

菊花 *BRC1b* 基因的分离与亚细胞定位

周晓阳 陈晓丽 毕玲 马男 赵梁军*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 以切花菊‘神马’(*Dendranthema grandiflora* ‘Jinba’)为材料,利用同源基因克隆法结合 RACE 技术克隆了侧枝相关重要基因 *BRANCHED1* 类似基因,命名为 *DgBRC1b*。该基因开放阅读框有 1 008 bp,可编码 335 个氨基酸。蛋白对比发现,*DgBRC1b* 所推测的氨基酸序列包含 TCP 家族转录因子的 2 个基本结构域。通过系统遗传进化树分析进一步表明 *DgBRC1b* 属于 TB1 亚家族。洋葱表皮亚细胞定位结果表明该基因定位于细胞核,进一步证明该基因可能为转录因子。

关键词 菊花;侧枝发育;TCP 家族;亚细胞定位;RT-PCR

中图分类号 S 682.1⁺1

文章编号 1007-4333(2012)01-0100-05

文献标志码 A

Isolation and expression analysis of *BRANCHED1* in *Dendranthema grandiflora* ‘Jinba’

ZHOU Xiao-yang, CHEN Xiao-li, BI Ling, MA Nan, ZHAO Liang-jun*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract A *BRANCHED1*-like gene named *DgBRC1b* was cloned by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) using *Dendranthema grandiflora* ‘Jinba’. A predicated 1 008 bp open reading frame was deduced in the cloned sequence, which encoded 335 amino acids. By alignment analysis, the deduced amino acid sequence contained two conserved regions which was identified as diagnostic of true TCP. The gene was proposed to belong to TB1 subfamily by phylogenetic analysis. Subcellular localization revealed that *DgBRC1b* was localized preferentially distributed to nucleus.

Key words chrysanthemum; branching; TCP; subcellular localization; RT-PCR

植物的侧枝发育在植物形态建成中占据十分重要的地位,是一个综合了遗传机制、生理过程及环境信号的复杂的发育过程,控制了植物的形态建成^[1]。

植物侧枝发育分为 2 个阶段:腋生分生组织的形成和腋芽的生长。腋生分生组织由顶端分生组织分化而成,形成于叶腋处。有些植物腋生分生组织形成后迅速生长发育在叶腋处形成分枝;而另一些植物由于受到顶端优势或其他条件的影响,腋生分生组织在形成后随即进入休眠,在一定的条件和时期受到合适条件的诱导才能形成分枝^[2-3]。

TCP 基因家族是于 1999 年新命名的一类植物

特异的转录因子,其编码的蛋白共有一个 59 个氨基酸的 bHLH(basic helix-loop-helix)序列,这段共有序列有 DNA 结合以及蛋白相互作用的活性。该家族的最早成员为玉米中的 *TB1*、金鱼草中的 *CYC* 以及水稻中的 *PCF*。*TB1* 基因在玉米的驯化过程中对顶端优势起到主要的决定性作用,*CYC* 主要在金鱼草中决定了花的对称性,水稻中的 *PCF* 主要通过 PCNA 启动子相结合从而影响细胞分裂。近年来,随着研究的不断深入,TCP 家族成员也在不断扩大^[4-6]。

Teosinte Branched1(*TB1*)影响玉米和类蜀黍

收稿日期:2011-06-10

基金项目:农业部‘948’项目(2011-G17);公益性行业(农业)科研专项经费资助(200903020)

第一作者:周晓阳,硕士研究生,E-mail:zxyvirgo@163.com

通讯作者:赵梁军,教授,主要从事观赏植物发育生理与分子生物学研究,E-mail:zhaolj5073@sina.com

的形态建成及花的发育^[7]。类蜀黍是玉米的野生祖先,玉米一般是无分蘖的,而类蜀黍是多分蘖的。玉米中 *TBI* 基因的表达量是类蜀黍中的 2 倍,表明 *TBI* 的高表达增加了顶端优势,且 *TBI* 被认为是玉米在驯化过程中人类选择的一个主要的目标基因,也是玉米与其祖先类蜀黍在分枝方面差异的主要原因^[8]。水稻中 *TBI* 基因的过量表达导致腋芽伸长的减少,顶端优势增强;而 *OsTBI* 功能丧失时侧枝增多^[9]。而在小麦中过量表达玉米的 *TBI* 基因同样抑制了分蘖的发育^[10]。

