

杧果 *MiCO* 基因的克隆与表达模式分析

徐 趁^a, 罗 聪^a, 余海霞, 陈锦文, 何新华*, 王 博, 方中斌

(广西大学农学院·广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004)

摘 要:【目的】克隆杧果(*Mangifera indica* L.) *MiCO* 基因并探讨其表达模式, 为深入研究该基因的功能奠定基础。【方法】根据从杧果转录组测序数据中获得一个 *MiCO* 基因全长序列信息, 设计基因全长引物, 克隆具有不同开花习性的‘四季杧’和‘紫花杧’2个品种的 *MiCO* 基因全长序列, 对其序列进行生物信息学分析, 并利用荧光定量 PCR 技术对 *MiCO* 基因在杧果不同组织以及年周期的表达情况进行分析。【结果】序列分析显示, 2个杧果品种的 *MiCO* 基因 cDNA 全长均为 1 150 bp, 都包含 1 个 966 bp 的开放阅读框, 编码 322 个氨基酸, 等电点为 5.8, ‘四季杧’品种的 *MiCO* 蛋白分子质量为 35.30 ku, ‘紫花杧’品种的 *MiCO* 蛋白分子质量为 35.22 ku; *MiCO* 基因编码的蛋白具有典型的 CO 同源蛋白结构, 包括 B-box1、B-box2 和 CCT 结构域; 系统进化树表明, 杧果 *MiCO* 蛋白属于第一类 CO 蛋白, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtCOL4 相似性最高而聚类到一起。基因表达分析表明, *MiCO* 基因在杧果不同组织中均表达, 但不同组织的表达水平存在差异。年周期表达分析表明, *MiCO* 基因在杧果成花转变期高度表达, 而且在来年的 5—6 月还存在一个小的表达高峰期, 但 2 个品种不同组织中 *MiCO* 基因表达存在差异。【结论】克隆获得杧果 *MiCO* 基因全长序列, 发现 2 个具有不同开花习性的杧果品种的 *MiCO* 基因核苷酸和氨基酸序列高度同源, 只存在少许差异。 *MiCO* 基因在杧果成花转变期高度表达, 说明 *MiCO* 基因与杧果成花关系密切。

关键词: 杧果; 克隆; *CO* 基因; 表达

中图分类号: S667.7

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)04-0418-09

Cloning and expression analysis of a *MiCO* gene in mango

XU Chen^a, LUO Cong^a, YU Haixia, CHEN Jinwen, HE Xinhua*, WANG Bo, FANG Zhongbin

(College of Agriculture·State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China)

Abstract: 【Objective】Floral induction is an important physiological process in higher plants from vegetative stage to reproductive growth. Photoperiod is one of the important environmental triggers of flowering, and the *CONSTANS* (*CO*) gene is a key regulator of this pathway in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Mango (*Mangifera indica* L.) is one of the world's important woody plants, known as “the king of tropical fruits”. Two mango cultivars were used in present study with different flowering habits. ‘SiJi’ blossoms several times a year and ‘ZiHua’ blossoms once a year. Off-season production of mango has been achieved successful by using ‘SiJi’ and much more income has been obtained by farmers. The molecular mechanism of different flowering habits in mango remains unclear. In present study, a *MiCO* gene of mango was cloned and its bioinformatics and genetic evolutionary relationships as well as the expression pattern were analyzed. The results would provide scientists with a basis to further reveal the function of *CO* gene on flowering regulation in mango. 【Methods】All materials were collected from the 8-year-old ‘SiJi’

收稿日期: 2016-07-28 接受日期: 2016-12-22

基金项目: 国家自然科学基金(31660561); 广西自然科学基金(2013 GXNSFDA019011, 2014GXNSFBAI1 8102); 国家现代农业产业技术体系广西杧果创新团队栽培功能岗位项目(nycytgxxtid-06-02)

作者简介: 徐趁, 女, 在读硕士研究生。Tel: 15676793089, E-mail: 1264454036@qq.com; a 为共同第一作者。罗聪, 男, 副教授, 博士。Tel: 0771-3270184, E-mail: 22003luocong@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0771-3237184, E-mail: honest66222@163.com

and ‘ZiHua’ trees grown in the park of College of Agriculture, Guangxi University. The mature leaves were used for gene cloning. Young stems, young leaves, flowers, mature leaves and the fruits of the 7 d, 50 d and 90 d post full flowering of ‘SiJi’ were used for studying on the expression patterns of different organizations. Mature stems, mature leaves and young stems of ‘SiJi’ and ‘ZiHua’ were used for analyzing the expression patterns of a year. All the materials collected were immediately stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Total RNA was isolated using hot-borate method, and quantified at OD_{260} and OD_{280} . The RNA quality was verified using agarose gel electrophoresis (1.2%). The single-stranded cDNA was synthesized using a Reverse Transcriptase M-M kit (TaKaRa, Dalian, China) with the primer AUP1. In the previous studies, the full-length sequence of *MiCO* gene from mango was obtained from the data of transcriptome sequencing. A pair of specific primers based on the full-length sequence of *CO* was designed and used for gene cloning by amplified the mixed cDNA of ‘SiJi’ and ‘ZiHua’ by RT-PCR respectively. The sequence amino acids, molecular weight and isoelectric point prediction were analyzed using software BioXM2.6. The similarity of the nucleotide and the domain structure prediction were analyzed by online NCBI BLAST program. The multiple alignments analysis of CO amino acids was performed using software ClustalW and a phylogenetic tree was computed using MEGA 4.0 software according to the neighbor-joining method. In addition, the expression characters of *MiCO* in different tissues and annual cycle expression were analyzed by quantitative real-time PCR respectively. All primers used in this study were designed by Primer 5.0 software. 【Results】Sequence analysis showed that the full-length cDNA sequence of *MiCO* gene from both ‘SiJi’ and ‘ZiHua’ were 1 150 bp with an open reading frame (ORF) of 966 bp, encoding 322 amino acids with a theoretical isoelectric point of 5.8. The protein molecular weight of *MiCO* of ‘SiJi’ and ‘ZiHua’ were 35.30 ku and 35.22 ku respectively. The conserved domain of *MiCO* had two B-box motifs near by the N-terminal and a CCT domain was near by the C-terminal. Phylogenetic tree indicated that both *MiCO* proteins of mango belonged to the first group of CO proteins family, and had the closest relationship with AtCOL4 (NM_122402) of *Arabidopsis thaliana*. Alignment analysis revealed that only four nucleotides and three amino acids differences were found between ‘SiJi’ and ‘ZiHua’ sequences with more than 99% homologous. qRT-PCR showed that the *MiCO* gene expressed in all the tested tissues but the expression level was different. High expression level of *MiCO* was observed in young leaves, flowers and the fruits in early developmental stage, while low expression level was observed in mature leaves and young stems. In addition, the qRT-PCR results indicated that *MiCO* expressed unlikely in different tissues as well as different cultivars in the annual cycle. The expression level of *MiCO* in ‘SiJi’ was highest in the young stems, while lowest in the mature stems. The expression level of *MiCO* in ‘ZiHua’ was highest in the young stems in March to June, while the highest expression level was observed in mature leaves in July to March of the next year. On the whole, the expression level of *MiCO* gene was highest in the flowering transition period, and another small peak of the expression appeared in May to June of the next year. 【Conclusion】In this study, *MiCO* gene was cloned from ‘SiJi’ and ‘ZiHua’ and they were conservative in both nucleotide sequences and amino acids sequences although several differences existed in ‘SiJi’ and ‘ZiHua’ with different flowering habits. In addition, the expression level of *MiCO* gene was much higher in the flowering transition period than that in any other period. The results implied that the function of *MiCO* gene might be related to the flowering transition in mango.

