增产物的测序结果设计 RACE 引物, *DEF1* 基因 3'RACE 引物 DEF1-3: 5'-TTACTGTAGCCCTTCTACTGATCTT-3'; 巢式引物 DEF1-4: 5'-AGGCAGAGGAATGGGGAAGAGTT-3'; 5'RACE 引物 DEF1-5: 5'-TGCCCTCTAACTCTTCCCCATTC-3'; 巢式引物 DEF1-6: 5'-CCATGCCAGTCAC AATCTGGTACTTC-3'。

*DEF2* 基因 3'RACE 引物 DEF2-3: 5'-GTATTGTAGTCCAACCACTGACACC-3'; 巢式引物 DEF2-4: 5'-TCAGGCAGAGGATGGGGGAGGAC-3'; 5'RACE 引物 DEF2-5: 5'-CCGCAGTAAGTTCCTGTGGTTT-3'; 巢式引物 DEF2-6: 5'-TTATGCCGGACACCTGCTGGTAACGA-3'。

*GLO* 基因 3'RACE 引物 GLO-3: 5'-TGAGTATTGTAGCCCCTCCACCA-3'; 巢式引物 GLO-4: 5'-CTCGGGCAAGAACTCTGGGACGC-3'; 5'RACE 引物 GLO-5: 5'-ATTCTGGAGCGTTTCCTCAATCGG-3'; 巢式引物 GLO-6: 5'-CTCAAGTTCTCGTGTTTTCGCTCC-3'; 以之前反转录的 cDNA 为模板, 采用 Clontech 公司的 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒进行 3'端和 5'端的 RACE 扩增。将 3'端和 5'端的 RACE 反应产物分别回收, 连接 pMD18-T 载体, 转化测序。拼接后获得基因全长。

### 1.3 序列分析

对于获得的基因全长 cDNA 序列, 先在 <http://au.expasy.org/tools/dna.html> 进行开放阅读框的分析; 用 ProtParam 软件分析 DEF 蛋白的基本性质, 再使用 ClustalX 1.83 软件进行氨基酸水平的序列比对, 用 Boxshade 3.21 软件进行显示。运用 BLAST 搜索同源基因, 使用 ClustalX 1.83 软件对搜索得到基因的 cDNA 序列进行多重序列比对, 再使用 MEGA4 软件中的邻位相连法进行系统发生树的构建, 并进行 Bootstrap 检测 (Saitou & Nei, 1987)。

### 1.4 基因表达分析

分别取 0.1 g 花芽、花瓣、萼片、唇瓣、蕊柱、子房、根和叶, 按照北京天恩泽基因公司 RNAout 2.0 试剂盒说明书提取总 RNA。分别以 200 ng RNA 为模板, 按照天根生化科技 (北京) 有限公司的 Quantscript RT Kit 说明书进行反转录, 反转录后的 cDNA 储存于 -20 °C 备用。根据蕙兰已有的 18S rRNA 序列和克隆的基因序列设计表达引物, 用 18S rRNA 基因作为内标。18S rRNA 基因引物序列: 上游引物: 5'-TGCCGTTTCCCTGTTGATTC-3', 下游引物: 5'-TGCTGCCTTCCTTGGATGTG-3'。DEF1 基因引物序列: 上游引物: DEF1-7 5'-GCAGGTGTCCGGCATAAATC-3', 下游引物: DEF1-8 5'-TCTGCCTGATCTCCCTTCTCA-3'; DEF2 基因引物序列: 上游引物: DEF2-7 5'-TGGCTGATTACTGTAGCCCTTCTA-3', 下游引物: DEF2-8 5'-GTGTATTTTGCATCCTCTCATATTGAG-3'。GLO 基因引

物序列: 上游引物: GLO-7 5'-GTGTTTCGGAATAAACAGATGGACTT-3', 下游引物: GLO-8 5'-TACTCCCTTCCATTGCCAATTG-3'。退火温度 50 °C, 共 35 个循环, 每组处理重复 3 次, 用凝胶成像软件量化图片中 PCR 产物, 文中显示具有代表性的一组电泳图片。之后采用荧光染料法对上述样品进行实时荧光定量表达分析。

