

文章编号: 1001-1498(2010) 01-0001-05

# 版纳龙竹 *CONSTANS* 同源基因的克隆与序列分析\*

崔丽莉<sup>1,2</sup>, 杨汉奇<sup>2\*\*</sup>, 杨宇明<sup>1</sup>

(1. 西南林学院保护生物学学院, 云南 昆明 650224; 2. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

**摘要:** 以版纳龙竹基因组 DNA 为模板, 采用前人基于水稻 *CO* 同源基因 *Hdl* 序列的保守区所设计的特异引物 COS1 和 COA1, 运用 PCR 方法扩增出一条 1 520 bp 的 DNA 片段, 并克隆到 pGEM-T 载体。测序和序列分析结果显示: 该片段含有 1 个 590 bp 的内含子, 编码区 930 bp 共编码 310 个氨基酸; 该基因被命名为 *DxCO1*, 其 DNA 序列在 GenBank 中的注册号为 GQ358925。在 GenBank 中进行同源性检索的结果显示: 其核苷酸序列与其它禾本科植物 *CO* 同源基因的氨基酸序列同源性高达 81% ~ 91%; 推测的 *DxCO1* 蛋白质序列与其它种子植物 *CO* 同源基因蛋白质序列的系统发育分析结果显示: *DxCO1* 与小麦 *Hdl-like* 等 5 个基因聚成了一个强烈支持的分支; 另外, 在该片段推测的蛋白质序列的氨基端含有一个类似锌指蛋白的 B-box (Cx<sub>2</sub>Cx<sub>8</sub>Cx<sub>7</sub>Cx<sub>2</sub>Cx<sub>4</sub>Hx<sub>8</sub>H) 结构域, 羧基端含有一个 CCT(*CO*, *CO-like*, *TOC1*) 结构域。序列和结构的高度同源性表明: *DxCO1* 是版纳龙竹的 1 个 *CO-like* 基因, 可能对其开花调控有着重要作用。

**关键词:** 版纳龙竹; *CONSTANS* 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S722.3

文献标识码: A

## Cloning and Sequence Analysis of *CONSTANS* Homologous Gene from *Dendrocalamus xishuangbannaensis*

CUI Li-li<sup>1</sup>, YANG Han-qi<sup>2</sup>, YANG Yu-ming<sup>1</sup>

(1. College of Biology Conservation, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China;

2. Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China)

**Abstract:** *CONSTANS* (*CO*) is one of the key genes controlling flowering time of the flowering plants in Photoperiod Pathways. In current study, two primers, COS1 and COA1, based on the conserved region of *Hdl* sequences from *CO-like* gene of rice (*Oryza sativa*), were employed to amplify a 1 520 bp fragment by polymerase chain reaction (PCR) with genomic DNA of *Dendrocalamus xishuangbannaensis* D. Z. Li & H. Q. Yang. The fragment was cloned into a pGEM-T vector and then sequenced. Result of the 1 520 bp fragment cloned into a pGEM-T vector produced a fragment of gene, i. e. *DxCO1*, with accession number GQ358925 in GenBank. The DNA sequence analysis indicated that *DxCO1* included one intron of 590 bp and two exons encoding putative 310 amino acids. Using homology analyses of DNA sequence, *DxCO1* was homologous to the other six *CO-like* genes from Gramineae plants with 81% - 91% supports, respectively. Phylogenetic analysis, based on protein sequences of *DxCO1* and the known *CO-like* genes of seed plant in GenBank, showed that *DxCO1* and other five *CO-like* genes from

收稿日期: 2009-09-02

基金项目: 中国林业科学研究院资源昆虫研究所中央级科研单位基本科研业务费专项 (Rin200702M), 国家林业局 948 项目 (2008-4-30), 国家林业科技支撑项目 (2006BAD19B0301), 云南省科技厅联合支持国家科技项目 (2007GA014) 和云南竹藤科学创新团队项目

作者简介: 崔丽莉 (1985-), 女, 云南昆明人, 硕士, 从事植物保护生物学研究。

\* 致谢: 中国科学院西双版纳热带植物园田波博士和中国科学院昆明植物研究所杨俊波、李洪涛博士在实验中给予了宝贵的建议, 特此致谢!

