

马广莹, 邹清成, 刘慧春, 等. 红掌 *FLOWERING LOCUS T* 同源基因的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(2): 31–33.

# 红掌 *FLOWERING LOCUS T* 同源基因的克隆及生物信息学分析

马广莹, 邹清成, 刘慧春, 周江华, 朱开元

(浙江省萧山棉麻研究所, 浙江杭州 311202)

**摘要:**通过高通量测序技术获得红掌成花素基因 *FT*, 对其进行序列分析, 通过与已报道同源基因的比较, 预测基因 *FT* 能够显著促进转基因植物开花, 为开展红掌分子育种提供了有益基因资源。

**关键词:**红掌; 克隆; 基因 *FT*; 信息学; 序列分析

**中图分类号:** S682.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2014)02–0031–02

为实现种群繁衍, 植物必须在合适的时间进行生殖生长、开花结果。许多植物调整开花时间的方式是根据环境信号(如日照长短、温度等)来产生应答反应, 植物内源激素和年龄这 2 个内部信号也可以诱导植物开花。近年来, 通过对模式植物拟南芥的分子水平研究, 人们总结出“光周期、春化、自主调控以及赤霉素”4 条控制植物开花的途径<sup>[1–3]</sup>。*FLOWERING LOCUS T* 基因(*FT* 基因)是学术界普遍认可的成花素, 于叶片中合成, 然后通过韧皮部运输到顶端分生组织, *FT* 与 *FD* 基因互作, 诱导下游成花基因的表达, 促进开花<sup>[4–5]</sup>。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中存在 6 类 *FT-like* 基因, 都可能参与了成花诱导, 这些基因有着共同的 PEPB 结构域<sup>[6]</sup>。本研究经转录组测序, 克隆到了 1 个红掌(*Anthurium andraeanum*) *PEPB* 基因, 通过序列对比等生物信息学分析, 确定该基因是 1 种促进开花的功能基因, 这为今后通过转基因手段培育矮化的早花红掌品种、缩短红掌育种年限提供了重要的资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

红掌品种为“阿拉巴马”, 取盛花期植株幼嫩叶片、苞片、花序 3 个组织进行混合, 按照美国 Invitrogen 公司生产的植物 RNA 提取试剂盒(货号: 12322–012)提取总 RNA, 构建 Illumina 文库, 并委托上海美吉生物公司采用 Illumina Hiseq 2000 对文库进行测序。

### 1.2 序列分析软件及分析方法

通过测序获得的基因序列, 经过 NCBI 网站 ORFfinder 软件进行编码区预测, 然后用 <http://prosite.expasy.org/> 网站进行编码区氨基酸序列预测, 并进行序列保守结构域的检索<sup>[7]</sup>, 采用 DNAMAN 软件进行多序列氨基酸比对, 采用 MEGA5 进行多物种 *FT* 基因进化关系分析<sup>[8]</sup>, 建树方法为

Neighbor-joining, bootstrap 1 000 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 红掌 *FT* 基因获得

通过测序, 获得了与水稻 *FT* 基因相似度较高的 1 条 EST 序列, 通过比对分析, 初步确定其为红掌 *FLOWERING LOCUS T* 基因的同源物, 命名为 *AaFT*。如图 1 所示, 该基因编码区核苷酸序列有 525 bp, 其余部分为 UTR 区域。用该区域序列进行氨基酸推测, 得到了 174 个氨基酸残基。

### 2.2 *AaFT* 基因生物信息学分析

通过在线软件分析, 不仅推测出该基因的氨基酸序列, 还找到了该序列中存在 PBP 结构域所在的位置, 该结构域共计 23 个氨基酸残基, 序列为 YTLVMVDPDAPSPDPNLYLH, 起始位置为 64~86 号氨基酸。

为了更好地分析该基因的保守性及与同类基因的相似度, 将其与拟南芥 *FT* 基因(*AtFT*)进行序列比较。由图 2 可见, 拟南芥与红掌 *FT* 基因的序列相似度比较高, 二者在 *FT* 基因关键氨基酸残基上有着相同的组成, 即第 85、140 号氨基酸残基分别为酪氨酸、谷酰胺。