20  $\mu\text{L}$  反应体系其中包括 9  $\mu\text{L}$  2.5  $\times$  Sybr Green mix, 9  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu\text{L}$  cDNA, 1  $\mu\text{L}$  引物混合物(正向引物和反向引物, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。反应程序为: 95 °C 3 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 循环 40 次, 每个处理 3 次重复, 整个过程在 IQ5 荧光定量 PCR 仪(BioRad 公司)上进行。数据通过 Sequence Detector Version 1.3.1 输出, 并转换为 Excel 格式再分析, 按相对定量法计算基因的表达量。目的基因相对表达量  $\text{Rel. Exp} = 2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$ , 其中  $\Delta\text{Cq} = \text{Cq}(\text{CgGLO}) - \text{Cq}(18\text{s RNA})$ ,  $\Delta\Delta\text{Cq} = (\text{各植物组织 } \Delta\text{Cq}) - (\text{花芽 } \Delta\text{Cq})$  (Bustin et al., 2009)。

## 2 结果与分析

### 2.1 蕙兰两个 *DEF* 基因和一个 *GLO* 基因全长 cDNA 的克隆

以蕙兰花芽 RNA 为模板进行反转录, 再以反转录产物为模板进行 PCR 扩增, 获得部分片段, 测序分析表明, 获得了 *DEF* 和 *GLO* 的部分序列。根据所得序列设计 3'RACE 和 5'RACE 特异引物, 按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 的说明书进行 cDNA 末端扩增, 测序后将两端拼接在一起得到基因全长 cDNA 序列(图 1)。

BLASTX 的结果显示, 全长 cDNA 与其它兰科植物 *DEF* 类和 *GLO* 类基因具有 90% 以上的同源性, 因此, 将基因分别命名为 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO*。 *CfDEF1* 全长 918 bp, 含有长度为 666 bp 的开放阅读框, 编码 222 个氨基酸, 分子量 25.6 kD, 预测等电点为 9.04, GenBank 登录号为 HM208535。 *CfDEF2* 全长 873 bp, 含有 681 bp 开放阅读框, 编码 227 个氨基酸, 分子量 26.6 kD, 预测等电点为 8.98, GenBank 登录号为 HM208536。 *CfGLO* 含有 630 bp 长的开放阅读框, 共编码 210 个氨基酸, 分子量为 24.5 kD, 预测等电点为 9.39, GenBank 登录号为 HQ164433。

### 2.2 基因序列分析

利用推测的 *CfDEF* 和 *CfGLO* 蛋白序列进行 BLASTP 分析, 得到一些来自不同物种的同源蛋白序列。使用 ClustalX 1.83 和 Boxshade 3.21 软件进行氨基酸水平的序列比对显示, *CfDEF1* 氨基酸序列与单子叶植物盔状爪唇兰的 *GgDEF2*、文心兰的 *OMADS9*、姬蝴蝶兰的 *PeMADS3*、秋石斛的 *DhAP3* 有 95% 左右的同源性; *CfDEF2* 氨基酸序列则与 *GgDEF1*、*OMADS5*、鸢尾石斛的 *DcAP3A*、大花蕙兰的 *ChAP3* 具有 88%~94% 的同源性(图 2)。

此外, *CfDEF1* 与 *CfDEF2* 的氨基酸序列 C 末端与其它单子叶植物的 AP3/DEF 氨基酸序列一样, 含有 PI-derived 结构域(FxFRLOPSQPNLH)和 *PaeloAP3* 结构域(YGxHDLRLA) (Kramer et al., 1998), 说明 *CfDEF1* 与 *CfDEF2* 都属于 *PaleoAP3* 类基因, 但是两者的氨基酸序列只有 65% 的同源

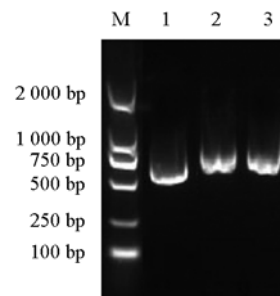


图 1 蕙兰 *DEF* 和 *GLO* 基因全长扩增

Fig. 1 Amplification profile of the putative full-length fragment of *DEF* and *GLO* genes from *C. faberi*

M. DL2000 DNA marker; 1. *CfGLO*; 2. *CfDEF1*; 3. *CfDEF2*.

性(图2)。在 I 结构域内,所有 AP3/DEF 蛋白具有高度保守的 (H/Q) YEXM 序列(Kramer et al., 1998)。在 CfDEF1 和 CfDEF2 氨基酸序列的 83~87 位也具有 QYEKM 和 QYERM 的保守序列。CfGLO 蛋白与芳香缙草、红门兰、盔状爪唇兰、长叶美洲兜兰、球花石斛、蝴蝶兰等兰科植物的 PI/GLO 蛋白都有 90% 以上的同源性,并且其 C 端具有典型的 PI 结构域(图2),结果表明 CfGLO 属于 B 类 MADS-box 基因的 PI/GLO 家族。

