

荔枝 *LEAFY* 同源基因克隆及表达分析

李 宁, 陈厚彬, 张昭其, 胡志群, 周碧燕
(华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:采用 RT-PCR 与 RACE-PCR 相结合的方法,从‘糯米糍’荔枝 *Litchi chinensis* 花芽中分离得到了‘糯米糍’荔枝 *LEAFY* 同源基因 (*LcLFY*) 的 cDNA 全长序列. 基因全长 1 397 bp, 其中编码区 1 171 个碱基, 推测编码 390 个氨基酸. 采用半定量 PCR 技术研究了 *LFY* 同源基因在荔枝花芽分化进程的表达情况. 结果表明, 在‘糯米糍’荔枝花芽分化开始时检测到 *LFY* 同源基因的表达, 在花序原基出现前后表达增强, 但在花分化的阶段表达水平明显减弱.

关键词:荔枝; 花芽分化; *LFY* 同源基因
中图分类号:S667.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)01-0057-05

Cloning and Expression Analysis of *LEAFY* Homologue Gene in Litchi

LI Ning, CHEN Houbin, ZHANG Zhaoqi, HU Zhiquan, ZHOU Biyan
(College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A litchi *LEAFY* homologue (*LcLFY*) cDNA in full length was isolated from floral buds in ‘Nuomici’ litchi, *Litchi chinensis*, using RT-PCR and RACE-PCR. The full length of the cDNA was 1 397 bp, containing an open reading frame of 1 171 bp, which encoded 390 amino acids. Furthermore, RT-PCR analysis revealed that *LcLFY* was expressed during floral differentiation. *LcLFY* mRNA began to accumulate in buds in the early stage of floral differentiation, and it increased in floral primordium formation stage. However, the *LcLFY* transcription level decreased in flower formation stage.

Key words: litchi; floral differentiation; *LFY* homologue

荔枝是我国热带亚热带地区广泛栽培的特产果树,但荔枝存在“大小年”结果现象,严重影响了荔枝产业的发展. 研究荔枝的花芽分化机理,对于解决荔枝“大小年”结果等生产中的实际问题具有重要的意义. 自 20 世纪 90 年代以来,利用分子生物学的研究手段研究成花机理,在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和金鱼草 *Antirrhinum majus* 等模式植物上取得了突破. 研究表明两类基因参与调控植物的成花过程,一类是“花分生组织身份基因”,在早期的分生组织内表达,控制花的发端,如 *LEAFY* (*LFY*) 基因^[1-2];另一类是表达转录因子的“同源异型基因”,在花内不同部位表达,决定花的“器官身份”^[3],如 *APETALA1* (*API*) 基因. 在一些木本植物包括果树上的研究表明,模式植物上所揭示的开花分子机理在木本植物中也广泛存在,在柑橘

Citrus sinensis × *Poncirus trifoliata*^[4] 和苹果 *Malus* × *domestica*^[5] 实生苗中组成型表达拟南芥的 *LFY* 和 *API* 基因或其同源基因可以缩短童期,提早开花. *LFY* 基因处于成花调控网络的关键位置,是开花启动过程的主要调控基因^[6-7],由于其在植物成花中起重要作用,自 *LFY* 基因发现以来,人们相继从枇杷 *Eriobotrya japonica*^[8]、芥菜 *Brassica juncea*.^[9]、甘蓝 *B. oleracea*^[10] 等多种植物中克隆到了 *LFY* 同源基因,但鲜见荔枝 *LFY* 同源基因克隆的报道. 本研究从‘糯米糍’荔枝花芽中分离得到了‘糯米糍’荔枝 *LEAFY* 同源基因 (*LcLFY*) 的 cDNA 全长序列,并采用半定量 PCR 技术研究了 *LFY* 同源基因在荔枝花芽分化进程中的表达情况,以期为荔枝成花调控提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料

‘糯米糍’荔枝 *Litchi chinensis* 花芽采自华南农业大学园艺学院果园; DNA marker DL2000、*Taq* 酶、dNTPs、3’ RACE 试剂盒、5’ RACE 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;所有引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 全长克隆

