

枇杷 *LEAFY* 同源基因的克隆及序列分析

刘月学¹, 胡桂兵¹, 林顺权¹, 刘宗莉², 陈厚彬²

(1 华南农业大学 园艺生物技术研究所, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要: 为从分子水平研究枇杷成花的机理, 通过分析植物花分生组织决定基因 *LEAFY* (*LFY*) 同源基因的保守区序列, 设计了 1 对简并引物, 用 PCR 方法从枇杷栽培品种‘早钟 6 号’基因组 DNA 中扩增出 1 个 1 317 bp 的片段, 把该片段克隆到 pUCm-T 载体, 测序和序列分析结果表明获得了枇杷 *LFY* 同源基因(*qlFY*)3' 端的 1 个片段, 该片段有 1 个 911 bp 的内含子, 编码区共编码 130 个氨基酸, 其序列已经在 GenBank 中登记(登录号为 AY551183). 在 GenBank 中进行同源性搜索, 发现该基因片段与其他作物中已经报道的 *LFY* 同源基因的同源性大都在 94% 以上, 特别是与同属于蔷薇科的苹果的同源性最高, 达到 98% 的同源性, 推测它们具有相似的功能.

关键词: 枇杷; *LEAFY* 基因; PCR; 分子克隆; 序列分析

中图分类号: Q943; S667.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)02-0066-03

Cloning and sequence analysis of *LEAFY* homologous gene from loquat

LIU Yue-xue¹, HU Gui-bing¹, LIN Shun-quan¹, LIU Zong-li², CHEN Hou-bin²

(1 Institute of Biotechnology for Horticulture Crops, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to study the molecular mechanism of floral formation on loquat, a pair of degenerate primers was designed according to the conservative regions of the plant floral meristem identity gene-*LEAFY* (*LFY*) homologous genes. A 1 317 bp fragment of *LFY* homolog gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the genomic DNA of ‘Zao Zhong No. 6’ loquat cultivar. The fragment was cloned into pUCm-T vector, and then sequenced. The results suggest that a fragment in the 3'-end of *LFY* homologous gene named *qlFY* was obtained. The sequence analysis indicated that there was an intron of 911 bp in the fragment, and the exons encoded 130 amino acids. The *qlFY* gene was registered in GenBank with the accession number AY551183. After the deduced amino acid sequence of the fragment was submitted to GenBank to blast, it was found that the homology reached 94% to most of the other *LFY* homologous gene, especially to *Malus* family-apple, the homology reached the highest level (98%). This result suggested that *qlFY* gene might have the same function as other *LFY* homologous gene.

Key words: loquat; *LEAFY* gene; PCR; molecular cloning; sequence analysis

枇杷 *Eriobotrya japonica* Lindl., 双子叶植物, 属蔷薇科、苹果亚科。它果肉柔软多汁, 风味甘甜, 品质细腻, 富含人体所需的各种营养元素。果实成熟时, 正值初夏其他水果不能上市的关键时期, 因此深受人们喜爱, 是一种色、香、味俱美的南方佳果。同其他木本植物一样, 枇杷的童期也较长, 即实生苗首次开花

较迟。与此同时, 枇杷成花还有两个较为特殊的现象: 一是云南和四川攀枝花干热河谷等新栽培地区的枇杷开花、结果“反季节”现象; 二是‘早钟 6 号’等早熟品种头批花结果不稳定现象。因此枇杷成花机理的研究, 对于缩短育种周期和人工控制开花结果都具有重要意义。

收稿日期: 2004-07-14

作者简介: 刘月学(1975-), 男, 博士研究生。通讯作者: 林顺权(1955-), 男, 教授, 博士;

E-mail: huyouli@public.guangzhou.gd.cn

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

自 20 世纪 80 年代末以来, 人们对拟南芥等模式植物开花的分子机制及其遗传控制研究, 取得了巨大的突破^[1-3], 为果树学科中类似的研究提供了许多可以借鉴的信息和手段. 在一系列模式植物的研究中发现, *LFY* 可能是花形成最早的标志基因, 该基因可能控制花发育的启动程序^[4-6]. 目前从苹果和柑橘^[7] 等大宗果树中已经克隆出了 *LFY* 同源基因片段. 笔者以枇杷栽培品种‘早钟 6 号’的幼叶为试验材料, 提取其基因组 DNA, 用 PCR 扩增的方法进行了 *LEAFY* 同源基因的分子克隆研究, 为从分子水平上对枇杷的童期及成花本质进行较为深入的研究奠定一定的基础.