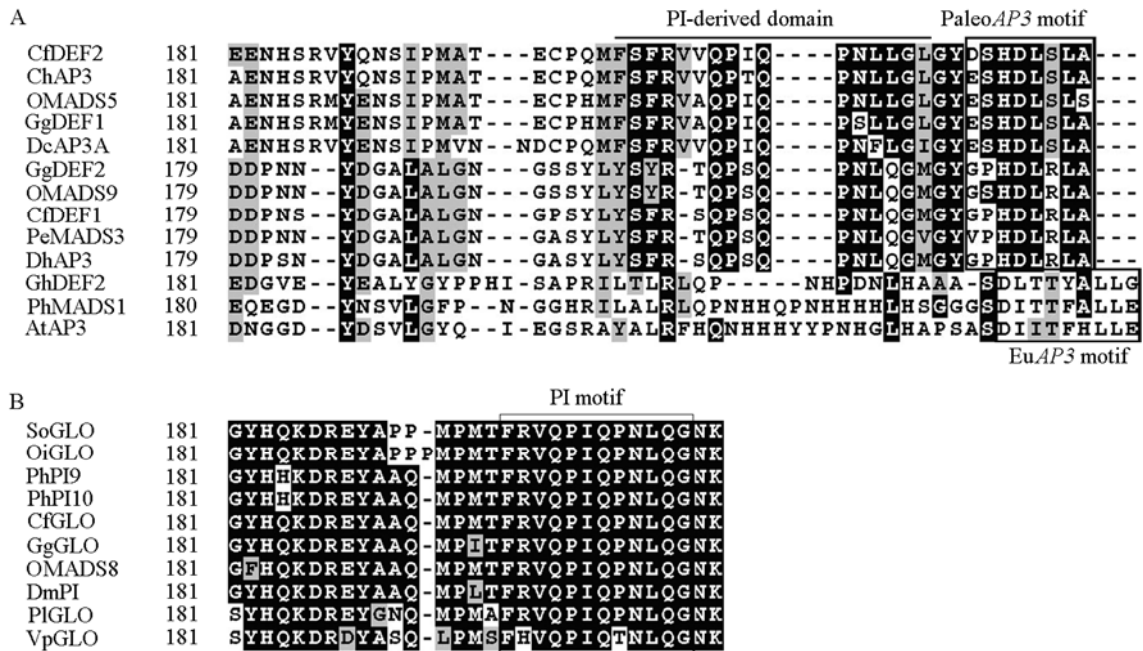


图2 CfDEF1、CfDEF2 以及 CfGLO 与其它植物的 AP3/DEF 和 PI/GLO 氨基酸序列同源比较

A. AP3/DEF 类氨基酸序列同源比较; B. PI/GLO 类氨基酸序列同源比较。各序列为盔状爪唇兰的 GgDEF1、GgDEF2 和 GgGLO (ACR16036、ACR16038 和 ACR16039)、文心兰的 OMADS5、OMADS9 和 OMADS8 (ADJ67234、ADJ67235 和 ADJ67236)、姬蝴蝶兰的 PeMADS3 (AAR26629)、秋石斛的 DhAP3 (ACJ66727)、大花蕙兰的 ChAP3 (ABG78568)、鹤石斛的 DcAP3A (AAZ95248)、非洲菊的 GhDEF2 (CAA08803)、矮牵牛的 PhMADS1 (Q07472)、拟南芥的 AtAP3 (AAM64919)、蝴蝶兰的 PhPI9 和 PhPI10 (AAV28175 和 AAV28490)、芳香缙草的 SoGLO (ACR16053)、红门兰的 OiGLO (BAI78360)、细茎石斛的 DmPI (ABW96391)、长叶美洲兜兰的 PiGLO (ACR16048)、香荚兰的 VpGLO (ACR16057)。

PI-derived domain 用上划线表示。黑色框表示 PaleoAP3 结构域和 EuAP3 结构域以及 PI 结构域。

Fig. 2 Alignment of the deduced amino acid sequences of C-terminal regions of CfDEF1, CfDEF2 and CfGLO from *Cymbidium faberi* with those of AP3/DEF and PI/GLO orthologs from other plant species

