

文章编号: 1674-7054(2020)03-0288-08

# 文心兰 *OnRR10* 基因的克隆及表达分析

闫冰玉<sup>1</sup>, 巩笑笑<sup>1</sup>, 谭玉荣<sup>1</sup>, 王 丹<sup>1</sup>, 高 璇<sup>1</sup>, 张 恒<sup>1</sup>,  
李双江<sup>1</sup>, 王 鹏<sup>1</sup>, 潘英文<sup>2</sup>, 刘进平<sup>1</sup>

(1. 海南大学 热带作物学院/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:** 为了鉴定控制文心兰花瓣衰老的关键基因, 从文心兰花瓣中提取总 RNA, 利用 RACE 技术, 得到 *OnRR10* 基因(登录号: MN337795)。该基因全长 630 bp, 编码 209 个氨基酸大小的蛋白质。蛋白质二级结构分析表明, *OnRR10* 蛋白为亲水性蛋白, 定位于细胞核中。同源序列比对及系统进化分析显示, *OnRR10* 基因属于 YesN 家族。兰科中, *OnRR10* 蛋白与小兰屿蝴蝶兰 *OnRR10* 亲缘关系最近。实时荧光定量分析表明, *OnRR10* 基因在文心兰花发育的 A 时期(花苞期)和 F 时期(衰老早期)表达量达到最高值; 基因表达似不受生物钟控制; 细胞分裂素处理后表达分析表明, 短时间内受 6-BA 刺激基因表达量急速上升。结果表明, *OnRR10* 基因可能通过细胞分裂素作用而参与文心兰花瓣衰老过程。

**关键词:** 文心兰; *OnRR10* 基因; 表达分析; 实时定量 PCR

中图分类号: Q 786; S 682.3

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2020.03.005

文心兰是兰科(Orchidaceae)文心兰亚族(Subtribe Oncidiinae)文心兰属(*Oncidium*)的植物, 又名舞女兰、跳舞兰、金蝶兰、瘤瓣兰, 是具有极高观赏价值的热带兰花<sup>[1]</sup>。其中, 开黄色花的南茜种文心兰(*Oncidium Gower Ramsey*)是栽培最广的热带兰切花品种。鲜切花的寿命长短是一个重要的品质指标, 对文心兰切花的商品价值具有重要影响。因此, 鉴定调控花瓣衰老的关键基因, 研究其花朵衰老的分子机制, 可为采用生物技术改良品种, 在分子水平上控制切花衰老快慢和寿命长短打下基础<sup>[2-8]</sup>。反应调节因子(response regulator, RR)为 His→Asp 磷酸转移系统或双组分信号转导系统的下游组成成分。植物 RR 广泛影响植物的许多生长、发育和胁迫反应过程。研究表明, 拟南芥中有 23 种拟南芥反应调节因子(*Arabidopsis thaliana* response regulators, ARRs), 根据结构和功能分为 A 类 ARRs 和 B 类 ARRs<sup>[9-12]</sup>。A 类 ARRs 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 ARRs 是定位于细胞核中的转录因子, 大多对细胞分裂素不敏感, 但可作用于 A 类 ARRs<sup>[10-13]</sup>。文心兰花瓣发育和衰老转录组学研究表明, 文心兰 RR 基因可能参与了文心兰花瓣的衰老启动<sup>[14]</sup>。为了鉴定控制文心兰花瓣衰老的关键基因的结构和功能, 首先需要对其进行克隆和表达分析。此前, 笔者已对文心兰 *OnRR9* 基因的克隆与表达进行过研究<sup>[8]</sup>, 本实验研究了文心兰该基因家族的另一个成员——*OnRR10* 基因的克隆和表达情况, 旨在为解决兰花的采后保鲜及衰老问题提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 材料 本实验材料为文心兰南茜种‘黄金 3 代’(*Oncidium Gower Ramsey* ‘Gold 3’)的鲜切花, 购自海

收稿日期: 2019-11-07

修回日期: 2020-02-27

基金项目: 2019 年海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC147); 国家自然科学基金项目(31560573); 2019 年海南省研究生创新科研课题(Hyb2019-14, Hys2019140); 海南大学作物学科研究生科研创新课题(ZWCX2018030)