\*\* 通讯作者: yanghanqikm@yahoo.com.cn

Gramineae plants clustered into a monophyly with bootstrap value of 92%. Meanwhile, there was a zinc-finger B-box (Cx<sub>2</sub>Cx<sub>8</sub>Cx<sub>7</sub>Cx<sub>2</sub>Cx<sub>4</sub>Hx<sub>8</sub>H) domain near amino terminus and a CCT (CO, CO-like, TOC1) domain near carboxy terminus in putative amino acid sequence of *DxCO1*. These results suggested that *DxCO1* belonged to CO-like gene family, and it might have the same function of controlling flowering time like other CO homologous genes.

**Key words:** *Dendrocalamus xishuangbannaensis*; *CONSTANS* homologous gene; cloning; sequence analysis

*CONSTANS* (CO) 基因是植物光周期调控开花途径中的关键基因之一, 对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)、水稻 (*Oryza sativa* L.) 等模式植物开花时间调控机理的研究发现, 它编码一类具有 2 个 B-box 锌指结构的转录因子, 可以直接激活开花整合因子 *FT* 和 *SOC1* 的表达, 决定了植物能否感受日照长度的变化, 如在长日照条件下, CO 基因能够促进拟南芥开花, 但在短日照条件下, CO 基因对拟南芥开花时间的促进作用不大<sup>[1-5]</sup>。由于植物 CO 基因在开花时间调控途径上的重要性, 该类基因的功能和作用机制一直是近年来植物学研究的热点之一<sup>[6-12]</sup>。木本竹子 (本文简称竹子) 是植物界中开花现象最奇特的类群之一。大多数竹子具有漫长的开花周期, 一般为 3 ~ 120 a, 而且大部分呈群体开花、群体死亡的状况; 到目前为止, 竹子开花原因和调控机理仍不清楚<sup>[13-17]</sup>。版纳龙竹 (*Dendrocalamus xishuangbannaensis* D. Z. Li & H. Q. Yang) 是最近定名的一种牡竹属大型丛生竹, 仅分布于云南省南部, 是一种用途广泛、经济价值极高的优良材用竹种<sup>[18]</sup>。近年来, 在版纳龙竹的种苗培育过程中, 得到了大量开花植株和花器官材料, 为研究竹子开花的分子机理提供了良好的实验材料。本文以版纳龙竹的幼叶为试验材料, 提取其基因组 DNA, 用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增的方法进行了 CO 同源基因的分子克隆研究, 期望能为从分子水平上认识竹子开花的分子机理等研究积累资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

在云南景洪市南糯山采集版纳龙竹幼嫩叶, 用 CTAB 法<sup>[19]</sup> 提取并纯化基因组 DNA 作为模板。采用已报道的基于水稻 CO 同源基因 *Hdl* 序列的保守区所设计的 1 对特异引物 COS1 和 COA1<sup>[15]</sup>, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 上游引物为 COS1: 5'-GGCGCCGAGCGTGGTGTACT-3', 下游引物为 COA1: 5'-GCCCTTGATCCGGGGTTCGT-3'。载体 pGEM-T 购自 Promega 公司, PCR 试剂购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

### 1.2 PCR 扩增

采用 Touchdown (TD) —PCR 扩增基因片段。反应体系 (50 μL) 为: ddH<sub>2</sub>O 38 μL; 10 × LA Taq Buffer 5 μL; dNTP 4 μL; 两端引物各 1 μL; 总 DNA 0.5 μL; LA Taq 0.5 μL。反应程序为: 94 预变 3 min; 94 变性 1 min, 64 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 5 个循环; 余下程序为 94 1 min, 62 1 min, 72 1 min, 5 个循环; 94 1 min, 60 1 min, 72 1 min, 5 个循环; 94 1 min, 58 1 min, 72 1 min, 5 个循环; 94 1 min, 56 1 min, 72 1 min, 15 个循环; 72 10 min; 4 保温。

