

银杏 *LEAFY* 同源基因的时空表达

郭长禄^{1,2}, 陈力耕¹, 何新华^{1,3}, 戴正¹, 袁海英¹

(1. 浙江大学农业部园艺植物生长发育与生物技术重点开放实验室, 杭州 310029; 2. 哈尔滨工业大学海洋学院, 威海 264209; 3. 广西大学农学院, 南宁 530005)

摘要:以银杏雄株、雌株成年树和还未开过花的幼树的根、茎、叶, 雌株幼果和不同时期的雄花芽、雌花芽为材料, 利用同位素标记, 制备 *Ginlfy* 和 *GinNdly* 两个特异探针, 进行 Northern 分子杂交, 研究银杏 *LFY* 同源基因 *Ginlfy*、*GinNdly* 在银杏不同器官, 花芽不同生长发育时期的时空表达情况。结果显示, 无论是幼树, 还是成年的雌株、雄株, *Ginlfy* 基因在各个器官, 如根、茎、叶、雌花芽、雄花芽、幼果以及雌花芽、雄花芽的不同发育时期都有表达, 属组成型表达, 而 *GinNdly* 基因只在叶和不同时期的雄花芽、雌花芽中表达, 其他器官都不表达, 属特异性表达。银杏双拷贝 *LFY* 同源基因中的 *GinNdly* 基因可能与开花关系更为密切。

关键词:银杏; *LEAFY* 同源基因; *Ginlfy*; *GinNdly*; 表达

中图分类号: S664.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2005)02-0241-04

Expressions of *LEAFY* Homologous Genes in Different Organs and Stages of *Ginkgo biloba*

GUO Chang-Lu^{1,2}, CHEN Li-Geng¹, HE Xin-Hua^{1,3}, DAI Zheng¹, YUAN Hai-Ying¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Growth Development and Biotechnology of Horticultural Plant, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. School of the Ocean, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China; 3. Agricultural College of Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Expressions of *Ginlfy* and *GinNdly* gene were studied by northern blotting in different organs and stages of *Ginkgo biloba*. *Ginlfy* gene was expressed in different organs such as root, stem, leaf of juvenile tree, male tree and female tree, and in different stages of male flower bud and female flower bud. It was inferred that *Ginlfy* gene could be expressed constitutionally. *GinNdly* gene was only expressed in leaf of juvenile tree, male tree and female tree and in different stages of male flower bud and female flower bud, while *GinNdly* gene was not expressed in the other organs. Therefore it was thought that *GinNdly* gene could be expressed differentially and be a close relation to development of flower.

Key words: *Ginkgo biloba*; *LEAFY* homologous gene; *Ginlfy*; *GinNdly*; expression

银杏是目前世界上珍稀裸子植物之一, 是著名的“活化石”。现仅存一科一属一种, 在植物学上具有重要的科学研究价值。银杏是雌雄异株植物, 童期长, 被称为“公孙树”, 实生苗定植后一般需要 20

~30 d 才能开花结实, 分出雌雄。研究缩短童期, 提早开花结果途径具有重要意义。*LEAFY* (*LFY*) 基因是植物的花分生组织特征基因, 是植物的一个开花开关^[1]。带有 35S 启动子的 *LFY* 基因导入拟南

收稿日期: 2004-03-18; 修回日期: 2005-01-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 30070634) 资助 [Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30070634)]

作者简介: 郭长禄 (1974—), 男, 黑龙江鹤岗人, 博士, 研究方向: 分子生物学与基因工程。E-mail: guochanglu@163.com

通讯作者: 陈力耕 (1943—), 男, 浙江省平湖人, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物分子生物学。Tel: 0571-86971390, E-mail: lgchen@zju.edu.cn

