

花生 *fw2.2* 基因的克隆及遗传转化

刘 强 王晶珊 乔利仙 赵春梅 隋炯明

(青岛农业大学生命科学院,青岛市主要农作物创新与应用重点实验室,山东 青岛 266109)

摘要: *fw2.2* 基因是影响番茄果重的一个重要数量性状基因,在心皮的细胞分裂中起负调控作用。本研究以番茄 *fw2.2* 基因的序列为探针,从花生 EST 数据库中筛选同源序列。根据花生的 EST 拼接序列设计引物对花生进行扩增,目标产物测序后,将推测的氨基酸序列与其他植物 *fw2.2* 基因编码的氨基酸序列进行比对,同源率为 34.78%~66.85%。半定量 RT-PCR 结果表明,该基因在野生种和栽培种中的表达存在差异。将 *fw2.2* 基因连接到植物表达载体,通过农杆菌介导法转化花生品种花育 23 号,获得了 12 个 PCR 阳性的独立转化子。

关键词:花生; *fw2.2* 基因; 克隆; 转化

CLONING AND GENETIC TRANSFORMATION OF *fw2.2* GENE IN PEANUT

LIU Qiang WANG Jing-shan QIAO Li-xian ZHAO Chun-mei SUI Jiong-ming

(Qingdao Key Lab of Germplasm Innovation and Application of Major Crops, College of Life Science,
Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

Abstract: *fw2.2* gene is an important quantitative trait locus (QTL) affecting fruit weight in tomato, and can reduce cell division in carpels as a negative regulator. In this experiment, *fw2.2* gene in tomato was prepared as probe to screen homologous sequence from peanut EST database. Then, according to the joint EST sequence, a pair of primer was designed to amplified the *fw2.2* gene of peanut. Compared with other plants, the similarity range of amino acid sequence was between 34.78% and 66.85%. Expression difference was detected between wild and cultivated materials by semi-quantitative RT-PCR. After transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, 12 independent transformants of peanut cultivar Huayu 23 were identified by PCR amplification.

Key words: peanut; *fw2.2* gene; cloning; transformation

分子生物学的快速发展和高密度遗传图谱的构建使数量性状基因的克隆成为可能。目前,在植物中已克隆了多个数量性状基因,它们有些编码转录因子,有些参与新陈代谢或信号转导。如在番茄中已克隆了 3 个数量性状基因,分别是控制果实形状的 *Ovate*、控制果实含糖量的 *Lin5* 和控制果实大小的 *fw2.2*^[1~3]。*fw2.2* 能抑制心皮的细胞分裂,是细胞分裂的负调控基因,在野生种中能使番茄果实变小,而在栽培种中的

等位基因能使果实增大,这个基因对番茄果重的影响占整个果重变异的 30%,是番茄果重进化中的一个关键性基因^[4~6]。

花生是主要的油料作物之一,但其产量相对较低,要提高花生的产量主要靠 2 个途径:一是提高单株结果数,二是提高果重。花生品种资源遗传基础狭窄,利用常规育种方法难以大幅度提高花生的产量。而且栽培花生是异源四倍体,基因组庞大、结构复杂,基因组

收稿日期:2011-01-19 接受日期:2011-04-24

基金项目:国家自然科学基金(30871544),山东省自然科学基金(ZR2011CQ026),山东省中青年科学家奖励基金(BS2009NY028),青岛农业大学博士启动基金(630716)

作者简介:刘 强(1987-),男,山东青岛人,在读硕士研究生,主要从事花生重要性状基因克隆。E-mail:qiangliu001@163.com

通讯作者:隋炯明(1978-),男,山东潍坊人,博士,讲师,主要从事花生分子育种。E-mail:suijiongming@163.com

尚未测序,利用图位克隆方法不能满足分离基因的需求。近年来,大量花生 EST 的测序,为通过同源克隆技术从花生中克隆基因提供了可能。本研究利用同源克隆法在花生及其野生种中克隆了 *fw2.2* 基因,并将野生种中克隆的 *fw2.2* 基因转入花生栽培种,为利用基因工程手段调控花生荚果大小及其产量奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试花生栽培种鲁花 11 号、鲁花 12 号、花育 23 号和野生种 *A. stenosperma* 均来自于青岛农业大学试验田。

pMD18-T 载体、*Taq* DNA 聚合酶、提取植物总 RNA 的 Trizol 试剂盒和反转录的 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 和 RNA 的提取 分别取花生叶片、花器和幼胚各 0.05g,液氮速冻并研磨成粉末状,分别用 CTAB 法和 Trizol 试剂盒提取 DNA 和 RNA。

