

文章编号: 1674-7054(2018)04-0393-08

文心兰 *OnRR9* 基因克隆及表达

闫冰玉¹, 巩笑笑¹, 谭玉荣¹, 王 鹏¹, 李双江¹, 潘英文², 刘进平¹

(1. 海南大学 热带农林学院/海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228;

2. 海南出入境检验检疫局 热带植物隔离检疫中心, 海口 570311)

摘 要: 利用 RACE 技术从文心兰花瓣中克隆到 *RR* 基因, 将其命名为 *OnRR9* (登录号: MH758789)。 *OnRR9* 基因全长为 627 bp, 编码 208 个氨基酸。对其进行蛋白质 2 级结构分析, 构建进化树, 并进行实时荧光定量分析。结果表明: *OnRR9* 蛋白为亲水性的分泌蛋白, 定位于细胞核中。同源序列比对显示, *OnRR9* 基因属于 YesN/AraC 家族, 氨基酸序列中含有保守的 REC 结构域, 可能参与双组分信号转导途径。构建进化树表明, *OnRR9* 蛋白与拟南芥中 A 型 ARR 亲缘关系接近, *OnRR9* 基因可能作为细胞分裂素信号传导的成分。实时荧光定量分析结果表明, *OnRR9* 基因在盛花期前后表达模式发生逆转, 表明它可能参与文心兰花瓣衰老启动过程。

关键词: 文心兰; *OnRR9* 基因; 花衰老; 双组分信号系统; 基因表达

中图分类号: Q 786 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.04.005

细菌信号转导通路有时被称为“双组分系统”或“磷酸化”, 它们调节多种细胞反应, 包括细菌趋化性、渗透调节、光敏性和微生物发病机制^[1]。“双组分系统”主要由感受刺激的组蛋白激酶和输出信号的反应调控因子 (Response Regulator) 组成, 当接收到环境刺激时, His 蛋白激酶调节自身并磷酸化其保守的 His 残基, 发起信号传导, 将磷酸基转移至反应调节器上的保守 Asp 残基, 导致其活性的调节。拟南芥基因组测序的完成促使在真核细胞中首次发现了双组分系统, 目前, 已发现拟南芥中有 23 种反应调节因子 (ARR), 根据结构和功能分为 A 类 ARRs 和 B 类 ARRs^[2-6]。在水稻中 OsRR3-OsRR6、玉米中 ZmRR1 和 ZmRR2 以及甘蓝型油菜中也研究得较充分^[7-8], 兰科中基因组测序发现了多种 *RR* 基因, 但尚未见其功能的报道。这些基因结构域分析显示都属于 YesN/AraC 基因家族, 由 REC 和 AraC 型 DNA 结合结构域组成。目前发现的 A 类反应调节因子大多与细胞分裂素传导途径相关, 表达受氮水平变化、盐处理、低温等影响, 其中, 拟南芥 *ARR4* 还与光信号传导以及下胚轴生长有关; B 类反应调节因子大多对细胞分裂素不敏感, 是定位于细胞核中的转录因子, 可作用于 A 类反应调节因子^[2-4]。

文心兰属兰科文心兰属植物, 又名舞女兰、跳舞兰、瘤瓣兰等, 因其花瓣鲜黄, 花型奇异可爱, 具有较高的观赏价值^[9-13]。花朵衰老快慢和寿命长短是评价观花植物品质好坏的一个重要指标。研究控制花瓣衰老的相关基因有利于采用生物技术从遗传物质上进行改造, 在分子水平上控制切花衰老, 从而有望从根本上解决花卉保鲜及衰老问题。文心兰主要切花品种黄色花南茜种 (*Oncidium* Gower Ramsey) 花发育阶段容易分期, 十分适合进行花衰老研究^[14]。此前, 笔者已从文心兰中克隆和鉴定出一系列跟花发育和衰老相关的基因^[15-17], 最近的转录组研究表明, 反应调控因子 (*RR*) 基因可能参与了文心兰花瓣的衰老启动^[14]。

收稿日期: 2018-09-25

修回日期: 2018-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31560573); 海南大学热带农林学院作物学科研究生科研创新课题 (ZWCX2018030); 海南大学作物学优秀本科生人才培养计划课题 (ZWCX2018046)

作者简介: 闫冰玉 (1995-), 女, 海南大学热带农林学院 2016 级硕士研究生, E-mail: 15008097361@163.com

通信作者: 刘进平 (1970-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 作物遗传育种, E-mail: liu3305602@163.com

