

毛白杨 PtMADS4 基因的克隆及序列分析

李 青, 于真真, 李 静, 郭 伟, 樊金会

(山东农业大学林学院 泰安 271018)

摘 要: MADS-box 转录因子家族在植物体的发育过程中具有重要的作用。以毛白杨易县雌株休眠花芽总 RNA 为模板, 用 PCR 扩增的方法获得了 1 个新的毛白杨的 MADS-box 基因, 命名为 PtMADS4。该基因全长 1041 bp, 编码 245 个氨基酸, 具有典型的 MADS-box 结构域和完整的 K 区。系统进化树分析表明 PtMADS4 与 SEP1, SEP2 同源性高达 78%。

关键词: 毛白杨; MADS-box 基因; 同源性分析

中图分类号: S 792.117.04 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)07-0149-03

高等植物花发育相关分子机理的研究一直是人们感兴趣的问题, Coen 和 Meyerowitz^[1] 在对模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 和金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 突变体及其基因功能分析的基础上, 提出了花器官发育的 ABC 模型。经过逐步完善, ABC 模型已发展为 ABCDE 模型^[2]。目前, 这一模型作为解释花器官发育的基本分子机理, 已得到广泛认可。

在拟南芥中, 过量表达 AP3-PI-SEP3、API-PI-SEP3 或 API-AP3-PI-SEP3, 叶转变成花瓣; 过量表达 PI-AP3-SEP3-AG, 叶转变成雄蕊; 过量表达 SEP3-AG, 叶转变为心皮^[3], 说明 SEP 类与 A 类、B 类和 C 类基因共同作用可以将叶转变为花器官。

杨属是木本植物生物学研究的重要模式植物。随着对毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 全基因组测序的完成, 对它的分子水平的研究引起世界范围内的关注。由于杨属植物为单性无被花, 其花结构不同于拟南芥、金鱼草等植物的花结构, 用 ABC 模型来解释花器官的发育显然存在困难。研究旨在从毛白杨中分离出类似拟南芥 SEP 类的基因 PtMADS4, 根据 PtMADS4 基因的序列分析以及与拟南芥 SEP 类的比较, 进一步帮助理解杨树的单性无被花发育的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

所用植物材料主要取自毛白杨 易县雌株' (*P. tomentosa* Carr. cv. 'hopeinica'), 该品种具有开花结实早的特点。大肠杆菌菌株为 DH5 α , 连接载体为 PMD18-T Vector。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 以毛白杨入冬后的休眠花芽剥离的

幼花序为材料, 采用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 取 2 μ g 总 RNA, 用引物 B26 反转录合成 cDNA 第一条链, 以此链为 PCR 反应模板。

1.2.2 PCR 反应 根据 MADS-box 的保守序列设计简并性引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增。PCR 体系: 10 \times PCR 缓冲液(含 Mg²⁺) 5.0 μ L, dNTPs(各自 2.5 mmol/L) 4.0 μ L, 上游引物 1.0 μ L, 下游引物 1.0 μ L, 模板 DNA 4 μ L, rTaq(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 加灭菌双蒸水至总体积 50 μ L。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 运行 35 个循环结束。

P1: 5' GGACAACCGAAGCACTTCTTT3'; P2: 5' CAAGAGCATGTGTACTTTC3'。

1.2.3 目的片段的克隆 扩增引物在 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶中电泳分离后, 切下含约 1 000 bp 目的片段的胶块, 采用 WizardTM PCR Preps DNA Purification System 进行回收和纯化。取适量经纯化的 PCR 产物与 50 ng PMD18-T Vector 在 T4DNA 连接酶作用下连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞, 在 LB/Amp/IPTG/X-gal 平板上筛选重组子, 挑取白色菌落, 经 LB 液体培养后, 碱裂解法抽提质粒 DNA, 进行 PCR 鉴定。经酶切鉴定获得重组质粒。

1.2.4 DNA 序列测定及分析 委托上海生工生物技术服务有限公司测定重组质粒的 DNA 序列, 用 NCBI BLAST 和 DNAMAN 4.0 软件进行基因有关的序列分析。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物的扩增和克隆

从毛白杨入冬后的休眠花芽剥离的幼花序中提取总 RNA, 以反转录产物为模板, 对设计的 1 对引物进行 PCR 反应, 得到长度为 918 bp 的特异条带。将经过回收、纯化后的 PCR 产物与 pM18-T 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞, 在含氨苄青霉素(Amp)、X-gal 及 IPTG 的 LB 平板上涂布, 挑少量白色菌落进行 PCR 鉴定后, 取阳性菌液培养, 提取质粒, 经

第一作者简介: 李青(1981-)女, 在读硕士, 研究方向为园林植物与观赏园艺。E-mail: liqing20011063@tom.com.

