

百合 *LiLFY1* 基因的克隆和表达分析

王爱菊^{1,2}, 唐金富^{1,2}, 赵祥云³, 朱立煌¹

(¹中国科学院遗传与发育生物学研究所生物技术重点实验室, 北京 100101; ²中国科学院研究生院, 北京 100094; ³北京农学院园林系, 北京 102206)

摘要: 【目的】分离百合的 *LFY* 类基因, 检测百合中 *LFY* 类基因的拷贝数并分析其表达模式。【方法】利用 RT-PCR 结合 RACE 的策略克隆百合的 *LFY* 类基因, 通过 Southern 杂交检测百合中 *LFY* 类基因的拷贝数, 通过 RT-PCR 分析 *LiLFY1* 基因的表达模式。【结果】获得了包括全长开放阅读框 (ORF) 的 *LiLFY1* 基因的 cDNA 序列。与已克隆的 *LFY* 类蛋白的同源性分析表明, *LiLFY1* 编码的蛋白与单子叶植物水稻和玉米的 *LFY* 类蛋白具有更高的同源性。Southern 杂交结果表明, 二倍体百合中有 2 个拷贝的 *LFY* 类基因。*LiLFY1* 基因在百合的幼嫩花芽和顶端分生组织中表达, 而在根、茎、成熟的叶片和成熟花的各轮器官中不表达。【结论】百合的 *LiLFY1* 基因与已克隆的其它作物的 *LFY* 类基因高度同源, 在百合的顶端分生组织和幼嫩花芽中表达, *LiLFY1* 基因的克隆将有助于调整百合开花时间的基因工程研究。

关键词: 百合; *LFY* 转录因子; *LiLFY1*; 成花转型

Isolation of *LiLFY1* and Its Expression in Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.)

WANG Ai-ju^{1,2}, TANG Jin-fu^{1,2}, ZHAO Xiang-yun³, ZHU Li-huang¹

(¹Key Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100094; ³Department of Gardens, Beijing Agricultural College, Beijing 102206)

Abstract: 【Objective】The aim of this study is to isolate the *LFY* family genes in lily and analyze the copies number and the expression of the *LFY* family genes isolated. 【Method】*LiLFY1* was isolated with the strategy of RT-PCR combining RACE. The copies number of the *LFY* family genes was analyzed by Southern blotting and the expression of *LiLFY1* was analyzed by RT-PCR. 【Result】The cDNA of *LiLFY1* containing the full-length open reading frame (ORF) was isolated from lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) by the RT-PCR and RACE strategy. The alignment analysis of the deduced *LiLFY1* protein with other known *LFY* family proteins indicated that *LiLFY1* is highly homologous with rice RFL and maize FLL. The result of Southern hybridization showed that there are two copies of *LFY* family genes in lily. *LiLFY1* is expressed in young flower buds and shoot apical meristem (SAM) but not in roots, shoots, mature leaves and mature floral organs. 【Conclusion】The *LiLFY1* isolated from lily are highly homologous with the other *LFY* family genes isolated from other species. *LiLFY1* is expressed in SAM and young flower buds. The cloning of *LiLFY1* gene may be applied to the genetic engineering aiming for regulating the flowering time in lily.

Key words: Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.); *LFY* transcriptional factor; *LiLFY1*; Flowering

0 引言

【研究意义】开花植物发育的一个显著阶段是成花转型, 即以叶片发育为主的营养生长停止, 而以侧芽和花的发育为主的生殖生长起始。对于拟南芥开花

调控的研究发现: 拟南芥开花时间的调控是通过多个不同遗传位点的作用来实现的^[1~7], 根据对一些拟南芥开花时间的突变体的研究, 将调控拟南芥开花的因素归为 4 条途径: 长日照途径、自主途径、春化途径和赤霉素途径^[4,8], 其中拟南芥的 *LEAFY* (*LFY*) 基因参

收稿日期: 2007-03-22; 接受日期: 2007-07-25

基金项目: 中科院遗传与发育研究所创新基金

作者简介: 王爱菊 (1976-), 女, 山东齐河人, 博士, 研究方向为分子遗传学。Tel: 010-64870491; E-mail: ajwang@genetics.ac.cn. 通讯作者朱立煌 (1942-), 北京人, 研究员, 研究方向为分子遗传育种。Tel: 010-64870491; E-mail: lh Zhu@genetics.ac.cn