本研究根据 NCBI 上兰科植物 *RR* 基因序列设计兼并引物,结合 RACE 技术,克隆到双组分信号系统中反应调节基因 *OnRR9*,并利用生物信息学的方法分析了蛋白质 3 维结构,利用蛋白序列比对构建进化树。同时,研究了该基因在不同花期基因表达量情况,这对深入探究 *OnRR9* 的功能,解决兰花的采后保鲜及衰老问题具有重要的理论价值。

1 材料与方法

1.1 实验材料 供试材料为文心兰南茜种‘黄金 3 代’(*Oncidium Gower Ramsey* ‘Gold 3’) 鲜切花。购自海南出入境检验检疫局热带植物隔离检疫中心。

1.2 文心兰花瓣总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 参照文献 [18] 的方法提取文心兰花瓣总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,并测量 RNA 浓度。按照 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒说明书合成 cDNA 第 1 条链。

1.3 *OnRR9* 基因保守序列的扩增 根据 NCBI 上已提交的蝴蝶兰、石斛兰等兰科植物的保守序列设计兼并引物 P1 和 P2(表 1),以合成的 cDNA 第 1 条链为模板,扩增 *OnRR9* 基因的保守区。反应体系为: cDNA, 0.5 μ L; 10 $\times$ LA Buffer II (Mg^{2+} plus) 5 μ L; dNTP Mix (2.5 mm each) 8 μ L; 上游引物 (10 μ m) 0.5 μ L; 下游引物 (10 μ m) 0.5 μ L; TaKaRa LA *Taq* (5 μ m) 0.2 μ L, 总体积 50 μ L。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; (95 $^{\circ}$ C, 30 s; 49 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 2 min) 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 基因 5'端序列和 3'端序列的扩增 获得保守序列后设计 5'RACE 引物 P3, P4, 合成 P3, P4 以及随机引物 QT, QO, QI(表 1)。提取文心兰花瓣总 RNA 根据 5'经典 RACE 方法^[19]获得 cDNA 第 1 条链,并进行巢式反应,获得 *OnRR9* 基因 5'端序列。

设计并合成 3'RACE 引物 P5, P6。提取文心兰花瓣总 RNA 根据 TaKaRa 3'-Full RACE Core set with PrimeScript RTase 试剂盒说明书操作,获得 *OnRR9* 基因 3'端序列。

表 1 实验引物

Tab. 1 List of primer information used in study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	用途 Usage
P1	5'-CTTCRGCTCCTTCTTCCAAG-3'	47.7	保守区扩增
P2	5'-GTGGATGACAGCMTCAATTGATMG-3'	50.2	Amplification of conservative region
P3	5'-CTGTTGATCCTGGAAGGCAC-3'	57.6	5' RACE
P4	5'-ATCATACCCAGTCATTYCWGGC-3'		
P5	5'-TTGACAGATAGCTCATCGAGAGA-3'	57	3' RACE
P6	5'-TGGATTCTGGAAGTAAGCGC-3'	57.8	
Q _T	5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC-17T-3'		5' RACE 随机引物
Q _O	5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3'		5' RACE random primer
Q _I	5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3'		
<i>OnRR9</i> -A1	5'-GGACTAGTCAACACAGTTAAGCTATCACTGCTGT-3'		全长序列扩增
<i>OnRR9</i> -S1	5'-CATGCCATGGCTGTTCGACGGAG-3'	59.8	Full-length amplification
<i>OnRR9</i> -A2	5'-CAAGAACTCGAGCGCCTTAC-3'	59.01	实时荧光定量 PCR
<i>OnRR9</i> -S2	5'-CGCAGTTCCATGTTCTTGCA-3'	59.41	Real-time fluorescence quantitative PCR
<i>Actin</i> A1	5'-ATCCTCCAATCCAGACACTGT-3'		检测 cDNA
<i>Actin</i> S1	5'-CAGTGGTCGTACAACCTGGTAT-3'		Testing cDNA
<i>Actin</i> A2	5'-GGGCATATCCTTCGTAGATTGT-3'		qPCR 内参
<i>Actin</i> S2	5'-AATGTGCCTGCTATGTATGTTGCT-3'		Reference gene qPCR

1.5 *OnRR9* 基因全长序列的获得 将 3' 5'端片段与之前获得的基因保守区序列进行拼接,得到 *OnRR9* 基因全长序列,为了验证拼接得到的全长序列是否正确,分别设计并合成引物 *OnRR9*-A1 和 *OnRR9*-S1,以 cDNA 第 1 条链为模板,进行 PCR 反应获得 *OnRR9* 基因全长序列并测序。PCR 反应体系为: Premix Taq (TaKaRa Taq version 2.0) plus dye 5 μL , 上游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.25 μL , 下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.25 μL , cDNA 0.5 μL , 总体积 10 μL 。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 30 个循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s); 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 PCR 产物的胶回收、克隆及测序 PCR 产物在 $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶电泳下检测。用 OMEAG Gel Extraction Kit 进行胶回收,将胶回收的目的片段与 PMD19-T 载体连接,对感受态大肠杆菌 DH5 α 进行转化,取 100 μL 转化后的菌液涂布到 LB 平板(含有 Amp, X-Gal 和 IPTG)上,过夜培养,挑取菌落检测后测序。

