

高羊茅春化基因*FeVRN2*的克隆及其在非生物胁迫下的表达

陈莹, 陈锡, 蔡一鸣, 吴佳海, 杨义成, 王小利*

贵州省草业研究所, 贵阳550006

摘要: *VRN2*基因是受春化作用负调控的开花抑制子。为揭示非生物胁迫下高羊茅(*Festuca elata*)春化基因*VRN2*的分子调控机制, 本研究以高羊茅为实验材料, 采用cDNA末端快速扩增技术, 克隆得到*VRN2*基因全长cDNA序列, 命名为*FeVRN2*。*FeVRN2*基因cDNA全长为1 219 bp, 具有一个完整的长度为657 bp的开放阅读框, 编码蛋白质产物长度为218个氨基酸, 并包含一个CCT保守结构域。同源性分析表明*FeVRN2*与禾本科植物圆锥小麦(*Triticum turgidum*)、节节麦(*Aegilops tauschii*)、山羊草(*Aegilops speltoides*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、大麦(*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*)的亲缘关系非常近。荧光定量PCR结果显示: *FeVRN2*基因在高羊茅叶片中的表达受高温、干旱与高盐胁迫特异诱导, 说明该基因参与了高羊茅对高温、干旱与高盐胁迫的适应性调控。

关键词: 高羊茅; *FeVRN2*基因; 克隆; 非生物胁迫

开花是植物发育的核心过程, 这一过程包含花器官的发生和发育, 以及在外界环境条件作用下内部信号的产生、传递、相互作用等。开花时机对生殖生长的成功至关重要, 并受内在因子和环境因子的共同调节。通过研究发现存在至少6条调控开花时间的信号途径, 即光周期途径、春化途径、温敏途径、自主途径、赤霉素途径与成花抑制途径(Diallo等2012; Distelfeld等2009; Andeden等2011)。这6条途径彼此独立又相互交织, 最终形成一个复杂的调控网络对植物的开花时间进行精密的调节。春化途径是调节植物成花诱导的重要因素, 植物必须经历一段时间的持续低温才能由营养生长阶段转入生殖生长阶段, 即为春化作用, 通过调控春化作用途径可以控制植物的开花时间, 解决植物的开花育种等方面的问题。

春化途径中一些关键的基因相互作用构成植物开花的多基因调控网络(Cockram等2007; Trevisaskis等2007; 陈锡等2017)。近年来, 人们从春化需求的小麦(*Triticum aestivum*)中分离出*VRN1*与*VRN2*基因, 研究发现*VRN1*位于*VRN2*的上游, 对冬小麦的开花起促进作用(Yan等2003, 2004)。Yan等(2003, 2004)将小麦的*VRN2*基因定位在5A染色体上, *VRN2*基因位点中含有两个紧密相连、序列相似性为76%的ZCCT基因, 均包含一个锌指结构域与CCT功能域, 是受春化作用负调控的显性开花抑制子。*VRN2*通过直接或间接的方式抑制*VRN1*, 春化处理后, *VRN2*表达量减少, *VRN1*转录逐渐增加,

最终启动植物开花(Corbesier等2007; Distelfeld等2009; Zhang等2008; Simada 2009)。春化途径中的调控基因在冬季阻止植物开花发育, 为温度敏感的花器官免受冬季寒冷提供保护(Kamran等2014)。*VRN1*和*VRN2*是小麦、大麦(*Hordeum vulgare*)和其他温带禾谷类植物春化途径中的主要基因, *VRN1*基因对春季生长习性是显性的, *VRN2*基因对冬季生长习性是显性的, 这两个基因具有很强的上位相互作用, 相似的遗传图谱定位分析表明春化基因是同源源的(Dubcovsky等1998)。高羊茅(*Festuca elata*)与小麦中春化调控基因*VRN1*、*VRN2*亲缘关系非常近, 其中*VRN1*与拟南芥中的分生组织基因*APETALA1 (API)*很相似, 具有启动拟南芥营养生长向生殖生长转变的作用, 但拟南芥与高羊茅中的*VRN1*与*VRN2*并不相同, 拟南芥中的*VRN1*与*VRN2*能保持*FLC*基因处在抑制状态(Gendall等2001; Levy等2002; 杨葵等2003)。本文将用*VRN1*和*VRN2*定位禾谷类作物的基因。

高羊茅是禾本科多年生植物, 作为我国主要的草坪草与饲用牧草, 具有很强的抗逆性, 能够耐寒、耐贫瘠, 抗病能力强, 在水土保持、城市绿化、草坪建植等方面发挥着巨大的作用。然而有关高羊茅中非生物胁迫调控的分子生物学研究比

