

张志国,丁寒雪,蒋成娣,等. 重瓣萱草 *AGAMOUS* 基因的克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(23):40-48.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.23.006

# 重瓣萱草 *AGAMOUS* 基因的克隆与表达分析

张志国<sup>1,2</sup>, 丁寒雪<sup>1</sup>, 蒋成娣<sup>1</sup>, 张世杰<sup>1</sup>, 王艺程<sup>1</sup>, 秦巧平<sup>1</sup>, 刘翔<sup>1</sup>

(1. 上海应用技术大学生态技术与工程学院, 上海 201400; 2. 金华花卉苗木产业研究院, 浙江金华 321000)

**摘要:** *AGAMOUS* (*AG*) 基因是花发育 ABC 模型中的 C 类基因, 通过对各类观赏植物的重瓣化诱导研究发现, C 类基因突变会诱导产生重瓣花。萱草作为园林景观的应用植物, 其花型补充改造一直是育种研究的重要目标之一。以单瓣萱草品种秋红、重瓣萱草 AH6 为试验材料, 克隆 C 类基因 *AG* 的全长 cDNA, 分别将其命名为 *qhHfAG*、*ahHfAG*, 并进行生物信息学分析, 用 Real-time PCR 分析其表达模式。结果表明, *HfAG* 全长为 624 bp, 编码 207 个氨基酸, 具有典型的植物 MADS-box 基因结构, 但是与其他物种相比缺少 *AG* 基序 II。与单瓣品种相比, 重瓣品种中部分氨基酸位点发生了变化, 这也导致重瓣品种该蛋白的疏水性、不稳定指数和二级结构发生了改变, 推测这可能是导致重瓣表型的原因。Real-time PCR 分析结果表明, 在不同瓣化程度的萱草品种中, *HfAG* 基因在花器官中的相对表达量有差异。研究首次从萱草中克隆出 *AG* 基因并进行分析, 并对单瓣、重瓣萱草基因序列进行比较, 进一步探究 C 类基因在重瓣表型萱草培育中发挥的功能, 为通过基因工程手段开展萱草重瓣育种奠定了基础。

**关键词:** 萱草; *AGAMOUS* 基因; 重瓣花; 基因克隆; 基因表达

**中图分类号:** S682.1<sup>+</sup>90.1      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2022)23-0040-09

花发育的 ABC 模型是一种成花模型, 描述了在花的不同部位, 不同转录因子对花器官形成的作用。其中 C 类基因主要控制心皮、雄蕊的发育, *AGAMOUS* (*AG*) 是拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中唯一的 C 类基因, 也是第一个被分离的 MADS-box 基因<sup>[1]</sup>。迄今, 人们已经从不同植物中克隆并鉴定了

很多 *AG* 同源基因, 尽管这些基因在序列上存在些许差异, 但功能是基本保守的<sup>[2]</sup>。*AG* 基因的主要功能包括以下几个方面: 抑制 A 功能基因在第 3 轮、第 4 轮中的异常表达; 在前期调控雄蕊、心皮和胚珠的正常发育; 在后期控制细胞分化, 终止花分生组织的分化以保证花器官的特征和数量<sup>[3]</sup>。1990 年 Yanofsky 等通过 T-DNA 插入突变技术, 获得了 *AG* 基因突变的重瓣表型拟南芥 (图 1), 其 6 枚雄蕊被 6 枚花瓣取代, 与 4 枚正常的花瓣形成了具有 10 枚花瓣的突变体, 而心皮也被 4 枚萼片和 10 枚花瓣取代, 具有花中花的整体表型<sup>[1]</sup>; 同年, Carpenter 等通过转座子诱变试验, 获得了 10 种花器官同源异型突变的金鱼草 (*Antirrhinum majus*), 其中 *pleniflora-624*、*pleniflora-625* 和 *pleniflora-626* 的表型非常相

收稿日期: 2021-12-24

基金项目: 上海市农业农村委员会科技兴农项目 (编号: 2019-02-08-00-08-F0110); 上海应用技术大学科技处引进人才科研启动项目 (编号: 39120K196025-A06); 沪农科推字 (2019) 第 1-8 号 (编号: 262201210095-A06)。

作者简介: 张志国 (1957—), 男, 山东滨州人, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为园林植物育种。E-mail: zgzhang@sit.edu.cn。

通信作者: 刘翔, 博士, 副研究员, 研究方向为倍性育种与分子育种。E-mail: liuxiang@sit.edu.cn。

the complete chloroplast genome sequence [J]. PeerJ, 2019, 7: e7210.

[15] 周晓君, 张凯, 彭正锋, 等. 矮牡丹与芍药属其他 5 个种叶绿体基因组特征的比较 [J]. 林业科学, 2020, 56(4): 82-88.

[16] 王玲, 董文攀, 周世良. 被子植物叶绿体基因组的结构变异研究进展 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(6): 1282-1288.

[17] 杜久军, 左力辉, 刘易超, 等. 裂叶榆叶绿体基因组及 CP-SSR 位点分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(6): 1187-1196.

[18] 温贝贝, 邓丽, 叶霞, 等. DNA 条形码在山茶属近缘植物鉴别中的应用 (英文) [J]. 广东农业科学, 2017, 44(1): 55-65.

[19] 苏玥, 刘娟娟, 完斌, 等. 乳苣叶绿体基因组特征及其系统发育分析 [J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(6): 33-42.

[20] 陈莹, 郭蓓琳, 姚丽敏, 等. 基于 DNA 条形码进行金花茶组种间鉴别 [J]. 种子, 2021, 40(2): 139-142.

[21] 肖丽梅. 金花茶组植物开花生物学特性及花粉粒形态初步研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2019.

[22] 覃冬梅. 6 种金花茶叶片表型和 SCoT 遗传多样性研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2020.

[23] 刘付永清. 基于叶绿体 SSC 序列的金花茶植物系统发育研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2015.

