

日本晚樱 *PrseSHP* 基因的克隆与功能分析

刘志雄^{1,2}, 李来运¹, 李凤兰²

(1 长江大学 园艺园林学院, 湖北荆州 434025; 2 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要: 采用同源克隆方法结合 RACE 技术, 从日本晚樱 (*Prunus lannesiana*) 品种‘大岛樱’中克隆到花发育调控相关的 *PrseSHP* 基因 (GenBank 登录号为 GU362645)。*PrseSHP* 基因序列全长 1 223 bp, 包含 1 个长 741 bp 的完整开放阅读框, 编码 246 个氨基酸和 1 个终止密码子。分子系统发生分析表明, *PrseSHP* 属 MADS-box 转录因子的 PLE/SHP 进化系, 并与蔷薇科植物的 SHP 同源蛋白聚于同一进化分支; 蛋白序列比对显示, 该转录因子拥有 M、I、K 和 C 共 4 个结构域, 且其 C 末端结构域中包含高度保守的 AG I 和 II 基序。基因表达分析表明, *PrseSHP* 基因主要在‘大岛樱’的花瓣、雄蕊、雌蕊和幼果等器官中表达, 在花萼中仅能检测到微弱的转录信号, 在幼叶中不表达, 与其他植物 SHP 同源基因的表达模式有一定的差别。功能分析显示, 转 *PrseSHP* 基因拟南芥植株明显比野生型拟南芥弱小, 转基因拟南芥在 6~8 片莲座叶后即抽薹开花, 时间较野生型拟南芥 (14~17 片莲座叶后抽薹开花) 明显提前, 证明异位表达的 *PrseSHP* 基因能促进拟南芥早花, 其在花发育过程中可能参与调控植物开花。

关键词: 日本晚樱; 花发育; MADS-box; *PrseSHP*

中图分类号: Q786

文献标志码: A

Cloning and Function Identification of *PrseSHP* Gene from *Prunus lannesiana* (Rosaceae)

LIU Zhixiong^{1,2}, LI Laiyun¹, LI Fenglan²

(1 College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; 2 College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: Full cDNA of one MADS-box gene, *PrseSHP* with GenBank accession No. GU362645, was cloned from *Prunus lannesiana* using homologous cloning and RACE method. The full length of *PrseSHP* cDNA is 1 223 bp, containing an open reading frame (ORF) of 741 bp and coding for a polypeptide of 246 amino acid residues. Sequence and phylogenetic analyses grouped *PrseSHP* into PLE/SHP lineages of the MADS-box family. Conceptual translation revealed that *PrseSHP* contain MADS, I, K and C domains. Expression analysis suggested that *PrseSHP* expressed mainly in petal, stamen, gynoecium and young fruit of *P. lannesiana* ‘Makino’. Moreover, functional analysis suggested that transgenic *Arabidopsis* was obviously dwarf, and flowering during 6—8 rosette leaves, which was early than that of wild-type *Arabidopsis* who was flowering during 14—17 rosette leaves. Ectopic expression of *PrseSHP* could obviously promote flowering of transgenic *Arabidopsis*. Our results suggest that *PrseSHP* are involved in flowering in Cherry Blossom.

Key words: *Prunus lannesiana*; flower development; MADS-box; *PrseSHP*

日本晚樱 (*Prunus lannesiana*) 是蔷薇科 (Rosaceae) 著名的观赏花木。其花色艳丽, 冠型优美, 品种多, 适应性广, 观赏价值高, 被广泛用于城市园林景观建设^[1]。随着近年国内赏樱热持续升温, 选育或引进名优樱花品种, 增加城市园林多样性, 满足人

们对人居环境日益增长的审美需求显得尤为重要。中国樱花种质资源丰富, 开展樱花生殖发育调控研究, 对樱花杂交育种、遗传改良和种质创新等均有较重要的意义。在拟南芥中, *SHATTERPOOF* (*SHP*) 是参与调控雌蕊、子房、胚珠和果实发育的

