

# 板栗 *MADS-box* 基因的分离及 RNAi 表达载体构建

李琳玲<sup>1,2</sup>, 廖志琴<sup>1,2</sup>, 陈小玲<sup>1,2</sup>, 程水源<sup>1,3</sup>, 程 华<sup>1,2</sup>

(1. 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室, 湖北 黄冈 438000; 2. 黄冈师范学院 生命科学学院, 湖北 黄冈 438000;

3. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023)

**摘 要:**以中国罗田板栗品种“玫瑰红”的幼叶和花为试材, 采用 EST 数据库分析, 结合 RACE 技术从板栗中分离到 *MADS* 基因的 cDNA 全长序列并构建了其 RNA 干扰载体, 研究开花关键基因对板栗花芽分化的影响。结果表明: *CmMADS* 基因全长为 922 bp 的 *CmMADS* 的 cDNA 序列, 该序列含有 1 个 681 bp 的可读框, 编码 227 个氨基酸序列。生物信息学预测 *CmMADS* 蛋白的分子质量为 25.87 kDa, 理论等电点为 6.27, N 端具有 M 盒保守序列, 其二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲组成。蛋白质同源分析表明, *CmMADS* 含有 M 盒和 K 盒 2 个特征性序列区域。同源建模分析显示 *CmMADS* 序列与苹果 *MADS* 蛋白的三维结构及活性位点高度相似。系统进化分析表明, 板栗 *MADS* 蛋白归属植物进化分支, 且与太行花的 *MADS* 蛋白归为一支。将 *CmMADS* 基因 2 段相同长度(283 bp)的反向互补片段 *RMADS* 和 *FMADS* 连入载体 pBluescript SK plus, 构成中间载体 pBluescript SK plus-FR。用 *Ban*HI 和 *Kpn*I 同时酶切中间载体 pBluescript SK plus-FR 和植物表达载体 pC1301-ubi, 回收 pBluescript SK plus-FR 的酶切小片段, 连入 pC1301-ubi 大片段中, 构成植物表达载体 pC1301-ubi-*CmMADS*-RNAi。下一步拟用构建好的 RNA 干扰载体转化农杆菌并由其介导将重组质粒转入烟草, 为深入研究该干扰载体的功能及 *CmMADS* 基因的功能提供参考。

**关键词:**板栗; *MADS-box* 基因; 开花; 成熟期

**中图分类号:**S 664.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0092-07

板栗(*Castanea mollissima*)属壳斗科栗属, 是我国传统的特产干果之一, 分布于北半球的亚洲、欧洲、非洲和

**第一作者简介:**李琳玲(1981-), 女, 湖北十堰人, 博士, 讲师, 现主要从事板栗种质资源评价与改良等研究工作。E-mail: lilinling1437@126.com.

**责任作者:**程水源(1965-), 男, 湖北天门人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事经济林木种质资源评价与利用等研究工作。E-mail: s\_y\_cheng@sina.com.

**基金项目:**湖北省自然科学基金重点资助项目(2010CBB03901); 湖北省教育厅高校产学研合作重点资助项目(C2010060); 2011 中央财政林业科技推广示范资助项目(2011BH0032)。

**收稿日期:**2014-09-09

美洲大陆<sup>[1-2]</sup>。中国板栗营养价值丰富, 口感良好, 囊皮易于脱落, 在国际市场上具有较强竞争力。发展板栗生产不仅具有较高的经济效益, 而且具有良好的生态效益<sup>[3]</sup>。虽然我国是板栗生产的传统大国, 在板栗栽培技术方面积累了较为丰富的经验, 但对板栗生产中长期存在的雄花量过大、雌花量不足(雌雄花比例通常为 1:2 000~1:3 000)的问题一直未能得到很好地解决, 导致单产低、效益差, 严重制约了板栗产业的健康发展<sup>[4]</sup>。

开花是高等植物从营养生长转向生殖生长的一个重要的生理过程, 开花既受外界环境因素的影响, 又受内在基因的调控, 研究表明, 在植物成花转变过程中, 植物的 *MADS-box* 基因网络起着非常关键的作用, 植物依

## Genetic Diversity of Total Flavonoids in Leaves of Hawthorn (*Crataegus* spp.)

ZHAO Yu-hui, WANG Gang, SU Kai, GUO Yin-shan, DONG Wen-xuan

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract:** Taking 135 germplasm resources which belong to 8 kinds species come from National Hawthorn Germplasm Nursery of Shenyang as materials, using  $\text{NaNO}_2$ - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - $\text{NaOH}$  colorimetry to research the total flavonoids and the genetic diversity of hawthorn. The results showed that the flavonoid content of hawthorn possesses abundant variation, and the variable coefficient was 57.07%, the variatble amplitude was 0.25%—11.65%. It was found that some valuable leaf resources through comparative study for the flavonoids in hawthorn.

