

灰毡毛忍冬 *API* 同源基因的克隆及互作蛋白鉴定

俞亚欣^{1,2}, 龙丽君^{1,2*}, 李昌珠², 曾慧杰², 乔中全², 刘思思^{2*}, 马英姿^{1*}

(1. 中南林业科技大学生命与环境科学学院, 湖南 长沙 410004; 2. 湖南省林业科学院省部共建木本油料资源利用国家重点实验室, 湖南 长沙 410004)

摘要: *MADS-box* 家族基因是一类十分重要的转录调控基因, 在植物的整个生长发育过程中发挥重要作用。其中家族成员 *APETALAI* (*API*) 基因不仅在植物开花转变过程中发挥调控作用, 还控制着花器官的特征发育。灰毡毛忍冬以干燥花蕾和初开的花入药, 因此研究 *API* 基因参与调控灰毡毛忍冬花器官发育的潜在机制可以为分子手段提高其药用价值提供基础。本研究采用逆转录 PCR (RT-PCR) 对 *API* 同源基因的 cDNA 全长进行扩增, 并将其命名为 *LmMADS4*。结果显示, *LmMADS4* 基因 CDS 序列长 729 bp, 编码 242 个氨基酸, 且 *LmMADS4* 蛋白不含信号肽, 无跨膜结构, 为不稳定的亲水性蛋白。通过序列比对及系统进化分析, *LmMADS4* 与忍冬 *MADS27* 蛋白聚为一类, 亲缘关系最近。最后利用实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (qRT-PCR)、酵母双杂交技术对 *LmMADS4* 基因的表达模式、蛋白间的相互作用进行了分析。qRT-PCR 结果表明, *LmMADS4* 基因在灰毡毛忍冬花蕾型龙花和野生型白云的茎、叶以及花蕾不同发育时期均有差异表达; 其中 *LmMADS4* 基因主要在龙花和白云生殖器官花蕾中高表达, 且随着灰毡毛忍冬花蕾的发育, *LmMADS4* 基因在花蕾型品种龙花中呈现持续上调表达的趋势, 而在白云花蕾末期的表达水平较花蕾晚期有所降低, 但差异不显著。酵母双杂交结果表明, 构建的诱饵载体 pGBKT7-*LmMADS4* 对酵母菌株无毒性, 也无自激活活性, *LmMADS4* 蛋白与 *LmSVP1* 蛋白、*LmSVP3* 蛋白和 *LmSOC1s* 蛋白间均存在相互作用。该研究可为分子层面探索灰毡毛忍冬蕾期和花冠不展开的作用机制以及品种改良提供理论依据。

关键词: 灰毡毛忍冬; *MADS-box*; 基因克隆; 花器官; 蛋白互作

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)10-2880-09

Cloning and interacted protein identification of *API* homologous gene from *Lonicera macranthoides*

YU Ya-xin^{1,2}, LONG Li-jun^{1,2*}, LI Chang-zhu², ZENG Hui-jie², QIAO Zhong-quan²,
LIU Si-si^{2*}, MA Ying-zi^{1*}

(1. College of Life and Environmental Sciences, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. State Key Laboratory of Utilization of Woody Oil Resource, Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China)

Abstract: The *MADS-box* gene family is a very important transcriptional regulator gene, which plays a role in the whole growth and development process of plants. The *APETALAI* (*API*) gene is considered to play an important regulatory role in the transformation of plant flowering, but also to control the characteristic development of floral organs. *Lonicera macranthoides* is used as medicine with dry buds and early flowers. Therefore, studying the potential mechanism of *API* gene in regulating flower organ development can provide a basis for improving its medicinal value by molecular means. To explore the potential mechanism of the *API* gene

收稿日期: 2024-04-26; 修回日期: 2024-06-05.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82304683); 湖南省自然科学基金项目 (2022JJ30326); 湖南省重大科技创新平台项目 (2023PT1001).

*通讯作者 Tel: 13873167001, E-mail: ma_yingzi@163.com;

Tel: 13787296671, E-mail: liusisi274@126.com;

Tel: 18244105375, E-mail: 2351643604@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0405

in the regulation of floral organ development in *L. macranthoides*, the full-length cDNA of the *API* was cloned by reverse transcription PCR (RT-PCR) and named *LmMADS4*. The results show that the CDS of the *LmMADS4* gene is 729 bp and encodes 242 amino acids, and the *LmMADS4* protein contains no signal peptide and no transmembrane structure, which is an unstable hydrophilic protein. Through homologous sequence alignment and phylogenetic analysis, *LmMADS4* and *L. japonica* *MADS27* protein cluster into one class and are closely related. Finally, the expression pattern and protein interaction pattern of *LmMADS4* were analyzed by real-time reverse transcription-PCR (qRT-PCR) and yeast two-hybrid technology. The qRT-PCR showed that *LmMADS4* gene was differentially expressed in the stems, leaves and flower bud at different developmental stages, including bud type variety Longhua and common variety Baiyun; and *LmMADS4* gene was highly expressed in the flower buds, and with the development of flower buds, *LmMADS4* gene was continuously up-regulated in the flower bud variety Longhua, however, the expression level of *LmMADS4* in the Baiyun terminal flower bud was lower than that in the late flower bud, but the difference was not significant. The yeast two-hybrid results showed that the bait vector pGBKT7-*LmMADS4* was not toxic to yeast strains and had no self-activating activity. *LmMADS4* protein interacted with *LmSVP1*, *LmSVP3* and *LmSOC1s* proteins. This study can provide a theoretical basis for exploring the mechanism of long flower bud stage and corolla non-unfolding at the molecular level and variety improvement of *L. macranthoides*.