1.2.2 *fw2.2* 基因的扩增 以番茄 *fw2.2* 基因的 cDNA 序列(GenBank 登录号:AF261774)为信息探针,运用 BLAST 程序搜索花生 EST 数据库,并对部分重叠的 EST 进行拼接。根据花生品种汕油 523 的拼接序列(GenBank 登录号:EG028717、ES758219 和 ES767373)设计下列引物:

P1:5'-GGATCCTATGTATCAAGCAGAAGAATC-3';

P2:5'-CTGCAGGATAAATGAAGTCAACGGGAC-3'

取花生总 RNA 1 μ g,采用 TaKaRa PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链,以 cDNA 第一链产物为模板进行 RT-PCR。反应体系 25 μ l 包含 10mmol/L Tris-HCl (pH8.3)、50mmol/L KCl、1.5mmol/L MgCl₂、1U 的 *Taq* 酶、4nmol/L dNTP、0.4 μ mol/L 引物、20ng 模板 cDNA 或 DNA。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 5min;95 $^{\circ}$ C 30s,61 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 50s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像仪观察结果。

1.2.3 序列测定及生物信息学分析 将获得的 PCR 产物回收纯化后,用 T₄ DNA 连接酶与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* 菌株 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 IPTG、X-gal 和氨苄青霉素的 LB 固体培养基上培养、筛选,挑取白色单菌落于含 100mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养,提取质粒,经 PCR 和双酶切鉴定为阳性后,送上海生物工程公司进行序列测定。利

用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 BLAST 软件对测序结果进行分析,氨基酸序列多重比对和进化树分析采用 Clustal W 和 DNAMAN 软件。

1.2.4 植物表达载体的构建 用 *Bam* H I 和 *Pst* I 双酶切测序正确的阳性质粒和表达载体 pCAMBIA23A,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,回收纯化目的基因片段和载体片段。用 T₄ DNA 连接酶连接 2 个片段,构成 pCAMBIA23A-*fw2.2* 重组质粒,转化 *E. coli* 菌株 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 IPTG、X-gal 和卡那霉素的 LB 固体培养基上培养、筛选,挑取白色单菌落于含 50mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中培养,对获得的重组质粒进行 PCR 和双酶切鉴定。然后将 pCAMBIA23A-*fw2.2* 重组质粒经冻融法转化农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞。

1.2.5 转化花生 挑取转入 pCAMBIA23A-*fw2.2* 质粒的农杆菌单菌落,转接于 30ml YEB(50mg/L 卡那霉素,50mg/L 利福平)液体培养基中,28 $^{\circ}$ C,200r/min 培养至 OD₆₀₀ \approx 0.5~0.8。以花育 23 号成熟种子的子叶为外植体进行遗传转化,利用 100~150mg/L 卡那霉素作为筛选压。

1.2.6 转基因植株的 PCR 鉴定 参考单世华等方法^[29]采用 CTAB 法分别提取花育 23 号野生型和转基因苗幼叶的 DNA,以其为模板,以 35S 启动子和 *fw2.2* 基因序列为上下游引物进行 PCR 反应。

1.2.7 半定量 RT-PCR 分析 以 cDNA 第一链产物为模板,以花生 *Actin* 为内标,扩增引物序列为:

P3:5'-CTGAGCGTGAAATTGTAAGGG-3';

P4:5'-TGCTAAAATAGAACCTCCAATCC-3'

Actin 基因 PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 5min;95 $^{\circ}$ C 30s,52 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 50s,28 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。*fw2.2* 基因扩增程序同 1.2.2,PCR 循环数 32 个。

2 结果与分析

2.1 DNA 和 RNA 的提取

提取花生幼胚的 DNA 和 RNA,电泳检测结果见图 1。由图 1 可知:所提 DNA 可以满足 PCR 扩增的需求;所提 RNA 经凝胶电泳后可见 28S、18S 和 5S 3 条清晰条带,完整性较好,可以用于下一步的反转录和 RT-PCR 扩增。

2.2 花生 *fw2.2* 基因的克隆

根据在汕油 523 中拼接好的序列,在两端设计 PCR 引物,分别以栽培种鲁花 11 号、鲁花 12 号和野生种 *A. stenosperma* 的花生幼胚总 DNA 和 cDNA 第一链

