

研究报告

Research Report

黄瓜 *CsPI* 基因的克隆及不同器官中的表达

张微微 余为为 徐菲 周鹏 高东菊* 成文竞*

上海农林职业技术学院, 植物科学技术系, 上海, 201699

* 通信作者, gaodj@shafc.edu.cn; chengwj@shafc.edu.cn

摘要 MADS-box 家族基因在植物花器官发育中具有重要的作用。本研究采用同源克隆技术, 从黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 顶芽中克隆获得 B 类 MADS-box 基因 *CsPI* 的 cDNA 序列。序列分析表明, *CsPI* 基因 cDNA 序列的完整开放阅读框(ORF)为 636 bp, 编码 211 个氨基酸, 分子质量为 24 904, 理论等电点为 8.42。蛋白质序列相似性比对和分子系统发生分析表明, *CsPI* 聚类于 PI 进化支, 其 C 末端包含保守的 PI 基序。葫芦科 PI 同源蛋白序列比较保守, 其中 *CsPI* 与甜瓜的同源性最高, 为 98.6%。实时荧光定量 PCR 显示, *CsPI* 基因主要在花器官中的花瓣和雄蕊中表达。本研究为探析黄瓜花器官发育提供了一定理论基础。

关键词 黄瓜; PISTILLATA(PI); 基因; 克隆; 花

Cloning and Expression Analysis of *CsPI* Gene from cucumber

Zhang Weiwei She Weiwei Xu Fei Zhou Peng Gao Dongju* Cheng Wenjing*

Department of Plant Science and Technology, Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry, Shanghai, 201699

* Corresponding author, gaodj@shafc.edu.cn; chengwj@shafc.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0024

Abstract MADS-box family genes play an important role in the development of plant floral organs. The cDNA sequence of B-class MADS-box gene *CsPI* involved in flower development were isolated from the apical bud of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by homology cloning. Open reading frame (ORF) of *CsPI* was 636 bp, encoding 211 amino acids. Molecular weight of *CsPI* was 24 904, and the theoretical isoelectric point was 8.42. Molecular phylogeny analysis and protein sequence alignment suggested that *CsPI* was grouped with the PI lineage, and C domain of *CsPI* was contained a conserved PI motif. Sequences of cucurbitaceae PI homologous proteins were relatively conservative. Among them, *CsPI* had the highest homology with melon *CmPI*, which was 98.6%. Quantitative real-time PCR showed that the *CsPI* gene was mainly expressed in petals and stamens of floral organs. This study provides a theoretical basis for studying the development of cucumber floral organs.

Keywords Cucumber; PISTILLATA (PI) ; Gene; Cloning; flower

花是被子植物特有的性状, 在植物生命繁衍中发挥着重要的作用(Thorne, 1992)。一朵典型的花通常包含四轮器官, 由外向内分别是: 萼片, 花瓣, 雄蕊和雌蕊。通过对模式植物拟南芥和金鱼草同源异型突变体的研究, Coen and Meyerowitz 于 1991 年提出

了经典的花发育 "ABC" 模型, 这个模型提出, A 类基因在第一和第二轮发挥作用, B 类基因在第二轮和第三轮发挥作用, C 类基因在第三轮和第四轮发挥作用(Litt and Kramer, 2010)。A 类和 C 类基因相互拮抗, 即如果 A 类基因发生突变, C 类基因便会在第

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2021 年 5 月 18 日; 接受日期: 2021 年 5 月 19 日; 发表日期: 2021 年 5 月 26 日

引用格式: 张微微, 余为为, 徐菲, 周鹏, 高东菊, 成文竞, 2021, 黄瓜 *CsPI* 基因的克隆及不同器官中的表达, 分子植物育种 (网络版), 19 (24): 1-6 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0024) (Zhang W.W., She W.W., Xu F., Zhou P., Gao D.J., and Cheng W.J., 2021, Cloning and expression analysis of *CsPI* gene from cucumber, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 19(24): 1-6 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0024))

一和第二轮表达,突变体的花由外向内依次是心皮、雄蕊、雄蕊、心皮。C类基因突变后,A类基因便会在第三和第四轮表达,突变体的花器官分别是萼片、花瓣、花瓣和萼片。B类基因的突变体的花器官分别是萼片、萼片、心皮和心皮(Coen and Meyerowitz, 1991; Litt and Kramer, 2010)。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中,B类基因包括 APETALA3 (AP3)和 PISTILLATA (PI)。ABC模型被提出后,研究者又在矮牵牛(*Petunia×hybrida*) 中发现了控制胚珠发育的D类基因FBP7和FBP11 (Angenent and Colombo, 1996; Irish, 2010)。之后,发现了参与所有花器官发育的E类基因SEPALLATA1/2/3/4 (SEP1/2/3/4) (Ditta et al., 2004)。至此,ABC模型补充发展为ABCDE模型。

