

月季生长素结合蛋白基因*RcABP19*的克隆及表达特征分析

任浩然¹, 傅晓东¹, 支秋娟², 李卉², 吴思琳¹, 刘金义¹, 王长泉^{1,*}

¹南京农业大学园艺学院, 南京210095

²常州市红梅公园管理处, 江苏常州213003

摘要: 本研究以月季品种‘月月粉’和‘绿萼’为试验材料, 对生长素结合蛋白基因*RcABP19*进行克隆和表达分析, 并通过转化拟南芥和在月季中进行病毒诱导基因沉默(VIGS)等途径, 对其在花器官发育中的作用进行了研究。结果表明: *RcABP19*属于Cupin超家族成员。喷施外源IAA、IBA和6-BA后, *RcABP19*的表达量显著升高, 表明*RcABP19*受到其诱导。此外, *RcABP19*的表达响应昼夜节律, *RcABP19*在白天随着光照时间的增加而积累, 在傍晚时达到峰值, 之后显著降低。 *RcABP19*基因在2个月季品种的花器官发育中的表达趋势存在显著差异, 且均在花器官中高表达。过表达*RcABP19*拟南芥和在月季中进行*RcABP19*病毒诱导基因沉默(VIGS)均未观察到明显的花器官表型变化, 但其相应的花器官发育相关基因(*AP1*、*AP3*和*PI*基因)的表达变化显著。本研究初步证明, 月季*RcABP19*基因的表达响应植物生长调节物质信号及光周期节律, 且可能参与花器官发育调控。

关键词: 月季; *RcABP19*; 克隆; 花器官发育; 激素; 表达分析

植物花的发育是一个非常复杂的过程, 受到多种因素的调控, 除了光照、温度等环境因素外, 植物激素及其相关基因的表达变化对花发育具有至关重要的调控作用, 其中, 生长素对花发育尤为重要(Li等2010; Arrom和Munne-Bosch 2012; da Silva等2014)。研究表明, 生长素在花序、花分生组织以及花器官的发育中起着关键的调控作用(Barazesh和McSteen 2008; Pagnussat等2009; Sundberg和Ostergaard 2009)。在激素调节植物生长发育过程中, 生长素受体是信号转导途径中极其重要的环节, 激素发挥其调控作用必须首先与受体蛋白相结合。因此, 对受体蛋白和激素调节机制的研究就显得十分重要(刘进平2007)。

ABP19 (auxin binding protein 19)最初是从桃(*Prunus persica*)的茎尖上分离得到的一种与生长素特异性结合的蛋白。通过对*ABP19*的氨基酸序列分析发现, 其与小麦萌发素蛋白(germin, GER)和植物类萌发素蛋白(germin-like proteins, GLPs)为同一亚家族基因(Ohmiya 2002)。研究表明, *ABP19*基因在桃树的幼嫩叶片中表达最为活跃, 且其表达在光照/黑暗周期中波动变化, 表明该基因一定程度上响应光周期节律, 这与其在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的同源基因*GER3*的功能相一致。此外, 与*ABP19*同源性较高的*ABP20*分别在桃的营养生长阶段和花芽形成或成花转变中都具有一定的作

用(Ohmiya 2002)。然而, 其是否调控花器官的进一步发育尚未见报道。

月季(*Rosa chinensis*)为我国传统名花及世界“四大切花”之一, 具有极高的观赏和经济价值。然而, 月季的花发育极易受到如光照、温度等环境因素的影响(Chmelnitsky等2002; 李箐博和许桂花2010)。范天刚等(2014)和田亚然等(2016)发现低温会导致月季花过度重瓣化或畸形。生产上也经常出现由于夏天高温而导致部分品种雌蕊叶片化(phyllody)的现象。Chmelnitsky等(2002)通过喷施外源生长素和细胞分裂素同样能够导致月季花器官出现类似的表型(即雌、雄蕊叶片化或花瓣畸形)。月季‘绿萼’为中国古老月季花器官突变的典型。除萼片之外, ‘绿萼’的其他各轮花器官均突变为叶/萼状结构, 不能进行有性繁殖, 在我国至今已有至少200年的栽培历史(Yan等2016)。Yan等(2016)通过分析‘绿萼’及其近源品种‘月月粉’花器官发育的转录组数据, 发现激素合成途径及相关基因在月季“花变叶”中具有重要的作用。其中, *RcABP19*基因在‘月月粉’和‘绿萼’花器官发育过程

收稿 2019-01-03 修定 2019-07-04

资助 江苏省重点研发项目(BE2016377)、常州市科技支撑计划(农业)(20170396)、江苏省青年基金项目(BK20180543)和中国博士后科学基金(2016M600425)。

* 通讯作者(cqwang@njau.edu.cn)。

中的表达存在显著差异,是研究花器官发育的重要候选基因。基于此,本研究对月季*RcABP19*基因的全长进行了克隆和序列分析,并通过实时荧光定量PCR (qRT-PCR)技术,分析了其在响应激素信号、光周期节律及花器官发育中的表达特征。此外,通过在拟南芥中过表达及在月季中进行VIGS (virus-induced gene silencing)基因沉默,初步分析了该基因在花器官发育中的作用。研究结果可以为深入理解*ABP19*基因的功能,以及利用该基因进行月季等观赏植物开花性状的改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验以中国古老月季(*Rosa chinensis* Jacq.) ‘月月粉’ (‘Old Blush’)和‘绿萼’ (‘Viridiflora’) 2个品种的扦插苗为材料,由江苏省林业科学院提供。其中,一部分材料是栽培在室外的成熟开花株,待其枝条上萌发的花芽时,用消毒剪刀将花芽剪下,迅速带回实验室;另外一部分是养护在植物培养室内的月季盆栽小苗,取其幼嫩的叶片作为试验材料。拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]为Columbia (Col)生态型,由本实验室保存。