Key words: *Lonicera macranthoides*; *MADS-box*; gene cloning; floral organ; protein-protein interaction

灰毡毛忍冬 (*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.) 为忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属 (*Lonicera*) 多年生常绿藤本或小灌木, 以干燥花蕾或初开的花入药, 是中药山银花的基源植物之一。其味甘、性寒, 具有清热解毒、疏散风热的功效, 主要用于治疗痈肿疔疮、喉痹、丹毒、热毒血痢、风热感冒、温病发热等病症^[1]。现代研究证明, 灰毡毛忍冬含有绿原酸、木犀草苷、皂苷等药理活性成分, 具有抗菌、抗内毒素、加强免疫、保肝、降血脂等作用^[2,3], 广泛应用于制药、食品、化妆品等领域, 具有广阔的开发潜力。普通灰毡毛忍冬花冠展开、花蕾不整齐且蕾期短, 不便于花蕾采摘, 极易造成其产量和品质的降低, 不利于实际生产。但 20 世纪 90 年代末, 有研究者^[4]选育出了花蕾型灰毡毛忍冬, 该品种表现为花期花冠一直不展开, 花蕾整齐均匀呈棒状, 花期可长达 20 余天。花蕾型灰毡毛忍冬的优良性状更契合实际生产需求, 因此解析花蕾型灰毡毛忍冬优良性状背后的分子调控机制具有重要意义。

MADS-box 基因家族在植物体中是一类生物功能丰富的转录调控基因, 控制着植物不同组织器官的形态发生与生长发育, 如花器官发育、开花时间的调节、根系和果实的生长调控等^[5,6]。*APETALA1* (*API*) 为 MIK^C 型 *MADS-box* 家族基因, 与 *FUL* (*FRUITFULL*) 和 *CAL* (*CAULIFLOWER*) 基因同属于 *SQUA* 亚家族, 是植物所特有的 *MADS-box* 基因, 在花器官的发育调控中起着重要作用^[7]。目前已从苹果 (*Malus pumila*)^[8]、芒果 (*Mangifera indica*)^[9]、陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)^[10]、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*)^[11]、莲瓣兰 (*Cymbidium tortisepalum*)^[12]、菊花 (*Chrysanthemum morifolium*)^[13]、

茶树 (*Camellia sinensis*)^[14] 等多个物种中成功分离并进行了功能分析。研究表明, *API* 基因具有双重功能, 既是花分生组织特征基因, 调控花序分生组织向花分生组织转变, 又属于花器官形态特征基因, 控制花萼和花瓣的正常发育^[15-17]。花的形成需要大量成花基因在特定时空进行表达, 并相互作用形成精细的调控网络来实现^[18]。成花相关基因 *SVP* (short vegetative phase)、*SOCI* (suppressor of overexpression of constans 1) 为控制开花时间的基因, 均属于 *MADS-box* 基因, 参与花分生组织起始, 但在控制花分生组织的转化方面作用相反^[19]。在拟南芥成花调控网络中, 两者都与花分生组织特征基因 *API* 有着密切关系。如 *API* 基因可抑制 *SVP*、*SOCI* 表达, 从而调控下游成花相关基因的表达^[20]。而在 *FLC* (FLOWERING LOCUS C) 基因参与的成花调控途径中, *FLC* 也参与调控下游 *SOCI* 基因的表达, 从而调控植物开花^[21], 这与 *API* 基因功能具有相似性。而在灰毡毛忍冬中这几种蛋白间的互作关系尚不明确。

鉴于 *API* 基因在花瓣发育中的重要调控作用, Peng 等^[4] 已从另一花蕾型灰毡毛忍冬品种湘蕾中克隆得到 *Lm-XL-API* 基因, 并进行了初步的生物信息学分析, 为本研究提供了一定的参考。本研究基于课题组前期获得的花蕾型灰毡毛忍冬龙花品种的转录组数据, 从中克隆得到 *API* 同源基因 *LmMADS4*, 并对其进行了生物信息学、实时荧光定量 PCR, 同时进一步开展了酵母双杂交实验, 鉴定其与植物成花关键促进因子 *LmSOC1*、关键抑制因子 *LmSVP* 和 *LmFLC* 蛋白间的相互作用, 初步探讨了 *LmMADS4* 基因在灰毡毛忍冬花器官发育中行使的生物学功能。

材料与方法

植物材料 本研究所用的灰毡毛忍冬龙花、白云植株均采自湖南省林业科学院试验林场。随机选择3株生长健壮、无病虫害的植株,分别采集其幼叶、成熟叶和茎以及不同发育时期的花蕾,液氮速冻,保存于-80 °C超低温冰箱备用。

试剂、菌株和载体 EASYspin Plus 多糖多酚复杂植物RNA快速提取试剂盒 (Lot: 341824)、琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 (Cat: DR01)、无内毒素质粒小量快速提取试剂盒 (Cat: PL04)、Zero Back-ground pTOPO-TA/Blunt Simple Cloning Vector (Lot: 332331AX) 购自北京艾德莱生物科技有限公司; HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) (Lot: 7E652J2)、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (Lot: 7E691J2)、DL2000 Plus DNA Marker (Lot: 027E2213 CA)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Lot: 7E712G3)、ClonExpress II One Step Cloning Kit (Lot: 7E67212) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性内切酶 *EcoR* I (Lot: AM60745A)、*Bam*H I (Lot: AM32619A) 和 *Pst* I (Lot: AM51218A) 购自宝日医生物技术有限公司; 大肠杆菌 *Trans5 α* 感受态细胞购自北京全式金生物; Y2HGold 酵母感受态细胞 (Lot: YC1002) 购自上海唯地生物技术有限公司; α -半乳糖苷酶显色底物 (*X- α -Gal*, Lot: SL331428100)、金担子素 A (AbA, Lot: CA2332G)、SD/-Trp 培养基 (Lot: PM331140120)、SD/-Leu/-Trp 培养基 (Lot: PM331231120)、SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 固体培养基 (Lot: PM322223140)、琼脂粉 (Lot: CA 331436200)、pGBKT7 Cloning Vector, pGADT7 Cloning Vector, pGBKT7-53 Control Vector, pGBKT7-Lam Control Vector 和 pGADT7-T Control Vector (Lot: SL33151601) 均购自北京酷莱搏科技有限公司。

仪器 QuantStudio6 Flex 荧光定量PCR仪 (美国Life Technology 公司); Bio-Tek 酶标仪 (美国Bio-Tek 公司); Veriti 96 Well Thermal Cycler PCR 仪 (美国Thermo Fisher Scientific 公司); Centrifuge 5424R 高速冷冻离心机 (德国Eppendorf 公司); DYY-8C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)。

