

草莓 *CO* 同源基因 *FaCO-2* 的克隆及表达分析

刘月学 邹冬梅 李 贺 张志宏 马 跃 代红艳

(沈阳农业大学 园艺学院 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 以草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 品种花姬为试材,通过 PCR 和 RT-PCR 方法克隆出草莓 *CO* 同源基因 *FaCO-2* 的 CDS 和 DNA 全长序列,在此基础上通过实时定量 PCR 的方法检测了其在草莓植株各组织和花器官中的表达。结果表明,该基因 DNA 序列长度为 1 882 bp,含 1 个内含子,其 CDS 长度为 1 146 bp,编码 382 个氨基酸,与其他物种的 *CO* 同源基因氨基酸序列有较高的同源性,生物信息学分析表明该蛋白分子量为 42 021.69 D,等电点 $pI = 5.49$ 。实时定量 RT-PCR 结果表明,在不同的组织、花器官中,*FaCO-2* 的表达量存在差异,在充分展开的较大叶片中的表达量最高;在 4 轮花器官中,只在萼片中表达,而其他花器官中不表达。

关键词: 草莓; *CO* 同源基因; 分离; 表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)04-0001-06

Isolation and Express Analysis of *FaCO-2*, a *CO* Homologue from Strawberry

LIU Yue-xue, ZOU Dong-mei, LI He, ZHANG Zhi-hong, MA Yue, DAI Hong-yan

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The *CO* homologue *FaCO-2* was isolated from strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Huaji) with the method of PCR and RT-PCR. Its express pattern in different tissues and organs was checked with qRT-PCR. The full length of its DNA sequence is 1 882 bp and its CDS is 1 146 bp in length. *FaCO-2* codes a predicted protein of 382 amino acids. The amino acid identity compared with other *CO* homologues is highly conserved. The protein molecular weight was 42 021.69 Da with an isoelectric point (PI) of 5.49. The real-time RT-PCR result showed that *FaCO-2* mainly transcripts differ in different tissues and floral organs. It was detected its highest expression in the expanded leaf. In the four flower organs it was only detected in sepal, while no transcription was detected in other flower organs.

Key words: Strawberry; *CO* homologue; Isolation; Expression

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 是多年生的草本植物,由于其独特的风味及丰富的营养成为栽培最为广泛的浆果之一。大多数栽培草莓品种是一季型的短日照植物,它们仅在秋季光周期缩短的情况下才能诱导成花^[1],短的光周期和低温这些信号虽然对成花有促进作用,但对营养生长却有相反的效果^[2]。目前,人们多从生理和栽培角度来阐述光周期等外界环境因素对草莓花芽分化的影响^[3],而对其如何调控的分子机理研究较少。

关于植物成花分子机制的研究,在拟南芥等模式植物上有比较深入的了解。在长日照植物拟南芥的光周期调控成花途径中,*CONSTANS* (*CO*) 基因是

连接光感知和开花时间的转录因子^[4],长日照条件使 *CO* 蛋白稳定,*CO* 蛋白通过调控成花素 *FT* 的合成影响成花^[5]。许多研究表明 *CO* 基因对成花有直接和间接促进作用,在花器官原基形成的早期,通过原位杂交发现在花器官原基上有 *CO* mRNA 的存在,而后期却检测不到,这说明 *CO* 基因对花发育的直接促进表现在它对花器官原基形成的早期的作用上^[6-7]。其他长日照植物中的 *CO* 同源基因在响应光周期成花过程中的作用机制和拟南芥 *CO* 基因大体类似^[8-9],但在短日照植物中 *CO* 同源基因的作用机制则复杂的多,如在水稻中 *CO* 同源基因 *Hdl* (*Heading date 1*) 既能在诱导性的短日照条件下促

收稿日期: 2012-05-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101524); 公益性行业(农业)科研专项(201003064); 辽宁省教育厅创新团队项目(LT2010094); 沈阳农业大学青年教师科研基金项目(20070201)