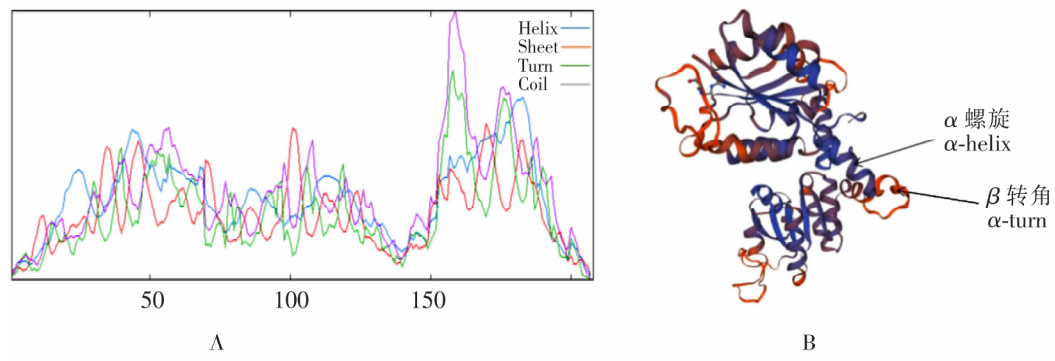
1.7 *OnRR9* 基因生物信息学分析 利用 ORFfinder 进行氨基酸序列预测;通过 ExPASy 服务器的在线软件 ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对推导的 *OnRR9* 基因的氨基酸序列进行理化性质分析;用 ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/>) 对 *OnRR9* 蛋白的亚细胞定位进行预测;运用 NCBI 的 CD-Search service 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对 *OnRR9* 进行蛋白序列的结构域分析;根据 ProtFun 在线分析程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>) 对基因进行蛋白功能预测;采用 SignalP 4.1 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/output.php>) 进行氨基酸序列的信号肽预测;根据 TMHMM 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测 *OnRR9* 蛋白跨膜区段。利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 对氨基酸的疏水性/亲水性进行预测;用 SOPMA SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD 对 *OnRR9* 蛋白进行 2 次结构分析;使用 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 进行 3 维结构分析;利用 ClustX 和 DNAMAN 进行蛋白同源序列比对,并用 MEGA6 构建系统进化树。

1.8 *OnRR9* 基因在不同花期的表达分析 提取文心兰不同花期花瓣总 RNA,反转录得到 cDNA,用 *Actin* A1 和 *Actin* S1 引物检测 cDNA 质量。本研究内参基因为 *Actin* A2 和 *Actin* S2, *OnRR9* 基因荧光定量 PCR 的上下游引物为 *OnRR9*-A2 和 *OnRR9*-S2。PCR 扩增反应体系为: TB Green premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 10.0 μL , Rox Reference Dye II 0.4 μL , 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.8 μL , cDNA 模板 2.0 μL , dd H₂O 6.0 μL , 总体积 20 μL 。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; (95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s; Tm 30 s) 40 个循环; (95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 5 s) 绘制溶解曲线。每对引物设 3 个无模板对照,不同花期的模板都进行 3 次重复实验。

2 结果与分析

2.1 文心兰 *OnRR9* 基因全长序列的克隆 提取质量良好的花瓣总 RNA 后,反转录获得 cDNA。通过在 NCBI 上查找兰科 *RR* 基因序列,比对分析获得保守区域,以 cDNA 为模板,利用保守区设计兼并引物,进行 PCR 扩增得到 *OnRR9* 基因条带大小约为 337 bp(图 1-A)。经过 BLAST 比对,发现与已知的兰科 *RR* 基因有较高的同源性,说明克隆获得的目的基因为 *RR* 基因。