黄瓜(*Cucumis sativus* L.), 又称王瓜、胡瓜,属于葫芦科(Cucurbitaceae)甜瓜属(*Cucumis*)是世界上普遍栽培的重要蔬菜作物之一(李怀智, 2003; 安志信等, 2006)。因此,研究黄瓜花器官的发育具有重要意义,相关研究近年来也不断增加。Sun等通过同源克隆研究了黄瓜B类基因CsAP3, CsAP3在雄花芽的花瓣和雄蕊中高表达,在拟南芥ap3突变体中过表达CsAP3可以互补ap3的表型(Sun et al., 2016)。黄瓜CUM1是拟南芥C类基因AG的同源基因,原味杂交显示CUM1在雄蕊和胚珠中表达(Gu et al., 2018)。黄瓜芒果瓜突变体(mango fruit (mf))的叶片和花瓣不正常分裂,雄蕊和雌蕊育性下降,图位克隆发现MF编码一个WUSCHEL-related homeobox (WOX) 转录因子。黄瓜CsUFO编码一个F-box蛋白,该基因突变后花器官发育异常,卷须前端也发育成"叶片"(Chen et al., 2021)。尽管关于黄瓜花器官发育的研究报道较多,但迄今为止,关于B类基因PI的研究在黄瓜中未见报道。本研究利用同源克隆从黄瓜cDNA中克隆CsPI基因,基于生物信息学对其进行分析,并通过实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)分析该基因的时空表达模式,初步分析其在黄瓜花发育过程中分子机制,为今后深入研究该基因功能提供一定基础。

1 结果与分析

1.1 RNA 提取与基因克隆

通过同源比对,发现拟南芥PI在黄瓜中同源性最高的基因是CsaV3_4G028010,将其命名为CsPI。使用设计好的引物对CsPI编码区全长进行扩增,1.0%的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测,出现

单一的DNA条带(图1)。将CsPI编码区片段与克隆载体连接转化后进行菌落PCR的鉴定。测序后发现CsPI全长636 bp,编码211个氨基酸,其分子质量为24 904,理论等电点为8.42。

1.2 CsPI 的同源性分析及系统发育树构建

将黄瓜的CsPI的蛋白序列与其他植物的PI蛋白序列进行相似性比对,结果发现,黄瓜CsPI与拟南芥的PI、猕猴桃(*Actinidia chinensis*)的AcPI、云南木鳖(*Momordica dioica*)的MdPI、美洲南瓜(*Cucurbita pepo*)的CpPI、冬瓜(*Benincasa hispida*)的BHPI、苦瓜(*Momordica charantia*)的McPI和甜瓜(*Cucumis melo*)的CmPI蛋白序列同源性分别为60.8%、79.7%、84.3%、93.9%、95.8%、97.2%和98.6%(图2)。这些PI蛋白序列在N端均包含MADS结构域,在C端含有保守的PI基序。

为了分析黄瓜的CsPI的系统发育,利用CsPI的蛋白序列与其他植物花器官发育的蛋白序列构建了系统进化树。结果表明,ABCDE模型中不同类型的基因聚为不同的分支,B类基因分为AP3和PI两个分支,其中黄瓜的CsPI与拟南芥的PI、猕猴桃的AcPI、云南木鳖的MdPI、苦瓜的McPI、甜瓜的CmPI、美洲南瓜的CpPI、中国南瓜的CmmPI、印度南瓜的CmaPI和冬瓜的BhPI等聚为同一分支。这些都说明CsPI属于B类基因PI的同源基因,且葫芦科的PI基因相对比较保守(图3)。