荔枝 RNA 提取采用 SDS 法,采用 TaKaRa 反转录酶、Oligo dT(18)对提取的 RNA 进行反转录,获得 cDNA,以 cDNA 为模板,在对其他物种上已得到的 *LFY* 序列保守区进行比较后,设计 1 对长度为 20 bp 的特异引物 (F: 5’-TGATTACCTCTTCTATCTCT-3’, R: 5’- GAGAATTGAAAATGGCATCG-3’) 进行 PCR 扩增,回收和纯化 PCR 产物,纯化后的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接,转化至大肠埃希菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 感受态细胞,在对重组质粒进行 DNA 序列测定后,在美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 进行 BLAST,在确认所得序列和 GenBank 上其他物种的 *LFY* 同源基因序列的相似性较高后,根据所得片段设计 2 条长度为 25 bp 的特异引物进行荔枝 *LFY* 同源基因 3’末端的克隆 (引物序列为 3’ RACE GSP1: 5’-ATCCAGGTCCAGAACATTGCCAAGG-3’; 3’ RACE GSP2: 5’-CTCTTGTGGTCATTGCAGCAGGCCA-3’),以及 5’末端的克隆 (引物序列为 5’ RACE GSP1: 5’-TCCTTGAACGCTCTCCTCAGCACAT-3’; 5’ RACE GSP2: 5’-GGCAATGTTCTGGACCTGGATCAAG-3’).

1.3 荔枝 *LFY* 同源基因在花芽分化过程中的表达分析

从 2006 年 11 月至 2007 年 2 月,在荔枝花芽分化的不同时期采集花芽,提取 RNA,采用半定量 RT-PCR 技术对荔枝 *LFY* 同源基因进行表达分析,引物序列为 F: 5’-CTCTTGTGGTCATTGCAGCAGGCCA-3’; R: 5’-GACAGACAGTAATTAGCTGCTC-3’,以荔枝 *Actin* 基因 (基因登陆号为 DQ309464) 为内参基因,内参基因的引物为 F: 5’-CATGGTTATCCAGGGTGAGC-3’; R: 5’-CCTGATCGACGAGGTAATCC-3’.

2 结果与分析

2.1 荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 目的片段克隆

以荔枝基因组 cDNA 为模板,在对其他物种上已得到的 *LFY* 序列保守区进行比较后设计 1 对长度为 20 bp 引物,用所设计的 1 对特异引物进行 PCR 反应,得到一长度为 300 bp 左右的目的带 (图 1a),

与预计条带大小基本一致. 经回收、纯化,再与 pMD19-T 载体连接,连接产物转化大肠埃希菌菌株 DH5 α 感受态细胞,在含 Amp、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,用 *Hind* III、*Eco*R I 双酶切鉴定所获得的重组质粒 (图 1b).

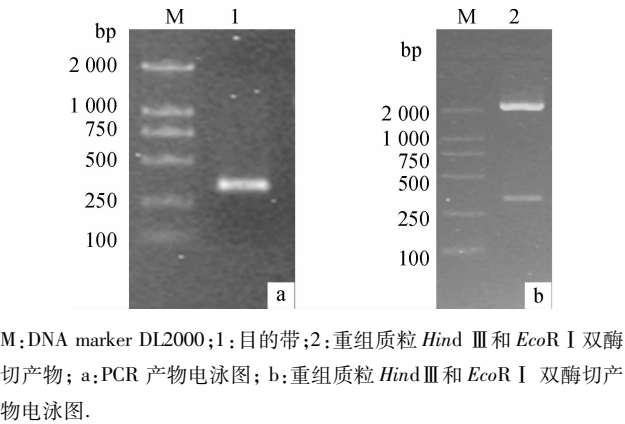


图 1 ‘糯米糍’荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 片段克隆
Fig. 1 Cloning of cDNA fragment of *LFY* homologue gene in ‘Nuomici’ litchi

