

棉花 SVP-like 基因 *GhMADS29* 的克隆与表达分析

张文香^{1,2}, 庞朝友¹, 范术丽¹, 宋美珍¹, 魏恒玲¹, 喻树迅^{1*}

(1. 中国农业科学院棉花研究所, 河南安阳 455000; 2. 贵州师范学院化学与生命科学学院, 贵州贵阳 550018)

摘要 [目的]研究棉花中 SVP 类基因的功能。[方法]通过同源克隆的方法在陆地棉中棉所 36 中克隆 SVP 的同源基因 *GhMADS29*, 对其进行 Blast 搜索比对和进化树分析以及荧光定量的表达模式分析。[结果]*GhMADS29* 与猕猴桃的 *SVP4* 基因相似度最高, 其 cDNA 序列含有 9 个外显子、8 个内含子, 不同时期顶芽的荧光定量结果表明它在花芽分化起始期的花芽中表达量最高, 且不同组织的荧光定量分析表明它在叶片和顶芽中表达量较高。[结论]首次获得棉花 SVP 亚族基因, 命名为 *GhMADS29*, 其 GeneBank 登录号为 JQ682642。

关键词 SVP; 荧光定量; 开花

中图分类号 S562 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)15-028-04

Molecular Cloning and Expression Analysis of SVP-like Gene, *GhMADS29* from *Gossypium hirsutum* L.

ZHANG Wen-xiang^{1,2}, PANG Chao-you¹, FAN Shu-li¹, YU Shu-xun^{1*} et al (1. Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Anyang, Henan 455000; 2. School of Chemistry and Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550018)

Abstract [Objective] To study SVP gene from cotton. [Method] The SVP homologue gene *GhMADS29* was cloned from CCRI 36 upland cotton by homology cloning strategy. Blast alignment, phylogenetic tree and quantitative RT-PCR were conducted to analyze *GhMADS29*. [Result] It was showed that *GhMADS29* was most similar to *SVP4* from kiwifruit and that *GhMADS29* had nine exons and eight introns. *GhMADS29* expressed highest in 2SAM (shoot apical meristems at the second true leaf expanded stage) at which stage flower bud initiated differentiation. Expression analysis in different tissues showed that *GhMADS29* expressed very highly in leaves and apical buds. [Conclusion] *GhMADS29* is belong to SVP subfamily obtained for the first time in cotton and the accession number is JQ682642.

Key words SVP; Quantitative RT-PCR; Flowering

拟南芥中的 *SVP* 和 *AGL24* 都属于 STMADS11 亚族, 它们序列高度保守, 在花器官分生组织决定方面具有相同的功能, 但在控制开花时间的功能上却是相反的: *AGL24* 是开花促进因子^[1-2], 而 *SVP* 却是开花抑制因子^[3]。 *svp* 突变体通过缩短营养生长阶段促进了开花^[3], 研究表明 *SVP* 是开花温度途径中一个很重要的调节因子, 它会调节开花促进因子 miRNA172 在不同温度的表达水平^[4]。水稻的 STMADS11 亚族基因 *OsMADS55* 在野生型拟南芥中过表达后, 会使拟南芥开花时间推迟, 花发育也发生改变, 而另一该亚族的基因 *OsMADS22* 在拟南芥中过表达后, 却不会影响开花时间, 只是花器官发生变异。但这 2 个基因都不能回复 *svp* 和 *agl24* 突变体的表型^[5]。

短季棉是指生育期较短的陆地棉品种, 是随着生态环境与农业种植制度的变化, 与一定的社会经济条件、生产发展水平、科学技术发展水平相适应逐步形成发展起来的^[6]。棉花的早熟性与多个农艺性状有关, 如株高、第一果枝节位、苗期、蕾期、花期、铃期、开花纵间隔期、横间隔期等^[7], 而且随着科学的发展进步, 分子育种成为当前的热点, 因此笔者根据其他作物中已有功能验证的且确定具有调控开花时间功能的 MADS 基因, 确定 SVP 类基因为研究对象, 以期能够明确这些基因的功能, 从而为短季棉培育提供良好的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。以棉花早熟品种中棉所 36 为试验材料, 种植于中国农业科学院棉花研究所老所部试验田, 按大田常规管理办法进行管理。分别取子叶展平 (OSAM)、第一真叶展平 (1SAM)、第二真叶展平 (2SAM)、第三真叶展平 (3SAM) 时的顶芽, 以及盛花期的顶芽、根、茎、叶、苞片、萼片、花瓣、雄蕊、心皮、开花后 10 d 的胚珠和纤维。所取材料立即投入液氮中冷冻, 然后于 -70 °C 冰箱保存备用。