Key words: Mango; Cloning; *CO* gene; Expression

植物成花和花器官发育分子机制是近年来分子生物学研究的热点内容。在植物成花转变过程中受到复杂的遗传网络调控,包括春化途径、光周期途径、自主途径和赤霉素途径^[1],这些调控途径彼此独立又相互作用。*CO* 基因是光周期途径中的一个关键基因,当其表达产物达到一定程度时,能够显著促进成花相关基因的表达,进而影响植物的开花时间^[2-4]。*CO* 基因在植物界中广泛存在^[5],它编码的蛋白包括 2 个 B-box 结构域和 1 个 CCT(*CO*, *CO-like*, *TOC1*)结构域^[6]。已有许多物种的 *CO* 同源基因被分离克隆,超量表达的 *CO* 能诱导植物提早开花^[7-8]。拟南芥^[6]、水稻^[9]、大麦^[6]、玉米^[10]和甘野菊^[11] *CO* 基因的拷贝数分别为 17、16、9、16 和 11 个,大豆 *CO* 基因有 12 个拷贝(GenBank 统计)。

杧果是世界上重要的水果,素有“热带水果之王”的美称。目前生产上主栽的杧果品种 1 a 开花结果 1 次,在广西成熟上市时期是 6—8 月,产期较集中,上市时间与其他热带水果相冲突,造成货多价低,严重影响果农收入和杧果产业的效益。对杧果进行产期调节生产可以显著提高杧果生产的效益,而产期调节的关键是对杧果花期的调控,因而探讨杧果成花和控制开花时间的作用机制意义重大。*CO* 基因作为光周期途径调节植物成花的关键基因,其在杧果成花过程中的作用尚不清楚,克隆该基因并探讨其表达模式,为深入研究该基因的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

供试材料为 8 a 生的‘四季杧’(一年开花多次,结果多次)和‘紫花杧’(一年开花 1 次,结果 1 次),种

植于广西大学农学院果树标本园。组织表达特性样品采自‘四季杧’的成熟叶(上一次老熟枝梢上的叶片,颜色深绿色)、嫩叶(正在生长中的新梢叶片,叶片嫩绿色)、花(初花期,含苞未放)、嫩茎(新抽生枝条,枝条韧皮部为嫩绿色)和盛花后 7、50、90 d 的杧果果实,采样时间为 2016 年 3 月;年周期样品为‘四季杧’和‘紫花杧’2 个杧果品种的成熟叶(上一次老熟枝梢上的叶片,颜色深绿色)、成熟茎(成熟的结果母枝,韧皮部为灰白色)和嫩茎(新抽生枝条,枝条韧皮部为嫩绿色),采集时间从 2009 年 7 月持续到 2010 年 8 月,花期每 15 d 采集 1 次,其他时间每隔 30 d 采集样品 1 次。采取的样品立即放入-80 ℃冰箱中冻存备用。

DL2000 Marker 购自杭州博日, Dream-Taq 酶、dNTP、琼脂糖、琼脂糖凝胶回收试剂盒、M-MLV 逆转录酶、pMD 18-T 载体、氨苄青霉素、实时荧光定量试剂盒 SYBR Premix Dimer Eraser 等均购自大连宝生物公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京全式金公司;引物合成和测序为上海生工公司;其他生化试剂和耗材购置于南宁恒因。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

采用热硼酸法提取杧果总 RNA^[12]。用紫外分光光度计测定总 RNA 的 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀。通过比值大小判定其纯度和浓度,总 RNA 的完整度用 1.2% (ω , 后同)的琼脂糖凝胶电泳检测。cDNA 第一链合成用 M-MLV 逆转录酶,引物为 AUP 1,合成方法参照逆转录酶的使用说明书,合成后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测逆转录效果。

