

日本晚樱同源异型基因 *PrseAP3* 的克隆 及其在单瓣与重瓣花中的表达分析

刘志雄 于先泥

长江大学园艺园林学院, 荆州 434025

摘要 用同源克隆的方法和 3'RACE 技术,从日本晚樱(*Prunus lannesiana*)中分离得到了 1 个 *AP3* 同源基因 *PrseAP3* 的 cDNA 全长,GenBank 登录号为 JF710371。其 cDNA 全长 977 bp,包括 1 个编码 235 个氨基酸共 708 bp 的开放阅读框。序列比对和分子系统发生分析表明,*PrseAP3* 是拟南芥的 *AP3* 同源基因,其蛋白质的 C 末端具有 2 个保守基元:PI-derived 模体和 paleoAP3 模体,属 B 类转录因子中 paleoAP3 进化系。半定量 RT-PCR 分析表明,*PrseAP3* 主要在单瓣日本晚樱品种大岛的萼片、花瓣和雄蕊中表达;在重瓣品种一叶的花瓣、雄蕊和叶化心皮中表达。其表达组织特异性在 2 个品种间表现出明显的差异,并与拟南芥的 *AP3* 基因有一定的差别。

关键词 日本晚樱;花发育;花同源异型基因;*APETALA3*;同源克隆;3'RACE 技术;半定量 RT-PCR
中图分类号 S 685 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0578-06

花瓣是观赏花木最具观赏性的结构之一,花瓣的形态、数量及花色一直是花卉育种的 3 个重要方向^[1]。在拟南芥中,*APETALA3* (*AP3*)是参与控制花瓣和雄蕊特征的 B 类 MADS-box 基因,其表达模式有很强的时空特异性^[2]。近年研究发现,*AP3* 同源基因表达模式在不同被子植物类群中呈现出一定的差异,并发生功能分化,进而参与调控植物花器官的形态差别^[3-6]。鉴于该基因在植物花型调控中的重要作用,其表达模式和功能的研究目前正成为花发育研究的热点领域,但主要集中在模式植物、观赏价值较高的兰科和菊科花卉以及一些花型奇特的基部被子植物,并发现这些基因表达模式改变和功能分化与植物花被形态分化密切相关^[3,6-7]。相对模式植物和草本观赏花卉而言,木本植物童期长、生长发育调控复杂以及遗传转化体系建立困难等,其花发育调控方面的研究相对滞后。

日本晚樱(*Prunus lannesiana*)是蔷薇科(Rosaceae)樱属著名的观赏花木。因其花色娇艳,树形优美,品种繁多,适应性广且观赏价值高,被广泛应用于园林绿化和景观建设。本研究分别选用遗传背景相近的日本晚樱白花单瓣品种大岛(*P. lannesiana* 'Makino')与重瓣品种一叶(*P. lannesiana* 'Hisakura'),比较分析其参与控制日本晚樱花瓣特

征决定的 *AP3* 同源基因的表达模式和功能,为解析日本晚樱花瓣形态建成的分子机制积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

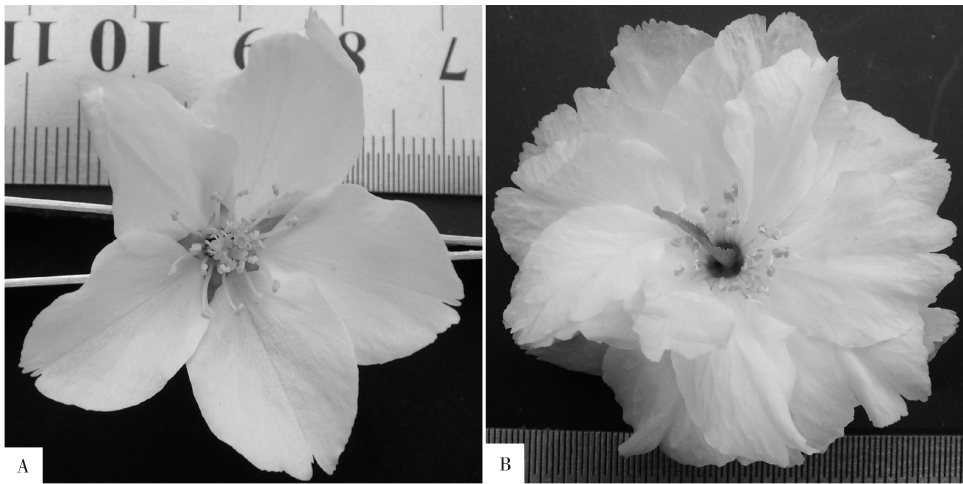
2010 年 4 月初采集供试品种大岛(*P. lannesiana* 'Makino')和一叶(*P. lannesiana* 'Hisakura')(图 1)蕾期雌雄蕊刚发育成熟时的花芽,并将萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊共 4 轮花器官分开,迅速置于液氮中速冻,-80 °C 超低温冰箱中保存备用。大岛与一叶分别采自中国农业大学校园和清华园。