1.1.2 主要试剂。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京天根公司, 农杆菌 LBA4404 为中国农业科学院棉花研究所早熟课题组保存; 培养基中的酵母粉、蛋白胨和琼脂粉购自 Oxoid 公司; pGEM-T easy 克隆载体购自 Promega 公司, 常规生化试剂, 如 Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶等, 均购自大连宝生物工程公司; RNA 提取试剂盒购自北京天根公司; 反转录试剂盒购自美国 Invitrogen 生物技术有限公司; 胶回收及 DNA 提取试剂盒购自上海生物工程公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega 生物技术公司。

1.1.3 主要仪器。PCR 仪、电泳仪、超净工作台、紫外凝胶成像系统、DU800 核酸蛋白分析仪、自动蒸汽消毒锅、超低温冰箱、高速冷冻离心机、冷冻台式离心机等。

1.2 方法

1.2.1 棉花 RNA 的提取。按照北京天根公司的 RNA 提取试剂盒操作说明进行。

1.2.2 引物设计与基因克隆。以拟南芥 *SVP* 和 *AGL24* 基因为参考序列, Blast 搜索棉花的 EST 数据库 (NCBI 棉花 EST 数据库网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucast/?term=cottonTIGR> 棉花 EST 数据库网址: <http://compbio.dfci.har>

基金项目 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-18); 国家高技术研究发展计划项目 (863 计划) (2011AA10A102)。

作者简介 张文香 (1984-), 女, 河北衡水人, 副教授, 博士, 从事分子生物学方面的研究。* 通讯作者, 研究员, 院士, 博士生导师, 从事棉花分子育种方面的研究。

收稿日期 2015-04-08

vard.edu/cgi-bin/tgi/cat_download.pl? db = cottest), 将得到的 EST 进行拼接, 得到含有完整阅读框的 cDNA 序列, 根据此序列设计引物, 引物需包含完整的开放阅读框 (ORF), 引物序列: 29F: 5'- ACCTCACTTCTTACACTTTCTTCC-3', 29R: 5'- TCTTCGCAACATCACCGCCTTTTAACC-3'。

根据大连宝生物公司 *Taq* DNA 聚合酶说明书配制 PCR 反应体系, 总体积为 25.00 μ l, 其中 *Ex-Taq* 酶 0.15 μ l, 10 $\times$ *Ex-Taq* Buffer 2.50 μ l, 10 mmol/L dNTP mixture 2.00 μ l, 引物 (20 μ mol/L) 各 1.00 μ l, 模板 2.00 μ l。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 以天根公司的 MarkerIII 为参照, 若条带大小与预期结果相近, 则回收目的片段, 送金唯智公司测序。

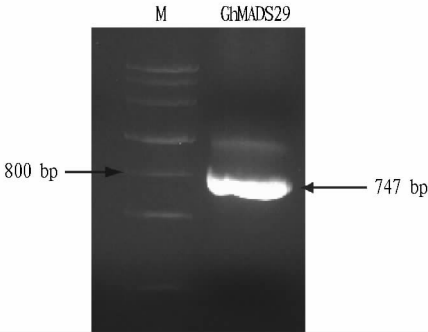
1.2.3 荧光定量 PCR. 参照 Roche 公司的 FastStart Universal SYBR Green Master 试剂盒说明书和 ABI (Applied Biosystems) 公司的 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪进行。以 *GhACTIN* (GenBank: AY305733) 作为内参, 以控制误差。荧光定量引物序列: Q29F: 5'-GCATCGACAGATCGGTCACCAG-3'; Q29R: 5'-CGTCTCAAGCCTCCTTCAACTA-3'。actinF: 5'-ATCCTC-CGTCTTGACCTTG-3'; actinR: 5'- TGTCCGTCAGGCAACTC AT-3'。

PCR 反应体系总体积 25.0 μ l, 其中 SYBR Green PCR Master mix 12.5 μ l, 上下游引物各 0.5 μ l, cDNA 模板 2.0 μ l。反应程序: 50 $^{\circ}$ C 预变性 2.0 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 65 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s。