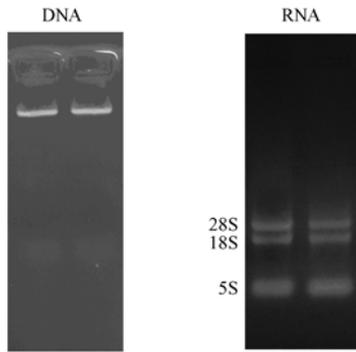
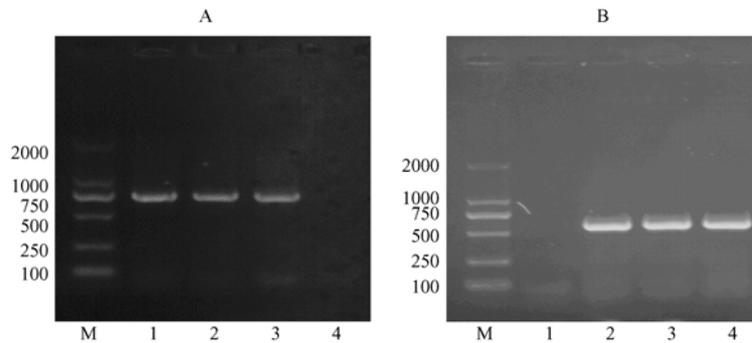


图 1 花生 DNA 和 RNA 的检测

Fig. 1 DNA and RNA test of peanut

图 2 花生 *fw2.2* 基因的 PCR 和 RT-PCR 扩增Fig. 2 PCR and RT-PCR amplification of *fw2.2* gene in peanut

A: PCR 扩增产物; B: RT-PCR 扩增产物; M: Marker DL2000; 1: 鲁花 11 号;

2: 鲁花 12 号; 3: *A. stenasperma*; 4: 对照

A: product of PCR; B: product of RT-PCR; M: Marker DL2000;

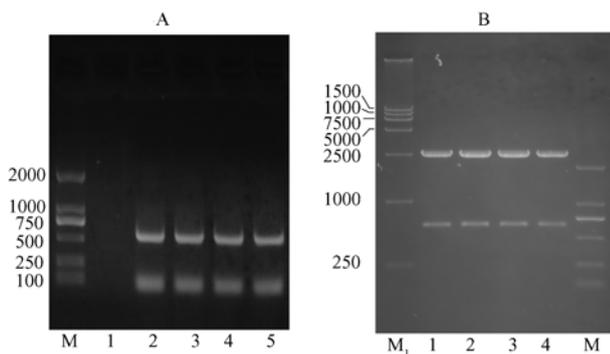
1: Luhua 11; 2: Luhua 12; 3: *A. stenasperma*; 4: control

图 3 重组质粒的鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmids

A: PCR 鉴定; M: Marker DL2000; 1: 对照; 2~5: 菌落; B: 酶切鉴定;

M: Marker DL2000; M₁: Marker DL15000; 1~4: 重组质粒

A: PCR identification; M: Marker DL2000; 1: control; 2~5: colonies;

B: digested identification; M: Marker DL2000;

M₁: Marker DL15000; 1~4: recombinant plasmids

2.3 花生 *fw2.2* 基因的测序及分析

将野生种 *A. stenasperma* 和栽培种鲁花 11 号、鲁

为模板,在花生中分别扩增出了大小约为 750bp (图 2-A) 和 600bp 的片段(图 2-B)。

回收扩增的目的片段,连接到 pMD18-T 载体上,将连接产物通过热激法转化 *E. coli* 菌株 DH5 α 感受态细胞,挑取白斑菌落进行 PCR 鉴定(图 3-A)。由图 3-A 可知,从白斑菌落能够扩增出 600bp 的目的片段。从白斑菌落提取重组质粒,用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定(图 3-B),由图 3-B 可知,重组质粒能够切出载体和 600bp 的目的片段。上述结果表明,*fw2.2* 基因已经连接到克隆载体 pMD18-T 上。

花 12 号 *fw2.2* 基因片段的重组质粒进行测序,所克隆的 DNA 片段长分别为 722、728 和 727bp,与对应的 cDNA 序列相比,都有 2 个内含子,编码区长都为 555bp,编码 184 个氨基酸(图 4),其中从野生种 *A. stenasperma* 中扩增出的 cDNA 序列为 579bp。从图 4 可以看出,栽培种鲁花 11 号、鲁花 12 号与野生种 *fw2.2* 基因相比,在外显子处都有碱基突变,鲁花 11 号、鲁花 12 号分别有 1 个和 5 个氨基酸发生改变。另外,野生种 *A. stenasperma* 与栽培种(汕油 523 未进行 DNA 测序)的 DNA 序列相比,第 2 个内含子缺少 6 个碱基(413~418bp,注册号:JF499831)。