在拟南芥中,*TBI* 的同源基因 *BRANCHED1* (*BRC1*) 表达量降低时分枝增多,且 *BRC1* 综合各种信号,在叶腋处起作用抑制腋芽的伸长^[11]。而且拟南芥中 *BRC1/TBI1* 基因的表达受到生长素信号的正调控,而且 strigolactones 在很大程度上也通过调节 *BRC1/TBI1* 基因的表达来抑制侧枝的发生^[12]。

菊花是世界的四大切花之一,在国际市场上约占鲜切花总量的 30%。市场上的切花菊主要有单头菊、多头菊、小菊 3 种。本研究所用的材料‘神马’是市场上主要的单头切花菊品种,单头菊最重要的特征是一茎一花,但菊花在生产后期会不断产生侧枝。在生产中,一般通过打顶或抹芽来控制菊花侧枝的生长,该过程需要消耗大量的时间和劳动力,因此,培育无分枝性状的菊花品种对减少生产过程中对劳动力的需求是非常重要的,最终能够降低菊花的生产成本。研究菊花侧枝发育机理,对利用基因工程手段调控菊花侧枝发育、培育理想株型具有重要的意义。

本研究从切花菊‘神马’中克隆控制侧枝伸长的关键基因 *BRC1*,并进一步研究该基因的亚细胞定位,旨在探讨该基因在菊花侧枝发育中的功能。

1 材料与方 法

1.1 试供材料

本研究以切花菊‘神马’(*Dendronthema grandiform* cv. Jinba)为材料,通过茎段再生获得菊花组培苗,在 MS 固体培养基上进行继代繁殖,置于培养室中培养。培养温度为 21 °C,光周期 16 h 光照/8 h 黑暗,光强度为 100~120 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s}^2)$ 。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

按照 Mylab 说明书提取叶腋组织总 RNA,并用 DNase I (日本 Takara 公司)去除 RNA 中的痕

量 DNA。以获得的 RNA 为模板,使用 Superscript II reverse transcriptase (美国 Invitrogen 公司)反转录合成 cDNA 第一链。

1.3 *BRC1* 类似基因的克隆

根据已报道的 *BRC1* 类似基因,在保守的 TCP 结构域设计上游引物 *BRC1-sense-1*: 5'-AGRAMRGACMGGCACAGCAAGAT-3',并利用 CodeHop 的方法设计上游引物 *BRC1-sense-2*: 5'-GGTATGAGAGATAGAAGAATGAGACTGTC-TYTNGAYGTNGC-3',在保守的 R 结构域用 CodeHop 的方法设计下游引物 *BRC1-anti-1*: 5'-TCCATTGTTCTTTCTCTAGCTCTTTCNCKN-GCYTT-3'。以 cDNA 第一链为模板,以 Invitrogen 公司的 3'RACE Version E 试剂盒接头引物 3'RACE-AUAP: 5'-GGCCACGCGTCGAC-TAGTACT-3'与 *BRC1-sense-1* 引物进行 PCR 扩增,得到的产物稀释 10 倍,然后以 *BRC1-anti-1* 与 *BRC1-sense-2* 为引物进行扩增,得到中间片段。连接 pMD19-T 载体 (Takara 公司),转化 DH5 α 感受态细胞 (北京天根公司),筛选阳性克隆后测序 (上海生工生物工程技术服务有限公司 (北京))。基因的 3' 序列使用 3'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 技术获得。根据所得的中间片段的测序结果设计特异性引物 *BRC1-sense-3*: 5'-GCTTCAGCCTTATGGG-TGTGTCA-3', *BRC1-sense-4*: 5'-TTCCGAATG-TGAAGTTCTGTCTGG-3'。按 Invitrogen 公司的 3'RACE Version E 试剂盒说明书操作,获得 3' 端序列。将保守序列与 3'RACE 序列进行拼接。基因的 5' 序列使用 5'-RACE 方法获得。以基因特异性引物 *BRC1-anti-2*: 5'-CTTGACACTGACCTA-TTTGC-3' 合成 cDNA 第一链,cDNA 第一链经 TdT 酶加尾。再以加尾的 cDNA 第一链为模板,引物 5-RACE-AAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTA-GTACGGIIGGGIIGGGIIG-3' 和 *BRC1-anti-3*: 5'-TCCAAGACCCTAATCGGCTCATA-3' 进行 PCR 扩增。再以此 PCR 产物稀释 10 倍为模板,用引物 5'RACE-AUAP: 5'-GGCCACGCGTCGACTAGT-ACG-3' 和 *BRC1-anti-4*: 5'-AACCACTCGATAG-TATTGCTTGCC-3' 进行巢式 PCR 扩增,得到 5' 端片段。