用 MEGA 软件构建了 6 种不同物种 *FT* 基因的进化树。从图 3 可见, 单、双子叶植物 *FT* 基因同源性差异明显, 属于单子叶植物的红掌与水稻(*Oryza sativa*, 登录号: AB052943.1)、蕙兰(*Cymbidium faberi*, 登录号: KC138734.1)、蝴蝶兰(*Phalaenopsis hybrid*, 登录号: KC138805.1)、小麦(*Triticum aestivum*, 登录号: AY705794.1)亲缘关系较近, 聚类时容易聚在一起, 而红掌 *FT* 基因与拟南芥相比, 亲缘关系则明显较远, 这也与二者分属单、双子叶植物类别相对应。

## 3 小结与讨论

*FT* 基因作为成花素, 受到广泛关注, 目前, 已经有非常多植物的 *FT* 基因被成功克隆出来, 在促进植物开花方面表现十分优异<sup>[9]</sup>。红掌作为国内外重要的高档盆栽花卉, 目前育种工作主要集中在常规杂交育种方面, 分子育种刚刚起步, 红掌 *FT* 基因的克隆为通过转基因手段快速培育红掌新品系、缩短杂交育种年限提供了有利条件, 也为微型红掌品种的开发提供了可能。

收稿日期: 2013–06–18

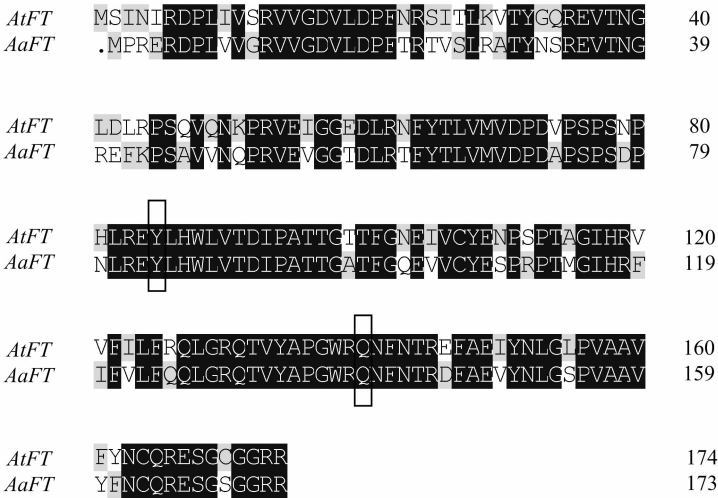
基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31200527); 浙江省自然科学基金(编号: Q13C150011)。

作者简介: 马广莹(1982—), 男, 山东梁山人, 博士, 助理研究员, 从事园林植物引种栽培及遗传育种工作。E-mail: magypetunia@aliyun.com。

TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCATCTGGTCACCTTCCATGTGATTCTTTGGAGTAGTATATCTCAAGATCTCGTCCC  
TTCCAGCTTCCTGCGGCAAAAAATGCCCCGTGAGAGGGACCCCTTGTTGTGGGAAGGGTAGTTGGGGATGTGTGG  
ACCCCTTCACAAGGACTGTGTCACTCAGGGCAACATACAACCTCAGGGAGGTCACCAATGGACGTGAATTCAAACC  
CTCTGCCGTCGTCAACCAGCCCAGGGTTGAGGTTGGAGGCACTGATCTGAGGACCTTCTACACGCTTGTCATGGTAG  
ATCCTGATGCCCCAAGTCCAAGTGACCCAAATCTGAGAGAGTACCTGCACTGGTTGGTCACAGATATACCGCGCAC  
AACTGGTGCAACTTTCGGTCAGGAGGTCGTCTGCTACGAGAGCCCCAGGCCACCATGGGGATCCACCGCTTCATCT  
TCGTCTGTTCAGCAGCTGGGGCGGCAGACCGTCTATGCCCCGGTTGGCGCCAGAACTTCAACACCCGCGACTTC  
GCCGAGGTCTACAACCTCGGGTCGCCGTCGCCGCCGTCTACTTCAACTGCCAGAGGGAGTCCGGCTCCGGCGGCA  
GGAGGATGTAGTTTCGAACCCCATGGTGCAAGTTGTGCCCTTCTCTTATCTCTGCGTTTTTGTCCACTCTTCACC  
GTCAAATGCTTCATATGGGAGCTGGATGTGCTAGGATTTAACTAGAATCAATTTGGCTTGTAAAGGAGGTTGTGATG  
TTTTGGTTCTTATTGCCTTTAACGGATGCAGATTCTTCTGCTTTAAAAATATTCTTGCCAGTGTGTGTGAACCAAATG  
AGCAAGATGATGAGAAGAAAATGTGGGGGTG