收稿日期: 2015-05-15; 修改稿收到日期: 2015-07-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101202); 长江大学博士启动基金 (801190010118)。

作者简介: 刘志雄 (1977—), 男, 博士, 副教授, 主要从事园林植物分子育种研究。E-mail: zxliu77@yahoo.com

C 类 MADS-box 基因,并具有促进角果正常开裂的功能^[2]。近年研究发现,*SHP* 基因还参与调控植物的胎座发育^[3]。*FBP6* 是矮牵牛(*Petunia hybrida*) *SHP* 同源基因,其除参与调控心皮发育和果实开裂外,还具有调控雄蕊正常发育和决定花分生组织特征的功能^[4];本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)的 *SHP* 同源基因 *NbSHP* 与 *FBP6* 基因功能相似^[5-6]。但在茄科植物番茄(*Solanum lycopersicum*)中,其 *SHP* 同源基因 *TAGL1* 仅参与调控果皮的发育与果实的成熟,并不参与花分生组织特性决定,也未在雌蕊中表达^[6-7]。而豆科苜蓿属(*Medicago*)植物中的 *SHP* 同源基因有参与种间荚果形态分化的功能^[8]。蔷薇科植物桃(*Prunus persica*)的 *SHP* 同源基因 *PperSHP* 在成熟果实中的表达量明显升高,并且在中、内果皮明显分离的栽培品种中表达更强^[9,10]; *FaSHP* 为草莓(*Fragaria × ananassa*)的 *SHP* 同源基因,其表达量的减少能延缓果实的成熟^[11]。上述研究表明,不同类群被子植物中的 *SHP* 同源基因,参与植物生殖发育调控的同时,其功能伴随被子植物的演化而发生了分化。

相对模式植物和草本园艺作物而言,园林树木童期长,生殖发育过程复杂并季节性开花,相关研究相对滞后。本研究以日本晚樱里樱系野生单瓣品种‘大岛樱’(*P. lannesiana* ‘Makino’)为试材,系统研究其 *SHP* 同源基因在花和果实发育过程中的表达模式和功能,为樱花的分子辅助育种积累资料。

1 材料和方法

1.1 材料

2009 年 4~5 月采集‘大岛樱’的幼叶、花芽和幼果,将雌雄蕊刚发育成熟但未开放的花蕾按花萼、花瓣、雄蕊与雌蕊分开,并将这 4 轮花器官、幼叶和幼果立即用液氮速冻,后-80℃保存备用。

1.2 方法

1.2.1 日本晚樱 *PrseSHP* 基因克隆 用 EASYspin 植物 RNA 提取试剂盒(北京艾德莱)提取‘大岛樱’花芽总 RNA,按试剂盒说明书操作。参照文献[1]的方法合成第一链 cDNA 和 3'-RACE 扩增,3'-RACE 基因特异引物为 GSP1SHP;根据获得的 3'-RACE 扩增序列设计 5'-RACE 扩增引物,利用 5'-RACE 试剂盒(Version 2.0, invitrogen 公司),参照文献[12]的方法,扩增日本晚樱 *PrseSHP* 基因的 5'端序列,5'-RACE 的第一链 cDNA 合成引物为 GSP1SHP,第 1 次 PCR 和巢式 PCR 反应的基

因特异引物分别为 GSP2SHP 和 GSP3SHP。根据 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增序列进行电子拼接,在基因的 5'-UTR 和 3'-UTR 区设计克隆日本晚樱 *PrseSHP* 基因全长引物,验证拼接序列的真实性并分离出 *PrseSHP* 基因。PCR 扩增的上下游引物为 *PrseSHPF* 和 *PrseSHPR*。PCR 扩增退火温度为 56~58℃、阳性克隆鉴定参照文献[12]。所用引物(表 1)均由生工生物(上海)股份有限公司合成, DNA 由华大基因测序。