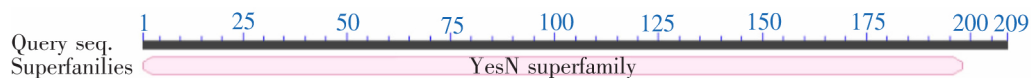
利用获得的保守区序列,分别设计 5'RACE 和 3'RACE 引物,经过两轮巢式反应,回收 5 经典 RACE 二轮反应约为 536 bp(图 1-B)的条带并测序,得到大小约为 525 bp 的序列。经过 DNAMAN 和 BLAST 比对,发现为 *OnRR9* 基因 5'端序列。同样地,回收 3'-Full RACE 二轮反应的条带,测序分析,获得大小约为 751 bp(图 1-C)的 *OnRR9* 基因 3'端序列。经过 DNAMAN 比对和 SnapGene Viewer2.2.8 分析得到 *OnRR9* 基因 CDS 区全长序列。设计引物 *OnRR9*-A1, *OnRR9*-S1,以 cDNA 第 1 条链为模板,进行 PCR 反应,测序得到 *OnRR9* 基因全长约为 627 bp(图 1-D),与预期结果一致。

图3 文心兰 *OnRR9* 基因的 2 级结构和 3 级结构预测

A: *OnRR9* 基因的 2 级结构预测; Helix: α 螺旋; Sheet: 延伸链; Turn: β 转角; Coil: 无规卷曲; B: *OnRR9* 基因的 3 级结构预测

Fig.3 Prediction of secondary structure and tertiary structure of *Oncidium OnRR9* gene

Note: A: Prediction of secondary structure of *OnRR9* gene; Helix: Alpha helix; Sheet: Extended strand; Turn: Beta turn; Coil: Random coil; B: Prediction of tertiary structure *OnRR9* gene

图4. 文心兰 *OnRR9* 基因的保守结构域Fig.4 Conserved domains of the *OnRR9* gene of *Oncidium*

NnARR9-like	MGMAAEACFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLREDDQTNPSPP..SVFSPN.HHEMCVNLIT	77
McSignal	MGMAAEACFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLMELEQRNSSPP..SVSSDFHCELEVNLIIT	78
TcType-a	MGMAAEACFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLHEDDTNPSTP..CVSPNNHCEVEVNLVIT	78
TcARR9	MGMAAEACFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLHEDDTNPSTP..CVSPNNHCEVEVNLVIT	78
AoARR9	MAVATETCFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLQDEQVDSSSSSSTTPEQNEIEVNLVIT	80
DoARR9-like	MAVASEAFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLRELLERPSSAT.....SCQHEIEVNLVIT	74
PeARR9-like	MAVATEACFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLRELLERPSSAT.....SCQHEIEVNLVIT	73
OnRR9	MAVATEACFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLREHRRDCSAN.....SSQLENEVNLVIT	74
DcARR8	MALAAESCFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLGETHGSAASS.....CEQLEAEVNLVIT	74
EgARR9	MAVATEACFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLQDDQTNPSFVS.....SDQHDVEVNLVIT	74
maARR9-like	MAVDREACFHVLAVDDSLIDRKLIERLLKSSYCVTVSGSKALEELGLREDDQDISPSS.....PDKNEIAVNLVIT	74
Consensus	m e fhvlavdds dr lie ll ss vt v sgskal lg vn it	
NnARR9-like	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSLKDI PVVIMSSENVSRINRCLEEGAEFFLLKPVCLSDVNRIRHILKKGKLRQ..KLQQ	156
McSignal	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSLKDI PVVIMSSENVSRISRCLEEGAEFFLLKPVKLSVVKIKKHLKKGKSRQ..CLQS	157
TcType-a	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSLRDI PVVIMSSENVSRISRCLEEGAEFFLLKPVRLSDLNKIRHILKKTSKDQHQKQ	158
TcARR9	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSLRDI PVVIMSSENVSRISRCLEEGAEFFLLKPVRLSDLNKIRHILKKTSKDQHQKQ	158
AoARR9	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSLKDI PVVIMSSENVSRINRCLEEGAEFFLLKPVKLSDMNIRHILKKGKGRDQKQQE	160
DoARR9-like	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSAFKDI PVVIMSSENVSRINRCLEEGAEFFLLKPVKLSDMNIRHILKKGKSKEDQCRN	154
PeARR9-like	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSAFKDI PVVIMSSENVSRINRCLEEGAEFFLLKPVKLSDMNIRHILKKGKSKEDQCRN	147
OnRR9	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSAFKDI PVVIMSSENVSRINRCLEEGAEFFLLKPVKLSDMNIRHILKKGKSKEDQKTN	154
DcARR8	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSAFKDI PVVIMSSENVSRINRCLEEGAEFFLLKPVKLSDMNIRHILKKGKCKEQGKNN	154
EgARR9	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSLKDI PVVIMSSENVSRINRCLEEGAEFFLLKPVCLSDMNRIRHILKKGKYEQH...QQ	152
maARR9-like	DYCMFGMTCYDILLKKIKSSSLKDI PVVIMSSENVSRINRCLEEGAEFFLLKPVCLSDMNRIRHILKKGKYEQH...QH	154
Consensus	dycmp m g dlkkik s pvvimssenvp ri rcle gaeeff lkp lsd l p k	
NnARR9-like	QQQQLSPPPQLPQQQLQPLQ.....QPQQNNRRKSIEEGLSPERTERY...SGLAVV...	209
McSignal	HQEQEQPQQKLSQEQEESLEAEQESVKLESQQLNNRRKAMEEGLSPERTERY...TGLTMV...	222
TcType-a	KQEEKSAFQSPKQQQKEEHHQ.....QQQSSNNRRKAMEEGLSPERTERY...NGITTV...	213
TcARR9	KQEEKSAFQSPKQQQKEEHHQ.....QQQSSNNRRKAMEEGLSPERTERY...NGITTV...	213
AoARR9	ENQEQN.....QSPSSGNRRKAADEGLSPERTERYSSNSLTVL...	200
DoARR9-like	NN.....NNIDFSTIN.....SGSRNRRKAMEEGLSPERTERYSSNTNLSLTVL...	200
PeARR9-like	NNGEFS.....SSSRGNRRKAMEEGLSPERTERYSSNPNGLTVL...	188
OnRR9	NNNSNNDDEDDVSTVK.....SSSRNRRKAMEEGLSPERTERYSSNSLTVL...	208
DcARR8	SNNDLSSSGSRCLVITNA.....SSNLSNRRKAMEEGLSPERTERYSSRKNGLTVL...	208
EgARR9	QVLQ.....DDSTI..SS.....NKNR...NRRKAMDEGLSPERTERYSSSLTVL...	193
maARR9-like	QETN.....SSTISSCSS.....NNNSNRRKAMEEGLSPERTERYSSSLALVSYEET	205
Consensus		