1 材料与方法

1.1 材料

在华南农业大学园艺学院果树种质资源圃的枇杷品种园采取枇杷‘早钟 6 号’幼嫩叶片, 用改进的 CTAB 法^[8] 提取并纯化其 DNA 作为模板, 在比较其他物种上已克隆的 *LEAFY* (*LFY*) 序列保守区后设计了 1 对长度均为 25 bp 的引物, 引物委托上海生工公司合成. 上游引物 A: 5'-GARGTGGCGCGGTGGSAAARAAGAA-3'; 下游引物: 5'-CAGAGYTTGGTGGGMACRTACCA-3'. 10×PCR 缓冲液、DL2000 DNA 分子标准、*Taq* 酶、dNTP 均购自 TaKaRa 公司, 其他试剂均为分析纯试剂.

1.2 PCR 扩增方法

反应体系为: 10×PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+}) 5.0 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol·L⁻¹) 4.0 μ L, dNTP 混合物(各 25 mmol·L⁻¹) 4.0 μ L, 上游引物(10 μ mol·L⁻¹) 1.0 μ L, 下游引物(10 μ mol·L⁻¹) 1.0 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L, *Taq* 酶(5 U· μ L⁻¹) 0.5 μ L, 加灭菌双蒸水至总体积 50 μ L. 扩增参数为: 94℃变性 5 min 后, 按 94℃, 40 s; 51℃, 60 s; 71.5℃, 90 s 进行 30 个循环.

1.3 DNA 片段重组入质粒载体

回收凝胶中的 PCR 产物, 纯化后与 pUCm-T 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞, 通过蓝白斑筛选、质粒长度和酶切鉴定获得重组质粒^[9].

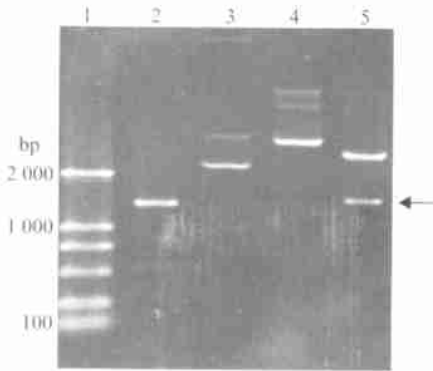
1.4 基因序列测定及分析

委托上海生工公司进行测序. 所得的序列通过 GenBank 上同源基因序列的比较分析后, 把编码区翻译成氨基酸序列, 用 BLAST 工具进行氨基酸序列同源性比较.

2 结果与分析

2.1 PCR 产物的扩增和克隆

以枇杷基因组 DNA 为模板, 所设计的 1 对引物进行 PCR 反应, 得到长度为 1 317 bp 的条带. 将经回收、纯化后的 PCR 产物与 pUCm-T 载体连接, 连接产物转化大肠杆菌菌株 DH5 α 感受态细胞, 在含氨苄青霉素、X-gal 及 IPTG 的 LB 平板上涂布获得白色菌落, 挑取这些菌落培养、提取质粒, 经长度和酶切(*Pst* I) 鉴定获得重组质粒(图 1).