1.2.2 蛋白同源比对与分子系统发生分析 将 *PrseSHP* 基因编码的蛋白在 NCBI 数据库中执行 Blast 搜索与同源比对。并将 *PrseSHP* 转录因子同 NCBI 上 *SHP* 同源蛋白序列进行比较。用 MEGA5.0 软件,选邻接法(Neighbour joining, NJ)构建分子系统发生树^[13]。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测 *PrseSHP* 基因表达的组织特异性 提取‘大岛樱’幼叶、花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊和幼果中的总 RNA,检测其质量与完整性,将其逆转录成第一链 cDNA。用半定量 RT-PCR 技术检测 *PrseSHP* 基因在这 6 种器官中表达的组织特异。并根据 *PrseSHP* 基因的特异序列设计上下游引物 *RTSHPF* 和 *RTSHPR*,进行 RT-PCR 分析之前,检测引物的特异性;以日本晚樱 *Actin* 基因作内参,内参引物序列和 RT-PCR 检测参考文献^[14]。

1.2.4 载体构建与功能分析 将 *PrseSHP* 基因包含完整开放阅读框(ORF)的正义片段插入到 *Xba* I 和 *Sma* I 限制性酶切位点之间,并将其克隆到表达载体 pBI121 上,构建载体的上下游引物为 *TPrseSHPF* 和 *TPrseSHPR*。将构建好的 pBI121-

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer name and sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')
GSPSHP	5'-ACAATGGAGTTCCCAAATCAAG-3'
GSP1SHP	5'-CCAAGATTACAGGGAGGA-3'
GSP2SHP	5'-AGGCGGCCACGGGTAGAGAAG-3'
GSP3SHP	5'-CGCTTAATCTCAATCTTGCTCTT-3'
PrseSHPF	5'-CGCTCAACTCAACAAC-3'
PrseSHPR	5'-TGGAACATCACACGGCATT-3'
RTSHPF	5'-ACAATGGAGTTCCCAAATCAAG-3'
RTSHPR	5'-GCAGCTCGATCTCCCTCTTT-3'
TPrseSHPF	5'-CGCTCTAGAACTCAACAAC-3'
TPrseSHPR	5'-TCCCGGGAACATCACACGGCATT-3'
qactinF	5'-CGTATGAGCAAGGAGTACAC-3'
qactinR	5'-CACATCTGTTGGAAGGTGCT-3'
qPrseSHPF	5'-GGAAGACTGGAGAAAGGGAT-3'
qPrseSHPR	5'-ATTTGTTTGCTGCTGTTGTG-3'

PrseSHP 表达载体导入农杆菌 GV3101-90 菌株, 在农杆菌的介导下, 用浸花法将 35S:: *PrseSHP* 转入野生型拟南芥 Col-0^[15]。收获拟南芥 T₁ 代种子, 消毒除菌后置于含 50 μg/mL 卡拉霉素的 1/2MS 培养基上 4 ℃ 暗培养 24 h, 后转入 22 ℃, 光暗周期 16 h/8 h 的温室中培养 10 d, 筛选根系发育良好, 且真叶和生长点都为绿色的植物为阳性转化苗, 经炼苗、壮苗后移置到人工气候箱, 待开花后进行实时荧光定量 PCR (quantitative real time RT-PCR, qRT-PCR) 鉴定, 检测 *PrseSHP* 在转基因拟南芥中的表达水平。作 qRT-PCR 分析时, 以拟南芥 *Actin* 基因为内参, 非转基因拟南芥为阴性对照, qRT-PCR 分析用的内参基因上下游引物为 qactinF 和 qactinR, *PrseSHP* 基因的上下游引物为 qPrseSH-PF 和 qPrseSHPR, 并观察外源基因表达量高的转基因拟南芥表型, 分析 *PrseSHP* 基因的功能。

2 结果与分析

2.1 *PrseSHP* 基因全长 cDNA 序列的克隆

同源克隆方法结合 RACE 技术, 从‘大岛樱’花芽中分离出 *PrseSHP* 基因完整 cDNA 全长。序列结构分析表明, 日本晚樱 *PrseSHP* 基因序列 cDNA 全长为 1 223 bp, 包括 264 bp 的 5'-UTR、741 bp 的完整 ORF 和 218 bp 的 3'-UTR, 编码 246 个氨基酸和 1 个终止密码子。在 NCBI 网站上执行 Blast 搜索和序列同源比对显示, 其与 MADS-box 基因家族中的 SHP 进化系亲缘关系最近, 命名为 *PrseSHP*, GenBank 登录号为 GU362645。

