

洋葱花发育 B 类 MADS-box 基因 *AcDEF* 的克隆与表达分析

徐启江¹, 丁 一¹, 黄 赫¹, 王 勇², 崔成日³, 梁 毅^{4,*}

(¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; ²东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; ³哈尔滨长日洋葱研究所, 哈尔滨 150090; ⁴北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097)

摘 要: 以紫皮洋葱常规品种 ‘RUPI’ 为试材, 通过 RACE 方法克隆了 *AP3/DEF* 同源基因 *AcDEF*, 并用半定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 研究 *AcDEF* 在洋葱各类器官中的表达模式。GenBank 登录号为 JX661502 的 *AcDEF* 基因长 1 014 bp, 开放阅读框长度为 675 bp, 编码 224 个氨基酸。系统发育分析表明, *AcDEF* 基因属于单子叶 B 功能基因家族的 *AP3/DEF* 亚家族。表达模式分析显示, *AcDEF* 在花器官中特异表达, 其中在花瓣、雄蕊内高丰度表达, 在花萼和膜状总苞中微量表达, 在心皮中表达水平极低, 在无性营养器官如根、假茎、叶片和鳞茎中无表达。在开花过程中, 各花器官中 *AcDEF* 转录物的积累呈动态变化; 在花瓣和雄蕊发育过程中 *AcDEF* 均高丰度表达, 但在完全开放花的花瓣和雄蕊中表达量略有降低; 在花萼、膜状总苞和心皮中表达量递减, 在完全开放花的膜状总苞和心皮中 *AcDEF* 的表达量很低。*AcDEF* 基因的序列结构和表达模式具有单子叶物种 *AP3/DEF* 基因的特征, 属于 *paleoAP3* 进化系。

关键词: 洋葱; 花发育; B - 功能 MADS-box 基因; *AcDEF* 基因

中图分类号: S 633.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 06-1090-11

Cloning and Expression Analysis of B Class MADS-box Gene *AcDEF* Associated with Floral Development in Onion

XU Qi-jiang¹, DING Yi¹, HUANG He¹, WANG Yong², CUI Cheng-ri³, and LIANG Yi^{4,*}

(¹College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Horticulture College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; ³Harbin Institute of Long-day Onion, Harbin 150090, China; ⁴Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: We isolated the *AP3/DEF*-homologue from the onion variety ‘RUPI’ using RACE (rapid amplification of cDNA ends), and characterized its expression patterns in vegetative and floral organs using semi-quantitative RT-PCR and quantitative real-time PCR. Phylogenetic analysis indicates that our onion gene, denoted *AcDEF*, belongs to the *AP3/DEF* subfamily of the B-function gene family and has sequence characteristics similar to other monocot *paleoAP3* genes. The cDNA sequence is 1 014 bp long, includes both 5' and 3' untranslated regions, a poly (A) tail, and an open reading frame encoding a protein with a predicted length of 224 amino acids. Expression analyses indicate that *AcDEF* is specifically expressed in flower with no detectable signal in vegetative organs, such as roots, cauloids, leaves and bulbs. In addition, expression is tissue-specific in floral organs, with the highest level in the petals and

收稿日期: 2013 - 01 - 30; 修回日期: 2013 - 04 - 10

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (C201016); 农业部公益性行业项目 (200903018-6-5); 哈尔滨市创新人才研究专项 (2013RFLYN015)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liangyi222@yahoo.com.cn; Tel: 010-51505026)

stamens, moderate level in scapes and membranous sheath. *AcDEF* is expressed at very low levels in the carpels. Accumulation of *AcDEF* transcripts is dynamically changed and associated with the flower-bud formation and development. Expression of *AcDEF* is strongly detected during the initiation and early development of petals and stamens, but expression levels in these organs are somewhat reduced at later developmental stages. There also appears to be a gradual and obvious decrease in *AcDEF* expression during the different developmental stages of scapes, membranous sheath and carpels, such that it is almost absent from the membranous sheath and carpels in full-opening flowers.

Key words: onion; *Allium cepa* L.; flower development; B-function MADS-box genes; *AcDEF* gene

花器官发育的“ABCDE”模型 (Coen & Meyerowitz, 1991; Purugganan et al., 1995; Rounsley et al., 1995; Theißen & Saedler, 1995, 2001; Theißen et al., 2000; Litt & Kramer, 2010) 指出, 双子叶植物 4 轮花器官 (萼片、花瓣、雄蕊、心皮) 的特征属性是由 A、B、C、D、E 类 MADS-box 基因决定的。A + E 功能基因调控萼片的发育, A + B + E 功能基因调控花瓣的发育, B + C + E 功能基因调控雄蕊的发育, C + E 功能基因调控心皮的发育, C + D + E 功能基因调控胚珠的发育。该分子模型是否适用于花结构多样的基部被子植物和单子叶植物? 目前已从基部被子植物克隆并鉴定了与拟南芥同源的 A、B、C 和 E 功能基因 (Kim et al., 2004, 2005; Stellari et al., 2004; Zahn et al., 2005; Chanderbali et al., 2006), 这些基因的表达模式基本符合“ABCDE”模型, 但同源的 B、C 功能基因表达区域有所外延, 与 *AP3* 和 *PI* 同源的 B 功能基因可在花被、雄蕊或退化的雄蕊、心皮中表达; C 功能基因也可在花被中表达。这些表达模式是独立的表达还是花被向雄蕊进化过程中的遗留特征, 正引发人们的兴趣。许多基部被子植物及单子叶植物的 B 功能基因表达区域向外扩展而导致花瓣状器官的分化, 使外轮器官与内层花瓣在形态上具有一致性, 如 *CCGLO* (Ochiai et al., 2004)、*ApGLO/ApDEF* (Nakamura et al., 2005)、*MaDEF1* (Nakada et al., 2006)、*NyodPI/NyodAP3* (Yoo et al., 2010) 等, 是“边界转移”模型 (Bowman, 1997) 和“边界滑动”模型 (Kramer et al., 2003) 等 ABC 修饰模型 (Kanno et al., 2003) 提出的基础。这类具有宽泛表达区域的 B 功能基因, 可能伴随着萼片的进化而被限定在核心真双子叶植物的雄蕊和心皮中表达 (Soltis et al., 2007)。

