

番荔枝节律钟输出基因*AsGI*的克隆、亚细胞定位与表达分析

刘锴栋, 袁长春*, 黎海利, 陈燕, 刘金祥

(岭南师范学院生命科学与技术学院, 广东湛江 524048)

摘要: *GIGANTEA* 基因在植物开花和生理节律变化过程中起着重要作用。利用同源克隆和 RACE-PCR 的方法获得番荔枝 *GIGANTEA* 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *AsGI*, GenBank 登录号为 KR095281。序列分析表明, 克隆获得的番荔枝 *AsGI* 基因长为 3 465 bp, 编码 1 154 个氨基酸。氨基酸序列比对显示与葡萄和油棕的 *GI* 的相似度分别为 77%和 76%。构建类似蛋白系统进化树显示, 番荔枝 *AsGI* 与香蕉、海枣、油棕等分子进化距离较近。预测 *AsGI* 蛋白为转录因子, 定位在细胞核中, 为非分泌性蛋白质, 不具备信号肽。同时构建了该基因融合 GFP 的植物表达载体, 通过农杆菌介导瞬时转化烟草上表皮细胞并在荧光显微镜下观察, 发现在烟草上表皮细胞的细胞核中有绿色荧光。实时定量 RT-PCR 结果表明, 在不同的器官中, *AsGI* 的表达量存在差异, 在叶片、花蕾和成熟花中的表达量相对较高。*AsGI* 呈现昼夜节律表达模式, 长日照下叶片中 *AsGI* 在白昼的表达高于短日照处理。在 4 月、6 月和 8 月, *AsGI* 的表达量相对较高。该基因可能作为番荔枝花期调控分子育种的目标基因。

关键词: 番荔枝; *GIGANTEA*; 生物节律钟; 亚细胞定位; 表达模式

中图分类号: S 667.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 12-2395-10

Cloning, Subcellular Localization and Expression Analysis of Circadian Clock Output Gene *AsGI* from Sugar Apple

LIU Kai-dong, YUAN Chang-chun*, LI Hai-li, CHEN Yan, LIU Jin-xiang

(Life Science and Technology School, Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China)

Abstract: *GIGANTEA* gene plays an important role in several molecular regulations in plant, such as flowering and circadian rhythm oscillation. A full-length cDNA sequence of homologous *GIGANTEA* gene was cloned by employing homology gene cloning and RACE-PCR from sugar apple (*Annona squamosa* L.), which was named as *AsGI* (GenBank accession KR095281). Sequence analysis showed that the *AsGI* gene has a 3 465 bp open reading frame (ORF) encoding 1 154 amino acids. Sequence alignment displayed that it was a similarity of 77% and 76% with *GIGANTEA* of *Vitis vinifera*, *Elaeis guineensis*, respectively. The phylogenetic tree showed that sugar apple *AsGI* and *Musa acuminata* *GIGANTEA* are the closest in molecular evolution distance, followed by *Phoenix dactylifera* *GIGANTEA* and *Elaeis guineensis*.

收稿日期: 2015-07-20; **修回日期:** 2015-12-07

基金项目: 广东省科技计划项目 (2013B020304008); 国家自然科学基金项目 (31201586); 广东省教育厅科技创新项目 (2013KJCX0124); 岭南师范学院自然科学研究项目 (LZL1507); 岭南师范学院科研创新团队项目 (2013CXTD05); 岭南师范学院协同创新中心项目 (CIL1503)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yuanchangchun@163.com; Tel: 0759-3183271)

GIGANTEA. It was speculated that *AsGI* protein is transcription factor, located in the nucleus and it is a non-secretory protein. It do not have a signal peptide. The plant expression vector was transformed into tobacco via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. GFP expression was observed in the nucleus of the epidermis cells of tobacco by fluorescence microscopy. The real-time PCR results suggested that *AsGI* gene showed a high transcription level in leaf, flower bud and mature flower. Interestingly, the expression patterns of *AsGI* gene are circadian rhythms expression. Under long-day conditions, the expression levels of *AsGI* gene are higher than that under short-day conditions. And the the expression levels of *AsGI* gene are relatively high in April, June, and August. This study provides some references for further exploration of photoperiod pathway of the flower in sugar apple molecular control mechanism. Meanwhile, *AsGI* gene could be used as the target gene of molecular breeding of flowering phase.

Key words: sugar apple; *GIGANTEA*; circadian clock; subcellular localization; expression pattern

番荔枝 (*Annona squamosa* L.) 的芽为复芽, 其腋芽被叶柄抱嵌, 若叶片不脱落, 腋芽一般不会萌发。在生产实践中, 一般于 3—8 月摘除老熟枝条中任一节位的叶片, 并结合剪顶或摘心就可以促发新梢, 同时, 先发新梢 80% 以上能成花。而在 9 月至翌年 2 月通过这一修剪技术, 番荔枝的腋芽抽发的新梢成花较少, 研究表明这与光周期调节有一定关系 (Olesen & Muldoon, 2009; Soler & Cuevas, 2009; 赵金凤 等, 2014)。

