

百子莲开花相关基因 *ApFT* 的克隆及表达分析

石玉波¹, 张 荻², 申晓辉^{2,*}, 王 玲^{1,*}, 卓丽环^{1,3}

(¹东北林业大学园林学院, 哈尔滨 150040; ²上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; ³上海农林职业技术学院, 上海 201699)

摘 要: 采用 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 方法得到了百子莲 (*Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*) *FT* 基因 cDNA 全长序列, 命名为 *ApFT*, GenBank 登录号为 KC951108。序列分析表明, 百子莲 *ApFT* 基因 cDNA 全长 815 bp, 其中开放阅读框 534 bp, 编码 177 个氨基酸, 5' 非编码区 (5'UTR) 和 3'非编码区 (3'UTR) 分别为 89 bp 和 192 bp。 *ApFT* 编码的蛋白有一个单一而非常保守的 PEBP (Phosphatidylethanolamine-binding protein, PEBP 磷酸乙醇胺结合蛋白) 结构域, 与玉米 (MFT2)、拟南芥 (AtFT) 和温州蜜柑 (CuMFT1) 等植物的 FT 蛋白有较高的相似性, 同源性均在 50% 以上。系统进化树分析表明, 百子莲 *ApFT* 与玉米 (MFT2) 聚类关系最近。实时荧光定量 qRT-PCR 结果显示, 整个花芽分化过程中 *ApFT* 在叶片中表达量高, 茎尖中表达量低。随着花芽分化的进程, 在叶片中 *ApFT* 表达量逐渐降低, 而茎尖中 *ApFT* 的表达量在诱导期均高于营养期和花芽分化期, 推测该基因可能在调节百子莲花芽分化过程中发挥重要作用。

关键词: 百子莲; *FT* 基因; 克隆; 基因表达

中图分类号: S 682.32

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 04-0726-09

Cloning and Expression Pattern Analysis of Flowering Related Gene *ApFT* from *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*

SHI Yu-bo¹, ZHANG Di², SHEN Xiao-hui^{2,*}, WANG Ling^{1,*}, and ZHUO Li-huan^{1,3}

(¹College of Landscape and Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; ³Shanghai Vocational Technical College of Agriculture and Forestry, Shanghai 201699, China)

Abstract: The full length sequence of cDNA, *FT* gene of *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* was gained by the RACE method, which was named *ApFT* with the accession number of KC951108. The results of sequence analysis showed that the *ApFT* gene length of cDNA was 815 bp, which contained an open reading frame of 534 bp, 177 encoding amino acids, untranslated region (UTR) 5' and 3' with the length of 89 bp and 192 bp, respectively. A single and conservative domain of phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP) was contained in the encoded proteins of *ApFT*, which highly similar with the FT proteins in species such as *Zea mays* (MFT2), *Arabidopsis thaliana* (AtFT) and *Citrus unshiu* (CuMFT1) with the homology of 50% or more. According to the phylogenetic analysis results, *ApFT* of *A. praecox*

收稿日期: 2013 - 09 - 29; **修回日期:** 2014 - 03 - 04

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (DL13EA07); 上海市科技兴农重点攻关项目 [沪农科攻字 (2010) 第 6-2 号]; 黑龙江省博士后科研启动项目 (LBH-Q12168)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: shenxh62@sjtu.edu.cn, wanglinghlj@126.com)

has the closest genetic relationship with clustering corn (MFT2). The real-time quantitative PCR results showed that the expression of *ApFT* in leaf was obviously higher than that in shoot tip during the whole period of flower bud differentiation. The expression of *ApFT* in leaf was going down with the differentiation of flower bud. For the shoot tips, the expression of *ApFT* in induction period was higher than those in vegetative and bud differentiation periods, which is conjectured that *ApFT* may play a crucial role in regulating the differentiation of *Agapanthus praecox* buds.

Key words: *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*; *ApFT*; clone; gene expression

百子莲 (*Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*) 又名蓝百合, 为百子莲科百子莲属植物, 原产非洲南部亚热带地区, 具有大的伞形花序, 每个花序着生小花几十至上百朵, 花期主要集中在 6 月中下旬至 7 月中旬。因其花色淡雅, 花朵姿态优美, 花期持续时间长, 常用于鲜切花生产以及园林地被栽培。

