

板栗花发育 B 类基因 *CmPI* 的克隆及功能分析

郭晓萌^{1, 2, 3}, 杨前宇³, 程丽莉^{1, 2}, 胡广隆^{1, 2}, 刘钊⁴, 周广柱³, 兰彦平^{1, 2*},
程运河^{1, 2*}

(¹北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093; ²国家林草局板栗工程技术研究中心, 北京 100093;
³沈阳农业大学林学院, 沈阳 110086; ⁴北京农学院, 北京 102200)

摘要: 【目的】对板栗花器官 B 类基因 *PISTILLATA* (*PI*) 进行鉴定和功能分析。【方法】在板栗基因组数据中检索 *PI* 同源基因 *CmPI*, 并克隆编码区序列。利用在线工具对 *CmPI* 进行生物信息学分析。通过荧光定量 PCR 分析 *CmPI* 在板栗不同组织及不同花发育时期的时空表达模式。构建 35S::*CmPI*-GFP 融合载体, 瞬时转化烟草叶片, 进行基因表达的亚细胞定位分析。将过表达载体 35S::*CmPI* 转入野生型拟南芥获得过表达植株, 验证 *CmPI* 在花发育中的功能。【结果】克隆到的板栗 *CmPI* 基因开放阅读框长度 630 bp, 编码 209 个氨基酸, 有高度保守的 MADS 域 (MADS-box) 和 K 域 (K-box), 属 MADS 的 II 型亚家族转录因子, 定位于细胞核。*CmPI* 主要在板栗雄花中表达。在拟南芥中过表达 *CmPI* 导致萼片转变为花瓣样组织。荧光定量 PCR 结果表明, *CmPI* 过表达拟南芥中除 C 类基因 *AtAG* 表达量显著高于野生型外, 其他 A 类、B 类、E 类基因的表达量均低于野生型拟南芥。【结论】笔者鉴定到的 MADS-box 基因 *CmPI* 为板栗花发育 B 类基因, 可导致萼片花瓣化, 可能是抑制雌花苞片进一步发育的关键基因。

关键词: 板栗; 花器官; B 类基因; 基因功能验证; *PISTILLATA*

中图分类号: S664.2 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2024)08-0001-08

Cloning and functional analysis of *CmPI*, a class B flower development gene in Chinese chestnut

GUO Xiaomeng^{1, 2, 3}, YANG Qianyu³, CHENG Lili^{1, 2}, HU Guanglong^{1, 2}, LIU Zhao⁴,
ZHOU Guangzhu³, LAN Yanping^{1, 2*}, CHENG Yunhe^{1, 2*}

(¹Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093, China; ²Chestnut Engineering Technology Research Center, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100093, China; ³College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110086, Liaoning, China; ⁴Beijing University of Agriculture, Beijing 102200, China)

Abstract: 【Objective】A complete flower consists of four floral organs, which are sepals, petals, stamens, and carpels from the outside to the inside. In the 'ABC(D)E' flower development regulation model, each round of flower organ development is specifically regulated by corresponding genes. The variation of plant flowers in the process of evolution has produced a different four-wheeled flower organ structure from the classic one. Such as chestnut, poplar, walnut, jatropha, birch are catkins, their flowers are unisexual, and no petals and sepals. In these plants, the petals and sepals are replaced by bracts. The development of bracts may be co-regulated by A, B and E genes. As a typical representative of Fagaceae plants, the female and male flowers of chestnut differ greatly in morphology. The male bracts of chestnut are small and thin, and the stamens are easy to extend out during flowering. The female flowers of chestnut are

收稿日期: 2024-03-18; 接受日期: 2024-04-24

基金项目: 北京市农林科学院青年科研基金 (QNJJ202315); 国家自然科学基金 (32301624); 北京市农林科学院林业果树研究所青年科研基金 (LGSJJ202402)

作者简介: 郭晓萌, 女, 硕士研究生, 研究方向为木本植物发育生理与分子生物学。Tel: 010-82590742, E-mail: 1985156098@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 010-82590742, E-mail: lanyanping2000@126.com; E-mail: heyuncheng666@163.com

usually 3 to 5 grouped together in clusters at the base of mixed inflorescences. The female flower cluster is surrounded by numerous bracts. After the female flower is fertilized, the bracts develop into epicarp.

The sexual dimorphism of chestnut bracts may also be regulated by MADS-box gene. PI gene is one of class B genes, which is involved in the development regulation of petals and stamens, and is one of the ideal genes for studying the development regulation of chestnut bracts. In this study, the *Castanea mollissima* variety 'Yanshan Hongli' was used as experimental material. Homology cloning, evolutionary analysis, spatio-temporal expression analysis and functional verification of Class B flower organ development gene CmPI of *Castanea mollissima* were used to lay a foundation for the molecular regulation of bracteal dimorphism of *Castanea mollissima*. **【Method】** The PI homologous gene CmPI was retrieved from the genome data of Chinese chestnut. The coding region sequence was cloned by RT-PCR. Bioinformatics analysis of CmPI was performed using online tools. The temporal and spatial expression patterns of CmPI in different tissues and flower development stages of Chinese chestnut were analyzed by fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). The 35S::CmPI-GFP fusion vector was constructed to transform tobacco leaves instantaneously for subcellular localization analysis. Overexpression vector 35S::CmPI was transferred into wild *Arabidopsis thaliana* to obtain overexpression plants for detecting the function of CmPI in flower development. The expressions level of flower development genes of *Arabidopsis thaliana* were analyzed. **【Results】** The coding sequence of CmPI was 630bp long, encodes 209 amino acids. CmPI protein is a hydrophilic protein with a theoretical molecular weight of 82015.9 Da and an isoelectric point of 5.1. MEGAX was used to construct the phylogenetic tree of PI homologous proteins of *Castanea mollissima*, *Glycine max*, *Cucumis sativus*, *Vitis vinifera*, *Betula platyphylla*, *Helianthus annuus*, *Liriodendron chinense*, *Salix purpurea*, *Nymphaea tetragona*, *Chenopodium quinoa* and *Arabidopsis thaliana*. The results showed that CmPI has the closest relationship with *Betula platyphylla*, followed by *Glycine max*, *Cucumis sativus* and *Vitis vinifera*. CmPI has conserved MADS domain (MADS-box) and K domain (K-box), and belongs to the type II subfamily of MADS transcription factors. CmPI is mainly expressed in male flowers of Chinese chestnut. The expression of CmPI in *Castanea mollissima* male flower kept increasing until 31th May. The constructed 35S::CmPI-GFP vector and 35S::GFP empty vector were infected by Agrobacterium-mediated method to carry out instantaneous expression. Fluorescence signals of empty carriers were distributed on the cell membrane, cytoplasm and nucleus, while fluorescence signals of 35S::CmPI-GFP were only distributed on the nucleus, indicating that CmPI gene was localized in the nucleus. In early flower development of *Arabidopsis thaliana* plants with overexpression of CmPI, the sepals become narrow and there are gaps between the sepals, which can not wrap the internal flower organ structure. After flowering of *Arabidopsis thaliana* plants with overexpression of CmPI, the sepals and petalization were scattered. The measurement results showed that the sepal width of CmPI transgenic plants was 0.59 mm, which was significantly lower than that of wild *Arabidopsis thaliana*. The length of the sepals was 2.49 mm, which was significantly higher than that of wild *Arabidopsis thaliana*. There was no significant difference in petal length between CmPI transgenic plants and wild individuals. The gene expression analysis of A, B, C and E genes related to the regulation of sepals and petals in transgenic lines and wild type individuals showed that class C gene *AtAG* was significantly higher in CmPI-OE lines than wild type *Arabidopsis thaliana*. And the expression levels of class A gene *AtAPI* and class B gene *AtAP3/AtPI*, E class genes