### 1.3 目的片段的克隆

把 PCR 扩增得到的目的片段纯化后, 连接到 pGEM-T 载体, 4 放置 5 h, 连接产物转化感受态细胞 (TIANGEN DH5), 涂平板于含 Amp/X-gal/IPTG 的 LB 固体培养基上, 在培养箱中以 37 培养 16 h 左右, 挑取白色菌落, 再采用 PCR 法进行扩增。反应体系 (20 μL) 为: ddH<sub>2</sub>O 14 μL, 10 × LA Taq Buffer 2 μL, dNTP 2 μL, 通用引物 T3 和 T7 各 0.5 μL, LA Taq 0.3 μL, 1 个白色菌落。反应程序为: 97 预变 1 min; 94 变性 40 s, 50 退火 40 s, 70 延伸 1 min, 30 个循环后, 70 延伸 7 min, 4 保温。

### 1.4 目的片段的测序及分析

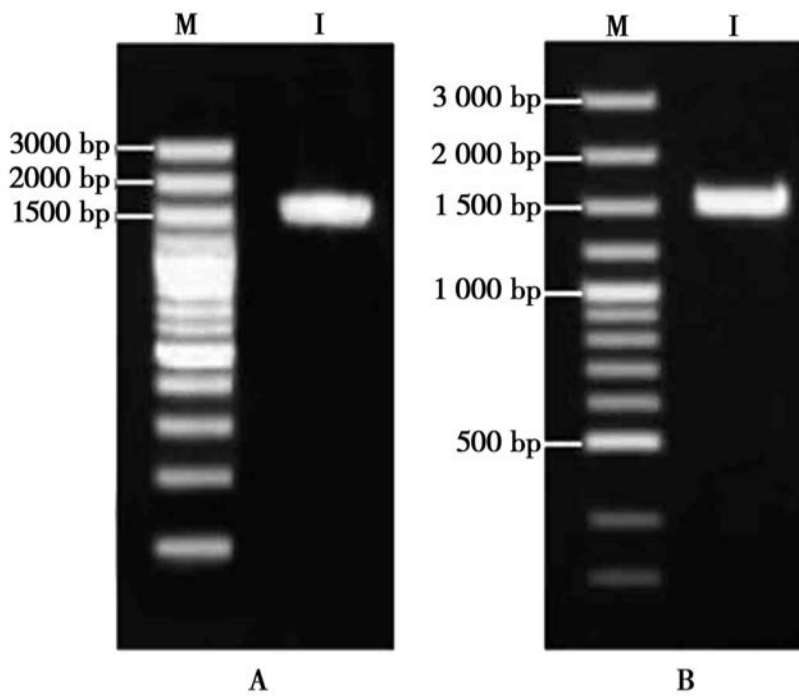
PCR 扩增所得目的片段的纯化产物由上海生物工程技术有限公司进行测序。测定的序列用 DNA Star 生物软件比较、翻译, 用 Blast 工具在 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 网站数据库中进行同源序列的在线分析和比较。运用 GenScan 进行基因结构预测。利用 PHYLIP 3.69<sup>[20]</sup> 分析所得基因与 GenBank 中已知种子植物 CO 同源基因的系统发育关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 产物的扩增和克隆

以版纳龙竹基因组 DNA 为模板, 通过上下游引物进行了 PCR 扩增, 得到长度为 1 500 bp 左右的条带 (图 1A), 经纯化后连接到 pGEM-T 载体并转化到

DH5 感受态细胞中, 再次通过 PCR 所得目的片段 (图 1B) 纯化后送交上海生工进行正反向测序, 经拼接后获得长为 1 520 bp 的序列 (图 2)。