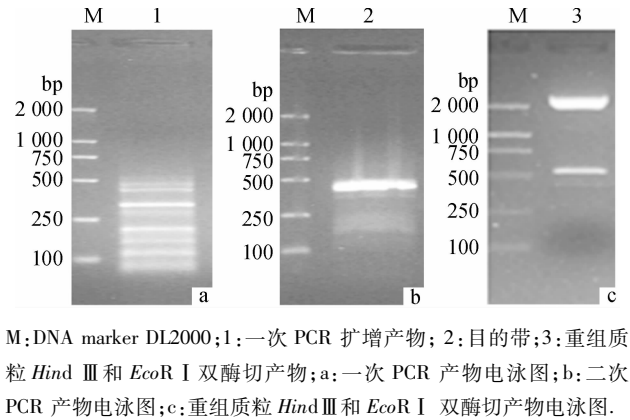
把克隆到的片段序列 (图 2) 通过 GenBank ([http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) 上的 BLAST 工具进行基因相似性比较分析,结果表明,其与同为无患子科的龙眼 *Dimocarpus longan* 的 *LFY* 同源基因相似性达到 94%,命名为 *LcLFY*.

TGATTACCTCTTCTATCTCTTTCTTGATCCAGGTCCAGAACATTGCCAAGGAGCG
CGGTGAAAAATGTCCAACCAAGGTGACAAACCAAGGTGTTAGGTATGCCAAAA
AGTCAGGCGCAAGGTACATCAACAAGCCGAAGATGCGGCCTATGTGCACTGC
TACGCCCTTGCAATTGCCTGGACGTGGAGCGCTCGAATGTGCTGAGGAGAGCGTTC
AAGGAGAGGGGGGAAAAATGTTGGGGCATGGCGGCAAGCGCTGTTACAAGCCTCT
TGTGGTCATGTGCAGCAGGCCAAGGCTGGGACATCGATGCCATTTTCAATTCTC

图 2 ‘糯米糍’荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 片段序列
Fig. 2 Sequence of cDNA fragment of *LFY* homologue gene in ‘Nuomici’ litchi

2.2 荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 3’末端克隆

以 cDNA 为模板,用所设计的 2 条特异引物参照试剂盒进行 PCR 反应,一次 PCR 为数条带 (图 3a),二次 PCR 得到长度为 400 bp 左右目的带 (图 3b). 经回收、纯化后,PCR 产物与 pMD19-T 载体连接,连接产物转化大肠埃希菌菌株 DH5 α 感受态细胞,在含 Amp、X-gal 及 IPTG 的 LB 平板上涂布获得白色菌落,挑取这些白色菌落培养,提取质粒,经 *Eco*R I、*Hind* III 双酶切后有目的条带的质粒为转入目的片段的重组质粒 (图 3c). 测定重组质粒的序列后,在 GenBank 上进行相似性搜索,结果表明获得了 *LFY* 同源基因的 3’末端,该片段长 346 bp,包含有终止密码子,编码 61 个氨基酸.



M; DNA marker DL2000; 1: 一次 PCR 扩增产物; 2: 目的带; 3: 重组质粒 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切产物; a: 一次 PCR 产物电泳图; b: 二次 PCR 产物电泳图; c: 重组质粒 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切产物电泳图.

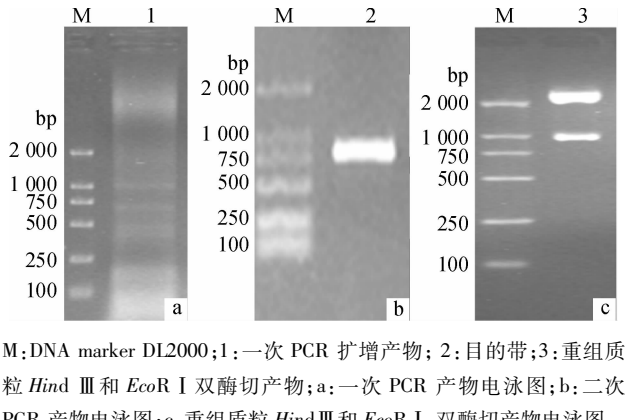
图 3 荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 3'末端克隆

