菲油果 LEAFY 基因的表达模式及启动子克隆

冯延芝^{1,2},张 琳^{1,2},袁德义^{1,2},龙洪旭^{1,2},刘 敏^{1,2},张日清²,陈圣林² (「中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室、长沙 410004; 「中南林业科技大学林学院、长沙 410004)

摘要:LEAFY(简称 LFY)是植物花分生组织特征基因,在植物由营养生长向生殖生长转变过程中起着重要作用,是启动开花的枢纽。菲油果是一种新兴的果树资源,为研究菲油果 LFY 基因(FsLFY)的表达调控规律,本研究通过实时荧光定量 PCR 技术研究了 FsLFY 基因的时空表达模式,并通过染色体步移技术克隆了该基因的启动子序列。荧光定量 PCR 结果表明,FsL-FY 基因在菲油果花蕾不同发育阶段以及其他组织器官中均有表达。在花蕾中,小蕾期最高,中蕾期最低;组织器官中,营养枝茎段最高,花瓣最低。FsLFY 基因启动子序列长度为 2436 bp(GenBank 登录号:KF766536),运用 PLACE、PlantCARE 等在线软件对其序列进行顺式作用元件分析,结果显示该序列不仅含有 CAAT-box、TATA-box 等核心启动子元件,而且还具有响应水分、光、赤霉素(GA)以及其他功能未知的顺式调控元件,表明 FsLFY 基因的表达受多种外界环境条件的调控。本研究为阐明菲油果的开花机理,以及通过分子育种手段使菲油果早花早果奠定了理论基础。

关键词: 菲油果: LFY 基因: 实时荧光定量 PCR: 表达模式: 启动子

Expression Pattern of FsLFY Gene and its Promoter Cloning in Feijoa Sellowiana

FENG Yan-zhi^{1,2}, ZHANG Lin^{1,2}, YUAN De-yi^{1,2}, LONG Hong-xu^{1,2},
LIU Min^{1,2}, ZHANG Ri-qing², CHEN Sheng-lin²

(1 Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Ministry of Education,

Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004;

²College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004)

Abstract: *LEAFY* (*LFY*) is a tagged gene of floral meristem and plays an important role in the transformation process from vegetative growth to reproductive growth in flowering plants. *Feijoa sellowiana*, a promising fruit tree species, has been introduced to China for fruits production and ornamental usage in recent years. *FsLFY* (*F. sellowiana LFY*) gene expression in different tissues and at different development stage of floral buds was studied by real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) technology, and the promoter sequences were isolated by the genome walking technology. The qPCR analysis showed that the *FsLFY* gene was expressed at all developmental stages of floral buds and all different tissue and organs. In developmental buds, the expression level of the *FsLFY* was the highest in small bud stage and the lowest in middle bud stage. In tissues and organs, the expression level was the highest in stems from vegetative branches and the lowest in petals. The newly cloned *FsLFY* promoter sequence was 2436 bp in length and had been deposited in GenBank with accession no. KF766536. Promoter analysis with online softwares PLACE and PlantCARE showed that the *FsLFY* promoter contained not only CAAT-box, TATA-box, and other core promoter elements, but also the unknown cis-regulatory elements response to water, light, and gibberellin (GA), implying that the expression of the *FsLFY* gene was regulated by various external environmental factors. This study would provide a theoretical basis for fully understanding the flowering mechanism of the *F. sellowiana* tree and accelerating flowering and fruit setting via molecular breeding strategy.

收稿日期:2013-11-29 修回日期:2014-03-03 网络出版日期:2014-06-09

URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S. 20140609.1431.027.html

基金项目:国家林业局"948"项目(2008-4-06,2012-4-42)

第一作者研究方向为林业生物技术。E-mail:fyz617912@126. com

通信作者:张琳,研究方向为经济林栽培育种与林业生物技术。E-mail:triwoodtim918@126.com

Key words: Feijoa sellowiana; LFY gene; real-time fluorescent quantitative PCR; expression pattern; promoter

菲油果(Feijoa sellowiana Berg.),又名凤榴,属桃金娘科菲油果属植物,是近年来新引入我国的一种新兴果树资源(图1)^[1]。菲油果用途广泛,集食

用、观赏、绿化于一体。但和大多数果树一样, 菲油 果童期较长, 一般要经过3~4年才开花结果, 从而 严重限制了其推广应用。









A:树形;B、C:花;D:果实 A:Tree,B and C:Flower,D:Fruit

图 1 菲油果'Unique'树体和花果

Fig. 1 The tree, flower, and fruit of F. sellowiana cultivar 'Unique'