**Keywords:** hawthorn leaves; total flavonoid content; genetic diversity

靠此基因网络调节自身的发育转化, *MADS* 盒基因是一类重要的转录调控因子。在植物中从根、茎、叶到花的发育、果实的成熟, *MADS-box* 基因均起作用, 尤其是在开花植物中花的发育、开花时间的控制等方面起着重要的作用; 同时也参与调节营养生长<sup>[5]</sup>、子房发育、种皮发育、根的形成<sup>[6-7]</sup>、胚形态建成和共生诱导<sup>[8]</sup>。研究板栗 *MADS-box* 基因的分子生物学基础, 对于解释不同品种间开花时间差异、果实成熟等具有重要的理论意义。另外, 对板栗 *MADS-box* 基因的进一步研究, 可为后期遗传操作及品种改良提高板栗产量及延长板栗货架期提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

板栗幼叶、花采自黄冈师范学院板栗苗圃园, 品种为罗田板栗主栽品种“玫瑰红”2年生实生苗。采后自封袋封装, 于-80℃冰箱中冷冻保存。试验所用的大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 Top10 为该实验室保存。

总 RNA 提取液有 100 mmol/L Tris-Base (pH 8.0)、50 mmol/L EDTA、4 mol/L NaCl、20 g/L PVP、20 g/L CTAB。β-巯基乙醇 2.5 mL/100mL, 亚精氨 100 mmol/L, 其它有机试剂氯仿、异戊醇、无水乙醇等均为国产分析纯, DEPC 为进口试剂。反转录酶、RACE Kit、ExTaq DNA 聚合酶、PCR 产物克隆载体 pMD18-T Vector、dNTP、DL2000、T4 DNA polymerase 和 T4 DNA Ligase 均购自大连宝生物工程有限公司; DNA 回收试剂盒为 Axygen 公司产品。载体 pEASY-T1simple 和 pBluescript SK plus 购自北京全式金生物公司。各种寡核苷酸序列由上海生物工程有限公司合成。反转录 cDNA 合成及 RACE 参照试剂盒说明书, 引物见表 1。

表 1 板栗 *MADS* cDNA 扩增及 RACE 引物序列

Table 1 The primers of amplification for *CmMADS* gene

引物名称	编号	序列
Primer name	No.	Sequence
筛选引物 Screening primer	MADU1	5'-TAACCTTTGCTTTTGCTCATAC-3'
	MADD1	5'-TTTCTTTCTATCACACGGGTCAA-3'
	MADU2	5'-CTGTGCTTTGTGATGCTGATGTT-3'
	MADD2	5'-ACTCAGTGCCAATGTGTCTTCG-3'
3'-RACE	3'CDS	5'-AAGCAGTGGTATCAACGAGAGTAC (T30VN)-3'
	MAD1	5'-TTGATGGAAGAGAATGAGCGAT-3'
	MAD2	5'-CTGAGGCAGATGAGAGGAGAAGAGC-3'
	MAD3	5'-ATCTACCACTTGCCGTCTTAATGCGTC-3'
5'-RACE	MAD4	5'-TTTCTATCACACGGGTCAATCCA-3'
	PS1	5'-GAATTCCTTTCTATCACACGGGTCAATC-3'
干扰载体引物 The RNAi interference primer RNAi	PS2	5'-AAGCTTGATAATGAGAGCAACATCAGCA-3'
	PA1	5'-CTCGAGCAAGGATTAAATGTGGAAGAAC-3'
	PA2	5'-GGTACCAATTGATGGAAGAGAATGAGCG-3'

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取、cDNA 合成 板栗总 RNA 的提取参照王滨蔚等<sup>[9]</sup>的 CTAB 法操作。