FLOWERING LOCUS T (*FT*) 基因是植物开花的诱导因子, 也是花发育途径的汇集点, 它能够整合来自光周期途径、春化途径和自主途径等不同花发育途径的信号, 在植物花发育过程中发挥重要的作用 (Baurle et al., 2006; Jaeger et al., 2006; Hemming et al., 2008)。*FT* 是光周期途径中关键的转录调控因子 *CO* 的直接靶基因, 在叶片和维管组织中特异表达 (Abe et al., 2005), *FT* 的转录水平在长日照条件下表现出昼夜节律。*FT* 蛋白被研究者认为是多年来寻找的 ‘成花素’, 作为长距离运输的开花素信号分子, 通过韧皮部从叶片移动到茎端, 在茎端分生组织中与 *bZIP* 转录因子 *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) 互作, *FT*/*FD* 复合物能够激活花分生组织基因 *APETALA1* (*API*) 的表达, 从而促进成花转换并启动花发育过程 (Abe et al., 2005; Notaguchi et al., 2008; Li et al., 2009)。*FT* 和 *FD* 蛋白的互作在小麦、拟南芥、玉米等不同物种上均得以验证 (Abe et al., 2005), 已经在拟南芥 (Kardailsky et al., 1999)、水稻 (Tamaki et al., 2007)、小麦 (Yan et al., 2006)、番茄 (Lifschitz et al., 2006)、柑橘 (Endo et al., 2005) 等植物中克隆出了 *FT* 的同源基因。在拟南芥中发现了 *FT/TFL1* 基因家族的 6 个成员, 分别是 *TFL1*、*FT*、*BFT*、*MFT*、*TSF* 和 *ATC* (Shannon & Meeks-Wagner, 1991; Kardailsky et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Mimida et al., 2001), 并对部分植物进行了遗传转化, 发现植物中 *FT* 类基因的过量表达均不同程度地引起植株的早期开花。

目前对 *FT* 基因的研究主要集中在一些模式植物中, *FT* 作为重要的开花相关基因, 在单子叶植物百子莲研究中未见报道。本研究中以百子莲为试材, 克隆得到了开花相关基因 *FT* 的同源基因 *ApFT*, 并对其在百子莲不同发育时期以及不同组织中的表达进行了分析, 为进一步研究调控百子莲花芽分化、促进其开花以及探讨该基因在开花过程中的表达调控和开花作用机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以上海交通大学农业与生物学院温室内 4 年生百子莲盆栽实生苗为试材, 分别取营养生长期 (2012 年 11 月 20 日)、花芽诱导期 (2012 年 12 月 20 日)、花芽分化期 (2013 年 3 月 7 日) 的茎尖和叶片组织, 在液氮中速冻后置于 -80°C 冰箱中保存备用。

利用植物 RNA 小量提取试剂盒 (上海莱枫生物科技有限公司) 提取叶片和茎尖组织中的 RNA。工程菌与载体分别为 DH5 α 大肠杆菌、PMD18-T 载体, 均购自 TaKaRa 公司; SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程 (上海) 有限公司; *Taq* 酶、反转录酶、RACE 试剂盒 SMARTerTM RACE

cDNA Amplification Kit 购于 Clontech 公司。所用引物由生工生物工程（上海）有限公司合成，测序由上海英骏（Invitrogen）生物技术有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 目的基因片段获得

根据前期百子莲转录组测序分析结果(尚未发表),得到百子莲 *FT* 同源基因的核心序列片段 509 bp, 使用 Primer5 软件设计引物 FT-F1 和 FT-R1 (表 1), 以百子莲营养期叶片的 cDNA 为模板进行目的片段扩增。反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s、65 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 保持 3 min, 使产物延伸完整。反应程序结束后经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收目的片段, 连接 pMD18-T simple 载体, 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。

表 1 引物序列名称及用途
Table 1 Sequence of primers and description

引物 Primer	序列 (5' - 3') Sequence	用途 Description
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	RACE-PCR 通用引物
NUP	CTAATACGACTCACTATAGGGC	RACE-PCR Universal primers
FT-F1	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3' RACE
FT-F2	TGTCGGTGAGCTACGGTTCCAAGCA	
FT-R1	TTGACCCGTGATGCACCAAGCCCAAGT	5' RACE
FT-R2	CATAACGGGCCGCAAAGTACCGAGTG	
FT-F3	CCTTGGGAAGGATCTGTTCTCCTCGTGA	扩增 CDS 序列 Amplification of CDS sequence
FT-R3	ATGCATATGGCAAGCTGTGTGGATC	
Actin-F	TCATATATGCCGTCTCCGGCGACTC	内参 Internal control
Actin-R	CAGTGTCTGGATTGGAGG	
qFT-F	TAGAAGCACTTCCTGTG	实时荧光定量分析 Real-time PCR analysis
qFT-R	GCGACTGTCTACTTCAATG	
	TTACATCAACCTTCACTAATCC	

1.2.2 *ApFT* 基因全长克隆

以提取的百子莲叶片和茎尖混合组织的总 RNA 为模板, 采用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 扩增试剂盒进行 3'RACE 和 5'RACE cDNA 文库的构建。以 FT-F1、UPM 和 FT-R1、UPM 作为 3'RACE 和 5'RACE 扩增的第 1 轮引物, 根据获得的目的片段序列, 使用 Primer 5 软件设计 3'RACE 巢式 PCR 引物 FT-F2, 以百子莲 3'RACE cDNA 文库(1 μ L)为模板, 按 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 扩增试剂盒说明书进行操作, 获得 3'端序列。将获取的目的片段序列和 3'RACE 序列拼接后, 设计 5'RACE 巢式 PCR 引物 FT-R2, 按上述扩增试剂盒说明书操作, 获得 5'端序列。将 3'端序列、中间目的片段序列和 5'端序列拼接后, 设计 *ApFT* 基因全长特异性引物 FT-F3 和 FT-R3, 通过 PCR 扩增, 克隆、测序, 获得该基因全长序列。

