

# 胚乳自主发生型龙须草 *FIE* 基因部分 cDNA 序列克隆和分析

旷乐<sup>1</sup>, 胡春根<sup>2</sup>, 姚家玲<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学园艺林学院, 武汉 430070)

**摘要:** 根据拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)等物种的*FIE*序列的保守区域设计简并引物, 以龙须草(*Eulaliopsis binata*)的花序为材料, 抽提 RNA, 用 RT-PCR 的方法扩增到 800 bp 左右的片断, 将其克隆到 pGEM-T 载体上并测序。结果表明该片断与已报道的玉米、高粱(*Sorghum halepense*)和水稻等*FIE*同源基因具有较高的相似性, 为龙须草*FIE*基因特异片断。

**关键词:** *FIE*; 无融合生殖; 基因克隆

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)06-0631-05

## Cloning and Analyzing of Partial cDNA Sequences of *FIE* in Autonomous Endosperm Type *Eulaliopsis binata*

KUANG Le<sup>1</sup>, HU Chun-Gen<sup>2</sup>, YAO Jia-Ling<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. College of Horticultural and Forest, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** RNA was extracted from inflorescence of *Eulaliopsis binata* and used as template for cloning by RT-PCR with degenerate primers which were designed according to the *FIE* homologous sequences of *Arabidopsis*, rice and maize. As a result, one about 800 bp fragment was obtained and then cloned and sequenced. Analysis with partial cDNA sequence and deduced amino acid sequence suggested that the fragment was similar to the reported *FIE* homologous genes of maize, sorghum and rice. The partial cDNA is a part of *FIE* gene in *Eulaliopsis binata*.

**Key words:** *FIE*; Apomixis; Gene clone

双受精是被子植物所特有的生殖方式, 授粉后, 一个精子与卵细胞融合形成受精卵(合子)进而发育为胚, 而另一个精子与中央细胞融合形成受精极核并发育为胚乳。胚乳的发生、发育直接关系到禾谷类种子籽实的饱满程度。

无融合生殖避开了双受精的有性生殖途径, 使被子植物不经雌雄配子的融合也能形成种胚。其胚乳的发生具有两种类型: 假受精类型和自主发生类型。假受精类型, 即极核或次生核需要受精才能发育形成胚乳; 自主发生类型, 即极核或次生核不经受精自主分裂形成胚乳<sup>[1]</sup>。前者在无融合生殖物种中占绝大多数, 只有少数几个无融合生殖植物, 如蒲公英属的二倍体孢子生殖种类(*Taraxacum officinaria*)<sup>[1]</sup>、山柳菊属(*Hieracium*)<sup>[2]</sup>, 以及雌雄异株植物(*Commiphora wightii*)<sup>[3]</sup>等, 其胚乳为自主发生类型。

胚乳作为胚发育和种子萌发营养的主要来源, 是植物体的重要组织, 而胚乳发生发育机理的阐明对于提高禾谷类作物的结实率和籽实饱满程度也具有重要意义。Ohad 等先后报道从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分离了系列 *fis* 基因、*fis1/mea*、*fis2*、*fis3/FIE*, 它们都与胚乳的发育相关<sup>[4,5]</sup>。其中 *FIE*(fertilization independent endosperm) 基因能编码产生具有 WD40 motif 的 polycomb 蛋白质。这类蛋白质可同时与多种多肽(特别是 MEA 编码的具有 SET domain 的蛋白质多肽)结合, 形成稳定的复合物, 在受精前抑制雌配子体中央细胞核复制基因的转录<sup>[4]</sup>。Ohad 称, *FIE* 可能通过与控制细胞周期元件 pRb 的互作, 从而抑制中央细胞核复制所需基因的表达, 影响胚乳的发育<sup>[6]</sup>。近年来, 人们又从水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、高粱(*Sorghum*

收稿日期: 2007-05-08, 修回日期: 2007-09-11。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30670127)。

作者简介: 旷乐(1981-), 男, 植物学硕士, 主要从事分子生物学研究。

\* 通讯作者(E-mail: yaojlmy@mail.hzau.edu.cn)。

*halepense*) 等禾谷类作物和非禾谷类作物(如桉树 *Eucalyptus* spp.) 以及动物中分离到胚乳自主发生相关突变型基因 *FIE*, 且同源性较高。

龙须草为禾本科拟金茅属多年生草本植物<sup>[7]</sup>, 本课题组经多年研究发现, 龙须草的无融合生殖为无孢子生殖, 对龙须草不同居群自然结实种子的流式细胞检测发现, 有 2C:4C 胚和胚乳的相对 C 值比的胚乳自发产生类型, 结合胚胎学、细胞学和遗传学研究证明, 龙须草中存在胚乳自主发生型无融合生殖<sup>[8]</sup>。