1: DL2000 marker, 2: PCR 产物, 3: pUC19 质粒, 4: 重组质粒, 5: 重组质粒 *Pst*I 酶切产物
1: DL2000 marker, 2: PCR product, 3: pUC19, 4: Recombinant plasmid, 5: Recombinant plasmid digested with *Pst*I

图 1 PCR 扩增片段重组入 pUCm-T 载体

Fig. 1 Cloning of amplified fragments into pUCm-T vector

2.2 基因序列与同源性分析

测定重组质粒的序列后, 在 GenBank 中进行同源性搜索, 结果表明获得了 *LFY* 同源基因的 1 个片段, 定名为 *qLFY*, 该片段长 1 317 bp, 编码 130 个氨基酸, 有 1 个长度为 911 bp 的内含子(图 2), 其序列已提交 GenBank 登记, 登记号为 AY551183.

把克隆到的 *qLFY* (AY551183) 通过 GenBank 上的 Blast 工具进行基因同源性比较分析, 发现得到的片段是 *LEAFY* 同源基因中 3' 端的一个片段. 通过氨基酸序列比较发现, 得到的枇杷 *LFY* 同源基因与其他植物的 *LFY* 或 *TFL* 等同源基因所编码的氨基酸高度相似, 同源性大都在 94% 以上(表 1). 特别是与同为蔷薇科的苹果 *LFY* 基因同源性最高, 氨基酸相同率达到了 98% 的水平. 另外, 与其他植物, 不论是作为模式植物的拟南芥、金鱼草、矮牵牛等, 还是与豌豆、番茄、黄瓜这样的蔬菜类作物中类似同源基因编码的氨基酸也有 94% 左右的同源性. 高度同源性一方面说明了本研究所克隆的枇杷 *LFY* 片段的正确性, 另一方面则验证了 *LEAFY* 这一成花基因在进化上高度保守的理论^[10].