1.2 RNA 分离和 cDNA 合成

用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)提取日本晚樱花芽和 4 种花器官(萼片、花瓣、雄蕊和雌蕊)的总 RNA。用 M-MLV 逆转录酶(TaKaRa 公司)合成第一链 cDNA,反应体系和操作按说明书进行。

1.3 日本晚樱 *AP3* 同源基因 *PrseAP3* 的分离

根据 NCBI 上现有其他植物的 *AP3* 同源基因序列,直接设计 3'-RACE 引物 5'-AACAAGATCAA-CAGGCAGGTG-3',用 3'-full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒(TaKaRa 公司)进行 *PrseAP3* 基因 3'端的克隆,操作按说明书进行。再根据获得的 3'-RACE



A: 大岛的花 The flower of 'Makino'; B: 一叶的花 The flower of 'Hisakura'.

图1 单瓣日本晚樱大岛与重瓣日本晚樱一叶花器官形态比较

Fig. 1 The morphological difference between single-flowered *P. lannesiana* 'Makino' and double-flowered *P. lannesiana* 'Hisakura'

序列的非翻译区(3'-UTR)和蔷薇科近缘种 *AP3* 同源基因 5'-UTR 的保守序列设计上下游引物 FLAP3F (5'-TTATGGGTCGTGGGAAGATTG-3') 和 FLAP3R (5'-CCGAGTCCAAGTCCAAGTCTAAG-3'), 分别从大岛和一叶花芽总 RNA 逆转录产物中获取基因的全长。PCR 反应体系、扩增程序和阳性克隆的鉴定参考文献[8], 鉴定后送样测序, 分离出 *PrseAP3* 基因。所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成, DNA 测序由华大基因公司完成。

1.4 蛋白质序列比对与系统发生分析

将 *PrseAP3* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF)编码的氨基酸序列在 EBI 数据库中进行 Blast 分析。用 Clusta1X1.83 软件, 将 *PrseAP3* 基因推导的氨基酸序列同 NCBI 上 *AP3* 同源蛋白序列 MdAP3 (苹果 *Malus × domestica*, BAC11907)、RrAP3 (玫瑰 *Rosa rugosa*, BAB63261)、TrAP3 (太行花 *Taihangia rupestris*, ABB59992)、HmAP3 (八仙花 *Hydrangea macrophylla*, BAG68950)、PtAP3 (毛白杨 *Populus tomentosa*, AAO49713)、AP3 (拟南芥 *Arabidopsis thaliana*, BAA04665)、VvAP3 (葡萄 *Vitis vinifera*, XP_002273223)、TaAP3 (昆栏树 *Trochodendron aralioides*, ABE11601)、EpAP3 (领春木 *Euptelea pleiosperma*, ADC79696)、PaAP3 (二球悬铃木 *Platanus × acerifolia*, ABO93622)、AktAP3 (三叶木通 *Akebia trifoliata*, AAT46097)、DEF (金鱼草 *Antirrhinum majus*, BAI68389) 和 PhDEF (矮牵牛

Petunia × hybrida, AAQ72510) 进行多重比较。在对上述来自不同类群植物的 12 个 *AP3* 同源基因进行系统发生分析时, 选择拟南芥的 AP1 (APETA-LA1, NP_177074)、PI (PISTILLATA, NP_197524)、AG (AGAMOUS, NP_567569)、AGL1/SHP1 (*SHATTERPROOF1*, NP_191437)、AGL5/SHP2 (*SHATTERPROOF2*, NP_850377)、STK/AGL11 (SEEDSTICK, NP_192734)、SEP1 (SEPAL-LATA, NP_568322)、SEP2 (NP_186880)、SEP3 (NP_850953) 和 SEP4 (NP_849930) 以及日本晚樱的 CLAP1 (ACT67688) 共 11 个 ABCDE 类蛋白作外类群, 用 MEGA4.0 软件, 以连接近邻法 (neighbour joining, NJ) 构建系统进化树^[9]。