本研究以龙须草胚乳自主发生的生物型为材料, 分离胚乳自主发生基因 *FIE*, 以进一步研究其胚乳发生发育的分子机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

本试验所用的胚乳自发类型龙须草(*Eulaliopsis binata*)株系为本课题组收集和保存的星子居群红秆型龙须草, 种植编号为星子 T3。2005 年 5 月 20 日取开花前和开花后的花序。

Trizol 试剂盒(Invitrogen)、*Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa Japan)和 dNTPs(AMresco 分装)。pGEM-T 载体购自 Promega 公司, X-gal 和 IPTG 购自 Sigma 公司。其它试剂如培养基的各种成分等均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 *EbFIE* 部分序列的分离方法

用于 RNA 提取、逆转录溶液均用 0.1% 的 DEPC 处理水配制; 所用玻璃器皿经 180℃ 烘烤 8 h, 塑料制品均用 0.1% DEPC 浸泡过夜、高压灭菌并烘干后备用。操作过程应尽量避免 RNase 污染。

### 1.2.1 RNA 提取和 RT-PCR

采用 Trizol 试剂盒提取开花前和开花后花序的 RNA(操作参照试剂盒说明书)。取 2 μg 总 RNA, 用反转录试剂盒(Amersham biosciences)合成 1st-strand cDNA。根据拟南芥、玉米、水稻等 *FIE* 基因序列的保守区域设计简并引物。上游引物 P1: 5'-GGIAGCAAGGATGAATCT-3'; 下游引物 P2: 5'-AAGIATIGCTTCCITC-3'。引物由 Invitrogen 公司合成, 其中 I 表示次黄嘌呤。RT-PCR 反应体系为 20 μL, 其中 10 × buffer 2 μL, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1 μL, dNTPs 1 μL, *Taq* 酶 0.2 μL (1 U), cDNA 模板 0.5 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 13.3 μL。

PCR 扩增程序为: 94℃ 变性 5 min, 94℃ 40 s, 40℃ 40 s, 72℃ 50 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。取 5 μL PCR 产物电泳检测, 其余 -20℃ 保存备用。胶回收试剂盒(上海生工)纯化 PCR 产物, 电泳检测。

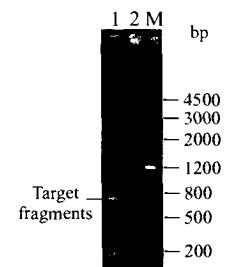
### 1.2.2 TA 克隆和测序、分析

纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接, 转化大肠杆菌, 在含 IPTG、X-gal、Amp 的 LB 平板上筛选阳性克隆。随机挑取白斑单菌落提取质粒酶切鉴定并测序。将所测序列在 NCBI 上通过 Blastn 和 Blastp 进行序列相似性分析, 最后用 DNASTAR 和 GENEDOC 软件进行序列的比较分析。

## 2 研究结果

### 2.1 RNA 提取及 *EbFIE* cDNA 部分序列扩增

以开花后花序分离得到总 RNA, 通过 RT-PCR 的方法扩增到 800 bp 左右的 cDNA 片断。电泳结果见图 1。胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。



1. Pre-flowering; 2. Post-flowering; M. DNA marker

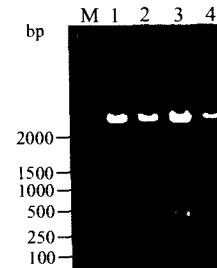
图 1 RT-PCR 电泳图  
Fig. 1 RT-PCR electrophoresis

### 2.2 *EbFIE* 部分 cDNA 克隆与测序

将通过 PCR 反应扩增的龙须草 *FIE* 基因特异性条带连接到 pGEM-T 载体上, 并转化到大肠杆菌中。经过蓝白筛选, 选取 3 个白斑和 1 个蓝斑, 分别提取质粒 DNA。

因为 pGEM-T 载体两端含有 *Pst* I (CTGCA<sub>▲</sub>G/G<sub>▲</sub>ACGTC) 和 *Nco* I (C<sub>▲</sub>CATGG/GGTAC<sub>▲</sub>C) 酶切位点, 所以对质粒 DNA 进行酶切鉴定。酶切电泳见图 2。图 2 中, 1、2、3 道为白斑所提质粒的酶切条带, 4 道为蓝斑对照质粒的酶切条带, 可见 T 载体中有外源片段的插入, 该片段大小为 250~500 bp。

