



陆地棉 MADS-box 基因 *GhMADS13* 的功能分析

江苏城, 宋美珍, 庞朝友, 魏恒玲, 范术丽*, 喻树迅*

(中国农业科学院棉花研究所 / 棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 455000)

摘要: 为了研究 *GhMADS13* 的功能, 利用 NCBI 上提交的序列设计引物进行 PCR 扩增, 扩增序列与提交序列的 ORF (Open reading frame) 的一致性为 100%。qRT-PCR 结果表明: 棉花的各个组织中, *GhMADS13* 在花中的表达量最高, 是表达量低的根的几百倍; 花器官中 *GhMADS13* 在萼片、花瓣、雄蕊、心皮和胚珠中都有表达, 表达量虽有差异, 但差异不大, 其在胚珠中的表达量最高。将 *GhMADS13* 插入到 pBI121 载体上, 构建了植物超表达载体。通过浸花法转化拟南芥, 获得了 2 个转基因株系, 分子检测和表型数据统计的结果表明 *GhMADS13* 的转录水平越高植株越矮小, 角果的长度越短, 种子的数目越少。根据 *GhMADS13* 的 qRT-PCR 结果和异位表达分析, 推测 *GhMADS13* 主要抑制胚珠的发育。

关键词: 陆地棉; MADS-box; *GhMADS13*; 转基因

中图分类号: S562.035 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2013)05-0377-05

Analysis of Transgenic *Arabidopsis thaliana* with the *Gossypium hirsutum* L. MADS-box Gene *GhMADS13*

JIANG Su-cheng, SONG Mei-zhen, PANG Chao-you, WEI Heng-ling, FAN Shu-li*, YU Shu-xun*

(Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences / State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: *GhMADS13*, whose primer designed according to submitted sequence, was obtained by PCR with the 100% identity to explore its function. qRT-PCR in different tissues revealed that *GhMADS13* had the highest expression level in the flower, and this was hundreds of times greater than root with the lowest expression level. *GhMADS13* was expressed in all floral organs, and expression levels in the sepal, petal, stamen, carpel, ovule were little different, and ovule had the highest expression level. *GhMADS13* was inserted into a pBI121 vector, and a plant over-expression vector was constructed successfully. Two lines of transgenic *Arabidopsis* were obtained by floral-dipping. The results of the molecular detection and phenotypic data showed that the *Arabidopsis* plants with high expression levels of *GhMADS13* were shorter, and produced less seeds and siliques. Based on the qRT-PCR results and the analysis of ectopic expression, we deduce *GhMADS13* mainly negatively regulates ovule development.

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; MADS-box; *GhMADS13*; transgenic gene

MADS-box 基因是真核生物中一类重要的转录调控因子, 在生长发育调控和信号传导中发挥着重要作用, 在动物、植物、真菌中都存在^[1]。在植物中 MADS-box 基因参与花器官的发育、开花时间的调节, 在果实、根、茎、叶的发育中也起作用。但关于 MADS-box 研究最多的是其参与花器官发育的作用。关于花器官发育的遗传控制机理, 最著名的就是 Coen 和 Meyerowitz 提出的 ABC 模型^[2], 即花器官是由 A, B 和 C 三类器官

特征基因共同表达的结果, 后经补充发展为 ABCDE 模型。开花植物的花大多具有由外到内的四轮结构: 萼片、花瓣、雄蕊、心皮, 后来又提出胚珠是一轮花器官。ABCDE 模型简单解释为: A+E 控制萼片, A+B+E 控制花瓣, B+C+E 控制雄蕊, C+E 控制心皮, D+E 控制胚珠发育^[3-8]。

关于棉花 (*Gossypium*) 花发育的研究不多, 吴东等^[9] 从中棉所 36 (CCRI 36) 花发育期均一化全长 cDNA 文库中获得 1 个与拟南芥 (*Arabidopsis*)

收稿日期: 2013-01-28 **作者简介:** 江苏城 (1987-), 女, 在读硕士, 18737295878, suchengjiang@163.com * 通讯作者: 范术丽, fansl@cricaas.com.cn; 喻树迅, yu@cricaas.com.cn

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2011AA10A102); 国家棉花产业技术体系 (CARS-18)