收稿日期: 2007-04-05

Xba I 和 SalI 酶切鉴定获得重组质粒(图 1)。

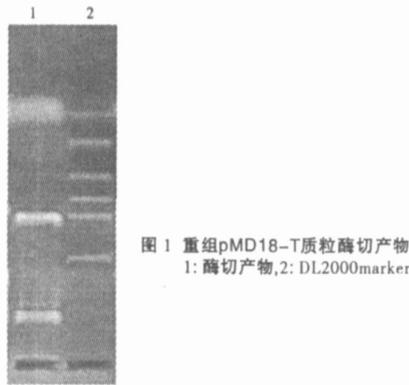


图 1 重组 pMD18-T 质粒酶切产物
1: 酶切产物, 2: DL2000 marker

2.2 PtMADS4 基因的全序列和同源性分析

SEP1	MGRGVDFRRIENKTRCVTEVYRPGGLIKKAYELSVLCAEVAI	45
AGL3	MGRGVDFRRIENKTRCVTEVYRPGGLIKKAYELSVLCAEVAI	45
AGL6	MGRGVDFRRIENKTRCVTEVYRPGGLIKKAYELSVLCAEVAI	45
AGL13	MGRGVDFRRIENKTRCVTEVYRPGGLIKKAYELSVLCAEVAI	45
ptMADS4.seq	MGRGVDFRRIENKTRCVTEVYRPGGLIKKAYELSVLCAEVAI	45
SEP1	MGRGVDFRRIENKTRCVTEVYRPGGLIKKAYELSVLCAEVAI	45
SEP2	MGRGVDFRRIENKTRCVTEVYRPGGLIKKAYELSVLCAEVAI	45
Consensus	mrggvdfrrienktrcvtevyrpggllkkayelsvlcaeva	
SEP1	IFSNAGKLYEFCSS.SSMILPILYVCKNYGAFHFVPSRELLA	89
AGL3	IFSNAGKLYEFCSS.SSMILPILYVCKNYGAFHFVPSRELLA	89
AGL6	IFSNAGKLYEFCSS.SSMILPILYVCKNYGAFHFVPSRELLA	87
AGL13	IFSNAGKLYEFCSS.SSMILPILYVCKNYGAFHFVPSRELLA	86
ptMADS4.seq	IFSNAGKLYEFCSS.SSMILPILYVCKNYGAFHFVPSRELLA	86
SEP1	IFSNAGKLYEFCSS.SSMILPILYVCKNYGAFHFVPSRELLA	89
SEP2	IFSNAGKLYEFCSS.SSMILPILYVCKNYGAFHFVPSRELLA	89
Consensus	ifsnagklyefcss.ssmilpilyvcknygafhfvp	
SEP1	ELSPGCVTHIRSRVYRACVTRGSDVLSHTEPESLRESEEPD	134
AGL3	ELSPGCVTHIRSRVYRACVTRGSDVLSHTEPESLRESEEPD	132
AGL6	ELSPGCVTHIRSRVYRACVTRGSDVLSHTEPESLRESEEPD	130
AGL13	ELSPGCVTHIRSRVYRACVTRGSDVLSHTEPESLRESEEPD	129
ptMADS4.seq	ELSPGCVTHIRSRVYRACVTRGSDVLSHTEPESLRESEEPD	131
SEP1	ELSPGCVTHIRSRVYRACVTRGSDVLSHTEPESLRESEEPD	132
SEP2	ELSPGCVTHIRSRVYRACVTRGSDVLSHTEPESLRESEEPD	132
Consensus	elspgcvthirsrvyracvtrgsgdvlsh	
SEP1	DSSKCHIRAIYVYRFDLQVLAQVGRMVFETDK.TTRLELADG	177
AGL3	DSSKCHIRAIYVYRFDLQVLAQVGRMVFETDK.TTRLELADG	175
AGL6	DSSKCHIRAIYVYRFDLQVLAQVGRMVFETDK.TTRLELADG	172
AGL13	DSSKCHIRAIYVYRFDLQVLAQVGRMVFETDK.TTRLELADG	170
ptMADS4.seq	DSSKCHIRAIYVYRFDLQVLAQVGRMVFETDK.TTRLELADG	175
SEP1	DSSKCHIRAIYVYRFDLQVLAQVGRMVFETDK.TTRLELADG	175
SEP2	DSSKCHIRAIYVYRFDLQVLAQVGRMVFETDK.TTRLELADG	175
Consensus	dsskchiraiyvyrfdlqlavlaqvgrmv	
SEP1	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	219
AGL3	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	187
AGL6	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	219
AGL13	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	214
ptMADS4.seq	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	215
SEP1	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	219
SEP2	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	218
Consensus	y.cmplicanpn..cqvvdygrhhqccvafv	
SEP1	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	249
AGL3	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	187
AGL6	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	252
AGL13	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	244
ptMADS4.seq	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	245
SEP1	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	251
SEP2	Y.CMPLICANPN..CQVVDHYGRHHQCCVAFVCFEET	250
Consensus	y.cmplicanpn..cqvvdygrhhqccvafv	