高等植物可以通过感知光周期的昼夜变化 (Daniel et al., 2004; Lu et al., 2012) 和季节日照时间的长短, 来调节启动开花的时间。这是环境信号和节律基因参与时间调控机制互作的结果 (Hayama & Coupland, 2003)。生物节律钟输出基因 *GI* (*GIGANTEA*) 是光周期途径调控开花的关键基因之一, 受昼夜节律的调控, 位于开花促进基因 *CO*、*FT* 的上游, 并正调控 *CO*、*FT* 基因的表达, 因此 *GI* 在整个光周期途径中起应答节律信号、调控下游开花促进因子的重要角色 (Tseng et al., 2004; Jung et al., 2007)。目前关于拟南芥 *GI* 基因 (*AtGI*) 的研究较多, *AtGI* 突变可引起拟南芥在长日照条件下开花延迟 (Fowler et al., 1999), 而 *AtGI* 过表达则会引起提前开花 (Mizoguchi et al., 2005)。在水稻中, 无论是在长日照还是在短日照条件下, *OsGI* 过表达都会导致水稻推迟开花, 这说明在水稻中 *OsGI* 的调控作用与在拟南芥中的可能是相反的 (Hayama et al., 2003)。此外, 在大豆、玉米、菊花中都克隆得到相应的 *GI* 基因 (孙霞 等, 2012; Bendix et al., 2013; Li et al., 2013)。 *GI* 基因在不同日照类型的植物中的功能存在较大差异。

本研究中从番荔枝中分离出 *GI* 基因, 并对其进行生物信息学和表达分析, 为研究番荔枝光周期成花途径的基因调控机制及进一步应用于花期分子育种奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试材及试剂

5 年生番荔枝栽培于岭南师范学院热带果树创新团队试验地, 常规管理。

2014 年 7 月中旬采集茎、顶芽、叶片、花蕾、成熟花和幼嫩的果实用于器官特异性表达分析。

2014 年 3 月 10 日在同一株树上选取长势和角度一致、位置相近、无病虫害、长度为 70 ~ 80 cm 的 1 年生番荔枝枝条 3 枝, 其中 1 枝不去顶不去叶 (即对照); 1 枝不去顶去叶; 1 枝去顶去叶。于 3 月 25 日取枝条中部的腋芽, 用于催花处理分析。

一年生的番荔枝盆栽幼苗用于不同光照周期和昼夜表达分析。在长日照下培养 20 d 后, 挑选长势均匀的植株 (苗高 30 cm 左右, 叶片数 10 片以上), 于 2014 年 5 月放入光照培养箱中进行短日照 (9 h/15 h, 8: 00—17: 00 光照) 和长日照处理 (15 h/9 h, 5: 00—20: 00 光照), 昼/夜温度设为 25°C/22°C, 相对湿度 65%, 光照强度 $220 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。72 h 后长日照和短日照同步取地上部叶片, 取样时间从凌晨 0 时开始每 4 h 取样 1 次, 共 6 次。

分别于 2014 年 2、4、6、8、10 月, 每月 15 日采集方向和位置基本一致的 5 年生植株叶片用于不同月份的表达分析。

上述器官及处理均重复 3 次。取样后立即用液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.2 RNA的提取和cDNA合成

取适量材料在液氮中研磨, 按照 RNAPrep pure 植物总 RNA 提取试剂盒 (天根生物公司) 的方法提取总 RNA。采用 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit (用于基因克隆) 和 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (用于定量 PCR) 反转录试剂盒将 RNA 反转录为第一链互补链 DNA (cDNA)。反转录的反应条件及程序均按照 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit 和 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒说明书进行。

1.3 *AsGI*基因全长的克隆

利用 DNAMAN 生物软件对已知物种的 *GI* 同源基因序列进行同源比对分析, 找到 *GI* 基因共有的保守序列区域, 并在其上设计一对基因特异引物 3GSP1 和 5GSP1 (表 1)。以叶片样本的反转录产物为模板, 通过 PCR 扩增番荔枝 *GI* 基因特异片段。反应体系如下: RNA 浓度为 $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 cDNA 1.0 μL , $10\times$ LA Taq Buffer 2.0 μL , $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 1.0 μL , LA Taq Polymerase 0.5 μL , 10 μmol 上下游引物各 1.0 μL , 超纯水 14.5 μL , 终体积为 20 μL 。反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 然后进行 30 个循环: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 循环结束后 72 °C 延伸反应 10 min, 4 °C 保温。1%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 对扩增所得目的片段进行切胶回收。将回收的 PCR 产物与测序载体 pMD19-T 连接后, 转化 DH5 α 感受态细胞, 在氨苄青霉素抗性平板上进行蓝白斑筛选, 再经 PSTI 酶切检测后选择阳性克隆进行测序。