作者简介: 刘月学(1975-),男,山东临沂人,副教授,博士,主要从事果树分子生物学研究。

进水稻中 *FT* 同源基因 *Hd3a* 的表达从而促进植株成花,又能在非诱导性的长日照条件下抑制 *Hd3a* 的表达从而导致植株开花延迟^[10-11]。

大多数栽培草莓品种属短日照类型,但同时存在对日照不敏感的日中型草莓材料,它们对光周期的成花反应明显不同,了解这一差异的分子机制有助于促进草莓的育种和栽培工作。赵志琴等^[12]在草莓栽培品种卡姆罗莎中分离出了 *CO* 同源基因,通过构建原核表达载体的方式获得了其融合蛋白。但该基因的内含子分布等详细序列结构情况、在不同组织和器官中的表达情况仍未见报道,而这方面的研究对于探讨 *CO* 同源基因在草莓光周期响应成花过程中的作用机制具有重要意义。因此为了进一步探讨 *CO* 同源基因在草莓生长发育过程中的作用,本研究从短日照草莓品种花姬中克隆 *CO* 同源基因的 cDNA 和 DNA 序列,对该基因在草莓各组织和花器官中表达情况进行了分析,以期深入阐述 *CO* 同源基因在草莓感受光周期成花过程中的作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

短日照草莓品种花姬栽培于沈阳农业大学草莓试验园,常规栽培管理。

取花姬幼嫩叶片,用于基因扩增用 DNA 和 RNA 的提取;再分别采取叶片、叶芽、幼蕾、成花及萼片、花瓣、花药、匍匐茎等组织、器官材料,用于表达分析用 RNA 提取。所有试材取回后用液氮速冻,然后于 -80°C 超低温冰箱中保存。

1.2 方法

1.2.1 DNA 与 RNA 的提取序列的获得 DNA 与 RNA 的提取采用 CTAB^[13-14]法。利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 与 RNA 的完整性,用 DU800 核酸蛋白分析仪(Beckman Coulter, USA)检测核酸的纯度。

1.2.2 *CO* 同源基因全长序列的获得 根据赵志琴等^[12]在卡姆罗莎中分离的 *CO* 基因的 cDNA 序列(GenBank 登录号: FJ377616),应用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计引物,委托赛百盛公司合成。引物序列为 F: 5'-ATGTTGAAAGAGGAGAGC-3', R: 5'-CTAGTACGAAGGAACAATGC-3'。

用从叶片中提取的 RNA 进行反转录反应,参照 PrimeScript 1 Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)说明书的方法进行。以 RNA 反转录后得到的第 1 链 cDNA 为模板,进行特异 PCR 扩增,反应体系为取 1

μL cDNA 加入 ExTaq DNA 聚合酶 $0.2 \mu\text{L}$, Buffer $2 \mu\text{L}$, dNTPs $1.6 \mu\text{L}$, 正反向引物各 $1 \mu\text{L}$, 最后用水补足到 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 94°C 5 min 后进行如下 30 个循环: 94°C 40 s, 56°C 1 min, 72°C 1.5 min, 最后 72°C 延伸 10 min。用含 EB ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

该基因编码区 DNA 全长序列的扩增以基因组 DNA 为模板,PCR 条件与步骤同上。

1.2.3 序列测定和分析 利用 DNA 凝胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收扩增片段,与 pGM-T 载体连接,转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,通过蓝白斑筛选及 PCR 鉴定阳性克隆,测序工作委托华大基因公司进行。DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEM 公司, pGM-T 载体购自天根公司,其他药品为国产分析纯。利用 NCBI BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对测序结果进行在线比对分析, DNAMAN 6.0 进行序列分析和氨基酸翻译,使用 Clustal X 1.83 进行多序列比对, MEGA 4 软件 1 000 次重复计算构建 NJ 树。利用 DNASTAR 6.13 分析软件分析预测该蛋白 α -螺旋、 β -折叠、 τ -转角、疏水区和亲水区等相关结构特性。

1.2.4 实时定量 RT-PCR 取各试材的总 RNA,以 Oligo-d(T) 为引物,用 AMV 反转录酶进行反转录,参照 PrimeScript 1 Strand cDNA Synthesis Kit(Takara)说明书的方法进行。以反转录后的 cDNA 作为模版进行实时定量 PCR 检测表达情况。