参照魏兆军^[7]、周生茂^[8]的方法对 *fw2.2* 基因进行生物学分析。将花生野生种 *A. stenasperma fw2.2* 基因编码的氨基酸序列与大豆(ACU14415)、葡萄(XP_002284819.1)、拟南芥(NP_172940.1)、蓖麻(XP_002527778.1)、杨树(XP_002315950.1)、水稻(NP_001173699.1)、番茄(AF261774_1)、玉米(ADI48424.1)、高粱(XP_002454063.1)、鳄梨

(ADA70360.1)、小立碗藓(XP_001782161.1)等植物 *fw2.2* 基因编码的氨基酸序列进行多重序列比对(图

<i>fw2.2</i>	EXON		INTRON		EXON		INTRON		EXON									
	1	182	272	343	426	728												
	1	1	1	111	1	2	3	3	444444	5	5	5	6					
	2	6	8	2	5	8	888	9	9	2	4	111111	0	6	8	1		
	7	9	1	4	8	5	789	3	8	3	7	345678	5	0	3	0		
鲁花 11 号 Luhua 11	T	G	T	A	T	T	T	A	G	G	T	C	G	A	T	G	A	T
鲁花 12 号 Luhua 12	C	A	C	G	C	A	A	G	-	C	C	C	G	A	T	G	A	T
<i>A.stenasperma</i>	T	G	T	A	T	T	T	A	G	G	T	C	A	-	-	-	-	-
汕油 523 Shanyou 523	T	G	T	A	T	-	-	-	-	-	-	T	T	-	-	-	-	-

图 4 *fw2.2* 基因在不同花生材料的核苷酸差异比较

Fig. 4 Summary of nucleotide difference in aligned sequences of *fw2.2* gene in peanut 短打表示缺失。

deletions are indicated by short dashes

S1MYQIVGYNPGF.....MKQPYVPPHYVSAPG..TITAFWSTGLC	37
PaMYPTPSAPVDMHPTPSAPVDGFFQPPYAPPSVFPQPGSGAGSRWSTGLC	50
PtWSTSLC	6
SbMYPKADEGAQPLATGIPISGGRGGYYQAGGATAAFVAVQAAPVAVWSTGLC	52
AhMYQAEESKPVFTGLPVSYNASSGAAPYSSSVDSAYYQPPP..KFPQWSTSLC	52
GmMYQQGSDFTKQSPATGFPVSYNSNTYSTNEASYAPVPPPPQKPLVWSTGLC	54
Vv	...MYSSDDYRRFMTIPFPEPAPPSFNGAGTATGIPVSSPEPSFSEKPSQAPLQPKVKAFRVWSSGLC	66
RcMSSLNNSKAQVFWSTGLC	19
AtMEAQHLHAKPHAEGWSTGLC	21
OsMAKPSAAPVTGVVPG...SAWSSGLF	24
ZmMYPPKASGDPAAGAAPVTGFFVGGPAASSQWSSGLL	36
Pp	MGIIYEGGSSNAPPEFVLGHFVYPPFPNYTHQGGPYAPQPSYDHMPAQAPIGGPPMVIFTALTGTITDLC	70
Consensusw	
S1	HCHDDPANCLVTSVCFCHTFGQIIEILNKGITSCGRGALYCLLG.LTGLPSLYSCFYRSKRMGGYDIEE	106
Pa	NCKEPESNCFITCCPCITTFGQIAAIVNRGALFOAASGALYLLLS.FTGFACLYSCFYRSRLRAQYDIEE	119