根据基因特异引物 PCR 扩增的达到的同源保守序列, 依据 RACE 操作手册分别设计了 3'-RACE、3'巢式引物 (3NGSP1)、5'-RACE、5'巢式引物 (5NGSP1) (表 1), 并按要求逆转录生成 cDNA 第 1 链。第 1 轮反应程序为: 94 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 73 °C 3 min, 25 个循环。取 5 μL 产物进行电泳检测, 所有 PCR 扩增条带均回收测序。利用第 1 轮 PCR 得到的产物, 再进行第 2 次巢式扩增 (引物分别为 3NGSP1 和 5NGSP1), 扩增条件为: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min 35 个循环, 72 °C 7 min。再次对所有 PCR 扩增条带均回收测序。依据测序结果, 设计 1 对全长引物, 扩增 *AsGI* 基因的 ORF 读码框, 引物分别为: ORF Up 和 ORF Dn。

1.4 *AsGI*基因编码蛋白的生物信息学分析

利用 ExPASy Proteomics Server 上的在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 *AsGI* 基因编码蛋白的理化性质进行分析预测; 采用 SOMPA (<http://www.expasy.ch/tools>) 和 Phyre2 在线软件 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk>) 分别对 *AsGI* 基因编码的蛋白进行二级结构分析与 3D 结构建模; 使用 SignalP4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行分泌蛋白预测;

利用在线软件 ProtComp v.9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>) 进行蛋白定位信号预测。GI 蛋白氨基酸序列比对利用 NCBI 的蛋白质序列数据库进行搜索, 并通过 ClustalW 软件进行作图。通过 MEGA 5.1 构建 Neighbor-joining 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1 000 次, 其他采用默认设置。

1.5 番荔枝 *AsGI* 蛋白亚细胞定位试验

番荔枝 *AsGI* 编码基因的 ORF 序列通过 PCR 扩增, 连入载体 pH7FWG2.0 产生蛋白 GFP 表达融合载体。绿色荧光蛋白 GFP 与 *AsGI* 蛋白的 C 末端相融合, 并在 35S 强启动子的控制下表达。载体构建使用的引物见表 1。融合表达载体, 转入 DH5 α , PCR、酶切筛选阳性克隆, 并对阳性克隆进行测序验证。将构建完毕的融合载体转入农杆菌中, 并对幼嫩烟草叶片进行侵染, 完成瞬时表达。使用倒置荧光显微镜 LSM710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany, <http://corporate.zeiss.com/>) 观察绿色荧光定位情况。

1.6 实时荧光定量 PCR

提取各样品总 RNA, 以 Oligo- (dT) 为引物, 用 AMV 反转录酶进行反转录, 参照 PrimeScript 1 Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 方法进行。用反转录后的 cDNA 作模板。为了提高荧光信号的特异性, 设计实时定量 PCR 特异引物 (*AsGI*-qRT-F 和 *AsGI*-qRT-R) (表 1)。根据前期克隆到的番荔枝看家基因 *AsActin* 设计一对定量内参引物 *AsActin*-F 和 *AsActin*-R (表 1)。

表 1 引物序列
Table 1 Primers used in this study

引物用途 Description	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5' - 3')
<i>AsGI</i> 基因片段分离 Isolation of <i>AsGI</i> fragment	3GSP1	CCTCTGGCTGGTTATATTTCT
巢式引物 Nested primer	3NGSP1	GCTGCAGCTATGGTTGCTGC
<i>AsGI</i> 基因片段分离 Isolation of <i>AsGI</i> fragment	5GSP1	AGCATTCTTCTGTTTGCTGC
巢式引物 Nested primer	5NGSP1	CATAGCTGCAGCAACAATCT
3'-RACE 引物 Rapid amplification of cDNA 3' ends	3'-CDS Primier	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC (T) 30VN
5'-RACE 引物 Rapid amplification of cDNA 5' ends	5'-CDS Primier	(T) 25VN
通用引物 Universal primer	BD SMART IITM	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
<i>AsGI</i> 开放阅读框的扩增 Amplification of <i>AsGI</i> ORF	<i>AsGI</i> ORF Up <i>AsGI</i> ORF Dn	ATGGCGGCATCTTTTCGAGAA TTAAGGAATGCCAGTACCAG
<i>AsGI</i> 蛋白 GFP 表达载体构建 Construction of GFP expression vector of <i>AsGI</i> protein	<i>AsGI</i> -GFP-F <i>AsGI</i> -GFP-R	GTTACCATGGCGGCATCTTTTCG GTCGACAGGAATGCCAGTACCAG
荧光定量检测引物 Real-time PCR of <i>AsGI</i>	<i>AsGI</i> -qRT-F <i>AsGI</i> -qRT-R	GCCACTCCAGAAACACAAATG GCCTTTGTAGGAGATGCTGATA
荧光定量内参引物 Real-time PCR of <i>AsActin</i>	<i>AsActin</i> -F <i>AsActin</i> -R	GACACCATCCCCAGAATCC CCCCAGAAGAACCCTGT

按照 SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] 操作说明, 以 *AsActin* 为内参基因, 在 Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增, 检测基因的相对表达量。荧光定量 PCR 反应体系为 20 μ L: 2 \times SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] 10 μ L, 10 μ mol 上下游引物各 1 μ L, RNA 浓度为 2 μ g \cdot μ L⁻¹ 的 cDNA 模板 1 μ L, 超纯水 7 μ L, 混合加样。PCR 反应程序为 96 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 40 次循环。每个试验设置 3 次重复。利用定量 PCR 所得到的 CT 值, 计算 *AsGI* 基因在各个不同样本中的相对表达量。在 *AsGI* 基因器官特异性表达分析中, 利用公式 $\text{target transcripts} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出