GAGGTGGCGCGCGTGGG

1 AAGAACGGTCTTGATTACCTCTTCCATCTCTACGAGCAGTGCCGTGATTCTTGATCCAG

K N G I D Y L F H L Y E Q C R D F L I Q

61 GTCCAGAACATTGCCAAGGAGCGCGGTGAAAAATGTCCAACCAAGgtacggagtttacc

V Q N I A K E R G E K C P T K

121 atgatttcatacagattatctttactgtggtaaatacagtaaactcatattagactcaetg

181 atccttgtgggccatttctcttaagtacaattataaaatagtgggcagtaataaatttt

241 tagttataacgagaatacacataatacaccaagtgttattatgccactaaaaaatctctc

301 ctgagtggttctttgtattateacatttgatttctggacgtccatcaataaagaaaaag

361 actcttatactaatatataaaattaccacaaaaacttgggtattgtctaaagaaaaacaat

421 tatagggttttttttactgtattcacctcattgatgcaccttgttggttatggatgcac

481 tagaaacttaggtagtgtgaaccctaagcggttatatacacactcatttttacttctcatac

541 atcattctcaatttcctagccatcgaatcgaatgaattgaagatcaatggaccaaaattaa

601 taagaatgtgtcagagataaaaagaggtgtatgaaaagcacgactaaaacacttcttcc

661 ggttatgaacaacacattttcaatcatttagatttggcaaagtttcatttatgcatttctc

721 aattacatcgaattttaatacatcggtctcgcaattttgtcaattttaagaatatctgtca

781 actttcttgaaatttctagtatgaaatctattaatttatactctctacaagaaatttacat

841 tgttgatgaatattcttgaatcggaactactttcttacattatgagtcaaaatttgatgc

901 attcgaaaatacatgaatgaaagtaggtcagttttagtcctaaattaatttgattcaact

961 acttagttcgactaattttattttcacacttttttactacaacattatatatgcagGTGA

V

1021 CAAACCAGGTGTTTAGGTATGCCAAAAAGTCAGGCGCAAGCTACATCAACAAGCCGAAGA

T N Q V F R Y A K K S G A S Y I N K P K

1081 TCGGGCACTATGTGCACTGCTACGCCTTGCAATTGCCTGGACGTGGAGGCGTCGAATGTGC

M R H Y V H C Y A L H C L D V E A S N V

1141 TGAGGAGAGCGTTCAAGGAGAGGGGGGAAAATGTTGGGGCATGGAGGCAAGCGTGTTACA

L R R A F K E R G E N V G A W R G A C Y

1201 AGCCTCTTGTGGTCATTGCAGCAGGCCAAGGCTGGGACATCGATGCCATTTTCAATTCTC

K P L V V I A A G Q G W D I D A I F N S

1261 ATCCCCGTCTCTCCATCTGGTACGTGCCCACTCAAACTCCG

H P R L S I W Y V P T K L R

大写黑体字母表示的区域是编码区, 划线部分为引物序列(The open reading frame shown by black capital letters, and sequences homologous to the oligonucleotide primers used for PCR amplification underlined)

图 2 ‘早钟 6 号’ 枇杷 *ejLFY* 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *ejLFY* of ‘Zao Zhong No. 6’ loquat

表 1 一些植物 *LFY* 同源基因氨基酸序列同源性比较

Tab. 1 Similarity of amino acid sequences of *LFY* from some plants

基因 gene	GenBank 登记号 accession number	同源性 similarity/ %	植物种类 species
<i>ejLFY</i>	AY551183		枇杷 <i>Eriobotrya japonica</i>
<i>AFL1</i>	BAB83096. 1	98	苹果 <i>Malus</i> × <i>domestica</i>
<i>AFL2</i>	BAB83097. 1	97	苹果 <i>Malus</i> × <i>domestica</i>
<i>ALF</i>	AAC49912. 1	96	矮牵牛 <i>Petunia</i> × <i>hybrida</i>
<i>LEAFY-like</i>	AAM46141. 1	96	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>
<i>FLORICAULA/</i>	AAM95155. 1	96	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>
<i>LEAFY-Like</i>	AAN14527. 1	96	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>
<i>NFL2</i>	Q40505	96	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>
<i>NFL1</i>	Q40504	96	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>
<i>FLORICAULA</i>	AAF66099. 1	96	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>
<i>LEAFY-like</i>	AA073067. 1	94	<i>Leavenworthia crassa</i>
<i>leafy/ floricaula</i>	AA073539. 1	96	褪色柳 <i>Salix discolor</i>
<i>LFY</i>	AAM27927. 1 <i>et c</i>	94	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>UNIFOLIATA</i>	AAC49782. 1	94	豌豆 <i>Pisum sativum</i>
<i>TroLFY</i>	AAF77118. 1	95	昆栏树 <i>Trochodendron aralioides</i>
<i>Floricaula</i>	AAS45975. 1	96	勾酸浆 <i>Mimulus ringens</i>
<i>Floricaula</i>	AAS46009. 1	96	欧洲丁香 <i>Syringa vulgaris</i>
<i>LFY-like</i>	AAC64705. 1	94	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>
<i>LFY-like</i>	AA073066. 1	94	堇兰 <i>Ionopsidium acaule</i>
<i>PTLF</i>	O04064	96	大叶钻天杨 <i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i>
<i>LEAFY</i>	AAF00503. 1	94	<i>Jonopsidium acaule</i>
<i>Floricaula</i>	AAS45974. 1	95	通泉草 <i>Mazus reptans</i>
<i>Floricaula-like</i>	AAO49794. 1	94	金英花 <i>Eschscholzia californica</i>
<i>LEAFY</i>	AAF00504. 1	94	<i>Jonopsidium acaule</i>
<i>FLO</i>	AAA62574. 1	94	金鱼草 <i>Antirrhinum majus</i>

表 5 巴结湿地种子植物占世界范围内属的划分比例

Tab. 5 The proportion of seed plants in Bajie Wetland Nature Reserve in the world flora

世界范围内属中所含种数	巴结湿地的属数	占总属数的比例
species of the genera in the world flora	genera in Bajie	ratio to total genera/%
大型属(≥ 400 种)the largest genera (over 400 species)	11	10. 58
较大型属(200~ 399 种)larger genera (200~ 399 species)	19	18. 27
中等属(100~ 199 种)middle genera (100~ 199 species)	24	23. 08
小型属(10~ 99 种)smaller genera (10~ 99 species)	41	39. 42
寡型属(2~ 9 种)oligotypic genera (2~ 9 species)	8	7. 69
世界单型属(1 种)monotypic genera (1 species)	1	0. 96
总计 total	104	100. 00

参考文献:

[1] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏植物志: 第 1 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1983. 356— 406.