研究表明,开花是高等植物重要的生命现象。 植物从营养生长向生殖生长转变的过程中涉及到许 多基因的表达调控和一系列的信号转导, LEAFY (LFY)基因是启动植物开花的枢纽,控制着植物的 花发育过程^[2]。E. S. Coen 等^[3]从金鱼草(Antirrhinum majus L.)中最早克隆得到 LFY 同源基因,并发 现 LFY 基因的失活导致其花形态发生变异, 而花序 持续生长。随后 D. Weigel 等[4] 又在拟南芥(Arabidopsis thaliana L.) LFY 缺失突变体中发现与金鱼草 LFY 突变体相似的表型。在拟南芥中, M. A. Blazquez 等[5] 研究发现过量表达 LFY 基因使其侧枝均转 化为单一的花器官,且使花期大大提前。在木本植 物杨树(Populus L.)中,D. Weigel 等[6] 通过过量表 达 LFY 基因, 使得山杨 (Populus davidiana Dode.) 的 开花期提早为5个月,而野生型山杨(P. davidiana) 开花期为8~12年。L. Peha 等[7] 又研究发现转基 因可使枳橙(Poncirus trifoliata Citrange.)的童期由5 年提早到 12~20个月。另外,近年来 E. J. Mellerowiez 等^[8]、W. H. Rottman 等^[9]、M. J. Carmona 等^[10] 和胡柱兵等[11] 分别从辐射松(Pinus radiate D. DON)、白杨(Populus. nigra L.)、葡萄(Vitis vinifera L.)、杧果(Mangifera indica L.)等木本植物中克隆 获得了 LFY 同源基因, M. W. Frohlich 等[12] 发现这 些 LFY 基因在氨基酸和核苷酸序列上非常保守,但 A. J. Kelly 等^[13]、J. Kyozuka 等^[14]、M. Wada 等^[15]、 A. Mouradov 等[16] 又研究发现其表达特征却相差较 大。如 M. J. Carmona 等[10]研究发现葡萄的 LFY 同 源基因在开花阶段和叶原基中均有表达,而 E. S.

Coen 等^[3] 发现金鱼草中的 FLO 基因(LFY)的同源基因)只在植物的开花期表达。LFY 同源基因间表达模式的差异与其启动子功能密切相关。启动子是一段特殊的 DNA 序列,能够通过与转录因子蛋白质结合的方式来调控目标基因,从而控制基因在植物中的表达时期、表达部位以及表达量。迄今为止,已在毛白杨(Populus tomentosa Carr.) [17]、龙眼(Dimocarpus longan Lour.) [18]、葡萄[19]等多种植物中成功克隆获得 LFY 基因的启动子序列,通过比对分析,发现 LFY 基因启动子序列在不同植物中既具有保守性,又有差异性,因而决定了不同 LFY 基因表达以及功能的差异。

为了缩短菲油果童期,使之早花早果,本文研究了 *LFY* 基因在菲油果不同组织器官、不同发育阶段中的表达特征,克隆了 *LFY* 基因启动子,并进行了生物信息学分析,以期为通过分子水平对菲油果进行遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验材料为菲油果品种'Unique',采集于湖南省株洲市攸县中南林业科技大学的菲油果种质资源圃。2011年4月9日将刚形成的幼小花蕾进行标记,然后分别于花蕾形成后的第7天、第14天、第21天、第28天、第35天采集花蕾样品(记作现蕾期4.16、小蕾期4.23、中蕾期4.30、大蕾期5.7、大蕾期5.14),其中花器官各组织采集于开花始期(5.21)。同时于4月中旬采集结果枝和营养枝的幼嫩叶片、

顶芽、茎段,样品采集后液氮速冻,-80 ℃贮藏 备用。

1.2 方法

1.2.1 FsLFY 基因的克隆 参照植物基因组 DNA 提取试剂盒提取菲油果幼嫩叶片 DNA。根据 Gen-Bank 中同科(桃金娘科)植物桉树(Eucalyptus robusta Smith.) LFY 基因序列设计 PCR 引物,FYG-F1:5′-ATGGATCCAGAAGCATTTGCGGTTGTG-3′、FYG-R1:5′-CTAGTAAGGGAGTTCGAGATGGTGAGCGGT-3′。PCR 反应条件为 94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性30 s,62 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min,共 35 个循环;72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存备用。回收纯化后的PCR产物直接克隆至 pMD18-T 载体,挑选阳性克隆送至上海博尚生物技术公司测序。将测序获得的序列与本实验室克隆得到的 FsLFY 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号 JN562738)进行比对,并通过Blastn 程序进行同源性搜索鉴定。