第一作者: 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

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 [15] 改良的 CTAB-LiCl 法提取文心兰花瓣总 RNA, 用  $w=1\%$  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 *OnRR10* 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 *OnRR10* 基因的保守区。反应体系: cDNA, 0.5  $\mu\text{L}$ ;  $10 \times \text{LA Buffer II}$  ( $\text{Mg}^{2+}$  plus), 5  $\mu\text{L}$ ; dNTP Mix ( $2.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 8  $\mu\text{L}$ ; 上游引物 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$ ; 下游引物 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$ ; TaKaRa LA *Taq* ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 0.2  $\mu\text{L}$ , 总体积 50  $\mu\text{L}$ 。反应条件:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min; ( $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s;  $49 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , 2 min) 35 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min;  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 保存。

表 1 本实验的引物

Tab. 1 List of primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	用途 Usage
P1	5'-CTTCRGCTCCTTCTTCCAAG-3'	保守区扩增
P2	5'-GTGGATGACAGCMTCATTGATMG-3'	Amplification of conservative region
P3	5'-CTGTTGATCCTGGAAGGCAC-3'	5' RACE
P4	5'-ATCATACCCAGTCATTYCWGGC-3'	5' RACE
P5	5'-TTGACAGATAGCTCATCGAGAGA-3'	3' RACE
P6	5'-TGGATTCTGGAAGTAAGGCG-3'	3' RACE
Q <sub>T</sub>	5'-CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC-17T-3'	5' RACE随机引物
Q <sub>O</sub>	5'-CCAGTGAGCAGAGTGACG-3'	5' RACE random primer
Q <sub>I</sub>	5'-GAGGACTCGAGCTCAAGC-3'	5' RACE random primer
<i>OnRR10</i> -A1	5'-GGACTAGTCGAGTTACTGCTTGATAATCGTTG-3'	全长序列的扩增
<i>OnRR10</i> -S1	5'-CATGCCATGGCCGTAGCTACGGAGG-3'	Full-length amplification
<i>OnRR10</i> -A3	5'-ACTCTCAAACCCTCGCAGA-3'	实时荧光定量PCR
<i>OnRR10</i> -S3	5'-TCCTTCCAAGTGACTGCAGT-3'	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

**1.4 *OnRR10* 基因 5' 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 Q<sub>T</sub>, Q<sub>O</sub>, Q<sub>I</sub> (表 1)。提取文心兰花瓣总 RNA, 方法同 1.2, 根据 5'经典 RACE 方法<sup>[16]</sup> 获得 cDNA 第 1 条链, 并进行巢式反应, 获得 *OnRR10* 基因 5'端序列。

**1.5 *OnRR10* 基因 3' 端序列的扩增** 设计并合成 3' RACE 引物 P5 和 P6。提取文心兰花瓣总 RNA, 方法同 1.2。根据 TaKaRa 3'-Full RACE Core set with PrimeScript RTase 试剂盒说明书操作, 获得 *OnRR10* 基因 3'端序列。

**1.6 *OnRR10* 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 *OnRR10*-A1 和 *OnRR10*-S1, 以 cDNA 第 1 条链为模板, 进行 PCR 反应基因全长序列并测序。PCR 反应体系: Premix Taq (TaKaRa Taq version 2.0 plus dye 5  $\mu\text{L}$ , 上游引物 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 下游引物 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , cDNA 0.5  $\mu\text{L}$ , 总体积 10  $\mu\text{L}$ 。反应程序:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 3 min; 30 个循环 ( $94 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s;  $57 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , 30 s);  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min;  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 保存。PCR 产物用  $w=1\%$  琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.7 *OnRR10* 基因及启动子的生物信息学分析** 利用 SnapGene Viewer 2.2.8 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 *OnRR10* 基因的氨

氨基酸序列进行理化性质分析;用 ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/>) 进行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>) 基因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 2 个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 OnRR10 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 对蛋白进行 2 次结构分析;用 NCBI 的 BLAST 进行序列比对,并用 MEGA6 构建系统进化树。