1.2 月季取样和植物生长调节物质处理

对室外月季‘绿萼’和‘月月粉’大苗进行观察,当发现枝条上萌发出肉眼可见的花芽时,进行采样,将花芽迅速带回实验室内,用眼科镊将花芽的外层轻轻去除,再用消毒过的手术刀片对花芽进行纵向解剖,在体式显微镜(徕卡Leica M165FC, 韦茨拉尔,德国)下进行观察和拍照,确定花芽分化时期后对花芽进行液氮速冻,用于基因克隆和基因表达分析。其中,花芽分化时期分为花芽DBO时期(营养生长阶段的花芽)、时期1 (stage 1, 萼片原基分化时期)、时期2 (stage 2, 花瓣原基分化时期)、时期3 (stage 3, 雄蕊原基分化时期)、时期4 (stage 4, 雌蕊原基分化时期)和时期5 (stage 5, 花芽分化完成时期) (Liu等2018)。另外,选取花朵未开放时期(或闭花时期, BFL) (Dubois等2012)对不同花器官进行取样,用于不同花器官的基因表达分析。

将室内正常养护的‘月月粉’植株分为4组,一

组作为对照组,喷施50 mL的0.05% Tween-20;其他三组为处理组,连续3 d同一时间分别喷施添加了0.05% Tween-20的浓度为50 mg·L⁻¹ 吲哚-3-乙酸(IAA)、吲哚丁酸(IBA)和6-苄氨基嘌呤(6-BA)溶液各50 mL。处理3 d后,从早上7点到次日7点,每隔4 h取样。每次剪取2片中等大小的叶片投入液氮中速冻,用于基因表达分析。

1.3 总RNA提取、cDNA合成、基因克隆及荧光定量PCR检测

总RNA提取前要对所有需要用到的枪头、离心管、研钵和研磨棒等进行去蛋白酶K处理并高温灭菌,采用植物总RNA提取试剂盒(上海浦迪生物科技有限公司,产品编号: AF503),按照试剂盒操作说明进行总RNA提取。cDNA合成采用TRANSGEN公司的One-Step反转录试剂盒,步骤按照试剂盒操作说明进行。cDNA合成后,将其稀释10倍作为模板,然后,利用FastPfu Fly高保真酶(TRANSGEN公司)进行基因克隆。利用SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II试剂盒(TaKaRa, Cat No. DRR820A)进行荧光定量PCR分析,反应体系为20 μL。基因的相对表达水平通过2^{-ΔΔCT}方法计算,并设置3次生物学重复和3次技术重复。

1.4 过表达载体构建及过表达*RcABP19*拟南芥的相关检测

以‘月月粉’和‘绿萼’的花芽cDNA为模板,利用*RcABP19*的全长引物,即*RcABP19*-F (前面加CACC)和*RcABP19*-R (表1),进行PCR扩增。然后连接到Gateway兼容载体pENTR[™]/D-TOPO (Invitrogen, Cat No. K2400-20),并进行测序验证。之后,通过LR重组反应,将*RcABP19*转移到过表达载体pFast-R05 (<https://gateway.psb.ugent.be/search/index/overexpression/any>)上。最后,将构建好的质粒转化农杆菌菌株GV3101,用其对拟南芥进行侵染。

拟南芥转基因采用蘸花法进行,并通过体式荧光显微镜RFP通道下对收获的拟南芥种子进行筛选及DNA和RNA水平检测,获得T₂代纯合体转基因株系种子。以拟南芥野生型(WT)为对照,对其花器官发育过程及表型进行观察及对花器官发育相关基因的表达量进行检测。

表1 本研究中用到的引物序列

Table 1 The sequences of primers used in this research

引物名称	序列(5'→3')	引物名称	序列(5'→3')
<i>RcGAPDH</i> -qRT-F	GCTGGCAGGTATCCTTTCTG	<i>RcAPI.1</i> -F	AATTGGGAGCAGCAGCAACA
<i>RcGAPDH</i> -qRT-R	GGCGACAATATCAGCCAAGT	<i>RcAPI.1</i> -R	CGAGCTGGTTCCTCCTCACT
<i>RcABP19</i> -F	CACCATGATTTTCCCTATATTTTTCAC	<i>RcAPI.2</i> -F	CAGCACGGACACTGCAAGA
<i>RcABP19</i> -R	ATTAGTACCACCTAGAACA	<i>RcAPI.2</i> -R	GCGGCATTAAGACGAGGGTT
<i>RcABP19</i> -VIGS-F	ATTTGCTGCTCAATTTCTGGTG	<i>RcFUL1</i> -F	ATGCTGAATCGGTAGCGTA
<i>RcABP19</i> -VIGS-R	ATTAGTACCACCTAGAACACCCCT	<i>RcFUL1</i> -R	CGAAGCGAAGGACAGGATTG
pTRV2-F	TACGGACGAGTGGACTTAGATTCT	<i>RcFUL2</i> -F	GGGCTACCTAGCAGTGCTGT
pTRV2-R	CGATCTCAAACAGTCTATACACAG	<i>RcFUL2</i> -R	TGTGTGTGTGTGCCAGTGC
<i>RcABP19</i> -qRT-F	TCACATTTGTTCTCCTCCTT	<i>RcAP3.2</i> -F	TTCGTTAATCGCAAGCTGAAG
<i>RcABP19</i> -qRT-R	TCATCTACGGTAACTTTTGC	<i>RcAP3.2</i> -R	TGCGGTTCTCCATTGCATC
<i>AtAPI</i> -F	CTTTACGCCGAAAGACAGC	<i>RcAP3.4</i> -F	ACCCTAATAACCACGGCAACC
<i>AtAPI</i> -R	ATTGCTTGCAAGTCTTCCCC	<i>RcAP3.4</i> -R	TCTGAACTTCTTCTCCGTGGT
<i>AtAP2</i> -F	GGATCTAAACGACGCACCAC	<i>RcPI3</i> -F	TCAACTACTATCTGAGCGCGA
<i>AtAP2</i> -R	TGATGGGTGACAAGTGGGTT	<i>RcPI3</i> -R	AATGCTAGTGATGGTGCCCT
<i>AtAP3</i> -F	GCCCTAACACCACAACGAAG	<i>RcPI5</i> -F	GAAAACCTCAAGCAACAGGCAG
<i>AtAP3</i> -R	GCTTGATCTGAGTCCGGAGA	<i>RcPI5</i> -R	GCATCCCAACCTCTTTCCAG
<i>AtPI</i> -F	CAACGGCAACTCACTTTCCA	<i>RcAG2</i> -F	GATGCCCAAAAAGAAGTTGGGAAG
<i>AtPI</i> -R	ATTTGGCTGAATCGGTTGCA	<i>RcAG2</i> -R	ATCTGCACATGCCTTCTTGTATCG
<i>AtAG</i> -F	ATCGTCTTCTAGCCGTGG	<i>RcAG3</i> -F	GGGTTATGGATGAGGGTTTG
<i>AtAG</i> -R	TGTTGACGCAATTTGGCTGA	<i>RcAG3</i> -R	CTGCATGTAATCAATTTCCGGC
<i>AtWUS</i> -F	TCACCAACAGCCGATCAGAT	<i>RcSEP1.1</i> -F	AGTCACATTCTGAAGCGTC
<i>AtWUS</i> -R	CCGCCATCATAACCGAGTTG	<i>RcSEP1.1</i> -R	GCATATTCATAGAGGCGCCC
<i>AtSPL</i> -F	GAGAAACACCCGTCTTGTGC	<i>RcSEP2.1</i> -F	TTGAGCAGCTTGAGCGTCAG
<i>AtSPL</i> -R	ACACCCATTCTCTCAACGT	<i>RcSEP2.1</i> -R	GACCCTGGGTTTGAGCATGT
<i>AtBPE</i> -F	CGTATGAGTCACGCGTTGTC	<i>RcSEP2.2</i> -F	AGCTTTGGTGTGTTGGGTAGG
<i>AtBPE</i> -R	CCGTCTCTGTTCTAGCGAT	<i>RcSEP2.2</i> -R	ATAGAGCTTGCCACGGTTAG
<i>AtMERI</i> -5-F	CGGCTGCTGATTCAACACT	<i>RcSOC1.1</i> -F	GCAAGGAAGGCACAGGTTTA
<i>AtMERI</i> -5-R	ACCGGAACCAGAGGATTGTG	<i>RcSOC1.1</i> -R	CTTACTGGTTGCCTCGGTTG