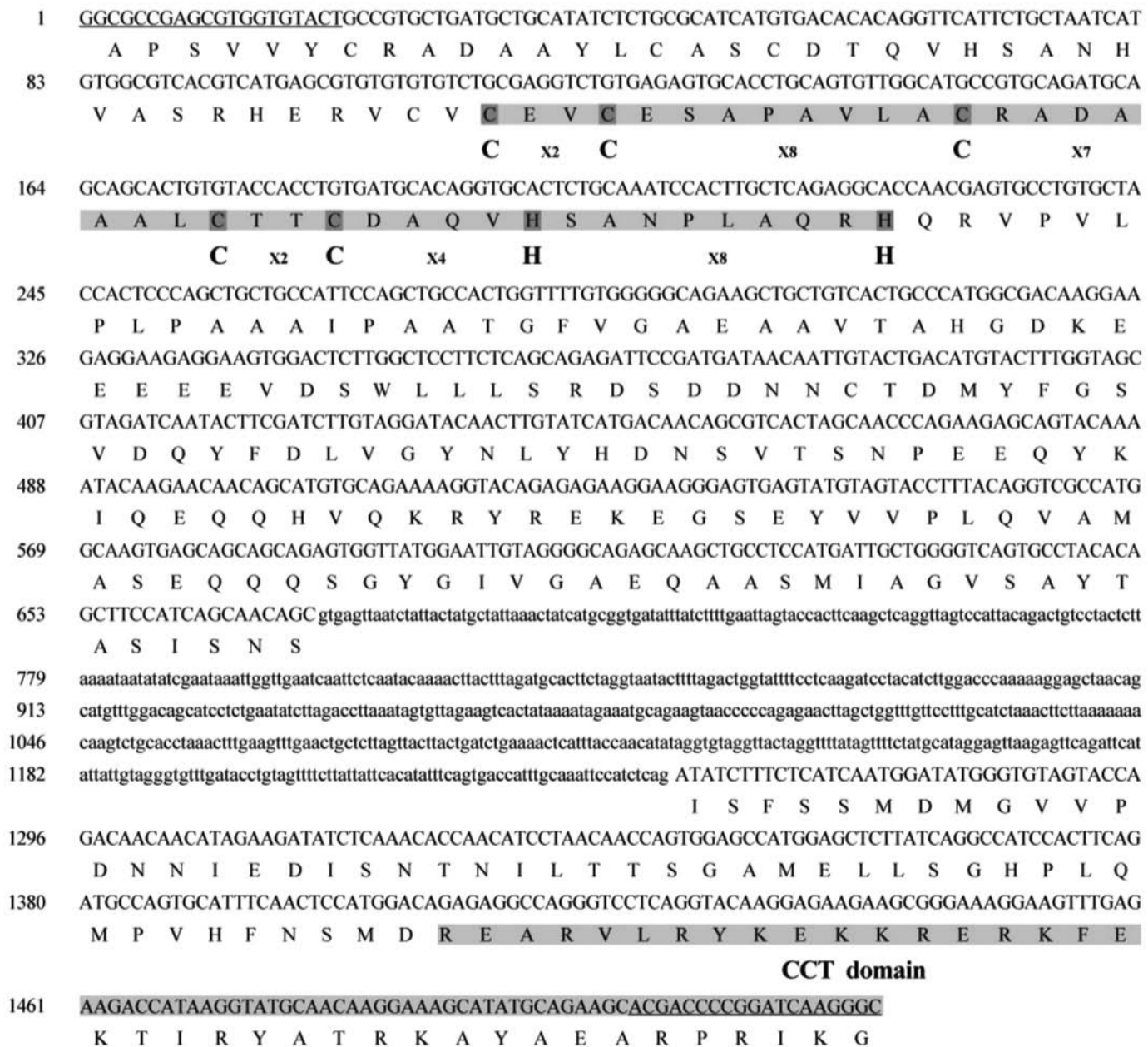


A 中 M 为 Marker, I 为扩增产物;  
B 中 M 为 Marker, I 为阳性克隆

图 1 PCR 扩增结果 (A) 和阳性克隆的 PCR 鉴定 (B)

## 2.2 基因序列与同源性分析

利用 GenBank/NCBI 中的 Blast 工具进行比较分析, 结果显示获得了 *CO* 同源基因的 1 个片段, 该片段全长 1 520 bp, 含 1 个内含子, 长度为 590 bp, 剪切点位置符合 GT-AG 规律; 其外显子区共 930 bp, 推测编码 310 个氨基酸。本基因片段命名为 *DxCO1*, GenBank 注册号为 GQ358925。用 Blast 工具在 GenBank 数据库中进行禾本科代表植物的核苷酸序列同源搜索, 结果如表 1 所示 (草丝竹序列由中国科学院西双版纳热带植物园田波博士惠赠)。从表中可以看出: 所克隆出片段与其他禾本科植物的 *CO* 同源基因核苷酸序列的同源性达到 81% ~ 91%。同源性最高的为禾本科竹亚科高山竹子草丝竹 (*Yushania andropogonoides* (Hand. -Mazz.) Yi), 达 91%; 最低为水稻, 其同源性为 81%。另外, 在预测的氨基酸序列的第 39 到第 75 个氨基酸区间发现了类似于动物蛋白 B-box 基因的锌指结构 ( $Cx_2 Cx_8 Cx_7 Cx_2 Cx_4 Hx_8 H$ )<sup>[21]</sup> 以及羧基端的 CCT 结构域 (第 273 到第 310 个氨基酸区间)<sup>[22 - 23]</sup>。