2 结果与分析

2.1 *GhMADS29* 基因的获得 利用拟南芥 *SVP* 和 *AGL24* 的核酸序列 Blast 棉花 EST 数据库, 将得到的 EST 序列通过 CAP3 在线拼接软件进行拼接, 根据拼接得到的序列设计引物, 保证所设计引物跨越完整的 ORF, 以中棉所 36 的 cDNA 为模板进行扩增 (图 1), 回收目的条带, 连接到 pGEM-T Easy 载体, 转化大肠杆菌, 通过蓝白斑筛选和 PCR 鉴定为阳性的

克隆, 送公司测序, 确定序列后, 将序列提交到 GeneBank 数据库, 获得登录号 JQ682642。



注: M. DNA Marker。

图 1 *GhMADS29* 的 PCR 扩增

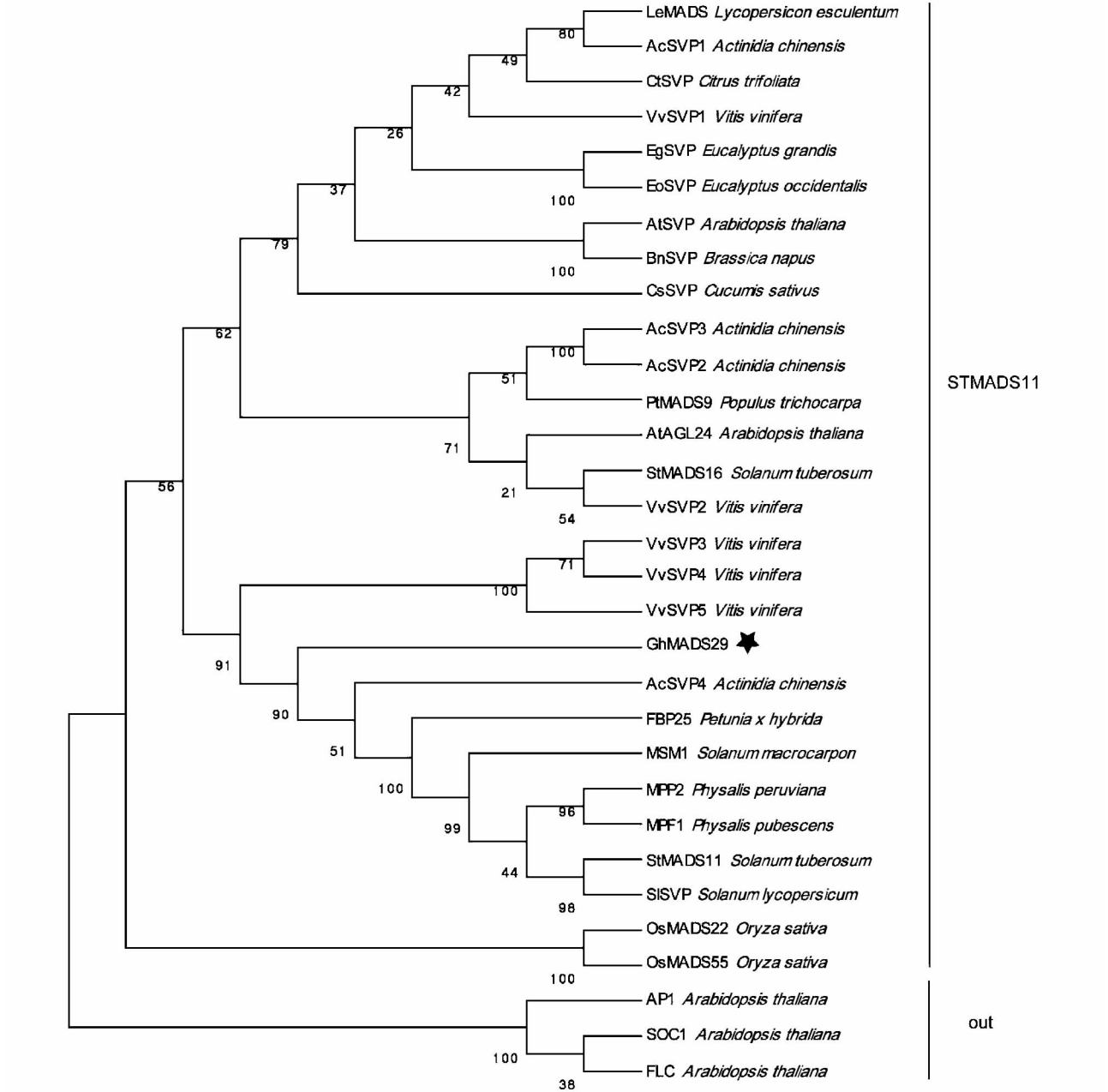
2.2 *GhMADS29* 的序列分析 利用 NCBI 的 ORF finder 在线工具对其蛋白序列进行预测, 发现其编码 228 个氨基酸。用预测的蛋白序列 Blast NCBI 的 nr 数据库, 结果显示 *GhMADS29* 与猕猴桃的 SVP4 相似度最高, 一致性达到 60%, 由此猜测 *GhMADS29* 属于 SVP 亚族 (STMADS11 亚族)。将 *GhMADS29* 与其他一些作物的 SVP 类基因进行序列比对, 发现所预测的 *GhMADS29* 的蛋白序列在 N 末端比其他 *SVP* 基因都多出 8 个氨基酸 (图 2), 进一步分析核酸序列发现, 得到的 cDNA 序列中包含 2 个 ATG 起始密码子, 且两者之间的碱基数正好是 3 的倍数。将这些序列进行进化树分析, 同样发现 *GhMADS29* 属于 STMADS11 亚族, 但聚类关系不是很近 (图 3)。