1.2.3 生物信息学分析

利用 NCBI 网站上的 BLASTx 程序进行序列相似性分析, 使用 GenBank ORF finder(<http://www.ncbi.nih.gov/gorf/gorf.html>) 和在线网站 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 进行开放阅读框的预测以及蛋白一级结构(理论等电点和分子量)的分析, 应用 DNAMAN 软件和瑞士模型预测网站 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源性比较分析以及蛋白疏水性、亲水性、蛋白二级结构和三级结构预测分析, 利用 MEGA4 软件进行系统进化树的构建。

1.2.4 实时荧光定量 PCR

通过实时荧光定量 qRT-PCR 方法分析 *ApFT* 在叶片、花芽不同发育时期的表达情况。使用 Beacon

Designer 7 软件设计 qRT-PCR 引物 qFT-F 和 qFT-R, 片段长度为 188 bp。利用 FTC-3000™ SYSTEM 实时荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR 反应, 反应体系为: SYBR Premix Ex Taq II (2X) 10 μ L、primer (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 0.5 μ L、cDNA 2.0 μ L, RNase-free H₂O 定容至 20 μ L。反应程序设置 94 $^{\circ}$ C 预变性 60 s; 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s, 共 40 个循环。反应完成后计算平均值和标准差, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法 (Livak & Schmittgen, 2001) 进行数据分析, 所用百子莲内参基因为 *Actin*, 片段大小为 117 bp (张荻, 2011)。所有样品重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 百子莲 *ApFT* 基因的全长序列获得

根据百子莲 *FT* 同源基因核心序列设计的特异性引物 FT-F1 和 FT-R1, 以百子莲叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到一条约 370 bp 左右的条带 (图 1, A), 目的片段经回收测序为 373 bp。序列经 BLASTp 分析表明, 该片段与多种植物的 *FT* 基因具有很高的同源性, 初步认定它是百子莲 *FT* 基因的片段。

通过 3'RACE 第 1 轮 PCR 得到 1 条 500 ~ 700 bp 左右条带 (图 1, B), 经第 2 轮巢式 PCR 获得 518 bp (图 1, C) 的 cDNA 片段; 5'RACE 第 1 轮弥散带位置 300 ~ 500 bp (图 1, D), 巢式 PCR 后获得 395 bp (图 1, E) 的 cDNA 片段, 将 3' RACE 序列、核心序列和 5'RACE 获得的序列进行比对拼接得到 815 bp 的 *ApFT* cDNA 全长序列, 其中 A、T、G、C 4 种碱基含量分别为 25.3% (A)、25.4% (T)、27.6% (G) 和 21.7% (C)。

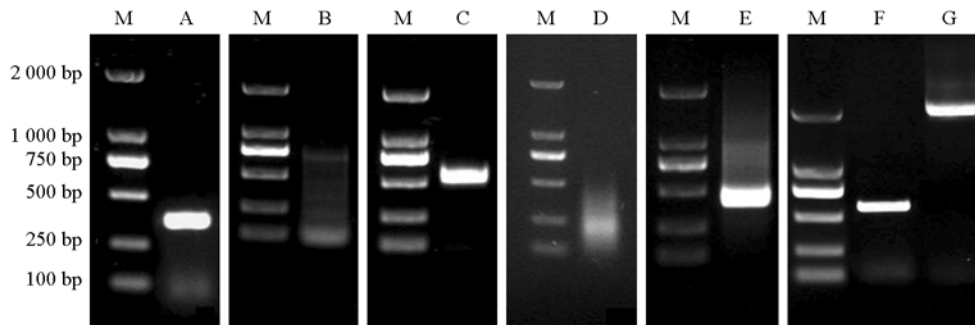


图 1 百子莲 *ApFT* 基因 RT-PCR 及 RACE 扩增电泳图谱

A: 目的片段产物; B: 3'第 1 轮 PCR 产物; C: 3'第 2 轮巢式 PCR 产物; D: 5'第 1 轮 PCR 产物; E: 5'第 2 轮巢式 PCR 产物;

F: *ApFT* ORF 扩增; G: *ApFT* gDNA 扩增; M: DL 2000 plus marker。

Fig. 1 Agrose electrophoresis of *ApFT* RT-PCR and RACE products

A: Middle fragment; B: 3' first-round product; C: 3' second round of nested PCR product; D: 5' first-round product; E: 5' second round of nested PCR product; F: Amplification of *ApFT* ORF; G: Amplification of *ApFT* gDNA; M: DL2000 plus marker.