1.2.2 *FsLFY* 基因的荧光定量 PCR 分析 采用 北京奥莱博生物技术有限责任公司的植物 RNA 提 取试剂盒提取菲油果各组织器官的总 RNA,采用 TaKaRa 公司的 PrimeScript® RT reagent it With gD-NA Eraser 合成 cDNA, 所用引物为该试剂盒中自带 引物 Random b mers 和 Oligo dT Primero. 根据 FsLFY 基因的外显子序列设计引物: FYG-F2:5'-CATCTC-TACGACCAGTGCCG-3', FYG-R2: 5'-CTTCTTCGCG-TACCTGAACAC-3′, 扩增长度为 223 bp。以 18S rRNA 作为内参基因[20] 分析 FsLFY 基因在各组织器 官中的表达模式。每个样品均配制 75 µL 的总反应 体系,平均分成3等份进行试验,反应程序为95℃预 变性 3 min;95 ℃变性 10 s,58 ℃退火延伸 30 s,40 个 循环,荧光值的读取均在延伸阶段完成。按照 2-ΔΔCI 法来确定目的基因的表达量,并利用软件 SigmaPlot 10.0 对 FsLFY 基因的相对表达量进行作图分析。

1.2.3 FsLFY 基因启动子的克隆及序列分析 根据 FsLFY 基因的 5′端序列设计 3 个巢式的特异性引物作为反向引物,其序列分别为 FYG-SP1:5′- GGT-GGGGCATTTTTCGCCTCTC-3′、FYG-SP2: 5′-GGGCTCCGTCACTATGAAGGGGT-3′、FYG-SP3: 5′-ACGGTGCTTCTTCCTCTGTTGCTG-3′,以 Genome Walking Kit 试剂盒中的 AP1 ~ AP4 随机引物作为正向引物。 0.5 μ L DNA 为模板、AP1 Primer (100 μ mol/L) 和 FYG-SP1 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L 为上下游引物,按试剂盒的说明书进行 PCR 扩增,总反应体系为 25 μ L,退火温度是 62 $^{\circ}$ C。取稀释 5 倍的第 1 次

PCR 产物 $0.5 \mu L$ 为模板进行第 2 次 PCR 扩增,引物为 FYG-SP2 和 AP1,退火温度为 64 %。取稀释 5 倍的第 2 次 PCR 产物为模板进行第 3 次 PCR 扩增,引物为 FYG-SP3 和 AP1,退火温度同上。电泳检测 3 次 PCR 产物后,回收、克隆、测序第 3 次 PCR 产物。

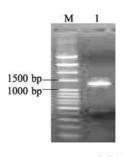
测序结果确定为 FsLFY 基因的启动子序列后,综合运用 PlantCARE 及 PLACE 等在线软件比对分析其转录调控元件 $[^{21-22}]$ 。

1.2.4 统计分析 采用 SPSS 18.0 统计软件对 Fs-LFY 基因的相对表达量进行方差分析,采用 Duncan 多重比较法进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 FsLFY 基因 DNA 序列的克隆

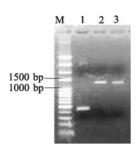
采用引物 FYG-F1 和 FYG-R1 从菲油果中扩增 到长度约1.2 kb 的片段(图2),该片段经克隆、PCR 检测后,挑选阳性克隆2和3进行测序(图3),结果 显示2和3的序列完全相同,将该序列与本实验室 之前克隆获得的 FsLFY 基因 cDNA 序列(登录号为 JN562738)进行比对,发现除外显子序列完全相同 外,还包含2个内含子。又通过 Blastn 进行同源性 搜索,结果表明该序列与几十种其他植物 LFY 基因 序列高度同源,其中与番石榴(Psidium guajava Linn.) LFY 基因的相似性最高, 为 97%, 与蓝桉 (Eucalyptus globulus Labill.)和莲雾(Eugenia javanica Lam.)的相似性也分别高达 92% 和 91%,因此 可确定该序列为 FsLFY 基因的基因组 DNA 序列。 其长度为1243 bp,包含2个内含子,第1个内含子 位于基因组 332 bp 位置,长度为 63 bp;第 2 个内 含子在 745 bp 的位置,长度为 109 bp。这 2 个内 含子和外显子边界序列的 5'端都是 GT.3'端都是 AG,即都遵循双子叶植物的内含子和外显子边界 序列特征。



M:100bp plus Marker;1:PCR产物电泳检测 M:100bp plus Marker,1:Detection of PCR products by electrophoresis