2.2 蛋白序列同源比对与分子系统发生分析

图 1 表明: 日本晚樱 *PrseSHP* 与桃的 *PperSHP* 亲缘关系最近, 同苹果的 *MdMADS14* 亲缘关系次之, 三者同其他蔷薇科植物的 SHP 同源蛋白聚于同一进化分支, 与其他科属植物的 SHP 同源蛋白分开, 聚类结果支持传统经典分类学种属间的亲缘关系。蛋白序列同源比对 (图 3) 显示: *PrseSHP* 转录因子包含 1 个高度保守的 MADS 结构域, 由 57 个氨基酸残基组成 (16~72); 1 个次级保守的 K 结构域, 含 82 个氨基酸 (105~186), 由 K1 (105~126)、K2 (139~153) 和 K3 (161~186) 3 个含疏水氨基酸残基的亚结构域^[16]; 其 MADS 区与 K 区之间, 含 1 个保守性相对较低的间隔区 I 区, 由 32 个氨基酸残基组成 (73~104); 该转录因子 C 末端结构域序列变异较大, 由 60 个氨基酸残基组成 (187~246), 包含 2 个十分保守的 AG I 和 II 基序, 属 C 类转录因

子; 另外, 该转录因子的 N 末端还有一段由 15 个氨基酸残基组成的延伸序列。

2.3 花器官与幼果中 *PrseSHP* 基因表达的半定量 RT-PCR 检测

半定量 RT-PCR 检测 (图 2) 显示: *PrseSHP* 主要在‘大岛樱’的花和果中表达, 在幼叶中不表达; 其在花瓣、雄蕊和雌蕊中表达量高, 在花萼中表达量低。且 *PrseSHP* 基因在‘大岛樱’花瓣、雄蕊、雌蕊和幼果中的表达差异不显著 ($P > 0.05$), 但其在这些器官中的转录活性均显著高于花萼 ($P < 0.05$)。

2.4 *PrseSHP* 基因的功能分析

为进一步验证 *PrseSHP* 基因在日本晚樱生殖发育过程中的功能, 将 *PrseSHP* 基因的正义片段克隆到双元表达载体 pBI121 中, 经农杆菌介导转入野生拟南芥。抗生素筛选和 qRT-PCR 鉴定 (图 4) 结果共获得 23 棵 35S:: *PrseSHP* 拟南芥转基因植株, 跟踪观察这些转基因拟南芥植株的表型发现, 23 株转基因拟南芥中有 17 株拟南芥开花时间明显提前, 占转基因植株总数的 73.9%, 其在 6~8 片莲座

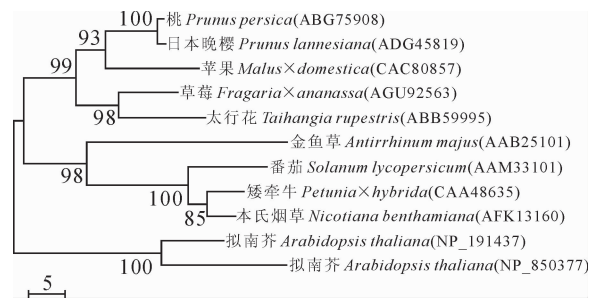


图 1 *PrseSHP* 同其他 SHP 同源蛋白的分子系统发生分析
括号内为氨基酸登录号; 分支上的数字表示 1 000 次重复
计算获得的自展百分比; 标尺代表遗传距离

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *PrseSHP* with other
SHP-like MADS-box proteins

Genbank accession numbers are in brackets; Numbers represent
the Bootstrap percentage values calculated by 1 000 replicates;
The scale bar represents genetic distance