A. CfDEF1 and CfDEF2 sequences were aligned with AP3/DEF from *Gongora galeata* (GgDEF1, ACR16036; GgDEF2, ACR16038; GgGLO, ACR16039); *Oncidium Gower Ramsey* (OMADS5, ADJ67234; OMADS9, ADJ67235; OMADS8, ADJ67236); *Phalaenopsis equestris* (PeMADS3, AAR26629); *Dendrobium hybrid* (DhAP3, ACJ66727); *Cymbidium hybrida* (ChAP3, ABG78568); *Dendrobium crumenatum* (DcAP3A, AAZ95248); *Gerbera hybrida* (GhDEF2, CAA08803); *Petunia hybrida* (PhMADS1, Q07472); *Arabidopsis thaliana* (AtAP3, AAM64919); B. CfGLO sequence was aligned with PI/GLO from *G. galeata* (GgGLO, ACR16039); *Oncidium Gower Ramsey* (OMADS8, ADJ67236); *P. hybrida* (PhPI9, AAV28175; PhPI10, AAV28490); *Spiranthes odorata* (SoGLO, ACR16053); *Orchis italica* (OiGLO, BAI78360); *Dendrobium moniliforme* (DmPI, ABW96391); *Phragmipedium longifolium* (PiGLO, ACR16048); *Vanilla planifolia* (VpGLO, ACR16057) using ClustalW.

The PI-derived domain is indicated on top of the columns.

The PaleoAP3 and EuAP3 domains and PI motif are indicated in black column, respectively.

为了进一步研究 CfDEF1、CfDEF2 和 CfGLO 与其他 B 类 MADS-box 基因的关系,进行了系统进化分析(图3)。分析显示 B 类 MADS-box 基因分成 PI/GLO 和 AP3/DEF 两个分支,其中 AP3/DEF

分支又分成 *PaleoAP3* 和 *EuAP3* 两个组, 而 *PaleoAP3* 组又分成 *PeMADS2* 类基因、*OMADS3* 类基因、*PeMADS3* 类基因、*PeMADS4* 类基因 4 个组。 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 在图中以三角形标示, 分别归类于 *PeMADS3* 类基因组、*PeMADS2* 类基因组以及 *PI/GLO* 组 (图 3)。