Fig. 3 Cloning of cDNA 3'-end of *LFY* homologue gene in 'Nuomici' litchi

2.3 荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 5'末端克隆

以 cDNA 为模板,用所设计的荔枝 *LFY* 同源基因 5' RACE GSP1 和荔枝 *LFY* 同源基因 5' RACE GSP2 这 2 条特异引物参照试剂盒进行 RT-PCR 反应,一次 PCR 得到数条带(图 4a),二次 PCR 得到目的带,长度为 800 bp 左右(图 4b). 经回收、纯化后,PCR 产物与 pMD19-T 载体连接,连接产物转化大肠埃希菌菌株 DH5 α 感受态细胞,在含 Amp、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,经质粒长度和 *Hind* III、*Eco*RI 双酶切鉴定获得重组质粒(图 4c). 测定重组质粒的序列后,得到一长 835 bp 的片段,包含有起始密码子. 在 GenBank 上进行相似性比对,表明所获得片段是荔枝 *LFY* 同源基因的 5'末端,该片段编码 258 个氨基酸.

```
1          atatggatccagatgc
17 ottctotgcgaactttgttcaagtgggaacttagtggatggttgt
62 atggaccctgaagcatttcacggccagccctgttcaagtggaccaca
   M D P E A F T A S L F K W D P
107 cgaacggttggtgccaccgcgcgcgcgtgttcgaaggatggcc
   R T V V P P P A R G K K N G L D Y L
152 acagcgtccgcgccttgggttggttcggcagcctatactatggtg
   T A S A P L V G S A A Y T M V
197 cgtccaaggatttgggtggttagaggattgtttcaggcttat
   R P R D L G G L E L F Q A Y
242 gggatcaggtactacacgcgtgcgaataagcgaagcgtgggttc
   G I R Y Y T A A K I A K L G F
287 acagtgaacacgcttttggacatgaagacgaggaacttgatgag
   T V N T L L D M K D E E L D E
332 ttgatgaacagcttgtctcacatattaaagttgggaacttccggt
   L M N S L S H I L R W E L P V
377 ggagagagatatgatatacaagctgcgctgagagctgagagaagg
   G E R Y D I K A A V R A E R R
422 aggcctgaagatgaggatcctagaaggcgttaacctgctgtctggc
   R L E D E D P R R R N L L S G
467 gacactaccacgcgcttgtatgctttgttccaagaagggttatca
   D T T N A L D A L F Q E G L S
512 caagagcaagtgctgcgaagagaggaggcgccaggagcggcaga
   Q E Q Q V A V C G E K E A A G S G R
557 ggaggcgctgggaagcagtcgcaggagcgcgcgtgcggcggag
   G G T W E A V P C G A A A A A A E
602 aagaagaaacaacgaggaagggttcagaggaagttggtgatgtt
   K K K Q R R K V Q R K L V D V
647 aacaacatcgatgatgagaacgggacgacgataacggtggtagt
   N N I D D E N G D D D N G G S
```



M; DNA marker DL2000; 1: 一次 PCR 扩增产物; 2: 目的带; 3: 重组质粒 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切产物; a: 一次 PCR 产物电泳图; b: 二次 PCR 产物电泳图; c: 重组质粒 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切产物电泳图.