核苷酸序列中的划线部分为引物序列, 大写字母示编码区; 氨基酸序列中的阴影部分示锌指结构和 CCT 结构域

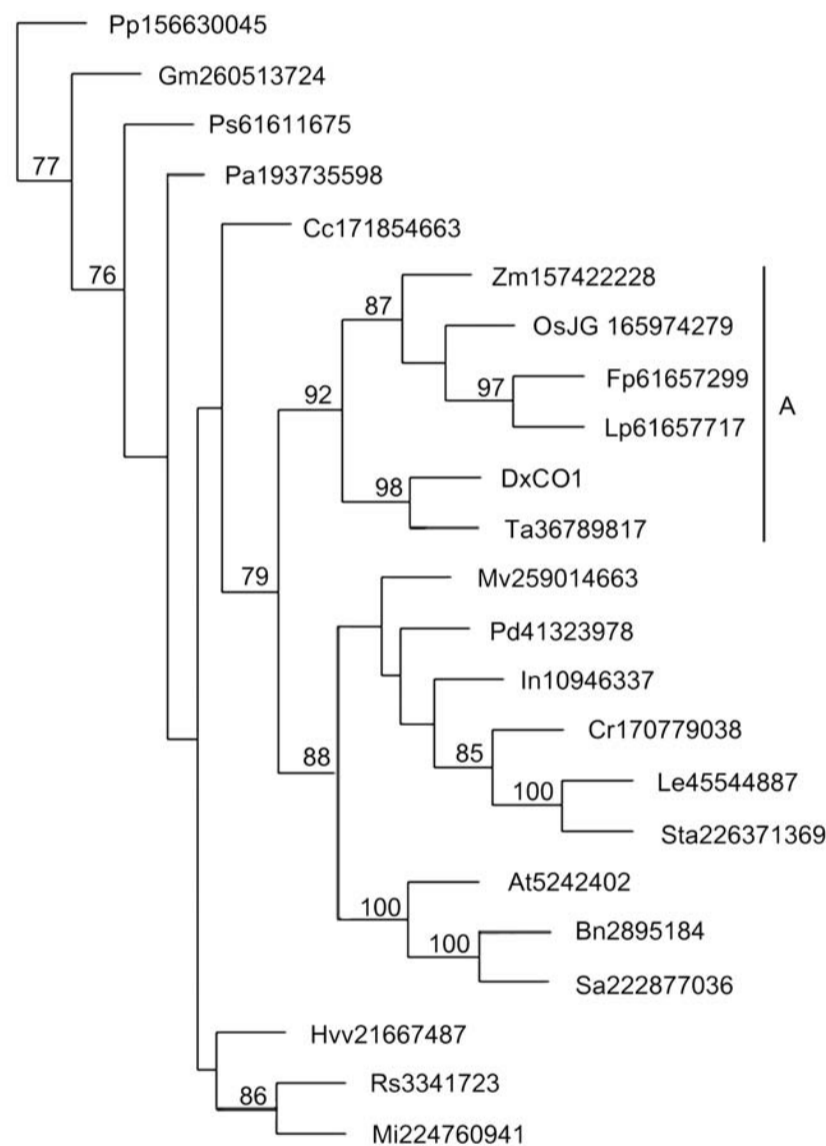
图 2 *DxCO1* 核苷酸序列和预测的氨基酸序列

表 1 *DxCO1* 与禾本科代表植物 *CO* 同源基因核苷酸序列的同源性比较

基因	GenBank 登记号	同源性 /%	植物种类
<i>YaCO1</i>	尚未登记	91	草丝竹 ( <i>Yushania andropogonoides</i> (Hand. -Mazz.) Yi)
<i>TaHdl-2</i> gene for <i>Hdl</i> -like protein	AB094488.1	87	小麦 ( <i>Triticum aestivum</i> L.)
<i>COL1</i>	DQ534011.2	84	黑麦草 ( <i>Lolium perenne</i> L.)
<i>conZ</i>	ZM118116	84	玉米 ( <i>Zea mays</i> L.)
<i>CONSTANS</i> -like protein	AF490470.1	83	大麦 ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)
<i>Hdl</i> gene for heading date 1	AB433218.1	81	水稻 ( <i>Oryza sativa</i> L.)