每个器官样本中 *AsGI* 基因的表达通过 *AsActin* 均一化处理后相对于茎中表达值的倍数。各器官样品中的平均相对表达量。

2 结果与分析

2.1 番荔枝*AsGI*基因全长序列的克隆

利用 *GI* 同源基因高度保守的序列设计了一对特异引物, 以番荔枝基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 技术得到了 1 条 1 219 bp 的特异条带 (图 1, A)。测序结果表明, 该片段与苜蓿、葡萄、马铃薯、番茄的 *GI* 基因高度同源, 表明得到的序列是番荔枝 *GI* 同源基因的片段。基于前期试验得到的番荔枝 *GI* 基因特异片段, 设计了两条巢式引物及 1 条 3'-CDS 引物, 1 条 5'-CDS 引物, 成功进行了 RACE 克隆。得到序列片段用于进一步全长基因的克隆。设计了两条全长序列克隆引物, *AsGI* ORF Up 和 *AsGI* ORF Dn, 通过 TaKaRa LA *Taq* DNA 聚合酶扩增全长后测序 (图 1), 得到了 3 465 bp 的全长 CDS 序列。其中 A、T、G 和 C 碱基含量分别为 26.35%、28.43%、23.95%和 21.27%。将该 cDNA 序列命名为 *AsGI*, 已经登录 GenBank, 登录号为 KR095281。

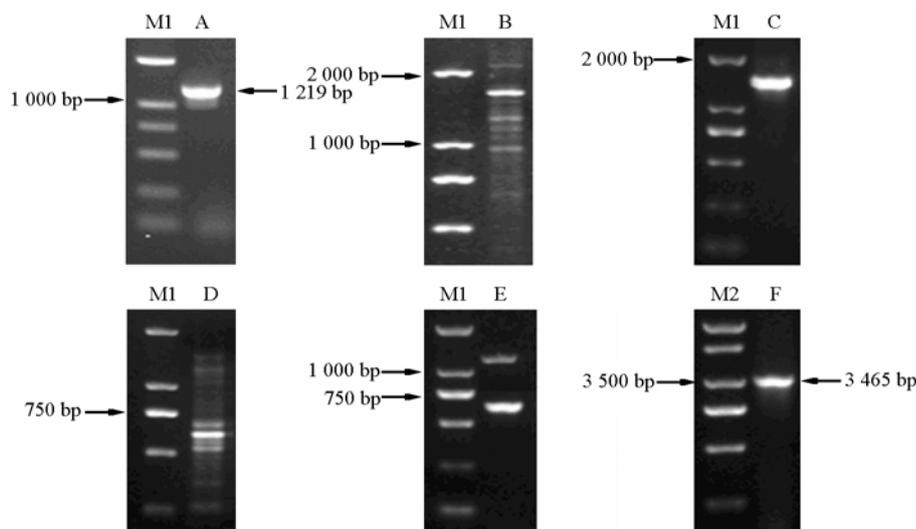


图 1 *AsGI* 全长基因的克隆

A: *AsGI* 特异片段扩增产物; B: 3'RACE 第 1 轮扩增产物; C: 3'RACE 第 2 轮扩增产物; D: 5'RACE 第 1 轮扩增产物;
E: 5'RACE 第 2 轮扩增产物; F: *AsGI* 全长基因 ORF 扩增产物; M1: DL2000 marker;
M2: DNA marker IV (7 000 bp)。

Fig. 1 Cloning of full length of *AsGI* gene

A: Amplification product of *AsGI* fragment; B: The first amplification product of 3'RACE; C: The second amplification product of 3'RACE; D: The first amplification product of 5'RACE; E: The second amplification product of 5'RACE; F: Full-length amplification product of *AsGI* ORF;
M1: DL2000 marker; M2: DNA marker IV (7 000 bp) .

2.2 番荔枝*AsGI*基因编码蛋白特性分析

利用 DNASTar 软件分析前期通过 RACE 技术得到的全长基因序列, 发现 *AsGI* 基因具有一个完整的开放阅读框, 共有 3 465 个碱基, 编码一个含有 1 155 个氨基酸的蛋白质。该蛋白的分子式为

C₆₆₇₆H₈₈₇₁N₁₅₆₉O₁₆₆₄S₄₇, 分子量为 126.0 kD, 等电点为 6.62, 带正电残基 (Arg + Lys) 为 106 个, 带负电残基 (Asp + Glu) 为 119 个。进一步分析得到, 该蛋白的不稳定系数为 49.37, 脂肪系数为 95.83, 平均亲水性系数为 -0.072。

拟南芥的同源 *GIGANTEA* 作为一个生物节律钟输出基因, 已被证明在光周期和生物节律钟调节开花途径中有着重要的作用 (Mizoguchi et al., 2005)。进一步利用在线 SignalP4.0 Server 软件分析发现, *AsGI* 蛋白不含信号肽。通过 ProtComp Version 9.0 软件预测 *AsGI* 蛋白的亚细胞定位在细胞核, 这与该基因不含有信号肽的预测结果相符。