图5 文心兰 *OnRR9* 与其他物种 RR 蛋白氨基酸序列多重比对

Nn: 水芙蓉; Mc: 博落回; Tc: 可可; Ao: 石刁柏; Dc: 石斛兰; Pe: 蝴蝶兰; On: 文心兰; Eg: 油棕; Ma: 小果野蕉

Fig.5 Multiple alignment of the amino acid sequence of the *OnRR9* of other species

Nn: *Nelumbo nucifera*; Mc: *Macleaya cordata*; Tc: *Theobroma cacao*; Ao: *Asparagus officinalis*; Dc: *Dendrobium catenatum*; Pe: *Phalaenopsis equestris*; Eg: *Elaeis guineensis*; Ma: *Musa acuminata* subsp. malaccensis

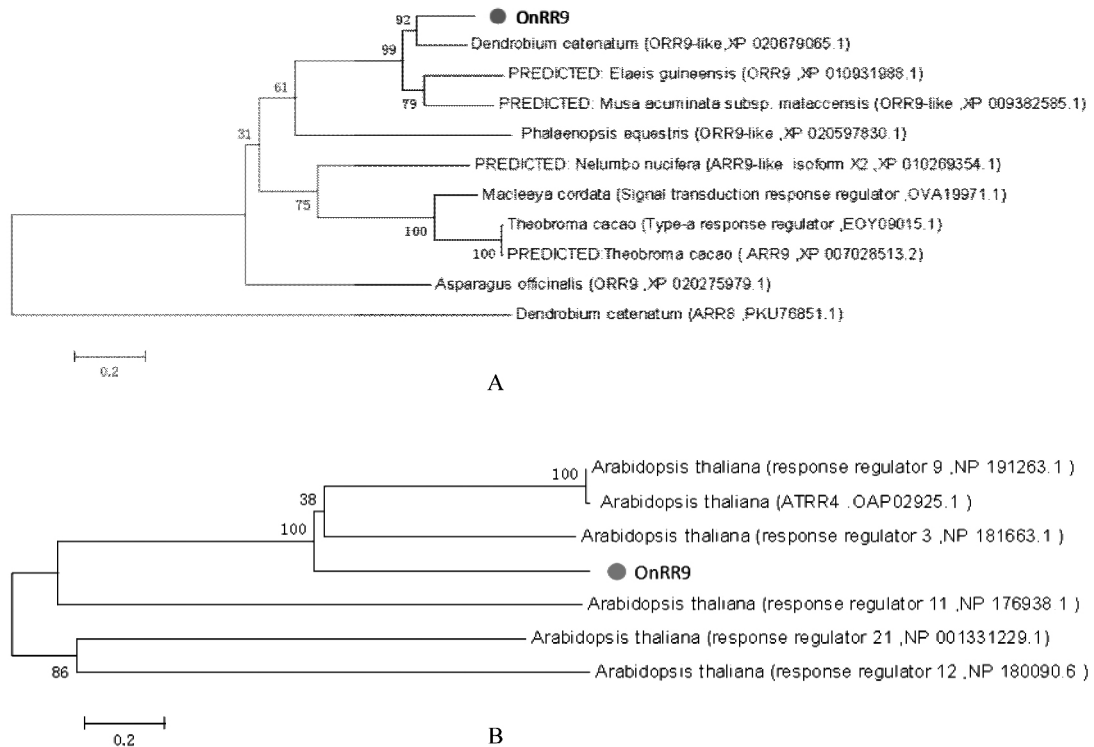


图6 文心兰 OnRR9 的系统进化树

A: OnRR9 与其他物种 RR 蛋白的系统进化树; B: OnRR9 与拟南芥 ARR 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of OnRR9

A: Phylogenetic tree of OnRR9 and the RR proteins of other plant species; B: Phylogenetic tree of the OnRR9 and the *Arabidopsis* ARR proteins

NCBI 保守结构域分析表明, *OnRR9* 基因属于 YesN/AraC 基因家族, 有 REC 和 AraC 型 DNA 结合结构域, 该保守结构域分布在 *OnRR9* CDS 区的 1 ~ 594 bp 之间(图 4)。将文心兰 *OnRR9* 基因翻译的蛋白与其他 8 个物种的蛋白氨基酸序列进行同源序列比对, 结果显示, 分析的 9 个物种的 11 个氨基酸序列在 N 端(文心兰 *OnRR9* 的 9 ~ 138 位氨基酸)均有 REC 保守结构域, 该结构域为 cheY - 同源受体结构域, 含有磷酸受体位点, 能被组氨酸激酶同源物磷酸化, 参与双组分信号系统。