似,第1轮、第2轮花器官表型与野生型相同,第3轮花器官变为花瓣状结构,且与第2轮花瓣结合在一起,第4轮花器官由2个部分组成,在野生型金鱼草心皮相对应的位置产生加厚卷曲表面蜡质的花瓣状结构,且在第4轮内有5个瓣状结构轮生<sup>[4]</sup>。1991年Coen等总结了花器官特异基因在植物4轮结构中的表达情况,并提出花发育的ABC模型,为植物花发育生物学的研究带来了里程碑式的突破<sup>[5]</sup>。之后,随着D类基因<sup>[6]</sup>及E类基因<sup>[7]</sup>的发现,花发育ABC模型不断得到补充完善。

萱草 (*Hemerocallis fulva*) 是阿福花科 (Asphodelaceae) 萱草属 (*Hemerocallis*) 多年生草本植物,花被片数量通常为6枚,排成2轮,外轮花被片即萼片,未开放时在花蕾外起到保护作用,颜色通常较浅,内轮花被片较外轮花被片稍大,花色鲜艳,雄蕊通常与花被片同数,子房上位常3室,即萱草共有4轮花器官,由外向内数,第1轮为花萼,第2轮为花瓣,第3轮为雄蕊,第4轮为心皮<sup>[8]</sup>。我国是萱草属植物的自然分布中心,已有3 000多年的种植历史,世界萱草育种历经1个世纪的发展,如今已经取得了卓越成就,但是目前应用于园林景观的仅有少数几个单瓣品种,因此萱草花型的补充改造是其育种的重要研究目标之一。随着花卉基因工程研究的深入开展,人们相继从萱草中分离了生物钟相关基因 *HcLHY*<sup>[9]</sup> 与成花相关基因 *HkTFL1*、*HkSVP*、*HkAPI*<sup>[10]</sup>、糖转运蛋白相关基因 *HfSWEET2a*<sup>[11]</sup>、衰老相关 *HhNAC1* 基因<sup>[12]</sup>等,但是对于花发育中极其重要的 *AGAMOUS* 基因在萱草中的研究尚未见报道。萱草1轮3枚花被片共2轮的单瓣表型为人们所熟知,然而随着育种工程的发展,

也产生了一些重瓣表型,产生重瓣表型的原因是否与 *AGAMOUS* 突变有关仍不得而知。笔者所在课题组在转录组测序和基因组测序数据的基础上,从单瓣萱草品种秋红、重瓣材料 AH6 中对 C 类同源基因 *HfAG* 进行克隆、多序列对比分析、理化性质分析、系统进化分析和生物信息学分析,为进一步探究萱草花器官形成过程中上述基因发挥的功能提供理论基础,从而为萱草花型变异机制的研究和通过基因工程手段开展萱草重瓣育种研究奠定基础。



图1 重瓣拟南芥

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

供试材料采自上海应用技术大学国家萱草种质资源库(地理位置:121°5'E,30°8'N),单瓣品种名称为秋红(图2),重瓣材料田间编号为AH6(图3),于2021年7—8月盛花期采集其未开放的花蕾(直径在0.5~0.8 cm之间),分离得到花萼、花瓣、雄蕊和心皮以及四者的混合样,共10份样品,于液氮中速冻后于-80℃保存,用于后续RNA的提取。



a. 花器官分解



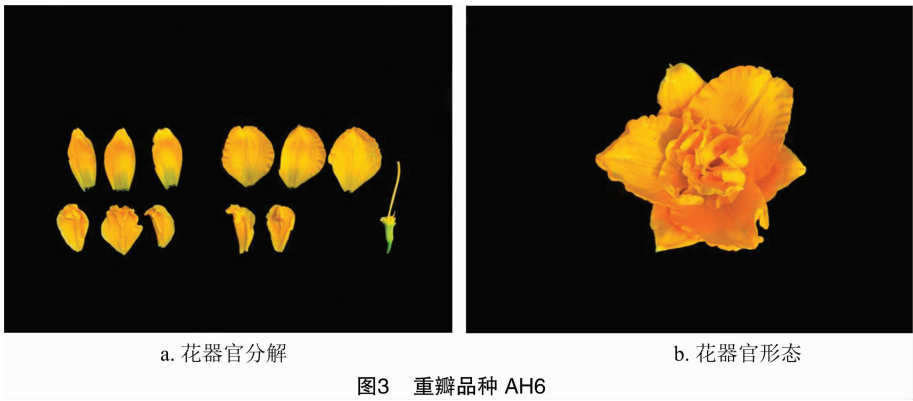
b. 花器官形态

图2 单瓣品种秋红

### 1.2 试验方法

1.2.1 总RNA的提取与cDNA第1条链的合成  
分别以萱草秋红、AH6的花蕾混合样为材料,用

RNApre Pure Plant Kit (Polysaccharides & Polyphenolics)试剂盒提取总RNA,用NanoDrop One超微量紫外分光光度计检测RNA的纯度、浓度,用



1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,再以总 RNA 为模板,用 M - MLV 转录酶[购自宝生物工程(大连)有限公司],以 Oligo( dT) 为引物,反转录合成 cDNA 第 1 链,将获得的 cDNA 于 -20 ℃ 保存。

1.2.2 *HfAG* 基因的克隆 参考笔者所在课题组前期建立的萱草秋红全长转录组库,筛选 *AG* 的同源基因序列,设计引物(表 1)。以 cDNA 为模板,使用 *Taq* DNA 聚合酶[购自宝生物工程(大连)有限公司]进行 PCR 扩增。20 μL PCR 扩增体系:2 μL 10 × *Taq* Buffer with KCl,1.6 μL MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L),0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL),0.4 μL dNTP (10 mmol/L),1 μL Primer - F(10 μmol/L),1 μL Primer - R(10 μmol/L),1 μL 模板 DNA,12.8 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应程序:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。

