

麝香百合花发育基因 *LLGLO1* 在花蕾中的时空表达

席梦利*, 潘 梅*, 施季森, 徐 进**

(南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 南京 210037)

摘 要: 为了获得百合花发育相关的 B 功能基因 *LLGLO1* 在调控百合花发育过程中的重要信息, 以麝香百合 (*Lilium longiflorum*) 未开放的花蕾为试材, 以 *LLGLO1* 基因的特异片段为探针, 应用 RNA 原位杂交技术, 对 *LLGLO1* 基因在花发育各个阶段的时空表达动态进行了研究。结果表明, *LLGLO1* 基因在外轮花被、内轮花被、雄蕊和心皮等 4 轮花器官中均有表达, 但表达强度随不同的发育阶段而变化。长度 2.0 和 3.0 cm 的花蕾中 *LLGLO1* 基因的表达量明显高于 0.5 和 1.0 cm 的花蕾, 说明随着花器官的发育成熟, 该基因在各轮花器官中的表达量逐渐增加。

关键词: 百合; 麝香百合; 花蕾; 花发育; 原位杂交; *LLGLO1* 基因

中图分类号: S 682.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 03-0533-06

The Temporal and Spatial Changes of Flower Development Gene *LLGLO1* in the Floral Buds of *Lilium longiflorum*

XI Meng-li*, PAN Mei*, SHI Ji-sen, and XU Jin**

(Key Laboratory of Forest Genetics and Biotechnology Ministry of Education, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: In order to obtain the important expression information of *LLGLO1* gene during the process of flower development, the temporal and spatial changes of *LLGLO1* gene at different development stages of floral buds by *in situ* hybridization, using the floral buds of *Lilium longiflorum* as materials and the special sequence of *LLGLO1* gene as the probe. Result indicated that *LLGLO1* gene was expressed in the four whorls of floral-organ, including outer tepal, inner tepal, stamen, and carpel. It also indicated that the expression level of *LLGLO1* gene varies with different development stages of floral buds. The expression level was higher in the 2.0 cm and 3.0 cm floral buds than that in the 0.5 cm and 1.0 cm ones, showing that the expression level of *LLGLO1* gene increases with the development of floral-organ.

Key words: *Lilium*; *Lilium longiflorum*; floral bud; flower development; *in situ* hybridization; *LLGLO1* gene

收稿日期: 2011 - 10 - 31; 修回日期: 2011 - 12 - 20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30972407); 国家 ‘948’ 项目 (2007-4-06); 江苏高校优势学科建设工程项目

* 并列第一作者

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

花器官的发育受 A、B、C 类基因控制,这 3 类基因分别在相邻的两轮花器官中发挥作用。A 类基因在第 1、2 轮花器官中表达, B 类基因在第 2、3 轮花器官中表达, 而 C 类基因则在第 3、4 轮花器官中表达。而且 A 类与 C 类基因功能相互拮抗 (Coen & Meyerowitz, 1991)。Colombo 等 (1995) 在矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 中发现了决定胚珠特征的 D 类基因, 将 ABC 模型延伸为 ABCD 模型 (Angenent et al., 1995; Colombo et al., 1995)。随着研究的不断深入, 花器官发育模型后来又被延伸为 ABCDE 模型和四聚体模型 (Pelaz et al., 2000; Theissen, 2001; Theissen & Saedler, 2001)。花器官发育模型的不断发展和延伸, 极大地推进了花器官发育遗传学的发展, 使花发育的研究成为发育生物学研究中最引人瞩目的热点 (刘晓玲, 2008)。

百合花的结构与模式植物拟南芥和金鱼草花的结构明显不同, 因此, 以拟南芥和金鱼草等双子叶植物为依据提出的花器官发育模型并不完全适用于百合等单子叶植物。van Tunen 等 (1993) 通过对郁金香花发育的研究, 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 轮花器官中表达, 从而使第 1 轮和第 2 轮花器官有着类似的结构 (van Tunen et al., 1993)。