Pt	GCFSDLNSCGLTWCPCVAFGRIAEIVDRGTSOGRMSGLYTLILCLTGCSCLYSCFYRSKRLRGQFFLEE	76
Sb	DOHDDCSNCCVTCICPCITTFGQIAEIIDRSTSGTSGALYTLVMLLIGCCQVYSCFYRAKMRQAQYGLRE	122
Ah	DOHSDCGNCCITWPCVTFGRVAEIVDRGTSOGRMSGLYTLVCLLIGCCQVYSCFYRSKMRRLNLKIG	122
Gm	DOHSECGNCCMTWCPCVTFGRVAEIVDRGTSOGRMSGLYTLICCVIIGCCQVYSCFYRPMRQYGLKIG	124
Vv	DOHSEPRNCCITWCPCITTFGQIAEIVDRGSSACGVNGALYTLIACVTGCACQVYSCFYRAKMRQCYLLKP	136
Rc	DOHSDRRTCITWPCITTFGQIAEIVEKGITSCATTGAIYALACFTGGCCVYSCMYRSKRLRHQYMLPE	89
At	DOHSDCKNCCITWPCITTFGQVAEIVDRGTSOGRMSGLYTLIYAVVTGCACVYSCFYRGMRAQYKIKIG	91
Os	DOHSDCGNCCMTWCPCITTFGRVAEIVDRGTSOGRMSGLYTLIYAVVTGCACVYSCFYRGMRAQYGLAD	94
Zm	DOHSDCGNCCITWPCITTFGRVAEIVDRGATSOGTAGALYAVLAYFTGCQWYVYSCFYRAKMRQAQGLPE	106
Pp	GCSCSDCLCCITWCPCVTFGQITFVLEGRSSCFVQCTIYALLC.TIIVFCVYVYRWRQLRKRKYMIEK	139
Consensus	c t cpc fg g c g y g ys r r	
S1	AEGVDCLVVFCEFCALCQCYREIKNRGFDMGIGRQANMERQSRGVTMPFPHAGMTR.....	163
Pa	DFQADCLVHCCCECCALCQCYREIKNRGFDMGIGRQANMERANRQVTVACTPPSMVGDMDR.....	180
Pt	SFQTDCCVHFCCEFCALCQCYREIKNRGFDLSIGVNMERQKRLAATAFPTEERMTR.....	134
Sb	SFQADCCVHCCCECCALCQCYREIKNRGFDMNIGRQANMERQGRTAATMFFLMHFGMTR.....	181
Ah	SDGDCMIFCCCEFCALCQCYREIEMQCFDMHIGRQANMERQSRGVTMPFPHAGMTR.....	184
Gm	NGSDCLVHFCCEFCALCQCYREIQHRGFDMLIGRQANMERQSRGVTMPFPHAGMTR.....	186
Vv	SFQDCCLVHCCCEYCSLCCQCYREIKNRGFDMTIGVHGNVQRN..RGVEMSSSSQTAPTMEEGMS	200
Rc	SFQNDCLVHCCCEFCALCQCYREIKSRGFDMSIGRQGNVERQK..GGVAMAPVFQAGMTR.....	147
At	DFQTDCLVHFCCEFCALCQCYREIKHRGFDMSLGRAGNVERQGNQGGVAMGAPVFQGGMTR.....	152
Os	ARGDCCVHFCCEFCALCQCYREIVARCYDPKLGHLNVERGAAAAFAVQHMGR.....	148
Zm	TFQDCCLVHFCCEFCALCQCYREIKARGFDVPLGRDR...NATMLPFSQAGMGR.....	157
Pp	GCQDFCLVHCCCEFCALCQCYREIKNRGFDMSLGRVAVQGNVYRPMVAPTAPGVMLR.....	196
Consensus	csd h c c q el g d gw	

