

# 超量表达 *PMADS20-SRDX* 的矮牵牛花瓣和雌蕊出现异位表皮毛和气孔

郭余龙, 余勇, 杨子, 秦小婷, 马婧, 韩垚, 杨霞, 李名扬\*

(西南大学园艺园林学院, 重庆市花卉工程技术研究中心, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:** 以矮牵牛(*Petunia hybrida*)花序 cDNA 为模板, 利用 EST 数据库信息, 克隆了一个 MADS-box 基因编码区序列, GenBank 登录为 *PMADS20* (GU129907)。进化树分析表明, *PMADS20* 属 StMADS11 亚家族 SVP 分支, 与番茄和辣椒的 *JOINTLESS* 基因氨基酸序列相似性最高。定量 PCR 检测结果表明, *PMADS20* 在矮牵牛营养器官中的表达量高, 在花中的表达量低。构建了 *PMADS20* 的超量表达载体 (35S: *PMADS20*) 和 CRES-T (Chimeric Repressor Gene Silencing Technology) 载体 (35S: *PMADS20-SRDX*)。35S: *PMADS20* 和 35S: *PMADS20-SRDX* 转基因矮牵牛的花器官表型变化相似, 花萼增大, 花瓣和雌蕊出现营养器官特征, 但 35S: *PMADS20-SRDX* 的变化更为明显。扫描电镜观察显示, 35S: *PMADS20-SRDX* 转基因花瓣下表皮的表皮毛增多, 并有气孔分布; 子房和花柱表面为表皮毛覆盖, 呈现超量表达 *UNHAVEN* 的矮牵牛牛皮的特征, 并且有气孔分布。35S: *PMADS20* 转基因植株株形无明显变化, 35S: *PMADS20-SRDX* 植株花序的节间较野生型短。

**关键词:** 矮牵牛; StMADS11 亚家族; *PMADS20*; 花器官发育

**中图分类号:** S 681.6

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 03-0509-12

## Over-expressing *PMADS20-SRDX* Repressor Leads to the Formation of Ectopic Trichome and Stoma on Petals and Pistils in *Petunia*

GUO Yu-long, YU Yong, YANG Zi, QIN Xiao-ting, MA Jing, HAN Yao, YANG Xia, and LI Ming-yang\*

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing Engineering Research Center for Floriculture, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Based on EST sequence data analysis, *PMADS20* (GU129907) was cloned from *Petunia hybrida* by PCR using inflorescence cDNA as template. Phylogenetic analysis shows that *PMADS20* belongs to SVP clade of StMADS11 subfamily and is most closely related to tomato and pepper *JOINTLESS*. qRT-PCR analysis indicated that *PMADS20* mRNA accumulated high level in vegetative organs, and low level in flowers. Vectors of over-expressing *PMADS20* and *PMADS20-SRDX* were constructed. When they were introduced into petunia using *Agrobacterium*-mediated transformation method, both 35S: *PMADS20* and 35S: *PMADS20-SRDX* transgenic floral organs exhibited leaf-like characteristics. However, the alterations of 35S: *PMADS20-SRDX* flowers were more severe than that of the 35S: *PMADS20*

收稿日期: 2013-10-25; 修回日期: 2014-01-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272199)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: limy@swu.edu.cn)

flowers. The 35S:PMADS20-SRDX petals and pistils showed the unshaven floral phenotype which characterized by ectopic trichome and stoma formation on adaxial side of petals and the surface of ovaries and styles. The results suggest that PMADS20 functions in flower development by transcriptional suppression. Constitutive expression of *PMADS20* did not lead to obvious changes in plant stature, while the internodes of 35S:PMADS20-SRDX transgenic inflorescences were shorter than that of the wild type. These results suggest that *PMADS20* may function differently between in petunia inflorescence internode and flower development.

**Key words:** petunia; StMADS11 subfamily; *PMADS20*; floral organ development

植物 MADS-box 基因家族编码的蛋白具有一个高度保守的与 DNA 结合的 MADS 结构域, 是一类重要的转录调控因子。除在开花时间调控、花分生组织和花器官决定、配子发育、果实形成和种子发育等生殖过程中发挥作用外, MADS-box 基因还参与根和叶的发育、植物激素应答、春化和衰老等过程, 在植物生命活动的各个主要方面发挥作用 (Gramzow & Theissen, 2010; Smaczniak et al., 2012)。

进化树分析将植物 MADS-box 基因分成多个亚家族, 同一亚家族的基因通常具有相似的序列和表达模式, 发挥的功能也存在一定的关系 (Becker & Theissen, 2003)。StMADS11 亚家族根据最先在马铃薯中克隆的 *StMADS11* 和 *StMADS16* 命名, 这两个基因主要在营养器官表达 (Carmona et al., 1998), 超量表达 *StMADS16* 的转基因烟草花序长度和花朵数增加, 并使花具有营养器官特征 (García-Maroto et al., 2000)。目前对几个物种的 StMADS11 亚家族基因的功能研究已有报道。拟南芥 StMADS11 亚家族有 *SVP* 和 *AGL24* 两个成员, 它们在所有分生组织中都有表达, 与从营养生长向生殖生长的转变有关, *SVP* 抑制开花, *AGL24* 促进开花 (Hartmann et al., 2000; Yu et al., 2002; Gregis et al., 2006), 它们与 *SOCI* 基因一起对 B 类和 C 类花器官决定基因的表达发挥冗余的抑制作用 (Liu et al., 2009)。金鱼草 *INCOMPOSITA* (*INCO*) 在营养生长和生殖生长阶段的各器官中都有表达, 抑制小苞片的形成, 并与花分生组织决定的调控有关, 突变不影响开花时间, 但在拟南芥中超量表达延迟开花 (Masiero et al., 2004)。番茄 *JOINTLESS* 在多种组织中表达, 在花梗离区的形成中发挥作用, 突变后完全抑制花梗离区的形成, 并改变植株有限生长方式, 使花序分生组织形成 1~2 朵花后退回营养生长状态 (Mao et al., 2000)。辣椒的 *CaJOINTLESS* 在茎尖分生组织中发挥营养生长抑制因子的作用, 促进开花 (Cohen et al., 2012)。酸浆 *MPF1* 具有调控开花时间、种子发育和株形的作用 (He et al., 2010); *MPF2* 基因促进细胞分裂抑制细胞伸长, 与该属植物的花萼膨大性状和雄蕊的育性有关 (He & Saedler, 2005, 2007)。枳的 *PtSVP* 在茎尖分生组织的功能可能是维持其发育而非抑制花的起始 (Li et al., 2010)。猕猴桃的 *SVP* 同源基因可能与芽的休眠和开花有关 (Wu et al., 2012)。大麦的 *Barley MADS1* (*BM1*)、*BM10* 异位表达有抑制花分生组织决定的作用 (Trevaskis et al., 2007)。水稻 StMADS11 亚家族的 *OsMADS22*、*OsMADS47* 和 *OsMADS55* 在芽的发育和芸藿素内脂信号传导过程中发挥作用 (Fornara et al., 2008; Lee et al., 2008)。这些结果表明, StMADS11 亚家族基因的功能在物种间具有多样性。