百合花与郁金香花结构相似, 其发育研究已深入到分子水平, 克隆并对表达进行初步研究的花发育相关基因主要有 *LMADS1*、*LMADS2*、*LMADS3*、*LMADS4*、*LfMADS1*、*LfMADS2*、*LfMADS3*、*LRSQA*、*LRSQB*、*LRGLOA*、*LRGLOB*、*LRAG*、*LRAGL2A*、*LRAGL2B*、*LLGLO1*、*LLTCP1* (Tzeng & Yang, 2001; Tzeng et al., 2002, 2003; Winter et al., 2002; 张云 等, 2004; 吴小萍 等, 2006; 吴小萍, 2007; Wu et al., 2010)。对已经克隆的基因的表达分析主要是通过实时定量 PCR 技术或转化模式植物拟南芥, 但这两项技术不能在显微或亚显微水平对百合花发育相关基因的时空表达进行定位。

为了揭示百合花发育过程中 B 类基因的表达模式, 吴小萍等克隆了百合花发育相关基因 *LLGLO1*, BLAST 分析结果表明, *LLGLO1* 的 cDNA 与多种单子叶植物的 GLO 类基因同源性较高 (吴小萍 等, 2006; 吴小萍, 2007; Wu et al., 2010)。本研究中以麝香百合品种 ‘雷山’ 不同发育阶段的花蕾为研究材料, 以 *LLGLO1* 的特异片段为探针, 应用麝香百合花蕾 RNA 组织原位杂交技术体系 (席梦利 等, 2010, 2011), 在百合上应用 RNA-RNA 组织原位杂交技术对 *LLGLO1* 基因在百合花发育各个阶段的时空表达进行定位, 获得了该基因在调控百合花发育过程中的重要表达信息, 为进一步揭示麝香百合花发育的分子机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料及其石蜡切片制作

试验于 2009—2010 年在南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室进行。试验材料为麝香百合 (*Lilium longiflorum*) 品种 ‘雷山’ 0.5~3.0 cm 长的花蕾, 基因探针为 *LLGLO1* 的特异片段。

将装有 70% FAA 的小瓶置于冰上, 将花蕾和茎段用手术刀片切下, 立即浸泡于 FAA 固定液中, 用抽气泵抽至花蕾沉于固定瓶底, 无气泡。换新鲜固定液, 4℃过夜。

材料经脱水、透明、浸蜡及包埋后进行石蜡切片, 切片厚度 10 μm。

1.2 RNA 探针的制备

通过 NCBI 网站搜索多个百合 MADS-box 基因的蛋白序列, 应用 DNAMAN 软件比对蛋白序列的同源性。根据比对结果选取同源性较低的区域作为探针转录的模板。

根据 *LLGLO1* 基因序列设计特异性引物 (PROBE-LG1U: 5'-AGGATACCGGAAGAGGATAACA AAC-3', PROBE-LG1D: 5'-GCGGC ATCCAATATTACGATTATAC-3'), 进行 PCR 扩增, 获得长 340 bp 的片段。

切胶回收目的片段, 将目的片段与 pGEM-T Easy Vector 连接并转化大肠杆菌 DH5 α , 对菌液进行 PCR 验证。将验证后的菌液送金思特公司测序, 测序结果与克隆的 *LLGLO1* 基因序列比对, 比对正确的作为制备探针的转录模板。

使用 Roche 公司的 DIG-labeling Kit 标记 RNA 正义和反义探针。反义探针是原位杂交过程中的实验探针, 正义探针是原位杂交过程中的对照探针。

1.3 原位杂交

石蜡切片经过脱蜡和复水后, 进行蛋白酶处理, 用甘氨酸溶液终止蛋白酶反应, 并进行组织再固定; 乙酸酐处理切片, 然后洗涤和脱水。

脱水后将玻片平铺于密封的盒中, 盒内底层放无水乙醇, 严格保持切片脱水状态, 置于 4 °C 3 ~ 4 h; 然后再将玻片平铺于湿盒中, 盒底加入适量 2 \times SSC、50%甲酰胺, 湿盒用 parafilm 密封后, 恒温箱中 52 °C 杂交过夜。