与了各条开花途径的整合, 在植物的开花调控中起着重要的作用^[9]。*LFY*类基因编码植物特异的转录因子, 促进开花植物的成花转型和生殖生长。目前在很多作物上已克隆了*LFY*类基因, 但在百合上, 相应基因还没有研究。百合是重要的单子叶花卉植物。不同品种百合的开花时间存在很大差异, 从种子开始, 大多数品种需要2~3年才能开花。克隆百合的*LFY*类基因, 对于通过基因工程技术人工改变百合的花期具有重要的意义。【前人研究进展】在拟南芥中, *LFY*基因是一个花序分生组织决定基因, 在成花转型前被诱导, 当花序分生组织出现后, *LFY*的表达逐渐增强^[1,10]。*LFY*基因的首要作用是协同其它成花相关基因抑制茎端分生组织的营养性发育, 同时参与促进花分生组织的形成和花分生组织属性的控制, 另外*LFY*基因还参与活化花器官属性基因^[11~13]。在拟南芥中*LFY*基因的突变会造成晚花表型, 同时使花部分转变为花序, 而转*LFY*基因的拟南芥的侧芽全部转变为花。自Weigel首次鉴定了*LFY*类基因在成花中起关键作用以来, 目前已经在多种作物上克隆得到了*LFY*类同源基因, 包括种子植物的水稻、烟草、苹果、葡萄等及裸子植物的辐射松、银杏等。*LFY*类基因的结构和功能在不同的物种间存在着高度的保守性^[14]。已克隆的*LFY*类基因的氨基酸序列同源性最高可达91%, 最低为44%。在功能上, 将杨树的*LFY*同源基因转化拟南芥会使转基因拟南芥的花期提前, 将辐射松的*LFY*类同源基因转化拟南芥会使转基因拟南芥对光周期不敏感并使开花提前, 单子叶植物水稻的*RFL*基因(*LFY*类同源基因)转化拟南芥可以互补*lfy*突变体的表型, 表明了*LFY*类基因在功能上的高度保守性。但是烟草的*NFL1*基因(*LFY*类同源基因)转化拟南芥并不能使拟南芥的花期提前^[15]; 水稻的*RFL*基因在水稻中影响花序的发育但不能促进水稻早花, 这些研究表明*LFY*类基因的功能在不同物种间既存在高度保守性又有一定程度的分化^[16]。同时*LFY*类基因的拷贝数和表达模式在不同物种间也不尽相同^[17]。【本研究切入点】*LFY*类基因的结构和功能在不同作物中存在很高的保守性, 因此可以应用同源基因克隆的策略克隆百合中的*LFY*类基因, 同时不同作物中*LFY*类基因的拷贝数和表达模式存在差异, 因此需要进一步明确百合中*LFY*类基因的拷贝数和表达模式。【拟解决的关键问题】分离百合中的成花转型关键基因:*LFY*类基因, 检测百合中*LFY*类基因的拷贝数并分析克隆得到的*LiLFY1*基因的表达模式。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试麝香百合品种‘雪皇后’, 种植于北京市延庆区百合苗圃, 由北京农学院赵祥云提供。试验中所用内切酶、反转录酶、连接酶为Promega公司产品, 所用Taq酶为TaKaRa公司产品, Trizol试剂为Invitrogen公司产品。

1.2 *LiLFY1*的同源克隆

利用Trizol试剂提取百合幼嫩花芽(约5 mm)总RNA, 去除DNA并进一步纯化后, 利用反转录酶M-MLV(Promega)合成cDNA用作以下PCR反应的模板。根据*LFY*类蛋白*LFY*, *FLO*和*RFL*的保守结构域设计兼并引物*LFY-F*和*LFY-R*(表1)。以百合花芽cDNA为模板进行RT-PCR扩增, 得到2条扩增片段。将2个片段都回收, 测序后进行Blast分析。

利用RACE策略克隆*LiLFY1*基因cDNA的3'和5'片段。首先根据已克隆的*LiLFY1*序列设计37 bp的基因特异引物*LiLFY1 3RE-F*, 利用引物对*LiLFY1 3RE-F*和CDS III/3'(SMART™ cDNA Library Construction Kit, CLONTECH)进行touchdown PCR扩增。扩增得到一条约500 bp的片段, 将该片段回收连接T-easy转化大肠杆菌*E.coli*, 提取单克隆, 用基因特异引物*LiLFY1 3RE-TF*和*LiLFY1 3RE-TR*先进行PCR检测, 阳性克隆进行测序分析。

设计35 bp的基因特异引物*LiLFY1 5RE-R*。利用引物对*LiLFY1 5RE-R*和SMART 5' oligo引物(SMART™ cDNA Library Construction Kit CLONTECH, 提供)进行第一轮touchdown PCR, 结果得到弥散的带。进一步设计20 bp的基因特异引物*LiLFY1 5RE-R2*和兼并引物*LiLFY1 1-21*, 以第一轮PCR产物为模板进行touchdown PCR扩增, 结果得到一条约500 bp的扩增片段。将该片段回收进行测序分析。

本文用于*LiLFY1*基因的分离和分析所用的引物见表1, 所用touchdown PCR的基本程序是: 95℃变性5 min, 然后进行20个循环的95℃变性40 s, 65℃(每个循环退火温度下降0.5℃)退火40 s和72℃延伸90 s, 然后进行30个循环的95℃变性40 s, 60℃退火40 s和72℃延伸90 s, 最后延伸5 min。

1.3 Southern杂交

利用SDS法提取百合叶片总DNA。20 μg百合基因组DNA用*BamH I*、*EcoR I*、*EcoR V*、*Xba I*、

表 1 本文中用于 *LiLFY1* 基因克隆和分析所用的引物及序列
Table 1 Primers and their sequences used in the isolation and analysis of *LiLFY1* in this study

引物 Primers	序列 Sequences (5'-3')
LFY-F	TGGGAG/CCTT/G/ACTT/CG/CTT/CGGT/C/AGA
LFY-R	TGGCAG/A AGCTGA/GCGA/C/GAGC/TT/CTG/TG
LiLFY1 3RE-F	GGACTACTGTGTTTCATCTCTACGAGCAGTGCAG GCAG
CDS III/3'	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T) ₃₀ N
LiLFY1 3RE-TF	CAGTTTCTGCTGCAGGTGCAAGC
LiLFY1 3RE-TR	CGTACCAGATGGCCAGTCGAGG
LiLFY1 5RE-R	ACGAGCCTGACTCGGGATCCCCATAACCCTCTCCC
LiLFY1 5RE-R2	GCTTCTCTCTCTGCTGCACC
SMART 5' oligo	GTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGCGCCGGG
LiLFY11-21	ATGGATCCT/CG/AAT/C/AGA/C/GA/TGCCTTC
LiLFY1 TF	CAGACAACCAGGCGAATGCTC
LiLFY1 TR	GTGGAAGGCGTAGCAGTGTACG
Liact-F	ATCCCAGCAGCGTCGCACATCC
Liact-R	GCCAGATCTTCTCCATGTCATCC
LiLFY1 PF	GCTTCTCTTGGCGAGCGG
LiLFY1 PR	ATGGCCAGTCGAGGGTGC