经 NCBI 的 ORF Finder 分析, *ApFT* 基因开放阅读框 (ORF) 为 534 bp, 编码一个含有 177 个氨基酸的蛋白质 (图 2), 全长 cDNA 序列还包含 89 bp 的 5'非翻译区 (5' UTR) 和 192 bp 的 3'非翻译区 (3' UTR)。根据 ORF 序列, 在其两端设计全长引物 FT-F3 和 FT-R3, 分别以 cDNA 与基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增片段经测序分别为 534 bp (图 1, F) 和 2 091 bp (图 1, G)。两条序列经比对后发现, 百子莲 *ApFT* 基因的基因组序列中包括 4 个外显子和 3 个内含子 (图 3), 此结构与其他植物类似, 只是在内含子的长度上有一定的差别 (表 2)。将两条序列分别登录 NCBI, 命名为 *ApFT*, 其 cDNA 登录号为: KC951108; gDNA 登录号: KF148635。

表 2 不同植物的 *FT* 基因组外显子和内含子序列
Table 2 Organization of introns and exons in *FT* genomic sequence from different plants

物种名称 Name of organisms	登录号 Accession No.	内含子数及长度/bp Number of introns and length	外显子数及长度/bp Number of exons and length	编码的氨基酸数 Number of amino acid residues
百子莲 <i>Agapanthus praecox</i> ssp. <i>orientalis</i>	KF148635	3 (224, 154, 1179)	4 (205, 59, 38, 232)	177
蓝桉 <i>Eucalyptus globulus</i>	HQ453992.1	3 (100, 421, 143)	4 (204, 62, 41, 224)	176
豌豆 <i>Pisum sativum</i>	HQ538832.1	3 (109, 119, 1189)	4 (201, 62, 41, 221)	174
苍耳 <i>Xanthium strumarium</i>	JF434696.1	3 (124, 812, 1031)	4 (201, 62, 41, 224)	175
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	AF152096.1	3 (815, 713, 124)	4 (201, 62, 41, 224)	175
白芥 <i>Sinapis alba</i>	FJ613329.1	3 (830, 1 011, 89)	4 (201, 62, 41, 224)	175
花生 <i>Arachis hypogaea</i>	JQ071507.1	3 (483, 207, 311)	4 (201, 62, 41, 227)	176
欧洲油菜 <i>Brassica napus</i>	FJ848914.1	3 (809, 342, 75)	4 (201, 61, 40, 223)	175
葡萄 <i>Vitis labrusca</i> × <i>Vitis vinifera</i>	EF203919.1	3 (137, 907, 679)	4 (198, 61, 40, 223)	174
毛环竹 <i>Phyllostachys meyeri</i>	AB498761.1	3 (164, 125, 90)	4 (201, 61, 40, 232)	178

1 GAAGCTCAAAAATAAAGCACACCAGCTTCTTCTTCTCTCTTATAAGCAAACCTTGTTGAGTAGCAACTACTAGTACTGCTTGTATT
90 ATGCATATGGCAAGCTGTGTGGATCCTTTGGTGGTAGGGAGAGTGATCGGCGAGGTCGTCGATCTTTTCGTGCCGACTCTGACCATGTCC
1 M H M A S C V D P L V V G R V I G E V V D L F V P T L T M S
180 GTGAGCTACGGTTCCTCAAGCATCAATAACGGCTGTGACGTCAAGCCTTCGATCGCGCGGAACCGCCACGGTGAATCTCGGTGGCCGG
31 V S Y G S K H I N N G C D V K P S I A A E P P T V N L G G R
270 ATGTCCGAACGTACACCTGGTGATGATTGACCTGTGACCAAGCCCAAGTGACCTACCATGAGGAGTGGGTCCATTGGGTGGTG
61 M S E L Y T L V M I D P D A P S P S D P T M R E W V H W V V
360 GTTAATATACCAGGAGGAACAGATCCTTCCCAAGGACAAGAGTGGTCCCTTACATGGGCCACGGCCGCCATTGGGGATCCATCGGTAC
91 V N I P G G T D P S Q G Q E V V P Y M G P R P P L G I H R Y
450 GTTCTAGTGCTCTTCAGACAGAAAGCGGGCTTCGGGAATAACTCGCGCGGAGTCTCGGGCCAACTTCAACACTCGGTACTTTGCGGCC
121 V L V L F R Q K A G L P G I T P P E S R A N F N T R Y F A A
540 CGTTATGACCTCGGGCTTCGGTGGCGACTGTCTACTTCAATGCCAGAAAGAGCGGCGAGTCCGCGGAGACGGCATATATGAGCTGTG
151 R Y D L G L P V A T V Y F N A Q K E P A S R R R R H I *
630 TCGCACTTGTTTGAACCACGGATGTATGTGTTTGGGTTTATGAAAGGTGTGCTAACTTAAAGTTTGTGGCTCTGTGTTTGTATAAAT
720 GGCAGGATGTGGATTAGTGAAGGTTGATGTAACTTTATGATGAAAGATATCTTGAAGGTTGTGTGAAAAA
810 AAAAAA

图 2 *ApFT* 核苷酸序列和推测的氨基酸序列

下划线 ATG 表示起始密码子，TGA*表示终止密码子；左侧数字分别为核苷酸和氨基酸序号。

Fig. 2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *ApFT*

ATG in the underline means initiator codon; TGA with * in the box means terminator codon;
Numbers at left means numbers of nucleotide and amino acid.