杂交后洗去多余探针, 经封闭、洗涤、显色、封片后显微镜下观察拍照, 细胞组织中有蓝紫色沉淀物为阳性反应。

2 结果与分析

正义探针原位杂交结果显示, 各个发育时期的花蕾切片上, 4 轮花器官除适量背景外均无明显阳性反应。

反义探针原位杂交结果显示, 在花蕾长度 0.5、1.0、2.0 和 3.0 cm 等 4 个不同发育阶段, 外轮花被、内轮花被、雄蕊和心皮等 4 轮花器官均有 B 功能基因 *LLGLO1* 转录的 mRNA 分布, 但表达水平有差异 (图 1)。

在长度约 0.5 cm 的花蕾 (图 1, A) 中, 外轮花被、内轮花被、雄蕊和心皮等 4 轮花器官的细胞处于分生状态, 细胞体积小, 核质比较大, 只能观察到组织细胞整体表现为浅红色, 没有典型的蓝紫色沉淀物出现, 说明 B 功能基因 *LLGLO1* 在该阶段表达量非常低。

花蕾长度发育到 1.0 cm 时, 多数花蕾处于减数分裂的第 1 次分裂期, 部分花粉囊中能明显观察到花粉母细胞分裂 1 次后形成的二分体。花器官中 B 功能基因 *LLGLO1* 的表达量明显高于 0.5 cm 的花蕾, 可以清晰观察到外轮和内轮花被片、花粉囊中部和雌蕊中发育为胚珠的部分有 B 功能基因 *LLGLO1* 转录的 mRNA 分布 (图 1, B、C)。

长度约 2.0 cm 的花蕾, 减数分裂已经结束, 花粉囊内部花粉粒已经形成。内外轮花被主要由体积较大的薄壁细胞组成, 可以观察到内外轮花被中有典型的蓝紫色沉淀物, 药隔部位蓝紫色沉淀物较多, 胚珠部位也可观察到蓝紫色沉淀物, 花粉囊颜色明显较花蕾长 0.5 和 1.0 cm 时的颜色深 (图 1, D、E)。

花蕾长度发育到 3.0 cm 时, 可以观察到 *LLGLO1* 在雄蕊中表达的杂交信号非常强烈, 整个花粉囊壁细胞、药隔、绒毡层细胞均可以观察到 B 功能基因 *LLGLO1* 转录的 mRNA 分布, 且杂交信号强度高于 2.0 cm 时期, 胚珠部分仍可观察到少量 B 功能基因 *LLGLO1* 转录的 mRNA 分布, 瓣状被片部分细胞多为薄壁细胞, 体积较大, 也能观察到有杂交信号的细胞 (图 1, F ~ H)。