1.3 杧果 *MiCO* 基因全长的克隆

在前期研究获得的转录组数据中,挖掘出 1 个 *MiCO* 基因,利用 *MiCO* 基因序列设计全长引物(表 1),

表 1 引物序列及其用途
Table 1 Primer sequences and purpose

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	引物用途 Primer purpose
AUP 1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)18	逆转录 For cDNA synthesis
CO 3side	ATGGCGTCTAAGCTATGTGAC GGCCACGCGTCGACTAGTAC	全长克隆 For full length
Cou Cod	CGGTGTCGTCAACTTCTTTG TTCATTTCAGGGCCATCTTC	荧光定量 SYBR 法 SYBR real-time PCR
Actinlu Actind	CCGAGACATGAAGGAGAAGC GTGGTCTCATGGATACGAGCA	
qActinlu qActind	CCCAAGGCTAACAGAGAGAAGATG ATCACCAGAATCCAGCACAATACC	荧光定量 TaqMan 探针法 TaqMan real-time PCR
ProbeActin	FAM-CCAGGCCGTTCTGTCTCTATGCCA-TAMRA	
qCO qCO	TCTGGTGAACGACCACTGCTT GACGATGACGACGATACACTATGAC	
Probe CO	FAM-ACCTGGATTCTCCGGCCCCAA-TAMRA	

扩增‘四季杧’和‘紫花杧’cDNA,通过克隆测序,获得这2个杧果品种的 *MiCO* 基因全长序列。PCR反应体系为:cDNA 1 μ L,dNTP (10 mmol $\cdot$ L⁻¹) 0.5 μ L,上游引物和下游引物(10 μ mol $\cdot$ L⁻¹)各1 μ L,Dream-Taq酶0.15 μ L,buffer缓冲液2.5 μ L,加超纯水至25 μ L。PCR扩增参数为:95 $^{\circ}$ C预变性4 min;95 $^{\circ}$ C变性40 s,56 $^{\circ}$ C退火40 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共38个循环;72 $^{\circ}$ C再延伸10 min。PCR产物在1.5%的琼脂糖凝胶上电泳。

使用胶回收试剂盒回收纯化目的条带。将胶回收产物连接到pMD-18载体,连接产物转化大肠杆菌DH5a感受态细胞,震荡培养后涂板挑菌。通过菌液PCR、电泳检测后,选出条带正确的菌液送生工测序,获得基因全长的核苷酸序列。

1.4 杧果 *MiCO* 基因生物信息学分析

序列分析和氨基酸序列推导用BoXM2.6软件。利用NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站的Blast检索工具,对杧果 *MiCO* 基因的同源性和结构域进行预测和分析。用ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测杧果 *MiCO* 蛋白分子质量和等电点。用ClustalW软件比较分析氨基酸序列。蛋白系统进化树的构建用MEGA 4.0软件选择连接近邻算法NJ (neighbour joining)。

1.5 杧果 *MiCO* 基因表达模式分析

利用实时荧光定量SYBR法对 *CO* 基因的组织表达特性进行分析。以杧果 *MiActin1* 基因(登录号:JF737036)为内参基因^[13],*MiCO* 基因和内参基因特异引物见表1。实时荧光PCR扩增每个试样3次重复,同时设空白对照和阴性对照。荧光定量仪器为ABI7500型PCR仪。扩增反应程序参照试剂盒SYBR Premix Dimer Eraser(TaKaRa)说明书进行。

利用实时荧光定量TaqMan探针法对 *CO* 基因的年周期表达模式进行分析。以杧果 *MiActin1* 基因为内参基因^[13],*MiCO* 基因和内参基因特异引物见表1。实时荧光PCR扩增每个试样3次重复,同时设空白对照和阴性对照。荧光定量仪器为ABI7500型PCR仪。扩增反应采用2步法:95 $^{\circ}$ C 10min,然后95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1min,共40循环。

2 结果与分析

2.1 杧果 *MiCO* 基因的克隆与生物信息学分析

2.1.1 杧果 *MiCO* 基因全长的获得与序列分析 前

期转录组测序得到1个杧果 *MiCO* 基因全长序列,根据其序列信息设计全长引物分别扩增‘四季杧’和‘紫花杧’的cDNA,获得杧果不同品种 *MiCO* 基因序列。‘四季杧’*MiCO* 基因(HQ585995)和‘紫花杧’的 *MiCO* 基因(FJ719767)序列长度均为1 150 bp,开放阅读框也均为966 bp。序列比对发现这2个杧果品种的 *MiCO* 基因核苷酸和氨基酸序列均具有高度的同源性,彼此相似度超过99%。‘四季杧’和‘紫花杧’核苷酸只有4个碱基的差异,其中编码区有3个碱基差异,分别是第63位点,‘紫花’由A变为G、第359位点‘紫花’由T变成C和第806位点‘紫花’由G变成A。非编码区有1个碱基的差异,即在1 036位点,‘紫花’由A变为G;而其编码的氨基酸也存在3个变异位点(图1),分别为第28位点‘紫花’由天冬酰胺变成丝氨酸、第120位点‘紫花’由缬氨酸变成丙氨酸和第269位点‘紫花’由精氨酸变成赖氨酸。

2.1.2 *MiCO* 基因生物信息学分析 利用生物信息学软件对‘四季杧’与‘紫花杧’*MiCO* 基因全长序列进行分析,结果显示,2个品种的 *MiCO* 基因均编码322个氨基酸,等电点同为5.8,蛋白质分子质量差异不大,‘四季杧’*MiCO* 为35.30 ku,‘紫花杧’为35.22 ku。在322个氨基酸中,其中丝氨酸(Ser)最多,为37个,占氨基酸总数的11.49%。

对 *MiCO* 基因编码的氨基酸进行保守结构域预测,结果显示,*MiCO* 基因编码的氨基酸在1~100位点之间存在2个相互连在一起的B-box 锌指结构域,在250~300位点之间存在1个CCT结构域,属于第一类 *CO* 基因家族。从GenBank下载 *CO* 基因的氨基酸序列,发现不同物种的 *CO* 基因编码氨基酸数存在较大差异。利用ClustalW软件对下载的氨基酸序列进行比较分析,然后利用MEGA 4.0软件选择连接近邻算法构建 *CO* 蛋白的系统进化树。进化系统树显示,3类 *CO* 蛋白被明显的分开聚类,杧果 *MiCO* 蛋白属于第一类 *CO* 蛋白,与拟南芥的AtCOL4蛋白最相似而聚类到一起(图2)。