芥,使其在体内过量表达能够促进提早开花^[2],这在杨树和柑橘中也得到同样的结果^[3,4]。每种作物都存在 *LFY* 同源基因,现已分离克隆的 *LFY* 基因,除拟南芥 *LFY* 基因外,还有金鱼草 *FLO*^[5]、烟草 *NFL*^[6]、花椰菜 *BOFH*^[7]、水稻 *RFL*^[8],而且大部分花芽中表达最强。裸子植物体内存在双拷贝的 *LFY* 同源基因,并大致可分为两类:类 *LFY* 与类 *NEEDLY*。*Ginlfy* 和 *GinNcly* 基因是我们从银杏雄株中克隆出来的双拷贝 *LFY* 同源基因^[9,10]。为明确其功能,我们首先对其在银杏植株各器官的时空表达模式进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

试材采自于浙江大学果园。包括银杏雄株、雌株成年树、未开过花幼树的根、茎、叶;雌株的幼果以及4月20日、25日、30日采集的银杏雌花芽、雄花芽。采集的样本立即投入液氮中速冻,并于-70℃冰箱中保存备用。

1.2 总 RNA 的提取

利用本实验室改良 CTAB 法^[11]提取银杏不同器官以及不同采收期的雌花芽、雄花芽总 RNA。

1.3 探针制备和 Northern 杂交

根据已克隆出来的银杏 *Ginlfy*、*GinNcly* 基因的序列,分别设计不带内含子引物 1:上游 5'-ATG-GATCCAGAACTTTTCCTGC-3',下游 5'-TTCCT-GAGAGAGTGTGTCCAACG-3';引物 2:上游:5'-ATGGATGCAGAAGATTTTGG-3',下游 5'-ATGTA-ACGCCAACCCAGAGTG-3'。从银杏雄株基因组中克隆到 480 bp 和 442 bp 的两个片断,经测序表明分别为银杏 *Ginlfy*、*GinNcly* 基因片段,将此片段用

Qiagen 公司的凝胶快速纯化试剂盒 (QIAquick Gel Extraction Kit) 纯化后用于标记探针。

将银杏不同器官、不同时期雌花芽、雄花芽的总 RNA,按 Sambrook 等^[12]的方法用 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶分离,然后转移到尼龙膜上。预杂交体系为:0.25 mol/L NaH₂PO₄ (pH7.2),7% SDS,EDTA 1 mmol/L,1% BAS,65℃ 预杂交 10 h,探针标记时取 *Ginlfy* 基因片段约 25 μg (2.5 μL),用 TaKaRa 公司的随机引物 DNA 标记试剂盒标记探针,预杂交完成后,加入已标记好的带有 α-³²P-dCTP 标记探针,杂交 12 h 后洗膜。洗膜条件:2 × SSC 和 0.1% SDS 65℃ 15 min,2 次;1 × SSC 和 0.1% SDS 65℃ 30 min;0.5 × SSC 和 0.1% SDS 65℃ 30 min。洗后的膜在 -80℃ 下,用 X 光片 (Kodak BioMax MS system) 曝光 3 d,并用 Agfa (Curix 60) X 光片自动洗片机洗片。获得杂交结果,然后把杂交后的尼龙膜用 0.1% SDS,0.1% SSC 煮沸漂洗 20 min,洗脱探针,洗好的尼龙膜用于 *GinNcly* 基因探针的杂交,*GinNcly* 基因探针标记和 Northern 杂交方法同上。

2 结果与分析

2.1 银杏不同器官、不同时期雄花芽、雌花芽 *Ginlfy* 基因的表达

由 *Ginlfy* 基因在银杏不同器官的 Northern 杂交结果 (图 1) 来看,无论是雌雄株的根、茎、叶,还是雌花芽、雄花芽、幼果,*Ginlfy* 基因都能表达。而且我们实验结果也显示,*Ginlfy* 基因也在幼树的根、茎、叶中表达。

不同时期银杏雄花芽、雌花芽 *Ginlfy* 基因的 Northern 杂交结果表明,*Ginlfy* 基因在银杏雄花芽、雌花芽发育的不同时期都有很强的表达 (图 2)。