实时定量 RT-PCR 采用 SYBGreen 染料法进行,实时定量 PCR 特异引物 F: 5'-TCAGATAATGGT-GGGGTC-3', R: 5'-TGCTGTTACTGTTGTGGTT-3', 扩增长度 161 bp。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,特异引物能且仅能扩增出预期大小的片段,没有引物二聚体。实时定量 PCR 的反应体积为 $20 \mu\text{L}$, 包括 $1 \mu\text{L}$ cDNA (RNA 为 $2 \mu\text{g}$), $10 \mu\text{L}$ $2.5 \times \text{Mix}$, 浓度为 $10 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的正反向引物各 $1 \mu\text{L}$, 用超纯水补足至 $20 \mu\text{L}$ 。每个反应重复 3 次。定量 PCR 反应程序: 95°C 3 min; 95°C 10 s, 56°C 20 s, 72°C 20 s, 40 个循环。定量 PCR 试剂 $2.5 \times \text{RealMaster Mix}$ (Cat # FP202-02) 购自天根公司。使用 BIO-RAD 公司 CFX96 定量 PCR 仪,八联排管完成 PCR 反应。以草莓 18S rRNA 基因作为内参基因,清水模板为阴性对照,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量的高低。

2 结果与分析

2.1 草莓 *CO* 同源基因全长序列的分离

从草莓叶片中提取 RNA,以 RNA 反转录得到

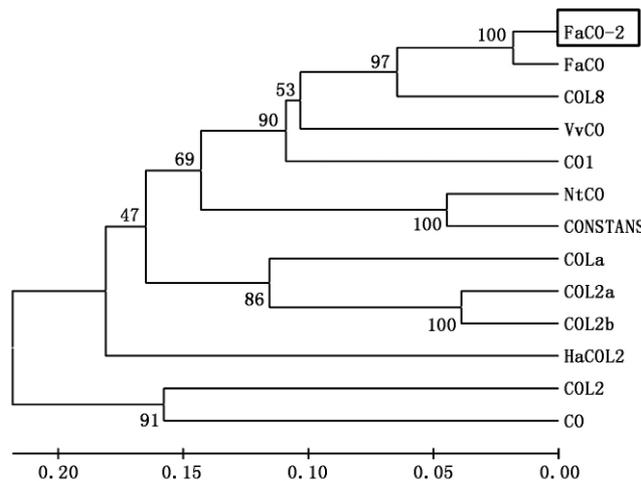
以基因组 DNA 为模板扩增获得的其编码区 DNA 序列 (GenBank 登录号: JQ663600) 长度为 1 882 bp, 有 2 个外显子, 1 个内含子。与其他物种已知 CO 同源基因的 DNA 序列结构比较(图 3) 表明, 该草莓基因 DNA 的内含子/外显子数量与野生草莓、拟南芥等中的 CO 同源基因相同。各同源基因间外显子大小差异不大, 但内含子大小差异较大。

2.3 FaCO-2 编码蛋白聚类分析及其序列特征

将 FaCO-2 所编码的氨基酸序列与其他物种的 CO 同源基因所编码的氨基酸序列通过 DNAMAN 进行氨基酸的同源性分析发现, 草莓的 FaCO-2 同源基因与其他植物的 CO 同源基因所编码的氨基酸都有

一定的同源性(图 4) 。通过与其他物种的 CO 氨基酸序列比对发现, FaCO-2 推测蛋白具有典型的植物 CO 家族的结构特点, 5'端具有 2 个高度保守的 B-box, 其典型结构为 CX2CX8CX7CX2CX4HX8H, 其中 X 代表任意氨基酸, 属典型的锌指结构。3'端具有保守的 CCT 和 COOH 结构域。

用 Clusxtal × 1. 83、MEGA 4 软件对 FaCO-2 氨基酸序列进行系统进化树分析, 该推测蛋白与在卡姆罗莎中报道的 FaCO 和苹果(*Malus × domestica*) 中的 COL8 聚为一类, 随后又与葡萄(*Vitis vinifera*) 中的 VvCO 和杨树(*Populus deltoides*) 中的 CO1 聚在一个分支上(图 5) 。



FaCO. 草莓, ACJ06578; COL8. 苹果, ADL36677; VvCO. 葡萄, CBI16899; CO1. 杨树, AAS00054; NtCO. 烟草, AEJ84000; CONSTANS. 西红柿, ABF56053; COLa. 豌豆, AAX47172; COL2a、COL2b. 大豆, ABD17253、ABD17254; HaCOL2. 向日葵, ADO60998; COL2、CO. 拟南芥, NP_186887、NP_197088。