本研究中对洋葱 (*Allium cepa* L.) B 功能 *AP3/DEF*-like MADS-box 基因进行分离, 获得该基因的全长 cDNA 序列, 初步阐述该基因及其编码蛋白质的结构特征, 阐明其不同组织器官中的表达模式, 探讨洋葱 *AcDEF* 基因的系统发育及其在确定花器官特征属性方面的作用, 为深入解析洋葱花发育的分子机制, 并通过分子遗传工程拓展雄性不育系资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫皮洋葱常规品种 ‘RUPI’ 由哈尔滨长日洋葱研究所提供。2011 年 11 月种植于东北林业大学花卉生物工程研究所的日光温室内, 常规栽培管理。2012 年 3 月现蕾, 采集不同发育期的花芽, 成花的花葶、膜状总苞、花瓣、雄蕊、心皮, 以及根、假茎、叶、鳞茎等, 采集后立即用液氮冰冻, 保存于 -80 °C 冰箱, 备用提取总 RNA。

1.2 RNA 提取、MADS-box 同源基因克隆

参照 Kim 等 (2004) 实验程序, CTAB 法结合植物 RNA 提取试剂盒 (Qiagen) 提取 ‘RUPI’ 花芽的总 RNA, NanoDrop1000 微量紫外分光光度计和甲醛琼脂糖凝胶检测总 RNA 的质量和浓度。

利用 oligo (dT)₁₇ 接头引物 (表 1)、反转录酶 III (Invitrogen), 以 500 ng 总 RNA 为模板合成第一链 cDNA。利用 cDNA 末端快速扩增法 (RACE) 克隆 3'-cDNA 序列 (Frohman et al., 1988), 根据 GenBank 中与洋葱亲缘关系相近物种 (风信子、芦笋、爱情花、意大利红门兰和小兰屿蝴蝶兰) 的 MADS-box 基因保守区的核苷酸序列设计上游兼并引物 (表 1), 以第一链 cDNA 为模板, 利用特异引物、接头引物、LA Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa) 进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min, 随后 30 个循环, 每循环 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火扩增 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 完成最后一个循环后, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物利用胶回收及 PCR 产物纯化试剂盒 (Promega) 回收约 850 bp 的 PCR 产物, 用 TOPO TA 克隆试剂盒 (Invitrogen) 进行 PCR 纯化产物的克隆, 快速质粒小提试剂盒 (Eppendorf) 提取质粒, 北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

根据获得的 3'-cDNA 序列设计基因特异性引物, 用 5'/3'-RACE 试剂盒 (Roche) 及特异引物、oligo (dT) 锚定引物、PCR 锚定引物 (表 1) 通过 5'-RACE 克隆 5'-cDNA 序列。根据拼接序列设计特异 PCR 引物 *AcDEF-Fw1* 与接头引物 (表 1) 克隆基因全长 cDNA。PCR 产物回收纯化、克隆、质粒提取、测序同 3'-RACE。

表 1 洋葱 *AcDEF* 基因克隆及表达分析所用引物

Table 1 List of primers used for cloning and expression analysis of *AcDEF* from onion

编号 No.	引物名称 Primer name	核苷酸序列 (5'→3') Nucleotide sequence 5' to 3'
1	oligo (dT) ₁₇	GACTCGAGTGCACATCG (T) ₁₇
2	接头引物 adaptor primer	GACTCGAGTGCACATCG
3	B 功能 MADS-box 基因特异引物 B-function MADS-box gene specific primer	ARCTCACYGT <u>S</u> CTYTG <u>Y</u> GAYGC
4	<i>AcDEFSP1</i>	ATCCGGTGTATGGCTTTGTGGA
5	oligo (dT) 锚定引物 oligo (dT) anchor primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC (T) ₁₆ <u>V</u>
6	<i>AcDEFSP2</i>	TCCACAAAGCCATACACC
7	<i>AcDEFSP3</i>	CTTCTTAGTATCAGTGTCCG
8	<i>AcDEF-Fw1</i>	GAAACTGTTGCCTCTCAC
9	<i>AcDEF-Fw2</i>	TCATGGACTTGCCTGTTCTTGAGC
10	<i>AcDEF-Rv2</i>	TGCAAGGGCTAGTGTTCATCGTA
11	<i>Actin-Fw</i>	GCTCAGTCCAAGAGAGGTATTC
12	<i>Actin-Rv</i>	GCTCGTTGTAGAAAGTGTGATG

注: 引物 3 和 5 中带下划线的缩写字母代表兼并碱基, 即 R 代表 A 或 G, Y 代表 C 或 T, S 代表 G 或 C, V 代表 A 或 C 或 G。其他缩写: Fw 意为正向引物; Rv 意为反向引物。

Note: The abbreviations (underlined) for the degenerate bases used in primers 3 and 5 are R = A or G; Y = C or T; S = G or C; V = A, C or G. Other abbreviations: Fw = Forward primer; Rv = Reverse primer.

1.3 序列比对及系统发育分析

为明确本研究分离基因所属的 MADS-box 亚家族, 通过 BLAST 检索与其他物种的基因序列进行比对, 并进行系统进化发育分析。首先将克隆的基因序列提交到 DDBJ/EMBL/GenBank 数据库中, 获得与克隆基因序列高度相似的同源基因, 然后用 ClustalX1.83 软件进行序列比对, 用 GeneDoc3.2 软件进行手工调整。按照标准遗传密码子翻译方式, 通过 Se-A1 v2.0 软件将核苷酸序列转换为氨基酸序列。通过 PHYML-v2.4 软件采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 对氨基酸矩阵进行系统发育分析。用默认的 JTT 模型 (Jones et al., 1992) 进行氨基酸矩阵分析, 不变位点的比例、Gamma 分布的形状参数均为自动优化, 初始树由 BioNJ 程序获得。ML 系统树分支的置信度采用重复抽样的方法, 重复抽样的次数为 1 000 次, 大于 50% 的 bootstrap 标注在树图上。

1.4 基于半定量 RT-PCR 和 qRT-PCR 的 *AcDEF* 基因表达分析

CTAB 法结合植物 RNA 提取试剂盒提取花萼、膜状总苞、花瓣、雄蕊、心皮、根、假茎、叶、鳞茎的总 RNA, DNase 处理去除基因组 DNA 污染。以洋葱不同器官的总 RNA 为模板, 利用 oligo(dT)₁₇ 引物和反转录酶 III 合成第一链 cDNA。以 cDNA 为模板进行基因特异性 PCR, 以 *ACTIN* 基因为内参。

半定量 RT-PCR 在 PE-9700 型 PCR 仪上进行, *AcDEF* 及 *ACTIN* 基因特异引物见表 1。PCR 反应条如下: 94 °C 预变性 2 min, 随后 30 个循环, 每循环 94 °C 变性 30 s, 60 °C 扩增退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 完成最后一个循环后, 72 °C 延伸 7 min。在 2% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物。