[2] 李锡文. 中国种子植物区系的统计分析[J]. 云南植物研究, 1996, 18(4): 363— 384.

[3] 中国生物多样性国情研究报告编写组. 中国生物多样性国情研究报告[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1998. 37— 43.

[4] 咎启杰, 廖文波, 陈继敏, 等. 广东内伶仃岛植物区系的研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(3): 507— 519.

[5] 吴征镒. 中国种子植物属的分布区类型[J]. 云南植物研究, 1991, (增刊 4): 1— 139.

[6] 吴征镒. “中国种子植物属的分布区类型”的增订和勘误[J]. 云南植物研究, 1993 (增刊 4): 141— 178.

[7] 侯宽昭. 中国种子植物科属词典[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1982. 1— 527.

[8] 邓立斌, 陈端吕. 洞庭湖湿地生物多样性保护及其可持续利用[J]. 林业资源管理, 2002 (1): 60— 63.

[9] 倪志英, 毛子军. 黑龙江省森工林区湿地的植物区系[J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(4): 18— 20.

[10] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏植物志: 第 5 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1987. 874— 902.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 68 页)

3 讨论

对于枇杷的成花机理的研究鲜有报道, 笔者从花期相对早于其他枇杷品种的‘早钟 6 号’中克隆出了 *ejLFY* 基因片段, 分析发现与其他植物的 *LFY* 基因的同源性很高. 根据这种结构上的相似性, 有理由推测它们在功能上的相似性. 笔者准备以克隆的基因片段为突破口, 一方面, 用所克隆的基因片段进行 Southern 杂交和构建反义表达载体, 以研究 *ejLFY* 基因在枇杷基因组中的整合特性和调控规律; 另一方面, 笔者正在设计特异引物, 运用 RT-PCR 并结合 RACE 的技术进行枇杷 *LFY* 同源基因的 cDNA 片段及全长的克隆工作, 以便对枇杷的成花机理进行系统深入的研究, 期望能对枇杷乃至其他木本果树的成花这一重要的生物学发育过程有逐步深入的了解.

参考文献:

[1] 孟繁静. 植物花发育的分子生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 168— 177.

[2] BUSCH M A, BOMBLIES K, WEIGE D. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1999, 285: 585— 587.

[3] STEYNEN Q J, BOBLOKOSKI D A, SCHULTZ E A. Alter-

ation in flowering time causes accelerated or decelerated progression through arabidopsis vegetative phases[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2001, 79: 657— 665.

[4] LILJEGREN S J, GUSTAFSON-BROWN C, PINYOPICH A, et al. Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate[J]. *Plant Cell*, 1999, 111: 1 017— 1 018.

[5] PENA L, MARTIN-TRILLO M, JUAREZ J, et al. Constitutive expression of Arabidopsis *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time[J]. *Nature Biology*, 2001, 19: 263— 267.

[6] 傅永福, 孟繁静. 植物成花转变过程的基因调控[J]. 植物生理学通讯, 1997, 33(5): 393— 400.

[7] 陈大明, 金勇丰, 张上隆. 柑橘 *LEAFY* 同源基因片段分离及特性研究[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 295— 300.

[8] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of leaf tissue[J]. *Phytochemistry Bulletin*, 1987, 19(1): 11— 15.

[9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南: 第 2 版[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1996. 42— 68.

[10] 张建业. 银杏 *LEAFY* 同源基因的分离克隆及其相关基础研究[D]. 杭州: 浙江大学农业与生物技术学院, 2002.

【责任编辑 柴 焰】