从图 3 可以看出 *EbFIE1* 中存在 *Pst* I (CTGCA<sub>▲</sub>G/G<sub>▲</sub>ACGTC) 和 *Nco* I (C<sub>▲</sub>CATGG/GGTAC<sub>▲</sub>C) 酶切



1~3: Positive clone; 4: Negative clone; M: DNA marker

图 2 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of enzyme restriction

位点,所以酶切检测电泳条带位于 250~500 bp 之间,而非我们预料当中的 800 bp 左右。

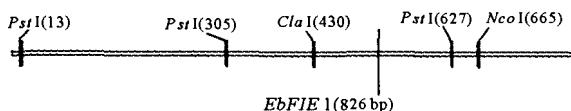


图 3 EbFIE1 酶切位点示意图  
Fig. 3 The site of enzyme restriction in EbFIE1

以 P1 和 P2 为引物,质粒 DNA 为模板进行 PCR 反应,扩增到长度为 500~800 bp 的片断(见图 4)。说明目的片断 EbFIE1 已连接 T 载体。

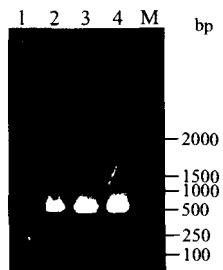


图 4 PCR 鉴定  
Fig. 4 Identification by PCR

由 ABI3730 DNA Analyzer 进行测序,结果见图 5。特异性片段长度为 826 bp,命名为 EbFIE1。

### 2.3 EbFIE1 与部分植物 FIE 基因同源比对和进化分析

#### 2.3.1 EbFIE1 核苷酸序列同源性分析

将本实验所得序列通过同源搜索(Blastn)与其他物种的 FIE 序列进行同源比较。结果表明,龙须草 EbFIE1 与禾本科植物玉米、水稻、小麦 FIE 基因同源性分别达 95%、87%、84%,同源性都在 80% 以上,同时 GENEDOC 上做出 cDNA 序列比对图(图 6)都说明在禾本科中 FIE 的保守性较高,进化过程中核苷酸差异不大。

#### 2.3.2 EbFIE1 氨基酸序列同源性分析

经 DNASTAR 软件将 EbFIE1 序列翻译成氨基酸(大小为 275 个氨基酸)后与 GenBank 上登陆的玉米 FIE1(AAO61682)、玉米 FIE2(AAO61684)、水稻(AAS13489)、高粱(AAS82596)、拟南芥(AAD23584)、桉树(AAN85568)、梓树(AAN85567)的 FIE 进行同源性比对(Blastp)和聚类分析(进化树)。

同源性比对结果(图 7)表明龙须草 EbFIE1 片断的氨基酸与玉米、水稻、高粱、拟南芥、桉树、梓树的同源性分别为 95%、88%、94%、72%、84%、80%。

从进化树(图 8)来看,无融合生殖龙须草的 EbFIE1 依次与高粱、玉米和水稻的亲缘关系较近。同时 Blastp 比对分析发现 EbFIE1 也含有 FIE 基因的特征保守区域 WD40 motif。在 GENEDOC 上采用 Clustal W 的方法比对(图 7)可直观看出氨基酸序列十分保守。同源性分析表明本实验得到的 EbFIE1 片断是无融合生殖龙须草胚乳发育相关的 FIE 候选基因片断。

### 3 讨论

通过同源序列克隆法,我们从龙须草中成功分离了 FIE 基因的同源序列 EbFIE1,它与禾谷类作物水稻、小麦、玉米 FIE2、FIE1 同源性在 80% 以上,氨基酸序列的同源性与水稻、高粱、玉米 FIE1 的同源性也在 85% 以上,聚类分析表明 EbFIE1 与高粱、玉米和水稻的亲缘关系更为接近,表明该片断为龙须草 FIE 基因特异片断,也说明 FIE 基因在禾本科植物中的高度保守性。