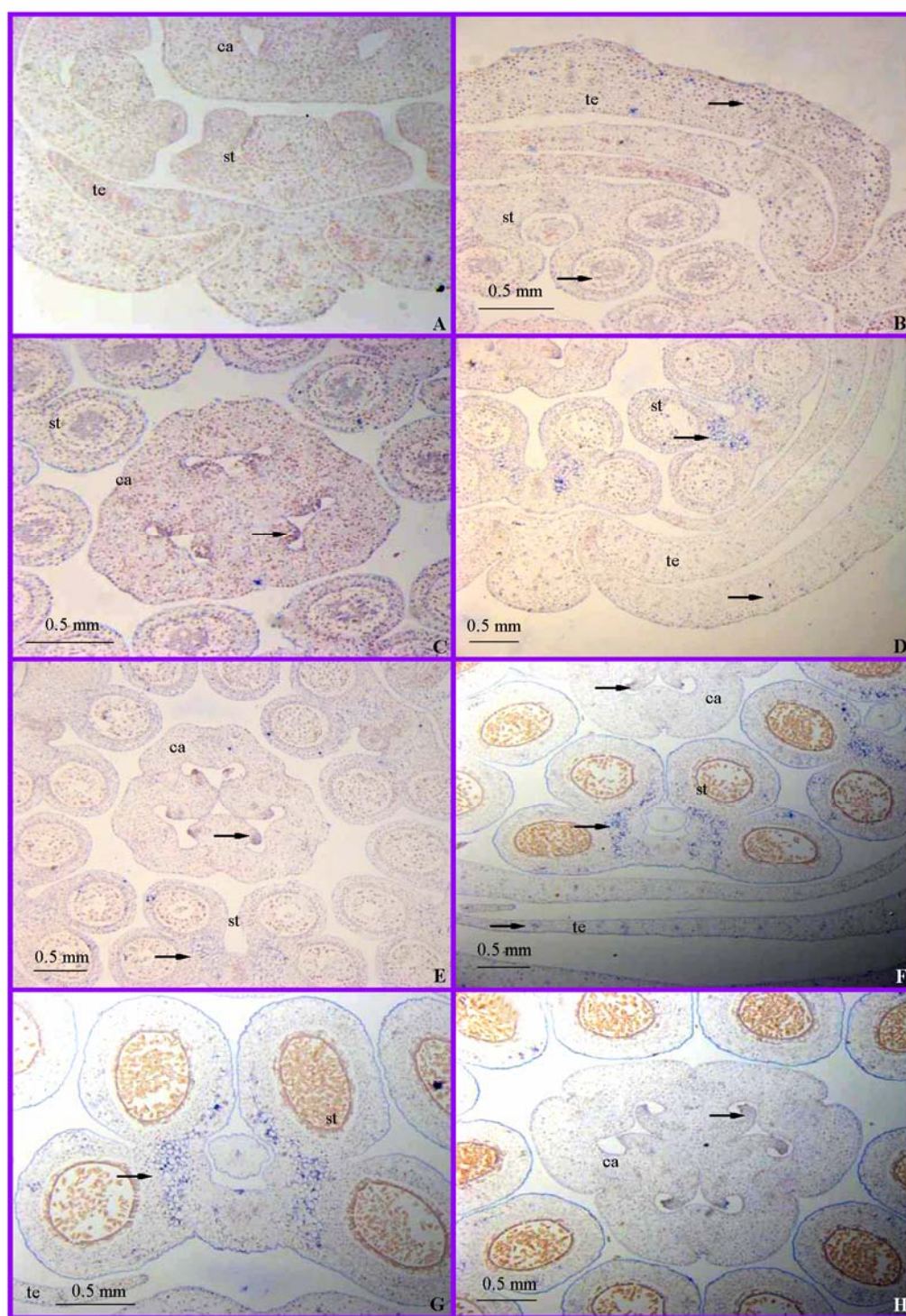


图 1 *LLGL01* 在百合花蕾不同发育时期的表达

A: 0.5 cm 长的花蕾横切面; B、C: 1.0 cm 长的花蕾横切面; D、E: 2.0 cm 长的花蕾横切面; F~H: 3.0 cm 长的花蕾横切面。
te、st、ca 分别代表瓣状被片、雄蕊和心皮。箭头所示为原位杂交信号。

Fig. 1 The expression of *LLGL01* in floral buds of different developmental periods

A: Transverse section of 0.5 cm floral bud; B, C: Transverse section of 1.0 cm floral bud; D, E: Transverse section of 2.0 cm floral bud;
F~H: Transverse section of 3.0 cm floral bud.

te, st, ca represented tepal, stamen and carpel, respectively. The arrow demonstrated *in situ* hybridization signal.

