

王 婧. 荷花 *MADS-box* 基因的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 39–42.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.011

# 荷花 *MADS-box* 基因的克隆及表达分析

王 婧

(吉林省经济管理干部学院, 吉林长春 130012)

**摘要:**采用 RT-PCR 方法从微山红莲花苞中克隆获得 1 个与花发育相关的 *MADS-box* 基因, 命名为 *NeMADS1*。该基因全长 729 bp, 包含 1 个 720 bp 的开放阅读框, 编码 239 个氨基酸, 具有典型的 *MADS* 结构域和 *K* 结构域。序列比对和系统进化分析结果表明, *NeMADS1* 与 *E* 类家族 *AGL9/SEP-like3* 基因亲缘关系较近。RT-PCR 分析结果表明, *NeMADS1* 基因在花瓣、雄蕊和心皮中表达。

**关键词:**荷花; 花发育; *MADS-box*; 基因表达; RT-PCR

**中图分类号:** S682.320.1; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0039-04

花发育的分子机理一直是植物分子生物学的研究热点, *MADS-box* 基因家族作为转录因子, 在花发育过程中起重要作用。*MADS-box* 基因不仅参与花发育的调控, 还在开花时间的控制、决定分生组织的分化<sup>[1]</sup>、促进根的形成<sup>[2]</sup>, 以及种子和果实发育<sup>[3-4]</sup>等方面都起着重要的作用。

前人在对双子叶模式植物遗传突变体的研究中, 提出了花器官发育 ABCDE 模型<sup>[5-10]</sup>。典型双子叶植物的花大多具有由外到内 4 轮结构: 萼片、花瓣、雄蕊和心皮。模型认为控制花器官发育的基因按功能可以分成 5 类 (*A~E* 类功能基因), 这些基因单独或共同作用控制各轮花器官的发育<sup>[9]</sup>。随着对拟南芥、矮牵牛、金鱼草等模式植物的研究, 已经克隆到很多 *MADS-box* 基因, 仅拟南芥中就有 100 多种 *MADS-box* 基因<sup>[11]</sup>。

*SEP(SEPALLATA)* 基因属于 *MADS-box E* 类基因<sup>[9]</sup>, 是花器官发育所必需的。拟南芥中有 4 个 *SEP* 基因: *SEP1*、*SEP2*、*SEP3*、*SEP4* (又称 *AGL2*、*AGLA*、*AGL9*、*AGL3*)<sup>[12-15]</sup>, *SEP1*、*SEP2*、*SEP4* 基因在拟南芥花发育的早期花分生组织中起始表达; 而 *SEP3* 主要在内 3 轮花器官原基中表达。随着花原基的进一步发育, *SEP1* 和 *SEP2* 在 4 轮花器官中均有表达<sup>[14]</sup>, 而 *SEP3* 仅在花瓣、雄蕊和雌蕊中表达<sup>[8]</sup>, *SEP4* 主要在萼片中表达<sup>[16]</sup>。目前为止, 研究人员已从桃<sup>[17]</sup>、苹果<sup>[18]</sup>、草莓<sup>[19]</sup>、春兰<sup>[20]</sup>、文心兰<sup>[21]</sup>等多种植物中分离克隆了 *SEP-like* 同源基因, 并且对其表达模型及功能开展了相关研究。

荷花 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.), 别称莲花, 是中国十大传统名花之一, 具有很高的观赏价值。目前, 有关荷花花器官发育 *MADS-box* 基因的研究报道较少, 更未见 *AGL9/SEP-like* 基因的研究报道。本研究以微山红莲的花苞为试验材料, 采用 RT-PCR 技术克隆获得 1 个荷花花器官发育 *MADS-box* 家族 *E* 类相关基因 *NeMADS1* 的全长序列, 并分析其表达模式, 为莲科植物进化研究提供依据, 同时为研究植

物花发育模式以及荷花花器官发育的分子机理奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

以吉林省经济管理干部学院基地的微山红莲为试验材料, 于 2015 年 8 月取雌蕊分化后期花苞进行基因克隆。取盛花期花朵的萼片、花瓣、雄蕊、心皮进行 RT-PCR 表达分析。所有材料采集后均立即用液氮处理, 于 -80 ℃ 保存备用。

### 1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

以雌蕊分化后期花苞为材料, 采用十六烷基三甲基溴化铵法 (CTAB 法) 提取其总 RNA, 用反转录试剂盒 (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen) 合成 cDNA, 按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.3 基因克隆与序列分析