AtSEP1/AtSEP2/AtSEP3/AtSEP4 were lower than wild type *Arabidopsis*. 【 Conclusion 】 The MADS-box gene *CmPI* is a B class gene in Chinese chestnut, which can lead to the petalization of sepals and may be a key gene in inhibiting the further development of female flower bracts.

Keywords: *Castanea mollissima*; Class B genes; Flower organs; Gene function verification; *PISTILLATA*

在植物发育过程中, 茎尖分生组织首先产生叶片等营养器官, 植株发育到特定阶段后, 在外界环境和内源激素等条件的共同影响下, 开始由营养生长转向生殖生长。此时, 茎尖分生组织分化出花序或花原基, 最终发育为花^[1]。一朵完全花由四轮花器官组成, 由外到内依次为萼片、花瓣、雄蕊和心皮^[2]。在‘ABC (D) E’花发育调控模型中, 每一轮花器官的发育都由相应的基因特异性调控, 其中 A (*API* 和 *AP2*) +E (*SEP*) 类基因决定萼片身份, A+B (*AP3* 和 *PI*) +E 类基因共同控制花瓣身份, B+C (*AG*) +E 类基因共同控制雄蕊的生长发育, C+E 类基因确定心皮的身份^[3-4]。

植物花在进化过程的变异, 产生了不同于经典的四轮花器官结构。如板栗、杨树、核桃、小桐子、白桦树等植物为柔荑花序, 其花单性, 无花瓣和萼片。在这些植物中, 花瓣和萼片由苞片替代^[5]。苞片的发育可能同时受 A、B、E 基因的共同调控^[6]。板栗作为壳斗科植物的典型代表, 其雌花和雄花形态差异较大。板栗雄花苞片小而薄, 花期易于雄蕊伸出。板栗雌花通常 3~5 朵聚合为雌花簇, 着生于混合花序基部, 雌花簇由大量苞片包围。板栗雌花受精后, 苞片发育为壳斗。板栗苞片的性二态发育可能同样受 *MADS-box* 基因调控。目前已有研究在板栗和欧洲栗基因组中对 *MADS-box* 基因进行了鉴定和表达分析, 但未进行生物学功能验证^[7]。*PI* 基因是 B 类花发育基因之一, 参与花瓣和雄蕊的发育调控, 是研究板栗苞片发育调控机制的理想基因之一。笔者以板栗 (*Castanea mollissima*) 品种燕山红栗为试验材料, 通过对板栗 B 类花器官发育基因 *CmPI* 的同源克隆、进化分析、时空表达分析和功能验证, 为解析板栗苞片性二态发育的分子调控机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以板栗品种燕山红栗为材料, 分别取雄花、雌花、胚、叶芽、花芽、茎尖及叶片, 雄花从 5 月 11 日始, 每隔 7 d 取样一次, 共取样 5 次, 样品经液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱保存。

课题组实验室保存的 *Columbia* 野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 用于目的基因的同源过表达验证, 本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 用于亚细胞定位融合载体的瞬时转化。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取与反转录 取液氮速冻后存于 -80 °C 冰箱的 100 mg 植物组织进行 RNA 提取。按照 TaKaRa 公司植物 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit, 9769) 说明书提取总 RNA。提取完成后检测总 RNA 的浓度和纯度, 再用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进一步检测总 RNA 的完整性。利用 TaKaRa 公司的反转录试剂盒 (PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser, RR047Q), 按照其说明书合成 cDNA 第一链, 反转录产物存放于 -20 °C 冰箱。

1.2.2 板栗 *PI* 基因克隆 根据板栗基因组测序数据 (<http://chestnutgenome.cn>) 利用 DNAMAN 软件设计板栗 *CmPI* 编码区序列 (CDS) 全长引物 (表 1)。以反转录产物为模

板进行 *CmPI* 基因的 CDS 扩增。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后，利用 TAKARA 胶回收试剂盒（TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0, 9761）回收目的条带。将回收产物连接 pBM21（pBM21 Topsmart Cloning Kit）载体上，转化大肠杆菌 DH5 α ，在含氨苄霉素的 LB 培养基上，放置 37 °C 恒温培养 16 h，送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析 利用 EXPACY 网站（<http://www.expacy.org/>）预测其编码蛋白的等电点和分子质量大小及其亲/疏水性；在 NCBI 数据库（<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>）中通过 Conserved Domains 进行 *CmPI* 基因的保守域预测。从 NCBI 数据库下载大豆（*Glycine max*）、黄瓜（*Cucumis sativus*）、葡萄（*Vitis vinifera*）、白桦（*Betula platyphylla*）、向日葵（*Helianthus annuus*）、鹅掌楸（*Liriodendron chinense*）、红皮柳（*Salix purpurea*）、睡莲（*Nymphaea tetragona*）、藜麦（*Chenopodium quinoa*）、拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的 PI 氨基酸序列并与 *CmPI* 在 MEGAX 软件中，用邻接法（Neighbor-Joining）构建进化树，校验参数为 bootsrap=1000。