图 2 FsLFY 基因 PCR 扩增

Fig. 2 Applification of FsLFY gene by PCR



M:100bp plus Marker;1~3:PCR产物电泳检测

M:100bp plus Marker,1-3:Detection of PCR products by electrophoresis

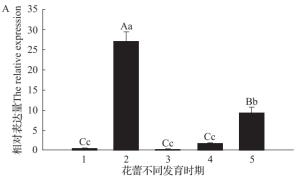
图 3 FsLFY 基因重组子阳性克降检测

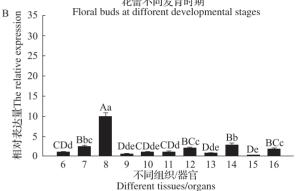
Fig. 3 Detection of positive clones for FsLFY recombinants

2.2 FsLFY 基因的表达模式

为避免荧光定量 PCR 扩增时基因组 DNA 的影响,引物位置要跨越或者包含内含子部分,本试验设计的引物扩增长度为 223 bp。分别提取菲油果 16个组织器官的总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量是否满足后续试验要求后,再进行荧光定量 PCR 扩增。FsLFY 基因的扩增曲线呈典型的 S 型,基线平直、指数期明显且平行性好,FsLFY 基因的溶解曲线在 84 ℃时达到峰值,且是单一的特异峰,表明无引物二聚体的污染和非特异性扩增,试验结果准确。

以 18S rRNA 作为内参基因进行荧光定量 PCR 扩增(图4)。结果表明:(1)在菲油果花蕾发育的 不同时期 FsLFY 基因的表达量也不同,在小蕾期中 表达量最高,其次是大蕾期(5.14)、大蕾期(5.7)、 现蕾期,表达量最低的是中蕾期,表达量最高值是其 最低值的 126 倍。在 P < 0.05 和 P < 0.01 的水平 下,FsLFY 基因在小蕾期中的相对表达量均显著高 于其他 4 个时期,在大蕾期(5.14)中的相对表达量 又显著高于现蕾期、中蕾期和大蕾期(5.7)3个时 期,而现蕾期、中蕾期和大蕾期(5.7)之间相对表达 量差异不显著。(2) FsLFY 基因在菲油果的不同组 织器官中均有表达,其表达量的大小依次为:营养枝 的幼嫩茎段>萼片>营养枝的顶芽>雌蕊>子房> 营养枝的幼嫩叶片>结果枝的幼嫩茎段>结果枝的 顶芽>雄蕊>结果枝的幼嫩叶片>花瓣,表达量最 高值是其最低值的 56 倍。在 P < 0.05 的水平下, FsLFY基因在营养枝的幼嫩茎段中的相对表达量 显著高于其他各个时期,营养枝的顶芽、雌蕊、萼 片、子房之间差异不显著,其他样本间差异不显 著:在P < 0.01 水平下的差异显著性与P < 0.05水平相同。以上结果表明菲油果中 FsLFY 基因的 表达具有组织特异性。





1: 现蕾期;2:小蕾期;3:中蕾期;4:大蕾期(5.7);5:大蕾期(5.14); 6: 营养枝的幼嫩叶片;7: 营养枝的顶芽;8: 营养枝的幼嫩茎段; 9: 结果枝的幼嫩叶片;10: 结果枝的顶芽;11: 结果枝的幼嫩茎段; 12: 雌蕊;13: 雄蕊;14: 萼片;15: 花瓣;16: 子房; A: FsLFY 基因在花蕾

不同发育时期中的表达;B:FsLFY 基因在不同组织器官中的表达;小写字母表示 P<0.05;大写字母表示 P<0.01
1:Squaring stage,2:Small bud stage,3:Middle bud stage,4:Big bud stage(5.7),5:Big bud stage(5.14),6:Young leaves of vegetative branches 7. Terminal buds of vegetative branches 8. Years of vegetative branches 7. Terminal buds of vegetative branches 8. Years of vegetative branches 7. Terminal buds of vegetative branches 8. Years of vegetative branches 9. Years of vegetative 9. Years of vegetative 9. Years of vegetat

stage (5.7),5;Big bud stage (5.14),6;Young leaves of vegetative branches,7;Terminal buds of vegetative branches,8;Young stems of vegetative branches,9;Young leaves of fruiting branches,10;Terminal buds of fruiting branches,11;Young stems of fruiting branches,12;Pistils,13;Stamens,14;Sepals,15;Petals,16;Ovary,A;Expression of FsLFY gene at different developmental stages of floral buds,B;Expression of FsLFY gene in different tissues,Lowercase letters indicate significant difference at P < 0.05 level, Uppercasel letters indicate significant difference at P < 0.01 level