划线部分为编码区

图1 红掌 FT 基因核苷酸序列



实线框分别为标记85号和140号氨基酸残基

图2 拟南芥与红掌 FT 氨基酸序列比对

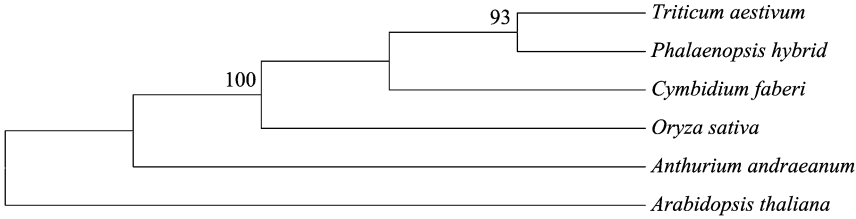


图3 不同物种 FT 基因进化关系

本试验通过高通量测序技术获得了 1 条包含完整编码框的 FT 基因序列,通过比对及生物信息学分析,确定该基因为红掌 FT 同源基因。前人研究证明,FT 基因家族存在着序列高度相似、功能完全相反的成员——TFL<sup>[10-11]</sup>,但是二者在关键氨基酸组成上存在着明显区别,通过比较分析,本研究所克隆的基因序列在 85 号及 140 号氨基酸组成上与拟南芥促进早花的 FT 基因完全一致,结合相似序列,确定该基因是 FT 基因,其功能应该是促进植物开花,而非抑制植物开花。

用红掌 FT 基因与拟南芥比较,虽然二者分属于单、双子叶植物类别,但是两基因在氨基酸组成的高度相似说明了 FT 基因在进化过程中保持着稳定性,这可能是其发挥早花功能的必备条件。与多物种 FT 基因进行聚类分析,发现红掌 FT 基因与其他单子叶植物之间存在着较大遗传距离,说明 FT 基因虽然功能上保持着稳定性,但随着物种的进化而不断发

生变异,深入研究该基因及其家族成员,有利于解析不同物种的进化模式。

参考文献:

[1]Simpson G G, Gendall A R, Dean C. When to switch to flowering [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1999, 15 (1): 519 - 550.

[2]Reeves P H, Coupland G. Response of plant development to environment: control of flowering by daylength and temperature [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2000, 3 (1): 37 - 42.

[3]Simpson G G, Arabidopsis D C. Arabidopsis, the rosetta stone of flowering time [J]. Science, 2002, 296 (5566): 285 - 289.

[4]Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, et al. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex [J]. Science, 2005, 309 (5737): 1052 - 1056.

严敏,刘艳,汤洪敏.艾纳香的组织培养[J].江苏农业科学,2014,42(2):33-35.

# 艾纳香的组织培养

严敏,刘艳,汤洪敏

(贵州民族大学,贵州贵阳 550025)

**摘要:**以贵州药用植物艾纳香的叶片为材料,MS 培养基为基本培养基,探讨影响艾纳香组织培养的因素,为艾纳香的组织培养快速繁殖提供重要的参考依据。结果表明:外植体灭菌组合以 0.1% 氯化汞 8 min + 75% 乙醇 5 s 最佳;诱导愈伤组织培养基以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最佳,诱导率为 88.17%;愈伤组织继代培养基以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最佳;愈伤组织分化为芽的培养基以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最佳,以试管苗(由野外艾纳香培育出的完整幼苗)叶片为外植体诱导愈伤组织,其分化率为 93%;芽继代培养基以 MS + 6-BA 3.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 最佳,平均苗高 4.3 cm;IBA 有利于艾纳香的无根绿苗生根,以 MS + IBA 1.4 mg/L 培养基培养,生根率为 100%。