1.2.3 目的基因的回收连接转化与测序 将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果,对检测结果合格的 PCR 产物进行电泳分离,随后用 DNA 凝胶回收试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)进行回收。将 PCR 纯化产物连接到 pMD19 - T 载体[宝生物工程(大连)有限公司]上,转化大肠杆菌 DH5α,挑取单菌落进行菌液 PCR 检测,随后对阳性菌落进行基因测序。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 以萱草材料秋红、AH6 同一花蕾的不同器官(萼片、花瓣、雄蕊、心皮)为材料提取的 RNA 为模板,用 Vazyme 公司的逆转录试剂盒(HiScript® III RT SuperMix for qPCR)合成 cDNA 第 1 链。根据 cDNA 序列设计上、下游定量引物,*HfAG* 基因和内参基因的引物序列见表 1,其中内参基因是萱草最优内参基因 *HfGAPDH*<sup>[13]</sup>,每个样品设置 3 个重复,使用荧光定量试剂盒(ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix)进行荧光定量 PCR。设置 3 个生物学重复和 3 次技术重复,用

2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup>法<sup>[14]</sup>对基因进行相对定量分析。反应体系:10 μL SYBR qPCR Master Mix、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、2 μL cDNA 模板,用 dd H<sub>2</sub>O 补至 20 μL。扩增程序:95 ℃ 30 s,95 ℃ 10 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环,熔解曲线为 95 ℃ 15 s,56 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。

表 1 ahHfAG 蛋白 PCR 与定量 PCR 的引物序列

| 引物名称                 | 序列(5'→3')                 | 用途   |
|----------------------|---------------------------|------|
| <i>HfAG1084</i> - cF | ATGGGGAGGGGAAGATAGAGATCA  | 基因克隆 |
| <i>HfAG1084</i> - cR | TCATCTCCACATTTGGAGGAAGTTT | 基因克隆 |
| <i>HfGAPDH</i> - F   | ACGGATAGAGATAGCACAG       | 内参引物 |
| <i>HfGAPDH</i> - R   | GCAGCACAGCACACATTCT       | 内参引物 |
| <i>RTAG1084</i> - F  | GAAGCAGCTGGA AACAGAC      | 定量引物 |
| <i>RTAG1084</i> - R  | GTCAATTTACGCGAACAGCA      | 定量引物 |

1.2.5 生物信息学分析 用 DNAMAN 软件分析阳性菌落的测序结果,用 Primer Premier 5.0 软件将核苷酸序列蛋白质编码区翻译成氨基酸序列,对蛋白进行理化性质、保守结构域、亲水性疏水性、二级结构、亚细胞定位等方面的预测和分析。基于 MEGA version 7,采用邻接法构建蛋白的系统发育进化树,分析与其他物种的亲缘关系。具体分析内容和工具见表 2。

2 结果与分析

2.1 基因克隆与序列分析

本研究以 *HfAG1084*cF/cR 为引物,分别以萱草秋红、AH6 的花蕾混合样为材料提取 RNA,反转录得到 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物经凝胶电泳检测,在 700 bp 附近出现 1 条特异条带(图 4),与预测片段大小吻合,片段在回收后的测序结果表明,最终得到 2 个 MADS - box 基因的 CDS 序列。

表 2 生物信息学分析网站及软件

| 功能       | 网站及软件  |
|----------|--|
| 蛋白质的理化性质 | ProtParam tool ( <a href="http://www.expasy.ch/tools/protparam.html">http://www.expasy.ch/tools/protparam.html</a> )   |
| 保守结构域分析  | NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</a> )   |
| 同源多序列比对  | NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )   |
| 同源多序列比对  | DNAMAN V6  |
| 系统进化树    | MEGA version 7   |
| 蛋白二级结构   | PredictProtein ( <a href="https://www.predictprotein.org">https://www.predictprotein.org</a> ) SOPMA ( <a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html</a> ) |
| 亲水性疏水性预测 | ProtScale ( <a href="https://web.expasy.org/protscale/">https://web.expasy.org/protscale/</a> )  |
| 亚细胞定位    | PSORT Prediction ( <a href="http://psort.hgc.jp/">http://psort.hgc.jp/</a> )   |

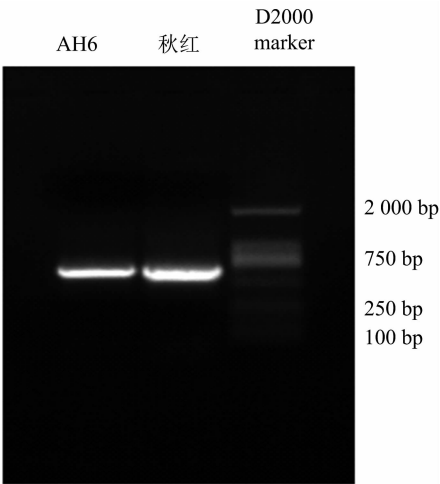


图4 PCR 产物的电泳结果

测序结果表明,*ahHfAG* 的序列长度为 624 bp。对序列进行多序列对比和结构域分析,结果(图 5)表明,*ahHfAG* 具有典型的植物 MADS - box 基因结构,编码肽链具有 2 个保守结构域,即 MADS 区(2 ~ 73 aa)、K 区(88 ~ 172 aa)。MADS 区、K 区属于 MIKCC 型基因特征基序<sup>[15]</sup>,MADS 区、K 区之间为长度为 14 个氨基酸的 I 区,在二聚体的选择性形成过程中起着关键作用<sup>[16]</sup>,而 C 端区域是位于 K 区下游保守性最低的转录激活区区间。虽然 C 末端的变化较大,但是 MADS - box 蛋白常含有一些保守基序,*AGAMOUS* 基因有 AG 基序 I、II 这 2 个相对保守区<sup>[2,17]</sup>,高志红等认为,这 2 个相对保守区是 AG 同源基因的特征之一<sup>[17-18]</sup>。