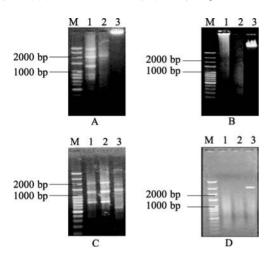
图 4 FsLFY 基因的时空表达模式

Fig. 4 The spatial and temporal expression pattern of *FsLFY* gene

2.3 FsLFY 基因启动子克隆

以菲油果基因组 DNA 为模板,通过染色体步移 法扩增 FsLFY 基因的启动子序列,图 5 中 A、B、C、D 分别代表 4 次扩增,A 中第 3 次巢式 PCR 扩增中点 样孔非常明亮,但是泳道中无任何条带,原因可能是 模板浓度过高或者是模板有杂质;B 中的 3 次扩增 均是空白,可能是引物的特异性不高而致;C 中第 3 次扩增有 2 条带,但是经过回收、测序后,确定该序列并非 FsLFY 基因启动子的序列;前 3 次扩增试验 均没有获得目的条带。只有 D 才成功扩增出 FsLFY

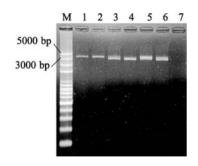
基因的启动子序列,长度约3 kb,产物连接至T 载体后,进行菌液 PCR 检测(图 6),随机挑选阳性克隆1、3、5 测序。将获得的序列(2946 bp)与菲油果 LFY 基因的 DNA 序列比对,两者间有 510 bp 的重复序列,对长度为 2436 bp 的序列进一步分析,表明该序列即为 FsLFY 基因的启动子序列。



A、B、C、D 分别表示启动子的 4 次巢式 PCR 扩增, M:100 bp plus Marker;1:第1次 PCR 产物电泳检测; 2:第2次 PCR 产物电泳检测;3:第3次 PCR 产物电泳检测 A,B,C,and D show the four nested PCR amplification of the promoter respectively,M:100 bp plus Marker,1:Electrophoresis of the first-round PCR product,2:Electrophoresis of the second-round PCR product,

图 5 FsLFY 基因启动子克隆 Fig. 5 Cloning of FsLFY promoter

3: Electrophoresis of the third-round PCR product



M:100 bp plus Marker;1~7:启动子重组子的电泳结果
M:100 bp plus Marker,1-7:Electrophoresis of promoter recombinant
图 6 FSLFY 启动子重组子阳性克隆检测

Fig. 6 Detection of positive clones for FsLFY promoter recombinants

2.4 FsLFY 基因启动子的序列分析

分别应用 PLACE 和 PlantCARE 在线分析软件对 FsLFY 基因 2436bp 的启动子序列进行调控元件的分析,两个软件的预测结果基本一致。图 7 为标注了主要转录因子结合位点(TFB)的 FsL-

FY 基因启动子序列。FsLFY 基因启动子中的典 型作用元件有:调控基因转录起始频率并可增强 转录的 CAAT-box、RNA 聚合酶的结合位点 TA-TA-box,还含有一些与水分胁迫相关的顺式作用 元件,如 ACGTG、ACGT、WAACCA、TAACTG 等。 GRWAAW、GGTTAA、GATAA 等元件表明了 FsLFY 基因启动子在光调节中的作用:TAACAAR、TGAC 等元件暗示了在 GA 应答中的作用。此外还存在 多个顺式作用元件,如 ABA 响应元件、MYC (MYB)结合位点、磷酸盐饥饿响应元件以及一些 至今功能未知的顺式作用元件等。因此推测 FsL-FY基因启动子的表达受到了多种外界环境信号的 调控,例如水分、激素和光等,通过参与一系列的生 物学过程来调控其特定的生长发育过程。FsLFY基 因的启动子序列(2436 bp)已提交至 GenBank,登录 号为 KF766536。

通过对葡萄、山核桃(Carya cathayensis Sarg.) 以及拟南芥等植物 LFY 基因启动子区域的序列分析发现,调控元件均存在保守性,并表现出不同程度的差异,这与不同物种中 LFY 同源基因除了花分生组织保守性外,也存在功能性差异的现象一致。