SOPMA 软件分析 *AsGI* 蛋白的二级结构显示, 此蛋白有 α 螺旋 (alpha helix, 占 46.19%)、 β 转角 (beta turn, 占 7.54%)、不规则卷曲 (random coil, 占 10.83%) 和延伸链结构 (extended strand, 占 35.44%)。

利用 Phyre2 在线软件进行蛋白 3D 结构建模, *AsGI* 蛋白的保守结构域三维结构模型如图 2 所示。

结构模型以拟南芥 *GIGANTEA* 为模板, 61 个氨基酸残基 (占整个蛋白的 5%) 与对照模型具有 61.1% 的相似度。*AsGI* 蛋白三维结构预测的相似度不高, 表明番荔枝的 *GI* 蛋白具有比较大的物种特异性。

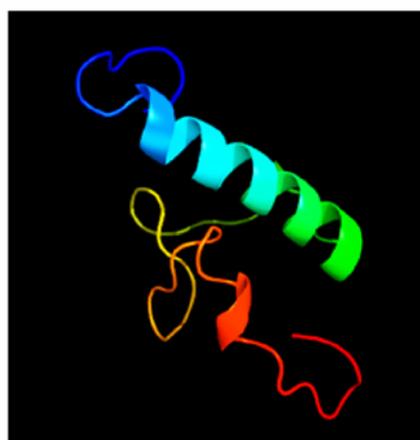


图 2 *AsGI* 蛋白三维结构预测
Fig. 2 Three-dimensional structure of deduced *AsGI* protein

2.3 番荔枝 *AsGI* 蛋白亚细胞定位

利用烟草上表皮细胞瞬时表达体系研究了番荔枝 *AsGI* 蛋白的亚细胞定位。利用 RACE 方法克隆得到的 *AsGI* 基因的全长 cDNA 序列, 构建了 35S: *AsGI*-GFP 载体, 并将其转入烟草上表皮细胞中, 发现在细胞核中有绿色荧光, 说明 *AsGI* 蛋白定位在细胞核 (图 3)。上述结果和通过软件 ProtComp Version 9.0 预测的结果一致。

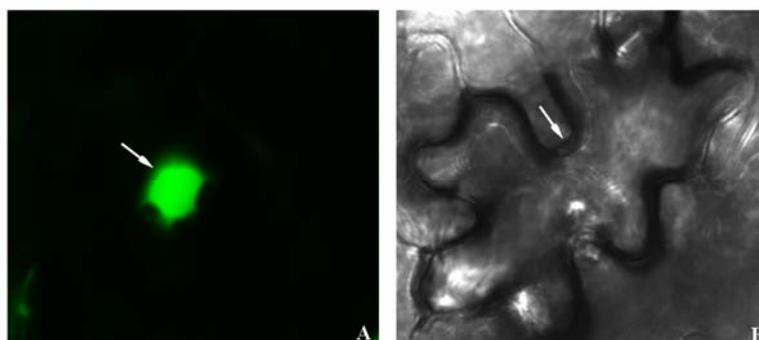


图 3 番荔枝 *AsGI* 蛋白亚细胞定位验证
A: 暗视野; B: 明视野。箭头所指: 定位信号。
Fig. 3 Subcellular location of *AsGI* protein
A: Dark field; B: Bright field. Arrow: Localization signal.

2.4 不同植物物种GI蛋白序列比对与聚类分析

将已知的 *AsGI* 蛋白序列提交至美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 的蛋白序列数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 BLASTP 相似性搜索。从 NCBI 的非冗余蛋白数据库 (Nr) 中下载与 *AsGI* 蛋白高度同源的豌豆 (*Pisum sativum* EF185297), 苜蓿 (*Medicago truncatula* MTR_1g098160), 鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* LOC101511540), 大豆 (*Glycine max* LOC100779044), 可可 (*Theobroma cacao* TCM_035715), 蓖麻 (*Ricinus communis* XM_002524295), 毛果杨 (*Populus trichocarpa* POPTR_0002s06490g), 胡杨 (*Populus euphratica* LOC105138505), 葡萄 (*Vitis vinifera* LOC100254197), 马铃薯 (*Solanum tuberosum* LOC102583457), 番茄 (*Solanum lycopersicum* LOC101255788), 莲 (*Nelumbo nucifera* LOC104605498), 芭蕉 (*Musa acuminata* LOC103969371), 海枣 (*Phoenix dactylifera* LOC103704831) 和油棕 (*Elaeis guineensis* LOC105047908) 等 15 条蛋白序列进行同源比对。利用 ClustalW 软件进行氨基酸同源比对, 结果表明 *AsGI* 蛋白与上述蛋白有着极高的相似性, 说明 *GI* 基因在进化过程中的高度保守性。

为了进一步分析 *GI* 蛋白在不同物种之间的进化关系, 利用 MEGA5.1 软件, 采用 Neighbor-joining 方法构建了不同植物物种间 *GI* 蛋白的系统进化树。15 种蛋白序列被分成两大亚家族。AsGI 蛋白属于亚家族 II, 与单子叶植物芭蕉, 海枣和油棕的 *GI* 蛋白同源性较高 (图 4)。