3 讨论

GLO 类基因在不同种植物花器官中表达的时空有明显差异。拟南芥花发育到第 3 阶段时, *PI* 基因主要在花瓣、雄蕊原基中表达, 心皮原基中有少量表达, 进入花发育的第 6 阶段时, *PI* 基因只在花瓣、雄蕊原基中表达。金鱼草的 *GLO* 基因与拟南芥的 *PI* 基因表达模式相似。单子叶植物玉米、水稻的 *GLO* 同源基因的表达模式与拟南芥、金鱼草也极为相似 (Yong-Yoon et al., 1995; Krizek & Fletcher, 2005)。郁金香的 *GLO* 同源基因 *TGGLO* 的表达模式则不同, 它不仅在内轮花被、雄蕊中表达, 还在外轮花被中也有较高水平的表达, 同时在心皮、苞片、叶和茎中有低量表达 (Kanno et al., 2003)。此种表达模式解释了郁金香花被形成的原因, 并支持了 van Tunen (1993) 修正的 ABC 模型。

本研究中观察到 *LLGLO1* 基因在百合外轮花被、内轮花被、雄蕊和心皮四轮花器官中均有表达, 且表达强度随不同的发育阶段而变化。在长 2.0 和 3.0 cm 的花蕾中, *LLGLO1* 基因的表达量明显高于 0.5 和 1.0 cm 的花蕾, 说明随着花器官的发育成熟, 该基因在各轮花器官中的表达量逐渐增加。该研究结果与已报道的荧光定量及半定量 PCR 结果 (吴小萍 等, 2006; 吴小萍, 2007; Wu et al., 2010) 基本一致。Wu 等 (2010) 将 35S::*LLGLO1* 转入拟南芥中, 发现转基因拟南芥的萼片同源转化为花瓣化的同源器官, 形成 6 个花被、6 个雄蕊和 1 个雌蕊。荧光定量 PCR、转基因及组织原位杂交研究结果均证明 *LLGLO1* 基因表达符合 van Tunen (1993) 修正的 ABC 模型。

References

- Angenent G C, Franken J, Busscher M, van Dijken A, van Went J L, Dons H J, van Tunen A J. 1995. A novel class of MADS-box genes is involved in ovule development in petunia. *Plant Cell*, 7 (10): 1569 - 1582.
- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31 - 37.
- Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons H, Angenent G, van Tunen A. 1995. The petunia MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. *Plant Cell*, 7 (11): 1859 - 1868.
- 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 Molecular Biology*, 52 (4): 831 - 841.
- Krizek B, Fletcher J. 2005. Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics*, 6 (9): 688 - 698.
- Liu Xiao-ling. 2008. Advances in the research of flower development models in plant. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 22: 9 - 12. (in Chinese)
- 刘晓玲. 2008. 植物花发育模型的研究进展. *现代农业科技*, 22: 9 - 12.
- Pelaz S, Ditta G, Baumann E, Yanofsky M. 2000. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature*, 405: 200 - 203.
- Theissen G. 2001. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 75 - 85.
- Theissen G, Saedler H. 2001. Floral quartets. *Nature*, 409: 469 - 471.
- Tzeng T, Chen H, Yang C. 2002. Ectopic expression of carpel-specific MADS box genes from lily and lisianthus causes similar homeotic conversion of sepal and petal in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130 (4): 1827.
- Tzeng T, Hsiao C, Chi P, Yang C. 2003. Two lily *SEPALLATA*-like genes cause different effects on floral formation and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 133 (3): 1091.
- Tzeng T, Yang C. 2001. A MADS box gene from lily (*Lilium longiflorum*) is sufficient to generate dominant negative mutation by interacting with *PISTILLATA* (*PI*) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 42 (10): 1156.
- van Tunen A J, Eikelboom W, Angenent G C. 1993. Floral organogenesis in *Tulipa*. *Flowering News Lett*, 16: 33 - 38.
- Winter K U, Weiser C, Kaufmann K, Böhne A, Kirchner C, Kanno A, Saedler H, Theissen G. 2002. Evolution of class b floral homeotic proteins:

- obligate heterodimerization originated from homodimerization. *Mol Biol Evol*, 19 (5): 587 – 596.
- Wu Xiao-ping. 2007. Cloning and functional dissection of genes underlying floral development and architecture formation in *Lilium* [Ph. D. Dissertation]. Nanjing: Nanjing Forestry University. (in Chinese)
- 吴小萍. 2007. 百合花发育与形态建成基因的克隆和功能解析[博士论文]. 南京: 南京林业大学.
- Wu Xiao-ping, Xi Meng-li, Shi Ji-sen. 2006. Cloning and expression of a MADS box gene *LLGLO1* from *Lilium longiflorum* Thunb. *Plant Physiology Communications*, 42 (5): 871 – 876. (in Chinese)
- 吴小萍, 席梦利, 施季森. 2006. 麝香百合 *LLGLO1* 基因的克隆和表达. *植物生理学通讯*, 42 (5): 871 – 876.
- 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.
- Xi Meng-li, Liu Po, Wu Xiao-ping, Shi Ji-sen. 2010. Construction of RNAi vector of *LLGLO1* gene related to flower development of *Lilium*. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science Edition*, 34 (1): 1 – 4. (in Chinese)
- 席梦利, 刘 坡, 吴小萍, 施季森. 2010. 百合花发育相关基因 *LLGLO1* 的 RNAi 载体构建. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 34 (1): 1 – 4.
- Xi Meng-li, Pan Mei, Shi Ji-sen. 2011. A *in situ* hybridization experiment system for the floral buds of *Lilium longiflorum*. *Molecular Plant Breeding*, 9 (4): 514 – 518. (in Chinese)
- 席梦利, 潘 梅, 施季森. 2011. 麝香百合花蕾组织原位杂交体系的建立. *分子植物育种*, 9 (4): 514 – 518.
- Yong-Yoon C, Seong-Ryong K, Hong-Gyu K, Yoo-Sun N, Park M, Finkel D, Gynheung A. 1995. Characterization of two rice MADS box genes homologous to *GLOBOSA*. *Plant Science*, 109 (1): 45 – 56.
- Zhang Yun, Liu Qing-lin, Ouyang Qing, Cai Wen-qi. 2004. Cloning of flower development associated MADS box gene fragments in *Lilium*. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (3): 332 – 336. (in Chinese)
- 张 云, 刘青林, 欧阳青, 蔡文启. 2004. 百合花发育相关 MADS box 基因的克隆. *园艺学报*, 31 (3): 332 – 336.

通 知

2012 年园艺植物染色体倍性操作与遗传改良学术研讨会

预备通知

自 2008 年 11 月在中国农业科学院郑州果树研究所成功召开园艺植物染色体倍性操作与遗传改良研讨会以来, 我国科研人员在该领域的研究取得了可喜的成绩。为进一步总结近几年来在该领域的研究进展, 促进园艺植物倍性育种研究, 同时为该领域的专家、学者和同仁们提供良好的交流平台。中国园艺学会定于 2012 年 4 月中旬在重庆召开园艺植物染色体倍性操作与遗传改良学术研讨会。欢迎从事该研究领域及相关研究工作的人员参加。

大会主题为染色体倍性操作与遗传改良基础、应用研究, 分子生物学研究技术在染色体倍性与遗传改良上的应用等。会议将邀请国内生物学研究领域的院士和知名专家作特邀报告。

会议拟定于 2012 年 4 月中旬召开, 会期 3 天, 参会代表 200 人左右。本次研讨会就会议主题广泛征集会议论文(全文或摘要), 会议将编印论文集(非正式出版物), 论文格式请按照《园艺学报》的要求撰写, 文责自负。论文通过电子邮件形式提交, 邮件主题请用“第一作者姓名 + 单位名称”格式, 会务组 E-mail: fruitlab@126.com。

会议论文征集截止时间: 2012 年 3 月 16 日, 请将参会回执于 2012 年 3 月 30 日发会务组 E-mail: fruitlab@126.com

联系人: 何桥 (13594231482), 汪卫星 (13883716907)。其它相关事项将在会议正式通知及中国园艺学会网站中更新。如您有任何问题, 请随时与会务组联系: fruitlab@126.com。

中国园艺学会 西南大学园艺园林学院

2011 年 12 月 1 日