Kpn I 和 *Hind*III 酶切, 用 0.8% 琼脂糖进行电泳后将 DNA 转到尼龙膜上 (Amersham)。利用 ³²P 和探针标记试剂盒 (TAKARA) 进行杂交, 程序参照植物分子生物学实验手册^[18]。*LiLFY1* 基因特异的探针通过 PCR 获得, 所用引物为 LiLFY1 PF 和 LiLFY1 PR (表 1)。

1.4 *LiLFY1* 基因的序列分析和系统树分析

多序列比对利用 DNASTAR 软件和 Blast 进行, 利用 *LiYABI* 基因编码的 396 个氨基酸的蛋白序列和已克隆的其它 LFY 类蛋白的序列进行多个蛋白的序列比对, 采用 MEGA2 neighbor-joining 软件绘制系统进化树。所用基因的登录号如下: 矮牵牛 *ALF* (AF030171), 桉树 *ELF1* (AF034806), 番茄 *FAL* (AF197936), 甘菊 *DFL* (AY559245), 花菱草 *EcFLO* (AY188789), 花椰菜 *BoFH* (Z18362), 黄瓜 *CFL* (AF059320), 金鱼草 *FLO* (M55525), 拟南芥 *LFY* (M91208), 苹果 *AFL2* (AB056159), 葡萄 *VFL* (AF450278), 水稻 *RFL* (AB005620), 豌豆 *UNI* (AF010190), 烟草 *NFL1* (U15798), 杨树 *PTLF* (U93196), 玉米 *FLL* (AY179883), 银杏 *GinNdly* (AF105111)。

1.5 *LiLFY1* 基因的表达分析

分别从根、茎、叶和茎顶端分生组织 (处于由营

养生长向生殖生长转化时期)、幼嫩花芽 (5 mm)、成熟花 (50 mm) 的不同花器官中提取 RNA 并反转录得到 cDNA, 程序同 1.2 所述, 以基因特异引物 LiLFY1 TF 和 LiLFY1 TR 进行 RT-PCR 反应。以百合 ACTIN 基因为参照, ACTIN 基因特异扩增的引物为 Liact-F 和 Liact-R (表 1)。

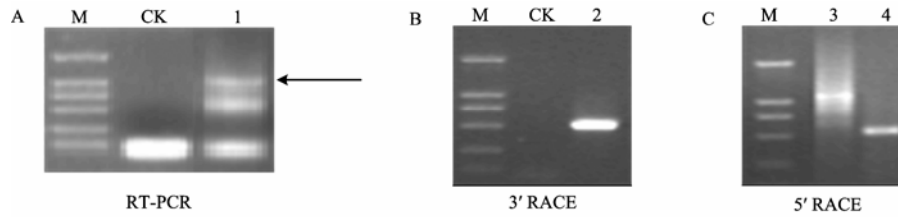
2 结果与分析

2.1 *LiLFY1* 基因的克隆

因为 LFY 类蛋白在 LFY 结构域是高度保守的, 笔者根据拟南芥的 LFY 蛋白、金鱼草的 FLO 蛋白和水稻 RFL 蛋白的 LFY 同源结构域设计兼并引物 LFY-F 和 LFY-R。以百合幼嫩花芽 (约 5 mm 的花芽) 的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增, 得到 2 条清晰的带 (图 1-A), 将 2 条带都回收, 连接 T-easy, 测序, 将所得序列进行 Blast 比对, 发现 831 bp 的片段与 LFY 类基因高度同源, 是百合的 LFY 类基因 (*LiLFY1*) 片段。

根据已经得到的 *LiLFY1* 片段的序列设计 3'RACE 的基因特异引物 LiLFY1 3RE-F, 同时利用笔者所在实验室构建 cDNA 基因文库所用的试剂盒提供的反转录引物 CDS III/3', 以百合幼嫩花芽的 cDNA 为模板进行 touchdown PCR 扩增, 结果得到一条约 500 bp 的带 (图 1-B)。再设计 1 对 3'端交叠部分的检测引物: LiLFY1 3RE-TF 和 LiLFY1 3RE-TR。将扩增产物回收并连接 T-easy, 转化大肠杆菌 *E.coli*, 挑取单克隆并用检测引物进行检测, 然后对阳性克隆进行测序。结果表明所得 500 bp 的片段包括已克隆的 *LiLFY1* 片段的 3'端 232 bp 的片段 (不包括 PolyA)。