在拟南芥和烟草中超量表达外源基因是研究 StMADS11 亚家族基因中经常使用的技术。研究结果显示, 超量表达 StMADS11 亚家族基因对开花时间的影响因所用目的基因不同而有差异, 但对花器官的影响较为一致, 即花器官程度不同地向营养器官转化, 并且当外源 *StMADS11* 类基因的表达足够强时, 转基因拟南芥花的中央、萼片与花瓣之间会有另外的花或花序形成 (Masiero et al., 2004; Fornara et al., 2008; Li et al., 2010; Shin et al., 2011; Lee et al., 2012; Wu et al., 2012; Khan et al., 2013)。

尽管 StMADS11 亚家族基因的功能受人关注, 但除拟南芥外, 对其它物种中该类基因发挥作用的机制缺少研究。矮牵牛是栽培最为广泛的盆栽和花坛观赏植物之一, 也是开展观赏性状研究的模式材料。StMADS11 亚家族基因可能调控矮牵牛开花时间和花器官发育两个与观赏性密切相关的重要性状, 但目前尚未见对矮牵牛 StMADS11 亚家族基因的研究报道。本试验旨在克隆矮牵牛 StMADS11 亚家族基因的新成员, 对其表达和序列进化进行分析, 利用超量表达和 CRES-T 基因沉默技术研究其功能。研究结果对认识 StMADS11 亚家族基因在不同物种间的功能差异及其对矮牵牛观赏性状的影响具有意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料、菌株与质粒

试验于 2009 年 7 月—2013 年 8 月于西南大学花卉研究所进行。矮牵牛品种‘地毯·紫青’的种子购自农友种苗(中国)有限公司; 自交系‘Mitchel Diploid (MD)’系新西兰 David Lewis 博士惠赠。植物材料种植于西南大学试验农场大棚。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和农杆菌株 GV3101 由本实验室保存, 植物表达载体 pGreen II 0229 由福建农林大学许莉萍教授惠赠。载体 pMD19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。辅助载体 pMF500 以 pUC18 为基础构建(王会平等, 2012), 含有源自 pSAT6 (Tzfira et al., 2005) 的  $2 \times 35S$ -TL 启动子区和终止子序列, 在  $2 \times 35S$ -TL 和终止子序列之间及两端为多克隆位点。

### 1.2 PMADS20 基因的克隆及序列分析

取‘地毯·紫青’的花序(0.5 cm 长的花蕾及苞叶), 用 RNAPrep pure 植物总 RNA 提取试剂盒(天根)提取总 RNA, 并根据试剂盒的程序用 DNAaseI 进行处理。用 DU<sup>®</sup>730 (BECKMAN) 分光光度计测定和 1% 琼脂糖凝胶电泳对 RNA 的浓度和质量进行检测, 当  $OD_{260/280} = 1.8 \sim 2.0$ , 电泳条带 28S 浓度约为 18S 的 2 倍时, 视为合格。cDNA 第一链的合成按 PrimeScript<sup>™</sup> RT Master Mix 试剂盒(TaKaRa)的方法合成, 每次反应使用 1  $\mu$ g 总 RNA。以合成的 cDNA 为模板, 引物 pm901: catggcgagagagaagattca 和 pm902: ggcaataagcatttgtctc 进行 PCR 扩增。扩增在 Mastercycler 5331 (Eppendorf) 上进行, 扩增反应总体积为 50  $\mu$ L, 其中包括 5  $\mu$ L  $10 \times$  Ex Taq buffer (含  $Mg^{2+}$ ), 4  $\mu$ L dNTP (各 2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>), 2  $\mu$ L 模板 cDNA, 引物 (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 2  $\mu$ L, 0.25  $\mu$ L Ex Taq (TaKaRa)。扩增条件为: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后, 进行 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min 的 25 轮扩增, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物电泳回收后, 连接到 pMD-19T, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , M13 引物扩增挑选阳性克隆进行测序。本研究中的引物合成和测序工作均由华大基因公司完成。

使用 MEGA5.10 软件(Tamura et al., 2011)进行进化树分析, 用基因的全长氨基酸序列进行比对, 序列取自 GenBank, 包括本试验中克隆的 PMADS20 和文献中报道过的 StMADS11 亚家族基因, 比对使用 MEGA5.10 内置的 MUSCLE 程序, 以邻接法(Neighbor-Joining)构建进化树, 计算进化距离时使用 Dayhoff 模型, 进行 1 000 次置信度检验。

### 1.3 表达载体构建

以连接 PMADS20(GU129907)编码区序列的质粒 DNA 为模板, 引物 pm911: ccatggcgagagagaagattca (Nco I) 和 pm912: ggatccttcagcccagtaggtag (BamH I) 进行 PCR 扩增, 将 Nco I 和 BamH I 添加到 PMADS20 编码区序列的两端。扩增反应总体积为 25  $\mu$ L, 其中包含 dNTP 2.0  $\mu$ L,  $10 \times$  Easy Taq Buffer (含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ L, Easy Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L, 引物各 1.0  $\mu$ L, 模板 DNA 1.0  $\mu$ L。扩增条

件为：94 °C 预变性 5 min 后，按 94 °C 变性 30 s，56 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min 进行 25 轮扩增，最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物连接到 pMD-19T，测序挑选序列正确的克隆提取质粒 DNA，用 *Nco* I 和 *Bam*H I 酶切将 *PMADS20* 编码区序列连接到辅助载体 pMF500，置于 35S 启动子和终止子之间，测序验证后，用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切，将约 1.8 kb 的表达框连接到 pGreen II 0229 上，测序验证后得到 35S:PMADS20 载体（图 1）。