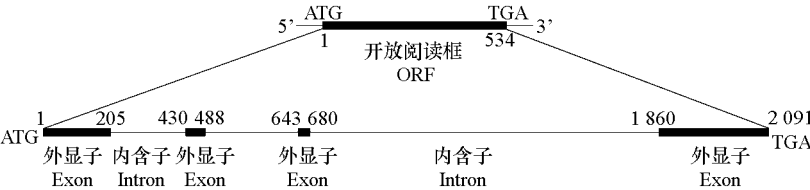


图 3 *ApFT* 基因示意图

数字 1 表示翻译起始密码子的位置，不同编号表示核酸序列的位置。

Fig. 3 Schematic representation of *ApFT*

The number 1 indicates the location of the translational start codon as determined, numbers delineate addresses in nucleic acid sequences.

2.2 *ApFT* 氨基酸序列分析

通过 Protparam 对百子莲 *ApFT* 进行理化性质分析,推测 *ApFT* 蛋白质相对分子量为 19 493.4 D, 等电点 (pI) 为 8.62。利用 NCBI 的 Blastx 分析, *ApFT* 基因有一个保守区域, 其为 PEBP (磷酸乙醇胺结合蛋白, Phosphatidylethanolamine-binding protein) 结构域, 该结构域占据 *ApFT* 基因编码序

列的 80%左右。对 *ApFT* 基因编码蛋白的疏水性和亲水性分析, 结果表明 *ApFT* 属于亲水蛋白。二级结构预测结果显示, *ApFT* 由 1 个 α 螺旋(12.43%), 6 个 β 折叠区(23.73%)和 13 个 β 转角(63.84%)构成。对 *ApFT* 蛋白三维结构进行在线分析发现, 百子莲 *ApFT* 蛋白与拟南芥 *AtFT* 有相似的三维结构(图 4)。

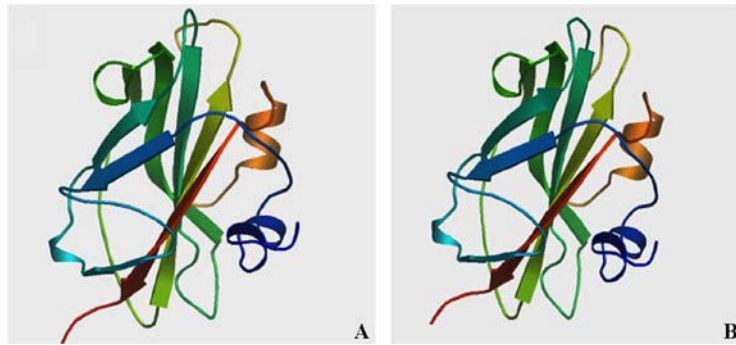


图 4 拟南芥 *AtFT* (A) 和百子莲 *ApFT* (B) 蛋白三维结构模型

Fig. 4 Tertiary structure model of *AtFT* (A) and *ApFT* (B)

2.3 *ApFT* 的同源性比较与进化树分析

通过 BLASTx 对 *ApFT* 进行同源性序列比对, 以及用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列同源性分析发现, 百子莲 *ApFT* 蛋白序列与其他植物的 FT 蛋白具有很高相似性, 与水稻 (ABA92722.1) 和温州蜜柑 (BAF93494) 相似性高达 72%, 与拟南芥 (NP_173250)、玉米 (NP_001147266.1) 和花生 (AFP33419.1) 蛋白序列的相似性也可达到 71% (图 5)。