根据已经得到的 *LiLFY1* 片段的序列设计 5'RACE 的基因特异引物 LiLFY1 5RE-R 和 LiLFY1 5RE-R2。同时根据 LFY 类基因蛋白 N 端的保守性设计兼并引物 LiLFY1 1-21。以 LiLFY1 5RE-R 和 cDNA 基因文库构建所用的试剂盒提供的 SMART 5' oligo 为引物, 以百合幼嫩花芽的 cDNA 为模板进行第一轮 touchdown PCR 扩增。第一轮 PCR 得到弥散的带, 以 LiLFY1 5RE-R2 和 LiLFY1 1-21 为引物, 以第一轮 PCR 产物为模板做第二轮 touchdown PCR。结果得到一条约 500 bp 的带 (图 1-C)。将之回收并连接 T-easy, 转化 *E.coli* 后取单克隆进行测序。结果表明, 所得 500 bp 的片段包括 *LiLFY1* 的 5'端 291 bp 的片段。由此得到 *LiLFY1* 基因的全长 cDNA 片段 (在 GenBank 中的登录号为 EF458319)。



A: RT-PCR; B: 3'RACE; C: 5'RACE. M: 分子量标准; CK: 以水为模板; 1: RT-PCR 中以 '雪皇后' cDNA 为模板, 箭头所示为长度 831 bp 的 *LiLFY1* 片段; 2: 3'RACE 中以 '雪皇后' cDNA 为模板; 3: 5'RACE 中以 '雪皇后' cDNA 为模板的第一轮 PCR; 4: 5'RACE 中以第一轮 PCR 产物为模板的第二轮 PCR

A: RT-PCR; B: 3' RACE; C: 5' RACE. M: Molecular weight ladder; CK: H₂O as template; 1: 'Xuehuanghou' cDNA as template in RT-PCR; the arrow indicated the fragment of *LiLFY1* that was 831 bp; 2: 'xuehuanghou' cDNA as template in 5'RACE; 3: The product of the first PCR in 5' RACE, 'Xuehuanghou' (a variety of Lily) as template; 4: The product of the second PCR in 5'RACE

图 1 百合 *LiLFY1* 基因的克隆

Fig. 1 Isolation of *LiLFY1*

2.2 *LiLFY1* 的结构和同源性比较

LiLFY1 基因编码含 396 个氨基酸的蛋白, 含有

LFY 结构域(图 2-A)。多序列比对分析表明, *LiLFY1* 蛋白与已克隆的 LFY 类蛋白都有比较高的同源性(图

A

```

1 ATGGATCCCAATGGTGCCTCCATTGAAAGGGTGGTCTAAGAAGGTGATCATCTCTGCC
1 M D P N G A F H L K G G A K K V I I S A
61 CCTAGCAAGGATGCTCCCATGTTTGTGATGGGTCCAAACCATCCGAGTACAAGCTGTGAC
21 P S K D A P M F V M G P N H P E Y K S D
121 ATCCCGAGAGTATCCAATGCCAGCTGCTTGGAGAATTGCTTGTCTCTTATGCTGTCCAGG
41 I P R V S N A S C L E N L L A P Y A V R
181 ATCTCGACCAAGGCCAGGATTGTGAGGGGTTTGTAGCACCGTGACATTGCTTATCATG
61 I S T K A R I V E G L M T T V T L L I M
241 ACTCAGAAAACCTGTTGGAATGGAGGACTTGGAGGGTCTAAGGGCTTGGGAGCTT
81 T Q K T V D G M M A D L R G L R A W E L
301 CTCTTGGCGAGCGGTACGGCATCAAGGGCGCCATTGCGACCGGAGCGCCGTCGCATCGAG
101 L L G E R Y G I K A A I R T E R R R I E
361 TCTCTCCTGATGCTTACCACCACCAATTTGATGCTGCTAATGATCCACGGCGGGGATG
121 S L L M L H H H L Y A A N D P R R R M
421 CTCTCTCTCAGACAACCGAGGCAATGCTTGGACGCCCTTCTCGCAAGAGGGTTTGTGCG
141 L L L S D N Q A N A L D A F S Q E G L S
481 GAGGAGCCGGTGCACAGGAGAGAAAGCTGCTGTTAGTGGCGGAGAGGCGCCGATAGG
161 E E P V Q O E R E A A G S G G E A A V G
541 CGGAGGGTGGCAAGGCAAGCAGCTATCTATCAAGAGAAACAAGAAAGAAAGAAAG
181 R R V G K G K Q L S I K R N N R K K K K
601 AAGGGAGAGGGTTATGGGATCCCGAGTCAAGCTCGTGGAAACCGACAGCAGCGGGCG
201 K G E G Y G D P E S G S S E T D S S G A
661 GAGCGCAGAGGGGAGCATCCGTTTATCGTACGAGAGCCGCGGAGAGTTGGCGGGGCAAG
221 E R Q R E H P F I V T E P G E L A R A K
721 AAGAACGGGTGGACTACTTGTGTTTATCTTACGAGCAGTGCAGGCAGTTTCTGCTCGAG
241 K N G L D Y L F H L Y E Q C R Q F L L Q
781 GTGCAAGCTCTTCTAAGGAGAGGGGGTATAAGTGCACCCACCAAGGTGACTAACAGGTG
261 V Q A L A K E R G D K C P T K V T N Q V
841 TTCCGGTACGCTAAGAAAATGGGAGCATGCTACATAAACAAGCCTAAGATGCGGCACCTAC
281 F R Y A K K M G A C Y I N K P K M R H Y
901 GTACTACTGCTACGCCCTTCCACTGCCTCGACGAGGAGGGCTCCAAACCGCTGAGGAGGGCC
301 V H C Y A F H C L D E E G S N A L R R A
961 TACAAGGAGCGGGGAGAACGTCGGAGCTTGGCGCCAGGCCTGCTACAAGCCGCTTGTG
321 Y K E R G E N V G A W R Q A C A Y K P L V
1021 GCGATCGCCGCCCATGGACCTGGGACATTGACGCTGTCTTCAATGCGCACCCCTCGA
341 A I A A R H G T W D I D A V F N A H P R
1081 CTGGCCATCTGGTACGTCACCCCAAAAACCTCCGACGCTCGCCACCTCGCCAGCAAT
361 L A I W Y V P T K L R Q L C H L A R S N
1141 GCCACTGCAACCGGTGAGCTCCAGCCACCACAGCAGCCGACCACTTTTGTGATATGTTA
381 A T A T G E L Q P P Q Q P T I F
1201 CGCATCAATATAGTGTAGCTTATTTTGGAACTTGTAGCTTATTTTCAAGAACTTGGGA
1261 TGTGAAGCAAGACACACCAGACAACCTTGAATTTGAATTTAGTATCCAACCTAAAAAAGGA
1321 TGCTTTATTGTAGGTAATTAAGCTTGCATGTTGTGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAA
1381 AAAAAACA
  