AGL6 高度同源的调控基因 *GhMADS13*。*AGL6* (*AGAMOUS like 6*) 及其同源基因都属于 MADS-box 家族 AP1/AGL9 组,为属于 E 类基因的 *SEP* 的姊妹群^[10]。而且 *AGL6* 与 *SEPs* 的蛋白互作模式相似,说明 *AGL6* 可能与 *SEPs* 具有相似的功能^[11]。为进一步研究 *GhMADS13* 功能,作者开展了进一步的表达分析和构建了植物超表达载体,并且成功获得了转基因拟南芥植株。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为短季棉品种中棉所 36 (CCRI 36),于 2012 年种植于中国农业科学院棉花研究所老所部试验地(河南安阳),分别取棉花盛花期的根、茎、叶、花、顶芽等不同组织,棉花开花后 10 d 的纤维和胚珠及开花当天的萼片、花瓣、雄蕊、心皮,在液氮中速冻,-80 °C 冰箱保存备用。所用拟南芥的生态型为 Columbia (Col-0)。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 的制备

总 RNA 的提取根据北京天根植物总 RNA 提取试剂盒说明书操作。总 RNA 经反转录制备 cDNA 第一链,按照 Invitrogen 公司 SuperScriptIII First-Strand Synthesis System Kit 说明书操作。

1.3 基因的克隆与鉴定

根据 NCBI 上提交的 *GhMADS13* 序列设计引物,上游引物:5'-ATGGGGAGAGGAAGAGT-GGA-3',下游引物:5'-TCAAATGACCCATCGT-GGAT-3'。PCR 扩增,回收目标条带,连接 pGEM T-easy 载体,将阳性克隆送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序验证。

1.4 荧光定量 PCR

以各棉花组织样品的 cDNA 为模板,用荧光定量试剂盒 SYBRgreen PCR (Roche) 对 *GhMADS13* 进行表达分析,其荧光定量的特异性引物:上游 5'-AAGACCTCCGTAAAAAGGAGC-3',下游 5'-ATGCAGAGGAAAGTTGCTA-GTT-3'。使用的棉花 ACTIN 上游引物为 5'-ATCCTCCGTCTTG-ACCTTG-3',下游引物为 5'-TGTCCTCAGG-CAACTCAT-3'。分析仪器为 Applied biosystems 7500 real time PCR system,并且采用相对定量 $\Delta\Delta C_t$ 法分析其结果。

1.5 表达载体的构建

应用 Clontech 公司的 Infusion 在线引物设计

软件 (http://www.clontech.com/US/Support/xxclt-onlineToolsLoad.jsp?citemId=https://www.takara-bio.co.jp/infusion_primer/infusion_primer_form.php§ion=16260&xxheight=1800) 设计 Infusion 引物,其上游引物序列:5'-CACGGGGGACTCTA-GAATGGGGAGAGGAAGAGTGGA P-3',下游引物序列:5'-ATGTTTGAACGATCGAGCTCT-CAAATGACCCATCCGTGGAT-3'。扩增目的片段并回收纯化,同时用限制性内切酶 Sac I 和 Xba I 双酶切植物表达载体 pBI121 质粒,按照 In-fusion 快速连接试剂盒说明书进行连接,转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α ,之后筛选阳性克隆并测序验证后转化农杆菌 (*Agrobacterium*) LBA4404 用于转基因研究。

1.6 转基因拟南芥植株的获得

拟南芥植株在长日照条件下(16 h 光照 +8 h 黑暗)生长至盛花期时用于转化。将含有重组质粒的农杆菌接种于 5 mL LB 培养基(含 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Rif, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Kan, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Str) 中,于 28 °C 下振荡培养过夜,按 1:50 的比例转接至 100 mL 含有相同抗生素的 LB 培养基中,培养至 A_{600} 为 1.2~1.6。收集菌体,重悬于渗入缓冲液(1/2 MS, 5% 蔗糖, 0.025% Silwet L-77),调 A_{600} 至 0.8 左右,通过浸花法(60 s)转化拟南芥^[12]。将 T_0 代拟南芥种子表面消毒后播种于含 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kan 的 1/2 MS 固体培养基上。筛选的抗性植株移栽至土中,于长日照条件下(16 h 光照 +8 h 黑暗)生长。收获的 T_1 代植株的种子继续播种于含 Kan 的 1/2 MS 固体培养基上,于长日照下生长;获得的 T_2 代植株,在播种后 8 周观察并统计其表型。