1.4 *BRC1* 类似基因的全长获得与序列分析

根据 3' 端和 5' 端拼接序列设计两条特异引物:

BRC1-sense-5: 5'-CGGCATAGCTGGTCTTTGG-ACTAT-3'和 BRC1-anti-5: 5'-CACCCCTTGACA-CTGACCTATTTGC-3',以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。然后克隆、测序,获得全长序列。分析该序列所翻译的氨基酸序列,并与拟南芥 TCP 家族成员和部分双子叶及单子叶植物的同源序列进行比对。利用 MUSCLE v3.6 对所得到的序列进行完全比对分析,并且利用 RAxML 构建了最大似然系统发育树。

1.5 BRC1b 基因的亚细胞定位

利用 RT-PCR 的方法,从菊花总 RNA 中扩增 BRC1b 完整的基因编码区 1 008 bp。经过酶切,测序,利用 DNA 重组技术,将其连接到植物瞬时表达载体 pEZS-NL 构建了全长基因瞬时表达载体 pDgBRC-GFP。将表达载体质粒使用基因枪轰击法转化洋葱表皮细胞,以增强型绿色荧光蛋白 EGFP

为报告基因,经激光共聚焦扫描显微镜(confocal)观察(尼康(nikon)C1si)。所得图像经 EZ-C1 software 及 Photoshop 处理分析。

2 结果与分析

2.1 BRC1 基因的克隆及功能分析

以 cDNA 第一链为模板,以 3'RACE-AUAP 与 BRC1-sense-1 引物进行 PCR 扩增,得到的产物稀释 10 倍,然后以 BRC1-anti-1 与 BRC1-sense-2 为引物进行扩增,获得 320 bp 的保守片段。经 BLAST 分析,该片段与大多数 TCP 家族基因高度同源。使用特异性引物 BRC1-sense-3, BRC1-sense-4 进行 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends),获得 3'序列 919 bp,经 5'-RACE 获得序列 682 bp。经过拼接、全长克隆后该序列中 1 008 bp 的开放阅读框可编码 335 个氨基酸(图 1)。