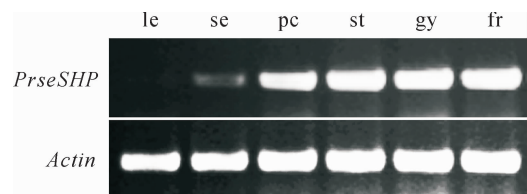


图 2 *PrseSHP* 基因在‘大岛樱’不同器官中的表达
le. 幼叶; se. 花萼; pe. 花瓣; st. 雄蕊; gy. 雌蕊; fr. 幼果

Fig. 2 Expression analysis of *PrseSHP* in different
organs of *P. lannesiana* ‘Makino’

le. Juvenile leaf; se. Sepal; pe. Petal; st. Stamen;
gy. Gynoecium; fr. Young fruit

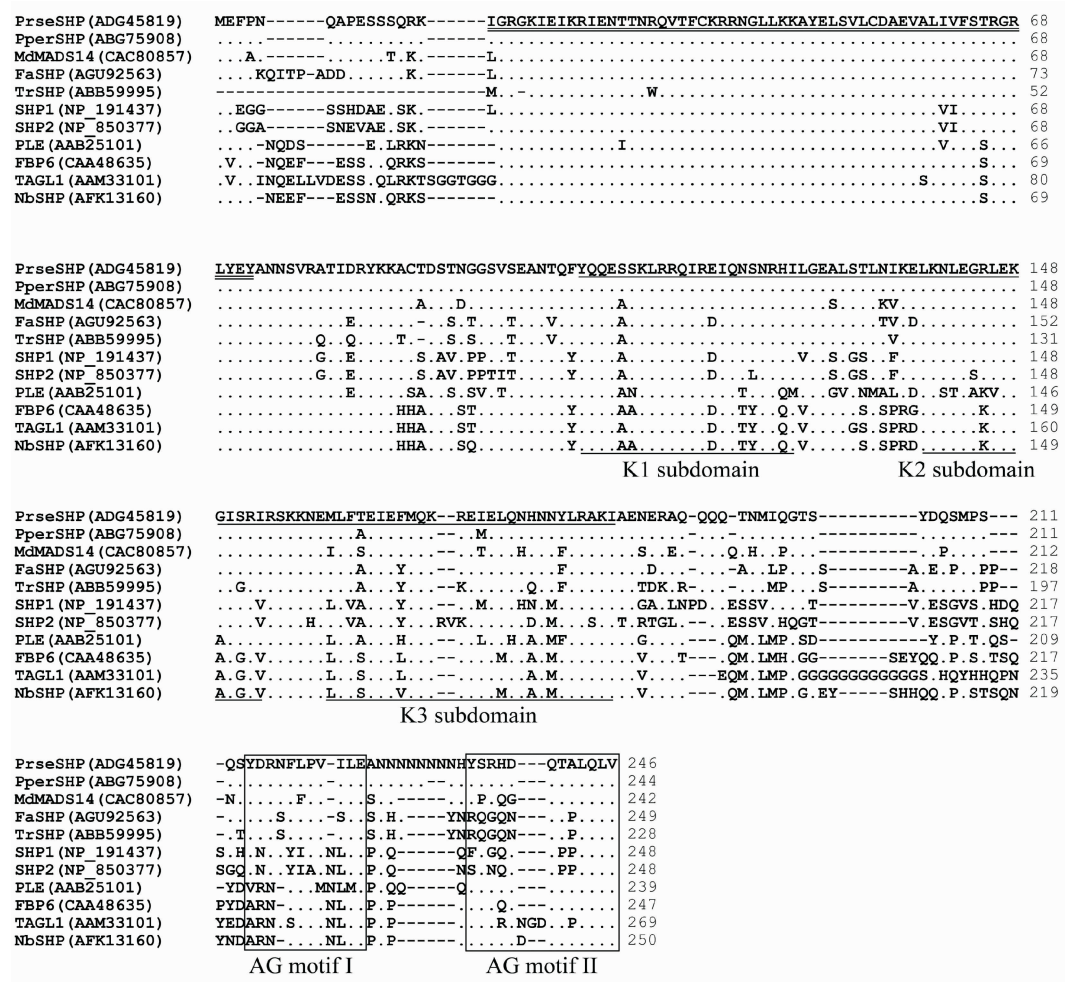


图 3 PrsesHP 蛋白序列同源比对和结构分析

双下划线代表 MADS-box 区;单下划线代表 K 区;近缘蛋白中的圆点表示相同的氨基酸残基,方框中分别为 AG I 和 II 基序;
括号内为氨基酸登录号;PrseSHP. 日本晚樱;PperSHP. 桃;MdMADS14. 苹果;FaSHP. 草莓;TrSHP. 太行花;
SHP1, SHP2. 拟南芥;PLE. 金鱼草;FBP6. 矮牵牛;TAGL1. 番茄;NbSHP. 本氏烟草

Fig. 3 Alignment of predicted amino acid sequence of PrseSHP with other homologous proteins sequences

The double and single underlined regions represent the MADS domain and K domain, respectively. Amino acid residues identical to PrseSHP are indicated as dots. AG-motif I and II of PrseSHP are boxed. Genbank accession numbers are in brackets; PrseSHP, *Prunus lannesiana*;