Luo 等认为, FIE 基因会阻止胚乳的自发形成,使极核或次生核必须在受精后才能发育形成胚乳;而 FIE 突变体的胚乳则可自发形成<sup>[9]</sup>。Ohad 等认为拟南芥突变体 fie 等位基因相对于野生型 FIE 来说是隐性的,表明 FIE 在受精前抑制胚乳发育;终止突变使 FIE 的抑制作用丧失,从而不经受精作用胚乳可以自主发育<sup>[4]</sup>。Danilevskaya 等对玉米 FIE 表达模式的分析表明, FIE 是一个印记基因,与胚乳发育有关<sup>[10]</sup>。Rojek 等通过野生型拟南芥的未授粉胚珠离体培养试验,认为胚乳自主发育与印记作用相关,只有在母本基因组去甲基化和 FIE 功能缺失的条件下才能启动胚乳发育<sup>[11]</sup>。Koltunow 的研究小组从山柳菊(Hieracium paniculatum)中分离了 FIE 同源序列 HFIE,并发现无融合生殖山柳菊中的 HFIE 与有性生殖类型中的同源序列只有 3 个氨基酸的差异,但这微小的差异足以使胚乳自发形成<sup>[12]</sup>。我们以水稻 FIE 部分序列制备 cRNA 探针,利用原位杂交技术检测到无融合生殖龙须草生殖发

```

1 GGTGGACCTG CAGGGGGCGG CACTACTGAT TCCGACCAAG GATGAATCTG TTAGGCTATG GAATGTCAT ACAGGGATCT GTATCTTGAT
91 ATTTGCTGGA GCTGGAGGTC ATCCGAATGA ACTGTTGAGT GTTGACTTCC ACCCTACTGA TATGAAACGT TTGCAAGTT GTGCCATCGGA
181 CAACACTGTC AAAATCTCT CGATGAAACA ATTTGCTTA TATGTTGACAA ATTCACATATC ATCCACTGAC CTTCATCAA AGTTTCCAAC
271 AAAATATGTC CAGTTCCCG TCTTGTTGC TCCAGTACAC TCTAATGATG TTGATGTCAC AAATGCGCTT GGTGACCTCA TCCATATCAA
361 CAGCTTGAC AATGAAATTG TCCCTTGGGA ACCAAAAACA AAAGAACAGA GTCCCTGGGG GGGAAACATC GATATTCTTC AAAAGTACCC
451 TGTCTCCAGAA TGTGACATCT GGCTCATTTAA ATTTGATGT GATTTCACT TCAACTGAGT GGCCTACCC AAATGTCAG GAAAATAT
541 CGTGTGGGAA TGTACAGTCGA GGCCTCTGT CCTAATGCT CGGCTGTATA ATCCAAATG CAAATGCGCA ATAAGGCGAA ACTGCACTGCT
631 CCTTCGACCG AAGCACCATC CTTAATCCCG CGGCCATGGC CGGCCGAGC ATCCGACGTC GGCCCCAAATG CGGCCATATAG TGACTGCTT
721 TACAATTCA C TGGCCGTCGT TTTAACACGT CGTGACTGGG AAAACCTGG CGTAAACCAA CTTAATCGCC TTGAGCACA TCCCCCTTC
811 GCCAGCTGCC GTAATA

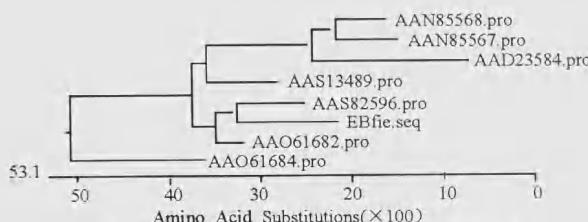
```