收稿 2017-12-22 修定 2018-04-25

资助 国家自然科学基金(31360576)和贵州省科学技术厅-贵州省农业科学院科学技术联合基金(黔科合LH字[2014]7699)。

* 通讯作者(wangxiaolizhenyuan@126.com)。

较少, 目前发现高羊茅中的MAPK基因可能参与了高羊茅对干旱、高盐与低温胁迫的调控。SRP与14-3-3基因家族基因均能够应答低氮、高盐、干旱、高温等胁迫。FeVRN2基因是受春化作用负调控的开花抑制子, 但是本文通过荧光定量PCR发现, FeVRN2对高温、干旱与高盐胁迫都有较明显的响应, 表明该基因可能参与了高羊茅对高温、干旱与高盐胁迫的抗性调节。为进一步了解高羊茅开花与抗逆的分子调控机制, 本研究在转录组学测序获得的高羊茅基因序列片段的基础上, 利用cDNA末端快速扩增(RACE)的方法从高羊茅中扩增出其开花基因FeVRN2, 旨在进一步利用分子生物学手段抑制高羊茅开花, 延长其营养生长期, 为培育晚花的牧草新种质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验采用的‘黔草1号’高羊茅(*Festuca elata* Keng ex E. Alexeev)是由贵州省草业研究所于2005年育成的国家牧草新品种(登记号: 299)。

1.2 材料的处理

选取200粒饱满的高羊茅种子用50°C温水浸泡过夜, 加入75%酒精浸泡50 s进行表面消毒, 用无菌水冲洗3次, 再用体积分数2% NaClO浸泡消毒5 min, 用无菌水冲洗3次, 在培养皿底铺垫灭菌滤纸, 加入无菌蒸馏水, 然后将消毒好的种子点播在滤纸上, 放入光照培养箱中23°C培养7 d促其发芽, 在培养期间滤纸保持湿润。萌发后转入装有Hoagland营养液的水培装置中培养, 植株培养条件为光照16 h、黑暗8 h, 生长温度23°C (Yue等2014); 每3

d更换一次营养液, 取样后用液氮速冻, 保存在-80°C冰箱中待用。

1.3 RNA提取

采用TaKaRa RNAsiso Reagent试剂盒提取样品RNA, 具体实验步骤参考试剂盒说明书。利用琼脂糖凝胶电泳及分光光度计检测RNA质量及浓度。合成cDNA前将提取的RNA用DNase处理除去DNA污染, 用1 μ L DNase处理RNA, RNA的反转录用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒提取, 每个样品取5 μ L RNA反转录成cDNA。

1.4 FeVRN2基因克隆

参考高羊茅‘黔草1号’转录组测序结果中FeVRN2相关基因片段, 利用软件DNAMAN在保守区域设计基因的PCR扩增特异引物(表1)。反应体系为50 μ L, 包括cDNA 1 μ L、上下游引物(10 μ mol·L⁻¹)各2 μ L、2 \times PCR Buffer for KOD FX Neo 25 μ L、脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP; 2 mmol·L⁻¹) 10 μ L、KOD FX Neo (1 U· μ L⁻¹) 1 μ L, 双蒸水(double-distilled water, ddH₂O) 9 μ L。PCR反应程序为: 98°C预变性5 min; 98°C变性10 s, 60°C退火30 s, 68°C延伸2 min, 共30个循环; 68°C延伸5 min。PCR产物进行1.8%琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下观察, 迅速切下目的条带。用胶回收试剂盒(Omega)回收目的片段, 送上海生物工程公司测序。采用Invitrogen公司的5'RACE试剂盒与Clontech公司的3'RACE试剂盒扩增获得FeVRN2基因的5'端与3'端, PCR产物回收后经T载体克隆与测序, 使用DNAMAN软件与已知序列进行拼接, 在序列拼接完成后对拼接的准确性进行验证。

表1 高羊茅FeVRN2基因克隆及荧光定量PCR的引物序列

Table 1 Primers used to clone and fluorescence quantitative PCR of FeVRN2 gene

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
FV1	ACGTCCCCACGCTGTG	5'末端快速扩增
FV2	TGGTACTCGAGCAGCGGA	
FV3	TGGTGGCGGCACATCATCAACGG	3'末端快速扩增
FV4	ATAGGGAGAAGAGGAAGAAGCGGATG	
FV-fwd1	ATGTCCATGKCATGYGGTTTGTGC	中间片段PCR扩增
FV-rev1	AAGCRGCCRTTGACCCGTGG	
UBI-fwd1	CACCTCGATCACCCACCTCT	UBI内参引物
UBI-rev1	AGGGTCTCCGATAACCTCCA	
FV-fwd2	GGCACACTCACTAACACCGTTG	荧光定量PCR引物
FV-rev2	TTCTTCCTCTCTCCCTATACCTCA	