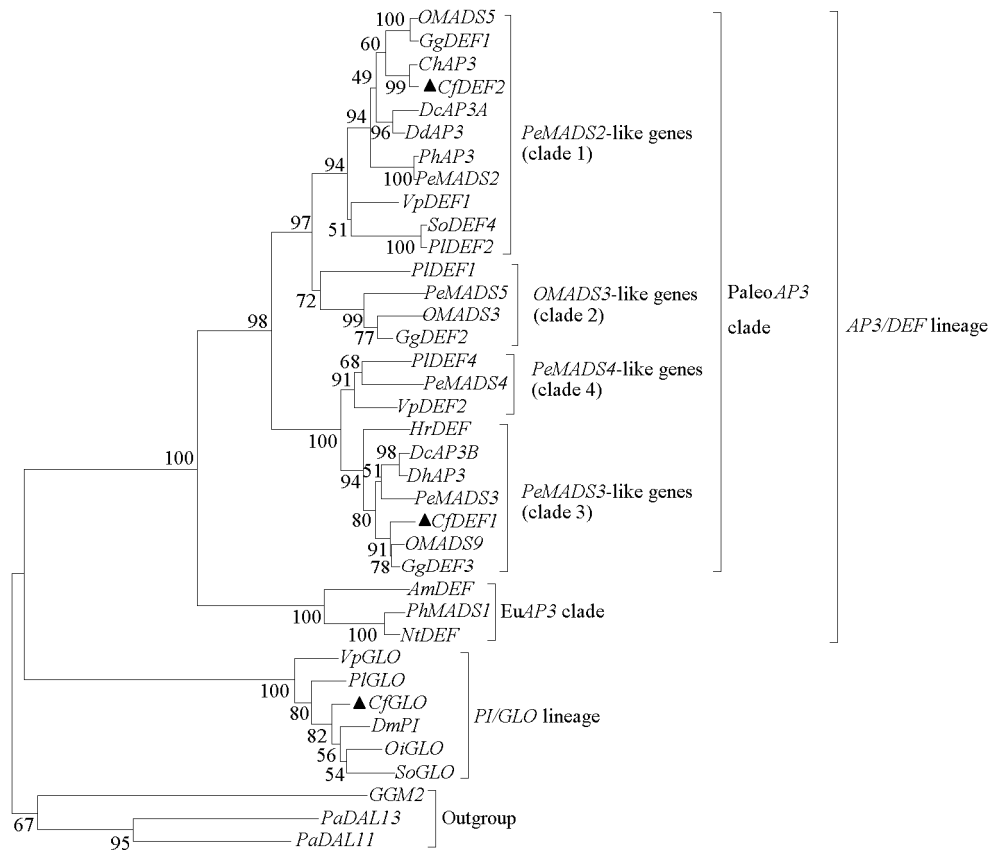


图 3 不同植物 AP3/DEF 类和 PI/GLO 类 MADS-box 基因系统进化树

系统进化树分析涉及到的基因序列如下: 文心兰的 *OMADS3*, *OMADS5*, *OMADS9* (AY196350, HM140840, HM140841)、盔状爪唇兰的 *GgDEF1*, *GgDEF2*, *GgDEF3* (237701150, 237701152, 237701154)、大花蕙兰的 *ChAP3* (DQ683575)、鸢尾的 *DcAP3A* 和 *DcAP3B* (DQ119838, DQ119839)、齿瓣石斛的 *DdAP3* (GU126414)、秋石斛的 *DhAP3* (EU927372)、细茎石斛的 *DmPI* (EU056326)、姬蝴蝶兰的 *PeMADS2*, 3, 4, 5 (AY378149, AY378150, AY378147, AY378148)、蝴蝶兰的 *PhAP3* (AY771993)、香荚兰的 *VpGLO* (FJ804118) 和 *VpDEF1*, 2 (FJ804115, FJ804116)、芳香烟草的 *SoGLO* (FJ804114) 和 *SoDEF4* (FJ804113)、长叶美洲兜兰的 *PIGLO* (FJ804109) 和 *PIDEF1*, 2, 4 (FJ804105, FJ804106, FJ804108)、鹭兰的 *HrDEF* (218118129)、红门兰的 *OiGLO* (290350877)、矮牵牛的 *PhMADS1* (22664)、烟草的 *NiDEF* (1370275)、金鱼草的 *AmDEF* (16017)、欧洲云杉的 *PaDAL11* 和 *PaDAL13* (AF158539, AF158543)、灌状买麻藤的 *GGM2* (5019428)。

各节点处数字表示 bootstrap 值 (重复 1 000 次)。

Fig. 3 Phylogenetic analysis of AP3/DEF-like and PI/GLO-like MADS-box genes in plant species

The B group MADS-box genes listed in the tree are as follows: *Oncidium Gower Ramsey* (*OMADS3*, AY196350; *OMADS5*, HM140840; *OMADS9*, HM140841); *Gongora galeata* (*GgDEF1*, 237701150; *GgDEF2*, 237701152; *GgDEF3*, 237701154); *Cymbidium hybrida* (*ChAP3*, DQ683575); *Dendrobium crumenatum* (*DcAP3A*, DQ119838; *DcAP3B*, DQ119839); *D. devonianum* (*DdAP3*, GU126414); *D. hybrid* (*DhAP3*, EU927372); *D. moniliforme* (*DmPI*, EU056326); *Phalaenopsis equestris* (*PeMADS2*, AY378149; *PeMADS3*, AY378150; *PeMADS4*, AY378147; *PeMADS5*, AY378148); *P. hybrida* (*PhAP3*, AY771993); *Vanilla planifolia* (*VpGLO*, FJ804118; *VpDEF1*, FJ804115; *VpDEF2*, FJ804116); *Spiranthes odorata* (*SoGLO*, FJ804114; *SoDEF4*, FJ804113); *Phragmipedium longifolium* (*PIGLO*, FJ804109; *PIDEF1*, FJ804105; *PIDEF2*, FJ804106; *PIDEF4*, FJ804108); *Habenaria radiata* (*HrDEF*, 218118129); *Orchis italica* (*OiGLO*, 290350877); *Petunia hybrida* (*PhMADS1*, 22664); *Nicotiana tabacum* (*NiDEF*, 1370275); *Antirrhinum majus* (*AmDEF*, 16017); *Picea abies* (*PaDAL11*, AF158539; *PaDAL13*, AF158543); *Gnetum gnemon* (*GGM2*, 5019428).

The numbers at node represent the bootstrap values (with 1 000 replicates).