以花萼、膜状总苞、花瓣、雄蕊、心皮、根、假茎、叶、鳞茎、花蕾及完全开放花的 cDNA 为模板, 用 7500 fast 型实时荧光定量 PCR 仪和 SYBR[®] *premix Ex Taq*[™] 试剂盒 (TaKaRa) 进行 *AcDEF* 基因的实时定量 PCR 分析; 20 μ L 反应体系其中包括 0.2 μ L 的第一链 cDNA 模板、浓度为 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的正反向引物各 1 μ L (引物序列同半定量 RT-PCR, 表 1)、SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] (2 \times) 10 μ L、荧光定量 PCR 参比染料 (50 \times) 0.5 μ L、ddH₂O 7.3 μ L。qRT-PCR 的反应程序如下: 95 °C 预变性 2 min; 随后 40 个扩增循环 (95 °C 10 s, 60 °C 45 s)。以 *ACTIN* 基因的转录表达水平为内参, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法 (Livak & Schmittgen, 2001) 分析 *AcDEF* 基因的相对表达水平。每样品设 3 个生物学重复, 在同一批次内完成内参基因和目标基因的 PCR 反应。

2 结果与分析

2.1 洋葱花器官特征基因 *AcDEF* 的克隆及序列比对

将洋葱花芽总 RNA 在 AMV 反转录酶的作用下合成第一链 cDNA, 利用 MADS-box 基因特异引物通过 3'-RACE 方法分离 MADS-box 基因。对约为 850 bp 的扩增产物切胶回收, 亚克隆入 pCR[®] 2.1-TOPO[®] 载体并测序。测序结果表明该片段有效长度为 802 bp, 其中包含 22 个碱基的 polyA 尾巴和 3'端接头引物序列, 说明已经到达 3'末端。将该核苷酸序列及其推导的氨基酸序列分别在 NCBI 的核苷酸数据库中进行 blastn 和蛋白数据库中进行 blastp 分析, 该核苷酸序列与芦笋 (*Asparagus officinalis*) *AoDEF*、葡萄风信子 (*Muscari armeniacum*) *MaDEF* 的核苷酸序列具有很高的相似性, 这两个基因均为 *DEF*-like 基因。因而将从洋葱中克隆的 *DEF*-like 基因命名为 *AcDEF*。

AcDEF cDNA 的 5'区序列用 5'/3'-RACE 试剂盒克隆。以 3'-RACE 所得序列为基序设计 3 个基因特异性引物进行 5'-RACE 扩增, 其中 *AcDEF*SP1 用于以 RNA 为模板反转录合成第一链 cDNA, 然后利用 *AcDEF*SP2 和 oligo (dT)₁₇ 锚定引物以加 dA 尾的 cDNA 为模板进行 5'-RACE 扩增。为保证克隆片段的特异性, 再用巢式引物 *AcDEF*SP3 和锚定引物进行第 2 次 5'-RACE 扩增, 克隆后测序结果表明, 该片段长度为 328 bp, 在 5'端 131 bp 处发现起始密码子。利用 5'-RACE 和 3'-RACE 得到的序列进行拼接, 得到 1 条完整的 cDNA 序列, 长度为 1 014 bp。在 5'端设计 *AcDEF*-Fw1 引物并与接头引物配对克隆 *AcDEF* 的全长 cDNA 序列, GenBank 登录号为 JX661502。克隆获得的 *AcDEF* 基因长度为 1 014 bp 的 cDNA 序列。其中, 5'端非翻译区为 140 bp, 开放阅读框长 675 bp, 3'端非翻译区为 188 bp, poly (A) 尾长 22 个腺苷酸。根据 cDNA 序列推测的多肽由 224 个氨基酸组成, 编码的蛋白质含有 57 个氨基酸的 MADS 结构域、28 个氨基酸的 I 结构域、69 个氨基酸的 K 结构域、70 个氨基酸的 C 结构域 (图 1)。

与其他 MADS-box 蛋白的多重氨基酸序列比对结果表明, *AcDEF* 拥有典型的 MIKC 结构, 与 AeAP3-1 (欧细辛, *Asarum europaeum*)、*AoDEF* (芦笋, *Asparagus officinalis*)、AtqMADS6 (龙舌兰, *Agave tequilana*)、LRDEF (岷江百合, *Lilium regale*)、*MaDEF* (葡萄风信子, *Muscari armeniacum*)、OsMADS16 (水稻, *Oryza sativa*) 和 WAP3 (小麦, *Triticum aestivum*) 具有较高的序列相似性, 说明分类关系十分相近的类群间其 *AP3/DEF* 同源基因的序列相似性较高。Kramer 等 (1998) 指出, B 功能基因的每个进化系都编码其典型的氨基酸基序。本研究数据表明, *AcDEF* 的 C 末端拥有保守的 PI 衍生基序 (YAMRIQPNOPNLN, 第 200 至 210 位氨基酸残基) 和 paleoAP3 基序 (FGLHDLRLA,