图 4 荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 5'末端克隆

Fig. 4 Cloning of cDNA 5'-end of *LFY* homologue gene in 'Nuomici' litchi

2.4 荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 全长及同源基因系统进化分析

经过对荔枝 *LFY* 同源基因片段与得到的 3'末端和 5'末端序列拼接,最后得到荔枝 *LFY* 同源基因 cDNA 全长序列(图 5). 本试验共扩增了 1 397 bp,其中编码区 1 171 bp,5'端不翻译区包含 61 bp,3'端不翻译区包含 165 bp,共编码 390 个氨基酸. 在 NCBI 中对荔枝 *LFY* 同源基因进行相似性比对,找到多个同源基因,利用 MEGA 5.05 对这些基因推导的氨基酸序列进行系统进化树构建,结果如图 6 所示,本文所克隆的荔枝 *LFY* 同源基因(*LcLFY*)所编码的蛋白质与龙眼 *Dimocarpus longan* *LFY* 同源基因所编码的蛋白质聚成一类,亲缘关系最近. 荔枝和龙眼同属于无患子科植物,而且两者亲缘关系相近.

```
692 ggtggcaccgagagacagcagagagaccccttcctcatgtgacggaa
   G G T E R Q R E H P F I V T E
737 cctgctgaggtggcagctggcaaaaaaacggcctagatattcctc
   P A E V A R G K K N G L D Y L
782 ttccatctcaacgaacatgcagagatatcttgatccagggtcaa
   F H L N E Q C R D I L I Q V Q
827 aacattgcccgaagagcggagcgcgaataatcaagggtgaac
   N I A E E R S E K C P I K V N
872 aatcaagtgtttaggtatgcccataagtcaggcgaagctacatc
   N Q V F R Y A K K S G A S Y I
917 aacaagcgaagatgcccactatgtgactgctacgccttgcat
   N K P K M R H Y V H C Y A L H
962 tgccctggacgtggagcgtgcaatgtgctgaggagagcgttcaag
   C L D V E A S N V L R R A F K
1007 gagaggggggaaaaatgttgggcctgcccgcaggcgtgttacaag
   E R G E N V G A W R Q A C Y K
1052 cctcttgtgtcattgcagcaggcccaaggtgggacatcatgcc
   P L V V I A A G Q G W D I D A
1097 attttcaattctcatctcctgactgcgccttggtatgttctact
   I F N S H P R L A I W Y V P T
1142 aagattgcacaactctgcatgcccagcgttaacacagccacagct
   K I R Q L C H A E R N T A T A
1187 tctagctctgcttcggtagtggtgataactgcacgttcaagct
   S S S A S G S G D Q L P F K A
1232 tgagtgtctgatatacgaaatttgcctgttgagatataggaggatta
1277 acctaatatttatgatatttttatgtgtacattcgtgagtgga
1322 atgtttgttaacgcgtatatagtatgtccttggagtagttagagc
1367 agctaattactgtctgtcaaaaaaaaaaaaaa
```

图 5 *LcLFY* cDNA 全长序列及氨基酸序列

Fig. 5 Sequences of full length *LcLFY* cDNA and amino acid

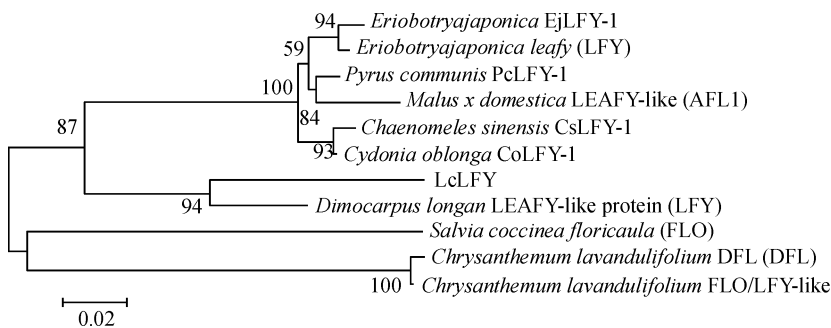


图 6 LcLFY 和其他 LFY 蛋白系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of LcLFY and other LFY-like proteins

2.5 荔枝花芽分化过程中的 *LFY* 同源基因表达分析

‘糯米糍’荔枝花芽分化的情况如图 7 所示, 2006 年 11 月 14 日为荔枝末次秋梢刚转绿、气温开始下降的时期, 属于花芽分化的诱导初期; 11 月 27 日、12 月 7 和 21 日为诱导期的中后阶段; 2007 年 1 月 5—11 日为荔枝花序原基开始显现的时期; 1 月

24 日和 2 月 8 日为小花分化的时期. 对 *LFY* 同源基因表达分析结果表明, *LFY* 同源基因在‘糯米糍’荔枝花芽分化的诱导初期, 即 11 月中下旬开始有表达; 12 月上中旬至 1 月中旬, 表达加强, 此时正是荔枝花芽分化的诱导期和花序原基形成的时期; 至小花分化期, 表达水平下降(图 7).