总RNA提取与cDNA合成 分别取100 mg 灰毡毛忍冬花蕾、叶片、茎组织样品在液氮中研磨,按照EASYspin Plus 多糖多酚复杂植物RNA快速提取试剂盒操作说明提取各样品的总RNA。利用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性,Bio-Tek 酶标仪测定总RNA的纯度和浓度。选取完整性好、纯度高的RNA样品为模板,按照HiScript III 1st Strand cDNA

Synthesis Kit (+gDNA wiper) 操作说明,逆转录合成cDNA,保存于-20 °C冰箱备用。

***LmMADS4* 基因克隆** 根据本课题组灰毡毛忍冬转录组数据库获取花发育相关 *MADS-box* 基因的序列,利用Primer Premier 6.0 软件设计特异性扩增引物,引物序列为 F: 5'-GGAAACACAACTCAAACGCAAA CA-3' 和 R: 5'-CCTCTCTTCTTCTGCTTGTCCTTG-3'。以花蕾 cDNA 为模板,进行PCR扩增,克隆 *API* 同源基因的 cDNA 全长序列。PCR 反应体系为: 2 \times Phanta Max Buffer 12.5 μ L, dNTP Mix 0.5 μ L, 引物各 1.0 μ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μ L, cDNA 模板 1.5 μ L, 补 ddH₂O 至 25.0 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保持。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,对目的条带进行切胶回收。将胶回收产物与 pTOPO 载体混合,在 37 °C 条件下连接 5 min。连接产物转入大肠杆菌 *Trans5 α* 感受态,取 100 μ L 菌液涂布在含有氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 固体培养基平板上,37 °C 倒置培养过夜。挑取单克隆置于 1 mL LB 液体培养基中,振荡培养 5 h,进行 PCR 鉴定筛选阳性克隆,送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。

***LmMADS4* 基因的生物信息学分析** 参照 Li^[22] 的方法,分析 *LmMADS4* 基因编码氨基酸的基本理化性质、亲水性、跨膜结构域、信号肽、磷酸化位点以及二、三级结构,预测亚细胞定位情况;并通过NCBI网站CD-Search分析其保守结构域;利用NCBI的blast P 搜索相似蛋白,下载同源性较高的蛋白序列,运用DNAMAN软件对灰毡毛忍冬 *LmMADS4* 与其他物种 API 蛋白进行序列对比分析;借助MEGA-X中的Neighbor-Joining法构建系统进化树。

***LmMADS4* 基因的表达模式分析** 根据扩增得到的 *LmMADS4* 基因的全长 cDNA 序列,利用Primer 6.0 软件设计 qRT-PCR 特异性引物,引物序列如下表 1。选择 18S rRNA 作为内参基因^[23],使用QuantStudio 6 Flex 仪器进行基因表达分析,qRT-PCR 体系为: 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10.0 μ L、引物各 0.4 μ L、cDNA 1.0 μ L、ddH₂O 8.2 μ L, 总体积 20.0 μ L。根据 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 *LmMADS4* 基因在不同品种、不同发育时期的花蕾、叶和茎中的相对表达量,并用 *t* 检验法进行差异显著性分析。

酵母双杂交载体构建、诱饵载体的毒性检测及自激活检测 根据ClonExpress II One Step Cloning Kit 操作说明,通过同源重组将 *LmMADS4* 基因的编码区 (CDS 区)、候选互作蛋白基因 (*LmSVPs*、*LmSOC1s*、

Table 1 Primers for real-time quantitative PCR

Primer name	Sequence (5'-3')
<i>LmMADS4</i> -qF	TGCCGAGGTCGCTTTGATTGTTT
<i>LmMADS4</i> -qR	GCTCAACGTGTCCAGATCTTCCC
18S rRNA-qF	CTTCGGGATCGGAGTAATGA
18S rRNA-qR	GCGGAGTCCTAGAAGCAACA

LmFLC) CDS 片段分别连接至诱饵载体 pGBKT7 (酶切位点: *EcoR* I 和 *Bam*H I)、猎物载体 pGADT7 (酶切位点: *EcoR* I 和 *Pst* I), 将重组产物转化至大肠杆菌 Trans5 α 感受态, 并筛选阳性单克隆鉴定测序。将测序结果正确的菌液进行扩大培养, 提取质粒备用。将转化 pGBKT7 空质粒和转化 pGBKT7-*LmMADS4* 质粒的 Y2HGold 酵母菌液 (100 μ L, A_{600} 调至 0.002) 分别涂布在 SD/-Trp 固体培养基平板上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3~5 d, 观察两种酵母菌的生长状况以判断诱饵载体是否对酵母菌株产生毒性。将 pGBKT7-*LmMADS4* 质粒和 pGADT7 空质粒共转化至 Y2HGold 感受态, 挑取新鲜的单菌落 (2~3 mm) 溶于无菌水中 (A_{600} 调至 0.002), 按浓度梯度稀释为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} , 梯度稀释后等体积 (5 μ L) 同时点板于 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His 营养缺陷型培养基中, 观察并记录菌落生长状况以判断诱饵蛋白是否具有自激活活性。

酵母双杂交验证互作 将 pGBKT7-gene 质粒和 pGADT7-gene 质粒按组合共转化至酵母 Y2HGold 感受态。以存在互作的蛋白 pGBKT7-53 和 pGADT7-T 为阳性对照, 两个没有互作的蛋白 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T 为阴性对照。涂布于 SD/-Leu/-Trp 固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 d。挑取酵母单菌落、阳性对照和阴性对照, 接种于 SD/-Leu/-Trp 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C 180 r \cdot min $^{-1}$ 振荡培养至 A_{600} 为 0.2, 取 5 μ L 浓度为 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 的菌液分别滴于 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/Aba 平板上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 d, 观察酵母菌生长状况。

结果与分析

1 *LmMADS4* 基因克隆

以灰毡毛忍冬龙花花蕾 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 法对 *API* 同源基因的 cDNA 全长进行扩增, 得到一条大小在 1 000 bp 左右的条带 (图 1)。PCR 扩增产物经胶回收后连接至 pTOPO 载体, 连接产物转化大肠杆菌并送测序, 结果与转录组测得序列一致, 将其命名为 *LmMADS4*。*LmMADS4* 基因序列长度为 1 107 bp, CDS 序列长 729 bp, 编码 242 个氨基酸, 基因登录号为 PP235953。