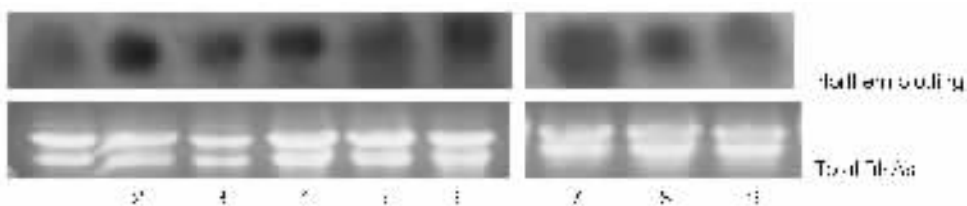


图 1 银杏不同器官 *Ginlfy* 基因的 Northern 杂交结果

1~3:分别为雄株成年树的根、茎、叶;4~6:分别为雌株成年树的根、茎、叶;7:雄花芽;8:雌花芽;9:幼果。

Fig. 1 Northern blotting analysis of *Ginlfy* in different organs

1~3: Root, stem, leaf of male tree; 4~6: Root, stem, leaf of female tree; 7: Male flower bud; 8: Female flower bud; 9: Immature fruit.

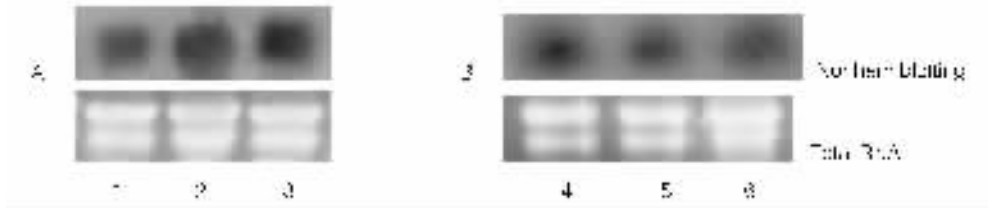


图2 不同时期银杏雄花芽(A)、雌花芽(B) *Gindfy* 基因的 Northern 杂交结果

1~3: 分别为银杏雄花芽采样日期: 4月20日, 25日, 30日; 4~6: 分别为银杏雌花芽采样日期: 4月20日, 25日, 30日。

Fig.2 Northern blotting analysis of *Gindfy* in male flower bud (A) and female flower bud (B) in different stages

1~3: picked days of male flower bud; 4~6: picked days of female flower bud.

2.2 银杏不同器官、不同时期雄花芽、雌花芽 *GinNdy* 基因的表达情况

由银杏不同器官 *GinNdy* 基因的 Northern 杂交结果可以看出, 无论雌株还是雄株, 都是叶中表达而根、茎中不表达; 在雄花芽、雌花芽中都很强的表达, 而幼果中不表达(图3), 说明 *GinNdy* 基因的表达与银杏叶和花的发育有很大关系。此外, 我们实验

结果也显示, 幼树根、茎、叶中, *GinNdy* 基因也只有叶中表达, 而茎、根中都不表达。这进一步表明 *GinNdy* 基因的功能可能与叶和花的发育有一定的关系。

由不同发育时期的银杏雄花芽、雌花芽 *GinNdy* 基因的 Northern 杂交结果(图4)来看, 不同发育时期银杏雄花芽、雌花芽 *GinNdy* 基因都有强烈表达。

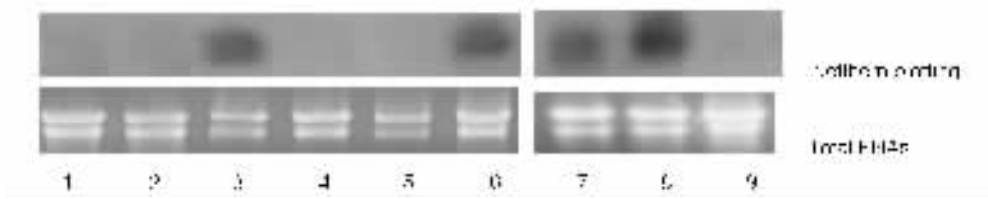


图3 银杏不同器官 *GinNdy* 基因的 Northern 杂交结果

1~3: 分别为雄株成年树的根、茎、叶; 4~6: 分别为雌株成年树的根、茎、叶; 7: 雄花芽; 8: 雌花芽; 9: 幼果。

Fig.3 Northern blotting analysis of *GinNdy* in different organs

1~3: Root, stem, leaf of male tree; 4~6: Root, stem, leaf of female tree; 7: Male flower bud; 8: Female flower bud; 9: Immature fruit.