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
1	ATGCATCCATCATTTTCTCATTCGCGCTCTACAACTCTGATTACAAACCCCTTAGAAGATCCACTTATAGCCACGAGCTTTTCGATACACACGACAAACATCGTTCACTAATGATCAT											
1	M H P S F S S F R L Y N P H Y N P L E D P L I A H E L F D T Q R Q Q S F T N D H											
	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
121	AACTACCACTGCACCTTCATGGTAGCTCAAGAAAACCTCAGCTCTCAGTAATACTAATGTGCACTCCACCATGAACAACCTCCAGCTGCAAAAATGGAAATTTATGGCCCTGATGGTGG											
41	N Y H C T F M V A Q E N S A L S N T N V H S T M N N S S C K N G K F I A L D G G											
	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
241	AATCGTGGTTAACCGACAATAGATCTTTCAAGAAAACCGACACAGCAAGATCAACACAGCTCGAGGCCCGAGGACCGAAGAATGAGATGTCCCTCGATGTGCTAAGAAGTTTTT											
81	N R G L T D N R S F K K D R H S K I N T A R G P R D R R M R L S L D V A K K F F											
	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
361	AAGTTGCAAGCATGCTGGTTTGATAAGGCAAGCAATACTCGAGGTGGATTGATAAAATCAAAACCCCTCTATTCGGGATCTCCTCACTGAACACTTATACCAAGCTCAGCCTC											
121	K L Q D M L G F D K A S N T I E W L I M K S K P S I R D L L T E H L Y Q S C S L											
	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
481	ATGGGTGTGCAACAGTGCATCTCTGCTGCCAATGTGAAGTCTATCTGGACTTAATGATGATCAATCTACGGATAAACCCGTAGAGGATCAAGGAATTCAGTAACAAAGAGAG											
161	M G V S N S A S S A S E C E V L S G L N D D Q S T D K T V E D E Q G I A V N K E K											
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720
601	AAAAACCGTATAAAGTAGTTAGGAGATGTGTATGTTGATCACTCTATAGCTAAAGAAAACAGAGAAAAGCAAGAGTAAGAGCAAGGAAGAGAAACAGCTGAAAAACGAAAAATAAG											
201	K K R D K V V R R C V Y V D H S I A K E T R E K A R V R A R K R T A E K R K I K											
	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840
721	CTCGGTAATGCATCATGTTGGATCATGTAATGTTACAGAAATGAGTCGATTAGGGTCTGGATCCCTTTTGAGAGCATCAAGTTCAAAACATCGATCAAGCCGAAATGCAAGCTCC											
241	L G N A S C L D H V M L Q N M S R L G S W I P F G E H Q V Q T I D Q A E Y A S S											
	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
841	TATTTTCAGTTTAAGCAAGGATTAATGTTGGTGATCTCATCCGCGAGCTAGCAATGGAAACCCATCCTTGTCAATCATCAACAAAATATGGAAATTTCTCATGAGCATCAGTTC											
281	Y F Q F K Q G I N V G D T S S A T S S N W N P S L F N H Q Q N I G I S H E H Q F											
	970	980	990	1000								
961	AGTGACTTTCAGATTCCTGGTAGACCATGGGAAGGCATGAGCAAATAG											
321	S D F Q I P G R P W E G M S K *											

图 1 菊花 BRC1b 类似基因的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列(*代表终止密码子)

Fig. 1 Complementary DNA sequence and deduced amino acids sequence for *DgBRC1b*

经 BLAST 分析表明,该基因与拟南芥,向日葵等植物同源性较高。通过氨基酸序列比对(图 2)发现,*DgBRC1b* 中包含 TCP 的 2 个关键保守结构域,即 TCP domain 和 R domain。

对菊花 *DgBRC1* 与已报道的拟南芥、水稻、玉

米、非洲菊、向日葵等物种中的 *BRC1* 基因进行系统发育分析,从系统发育树看,菊花 *DgBRC1b* 是 *AtBRC1*, *OsTB1*, *ZmTB1*, *HaCYC1*, *GhCYC1* 的同源基因,而且 *DgBRC1b* 与 *GhCYC1* 亲缘关系较近,属于 *TB1* 亚家族(图 3)。

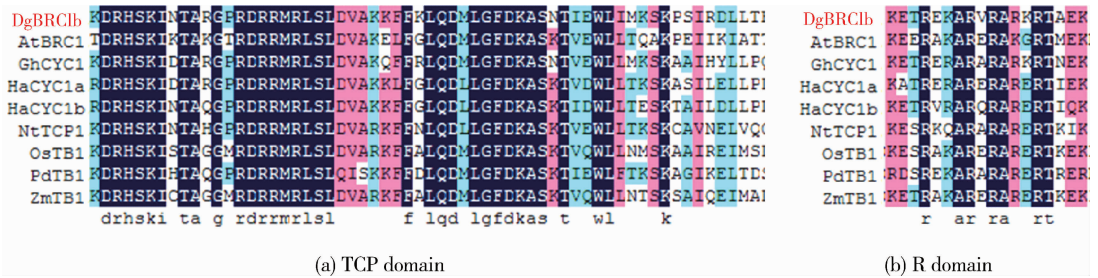
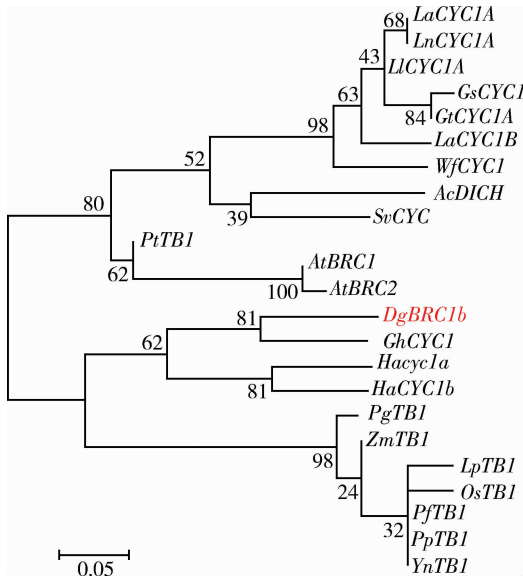