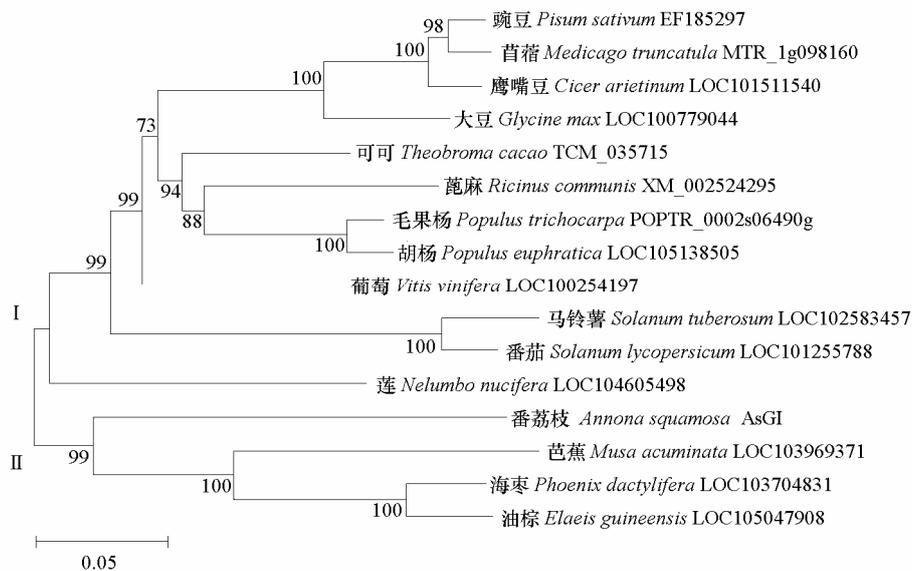


图 4 番荔枝 *GI* 与其他物种 *GI* 蛋白的系统进化分析

进化树中的数值代表支持率。

Fig. 4 Phylogenetic evolutionary analyses of *GI* proteins from different plant species
The value of the evolutionary tree represents bootstrap support values.

2.5 *AsGI* 基因器官特异性表达分析

AsGI 基因在番荔枝的不同器官中表达量差异较大: 叶片 > 成熟花 > 花蕾 > 顶芽 > 茎 > 幼嫩的果实 (图 5)。表明番荔枝中 *AsGI* 基因的表达主要集中在叶和花中。

2.6 催花处理下*AsGI*基因的表达

通过分析 *AsGI* 基因在催花处理方式下的腋芽中的表达量 (图 6), 发现去顶去叶处理的腋芽中 *AsGI* 基因的表达量最高, 不去顶去叶处理和对照中 *AsGI* 基因的表达量较小, 且相差不大。

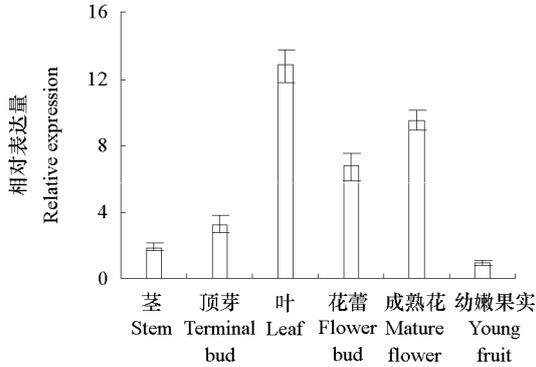


图 5 *AsGI* 基因在不同器官中的表达

Fig. 5 Expression pattern of *AsGI* in different organs

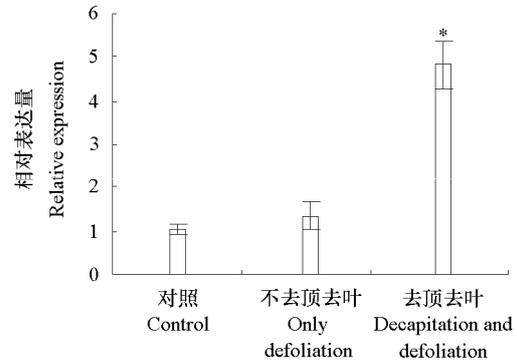


图 6 *AsGI* 在不同催花处理的腋芽中的表达模式分析

*表示 5% 差异显著水平。

Fig. 6 Analysis of *AsGI* gene expression pattern in axillary buds in flower forcing treatments

* means the significant level of 5%.