1.2.2 RNA 干扰载体 pC1301-ubi-CMMADS-RNAi 的构建 RNA 干扰(RNAi)植物表达载体 pC1301-ubi-CmMADS1 的构建参考代小梅<sup>[10]</sup>的方法流程: 首先选择板栗 *CmMADS* 基因的开放阅读框内 283 bp 的片段将其构建成为回文序列, 其次在 2 对引物前加上设计好的定向酶切位点, 再将该片段以特定的方向链接到预备好的载体上。以连接板栗 cDNA 为模板进行 PCR, PCR 产物分别命名为反向片段 Rflc 和正向片段 Fflc, 并分别连入 pEASY-T1simple 载体, 获得重组载体 pEASY-T1-F 和 pEASY-T1-R, 用 EcoRI 和 HindIII 同时酶切中间载体 pBluescript SK plus 和重组载体 pEASY-T1-F, 回收 pEASY-T1-F 的酶切小片段, 连入 pBluescript SK plus 中, 构成中间载体 pBluescript SK plus-F, 再用 XhoI 和 KpmI 同时酶切中间载体 pBluescript SK plus-F 和重组载体 pEASY-T1-R, 回收 pEASY-T1-R 的酶切小片段, 连入 pBluescript SK plus-F, 构成中间载体 pBluescript SK plus-FR。用 BanHI 和 KpmI 同时酶切中间载体 pBluescript SK plus-FR 和植物表达载体 pC1301-ubi, 回收 pBluescript SK plus-FR 的酶切小片段, 连入 pC1301-ubi 大片段中, 构建植物表达载体 pC1301-ubi-CMMADS1-RNAi。

1.2.3 植物表达载体 pC1301-ubi-CmMADS-dsRNAi 质粒的农杆菌转化 将构建好的植物表达载体 pC1301-ubi-CmMADS1-RNAi 进行质粒提取。pC1301-ubi-CmMADS1-RNAi 质粒的农杆菌转化方法参照 Li 等<sup>[11]</sup>方法: 将质粒与农杆菌感受态细胞分别置冰上溶解。取 5 μL 表达载体(质粒 DNA), 加入 200 μL 感受态细胞, 冰浴 5 min 后置液氮中冷冻 1 min, 37℃ 恒温水浴 5 min。加入 YEB 培养液 800 μL, 28℃ 恒温下 200 r/min 振荡培养 4~5 h。将菌液涂布于含 1 倍抗生素(1 mL 50 mg/mL Rif, 1 mL 50 mg/mL Kan)的 YEB 固体选择培养基上。倒置, 暗培养 1~2 d。表达载体转化农杆菌后, 经检测并保存, 待用于农杆菌介导转基因。

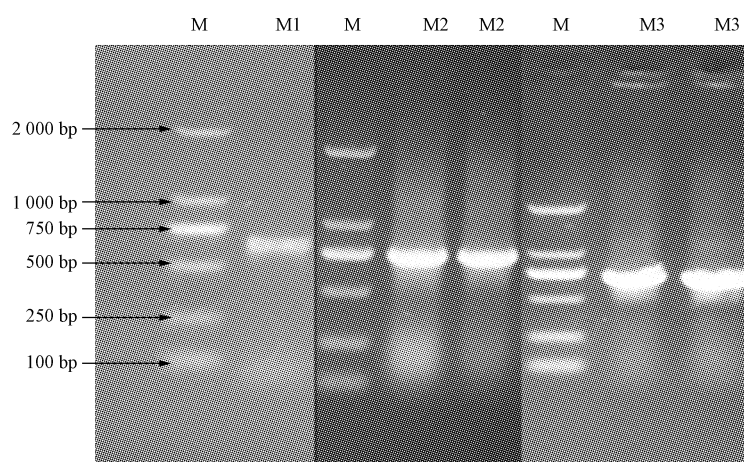
## 2 结果与分析

### 2.1 *CmMADS* 基因 cDNA 序列全长克隆及拼接

将板栗总 RNA 进行反转录 PCR, 获得 cDNA, 特异引物筛选扩增, 获得板栗 *MADS-box* 基因 cDNA 的中间片段, 电泳检测结果如图 1-M1 所示, 切胶回收得 700 bp 左右的条带, TA 克隆后, 送出测序。在第 1 次反转录 PCR 获得板栗 *MADS-box* 基因 cDNA 部分片段的基础上设计 RACE 引物, 在序列 5'端设计 5'RACE 内(Inner)

外(Outer)引物,在3'端设计3'RACE内(Inner)外(Outer)引物,利用RACE试剂盒分别进行5'端和3'端的扩增。5'RACE扩增得到750 bp左右的片段(图1-M2),所得5'RACE序列与候选靶序列比对,确认为同一基因。3'RACE扩增得到750 bp左右的目的片段(图1-M3),所得3'RACE序列与候选靶序列比对,确认为同一基因。将2次RACE产物和第1次cDNA扩增到的中间产物序列使用Vector NTI软件进行序列拼接,获得1条长为922 bp的cDNA序列。板栗MADS基因cDNA全长序列,通过FGENESH程序中的ORF Finder程序分析预

测基因开放阅读框,该cDNA序列包含起始和终止密码子(分别为ATG和TAA),从169~850 bp区域为1个681 bp长度的ORF,编码1个由227个氨基酸组成的蛋白质,将编码氨基酸序列提交NCBI蛋白质数据库比对,初步确认其为MADS-box基因家族。在MADS-box基因起始密码子ATG的上游具有1个符合读框的终止密码子,在cDNA序列的3'末端还发现了1个多聚腺苷酸(polyA)加尾信号,判断其为板栗MADS全长的cDNA序列。



注:M;DNA marker;M1;第1次反转录中间产物;M2;5'RACE扩增产物;M3;3'RACE扩增产物。

Note:M;DNA marker;M1;The first reverse transcription sequence;M2;The 5'RACE sequence;M3;The 3'RACE sequence.