表 1 PCR 引物信息

Table 1 Primers used for gene cloning

名称 Name	正向引物 Forward primer (5'→3')	反向引物 Reverse primer (5'→3')
<i>CmPI</i> -CDS	ATGGGGAGAGGCAAGATTGAGA	TTACATCCTCTCTGTAGATT
<i>CmPI</i> -qPCR	GCATGAGAACCTTAGCAATGAG	CGACAGCCATCAGATTTTCAA
<i>Cm</i> -ACTIN	ATTCACGAGACCACCTACA	TGCCACAACCTTAATCTTCAT
<i>CmPI</i> -GW-SL	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTT GGAATGGGGAGAGGCAAGATTG	CGGCCGCACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGTATTACATC CTCTCTGTAGATTTCCG
<i>CmPI</i> -GW-OE	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGTT GGAATGGGGAGAGGCAAGATTG	CGGCCGCACAACCTTTGTACAAGAAAGTTGGGTATTACATC CTCTCTGTAGATTTCCG
<i>AtAPI</i> -qPCR	CATTCTCGAAAAGAAGAGCTGG	ACTCCATCGACCAGTTTGTATT
<i>AtPI</i> -qPCR	GCATGAGAACCTTAGCAATGAG	CGACAGCCATCAGATTTTCAA
<i>AtAP3</i> -qPCR	GTCAAGTCACTTTTGTCAAACG	GGTTTCTTGCAATTCGCTCATAT
<i>AtAG</i> -qPCR	GTCAAGTCACTTTTGTCAAACG	TTGCCTTCTGTACCTCTCAAT
<i>AtSEP1</i> -qPCR	GAAACCAATAGAGCTTTGGCAA	GCGTAGGTAACATTCTGTTCAC
<i>AtSEP2</i> -qPCR	ATCAGAAGTGTAGCTATGGCTC	CAAGAAGATTCTCTGCTGACG
<i>AtSEP3</i> -qPCR	CAAGATCAATAGGCAAGTGACG	TGGTGCTCCATAGTTACTCTT
<i>AtSEP4</i> -qPCR	GAGCTTCTGTCTTTGTGATG	TATACTTATCAACCGTCTCGC
<i>At</i> -ACTIN	GAAATTCAGGAGCAAGCCGTCT CAG	ATCAACTCTCAGCCAAAATCGCAAG

1.2.4 *CmPI* 在板栗中的时空表达模式分析 以不同组织和不同发育时期雄花 RNA 反转录产物为模板，进行实时荧光定量 PCR。利用 DNAMAN 设计特异引物。以 *CmActin* 基因为内参（表 1）^[8]。具体步骤参照 TaKaRa 试剂盒（TB Green® Premix Ex Taq™ II, RR820A）说明书。反应程序为：95 °C 预变性 30 s；95 °C 变性 5 s，60 °C 延伸 30 s，40 个循环。试验

设置 3 个重复，并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。通过 GraphPad Prism8 软件对基因的表达量进行差异分析。

1.2.5 载体构建 根据试剂盒 (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) 说明书分别设计亚细胞定位载体和过表达载体引物 (表 1)。利用 PCR 扩增得到含有载体接头的 *CmPI* 基因，并将其克隆至 *pEGOEP35S* 中间载体上。将中间载体上不含终止密码子 *CmPI-GFP* 基因和完整 *CmPI-GFP* 基因分别重组至 pVS1 RepA 和 pVS1 StaA 载体上，得到含 35S::*CmPI-GFP* 亚细胞定位载体和 35S::*CmPI* 过表达载体。

1.2.6 亚细胞定位 利用冻融法，将 35S::*CmPI-GFP* 亚细胞定位载体质粒转化到农杆菌中。参照杨国栋^[9]的方法侵染本氏烟草叶片，将 pEGOEP35S-H-GFP 空载作为对照。烟草侵染 2~3 d 后，用激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SPII) 观察叶片细胞中荧光的分布情况。

1.2.7 板栗 *CmPI* 过表达转基因拟南芥的获取及表型分析 将含有目的基因的过表达载体通过冻融法转入 GV31001 农杆菌感受态细胞。参照 Clough 等^[10]报道的花粉管侵染法转化拟南芥。用 50 mg·L⁻¹ 的潮霉素筛选抗性植株。将长出真叶的拟南芥幼苗移栽到花盆中置于光照培养箱培养，培养条件为光照 16 h (24 °C)，黑暗 8 h (20 °C)。选择表型变化明显的 5 个株系继续培养至 T2 代。挑选目的基因表达量较高的 3 个转基因株系及野生型株系分别移栽 10 棵至气候箱，对其进行定期观察，待进入盛花期后，在顶部花序中，每株随机选取 5 朵处于第六阶段的拟南芥花，分别测量其花瓣与萼片的长度，对测量结果利用 GraphPad Prism8 软件进行分析^[11]。

1.2.8 *CmPI* 过表达拟南芥中 ABCE 类花发育基因表达分析 取 5 株 *CmPI-OE* 拟南芥，以 *CmPI-OE* 拟南芥花 RNA 反转录产物为模板，进行实时荧光定量 PCR。花发育基因 *AtAPI*、*AtAP3*、*AtPI*、*AtAG*、*AtSEP1*、*AtSEP2*、*AtSEP3*、*AtSEP4* 及内参 *AtACTIN* 引物参考 (<https://biodb.swu.edu.cn/qprimerdb/>) (表 1)。具体步骤参照 TaKaRa 试剂盒 (TB Green® Premix Ex Taq™ I, RR820A) 说明书进行。反应程序为：95 °C 预变性 30 s；95 °C 变性 5 s，60 °C 延伸 30 s，40 个循环。试验设置 3 个重复，并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量。通过 GraphPad Prism8 软件对基因的表达量进行差异分析。