第 216 至 224 位氨基酸残基) (图 2), 表明 *AcDEF* 基因属于 B 功能基因中的 *paleoAP3* 进化系。B 功能基因在被子植物形成之前发生一次大规模基因重复事件, 产生了 *paleoAP3* 和 *PI* 两个进化系; 在核心真双子叶植物形成之前又发生一次基因重复事件, 由 *paleoAP3* 型基因通过复制产生了 *euAP3* 和 *TM6* 两个进化系 (Kramer et al., 1998, 2006)。 *paleoAP3* 型基因和 *TM6* 型基因的 C-末端结构域中均拥有 *PI* 衍生基序和 *paleoAP3* 基序, *euAP3* 型基因的 C-末端结构域中拥有 *PI* 衍生基序和 *euAP3* 基序, 而 *PI* 型基因的 C-末端结构域中只有 *PI* 基序。

```

1  GAAACTGTTGCCTCTCACTTTCTCTTGCTGCTCTCAAACTCCTCACCACCACCTTCCTGCTTTTATTTCCCTTTTAAATGTACTGCTTC
92  TTCCAGAGAAAAATAATTCATTGCGCAAAAGAAAAAATGGGGAGAGGAAAGATAGAGATAAAAAAGATCGAAAAATGCAACAAATAGA
      M G R G K I E I K K I E N A T N R
182 CAAGTAACCTTATCTAAAAGAAAGCAGGATTATGAAAAAGGCCAAAGAACTCACTGTCCTTTGTGATGCTCAAGTTTCCATTATAATG
      Q V T Y S K R K A G I M K K A K E L T V L C D A Q V S I I M
272 TTTTCTAAGCTGGCAAAATTTTCGAGTATTGCAGCCCGACACTGATACTAAGAAGATTTCGATCGGTACCAGCAAGCTACTGGAATT
      F S N T G K F S E Y C S P D T D T K K I F D R Y Q Q A T G I
362 AACTTGTGGGATGCACAATACGAGAAAAATGCAAAATACAATGAACCATCTCAAGGATATCAATCACAACCTTCGAAGAGAAATTAGACAA
      N L W D A Q Y E K M Q N T M N H L K D I N H N L R R E I R Q
452 AGGATGGGGAGGATCTTGATGGCATGATATCATGGACTTGGCTGTTCTTGAGCAAAATCTTGATGAAGCTTTAAGAAATGTTGCTCAA
      R M G E D L D G M D I M D L R V L E Q N L D E A L K N V R Q
542 AGAAAAATATCATCTCCCACTCAGACAGAAACCTACAAGAAAAGTTGAAGAACTCTCAAGAAGCACACAAGACATTGATAAATGAA
      R K Y H V I H T Q T E T Y K K K L K N S Q E A H K T L I N E
632 CTGGAATGAACGATGAGCATCGGTGTATGGCTTTGTGGAAGATCCAAATAGCTACGATGGAACACTAGCCCTTGCAAAATGGTGGAAAC
      L E M N D E H P V Y G F V E D P N S Y D G T L A L A N G G N
722 CATATGTACGCGATGAGAATTCAGCCAAATCAACCAACCTTAATGAATGGGTTTGGTTTGCATGATCTTCGCTTCTGAATATCA
      H M Y A M R I Q P N Q P N L N G M G F G L H D L R L A *
812 ATATTTTCATGCAACCTCTTCTCATAAATTAATGTGTGAGTACTTTATTACTACTGATGTTAATGAGGTTAAGAGCTGCTTATAATAC
902 TCTCAATTCTGATTGAACTCTCTGTGATGCTTTATTCATGACCTATATGCTACTTATTACACTATCTATCTATTATGAATTAGAGC
992 TAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

图 1 洋葱 *AcDEF* cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

MADS、I、K、C 结构域分别用单、双、波浪和点线标记。左右两侧的数字分别标注核苷酸及氨基酸位置。

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *AcDEF* cDNA from onion

MADS, I, K and C domains are underlined and defined by single, double, wave and dash line, respectively.

The positions of the nucleotides and amino acids are shown on the left and the right, respectively.

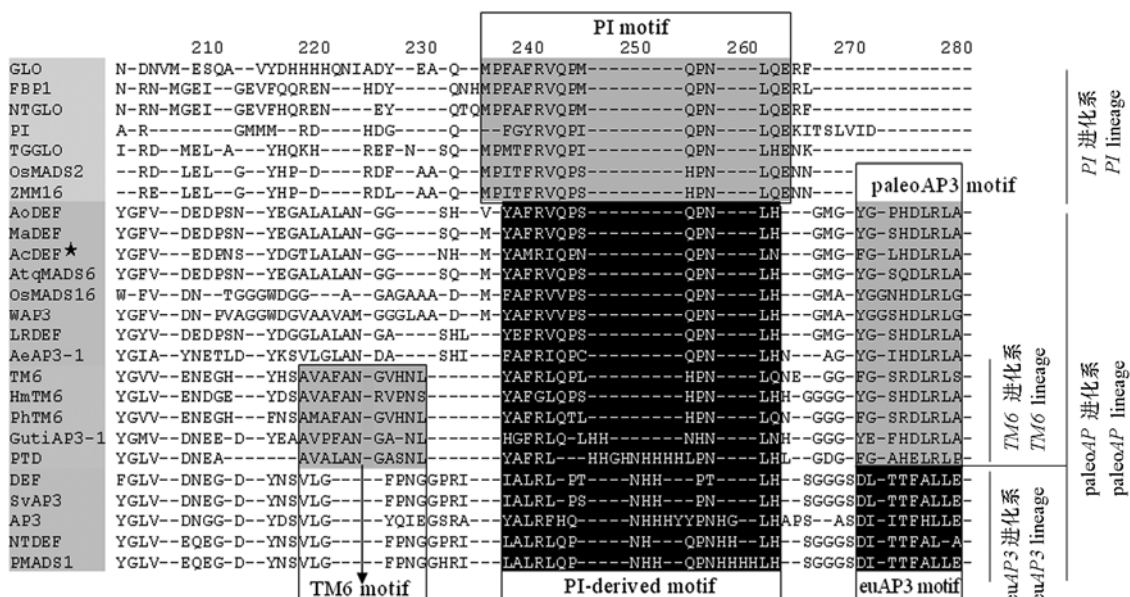


图 2 部分 *AP3/DEF*-like 和 *PI/GLO*-like 基因的氨基酸序列的 GeneDoc3.2 比对

PI 衍生基序、*paleoAP3* 基序、*euAP3* 基序、*PI* 基序、*TM6* 基序用方框标出。

Fig. 2 Sequence alignment of amino acid sequences among several *AP3/DEF*-like and *PI/GLO*-like genes using GeneDoc3.2

PI-derived motif, *paleoAP3* motif, *euAP3* motif, *PI* motif and *TM6* motif are boxed.

2.2 *AcDEF* 与其它 MADS-box 基因的系统发育关系

为确定洋葱 *AcDEF* 的系统发育位置, 从 DDBJ/EMBL/GenBank 数据库中收集了 62 个 B 功能 MADS-box 基因用于系统发育树的构建。图 3 显示了对 MIKC 区的氨基酸序列进行 ML 分析而构建的系统发育树, B 功能 MADS-box 基因在系统发育树中被划分为 AP3/DEF 同源蛋白和 PI/GLO 同源

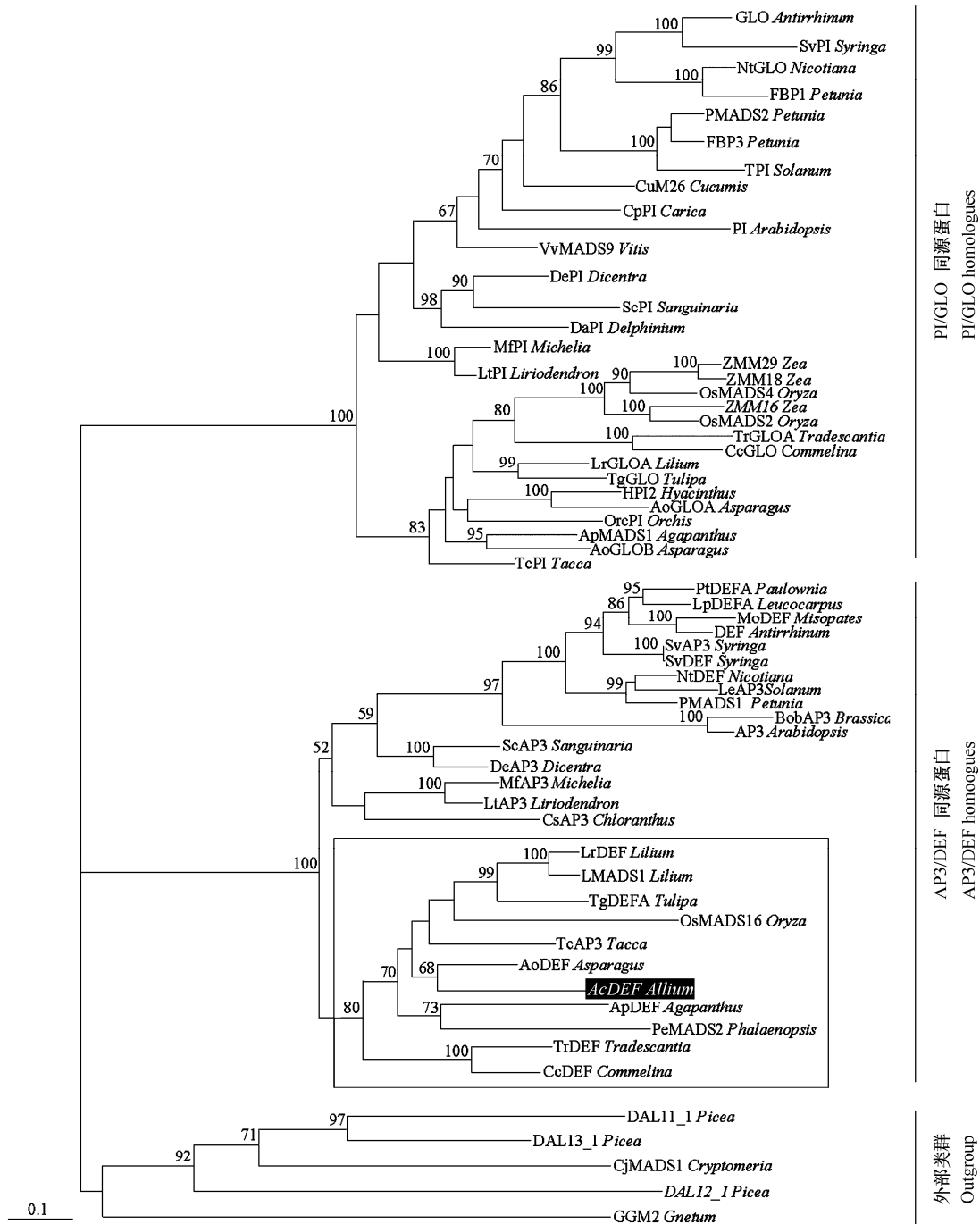


图 3 以最大似然法构建的被子植物 B - 功能 MADS-box 蛋白的系统发育树

用 1 000 个重复进行 bootstrap 检验, 可信度超过 50% 的在接点部位标出。洋葱的 *AcDEF* 用黑底标注, 单子叶植物的 AP3/DEF 同源蛋白的 MADS-box 蛋白用方框框出。

Fig. 3 The phylogenetic tree of angiosperm B-function MADS-box proteins generated using the maximum-likelihood method