运用 PHYLIP 3.69 所得到的 *DxCO1* 基因与已知种子植物 *CO* 同源基因氨基酸序列的系统发育树如图 3 所示。*DxCO1* 与 5 种禾本科植物的 *CO*-like 基因聚在分支 A 上, 并得到了 92% 的靴带分析

(Bootstrap) 支持率, 其中, *DxCO1* 与小麦的 *Hdl*-like 蛋白 (GI: 36789817) 的关系最近, 并得到了强烈的支持 (98%)。小麦的 *Hdl*-like 蛋白在短日照条件下对其开花时间有促进作用<sup>[8]</sup>。

图 3 推测的 *DxCO1* 蛋白质序列与 GenBank 中种子植物 *CO*-like 基因蛋白质序列的系统发育关系分析

物种缩写后面的数字为其蛋白质序列在 GenBank 中的编号 (GI), 分支上方数值代表大于 75% 的靴带值。Pp: 海岸松 (*Pinus pinaster* Aiton); Gm: 大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.); Ps: 豌豆 (*Pisum sativum* L.); Pa: 挪威云杉 (*Picea abies* (L.) H. Karst.); Cc: 中国辣椒 (*Capsicum chinense* Jacq.); Zm: 玉米; OsJG: 水稻; Fp: 草甸羊茅 (*Festuca pratensis* Huds.); Lp: 黑麦草; Dx: 版纳龙竹; Ta: 小麦; Mv: 维吉尼亚玉兰; Pd: 美洲黑杨 (*Populus deltoids* Marsh); In: 大叶牵牛 (*Ipomoea nil* (L.) Roth); Cr: 红叶藜 (*Chenopodium rubrum* L.); Le: 番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.); Sta: 马铃薯 (*Solanum tuberosum* subsp. *andigena* L.); At: 拟南芥; Bn: 油菜 (*Brassica napus* L.); Sa: 白芥 (*Sinapis alba* L.); Hvv: 大麦; Rs: 萝卜 (*Raphanus sativus* L.); Mi: 芒果 (*Mangifera indica* L.)。

### 3 讨论

从营养生长转变到生殖生长 (成花转变) 是植物生长发育中一个非常重要的事件, 受复杂的基因

调控网络所控制。*CO* 基因是植物光周期促进开花途径中一个重要的成花转变调控基因, 它是连接生理钟和花分生组织决定基因的桥梁<sup>[7]</sup>。目前, 国内外对多个物种中的 *CO* 同源基因进行克隆, 研究表