```

B

```

Anth_FLO.pro MDPAF...LF.KMDHRTALPQPMRLLDKVAAPPFPFPAAPSYSHPRELGGDELPQAV 56
Arab_LFY.PRO MDPEGTTSGLF.KMMPTRALVQAPPVQPPPLQQQVUTSPTAAGFHR...LGGDELPQAV 56
Rice_RFL.PRO MDPDATFS.....AAMPTRVMDLGPAPAPVTP...DPPPPPPPAMVPRDELPQAV 51
LiLFY1.pro MDPNGAFM...LKGGACKVILSAPSKDAFMFMGDRHREYKSDIPRVSASQDELPQAV 57
Consensus mdp ..... p p ..... l e l y

Anth_FLO.pro GRTYVAVKIAEAGTQVNLIDPDEELDDHMSLQQITRDLLGEFPGDRAAARER 116
Arab_LFY.PRO GRTYVAVKIAEAGTQVNLIDPDEELDDHMSLQSHITRDLLGEFPGDRAAARER 116
Rice_RFL.PRO GRTYVAVKIAEAGTQVNLIDPDEELDDHMSLQSHITRDLLGEFPGDRAAARER 111
LiLFY1.pro GRTYVAVKIAEAGTQVNLIDPDEELDDHMSLQSHITRDLLGEFPGDRAAARER 117
Consensus r t a i e t e l n ..... m m l ..... w l l g e r g a a r e r

Anth_FLO.pro RID.....EEE...VRRFLLLS...DTTRLDALDSQEGLSSEEPVQGE...KRAM 157
Arab_LFY.PRO RID.....EEEEDSFRFRLLLSAAGDSGTMDLALDSQEGLSSEEPVQGDQTDAA 158
Rice_RFL.PRO RIMSLGGRHMGNQSGSTUDGASQDLIS.....DEHMDLGGGCHGDDMGRPMVTC...KKA 155
LiLFY1.pro RIDSLMLMHDHMLYAAMDPRFLLLS...DQQAHLDAIATSQEGLSSEEPVQGE...REA 171
Consensus r ..... 1 ..... a

Anth_FLO.pro GSGGGGUGGUMEM.HSAGGRKAPQRRKIKYGRSPHASMEDDDDDDDDETEGAADDENIV 216
Arab_LFY.PRO GDMGGGGVYDAGQGMKIQQQRRKIKPILTSUETDEVDVEGDDGDHMGNGGSGLG 228
Rice_RFL.PRO KKGSS.....AARKGKARRKQVLDLRLDMQEDHMDCCDEDDGGGSESTESSAGGG...G 216
LiLFY1.pro GSGG.....EAAVGRVGRKQKLSIKRNRKIKK...KGGVGDPESSSETDS...G 219
Consensus g

Anth_FLO.pro SERQREHPFVTEPGEARAKKMGLDVYLRLYEQCRFLILQQVILAKRGGGQPTKVTNQ 276
Arab_LFY.PRO TERQREHPFVTEPGEARAKKMGLDVYLRLYEQCRFLILQQVILAKRGGGQPTKVTNQ 288
Rice_RFL.PRO GERQREHPFVTEPGEARAKKMGLDVYLRLYEQCRFLILQQVILAKRGGGQPTKVTNQ 276
LiLFY1.pro AERQREHPFVTEPGEARAKKMGLDVYLRLYEQCRFLILQQVILAKRGGGQPTKVTNQ 279
Consensus e r q r e h p f v e t p g e a r k k n g l d y l f h l y e q c r f l q q v a k g k p t k v n q

Anth_FLO.pro VTRVAKKGGAVYINKPMRHYVNCYAHCLDDESSALRRARHNGRERUGSRQACVYPL 336
Arab_LFY.PRO VTRVAKKGGAVYINKPMRHYVNCYAHCLDDESSALRRARHNGRERUGSRQACVYPL 348
Rice_RFL.PRO VTRVAKKGGAVYINKPMRHYVNCYAHCLDDESSALRRARHNGRERUGSRQACVYPL 336
LiLFY1.pro VTRVAKKGGAVYINKPMRHYVNCYAHCLDDESSALRRARHNGRERUGSRQACVYPL 339
Consensus v t r y a k k g a v y i n k p m r h y v n c y a h c l d e s s a l r r a r h n g r e r u g s r q a c v y p l

Anth_FLO.pro VVIAARCG...DIDITFVAHPRLSIWYVPTLRQLCHADESSAAVAATSSIT..... 386
Arab_LFY.PRO VVIAARCG...DIDIAVVAHPRLSIWYVPTLRQLCHADESNVAALUAGG1SCTGSST 407
Rice_RFL.PRO VVIAARCG...DIDIAVVAHPRLSIWYVPTLRQLCHADESSAAAALPF..... 386
LiLFY1.pro VVIAARCG...DIDIAVVAHPRLSIWYVPTLRQLCHADESNVATATGELQPPQ..... 391
Consensus v i a r c g ... d i d i f v a h p r l s i w y v p t l r q l c h a d e s s a a v a a t s s i t .....

Anth_FLO.pro ...GGFPADHLP 396
Arab_LFY.PRO GGRGGCGDDLRP 420
Rice_RFL.PRO .....PL 389
LiLFY1.pro .....QPTI 396
Consensus f
  