用所得到的 cDNA 序列 Blast 雷蒙德氏棉的基因组序列, 分析 *GhMADS29* 的基因结构。发现所得到的这段 cDNA 序列所对应的基因组序列含有 9 个外显子、8 个内含子 (图 4), 而且第一个起始密码子位于第一个外显子, 第二个起始密码子位于第二个外显子, 基因组全长 11 466 bp。

2.3 *GhMADS29* 的表达模式 由图 5A 可知, 在 2SAM (第二片真叶展平) 的花芽分化时期, *GhMADS29* 的表达量最高, 随后的 3SAM (第三片真叶展平) 时期表达量也较高, 但相比于 2SAM, 3SAM 时期的表达量又有所下降。对 *GhMADS29* 进

OsMADS22	-----MARERREIKRIESAAARQVTFSKRRRGLFKKAEELSVLCDADVALIVFSSTG	52
OsMADS55	-----MARERREIRRIESAAARQVTFSKRRRGLFKKAEELAVLCDADVALVVFSSSTG	52
EgSVP	-----MAREKIQIKKITNATARQVTFSKRRRGLFKKAEELSVLCDADVALIVFSSSG	52
LeMADS	-----MAREKIQIKKIDNSTARQVTFSKRRRGLFKKAEELSVLCDADVALIIFSSTG	52
AtSVP	-----MAREKIQIRKIDNATARQVTFSKRRRGLFKKAEELSVLCDADVALIIFSSTG	52
PtMADS9	-----MAREKIKIKKIDNVTARQVTFSKRRRGLFKKAEELSVLCDAEVAVIIFSATG	52
AcSVP3	-----MAREKIKIKKIDNITARQVTFSKRRRGLFKKAEELAVLCDAEVALIIFSATG	52
AtAGL24	-----MAREKIRIKKIDNITARQVTFSKRRRGIFKKADELVLCDADVALIIFSATG	52
MPP2	-----MVRQKIQIKKIDNLTARQVTFSKRRRGLFKKAQELSTLCDADIGLIVFSATG	52
MPF1	-----MVRQKIQIKKIDNLTARQVTFSKRRRGLFKKAQELSTLCDADIGLIVFSATG	52
STMADS11	-----MVRQKIQIKKIDNLTARQVTFSKRRRGLFKKAQELSTLCDADIGLIVFSATG	52
MSM1	-----MVRQKIQIKKIDNLTARQVTFSKRRRGLFKKAQELSTLCDADIGLIVFSATG	52
FBP25	-----MVRQKIQIKKIDNLTAGQVTFSKRRRGLFKKAQELSTLCDADIGLIVFSATG	52
GhMADS29	MSFGLYFRMTRKRIQIKKIDNVAARQVTFSKRRRGLFKKAHELVLCDAEIALIVFSATG	60
AcSVP4	-----MVRQRIQIKKIDNLTARQVTFSKRRRGLFKKAQELSTLCDAEIALIVFSATG	52