图 2 不同植物 TCP 家族部分氨基酸序列比对分析

Fig. 2 Comparison of partial proteins with homologous proteins of plants

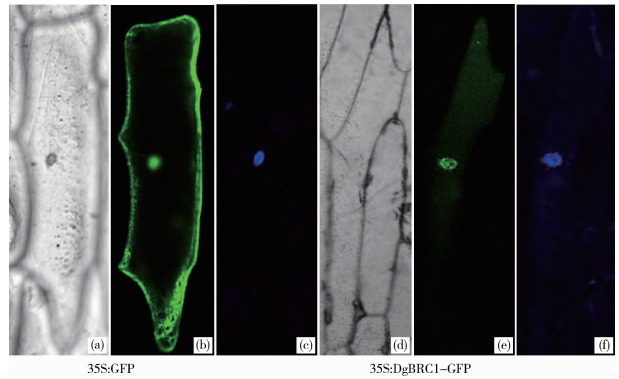


植物名称缩写: *La*: *Lupinus argenteus* 羽扇豆; *Ln*: *Lupinus neomexicanus* 墨西哥羽扇豆; *Ll*: *Lupinus lepidus* 草原羽扇豆; *Gt*: *Genista tenera* 马德拉金雀花; *Gs*: *Genista stenopetala* 多叶金雀花; *Wf*: *Wisteria floribunda* 多花紫藤; *Ac*: *Antirrhinum coulterianum* 金鱼草; *Sv*: *Senecio vulgaris* 欧洲千里光; *At*: *Arabidopsis thaliana* 拟南芥; *Dg*: *Dendranthema grandiflora* ‘Jinba’ 切花菊 ‘神马’; *Gh*: *Gerbera hybrida* 非洲菊; *Ha*: *Helianthus annuus* 向日葵; *Os*: *Oryza sativa* 水稻; *Lp*: *Lolium perenne* 多年生黑麦草; *Pg*: *Pennisetum glaucum* 珍珠粟; *Zm*: *Zea mays* 玉米; *Pf*: *Pleioblastus fortunei* 菲白竹; *Pp*: *Phyllostachys praecox* 黄条早竹; *Yn*: *Yushania nitakayamensis* 玉山竹。

图 3 不同植物的 CYC 蛋白系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of CYC protiens

2.2 *BRC1b* 基因的亚细胞定位

将构建好的重组质粒 pDgBRC1b-GFP 与金粉颗粒混合, 制成金粉-DNA 复合体, 在一定的压力下, 使用基因枪轰击洋葱表皮, 28 °C 过夜培养后在激光共聚焦显微镜下观察(图 4)。以绿色荧光蛋白为标签, 可观察到与对照相比, DgBRC1b-GFP 定位于细胞核, 支持了其作为转录因子的理论。



明场(a、d), 暗场下绿色荧光蛋白图像(b、e), 暗场下 DAPI 染色图像(c、f)。

图 4 *DgBRC1b* 基因的亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of *DgBRC1b*

3 讨论

TCP 蛋白根据其特异的结构域可分为 2 类: class I (TCP-P class) 和 class II (TCP-C class)。与 class II 相比, class I 在基本结构域中缺少 4 个氨基酸。在被子植物中, class I 是由紧密相关的一组蛋白形成, 主要包括水稻的 PCF1 和 PCF2 蛋白; 而 class II 又可依据结构域的不同分为两组: CIN 与 CYC/TB1。CIN 主要从金鱼草中发现, 与侧生器官的发育有关; CYC/TB1 具有一个特有的 R 结构域, 主要与侧生分生组织有关, 即与花或侧芽的形成有关。CIN 组较 CYC/TB1 组更为古老。在核心真双子叶植物中, CYC/TB1 组经进化产生 3 种不同的基因: *CYC1*、*CYC2*、*CYC3*, 其中, *CYC1* 与侧枝发生有关, *CYC2* 与花的两侧对称有关, *CYC3* 基因在侧枝以及花芽原基中都有表达, 可能对侧枝的发生起到较小的调控作用, 但是它在花发育过程中的作用尚不明确^[5-6]。TCP 家族基因调控了植物的分生组织, 包括花分生组织和腋生分生组织。在禾本