查找 NCBI 中 EST 序列信息及相关资料设计引物扩增基因全长, 引物序列 *NeS1-F*: 5'-CTGAAATGGGAGAGG-TAGGGT-3'、*NeS1-R*: 5'-CTGATCATGCCAGCCACCCAGGC-3', 以荷花花苞的 cDNA 为模板进行基因全长 PCR 扩增。反应体系为 25 μL, 反应程序为 94 ℃ 10 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 50 s, 35 个循环; 72 ℃ 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的片段, 连接到 pMD-19T (TAKARA) 载体上, 转化 DH5α 菌株, 进行克隆、测序。引物合成和测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行。

采用 DNAMAN 软件进行序列拼接和分析, 获得的序列在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站上进行 Blast 比对, 用 MEGA 5.0 和 ClustalX 软件构建系统进化树。

### 1.4 RT-PCR 表达分析

提取盛花期花萼、花瓣、雄蕊和心皮的总 RNA 并反转录成 cDNA, 进行 RT-PCR 表达分析。设计引物 *NeS1-F2*: 5'-AACAGGGCATTGAAACGG-3', *NeS1-R2*: 5'-AGC-CACCCAGGCATATAAC-3', 定量 PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq™ II kit (TAKARA)。反应体系为: 10 μL SYBR Premix Ex Taq™ II (2 ×) mix, 0.8 μL forward primer, 0.8 μL reverse primer, 2 μL cDNA, 0.4 μL Rox Reference Dye or Dye (50 ×),

收稿日期: 2015-11-26

作者简介: 王 婧 (1981—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士, 讲师, 主要从事园林植物栽植及分子育种方面研究。E-mail: 47292634@qq.com。

6.0 μL H<sub>2</sub>O。反应条件为:95 ℃ 5 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。以 *Actin* 为内参 (*Actin* - F: 5' - TGCCTATGTG-GCTCTTGACTAT - 3', *Actin* - R: 5' - GATGGCTGGAAT-AGAACCTCA - 3') 在 Roche Light Cycler 2.0 荧光定量 PCR 仪上反应,3 次重复,采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 基因克隆与序列分析

以雌蕊分化后期的花苞总 RNA 反转录获得的 cDNA 为

```
1      CTGAAATGGGGAGAGGTAGGGTTGAGCTGAAGAGGATCGAGAACAAGATCAATCGGC
      E M G R G R V E L K R I E N K I N R Q
58     AGGTCACCTTTGCAAAACGAAGAAATGGTCTTTTGAAGAAAGCTTACGAGCTTTCCG
      V T F A K R R N G L L K K A Y E L S V
115    TTCTTTGTGATGCTGAGGTTGCTCTGATAATCTTCTCCAATAGAGGAAAGTTGTACG
      L C D A E V A L I I F S N R G K L Y E
172    AGTTCTGCAGCAGTTTCGAGCATGATCAAGACGCTCGAAAGGTATCAAAAATGCAACT
      F C S S S S M I K T L E R Y Q K C N Y
229    ATGGAGCACCAGAGACAACATATATCCACAAGGGAGTCAGAGGAGCTGAGTTGTCAGC
      G A P E T T I S T R E S E E L S C Q Q
286    AGGAATATCTGAAACTAAAAGCAGAGTTGAGGCGGTACAGAGGATCAGAGGAATC
      E Y L K L K A R V E A L Q R S Q R N L
343    TCTTGGGAGAGACCTGGGCCCACTAAGTGGCAAGGAGCTTGAGTCACTGGAGAGGC
      L G E D L G P L S G K E L E S L E R Q
400    AGCTGATATGTCGTTGAAGCAGATCAGATCAACACGGACCCAATACATGCTTGATC
      L D M S L K Q I R S T R T Q Y M L N D Q
457    AGCTTGCAGATCTTCAAAGAAGGGAGCAAATGCTTAGCGAAGCTAACAGGGCATTGA
      L A D L Q R R E Q M L S E A N R A L K
514    AACGGCGGTTTGAAGAAGGAAGTCAGGCAATGCACATCAGTGGGACCCCAATGTGC
      R R F E E G S Q A N A H Q W D P L N V H
571    ATGGTTATGGACGGCATCCAGCCCAAACACAAGGCGAAGGTTTCTTTCATCCTGTAG
      G Y G R H P A Q T Q G E G F F H P V E
628    AGTGTGAGCCACGCTACAAATTGGGTACAGCCTGATCAAATAACGGTTGCAGCAC
      C E P T L Q I G Y Q P D Q I T V A A P
685    CAGGCCAAGTGTAGTTATATGCCTGGGTGGCTGGCATGATCAG
      G P S V S Y M P G W L A * S
```