图 5 花生与其他植物 *fw2.2* 氨基酸序列的同源比较

Fig. 5 Comparison of *fw2.2* amino acid sequence among peanut and other plants

Ah: 花生; Gm: 大豆; Vv: 葡萄; At: 拟南芥; Rc: 蓖麻; Pt: 杨树; Os: 水稻; S1: 番茄;

Zm: 玉米; Sb: 高粱; Pa: 鳄梨; Pp: 小立碗藓。下图同。

Ah: *Arachis hypogaea*; Gm: *Glycine max*; Vv: *Vitis vinifera*; At: *Arabidopsis thaliana*; Rc: *Ricinus communis*;

Pt: *Populus trichocarpa*; Os: *Oryza sativa*; S1: *Solanum lycopersicum*; Zm: *Zea mays*; Sb: *Sorghum bicolor*;

Pa: *Persea Americana*; Pp: *Physcomitrella patens*. The same as following table.

5), 并用 neighbour-joining (NJ) 法构建系统发生进化树 (图 6), 结果表明在进化上花生与大豆的 *fw2.2* 基因亲缘关系最近, 一致性达到 66.85%, 与其他物种的一致性也在 50% 左右。

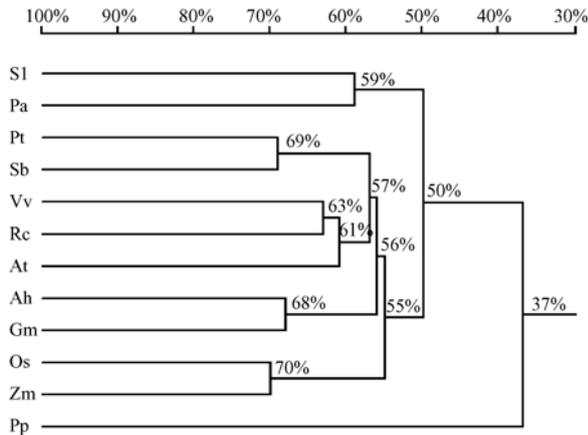


图 6 不同生物 *fw2.2* 基因的进化树分析

Fig. 6 Analysis for the phylogenetic relationship of *fw2.2* gene

2.4 植物表达载体的构建和鉴定

用 *Bam* H I 和 *Pst* I 分别酶切带有野生种 *A. stenosperma* *fw2.2* 基因 cDNA 片段的克隆载体和植物表达载体 pCAMBIA23A, 酶切产物纯化后用 T_4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆, 提取质粒进行 PCR 和双酶切鉴定。由图 7 可以看出, 重组质粒扩增出了 579bp 的基因片段, 用 *Bam* H I 和 *Pst* I 进行双酶切后, 获得了目的条带和大约 10kb 的载体条带, 说明 *fw2.2* 基因已经连接到表达载体 pCAMBIA23A 中, 该植物表达载体命名为 pCAMBIA23A-*fw2.2*。

2.5 *fw2.2* 基因的遗传转化、再生及鉴定

选取花育 23 号成熟种子, 经表面消毒后, 去种皮和胚轴, 将每片子叶切成 2 半, 在转入 pCAMBIA23A-*fw2.2* 表达载体的农杆菌中侵染 10min 后, 置于添加 2,4-D 和苄氨基嘌呤 (BAP) 的 MS 诱导培养中共培养 3d。然后将外植体转移到添加 250mg/L 头孢霉素的诱导培养基上培养, 诱导丛生芽。将形成丛生芽的外植体转移到添加 BAP、250mg/L 头孢霉素、100mg/L 卡那霉素的培养基上培养 2 周左右后, 将卡那霉素浓度增加至 150mg/L, 进行抗性芽的筛选及诱导芽伸长 (图 8), 最终共得到 34 个抗性苗。提取抗性植株的总 DNA 进行 PCR 检测, 从中鉴定出 12 个独立的阳性转化子, 初步表明带有 *fw2.2* 基因的片段已转入花生基因组中。

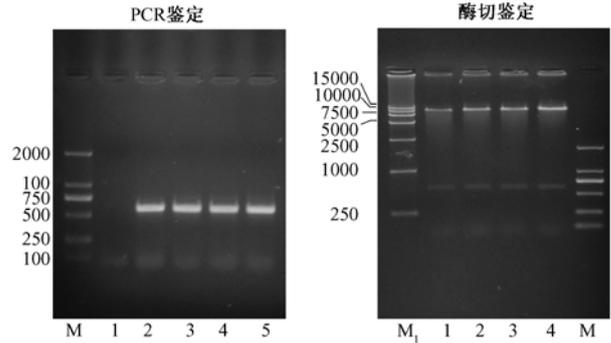


图 7 pCAMBIA23A-*fw2.2* 植物表达载体的鉴定

Fig. 7 Identification of plant expression vector pCAMBIA23A-*fw2.2*

M: Marker DL2000; 1: 对照; 2~5: 重组质粒.

M₁: Marker DL15000; 1~4: 重组质粒

M: Marker DL2000; 1: control; 2~5: recombinant plasmids;

M₁: Marker DL15000; 1~4: recombinant plasmids

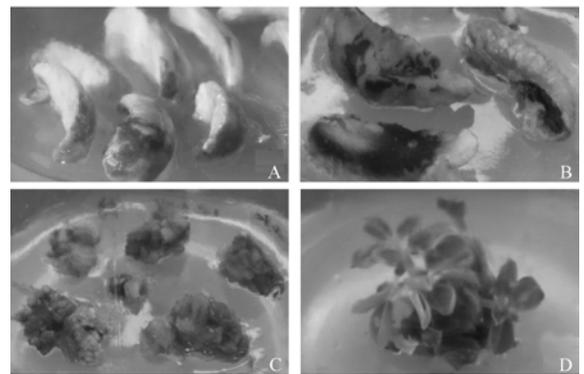


图 8 花生遗传转化

Fig. 8 Process of peanut transformation

A: 共培养 3d 的子叶外植体; B: 培养 2 周的子叶外植体;
C: 添加 100mg/L 卡那霉素培养基上筛选的抗性芽 (培养 4 周);
D: 150mg/L 卡那霉素培养基上筛选的抗性苗 (培养 6 周)

A: peanut explants of cotyledon coincubated for 3d; B: cotyledons incubated for 2 weeks; C: resistant shoots selected under 100mg/L Kanamycin (4 weeks); D: resistant seedlings selected under 150mg/L Kanamycin (6 weeks)