**1.8 OnRR10 基因的表达分析** 根据文心兰南茜种花的形态变化特征,将文心兰南茜种花发育分为花苞期、绽口期、半开放期、盛开前期、盛开期、衰老初期、衰老期和脱落干枯期 8 个阶段<sup>[7]</sup>。连续 8 d 采集生长状况良好的不同时期的花瓣,装于无 RNA 酶的离心管中,−80 °C 保存备用;将 150 枝文心兰平均分到 3 个量杯中,分别在长日照 (光照 16 h·d)、全光照 (光照 24 h·d)、全黑暗 (光照 0 h·d) 下处理,采样备用;配制 60 mg·L<sup>-1</sup> 的 6-BA 溶液处理文心兰,1 h 内,每隔 10 min 采样备用。

按照 1.2 方法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,基因荧光定量 PCR 的上下游引物为 *OnRR10*-A3 和 *OnRR10*-S3。PCR 扩增反应体系: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 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 0.8 μL, cDNA 模板 2.0 μL, dd H<sub>2</sub>O 6.0 μL,总体积 20 μL。反应程序:95 °C, 30 s; (95 °C, 5 s; T<sub>m</sub>, 30 s) 40 个循环; (95 °C, 10 s; 0.5 °C, 5 s) 绘制溶解曲线。每对引物设 3 个无模板对照,不同模板都进行 3 次重复实验。

## 2 结果与分析

**2.1 文心兰 OnRR10 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。以 cDNA 为模板,利用保守区引物进行 PCR 扩增得到 *OnRR10* 基因条带,大小约为 336 bp (图 1A)。经过 BLAST 比对,发现已知的兰科 *ORR* 基因均有较高的同源性,说明目的基因为 *ORR* 基因。

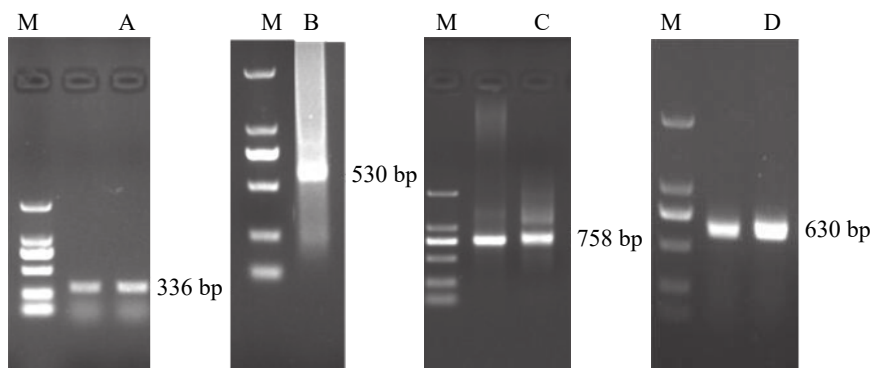


图 1 文心兰 *OnRR10* 基因的 PCR 产物扩增电泳图

M: DL 2000 Marker; A: *OnRR10* 保守区扩增产物; B: 5'经典 RACE 产物; C: *OnRR10*-3'-Full RACE 产物; D: *OnRR10* 全长扩增产物。

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products by *OnRR10* gene of *Oncidium*

M: DL 2000 Marker; A: *OnRR10* conserved region amplification product; B: 5' classical RACE product; C: *OnRR10*-3'-Full RACE product; D: *OnRR10* full-length amplification product.

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 530 bp 的条带并测序,得到大小为 530 bp 的序列 (图 1B)。经过 DNAMAN 和 BLAST 比对,为 *OnRR10* 基因 5'端序列。同样地,回收 3'-Full RACE 第 2 轮反应的条带,测序分析,获得 *OnRR10* 基因大小为 758 bp 的 3'端序列 (图 1C)。

经过 DNAMAN 比对和 SnapGene Viewer2.2.8 分析得到基因 CDS 区全长序列。设计引物 *OnRR10*-A1, *OnRR10*-S1, 以 cDNA 第 1 条链为模板, 进行 PCR 反应, 测序得到 *OnRR10* 基因全长约为 630 bp (图 1D), 与预期结果一致。

**2.2 文心兰 *OnRR10* 基因的生物信息学分析** *OnRR10* 基因一级结构预测显示其编码的氨基酸个数为 209, 等电点为 8.76, 分子式是  $C_{999}H_{1653}N_{283}O_{318}S_{13}$ , 相对分子质量是  $23\ 133.60 \times 10^3$ , 平均疏水性是 -0.40, 表明该蛋白也为亲水蛋白, 不稳定系数 52.33, 表明该蛋白不稳定。