1.5 VIGS基因沉默

VIGS实验流程: 选取*RcABP19*目标片段(349 bp, 跨保守区)进行PCR扩增, 将扩增的片段连接到pEASY-Blunt载体(北京全式金生物公司), 然后借助载体上的*Bam*HI和*Kpn*I限制性内切酶位点进行酶切, 将目标片段再连接至VIGS载体的pTRV2上。然后, 分别将VIGS系统的另一载体pTRV1和含有目的基因片段的pTRV2载体利用热击法分别转入农杆菌菌株GV3101, 并于LB培养基(含有10 mmol·L⁻¹ MES+20 mmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮+50 mg·L⁻¹ 庆大霉素+50 mg·L⁻¹ 卡那霉素)震荡培养约24 h (28°C)。之后, 离心收集菌液并分别于渗透缓冲液(10 mmol·L⁻¹ MgCl₂+200 mmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮+10 mmol·L⁻¹ MES, pH 5.6)进行悬浮。最后, 将悬浮之后

的pTRV1和pTRV2菌液(1:1)混合, 在黑暗的室温中静置4 h以备侵染。侵染时, 利用上述悬浮液将菌液浓度调为OD₆₀₀=1.0并加入0.01% Silwet L-7表面活性剂, 然后将月季枝条剪为含有2~3腋芽的小段(下端为斜口), 并倒置将腋芽浸入菌液中(下切口端露出), 之后, 利用真空泵(AP-01P真空泵, 天津市奥特赛恩仪器有限公司)于-25 kPa抽真空, 每次1 min, 共抽2次。最后, 利用灭菌蒸馏水冲洗1遍并包裹于湿滤纸中暗培养3~5 d后, 进行扦插(扦插基质为蛭石:珍珠岩=5:1)。月季VIGS侵染参照文献方法(Tian等2014)。

1.6 数据统计与分析

数据差异显著性分析采用软件SPSS v20.0进行。图3采用Tukey的HSD (honest significant difference)测试法; 图4和5中采用*T*检验法。

2 实验结果

2.1 *RcABP19*基因的克隆及序列分析

以中国古老月季品种‘绿萼’和‘月月粉’的花芽cDNA为模板,分别成功克隆到了*ABP19*基因,其扩增条带特异(图1-A),测序结果显示,其开放阅读框(ORF)全长为630 bp碱基,编码209个氨基酸,并命名为*RcABP19*。通过SMART蛋白结构域网站在线比对分析,发现*RcABP19*含有一个典型的Cupin-1结构域(147个氨基酸),E-value为 $1.47e-35$,并含有一个18氨基酸的信号肽,说明该基因属于Cupin超家族成员(图1-B)。通过在线软件Protparam tool预测,表明该基因编码蛋白质相对分子质量为 21.787×10^3 ,理论等电点为6.24,不稳定指数为24.21,属于稳定蛋白。此外,利用SWISS-MODEL进行建模,预测了其三维空间结构,可以看出*RcABP19*蛋白具有典型的小桶状折叠结构(barrel structure)(图1-C),其为Cupin超家族蛋白的典型特征。值得注

意的是,从‘月月粉’和‘绿萼’中克隆的*RcABP19*基因的编码序列完全相同,编码的多肽链也完全相同。由此推测,导致该基因表达差异的原因可能为该基因的上游调控因素。

2.2 月季*RcABP19*基因对植物生长调节物质信号的响应及昼夜节律

为了进一步明确*RcABP19*基因对植物生长调节物质处理的响应情况,本研究对IAA、IBA和6-BA处理后的植株进行*RcABP19*表达量分析。结果(图2)显示,在不同处理及不同时间点下,*RcABP19*表达量较对照均显著增高,且6-BA和IBA处理的高于IAA处理。由此说明,*RcABP19*能够接收植物生长调节物质信号,并对此作出响应。