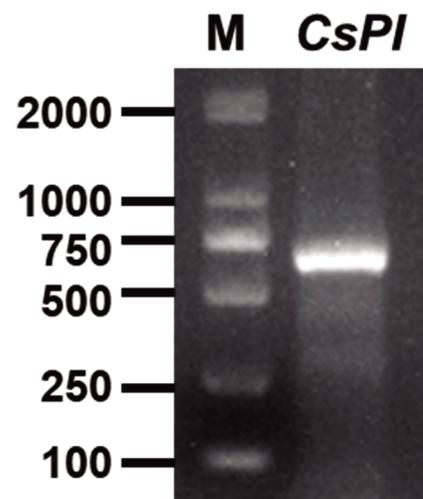


图1 CsPI基因cDNA的PCR扩增

注:M代表2 kb DNA Maker的分子量标准;左侧数字单位是bp

Figure 1 PCR amplification of CsPI cDNA

Note: M refers to 2 kb DNA Maker; The unit of the number on the left is bp

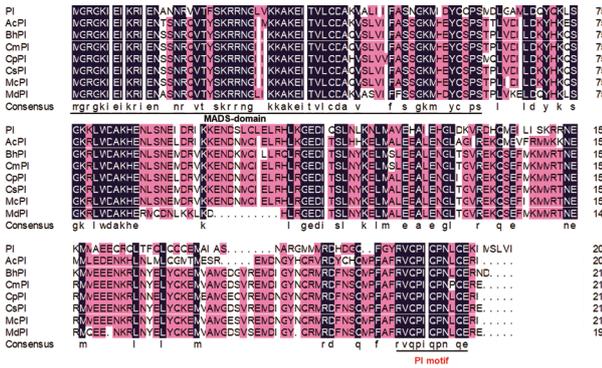


图2 不同植物中 PI 同源蛋白的序列比对
Figure 2 Alignment of the PI homologous proteins from different plant species

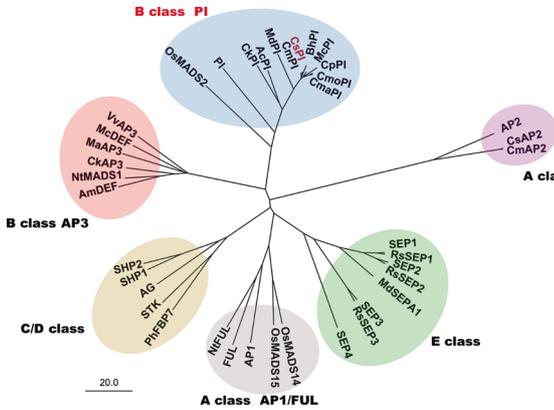


图3 CsPI 蛋白与其他物种花器官发育蛋白的系统进化树
Figure 3 Phylogenetic tree of CsPI and floral organ development proteins of other species

1.3 CsPI 的表达模式

以特异引物 RT-CsPIF 和 RT-CsPIR 检测 *CsPI* 基因在黄瓜不同组织中的表达情况(图 4)。结果表明,4 片真叶时,*CsPI* 基因主要在黄瓜顶芽中表达,茎中次之,在其他营养器官中根、叶、子叶和卷须中表达量均比较低。在花器官中,*CsPI* 主要在花瓣和雄蕊中表达,这与 B 类基因的功能相一致 (Goto and Meyerowitz, 1994)。

2 讨论

本研究通过同源克隆获得了黄瓜 B 类 MADS-box 基因 *CsPI*, 序列同源性显示, *CsPI* 与葫芦科其他物种的 PI 蛋白同源性较高, C 端包含保守的 PI 基序, 并与聚为一类, 说明 *CsPI* 在进化过程上相对比较保守。

在被子植物中, B 类基因 AP3 和 PI 来源于相同的祖先。AP3 和 PI 主要在第二轮和第三轮花器官中

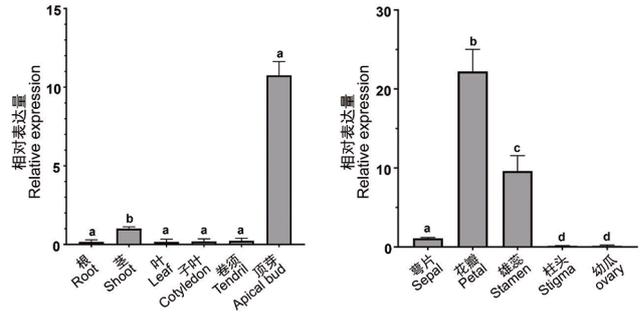


图4 *CsPI* 基因营养器官(A)和花器官中(B)的表达模式
注: 小写字母代表通过多重比较计算后存在显著差异($p < 0.05$)
Figure 4 Expression pattern of *CsPI* gene in vegetative organs (A) and floral organs (B)
Note: Lowercase letters above the bars indicate significant differences according to Tukey's multiple comparisons test with $p < 0.05$