The numbers next to the nodes indicate bootstrap values of 50% or more support from 1 000 replicates. *AcDEF* is showed by outline letters on solid box and the monocot AP3/DEF homologues are enclosed by box.

蛋白 2 个单元组, 相同物种的 AP3/DEF 或 PI/GLO 同源蛋白具有较高的自展支持率, 例如, 来自天门冬目的 4 个 AP3/DEF 同源基因 AoDEF(芦笋, *Asparagus officinalis*)、ApDEF(百子莲, *Agapanthus praecox*)、PeMADS2(小兰屿蝴蝶兰, *Phalaenopsis equestris*) 和 AcDEF(洋葱, *Allium cepa*)。AcDEF 被归于 AP3/DEF 同源蛋白单元组, 并与单子叶植物芦笋 (*Asparagus officinalis*) AoDEF、百子莲 (*Agapanthus praecox*) ApDEF、鸭跖草 (*Commelina communis*) CcDEF、水稻 (*Oryza sativa*) OsMADS16、岷江百合 (*Lilium regale*) LMADS1、岷江百合 (*Lilium regale*) LrDEF、桃红蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*) PeMADS2、箭根薯 (*Tacca chantrieri*) TcAP3、郁金香 (*Tulipa gesneriana*) TgDEFA 和紫露草 (*Tradescantia reflexa*) TrDEF 聚为一支 (clade), 属于 *paleoAP3* 进化系。

2.3 AcDEF 基因在洋葱各花器官中的表达模式

半定量 RT-PCR 结果表明, 洋葱的 B 功能基因 *AcDEF* 特异地在花器官中表达, 在无性营养器官如根、假茎、叶及鳞茎中无表达 (图 4)。其中在花瓣和雄蕊中高丰度表达, 在花萼和膜状总苞中表现为微弱表达量, 而在心皮中几乎无表达。qRT-PCR 检测结果 (图 5) 与之相一致。

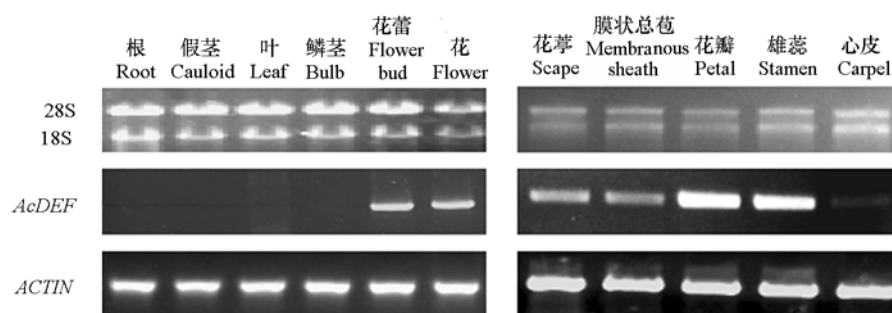


图 4 洋葱 *AcDEF* 基因花器官特异性表达的半定量 RT-PCR 分析

每一样品中 *AcDEF* 的转录物水平通过持家基因 *ACTIN* 的转录水平校正。

Fig. 4 Quantification of expression levels of the *AcDEF* gene in deferent floral organs of onion as determined by gene-specific semi-quantitative RT-PCR

The *AcDEF* transcripts level in each sample was normalized by the amplification of the housekeeping *ACTIN* gene were used as the inner control.

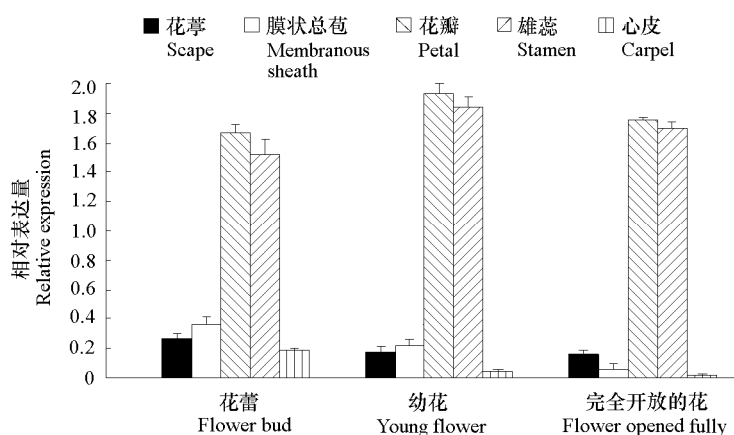


图 5 洋葱 *AcDEF* 基因在花发育进程中时空表达模式的 qRT-PCR 分析

每一样品中 *AcDEF* 的转录物水平通过持家基因 *ACTIN* 的转录水平校正。

Fig. 5 Temporal and spatial expression pattern of *AcDEF* gene was detected by real time quantitative PCR during flower development

The *AcDEF* transcripts level in each sample was normalized by the amplification of the housekeeping *ACTIN* gene were used as the inner control.

在开花过程中, *AcDEF* 在所有花器官中都有表达, 但转录物的积累呈动态变化(图 5)。在花蕾、幼花及完全开放花中, *AcDEF* 在花瓣和雄蕊中均高丰度表达, 在幼花期达到高峰值。在花萼、膜状总苞和心皮中弱表达, 而且表达量随着花的完全开放而呈递减趋势。膜状总苞和心皮的 *AcDEF* 转录物积累量下降明显。

3 讨论

3.1 *AcDEF* 基因属于 *AP3/DEF* 亚家族中的 *paleoAP3* 进化系

B 类 MADS-box 的序列特征及在花发育中的功能已在多种植物中获得了较为详细的研究, 但是其在洋葱中的特征还不甚了解。B 功能 MADS-box 基因包括 *APETALA3/DEFICIENS* (*AP3/DEF*) 和 *PISTILLATA/GLOBOSA* (*PI/GLO*) 进化系, 是花瓣和雄蕊属性的关键调节因子, 其原始功能是区分雄性生殖器官和雌性生殖器官 (Wang et al., 2010), 在裸子植物中, 通过 *DEF/GLO-like* 基因的差异表达而使雄性生殖器官区别于雌性生殖器官 (Melzer et al., 2010)。除了具有重要的同源功能外, B 类基因还是研究进化过程中基因通过复增或移码突变而功能趋异 (新功能化和亚功能化) 机制的范例。系统发育分析表明, 在被子植物进化过程中 B 类基因经历了两次大规模基因复增事件而产生了 *PI*、*euAP3* 和 *TM6* 进化系 (Kramer et al., 1998; Kramer & Irish, 1999)。TM6 在其 C - 末端保留了祖先基因 *paleoAP3* 的 *paleoAP3* 基序, 而 *euAP3* 则形成了新的 *euAP3* 基序 (DLTTFALLE) (Kramer et al., 2006)。尽管 *paleoAP3* 基因在多层花器官中表达, 但是可能只具有决定雄蕊而非花瓣特征属性的功能 (Lamb & Irish, 2003)。*paleoAP3* 的 C - 末端区取代 *euAP3* 的 C - 末端区可以恢复拟南芥 *ap3* 的雄蕊表型, 而不能恢复花瓣表型。然而, 编码 *paleoAP3* 基序的 *DEF* 直系同源基因 *SILKY* 能够恢复 *ap3* 的雄蕊和花瓣表型 (Whipple et al., 2004)。本研究从洋葱中克隆的 MADS-box 基因 cDNA 序列 *AcDEF* 属于 *AP3/DEF* 亚家族的 *paleoAP3* 型进化系, C - 末端包含 *PI* 衍生基序和 *paleoAP3* 基序, 与 *AoDEF* 和 *MaDEF* 的序列同源性较高 (79%), 特异地在洋葱花组织中表达, 表现出与其他植物 *AP3/DEF-like* 基因相同的表达特征。蛋白质序列比对和系统发育分析结果均表明, *AcDEF* 与百子莲科百子莲 *ApDEF* 基因的亲缘关系最近, 而与百合科岷江百合 *LrDEF* 及郁金香 *TgDEFA* 的亲缘关系相对较远 (图 2, 图 3)。从而支持了将葱属植物从百合科中分离出来组成葱科、并归入天门冬目的 APGIII 分类法 (Angiosperm Phylogeny Group, 2009)。

3.2 *AcDEF* 基因的表达模式