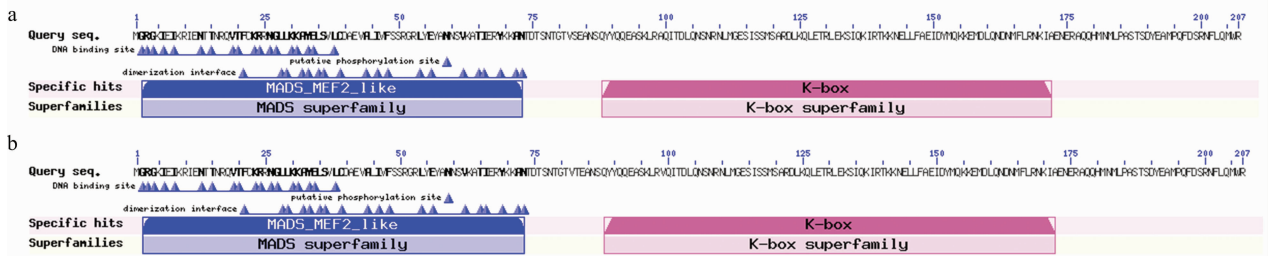


图5 ahHfAG 蛋白(a)和 qhHfAG 蛋白(b)的结构域分析

通过 ProtParam 软件对萱草 AG 编码氨基酸序列的理化性质进行预测,得到 *qhHfAG*、*ahHfAG* 编码蛋白质的分子式、理论分子质量、等电点、总平均疏水性和不稳定性指数等。*ahHfAG* 编码蛋白质的总平均疏水性为 -0.843,属于亲水蛋白,不稳定性指数为 45.84,为不稳定蛋白;*qhHfAG* 编码蛋白质的总

平均疏水性为 -0.855,也属于亲水蛋白,不稳定性指数为 46.25,为不稳定蛋白(表 3)。两者的疏水性和不稳定性略有差异。亚细胞定位预测结果显示,萱草 *ahHfAG* 和 *qhHfAG* 编码的蛋白定位于细胞核中,可知该蛋白合成后不需要分泌到细胞外,而是进入细胞核中。

表 3 *qhHfAG* 和 *ahHfAG* 编码蛋白质的一级结构分析

| 蛋白质    | 分子式   | 氨基酸数量<br>(个) | 理论相对分子量<br>(ku) | 等电点  | 不稳定性指数 | 总平均疏水指数 |
|--------|---|--------------|-----------------|------|--------|---------|
| qhHfAG | C <sub>1 036</sub> H <sub>1 686</sub> N <sub>310</sub> O <sub>329</sub> S <sub>12</sub> | 207          | 24.133 38       | 9.45 | 46.25  | -0.855  |
| ahHfAG | C <sub>1 039</sub> H <sub>1 692</sub> N <sub>310</sub> O <sub>329</sub> S <sub>12</sub> | 207          | 24.175 46       | 9.45 | 45.84  | -0.843  |



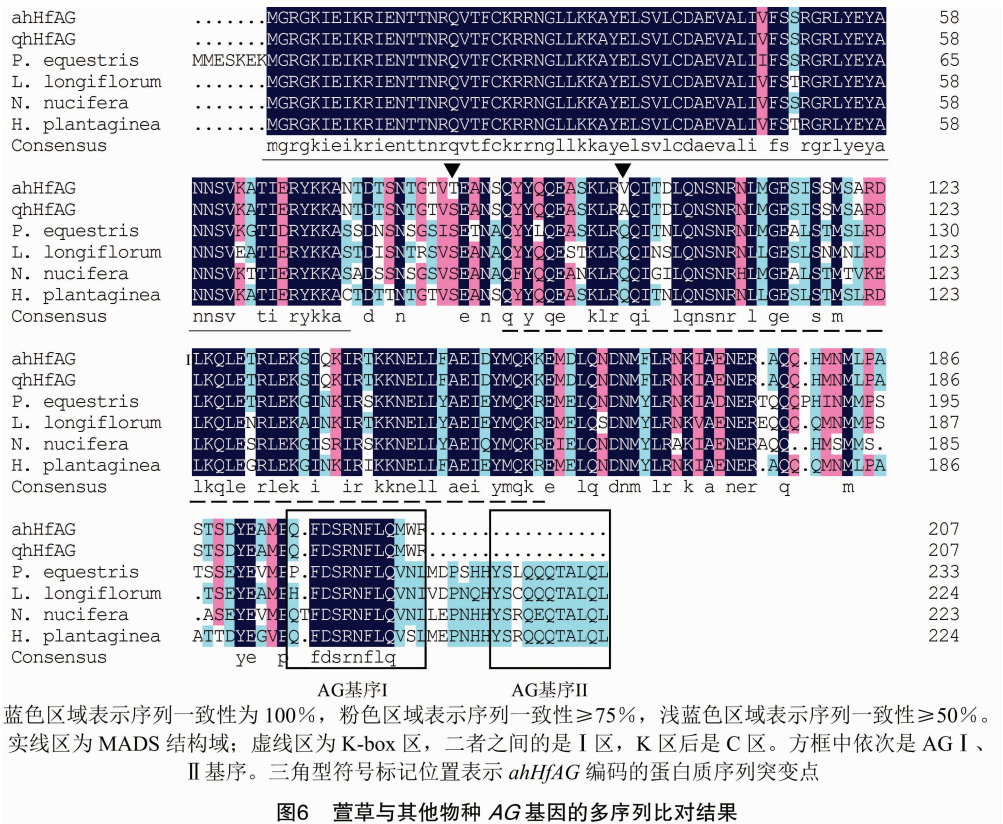
2.2 同源性对比分析

将 AG 同源蛋白 ahHfAG 的氨基酸序列与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中已知的序列进行比较分析。结果显示, ahHfAG 蛋白与玉簪 (*Hosta plantaginea*) 的 HopAG (ACB70410. 1)、莲 (*Nelumbo nucifera*) 的 NenAGL (XP\_010272685. 1)、麝香百合 (*Lilium longiflorum*) 的 LMADS10 (AIJ29174. 1)、小兰屿蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*) 的 PeAGL (XP\_020582512. 1) 等有较高的一致性, 都在 80% 以上, 其中与玉簪的 HopAG (ACB70410. 1) 蛋白一致性最高, 达 88. 78%, 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 AG (AT4G18960) 一致性为 59. 13%。

将重瓣萱草 AG 同源基因 *ahHfAG* 和单瓣萱草

AG 同源基因 *qhHfAG* 相比, 发现有 2 个位点发生突变。一是第 247 位碱基, 其突变导致位于保守性较低的 I 区的第 83 位氨基酸产生变化, 在单瓣品种秋红中为丝氨酸 (Ser), 而在重瓣萱草 AH6 中为苏氨酸 (Thr)。另一个是第 296 位碱基, 其突变导致位于半保守的 K 区的第 99 位氨基酸发生变化, 在单瓣品种秋红中为丙氨酸 (Ala), 而在重瓣萱草 AH6 中为缬氨酸 (Val)。