用 NCBI 的 BLAST 进行序列比对, 并用 MEGA6 对 *OnRR9* 蛋白及其同源序列构建进化树。结果显示, 文心兰 *OnRR9* 蛋白与铁皮石斛 *ORR9* (*Dendrobium catenatum*, XP 020679065.1) 亲缘关系最近, 其次是油棕 *ORR9* (*Elaeis guineensis*, XP 010931988.1)、小果野蕉 *ORR9* (*Musa acuminata*, XP 009382585.1) 以及小兰屿蝴蝶兰 *ORR9* (*Phalaenopsis equestris*, XP 020597830.1) (图 6 - A)。为进一步确认所克隆的 RR 类型, 使其与拟南芥 6 个 ARR 家族成员进行比对并构建进化树(图 6 - B), 发现文心兰 *OnRR9* 与拟南芥 *ARR3*, *ARR4*, *ARR9* 亲缘关系相对较近。

综上所述, *OnRR9* 蛋白与蝴蝶兰、石斛兰等兰科植物 RR 同源性在 66% ~ 75% 之间, 与其他物种同源性在 60% ~ 67% 之间。同时, 蛋白结构域分析表明该基因属于 YesN/AraC 基因家族, 与其他植物 RR 蛋白结构域分析结果一致, 因此, 认为克隆到的基因确为 RR 基因。

2.3 文心兰 *OnRR9* 基因在不同花期的表达分析 根据文心兰南茜种花的形态变化特征, 文心兰花发育分为 8 个阶段^[20]。分别采取脱落前 7 个时期(花苞期 A、绽口期 B、半开放期 C、盛开前期 D、盛开期 E、衰老初期 F、衰老期 G)花瓣, 提取总 RNA, 反转录得到 cDNA 进行 Q-PCR 反应, 以花苞期(A 时期)表达量为单位 1, 绘制不同花期 *OnRR9* 基因相对表达量柱状图。从图 7 可知, *OnRR9* 基因在盛开期(E 时期)表达量达到最高值, 在花苞期(A 时期)、半开放期(C 时期)和衰老期(G 时期)表达量相对较低。尤其值得注意的是, *OnRR9* 基因在盛开期(E 时期)前后表达模式发生逆转, 即从半开放期到盛开期上升, 到中盛开期顶点后, 从盛开期到衰老期呈下降趋势。