表达, 控制花瓣和雄蕊的发育, 但不同物种中其功能又有所差异。模式植物拟南芥的 B 类基因主要在花瓣和雄蕊中表达。但是, 在部分单子叶植物中, 花器官并不是典型的结构, 即由萼片, 花瓣, 雄蕊和雌蕊组成。例如百合科植物, 花的最外两轮几乎是完全相同的花瓣状器官, B 类基因不仅在第二、三轮花器官中表达, 而且也在第一轮花器官中表达(Van Tunen et al., 1993)。在洋葱(*Allium cepa*)中, *AcPI* 基因在 4 轮花器官中均有表达(李洪有等, 2012)。番红花(*Crocus sativus*) 的两个 B 类功能基因 *CsatAP3* 和 *CsatPI* 也在全部 4 轮花器官中都表达(Tsaftaris et al., 2006)。在大花蕙兰(*Cymbidium hybrid*)中, AP3 类基因 *ChMADS1* 在子房以及所有花器官中都表达 (陈小强等., 2008)。Hsu 等通过病毒诱导的基因沉默(virus-induced gene silencing, VIGS)技术, 发现 B 类基因参与了文心兰(*Oncidium hybridum*)和蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite*)萼片和花瓣的发育。在这些单子叶植物中, B 类基因的表达部位发生了变化, 其功能也发生了相应改变。而通过 RT-PCR 和原位杂交实验, 发现黄瓜的 *CsAP3* 主要在花瓣和雄蕊中表达(Sun et al., 2016), 本研究的 *CsPI* 也在主要在花瓣和雄蕊中表达, 与模式植物拟南芥的 PI 基因表达类似。这说明黄瓜的 B 类基因功能比较保守, 可能主要参与花瓣和雄蕊的发育。

在拟南芥中, B 类基因的表达依赖 *LFY* 和 *UFO* 的互作来激活。Zhao 等通过同源克隆黄瓜的 *CsLFY* 基因, 同样发现 *CsLFY* 可以和 *CsUFO* 互作调控 *CsAP3* 的表达, *CsLFY*-RNAi 转基因植株 *CsAP3* 的表达水平显著下调(Zhao et al., 2018)。另外, Chen 等通过图位克隆获得了黄瓜 *CsUFO* 基因, 该基因突变

后黄瓜花瓣变成叶片状,突变体中 CsAP3 和 CsPI 的表达水平都明显降低(Chen et al., 2021),这说明黄瓜 B 类基因同样可能受 CsLFY 和 CsUFO 的调控。本研究初步揭示了 CsPI 的功能,但后续还需要通过原位杂交、转基因等技术对其进行进一步探析。

3 材料与方 法

3.1 实验材料与试剂

黄瓜自交系 9930 种植于上海农林职业技术学院五库实训基地。全能型植物 RNA 提取试剂盒(DNase I), 反转录试剂盒 HiFiScript cDNA Synthesis Kit, 实时荧光定量 PCR 试剂 UltraSYBR Mixture 均购买于康为世纪。普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购买于天根生化科技有限公司, 无缝克隆试剂盒 pClone007 Blunt Simple Vector kit 购买于擎科生物科技有限公司, DH5 α 克隆感受态细胞购买于上海唯地生物技术有限公司, 引物合成与测序均在上海生工生物工程股份有限公司进行。

3.2 基因的克隆与鉴定

在 NCBI 网站查询拟南芥 PI 序列, 在黄瓜基因组网站(<http://cucurbitgenomics.org/>)上比对到黄瓜 9930 第三版基因组, 找到同源性最高的基因, 将其命名为 CsPI。通过分析 CsPI 的基因序列, 设计含有起始密码子的特异引物(CsPIF: 5'-ATGGGAAGAGGGA AAATAGAAATAA-3') 和终止密码子的特异引物(CsPIR: 5'-TTATTCCTTTCTTG TAGATTTGGCT-3')。以黄瓜顶芽 cDNA 为模板, CsPIF 和 CsPIR 为引物, 进行 PCR 扩增得到 CsPI 编码区片段。将经过电泳检测后的片段与 pClone007 Blunt Vector 克隆载体连接, 转化入 DH5 α 感受态细胞, 经过菌落 PCR 筛选, 选择阳性克隆送往上海生工进行测序。