图 6 是 *ahHfAG* 与 *qhHfAG* 编码的蛋白质和一致性靠前的 4 个不同物种蛋白质序列的 BLAST 比较分析结果。可以看出, 氨基酸序列 5' 端的保守性比较高, 而 3' 端的保守性比较低。且 *ahHfAG* 与 *qhHfAG* 缺少 C 末端 AG 基序 II 这个相对保守区。



2.3 系统进化分析

在 NCBI 中用 ahHfAG 蛋白进行 BLASTp 比对, 选取不同物种中已经确认的 C 功能 MADS - box 蛋白的氨基酸序列 (序列信息见表 4) 构建系统进化树 (图 7)。可以看出, AmFAR、TAG1、HmAG、PgAG2、GhMADS10 和 AG 归为 1 支, 属于 euAG 同源蛋白; FBP6、LAG、SHP1、SHP2 和 PLE 归为 1 支, 同属于 PLE 同源蛋白; 而 *ahHfAG* 基因的蛋白序列则与其他序列一同被归于 AG 同源蛋白, 即萱草的 *ahHfAG* 基

因属于 AG 谱系。此外, 萱草与天门冬目的植物聚于 1 支, 且与扫帚芦笋 (*Asparagus virgatus*) 的亲缘关系最近, 这也与同源性对比结果一致。

2.4 ahHfAG 和 qhHfAG 基因的蛋白二级结构预测

用 SOPMA 在线分析工具对 *ahHfAG* 和 *qhHfAG* 编码蛋白序列的二级结构进行分析。由表 5 可以看出, HfAG 蛋白以  $\alpha$  - 螺旋结构为主, 其次为无规则卷曲结构, 延伸链占比较少, 占比最少的是  $\beta$  - 转角, 其中  $\alpha$  - 螺旋结构主要集中在 K 区。

表 4 部分被子植物 C 类 MADS - box 蛋白

| 登录号       | 基因名      | 拉丁名  | 中文学名   | 科属       |
|-----------|----------|--|--------|----------|
| AAA02933  | ZAG1     | <i>Zea mays</i>                                  | 玉米     | 禾本科玉蜀黍属  |
| NP_567569 | AG       | <i>Arabidopsis thaliana</i>                      | 拟南芥    | 十字花科拟南芥属 |
| NP_191437 | SHP1     |  |        |          |
| NP_850377 | SHP2     |  |        |          |
| AAB25101  | PLE      | <i>Antirrhinum majus</i>                         | 金鱼草    | 车前科金鱼草属  |
| CAB42988  | AmFAR    |  |        |          |
| CAA48635  | FBP6     | <i>Petunia hybrida</i>                           | 矮牵牛    | 茄科碧冬茄属   |
| AAD38119  | LAG      | <i>Liquidambar styraciflua</i>                   | 北美枫香   | 金缕梅科枫香树属 |
| BAB70737  | MPMADS2  | <i>Magnolia praecocissima</i>                    | 皱叶木兰   | 木兰科木兰属   |
| AAS01766  | LMADS2   | <i>Lilium longiflorum</i>                        | 麝香百合   | 百合科百合属   |
| AAD19360  | HAG1     | <i>Hyacinthus orientalis</i>                     | 风信子    | 风信子科风信子属 |
| ACY26070  | OsMADS3  | <i>Oryza sativa</i>                              | 水稻     | 禾本科稻属    |
| Q40168    | TAG1     | <i>Solanum lycopersicum</i>                      | 番茄     | 茄科番茄属    |
| ABQ28694  | NtAG     | <i>Narcissus tazetta</i> subsp. <i>chinensis</i> | 水仙     | 石蒜科水仙属   |
| BAD18011  | AvAG1    | <i>Asparagus virgatus</i>                        | 扫帚芦笋   | 天门冬科天门冬属 |
| ACB70410  | HopAG    | <i>Hosta plantaginea</i>                         | 玉簪     | 百合科玉簪属   |
| AAS45692  | NymAG1   | <i>Nymphaea</i> sp. EMK - 2003                   | 睡莲     | 睡莲科睡莲属   |
| BAG74745  | HmAG     | <i>Hydrangea macrophylla</i>                     | 绣球     | 虎耳草科绣球属  |
| Q40872    | PgAG2    | <i>Panax ginseng</i>                             | 人参     | 五加科人参属   |
| ACF93432  | GhMADS10 | <i>Gossypium hirsutum</i>                        | 棉花     | 锦葵科棉属    |
| BAH56656  | WAG2     | <i>Triticum aestivum</i>                         | 小麦     | 禾本科小麦属   |
| AAL76415  | PeMADS1  | <i>Phalaenopsis equestris</i>                    | 小兰屿蝴蝶兰 | 兰科蝴蝶兰属   |
| AEZ51868  | CeAG     | <i>Cymbidium ensifolium</i>                      | 建兰     | 兰科兰属     |
| ABD62864  | PaAG1    | <i>Persea americana</i>                          | 鳄梨     | 樟科鳄梨属    |
| AAY25577  | AmtAG    | <i>Amborella trichopoda</i>                      | 无油樟    | 无油樟科无油樟属 |

相较于 *qhHfAG* 基因, *ahHfAG* 基因编码蛋白在 M 区的第 10 位由  $\alpha$  - 螺旋变为  $\beta$  - 转角, 在 M 区的第 56 位由延伸链变为  $\alpha$  - 螺旋; *ahHfAG* 基因编码蛋白在 K 区的第 140 ~ 141 位由无规则卷曲、延伸链变为  $\alpha$  - 螺旋; 保守性最低转录激活区 (C 区) 的第 174 ~ 178 位由  $\alpha$  - 螺旋变为无规则卷曲结构, 第 184 位由  $\alpha$  - 螺旋变为无规则卷曲, 第 194 ~ 197 位由  $\alpha$  - 螺旋变为无规则卷曲, 第 201 ~ 203 位由无规则卷曲变为  $\alpha$  - 螺旋。