表达模式分析结果表明, *AcDEF* 特异地在花器官中表达, 在根、假茎、叶及鳞茎中无表达。在花器官中, *AcDEF* 主要在花瓣和雄蕊中高丰度表达, 在花萼和膜状总苞中微量表达, 虽然在心皮中也检测到 *AcDEF* 信号, 但表达水平极其微弱。在花发育的整个进程中, *AcDEF* 在花萼、膜状总苞和心皮中表达水平呈下降趋势, 但在花瓣和雄蕊中一直保持较高的表达水平 (图 5)。拟南芥的 *ap3* 和 *pi* 单突变体出现花瓣转化为萼片、雄蕊转化为心皮的同源转换表型, 表明 B 类基因 (*AP3* 和 *PI*) 是决定花瓣和雄蕊特征属性所必须的 (Bowman et al., 1989; Jack et al., 1992)。在花发育的第 3 个时期, 拟南芥 *AP3* 和 *PI* 主要在形成花瓣原基和雄蕊原基的花分生组织细胞中表达 (Jack et al., 1992; Goto & Meyerowitz, 1994), 而且 *PI* 在形成心皮原基的花分生组织中心部位也有少量表达 (Goto & Meyerowitz, 1994); 但发育至第 6 阶段时, *AP3* 的表达被限定在花瓣、雄蕊原基, 但在萼片的基部细胞中也有表达 (Weigel & Meyerowitz, 1993)。此外, 在胚珠中也能检测到 *AP3* 的表达 (Jack et al., 1992; Schwarz-Sommer et al., 1992)。金鱼草 *DEF* 与 *GLO* 基因与拟南芥 *AP3* 和 *PI* 基因表达模式

相似,只是在心皮发育的早期阶段也能检测到 *DEF* 基因的表达。但在完全开放的花中, *AP3* 与 *DEF* 只在花瓣和雄蕊中表达,而 *AcDEF* 在完全分化的花萼、膜状总苞、花瓣、雄蕊和心皮中均有表达,这与其他单子叶植物的 B 功能基因如 *LMDS1* (Tzeng & Yang, 2001)、*ApDEF* (Nakamura et al., 2005) 和 *CsatAP3* (Tsaftaris et al., 2006) 在各轮花器官中表达的模式一致。

AcDEF 在心皮中表达可能是祖先基因表达模式的体现。到目前为止, *DEF* 或 *GLO* 基因突变都不会影响第 4 轮器官的属性,或许是祖先基因的功能丢失,但由于基因调节渗漏而保留了在心皮中表达的特性。考虑到 *DEF/GLO* 基因的重要性及其在许多被子植物类群的第 4 轮花器官中表达的事实, Zahn 等 (2005) 认为, *DEF/GLO* 可能以目前未知的功能影响心皮的发育,与核心真双子叶植物 *DEF/GLO* 决定花瓣和心皮特征属性的功能相比,这种保守性功能的重要性很弱。*AcDEF* 在心皮中表达是基因调节渗漏的结果,还是具有与雌蕊发育相关的新功能,这些问题有待于深入研究。

3.3 单子叶植物类群 *AP3/DEF-like* 基因的表达模式与功能

对许多基部被子植物、非模式双子叶植物和单子叶植物种类花发育分子机制的研究,使人们对 ABC 模型的适用性和变异性有了更为深入的了解。单子叶植物类群中不同种类的花的结构迥异,包括花被由未分化的花被片组成的花瓣状种类(如郁金香)、具有完全分化的萼片和花瓣的种类(如紫露草)以及具有唇瓣的种类(兰花)。与之相应的是 B 类基因的表达模式也存在很大的差异。有些种类(如玉米)的 B 类基因具有决定花瓣和雄蕊特征属性的 B 功能 (Whipple et al., 2004); 而兰花等其 *AP3* 和 *PI* 的直系同源基因在花发育早期阶段的各轮花器官中均表达 (Chung et al., 1994; Xu et al., 2006; Kanno et al., 2007), 由于 B 类基因的表达区域扩展至第 1 轮,从而形成花瓣状花被片或花瓣状萼片,为“边界滑动模型”提供了证据。在膜状总苞中表达的事实可能表明, *AcDEF* 是洋葱花发育所必需的,但还没有建立起真正的 B 功能。然而,有些单子叶植物的花表型结构及 B 基因表达模式与修饰的 ABC 模型相矛盾。其可能解释如下: 其一,每个旁系同源基因存在额外的拷贝且表现异常的表达模式(如芦笋、鸽石斛、番红花和葡萄风信子等) (Stellari et al., 2004); 其二, B 类基因存在转录后调控机制或编码的转录因子缺失, MADS-box 基因并不总是在其 mRNA 表达的区域发挥功能 (Tzeng & Yang, 2001)。拟南芥 *PI* 在内 3 轮花器官中表达, *AP3* 在第 2、3 轮花器官中表达 (Jack et al., 1992), 但可能也在萼片中表达,因为超表达 *PI* 可使萼片转化成萼片/花瓣器官 (Krizek & Meyerowitz, 1996)。 *AP3-PI* 异源二聚体维持 *AP3*、*PI* 的表达,但 *SUP* 阻止 *AP3* 在第 4 轮表达,无 *AP3-PI* 异源二聚体的形成,所以 *PI* 的表达也就被限制。这样, *AP3* 和 *PI* 转录因子仅同时存在于第 2、3 轮,形成异源二聚体而发挥 B 功能 (Krizek & Meyerowitz, 1996; Riechmann et al., 1996)。与核心真双子叶植物相比,某些单子叶植物的 B 类 MADS 蛋白能够以同源二聚体的形式与 CArG 盒结合,但还不清楚是否发挥 B 功能 (Garay-Arroyo et al., 2012)。因此,要阐释洋葱花结构的分子基础,需要克隆 *AcDEF* 的旁系同源基因,深入研究 B 类 MADS 蛋白的组织定位及其发挥功能的异源二聚体系统。

被子植物花器官特征属性决定是多 MADS-box 基因协同调控的结果。本研究中只克隆了 *AP3/DEF-like* 基因,初步探讨了 *AcDEF* 基因的表达模式,但还需要通过原位杂交和蛋白质定位分析进一步确定该基因 mRNA 和蛋白质的时空分布特征,更需深入探讨 *PI/GLO-like* 基因、A 功能、C 功能和 E 功能基因的序列结构、表达模式及其相互之间的蛋白质作用方式,为全面阐释洋葱花发育的分子机制、服务于洋葱三系育种奠定基础。

References

Angiosperm Phylogeny Group. 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants:

- APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, 161: 105 – 121.
- Bowman J L. 1997. Evolutionary conservation of angiosperm flower development at the molecular and genetic levels. *Journal of Biosciences*, 22: 515 – 527.
- Bowman J L, Smyth D R, Meyerowitz E M. 1989. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1: 37 – 52.
- Chanderbali A, Kim S, Buzgo M, Zheng P, Oppenheimer D G, Soltis D E, Soltis P S. 2006. Genetic footprints of stamen ancestors guide perianth evolution in *Persea* (Lauraceae). *International Journal of Plant Sciences*, 167: 1075 – 1089.