FaCO. *Fragaria × ananassa*, ACJ06578; COL8. *Malus × domestica*, ADL36677; VvCO. *Vitis vinifera*, CBI16899; CO1. *Populus deltoides*, AAS00054; NtCO. *Nicotiana tabacum*, AEJ84000; CONSTANS. *Solanum tuberosum*, ABF56053. COLa. *Pisum sativum*, AAX47172; COL2a, COL2b. *Glycine max*, ABD17253, ABD17254; HaCOL2. *Helianthus annuus*, ADO60998; COL2, CO. *Arabidopsis thaliana*, NP_186887, NP_197088。

图 5 FaCO-2 与其他 CO 同源蛋白的聚类分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of the predicted FaCO-2 and CO homologous proteins from different species

2.3 FaCO-2 编码蛋白结构的预测

用 BioEdit 软件对所推导出来的蛋白质序列进

行蛋白质性质结构的预测分析, 该基因编码的氨基酸组分包含 382 个氨基酸残基, 其组成如图 6 所示。

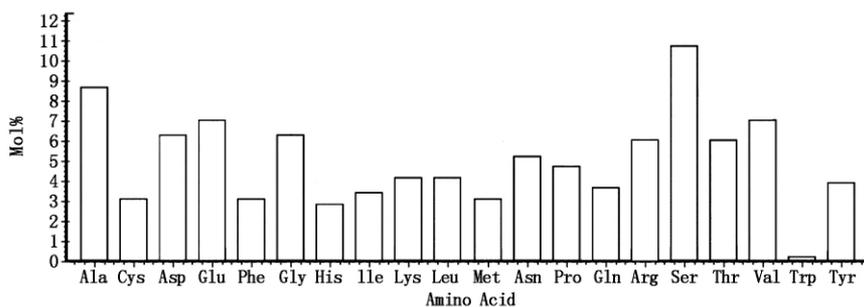


图 6 草莓 CO 氨基酸组成图

Fig. 6 The amino acid constitution of CO in strawberry

由该序列演绎出的蛋白分子量为 MW = 42 021. 69 Da, 蛋白质理论等电点(PI) 为 5. 49。根据 DNA STAR 软件推测出的 FaCO-2 所编码蛋白的二级结构各种比例所在的位置如图 7 所示。在 FaCO-2 所

编码的蛋白中存在较多的 α -螺旋, β -折叠较少, FaCO-2 蛋白除了在 N-端有 2 个疏水区域, 大多数都是亲水区域(0)。预测发现, FaCO-2 蛋白骨架区内含有较多的柔韧区域, 且分布不均匀, 表明该蛋白

的柔韧性较好。因此,推测该蛋白属柔韧性较好的亲水性蛋白。

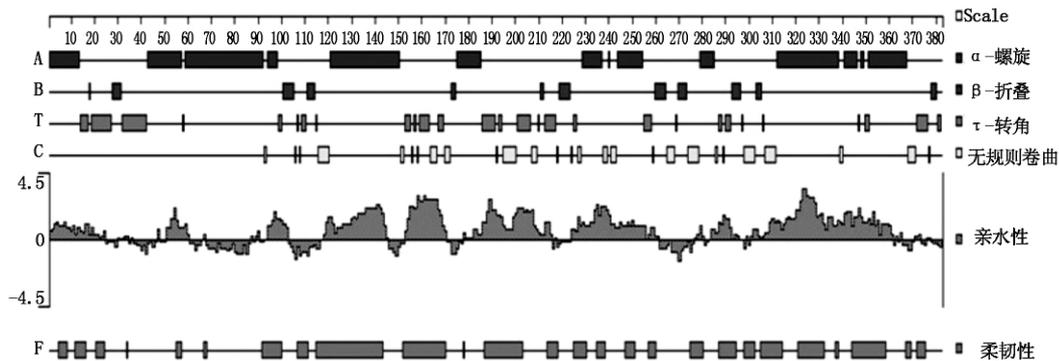
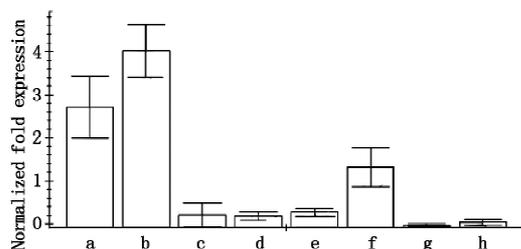