图2显示,*RcABP19*的表达在一天的光周期中存在比较明显的差异性,具有一定的规律性。早上7点时表达量最低,随着光照时间的延长,表达量逐渐增高,黑夜初期的表达量达到最高,随着黑

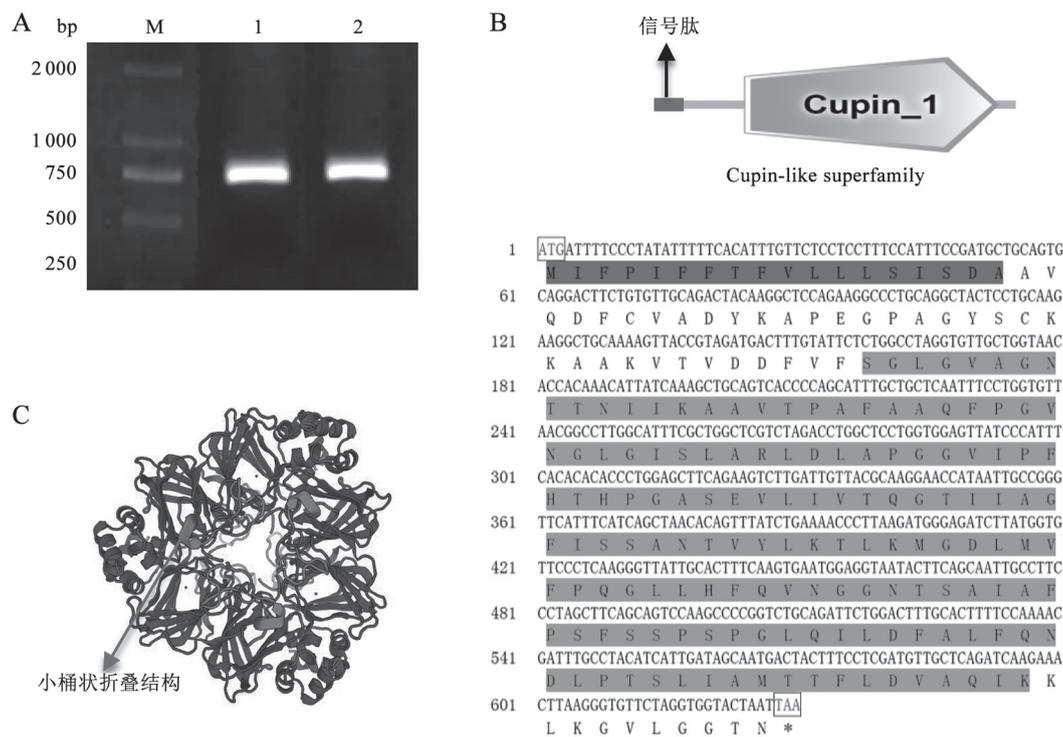


图1 月季*RcABP19*基因的克隆及序列分析

Fig.1 Cloning and sequence analysis of *RcABP19* gene

A: *RcABP19*基因其特异性扩增条带; M: Marker 2000; 1: ‘绿萼’; 2: ‘月月粉’。B: *RcABP19*基因属于Cupin超家族成员。C: *RcABP19*蛋白具有典型的小桶状折叠结构,其为Cupin超家族蛋白的典型特征。

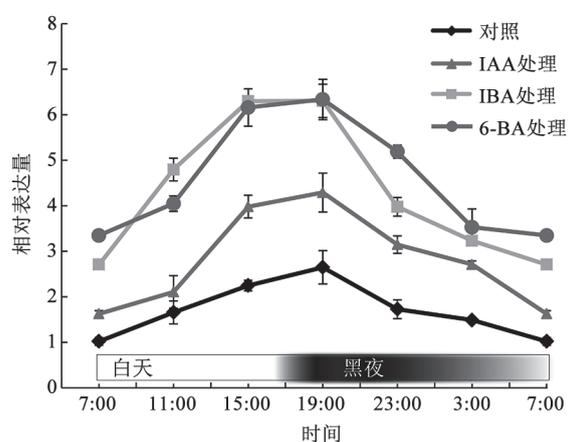


图2 月季*RcABP19*响应植物生长调节物质处理及昼夜节律变化的表达模式

Fig.2 The expression profiles of *RcABP19* in response to plant growth regulators treatments and circadian rhythm

暗时间的延长, *RcABP19*的表达量逐渐下降。由此说明, 月季*RcABP19*响应光周期节律。

2.3 月季*RcABP19*基因在花器官发育中的表达分析

为了明确月季*RcABP19*基因在花器官发育中的作用, 本研究进一步检测了该基因在月季花原基形成和发育的不同时期及不同轮花器官中的表达水平。结果如图3-A所示, 月季*RcABP19*在‘月月粉’花芽分化各个时期中的表达量有明显的变化, 随着花器官发育的进程逐渐增高。在花芽分化完成时期(时期5), *RcABP19*的表达量最高, 约是叶片中表达量的3倍。而在‘绿萼’花芽分化过程中, 随着花芽分化进程, *RcABP19*呈现先升高再降低再升高的趋势, 在萼片原基分化时期(时期1)和雄蕊原基分化时期(时期3), *RcABP19*的表达量最高, 约是叶片中表达量的6倍(图3-B)。随后, 其表达量在花芽分化完成时期降至与叶片相同的水平。从总体水平来看, *RcABP19*在‘绿萼’花芽分化时期中的表达量大多高于‘月月粉’, 且两者表达趋势明显不同。