3.3 CsPI 的生物信息学分析

利用 Expasy 数据库的 "Compute pI/Mw tool" 功能计算 CsPI 的等电点与分子量。从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站中下载植物花器官发育蛋白的序列(表 1), 利用黄瓜的 CsPI 序列和其他物种的 PI 蛋白进行多序列比对, 利用这些花器官发育蛋白序列使用 MEGA X 软件构建 Neighbor Joining 系统进化树。

3.4 黄瓜 CsPI 的表达模式分析

为了分析 CsPI 基因在黄瓜不同组织中表达模

式, 对 4 片真叶时黄瓜植株的根、茎、嫩叶和顶芽进行取样, 对 20 节位时植株的伸展开的卷须、开花当天雄花的萼片和花瓣、雌花开花当天的幼瓜进行取样, 分别提取各个器官的总 RNA, 反转录成 cDNA。然后以合成的 cDNA 为模板, 黄瓜 CsACTIN2 (Csa6-G484600) 基因为对照, 用 CsPI 基因编码区的特异性引物 RT-CsPIF (5'-CTAAGCATGAGAATCTGAGCA ATG-3') 和 RT-CsPIR (5'-AGCCATTA ACTCCTTGTA GTTCAA-3'), 通过实时荧光定量 PCR 检测 CsPI 基因在黄瓜不同组织中的表达情况。使用 CFX96 Touch? Real-Time PCR System 进行反应, 所有样品进行三个生物学重复, 三个技术重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行基因的相对表达量分析(Livak and Schmittgen, 2001)。

作者贡献

张微微是本研究实验设计者和实验研究执行人及负责人; 余为为及徐菲完成数据分析, 论文初稿撰写; 周鹏参与实验设计, 试验结果分析; 高东菊和成文竞指导论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由上海市 " 科技创新行动计划 " 农业领域项目(20392001300)、上海自然科学基金(20ZR1439600)、上海农林职业技术学院中青年领军人才项目(A2-0273-20-01-16)和校内课题(KY2-0000-20-01)项目资助。

参考文献

- Angenent G.C., and Colombo L., 1996, Molecular control of ovule development, Trends in plant science, 1(7): 228-232.
- An Z.X., Meng Q.L., and Liu W.M., 2006, A preliminary analysis of the origin and spread of cucumber, Changjiang Shucai (Journal of Changjiang Vegetables), 1: 39-40. (安志信, 孟庆良, 刘文明, 2006, 黄瓜的起源和传播初析, 长江蔬菜, 1: 39-40.)
- Chen X.Q., Wang C.G., Li X.L., Song W.Q., and Chen R.Y., 2008, Cloning and sequence analysis of a novel MADS-box gene ChMADS1 expressed in the ovary from Cymbidium Hybridium, Nankai Daxue Xuebao (Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis), 41(6): 1-7. (陈小强, 王春国, 李秀兰, 宋文芹, 陈瑞阳, 2008, 大花蕙兰 MADS-box 基因 ChMADS1 的克隆及表达分析, 南开大学学报, 41(6): 1-7.)

表 1 系统进化分析和多序列比对所用的蛋白

Table 1 Proteins used in phylogenetic analysis and multiple sequence alignment

物种	蛋白名	获取号	物种	蛋白名	获取号
Species	Protein names	Accession numbers	Species	Protein names	Accession numbers
拟南芥	AP1	CAA78909.1	印度南瓜	CmaPI	XP_022976853.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AP2	NP_001190938.1	<i>Cucurbita maxima</i>		
	OsMADS2	sp Q40702.1	中国南瓜	CmmPI	XP_022936488.1
	PI	OAO90482.1	<i>Cucurbita moschata</i>		
	AG	NP_567569.3	美洲南瓜	CpPI	XP_023523689.1
	SHP1	OAP06129.1	<i>Cucurbita pepo</i>		
	SHP2	NP_850377.1	苹果	MdSEP1	NP_001280893.1
	STK	OAO98566.1	<i>Malus domestica</i>		
	SEP1	OAO95853.1	山靛	MaAP3	ALK01327.2
	SEP2	OAP01740.1	<i>Mercurialis annua</i>		
	SEP3	OAP12718.1	苦瓜	McPI	XP_022154226.1
	SEP4	OAP10349.1	<i>Momordica charantia</i>	McDEF	XP_022136271.1
	FUL	NP_568929.1	云南木鳖	MdPI	AXR70628.1
猕猴桃	AcPI	PSS00121.1	<i>Momordica dioica</i>		
<i>Actinidia Chinensis</i>			烟草	NtFUL	NP_001312134.1
金鱼草	AmDEF	BAI68389.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	NtMADS1	NP_001312649.1
<i>Antirrhinum majus</i>			水稻	OsMADS14	AAF19047.1
冬瓜	BhAP2	XP_038902025.1	<i>Oryza sativa</i>	OsMADS15	AAF19048.1
<i>Benincasa hispida</i>			矮牵牛	PhFBP7	CAA57311.1
日本四照花	CkAP3	AGA61754.1	<i>Petunia x hybrida</i>		
<i>Cornus kousa</i>	CkPI	AGA61757.1	萝卜	RsSEP1	XP_018442177.1
甜瓜	CmAP2	XP_008457743.1	<i>Raphanus sativus</i>	RsSEP2	XP_018490821.1
<i>Cucumis melo</i>	CmPI	XP_008444207.1		RsSEP3	XP_018480830.1
黄瓜	CsAP2	XP_004149686.1	葡萄	VvAP3	NP_001267960.1
<i>Cucumis sativus</i>			<i>Vitis vinifera</i>		