2.7 不同光照周期下*AsGI*基因的昼夜表达

通过分析 *AsGI* 基因在叶中的昼夜表达量 (图 7) 发现, 长日照和短日照处理下, 叶片中 *AsGI* 在 1 d 内的表达量均呈昼夜节律变化, 夜间 0: 00—4: 00 和 20: 00—24: 00 时表达量都相对较低; 8: 00 时, 短日照开始照光, 表达量开始上升, 但幅度不大, 长日照叶 8: 00 时迅速升高, 12: 00 时达到峰值, 此后下降。长日照下 8: 00—16: 00 时的表达量都比相应时段短日照的高。

2.8 不同月份*AsGI*基因的表达

由图 8 可以看出, 番荔枝 *AsGI* 基因在不同月份的叶片中表达量差异较大, 4、6 和 8 月表达量较高, 在 2 月和 10 月表达量较。

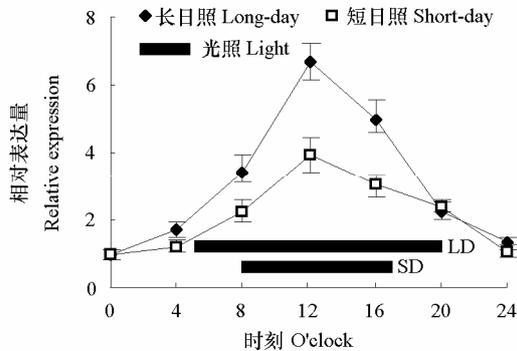


图 7 *AsGI* 在不同光照周期下的昼夜表达

Fig. 7 Analysis of *AsGI* gene expression pattern during day and night under different photoperiod treatments

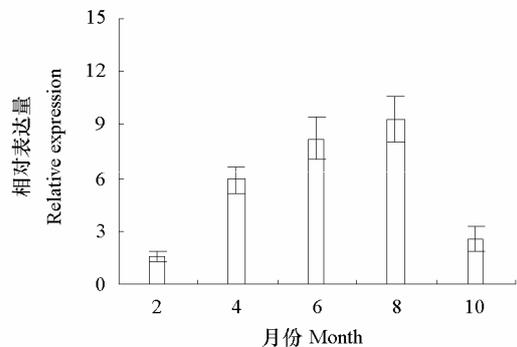


图 8 *AsGI* 在不同月份中的表达

Fig. 8 Analysis of *AsGI* gene expression pattern in different months

3 讨论

本试验中 *AsGI* 序列是采用同源克隆方法首次从番荔枝中克隆到 *GI* 基因, 并对其进行了初步分析。*AsGI* 编码区为 3 465 bp, 编码了 1 155 个氨基酸, NCBI 序列比对结果显示, *AsGI* 与其他物种的 *GI* 有较高的相似度。同时, 其他生物信息学分析还表明, *AsGI* 蛋白没有跨膜结构, 不含有信号肽, 是非分泌蛋白。而亚细胞定位预测将蛋白定位于细胞核中, 符合 *GIGANTEA* 为核内蛋白的特征, 满足 *GI* 基因发挥转录调控作用的要求 (Huq et al., 2000)。由此可见, 所克隆的 *AsGI* 为生物节律钟输出基因 *GIGANTEA* (*GI*) 的同源基因, 这为更加全面地研究番荔枝光周期途径的开花机制以及光周期途径与其他开花途径间的相互联系提供了参考。

GI 基因在光周期调控植物开花的过程中, 具有感受光信号, 响应生物节律钟信号, 对生物、非生物胁迫产生应激反应等作用 (Tseng et al., 2004; Cao et al., 2005; 唐维等, 2014)。*AsGI* 在叶片、花蕾、成熟花中的表达量相对较高, 这主要与叶和花是感受光周期和响应生物节律钟信号最为敏感的器官相关, 也在一定程度上证明了 *AsGI* 基因可以调控植物开花与生理节律。为探究番荔枝成花转变过程中生物节律钟输出基因 *AsGI* 基因作用, 本研究分析了该基因在催花处理下的腋芽中的表达情况。结果发现去顶去叶处理的枝条中部腋芽 *AsGI* 基因表达量最高, 这在一定程度上说明只有解除顶端优势, 并去掉叶片和叶柄, 使腋芽暴露出来, 响应光照条件下, *AsGI* 基因才开始大量表达。

在拟南芥中, *AtGI* 突变可引起拟南芥在长日照条件下开花延迟 (Fowler et al., 1999), 而 *AtGI* 过表达则会引起提前开花 (Mizoguchi et al., 2005)。长日照下 *AtGI* 转录在黎明后 10 h 到高峰, 12 h 后蛋白达高峰 (Günl et al., 2009)。本试验中, 番荔枝叶片中 *AsGI* 的转录高峰也与拟南芥的表达模式相似, 即在长日照和短日照下, *AsGI* 的表达都在光照下 8:00—16:00 有较高的表达, 在黑暗时表达量都相对较低。这说明 *AsGI* 转录本主要在光照下积累表达, 受控于生物节律钟并且转录后表达受光照与黑暗的调控。长日照处理明显比短日照处理上调了叶片中 *AsGI* 的高峰值, 而在长日照下, 番荔枝成花数比在短日照下显著增加 (Liu et al., 2015)。此外, 番荔枝 *AsGI* 基因在 4 月、6 月和 8 月中表达量较高, 而在 2 月和 10 月表达量较低, 番荔枝在 9 月至翌年 2 月即便通过剪顶去叶仍开花较少可能与此有关, 4—8 月南方地区光照充足和光照时间长, *AsGI* 表达量高可能会促进番荔枝成花。这些都说明番荔枝可能通过 *AsGI* 在长日照下的上调表达响应光周期信号, 进而调控番荔枝的成花。