图7 草莓 *FaCO-2* 蛋白的结构预测

Fig. 7 Structure prediction of *FaCO-2* protein in strawberry

2.5 *FaCO-2* 表达模式的分析

实时定量 RT-PCR 分别检测在不同组织、不同花器官及不同花发育阶段的表达情况结果表明, *FaCO-2* 主要在叶片中表达, 其中在充分展开的较大叶片中的表达量最高; 其次在幼叶的表达较高, 而在花序茎、匍匐茎及芽等营养生长的组织中表达量很低。在生殖生长的花蕾中有一定的表达, 而在成熟的花中检测不到该基因的表达。所有 4 轮花器官中, 只在萼片中检测到其表达, 在其他 3 轮花器官中检测不到表达(图 8 9)。

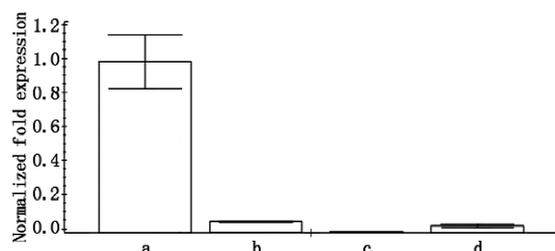


a. 幼叶; b. 大叶; c. 匍匐茎的芽; d. 匍匐茎的茎; e. 花序茎; f. 花蕾; g. 成熟花; h. 幼果。

a. Young leaf; b. Expanded leaf; c. Inflorescence stem; d. Stolon bud; e. Little flower; f. Mature flower; g. Young fruit; h. Young fruit.

图8 *FaCO-2* 基因在草莓不同组织中表达

Fig. 8 Expression pattern of *FaCO-2* in different tissues revealed by the Real time RT-PCR method



a. 萼片; b. 花瓣; c. 雄蕊; d. 子房。
a. Sepal; b. Petal; c. Stamen; d. Ovary.

图9 草莓 *FaCO-2* 基因在不同花器官中的表达

Fig. 9 Expression Pattern of *FaCO-2* in different floral organs revealed by the real time RT-PCR method

3 讨论

目前从拟南芥、黑麦草^[15]、水稻^[16]等植物中分离出了 *CO* 同源基因, 各物种中的 *CO* 同源基因的序列虽不完全相同, 但都有一定的同源性。同时, 该基因在结构上相对保守, 表现为一是含有 2 个外显子和 1 个内含子; 二是含有 B-box1、B-box2、CCT 结构域及 COOH 区域 4 个高度保守的区域。研究显示, B-box1 和 B-box2 结构域跟许多动物蛋白中的 B-box 结构域极为相似, 主要结合环状锌指结构、NHL 结构、螺旋结构或 RFP 结构域, 调解蛋白互作反应^[17]。CO 蛋白的 C 末端有 1 个 CCT (CO、CO-like、TOCI) 区域, 是核定位信号区域。Robson 等^[18]对已知的 7 个 *CO* 突变体进行分析发现, 这些突变全部发生在 N 末端的锌指结构区域或 C 末端 CCT 区域, 证明这 2 个区域对 *CO* 基因的功能非常重要。本研究在草莓中分离得到的 *FaCO-2* 基因在核酸和蛋白水平上都与其他该类同源基因类似, 包含有典型的内含子/外显子分布特征以及高度保守区域。由于 *CO* 基因在结构上的保守性, 在诱导条件下, *CO* 基因对植物成花的调控途径可能也是保守的^[19-20]。在拟南芥中, *CO* 基因编码一个类锌指转录因子调控其他基因的转录, 从而来促进开花^[21-22]。因此, 从结构上来看 *FaCO-2* 很可能与其他物种中的 *CO* 同源基因类似, 在草莓成花的调控途径中发挥重要作用。

在植物营养生长阶段, *CO* 基因在叶和茎顶端开始表达, 它转录的 mRNA 呈渐进方式积累, 当达到一定域值时, 通过激活下游基因使植物由营养生长向生殖发育转变, 开始了植物花的发育^[6-7]。本研究 qRT-PCR 结果表明, 在草莓的各组织中, *FaCO-2* 基因主要在叶片中表达, 且在充分展开的大叶

中表达量最高;在草莓的花器官中,*FaCO-2*仅在萼片中表达,而其他的花器官未检测到其表达。植物感受和接收光周期调控开花信号的部位是叶片,因此结合前人的研究和*FaCO-2*的表达特性来看,该基因很可能参与了草莓光周期信号诱导的成花途径。在花器官的萼片中含有叶绿素等植物色素,可能由于其同样可感知一定的外界光信号从而诱导其在萼片中也有一定的表达量。