2.5 ahHfAG 和 qhHfAG 编码氨基酸的疏水性分析

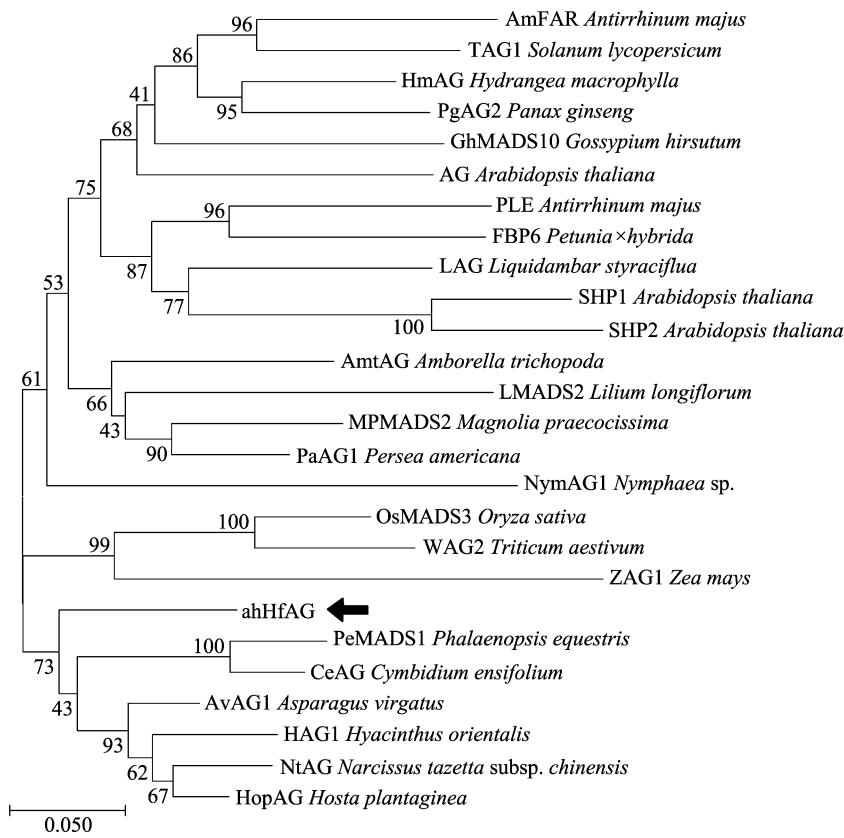
使用在线工具 ProtScale 对 *qhHfAG* 编码的氨基酸进行疏水性分析, 结果表明, 该肽链第 45 位点上的 L 疏水性最强, 分值为 2. 089, 而第 71 位点上的 K 亲水性最强, 分值为 - 2. 556, 预测 *qhHfAG* 编码的氨基酸疏/亲水性值总和为 - 170. 621, 因此认为该蛋白是亲水性蛋白。而 *ahHfAG* 编码氨基酸的疏水性最高值、最低值都没有变化, 但从第 80 ~ 88 位、第 96 ~ 104 位开始疏水性明显升高, 总和变为 - 168. 12 (图 9)。

2.6 ahHfAG 编码蛋白的表达分析

为了研究 *AG* 编码蛋白的表达模式, 以单瓣品种萱草秋红、重瓣萱草 AH6 的同一花蕾不同花器官的 cDNA 为模板, 以 *HfGAPDH* 为内参基因, 用 qRT - PCR 技术对 *ahHfAG* 编码蛋白在萱草不同器官中的表达量进行分析。由图 10 qRT - PCR 结果表明, *ahHfAG* 蛋白在萱草的雄蕊、心皮中均有较高的表达量, 在花萼、花瓣中的表达量较低, 推测该基因可能为特异性表达基因。其次, 在单瓣品种秋红中, *qhHfAG* 蛋白在 4 轮花器官中均有表达, 且在第 1 轮花萼中表达明显, 但是在重瓣萱草 AH6 中, 表达范围显著收缩, 在 1、2 轮花器官中几乎不表达。这种表达模式与 ABC 模型中 C 类基因的表达模式较为符合。上述结果表明, *HfAG* 基因在萱草花器官发育过程中发挥着重要作用, 且在不同植物中功能较为保守。

3 讨论与结论

本研究以萱草单瓣品种秋红、重瓣材料 AH6 为



各节点处数值表示 Bootstrap 值(重复 1 000 次); 其余参数采用默认设置; ahHfAG 用黑色实心箭头标出

图7 ahHfAG 与其他物种 AGAMOUS 蛋白的系统进化树

表 5 萱草 AG 同源基因的二级结构预测分析结果

| 蛋白名称   | 占比(%) |       |      |      |
|--------|-------|-------|------|------|
|        | α-螺旋  | 无规则卷曲 | 延伸链  | β-转角 |
| ahHfAG | 63.77 | 21.74 | 9.66 | 4.83 |
| qhHfAG | 66.67 | 19.32 | 9.66 | 4.35 |

试验材料,用 RT-PCR 技术克隆了 C 类基因 AGAMOUS 的全长序列,用生物信息学软件分析其序列信息,通过实时荧光定量 PCR 技术分析表达模式。结果表明,AGAMOUS 基因作为 C 类功能基因可调控雄蕊、心皮和胚珠的正常发育,在植物花器官中均有表达,但在不同器官中的表达量存在差