1.7 转基因植株的分子鉴定

提取盛花期的转基因拟南芥植株和野生型植株的 RNA,将其反转录得到的 cDNA 作为模板。通过荧光定量 PCR 检测 *GhMADS13* 的转录水平,使用的内参为拟南芥的 *tublin* 基因,分析方法为 ΔC_t 法,即其转录水平是相对于 *tublin* 的转录水平。*Tublin* 的上游引物为 5'-ACCAAGCC-GAAGAAGATCAA-3',下游引物为 5'-CGCCAT-GAAAGTCCCAG-3'。

2 结果与分析

2.1 *GhMADS13* 的克隆与分析

根据 NCBI 上提交的 *GhMADS13* 序列设计

引物进行 PCR 扩增,测序得到的结果表明它有 732 bp,与提交序列的 Identity 为 100%,因此可以用于 *GhMADS13* 的转基因试验。

2.2 *GhMADS13* 的表达分析

2.2.1 *GhMADS13* 的时空表达分析。采用荧光定量 RT-PCR 分析 *GhMADS13* 基因在棉花不同组织中的表达情况,图 1 的结果表明,*GhMADS13* 基因在棉花的根、茎、叶、纤维中表达量很低,在顶芽中表达量较高,在花中的表达量最高,是根中表达量的数百倍。

2.2.2 *GhMADS13* 的花器官表达分析。荧光定量分析 *GhMADS13* 在棉花花器官中的表达,结果(图 2)表明,*GhMADS13* 在萼片、花瓣、雄蕊、心皮、胚珠中都有表达,在胚珠的表达量最高,其次是萼片和心皮,表达量较低的是花瓣和雄蕊。

2.3 *GhMADS13* 的转基因植株的表型分析

通过浸花法得到了 2 个 *GhMADS13* 的转基因拟南芥株系,每个株系各获得 48 株,随机挑选 20 株统计其和 20 株野生型的开花时间、株高、角果长度和每个角果里的种子数,分别计算每种表

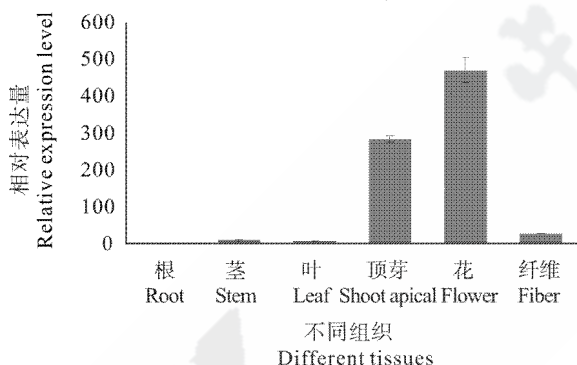


图 1 *GhMADS13* 在棉花不同组织中的表达

Fig. 1 Relative expression level of *GhMADS13* in different tissues

型中这 20 个数据的平均值,然后再计算每种表型数据的标准偏差(STDEV)。结果(表 1)表明野生型和转基因植株的开花时间相差比较小,2 个转基因株系的角果的长度和角果里种子的数目都比野生型的少,而且株高也比野生型的低。从图 3 可以看出 2 个转基因株系长的都比较弱小,特别是株系 2,茎干细、叶子小。野生型的莲座叶(图 4A)和转基因株系 1 的莲座叶(图 4B)都是展平的,转基因株系 2 的莲座叶(图 4C)却又一定程度卷曲。野生型和茎生叶(图 4D)和株系 1 的茎生叶(图 4E)都会长出侧枝,而株系 2(图 4F)的茎生叶中不长侧枝。

2.4 转基因植株的分子检测

图 5 展示了 *GhMADS13* 在野生型拟南芥和转基因植株中转录水平,结果表明 *GhMADS13* 在野生型中无转录,在转基因植株中的转录水平比内标基因 *tublin* 高,而且株系 2 中的转录水平比株系 1 中的高。说明 *GhMADS13* 已被成功地转入了转基因株系 1 和 2,但转录水平有差异。