35S:PMADS20-SRDX 的载体构建时，扩增所用的上游引物仍为 pm911，下游引物（在 *PMADS20* 编码序列的 C 端添加了 12Aa 的 SRDX 转录抑制域序列）为 pm914: ggatcctaagcgaaacccaacggagtcttag atcgagatctaagcccagtaggtagcc (*Bam*H I)，其余的程序与构建 35S:PMADS20 的载体相同（图 1）。构建完成的目标载体与 *Soup* 质粒一起用电击法共转化农杆菌 GV3101。

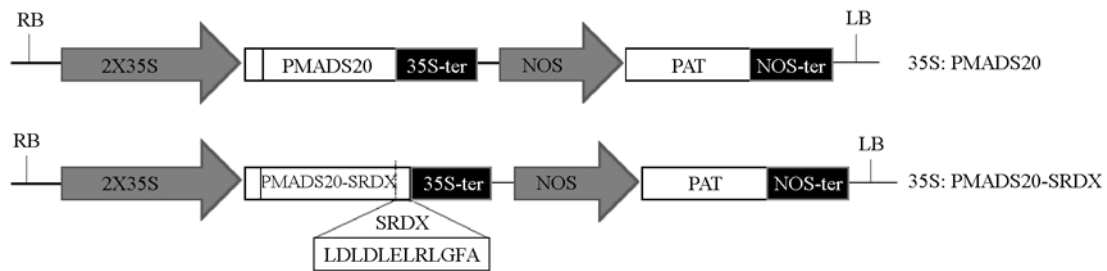


图 1 35S:PMADS20 和 35S:PMADS20-SRDX 载体结构简图

Fig. 1 Schematic representation of the 35S:PMADS20 and 35S:PMADS20-SRDX constructs

#### 1.4 抗性植株的获得

**外植体的准备：**将矮牵牛‘MD’的种子用 75%乙醇处理 1 min，2.5%（有效氯）的次氯酸钠灭菌 8 min，无菌水冲洗 4 次后播种到 1/2 MS 固体培养基上，2~3 周后切取带下胚轴的芽接种到新的 MS 培养基上重新生根。继续培养 4 周后，取幼叶切成 5~8 mm 的小块，置于预培养基（含 MS 矿质元素和有机物，蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>，琼脂 7 g·L<sup>-1</sup>，BAP 3.0 mg·L<sup>-1</sup>，IAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>，pH 5.8）上培养，2 d 后进行农杆菌侵染。

**农杆菌的准备：**从 -80 °C 冰箱中取出保存的含目标质粒的 GV3101，划线到含庆大霉素 50 μg·mL<sup>-1</sup> 和卡那霉素 50 μg·mL<sup>-1</sup> YEB 培养基上，28 °C 条件下培养。3 d 后挑取单菌落接种到含抗生素的液体 YEB 培养基中，28 °C，250 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养过夜。当培养的菌液浓度到 OD<sub>600</sub> = 0.8~1.5 时，将菌液转入离心管中，4 °C，7 000 r·min<sup>-1</sup>，离心 5 min 收集菌体，用侵染液（含 MS 矿质元素和有机物，蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>，MES 0.1%，乙酰丁香酮 20 μmol·L<sup>-1</sup>，pH 5.8）稀释至 OD<sub>600</sub> = 0.4 用于侵染。

**共培养：**将预培养 2 d 的叶盘放入准备好的农杆菌菌液中，轻轻振荡，使菌液与叶盘充分接触，5 min 后将叶盘捞出，用无菌滤纸吸干叶盘上残留的菌液，平放到共培养基（预培养基附加 20 μmol·L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮）上，25 °C 黑暗条件下培养 48 h。

**抗性植株的筛选：**共培养结束后，将外植体转移到筛选培养基（MS 矿质元素和有机物，附加蔗糖 30 g·L<sup>-1</sup>，琼脂 7 g·L<sup>-1</sup>，BAP 3.0 mg·L<sup>-1</sup>，IAA 0.2 mg·L<sup>-1</sup>，羧苄青霉素 500 mg·L<sup>-1</sup>，草铵膦 5 mg·L<sup>-1</sup>）上，25 °C 50 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> 日光灯光照下进行培养，4 周后切下愈伤组织块（或带芽）放到新的筛选培养基上培养。继代时将不相连的组织块分别继代，成苗获得转基因植株后，将来源于同一块愈伤组织的植株视为一个独立转化系。当再生的芽超过 1 cm 长时，切下接种到生根培养基

(1/2MS 矿质元素和有机物, 附加蔗糖  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 琼脂  $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , IAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 羧苄青霉素  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 草铵膦  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 进行生根筛选。将超过 3 cm 高并正常生根的幼苗从培养瓶中取出, 洗净根上的培养基, 直接移栽到草炭基质中, 盖地膜保湿。1 周后揭去地膜, 2 周后按  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{m}^{-2}$  的用量喷施保试达®除草剂(有效成分  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 产品说明推荐的使用浓度  $0.1 \sim 0.5 \text{ mL} \cdot \text{m}^{-2}$ ) 进行进一步筛选。

### 1.5 转基因植株的鉴定及外源基因表达分析

用植物总 DNA 提取试剂盒(北京天根)提取经除草剂保试达®筛选的抗性植株幼叶 DNA 做模板, 利用根据 *PMADS20* 基因非保守的 I 区序列设计正向引物 pm913: cttagcagggaaatttctgag 和据 35S 终止子序列设计的引物 35st2: ctgggaactactcacacatt, 对抗性植株进行 PCR 检测。分析转基因植株中 *PMADS20-SRDX* mRNA 的表达情况时, 以叶片 cDNA 为模板。扩增 *ACTIN* 内参的引物为: agatctggcatcataccttctaca 和 ccmgcagcttccatrcaatca。扩增 *PMADS20-SRDX* 的正向引物为 pm913, 反向引物除 35st2 外, 还使用了与 *SRDX* 区序列配对的引物: cgaaacccaaacggagtt (srdxp2)。扩增条件与构建载体时扩增编码区序列的相同, 但基因表达分析时使用的循环数为 22 个, 设置 3 次生物学重复。