实线部分为MADS盒;双线部分为K盒

图1 *NeMADS1* 基因序列及推测的氨基酸序列

2.2 *NeMADS1* 氨基酸同源性比较

利用 NCBI 的 BlastX 工具将 *NeMADS1* 基因核酸序列翻译成氨基酸序列并进行同源性比对,结果表明:*NeMADS1* 与 ABCDE 模型中的 E 类蛋白有较高的同源性,其中与 EpSEP3、PaAGL9、EcAGL9 和 PtSEP3 的同源性分别是 87%、84%、84%、83%。对 *NeMADS1* 基因氨基酸序列的多序列比对结果表明:*SEP-like* 基因编码氨基酸序列含有高度保守的 5'端 MADS 结构域和半保守的 K 结构域,在差别较大 3'端 C-末端中发现了 *SEP-like* 蛋白特有的 SEP I 和 SEP II 基序结构域(图 2)。

2.3 系统进化树分析

系统进化关系分析结果表明, *NeMADS1* 编码蛋白与 ABCDE 模型中的 *AGL9/SEP-like3* (E 类) 基因编码蛋白同源性较高,与领春木 (*Euptelea pleiosperma*) 的 *EpSEP3* 关系最近,说明 *NeMADS1* 应属于 E 类 *MADS-box* 基因(图 3)。

A 类和 E 类基因在进化上属于 *API/AGL9* 组,该组有 3 个进化系:*AGL9 (SEP)*、*API* 和介于二者之间的 *AGL6* 进化系<sup>[21-22]</sup>。为了确定 *NeMADS1* 的归类及进化关系,选取 *API/AGL9* 组 *MADS-box* 基因的氨基酸序列进行聚类分析。结果显示,*API/AGL9* 组氨基酸序列明显分为 3 类:*SEP*、*API* 和

模板进行 PCR 扩增,分离出长度为 729 bp 的片段,NCBI 上进行 Blast 比对分析,结果表明该片段与多种植物的 *MADS-box* 基因有较高同源性,证明该片段为所需目的片段。通过 DNAMAN 软件的序列拼接和分析,获得基因全长为 720 bp,编码 239 个氨基酸(图 1),命名为 *NeMADS1*。

蛋白结构域分析结果表明,该蛋白是植物特有的 MIKC 型 *MADS-box* 基因,包含典型的 MADS 盒(实线部分)和 K 盒(双线部分)。Blast 同源序列分析该基因与其他植物 *AGL9/SEP-like3* 基因具有较高的同源性。

*AGL6*,其中 *AGL6* 与 *SEP* 分枝为姊妹关系,所有 *AGL9*、*SEP3* 聚在一起,然后又与 *SEPI/2/4* 聚在了一个大枝上(图 3)。

2.4 RT-PCR 表达分析

RT-PCR 分析结果表明, *NeMADS1* 基因在花瓣、雄蕊和心皮中表达量较高,尤其在花瓣中表达量最高,在花萼中表达量最低。*NeMADS1* 基因的表达模式与拟南芥 *SEP3* 基因在各组织的表达模式一致,进一步说明 *NeMADS1* 属于 E 类基因(图 4)。

3 讨论与结论

本试验采用 RT-PCR 技术克隆了与花发育相关的 *NeMADS1* 基因。同源性分析结果表明, *NeMADS1* 基因与其他植物的 *AGL9/SEP-like3* 基因具有较高的同源性,其蛋白质包含 MADS 区、K 区、I 区和 C-末端等 4 个区域,属于植物典型的 MIKC 类 *MADS-box* 基因。*MADS-box* 蛋白的 C-末端被认为与转录激活、高阶蛋白质复合体的形成、DNA 特异性识别、亚细胞定位等有关<sup>[23]</sup>。*SEP* 亚家族大部分成员的 C 端具有 2 个短的、相对保守的基序(SEP I 和 SEP II 基序)<sup>[15]</sup>。*NeMADS1* 基因具有保守的 SEP I 和 SEP II 基序,是典型的 *SEP-like* 基因。