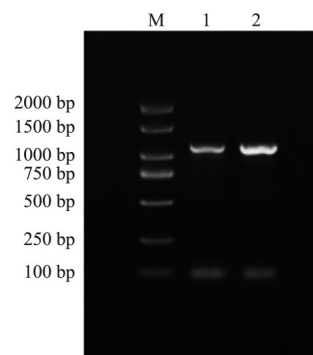


Figure 1 PCR amplification products of *LmMADS4* gene. M: 2 000 bp DNA marker; 1, 2: *LmMADS4*

2 *LmMADS4* 基因编码蛋白的生物信息学分析

ProtParam 预测在 *LmMADS4* 基因编码氨基酸中, 含量较高的为亮氨酸, 蛋白分子式为 $C_{1215}H_{1955}N_{357}O_{379}S_{11}$, 相对分子质量为 27 980.71, 理论等电点为 7.64; 不稳定系数为 66.05, 亲水性平均系数为 -0.774, 为不稳定的亲水性蛋白; *LmMADS4* 蛋白带正电残基 (Arg+Lys) 为 35, 带负电残基 (Asp+Glu) 为 34。TMHMM 分析发现 *LmMADS4* 蛋白无跨膜结构, 为非跨膜蛋白。Signal P 预测发现 *LmMADS4* 蛋白不含信号肽, 亚细胞定位在细胞核中。利用 CD-Search 分析 *LmMADS4* 蛋白功能结构域, 结果表明 *LmMADS4* 蛋白具有 *MADS-box* 基因家族共有的 *MADS* 结构域和 *K-box* 结构域, *LmMADS4* 第 2~79 个氨基酸为 *MADS* 结构域, 第 84~169 个氨基酸为 *K-box* 结构域; 通过 Netphos 3.1 server 预测 *LmMADS4* 蛋白的磷酸化位点, 结果显示 *LmMADS4* 蛋白可能发生磷酸化的位点有 21 个, 包括 14 个丝氨酸 (Ser) 位点、4 个苏氨酸 (Thr) 位点、3 个酪氨酸 (Tyr) 位点。

使用 SOMPA 软件预测 *LmMADS4* 蛋白的二级结构, 结果显示 *LmMADS4* 蛋白由 139 个 α -螺旋、8 个 β -转角、69 个无规则卷曲和 26 个延伸链结构组成, 占比分别为 57.44%、3.31%、28.51% 和 10.74% (图 2A), α -螺旋是主要组成元件。使用 SWISS MODEL 构建 *LmMADS4* 蛋白的三级结构 (图 2B)。

3 *LmMADS4* 基因序列比对与系统进化分析

将 *LmMADS4* 基因编码氨基酸序列与其他植物的氨基酸序列进行多重比对 (图 3), 结果显示, *LmMADS4* 蛋白与金银花 *LjMADS27* 的相似性最高, 高达 98.35%; 而与拟南芥 *AtAPI* 的相似性为 69.53%。为了进一步确定 *LmMADS4* 蛋白与其他物种的进化关系, 将其氨基酸序列在 NCBI 上比对, 选取同源性高的物种的 *API* 同源蛋白, 利用 MEGA11.0 进行多序列比对并构建进化树。结果显示 (图 4), 克隆的 *LmMADS4* 与金银花