### 1.6 荧光定量分析

分析 *PMADS20* 在不同器官中 mRNA 的表达量时, 以 6 叶期幼苗的根、茎段、腋芽, 1 cm 长的幼叶和开放当日的花为材料; 分析转基因植株的基因表达变化时, 以 ‘MD’ 野生型植株、Lm 和 Lp 两个 35S: *PMADS20-SRDX* 转基因株系 1 cm 长的幼叶为材料。提取总 RNA 和合成 cDNA 的方法与基因克隆时使用的方法相同。荧光定量分析在 CFX96 PCR 仪上进行, 每个 qRT-PCR 反应总体积为  $10 \mu\text{L}$ , 包含  $0.5 \mu\text{L}$  cDNA, 正反向引物各  $0.5 \mu\text{L}$  ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $5 \mu\text{L}$   $2 \times$  SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad)。扩增条件为:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 30 s, ( $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  退火并延伸 5 s) 39 个循环。内参基因 SAND 的引物为: cttacgacgagttcagatgcc 和 ggtaagtctcaacacgcatg (Mallona et al., 2010)。分析不同器官中 *PMADS20* 的表达的引物为: ccagcagcagcagtagtagca 和 agggtagcccaacttgagag, 分析转基因植株中内源 *PMADS20* 表达的引物为: agatgatgacagttccgatacttctct 和 tcttgtgttagctcttacgttctacca (与 3'UTR 区序列配对)。设 3 次生物学重复 3 次技术重复。数据分析根据 Schmittgen 和 Livak (2008) 的方法进行, 即  $\Delta C_T = C_T \text{ 目标基因} - C_T \text{ 内参基因}$ , 目标基因的相对表达量(相对于内参基因)为  $2^{-\Delta C_T}$ 。

### 1.7 冷冻扫描观察

将样品用导电胶粘在样品支架上, 放入 HITACHI S-3000N 扫描电镜样品室的冷冻台上, 在  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , 15 kV 的条件下进行观察、拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PMADS20* 基因的克隆与序列分析

前人的研究显示茄科植物 StMADS11 亚家族有 3 支 (He & Saedler, 2005), 对矮牵牛 MADS-box 基因的分析显示, StMADS11 亚家族有 3 个成员, 其中 *FBP13* 和 *FBP25* 有完整的 CDS, 但 *OPU9-2* 仅有部分 CDS 序列 (郭余龙, 2008), 且可能是一假基因。为了对矮牵牛 StMADS11 亚家族基因的功能分化情况进行分析, 对 GenBank 和 TGI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) 数据库中矮牵牛的 EST 序列进行了分析, 结果显示, TC3144 (EB174359, EB174419) 可能代表矮牵牛中不同于 *FBP13* 和 *FBP25* 的另一个成员, 为此根据 TC3144 序列设计了引物 pm901 和 pm902, 以花序 cDNA

为模板扩增 ORF 框。扩增产物为约 700 bp 的片段 (图 2), 扩增产物连接 pMD19-T 载体上后挑取 10 个经检测连接有外源片段的克隆进行测序, 测序结果利用 DNASTar 进行分析以去除 PCR 扩增引入的变异, 确定正确的序列。序列测定结果表明, 扩增出的序列长度为 727 bp, 编码区内的序列与 TC3144 比较只有一个碱基转换, 没有导致氨基酸变异。将序列提交 GenBank, 命名为 *PMADS20* (登录号, GU129907)。GenBank 于 2012 年 12 月 31 日释放了一条与 *PMADS20* 相同 (一致性为: 99.3%) 的序列, 该基因为 *EXTRAPETALS (EXP)*, 因此, 本研究中的 *PMADS20* 即为 *EXP* 基因。

将克隆的 *PMADS20* 推测的氨基酸序列与目前进行过功能研究的 *StMADS11* 亚家族的基因全长氨基酸序列用于进化树分析, 结果显示, *PMADS20* 属于 SVP 分支 (图 3), 与番茄和辣椒 *JOINTLESS* 的关系最近。