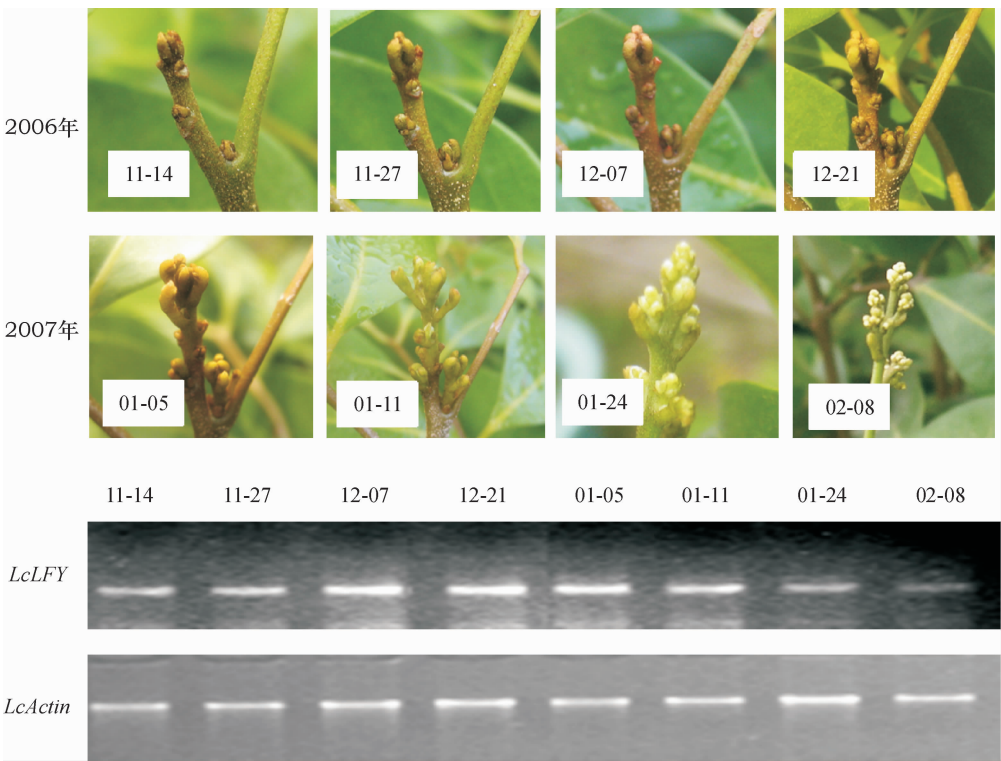


图 7 ‘糯米糍’荔枝花芽分化过程中 *LcLFY* 基因的表达

Fig. 7 *LcLFY* gene expression during floral differentiation of ‘Nuomici’ litchi

3 讨论

在本研究中, 我们已获得‘糯米糍’荔枝 *LcLFY* cDNA 全长序列, 系统进化树分析结果表明, 该基因所编码的蛋白质与龙眼 *LFY* 同源基因所编码的蛋白质聚成一类, 亲缘关系最近, 与其他多种植物也有较高的相似性. *LFY* 属于花分生组织特征基因, *LFY* 基

因控制拟南芥花序梢分生组织向花分生组织转变, 是成花诱导的开关基因^[6-7]. *LFY* 基因编码转录因子的激活蛋白, 并且正调节 *API* 基因等的表达, *LFY* 基因在早期的花原基中表达, 在 *LFY* 基因开始表达后, 其他 2 个花分生组织基因 *API* 和 *CAL* 才开始表达; 而当花器官特异基因开始表达时, 大部分 *LFY* 基因的活性已经减弱^[11]. 本研究的结果表明, 从‘糯米