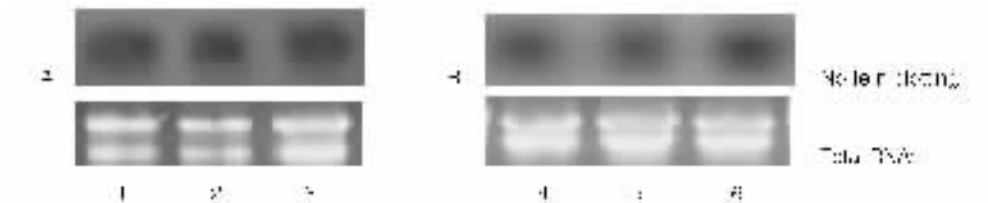


图4 银杏雄花芽(A)、雌花芽(B)不同时期 *GinNdy* 基因的 Northern 杂交结果

1~3: 分别为银杏雄花芽采样日期: 4月20日, 25日, 30日; 4~6: 分别为银杏雌花芽采样日期: 4月20日, 25日, 30日。

Fig.4 Northern blotting analysis of *GinNdy* in male flower bud (A) and female flower bud (B) in different stages

1~3: picked days of male flower bud; 4~6: picked days of female flower bud.

3 讨论

植物生长周期包括两个最基本的形式—营养生长和生殖生长。开花作为生殖生长的开始, 对植物的繁殖与演化具有极其重要的意义。LFY 基因是

一个促进营养分生组织向花分生组织转变的花分生组织特征基因。Michael 认为, 在裸子植物到被子植物的进化过程中, 丢掉了 *LFY* 基因, 因而被子植物的 *LFY* 同源基因是单拷贝的^[13]。银杏双拷贝的 *LFY* 同源基因 *Ginlfy* 和 *GinNdy* 在生长发育中起

不同的作用。Northern 分子杂交结果显示, *GinNdly* 基因除了花芽中表达外, 还在幼树和成年的雌株、雄株叶片中表达, 而其他器官都不表达, 说明 *GinNdly* 基因属于特异性表达, 可能与银杏叶和花的发育都有关系。 *Ginlfy* 基因在银杏幼树、成年的雌株、雄株的根、茎、叶和雌花芽、雄花芽、幼果等器官中表达, 可能 *Ginlfy* 基因在银杏整个生长发育过程中都起作用, 属于组成型表达。裸子植物辐射松 *LFY* 同源基因 *PRFLL* 基因在幼树和结果树的营养芽中均表达, 在雄球果中能表达, 而在雌球果中不表达^[14]; 而另一个 *LFY* 同源基因 *NEEDLY*^[15] 在针叶叶原基、花粉母细胞、小孢子叶叶原基和鳞片原基中表达, 银杏 *LFY* 同源基因与辐射松 *PRFLL* 和 *NEEDLY*、拟南芥 *LFY*、金鱼草 *FLO* 等功能虽然有所不同, 但 *GinNdly* 基因除叶中表达外, 在花芽中表达强烈, 表现出明显的相似性, 这些表达上的异同可能与不同物种有关, 是长期进化的结果; 但这是否是银杏童期特别长的原因, 有待于进一步研究。最近报道苹果^[16] 和裸子植物一样也有两个 *LFY* 同源基因 *AFL1* 和 *AFL2*, *AFL1* 只在果台枝顶芽中表达, 而 *AFL2* 在萼片、子房、根、茎、叶、以及果台枝顶芽中都有表达, 这与银杏 *LFY* 同源基因的表达很相近。而银杏 *GinNdly* 基因在叶中也有表达, 这可能是 *GinNdly* 基因与银杏自身的进化有关, *GinNdly* 基因很有可能在漫长的进化发育过程中同时具有了影响叶和花发育双重作用。不同植物 *LFY* 同源基因的表达差异也许是造成不同植物开花早晚的原因。