Chen Y., Wen H., Pan J., Du H., Zhang K., Zhang L., Yu Y., He H., Cai R., Pan J., and Wang G., 2021, *CsUFO* is involved in the formation of flowers and tendrils in cucumber, *Theoretical and Applied Genetics*, 1-10.

Coen E.S., and Meyerowitz E.M., 1991, The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development, *Nature*, 353(6339): 31-37.

Ditta G., Pinyopich A., Robles P., Pelaz S., and Yanofsky M.F., 2004, The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity, *Current biology*, 14(21): 1935-1940.

Goto K., and Meyerowitz E.M., 1994, Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene PISTILLATA, *Genes & development*, 8(13): 1548-1560.

Gu R., Liu X., Zhao W., Yan S., Sun L., Wu B., and Zhang X., 2018, Functional characterization of the promoter and second intron of CUM1 during flower development in cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Horticultural Plant Journal*, 4(3): 103-110.

Irish V.F., 2010, The flowering of *Arabidopsis* flower development, *The Plant Journal*, 61(6): 1014-1028.

Li H.Y., Wang C., Li L.L., Wang Y.Q., and Zhao R., 2012, Cloning and expression analysis of a putative B class MADS-box gene of AcPI in Onion, *Zhongguo Nongye Kexue* (*Scientia Agricultura Sinica*), 45(23): 4759-4769. (李洪有, 王婵, 李丽林, 王永勤, 赵瑞, 2012, 洋葱花器官 B 类 MADS-box 基因 AcPI 的克隆及表达分析, *中国农业科学*, 45(23): 4759-4769.)

Li H.Z., 2003, Current Status and development trend of cucumber cultivation in China, *Shucai* (*Vegetables*), 08: 3-4. (李怀智, 2003, 我国黄瓜栽培的现状及其发展趋势, *蔬菜*, 08: 3-4.)

Litt A., and Kramer E.M., 2010, The ABC model and the diversification of floral organ identity, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(1): 129-137.

Livak K.J., and Schmittgen T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25(4): 402-408.

Sun J.J., Li F., Wang D.H., Liu X.F., Li X., Liu N., Gu H.T., Zou

- C., Luo J.C., He C.X., Huang S.W., Zhang X.L., Xu Z.H., and Bai S.N., 2016, CsAP3: A cucumber homolog to Arabidopsis APETALA3 with novel characteristics, *Frontiers in Plant Science*, 7(e6144).
- Thorne R.F., 1992, Classification and geography of the flowering plants, *The botanical review*, 58(3): 225-327.
- Tsaftaris A.S., Polidoros A.N., Pasentsis K., and Kalivas A., 2006, Tepal formation and expression pattern of B-class paleoAP3-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.), *Plant science*, 170(2): 238-246.
- Van Tunen A.J., Eikelboom W., and Angenent G.C., 1993, Floral organogenesis in Tulipa, *Flowering Newsletter*, 16: 33-38.
- Zhao W., Chen Z., Liu X., Che G., Gu R., Zhao J., Wang Z., Hou Y., and Zhang X., 2018, CsLFY is required for shoot meristem maintenance via interaction with WUSCHEL in cucumber (*Cucumis sativus*), *New Phytologist*, 218(1): 344-356.