2.2 杧果 *MiCO* 基因的表达特性分析

2.2.1 杧果 *MiCO* 基因的组织表达特性分析 利用实时荧光定量SYBR法对杧果 *MiCO* 基因在不同组织中的表达情况进行分析。结果显示,*MiCO* 基因在杧果受试的各个组织中均表达,其中在花、嫩叶、以及幼果期都有较高的表达量,其中在花中表达量最高,在成熟叶和嫩茎中的表达量相对较低(图3)。

```

1  ATGGCGTCTAAGCTATGTGACTCGTGCAAATCCGCCACGGCCACTCTGTTCTGCCGGGCG
M  A  S  K  L  C  D  S  C  K  S  A  T  A  T  L  F  C  R  A
61  GACTCGGCTTTTTGTGTGTCA[A]CTGCGATACGAAAATCCACACGGCCAACAAGCTCGCG
D  S  A  F  L  C  V  [N]  C  D  T  K  I  H  T  A  N  K  L  A
121  TCTCGCCACGCGGAGTTTGGGTGTGCGAGGTCTGCGAGCAGGC GCCGGCTCACGTCACA
S  R  H  A  R  V  W  V  C  E  V  C  E  Q  A  P  A  H  V  T
181  TGCAAGGCCGACGCGCTGCACTCTGCGTCTGCGTGCAGCACGACATCCACTCGGCTAAC
C  K  A  D  A  A  A  L  C  V  A  C  D  H  D  I  H  S  A  N
241  CCCCTGGCGCGTGGCATGAGCGGTACAGTCACTCCATTCTACGACTCCGTGAACCTCC
P  L  A  R  R  H  E  R  V  P  V  T  P  F  Y  D  S  V  N  S
301  GCTGACAAACATAACGGTGTCTCAACTTCTTTGATGACGTGGAGGGAGGTGGTGATG[T]C
A  D  K  H  N  G  V  V  N  F  F  D  D  V  E  G  G  G  D  [V]
361  AGTAGGGAGGAAGCTGAAGCAGCTTCATGGCTGTTGCCCAACCCAAAGGTAGTTGAAGAT
S  R  E  E  A  E  A  A  S  W  L  L  P  N  P  K  V  V  E  D
421  GGCCCTGAAATGAACACTGGACAGTACGTGTTCTCGGATATGGATCCGTATTGGATCTG
G  P  E  M  N  T  G  Q  Y  V  F  S  D  M  D  P  Y  L  D  L
481  GATTATGGGCTGTGGATCCGAACTGGAGGCCCAAGAACAGAACAGTTCAGGTACAGAC
D  Y  G  P  V  D  P  K  L  E  A  Q  E  Q  N  S  S  G  T  D
541  GGAGTCGTCCCTGTACAAAGCCAAACCGCTCCCGTTCTCTGGTGAACGACCACTGCTTC
G  V  V  P  V  Q  S  Q  T  A  P  V  P  L  V  N  D  H  C  F
601  GACCTGGATTCTCCGGCCCCAAATCTTTTGGCTATGGATCAACAACACTCAGTGTCTC
D  L  D  F  S  G  P  K  S  F  G  Y  G  Y  N  N  T  Q  C  L
661  AGTCATAGTGATCGTCGTCATCGTTGGATGTTGGAGTGGTGCCAGACGGCAGTGCAGCG
S  H  S  V  S  S  S  S  L  D  V  G  V  V  P  D  G  S  A  T
721  ACGGAGTCGACAAATCAGACGGTTCAGCTATCATCGGCGGACAGGGAGGCGCGTGTGCTG
T  E  S  T  N  Q  T  V  Q  L  S  S  A  D  R  E  A  R  V  L
781  AGGTACAGAGAGAAGAGAAAGAACA[G]GAAGTTTGAGAAGACGATACGGTATGCATCAAGA
R  Y  R  E  K  R  K  N  [R]  K  F  E  K  T  I  R  Y  A  S  R
841  AAGGCGTACGCGGAGATGAGGCCGAGAATCAAAGGAAGTTGCGAAAGCGTACGGACATG
K  A  Y  A  E  M  R  P  R  I  K  G  R  F  A  K  R  T  D  M
901  GACGTGGAAGCCGATCGGAGTAGCAACAGTAGTAGTATCTACGGATTGCGCGTCTCCG
D  V  E  A  D  R  S  S  N  S  S  S  I  Y  G  F  G  V  V  P
961  TCTTACTAATTATCTAAGAAAATAATTTTTATGTAATAAAATTTGGGTGTTTAAATTTAT
S  Y  *
1 021  GGTTGAATGTATAT[A]AGGTAAGGTGCGGTGAGATGTCTGATTTGGTGCAAGTTTTTATGTA
1 081  GTAATCGAGTAATGAACTTTTAATGTATCATCGAAGTTTTTCTAAAAAAAAAAAAAAAA
1 141  AAAAAAAAAA

```

方框内为四季杧与紫花杧 *MiCO* 基因比较变异的位点。

The variable sites between SiJi and ZiHua were marked by box.