1.5 半定量 RT-PCR 与组织表达特异性分析

用半定量 RT-PCR 技术检测 *PrseAP3* 基因在供试的 2 个日本晚樱品种共 4 轮花器官中表达的组织特性。根据日本晚樱 *PrseAP3* 基因的序列分别设计上下游引物 RTAP3F (5'-ATGGGTCGTGGGAAGATTG-3') 和 RTAP3R (5'-TATCAATAGCAGCGTCAGTCAAG-3'), 并在进行 RT-PCR 之前, 检测引物的特异性; 以日本晚樱 *actin* 基因作内参, 内参引物和 RT-PCR 方法参考文献[8]进行。

2 结果与分析

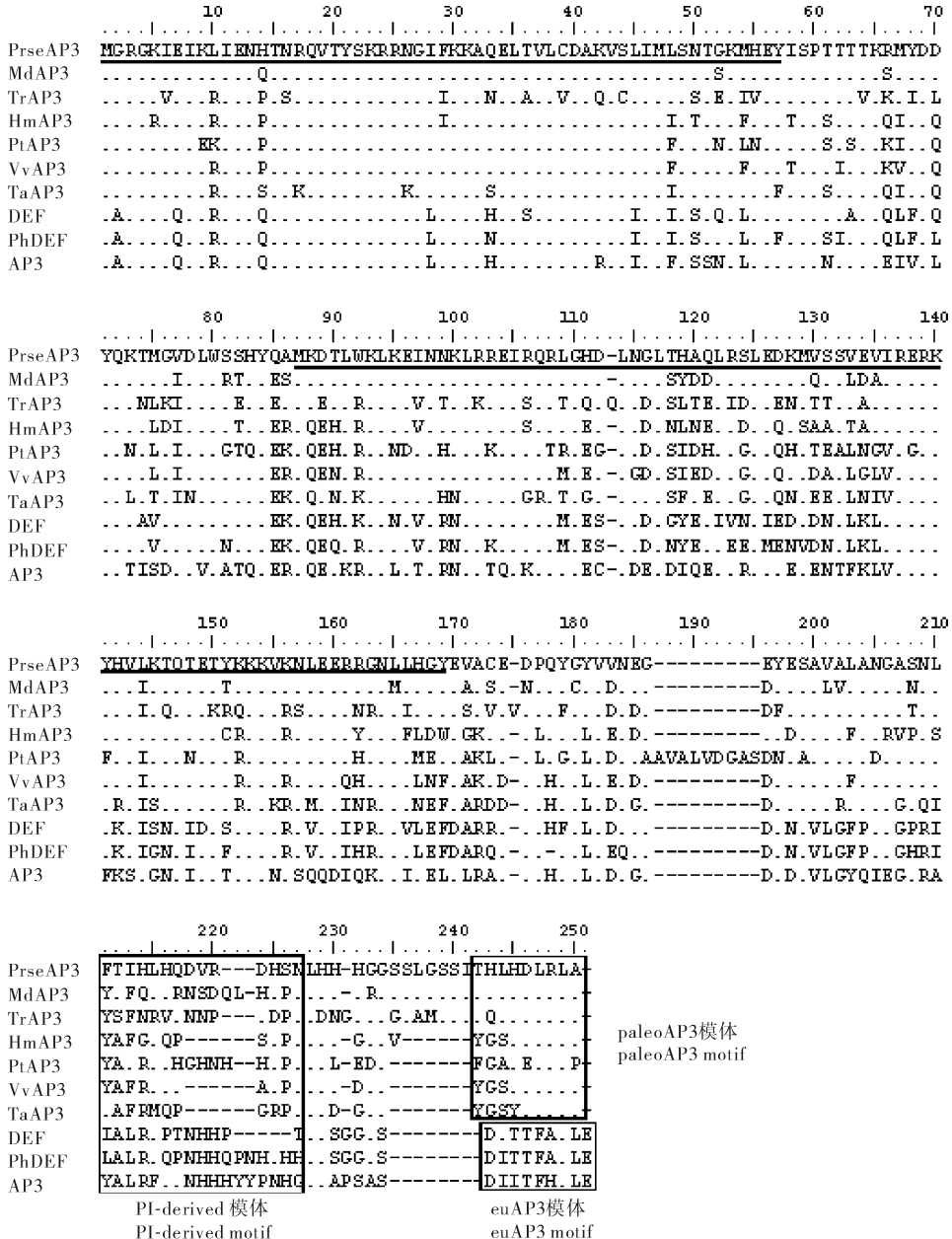
2.1 *PrseAP3* 基因全长 cDNA 序列的克隆

同源克隆结合 RACE 技术, 分别从大岛和一叶中克隆得到了完整的 *PrseAP3* 基因全长 cDNA。

结果表明, *PrseAP3* 基因序列结构在 2 个品种中完全一致, 其 cDNA 序列全长 977 bp, 包括 269 bp 的 3' 非翻译区和 708 bp 的完整 ORF, 编码 235 个氨基酸和 1 个终止密码子。根据 NCBI 网站的 Blast 分析, 它与 MADS-box 基因家族中 *paleoAP3* 进化系基因的同源性最高, 命名为 *PrseAP3*, GenBank 登录号为 JF710371。

2.2 蛋白质序列比对与分子系统发生分析

蛋白质序列同源比对结果(图 2)显示: *PrseAP3* 拥有 1 个高度保守的 MADS 结构域(MADS domain)、1 个次级保守的 K 结构域、1 个保守性相对较低的 I 区和 1 个变异较大的 C 末端结构域。其中, M 区(1~57)含 57 个氨基酸, I 区(58~86)有 29 个氨基酸, K 区(87~168)含 82 个氨基酸, C 结构



第 1 个和第 2 个画线的部分分别代表 MADS-box 区和 K 区; 其他物种同源蛋白氨基酸残基与 *PrseAP3* 相同的部分用圆点表示 PI-derived motif, a paleoAP3-motif and euAP3-motif of AP3-like sequences are boxed. The first and second underlined regions represent the MADS domain and K domain, respectively. Amino acid residues identical to *PrseAP3* are indicated as dots.

图 2 *PrseAP3* 基因所编码氨基酸结构域 Blast 分析及 PI-derived 模体、paleoAP3 和 euAP3 模体

Fig. 2 Alignment of the domain of the predicted amino acid sequence of *PrseAP3* with the most similar sequences identified in Blast