通过对 *SEP-like* 基因的系统发育分析,发现 *SEP* 亚家

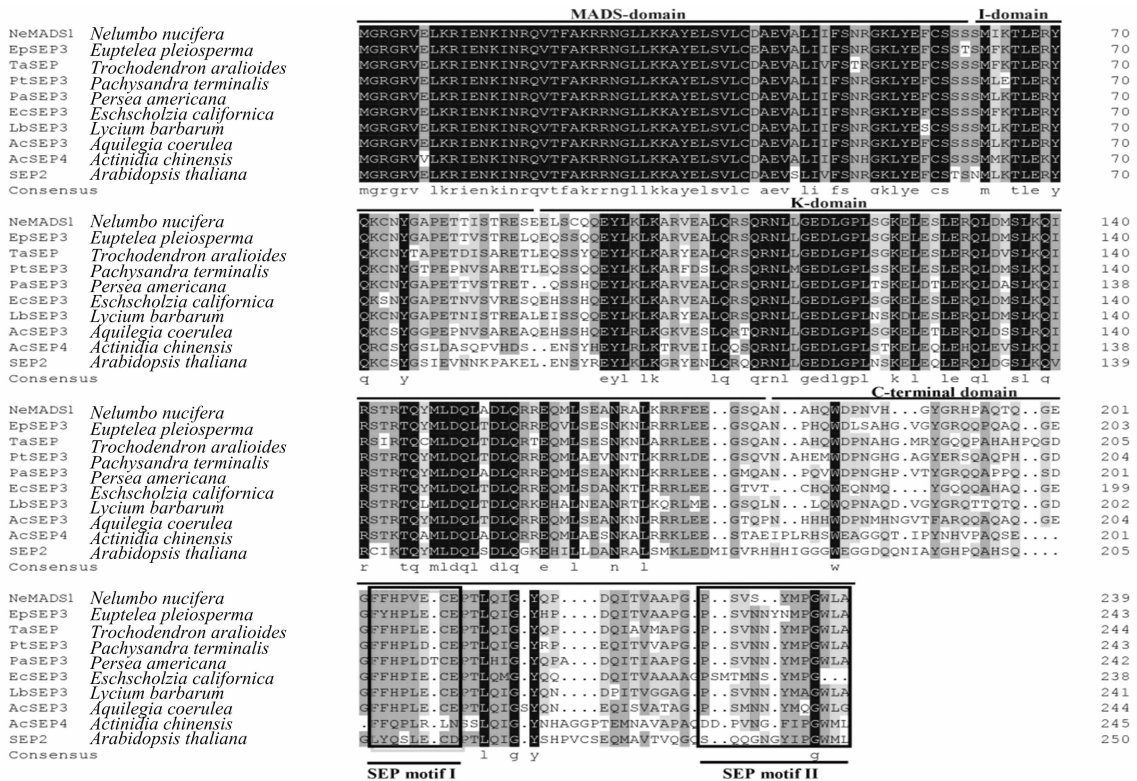


图2 NeMADS1 蛋白与其他植物 SEP-like 蛋白的序列比对

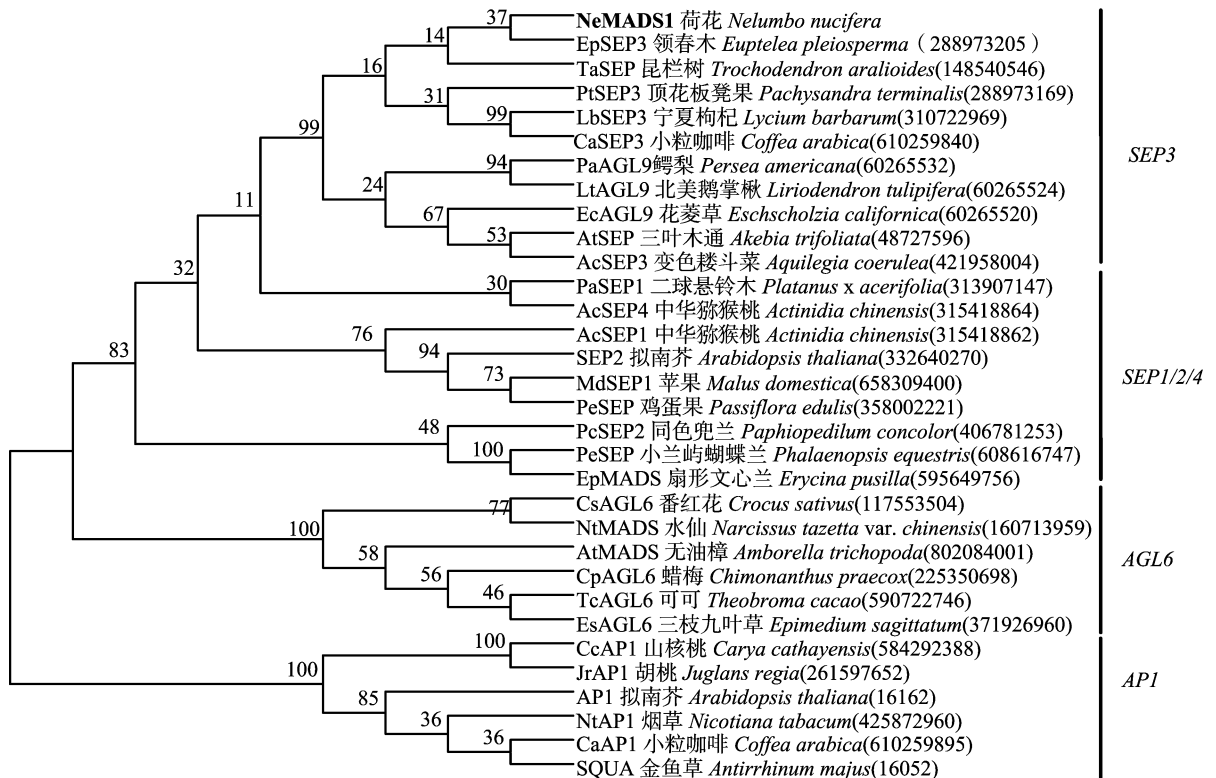


图3 NeMADS1 蛋白的系统进化树

族发生过多次基因重复事件,其中在被子植物起源之前发生了1次基因重复事件,产生了 *SEP3* 进化系和 *SEP1/2/4* 进化系<sup>[15]</sup>。本研究对 *NeMADS1* 基因系统进化树分析表明,所有的 *AGL9/SEP-like3* 聚在了一起,其中与领春木、昆栏树 (*Tro-*

*chodendron aralioides*) 的关系较近, 而三者均属于基部双子叶植物, 这个结果与 APG III 分类系统一致, 说明 *AGL9/SEP-like3* 基因在进化上相对保守, 同时也为莲科在系统进化中所属的位置提供了证据。