### 2.3 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 在蕙兰不同组织的表达分析

采用半定量 RT-PCR 对 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 进行组织特异性表达分析 (图 4), 结果表明 *CfDEF1* 主要在第 2 轮的侧瓣和唇瓣以及第 3 轮的蕊柱中表达, 在营养组织叶片和根以及第 1 轮的萼片中都不表达; *CfDEF2* 则在 1、2 轮花器官中表达, 在蕊柱、叶片和根中不表达; *CfGLO* 在所有花器官及其它组织中都表达。

进一步的实时荧光定量表达分析将各基因在花芽中的表达量设为 1, 结果与半定量 RT-PCR 结果基本一致 (图 5), *CfDEF1* 在唇瓣和侧瓣的表达量最高, 在蕊柱中表达量次之, 在子房中表达较低, 约为唇瓣和侧瓣的表达量的 24%; *CfDEF2* 在侧瓣中表达量最高, 在萼片中表达量次之, 在唇瓣、子房中表达量较低, 与半定量 RT-PCR 表达不一样的是在蕊柱中也有少量表达, 约为侧瓣表达量的 3%; *CfGLO* 在唇瓣和侧瓣中表达量最高, 在叶、子房和萼片中表达较低, 在蕊柱和根中的表达量最低, 约为唇瓣和侧瓣表达量的 7%。

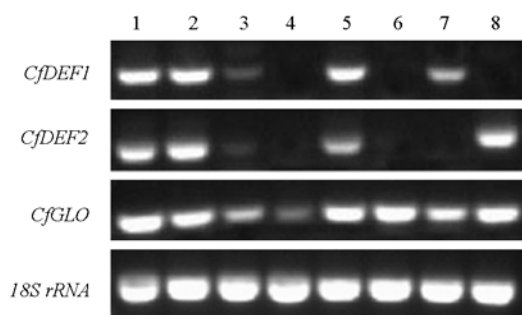


图 4 半定量 RT-PCR 检测 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 在蕙兰不同组织以及花芽中的表达情况

1. 花芽; 2. 侧瓣; 3. 子房; 4. 根; 5. 唇瓣; 6. 叶片; 7. 蕊柱; 8. 萼片。

Fig. 4 Expression of *CfDEF1*, *CfDEF2* and *CfGLO* genes in different tissues of *C. faberi* by semi-quantitative RT-PCR

1. Flower bud; 2. Petal; 3. Ovary; 4. Root; 5. Lip; 6. Leaf; 7. Column; 8. Sepal.

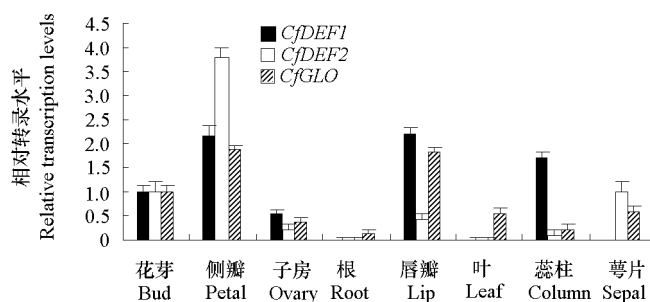


图 5 荧光定量 PCR 检测 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 在蕙兰各组织以及花芽中的表达情况

Fig. 5 Real-time quantitative PCR analysis of *CfDEF1*, *CfDEF2* and *CfGLO* mRNA expression in the flower bud, petal, ovary, root, lip, leaf, column and sepal of *C. faberi*

## 3 讨论

为了研究 B 类 MADS-box 基因对蕙兰花被形成的调控作用, 2 个 *DEF* 基因和 1 个 *GLO* 基因被克隆出来。序列同源分析以及系统进化分析表明, *CfDEF1*、*CfDEF2* 分别属于兰科植物 *PaleoAP3*

基因的 *PeMADS3* 类基因和 *PeMADS2* 类基因。*CfGLO* 属于 B 类 MADS-box 基因的 *PI/GLO* 类基因 (图 2, 图 3)。

以双子叶植物拟南芥和金鱼草为基础的经典 ABC 模型认为 B 类基因一般只在第 2、3 轮花器官的花瓣和雄蕊中表达, 部分花萼与花瓣有明显差异的单子叶植物如水稻 (*Oryza sativa*)、芦笋 (*Asparagus officinalis*) 和玉米 (*Zea mays*) 等的 B 类基因也符合 ABC 的表达模型 (Chung et al., 1995; Munster et al., 2001; Park et al., 2004), 但对于具有花瓣状萼片的单子叶植物却不适用。为此, van Tunen 等 (1993) 通过对郁金香的研究, 对 ABC 模型进行了修正: 认为 B 类基因不仅在第 2、3 轮花器官中表达, 同时也在第 1 轮中表达。本结果表明, *CfDEF2* 的表达模式与同类 (*PeMADS2* 类) 姬蝴蝶兰的 *PeMADS2*、鸢尾的 *DcOAP3A*、细茎石斛的 *DMAP3A* 一致 (Tsai et al., 2004; Xu et al., 2006; Sirisawat et al., 2010) (图 4, 图 5), 在第 1~3 轮花器官中都表达, 支持了 van Tunen 等 (1993) 对 ABC 模型的修正。