图1 板栗MADS基因cDNA全长扩增

Fig. 1 The amplification of MADS gene cDNA sequence

## 2.2 CmMADS蛋白质序列结构特征分析

板栗MADS基因完整ORF长681 bp,编码277个氨基酸(图2),相对分子质量为25.87 kDa,理论等电点为6.27。预测氨基酸序列中,含量最高的为谷氨酸(Glu,28个,占12.3%),其次是亮氨酸(Leu,27个,占11.9%)和丝氨酸(Ser,26个,占11.5%);酸性残基(Asp,Glu)总数37个,碱性残基(Arg,Lys)总数35个;总亲水性平均系数为-0.771。Prosite数据库比对发现板栗CmMADS蛋白质序列的1~61氨基酸位(氨基酸序列MAREKIQIKKIDNATARQVTFKRRRGLFKKAEEL-SVLCADADVALIIFSSTGKLFYSSSS)为MADS-box结构域,即MADS盒区,位于氨基酸序列N端的高度保守区,是与DNA结合的区域,参与同源二聚体的形成;另外该蛋白质序列的86~176氨基酸位(氨基酸序列QL-VENSNSRSLKEIAEKSHQLRQMRGEELQGLNVEE-

LQQLERSLESGLTRVIERKGEKIMKEINDLQRKGM-QLMEENERLRRQVVDISNG)为K-box结构域,典型的Type II型MADS-box基因都含有K盒区域,K区是植物MADS-box蛋白特有的,参与蛋白与蛋白的相互作用。SOPMA分析表明 $\alpha$ -螺旋(alpha helix,Hh)和无规则卷曲(random coil,Cc)是CmMADS蛋白质二级结构的主要成分,组成 $\alpha$ -螺旋、无规则卷曲、延伸链、 $\beta$ -转角的氨基酸比例分别是59.47%、29.07%、8.37%和3.08%。

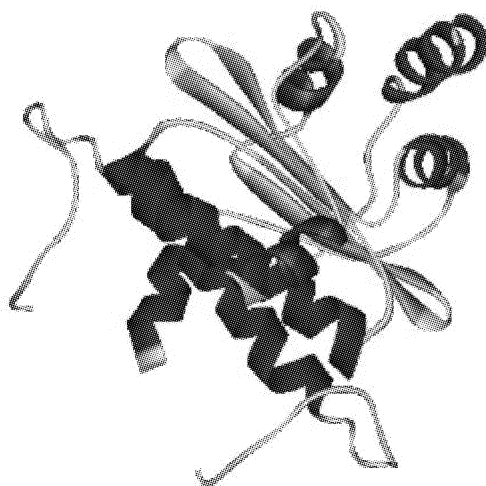
在SWISS-MODEL服务器上搜索显示板栗MADS蛋白序列与苹果(*Malus domestica*)MADS蛋白同源性最高(PDB ID:5YRS),为65.6%。以此结构为模型,构建CmMADS蛋白的三维结构(图3)。同源建模结果显示QMEAN4分值为0.62,表明模拟得到的CmMADS蛋白质三维结构是可靠的。



```

1  CCCCCAAACA GCAAACTAGG GTTAGTGCTC AGATTCTTGA CTAAATTCGG CAACTTGCTG
61  CCAGTTTAAC CTTTGCTTTT GCCTCATACA AGCGCTCTAT ATATAGCAAC TACCCTGCCT
      M A R E
121 TTTGTGTAAG GCTTTGTTCT AGGTAAAAGT TGGAGGAGAA GAAGAAGAT GCGAGAGAG
      K I Q I K K I D N A T A R Q V T F S K R
181 AAGATTCAGA TCAAGAAGAT TGACAACGCC ACAGCTAGGC AAGTCACTTT CTCGAAGAGG
      R R G L F K K A E E L S V L C D A D V A
241 CGAAGAGGGC TTTTAAAGAA AGCTGAGGAG CTATCTGTGC TTTGTGATGC TGATGTTGCT
      L I I F S S T G K L F E Y S S S S M K E
301 CTCATTATCT TTTCTTCTAC TGGAAAGCTC TTTGAGTACT CCAGCTCAAG CATGAAGGAA
      I L E R H N L H S K N L E K L D Q P S L
361 ATACTAGAGA GACATAATTT GCACTCAAAG AACCTTGAGA AACTGGATCA ACCATCTCTT
      E L Q L V E N S N Y S R L S K E I A E K
421 GAGTTGCAGC TAGTAGAGAA CAGCAACTAC TCCAGATTGA GCAAGGAAAT TGCAGAGAAA
      S H Q L R Q M R G E E L Q G L N V E E L
481 AGCCATCAGC TGAGGCAGAT GAGAGGAGAA GAGCTTCAAG GATTAAATGT GGAAGAAGTG
      Q Q L E R S L E S G L T R V I E R K G E
541 CAACAGCTAG AGAGGTCAGT GGAATCTGGA TTGACCCGTG TGATAGAAAG AAAGGGTGAG
      K I M K E I N D L Q R K G M Q L M E E N
601 AAGATTATGA AAGAGATAAA TGATCTTCAA AGAAAGGGGA TGCAATTGAT GGAAGAGAAT
      E R L R R Q V V D I S N G R R H I G T E
661 GAGCGATTAA GACGGCAAGT GGTAGATATA TCTAATGGCC GAAGACACAT TGGCACTGAG
      S E N L I A E E G Q S S E S V T N V C N
721 TCAGAGAATT TGATTGCTGA GGAAGGCCAG TCATCAGAGT CTGTCACTAA TGTCTGCAAC
      S T G A P H D Y D S S D T S L K L G L P
781 TCCACTGGTG CCCCTCATGA CTATGACAGC TCAGATACAT CCCTCAAGTT AGGGCTACCC
      Y S G
841 TACTCTGGG TGAACGCTTGG AGGAGATTAC GAAGCAAAAC AAATATCTAA AAAAAAAAAA
901 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA

```

图2 板栗 *MADS1* 基因的 cDNA 序列及 ORF 编码氨基酸序列Fig. 2 The full length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *CmMADS* ORF图3 板栗 *CmMADS* 蛋白质三级结构预测图Fig. 3 Theoretical tertiary structure of *CmMADS* protein2.3 *CmMADS* 蛋白质同源性分析与系统进化树构建

Blast 结果显示板栗 *CmMADS* 蛋白质序列与已知报道的大豆(*Glycine max*, *GmMADS*, NP-001240951)、苹果(*Malus domestica*, *MdMADS*, ADL36738)、葡萄(*Vitis vinifera*, *VvMADS*, CBI38273)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*, *MtMADS*, AES96044)、台湾泡桐(*Paulownia*

*kawakamii*, *PkMADS*, AAF22455)、甘薯(*Ipomoea batatas*, *IbMADS*, BAC15561)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*, *GhMADS*, AGW23342)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, *AtMADS*, AFU85641)等 8 种高等植物的 *MADS* 蛋白质的一致性分别达到 85%、85%、84%、81%、80%、80%、78%、75%(图 4)。多序列同源性比对分析结果表明,不

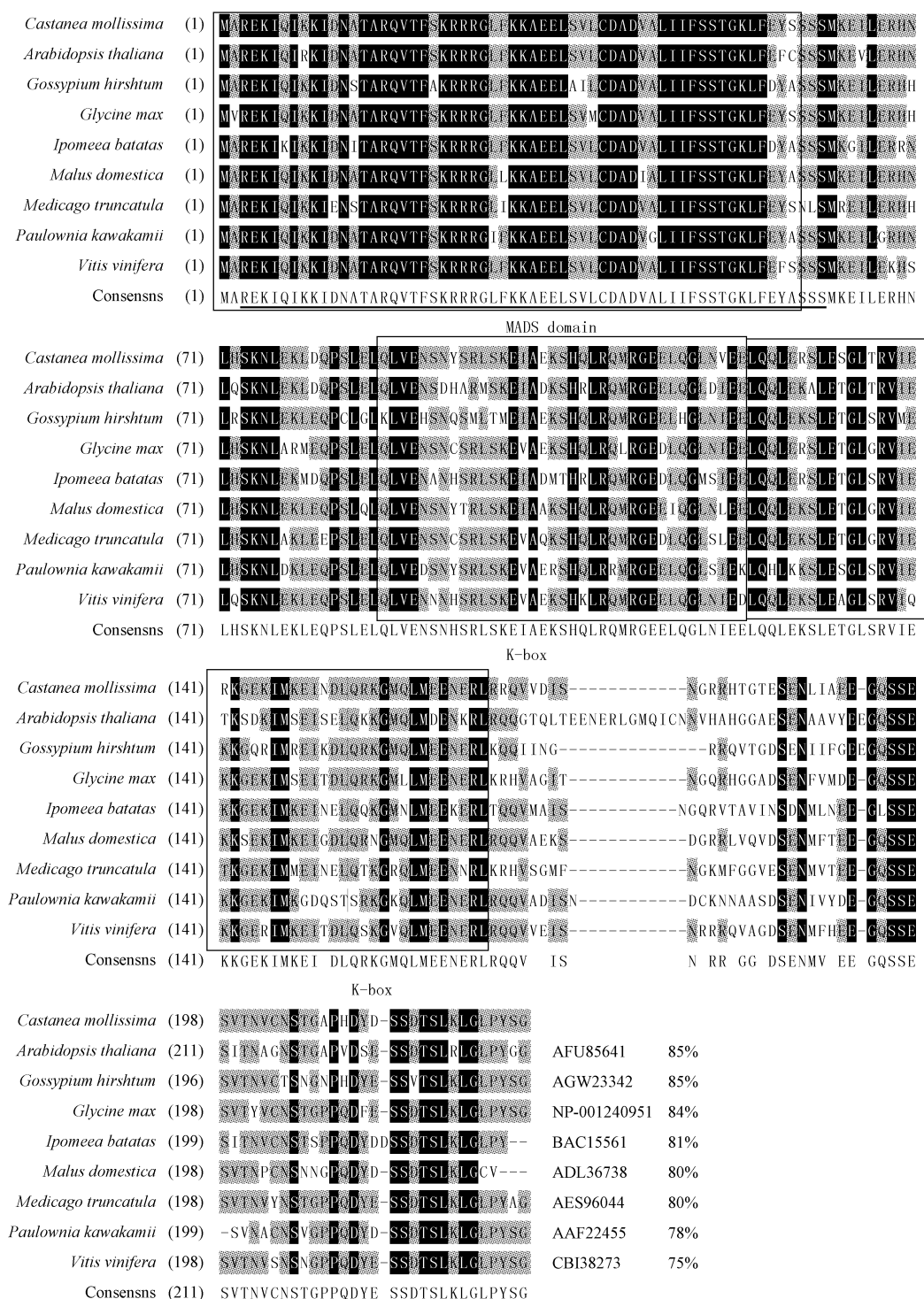


图4 不同物种 MADS 蛋白质的同源比较