百子莲 <i>Agapanthus praecox</i> ssp. <i>orientalis</i> (KC951108)	.MHASCVDPVLVGVVIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	63
水稻 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group (ABA92722.1)	...MSR...DPLVVG...VIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	60
矮斗菜 <i>Aquilegia formosa</i> (ABB90591.1)	...MAASVDPVLVGVVIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	61
菊花 <i>Chrysanthemum</i> × <i>morifolium</i> (ACX48949.1)	...MFRERDPLVVG...VIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	62
花生 <i>Arachis hypogaea</i> (AFP33419.1)	MCMMGASVDPVLVGVVIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	65
温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i> (BAF93494)	...MAASVDPVLVGVVIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	61
玉米 <i>Zea mays</i> (NP_001147266.1)	...MARFVDPVLVGVVIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	61
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> (XP_003634198)	...MFRERDPLVVG...VIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	62
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_173250)	...MAASVDPVLVGVVIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	61
苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> (XP_003631075.1)	...MAASVDPVLVGVVIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	61
梅花 <i>Prunus mume</i> (CBY25181.1)	...MFRERDPLVVG...VIGGVVDHVFETLMSVSYGSKHINNGCDVPSIAAEHFTVNIGG.RMSE	62
Consensus	m dplvvg v g d f v ng ps p g	
百子莲 <i>Agapanthus praecox</i> ssp. <i>orientalis</i> (KC951108)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	128
水稻 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group (ABA92722.1)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	125
矮斗菜 <i>Aquilegia formosa</i> (ABB90591.1)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	126
菊花 <i>Chrysanthemum</i> × <i>morifolium</i> (ACX48949.1)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	127
花生 <i>Arachis hypogaea</i> (AFP33419.1)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	130
温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i> (BAF93494)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	126
玉米 <i>Zea mays</i> (NP_001147266.1)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	126
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> (XP_003634198)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	127
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_173250)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	126
苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> (XP_003631075.1)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	126
梅花 <i>Prunus mume</i> (CBY25181.1)	LTITLMDPDAFSPSEHTMRFWVHWVNIHGGTDFSCGGEVVEVMGFRFPIGIRHYVLMLEKCK	127
Consensus	tl m dpdapsps p e hw v ip g e y p p qihz lf q	
百子莲 <i>Agapanthus praecox</i> ssp. <i>orientalis</i> (KC951108)	AGLP.GITFESESRANETRMFAARYDLGFVATVYFNACKEPASPASRRRHHI.....	177
水稻 <i>Oryza sativa</i> Japonica Group (ABA92722.1)	VRQT..TYRGGNRCQENTRIDFAELYNLGSPVAALFFNCCGPNCGGRRLKLELRIVPDIYM	183
矮斗菜 <i>Aquilegia formosa</i> (ABB90591.1)	NPLS..IDNFEISANETRMFAHQFLGFPVACAYFNACKEP.....	166
菊花 <i>Chrysanthemum</i> × <i>morifolium</i> (ACX48949.1)	GRQT..VYAGGNRCQENTRIDFAELYNLGSPVAALFFNCCGPNCGGRRLKLELRIVPDIYM	174
花生 <i>Arachis hypogaea</i> (AFP33419.1)	GVLG.GVEQFARASFTTRYPARQFLGFPVATVYFNACKEPASPASRRR.....	176
温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i> (BAF93494)	APLG.LVEQFTRANETRMFAAGNLLGFPVATVYFNACKEPASPASRRR.....	172
玉米 <i>Zea mays</i> (NP_001147266.1)	TRVH..AEGGGSEANETRMFAAAHBLGFPVATVYFNACKEPASPASRRR.....	172
葡萄 <i>Vitis vinifera</i> (XP_003634198)	GRQT..VYAGGNRCQENTRIDFAELYNLGSPVAALFFNCCGPNCGGRRLKLELRIVPDIYM	174
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> (NP_173250)	SFVGLMVQCFESNANETRMFAAGHFLGFPVATVYFNACKEPASPASRRR.....	173
苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> (XP_003631075.1)	GPFG.MVEQFTRANETRMFAAGNLLGFPVATVYFNACKEPASPASRRR.....	172
梅花 <i>Prunus mume</i> (CBY25181.1)	GRQT..VYAGGNRCQENTRIDFAELYNLGSPVAALFFNCCGPNCGGRRLKLELRIVPDIYM	174
Consensus	p r f t fa lg p a fn q e	

图 5 *ApFT* 基因推测的氨基酸序列与其他植物 FT 蛋白的多序列比对

Fig. 5 Alignments of the *ApFT* deduced amino acid sequences with those of other plants

利用 MEGA4 软件,在多重比对的基础上,对 *ApFT* 蛋白序列和其他植物 FT 蛋白序列进行系统发育树的构建。从进化树(图 6)中可以看出百子莲 *ApFT* 与玉米(NP_001147266.1)亲缘关系最近,它们同属单子叶植物;与花生(AFP33419.1)、苜蓿(XP_003631075.1)和温州蜜柑(BAF93494)等亲缘关系较近;与水稻(ABA92722.1)、菊花(ACX48949.1)、绣线菊(AEO72031.1)和梅花(CBY25181.1)亲缘关系相对较远。

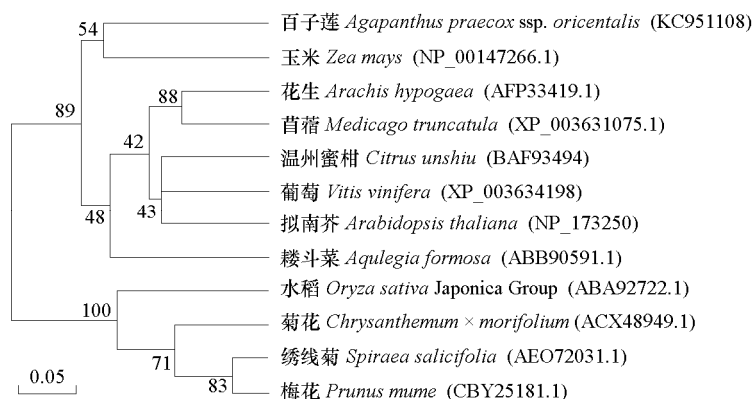


图 6 不同植物 FT 氨基酸序列的系统树分析

各节点处数字代表 bootstrap 值。

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis of the deduced amino acid sequences of FT in different species

The numbers at node represent the bootstrap values.