2 结果与分析

2.1 板栗 *CmPI* 基因克隆及生物信息学分析

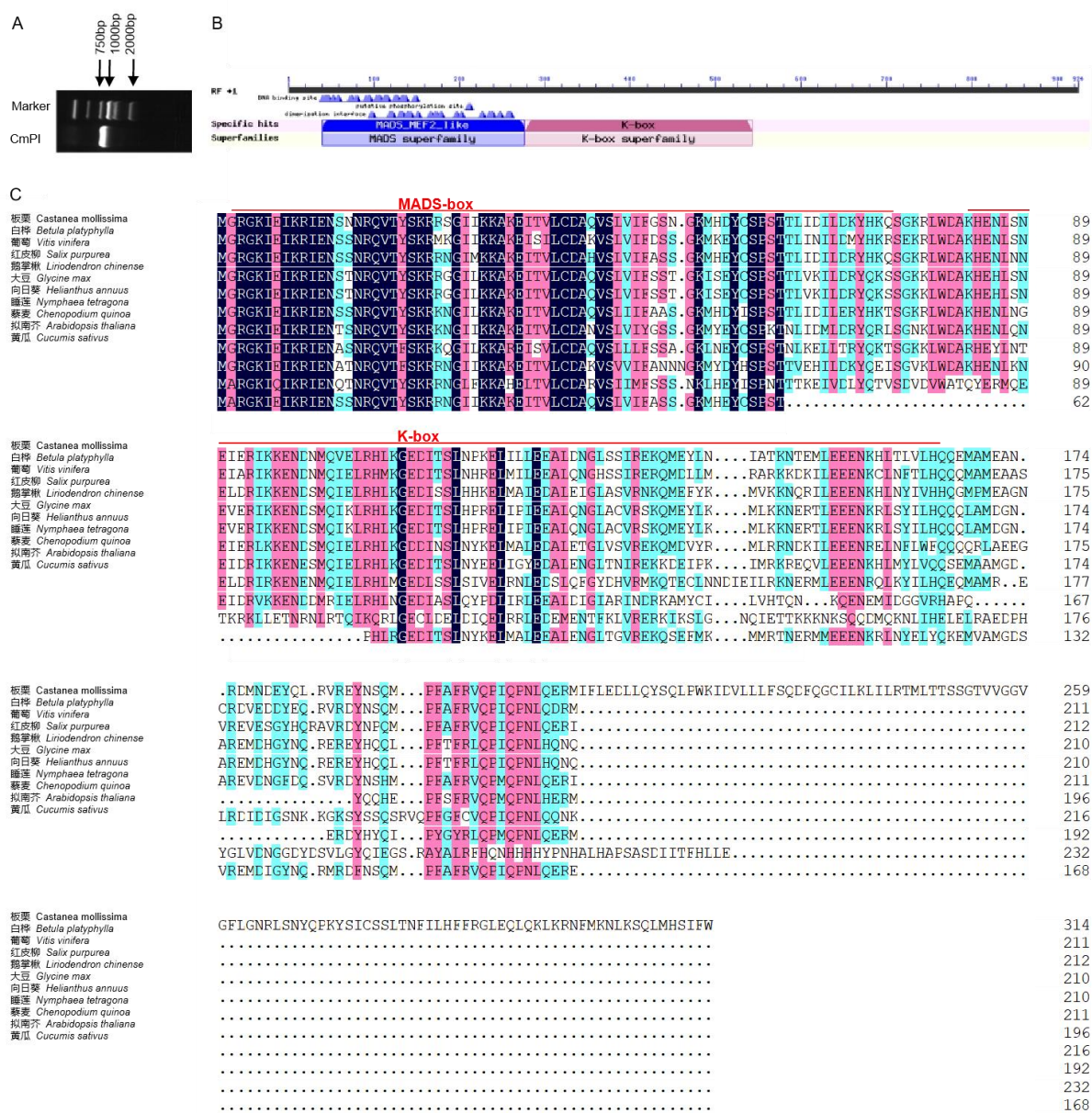
以板栗雄花的 cDNA 为模板，通过 RT-PCR 克隆板栗 *CmPI* (图 1-A)。克隆到的板栗 *CmPI* 编码区序列长度为 630 bp，编码 209 个氨基酸。NCBI 分析表明，*CmPI* 蛋白理论分子质量为 82 015.9 Da，等电点为 5.1，为亲水性蛋白。

在 NCBI 数据库中通过 Conserved Domains 进行基因的保守域预测 (图 1-B), 结果表明, PI 蛋白在 2~75 AA 处含有高度保守的 MADS 域 (MADS-box), 在 84~165 AA 处含有 K 域 (K-box), 为 MADS 的 II 型亚家族成员。

在 NCBI 库中用 Blast 对 CmPI 蛋白序列进行相似性比对分析 (图 1-C)。利用 MEGAX 构建板栗与大豆、黄瓜、葡萄、白桦、向日葵、鹅掌楸、紫柳、睡莲、藜麦、拟南芥 PI 同源蛋白的系统进化树 (图 2)。结果表明, 板栗与白桦 PI 蛋白亲缘关系最近, 大豆、黄瓜和葡萄次之。

2.2 CmPI 在板栗中的时空表达模式分析

以板栗雄花、雌花、叶片、叶芽、花芽、胚、茎尖 7 个不同植物组织为材料, 进行实时荧光定量 PCR 分析 (图 3), 结果表明, CmPI 主要在雄花中表达。以板栗不同时期雄花为材料, 进行实时荧光定量 PCR 分析 (图 4), 结果表明, CmPI 基因的表达水平在雄花发育过程中逐渐升高, 并在 5 月 31 日 (盛花期) 达到最大值, 然后开始降低。



A. CmPI 同源克隆 PCR 产物琼脂糖电泳图; B. 板栗 CmPI 保守结构域示意图; C. 不同物种 PI 氨基酸序列比对。

A. Agarose electrophoresis of PCR product of *CmPI* homologous cloning; B. Schematic diagram of *CmPI* conserved domain of *Castanea mollissima*; C. Amino acid sequence alignment of *PI* in different species.

图 1 板栗 *CmPI* 基因克隆及序列分析

Fig. 1 Cloning and sequence analysis of *CmPI* gene in chestnut

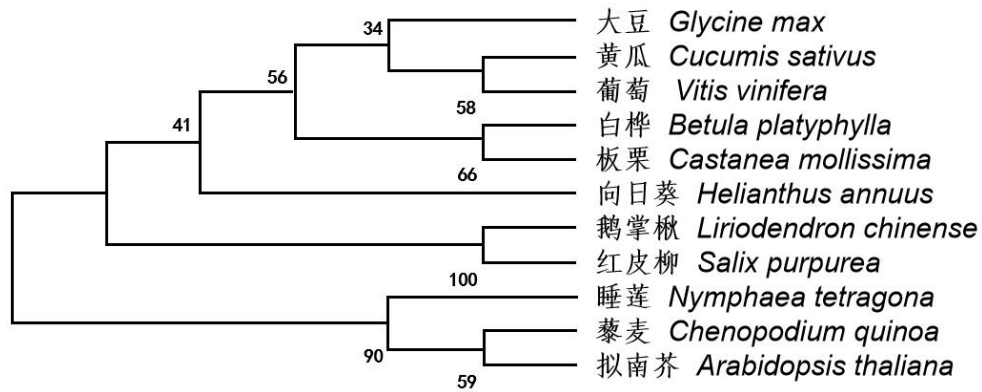
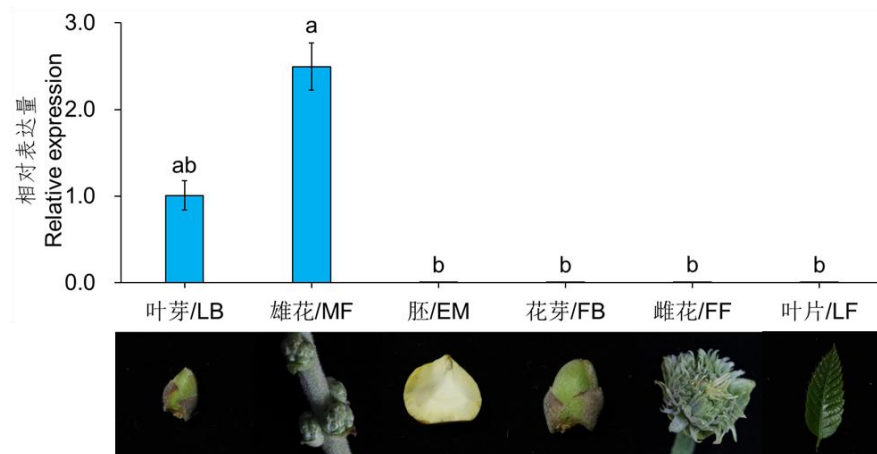