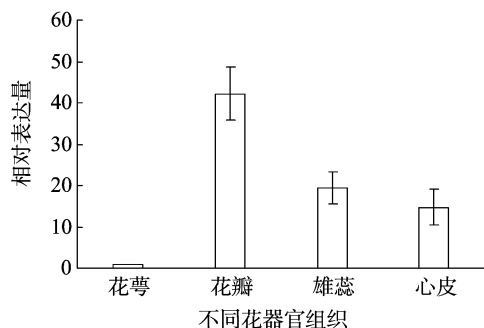


图4 *NeMADS1* 基因在不同花器官中的表达

荷花 *SEP-like* 基因 *NeMADS1* 在花瓣、雄蕊和心皮中表达,这与拟南芥 *SEP3* 基因、加州罂粟 (*Eschscholzia californica*) *EScaAGL9* 基因在表达模式上一致<sup>[15]</sup>,而与草原龙胆 (*Eustoma grandiflorum*) *EgSEP3-1* 基因的表达模式有所差异<sup>[24]</sup>。*SEP* 作为花器官同源异型基因 *ABCD* 的共因子 (co-factor) 在各轮花器官决定中发挥作用<sup>[8]</sup>。事实上,各进化系的表达模式是存在差异的<sup>[25]</sup>,虽然 E 类基因的表达模式在被子植物不同的物种中有差异,但该基因对所有花器官的发育都是必需的,其功能是保守的。