明: 这些物种中的 *CO* 同源基因具有保守的 B-box 型锌指结构与核定位区域 (CCT 结构域), 具有调控植物开花时间的功能, 但是不同植物中的 *CO* 同源基因作用机理存在一定差异<sup>[5, 8, 23-24]</sup>。长期以来, 对竹子奇特的开花习性的研究多集中于形态学观测和生理学实验手段<sup>[13-14, 16]</sup>, 而以分子生物学技术手段从基因表达和调控水平研究竹子成花分子机理还少见报道<sup>[15, 17]</sup>。截止目前为止, 竹子 *CO* 同源基因的分离和克隆仅见于温带高山竹子草丝竹<sup>[15]</sup>。本研究首次从热带大型丛生竹版纳龙竹基因组 DNA 中分离出一个 *CO* 同源基因的片段 *DxCO1*, 核苷酸序列和氨基酸序列分析显示: 它与其它种子植物 (特别是禾本科植物) 的 *CO* 同源基因有很高的同源性, 并在预测的氨基酸序列中存在相同的 B-box 型锌指结构与 CCT 结构域, 这种序列和结构上的相似性有理由推测 *DxCO1* 确实是版纳龙竹中的一个 *CO-like* 基因, 对其开花调控有着重要作用。本文的结果对于深入探索竹子成花机理, 揭示植物开花机制多样性具有重要的意义, 同时也为下一步版纳龙竹 *CO* 同源基因全长序列克隆以及功能研究打下了良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] Impson G G, Dean C. *Arabidopsis*, the rosetta stone of flowering time [J]. *Science*, 2002, 296: 285 - 289
- [2] Mouradov A C F, Coupland G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity [J]. *Plant Cell*, 2002, Suppl: 111 - 130
- [3] Datta S, Hettiarachchi G H C M, Deng X W, et al. *Arabidopsis* *CONSTANS-LIKE3* is a positive regulator of red light signaling and root growth [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (1), 70 - 84
- [4] Miller T A, Muslin E H, Dorweiler J E. A maize *CONSTANS*-like gene, *conZ*, exhibits distinct diurnal expression patterns in varied photoperiods [J]. *Planta*, 2008, 227 (6): 1377 - 1388
- [5] Takahashi Y, Teshima K M, Yokoi S, et al. Variations in *Hdl* proteins, *HtBa* promoters, and *Ehdl* expression levels contribute to diversity of flowering time in cultivated rice [J]. *Proc Nation Acad Sci*, 2009, 106 (11): 4555 - 4560
- [6] Putterill J, Robson F, Lee K, et al. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors [J]. *Cell*, 1995, 80 (6): 847 - 857
- [7] Suarez-Lopez P, Wheatley K, Robson F, et al. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2001, 410: 1116 - 1120
- [8] Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, et al. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice [J]. *Plant J*, 2003, 36 (1): 82 - 93
- [9] Holfors A, OPseth L, Rosnes A K R, et al. Identification of *PaCOL1* and *PaCO2*, two *CONSTANS*-like genes showing decreased transcript levels preceding short day induced growth cessation in Norway spruce [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47 (2): 105 - 115
- [10] Imada R, Cabrera N, Casaretto J A, et al. *VvCO* and *VvCOL1*, two *CONSTANS* homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds [J]. *Plant Cell Rep*, 2009, 28 (8): 1193 - 1203
- [11] Hassidim M, Harir Y, Yakir E, et al. Over-expression of *CONSTANS-LIKE5* can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2009, 230 (3): 481 - 491
- [12] Kim S Y, Yu X H, Michaels S D. Regulation of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* expression in response to changing light quality [J]. *Plant Physiology*, 2008, 148 (1): 269 - 279
- [13] 辉朝茂, 杨宇明, 杜凡, 等. 云南竹亚科珍稀种质资源及其开花结实研究 [J]. *世界竹藤通讯*, 2007, 5(2): 15 - 20
- [14] 杜凡, 薛嘉榕, 杨宇明, 等. 15 年来云南竹子的开花现象及其类型的研究 [J]. *林业科学*, 2000, 36(6): 57 - 68
- [15] 田波. 竹类植物开花时间相关基因的克隆与功能分析 [D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2005
- [16] 王涇. 云南竹类开花规律研究及人工促进竹子开花的试验 [D]. 昆明: 西南林学院资源学院, 2005
- [17] 田波, 陈永燕, 严远鑫, 等. 一个竹类植物 *MADS* 区基因的克隆及其在拟南芥中的表达 [J]. *科学通报*, 2005, 50 (2): 145 - 151
- [18] Mao W, Yang H Q, Li D Z. *Dendrocalamus xishuangbannaensis* (Poaceae: Bambusoideae), a new species from Yunnan, China [J]. *Ann Bot Fennici*, 2009, 46 (6): 574 - 576
- [19] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19 (1): 11 - 15
- [20] Felsenstein, J. PHYLIP-Phylogeny Inference Package [J]. *Cladistics*, 1989, 5 (2): 164 - 166
- [21] Torok M, Elkin L D. Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins [J]. *Differentiation*, 2000, 67 (1): 63 - 71
- [22] Strayer C, Oyama T, Schultz T F, et al. Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog [J]. *Science*, 2000, 289: 768 - 771
- [23] Robson F, Costa M, Hepworth S R, et al. Functional importance of conserved domains in the flowering-time gene *CONSTANS* demonstrated by analysis of mutant alleles and transgenic plants [J]. *Plant J*, 2001, 28 (6): 619 - 631
- [24] Komeda Y. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 521 - 535