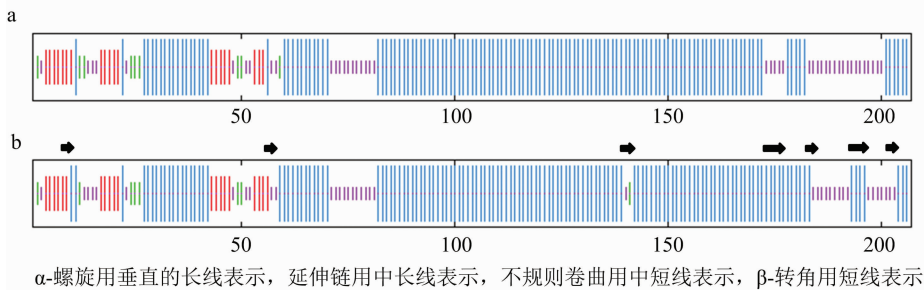
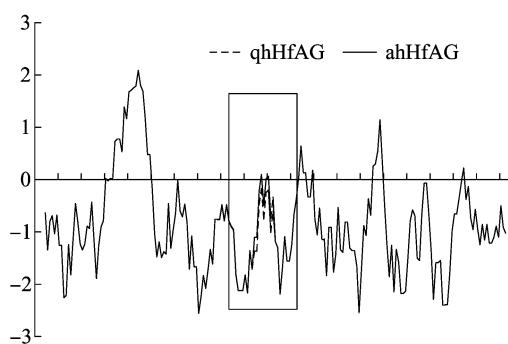
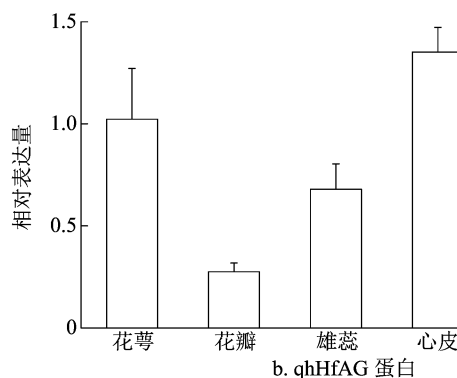
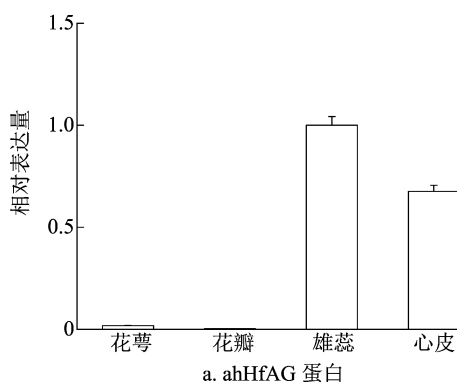


图8 ahHfAG (a)和 qhHfAG (b)编码蛋白序列二级结构预测结果

异。研究重瓣花的驯化过程可以发现,C 类基因的功能丧失和表达收缩都会引起生殖器官的缺失,促进额外花瓣的形成,形成重瓣花。Dubois 等通过研究 1 个由重瓣变为单瓣的月季(*Rosa hybrida*)突变体发现,重瓣月季的形成与 C 类基因 *RhAG* 表达范围缩小有关<sup>[19]</sup>。在重瓣品种中,*RhAG* 的表达仅限

于花芽的中心部位;而在单瓣突变体中,*RhAG* 的表达范围更大。从 qRT-PCR 结果可以看出,在单瓣品种秋红中,qhHfAG 蛋白在 4 轮花器官中均有表达,且在第 1 轮花萼中表达明显,但是在重瓣材料 AH6 中,表达范围显著收缩,在 1、2 轮花器官中几乎不表达。该研究结果与 AGAMOUS 基因在其他植

图9 *HfAG* 编码蛋白疏水性的对比分析图10 *ahHfAG* 蛋白和 *qhHfAG* 蛋白在不同器官的花中的表达

地介导蛋白与蛋白之间的相互作用<sup>[20]</sup>。在本研究获得的萱草 *HfAG* 中,具有 MADS 区、K 区这 2 个保守结构域,可以推测 *HfAG* 基因也是通过与其他基因结合来共同调控花器官发育的。Galimba 等下调唐松草 (*Thalictrum thalictroides*) 栽培品种双白的 *AG* 同源基因 *ThAG1* 的表达,导致转录组无意义衰退和选择性拼接,最终致使其蛋白的 K 区丢失,形成重瓣花<sup>[23]</sup>。在星花木兰 (*Magnolia tomentosa*) 中, *MastAG* 基因发生选择性拼接,形成 2 种非正常的转录蛋白 *mastag-2* 蛋白 (I 区、K 区缺失) 和 *msatag-3* 蛋白 (K 区和 C 区缺失),导致星花木兰的花瓣数增加<sup>[24]</sup>。但是本研究发现, *ahHfAG* 编码蛋白具有较为完整的 MADS-box 基因结构,因此材料 AH6 重瓣的原因不是保守结构域的丢失。C 区是位于 K 区下游的转录激活区区间<sup>[2]</sup>, *AG* 基因编码产物结合形成同源二聚体,或者与其他 MADS 家族基因编码的蛋白质结合形成异源二聚体,然后特异地结合到靶基因 DNA 调控区,通过 C 末端与其他二聚体结合形成四聚体,再绑定到靶基因上游,调控下游靶基因的表达,指导花器官的形成。Mizukami 等通过异位表达试验表明, C 末端对 *AG* 转录因子功能的正常发挥具有重要影响<sup>[25]</sup>。C 末端保守性最低,但是

物中的研究结果相似。

*AGAMOUS* 基因具有典型的植物 MADS-box 基因结构,即 MADS 区 (M 区)、间隔区 (I 区)、角蛋白类似区 (K 区) 和 C 末端区 (C 区)<sup>[20]</sup>。MADS 区 (第 1~72 位) 含有 C-A/T rich-GC (CArG) 基序,是 *AG* 与其他 DNA 结合所必需的结合基元<sup>[21]</sup>,也是 MADS-box 基因中最保守的区域<sup>[22]</sup>。半保守的 K 区 (第 88~172 位) 是由疏水的氨基酸残基规律性的间隔排列组成的 coiled-coil 结构,能够折叠形成 3 个连续的两性  $\alpha$ -螺旋 K1、K2、K3,参与有选择性