对‘绿萼’和‘月月粉’不同花器官部位中*RcABP19*

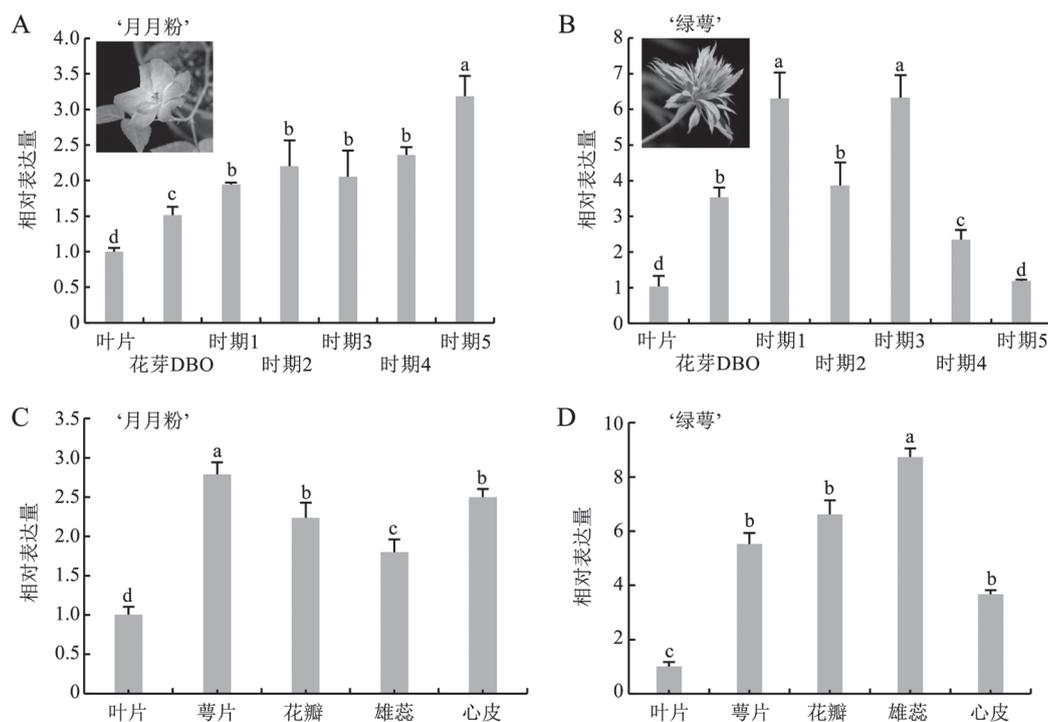


图3 *RcABP19*在不同花芽发育时期及不同花器官部位的表达模式

Fig.3 The expression pattern of *RcABP19* in different flower bud developmental stages and different floral organs

A和B: *RcABP19*在‘月月粉’和‘绿萼’花芽分化各个时期中的相对表达量; C和D: *RcABP19*基因在‘月月粉’和‘绿萼’不同花器官部位中的相对表达量。不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

基因的表达量进行分析表明, *RcABP19*在月季花器官中的表达均显著高于叶片(图3-C和D)。在‘月月粉’各个花器官部位中, *RcABP19*在萼片中表达量最高, 在雄蕊中的表达量最低(图3-C)。 *RcABP19*在‘绿萼’雄蕊中的表达量最高, 约为叶片的8倍; 在心皮中的表达量最低, 与雄蕊的相差近3倍(图3-D)。结合两个品种的数据分析, *RcABP19*在‘绿萼’花器官中的表达水平显著高于‘月月粉’的花器官, 且其不同花器官(特别是花瓣、雄蕊和雌蕊)中的表达趋势发生了明显的分化。

2.4 月季*RcABP19*基因在拟南芥中过表达分析

为明确*RcABP19*基因对花发育的影响, 本研究对过表达*RcABP19*拟南芥种子进行筛选(图4-A)及DNA和RNA水平检测(图4-B), 获得了3株T₂代纯合体转基因株系种子。

对其花器官发育过程和表型进行观察及对花器官发育相关基因的表达量进行检测。结果表明, 转基因拟南芥的开花时间和株型均未发生改变, 花器官也无明显的差异(图4-C)。然而, 花发育ABC模型相关基因(*APETALA1/AP1*、*APETALA2/AP2*、*APETALA3/AP3*、*PISTILLATA/PI*和*AGAMOUS/AG*)及其他花发育相关基因(*WUSCHEL/WUS*、*SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE/SPL*、*BPEP/BPE*和*MERISTEM 5/MERI-5*)的表达却出现了不同程度的变化。如图4-D所示, A类基因*AP1*、*AP2*和C类基因*AG*在过表达*RcABP19*拟南芥花序中的表达较野生型略有下降, 但无显著差异, 而B类基因*AP3*则显著下降。与野生型相比, 过表达*RcABP19*拟南芥中B类基因*PI*的表达量极显著上升, 约为野生型的2.37倍。*WUS*、*SPL*和*BPE*