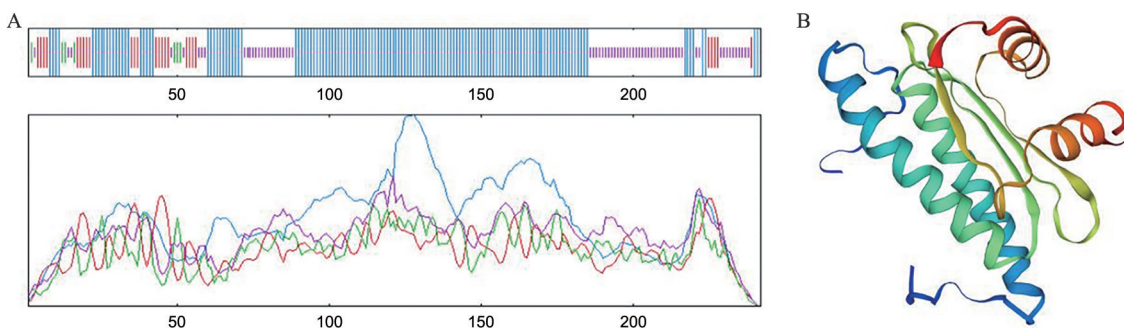


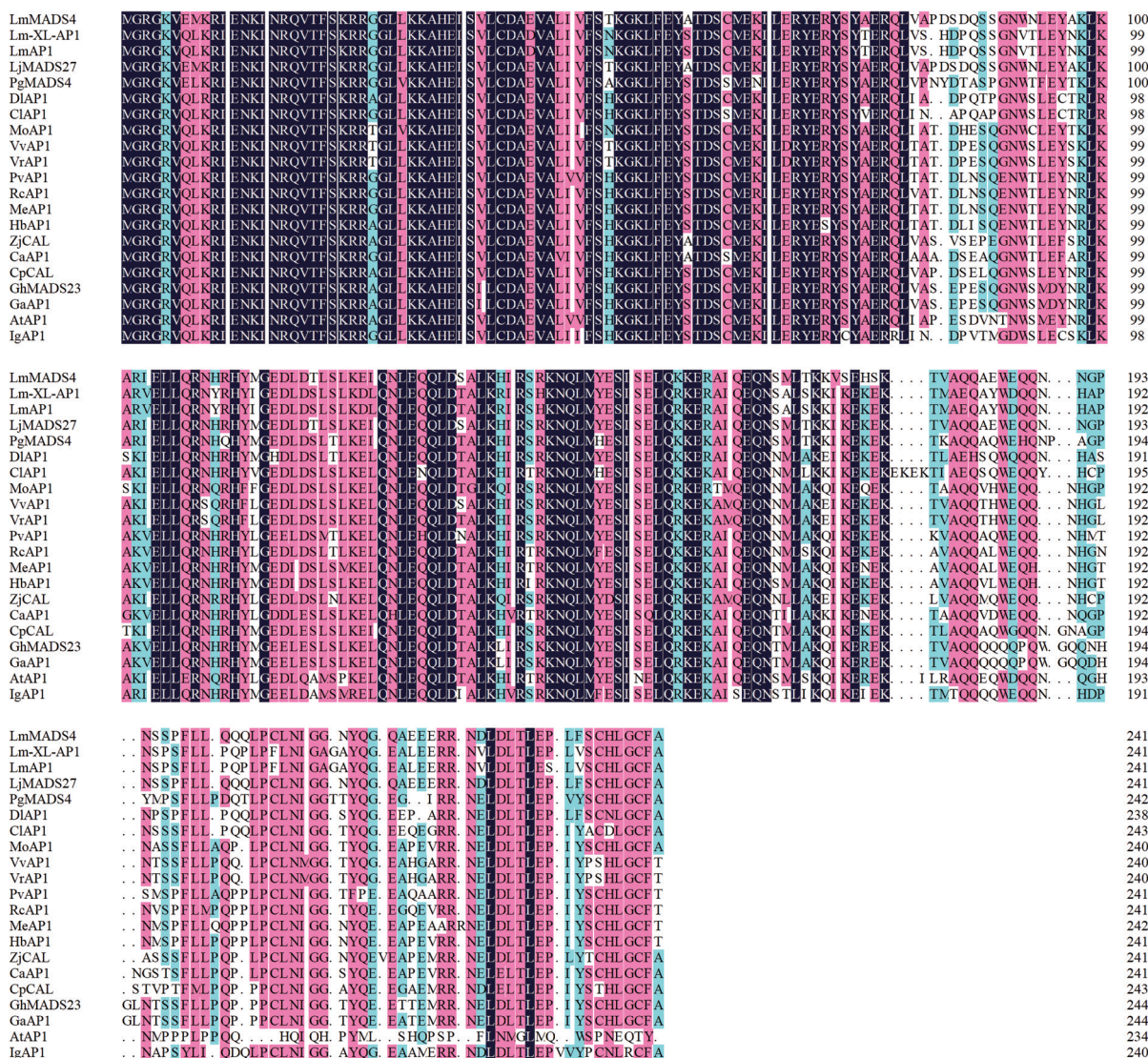
Figure 2 Predicted structure of LmMADS4 protein. A: Secondary structure of LmMADS4 protein (blue: α Helix; red: Extended strand; purple: Random coil; green: β Turn); B: Three tertiary structure of LmMADS4 protein

LjMADS27蛋白聚为一类, 亲缘关系最近。

4 LmMADS4基因的表达模式分析

以灰毡毛忍冬18S rRNA为内参基因, 进行实时荧光定量PCR, 比较研究了LmMADS4基因在花蕾型品种

龙花与普通品种白云的嫩叶、成熟叶和茎以及花蕾不同发育期的相对表达量, 并进行了差异显著性分析。由图5A、B可知, 灰毡毛忍冬LmMADS4基因主要在龙花和白云生殖器官花蕾中表达, 在营养器官嫩叶、成熟叶



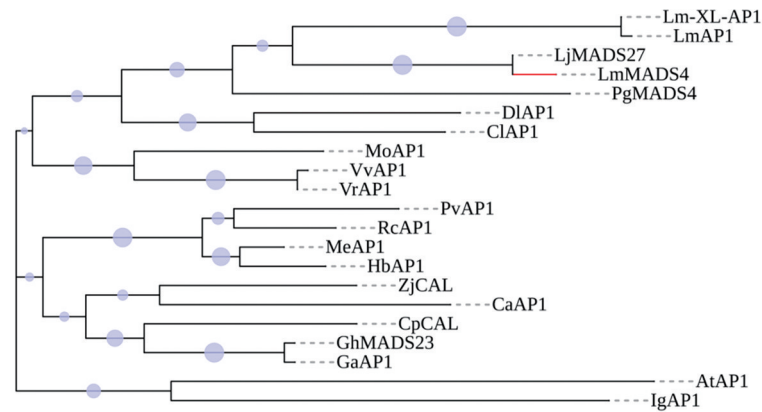


Figure 4 Phylogenetic evolution of *LmMADS4* and other plant *API* homologous proteins. The accession number for each protein in phylogenetic tree are as follows: *LmMADS4*, *Lonicera macranthoides* (PP235953); *Lm-XL-API*, *L. macranthoides* (ASC49546.1); *LmAPI*, *L. macranthoides* (ASM90855.1); *LjMADS27*, *L. japonica* (WAO97430.1); *PgMADS4*, *Panax ginseng* (BAK20019.1); *DIAP1*, *Diospyros lotus* (XP_052184583.1); *ClAP1*, *Camellia lanceoleosa* (KAI8024541.1); *MoAP1*, *Malaria oleifera* (XP_057961538.1); *VvAP1*, *Vitis vinifera* (NP_001268210.1); *VrAP1*, *V. riparia* (XP_034699499.1); *PvAP1*, *Plukenetia volubilis* (ANA05340.1); *RcAP1*, *Ricinus communis* (XP_002512051.2); *MeAP1*, *Manihot esculent* (XP_021623236.1); *HbAP1*, *Hevea brasiliensis* (XP_021684191.2); *ZjCAL*, *Ziziphus jujuba* var. *Spinosa* (XP_048317859.1); *CaAP1*, *Corylus avellana* (XP_059447741.1); *CpCAL*, *Carica papaya* (XP_021910321.1); *GhMADS23*, *Gossypium hirsutum* (AET74058.1); *GaAP1*, *G. arboretum* (XP_017618710.1); *AtAPI*, *Arabidopsis thaliana* (NC_003070.9); *IgAP1*, *Impatiens glandulifera* (XP_047323111.1)

和茎中也有所表达,但表达量较低。这说明 *LmMADS4* 基因在灰毡毛忍冬花蕾发育过程中发挥了重要作用,与 *API* 同源基因参与花器官发育过程相一致。由图 5C、D 可知,随着灰毡毛忍冬花蕾的发育, *LmMADS4* 基因在花蕾型品种龙花中呈现出持续上调表达的趋势,其表达量在花蕾末期 (Lm4) 达到最高峰值,而在

普通品种白云花蕾末期 (Lm4) 的表达水平较花蕾晚期 (Lm3) 有所降低,但差异不显著。且从整体来看,花蕾型品种龙花中 *LmMADS4* 基因表达量高于普通品种白云。