1.5 实时荧光定量PCR检测

应用荧光定量PCR技术检测高温、干旱与高盐逆境胁迫下高羊茅叶片中*FeVRN2*基因的表达量, 采用TaKaRa RNAiso Reagent试剂盒提取样品RNA, 利用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒反转录合成cDNA, 将合成的cDNA稀释20倍作为荧光定量PCR的模板。用BLAST程序设计荧光定量PCR引物(表1), 反应体系含20 μ L, 包括上下游引物各1 μ L、模板cDNA 2 μ L、2 \times SYBR *Pre-mix Ex Taq* 10 μ L、ddH₂O 6 μ L, 置于荧光定量PCR仪上进行反应, PCR体系为: 95 $^{\circ}$ C预变性3 min; 94 $^{\circ}$ C变性10 s, 60 $^{\circ}$ C退火10 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 45个循环, 每个样品3个重复, 内参基因为*Ubiquitin (UBI)*(表1)。

1.6 生物信息学分析

在NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行BLAST搜索比对其他植物相似性高的氨基酸序列, 分析编码蛋白功能域, 使用MEGA 6.0软件进行氨基酸序列同源性分析并构建*FeVRN2*的系统进化树; 在ExPASy网站(<http://www.expasy.ch/tools/proscale.html>)上分析*FeVRN2*的分子质量、等电点及疏水性; 在SOPMA网站(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)上预测蛋白的基本性质、二级结构。

2 实验结果

2.1 高羊茅*FeVRN2*基因的克隆与核酸序列分析

本研究以高羊茅cDNA为模板, 经转录组学拼接的序列设计特异引物, 扩增得到*FeVRN2*核心序

列长度为561 bp的条带(图1-A), 胶回收测序后得到高羊茅*FeVRN2*基因的保守片段。以此序列为基础, 经RACE分别获得了5'端531 bp和3'端412 bp的cDNA片段(图1-B和C)。利用DNAMAN软件将以上3段序列进行拼接, 得到*FeVRN2*基因全长cDNA序列, 其总长度为1 219 bp, DNAMAN结果显示, 该基因包含341 bp的5'端非编码区、221 bp的3'端非编码区与657 bp的开放阅读框, 共编码218个氨基酸(图2)。

2.2 高羊茅*FeVRN2*基因编码蛋白的生物信息学分析

通过在线软件ExPASy预测*FeVRN2*基因编码的蛋白质分子质量为24.21 kDa, 理论等电点为9.48, 不稳定系数为61.87。生物信息学预测*FeVRN2*定位于细胞核。对其进行疏水性分析, 发现*FeVRN2*基因疏水性最大值为1.76, 最小值为-3.87, 为亲水蛋白(图3)。利用SOPMA软件预测*FeVRN2*蛋白二级结构, 结果显示: *FeVRN2*蛋白结构域主要由 α 螺旋(22.02%)、延伸链(24.31%)、 β 转角(10.55%)、无规则卷曲(43.12%)组成。

2.3 高羊茅*FeVRN2*蛋白的保守结构域分析

在NCBI网站进行BLAST分析发现高羊茅*FeVRN2*属于CCT蛋白家族, 保守结构域功能分析发现*FeVRN2*具有典型的CCT蛋白结构域, 并发现该蛋白与圆锥小麦(*T. turgidum*)、山羊草(*Aegilops speltoides*)、二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)、黑麦(*Secale cereale*)、节节麦(*A. tauschii*)、大麦(*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*)等植物中的CCT同源蛋白具有很高的相似性(图4)。