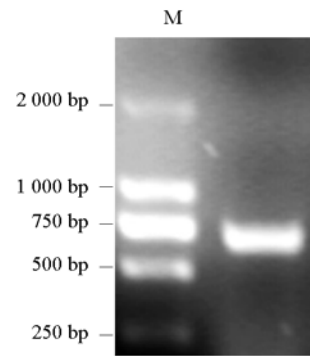


图 2 *PMADS20* 基因的克隆  
Fig. 2 Amplification of *PMADS20* gene

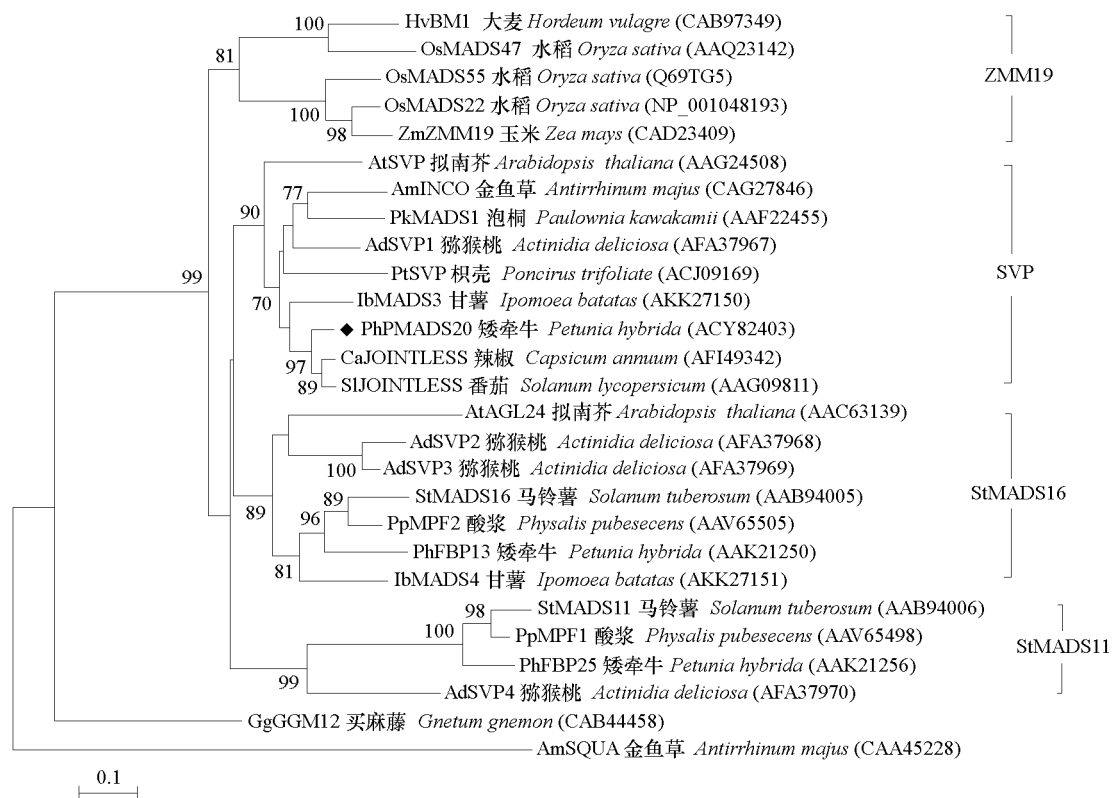


图 3 *StMADS11* 亚家族基因的进化树分析  
Fig. 3 Phylogenetic analysis of *StMADS11* subfamily genes

利用荧光定量 PCR 技术对矮牵牛不同器官中 *PMADS20* mRNA 的丰度进行分析, 结果显示, 该基因主要在营养器官中表达, 在腋芽 (6 叶期) 中的表达量最高, 在花 (开放当日) 中的表达量低 (图 4)。

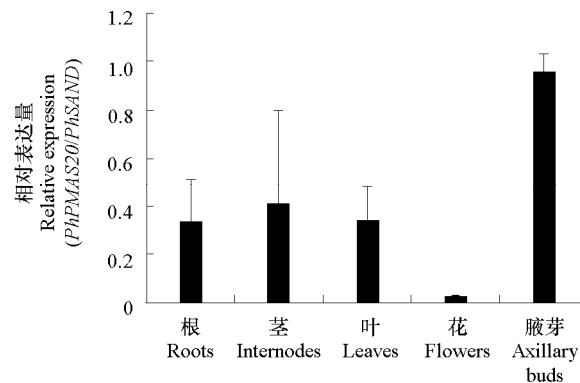


图 4 *PMADS20* 在矮牵牛不同器官中的相对表达

Fig. 4 Relative expression of *PMADS20* mRNA in different organs of petunia

## 2.2 超量表达 *PMADS20* 和 *PMADS20-SRDX* 的转基因植株花器官的变异相似

经过喷施  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{m}^{-2}$  的保试达®除草剂后, 分别获得 21 个和 15 个移栽成活的 35S:*PMADS20* 和 35S:*PMADS20-SRDX* 转化株系, PCR 鉴定表明这些植株均有外源基因整合。

*PMADS20* 转基因植株生长特性和开花时间与对照植株差异不明显, 开花后有 10 个株系的花器官可见程度不同的变化: 萼片增大, 花蕾和已开放花朵的花冠边缘呈淡绿色 (图 5, C、D), 子房较长 (图 5, F), 胎座基部多出一梗状结构 (图 5, G), 子房和花柱表面有表皮毛。

*PMADS20-SRDX* 转基因植株有 7 个株系有明显的变化, 花的变化与 *PMADS20* 转基因植株相似, 但更为显著。花较野生型的小, 花开放后花瓣不能完全展开、且多呈绿色 (图 5, B、D), 偶尔可见白色的花, 开花之后柱头和绿色的花瓣不会脱落 (图 5, E), 育性受到明显的影响, 自交不能正常结种子。对 Lm 和 Lp 两个 35S:*PMADS20-SRDX* 转基因株系用野生型花粉授粉, Lp 的部分花朵虽有种子形成, 但发育不良 (图 5, H)。转基因植株花粉量少, 用于授粉野生型植株也没有获得种子 (每株系 10 朵)。将这两个株系进行扦插繁殖, 获得的植株的表型与来源植株一致。与同期繁殖的野生型植株比较, 转基因植株株型较矮 (图 5, A), 这主要是由于花序的节间较野生型短 (图 5, B) 所致。

为了分析 Lm 和 Lp 两个株系中外源基因的表达情况, 以叶片 cDNA 为模板, 结合 *PMADS20* 基因 I 区的正向引物 pm913 与结合 SRDX 区和 35S 终止子的反向引物 (srdxp2 和 35st2) 分别配对进行扩增, 转基因植株中两对引物都扩增出预期条带, 野生型和水对照没有扩增带 (图 6), 说明转基因植株中外源基因正确转录。前人的研究表明, 在矮牵牛中共抑制可以导致同源基因的降解, 从而导致性状改变。为了检测转基因植株中是否有共抑制现象发生导致内源 *PMADS20* 的下调, 用与 *PMADS20* 基因 C 区结合的正向引物和 3'UTR 区结合的反向引物进行定量 PCR 分析, 结果表明, 转基因株系和野生型植株中 *PMADS20* mRNA 的积累没有明显的变化 (图 7), 说明观察到的表型变化不是由共抑制所致。





图5 超量表达 *PMADS20* 与 *PMADS20-SRDX* 矮牵牛转基因植株的表型变化

A: 转基因植株株形的变化; B: 转基因植株花序的变化; C: 转基因植株花蕾呈淡绿色; D: 花的形态变化, 箭头指示淡绿色的花瓣边缘; E: 转基因植株花瓣和柱头宿存; F: 雌蕊; G: 子房 (箭头指示胎座基部异位的茎状结构); H、I: 果实 (箭头指示胎座基部异位的茎状结构, 星号指示发育不良的种子)。WT: 野生型; PM: 35S: *PMADS20* 转基因植株; PMS: 35S: *PMADS20-SRDX* 转基因植株。

Fig. 5 Effects of *PMADS20* and *PMADS20-SRDX* constitutive expression on petunia plants

A: Plant architecture of *PMADS20-SRDX* overexpression plants; B: Inflorescences of 35S: *PMADS20-SRDX* transgenic plants and the wild type plants; C: A greenish flower bud of *PMADS20* overexpression plants; D: Flower morphology of wild type and transgenic plants (arrow indicates the greenish edge of a 35S: *PMADS20* transgenic flower); E: Styles and petals persist on the developing fruits of 35S: *PMADS20-SRDX* transgenic plants; F: Pistils; G: An ovary of 35S: *PMADS20* transgenic plants (Arrow indicates the ectopic stem-like structure at the basis of the placenta); H, I: Fruits (Arrow indicates the ectopic stem-like structure at the basis of the placenta and star indicates poor developed seeds).