```

A. *LiLFY1* 蛋白的氨基酸序列, 图中 LFY 保守结构域用下划线表示; B. *LiLFY1* 蛋白与其它 LFY 类蛋白的序列比对分析
A. The amino acid sequence of *LiLFY1*, the conserved LFY domain was underlined; B. Amino acid sequence alignment of *LiLFY1* with other LFY proteins

图 2 *LiLFY1* 蛋白的氨基酸序列 (A) 和与其它 LFY 类蛋白的序列比对 (B)

Fig. 2 The amino acid sequence of *LiLFY1* (A) and the alignment of *LiLFY1* and other LFY proteins(B)

2-B)，其中与水稻的RFL和玉米的FLL同源性最高，分别为52.38%和50.7%；与拟南芥的LFY蛋白同源性较低（48.08%）。对已克隆LFY类蛋白进行系统树分析表明，*LiLFY1*与单子叶植物的LFY类蛋白RFL和FLL聚为同一分支，与裸子植物LFY类蛋白GinNdly和双子叶植物LFY类蛋白LFY、PTLF等为并列的分支（图3）。

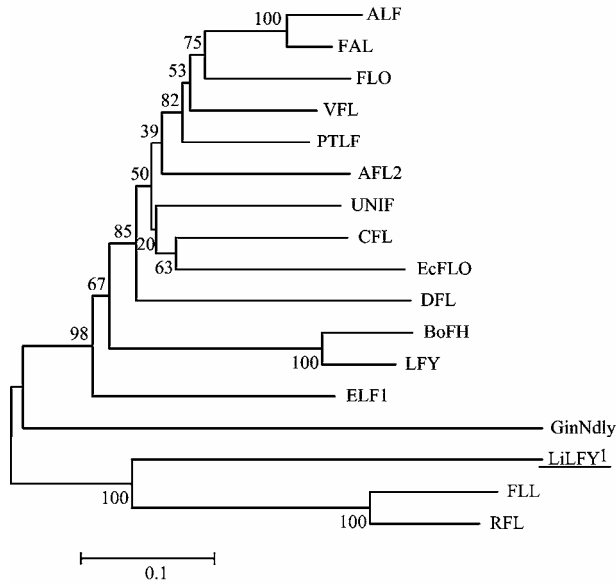


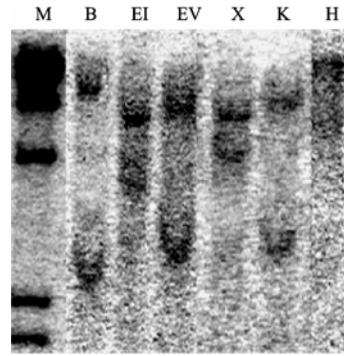
图 3 *LiLFY1* 蛋白和 LFY 类蛋白的系统进化树分析
Fig. 3 Phylogram of *LiLFY1* and other LFY proteins

2.3 百合中 *LFY*类基因拷贝数分析

用 SDS 法大量提取百合叶片 DNA，分别用 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Xba* I、*Kpn* I 和 *Hind*III 对 20 μg DNA 进行酶切 24 h，转膜，以 500 bp 的 *LiLFY1* 片段为探针进行 Southern Blot 杂交。结果表明，*LFY* 类基因在百合中是双拷贝（图 4），所以笔者将本研究克隆的基因称为 *LiLFY1*。

2.4 *LiLFY1* 的表达

为了检测 *LiLFY1* 在百合不同器官中的表达，取百合的根、成熟叶片、茎、顶端分生组织、幼嫩花芽（5 mm）和成熟花（约 50 mm）的花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊，提取其 RNA，经反转录后得 cDNA，利用 *LiLFY1* 基因的特异引物 *LiLFY1* TF 和 *LiLFY1* TR 进行 RT-PCR。同时用百合 *ACTIN* 基因为内参。结果发现，*LiLFY1* 在顶端分生组织和幼嫩花芽中表达（图 5），而在根、成熟叶片、茎和成熟花的 4 轮器官中都不表达（图片未显示）。



百合基因组 DNA 分别用 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Xba* I、*Kpn* I 和 *Hind*III 酶切
Genome DNA of lily was digested with *Bam*H I (B), *Eco*R I (EI), *Eco*R V (EV), *Xba* I (X), *Kpn* I (K) and *Hind*III(H), respectively

图 4 百合 *LFY*类基因的拷贝数分析

Fig. 4 Analysis of *LFY* family genes in lily

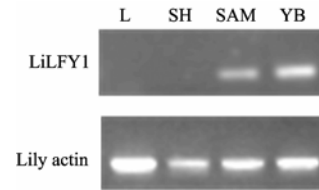


图 5 *LiLFY1* 基因在百合叶片 (L)、茎 (SH)、茎端分生组织 (SAM) 和幼嫩花芽 (YB) 中的表达

Fig. 5 Expression of *LiLFY1* in lily leaves (L), shoots (SH), shoot apical meristem (SAM) and young buds (YB)