图1 ‘四季杧’*MiCO* 基因全长序列及其推导的氨基酸序列

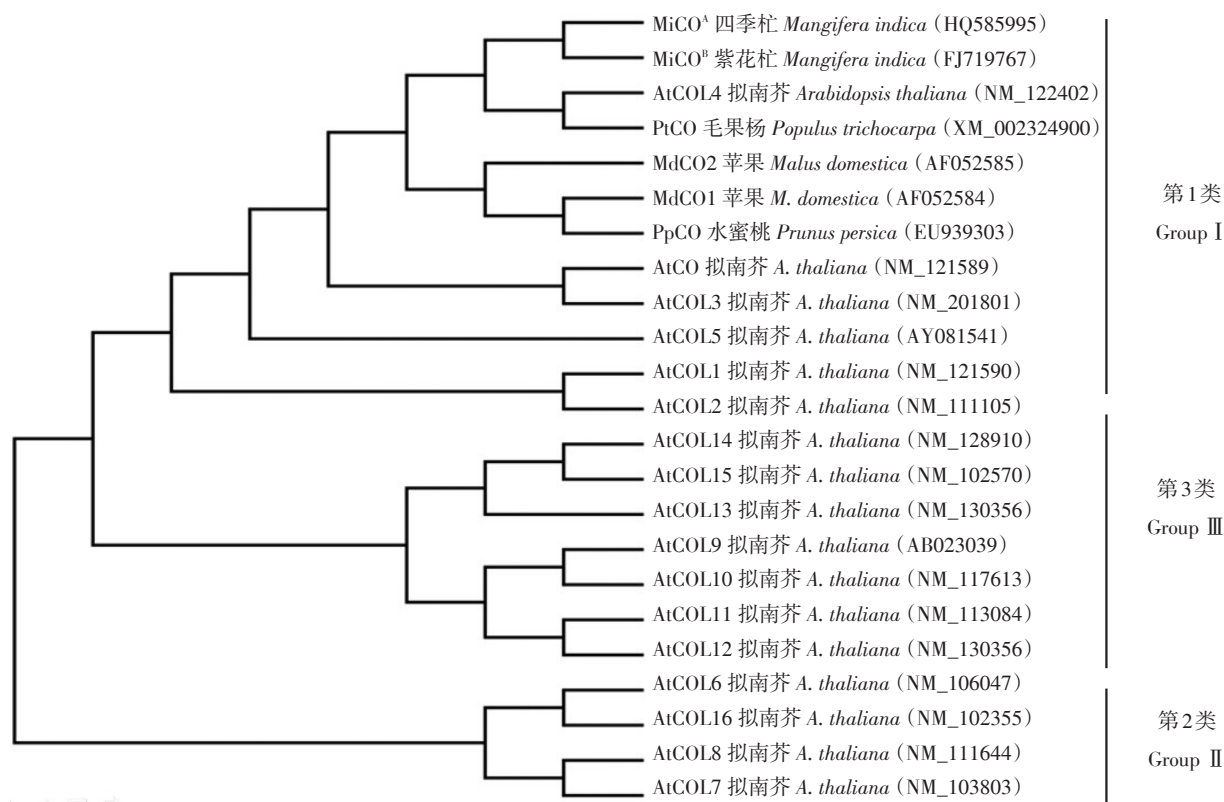
Fig. 1 The full length sequence and deduced amino acid of *MiCO* gene from *Mangifera indica* ‘SiJi’

2.2.2 *MiCO* 同源基因年周期表达模式分析 利用实时荧光定量 TaqMan 探针法对杧果 *MiCO* 基因在‘四季杧’和‘紫花杧’2个杧果品种的成熟叶、成熟茎和嫩茎年周期表达模式进行分析(图4)。

在‘四季杧’中,*MiCO* 基因在嫩茎中表达量最高,成熟叶次之,成熟茎再次之。嫩茎在8月份出现第一个表达高峰,而后下降,10月表达水平开始回升,在12月达到表达高峰,在第二年的5—6月还存在一个表达高峰。成熟叶表达水平在10月开始上

升,在11月份出现一个表达高峰,而后下降,在其他时间其表达水平很低;成熟茎在10月和12月出现2个小的表达高峰,而在其他时间表达水平很低。

在‘紫花杧’中,从7月到第二年的3月,*MiCO* 基因在成熟叶片中表达水平最高,成熟茎次之,嫩茎再次之;而在来年的3月到6月之间,则在嫩茎中的表达水平最高。成熟叶在10月末表达水平急速上升,在11月达到表达高峰,其后又迅速下降,在来年的2月份出现第二个表达高峰,在其他时间表达水平较

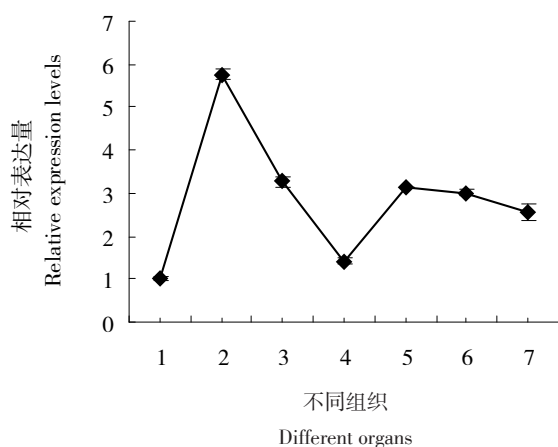


MiCO^A 和 MiCO^B 分别代表‘四季杧’和‘紫花杧’的 MiCO 蛋白。

MiCO^A and MiCO^B represent CO protein from *M. indica* ‘SiJi’ and ‘ZiHua’ respectively.

图 2 不同物种 MiCO 蛋白聚类分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of MiCO proteins from various plants