尽管单子叶植物的 *PaeloAP3* 类基因大多数在第 1 和第 2 轮花器官中都表达, 但 *PeMADS3* 类基因如 *PeMADS3*、*DcOAP3B*、*OMADS9*、*DMAP3B*、*HrDEF* 都不在第 1 轮花器官中表达, 这符合经典的 ABC 模型。蕙兰的 *PeMADS3* 类基因 *CfDEF1* 的表达模式与同类基因表达相似, 只在侧瓣和唇瓣中表达 (图 4, 图 5), 说明 *CfDEF1* 可能控制蕙兰侧瓣和唇瓣的形成。另外, *CfDEF2* 在萼片中强烈表达, 而 *CfDEF1* 在萼片中不表达, 这表明 *CfDEF2* 可能对蕙兰萼片的形成具有积极作用, 但是既然 *CfDEF2* 也在侧瓣和唇瓣中都有表达, 却没有将花瓣转化成萼片, 这可能是 *CfDEF2* 的单独存在还不足以促进花瓣向萼片的转化。对鹭兰的研究发现, 正常的鹭兰萼片与花瓣形态不一, *HrDEF* 在正常鹭兰中只在第 2 轮的花瓣中表达, 而在具有花瓣状萼片的鹭兰突变体的第 1 和第 2 轮的花器官中却都有表达, 这说明 *HrDEF* 的差异表达导致了鹭兰萼片和花瓣的差异 (Kim et al., 2007), 从而推测 *PeMADS3* 类基因在兰花的萼片和花瓣的分化过程中起作用 (Mondragon-Palomino & Theissen, 2008)。因此 *CfDEF2* 可能需要与 *CfDEF1* 一起共同作用才能控制蕙兰萼片的形成。

*CfGLO* 的表达模式也与同类的鸢尾中 *DcOPI*、姬蝴蝶兰中的 *PeMADS6*、麝香百合 (*Lilium longiflorum*) 的 *LLGLO1* 一致 (Tsai et al., 2005; Xu et al., 2006; Wu et al., 2010), 在第 1~3 轮花器官中都表达, 也支持 van Tunen 等 (1993) 对 ABC 模型的修正。并且 *CfGLO* 基因在蕙兰营养器官叶片和根中有少量表达 (图 4, 图 5), 这与其它植物的 B 类 MADS-box 基因, 如郁金香 (*Tulipa gesneriana*) 的 *TGGLO*、油棕 (*Elaeis guineensis*) 的 *EgGLO2* 等的表达一致 (Kanno et al., 2003; Adam et al., 2007), 说明这些基因除了控制花器官的发育外, 可能对营养组织如叶的发育也起作用。

对兰科植物 *PeMADS2* 类基因在花器官中的表达分析表明, *OMADS5*、*PeMADS2* 以及 *DcOAP3A* 等基因在侧瓣与萼片中的表达量基本一致 (Tsai et al., 2004; Xu et al., 2006; Chang et al., 2010), 而 *CfDEF2* 在这两个花器官中的表达量差别较大 (图 5)。同样, *PI/GLO* 类基因 *OMADS8*、*PeMADS6*、*DMPI* 以及 *DcOPI* 在花瓣与萼片及蕊柱中的表达量基本一致 (Tsai et al., 2005; Xu et al., 2006; Chang et al., 2010; Sirisawat et al., 2010), 而 *CfGLO* 在这 3 个花器官中的表达量差异也较大, 这可能是因为取材是花蕾刚刚绽开时的蕙兰, 此时花瓣、萼片、唇瓣、蕊柱形状和数量已经基本定型了, 所以基因的表达量在部分花器官中开始下降。此外, *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 在蕙兰的幼嫩子房中都有表达, 这与 *DcOAP3A*、*DcOAP3B*、*DcOPI*、*DMAP3A*、*PeMADS6* 的表达类似 (Tsai et al., 2005; Xu et al., 2006; Sirisawat et al., 2010), 说明 *CfDEF1*、*CfDEF2* 和 *CfGLO* 可能在蕙兰子房的形成过程中扮演了一定的角色。