- Chung Y Y, Kim S R, Finkel D, Yanofsky M F, An G. 1994. Early flowering and reduced apical dominance result from ectopic expression of a rice MADS box gene. *Plant Molecular Biology*, 26: 657 – 665.
- Coen E S, Meyerowitz E M. 1991. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31 – 37.
- Frohman M A, Dush M K, Martin G R. 1988. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 8998 – 9002.
- Garay-Arroyo A, Piñeyro-Nelson A, García-Ponce B, Sánchez Mde L, Álvarez-Buylla E R. 2012. When ABC becomes ACB. *Journal of Experimental Botany*, 63: 2377 – 2395.
- Goto K, Meyerowitz E M. 1994. Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*. *Genes & Development*, 8: 1548 – 1560.
- Jack T, Brockman L L, Meyerowitz E M. 1992. The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell*, 68: 683 – 697.
- Jones D T, Taylor W R, Thornton J M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences*, 8: 275 – 282.
- Kanno A, Nakada M, Akita Y, Hirai M. 2007. Class B gene expression and the modified ABC model in nongrass monocots. *The Scientific World Journal*, 7: 268 – 279.
- 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: 831 – 841.
- Kim S, Endress P, Hauser B, Soltis P S, Soltis D E. 2005. Origin of the calyptra and characterization of B class genes in *Eupomatia* (Eupomatiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 166: 185 – 198.
- Kim S, Yoo M-J, Albert V A, Farris J S, Soltis P S, Soltis D E. 2004. Phylogeny and diversification of B-function MADS-box genes in angiosperms: Evolutionary and functional implication of a 260-million-year-old duplication. *American Journal of Botany*, 91: 2102 – 2118.
- Kramer E M, Di Stilio V S, Schluter P M. 2003. Complex patterns of gene duplication in the *APETALA3* and *PISTILLATA* lineages of the Ranunculaceae. *International Journal of Plant Sciences*, 164: 1 – 11.
- 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.
- Kramer E M, Irish V F. 1999. Evolution of genetic mechanisms controlling petal development. *Nature*, 399 (13): 144 – 148.
- Kramer E M, Su H J, Wu C C, Hu J M. 2006. A simplified explanation for the frame shift mutation that created a novel C-terminal motif in the *APETALA3* gene lineage. *BMC Evolutionary Biology*, 6: 30.
- Krizek B A, Meyerowitz E M. 1996. The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development*, 122: 11 – 22.
- Lamb R S, Irish V F. 2003. Functional divergence within the *APETALA3/PISTILLATA* floral homeotic gene lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 6558 – 6563.
- Litt A, Kramer E M. 2010. The ABC model and the diversification of floral organ identity. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21: 129 – 137.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 – 408.
- Melzer R, Wang Y Q, Theißen G. 2010. The naked and the dead: The ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21 (1): 118 – 128.

- Nakada M, Komatsu M, Ochiai T, Ohtsu K, Nakazono M, Nishizawa N K, Nitta K, Nishiyama R, Kameya T, Kanno A. 2006. Isolation of *MaDEF* from *Muscari armeniacum* and analysis of its expression using laser microdissection. *Plant Science*, 170: 143 – 150.
- Nakamura T, Fukuda T, Nakano M, Hasebe M, Kameya T, Kanno A. 2005. The modified ABC model explains the development of the petaloid perianth of *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Agapanthaceae) flowers. *Plant Molecular Biology*, 58 (3): 435 – 445.