PperSHP, *P. persica*; MdMADS14, *Malus × domestica*; FaSHP, *Fragaria × ananassa*; TrSHP, *Taihangia rupestris*;

SHP1, SHP2, *A. thaliana*; PLE, *Antirrhinum majus*; FBP6, *Petunia × hybrid*; TAGL1, *S. lycopersicum*; NbSHP, *N. benthamiana*

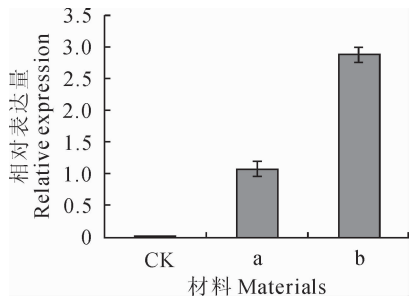


图 4 转基因拟南芥 qRT-PCR 检测

CK. 野生型拟南芥; a, b. 转基因拟南芥植株

Fig. 4 Transgenic *Arabidopsis* plants confirmed by qRT-PCR

CK. Wild-type *Arabidopsis*; a, b. Transgenic *Arabidopsis*



图 5 转基因拟南芥与野生型拟南芥表型比较

A. 野生型拟南芥; B, C. 转基因拟南芥

Fig. 5 Comparison of phenotypes of the wild-type and transgenic *Arabidopsis*

A. Wild-type *Arabidopsis*; B, C. Transgenic *Arabidopsis*

叶后即抽薹开花(图 5,B,C),而相同生长条件种植的野生型拟南芥要长到 14~17 片莲座叶后才抽薹开花(图 5,A)。并且,所有转基因植株明显比野生型拟南芥弱小,但其花器官结构未见明显改变(图 5,B,C)。说明 *PrseSHP* 基因在花发育过程中能促进植物早花。

3 讨 论

同源序列比对与分子系统发生分析表明,‘大岛樱’*PrseSHP* 属 C 类 MADS-box 转录因子的 PLE/SHP 进化系,并与蔷薇科植物 SHP 同源蛋白聚于同一进化分支。表达分析表明,*PrseSHP* 主要在‘大岛樱’的花瓣、雄蕊、雌蕊和幼果等器官中表达,在花萼中仅能检测到微弱的转录信号,在幼叶中不表达,其表达模式与其他类群植物中的 SHP 同源基因有一定的差异。