5 pGBKT7-*LmMADS4* 的毒性检测及自激活检测

将 pGBKT7 空质粒和构建的诱饵质粒分别转化至

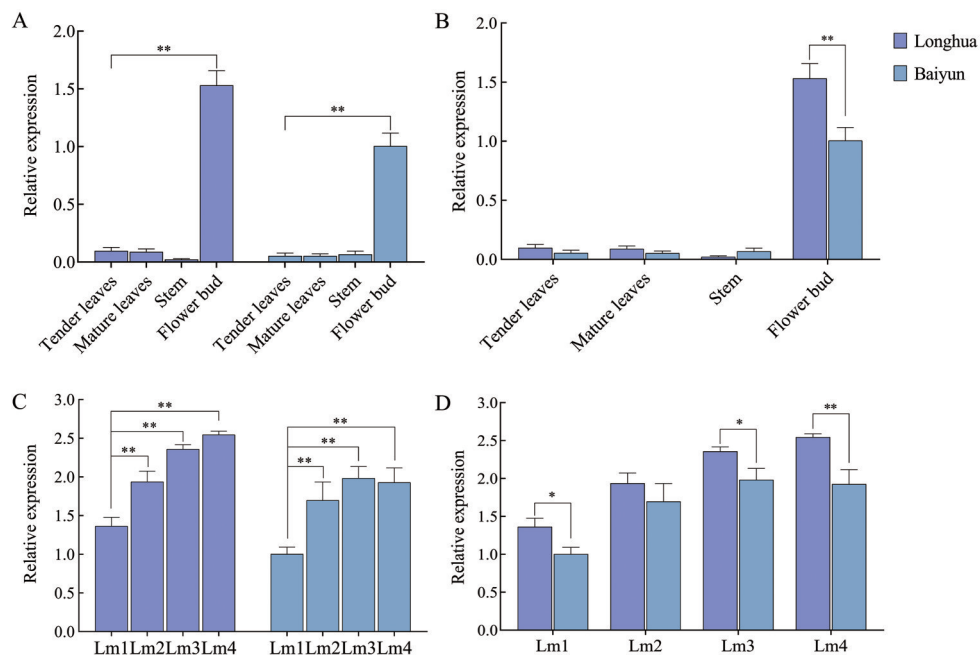


Figure 5 Expression patterns of *LmMADS4* at different organs and stages of *L. macranthoides*. A, B: At different organs of Longhua and Baiyun. C, D: At different flower bud development stages of Longhua and Baiyun (Lm1: Early stage; Lm2: Mid-stage; Lm3: Late stage; Lm4: Terminal stage). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Y2HGold 酵母感受态, 涂布于 SD/-Trp 固体培养基平板上培养 3 d, 结果发现, 诱饵酵母与空载体酵母的生长速度相似, 菌落形态正常, 说明构建的诱饵质粒酵母菌株无毒性。

自激活检测结果显示, 转入 pGBKT7-LmMADS4+pGADT7 的菌株、pGBKT7-53+pGADT7 (阳性对照) 以及 pGBKT7-Lam+pGADT7 (阴性对照) 均能在二缺 SD/-Leu/-Trp 固体培养基上长出白色菌落; 而在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 平板上只有阳性对照能够正常生长, 阴性对照、pGBKT7-LmMADS4 和 pGADT7 的菌株不能生长, 说明诱饵在酵母菌株中不能激活报告基因的表达, 无自激活活性。

6 酵母双杂交验证

克隆 7 个候选互作蛋白的 CDS 序列, 连接至 pGADT7 载体, 构建酵母双杂交猎物载体 pGADT7-LmSVPs、pGADT7-LmSOC1s、pGADT7-LmFLC 和 pGADT7-LmMADS4。随后将构建的猎物载体分别与诱饵载体 pGBKT7-LmMADS4 共转化至酵母 Y2HGold 感受态中, 并在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA 平板上验证 LmMADS4 蛋白与其他蛋白之间的相互作用模式。结果显示 (图 6), 所有二倍体酵母均能在 SD/-Leu/-Trp 固体培养基上长出白色菌落, 说明诱饵质粒和猎物质粒成功转化至酵母菌株中。SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal/AbA 平板上, 阳性对照、转化 pGBKT7-LmMADS4 质粒和 pGADT7-LmSVP1 质粒、转化 pGBKT7-LmMADS4 质粒和 pGADT7-

LmSVP3 质粒、转化 pGBKT7-LmMADS4 和 pGADT7-LmSOC1s 质粒以及转化 pGBKT7-LmMADS4 质粒和 pGADT7-LmMADS4 质粒的酵母菌株能正常生长, 并能水解 X- α -Gal, 从而使菌斑呈现蓝色, 说明 LmMADS4 蛋白与 LmSVP1、LmSVP3、LmSOC1-1 和 LmSOC1-2 蛋白之间均存在互作关系, 与 LmSVP2 和 LmFLC 不存在相互作用。除此之外, LmMADS4 蛋白自身还可以形成同源二聚体。

讨论

本研究从灰毡毛忍冬中克隆得到一个 *API* 同源基因 *LmMADS4*。生物信息学分析证明该基因具有 *MADS-box* 基因家族典型结构域, 属于 *MADS-box* 家族基因。多序列比对及系统进化分析表明, *LmMADS4* 与其他物种 AP1 蛋白序列的一致性较高, 因此推测不同物种中 *API* 同源基因序列可能具有相似的功能。将 *LmMADS4* 与另一花蕾型品种湘蕾中克隆得到的 *Lm-XL-API* 基因进行基因序列比对发现, 两基因除 5' 与 3' 端存在差异外, 其 CDS 区个别碱基也存在差异, 这使得两基因编码的氨基酸序列中大约存在 43 个氨基酸不一致。推测造成这种差异的一种原因可能是品种差异导致的; 另一种原因则有可能是同一基因在编码过程中发生了可变剪切而得到了不同的转录本。*API* 同源基因在开花植物中广泛存在, 目前, *API* 同源基因已从许多物种中克隆出来并进行了时空表达分析, 该同源基因在很多植物成花发育和花器官形成过