图 2 *GhMADS29* 与其他作物 SVP 类基因的序列比对



注:AcSVP4. AFA 37970. 1, MPP2. AAV65500. 1, MPF1. AAV65498. 1, StMADS11. ACH53556. 1, MSM1. AAV65497. 1, FBP25. AAK21256. 1, PtMADS9. 224063317, SISVP. 460369548, CsSVP. 449451385, AcSVP3. 375155238, EgSVP. AAP33087. 1, AtSVP. 110741167, AtAGL24. 15233857, BnSVP. AFM77910. 1, CtSVP. ACJ09170. 1, StMADS16. AAV65507. 1, EoSVP. AAP40641. 1, OsMADS22. 75315340, OsMADS55. 91207153。

图3 *GhMADS29* 的进化树分析



图4 *GhMADS29* 的基因结构

行不同组织的表达模式分析(图5B),发现其在叶片中的表达量最高,顶芽次之,各个花器官中的表达量都较低,只有苞片和心皮相对较高。GA处理后的表达分析发现(图6),*GhMADS29* 的表达量下降。

3 结论与讨论

该研究以拟南芥中的 *SVP* 和 *AGL24* 基因为参考序列, Blast 棉花 EST 数据库后,通过 EST 拼接得到了 *GhMADS29*

的序列,与拟南芥 *SVP* 和 *AGL24* 序列比对发现,*GhMADS29* 与 *SVP* 相似性更高,由此推测 *GhMADS29* 可能与 *SVP* 具有相似的功能。

不同时期顶芽的表达模式分析发现,*GhMADS29* 在二叶展平时期顶芽中表达量最高,推断它可能与花芽的起始分化有关,不同组织的表达模式分析发现,*GhMADS29* 在叶片中的表达量最高,顶芽次之,而且对棉花进行 GA 处理,也发现

GhMADS29 的表达量下降,因此猜测 *GhMADS29* 可能通过叶片和顶芽感受信号后表达量上调进而促进花芽分化且它可能与拟南芥 *SVP* 的作用模式相同,因为研究表明拟南芥 *SVP* 在叶片中与 *FLC* 形成二聚体调控 *SOC1* 和 *FT* 的表达^[8],进

而调控植物开花,而且在感受到自主途径、温度途径、GA 途径的信号后,*SVP* 在顶芽中的表达量下调^[3,8-9]。通过不同组织的表达模式分析发现,*GhMADS29* 在花器官中的表达量相对较低,因此猜测 *GhMADS29* 可能不参与花器官发育的调控。

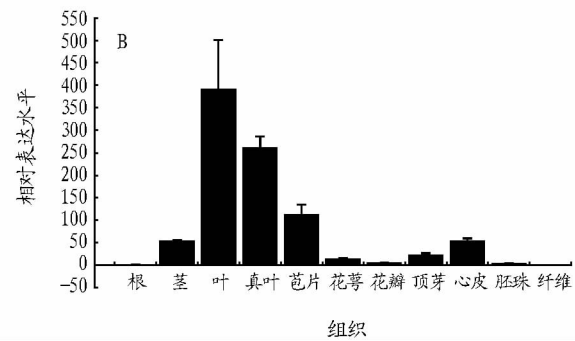
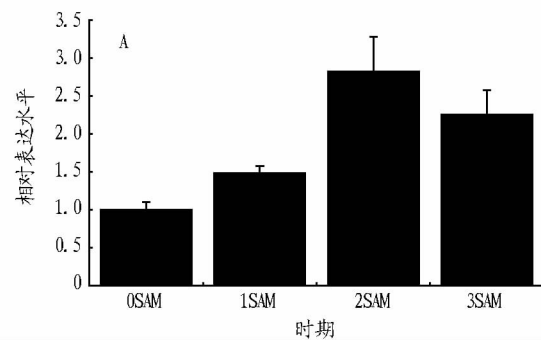