- Ochiai T, Nakamura T, Mashiko Y, Fukuda T, Yokoyama J, Kanno A, Kameya T. 2004. The differentiation of sepal and petal morphologies in Commelinaceae. *Gene*, 343 (2): 253 – 262.
- Purugganan M D, Rounsley S D, Schmidt R J, Yanofsky M F. 1995. Molecular evolution of flower development: Diversification of the plant MADS-box regulatory gene family. *Genetics*, 140: 345 – 356.
- Riechmann J L, Wang M, Meyerowitz E M. 1996. DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. *Nucleic Acids Research*, 24: 3134 – 3141.
- Rounsley S D, Ditta G S, Yanofsky M F. 1995. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 7: 1259 – 1269.
- Schwarz-Sommer Z, Hue I, Huijser P, Flor P J, Hansen R, Tetens F, Lonnig W E, Saedler H, Sommer H. 1992. Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: Evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *The EMBO Journal*, 11: 251 – 263.
- Soltis D E, Chanderbali A S, Kim S, Buzgo M, Soltis P S. 2007. The ABC model and its applicability to basal angiosperm. *Annals of Botany*, 100: 155 – 163.
- Stellari G, Jaramillo M, Kramer E. 2004. Evolution of the *APETALA3* and *PISTILLATA* lineages of MADS-box-containing genes in the basal angiosperms. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 506 – 519.
- Theißen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim J T, Munster T, Winter K U, Saedler H. 2000. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant Molecular Biology*, 42: 115 – 149.
- Theißen G, Saedler H. 1995. MADS-box genes in plant ontogeny and phylogeny: Haeckel's 'biogenetic law' revisited. *Current Opinion in Genetics and Development*, 5: 628 – 639.
- Theißen G, Saedler H. 2001. Plant biology: Floral quartets. *Nature*, 409: 469 – 471.
- Tsaftaris A, Polidoros A N, Pasentsis K, Kalivas A. 2006. Tepal formation and expression pattern of B-class *paleoAP3*-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Science*, 170: 238 – 246.
- Tzeng T Y, Yang C H. 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: 1156 – 1168.
- Wang Y Q, Melzer R, Theißen G. 2010. Molecular interactions of orthologues of floral homeotic proteins from the gymnosperm *Gnetum gnemon* provide a clue to the evolutionary origin of 'floral quartets'. *The Plant Journal*, 64 (2): 177 – 190.
- Weigel D, Meyerowitz E M. 1993. Activation of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Science*, 261: 1723 – 1726.
- Whipple C J, Ciceri P, Padilla C M, Ambrose B A, Bandong S L, Schmidt R J. 2004. Conservation of B-class floral homeotic gene function between maize and *Arabidopsis*. *Development*, 131 (24): 6083 – 6091.
- Xu Y F, Teo L L, Zhou J, Kumar P P, Yu H. 2006. Floral organ identity genes in the orchid *Dendrobium crumenatum*. *The Plant Journal*, 46: 54 – 68.
- Yoo M, Soltis P S, Soltis D E. 2010. Expression of floral MADS-box genes in two divergent water lilies: Nymphaeales and *Nelumbo*. *International Journal of Plant Sciences*, 171: 121 – 146.
- Zahn L M, Leebens-Mack J, Depamphilis C W, Ma H, Theißen G. 2005. To B or Not to B a Flower: The role of *DEFICIENS* and *GLOBOSA* orthologs in the evolution of the angiosperms. *Journal of Heredity*, 96 (3): 225 – 240.