用 ProtComp 9.0 进行 *OnRR10* 蛋白的亚细胞定位预测显示 *OnRR10* 蛋白定位于细胞核的概率为 99.7%, 由此推测, *OnRR10* 是在细胞核中发挥转录激活作用的转录因子。

运用 NCBI 的 CD-Search service 工具分析 *OnRR10* 基因的 CDS 序列, 结果显示, 它有 1 个典型的 YesN 保守结构域, 该保守结构域分布在 *OnRR10* CDS 区的 1~618 bp 之间 (图 2), 由此推测, *OnRR10* 基因属于 YesN 家族。

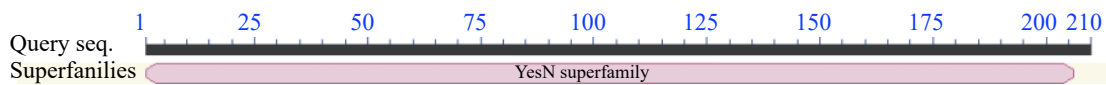


图 2 文心兰 *OnRR10* 基因的保守结构域

Fig. 2 Conserved domains of the *OnRR10* gene of *Oncidium*

用 ProtFun 在线分析程序预测 *OnRR10* 编码蛋白的功能, 从表 2 可知, 激素功能的可能性高达 17.538。

采用 SignalP 4.1 程序进行氨基酸序列的信号肽预测, 结果显示, *OnRR10* 基因在第 30 位氨基酸残基具有最高的原始剪切位点分值 0.427, 第 9 位氨基酸具有最高的信号肽分值 0.950, 由此可以看出, 该基因编码的蛋白是分泌蛋白。根据 TMHMM 在线软件对 *OnRR10* 蛋白进行跨膜区段预测, 结果表明, *OnRR10* 基因编码的蛋白没有跨膜结构 (图 3), 均属于非跨膜蛋白。利用 ProtScale 对氨基酸的疏水性/亲水性进行预测, 结果表明, *OnRR10* 基因编码的多肽链在第 15 号的天冬氨酸具有最高分值 1.689, 第 149 号的天冬酰胺具有最低分值 -3.289; 2 条肽链均表现为亲水性, 没有明显的疏水区 (图 4)。

用 SOPMA SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD 对 *OnRR10* 蛋白进行 2 次结构分析; 结果表明, 该蛋白中无规卷曲占比最高为 44.02%,  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角和延伸链占比分别为 37.32%、6.22% 和 12.44% (图 5)。

用 NCBI 的 BLAST 进行序列比对, 并用 MEGA6 基因及其同源序列构建进化树 (图 6)。结果显示, 在与其他 11 个物种的比对中, *OnRR10* 与石斛兰 *ORR9* 蛋白 (*Dendrobium catenatum*, XP020684569.1) 及小兰屿蝴蝶兰 *ORR10* 蛋白 (*Phalaenopsis equestris*, XP020594130.1) 亲缘关系最近。

### 2.3 文心兰 *OnRR10* 基因表达分析

**2.3.1 文心兰 *OnRR10* 基因在不同花期的表达分析** 分别采取文心兰花发育中 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 A 时期表达量为单位 1, 绘制不同花期 *OnRR10* 基因相对表达量柱状图。该基因在 F 时期表达量达到最高值, 在 D 时期表达量最低 (图 7)。

表 2 文心兰 *OnRR10* 蛋白的功能预测

Tab. 2 Prediction of protein functions of *Oncidium OnRR10*

基因本体分类 Gene Ontology category	可能性 Prob	几率 Odds
信号转导	0.272	1.271
受体	0.008	0.047
激素	0.114	17.538
结构蛋白	0.003	0.107
运载体	0.043	0.394
离子通道	0.079	1.386
电压门控离子通道	0.003	0.136
阳离子通道	0.010	0.217
转录	0.031	0.242
Transcription regulation(转录调控)	0.031	0.248
Stress response(胁迫应答)	0.223	2.534
Immune response(免疫应答)	0.123	1.447
Growth factor(生长因子)	0.040	2.857