## References

- Adam H, Jouannic S, Orioux Y, Morcillo F, Richaud F, Duval Y, Tregear J W. 2007. Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure. *J Exp Bot*, 58: 1245 – 1259.
- Bustin S A, Benes V, Garson J A, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M W, Shipley G L, Vandesompele J, Wittwer C T. 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55 (4): 611 – 622.
- Chang Y Y, Kao N H, Li J Y, Hsu W H, Liang Y L, Wu J W, Yang C H. 2010. Characterization of the possible roles for B class MADS box genes in regulation of perianth formation in orchid. *Plant Physiol*, 152: 837 – 853.
- Chung Y Y, Kim S R, Kang H G, Noh Y S, Park M C, Finkel D, An G. 1995. Characterization of two rice MADS box genes homologous to *GLOBOSA*. *Plant Sci*, 109: 45 – 46.
- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31 – 37.
- Goto K, Meyerowitz E M. 1994. Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes Dev*, 8: 1548 – 1560.
- Hsu H F, Yang C H. 2002. An orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AP3*-like MADS genes regulate floral formation and initiation. *Plant Cell Physiol*, 43: 1198 – 1209.
- Kanno A, Saeki H, Kameya T, Saedler H, Theissen G. 2003. Heterotopic expression of class B floral homeotic genes supports a modified ABC model for tulip (*Tulipa gesneriana*). *Plant Mol Biol*, 52: 831 – 841.
- Kim S Y, Yun P Y, Fukuda T, Ochiai T, Yokoyama J, Kameya T, Kanno A. 2007. Expression of a *DEFICIENS*-like gene correlates with the differentiation between sepal and petal in the orchid, *Habenaria radiata* (Orchidaceae). *Plant Sci*, 172: 319 – 326.
- Kramer E M, Dorit R L, Irish V F. 1998. Molecular evolution of genes controlling petal and stamen development: Duplication and divergence within the *APETALA3* and *PISTILLATA* MADS-box gene lineages. *Genetics*, 149: 765 – 783.
- Mondragon-Palomino M, Theissen G. 2008. MADS about the evolution of orchid flowers. *Trends Plant Sci*, 13: 51 – 59.
- Munster T, Wingen L U, Faigl W, Werth S, Saedler H, Theissen G. 2001. Characterization of three *GLOBOSA*-like MADS box genes from maize: Evidence for ancient paralogy in one class of floral homeotic B-function genes of grasses. *Gene*, 262: 1 – 13.
- Park J H, Ishikawa Y, Ochiai T, Kanno A, Kameya T. 2004. Two *GLOBOSA*-like genes are expressed in second and third whorls of homochlamydeous flowers in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Physiol*, 45: 325 – 332.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4: 406 – 425.
- Sirisawat S, Ezura H, Fukuda N, Kounosu T, Handa T. 2010. Ectopic expression of an *AP3*-like and a *PI*-like genes from ‘Sekkoku’ orchid (*Dendrobium moniliforme*) causes the homeotic conversion of sepals to petals in whorl 1 and the suppression of carpel development in whorl 4 in *Arabidopsis* flowers. *Plant Biotech*, 27: 183 – 192.
- Tsai W C, Kuoh C S, Chuang M H, Chen W H, Chen H H. 2004. Four *DEF*-like MADS Box genes displayed distinct floral morphogenetic roles in *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Physiol*, 45 (7): 831 – 844.
- Tsai W C, Lee P F, Chen H I, Hsiao Y Y, Wei W J, Pan Z J, Chuang M H, Kuoh C S, Chen W H, Chen H H. 2005. *PeMADS6*, a *GLOBOSA/PISTILLATA*-like gene in *Phalaenopsis equestris* involved in petaloid formation, and correlated with flower longevity and ovary development. *Plant Cell Physiol*, 6 (7): 1125 – 1139.
- van Tunen A J, Eikelboom W, Angenent G C. 1993. Floral organogenesis in *Tulipa*. *Flowering Newsl*, 16: 33 – 38.
- Wu X P, Shi J S, Xi M L, Luo Z W, Hu X H. 2010. A B functional gene cloned from lily encodes an ortholog of *Arabidopsis PISTILLATA* (*PI*). *Plant Mol Biol Rep*, 28: 684 – 691.
- Xu Y F, Teo L L, Zhou J, Kumar P P, Yu H. 2006. Floral organ identity genes in the orchid *Dendrobium crumenatum*. *Plant J*, 46: 54 – 68.