图 5 测序结果  
Fig. 5 Result of sequence

		740	760	780	
<i>EbFIE 1</i>		GGCAATTCAATAATGAGATAAGAACTCAACCTTGAAAGCTTGGCTCATCATTTCTGCAA			35
AY195849		GGCAATTCAATAATGAGATAAGAACTCAACCTTGAAAGCTTGGCTCATCATTTCTGCAA			460
AY195850		GGCAATTCAATAATGAGATAAGAACTCAACCTTGAAAGCTTGGCTCATCATTTCTGCAA			777
AY456262		GGCAATTCAATAATGAGATAAGAACTCAACCTTGAAAGCTTGGCTCATCATTTCTGCAA			454
BT009081		GGCAATTCAATAATGAGATAAGAACTCAACCTTGAAAGCTTGGCTCATCATTTCTGCAA			396
		800	820	840	
<i>EbFIE 1</i>		GCAGGATGAATCTGTTAGGCTATGGAATGTCATACAGGGATCTGATCTTGTATATTG			85
AY195849		GCAGGATGAATCTGTTAGGCTATGGAATGTCATACAGGGATCTGATCTTGTATATTG			520
AY195850		GCAGGATGAATCTGTTAGGCTATGGAATGTCATACAGGGATCTGATCTTGTATATTG			637
AY456262		GCAGGATGAATCTGTTAGGCTATGGAATGTCATACAGGGATCTGATCTTGTATATTG			514
BT009081		GCAGGATGAATCTGTTAGGCTATGGAATGTCATACAGGGATCTGATCTTGTATATTG			456
		860	880	900	
<i>EbFIE 1</i>		CTGGAGCTGGAGGTATCGCAATGAAGTCTTGTACTTCCACCCCTAGTGATATTG			155
AY195849		CTGGAGCTGGAGGTATCGCAATGAAGTCTTGTACTTCCACCCCTAGTGATATTG			580
AY195850		CTGGAGCTGGAGGTATCGCAATGAAGTCTTGTACTTCCACCCCTAGTGATATTG			897
AY456262		CTGGAGCTGGAGGTATCGCAATGAAGTCTTGTACTTCCACCCCTAGTGATATTG			574
BT009081		CTGGAGCTGGAGGTATCGCAATGAAGTCTTGTACTTCCACCCCTAGTGATATTG			516
		920	940	960	
<i>EbFIE 1</i>		AACGTTTGCAGTGTGGATGGACAAACACTGTGAAAGCTGGGCAATGAAGAAATT			215
AY195849		AACGTTTGCAGTGTGGATGGACAAACACTGTGAAAGCTGGGCAATGAAGAAATT			640
AY195850		AACGTTTGCAGTGTGGATGGACAAACACTGTGAAAGCTGGGCAATGAAGAAATT			957
AY456262		AACGTTTGCAGTGTGGATGGACAAACACTGTGAAAGCTGGGCAATGAAGAAATT			634
BT009081		AACGTTTGCAGTGTGGATGGACAAACACTGTGAAAGCTGGGCAATGAAGAAATT			526
		980	1000	1020	
<i>EbFIE 1</i>		GGCTATATGTTGAAAAATCATATTGACTGAACTTGCCATTGAAACAAAT			275
AY195849		GGCTATATGTTGAAAAATCATATTGACTGAACTTGCCATTGAAACAAAT			700
AY195850		GGCTATATGTTGAAAAATCATATTGACTGAACTTGCCATTGAAACAAAT			1017
AY456262		GGCTATATGTTGAAAAATCATATTGACTGAACTTGCCATTGAAACAAAT			694
BT009081		GGCTATATGTTGAAAAATCATATTGACTGAACTTGCCATTGAAACAAAT			636
		1040	1060	1080	
<i>EbFIE 1</i>		ATGTCAGTTCCGGCTTGGTTGCTGCGACTACACTTAACATGTTGATTTGTACAAGAT			335
AY195849		ATGTCAGTTCCGGCTTGGTTGCTGCGACTACACTTAACATGTTGATTTGTACAAGAT			760
AY195850		ATGTCAGTTCCGGCTTGGTTGCTGCGACTACACTTAACATGTTGATTTGTACAAGAT			1077
AY456262		ATGTCAGTTCCGGCTTGGTTGCTGCGACTACACTTAACATGTTGATTTGTACAAGAT			754
BT009081		ATGTCAGTTCCGGCTTGGTTGCTGCGACTACACTTAACATGTTGATTTGTACAAGAT			696
		1100	1120	1140	
<i>EbFIE 1</i>		GGCTTGGTACATCTTATCAACAGCTTGTACAAATGAAATTGTGCTTTGGGAAACCAA			395
AY195849		GGCTTGGTACATCTTATCAACAGCTTGTACAAATGAAATTGTGCTTTGGGAAACCAA			820
AY195850		GGCTTGGTACATCTTATCAACAGCTTGTACAAATGAAATTGTGCTTTGGGAAACCAA			1137
AY456262		GGCTTGGTACATCTTATCAACAGCTTGTACAAATGAAATTGTGCTTTGGGAAACCAA			814
BT009081		GGCTTGGTACATCTTATCAACAGCTTGTACAAATGAAATTGTGCTTTGGGAAACCAA			756
		1160	1180	1200	
<i>EbFIE 1</i>		AAACAAAAACACAGACTTGGGGAGGCAACCATGATATTCTTCAAACTACCCCTGTC			455
AY195849		AAACAAAAACACAGACTTGGGGAGGCAACCATGATATTCTTCAAACTACCCCTGTC			630