图 2 使用邻接法 (NJ) 构建的 11 个物种的 *PI* 氨基酸序列系统树

Fig. 2 *PI* amino acid sequence tree of 11 species constructed by adjacency method (NJ)



用 LSD 法分析不同组间的差异显著性。数值为平均值±标准误， $n=3$ 。组间小写字母不同表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同。

Least significant difference (LSD) tests were used to determine significant differences between groups. Data are (mean \pm SE), $n=3$.

Different small letters indicate significant difference ($p < 0.05$). The same below.

图 3 *CmPI* 在板栗不同组织中的表达

Fig. 3 The expression analysis of *CmPI* in different tissues of chestnut

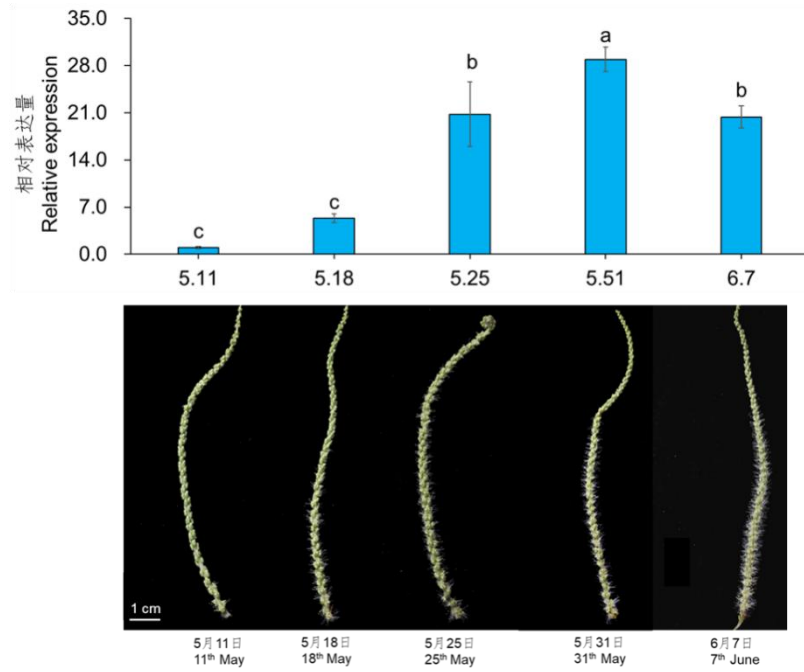


图 4 *CmPI* 在不同发育时期板栗雄花中的表达

Fig. 4 The expression analysis of *CmPI* in different development stage male flower of chestnut

2.3 亚细胞定位分析

将构建好的 *pEGOEP35S::CmPI-GFP* 载体和 *pEGOEP35S::GFP* 空载体通过农杆菌介导法侵染本氏烟草叶片，进行瞬时表达，观察 GFP 荧光信号。结果如图 5 所示，空载体的荧光信号分布在细胞膜、细胞质和细胞核上，而 *pEGOEP35S::CmPI-GFP* 的荧光信号只分布在细胞核上，表明 *CmPI* 基因定位于细胞核。