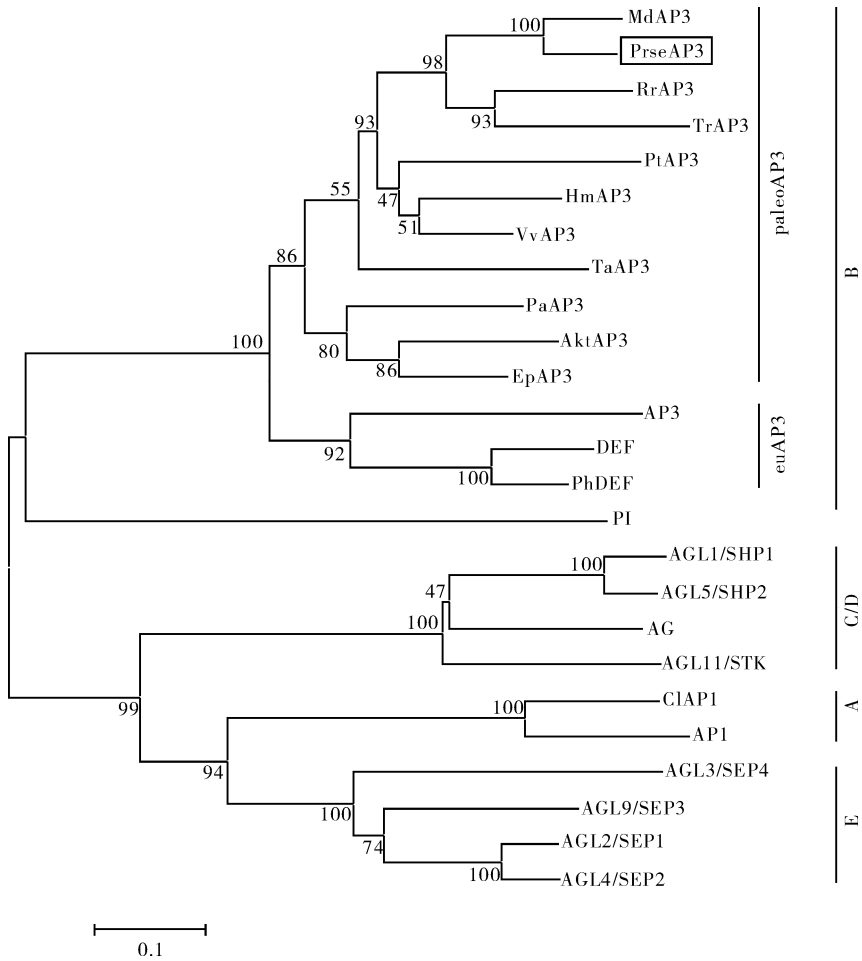


图 3 *PrseAP3* 蛋白与其他 AP3 同源蛋白的分子系统发生分析

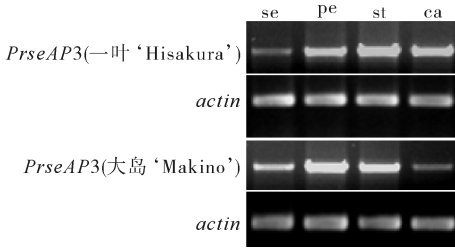
Fig. 3 Phylogenetic analysis of *PrseAP3* with other AP3-like MADS-box proteins

域(169~235)含 67 个氨基酸。在 K 结构域,这 2 个基因产物都包括 3 个保守的区域 K1(87~108)、K2(121~135)和 K3(143~168),并且这 3 个保守的区域含有许多疏水氨基酸位点^[10]。另外 *PrseAP3* 的 C 末端结构域拥有保守的 PI-derived 模体和 paleo-AP3 模体,属 B 类转录因子中 paleoAP3 进化系,与拟南芥 AP3 蛋白所属的 euAP3 进化系不同,并与其他 ACDE 类基因区分开来(图 2、3)。分子系统发生分析表明,日本晚樱 *PrseAP3* 和苹果的 *MdAP3* 聚于进化树的一个分支,亲缘关系最近,与太行花、玫瑰的亲缘关系次之,但是蔷薇科植物共同聚于一个大的分支,与其他科中物种区分开来,与传统分类学所得的结果基本一致(图 3)。

2.3 半定量 RT-PCR 与组织表达特异性分析

半定量 RT-PCR 技术检测 *PrseAP3* 在日本晚樱单重瓣品种 4 轮花器官中表达的组织特异性结果

(图 4、5)显示, *PrseAP3* 主要在单瓣日本晚樱品种大岛的萼片、花瓣和雄蕊中表达,且在花瓣和雄蕊中的表达量极显著高于萼片($P < 0.01$),但花瓣和雄蕊中的表达量无显著差异($P > 0.05$),在心皮中仅能检测到微弱的转录信号。 *PrseAP3* 主要在重瓣日本晚樱品种一叶的花瓣、雄蕊和叶化的心皮中表达,且在这 3 轮花器官中的表达量无显著差异($P > 0.05$),在萼片中仅能检测到微弱的转录信号,但极显著低于内 3 轮花器官($P < 0.01$),其在重瓣品种中表达的组织特异性与单瓣品种明显不同。进一步对 *PrseAP3* 在单瓣和重瓣品种同轮花器官中的表达量进行方差分析,结果显示,其在 2 个品种萼片、花瓣和雄蕊等 3 种器官中的表达量无显著差异($P > 0.05$),但在重瓣品种一叶叶化雌蕊中的表达量极显著高于单瓣品种大岛正常雌蕊中的表达量($P < 0.01$)。



Se: 萼片 Sepal; pe: 花瓣 Petal; st: 雄蕊 Stamen; ca: 心皮 Carpel.