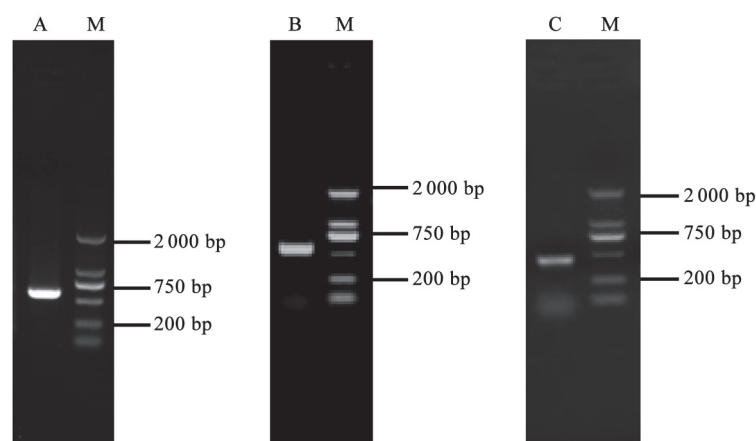


图1 *FeVRN2*基因的RACE扩增

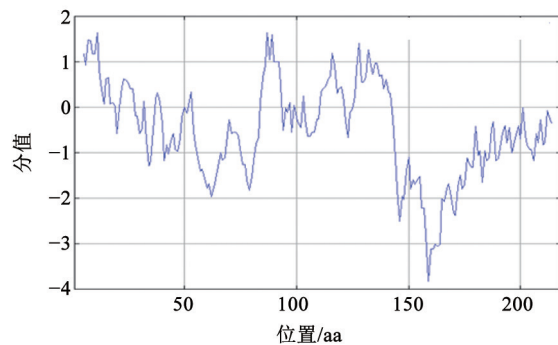
Fig.1 RACE of *FeVRN2* gene

A: cDNA荧光定量PCR; B: 5'RACE; C: 3'RACE; M: DL2000 marker.

```

ACGTCCAACCTTGCCCCCTGTTTCTCTCCGGCTCTGGGCTACTCAGATCAGCTCATGAG      1
ATATACAGGGCCGGAGGACCGGCGTCCGCGACATGGCGTGCAGCCTCCGTACCTTC      60
TCCGCTCGGGAGGGGGCGCGTCCAGCGCCAGGTGGTGTTCCTTTGGCGTTCAGGAGGC     120
GCAGTTGCAGTTGCTCCTCCACTCCCTAAACCCCTCTCCCGAGCTCCTCCTCACTCCCT     180
AAACTTCTCTCCCAGCTCCTCCTCCACACACCAGAAACAAGAAACAATCACTT      240
GACCTCAATTCCTAGCTAGGCTAGCTACTCTCGATCGTCCATGTCCATGTCCATGTCGCGGG     300
                                     M S M S C G
TGTGCGGCGGCGTAGCCAAGTGCCTGCACTACCACATCATCGACCATGCCCCCATGTTCC     360
V C G G V A N C L H Y H I I D H A P M F
CTGTTCTTTCGTACGAGCCTCCGCTGCTCGAGTACCAGTTCTTCGGAACGGCCAAGGCC     420
P V L R H E P P L L E Y Q F F G N G Q G
ACAGCGTGGGAACGTGGCTCCCACCGCGGGGACCACCACAACGTCCAGAACACCAGTC     480
H S V G T W L P P P A D H H N V Q N T S
CGCCGTGACGTTTCATGGCCTGCAGTACCACCGCATGGACACCAAGCAACAGCAGCTG     540
P P S T F H G L Q Y P P H G H Q A T A A
GGTGATCAGTTCCAGGTTCGACGCGCGGACCGACTCATGCCACCGGCCACACCACCGG     600
G L I T F Q V D A G S R L M P P A T P P
CCACACCACCGCATGCCATTATGTGGGGCACACTCACTAACACCGTTGGAAGAG     660
A T P P T A M P L C G G T L T N T V G R
AGGTGATAATGGCTATCAATGGAGACATGATGATGGTGGCGGCACATCATCCAACGGCGC     720
E V I M A I N G D M M M V A A H H P T A
ACGAGAGACGTGCAAAGGTGATGAGGTATAGGGAGAAGAGGAAGAAGCGGATGATGAGA     780
H E R R A K V M R Y R E K R K K R M Y E
AGCAGATCCGATACGAGTCCAGAAAAGCTTACGCCAGTTGAGGCCCGGGTCAAAGGCC     840
K Q I R Y E S R K A Y A Q L R P R V K G
GCTTCGCAAGGTGCATGAAGAAGCCCTGTGCCATCGTACCACCCCATCGATCTATG     900
R F A K V H E E A P V P S S P P P S I Y
ATCCAGTAAATTAGACCTTGGATGGTTCATCCGTAACATGTGATACAAGCTACATACA     960
D P S K L D L G W F H P *
TATTTTATAGCTTATCCTCAATGAATAGTGTTCATGAGTTCACCCGAAGTGTATGATTAA   1020
AACAGGCATCTCGATGGTATGTGTTAACTAAAATGGGTATTTTGGAGCATGGATACCTG   1080
AATTAGTGTATTTATATTGTAATAAAGCTCATTGGTATTTTTTCAAAAAAAAAAAAAA   1140
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                                             1200