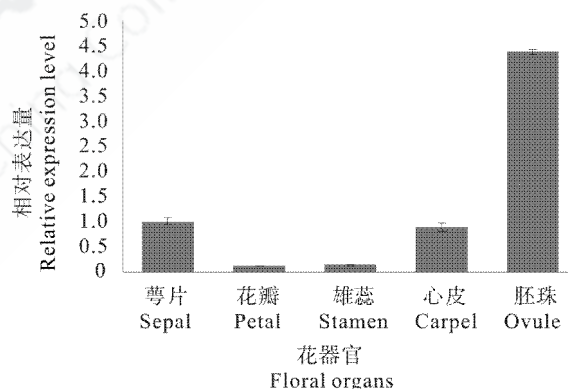


图 2 *GhMADS13* 在棉花花器官中的表达

Fig. 2 Relative expression level of *GhMADS13* in floral organs

表 1 *GhMADS13* 的转基因植株表型的统计分析

Table 1 Statistic data of transgenic *Arabidopsis* of *GhMADS13*

	开花时间 Flowering time /d	株高 Height /cm	角果长度 The length of silique /cm	种子数 The number of seed
WT	35.45±1.37	24.85±2.77	1.34±0.05	39.50±5.75
L1	36.28±2.69	18.30±1.65***	1.00±0.17***	34.71±7.95
L2	33.74±3.14	12.90±2.29***	0.84±0.09***	29.11±3.98**

注:WT:野生型拟南芥;L1:转基因株系 1;L2:转基因株系 2;种子数:每个角果里的种子数;“±”前面的数据表示每种表型数据的平均值,后面的数据表示是其相应的标准偏差;**表示与野生型相比在 0.05 置信水平上的显著差异,***表示与野生型相比在 0.001 置信水平上的显著差异,所用分析软件为 SigmaStat。

Note: WT, L1, L2 represent wild type of *Arabidopsis*, line one and two of transgenic *Arabidopsis*, respectively, and number of seeds means seeds in one silique; the date before "±" represents the average of each phenotypic data, the date after ± represents corresponding STDEV; ** Values significantly different from WT at 0.05 confidence level, *** Values significantly different from WT at 0.001 confidence level, the used software is SigmaStat.



注: WT、L1、L2 分别表示野生型拟南芥、转基因株系 1 和 2。

Note: WT, L1, L2 represent wild type of *Arabidopsis*, line 1 and 2 of transgenic *Arabidopsis*, respectively.

图 3 GhMADS13 的转基因植株的表型

Fig. 3 Phenotype of transgenic *Arabidopsis* of GhMADS13



注: WT、L1、L2 分别表示野生型拟南芥、转基因株系 1 和 2。

Note: WT, L1, L2 represent wild type of *Arabidopsis*, line 1 and 2 of transgenic *Arabidopsis*, respectively.

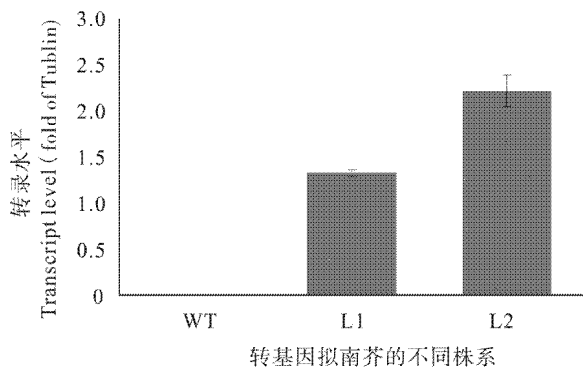
图 4 GhMADS13 的转基因植株的局部表型

Fig. 4 Local phenotype of transgenic *Arabidopsis* of GhMADS13

3 讨论

GhMADS13 的时空表达显示其在花中的表

达量最高,在顶芽中的表达量其次,而在根、茎、叶和纤维中的表达量很低, 研究结果初步说明其主要是参与花发育的调节。GhMADS13 是ABCDE



注: WT、L1、L2 分别表示野生型、转基因株系 1 和 2。
Note: WT, L1, L2 represent wild type of *Arabidopsis*,

line 1 and 2 of transgenic *Arabidopsis*, respectively.