AY195850		AAACAAAAACACAGACTTGGGGAGGCAACCATGATATTCTTCAAACTACCCCTGTC			1197
AY456262		AAACAAAAACACAGACTTGGGGAGGCAACCATGATATTCTTCAAACTACCCCTGTC			874
BT009081		AAACAAAAACACAGACTTGGGGAGGCAACCATGATATTCTTCAAACTACCCCTGTC			816
		1220	1240	1260	
<i>EbFIE 1</i>		CAGAATGTCACATTTGTTGATTTTCACTGTCATTTTCACTTCATGTCATTTGCGCA			515
AY195849		CAGAATGTCACATTTGTTGATTTTCACTGTCATTTTCACTTCATGTCATTTGCGCA			940
AY195850		CAGAATGTCACATTTGTTGATTTTCACTGTCATTTTCACTTCATGTCATTTGCGCA			1257
AY456262		CAGAATGTCACATTTGTTGATTTTCACTGTCATTTTCACTTCATGTCATTTGCGCA			934
BT009081		CAGAATGTCACATTTGTTGATTTTCACTGTCATTTTCACTTCATGTCATTTGCGCA			876
		1280	1300	1320	
<i>EbFIE 1</i>		TAGGCAATGTTGAAAGGAAAAATATACGTTGTTGGGAAAGTACAGCTGGCCCTCTGTCTAA			575
AY195849		TAGGCAATGTTGAAAGGAAAAATATACGTTGTTGGGAAAGTACAGCTGGCCCTCTGTCTAA			1000
AY195850		TAGGCAATGTTGAAAGGAAAAATATACGTTGTTGGGAAAGTACAGCTGGCCCTCTGTCTAA			1317
AY456262		TAGGCAATGTTGAAAGGAAAAATATACGTTGTTGGGAAAGTACAGCTGGCCCTCTGTCTAA			994
BT009081		TAGGCAATGTTGAAAGGAAAAATATACGTTGTTGGGAAAGTACAGCTGGCCCTCTGTCTAA			936
		1340	1360	1380	
<i>EbFIE 1</i>		TTGCTCGGCTGTATAATCAGCAATGCAAAATGCCCAATAAAAGCAAAACTGCACTGTCTTC			635
AY195849		TTGCTCGGCTGTATAATCAGCAATGCAAAATGCCCAATAAGCAAAACTGCACTGTCTTC			1059
AY195850		TTGCTCGGCTGTATAATCAGCAATGCAAAATGCCCAATAAGCAAAACTGCACTGTCTTC			1376
AY456262		TTGCTCGGCTGTATAATCAGCAATGCAAAATGCCCAATAAGCAAAACTGCACTGTCTTC			1053
BT009081		TTGCTCGGCTGTATAATCAGCAATGCAAAATGCCCAATAAGCAAAACTGCACTGTCTTC			995
		1400	1420	1440	
<i>EbFIE 1</i>		GAGGGAAGCACATCTTATACCCGGGGCATGGCGCGCGAGCAAGGGCTGGCGG			693
AY195849		GAGGGAAGCACATCTTATACCCGGGGCATGGCGCGAGCAAGGGCTGGCGG			1119
AY195850		GAGGGAAGCACATCTTATACCCGGGGCATGGCGCGAGCAAGGGCTGGCGG			1436
AY456262		GAGGGAAGCACATCTTATACCCGGGGCATGGCGCGAGCAAGGGCTGGCGG			1113
BT009081		GAGGGAAGCACATCTTATACCCGGGGCATGGCGCGAGCAAGGGCTGGCGG			1055
		1460	1480	1500	
<i>EbFIE 1</i>		GGCAATTGTCCTATACGTTGTCAGCTTGTGAAAGGAACTGCACTGTGCGG			737
AY195849		GGCAATTGTCCTATACGTTGTCAGCTTGTGAAAGGAACTGCACTGTGCGG			1168
AY195850		GGCAATTGTCCTATACGTTGTCAGCTTGTGAAAGGAACTGCACTGTGCGG			1496
AY456262		GGCAATTGTCCTATACGTTGTCAGCTTGTGAAAGGAACTGCACTGTGCGG			1131
BT009081		GGCAATTGTCCTATACGTTGTCAGCTTGTGAAAGGAACTGCACTGTGCGG			1107
		1520	1540	1560	
<i>EbFIE 1</i>		-CGTTTACAACGCTCGTACGTTGCGGGAAACGCTGGGCTGGGAGTGAAGTG			788
AY195849		-CGTTTACAACGCTCGTACGTTGCGGGAAACGCTGGGCTGGGAGTGAAGTG			1215
AY195850		-CGTTTACAACGCTCGTACGTTGCGGGAAACGCTGGGCTGGGAGTGAAGTG			1554
AY456262		-CGTTTACAACGCTCGTACGTTGCGGGAAACGCTGGGCTGGGAGTGAAGTG			1166
BT009081		-CGTTTACAACGCTCGTACGTTGCGGGAAACGCTGGGCTGGGAGTGAAGTG			1166
		1580	1600	1620	
<i>EbFIE 1</i>		CCTGTTGAGCACATCCCTTCCCGACTGGGAAATACTGTCATTTGCTTAC			626
AY195849		CCTGTTGAGCACATCCCTTCCCGACTGGGAAATACTGTCATTTGCTTAC			1275
AY195850		CCTGTTGAGCACATCCCTTCCCGACTGGGAAATACTGTCATTTGCTTAC			1613
AY456262		CCTGTTGAGCACATCCCTTCCCGACTGGGAAATACTGTCATTTGCTTAC			1226
BT009081		CCTGTTGAGCACATCCCTTCCCGACTGGGAAATACTGTCATTTGCTTAC			1226