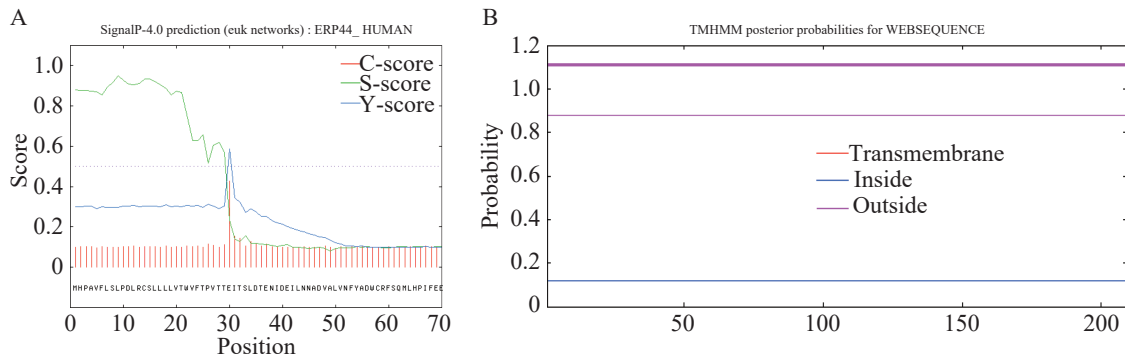


图3 文心兰 OnRR10 蛋白的信号肽预测和分析及跨膜结构域预测

A: OnRR10 蛋白的信号肽预测和分析。横坐标为氨基酸位置,纵坐标为预测得分。红色线为粗剪切位点得分 C-score,绿色线为信号肽得分 S-score,蓝色线为结合剪切位点得分 C-score; B: OnRR10 蛋白的跨膜结构域预测。横坐标为氨基酸位置,纵坐标为概率。红色线为跨膜区,蓝色线为膜内区,紫色线为膜外区。

Fig. 3 Prediction and analysis of signal peptides and prediction of transmembrane domains of the OnRR10 protein of *Oncidium*

Prediction and analysis of signal peptides of the OnRR10 protein. The amino acid positions and the predicted scores are presented respectively on the horizontal and vertical axes. The red line represents the C-scores of the rough shear sites, the green line represents the C-scores of the signal peptides, and the blue line represents the C-scores of the binding shear site; B: Prediction of transmembrane domains of the OnRR10 protein. The amino acid positions and the probabilities are presented respectively on the horizontal and vertical axes. The red line represents the transmembrane areas, the green line represents the inner membrane areas, and the blue line represents the outer membrane areas.

### 2.3.2 文心兰 *OnRR10* 基因在外源 CTK 处理下的表达分析

在  $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA 处理下,1 h 内, *OnRR10* 表达量整体呈上升趋势,在 0~10 min 内, *OnRR10* 基因表达量急剧上升(图 8)。这与 D'AGOSTINO 等<sup>[18]</sup> 的研究结果基本一致(大部分 A 类 ARR 受 CTK 转录诱导,外源 CTK 处理拟南芥,ARR 基因在 10~15 min 内表达量急剧上升),表明该基因属于 A 型 RR 基因。

### 2.3.3 文心兰 *OnRR10* 基因在不同光照的表达分析

在全光照、长日照、全黑暗处理下,观察 48 h 内基因的表达量变化。结果显示: *OnRR10* 基因在全光照下 22~24 h 及 2~8 h 出现表达量峰值;在长日照下 20~22 h 出现该基因表达量峰值;在全黑暗