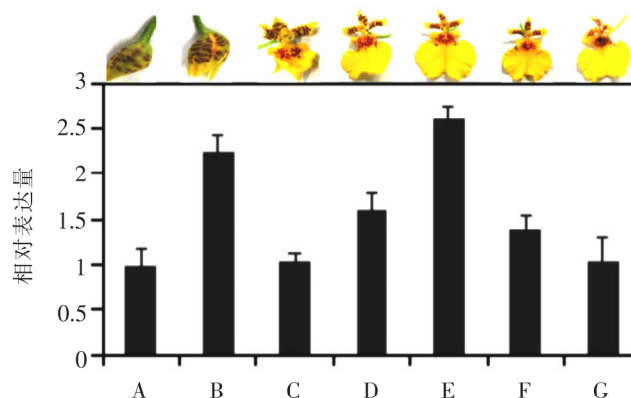


图7 文心兰 *OnRR9* 基因在不同花期时的表达

A: 花苞期; B: 绽口期; C: 半盛花期; D: 盛开前期; E: 盛花期; F: 衰老初期; G: 衰老期

Fig. 7 Expression of the *OnRR9* of *Oncidium* at different flowering stages

A: A floral bud; B: A bursting bud; C: A half-unfolded flower; D: A flower prior to full blossom; E: A full blossom flower; F: A flower at the initial stage of senescence; G: A flower at the senescence stage

3 讨论

拟南芥中的 23 种反应调节因子根据它们的同源性、保守域的结构、氨基酸的相似程度以及是否受到细胞分裂素诱导,一般被分为 2 大类,分别是 11 个 A 型反应调节因子(ARR3-9, ARR15-17, ARR22)和 12 个 B 型反应调节因子(ARR1-2, ARR10-14, ARR18-21, ARR24)。A 型反应调节因子有接受域,较短的 N-端, C-延伸,无输出域,可能参与细胞分裂素信号途径; B 型反应调节因子位于细胞核,有转录活性, N-端接受域,较长的 C-端,羧基末端延伸区有特异的 DNA 序列结合位点以及含有 80 个氨基酸组成的延伸域和富含麸氨酸区域组成的转导域^[2-3]。该实验得到的 *OnRR9* 蛋白预测显示其与缺乏输出结构域的细菌应答调节蛋白 CheY 最相似,氨基酸序列中含有磷酸受体位点,以及双组分信号系统中常见的 REC 保守结构域,序列结构域分析显示, C-末端由约 30 个氨基酸组成,有接受域,认为该基因与拟南芥 A 型反应调节因子更相近。同时,通过与拟南芥中双组分系统相关的反应调节蛋白比对建树也发现, *OnRR9* 与拟南芥中 A 型 ARR 亲缘关系较近。研究发现, A 型 ARR 参与细胞分裂素信号传导^[21-22]。植物衰老受协调的遗传程序调节,该程序部分由乙烯、脱落酸和细胞分裂素含量变化与敏感性介导。研究表明,细胞分裂素可能调控花瓣的寿命^[23-24],与花瓣衰老关系密切^[25]。因此, *OnRR9* 基因很可能通过细胞分裂素信号转导途径从而在文心兰花瓣衰老中发挥作用。笔者利用实时荧光定量分析了 *OnRR9* 基因在文心兰切花发育和衰老不同阶段的相对表达量,结果发现, *OnRR9* 基因在盛花期前后表达模式发生逆转,因此,推断该基因可能参与文心兰花瓣的衰老启动过程。

参考文献:

- [1] IMAMURA A, HANAKI N, NAKAMURA A, et al. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1999, 40(7): 733-742.
- [2] MIZUNO T. Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm[J]. *Current opinion in plant biology*, 2004, 7(5): 499-505.
- [3] HWANG I, CHEN H C, SHEEN J. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 500-515.
- [4] HWANG I, SHEEN J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction[J]. *Nature*, 2001, 413(6854): 383.
- [5] SALOMÉ P A, TO J P C, KIEBER J J, et al. *Arabidopsis* response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(1): 55-69.
- [6] 孟文静. 拟南芥 B 类 ARR 调控茎端分生组织重塑与维持的分子机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- [7] 程潇. 水稻细胞分裂素二元信号系统分析及反应调节因子的分子调控研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [8] D'AGOSTINO I B, KIEBER J J. Phosphorelay signal transduction: the emerging family of plant response regulators [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(11): 452-456.