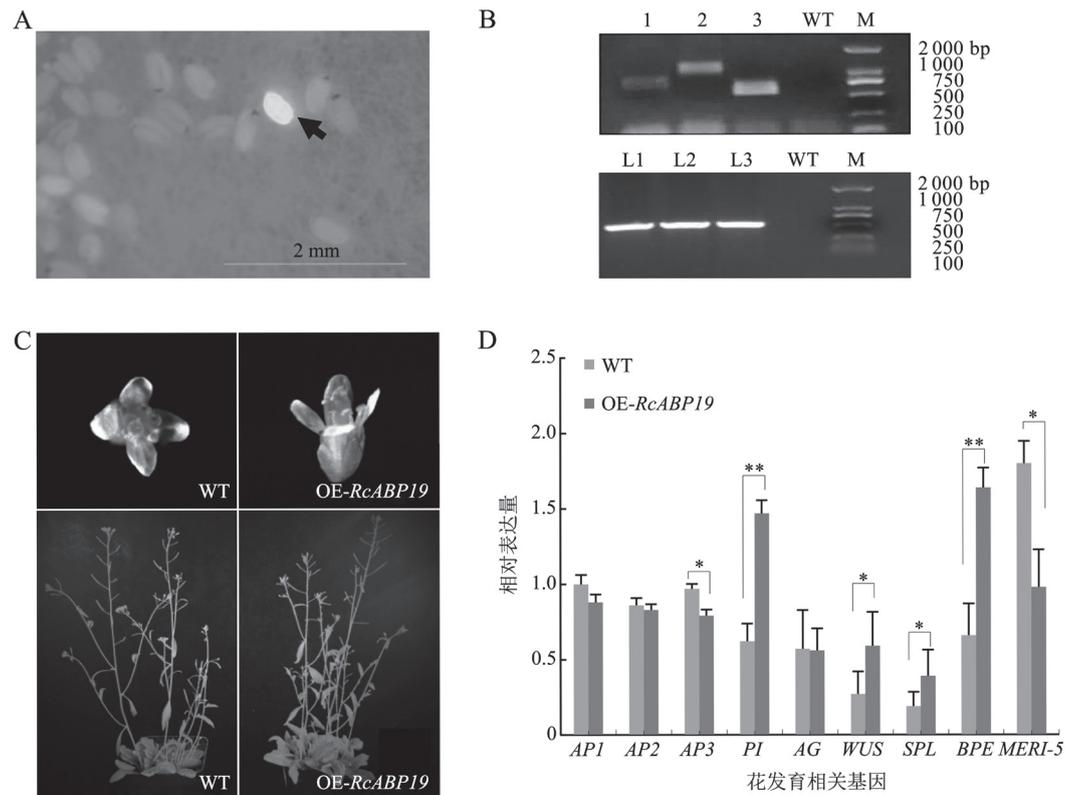


图4 *RcABP19*在拟南芥中的功能验证

Fig. 4 Functional characterization of *RcABP19* in *Arabidopsis*

A: 体式荧光显微镜RFP通道下转基因拟南芥种子筛选, 箭头所指区域为转基因种子。B: DNA (上)和RNA (下)水平检测。M: DL2000 marker; 1和2: 交叉引物; 3: 基因引物; L1~L3: 转基因株系; C: 转基因拟南芥表型。D: 花发育相关基因的qRT-PCR表达分析。WT: 野生型; OE-*RcABP19*: 过表达转基因植株。*表示与野生型差异显著($P < 0.05$)水平, **表示与野生型差异极显著($P < 0.01$), 下图同此。

也显著升高, 分别为野生型的2.18倍、2.0倍和2.48倍。而*MERI-5*则显著下降, 为野生型的0.54倍。这些结果表明, 虽然在拟南芥中过表达月季*RcABP19*基因并不能引起花器官的明显变化, 但其仍然能够影响花器官发育基因的表达。

2.5 月季*RcABP19*基因的VIGS载体构建及转化分析

为了进一步获得反向遗传学证据, 本研究利用VIGS技术, 选取该基因保守区(图5-A), 构建pTRV2沉默载体(转移载体为pTRV1), 并通过农杆菌GV3101介导侵染‘月月粉’。通过PCR扩增对pTRV2载体进行检测, 确定为阳性转化株系, 最终,

成功获得了3个阳性株系(图5-B), 其*RcABP19*的表达水平显著低于对照(图5-C)。然而, 在其开花后, 并未观察到转化株系在株型、花器官特征及开花时间与野生型相比存在明显差异(图5-D)。

对花发育相关基因进行qRT-PCR分析结果(图5-E)表明, 在干扰*RcABP19*基因的表达后, *RcAPI.1*、*RcAPI.2*、*RcFUL1*、*RcFUL2*、*RcAP3.2*、*RcAP3.4*、*RcAG2*、*RcAG3*、*RcSEPI.1*、*RcSEP2.1*及*RcSEP2.2*等花发育基因以及开花调控基因*RcSOC1.1*的表达量均升高。而*RcPI3*和*RcPI5*的表达量则有所下降, 这与拟南芥过表达株系的趋势相反,