**关键词:**艾纳香;组织培养;愈伤组织;诱导;MS 培养基

**中图分类号:** Q943.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0033-03

艾纳香(*Blumea balsamifera* DC)为菊科艾纳香属植物,在我国仅分布在贵州、云南、广东、广西等少数湿热地区<sup>[1]</sup>。艾纳香叶提取的挥发油有特殊的清香,具有显著的抗菌、消炎、消肿、止痛、止痒等作用<sup>[2]</sup>。艾纳香油的主要成分为 L-龙脑,主要用途之一是提制冰片(艾片),冰片具通窍、散热、明目、止痛等功能。艾纳香属多年生宿根植物,主要以宿根分株繁殖,分生苗移栽成活率低;艾纳香利用种子育苗,种子结实率低,休眠期长,发芽率低于 5.8%<sup>[3]</sup>。这些情况导致艾纳香种苗短缺,严重制约艾纳香大规模生产,因此必须研究艾纳香的组织培养以快速获得批量种苗,扩大种植规模以满足日益增长的市场要求。国内的报道主要着重在艾纳香药理研究上<sup>[4-5]</sup>,所以对艾纳香进行植物组织培养是一条全面研究艾纳香的重要途径。通过本项目的实施,以期对贵州省艾纳香成功培育试管苗作参考,同时也可对贵州省其他特色药用植物的组织培养快繁提供参考。

收稿日期:2013-07-12

基金项目:贵州省科技厅联合课题(编号:黔科合 J 字 LKM[2011]27、黔科合处 G 字[2011]7034 号)。

作者简介:严敏(1973—),贵州印江人,硕士,高级实验师,研究方向为植物化学。E-mail:577977087@qq.com。

通信作者:汤洪敏。E-mail:thm@gznc.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

来源于贵州省罗甸县,由贵州大学林学院熊中华副教授鉴定。

### 1.2 培养基

MS 培养基;以 MS 培养基为基本培养基,附加激素、白砂糖 30 g/L、琼脂 13 g/L。所有培养基均在 1.1 kg/cm<sup>2</sup>、121 ℃ 的灭菌锅中灭菌 25 min。

### 1.3 试验方法

1.3.1 艾纳香外植体的灭菌处理 将洗净的外植体叶片用氯化汞和乙醇进行不同灭菌剂、不同时间的比较试验及相同灭菌剂不同时间的比较试验,以筛选出外植体灭菌的最佳处理。

#### 1.3.2 艾纳香的接种

1.3.2.1 诱导接种 将已冲洗的外植体放入超净台中,并将其灭菌,然后把叶片剪成大小为 0.6 cm × 0.6 cm 的小块,接入诱导培养基中,每瓶接种 8 块叶片。

1.3.2.2 愈伤组织继代接种 将由外植体诱导出的愈伤组织接种于继代培养基中。

1.3.2.3 愈伤组织分化接种 将愈伤组织接入分化培养基中,分化出芽。

[5] Hanzawa Y, Money T, Bradley D. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102 (21): 7748-7753.

[6] Chardon F, Damerval C. Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals[J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 61 (5): 579-590.

[7] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: W597-W603.

[8] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary dis-

stance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28 (10): 2731-2739.

[9] Kotoda N, Hayashi H, Suzuki M, et al. Molecular characterization of *FLOWERING LOCUS T*-like genes of apple (*Malus domestica* Borkh.)[J]. Plant & Cell Physiology, 2010, 51 (4): 561-575.

[10] Ahn J H, Miller D, Winter V J, et al. A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators *FT* and *TFL1*[J]. Embo Journal, 2006, 25 (3): 605-614.

[11] Mimida N, Goto K, Kobayashi Y, et al. Functional divergence of the *TFL1*-like gene family in Arabidopsis revealed by characterization of a novel homologue[J]. Genes to Cells, 2001, 6 (4): 327-336.