A: peanut explants of cotyledon coincubated for 3d; B: cotyledons incubated for 2 weeks; C: resistant shoots selected under 100mg/L Kanamycin (4 weeks); D: resistant seedlings selected under 150mg/L Kanamycin (6 weeks)

2.6 *fw2.2* 基因的半定量 RT-PCR 分析

选取花生野生种 *A. stenosperma* 和栽培种鲁花 11 号, 分别提取叶片、花和开花后 30d 的幼胚 RNA, 各取 2 μ g 进行反转录。取反转录得到的 cDNA 1 μ l, 分别用扩增 *Actin* 和 *fw2.2* 基因的引物进行半定量 RT-PCR 分析, 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测 (图 9)。由图 9 可以看出, *fw2.2* 基因在花和叶片中的表达量较低, 而在幼胚中的表达量较高, 且在野生种 *A. stenosperma* 的表达量明显高于在栽培种鲁花 11 号的

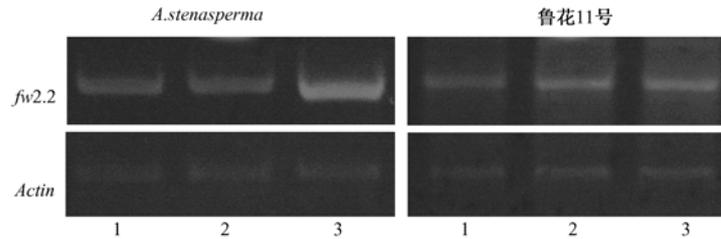


图9 *fw2.2* 基因在野生种 *A. stenosperma* 和栽培种鲁花 11 号的半定量 RT-PCR 分析结果

Fig. 9 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *fw2.2* gene between wild species *A. stenosperma* and cultivated species Luhua 11

1: 叶片; 2: 花; 3: 幼胚

1: leaf; 2: flower; 3: immature embryo

表达量。

3 讨论

本研究以番茄 *fw2.2* 基因的序列为探针,利用花生 EST 数据库筛选同源序列并进行拼接。根据花生的 EST 拼接序列设计引物进行 PCR 和 RT-PCR 扩增,在野生种中分别获得大小为 722bp 和 579bp 的条带。与其他物种的氨基酸序列进行比对,同源性为 34.78% ~ 66.85%。半定量 RT-PCR 结果表明,*fw2.2* 基因在野生种的表达量高于栽培种,初步表明它在花生的荚果形成中可能是一个负调控因子。近年来在水稻中克隆了多个和产量性状有关的数量性状基因,如 *GW2*、*GS3* 和 *GW5*^[10~12],它们都对产量性状起负调控作用。根据本研究对野生种和栽培种中该基因的测序结果分析看,这种表达差异可能是由于编码区的突变,也有可能是由基因上游启动子的调控区造成的,在番茄 *fw2.2* 基因和玉米的 *teosinte branched1* 基因中也曾发现这种现象^[3,13]。为了研究花生 *fw2.2* 基因的功能,本研究构建了带有 *fw2.2* 基因的植物表达载体 pCAMBIA23A-*fw2.2*,对花生进行了遗传转化,并获得了阳性再生植株,该基因对花生荚果大小的影响还有待继续研究。

花生遗传转化所选择的外植体有子叶、成熟胚和胚小叶等。Sharma 等以成熟花生种子的子叶为外植体,通过根癌农杆菌介导进行转化,转化率达到 55% 以上^[14];Anuradha 等以子叶节为外植体,通过根癌农杆菌介导对花生进行转化,GUS 检测 31% 再生植株表现为阳性^[15]。本研究中选择了花育 23 号成熟种子的子叶作外植体,并在 Sharma 等的研究基础上,将侵染时间由几秒钟延长至 10min。共接种 50 个外植体,在

未添加卡那霉素的诱导培养基上,丛生芽诱导率达到 90% 以上,经卡那霉素筛选获得 34 个抗性苗,PCR 检测确定 12 个阳性的独立转化子。

参考文献:

- [1] Liu J, Van Eck J, Cong B, Tanksley S D. A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:13302 - 13306
- [2] Zanon M I, Osorio S, Nunes-Nesi A, Carrari F, Lohse M, Usadel B, Kühn C, Bleiss W, Giavalisco P, Willmitzer L, Sulpice R, Zhou Y H, Fernie A R. RNA interference of LIN5 in tomato confirms its role in controlling Brix content, uncovers the influence of sugars on the levels of fruit hormones, and demonstrates the importance of sucrose cleavage for normal fruit development and fertility[J]. Plant Physiology, 2009, 150:1204 - 1218
- [3] Frary A, Nesbitt T C, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert K B, Tanksley S D. *fw2.2*: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size[J]. Science, 2000, 289:85 - 88
- [4] Grandillo S, Ku H M, Tanksley S D. Identifying loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato[J]. Theor Appl Genet, 1999, 99:978 - 987
- [5] Lippman Z, Tanksley S D. Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. *Giant Heirloom*[J]. Genetics, 2001, 158:413 - 422
- [6] Tanksley S D. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato[J]. Plant Cell, 2004, (16):S181 - S189
- [7] 魏兆军, 陈复生, 尹 姣, 张海如, 罗建平. 棉铃虫线粒体 *cox2* 基因的克隆、序列及系统学分析[J]. 核农学报, 2006, 20 (3): 193 - 198
- [8] 周生茂, 王玲平, 向 珣, 韦本辉, 李杨瑞, 方锋学, 韦威旭, 曹家树. 山药 *PAL* 基因全长 cDNA 序列的克隆、表达与分析[J]. 核农学报, 2008, 22 (6):781 - 788

(下转第 1210 页)

- arthropods other than fruit flies[J]. Irradiation as A Phytosanitary Treatment of Food and Agricultural Commodities. IAEA-TEC-DOC-1427, 2004, 37 - 44
- [16] Ozardime B, Cetinkaya N, Denli E, Alabay E, Ic M. Inhibition of egg and larval development of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hubner) and almond moth *Ephesia cautella* (Walker) by gamma radiation in decorticated hazelnuts[J]. Journal of Stored Products Research, 2006, 42: 183 - 196
- [17] Zolfaghari H R. Irradiation to control *Plodia interpunctella* and *Oryzaephilus surinamensis* in pistachios and dates[J]. Irradiation as a phytosanitary treatment of food and agricultural commodities. IAEA-TEC-DOC-1427, 2004, 101 - 109
- [18] Brower J H. Gamma irradiation of adult *Plodia interpunctella*: effects on mating, sterility, and number of progeny [J]. Annals of the Entomological Society of America, 1975, 68(6): 1086 - 1090
- [19] GUY J Hallman and Thomas W Phillips. Ionizing irradiation of adults of Angoumois Grain Moth (*Lepidoptera: Gelechiidae*) and Indianmeal Moth (*Lepidoptera: Pyralidae*) to prevent reproduction, and implications for a generic irradiation treatment for insects[J]. J Econ Entomol, 2008, 101(4): 1051 - 1056
- [20] 王 瑛, 王维国, 李凤梅, 谢立青, 狄少杰, 兰李桥. 杏仁辐射杀虫卫生标准研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 1992, 10(4): 243 - 245
- [21] 程新胜, 王方晓, 魏重生. 从 CORESTA 指南谈我国烟草仓库熏蒸灭虫实践[C]. 武汉: 中国烟草学会 2004 年学术年会论文集, 2004

(责任编辑 高美须 裴 颖)



(上接第 1128 页)

- [9] 刘 峰, 单世华, 闫彩霞, 毕玉平, 李光敏, 伦伟志. 花生子叶遗传转化再生体系影响因素的研究[J]. 花生学报, 2007, 36(1): 13 - 19
- [10] Song X J, Huang W, Shi M, Zhu M Z, Lin H X. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase[J]. Nature Genetics, 2007, 39(5): 623 - 630
- [11] Fan C C, Xing Y Z, Mao H L, Lu T T, Han B, Xu C G, Li X H, Zhang Q F. GS3, major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encode a putative transmembrane protein[J]. Theor Appl Genet, 2006, 112(6): 1164 - 1171
- [12] Shomura A, Izawa T, Ebana K, Ebitani T, Kanegae H, Konishi S, Yano M. Deletion in a gene associated with grain size increased yields during rice domestication [J]. Nature Genetics, 2008, 40(8): 1023 - 1028
- [13] Lauren H, Paula, John, Sarah H. Expression patterns and mutant phenotype of *teosinte branched1* correlate with growth suppression in maize and teosinte[J]. 2002, Genetics, 162: 1927 - 1935
- [14] Sharma K K, Anjaiah V V. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation[J]. Plant Science, 2000, 159: 7 - 19
- [15] Anuradha T S, Jami S K, Datta R S, Kirti P B. Genetic transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) using cotyledonary node as explant and a promoterless *gus: nptII* fusion gene based vector[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 31(2): 235 - 246

(责任编辑 王媛媛)