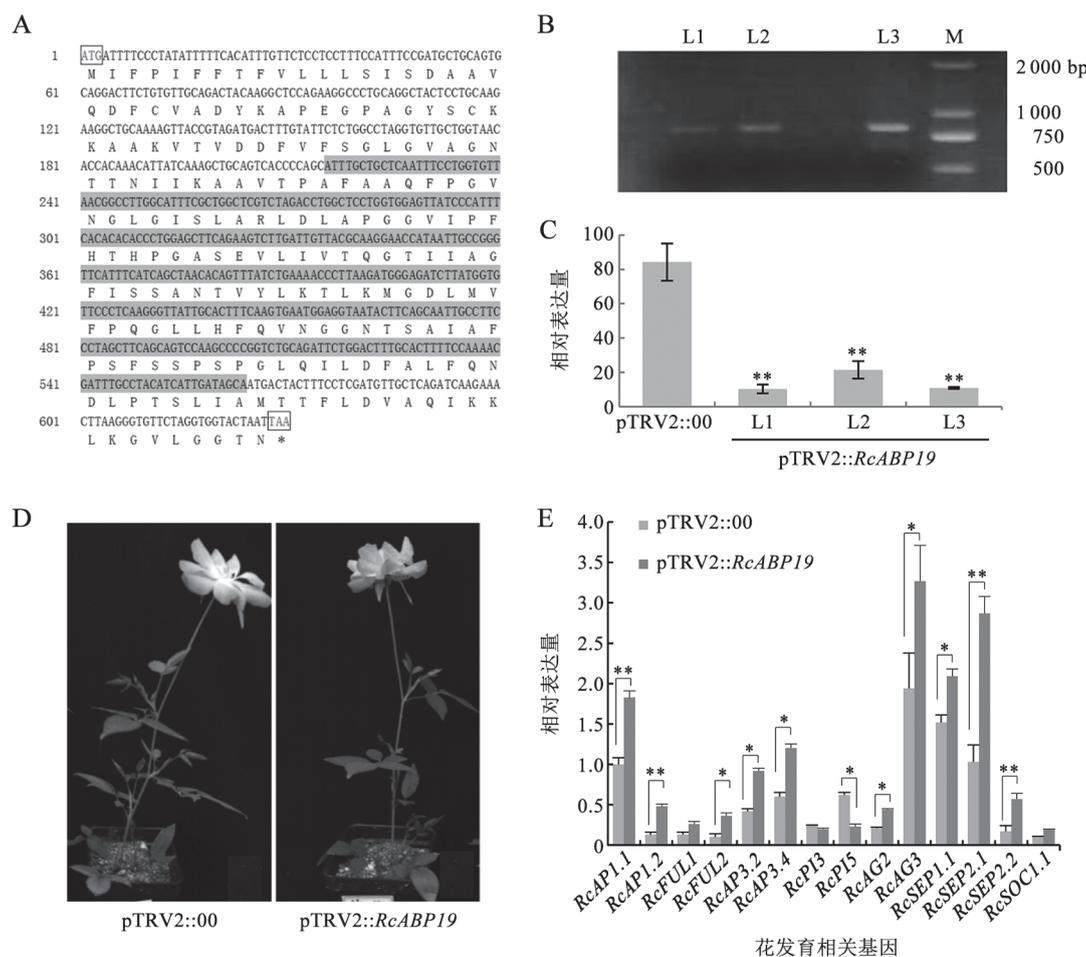


图5 *RcABP19*在月季中的VIGS功能验证

Fig.5 Functional characterization of *RcABP19* by using VIGS

A: VIGS目标区域(灰色); B: pTRV2的DNA水平检测, M为DL2000 marker, L1~L3为VIGS转化阳性株系; C: VIGS沉默株系及对照中*RcABP19*的表达量检测; D: 阳性植株的表型; E: 花发育相关基因的qRT-PCR表达差异分析, pTRV2::00为对照(空载体), pTRV2::RcABP19为VIGS沉默株系。

其结果符合基因调控的预期。因此推测, *RcABP19* 的表达变化会引起其他花器官发育相关基因的表达量变化。

3 讨论

花是被子植物短期快速进化的关键因素, 也因此被达尔文称之为“讨厌之谜(abominable mystery)”。有关花发育的分子机制也一直是植物科学家研究的热点问题。自20世纪90年代初, 科学家提出了著名的花发育“ABC模型”(Coen和Meyerowitz 1991), 花发育“ABC模型”(后来被补充为“ABCDE模型”或“四因子模型”)已经引领了花器官发育研究近30年(Goslin等2017)。其中, 最核心的内容是花器官决定基因的同源异型表达及其表达的边界性(boundary), 但这种同源异型表达及边界性的调控机制至今仍不清楚(Goslin等2017)。研究认为, 在花器官的形成和发育过程中, 激素途径扮演着至关重要的角色(Yamaguchi等2013; Denay等2017), 但其分子调控机理很少见报道。

月季是我国传统名花, 其四季开花的特点为花器官发育的研究提供了绝佳的条件。而在月季中, 一直存在一类奇特的花朵形态——“花变叶”现象(Chmelnitsky等1992; 李菁博和许桂花2010)。Chmelnitsky等(2002)通过月季喷施外源生长素和细胞分裂素, 同样出现类似的表型。但其分子机制至今尚为未知。‘绿萼’为中国古老月季, 是“花变叶”现象的稳定突变体。Yan等(2016)通过转录组测序, 比较了‘绿萼’及其近源品种‘月月粉’在花器官中的转录组水平的差异, 并将‘绿萼’花器官突变的机制归因为花器官“ABCE模型”基因的缺失表达。然而, 通过对Yan等(2016)转录组数据的进一步分析, 我们发现激素途径同样也存在显著的差异, 在GO (gene ontology, 基因本体)中显著富集, 说明激素途径在‘绿萼’花器官“花变叶”的突变中具有重要的作用。其中, 生长素结合蛋白基因*RcABP19*的表达最为显著。本研究以*RcABP19*为研究对象对其功能进行进一步验证, 结果表明, *RcABP19*在‘月月粉’和‘绿萼’中的序列完全一致, 由此说明, 该基因只是激素途径上影响花器官发育的保守基因, 而并非导致‘绿萼’花器官突变的关

键节点。至于导致该基因在两个品种中的差异, 可能是由该基因的上游调控因素所致。为了进一步探讨*RcABP19*是否在激素途径上或者受哪种激素诱导, 本研究使用了3种常规的植物生长调节物质对‘月月粉’扦插苗进行处理。结果表明, 月季*RcABP19*显著响应激素诱导, 特别是细胞分裂素(6-BA)和生长素(IBA)的处理中, *RcABP19*较对照显著上调表达(图2)。由此说明, *RcABP19*为激素途径上的重要基因, 且可能参与调控月季的“花变叶”现象。此外, 由于外源生长素(IBA)和细胞分裂素(6-BA)处理均能够导致生长素结合基因*RcABP19*表达量升高, 由此推测, *RcABP19*有可能还是生长素和细胞分裂素调控的一个交叉点。另外, 在一天24h取样的检测中, 我们还发现了*RcABP19*响应光周期节律(图2), 这与前人的研究一致(Ohmiya 2002)。

为了进一步验证*RcABP19*是否对月季花器官发育的影响, 本研究将*RcABP19*在拟南芥中过表达和在月季‘月月粉’中进行VIGS干扰, 以获得相关的遗传学证据。结果(图4和5)表明, 过表达*RcABP19*基因的拟南芥转基因株系及VIGS干扰的月季转化株系均未观察到明显的花器官突变表型, 表明该基因并非调控植物花器官发育的主效基因。而通过对花器官发育相关基因进行表达分析, 发现部分基因的表达水平受到了*RcABP19*基因的显著影响, 尤其是*API1*、*AP3*和*PI*基因在拟南芥过表达*RcABP19*株系及月季VIGS干扰*RcABP19*株系中的表达趋势相反, 符合基因调控的预期。表明*RcABP19*参与花器官发育过程。

本研究初步明确了月季*RcABP19*基因响应植物生长调节物质信号及光周期节律, 且可能参与花器官发育过程。但其具体的分子机理仍需进一步研究和探讨。

参考文献(References)

- Arrom L, Munne-Bosch S (2012). Hormonal changes during flower development in floral tissues of *Lilium*. *Planta*, 236 (2): 343–354
- Barazesh S, McSteen P (2008). Hormonal control of grass inflorescence development. *Trends Plant Sci*, 13 (12): 656–662
- Chmelnitsky I, Azizbekova N, Khayat E, et al (2002). Mor-