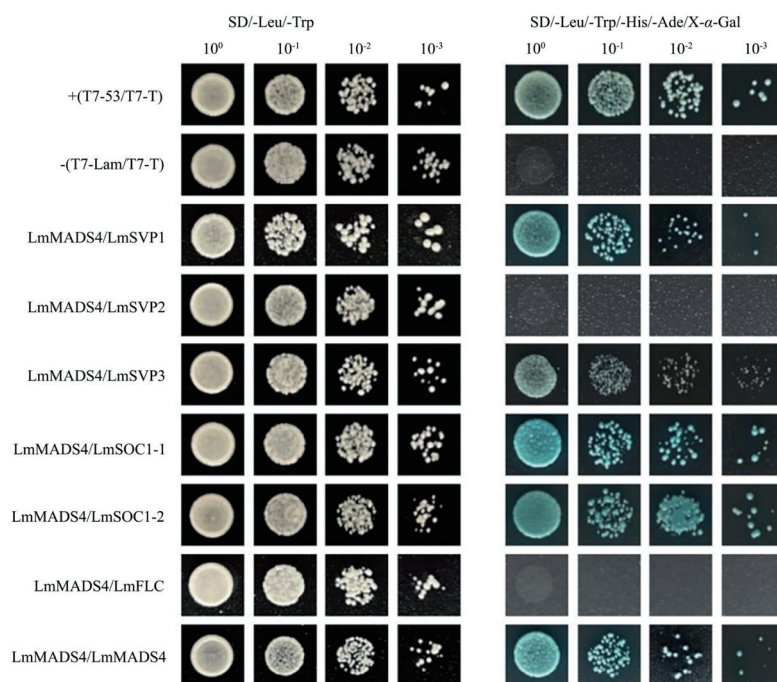


Figure 6 Yeast two-hybrid verification

程中发挥主导作用。但是研究表明, *API* 同源基因在不同植物中的表达模式存在差异。拟南芥 *AtAPI* 基因在花萼和花瓣中表达, 在雌蕊、雄蕊和营养器官中均不表达^[24]。银缕梅 *PsuAPI* 在花和果实中大量表达, 并且在花发育不同时期的表达水平存在明显差异, 说明 *PsuAPI* 参与了银缕梅花器官的发育^[25]。荷花 *NeAPI* 基因在根、茎、叶和花中均有表达, 但在花中的表达量最高^[26]。红花玉兰 *MamuAPI* 在苞片、花被片、雄蕊和心皮等花器官以及叶中均有表达, 在苞片中表达水平最高, 且 *MamuAPI* 随着各轮花器官的发育而持续表达^[27]。基因的表达量与功能密切相关, *API* 基因在花中的高表达以及在花发育过程中的差异表达, 说明 *API* 同源基因在调控花器官发育过程中发挥着至关重要的作用。

本研究对灰毡毛忍冬 *API* 同源基因 *LmMADS4* 在不同组织部位和花蕾发育不同阶段的表达模式进行了分析, 结果表明 *LmMADS4* 基因在两个灰毡毛忍冬品种的花蕾中呈现高表达, 在营养器官茎和叶中则低表达, 这与前人的研究结果一致。已有研究表明在建兰 (*Cymbidium ensifolium*)、芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 以及菊花 (*Chrysanthemum morifolium*) 等中, *API* 基因在花芽中的表达量均高于其他器官组织, 尤其在花芽分化的初期阶段^[28-30]。由此推测 *LmMADS4* 参与灰毡毛忍冬花器官发育过程。在花蕾发育的不同阶段中, *LmMADS4* 基因在花蕾型品种龙花花蕾末期依然上调表达, 而在普通品种白云花蕾末期的表达量有所下降, 推测花蕾品种 *LmMADS4* 表达量的峰值较普通品种晚, 可能与花蕾型品种蕾期长、花冠不展开等性状的产生有关。但仅根据灰毡毛忍冬 *LmMADS4* 的表达特征尚无法获取更多有关其参与调控花发育过程的信息, 其具体功能还有待深入研究。

已有研究表明, 花分生组织和花器官发育决定因子 AP1 会结合到 *SVP* 和 *SOC1* 基因的启动子 CARG 片段上, 抑制它们的表达, 从而调控花器官的正常发育。而 *SOC1* 和 *SVP* 也会通过结合 *API* 的启动子来抑制 *API* 的表达^[31,32]。在花分生组织形成时, *SOC1*、*SVP* 蛋白会通过 AP1、LUG (LEUNIG) 和 SEU (staphylococcal enterotoxin U) 形成复合物或直接阻碍花器官发育 ABCDE 模型中的 B 类基因和 C 类基因的表达, 从而抑制植物的成花转变, 但是这个抑制过程需要依赖 *SEP3* 基因^[20]。与拟南芥研究结果相似, 本研究中的酵母双杂交实验表明, 灰毡毛忍冬 *LmMADS4* 蛋白与 *LmSVP1*、*LmSVP3*、*LmSOC1-1* 和 *LmSOC1-2* 蛋白之间均存在互作关系, 但与 *LmSVP2* 和 *LmFLC* 不存在相互作用。结合荧光定量分析结果, *LmMADS4* 在灰毡毛

忍冬花蕾中有显著表达, 推测 *LmSOC1-1*、*LmSOC1-2*、*LmSVP1*、*LmSVP3* 与 *LmMADS4* 的互作发生在花蕾中。为进一步研究其功能, 下一步可通过构建 *LmMADS4* 过表达载体并遗传转化拟南芥, 揭示其在灰毡毛忍冬花器官发育过程中所行使的生物学功能及其潜在的作用机制。