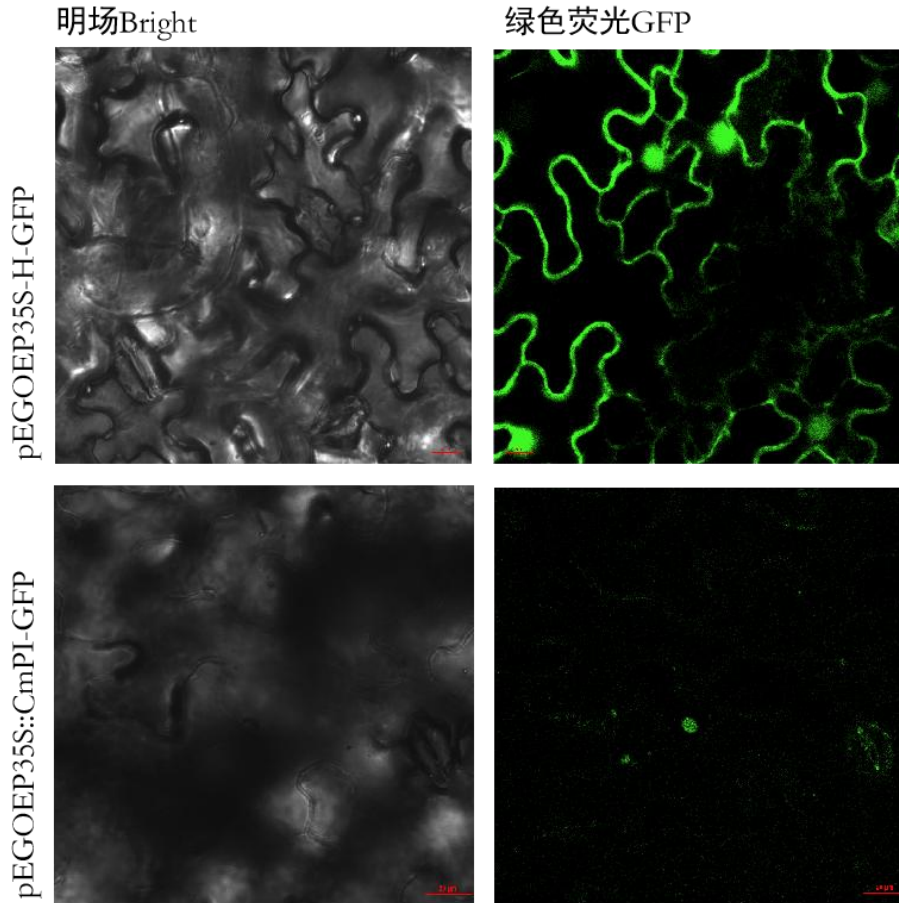
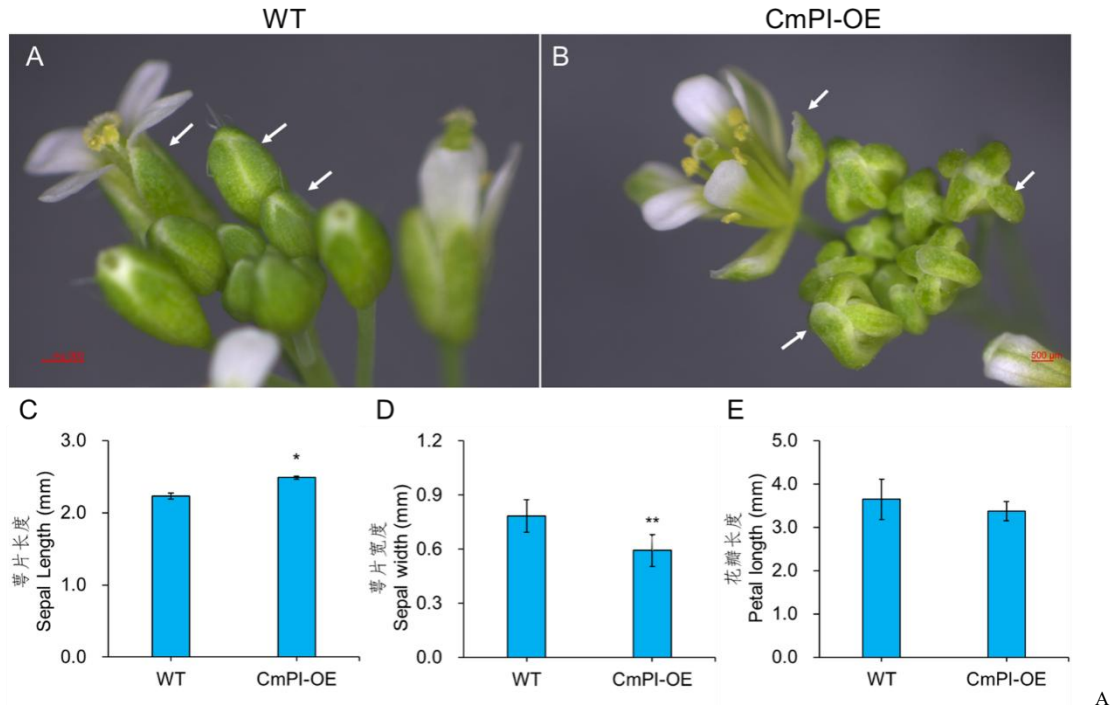


图 5 *CmPI* 亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of *CmPI*

2.4 过表达 *CmPI* 影响花器官发育及相关基因的表达

为进一步研究 *CmPI* 的生物学功能，笔者构建了 *CmPI* 过表达载体，并转入拟南芥获取了转基因植株。通过表型观察发现，*CmPI* 过表达拟南芥植株花发育早期，萼片变窄，萼片间出现缝隙，无法包裹内部花器官结构。*CmPI* 过表达拟南芥植株花开放后，萼片和花瓣化呈离散状（图 6-A~B）。测量结果表明，*CmPI* 转基因植株萼片宽度为 0.59 mm，显著低于野生型拟南芥（图 6-C）；萼片长度为 2.49 mm，显著高于野生型拟南芥（图 6-D）。而 *CmPI* 转基因植株花瓣长度与野生型拟南芥相比，无显著差异（图 6-E）。对转基因株系和野生型拟南芥调控萼片和花瓣的相关 A、B、C、E 基因进行表达分析，结果表明，C 类基因 *AtAG* 在 *CmPI* 过表达拟南芥中的表达量极显著高于野生型，而 A 类基因 *AtAP1*、B 类基因 *AtAP3/PI*、E 类基因 *AtSEP1/AtSEP2/AtSEP3/AtSEP4* 在 *CmPI* 过表达拟南芥中的表达量显著低于野生型（图 7）。



为野生型拟南芥花表型，B为 *CmPI* 过表达拟南芥花发育表型，C-E 依次为过表达 *CmPI* 对萼片长度、萼片宽度及花瓣长度的影响。WT 代表野生型拟南芥，CmPI-OE 代表过表达转基因拟南芥。白色箭头示萼片。*代表 p 在 <0.05 水平存在显著差异；**代表 p 在 <0.01 水平存在显著差异。

A is the wild type *Arabidopsis* flower phenotype. B is the flower development phenotype of *Arabidopsis* overexpression of *CmPI*. C-E is the effect of overexpression of *CmPI* on sepal length, sepal width and petal length respectively. WT stands for wild-type *Arabidopsis thaliana*, and CmPI-OE stands for overexpressing transgenic *Arabidopsis*; WT stands for wild-type *Arabidopsis thaliana*, and CmPI-OE stands for overexpressing transgenic *Arabidopsis*. The white arrow shows sepals. * represents a significant difference in p at the <0.05 level; ** represents a significant difference in p at the <0.01 level.

图 6 过表达 *CmPI* 对拟南芥花器官发育的影响

Fig. 6 The effects of *CmPI* overexpression on flower development in *Arabidopsis thaliana*

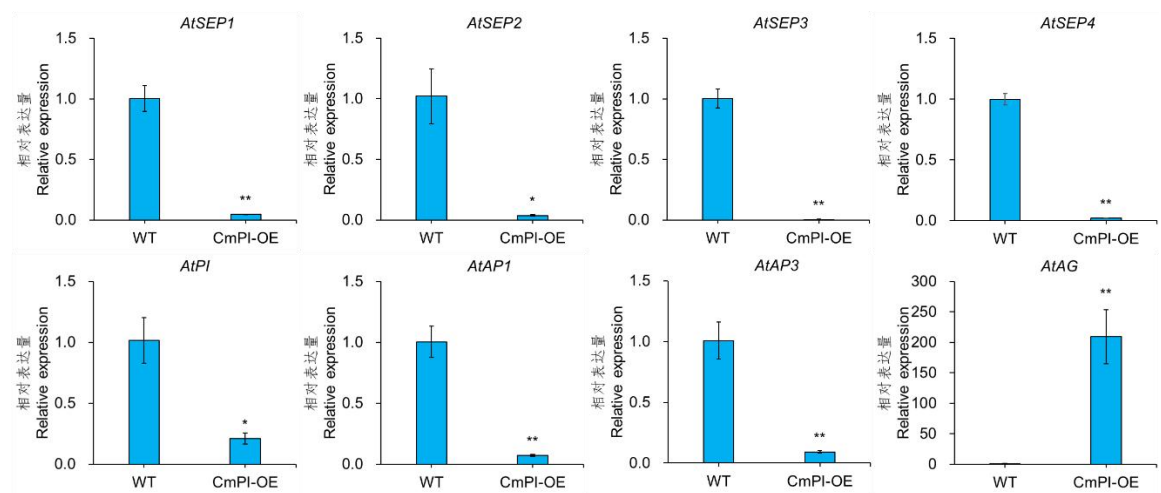


图 7 *CmPI* 过表达对拟南芥花器官发育基因表达的影响

Fig. 7 The effects of *CmPI* overexpression on the expression of flower development related genes in *Arabidopsis thaliana*