WT: Wild type; PM: 35S: *PMADS20* transgenic plants; PMS: 35S: *PMADS20-SRDX* transgenic plants.



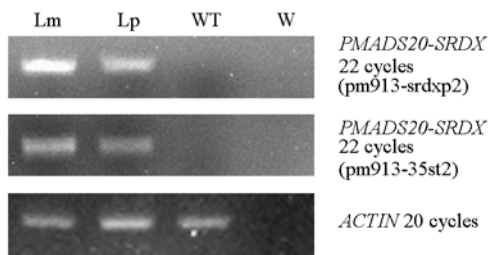


图 6 转基因植株中 *PMADS20-SRDX* mRNA 的表达  
Lm 和 Lp: 转基因株系; WT: 野生型对照; W: 水对照。

Fig. 6 Accumulation of *PMADS20-SRDX* mRNA in 35S : *PMADS20-SRDX* transgenic leaves  
Lm: Transgenic line-M; Lp: Transgenic line-P;  
WT: Wild type; W: Water.

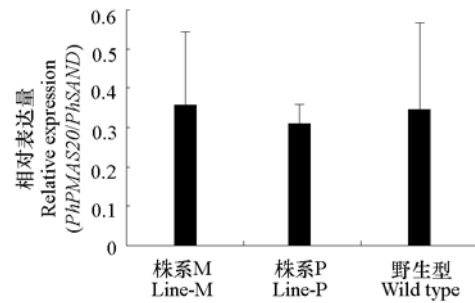


图 7 *PMADS20-SRDX* 转基因植株中内源 *PMADS20* mRNA 的表达

Fig. 7 Accumulation of *PMADS20* mRNA in 35S : *PMADS20-SRDX* transgenic plants

### 2.3 转基因矮牵牛植株呈 UNSHAVEN 表型

35S : *PMADS20* 和 35S : *PMADS20-SRDX* 转基因植株花器官具有相似的变化, 且后者的表现更为突出, 因此, 取 35S : *PMADS20-SRDX* 转基因株系的花瓣和雌蕊用冷冻扫描电镜观察。结果 (图 8) 显示, 转基因植株花瓣表皮细胞形状不规则, 表面没有凸起 (图 8, B、D), 而野生型植株

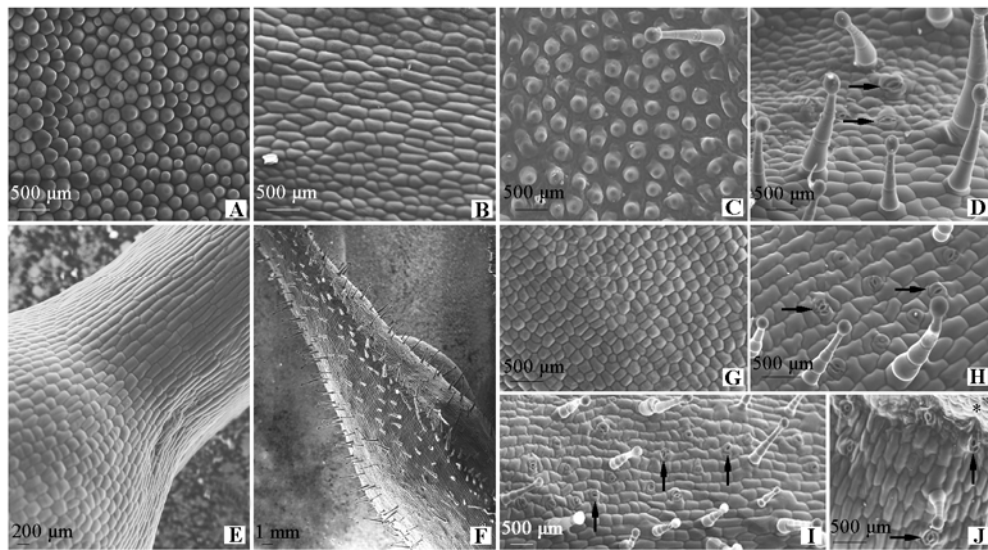


图 8 *PMADS20-SRDX* 转基因和野生型植株花瓣和雌蕊的扫描电镜观察

A、B: 野生型 (A) 和 *PMADS20-SRDX* 转基因 (B) 花瓣上表皮; C、D: 野生型 (C) 和 *PMADS20-SRDX* 转基因 (D) 花瓣下表皮; E、F: 野生型 (E) 和 *PMADS20-SRDX* 转基因 (F) 的子房和花柱;  
G、H: 野生型 (G) 和 *PMADS20-SRDX* 转基因 (H) 的子房表面;  
I、J: *PMADS20-SRDX* 转基因花柱中段 (I) 和近柱头 (J) 区表面。箭头指示气孔; 星号指示柱头。

Fig. 8 Scanning electron microscopy observation of petals and pistils of wild-type and *PMADS20-SRDX* transgenic lines

A, B: Adaxial side of petals of the wild type (A) and *PMADS20-SRDX* transgenic lines (B); C, D: Abaxial side of petals of the wild type (C) and *PMADS20-SRDX* transgenic lines (D); E, F: Pistils of the wild type (E) and *PMADS20-SRDX* transgenic lines (F);  
G, H: Ovary surfaces of the wild type (G) and *PMADS20-SRDX* transgenic lines (H);  
I, J: Middle (I) and near the stigma (J) regions of *PMADS20-SRDX* transgenic styles. Arrow indicates stoma, and star indicates stigma.