1. 嫩茎; 2. 花; 3. 嫩叶; 4. 成熟叶; 5~7. 盛花后 7、50 和 90 d 的果实。

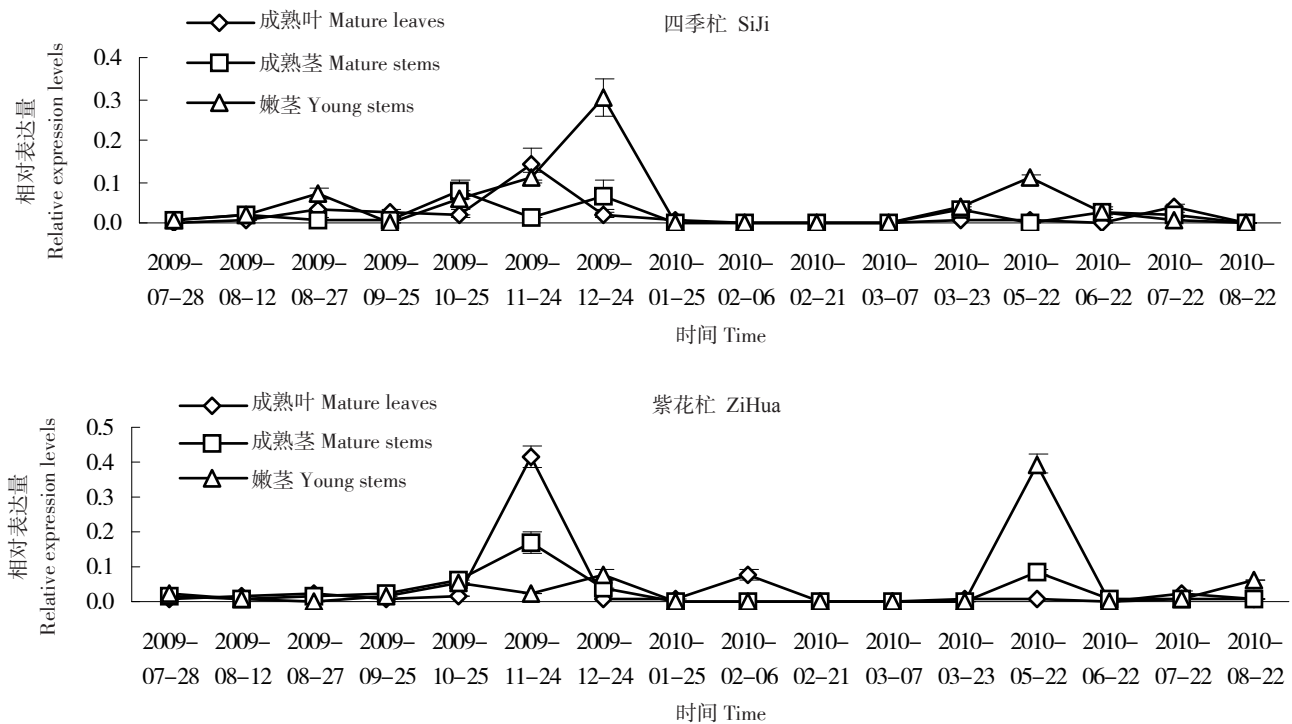
1. Young stem; 2. Flower; 3. Young leaf; 4. Mature leaf; 5~7. Fruit of 7, 50 and 90 days after full flowering.

图 3 *MiCO* 基因在不同组织中的表达模式

Fig. 3 The expression patterns of mango *MiCO* gene in different organs

低;成熟茎中,从10月份开始表达水平开始上升,在11月到达表达高峰,在5月份还存在一个小的表达高峰,而在其他时间表达水平很低;嫩茎中,其在10月和12月存在2个小的表达高峰,而在5月份出现一个较高的表达高峰,在其他时间表达水平较低。

2个杧果品种 *MiCO* 基因表达水平比较分析显示,在成熟叶中,2个杧果品种均在11月份达到表达高峰,但‘紫花杧’表达水平明显高于‘四季杧’,而‘紫花杧’在来年2月还存在第二个表达高峰。在成熟茎中,‘四季杧’在10月和12月存在2个小的表达高峰,而‘紫花杧’在10—12月均维持较高的表达水平,并在11月达到表达高峰;在嫩茎中,‘四季杧’在8月出现一个小的表达高峰,并在10月到第二年的1月维持较高的表达水平,表达高峰出现在12月份,而‘紫花杧’在10月到第二年的1月之间表达水平相对较低,在第二年的5月份2个品种都出现另外一个表达高峰,并且‘紫花杧’*MiCO* 基因的表达水平高于‘四季杧’。

图 4 *MiCO* 基因年周期表达模式Fig. 4 The expression patterns of *MiCO* gene during annual periodicity

3 讨 论

CO 基因是植物光周期途径过程中的关键基因,它位于生物钟的输出途径,是监测日照长短的重要元件,它可以整合外源光信号和内源生物钟信号,节律性地调控 *FLOWERING LOCUS T (FT)* 基因的表达,从而诱导植物开花^[8,14]。*CO* 基因是 Putterill 等^[15]首次从拟南芥开花延迟突变图中分离克隆而来,而在随后的研究中,研究者从拟南芥中分离得到了 17 个 *CO* 同源基因^[6]。*CO* 基因氨基酸具有 2 个功能结构域, B-box 结构域和 CCT 结构域,根据 B-box 结构域在基因氨基酸序列上的分布情况又可把 *CO* 基因分为 3 大类,第一类为包含 2 个 B-box 结构域基因,即: *CO*、*COL 1-COL 5*;第二类为只包含一个 B-box 结构域基因,即 *COL 6-COL 8*、*COL 16*;第三类为包含 1 个 B-box 结构域和 1 个二级结构发生变化的锌指蛋白结构域,即 *COL 9-COL 15*^[6,16]。在前期研究中,笔者利用转录组测序技术对“四季杞”进行了高通量测序,获得了约 100 G 的转录组数据(未发表数据)。从杞果转录组数据中也分离获得了 17 类 *CO* 基因,包括 *MiCO*、*MiCOL 1-MiCOL 16*, 序列分析显示,不同类型的 *CO* 基因彼此之间的序列同源性很

低,推测不同类型的 *CO* 基因其功能存在差异,因此这些 *CO* 基因在杞果成花过程中的作用需要逐个展开深入研究。本研究中,笔者分别克隆了具有不同成花习性的 2 个杞果品种的 *MiCO* 基因,序列分析显示其高度保守,只有几个核苷酸和氨基酸的差异, *MiCO* 基因与其他物种的 *CO* 基因一样也具有典型的 B-box 锌指结构域和一个 CCT 结构域,属于第一类 *CO* 基因。