3 讨论

MADS-box 基因调控花果发育的功能备受关注。*PI* 属于 ABCDE 花发育模型中的 B 类 *MADS-box* 功能基因, 在花发育过程参与花瓣和雄蕊的发育^[12]。笔者克隆的板栗花发育 B 类基因 *CmPI* 有高度保守的 *MADS* 域 (*MADS-box*) 和 K 域 (*K-box*), 属 *MADS* 的 II 型亚家族转录因子^[13-14]。板栗、白桦、向日葵、葡萄等 8 个物种的 *PI* 同源基因编码 134~186 个氨基酸, 相似度 58.7%。该结果表明 *PI* 在不同物种中蛋白结构高度保守, 可能具有相似的生物学功能。*CmPI* 定位于细胞核, 符合其转录因子的定位特征。值得注意的是, 本研究中的进化分析结果表明, 板栗与白桦的 *PI* 基因关系最近, 这可能与两者均是柔荑花序花序木本植物有关。该结果暗示柔荑花序植物的 *PI* 基因在进化中发生了区别与其他类型花序的变异。

基因的时空表达模式是其发挥生物学功能的关键因素之一。在笔者的研究中, *CmPI* 主要在雄花中表达, 茎尖、叶片、根等组织中几乎不表达, 且 *CmPI* 在雄花中的表达量随雄花发育进程不断升高。这与 Liu 等^[7]对 *CmPI* 在板栗不同组织中的表达分析结果一致。该结果暗示 *CmPI* 是参与板栗雄花发育的关键基因。在拟南芥^[15]、辣椒 (*Capsicum annuum*)^[16]、烟草^[17]、摩洛哥坚果树 (*Argania spinosa*)^[7]、蒲公英 (*Taraxacum mongolicum*)^[18] 等完全花植物中, *PI* 主要在第二轮和第三轮花器官中表达。但板栗花为不完全花, 其花的第一轮和第二轮器官被合生苞片取代。雄花主要由苞片和雄蕊组成, 雌花则由苞片和雌蕊组成。*CmPI* 在板栗苞片、雌蕊、雄蕊中的表达模式需要进一步研究, 以揭示其时空表达模式在调控花器官发育中的作用。

为进一步验证 *CmPI* 的生物学功能, 笔者将 *CmPI* 过表达载体转入野生型拟南芥, 结果表明, *CmPI* 过表达转基因拟南芥的萼片发育为花瓣状组织。夏堇 (*Torenia fournieri*) *TYP1* 基因在拟南芥中过表达导致萼片转变为花瓣组织^[19]。将蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite* Rchb.) *PI-like* 基因 *PeMADS6* 在拟南芥中过表达会导致萼片膨大、伸长, 并在近轴侧沿边缘呈现花瓣状结构^[20]。在麝香百合 (*Lilium longiflorum* Thumb.) 中将 *LMADS8/9* 的异位表达可以挽救拟南芥 *pi-1* 突变体第二轮花瓣的发育, 并使部分萼片转化为花瓣状组织^[21-22]。上述研究表明不同物种 *PI* 基因具有保守的抑制萼片发育, 而促进花瓣发育的生物学功能。De Craene^[5]认为苞片与萼片和花瓣由同一器官进化而来, 而苞片在板栗雌花和雄花中进一步进化为形态差异的器官。*CmPI* 在板栗雌花中的表达量显著低于雄花, 暗示了其能够抑制苞片发育为壳斗。

PI 通过与其他 *MADS-box* 蛋白形成二聚体来调控花器官发育^[23-24]。*API* 可激活 *AP3* 和 *PI*^[23]。*PI* 则直接与 *API* 的启动子结合, 进行负反馈调节^[25]。在笔者的研究中, *CmPI* 过表达拟南芥株系中 A、B 和 E 三类基因的表达量均显著低于野生型拟南芥。这可能是因为 *CmPI* 与拟南芥 *PI* 具有相似的结构域, 均能结合 *API* 的启动子, 抑制其转录激活^[26]。而 *AP3* 和 *PI* 的转录激活依赖于 *API*, 进而表达受到抑制。值得注意的是, *CmPI* 过表达拟南芥中 C 类基因 *AG* 的表达水平显著高于野生型拟南芥。*AG* 基因主要调控雄蕊和心皮的发育, 但本研究中转基因株系的雄蕊和心皮形态均未发生异常。花器官的发育调控网络复杂, 是多基因与多因素共同作用的结果。板栗 *CmPI* 在花发育中的生物学功能及其分子机制尚需进一步研究。

4 结论

板栗与其他物种相同, 均具有结构高度保守的 B 类开花基因 *CmPI*。*CmPI* 为核定位基因, 主要在雄花中表达。*CmPI* 在野生型拟南芥中过表达可促进萼片转变化为花瓣组织, 可能是板栗苞片进一步发育的抑制基因。

参考文献 References:

- [1] HU T Q, LI X H, DU L R, MANUELA D, XU M L. Leafy and apetala1 down-regulate zinc finger protein 1 and 8 to release their repression on class B and C floral homeotic genes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023, 120(22): e2221181120.
- [2] 马小杰, 闫先喜, 张宪省. 高等植物花发育的基因调控[J]. 山东农业大学学报, 1995, 26(2): 263-272.
MA Xiaojie, YAN Xianxi, ZHANG Xiansheng. Gene-regulated flower development in higher plants[J]. Journal of Shandong Agricultural University, 1995, 26(2): 263-272.
- [3] 冯献忠, 杨素欣, 郭蔼光. 高等植物花发育的研究进展[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(3): 94-99.
FENG Xianzhong, YANG Suxin, GUO Aiguang. Progress of flower development in higher plants[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 1998, 26(3): 94-99.
- [4] PELAZ S, DITTA G S, BAUMANN E, WISMAN E, YANOFSKY M F. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes[J]. Nature, 2000, 405(6783): 200-203.
- [5] DE CRAENE L P R. Are petals sterile stamens or bracts? The origin and evolution of petals in the core eudicots[J]. Annals of Botany, 2007, 100(3): 621-630.
- [6] ZHAO Y H, ZHANG X M, LI D Z. Development of the petaloid bracts of a paleoherb species, *Saururus chinensis*[J]. PLoS One, 2021, 16(9): e0255679.
- [7] LIU Y, CHEN G S, GAO Y R, FANG K F, ZHANG Q, CAO Q Q, QIN L, XING Y, SU S C. Identification and characterization of MADS-box genes involved in floral organ development in Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume)[J]. Horticultural Science and Technology, 2021, 39(4): 482-496.
- [8] 程运河, 程丽莉, 胡广隆, 杨前宇, 韩笑, 兰彦平. 板栗CmFT基因的克隆及功能分析[J]. 果树学报, 2022, 39(6): 935-944.
CHENG Yunhe, CHENG Lili, HU Guanglong, YANG Qianyu, HAN Xiao, LAN Yanping. Cloning and functional analysis of CmFT in Chinese chestnut[J]. Journal of Fruit Science, 2022, 39(6): 935-944.
- [9] 杨国栋. 棉花耐盐基因GhNHX1启动子的克隆及功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
YANG Guodong. Isolation and characterization of a salt inducible GhNHX1 promoter from *Gossypium hirsutum*[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2007.
- [10] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 1998, 16(6): 735-743.
- [11] SMYTH D R, BOWMAN J L, MEYEROWITZ E M. Early flower development in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 1990, 2(8): 755-767.
- [12] 徐启江, 丁一, 黄赫, 王勇, 崔成日, 梁毅. 洋葱花发育B类MADS-box基因AcDEF的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(6): 1090-1100.
XU Qijiang, DING Yi, HUANG He, WANG Yong, CUI Chengri, LIANG Yi. Cloning and expression analysis of B class MADS-box gene AcDEF associated with floral development in onion[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(6): 1090-1100.
- [13] KIM S, YOO M J, ALBERT V A, FARRIS J S, SOLTIS P S, SOLTIS D E. Phylogeny and diversification of B-function MADS-box genes in angiosperms: Evolutionary and functional implications of a 260-million-year-old duplication[J]. American Journal of Botany, 2004, 91(12): 2102-2118.
- [14] 陈磊, 翟笑雨, 徐启江. B类MADS-Box基因的系统发育与功能演化[J]. 植物生理学报, 2015, 51(9): 1359-1372.

- CHEN Lei, ZHAI Xiaoyu, XU Qijiang. The phylogeny and functional evolution of B-class MADS-box genes[J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(9): 1359-1372.
- [15] GOTO K, MEYEROWITZ E M. Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *PISTILLATA*[J]. *Genes & Development*, 1994, 8(13): 1548-1560.
- [16] 廖铭宇, 肖佳林, 李丽缘, 宋钰, 黄湖荣, 杨博智. 辣椒雄性不育系和保持系CaMADS6基因克隆及表达分析[J]. *华北农学报*, 2023, 38(1): 46-52.
- LIAO Mingyu, XIAO Jialin, LI Liyuan, SONG Yu, HUANG Hurong, YANG Bozhi. Cloning and expression analysis of CaMADS6 in cytoplasmic male sterile line and maintainer line of pepper[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2023, 38(1): 46-52.
- [17] HANSEN G, ESTRUCH J J, SOMMER H, SPENA A. *NTGLO*: A tobacco homologue of the *GLOBOSA* floral homeotic gene of *Antirrhinum majus*: cDNA sequence and expression pattern[J]. *Molecular & General Genetics*, 1993, 239(1/2): 310-312.
- [18] VIJVERBERG K, WELTEN M, KRAAIJ M, VAN HEUVEN B J, SMETS E, GRAVENDEEL B. Sepal identity of the *Pappus* and floral organ development in the common dandelion (*Taraxacum officinale*; Asteraceae)[J]. *Plants*, 2021, 10(8): 1682.
- [19] SASAKI K, YAMAGUCHI H, NAKAYAMA M, AIDA R, OHTSUBO N. Co-modification of class B genes TfDEF and TfGLO in *Torenia fournieri* Lind. alters both flower morphology and inflorescence architecture[J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86(3): 319-334.
- [20] TSAI W C, LEE P F, CHEN H I, HSIAO Y Y, WEI W J, PAN Z J, CHUANG M H, KUOH C S, CHEN W H, CHEN H H. PeMADS6, a *GLOBOSA*/*PISTILLATA*-like gene in *Phalaenopsis equestris* involved in petaloid formation, and correlated with flower longevity and ovary development[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2005, 46(7): 1125-1139.
- [21] CHEN M K, HSIEH W P, YANG C H. Functional analysis reveals the possible role of the C-terminal sequences and PI motif in the function of lily (*Lilium longiflorum*) *PISTILLATA* (PI) orthologues[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(2): 941-961.
- [22] MAO W T, HSU H F, HSU W H, LI J Y, LEE Y I, YANG C H. The C-terminal sequence and PI motif of the orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *PISTILLATA* (PI) ortholog determine its ability to bind AP3 orthologs and enter the nucleus to regulate downstream genes controlling petal and stamen formation[J]. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56(11): 2079-2099.
- [23] NG M, YANOFISKY M F. Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by *APETALA1*[J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(4): 739-753.
- [24] 杜朝金, 张汉尧, 罗心平, 宋云连, 毕珏, 王跃全, 张惠云. 基因调控植物花器官发育的研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2024, 25(2): 151-161.
- DU Chaojin, ZHANG Hanyao, LUO Xinping, SONG Yunlian, BI Jue, WANG Yuequan, ZHANG Huiyun. Progress in gene regulation of plant floral organ development[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2024, 25(2): 151-161.
- [25] SUNDSTRÖM J F, NAKAYAMA N, GLIMELIUS K, IRISH V F. Direct regulation of the floral homeotic *APETALA1* gene by *APETALA3* and *PISTILLATA* in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46(4): 593-600.
- [26] WANG S, HUANG H J, HAN R, LIU C Y, QIU Z N, LIU G F, CHEN S, JIANG J. Negative feedback loop between BpAP1 and BpPI/BpDEF heterodimer in *Betula platyphylla* × *B. pendula*[J].

Plant Science, 2019, 289: 110280.