图 6 *EbFIE1* 与其他植物 *FIE* 基因核苷酸序列同源比对图Fig. 6 Alignment of the nucleotide sequences of *EbFIE1* and various other *FIE* genes in grass family

	*	260	*	280	*	300	
<i>EbFIE1</i>	:			LVASKDESVRLWNVHTGICILIF	:		
AA061684	:	GIIRVINCATEKLINKS1VGHGDSI	*	IRTHASKPSLIIASKDDESIRLWNVHTGICILIF	:	31	
AA061682	:	GIIRVINCATEKLAKSFVGHGDSIN	*	IRTQPLKPSLIIASKDDESIRLWNVHTGICILIF	:	230	
AA813489	:	GIIRVINCATEKLKTFVGHGDSIN	*	IRTOALKPSLIIASKDDESIRLWNVHTGICILIF	:	173	
AAS2596	:	GIIRVINCATEKLAKSFVGHGDSIN	*	IRTQPLKPSLIIASKDDESIRLWNVHTGICILIF	:	171	
AAD23584	:	GIIRVIVDNSEL	*	IRK8VGHGDSVNEIRTOPLKPLV	*	167	
AAN85568	:	GIIRVIVDNSEL	*	IRK8VGHGDSVNEIRTOPLKPLV	*	167	
AAN85567	:	GIIRVIVDNSEL	*	IRK8VGHGDSVNEIRTOPLKPLV	*	157	
		GIIRVIVDNSEL	*	IRK8VGHGDSVNEIRTOPLKPLV	*	157	
	*	280	*	300	*	320	
<i>EbFIE1</i>	:	AGAGGHRNEVLSVDFHPSDI	*	RFASCMDNTVKIWSMKEEWLYV	*	320	
AA061684	:	AGAGGHRNEVLSVDFHPSDI	*	RFASCMDNTVKIWSMKEEWLYV	*	320	
AA061682	:	AGAGGHRNEVLSVDFHPSDI	*	RFASCMDNTVKIWSMKEEWLYV	*	320	
AAS13489	:	AGAGGHRNEVLSVDFHPSDI	*	RFASCMDNTVKIWSMKEEWLYV	*	320	
AA82596	:	AGAGGHRNEVLSVDFHPSDI	*	RFASCMDNTVKIWSMKEEWLYV	*	320	
AAD23584	:	AGAGGHRNEVLSVDFHPSDI	*	RFASCMDNTVKIWSMKEEWLYV	*	320	
AAN85568	:	AGAGGHRNEVLSVDFHPSDI	*	RFASCMDNTVKIWSMKEEWLYV	*	320	
AAN85567	:	AGAGGHRNEVLSVDFHPSDI	*	RFASCMDNTVKIWSMKEEWLYV	*	320	
	*	320	*	340	*	360	
<i>EbFIE1</i>	:	YVQFPVLVAAVHSNVSNDCTRWLGDF	*	ILSKSVDNELVWEPKTEQSPGEGSIDILQKYPV	:	360	
AA061684	:	YVQFPVLVAAVHSNVSNDCTRWLGDF	*	ILSKSVDNELVWEPKTEQSPGEGSIDILQKYPV	:	360	
AA061682	:	YVQFPVLVAAVHSNVSNDCTRWLGDF	*	ILSKSVDNELVWEPKTEQSPGEGSIDILQKYPV	:	360	
AAS13489	:	YVQFPVLVAAVHSNVSNDCTRWLGDF	*	ILSKSVDNELVWEPKTEQSPGEGSIDILQKYPV	:	360	
AA82596	:	YVQFPVLVAAVHSNVSNDCTRWLGDF	*	ILSKSVDNELVWEPKTEQSPGEGSIDILQKYPV	:	360	
AAD23584	:	YVQFPVLVAAVHSNVSNDCTRWLGDF	*	ILSKSVDNELVWEPKTEQSPGEGSIDILQKYPV	:	360	
AAN85568	:	YVQFPVLVAAVHSNVSNDCTRWLGDF	*	ILSKSVDNELVWEPKTEQSPGEGSIDILQKYPV	:	360	
AAN85567	:	YVQFPVLVAAVHSNVSNDCTRWLGDF	*	ILSKSVDNELVWEPKTEQSPGEGSIDILQKYPV	:	360	
	*	360	*	380	*	400	
<i>EbFIE1</i>	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	400	
AA061684	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	400	
AA061682	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	400	
AAS13489	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	400	
AA82596	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	400	
AAD23584	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	400	
AAN85568	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	400	
AAN85567	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	400	
	*	400	*	420	*	440	
<i>EbFIE1</i>	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	440	
AA061684	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	440	
AA061682	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	440	
AAS13489	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	440	
AA82596	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	440	
AAD23584	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	440	
AAN85568	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	440	
AAN85567	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	440	
	*	440	*	460	*	480	
<i>EbFIE1</i>	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	480	
AA061684	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	480	
AA061682	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	480	
AAS13489	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	480	
AA82596	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	480	
AAD23584	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	480	
AAN85568	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	480	
AAN85567	:	PECDIWFKESCDFHFNQLAIGNREGKTYVWEVQSPPEVLIARL	*	INQCKSPIK-----	:	480	