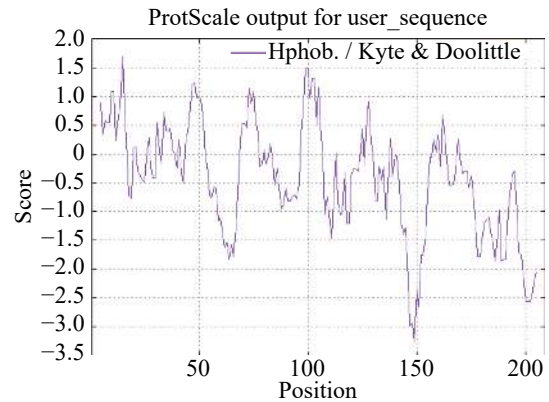


图4 文心兰 OnRR10 蛋白的亲水性/疏水性预测

Fig. 4 Prediction of hydrophilicity/hydrophobicity of *Oncidium* OnRR10 protein

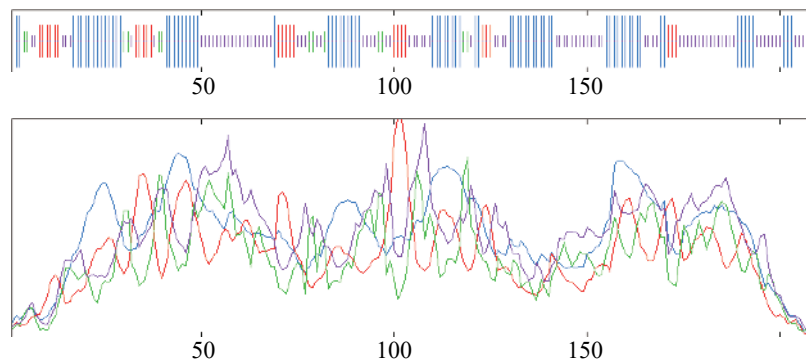


图5 文心兰 OnRR10 蛋白的二级结构预测

紫色为无规卷曲,蓝色为  $\alpha$ -螺旋,绿色为  $\beta$ -转角,红色为延伸链;数字代表氨基酸位置。

Fig. 5 Prediction of secondary structure of the OnRR10 protein of *Oncidium*

Purple represents random coil, blue represents  $\alpha$ -helix, green represents  $\beta$ -sheet, and red represents chain extension; Number denotes the position of the amino acid.

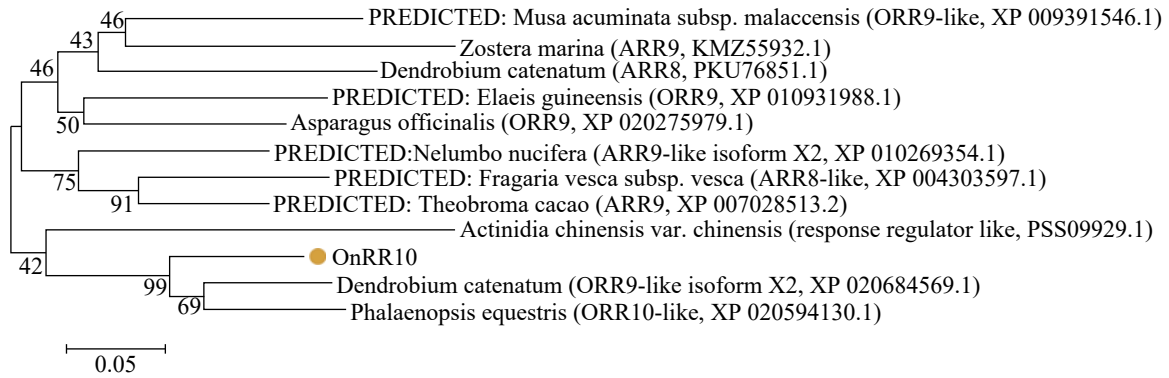


图 6 文心兰 *OnRR10* 蛋白的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the *OnRR10* protein of *Oncidium*

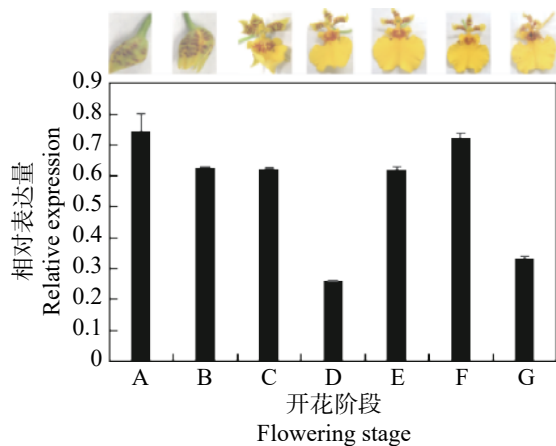


图 7 文心兰 *OnRR10* 基因在不同花期时的表达

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

Fig. 7 Expressions of the *OnRR10* gene of *Oncidium* in different flowering stages

A: Bud swelling stage; B: Bud burst stage; C: half opening stage; D: Early opening stage; E: Fully opening stage; F: The initial stage of senescence. G: The senescence stage.