2.4 百子莲 *ApFT* 的表达分析

分别取百子莲营养生长期、花芽诱导期和花芽分花期的茎尖和叶片组织进行 *ApFT* 基因的实时荧光定量分析。图 7 结果表明:在整个花芽分化过程中,叶片中 *ApFT* 表达量均高于茎尖。3 个时期中叶片的表达量分别是茎尖中表达量的 24.13、11.56 和 14.04 倍。说明该基因主要在叶片中表达,表达具有明显的空间差异性。*ApFT* 在叶片中的表达量呈递减趋势,营养生长期叶片中表达量分别是诱导期和花芽分化期叶片的 1.23 倍和 2.37 倍。*ApFT* 在茎尖中的表达量花序芽诱导期最高,分别为营养期和花芽分花期的 1.70 倍和 2.35 倍。推测该基因可能在调节花芽分化过程中发挥重要作用。

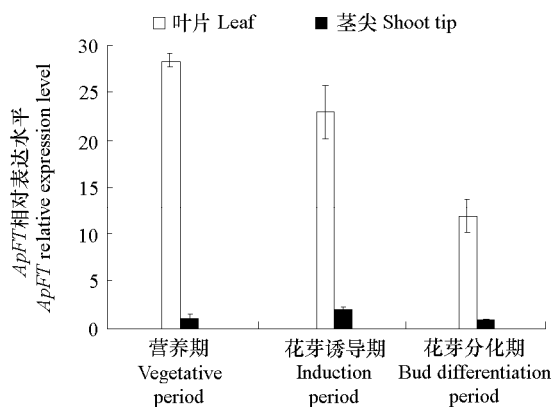


图 7 荧光定量检测 *ApFT* 在叶片和茎尖中的差异表达

Fig. 7 The fluorescence quantitative detection *ApFT* differentially expressed in the leaves and shoot tips

3 讨论

目前许多植物的 *FT* 基因已经被克隆出来, 然而在观赏植物百子莲中尚未见报道。本试验中采用 RACE 的方法, 获得百子莲 *ApFT* 基因全长序列。通过序列分析显示, *ApFT* 与其他植物 *FT* 有相同的 PEBP 结构域。PEBP 是一类结构高度保守、生物功能多样的碱性胞质蛋白, 可与膜磷脂(Raf-1)、阿片、核苷酸等多种物质结合, *FT* 基因编码的蛋白和 *TFL1*、*CEN* 基因同属一类(Bradley et al., 1997)。PEBP 家族基因在植物的成花转变过程中扮演重要的角色, 可调节植物的开花时间(Chardon & Damerval, 2005)。百子莲 *ApFT* 蛋白三级结构与拟南芥 *AtFT* 高度相似, *ApFT* 基因的核苷酸序列与其他植物 *FT* 基因的核苷酸有一定的差异, 但是内含子和外显子数相同, 分别为 4 个内含子和 3 个外显子。分子系统进化分析显示, *ApFT* 同其他植物的 *FT* 具有较高的同源性, 与玉米亲缘关系最近, 可能与百子莲和玉米都是单子叶植物, 进化关系较近有关, 与水稻、菊花和梅花等植物亲缘关系较近, 而与葡萄、拟南芥和蔊斗菜等植物亲缘关系相对较远。