3 讨论

在植物个体发育过程中开花是其中心环节,如 何提早开花和缩短童期对于经济林木的育种和栽培 具有十分重要的现实意义[20],因此开花关键基因逐 渐成为近年来的研究热点。LFY基因是植物典型的 花分生组织特征基因,是启动开花的枢纽。LFY 同 源基因的表达特性也因植物物种而异。M. Wada 等[15]研究发现苹果(Malus pumila Mill.) LFY 的同 源基因 AFL2 不仅在花分生组织中强表达,而且在 叶片和根中也有较强的表达:柑橘(Citrus reticulata Banco.) LFY 同源基因在花芽中的表达强度显著高 于营养芽^[23]:龙眼 LFY 基因在嫁接苗的幼树期叶芽 中无表达,而在成年树叶芽中有微弱表达[24];甘菊 (Dendranthema lavandulifolium Ling.) LFY 的同源基 因 DFL 强烈表达于花芽, 但是在幼茎和幼叶中表达 量较少[25];芥菜(Brassica juncea Czernajew.) LFY 同 源基因在根中无表达,在花芽、幼茎、幼叶中的表达 模式与甘菊相同^[26];核桃(Juglans regia Linn.)LFY 同源基因在叶片中表达量最低,嫩茎次之,花芽中 最高[27]。

基因的表达模式和水平取决于启动子的顺式作

-2436	GAGTTTTTGAGTTGTGGCAATTGGAGACATCTTAAAAGGGATTTCCCTAAGCTGAAGAACAGGAGAAGAGAAATTGAATTAGAGATCAGTCTGTAGATGATA- MYCCONSENSUSAT+
-2336	TTGCAAGTGTAGCTGACTGTAATTTTGGATAATGTTTTACCTGTCCTAGAGGATTTGTTTG
-2330	MYCCONSENSUSAT IBOXCORE+
-2236	ATGCATTATAGTGGTAAAGTACAATTGGGGATCAATGATGATGTGTGTG
	MYCCONSENSUSAT.
-2136	CATTGAC TAGAGTGAGGCACGTTGTAGAGTTGAAGAATTTGATTTCCTTAAGTATTGTGGATTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCCTTAAGTATTGTGGATTCAGCTGAGTGTCGGTAATCTTTAGAATGTGGAGTTTTTCAGAATGTGAGAGTTTTTCAGAATGTGAGAGTTTTTCAGAATGTGAGAGTTTTTCAGAATGTGAGAGTGTCAGAGTGTCAGAGTGTCAGAGTGTAGAGTGTCAGAGTGTCAGAGTGTCAGAGTGTCAGAGAGTTTTTCAGAATGTGAGAGTAGTAGAGAGTGTCAGAGAGTGTCAGAGAGTTTTAGAGAATGTGAGAGAGTTTTAGAGAATGTGAGAGAGAGAGTTTTAGAGAATGTGA
	WBOXATNPR1 MYCCONSENSUSAT→
-2036	${\tt GAATGTCATTCGAGGTGCCTTGGTACAAT}{\tt GGCCTGTATGAGTTTCAAGGTGAAATTGTGACAGATTTCATTGCGGAGACGT{\tt CAGATGCATTTGTTTGAGAGGTGAAATTGTATTGAGAGATGCATTTGTTTG$
	CAAT-box MYCCONSENSUSAT.
-1936	GTTTGAATTGTGGCATATCCGTTTGGAGCACAATAGCGAGAAAAGAACAAGGGTTCTAAGTGAAATGAATATGCTGTGATTATGTGACCGAGAAATTGAA- MYCCONSENSUSAT CAAT-box-
-1836	TGTATGCAAATATTGTGACTAAACGACTGTAAGTGCAATTCAATACGACTGTTAGAGAAACTATGAAAATTGCAGAGTTAATTCATTTGAATTTT-
-1030	ABRELATERD1 MYCCONSENSUSAI
-1736	TGCAGGCTATCGCACTTTCCTTCATAGATTACTATTCAAGCAAG
	CATATGGMSAUR
-1636	AGAGCTTTGATCGACAAGGAAGCTGGTAAGATGACCAAGCATGTGCAGACTGACAGTAGCATGACATTCTACTTGGAGTTGTTAAAGGAATTACACGTTA-
	ABRELATERD1-
-1536	AAAAATGTATAGTGAGATACTGCCCTAGCGCAAGATTAGTAGCAAATATGAGCTTGTTAATGTGTGGTCTCTCCTTTTATCGAGCACATACAACTTGTTT-
	GT1CONSENSUS+
-1436	GATGATATGTCCTTGAGATACGGTCATGAATTAATTCTTGGAATTGCTTAATCTGAAGAGTTTTGATATAGTCCACATGCTACTAATCGATTTGTTAATT-
	MYBCORE MYCCONSENSUSAT GT1CONSENSUS.
-1336	ATTAGACATGATTCTTTAATGTAATTTCATAGTTGCCGGGTACGCTACTAAACTTTTGTTGCTTTTGTTTCTTTGTTCGCTTCAATCAA
-1236	CAAT-box- CGCCATTGAACTTGCAGGTTAACCATCATCTTGCTCGTTGAAAATTAGAGTATTATCAGGTTGAATCAGAAGTGATGATGAGATCATTCAT
-1230	MYBIAT GTICONSENSUS WBOXATNPRI
1126	CTTTATGTTCGAATATTATTAGTTATTACATAATGAATCTTGTGTGTG
-1136	IBOXCORE
-1036	AATAACCAAATATATCAGATGATGAAGAGTCAGTGACAAGGGAGGTGGTCAAAGAATTCAAAGAAGCAAGAATGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGATGGTCGTCG-
-1030	MYB1AT EBOXBNNAPA GAG-motify
-936	AGATTTATGTTTATAAGAAGATGAGGCCGTAGCTAATGAAGACGCAAATTCTAATAATAATATCCAAGCGGACCCGATATTGATGATTTTAAAGAAACC
	GT1CONSENSUS .
-836	AATGGGATATCAAGCCTAATGGTTAATAGGTATAATCTTATATGTGACCATAACAAGGTAGTGTTTAGTCTAGACATGGGATTACAAAAATGATGTGCAA-
	GT1CORE GAREAT ABRELATERD!
-736	AGATACATCATAATTAATGGATTTGACAATCTTTTGTCCTGATGTGGAATTACCATGTTAGAAGATTTAATGGTGATTTTTAACGAAAGGCTAAAGGCTA
	WBOXATNPR1
-636	TAATGAAAATTGAGGATTTTTGTTTAGAAAAAAATTGTGGCAGATTTAACACTATACATAAAATTTGGGAGGTTCCTAAGAAATTAGGTCAAAACTGAG-
	GTICONSENSUS GTICONSENSUS.
-536	CTCCATACAACAGGAGCCAGATTGACTCAATGTTTTGTTGGTATCCATATCTCTCCCACGTAATGGACAAAGAGGATCCCTAATGCACAGTGGGTGCTTG-
	WBOXATNPR1 G- box+
-436	$AGGAGATC \\ GAAAATTGATGGGAAAGAAGAGGGGAGGGGGCAGCAGAGGCCAAAGATGAGAAGAGGACATTCCTTTAGAGCCTTCTCTCTTTTCTCTCTGTG-CACAAGATGAGAAGAGAA$
	GT1CONSENSUS GA-motife
-336	GGACAACCCACGACGACACCAACTACGAAACAAACTGGTGACAAGACCACTCGATTCCCAGTTCCAGCAGTTGCAGCAACAGTCAAAACACAGTGGGTG
224	MYCCONSENSUSAT.
-236	TCAGTGACCAAATCCCGATGACTACCCAAATCGCAAGGTTAACACTAACTGGACAGCACCCTCCTCCTCGTCTAGTTCCTTCTGACCAGCAACTTCA- GT1CORE MYB2AT+
-136	ACTTGTAGTTACTGCTGTCCCGTCCCATGCAACGCCATCCACCATTTGTTTATAAACCAGGAAGCAACAGTTGCGCACACCTACACTACAATACAC
-130	+1 TATA- box CAAT-box
-36	TACTGCAGTCATTTGTGTTTGAAGCGCCGAGAGAGAATTGGATCCGGAAGCATTTGCG
	MYCCONSENSUSAT M D P E A F A