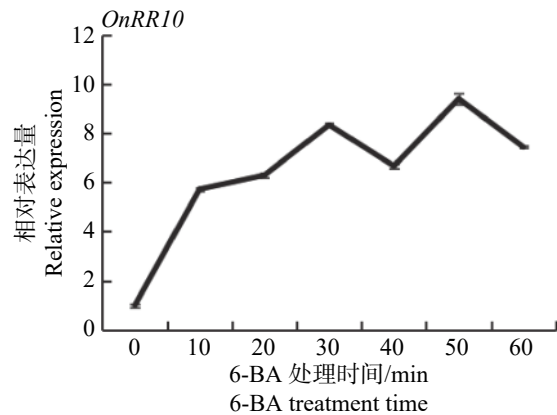


图 8 文心兰 *OnRR10* 基因在 6-BA 处理下的表达量变化

Fig. 8 Changes in expressions of the *OnRR10* gene under 6-BA treatments

下 10~12 h 出现表达量峰值, 该结果表明, 该基因表达与生物钟无关, 但同时也观察到, *OnRR10* 基因在全光照下整体表达量最高, 在长日照下整体表达量最低, 说明该基因表达量受光照影响, 全光照处理下, 16 h 后 *OnRR10* 基因表达量急速上升, 持续约 8 h, 之后, 表达量下降至平稳水平, 但仍高于长日照下的表达量 (图 9)。

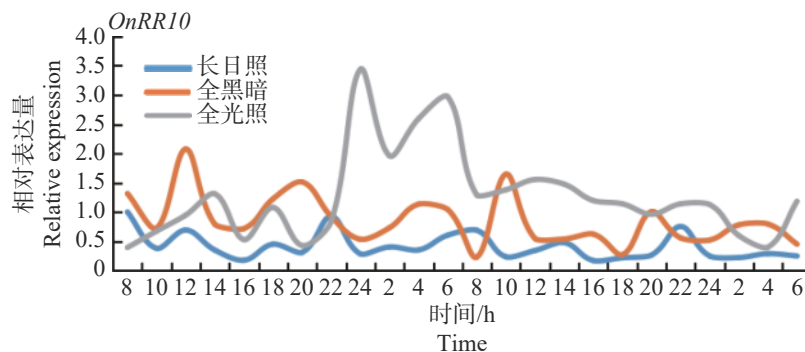


图 9 文心兰 *OnRR10* 基因在不同光照处理下的表达量变化

Fig. 9 Changes in the expressions of the *OnRR10* gene under different light treatments

### 3 讨论

本实验通过在 NCBI 上查找兰科 *RR* 基因序列, 比对分析获得保守区域, 设计兼并引物, 并结合 RACE 技术获得 *OnRR10* 基因序列。Blast 比对显示, *OnRR10* 蛋白与蝴蝶兰、石斛兰等兰科植物 ORR 同源性在 66%~83% 之间, 与其他物种同源性在 60%~65% 之间。同时, 蛋白结构域分析表明, 该基因属于 YesN 家族, 与其他植物 RR 蛋白结构域分析结果一致<sup>[10-12]</sup>, 因此, 克隆到的基因为 *RR* 基因。*OnRR10* 基因在 A 时期(花苞期)和 F(衰老早期)表达量最高, 表明该基因可能在文心兰开花及花瓣衰老早期发挥作用。在 6-BA 处理下, *OnRR10* 在短期内急速上升, 表达量达到峰值。由于拟南芥中 A 类型反应调节因子参与细胞分裂素信号转导系统, 表达受外源细胞分裂素影响<sup>[18-20]</sup>, 结果表明, 该基因属于 A 型 *RR* 基因, 该基因表达并不受生物钟影响, 但与光照有很大关系。相比于长日照、全黑暗条件, *OnRR10* 基因全光照下表达量更高, 但具体机制有待进一步研究。细胞分裂素是植物器官衰老的重要调控激素, 细胞分裂素可延缓花瓣衰老<sup>[21-23]</sup>。有研究表明, 参与双组分信号系统的蛋白参与到细胞分裂素信号转导, 如拟南芥中 ARR1, ARR6, ARR7, ARR10 和 ARR15 均参与 AHK 调控的 6-BA 信号途径<sup>[11-12, 24-25]</sup>。因此, *OnRR10* 基因很可能通过细胞分裂素信号转导途径在文心兰花瓣衰老启动中发挥调控作用。在后续转化研究中将对其功能加以验证。