图 5 *GhMADS13* 的转基因植株的分子检测

Fig. 5 Molecular detection of transgenic *Arabidopsis* of *GhMADS13*

模型中的 E 类基因 *SEP* 的姊妹群^[10], 而 E 类基因在花器官形成中扮演的角色是: A+E 控制萼片, A+B+E 控制花瓣, B+C+E 控制雄蕊, C+E 控制心皮, D+E 控制胚珠发育^[3-8]。图 2 显示了 *GhMADS13* 在萼片、花瓣、雄蕊、心皮和胚珠中均有表达, 最高的表达量(胚珠)和最低的表达量(花瓣)与萼片的表达相差 5 倍左右, 相差不大。结果表明 *GhMADS13* 可能参与萼片、花瓣、雄蕊、心皮和胚珠的形成。表 1 的结果显示了野生型拟南芥和转基因植株的开花时间相近, 但是株高、角果长度和每个角果里的种子数目相差很大, 转基因株系 1 和 2 的植株高度都比野生型的低, 角果的长度都比野生型的短, 种子的数目都比野生型的少。从图 5 可以看出 *GhMADS13* 在野生型拟南芥中无转录, 在转基因株系 2 中转录水平最高, 在株系 1 中其次。结合表 1 和图 5, 显示 *GhMADS13* 的转录水平越高, 植株越矮小, 角果的长度越短, 种子的数目越少, 说明 *GhMADS13* 可能抑制胚珠的发育。在拟南芥中, *AGL6* 促进植株开花和涉及花器官中的同源器官的转换^[13]。近年来外源 *AGL6* 类基因在拟南芥中的异位表达的结果显示其与拟南芥的 *AGL6* 有相似的功能, 例如文心兰 (*Oncidium*)^[14] 和风信子 (*Hyacinthus orientalis* L.)^[15]。棉花中的 *GhMADS13* 的异位表达结果表明它可能不参与开花时间的调控, 主要抑制胚珠的发育。

胚珠的发育是一个复杂的过程, 由花器官形成 ABCDE 模型中的 D 类和 E 类基因共同决定。本研究只是说明 *GhMADS13* 参与胚珠的发育, 但其调控胚珠发育的机制需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] MESSENGUY F, Dubois E. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development[J]. *Gene*, 2003, 316(1): 1-21.
- [2] COEN E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development[J]. *Nature*, 1991, 353(6339): 31-37.
- [3] SCHWARZ-SOMMER Z, Huijser P, Nacken W, et al. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*[J]. *Science*, 1990, 250(4983): 931-936.
- [4] BOWMAN J L, Smyth D R, Meyerowitz E M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*[J]. *Development*, 1991, 112(1): 1-20.
- [5] WEIGEL D, Meyerowitz E M. The ABCs of floral homeotic genes[J]. *Cell*, 1994, 78(2): 203-209.
- [6] ANGENENT G C, Colombo L. Molecular control of ovule development[J]. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(7): 228-232.
- [7] PELAZ S, Ditta G S, Baumann E, et al. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes[J]. *Nature*, 2000, 405(6783): 200-203.
- [8] THEIBEN G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(1): 75-85.
- [9] 吴东, 喻树迅, 范术丽, 等. 棉花 MADS-box 蛋白基因 (*GhMADS13*) 的克隆和表达分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(2): 223-228.
WU Dong, Yu Shu-xun, Fan Shu-li, et al. Cloning and expression analysis of a MADS-box protein gene (*GhMADS13*) from upland cotton [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(2): 223-228.
- [10] MA H, Yanofsky M F, Meyerowitz E M. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes [J]. *Genes & Development*, 1991, 5(3): 484-495.
- [11] ALVAREZ-Buylla E R, Pelaz S, Liljegren S J, et al. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2000, 97(10): 5328-5333.
- [12] CLOUGH S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* - mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [13] KOO S C, Bracko O, Park M S, et al. Control of lateral organ development and flowering time by the *Arabidopsis thaliana* MADS - box Gene *AGAMOUS - LIKE6* [J]. *The Plant Journal*, 2010, 62(5): 807-816.
- [14] HSU H F, Huang C H, Chou L T, et al. Ectopic expression of an orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AGL6-like* gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44(8): 783-794.
- [15] FAN Jin-hui, Li Wen-qiong, Dong Xin-chun, et al. Ectopic expression of a hyacinth *AGL6* homolog caused earlier flowering and homeotic conversion in *Arabidopsis* [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2007, 50(5): 676-689. ●