本试验中分离出 1 个 *MADS-box* 基因家族 E 类基因,并对其功能进行了初步分析,有关其时空表达模式和深入功能分析工作也正在进行中,以期阐明荷花花器官发育的分子调控机理奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Weigel D, Nilsson O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants [J]. *Nature*, 1995, 377 (6549): 495–500.
- [2] Alvarezbuylia E R, Liljegen S J, Pelaz S, et al. *MADS-box* gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2000, 24 (4): 457–66.
- [3] Buchner P, Boutin J – P. A *MADS box* transcription factor of the *API/AGL9* subfamily is also expressed in the seed coat of pea (*Pisum sativum*) during development [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38 (6): 1253–1255.
- [4] Gu Q, Ferrándiz C, Yanofsky M F, et al. The *FRUITFULL MADS-box* gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development [J]. *Development*, 1998, 125 (8): 1509–1517.
- [5] Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development [J]. *Nature*, 1991, 353 (6339): 31–37.
- [6] Honma T, Goto K. Complexes of *MADS-box* proteins are sufficient to convert leaves into floral organs [J]. *Nature*, 2001, 409 (6819): 525–529.
- [7] Jack T. Molecular and genetic mechanisms of floral control [J]. *The Plant Cell Online*, 2004, 16 (S1): S1–S17.
- [8] Pelaz S, Ditta G S, Baumann E, et al. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA MADS-box* genes [J]. *Nature*, 2000, 405 (6783): 200–203.
- [9] Theissen G, Saedler H. Plant biology: floral quartets [J]. *Nature*,

2001, 409 (6819): 469–471.

- [10] Colombo L, Franken J, Koetje E, et al. The petunia *MADS box* gene *FBP11* determines ovule identity [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7 (11): 1859–1868.
- [11] 郭爽, 马宁, 杨文才, 等. 辣椒花器官发育 *MADS-box* 基因的克隆与表达分析 [J]. *园艺学报*, 2010, 37 (10): 1591–1597.
- [12] Huang H, Tudor M, Weiss C A, et al. The *Arabidopsis MADS-box* gene *AGL3* is widely expressed and encodes a sequence-specific DNA-binding protein [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28 (3): 549–567.
- [13] Ma H, Yanofsky M F, Meyerowitz E M. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes [J]. *Genes & Development*, 1991, 5 (3): 484–495.
- [14] Mandel M, Yanofsky M F. The *Arabidopsis AGL9 MADS box* gene is expressed in young flower primordia [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1998, 11 (1): 22–28.
- [15] Zahn L M, Kong H, Leebens-Mack J H, et al. The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of *MADS-Box* genes: a preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history [J]. *Genetics*, 2005, 169 (4): 2209–2223.
- [16] Ditta G, Pinyopich A, Robles P, et al. The *SEP4* gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity [J]. *Current Biology*, 2004, 14 (21): 1935–1940.
- [17] Tani E, Polidoros A N, Flemetakis E, et al. Characterization and expression analysis of *AGAMOUS-like*, *SEEDSTICK-like*, and *SEPALLATA-like MADS-box* genes in peach (*Prunus persica*) fruit [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, 47 (8): 690–700.
- [18] Ireland H S, Yao J L, Tomes S, et al. Apple *SEPALLATA1/2-like* genes control fruit flesh development and ripening [J]. *The Plant Journal*, 2013, 73 (6): 1044–1056.
- [19] Seymour G B, Ryder C D, Cevik V, et al. A *SEPALLATA* gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62 (3): 1179–1188.
- [20] Chunlei J, Lin X, Dehui Q, et al. Cloning and expression analysis of *CgSEP3* gene from *Cymbidium goeringii* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014.
- [21] Chang Y, Chiu Y, Wu J, et al. Four orchid (*Oncidium Gower Ramsey*) *API/AGL9-like MADS box* genes show novel expression patterns and cause different effects on floral transition and formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50 (8): 1425–1438.
- [22] Purugganan M D, Rounsley S D, Schmidt R J, et al. Molecular evolution of flower development: diversification of the plant *MADS-box* regulatory gene family [J]. *Genetics*, 1995, 140 (1): 345–356.
- [23] Vandenbussche M, Theissen G, Van de Peer Y, et al. Structural diversification and neo-functionalization during floral *MADS-box* gene evolution by C-terminal frameshift mutations [J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31 (15): 4401–4409.
- [24] 徐启江, 关录飞, 吴笑女, 等. 草原龙胆 *MADS-box* 基因的克隆及表达分析 [J]. *植物学报*, 2008, 25 (4): 415–429.
- [25] Malcomber S T, Kellogg E A. *SEPALLATA* gene diversification: brave new whorls [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10 (9): 427–435.