图 2 PtMADS4 与拟南芥 SEP 类和 AGL6/AGL13 族蛋白序列之间的比较 序列比较所涉及的拟南 MADS 盒基因包括 SEP1 (At5g15800)、AGL3 (At2g03710)、SEP2 (At3g02310)、SEP3 (At1g24260) 和 AGL6 (At2g45650)。图中加黑部分为高度相似的氨基酸残基

用以上方法获得了长度为 1 041 bp 的 cDNA, 命名为 PtMAD4 (Populus tomentosa MADS box gene 4), 在 GenBank 中的登记序列号为 (DQ789398)。该基因具有一个 729 bp 的完整的读码框(ORF) (82-819), 所编码的蛋白含有 243 个氨基酸残基。用 NCBI BLAST 工具推测出的蛋白序列显示 PtMADS4 为一 MADS 盒基因。由于 PtMADS4 氨基酸序列与拟南芥 MADS 盒基因 AGL6/SEP 分支同源性最高, 把 PtMADS4 蛋白与拟南

芥 AGL6/SEP 分支的 MADS 盒蛋白比较(图 2), 结果显示 PtMAD4 与这一分支的蛋白序列高度同源。

用 DNAman 4. 0 软件对 PtMADS4 与拟南芥 AGL6/SEP 分支的 MADS 盒基因的氨基酸序列进行同源分析(图 3), 所产生的同源树显示, 在蛋白水平上 PtMADS4 与 SEP1 和 SEP2 最为相似。因此, 从序列上, 与 SEP1 和 SEP2 相同性最高, 同源性为 78%, 初步可以判断 PtMADS4 为 SEP 类基因的同源基因。

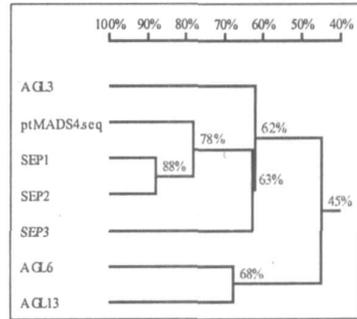


图 3 毛白杨 PtMADS4 基因的蛋白序列的同源树分析。PtMADS4 与拟南芥 SEP 类和 AGL6/AGL13 族蛋白序列的同源树分析。有关的拟南芥 MADS-box 基因同图 2。标尺所标出的为相似性。

3 讨论

由于木本植物生命周期长, 研究其花器官发育有很大的困难, 杨属植物作为木本植物生物学的模式植物, 也不例外, 研究资料较少。与花器官发育研究的模式植物比较, 杨属的单体无被花具有其特殊的结构特点, 开展对其花器官形成的研究有很大的意义。

为了解 MADS 盒基因在杨树花器官发育中的功能, 因此分离出 PtMADS4, 从基因的蛋白序列比较结果上可以判断其与拟南芥 SEP 类基因同源。由于拟南芥 SEP 类基因属于 MADS 盒基因家族, 其进一步的归类主要是基于 C 区的序列特征和它们的功能^[4]。PtMADS4 与拟南芥 SEP 类基因的蛋白序列之间存在一定的差异, 反映出在不同的植物种类中, SEP 类基因的分化, 可能它们功能也存在着差异。拟南芥的 SOC1 基因具有促进植物开花的作用。这对深入研究 PtMADS4 基因的功能指明了一个方向。今后尚需构建正义和反义表达载体, 转化毛白杨植株, 进一步研究该基因在毛白杨开花过程中的作用。

参考文献

[1] Coen E S, Meyerowitz E. The war of the whorls: Genetic interactions controlling flower development[J]. Nature 1991, 353: 31-37.

[2] Theissen G. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house[J]. Curr Opin Plant Biol 2001(4): 75-85.