3 讨论

3.1 *LiLFY1* 基因编码百合的 LFY 类蛋白

笔者应用 RT-PCR 和 RACE 的策略成功地克隆了百合的 *LFY* 类基因。由于百合基因组较大，为拟南芥基因组的 250 倍，水稻基因组的 9 倍^[19]，同时在百合中存在两个拷贝的 *LFY* 类基因，普通 PCR 扩增往往会有非特异性扩增。因此笔者采用了设计长的基因特异引物和 touchdown PCR 的方法，增强了 PCR 扩增的特异性，得到了 *LiLFY1* 基因的全长 cDNA。

对 *LiLFY1* 基因的分析发现，*LiLFY1* 编码的蛋白具有 LFY 结构域，是 LFY 类转录因子。与已克隆的 LFY 类蛋白的同源性分析表明，*LiLFY1* 与单子叶植物水稻和玉米的 LFY 类蛋白具有更高的同源性，三者聚为一个分支，与双子叶植物的 LFY 类蛋白和裸子植物银杏的 LFY 类蛋白为并列的分支，这与其单子叶植

物的分类地位表现一致,表明随着单子叶植物和双子叶植物的进化,*LFY*类基因的结构也在分化。

3.2 *LFY*类基因在百合中有两个拷贝

迄今为止,在很多作物上已经克隆了*LFY*类同源基因,但在不同作物中*LFY*类基因的拷贝数存在差异。*LFY*类基因的拷贝数呈现越高等的作物中*LFY*基因的拷贝数越少的规律。其中裸子植物中一般有2个拷贝,二倍体被子植物一般有1个拷贝。在模式植物拟南芥和水稻中,*LFY*基因都只有1个拷贝。但是随着对更多作物的*LFY*类基因的分析发现,这个规律并不是普遍适用的。其中高等被子植物苹果中有2个拷贝的*LFY*类基因^[20]。*LFY*基因的拷贝数与作物的染色体的倍性也有关系,在二倍体烟草中*LFY*基因有1个拷贝,但在四倍体烟草中*LFY*基因有2个拷贝^[21]。根据本文Southern杂交的结果,二倍体百合中有2个拷贝的*LFY*类基因。

3.3 *LiLFY1*在百合的茎端分生组织和幼嫩花芽中表达

*LFY*类基因的表达模式在不同植物中也有差异。金鱼草的*FLO*基因只在花原基和花中表达,而在营养生长的叶片中不表达^[22];拟南芥的*LFY*基因在营养生长的叶片和生殖生长的花序和花芽中都表达,并且在开花前呈现表达量逐渐提高的趋势。在花序分生组织产生后表达量最高;在苹果中,*AFL1*基因只在花芽中表达,但是*AFL2*在营养生长的根、茎、叶片及生殖生长的花芽中都表达;单子叶植物水稻的*LFY*类基因*RFL*,只在水稻的花序中表达,而在营养生长的叶片和生殖生长的小花中都不表达;在裸子植物辐射松中,*NLY*基因在营养生长器官中表达,包括茎、松针等,而*PRFLL*在营养生长器官和生殖生长器官中都表达,且在生殖生长的雄果球原基中表达最高^[23,24];银杏的双拷贝*LFY*同源基因*Ginlfy*和*GinNdy*呈现不同的表达模式,前者在银杏幼树,成年雌株和雄株的根茎叶及花芽幼果中都表达,而后者除在花芽中表达外,还在幼树和成年的雌株和雄株的叶片中表达,而在其它器官中不表达^[25]。

虽然在各种作物中,*LFY*类基因的拷贝数和表达模式存在差异,但是在所有作物中,至少有1个拷贝的*LFY*类基因在花序或花芽中表达,这与*LFY*类基因促进开花和生殖生长的功能是对应的。百合的*LiLFY1*基因在幼嫩花芽和顶端分生组织中表达而在成熟的叶片和茎中不表达,可能与*LiLFY*基因的促进开花和维持花分生组织活性的功能有关。

3.4 *LiLFY1*基因应用于百合基因工程的潜力

*LFY*类基因有着广泛的功能,首要的功能是促进营养生长向生殖生长的转变,即影响作物的成花转变^[26,27],笔者克隆了百合的*LiLFY1*基因,根据*LiLFY1*的表达模式和*LFY*类基因在调控开花时间上的功能保守性,笔者推测*LiLFY1*基因对调控百合开花起着重要的作用。目前基于基因改造和遗传转化的基因工程技术已经应用于作物的品种改良和生产,通过基因工程技术将*LiLFY1*基因在百合中过表达,将有可能使百合的开花提前,从而促进百合的分子育种和繁殖生产。

4 结论

本研究从百合中克隆得到了调控开花时间的*LFY*类基因的同源基因*LiLFY1*,蛋白序列同源性分析表明*LiLFY1*蛋白与已克隆的*LFY*类蛋白有很高的同源性,其中与单子叶植物水稻和玉米的*LFY*类蛋白具有更高的同源性,这与其作为单子叶植物的分类地位是一致的。在二倍体百合中有2个拷贝的*LFY*类基因。*LiLFY1*基因在百合的幼嫩花芽和顶端分生组织中表达,而在根、茎、成熟的叶片和成熟花的各轮器官中不表达,这与其可能的调控开花时间的功能是相对应的。