起始密码子 ATG 以方框和 +1 标出。与已鉴定的顺式作用元件同源的基序用阴影标识, 其对应的名称在阴影下标出。箭头表示的顺式作用元件方向与启动子相反

The initiation codon ATG in box is marked with +1. The motif of identified cis-acting elements is marked with shadows under which the name of the motif is present. The cis-acting elements indicated with arrowheads and the promoter is in the opposite direction

图 7 FsLFY 基因上游调控序列及预测的顺式作用元件

Fig. 7 The upstream nucleotide sequence of FsLFY gene and the predicted cis-regulatory elements

用元件,为获得菲油果 FsLFY 基因启动子,连续设计了 4 次特异引物进行扩增,其中前 3 次均没有扩增出来,只有第 4 次才成功克隆获得启动子序列。通过对扩增出的启动子序列分析发现引物附近模板GC 百分含量较高(接近 64%),故扩增难度大,对引物的特异性要求也较高,由此可见引物是成功克隆

启动子的关键因素。目前已在多种植物中克隆得到 LFY 同源基因的启动子序列,经比对分析发现许多 转录因子的结合位点存在一定的保守性,比如均含 有 ABA 应答元件、光响应元件、MYB(C)结合位点 等顺式作用元件,表明这些元件在 LFY 基因的表达 调控过程中可能起着非常重要的作用。另外位于基 因和启动子之间 5′-UTR 区域序列具有的作用,对启动子活性的发挥是具有增强、弱化还是冗余的功能尚不得而知,而且 FsLFY 基因启动子还存在一些功能未知的作用元件,要探究这些作用元件在 LFY 基因表达调控中的具体作用,还需要通过进一步的实验来验证。