[3] Honma T, Goto K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs[J]. Nature 2001, 409: 525-529.

[4] Litta A, Inish V F. Duplication and diversification in the APETALA1/FRUITFULL floral Homeotic gene lineage. Implications for the evolution of floral development[J]. Genetics 2003, 165: 821-833.

三种不同基质草花育苗效果研究

张华丽, 董爱香, 张西西

(北京市园林科学研究所, 100102)

摘要: 比较了 A(自配基质)、B(进口专用育苗基质)和 C(醋糟基质) 3 种基质理化性状差异, 分析了万寿菊、一串红、矮牵牛在 3 种基质上的生长差异。结果表明: 3 种草花在基质 C 中发芽效果均差, 其中矮牵牛发芽率仅为 32%。万寿菊和 一串红种苗在基质 C 中生长最快, 其次为基质 B。矮牵牛在基质 B 中发芽和生长表现都最好, 其次为基质 A。并分析了其差异产生的原因。

关键词: 基质; 草花; 穴盘苗

中图分类号: S 681.04⁺.3 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2007)07-0151-03

在工厂化育苗中, 选用优质、廉价的育苗基质是培育壮苗、降低成本的关键性技术之一。目前用于草花穴盘育苗的基质材料除了草炭、蛭石、珍珠岩外, 菌糠、腐叶土、处理后的醋糟、酒糟、锯末、玉米芯等均可作为基质材料。进口基质如伯爵和维生基质等, 因其良好的理化性质、保水透气, 育苗效果很好, 但价格昂贵; 利用国内现有材料进行新型基质的配制, 对促进基质国产化, 降低生产成本很有意义。然而取材不同, 配比不同影响基质的理化性状, 对不同草花育苗效果也不同。试验比较了以醋糟、草炭为主配制的基质和进口专用育苗基质育苗效果, 为研制草花专用工厂化育苗基质提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

选用 3 种基质为: A: 东北草炭和蛭石为 4:1 配比;

B: 从加拿大伯爵公司购买的育苗专用基质; C: 醋糟基质, 由中国农业大学研制, 以酿造山西陈醋的副产品—醋糟为主要原料, 经过科学加工配制而成。3 种草花种子选用北京园林科研所培育的万寿菊、一串红、矮牵牛。

1.2 试验方法

3 种基质分别装入 200 孔穴盘中, 每种草花播种 1 盘。苗期水分管理以见干见湿为准。每周交替施用 14-0-14 和 20-10-20 肥 1 次, 第一、二阶段施肥浓度为 50 mg/kg, 第三、四阶段施肥浓度为 100 mg/kg。

1.3 测定指标

基质容重和孔隙度测定方法参考土壤农化分析书^[1-3], 并做了适当的调整。具体测定方法为: 容重: 取自然状态下的基质均匀地装在 1 000 mL 的烧杯中, 装基质时应装满烧杯, 然后在桌面上轻轻蹲几下, 不能用手压, 再用小刀沿烧杯边缘将多余的基质去掉抹平, 然后放入 80℃ 的恒温烘箱中烘干至恒重后, 取出称重 (W_1), 然后将烧杯中的基质倒出, 称烧杯重 (W_2), 用体积法测定烧杯的体积 (V), 3 次重复, 则容重 = $(W_1 - W_2) / V$ 。充气孔隙度 (AFP) 和容水量 (CC): 将 72 孔穴盘剪成每 2 穴格为一单位, 底部用 0.5 mm 的细沙网覆盖, 装填基

第一作者简介: 张华丽 (1978-), 女, 硕士, 助理工程师, 研究方向为花卉育种, 现从事花卉杂交种工作。E-mail: hhyf2004@sina.com。

基金项目: 北京市科学技术委员会项目资助 (D0705003040221)。

收稿日期: 2007-03-22

Cloning and Sequencing of PtMADS4 Gene of *Populus Tomentosa*

LI Qing, YU Zhen-zhen, LI Jing, GUO Wei, FAN Jin-hui

(Forestry Department of Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: MADS-box transcription factors are key regulators of several plant development processes. A novel MADS-box gene named PtMADS4 was cloned from poplar by PCR Amplification method. PtMADS4 is 1 041 bp long and encodes 245 amino acids. The putative protein encoded by this gene contains a typical MADS-box domain and a complete K box. Phylogenetic analysis showed that the sequenced region of PtMADS4 had high degree of homology with sep1 (78%) and sep2 (78%).

Key words: *Populus tomentosa*; MADS-box gene; Homology tree analysis