目前许多物种的 *CO* 基因通过同源克隆法被分离出来,但大部分获得的 *CO* 基因都属于第一类 *CO* 基因家族。在拟南芥中, *AtCO* 在长日照下促进开花^[17]; *AtCO 1* 和 *AtCO 2* 的表达受生物节律钟的调节,超量表达 *AtCO 1* 能明显缩短 2 个生物钟之间的时间间隔,表明它能影响光信号的传递^[18]; *AtCOL 3* 在短日照和长日照下阻遏开花^[19]; *AtCOL 5* 在短日照下能促进拟南芥开花^[20]; Min 等^[21]对拟南芥 *AtCOL 4* 基因进行了深入研究,分析发现 ABA、盐和渗透胁迫诱导 *AtCOL 4* 基因强烈表达, *AtCOL 4* 基因的功能缺失体拟南芥植株对 ABA 和盐胁迫的敏感性增加,相反超量表达 *AtCOL 4* 基因转基因拟南芥植株对 ABA 和盐胁迫的敏感性低于野生型拟南芥,说明拟南芥的 *AtCOL 4* 基因与逆境胁迫应答有关,而 *AtCOL 4* 基因转

基因拟南芥植株和 *AtCOL4* 基因的功能缺失体拟南芥植株与野生型比较,其生长发育过程和开花时间无明显差异。以上研究说明同属于第一类的 *CO* 基因功能彼此存在差异。

Jeong 等^[22]从苹果上克隆了 2 个 *CO* 同源基因 (*MdCOL1* 和 *MdCOL2*),表达分析显示这些基因在各个组织中均表达,但在花芽和幼果中表达量更高,而杧果 *MiCO* 基因在各个组织中也均有表达,但除花、幼果中表达量高外,在嫩叶的表达量也高。Almada 等^[23]从葡萄上克隆到 2 个 *CO* 同源基因 *VvCO* 和 *VvCOL1*,表达模式分析显示,*VvCO* 基因在 11—12 月表达量最高,之后迅速下降,在来年 3 月份还有一个小的表达高峰,但其他月份表达量很低,*VvCOL1* 基因则与 *VvCO* 基因的表达模式完全不同,除了在 2 月和 9 月份表达量很低外,其他月份表达量比较高。在本研究中,杧果 *MiCO* 基因在花芽分化期的 11—12 月高度表达,之后迅速下降,在来年 5—6 月还有一个小的表达高峰,这与葡萄的 *VvCO* 基因表达模式既存在相似之处也存在差异。

杧果 *MiCO* 基因主要在花芽分化期的 10—12 月具有较高的表达水平,说明 *MiCO* 基因与杧果成花密切相关。而在 2 个杧果品种中,‘四季杧’和‘紫花杧’的 *CO* 基因表达模式在整体上趋势类似但也存明显差异,这可能跟 2 个杧果品种不同的开花习性有关。而 2 个杧果品种 *MiCO* 基因的核苷酸和氨基酸序列存在少许几个碱基和氨基酸的差异,因此 *CO* 基因表达模式的差异也可能与不同杧果品种中 *CO* 基因上下游调控模式存在差异有关。本试验结果可为进一步深入研究杧果 *MiCO* 基因在调控杧果成花机制中的作用积累资料。

参考文献 References:

- [1] 陈晓,陈彦惠,任永哲. 植物开花转换的分子生物学研究[J]. 分子植物育种,2005,3(4): 557-565.
CHEN Xiao, CHEN Yanhui, REN Yongzhe. Research on the molecule biology of flowering transition in higher plant[J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(4): 557-565.
- [2] ONOUCHI H, IGENO M I, PERILLEUX C, GRAVES K, COUPLAND G. Mutagenesis of plants over-expressing *CONSTANS* demonstrates novel interactions among *Arabidopsis* flowering-time genes[J]. The Plant Cell, 2004, 12(6): 885-900.
- [3] CHAURASIA A, PATIL H, AZEEZ A, SUBRAMANIAM V, KRISHNA B, SANE A, SANE P. Molecular characterization of *CONSTANS-Like (COL)* genes in banana (*Musa acuminata* L. AAA Group, cv. Grand Nain) [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2016, 22(1): 1-15.
- [4] TAN J, JIN M, WANG J, WU F, SHENG P, CHENG Z, WANG J, ZHENG X, CHEN L, WANG M, ZHU S, GUO X, ZHANG X, LIU X, WANG C, WANG H, WU C, WAN J. *OsCOL10*, a *CONSTANS-Like* gene, functions as a flowering time repressor downstream of *Ghd7* in rice[J]. Plant & Cell Physiology, 2016, 57(4): 798-812.
- [5] GANGAPPA S N, BOTTO J F. The *BBX* family of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(7): 460-470.
- [6] ROBSON F, COSTA M, HEPWORTH S R, COUPLAND G. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants[J]. The Plant Journal, 2001, 28(6): 619-631.
- [7] 郭春晓,田素波,郑成淑,王文莉,孙宪芝. 光周期途径植物开花决定关键基因 *FT*[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3): 613-618.
GUO Chunxiao, TIAN Subo, ZHENG Chengshu, WANG Wenli, SUN Xianzhi. *FT* gene of flowering determination of plants in photoperiod pathway[J]. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(3): 613-618.
- [8] 付建新,王琳琳,戴思兰. *FT/TFL1* 基因家族调控高等植物生长发育的分子机制[J]. 分子植物育种(网络版), 2011, 9: 1662-1672. doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0093. <http://biopublisher.cn/html-553-1-mpb>.
FU Jianxin, WANG Linlin, DAI Silan. Molecular mechanism of *FT/TFL1* gene family regulating the development of higher plant [J]. Molecular Plant Breeding (Online), 2011, 9: 1662-1672. doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0093. <http://biopublisher.cn/html-553-1-mpb>.
- [9] YANO M, KATAYOSE Y, ASHIKARI M, YAMANOUCHI U, MONNA L, FUSW T, BATA T, YAMAMO- TO K, UMEHARA Y, NAGAMURA YSASALI T. *Hdl1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*[J]. The Plant Cell, 2000, 12(12): 2473-2483.
- [10] MILLER T A, MUSLIN E H, DORWEILER J E. A maize *CONSTANS-like* gene, *conz1*, exhibits distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods[J]. Planta, 2008, 227(6): 1377-1388.
- [11] FU J X, YANG L W, DAI S L. Identification and characterization of the *CONSTANS like* gene family in the short day plant *Chrysanthemum lavandulifolium*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2015, 290(3): 1039-1054.
- [12] WAN C Y, WILKINS T A. A modified hot borate method significantly enhances theyield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Analytical Biochemistry, 1994, 223(1): 7-12.
- [13] LUO C, HE X H, CHEN H, HU Y, OU S. Molecular cloning and expression analysis of four *actin* genes (*MiACT*) from mango[J].