参考文献

- [1] 向盛萍. 四个菲油果品种特性比较研究[D]. 长沙;中南林业 科技大学,2009
- [2] 田淑兰,除敏,白书农. LFY/FLO 基因与高等植物成花诱导分子机理的研究进展[J]. 生物学通报,1999,34(9):5-7
- [3] Coen E S, Romero J M, Doyle S, et al. Florieaula; a homeotic gene required for flower development in antirrhnum majus [J]. Cell, 1990,63:1311-1322
- [4] Weigel D, Meyerowitz E M. Aetivation of floral homeotic genes in Arabidopsis [J]. Science, 1992, 261:1723-1726
- [5] Blazquez M A, Soowal L N, Lee I, et al. LFY expression and flower initiation in Arabidopsis [J]. Development, 1997, 124: 3835-3844
- [6] Weigel D, Nillson O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants [J]. Nature, 1995, 377;495-500
- [7] Peha L, Martín-Trillo M, Juárez J, et al. Constitutive expression of Arabidopsis LEAFY or APETALA1 gene in citrus reduces their generation time [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19;263-267
- [8] Mellerowiez E J, Horgan K, Walden A, et al. PRFLL a Pinus radiata homologue of FLORICA-ULA and LFY is expressed in buds containing vegetative shoots and undifferentiated male cone primodia [J]. Plant, 1998, 206 (4):619-629
- [9] Rottman W H, Meilan R, Sheppard L A, et al. Divers effects of over expression of LFY and PTLF, a popla (Populus) homolog of LEAFY/FLORICAULA, in trans genic poplar and Arabidopsis[J]. Plant, 2000, 22:235-245
- [10] Carmona M J, Cubas P, Martine-Zapater J M. VFL, the grapevine FLORICAULAP LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate [J]. Plant Physiol, 2002, 130 (9):68-77
- [11] 胡柱兵,林顺权,叶白行. 芒果 LEAFY 同源基因的分离及序列

- 分析[J]. 亚热带植物科学,2004,33(2):1-4
- [12] Frohlich M W, Parker D S. The mostly male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils [J]. Aust Syst Bot, 2000, 25:155-170
- [13] Kelly A J, Bonnlander M B, Meeks-Wagner D R. NFL, the tobacco homolog of FLORICAULA and LEAFY, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems [J]. Plant Cell, 1995, 7:225-234
- [14] Kyozuka J, Konishi S, Nemoto K, et al. Down-regulation of RFL, the FLO/LFY homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:1979-1982
- [15] Wada M, Cao Q F, Kotoda N, et al. Apple has two orthologues of FLORICAULA/LEAFY involved in flowering [J]. Plant Mol Biol, 2002,49;567-577
- [16] Mouradov A, Glassick T, Hamdorf B, et al. NEEDLY, a Pinus radiate ortholog of FLORICAULA/LEAFY genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:6537-6542
- [17] 李昊,陈仲,李英,等. 毛白杨 PuLFY 基因启动子的克隆及其 瞬时表达分析[J]. 中国生物工程杂志,2012,32(4):41-46
- [18] 朱娜. 龙眼 LFY 同源基因表达及启动子克隆 [D]. 福州: 福建 农林大学,2010
- [19] 宗成文,章镇,房经贵,等. 葡萄 *LEAFY* 基因启动子的克隆与序列分析[J]. 南京农业大学学报,2007,30(4):20-25
- [20] 冯延芝. 枣和菲油果 *LFY* 基因的基因组 DNA 序列克隆及表达模式比较研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2013
- [21] 郭余龙, 闫明旭, 陈君. 矮牵牛 *PMADS9* 基因启动子的克隆及分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(2): 275-280
- [22] 马婧,刘群,王晓斌,等.2个腊梅 nsLTP 基因启动子的克隆及 其在烟草中的瞬时表达分析[J]. 植物遗传资源学报,2012, 13(4):601-608
- [23] 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
- [24] 管磊. 龙眼 *LEAFY* 基因克隆与功能研究[D]. 福州:福建农林 大学,2008
- [25] 马月萍. 甘菊 *LEFAY* 同源基因的克隆与表达分析[D]. 北京: 北京林业大学,2005
- [26] 张敏. 芥菜生殖发育转变的生化机理及 LFY 基因的克隆与分析[D]. 重庆:西南大学,2009
- 27] 何富强. 核桃 LFY 同源基因的克隆和表达[D]. 保定:河北农业大学,2011