- [9] 田晓岩 杨翠萍 胡进 等. 文心兰 *OnERS1* 全长基因克隆及表达分析[J]. 分子植物育种 2017 ,15(4): 1265 – 1272.
- [10] 田晓岩 石乐松 潘英文, 等. 文心兰 *OnACO2* 基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种 2015 ,13(7): 1602 – 1610.
- [11] 李玲 赖钟雄 陈裕坤 等. 文心兰 *OnCOBRA* 基因克隆及表达模式分析[J]. 热带作物学报 2014 ,35(8): 1551 – 1558.
- [12] 杨光华 刘进平. 文心兰 ACC 氧化酶基因 *OnACO1* 克隆与表达分析[J]. 热带作物学报 2014 ,35(4): 693 – 699.
- [13] 张国付 蒋素华 崔波 等. 文心兰 *GAPDH* 基因片段的克隆及序列分析[J]. 河南农业大学学报 2013 ,47(01): 68 – 71.
- [14] YANG C P , XIA Z Q , HU J , et al. Transcriptome analysis of *Oncidium* petals provides new insights into the initiation of petal senescence[J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology , 2018 ,93: 1 – 12.
- [15] YANG G-H , LIU J-P. Isolation of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene from *Oncidium* Gower Ramsey [J]. Genetics and Molecular Research , 2014 ,13(4): 8480 – 8488.
- [16] 杨光华 刘进平. 文心兰 ACC 氧化酶基因 *OnACO1* 克隆与表达分析[J]. 热带作物学报 2014 ,35(4): 693 – 699.
- [17] SHI L-S , LIU J-P. Molecular cloning and expression analysis of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene from *Oncidium* Gower Ramsey [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications , 2016 ,469: 203 – 209.
- [18] 石乐松 刘进平. 文心兰 RNA 不同提取方法比较[J]. 生物技术 2012 ,22(6): 42 – 45.
- [19] SCOTTO-LAVINO E , Du G , Frohman M A. 5' end cDNA amplification using classic RACE[J]. Nature protocols , 2006 ,1(6): 2555.
- [20] 石乐松 孙慧 田晓岩 等. 文心兰南茜种花发育进程与分期[J]. 热带生物学报 2016 ,7(4): 440 – 443 , 449.
- [21] VERMA V , SIVARAMAN J , SRIVASTAVA A K , et al. Destabilization of interaction between cytokinin signaling intermediates *AHP 1* and *ARR 4* modulates *Arabidopsis* development [J]. New Phytologist , 2015 ,206(2): 726 – 737.
- [22] OSAKABE Y , MIYATA S , URAO T , et al. Overexpression of *Arabidopsis* response regulators , *ARR4/ATRR1/IBC7* and *ARR8/ATRR3* , alters cytokinin responses differentially in the shoot and in callus formation [J]. Biochemical and biophysical research communications , 2002 ,293(2): 806 – 815.
- [23] HOEBERICHTS F A , VAN DOORN W G , VORST O , et al. Sucrose prevents up-regulation of senescence-associated genes in carnation petals [J]. Journal of Experimental Botany , 2007 ,58(11): 2873 – 2885.
- [24] CHANG H , JONES M L , BANOWETZ G M , et al. Overproduction of cytokinins in petunia flowers transformed with PSAG12-IPT delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene [J]. Plant Physiology , 2003 ,132(4): 2174 – 2183.
- [25] VAN STADEN J , DIMALLA G G. The effect of silver thiosulphate preservative on the physiology of cut carnations II. Influence on endogenous cytokinins [J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie , 1980 ,99(1): 19 – 26.

Cloning and Expression Analysis of *OnRR9* Gene in *Oncidium*

YAN Bingyu¹ , GONG Xiaoxiao¹ , TAN Yurong¹ , WANG Peng¹ , LI Shuangjiang¹ , PAN Yingwen² , LIU Jinping¹

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources , Institute of Tropical Agriculture and Forestry ,

Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China; 2. Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plant ,

Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Haikou , Hainan 570311 , China)

Abstract: A gene of response regulator , *OnRR9* gene (GenBank accession number: MH758789) , was cloned from the petals of *Oncidium* Gower Ramsey flowers with RACE technology. The *OnRR9* gene is 627 bp in length and encodes a protein of 208 amino acids in size. The secondary structure analysis of the protein showed that *OnRR9* protein is a hydrophilic secreted protein localized in the nucleus. The homologous sequence alignment revealed that the *OnRR9* gene belongs to the YesN/AraC family and contains a conserved REC domain in the amino acid sequence , which may be involved in the two-component signal transduction pathway. The construction of the phylogenetic tree demonstrated that the *OnRR9* protein is closely related to the type A ARRs in *Arabidopsis thaliana* , suggesting that the *OnRR9* may be involved in the response of cytokinin signaling. Real-time fluorescence quantitative analysis indicated that the *OnRR9* gene had the maximum expression in the full blossom flower but was low expressed before and after full blossom , suggesting that this gene might play a role in the initiation of petal senescence of *Oncidium* Gower Ramsey flowers.

Keywords: *Oncidium*; *OnRR9* gene; flower senescence; two-component signal system; gene expression

(责任编辑: 潘学峰)