的呈圆锥状(图 8, A、C);转基因花瓣下表皮有较多表皮毛且有气孔分布(图 8, D);而野生型的只有少量表皮毛,且多集中在叶脉,没有气孔分布(图 8, C)。对照的子房和花柱表面光滑,细胞形状较为规整(图 8, E、G);转基因植株的子房和花柱表面覆盖表皮毛,并且有气孔的分布,细胞形状也趋于不规整(图 8, F、H、I、J)。子房和花柱表面为表皮毛覆盖的表型与超量表达 *UNSHAVEN* (*UNS*) 和 *UNSAIMI* (剪去 *MADS* 区和 *I* 区的 *UNS*) 的矮牵牛 (Ferrario et al., 2004) 相似。

### 3 讨论

本研究中以矮牵牛花序 cDNA 为模板,克隆了一个 *MADS*-box 基因,命名为 *PMADS20*。进化树分析表明,该基因属 *SVP* 分支,是矮牵牛 *StMADS11* 亚家族的一个新成员。qRT-PCR 检测显示, *PMADS20* 在腋芽中的表达量最高,在根、茎和叶中均有表达,且表达量较高,在花中的表达量低(图 4),具有营养器官中优势表达的特征。这种空间表达特性与其它物种 *StMADS11* 亚家族基因的表达特性 (Carmona et al., 1998; García-Maroto et al., 2000; Hartmann et al., 2000) 相似。在多种器官组织中广泛表达可能是该亚家族基因在不同物种中的功能具有多样性的基础。

*CRES-T* 基因沉默技术通过将人工设计的植物特有的 *EAR* 抑制域 (*SRDX*) 与转录因子融合,构建融合的转录抑制子,抑制下游基因的表达 (Hiratsu et al., 2003)。组成型表达 *PMADS20* 和 *PMADS20-SRDX* 对矮牵牛花器官发育的影响相似,但 *PMADS20-SRDX* 转基因花朵的表型更为明显(图 5),说明 *PMADS20* 在花器官的发育过程中可能发挥转录抑制作用。

表达 *PMADS20-SRDX* 花器官的萼片增大,花瓣表皮毛增多,心皮表面覆盖异位的表皮毛,并且在花瓣下表皮、心皮表面均有异位的气孔分布,转基因植株的花器官有向营养器官转化的趋势(图 8)。*PMADS20-SRDX* 超量表达的矮牵牛花器官的表型与超量表达 *UNS* 的矮牵牛 (Ferrario et al., 2004) 非常相似,但有两点不同, *UNS* 超表达的花瓣上表皮有表皮毛, *PMADS20-SRDX* 超量表达的没有; *PMADS20-SRDX* 超量表达的花瓣和心皮表面有气孔,而 *UNS* 超表达的没有。矮牵牛 *UNS* 是拟南芥 *SOC1* 的同源基因,为 *TM3* 亚家族 *MADS*-box 基因。有趣的是,超量表达 *SOC1* 同源基因 *GhSOC1* 的非洲菊管状花心皮表皮细胞有异位的保卫细胞结构出现,但没有异位表皮毛 (Ruokolainen et al., 2011)。目前,在 *StMADS11* 和 *TM3* 亚家族基因超量表达的研究中,还没有异位表皮毛和气孔同时出现在子房和心皮表面的报道。花器官表皮毛增多表型在其它 *StMADS11* 亚家族基因超量表达的转基因烟草 (García-Maroto et al., 2000) 和拟南芥 (Masiero et al., 2004; Fornara et al., 2008; Li et al., 2010) 中也有报道,但本研究中观察到的变化更为明显,并且 *PMADS20-SRDX* 超量表达的矮牵牛花的育性受到严重影响,花瓣和花柱在花开放后宿存,表现为显著的营养器官特性。表型增强可能是因为 *SRDX* 抑制结构域增强了基因的抑制效应。*PMADS20-SRDX* 与 *UNS* 超量表达后花瓣上表皮的变化不同可能反应了基因功能的差异。

在拟南芥中, *SVP*、*AGL24* 和 *SOC1* 具有冗余的抑制花器官特征形成的作用,它们在花原基中短暂表达,通过结合到 *SEP3* 启动子上抑制其表达,从而进一步抑制花器官发育 *B*、*C* 类基因表达,避免花器官发育早熟 (Liu et al., 2009; Lee & Lee, 2010)。 *AGL24* 和 *SOC1* 能与 *SAP18* 相互作用,可能通过招募 *Sin3/HDAC* 复合体避免 *SEP3* 位点组蛋白 *H3* 的乙酰化,从而抑制其表达;而 *SVP* 可能通过引导 *TFL2* 到达 *SEP3* 位点,通过影响 *H3K27me3* 复合体而抑制 *SEP3* 的表达 (Liu et al., 2009)。当这 3 个基因超量表达时会导致花器官向营养器官转化、花的决定性散失导致从花中形成额外的花序(或花)等现象。最近有资料显示,矮牵牛 *PMADS20* (*EXTRAPETAL*) 基因在花序原基中短暂表达,可能具有 *SVP* 相似的抑制花器官发育的功能,其突变体的花序结构发生改变 (<http://>

dspace.uvu.vu.nl/bitstream/handle/1871/20137/8962.pdf?sequence)。本研究中, 超量表达 *PMADS20* 和 *PMADS20-SRDX* 的矮牵牛植株的花序没有明显变化, *SRDX* 抑制结构域增强 *PMADS20* 超量表达对花器官发育的影响。综合以上结果, 推测 *PMADS20* 在花发育过程中的作用可能是通过转录抑制而非转录激活实现的。

超量表达 *PMADS20-SRDX* 抑制矮牵牛花序节间的伸长, 导致开花后转基因植株矮化; 但超量表达 *PMADS20* 的花序节间伸长没有受到明显的影响。推测 *PMADS20* 基因在茎中发挥作用的方式与在花中存在差异, 具体机制有待进一步分析。