- Biologia Plantarum, 2013, 57(2): 238–244.
- [14] ZHANG Z, WANG P, LI Y, MA L, LI L, YANG R, MA Y, WANG S, WANG Q. Global transcriptome analysis and identification of the flowering regulatory genes expressed in leaves of *Lagerstroemia indica*[J]. DNA and Cell Biology, 2014, 33(10): 680–688.
- [15] PUTTERILL J, ROBSON F, LEE K, SIMON R, GOUPLAND G. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors[J]. Cell, 1995, 80(6): 847–857.
- [16] LAGERCRANTZ U, AXELSSON T. Rapid evolution of the family of *CONSTANS LIKE* genes in plants[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(10): 1499–1507.
- [17] VALRED F. *CONSTANS* and the evolutionary origin of photoperiodic timing of flowering[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(8): 2453–2463.
- [18] LENDER S, KAY S A, PUTTERILL J. Analysis of the function of two circadian-regulated *CONSTANS-LIKE* genes[J]. Plant Journal, 2001, 26(1): 15–22.
- [19] DATTA S, HETTIARACHCHI G H, DENG X W, HOLM M. *Arabidopsis* *CONSTANS-LIKE3* is a positive regulator of red light signaling and root growth[J]. Plant Cell, 2006, 18(1): 70–84.
- [20] HASSIDIM M, HARIR Y, YAKIR E, KRON I, GREEN R M. Over-expression of *CONSTANS-LIKE 5* can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis*[J]. Planta, 2009, 230(3): 481–491.
- [21] MIN J H, CHUNG J S, LEE K H, KIM C S. The *CONSTANS-like 4* transcription factor, *AtCOL4*, positively regulates abiotic stress tolerance through an abscisic acid-dependent manner in *Arabidopsis* [J]. Plant Biology, 2015, 57(3): 313–324.
- [22] JEONG D H, SUNG S K, AN G. Molecular cloning and characterization of *CONSTANS-Like* cDNA clones of the Fuji apple[J]. Journal of Plant Biology, 1999, 42(1): 23–31.
- [23] ALMADA R, CABRERA N, CASSRETTO G A, LAEA S R, VILLANUEVA E G. *VvCO* and *VvCOL1*, two *CONSTANS* homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds[J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(8): 1193–1203.

· 会 讯 ·

第二届河南省草莓产业技术交流会在河南孟津召开

第二届河南省草莓产业技术交流会于2017年3月4—6日在河南省孟津县成功举办。大会由河南省草莓协会和孟津县人民政府共同主办,洛阳市农发农业科技公司承办,孟津县农业局、县科技局、县科协、县旅游局协办。孟津县政府刘文文副县长代表东道主致欢迎辞,河南省科技厅刘彦宾处长对进一步提升河南省草莓产业的科技水平、推进省内外有关新成果的转化应用作了要求,河南省草莓协会理事长、中国农业科学院郑州果树研究所刘君璞研究员在致辞中指出河南省草莓协会应最广泛地凝聚全省甚至全国草莓界的力量,进一步促进河南草莓产业的发展,为农民持续稳定增收、为农业供给侧改革做出草莓人应有的贡献,并对协会工作提出了要求和希望。中国园艺学会草莓分会理事长张运涛研究员在讲话中高度评价了河南省草莓产业在协会成立后的快速发展及取得的成绩,介绍了全国草莓产业的发展形势。会议由中国园艺学会草莓分会副理事长、河南省草莓协会副理事长兼秘书长周厚成博士主持。来自河南全省18个市及省外的两百余位代表及河南电视台、果农之友杂志社等多家媒体代表参加了会议。河南省草莓协会挂靠单位中国农业科学院郑州果树研究所的领导和专家也参加了会议。

在技术交流报告会上,15位草莓界专家学者和产业代表先后做了报告。报告内容涵盖我国草莓产业发展现状和展望、土壤生态重建、品种选育、种苗繁育和出口、设施栽培提

质增效技术、病虫害防控技术以及草莓加工、市场营销等草莓全产业链涉及的多方面技术研究进展。这些报告分别是《草莓产业发展现状和展望》(张运涛)、《有机循环农业草莓高效栽培技术》(姜卓俊)、《草莓苗出口生产流程》(李怀宝)、《设施草莓提质增效核心技术分析与探讨》(李军见)、《草莓加工技术》(王思新)、《河南省草莓产业发展新态势》(李亮杰)、《草莓与西瓜套种技术》(朱忠厚)、《河南省草莓育苗技术》(李刚)、《土壤生态重建技术及应用》(王静伟)、《河南省草莓主要病虫害及其防治方法》(杜小亮)、《利用胡瓜钝绥螨控制草莓小型害虫害螨》(林坚贞)、《烟雾法喷施防治大棚草莓病虫害》(马旭)、《适宜河南省草莓生产的温室大棚分析》(杨祖墩)、《草莓水肥一体化解决方案》(郑雪松)、《草莓无土栽培技术》(高兴洋)等。

大会期间举行了精品草莓擂台赛,来自全省11个市及安徽、江苏等地选送参赛的20余个品种150多份草莓样品,经过10位省内外评委专家对草莓样品的外观、口感、品质的综合鉴评,结合样品的农残检测及果实含糖量测定的结果,评选出了金奖20个、银奖25个、优秀奖25个。另外,大会期间与会代表集中考察了孟津县5家单位的草莓生产基地,对各基地的栽培模式与管理经验以及存在的问题进行了现场研讨。

(周厚成 中国农业科学院郑州果树研究所 450009)