```

图2 *FeVRN2*基因核苷酸及推导的氨基酸序列Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *FeVRN2* gene图3 *FeVRN2*蛋白疏水性分析Fig.3 Predicted hydrophobicity for *FeVRN2* protein

2.4 系统进化分析

通过MEGA软件对*FeVRN2*基因编码的氨基酸序列与GenBank收录的14种植物的同源序列

对比, 构建系统进化树(图5)。初步的系统进化分析结果显示: 高羊茅*FeVRN2*与禾本科植物圆锥小麦(AAS60252.1)、黑麦(ADR51709.1)、节节麦(ACI-00358.1)、山羊草(ACI00357.1)、大麦(ABF50039.1) CCT的进化关系非常近, 氨基酸同源性很高; 与二穗短柄草(XP003571193.1)的氨基酸同源性次之; 与玉米(*Zea mays*; AGW42770.1)、高粱(*Sorghum bicolor*; AGO03832.1)、小米(*Setaria italica*; KQK-86275.1)、哈氏黍(*Panicum hallii*; PAN36883.1)、野生稻(*Oryza australiensis*; AER41567.1)、油棕(*Elaeis guineensis*; XP010933637.1)、海枣(*Phoenix dactylifera*; XP008796123.1)的氨基酸同源性比较远。

2.5 非生物胁迫下高羊茅*FeVRN2*基因表达特性的分析

采用荧光定量PCR技术分析高羊茅*FeVRN2*

<i>Festuca elata</i>	MFLCGGTLTNTVGREVIMAINGDMMVAAHHPHTAHERRAK	152
<i>Triticum turgidum</i>	VFFCGAFTSTISNATIMTIDTEMMVGAHNLTMQEREA	148
<i>Aegilops speltoides</i>	VFFREGAFTSTISNATIMTIDTEMMVGAHNPTMQEREA	147
<i>Brachypodium distachyon</i>	MPFGGTFGDIMGREAIMAVDGMVAAHHPHTMHEREAK	139
<i>Secale cereale</i>	VFFCGAFTSTISNATIMTIDTEMMVWAAHNPTRQEREA	146
<i>Aegilops tauschii</i>	VFFCGAFTSTISNATIRTIDTEMMVGAHNPTMQEREA	149
<i>Hordeum vulgare</i>	VFFCESAFTSTISNATIMTIDTEMMVGAHNPTMQEREA	152
<i>Festuca elata</i>	VMRYREKRKRMYEKQIRYESRKAYAQLRPRVKGRFAKVH	192
<i>Triticum turgidum</i>	VMRYREKRKRRCYDKQIRYESRKAYAELRPRVNGRFVKVP	188
<i>Aegilops speltoides</i>	VMRYREKRKRRCYDKQIRYESRKAYAKLRPRVNGRFVKVP	187
<i>Brachypodium distachyon</i>	VMRYREKRRRRYDKQIRYESRKAYAEMRPRVKGRFAKVP	179
<i>Secale cereale</i>	VMRYREKRKRRCYDKQIRYESRKAYAELRPRVNGRFVKVP	186
<i>Aegilops tauschii</i>	VMRYREKRKRRCYDKQIRYESRKAYAELRPRVNGRFVKVP	186
<i>Hordeum vulgare</i>	VMRYREKRKRRCYDKQIRYESRKAYAELRPRVNGRFVKVP	186
<i>Festuca elata</i>	EAAFVFSFPFSIYDFSKLDLGFH	217
<i>Triticum turgidum</i>	EAAASS. FPASFYDFSKLHLGF	211
<i>Aegilops speltoides</i>	EAAVSFS. FPASFYDFSKLNLGLF	210
<i>Brachypodium distachyon</i>	GSAAPFSPFSGSYDFSKLDLGF	203
<i>Secale cereale</i>	ETA	189
<i>Aegilops tauschii</i>	EATASFS. FPTSFYDFSKLHLGF	212
<i>Hordeum vulgare</i>	EAVVSFS. FPTSFDHDFSKLHLGF	215

图4 高羊茅*FeVRN2*蛋白与其他植物*VRN2*蛋白氨基酸序列比对

Fig.4 Comparison of deduced amino sequence of *FeVRN2* with *VRN2s* in other species
图中物种名从上到下依次为高羊茅、圆锥小麦、山羊草、二穗短柄草、黑麦、节节麦、大麦。