探讨光周期对草莓成花影响的分子机理对于指导草莓的育种和生产工作具有重要意义,本研究的结果有助于揭示*CO*基因在草莓成花光周期响应分子调控机制中的作用。为了更进一步了解其作用机制,有必要通过超表达、基因沉默等方法研究该基因的功能,并探讨其与下游与决定成花的*FT*等同源基因的调控关系,相关工作正在进行中。

参考文献:

- [1] Heide O, Sonstebj A. Interactions of temperature and photoperiod in the control of flowering of latitudinal and altitudinal populations of wild strawberry (*Fragaria vesca*) [J]. *Physiology Plant* 2007, 130: 280 – 289.
- [2] Konsin M, Voipio I, Palonen P. Influence of photoperiod and duration of short-day treatment on vegetative growth and flowering of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) [J]. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2001, 76: 77 – 82.
- [3] Taylor D R. The physiology of flowering in strawberry [J]. *Acta Hort* 2000, 567: 245 – 252.
- [4] Putterill J, Robson F, Lee K, et al. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors [J]. *Plant Cell*, 1995, 80: 847 – 857.
- [5] Yanovsky M J, Kay S A. Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis* [J]. *Nature* 2002, 419: 308 – 312.
- [6] Samach A. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis* [J]. *Science* 2000, 288: 1613 – 1616.
- [7] Lopez P S. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis* [J]. *Nature* 2000, 410: 1116 – 1120.
- [8] Bohlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, et al. *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees [J]. *Science*, 2006, 312: 1040 – 1043.
- [9] Turner A, Beales J, Faure S, et al. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley [J]. *Science* 2005, 310: 1031 – 1034.
- [10] Itoh H, Nonoue Y, Yano M, et al. A pair of floral regulators sets critical day length for *Hd3a* florigen expression in rice [J]. *Nature genetics* 2010, 42: 638 – 639.
- [11] Osugi A, Itoh H, Ikeda-Kawakatsu K, et al. Molecular dissection of the roles of phytochrome in photoperiodic flowering in Rice [J]. *Plant Physiology* 2011, 157: 1128 – 1137.
- [12] 赵志琴, 安丽君, 李芳, 等. 草莓 *CO* 基因克隆与表达分析 [J]. *中国农业大学学报* 2010, 15(1): 19 – 24.
- [13] 肖敏, 张志宏, 杨洪一, 等. PCR 检测草莓镶脉病毒的稳定性研究 [J]. *果树学报* 2005, 22(5): 483 – 487.
- [14] 李贺, 印东升, 王志刚, 等. 草莓不同器官中 *microRNA* 表达差异研究 [J]. *果树学报* 2009, 26(5): 632 – 637.
- [15] Martin J, Storgaard M, Claus H, et al. Photoperiodic regulation of flowering in perennial ryegrass involving a *CONSTANS*-like homolog [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 56: 159 – 169.
- [16] Kim S K, Yun C H, Lee J H, et al. *O₃CO₃*, a *CONSTANS*-like gene, controls flowering by negatively regulating the expression of *FT*-like genes under SD conditions in rice [J]. *Planta* 2008, 228: 355 – 365.
- [17] Borden K L B. Ring domains: master builders of molecular scaffolds [J]. *Molecular Biology*, 2000, 295: 1103 – 1112.
- [18] Robson F, Costa M M, et al. Functional importance of conserved domains in the flowering time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants [J]. *Plant Journal* 2001, 28(6): 619 – 631.
- [19] Guo J L, Yang Q, Liang F, et al. Molecular cloning and expression analysis of a novel *CONSTANS*-like gene from potato [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, 72(11): 1241 – 1246.
- [20] Gonzolez-Schain N D, Suarez-Lopez P. *CONSTANS* delays flowering and affects tuber yield in potato [J]. *Biologia Plantarum* 2008, 52(2): 251 – 258.
- [21] Valverde F, Mouradov A, Soppe W, et al. Photoreceptor regulation of *CONSTANS* protein in photoperiodic flowering [J]. *Science* 2004, 303: 1003 – 1006.
- [22] Wenkel S, Turck F, Singer K, et al. *CONSTANS* and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell* 2006, 18: 2971 – 2984.