通过对百子莲花芽分化不同时期叶片和茎尖中 *ApFT* 表达分析, 结果表明: 营养期叶片中 *ApFT* 表达量最高, 其含量为同时期茎尖的 24.12 倍, 随着花芽分化进程的加快, 叶片中 *ApFT* 表达量逐渐降低, 在花序芽形成期叶片中表达量最低, 分析可能是有部分 *FT* 蛋白已经运输到茎尖, 参与花芽分化的过程。诱导期茎尖中 *ApFT* 的表达量高于营养生长期和花芽分化期, 推测 *ApFT* 基因可能在百子莲成花诱导过程中起到重要的调控作用, 其表达模式与拟南芥等多数植物的 *FT* 同源基因表达模式基本一致。在拟南芥中, *FT* 蛋白被运输到茎尖后可与 *FD* 蛋白共同作用激活花分生组织基因的表达从而促进开花(Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005; Corbesier et al., 2007), *FT* 基因最初在叶片中表达, 并不定位于开花发端的茎顶端特异区域, *FD* 在茎顶端分生组织的边缘, 即花原基起始的区域表达(Jaeger et al., 2006), 不在茎顶端分生组织表达(Simpson & Dean, 2002), 只有 *FT*/*FD* 互作表达, 才能共同调控其下游 *API* 的表达, 促进茎顶端开花起始(Wigge et al., 2005)。*ApFT* 基因可能也是通过此途径在叶片中表达进而激活花分生组织基因, 且花芽分化不同阶段 *ApFT* 在叶片中表达量均高于茎尖, 与‘三月红’荔枝花芽分化期 *FT* 同源基因在成熟叶中表达量最高的研究结果(丁峰等, 2012)相符, 而与田素波等(2011)报道的菊花 *CmFT* 在花芽中表达量最高的结果有所不同, 说明不同植物种 *FT* 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 (5737): 1052 - 1056.
- Baurle I, Dean C. 2006. The timing of developmental transitions in plants. *Cell*, 125 (4): 655 - 664.
- Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, Carpenter R, Coen E. 1997. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*, 275: 80 - 83.
- Chardon F, Damerval C. 2005. Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals. *J Mol Evol*, 61: 579 - 590.
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G. 2007. *FT* protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316: 1030 - 1033.
- Ding Feng, Peng Hong-xiang, He Xin-hua, Li Dong-bo, Zhu Jian-hua. 2012. Cloning and expression analysis of the *FLOWERING LOCUS T (FT)* homologous gene cDNA from *Litchi chinensis*. *Journal of Fruit Science*, 29 (1): 75 - 80. (in Chinese)
- 丁峰, 彭宏祥, 何新华, 李冬波, 朱建华. 2012. 荔枝 *FLOWERING LOCUS T (FT)* 同源基因 cDNA 全长克隆及其表达. *果树学报*, 29 (1): 75 - 80.

- Endo T, Shimada T, Fujii H, Kobayashi Y, Araki T, Omura M. 2005. Ectopic expression of an FT homolog from *Citrus confers* an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) . Transgenic Research, 14 (5): 703 – 712.
- Hemming M N, Peacock W J, Dennis E S, Trevaskis B. 2008. Low-temperature and daylength cues are integrated to regulate FLOWERING LOCUS T in barley. Plant Physiology, 147: 355 – 366.
- Jaeger K E, Graf A, Wigge P A. 2006. The control of flowering in time and space. Journal of Experimental Botany, 57: 3415 – 3418.
- Kardailsky I, Shukla V K, Ahn J H, Dagenais N, Christensen S K, Nguyen J T, Chory J, Harrison MJ, Weigel D. 1999. Activation tagging of the floral inducer FT. Science Reports, 286: 1962 – 1965.
- Kobayashi Y, Kaya H, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. Science, 286: 1960 – 1962.
- Li C, Zhang K, Zeng X, Jackson S, Zhou Y, Hong Y. 2009. A cis element within flowering 1 Locus T mRNA determines its mobility and facilitates trafficking of heterologous viral RNA. Journal of Virology, 83 (8): 3540 – 3548.
- Lifschitz E, Eviatar T, Rozman A, Shalit A, Goldshmidt A, Amsellem Z, Alvarez J P, Eshed Y. 2006. The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. Proc Natl Acad Sci USA, 103 (16): 6398 – 6403.
- 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: 402 – 408.
- 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.
- Notaguchi M, Abe M, Kimura T, Daimon Y, Kobayashi T, Yamaguchi A, Tomita Y, Dohi K, Mori M, Araki T. 2008. Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. Plant Cell Physiology, 49 (11): 1645 – 1658.
- Shannon S, Meeks-Wagner D R. 1991. A mutation in the *Arabidopsis* TFL1 gene affects inflorescence meristem development. Plant Cell, (3): 877 – 892.
- Simpson G G, Dean C. 2002. *Arabidopsis* the rosetta stone of flowering time? Science, 296: 285 – 289.
- Tamaki S, Matsuo S, Wong H L, Yokoi S, Shimamoto K. 2007. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. Science, 316: 1033 – 1036.
- Tian Su-bo, Lin Gui-yu, Zheng Cheng-shu, Sun Xia, Ren Hong-yan, Wen Li-zhu. 2011. Cloning and expression of *CmCO* and *CmFT* of floral development genes in *Chrysanthemum*. Acta Horticulturae Sinica, 38 (6): 1129 – 1138. (in Chinese)
- 田素波, 林桂玉, 郑成淑, 孙霞, 任洪艳, 温立柱. 2011. 菊花花发育基因 *CmCO* 和 *CmFT* 的克隆与表达分析. 园艺学报, 38 (6): 1129 – 1138.
- Wigge P A, Kim M C, Jaeger K E, Busch W, Schmid M, Lohmann J U, Weigel D. 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. Science, 309 (5737): 1056 – 1059.
- Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J. 2006. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT. Proc Natl Acad Sci USA, 103 (51): 19581 – 19586.
- Zhang Di. 2011. Flower bud development and flowering mechanism in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* [Ph. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Forestry University. (in Chinese)
- 张 获. 2011. 百子莲花芽分化及开花机理研究[博士论文]. 哈尔滨: 东北林业大学.