图 5 *GhMADS29* 的表达模式

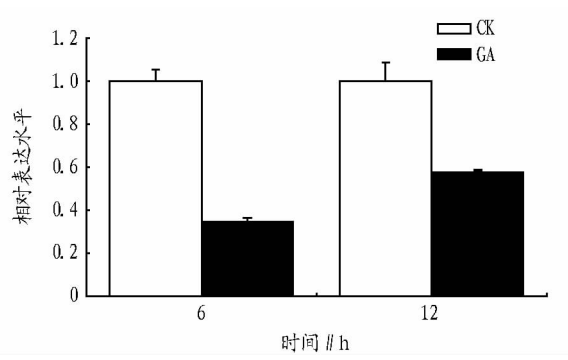


图 6 GA 处理对 *GhMADS29* 的影响

本研究通过同源克隆的方法克隆到陆地棉中 *SVP* 类基因的完整开放阅读框,命名为 *GhMADS29*,并提交到 Gene-Bank 获得登录号为 JQ682642。其在第二片真叶展平时表达量最高,且 GA 会抑制其表达。

参考文献

[1] MICHAELS S D,DITTA G,GUSTAFSON-BROWN C,et al. AGL24 acts as

a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization[J]. The Plant Journal,2003(33):867-874.

[2] YU H,X U Y,TAN E L,et al. AGAMOUS-LIKE 24, a dosage-dependent mediator of the flowering signals[J]. PNAS,2002,99(25):16336-16341.

[3] HARTMANN U,HOHMANN S,NETTESHEIM K,et al. Molecular cloning of *SVP*:A negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*[J]. Plant Journal,2000,21:351-360.

[4] LEE H,YOO S J,LEE J H,et al. Genetic framework for owering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*[J]. Nucleic Acids Research,2010,38:3081-3093.

[5] LEE J H,PARK S H,AHN J H. Functional conservation and diversification between rice *OsMADS22/OsMADS55* and *Arabidopsis SVP* proteins[J]. Plant Science,2012,185:97-104.

[6] 承泓良. 短季棉育种技术[J]. 江西棉花,1994(3):24-26.

[7] 季道藩,汪若海,潘家驹,等. 棉花知识百科[M]. 北京:中国农业出版社,2001.

[8] LI D,LIU C,SHEN L,et al. A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*[J]. Dev Cell,2008,15:110-120.

[9] LEE J H,YOO S J,PARK S H,et al. Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*[J]. Genes Dev,2007,21:397-402.

(上接第 19 页)

[20] 王加,王淼,翁琰,等. GC-MS 法分析川乌炮制前后挥发性成分[J]. 沈阳药科大学学报,2014,31(8):622-628.

[21] 施婧妮,陈进文,高建蓉,等. 鳖甲炮制前后抗肝纤维化有效物质部位 HPLC 指纹图谱的比较研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(2):63-66.

[22] 胡莹. 金樱子饮片 HPLC 指纹图谱研究[J]. 亚太传统医药,2014,10(18):22-23.

[23] 张英,王淑敏. 杜仲炮制前后绿原酸含量的毛细管区带电泳研究[J]. 中国药业,2014,23(20):21-23.

[24] 吴明侠,王晶娟,张贵君,等. 野菊花药材不同炮制品的红外鉴别研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(1):211-212.

[25] 尤淑霞,刘圣金,吴德康,等. 白矾和枯矾的 FTIR 指纹图谱比较研究[J]. 药物分析杂志,2011,31(6):1054-1058.

[26] 李可藏,王胜波,张程荣,等. 山茱萸炮制前后红外光谱研究[J]. 中华

中医药学刊,2014,32(8):1901-1903.

[27] 毕晓黎,彭丽诗,罗文汇. 补骨脂与盐补骨脂配方颗粒的红外光谱鉴别[J]. 中成药,2014,36(10):2152-2155.

[28] 翁德会,吴士筠,魏艳芬,等. 用紫外分光光度法分析中药厚朴饮片[J]. 时珍国医国药,2011,22(8):1900-1901.

[29] 郑玉丽. 乳香炮制前后化学成分变化及质量标准研究[D]. 郑州:河南中医学,2011.

[30] 许腊英,许康,潘新,等. 乌梅及乌梅炭的 X 射线衍射 Fourier 谱研究[J]. 湖北中医学院学报,2010,12(5):28-30.

[31] 雷雨,李伟东,李俊松,等. 自然铜炮制前后 X 射线衍射指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(19):2561-2564.

[32] 许腊英,夏险峰,毛维伦. 中药苍术炮制前后 DNA 指纹图谱研究[J]. 中成药,2006,28(5):675-676.

[33] 许腊英,石琪,余倩倩,等. 中药乌梅炒炭前后 DNA 指纹图谱的研究[J]. 中成药,2012,34(1):1-3.