糍’荔枝花芽分化诱导期开始,*LcLFY* 基因有一定的表达,之后表达加强,在诱导的中后期以及花序原基出现的时期维持相对较高的水平,然而在小花分化期 *LcLFY* 基因表达减弱,此时也是小花中各花器官分化的时期,与前人研究结果^[11] 相似. 我们对荔枝 *API* 同源基因 (*LcAPI*) 的表达分析结果表明,*LcAPI* 基因的表达要比 *LcLFY* 基因迟^[12],与前人的研究结果^[13] 吻合. 本文认为,*LcLFY* 基因可能与拟南芥等植物一样,在成花的早期起作用,也可能是荔枝成花的开关基因之一. 但要明确 *LcLFY* 基因在荔枝成花中的作用,仍需要通过转基因技术进行功能鉴定. 目前,由于荔枝离体再生技术还不成熟,有必要借助拟南芥或烟草等植物进行异源表达来分析鉴定其功能.

参考文献:

- [1] WEIGEL D, ALVAREZ J, SMYTH D R, et al. *LEAFY* controls floral meristem identity genes in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1992, 69(5): 842-859.
- [2] WEIGEL D, NILSSON O. A development switch sufficient for flower initiation in diverse plants [J]. *Nature*, 1995, 377(6549): 495-500.
- [3] PARCY F, NILSSON O, BUSH M A, et al. A genetic framework for floral patterning [J]. *Nature*, 1998, 395(6702): 561-566.
- [4] PENA L, MARTIN T M, JUAREZ J, et al. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time [J]. *Nature Biotech*, 2001, 19(3): 263-267.
- [5] KOTODA N, WADA M, MASUDA T, et al. The break

through in the reduction of juvenile phase in apple using transgenic approaches [C] // HAMMERSCHLAG F A, SAXENA P. *ISHS Acta Horticulturae* 625: XXVI International Horticultural Congress: Biotechnology in Horticultural Crop Improvement: Achievements, Opportunities and Limitations. Ooslakker, Belgium: International Society for Horticultural Science, 2003: 337-343.

- [6] BLAZQUEZ M A, SOOWAL L N, LEE I, et al. *LFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 1997, 124(19): 3835-3844.
- [7] 王利琳, 梁海曼, 庞基良, 等. 拟南芥 *LEAFY* 基因在花发育中的网络调控及其生物学功能 [J]. *遗传*, 2004, 26(1): 137-142.
- [8] 刘月学, 胡桂兵, 林顺权, 等. 枇杷 *LEAFY* 同源基因的克隆及序列分析 [J]. *华南农业大学学报*, 2005, 26(2): 66-68.
- [9] 张敏, 汤青林, 宋明, 等. 芥菜 *LFY* 同源基因克隆及序列分析 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2009, 31(4): 69-72.
- [10] 汤青林, 王志敏, 任雪松, 等. 甘蓝 *LFY* 基因的克隆及序列分析 [J]. *中国蔬菜*, 2011(4): 17-22.
- [11] BLÁZQUEZ M A, FERRÑNDIZ C, MADUEÑO F, et al. How floral meristems are built [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(6): 855-870.
- [12] 崔智勇. 荔枝 *API*、*LFY* 基因的克隆及表达研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2010.
- [13] WILLIAM D A, SU Yanhui, SMITH M R, et al. Genomic identification of direct target genes of *LEAFY* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(6): 1775-1780.

【责任编辑 李晓卉】

欢迎订阅 2013 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物. 本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、综述等, 设有农学·园艺·土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、动物科学与兽医学、农业工程与食品科学、综述、简报等栏目. 本刊附英文目次和英文摘要. 读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部.

本刊为《中国科学引文数据库》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》等固定刊源, 并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内. 被《中文核心期刊要目总览》遴选为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊. 为美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内农业类文摘期刊等多家国内外著名文摘固定刊源.

国内外公开发行, 季刊, A4 幅面. 定价 10.00 元, 全年 40.00 元. 自办发行, 参加全国非邮发报刊联合征订发行, 非邮发代号: 6573.

订阅办法: 订阅款邮汇至: 300381 天津市卫津南路李七庄邮局 9801 信箱, 全国非邮发报刊联合征订服务部.