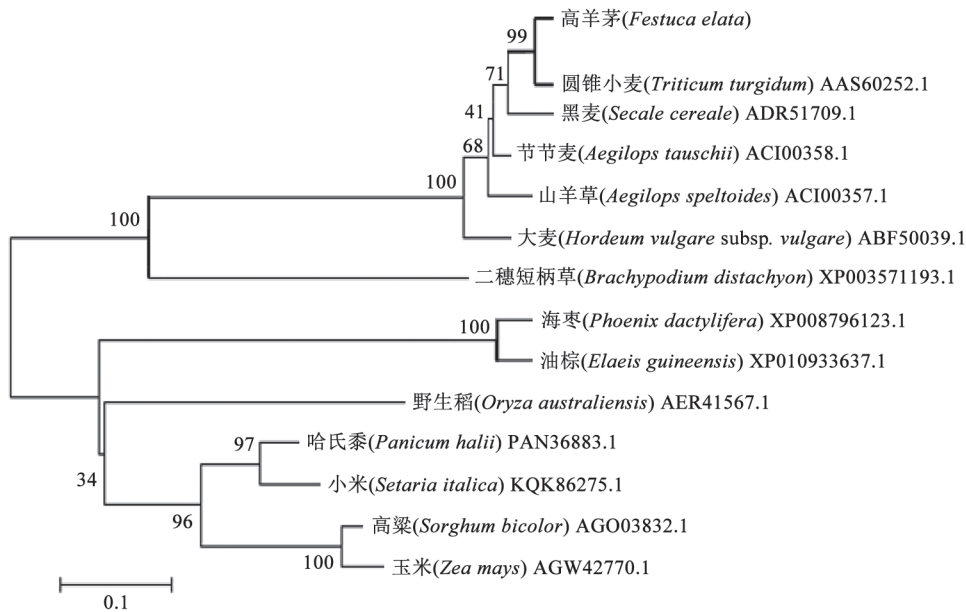


图5 *FeVRN2*与其他植物CCT家族基因同源性分析

Fig.5 Homology analysis of *FeVRN2* and CCT family genes from other plants

基因在非生物胁迫下的表达水平, 结果表明(图6): 在高温胁迫下, *FeVRN2*基因在胁迫2 h后受到诱导(图6-A), 表达量上调, 高温处理6 h后表达量达到最高; 在干旱胁迫下, *FeVRN2*基因的表达量呈现先升后降的趋势, 在胁迫处理1 h后达到峰值, 表达量上调了3倍多, 之后回复到正常水平; 盐胁迫处理后, *FeVRN2*基因被快速诱导, 在胁迫0.5 h后迅速上调, 之后缓慢下降。总之, *FeVRN2*基因在高温、干旱、盐胁迫下都有响应, 表达量上调明显。

3 讨论

*VRN2*是广泛存在于植物中的一类重要功能蛋白, 关于该基因在春化作用途径中调控植物开花的功能已有较多的报道, *VRN1*与*VRN2*基因在春化作用途径中协作调控植物开花的模式一直是研究的热点(Kane等2007)。Dubcovsky等(2006)提出小麦*VRN2*基因作为开花抑制因子, 春化前抑制*VRN1*基因, 其表达水平受春化作用影响而下调, 进而诱导*VRN1*基因的表达, 促进小麦开花。自然突变或碱基删除导致*VRN2*基因功能缺失, 都会产生春小麦系列, 不需要春化就开花。通过RNA干扰技术降低*VRN2*基因的RNA水平, 能使冬小麦提前开花一个多月。而*VRN2*基因的过量表达将延长植物的营养生长阶段, 抑制植物进入生殖生长(Trevaskis等2006; Greenup等2009)。本研究从高羊茅基因组中克隆出春化基因*FeVRN2*, 并对其氨基酸序列进行了分析。序列比对结果表明高羊茅*FeVRN2*与禾本科植物圆锥小麦、黑麦、节节麦、山羊草、大麦CCT蛋白的进化关系非常近, 在进化树分析中高羊茅*FeVRN2*与禾本科植物的*VRN2*聚在一起, 这可能是因为高羊茅同为禾本科的植物, 与其他同科植物的家族成员具有共同的保守区, 而在其他科属中存在着分化。