图 7 *EbFIE1* 与其他植物 *FIE* 基因氨基酸序列同源性比对Fig. 7 Alignment of the predicted amino acid *EbFIE1* and various other *FIE* genes图 8 几种植物 *FIE* 氨基酸序列的聚类分析Fig. 8 Molecular phylogenetic trees based on the amino acid sequences of plant *FIE* using DNASTAR

育过程中 *FIE* 基因的表达情况,发现 *FIE* 基因在胚和胚乳的发育过程中直至种子成熟时期都有表达(未发表),说明 *FIE* 是控制和调节龙须草胚和胚乳发育的重要基因。

PCR 技术简单、高效、快速且易于操作,在现代分子生物学的实验中广泛使用。本次实验采用 PCR 的方法,成功克隆到无融合生殖龙须草 *FIE* 的部分 cDNA 片断,片断大小为 826 bp。引物设计上,我们参照拟南芥、玉米、水稻的 *FIE* 序列设计简并性引物,上游引物 P1: 5'-GCIAGCAAGGATGAATCT-3',下游引物 P2: 5'-AAGIATIGTGCTTCCITC-3',次黄嘌呤能与所有的碱基配对,从而可以降低引物的退火温度。*EbFIE1* 的获得为以后龙须草 *FIE* 基因全长序列和 *FIE* 基因在不同生殖类型龙须草中的表达调控奠定了一定的基础。

## 参考文献:

- Koltunow A M. Apomixis: embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules [J]. *Plant Cell*, 1993, **5**: 1425-1437.
- Koltunow A M, Ross A B, Abdul M C. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization [J]. *Plant physiol*, 1995, **108**: 1345-1352.
- Gupta P, Shivanna K R, Mohanram H Y. Apomixis and polyembryony in the guggul plant, *commiphora wightii* [J]. *Annals of Botany*, 1996, **78**: 67-72.
- Ohad N, Yadegari R, Fischer R. Mutations in *FIE*, a WD polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization [J]. *Plant Cell*, 1999, **11**: 407-415.
- Ohad N, Margossian L, Fischer R L. A Mutation that allows endosperm development without fertilization [J]. *PNAS*, 1996, **93**: 5319-5324.
- Mosquna A, Ohad N. Interaction of *FIE*, a Polycomb protein, with pRb: a possible mechanism regulating endosperm development [J]. *Mol Gen Genomics*, 2004, **271**: 651-657.
- 张莉,毛雪,李润植.种子发育相关基因的研究进展[J].植物学通报,2004,21(3):288-295.
- Yao J L. Embryological evidence of apomixis in *Eulaliopsis binata* [J]. *Acta Botanica Sinic*, 2004, **46**(1): 86-92.
- Luo M. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **96**: 296-301.
- Danilevskaya O N, Pedro H, Sabine H. Duplicated *FIE* genes in maize expression pattern and imprinting suggest distinct functions [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**: 425-436.
- Rojek J, Kuta E, Bohdanowicz J. *In vitro* culture promotes partial autonomous endosperm development in unfertilized ovules of wild-type *Arabidopsis thaliana* var. *columbia* [J]. *Sex Plant Report*, 2005, **18**: 29-36.
- Koltunow A M, Grossniklaus U. Apomixis: A developmental perspective [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, **54**: 547-574.