Fig. 4 Homology analysis of MADS in different species

同植物来源的 MADS 蛋白质的 N 末端保守性强, C 末端差异很大。CmMADS 蛋白为 MADS-box 基因家族转录子蛋白, 所以包含 MADS 区域(图 4)。

CmMADS 氨基酸序列比较结果来看, 该序列分别在 86 bp 和 132 bp 处含有 M 盒和 K 盒 2 个 Type II 型 MADS-box 基因的保守序列, 说明 CmMADS 基因属于

Type II 型 MADS-box 基因。

CmMADS 蛋白是 MADS-box 基因家族的转录子蛋白, 由于 MADS-box 基因广泛存在于动植物基因组中, 分子进化表现复杂多样, 进化程度有高有低, 这导致用包括板栗 MADS 蛋白在内的来自多个植物科属的 12 种 MADS 蛋白进行系统进化树的构建时, 板栗 MADS 蛋

白处于其它物种进化分支的外群,这可能与选取的建树序列有一定的关系,由板栗 *MADS* 蛋白的建树情况可知,板栗作为壳斗科的植物,与其它不同科属植物在 *MADS-box* 基因的分子进化上差异较大(图 5)。

#### 2.4 pC1301-ubi-*CmMADS*-RNAi 干扰载体构建

2.4.1 中间载体 pBluescript SK plus-FR 的构建 运用基因重组技术,利用分别设计好的引物 PS1、PS2 和引物 PA1、PA2 分别扩增板栗叶片 cDNA,得到 2 段相同长度(283 bp)的反向互补片段 RMADS 和 FMADS,分别将反向片段 RMADS 和正向片段 FMADS 连入载体 pBluescript SK plus,构成中间载体 pBluescript SK plus-FR。用 *EcoR* I 和 *Kpn* I, *Xho* I 和 *Kpn* I 同时酶切中间载体 pBluescript SK plus-FR 验证片段 RMADS 和 FMADS 确实按照正确的方向连接入中间过度载体。