References

- [1] Blazquez M A, Soowal L N, Lee I, Weigel D. LEAFY expression and flower initiation in *Arabidopsis*. *Development*, 1997, 124: 3835-3844.
- [2] Bernier G. The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1988, 39: 17-20.
- [3] Putterill J. Flowering in time: genes controlling photoperiodic flowering in *Arabidopsis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 2001, 356: 1761-1767.
- [4] Mouradov F, Coupland G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell*, 2002, 14(Suppl.): 111-130.
- [5] Hempel F D, Weigel D, Mandel M A, Ditta G, Zambryski P C, Feldman L J, Yanofsky M F. Floral determination and expression of floral regulatory genes in *Arabidopsis*. *Development*, 1997, 124: 3845-3853.
- [6] Levin J Z, Meyerowitz E M. UFO: an *Arabidopsis* gene involved in both floral meristem and floral organ development. *The Plant Cell*, 1995, 7: 529-548.
- [7] Mandel M A, Yanofsky M F. A gene triggering flower formation in

- Arabidopsis*. *Nature*, 1995, 377: 522-524.
- [8] Blazquez M A, Weigel D. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature*, 2000, 404: 889-892.
- [9] Schultz E A, Haughn G W. LEAFY, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1991, 3: 771-781.
- [10] Weigel D, Alvarez J, Smyth D R, Yanofsky M F, Meyerowitz E M. LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 1992, 69: 843-859.
- [11] Busch M A, Bomblies K, Weigel D. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 585-587.
- [12] Lee I, Wolfe D S, Nilsson O, Weigel D. A LEAFY co-regulator encoded by UNUSUAL FLORAL ORGANS. *Current Biology*, 1997, 7: 95-104.
- [13] Wagner D, Sablowski R W, Meyerowitz E M. Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science*, 1999, 285: 582-584.
- [14] 马月萍, 陈凡, 戴思兰. 植物 LEAFY 同源基因的研究进展. 植物学通报, 2005, 22(5): 605-613.
Ma Y P, Chen F, Dai S L. Studies of LEAFY homologue genes in higher plants. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, 22(5): 605-613. (in Chinese)
- [15] Kelly A J, Bonnländer M B, Meeks-Wagner D R. NFL, the tobacco homolog of FLORICAULA and LEAFY, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *The Plant Cell*, 1995, 7: 225-234.
- [16] Kyojuka J, Konishi S, Nemoto K, Izawa T, Shimamoto K. Down-regulation of RFL, the FLO/LFY homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95: 1979-1982.
- [17] Sliwinski M K, White M A, Maizel A, Weigel D, Baum D A. Evolutionary divergence of LFY function in the mustards *Arabidopsis thaliana* and *Leavenworthia crassa*. *Plant Molecular Biology*, 2006, 62: 279-289.
- [18] Clark M S 主编. 顾红雅, 瞿礼嘉主译. 植物分子生物学实验手册. 北京: 高等教育出版社, 1998.
Clark M S (ed). Gu H Y, Qu L J (translated). *Molecular Biology of Plants-Manual for Experiment*. Beijing: Higher Education Press, 1998. (in Chinese)
- [19] 杨勇, 陈克成, 孙天恩. 对几种百合科植物基因组大小的评价. 武汉植物学研究, 1996, 14(3): 199-203.
Yang Y, Chen K C, Sun T E. Evaluation on the genome of several liliaceous plants. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1996, 14(3): 199-203. (in Chinese)
- [20] Wada M, Cao Q F, Kotoda N, Soejima J, Masuda T. Apple has two orthologues of FLORICAULA/LEAFY involved in flowering. *Plant Molecular Biology*, 2002, 49: 567-577.
- [21] Ahearn K P, Johnson H A, Weigel D, Wagner D R. NFL1, a *Nicotiana tabacum* LEAFY-like gene, controls meristem initiation and floral structure. *Plant Cell Physiology*, 2001, 42: 1130-1139.
- [22] Coen E S, Romero J M, Doyle S, Elliot R, Murphy G, Carpenter R. Floricaula: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell*, 1990, 63: 1311-1322.
- [23] Mellerowicz E J, Horgan K, Walden A, Coker A, Walter C. PRFL-a *Pinus radiata* homologue of FLORICAULA and LEAFY is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia. *Planta*, 1998, 206: 619-629.
- [24] Mouradov A, Glassick T, Hamdorf B, Murphy L, Fowler B, Marla S, Teasdale R D. NEEDLY, a *Pinus radiata* ortholog of FLORICAULA/LEAFY genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95: 6537-6542.
- [25] 郭长禄, 陈力耕, 何新华, 戴正, 袁海英. 银杏 LEAFY 同源基因的时空表达. 遗传, 2005, 27(2): 241-244.
Guo C L, Chen L G, He X H, Dai Z, Yuan H Y. Expressions of LEAFY homologous genes in different organs and stages of *Ginkgo biloba*. *Hereditas*, 2005, 27(2): 241-244. (in Chinese)
- [26] He Z, Zhu Q, Dabi T, Li D, Weigel D, Lamb C. Transformation of rice with the *Arabidopsis* floral regulator LEAFY causes early heading. *Transgenic Research*, 2000, 9: 223-227.
- [27] Wei H, Meilan R, Brunner A M, Skinner J S, Ma C, Strauss S H. Transgenic sterility in *Populus*: expression properties of the poplar PTLF, *Agrobacterium* NOS and two minimal 35S promoters in vegetative tissues. *Tree Physiology*, 2006, 26: 401-410.

(责任编辑 曲来娥)