本实验通过 RACE 技术克隆获得 *OnRR10* 基因全长序列, 对其编码蛋白质的氨基酸序列和蛋白质二级结构分析, 对其亚细胞定位、疏水性、跨膜区段、功能进行预测, 并对该基因在不同花发育阶段、6-BA 处理、光照处理条件下进行表达分析, 为进一步深入研究该基因功能打下了基础。

### 参考文献:

- [1] 刘晓荣, 王碧青, 朱根发. 文心兰研究进展[J]. *亚热带植物科学*, 2007, 36(3): 85-90.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 杨翠萍, 胡进, 闫冰玉, 等. 文心兰生物钟相关基因 *PRR7* 克隆与表达分析[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(8): 1670-1679.
- [8] 闫冰玉, 巩笑笑, 谭玉荣, 等. 文心兰 *OnRR9* 基因克隆及表达[J]. *热带生物学报*, 2018, 9(4): 393-400.
- [9] 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.
- [10] MIZUNO T. Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(5): 499-505.
- [11] HWANG I, CHEN H C, SHEEN J. Two-component signal transduction pathways in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(2): 500-515.
- [12] HWANG I, SHEEN J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction [J]. *nature*, 2001, 413(6854): 383.
- [13] 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.
- [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]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2019, 94(1): 12-23.
- [15] 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.
- [16] SCOTTO-LAVINO E, DU G, FROHMAN M A. 5' end cDNA amplification using classic RACE [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(6): 2555.
- [17] 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.
- [18] D'AGOSTINO I B, DERUERE J, KIEBER J J. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin [J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(4): 1706-1717.

- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [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] KAKIMOTO T. CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction [J]. *Science*, 1996, 274(5289): 982 – 985.
- [25] KI BA, T, YAMADA H, SATO S, et al. The type-A response regulator, *ARR15*, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44(8): 868 – 874.

## Cloning and Expression Analysis of *OnRR10* Gene in *Oncidium*

YAN Bingyu<sup>1</sup>, GONG Xiaoxiao<sup>1</sup>, TAN Yurong<sup>1</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>, GAO Xuan<sup>1</sup>, ZHANG Heng<sup>1</sup>,  
LI Shuangjiang<sup>1</sup>, WANG Peng<sup>1</sup>, PAN Yingwen<sup>2</sup>, LIU Jinping<sup>1</sup>

(1. Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources/College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Post-Entry Quarantine Station for Tropical Plants, Hainan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Haikou, Hainan 570311, China)

**Abstract:** In order to characterize the key genes which control the petal senescence, a gene encoding an response regulator (RR), *OnRR10* gene (GenBank accession number: MN337795), was isolated from the petals of *Oncidium* with RACE (rapid amplification of cDNA ends). The gene is 630 bp in length and encodes a protein of 209 amino acids in size. Protein secondary structure analysis showed that the *OnRR10* protein is a hydrophilic protein and is localized in the nucleus. Homologous sequence alignment and phylogenetic analysis showed that the *OnRR10* belongs to the YesN family. In Orchidaceae, *OnRR10* protein is closely related to the *ORR10* gene of *Phalaenopsis equestris*. Real-time quantitative analysis showed that the expression level of the *OnRR10* gene was the highest at the bud swelling stage and flower initial senescence stage of *Oncidium* during the flower development, and that the expression of the *OnRR10* gene was not regulated by the circadian clock, but increased rapidly in a short time under the 6-BA (6-Benzylaminopurine) treatment. These results implicated that the *OnRR10* gene may be involved in the petal senescence through cytokine effect.

**Keywords:** *Oncidium*; *OnRR10* gene; expression analysis; real-time qPCR

(责任编辑: 潘学峰)