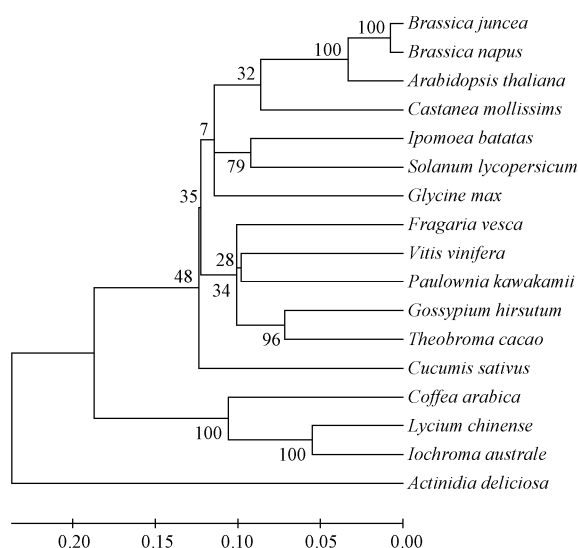


图 5 不同物种 *MADS* 蛋白序列的系统进化树构建

Fig. 5 Phylogenetic tree of plant *MADS*

#### 2.4.2 表达载体 pC1301-ubi-*CmMADS*-RNAi 的构建

用 *Ban*H I 和 *Kpn* I 同时酶切中间载体 pBluescript SK plus-FR 和植物表达载体 pC1301-ubi,回收 pBluescript SK plus-FR 的酶切小片段,连入 pc1301-ubi 大片段中,构成植物表达载体 pC1301-ubi-*CmMADS*-RNAi,能够切出发夹结构的功能片段,酶切证明载体 pC1301-ubi-*CmMADS*-RNAi 构建成功。

#### 2.5 RNA 干扰载体 pC1301-ubi-*CmMADS*-RNAi 转化农杆菌

由于试验后期时间有限,构建成功的 RNA 干扰载体还没来得及转化农杆菌,拟将构建好的 RNA 干扰载体通过转化农杆菌,用获得的转化子侵染烟草,对 pC1301-ubi-*CmMADS*-RNAi 干扰载体进行功能分析。

### 3 讨论

*MADS-box* 是植物中一类重要的转录调控因子,在植物中参与花器官的发育,开花时间的调节,在果实、根、茎、叶的发育中都起着重要作用<sup>[12]</sup>。该研究采用反转录及 RACE 技术从板栗叶片总 RNA 中扩增、拼接得到 *CmMADS* 基因 cDNA 的全长序列,序列全长为 922 bp,分析发现,该 cDNA 序列从 169~850 bp 区域为 1 个 681 bp 长度的 ORF,编码 1 个由 227 个氨基酸组成的蛋白质,相对分子质量为 25.87 kDa,理论等电点为 6.27。*MADS-box* 基因在现存的动物、植物和真菌中分为两大类:I 型 *MADS-box* 基因和 II 型 *MADS-box* 基因。它们的共同特点是都含有 1 个高度保守的 *MADS-box* 结构域<sup>[13]</sup>。由 *CmMADS1* 预测的氨基酸序列比较结果来看,该序列含有 M 盒和 K 盒 2 个 Type II 型 *MADS-box* 基因的保守序列,说明板栗 *CmMADS1* 基因属于 Type II 型 *MADS-box* 基因家族。

在拟南芥、番茄、桃等植物中,*MADS-box* 基因在果实的形成中起重要作用。在桃中,C 功能 *MADS-box* 基因 *PLENA* 亚家族的 *PpPLENA* 基因在花和中果皮发育中表达,果实成熟过程中表达量增加,在转基因番茄中,使萼片转变成心皮状结构,形成肉质并像真正的果实一样成熟。组成型表达 *PpPLENA* 基因的转基因植株表现为果实加速成熟<sup>[14]</sup>。果实形态的建成是开花植物所特有的,受精后,果实经历一个许多细胞膨大的过程。*MADS-box* 家族中,AGL8/FUL 调节果实和叶发育中细胞分化必须基因的表达<sup>[15]</sup>。板栗 *MADS1* 基因 cDNA 全长序列的分离,证实了板栗中该基因的存在,意味着板栗开花及果实的成熟受到该基因的调节。后期对板栗不同器官,不同时期的 *MADS-box* 基因的表达分析及 *CmMADS* 基因干扰表达载体的构建转化,将有利于阐明该基因在板栗开花时间、雌雄花芽分化比及果实成熟等生理现象中的作用,以期为板栗花发育的遗传改良提供理论依据。我国板栗品种繁多,各地栽培品种成熟期跨度较大,如能有效延长板栗不同品种间的成熟时间,将有效提升板栗的商品价值。