- phological development of normal and phyllody expressing *Rosa hybrida* cv. Motrea flowers. *Plant Growth Regul*, 37 (3): 215–221
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 353: 31–37
- Denay G, Chahtane H, Tichtinsky G, et al (2017). A flower is born: an update on *Arabidopsis* floral meristem formation. *Curr Opin Plant Biol*, 35: 15–22
- Dubois A, Carrere S, Raymond O, et al (2012). Transcriptome database resource and gene expression atlas for the rose. *BMC Genomics*, 13 (638): 1–11
- da Silva JAT, Aceto S, Liu W, et al (2014). Genetic control of flower development, color and senescence of *Dendrobium* orchids. *Sci Hortic*, 175: 74–86
- Fan TG, Zhang G, Tian YR, et al (2014). Morphological observation of excessive petal *Rosa hybrida* induced by low temperature. *J Northeast Normal Univ*, 42 (9): 116–121 (in Chinese with English abstract) [范天刚, 张钢, 田亚然等 (2014). 低温诱导切花月季过度重瓣化的形态学观察. *东北林业大学学报*, 42 (9): 116–121]
- Goslin K, Zheng BB, Serrano-Mislata A, et al (2017). Transcription factor interplay between LEAFY and APETALA1/CAULIFLOWER during floral initiation. *Plant Physiol*, 174 (2): 1097–1109
- Li QB, Xu GH (2010). The trying of uncovering the mystery of the ‘phyllody’ phenotype in rose. *China Flower Penjing*, 6: 23 (in Chinese) [李菁博, 许桂花(2010). 试揭开月季“花变叶”之谜. *中国花卉盆景*, 6: 23]
- Li XG, Su YH, Zhao XY, et al (2010). Cytokinin overproduction-caused alteration of flower development is partially mediated by *CUC2* and *CUC3* in *Arabidopsis*. *Gene*, 450 (1–2): 109–120
- Liu JP (2007). Advances in research on auxin receptors and auxin signaling. *Biotechnol Bull*, (3): 22–30 (in Chinese with English abstract) [刘进平(2007). 生长素受体与信号转导机制研究进展. *生物技术通报*, (3): 22–30]
- Liu JY, Fu XD, Dong YW, et al (2018). MIKC^C-type MADS-box genes in *Rosa chinensis*: the remarkable expansion of ABCDE model genes and their roles in floral organogenesis. *Hortic Res*, 5 (25): 1–15
- Ohmiya A (2002). Characterization of ABP19/20, sequence homologues of germin-like protein in *Prunus persica* L. *Plant Sci*, 163 (4): 683–689
- Pagnussat GC, Alandete-Saez M, Bowman JL, et al (2009). Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science*, 324 (5935): 1684–1689
- Sundberg E, Ostergaard L (2009). Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1 (6): 1–14
- Tian J, Pei HX, Zhang S, et al (2014). TRV-GFP: a modified *Tobacco rattle virus* vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *J Exp Bot*, 65 (1): 311–322
- Tian YR, Fan TG, Zhang G, et al (2016). Expression and analysis of key genes of excessive double flowers in rose caused by low temperature. *Chin J Tropic Crops*, 37 (6): 1147–1154 (in Chinese with English abstract) [田亚然, 范天刚, 张钢等(2016). 低温引起月季花朵过度重瓣化关键基因的表达及分析. *热带作物学报*, 37 (6): 1147–1154]
- Yan HJ, Zhang H, Wang QG, et al (2016). The *Rosa chinensis* cv. Viridiflora phyllody phenotype is associated with misexpression of flower organ identity genes. *Front Plant Sci*, 7: 1–14
- Yamaguchi N, Wu MF, Winter CM, et al (2013). A molecular framework for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Dev Cell*, 24 (3): 271–282

Cloning and expression profile analysis of auxin binding protein gene *RcABP19* in *Rosa chinensis*

REN Hao-Ran¹, FU Xiao-Dong¹, ZHI Qiu-Juan², LI Hui², WU Si-Lin¹, LIU Jin-Yi¹,
WANG Chang-Quan^{1,*}

¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

²Management Office of Changzhou Hongmei Park, Changzhou, Jiansu 213003, China

Abstract: The Chinese old rose cultivars *Rosa chinensis* ‘Old Blush’ and ‘Viridiflora’ (known as green rose) were used in our study as plant materials, and then the cloning and gene expression analysis of *RcABP19* gene were performed and compared between these two cultivars. *Arabidopsis* transformation and VIGS gene silencing in rose were applied for further characterization of *RcABP19* functions in flower development. The results showed that *RcABP19* gene was one of the Cupin super family members, and which was significantly induced by IAA, IBA and 6-BA treatments. In addition, the expression of *RcABP19* also responded to circadian rhythm during a day, *RcABP19* accumulated in the daytime with the increase of illumination time, and reached the peak in the evening before getting dark, and then decreased significantly. The expression of *RcABP19* significantly varied in floral organ development of two cultivars, and all of them were highly expressed in floral organs. Furthermore, although there were no visible phenotypes differences observed in over-expressed transgenic *Arabidopsis* lines and VIGS gene silencing rose lines, the expression of flower development related genes, especially *API*, *AP3* and *PI*, changed significantly. Our results suggested that the expression of *RcABP19* gene responded to plant growth regulators and circadian rhythm in rose, and might be involved in the regulation of plant flower development.

Key words: *Rosa chinensis*; *RcABP19*; cloning; flower development; hormone; expression analysis

Received 2019-01-03 Accepted 2019-07-04

This work was supported by the Key Research and Development Project of Jiangsu Province (BE2016377), Science & Technology Pillar Program of Changzhou City (Agriculture) (20170396), Science Foundation for Youths of Jiangsu Province (BK20180543) and China Postdoctoral Science Foundation (2016M600425).

*Corresponding author (cqwang@njau.edu.cn).