常含有 *AG* 基序 I、II 这 2 个相对保守区。Liu 等从单瓣和日本晚樱 (*Prunus lannesiana*) 的栽培变种 *Alboreosa* 中各分离出来 1 个 *AG* 基因的异构体<sup>[26]</sup>,重瓣品种的 *Prseag-1* 与单瓣品种的 *PrseAG* 相比有 1 个 170 bp 的外显子跳跃且表达范围更广泛。*Prseag-1* 可能因为 C 末端的 *AG* 基序 I、II 丢失而丧失了 C 类基因的功能,从而使雄蕊转变成花瓣,雌蕊转变成叶状结构。不过在本研究得到的 CDS 序列中, *ahHfAG*、*qhHfAG* 编码肽链只含有 *AG* 基序 I 而没有 *AG* 基序 II。尽管 *AG* 基序的丢失可能会造成 C 类基因功能的丧失,从而形成重瓣花,但是对比单瓣、重瓣萱草序列可以发现,二者均缺失基序 II,说明该基序 II 的缺失并不是造成重瓣的根本原因。通过二级结构预测的对比可以发现,氨基酸的突变导致基序 I (第 196 位到第 207 位) 二级结构第 194~197 位由  $\alpha$ -螺旋变为无规则卷曲,第 201~203 位由无规则卷曲变为  $\alpha$  螺旋。或许基序 I 对于重瓣表达有更重要的作用,这可能是产生重瓣的原因之一。根据系统进化树可以看出, *ahHfAG* 基因属于 AGL 亚家族中 C 类基因的 *AG* 谱系,参与雄蕊、心皮的发育,与扫帚芦笋的亲缘关系最近,说明其遗传背景较为相似。 *ahHfAG* 基因与 *qhHfAG* 基



因序列有 2 个氨基酸的差异,该差异导致蛋白质二级结构、三级结构及疏水性发生变化,这也许是导致花型变异的一个内在因素。接下来可以将 *ahHfAG* 基因转入拟南芥和烟草中,进行进一步的功能鉴定。

本试验克隆的萱草 *HfAG* 基因为研究观花植物的重瓣机制奠定了基础,同时也为进一步通过基因工程开展萱草重瓣新品种育种提供了理论和试验依据。

#### 参考文献:

- [1] Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, et al. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors [J]. *Nature*, 1990, 346(6279): 35–39.
- [2] Kramer E M, Jaramillo M A, Di Stilio V S. Patterns of gene duplication and functional evolution during the diversification of the *AGAMOUS* subfamily of MADS box genes in angiosperms [J]. *Genetics*, 2004, 166(2): 1011–1023.
- [3] Causier B, Schwarz – Sommer Z, Davies B. Floral organ identity: 20 years of ABCs [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(1): 73–79.
- [4] Carpenter R, Coen E S. Floral homeotic mutations produced by transposon – mutagenesis in *Antirrhinum majus* [J]. *Genes Dev*, 1990, 4(9): 1483–1493.
- [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] Pinyopich A, Ditta G S, Savidge B, et al. Assessing the redundancy of MADS – box genes during carpel and ovule development [J]. *Nature*, 2003, 424(6944): 85–88.
- [7] 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.
- [8] Wu Z, Raven P H, Missouri B G. *Flora of China*(24) [M]. Beijing: Science Press, 2000: 73–263.
- [9] 公菲菲, 李 森, 杜 巍, 等. 黄花菜生物钟基因 *HcLHY* 的克隆及时空表达分析 [J]. *河北农业大学学报*, 2020, 43(3): 37–44.
- [10] 刘颖竹. 萱草成花相关基因功能分析及 CRISPR/Cas9 系统介导成花基因功能敲除研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2020: 6–12.
- [11] 黄东梅, 肖海涛, 张志国, 等. 萱草糖转运蛋白 *HfSWEET2a* 的克隆及低温胁迫下的表达分析 [J]. *应用技术学报*, 2020, 20(4): 367–374.
- [12] 马广莹, 史小华, 詹 菁, 等. 萱草 *HhNAC1* 基因序列特征及在花衰老进程中的表达分析 [J]. *植物生理学报*, 2021, 57(9): 1799–1807.
- [13] 梁 锦, 刘海婷, 钟 荣, 等. 萱草不同器官实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选 [J]. *植物生理学报*, 2020, 56(9): 1891–1898.
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real – time quantitative PCR and the  $2(-\Delta\Delta C(T))$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [15] Kaufmann K, Melzer R, Theissen G. MIKC – type MADS – domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants [J]. *Gene*, 2005, 347(2): 183–198.
- [16] Riechmann J L, Meyerowitz E M. MADS domain proteins in plant development [J]. *Biological Chemistry*, 1997, 378(10): 1079–1101.
- [17] 高志红, 张玉明, 王 珊, 等. 植物花发育调控基因 *AGAMOUS* 的研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2008, 28(3): 638–644.
- [18] 龚霞峰, 胡江琴, 刘姬艳, 等. 植物 *AGAMOUS* 同源基因的表达调控 [J]. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 8(3): 218–223.
- [19] 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.
- [20] Fan H Y, Hu Y, Tudor M, et al. Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 1997, 12(5): 999–1010.
- [21] Serivichyaswat P, Ryu H S, Kim W, et al. Expression of the floral repressor miRNA156 is positively regulated by the *AGAMOUS* – like proteins AGL15 and AGL18 [J]. *Mol Cells*, 2015, 38(3): 259–266.
- [22] Immink R G H, Gadella T W J J, Ferrario S, et al. Analysis of MADS box protein – protein interactions in living plant cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(4): 2416–2421.
- [23] Galimba K D, Tolkin T R, Sullivan A M, et al. Loss of deeply conserved C – class floral homeotic gene function and C – and E – class protein interaction in a double – flowered ranunculid mutant [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(34): E2267–E2275.
- [24] Zhang B, Liu Z X, Ma J, et al. Alternative splicing of the *AGAMOUS* orthologous gene in double flower of *Magnolia stellata* (Magnoliaceae) [J]. *Plant Science*, 2015, 241: 277–285.
- [25] Mizukami Y, Huang H, Tudor M, et al. Functional domains of the floral regulator *AGAMOUS*: characterization of the DNA binding domain and analysis of dominant negative mutations [J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(5): 831–845.
- [26] Liu Z X, Zhang D D, Liu D, et al. Exon skipping of *AGAMOUS* homolog *PrseAG* in developing double flowers of *Prunus lannesiana* (Rosaceae) [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(2): 227–237.