参 考 文 献 (References):

- [1] Schultz E A, Haughn G W. *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1991, 3: 771~781.
- [2] Weigel D, Alvarez J, Smyth D R, Yanotsky M F, Meyerowitz E M. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 1992, 69: 843~859.
- [3] Weigel D, Nilsson O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*, 1995, 377: 495~500.
- [4] Peña L, Martín-Trillo M, Juárez J, Pina J, Navarro L, Martínez-Zapater J. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA 1* genes in citrus reduces their generation time. *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19(3): 263~267
- [5] Coen E S, Romero J M, Doyle S, Elliott R, Murphy G, Carpenter R. *Floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell*, 1990, 63: 1311~1322.
- [6] Kelly A J, Bonlander M B, Meeks-Wagner D R. *NFL*, the tobacco homolog of *FLO-RICAULA* and *LEAFY*, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristem. *Plant Cell*, 1995, 7: 225~234.
- [7] Anthony R G, James P E, Jordan B R. Cloning and sequence analysis of a *flo/lfy* homologue isolated from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*). *Plant Mol Biol*, 1993, 22: 1163~1166.
- [8] Kyojuka J, Konishi S, Nemoto K, Izawa T, Shimamoto K. Down-regulation of *RFL*, the *FLO/LFY* homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 1979~1982.
- [9] ZHANG Jian-Ye, CHEN Li-Geng, HU Xi-Qin, HE Xin-Hua. *LEAFY* homologous gene cloned in maidenhair tree (*Ginkgo Biloba* L.). *Scientia Silvae Sinicae*, 2002, 38(3): 167~170.
张建业, 陈力耕, 胡西琴, 何新华. 银杏 *LEAFY* 同源基因的分离与克隆. 林业科学, 2002, 38(3): 167~170.
- [10] ZHANG Jian-Ye, CHEN Li-Geng, HU Xi-Qin, HE Xin-Hua. *GinNdly* gene cloned from the male gametophyte of *Ginkgo biloba*. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2002, 24(3): 189~191.
张建业, 陈力耕, 胡西琴, 何新华. 银杏雄株 *GinNdly* 全长基因的分离与克隆. 细胞生物学杂志, 2002, 24(3): 189~191.
- [11] GUO Chang-Lu. Studies on establishment of regeneration system, expression of *LEAFY* gene and genetic transformation in *Ginkgo biloba*. Hangzhou: dissertation for the degree of Doctor in Zhejiang University, 2004.
郭长禄. 银杏再生体系建立和 *LEAFY* 基因表达、转化的研究. 杭州: 浙江大学博士研究生论文, 2004.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Clone: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [13] Michael W Frohlich, David S Parker. The mostly male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils. *Systematic botany*. 2000, 25(2): 155~170.
- [14] Mellerowicz E J, Horgan K, Walden A, Coker A, Walter C. *PRFLL*-a *Pinus radiata* homologue of *FLORICAULA* and *LEAFY* is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia. *PLANTA*, 1998, 206(4): 619~629.
- [15] Mouradov A, Glassick T, Murphy B, Foeler S, Majla, Teasdale D. *NEEDLY*, a *Pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (11): 6537~6542.
- [16] CAO Qiu-Fen, Wada Masato, MENG Yu-Ping, HUANG Jing, SUN Yi, WANG Guo-Ping. Cloning and expression analysis of *LEAFY* homologous genes from apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(3): 267~271.
曹秋芬, 和田雅人, 孟玉平, 黄静, 孙毅, 王果萍. 苹果 *LEAFY* 同源基因的 cDNA 克隆与表达分析. 园艺学报, 2003, 30(3): 267~271.