图 4 *PrseAP3* 基因在 2 个品种 4 轮花器官中表达的半定量 RT-PCR 分析

Fig. 4 Expression analysis of *PrseAP3* in sepal, petal, stamen and carpel of two *P. lannesiana* cultivars by semiquantitative RT-PCR with *actin* as control

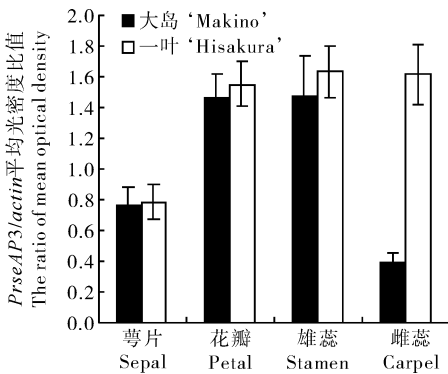


图 5 *PrseAP3* 基因在 2 个品种 4 轮花器官中的表达比较
Fig. 5 Expression difference of *PrseAP3* in sepal, petal, stamen and carpel of 'Makino' and 'Hisakura' by semiquantitative RT-PCR with *actin* as control

3 讨论

测序结果表明,从单瓣大岛和重瓣一叶中分离到的 *PrseAP3* 基因核苷酸序列完全一致。蛋白质序列同源比对分析(图 2)表明, *PrseAP3* 的 C 末端结构域拥有保守的 PI-derived 模体和 paleoAP3 模体,分子系统发生和进化树重建(图 3)进一步证实其属 B 类转录因子中 paleoAP3 进化系,是拟南芥 AP3 的同源蛋白;但拟南芥的 AP3 属 euAP3 型蛋白, *PrseAP3* 属于 paleoAP3 型蛋白。功能分析表明, MADS-box 转录因子 C 末端结构域在转录激活、蛋白四聚体形成以及蛋白功能特化方面有着非常重要的作用^[11],因此,日本晚樱 *PrseAP3* 基因的表达模式和功能可能与拟南芥的 AP3 呈现差别。半定量 RT-PCR 分析表明, *PrseAP3* 主要在单瓣日本晚樱品种大岛的萼片、花瓣与雄蕊中表达,且在花

瓣和雄蕊中的表达量极显著高于萼片($P < 0.01$);在重瓣品种一叶中,其转录活性主要局限在花瓣、雄蕊和叶化的雌蕊中,并且在一叶叶化雌蕊中的表达量极显著高于单瓣品种大岛正常雌蕊中的表达量($P < 0.01$)。重瓣品种一叶心皮叶化(图 1),雌蕊通过同源异型转变成类似萼片的结构^[12]; *PrseAP3* 在重瓣品种雌蕊轮的表达量显著升高可能与其参与这种萼片化结构的发育相关,进而造成日本晚樱单重瓣花雌蕊轮的形态差异。

从基因表达的组织特异性看, *PrseAP3* 主要在日本晚樱花瓣和雄蕊轮表达,在萼片和雌蕊轮也能检测到转录信号,其表达组织特异性与 E 类基因相似,但蛋白序列比对和分子系统发生分析又将其与 E 类基因区分开来(图 3)。其他植物 paleoAP3 型基因的表达也呈现类似的结果,在兰科 (Orchidaceae) 植物文心兰属 (*Oncidium*) 植物中,其 paleoAP3 型基因 OMADS3 在 4 轮花器官中都有表达^[4];进一步研究发现,其他兰科植物 paleoAP3 型基因的表达调控也类似^[6]。在睡莲科 (Nymphaeaceae) 植物圆叶萍蓬草 (*Nuphar advena*) 中,其 paleoAP3 型基因 *Nu. ad. AP3.1* 在 4 轮花器官中表达量均很高;而在佛罗里达八角茴香 (*Illicium floridanum*) 和荷花玉兰 (*Magnolia grandiflora*) 中,其 paleoAP3 型基因主要在萼片、花瓣和雄蕊中表达,在雌蕊轮不表达^[13]。在基部真双子叶植物三叶木通 (*Akebia trifoliata*) 中,其 paleoAP3 型基因 *AktAP3_3* 在每轮花器官均有表达^[14]。可见 paleoAP3 型基因的表达模式在不同植物花发育调控中呈现差异,这种差异是基因功能进化和分化的结果,并参与植物花器官形态多样化的进化^[5,15]。在日本晚樱近缘种蔷薇科李亚科植物中,有关 AP3 同源基因调控花发育的相关研究也未见报道,日本晚樱 paleoAP3 型基因 *PrseAP3* 参与花发育调控的生理活性和功能,仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] DUBOIS A, RAYMOND O, MAENE M, et al. Tinkering with the C-function: a molecular frame for the selection of double flowers in cultivated roses [J]. PLoS ONE, 2010, 5(2): e9288.
- [2] ZAHN L M, FENG B M, MA H. Beyond the ABC-model: regulation of floral homeotic genes [J]. Adv Bot Res, 2006, 44 (6): 164-196.
- [3] SOLTIS P S, SOLTIS D E, KIM S, et al. Expression of floral regulators in basal angiosperms and the origin and evolution of