## References

- Becker A, Theissen G. 2003. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29 (3): 464 - 489.
- Carmona M J, Ortega N, Garcia-Maroto F. 1998. Isolation and molecular characterization of a new vegetative MADS-box gene from *Solanum tuberosum* L. *Planta*, 207 (2): 181 - 188.
- Cohen O, Borovsky Y, David-Schwartz R, Paran I. 2012. *CaJOINTLESS* is a MADS-box gene involved in suppression of vegetative growth in all shoot meristems in pepper. *Journal of Experimental Botany*, 63 (13): 4947 - 4957.
- Ferrario S, Busscher J, Franken J, Gerats T, Vandenbussche M, Angenent G C, Immink R G. 2004. Ectopic expression of the petunia MADS box gene *UNSHAVEN* accelerates flowering and confers leaf-like characteristics to floral organs in a dominant-negative manner. *Plant Cell*, 16 (6): 1490 - 1505.
- Fornara F, Gregis V, Pelucchi N, Colombo L, Kater M. 2008. The rice StMADS11-like genes *OsMADS22* and *OsMADS47* cause floral reversions in *Arabidopsis* without complementing the *svp* and *agl24* mutants. *Journal of Experimental Botany*, 59 (8): 2181 - 2190.
- García-Maroto F, Ortega N, Lozano R, Carmona M J. 2000. Characterization of the potato MADS-box gene *STMADS16* and expression analysis in tobacco transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 42 (3): 499 - 513.
- Gramzow L, Theissen G. 2010. A hitchhiker's guide to the MADS world of plants. *Genome Biology*, 11 (6): 214.
- Gregis V, Sessa A, Colombo L, Kater M M. 2006. *AGL24*, *SHORT VEGETATIVE PHASE*, and *APETALA1* redundantly control *AGAMOUS* during early stages of flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (6): 1373 - 1382.
- Guo Yu-long. 2008. Petunia MADS-box gene family. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (6): 917 - 925. (in Chinese)
- 郭余龙. 2008. 矮牵牛 MADS-box 基因. *园艺学报*, 35 (6): 917 - 925.
- Hartmann U, Höhmann S, Nettesheim K, Wisman E, Saedler H, Huijser P. 2000. Molecular cloning of *SVP*: A negative regulator of the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 21 (4): 351 - 360.
- He C, Saedler H. 2005. Heterotopic expression of *MPF2* is the key to the evolution of the Chinese lantern of *Physalis*, a morphological novelty in Solanaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (16): 5779 - 5784.
- He C, Saedler H. 2007. Hormonal control of the inflated calyx syndrome, a morphological novelty in *Physalis*. *Plant Journal*, 49 (5): 935 - 946.
- He C, Tian Y, Saedler R, Efremova N, Riss S, Khan M R, Yephremov A, Saedler H. 2010. The MADS-domain protein *MPF1* of *Physalis floridana* controls plant architecture, seed development and flowering time. *Planta*, 231 (3): 767 - 777.
- Hiratsu K, Matsui K, Koyama T, Ohme-Takagi M. 2003. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 34 (5): 733 - 739.
- Khan M R, Khan I U, Ali G M. 2013. *MPF2-Like* MADS-Box genes affecting expression of *SOC1* and *MAF1* are recruited to control flowering time. *Molecular Biotechnology*, 54 (1): 25 - 36.
- Lee J, Lee I. 2010. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany*, 61 (9): 2247 - 2254.
- Lee J H, Park S H, Ahn J H. 2012. Functional conservation and diversification between rice *OsMADS22/OsMADS55* and *Arabidopsis* *SVP* proteins. *Plant Science*, 185: 97 - 104.
- Lee S, Choi S C, An G. 2008. Rice *SVP*-group MADS-box proteins, *OsMADS22* and *OsMADS55*, are negative regulators of brassinosteroid responses. *Plant Journal*, 54 (1): 93 - 105.

- Li Z M, Zhang J Z, Mei L, Deng X X, Hu C G, Yao J L. 2010. *PtSVP*, an SVP homolog from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), shows seasonal periodicity of meristem determination and affects flower development in transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, 74 (1 - 2): 129 - 142.
- Liu C, Xi W, Shen L, Tan C, Yu H. 2009. Regulation of floral patterning by flowering time genes. *Dev Cell*, 16 (5): 711 - 722.
- Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M. 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology*, 10: 4.
- Mao L, Begum D, Chuang H W, Budiman M A, Szymkowiak E J, Irish E E, Wing R A. 2000. *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature*, 406 (6798): 910 - 913.
- Masiero S, Li M A, Will I, Hartmann U, Saedler H, Huijser P, Schwarz-Sommer Z, Sommer H. 2004. *INCOMPOSITA*: A MADS-box gene controlling prophyll development and floral meristem identity in antirrhinum. *Development*, 131 (23): 5981 - 5990.
- Ruokolainen S, Ng Y P, Albert V A, Elomaa P, Teeri T H. 2011. Over-expression of the *Gerbera hybrida* At-SOC1-like1 gene *Gh-SOC1* leads to floral organ identity deterioration. *Annual Botany*, 107 (9): 1491 - 1499.
- Schmittgen T D, Livak K J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3 (6): 1101 - 1108.
- Shin M R, Seo S G, Kim J S, Joen S B, Kang S W, Lee G P, Kwon S Y, Kim S H. 2011. Alteration of floral organ identity by over-expression of *IbMADS3-1* in tobacco. *Transgenic Research*, 20 (2): 365 - 376.
- Smaczniak C, Immink R G, Angenent G C, Kaufmann K. 2012. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: Insights from recent studies. *Development*, 139 (17): 3081 - 3098.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10): 2731 - 2739.
- Trevaskis B, Tadege M, Hemming M N, Peacock W J, Dennis E S, Sheldon C. 2007. Short vegetative phase-like MADS-box genes inhibit floral meristem identity in barley. *Plant Physiology*, 143 (1): 225 - 235.
- Tzfira T, Tian G W, Vyas S, Li J, Leitner-Dagan Y, Krichevsky A, Taylor T, Vainstein A, Citovsky V. 2005. pSAT vectors: A modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Molecular Biology*, 57 (4): 503 - 516.
- Wang Hui-ping, Yu Ling, Zou Shi-hui, Chen Jing, Guo Yu-long, Li Ming-yang. 2012. Silencing of chalcone synthase genes by artificial microRNA in petunia. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (12): 2491 - 2498. (in Chinese)
- 王会平, 遇玲, 邹世慧, 陈璟, 郭余龙, 李名扬. 2012. 利用 amiRNA 技术沉默矮牵牛查尔酮合成酶基因. *园艺学报*, 39 (12): 2491 - 2498.
- Wu R M, Walton E F, Richardson A C, Wood M, Hellens R P, Varkonyi-Gasic E. 2012. Conservation and divergence of four kiwifruit SVP-like MADS-box genes suggest distinct roles in kiwifruit bud dormancy and flowering. *Journal of Experimental Botany*, 63 (2): 797 - 807.
- Yu H, Xu Y F, Tan E L, Kumar P P. 2002. *AGAMOUS-LIKE 24*, a dosage-dependent mediator of the flowering signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (25): 16336 - 16341.