作者贡献: 俞亚欣、龙丽君设计了本项工作, 并执行了本项工作的实验、数据分析和初稿撰写; 李昌珠、曾慧杰、乔中全指导采样和数据分析; 刘思思和马英姿指导实验操作、论文写作和文章修改。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2020 Ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 30-31.
- [2] Qiu LJ, Suo CX, Pan LY, et al. Study on the quality evaluation of Lonicerae Japonicae Flos, Lonicerae Flos and Lonicerae Similis Flos based on multivariate statistical analysis [J]. J Guangdong Pharm Univ (广东药科大学学报), 2020, 36: 620-626.
- [3] Mei YD, Li HB, Wang ZZ, et al. Study on the chemical composition of glycosides in *Lonicera macranthoides* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2020, 51: 287-292.
- [4] Peng MC, Liu XD, Xu YQ, et al. Lt, Cloning of *API* gene from *Lonicera macranthoides* "Xianglei" and analysis on its bioinformatics and space-time expression [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2018, 49: 1652-1660.
- [5] Yang Z, Nie G, Feng G, et al. Genome-wide identification of *MADS-box* gene family in orchardgrass and the positive role of *DgMADS114* and *DgMADS115* under different abiotic stress [J]. Int J Biol Macromol, 2022, 223: 129-142.
- [6] Schilling S, Kennedy A, Pan S, et al. Genome-wide analysis of MIKC-type *MADS-box* genes in wheat: pervasive duplications, functional conservation and putative neofunctionalization [J]. New Phytol, 2020, 225: 511-529.
- [7] Guo X, Hu QY, Xu HX, et al. Cloning and function analysis of *PfAPI* from *Perilla frutescens* [J]. Plant Physiol J (植物生理学报), 2022, 58: 1598-1606.
- [8] Nobuhiro K, Masato W, Shinnosuke K, et al. Overexpression of *MdMADS5*, an *APETALAI*-like gene of apple, causes early flowering in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Sci, 2002, 162: 679-687.
- [9] Yu H, Luo C, Fan Y, et al. Isolation and characterization of two *APETALAI*-like genes from mango (*Mangifera indica* L.) [J]. Sci Hortic, 2020, 259: 108814.
- [10] Cheng X, Wang H, Wei H, et al. The *MADS* transcription factor *GhAPI.7* coordinates the flowering regulatory pathway in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Gene, 2021, 769:

- 145235.
- [11] He JZ, Fan JZ, Zeng YH, et al. Cloning and expression of the *APETALA1* gene from *Phalaenopsis aphrodite* Rehb. f. "Big pepper" [J]. North Hortic (北方园艺), 2021, 3: 83-90.
- [12] Liu T, Pu WQ, Zhao YH, et al. Cloning and phylogenetic analysis of the *API MADS-box* gene from *Cymbidium tortisepalum* [J]. Seed (种子), 2016, 35: 14-17.
- [13] Zhao KK. Functional Analysis of *API/FUL*-like Subfamily Genes in *Chrysanthemum* (菊花 *API/FUL*-like 亚家族基因功能初步研究) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2023.
- [14] Shi YF. Cloning of *CsAPI* Gene and Phylogenetic Analysis of *API* Gene in *Camellia sinensis* (茶树 *CsAPI* 基因克隆及 *API* 基因系统进化分析) [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2015.
- [15] Du CJ, Zhang HY, Luo XP, et al. Progress in gene regulation of plant floral organ development [J]. J Plant Genet Resour (植物遗传资源学报), 2024, 25: 151-161.
- [16] Zhang ZT, Li XB. Function of the *MADS-box* genes in plant development [J]. Plant Physiol J (植物生理学报), 2007, 2: 218-222.
- [17] Jiang QN, Fu JX, Zhang C, et al. Cloning and expression analysis of *osmanthus OfAPI* gene from *Osmanthus fragrans* [J]. J Zhejiang A F Univ (浙江农林大学学报), 2019, 36: 664-669.
- [18] Cong N, Cheng ZJ, Wan JM. The ABCDE model controlling floral organ development [J]. China Agric Sci Bull (中国农学通报), 2007, 23: 134-138.
- [19] Liu C, Xi W, Shen L, et al. Regulation of floral patterning by flowering time genes [J]. Dev Cell, 2009, 16: 711-722.
- [20] Qi XL, Lu MZ. Regulation network and biological roles of *APETALA1* of *Arabidopsis Thaliana* in flower development [J]. China Agric Sci Bull (中国农学通报), 2011, 27: 103-107.
- [21] Madrid E, Chandler JW, Coupland G. Gene regulatory networks controlled by FLOWERING LOCUS C that confer variation in seasonal flowering and life history [J]. J Exp Bot, 2021, 72: 4-14.
- [22] Li FY. Screening and Functional Validation of *MADS-box* Transcription Factors Related to Flowering Time from *Iris laevigata* (燕子花花期调控相关 *MADS-box* 转录因子筛选及功能验证) [D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2022.
- [23] Cai JL, Zhu YL, Xie SP, et al. Gene screening and spatial and temporal expression analysis of the *MADS-box* family gene *AGL15* in *Lonicera macranthoides* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 2727-2733.
- [24] Alejandra Mandel M, Gustafson-Brown C, Savidge B, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* [J]. Nature, 1992, 360: 273-277.
- [25] Chen YX, Xue XM, Nan CH, et al. Cloning and bioinformatic expression analysis of the *MADS-box* family gene *PsuAPI* from *Shaniodendron subaequale* [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2021, 19: 72-79.
- [26] Guo B. Cloning and Expression of *NnAPI* Related Gene from *Nelumbo nucifera* (荷花成花相关基因 *NnAPI* 的克隆与表达) [D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2014.
- [27] Chen LY. Cloning and Functioning Study of *APETATAL1* and *AGAMOUS-LIKE6* Homologs of *Magnolia wufengensis* (红花玉兰 *APETATAL1* 和 *AGAMOUS-LIKE 6* 同源基因克隆和功能研究) [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2020.
- [28] Wu JH, Wu SH, Yang C, et al. Cloning and expression analysis on *API* homologous gene from *Cymbidium ensifolium* and interaction analysis between *API* and *MADS-box* transcription factors [J]. Acta Hortic Sin (园艺学报), 2013, 40: 1935-1942.
- [29] Wu YQ, Ge JT, Tao J. cDNA cloning, sequence analysis and tissue expression detection of *APETALA1* gene (*API*) in *Paeonia lactiflora* Pall. petals of different development stages [J]. J Agric Biotechnol (农业生物技术学报), 2015, 23: 1559-1567.
- [30] Liang F, Huang P, Yuan XY, et al. Cloning of *CmAPI* gene from *Chrysanthemum morifolium* and establishment of its plant expression vector [J]. J South Agric (南方农业学报), 2017, 48: 952-959.
- [31] Chen JW, He XH, Luo C, et al. Research progress of plants flowering suppressor homologous genes of *SVPs* [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2017, 15: 4888-4898.
- [32] Qi LL, Su Q, Zhang K. Molecular mechanism of flowering time regulate by *SOCI* [J]. Pratac Sci (草业科学), 2022, 39: 149-160.