PperSHP 为日本晚樱近缘种桃的 SHP 同源基因,其仅在雄蕊、雌蕊和果实中表达,主要参与果

实的发育^[9];而蔷薇科另一植物太行花的 SHP 同源基因 *TrSHP* 仅在发育中的雄蕊和雌蕊中表达,随着子房中胚珠的发育,其转录活性仅局限在胚珠中,参与调控胚珠的发育^[17]。*TAGL1* 为茄科植物番茄的 SHP 同源基因,在花发育过程中其主要在雄蕊和雌蕊中表达,并且在花瓣中也能检测到微弱的转录信号;但在果实发育过程中,其仅在果皮中表达,参与调控果皮的发育与果实的成熟^[7];*FBP6* 是矮牵牛的 SHP 同源基因,其主要在雄蕊、柱头和胚珠中表达,除参与调控雌蕊发育和果实开裂外,还参与调控花分生组织的形成,促进植物开花^[4]。可见,不同类群植物中 SHP 同源基因除表达模式变化外,其功能也发生了相应的分化。从日本晚樱 *PrseSHP* 基因的表达模式及 35S::*PrseSHP* 转基因拟南芥的表型推测,*PrseSHP* 在发育过程中具有促进开花和参与调控果实发育的功能,其具体的调控机制仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LIU ZH X(刘志雄), YU X N(于先泥). Cloning and expression analysis of a floral homeotic gene *PrseAP3* from *Prunus lannesiana* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University* (华中农业大学学报), 2012, **31**(5): 578–583 (in Chinese).
- [2] PINYOPICH A, DITTA GS, SAVIDGE B, et al. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development [J]. *Nature*, 2003, **424**(6 944): 85–88.
- [3] PABÓN-MORA N, WONG GK, et al. Evolution of fruit development genes in flowering plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, **5**: 300.
- [4] HEIJMANS K, AMENT K, RIJPKEMA AS, et al. Redefining C and D in the petunia ABC [J]. *The Plant Cell*, 2012, **24**(6): 2 305–2 317.
- [5] FOURQUIN C, FERRANDIZ C. Functional analyses of AGAMOUS family members in *Nicotiana benthamiana* clarify the evolution of early and late roles of C-function genes in eudicots [J]. *The Plant Journal*, 2012, **71**(6): 990–1 001.
- [6] FERRÁNDIZ C, FOURQUIN C. Role of the *FUL-SHP* network in the evolution of fruit morphology and function [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **65**(16): 4 505–4 513.
- [7] VREBALOV J, PAN IL, ARROYO AJM, et al. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato SHATTERPROOF gene *TAGL1* [J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(10): 3 041–3 062.
- [8] FOURQUIN C, DEL CERRO C, VICTORIA FC, et al. A change in SHATTERPROOF protein lies at the origin of a fruit morphological novelty and a new strategy for seed dispersal in medicago genus [J]. *Plant Physiology*, 2013, **162**(2): 907–917.
- [9] 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.
- [10] TANI E, POLIDOROS AN, TSAFTARIS AS. Characterization and expression analysis of *FRUITFULL*- and *SHATTERPROOF*-like genes from peach (*Prunus persica*) and their role in split-pit formation [J]. *Tree Physiology*, 2007, **27**(5): 649–659.
- [11] DAMINATO M, GUZZO F, CASADORO G. A *SHATTERPROOF*-like gene controls ripening in non-climacteric strawberries, and auxin and abscisic acid antagonistically affect its expression [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, **64**(12): 3 775–3 786.
- [12] LIU Z, ZHANG 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.
- [13] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, **28**(10): 2 731–2 739.
- [14] LIU ZH X(刘志雄), WANG Y(王莹), LÜ X M(吕小蒙), et al. Cloning and expression analysis of a floral organ identity gene *CLAP1* from *Prunus lannesiana* [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2010, **37**(4): 649–654 (in Chinese).
- [15] CLOUGH SJ, BENT AF. Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, **16**: 735–743.
- [16] YANG Y, JACK T. Defining subdomains of the K domain important for protein-protein interactions of plant MADS proteins [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, **55**(1): 45–59.
- [17] LÜ S, DU X, LU W, et al. Two AGAMOUS-like MADS-box genes from *Taihangia rupestris* (Rosaceae) reveal independent trajectories in the evolution of class C and class D floral homeotic functions [J]. *Evolution & Development*, 2007, **9**(1): 92–104.

(编辑: 宋亚珍)