*VRN2*基因是受春化作用负调控的开花抑制子, 这一点已经被很多人证实, 但是关于*VRN2*基因在植物非生物胁迫下抗性调控方面却没有相关研究。本实验荧光定量PCR表明高羊茅*FeVRN2*基因在高温、干旱、盐胁迫下都有响应, 表达量上调明显, 这可能是因为*FeVRN2*基因的表达量上调抑制高羊茅开花, 促进其营养生长, 从而保护高羊茅花器官免受逆境胁迫的伤害。下一步将通过遗传

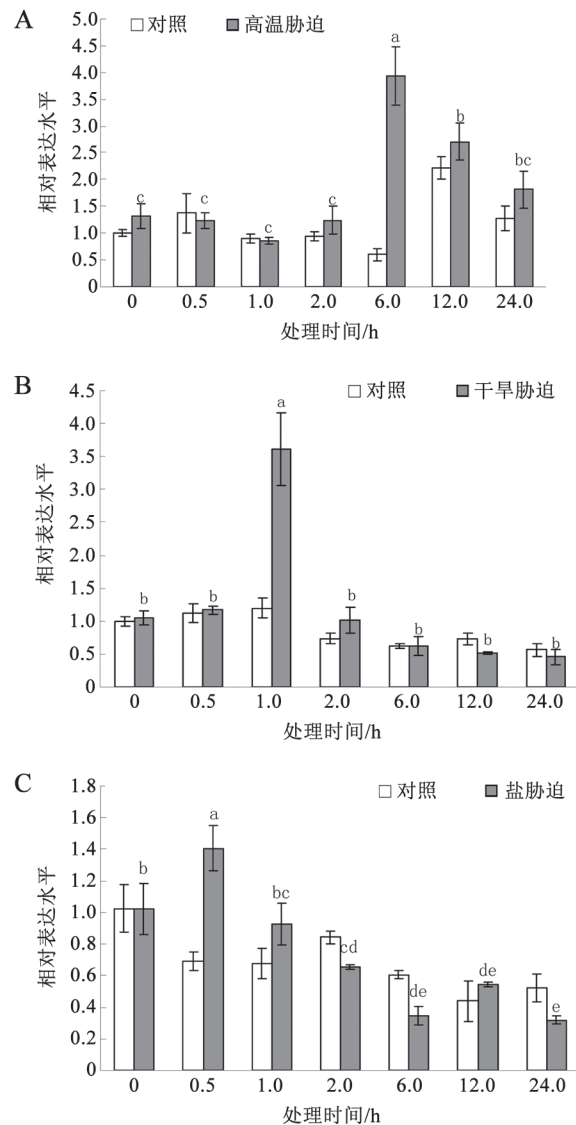


图6 非生物胁迫下*FeVRN2*基因在高羊茅中的转录水平
Fig.6 Relative transcript levels of *FeVRN2* gene in tall fescue under abiotic stresses

不同小写字母标识表示数据间差异显著($P < 0.05$)。

转化将*FeVRN2*基因转入拟南芥与二穗短柄草中, 对该基因在开花机制与逆境胁迫中的适应功能进行深入研究。

高羊茅对复杂生态条件有很强适应能力, 这完全依赖于自身的遗传系统对高羊茅的精细调控。近几年随着对开花机制与抗逆基因的研究, 更多功能基因被鉴定和发现。本团队相继克隆了高羊茅春化相关基因*VRN1*和*VRN2*, 我们将进一步应用反向遗传学探索春化基因对植物的开花与抗

逆的调控机制, 并通过基因的过量表达和RNA干扰研究高羊茅的发育特性的变化情况, 从而实现高羊茅种质的定向人为改良, 为培育高羊茅新品种提供基础理论和优良的基因资源。

参考文献(References)