科植物中, *TBI* 基因调控了花分生组织的形成和腋芽的伸长^[7-9];而在拟南芥中, *BRC1* 基因只调控了腋芽的伸长^[11]。该基因在菊花中的作用则需要进一步研究。

本研究获得的 *DgBRC1b* 含有保守的 TCP 结构域和 R 结构域,与 *CYC/TBI* 的同源性较高,经系统进化分析也说明该基因与这一家族亲缘性更近。通过进化分析发现, *DgBRC1b* 基因与非洲菊 *CYC1* 和向日葵 *CYC1b* 基因亲缘关系最近,但是这两个基因功能并不清楚,只是推测与侧枝发育有关^[14];其次,该基因与水稻等禾本科植物 *TBI* 基因亲缘关系也较近,而该类基因的功能已经清楚,能够抑制侧枝的伸长。另外,该基因与拟南芥 *BRC1* 和 *BRC2* 亲缘关系也较近,在拟南芥中已证实 *BRC1* 基因在叶腋处综合多种信号,调控了腋芽的伸长^[11]。因此推测菊花 *DgBRC1b* 功能与侧枝发育有关。GFP 融合蛋白试验将 *BRC1b* 定位于细胞核,支持了其作为转录因子的假设。

菊花是世界的四大切花之一,菊花在生产后期会不断产生侧枝。在生产中,一般通过打顶或抹芽来控制菊花侧枝的生长,该过程需要消耗大量的时间和劳动力。对 *DgBRC1b* 的相关研究有助于了解菊花侧枝调控的分子机理,为少侧枝菊花的基因工程育种奠定理论基础。

参 考 文 献

- [1] 袁进成,刘颖慧. 高等植物侧芽、侧枝的发生及调控[J]. 河北北方学院院报,2007,23(5):18-23
- [2] Elizabeth Ann Dun, Brett James Ferguson, Christine Anne Beveridge. Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? [J]. *Plant Physiology*, 2006,142:812-819
- [3] Alice Hayward, Petra Stirnberg, Christine Beveridge, et al. Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control[J]. *Plant Physiology*,2009,151:400-412
- [4] Thomas G, Oliver C, Elisabeth S, et al. Molecular analysis of the lateral suppressor gene in tomato reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation[J]. *Genes and Development*,2003,17:1175-1187
- [5] Gregor Schmitz, Klaus Theres. Shoot and inflorescence branching[J]. *Current Opinion in Plant Biology*,2005,8:506-511
- [6] Mar Martin-Trillo, Pilar Cubas. TCP genes: a family snapshot ten years later[J]. *Trends in Plant Science*,2009,15(1):31-39
- [7] Doebley J, Stec A, Hubbard L. The evolution of apical dominance in maize[J]. *Nature*,1997,386:485
- [8] Wang R L, Stec A, Hey J, et al. The limits of selection during maize domestication[J]. *Nature*,1999,398:236
- [9] Takeda T, Suwa Y, Suzuki M, et al. The *OsTBI* gene negatively regulates lateral branching in rice[J]. *Plant Journal*, 2003,33:513
- [10] Lewis Janet M, Mackintosh Caroline A, Shin Sanghyun, et al. Overexpression of the maize *Teosinte Branched1* gene in wheat suppresses tiller development [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 1217
- [11] Aguilar-Martinez J A, Poza-Carrion C, Cubas P. *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds[J]. *Plant Cell*,2007,19:458
- [12] Finlayson S A. *Arabidopsis* TEOSINTE BRANCHED1-LIKE 1 regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot TEOSINTE BRANCHED1 [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007,48(5):667-677
- [13] 薛启汉. 绿色荧光蛋白(GFP)的特性及其在分子生物学研究中的应用[J]. *江苏农业学报*,1999,15(1):52-58
- [14] Dianella G, Michael J D. Phylogenetic analysis of the "ECE" (*CYC/TBI*) clade reveals duplications predating the core eudicots[J]. *PNAS*,2006,103(24):9101-9106

责任编辑:袁文业