- ABC-function[J]. *Adv Bot Res*,2006,44:323-347.
- [4] CHANG Y Y, KAO N H, LI J Y, et al. Characterization of the possible roles for b class MADS box genes in regulation of perianth formation in orchid [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152: 837-853.
- [5] MONDRAGON-PALOMINO M, THEIBEN G. Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes [J]. *Ann Bot*, 2009, 104(3): 583-594.
- [6] MONDRAGON-PALOMINO M, THEIBEN G. Conserved differential expression of paralogous DEFICIENS- and GLOBOSA-like MADS-box genes in the flowers of Orchidaceae: refining the 'orchid code'[J]. *Plant J*, 2011, 66(6):1008-1019.
- [7] BROHOLM S K, POLLANEN E, RUOKOLAINEN S, et al. Functional characterization of B class MADS-box transcription factors in *Gerbera hybrida* [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61:75-85.
- [8] 刘志雄,王莹,吕小蒙,等.日本晚樱花器官特征基因 *ClAP1* 的克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 2010, 37(4):649-654.
- [9] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [10] YANG Y, FANNING L, JACK T. The K domain mediates heterodimerization of the *Arabidopsis* floral organ identity proteins, *APETALA3* and *PISTILLATA*[J]. *Plant J*, 2003, 33: 47-59.
- [11] LIU C J, ZHANG J, ZHANG N, et al. Interactions among proteins of floral MADS-Box genes in basal eudicots: implications for evolution of the regulatory network for flower development [J]. *Mol Biol Evol*, 2010, 27(7): 1598-1611.
- [12] 刘志雄,马小婷,程朋军,等.单瓣与重瓣樱花雌雄蕊发育的比较研究[J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(4): 86-91.
- [13] KIM S, KOH J, YOO M J, et al. Expression of floral MADS-box genes in basal angiosperms: implications on evolution of floral regulators and the perianth[J]. *Plant J*, 2005, 43(5): 724-744.
- [14] SHAN H, SU K, LU W, et al. Conservation and divergence of candidate class B genes in *Akebia trifoliata* (Lardizabalaceae) [J]. *Dev Genes Evol*, 2006, 216(12): 785-795.
- [15] ENDRESS P K. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms [J]. *Am J Bot*, 2011, 98(3): 370-396.

Cloning and expressing analysis of a floral homeotic gene *PrseAP3* from *Prunus lannesiana*

LIU Zhi-xiong YU Xian-ni

College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025, China

Abstract To find genes involved in the floral organogenesis of *Prunus lannesiana*, cDNAs for one MADS-box genes, *PrseAP3* with GenBank accession No. JF710371, was cloned using homologous cloning and 3'-RACE method based on the sequence database of NCBI. The full length of *PrseAP3* cDNA is 977 bp, containing an open reading frame (ORF) of 708 bp and coding for a polypeptide of 235 amino acid residues. Sequence comparison and phylogenetic analysis revealed that *PrseAP3* was highly homologous to protein AP3 in *Arabidopsis* and belonged to the paleoAP3 clade of class B. However, semiquantitative RT-PCR analysis showed that *PrseAP3* was strongly expressed in petal and stamen of single-flowered *P. lannesiana* cultivar 'Makino', and in petal, stamen and leaf-like carpel of double-flowered cultivar 'Hisakura', obviously different from the expression pattern of AP3 in *Arabidopsis*.

Key words *Prunus lannesiana*; flower development; floral homeotic gene; *APETALA3*; homologous cloning; 3'-RACE method; semiquantitative RT-PCR

(责任编辑:张志钰)