- Andeden EE, Yediay FE, Baloch FS, et al (2011). Distribution of vernalization and photoperiod genes (*Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3*, *Ppd-D1*) in Turkish bread wheat cultivars and landraces. *Cereal Res Commun*, 39: 352–364
- Chen X, Zhao DG, Chen Y, et al (2017). Cloning and expression analysis of *FaFT2* gene in tall fescue. *Plant Physiol J*, 53 (8) :1523–1531 (in Chinese with English abstract) [陈锡, 赵德刚, 陈莹等(2017). 高羊茅*FaFT2*基因克隆及表达分析. *植物生理学报*, 53 (8): 1523–1531]
- Cockram J, Jones H, Leigh F, et al (2007). Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication and sustainable productivity. *J Exp Bot*, 58 (6): 1231–1244
- Corbesier L, Vincent C, Jang S, et al (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 316: 1030–1033
- Diallo AO, Ali-Benali MA, Badawi M, et al (2012). Expression of vernalization responsive genes in wheat is associated with histone H3 trimethylation. *Mol Genet Genomics*, 287: 575–590
- Distelfeld A, Li C, Dubcovsky J (2009). Regulation of flowering in temperate cereals. *Curr Opin Plant Biol*, 12: 178–184
- Distelfeld A, Tranquilli G., Li C, et al (2009). Genetic and molecular characterization of the *VRN2* loci in tetraploid wheat. *Plant Physiol*, 149: 245–257
- Dubcovsky J, Lijavetzky D, Appendino L, et al (1998). Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theor Appl Genet*, 97: 968–975
- Dubcovsky J, Loukoianov A, Fu D, et al (2006). Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2*. *Plant Mol Biol*, 60 (4): 469–480
- Gendall AR, Levy YY, Wilson A, et al (2001). The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell*, 107 (4): 525–535
- Greenup A, Peacock WJ, Dennis ES, et al (2009). The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals. *Ann Bot*, 103 (8): 1165–1172
- Kamran A, Iqbal M, Spaner D (2014). Flowering time in wheat (*Triticum aestivum* L.): a key factor for global adaptability. *Euphytica*, 197: 1–26
- Kane NA, Agharbaoui Z, Diallo AO, et al (2007). *TaVRT2* represses transcription of the wheat vernalization gene *TaVRN1*. *Plant J*, 51: 670–680
- Levy YY, Mesnage S, Mylne JS, et al (2002). Multiple roles of *Arabidopsis VRN1* in vernalization and flowering time control. *Science*, 297: 243–246
- Trevaskis B, Hemming MN, Dennis ES, et al (2007). The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals. *Trends Plant Sci*, 12 (8): 352–357
- Trevaskis B, Hemming MN, Peacock WJ, et al (2006). *HvVRN2* responds to daylength, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status. *Plant Physiol*, 140: 1397–1405
- Yan L, Fu D, Li C, et al (2006). The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 19581–19586
- Yan L, Loukoianov A, Blechl A (2004). The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*, 303: 1640–1644
- Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, et al (2003). Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 6263–6268
- Yang Y, Xu BY, Jin ZQ (2003). Cloning and analysis of vernalization-related gene *VRN2* in *Arabidopsis thaliana* L. *Chin J Trop Crops*, 24 (2): 46–50 (in Chinese with English abstract) [杨葵, 徐碧玉, 金志强(2003). 拟南芥春化基因*VRN2*的克隆及相关分析. *热带作物学报*, 24 (2): 46–50]
- Yu E, Fan C, Yang Q, et al (2014). Identification of heat responsive genes in *Brassica napus* Siliques at the seed-filling stage through transcriptional profiling. *PLoS ONE*, 9 (7): e101914
- Zhang XK, Xiao YG, Zhang Y (2008). Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit. *Crop Sci*, 48: 458–470

Cloning and expression analysis of vernalization gene *FeVRN2* in tall fescue under abiotic stress conditions

CHEN Ying, CHEN Xi, CAI Yi-Ming, WU Jia-Hai, YANG Yi-Chen, WANG Xiao-Li*

Guizhou Institute of Prataculture, Guiyang 550006, China

Abstract: *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. To explore the molecular mechanism of *VRN2* gene in tall fescue (*Festuca elata*) under abiotic stress, with mRNA from leaves of tall fescue as the template, *VRN2* was cloned through rapid amplification of cDNA ends technique from the leaves of tall fescue and designated as *F. elata VRN2* (*FeVRN2*). The whole sequence of *FeVRN2* is 1 219 bp, with a 657 bp open reading frame (ORF), encoding a polypeptide of 218 amino acids. Domain analysis reveals that proteins encoded by *VRN2* contain conserved domains (CCT). Phylogenetic analysis showed that *FeVRN2* is closely related to other Gramineae plants such as *Triticum turgidum*, *Aegilops tauschii*, *A. speltoides*, *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*. Fluorescence quantitative PCR results showed that expressions of *FeVRN2* genes in tall fescue were distinctly induced under heat, drought and salt stresses, suggesting that *FeVRN2* participates in heat, drought and salt stresses regulation in tall fescue.

Key words: tall fescue; *FeVRN2* gene; cloning; abiotic stress

Received 2017-12-22 Accepted 2018-04-25

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31360576), and Guizhou Natural Science Foundation (LH[2014]7699).

*Corresponding author (wangxiaolizhenyuan@126.com).