#### 参考文献

- [1] 冯学文. 实用果树栽培技术[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1993.
- [2] 张宇和, 王福堂, 高新一. 板栗[M]. 北京: 中国林业出版社, 1989.
- [3] 姜德志, 程水源, 王燕, 等. 罗田 3 个板栗栽培品种主要营养成分分析[J]. 湖北农业科学, 2012, 50(23): 4882-4884.
- [4] 郭成圆. 板栗花芽分化及内源激素变化的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [5] Chloe D M, Vivian F I. Two GATA transcription factors are downstream effectors of floral homeotic gene action in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2008, 147(2): 707-718.
- [6] Ku A T, Huang Y S, Wang Y S, et al. IbMADS1 (*Ipomoea batatas MADS-box 1* gene) is involved in tuberous root initiation in sweet potato[J].

Annals of Botany, 2008, 102(1): 57-67.

[7] Reyes B, Edelin R, Cristina F, et al. Analysis of B function in legumes; PISTILLATA proteins do not require the PI motif for floral organ development in *Medicago truncatula*[J]. The Plant Journal, 2009, 60(1): 102-111.

[8] Lydia G, Gunter T. Phylogenomics of MADS-box genes in plants two opposing life styles in one gene family[J]. Biology, 2013, 2(3): 1150-1164.

[9] 王滨蔚, 车鹏燕, 何承忠, 等. 板栗子叶总 RNA 提取方法研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(22): 34-38.

[10] 代小梅. 日本结缕草(*Zoysia japonica* Steud.) ZjGA20ox 基因表达模式及 RNA 干扰载体遗传转化体系研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2013.

[11] Li L L, Cheng H, Peng J Y, et al. Construction of a plant expression vector of chalcone synthase gene of *Ginkgo biloba* and its genetic transformation into tobacco[J]. Frontiers of Agriculture In China, 2010, 4(4): 456-462.

[12] 王力娜, 范术丽, 宋美珍, 等. 植物 MADS-box 基因的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(8): 12-19.

[13] Nam J, Kim J, Lee S. Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(7): 1910-1915.

[14] Tadiello A, Pavanello A, Zanin D et al. A PLENA-like gene of peach is involved in carpel formation and subsequent transformation into a fleshy fruit [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(2): 651-661.

[15] Ferrandiz C, Liljegren S J, Yanofsky M F. Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during Arabidopsis fruit development[J]. Science, 2000, 289(5478): 436-438.

## Molecular Cloning and RNAi Expression Vector Construction of MADS-box Gene from *Castanea mollissima*

LI Lin-ling<sup>1,2</sup>, LIAO Zhi-qin<sup>1,2</sup>, CHEN Xiao-ling<sup>1,2</sup>, CHENG Shui-yuan<sup>1,3</sup>, CHENG Hua<sup>1,2</sup>

(1. Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Utilization of Resources of Hubei Key Laboratories, Huanggang, Hubei 438000; 2. College of Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 3. School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023)

**Abstract:** Taking the flowers and leaves of chestnut ‘Meiguishong’ as materials, the cDNA sequence of MADS gene was isolated from the flowers and leaves according to RACE technology and EST database from NCBI, plant expression vector of RNA interference pCl301-ubi-CmMADS-dsRNAi had also constructed by the MADS gene to study effect of blossom key gene on flower bud differentiation of Chinese chestnut. The results showed that, CmMADS was 922 bp containing an open reading frame(ORF) of 681 bp, which encoded 227 amino acids with a predicted molecular mass of 25.87 kDa and the theoretical isoelectric point(PI) of 6.27, CmMADS was an intro-free gene, and its deduced polypeptide contained a M box of 58 amino acids in the N terminal. The secondary structure of CmMADS was mainly composed of alpha helix and random coil. Comparative analysis showed that CmMADS had a high similarity to other plant MADS proteins, and contained all the M box and K box. The homology based structural modeling showed that CmMADS had the typical structure of *Malus domestica* MADS. Phylogenetic tree revealed that CmMADS and TrMADS3 were assigned to the same clade. Use *BanH I* and *Kpn I* and enzyme intermediate carrier pBluescript SK plus-FR and plant expression vector pCl301-ubi, recycling pBluescript SK plus-FR enzyme cut into small pieces, connected pCl301-ubi in larger pieces, a plant expression vector pCl301-ubi-CmMADS-dsRNAi. Next build good carrier of RNA interference and conversion of agrobacterium mediated by its putting the recombinant plasmid into tobacco, the function of the carrier for further study of the interference and CmMADS gene function.

**Keywords:** *Castanea mollissima*; MADS-box gene; flowering period; maturation stage