References

- Bendix C, Mendoza J M, Stanley D N, Meeley R, Harmon F G. 2013. The circadian clock-associated gene *gigantea1* affects maize developmental transitions. *Plant Cell Environ*, 36 (7): 1379 - 1390.
- Cao S, Ye M, Jiang S. 2005. Involvement of *GIGANTEA* gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 24 (11): 683 - 690.
- Daniel X, Sugano S, Tobin E M. 2004. CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for its circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (9): 3292 - 3297.
- Fowler S, Lee K, Onouchi H, Samach A, Richardson K, Morris B, Coupland G, Putterill J. 1999. *GIGANTEA*: A circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in *Arabidopsis* and encode s a protein with several possible membrane-spanning domains. *EMBO J*, 18 (17): 4679 - 4688.
- Günl M, Liew E F, David K, Putterill J. 2009. Analysis of a post-translational steroid induction system for *GIGANTEA* in *Arabidopsis*. *BMC Plant*

- Biology, 9: 141. doi: 10.1186/1471-2229-9-141.
- Hayama R, Coupland G. 2003. Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Current Opinion in Plant Biology*, 6 (1): 13 - 19.
- Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, Yano M, Shimamoto K. 2003. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice. *Nature*, 422 (6933): 719 - 722.
- Huq E, Tepperman J M, Quail P H. 2000. GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (17): 9789 - 9794.
- Jung J H, Seo Y H, Seo P J, Reyes J L, Yun J, Chua N H, Park C M. 2007. The *GIGANTEA*-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (9): 2736 - 2748.
- Li F, Zhang X M, Hu R B, Wu F Q, Ma J H, Meng Y, Fu Y F. 2013. Identification and molecular characterization of *FKF1* and *GI* homologous genes in soybean. *PLoS ONE*, 8 (11): e79036.
- Liu K D, Li H L, Yuan C C, Huang Y L, Chen Y, Liu J X. 2015. Identification of phenological growth stages of sugar apple (*Annona squamosa* L.) using the extended BBCH-scale. *Scientia Horticulturae*, 181: 76 - 80.
- Lu S X, Webb C J, Knowles S M, Kim S H, Wang Z, Tobin E M. 2012. CCA1 and ELF3 Interact in the control of hypocotyl length and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 158 (2): 1079 - 1088.
- Mizoguchi T, Wright L, Fujiwara S, Cremer F, Lee K, Onouchi H, Mouradov A, Fowler S, Kamada H, Putterill J, Coupland G. 2005. Distinct roles of *GIGANTEA* in promoting flowering and regulating circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17 (8): 2255 - 2270.
- Olesen T, Muldoon S J. 2009. Branch development in custard apple (cherimoya *Annona cherimola* Miller × sugar apple *A. squamosa* L.) in relation to tip-pruning and flowering, including effects on production. *Trees*, 23 (4): 856 - 862.
- Sun Xia, Wang Xiu-feng, Zheng Cheng-shu, Xing Shi-yan, Shu Huai-rui. 2012. The cDNA Cloning and analysis of sequence information and quantitative express of chrysanthemum rhythms clock output gene *CmGI* (*GIGANTEA*). *Scientia Agricultura Sinica*, 45 (13): 2690 - 2703. (in Chinese)
- 孙霞, 王秀峰, 郑成淑, 邢世岩, 束怀瑞. 2012. 菊花节律钟输出基因 *CmGI* (*GIGANTEA*) 的 cDNA 全长克隆、序列信息及定量表达分析. *中国农业科学*, 45 (13): 2690 - 2703.
- Soler L, Cuevas J. 2009. Early flower initiation allows ample manipulation of flowering time in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 121: 327 - 332.
- Tang Wei, Liu Ya-ju, Zhang Yun-gang, Wang Xin, Hou Meng, Yan Hui, Ma Dai-fu, Li Qiang. 2014. Advances on physiological functions of *GI* gene in plant. *Molecular Plant Breeding*, 12 (5): 1044 - 1049. (in Chinese)
- 唐维, 刘亚菊, 张允刚, 王欣, 侯猛, 闫会, 马代夫, 李强. 2014. 植物 *GI* 基因生理功能研究进展. *分子植物育种*, 12 (5): 1044 - 1049.
- Tseng T S, Salomé P A, McClung C R, Olszewski N E. 2004. SPINDLY and *GIGANTEA* interact and act in *Arabidopsis thaliana* pathways involved in light responses, flowering, and rhythms in cotyledon movements. *The Plant Cell*, 16 (6): 1550 - 1563.
- Zhao Jin-feng, Liu Kai-dong, Yuan Chang-chun, Li Hai-li, Liu Jing-ting. 2014. Effects of two flower forcing treatments on shoot growth and flowering of *Annona atemoya* Hort cv. African Pride. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 42 (12): 133 - 138. (in Chinese)
- 赵金凤, 刘楷栋, 袁长春, 黎海利, 刘静婷. 2014. 2种人工催花方法对 AP 番荔枝新梢生长和成花的影响. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 42 (12): 133 - 138.