

植物开花基因调控及银杏童期遗传改良研究进展

陈柳吉¹, 许 锋¹, 蔡 荣¹, 程水源^{1,2*}

(1. 长江大学 园艺园林学院, 湖北 荆州 434025; 2. 黄冈师范学院 生命科学与工程学院, 湖北 黄冈 438000)

摘要: 对近几年银杏和其他植物开花基因分离克隆和童期控制研究进展进行了综述, 并对银杏童期遗传改良所存在的问题进行了分析, 以为银杏童期遗传改良提供一定的参考。

关键词: 植物; 开花基因; 调控; 银杏; 童期; 遗传改良

中图分类号: S664.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)02-0013-04

植物开花时间早晚由内源因子和外源因素共同决定。内源因子是指除了光照、温度、水分、土壤肥力、植物生长调节剂等外源因素之外, 植物开花(自主促进途径)所需的必要条件, 主要涉及调控植物开花转换的相关基因。目前在拟南芥、金鱼草、水稻(*Oryza sativa*)等植物中分离和克隆出许多开花相关基因, 如 *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*API*), *APETALA2* (*AP2*), *APETALA3* (*AP3*), *AGAMOUS* (*AG*), *WUSCHEL* (*WUS*), *EMBRYONIC FLOWER* (*EMF*), *TERMINAL FLOWER* (*TFL*), *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*)等。其中, 对 *LFY* 基因结构和功能研究的最为详细, 主要作为一个开花开关决定着花分生组织的分化。*API*, *AP2*, *AP3*, *AG* 等属于花器官特异性基因, 控制着花各部分组织的发育和形成。*EMF*, *TFL*, *FLC* 等基因在营养生长阶段表达, 抑制植物开花, 它们表达水平高低与童期长短密切相关。总之, 花发育相关基因构成一个复杂的网络共同调控植物开花^[1]。

银杏(*Ginkgo biloba*)是童期特别长的一种中生代子遗裸子植物, 一般种植 15~20 年才能开花结果, 在我国有着悠久的栽培历史, 广泛应用于园林景观、医药、食品、保健等领域。但是其较长的童期生长, 给银杏优良品种的选育带来了严重的障碍, 使其经济效益和社会价值也受到很大程度的限制。

多年来, 育种学家们借助扦插和嫁接等无性繁殖手段试图缩短银杏童期生长, 由于扦插和嫁接只是在其形态学上选择, 而没有从内源本质上进行调控, 一般嫁接后也要 8~10 年才能开花结果。近年

来, 通过基因手段对木本植物开花相关基因的遗传改造研究结果显示, 可以有效缩短木本植物的童期生长。Lemmetinen 等^[2]通过转基因和快繁选择得到白桦的早花克隆, 转入白桦中使其在不到一年时间就出现花序。Pena 等^[3]将拟南芥的 *LFY* 基因转入柑橘中, 培育出的柑橘当年开花, 果实正常发育, 种子当年播种, 次年春天就能正常开花。因此有理由相信开展银杏花发育功能基因组研究, 有利于遗传学改良银杏童期, 为银杏的分子育种、性别鉴定以及经济效益的提高奠定基础。

1 开花基因研究现状

1.1 花分生组织特异基因

LFY 是目前研究得最清楚的与开花相关的转录因子, 目前在水稻(*RFL*)^[4]、金鱼草(*FLO*)^[5]、烟草(*NFL*)^[6]、银杏(*Ginlfy* 和 *GinNdy*)^[7,8]、辐射松(*Pinus radiata*)(*PRFLL* 和 *NEEDLY*)^[9,10]、苹果(*Malus domestica*)(*AFL1* 和 *AFL2*)^[11]等多种植物中都分离到 *LFY* 同源基因。1992 年, Weigel 等^[12]从拟南芥中首次分离克隆得到 *LFY* 基因, 指出 *LFY* 是一个花分生组织特异基因, 调控植物开花时间。*LFY* 的下游直接靶基因为花器官特异基因 *API* 和 *CAL*^[13], 在植物开花的起始阶段起着重要作用, 作为一个开花转换开关, 决定花序分生组织向花分生组织的转换。

之后, 银杏中 *LFY* 同源基因也相继被克隆, Frohlich 等^[7]克隆得到银杏雌株 *LFY* 同源基因 *Ginlfy* 的全长序列, 张建业等^[8]根据雌株 *Ginlfy*

收稿日期: 2007-08-16

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0746)

作者简介: 陈柳吉(1982-), 男, 重庆人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物开花生理及分子生物学研究。

通讯作者: 程水源(1956-), 男, 湖北天门人, 教授, 博士生导师, 主要从事银杏分子及生理代谢研究。

基因序列得到银杏品种大佛手雄株 *LFY* 同源基因 *GinNdly* 全长基因序列。与被子植物不同的是, 银杏具有双拷贝的 *LFY* 同源基因, 比较它们的核苷酸序列, 同源率为 99%, 蛋白质序列同源率为 99%。进一步分析它们的时空表达水平表明: 银杏两个 *LFY* 同源基因在其生长发育过程中有着截然不同的表达方式。*GinNdly* 除了在花芽、幼树和成年的雌株、雄株叶片中表达之外, 在其他器官中均无表达, 属于组织特异性表达。而 *Ginlfy* 在银杏幼树, 成年的雌株、雄株的根茎叶以及雌花芽、雄花芽、幼果等器官中都有表达, 说明 *Ginlfy* 为组成型表达^[14]。银杏 *LFY* 同源基因的这种时空表达差异有可能是裸子植物花进化发育的一个显著特征, 在长时间的进化过程中导致 *LFY* 基因功能分化, 具有控制花和叶片发育的重要功能, 这种差异可能正是造成银杏童期长的一个重要因素。

1.2 花器官特异基因

花器官特异性基因除了 *AP2* 之外均含有重要的分子元件 *MADS*—box DNA 结合区, 称为 *MADS*—box 家族基因, 它们共同作用决定各种花器官的发育。根据花器官 ABC 模型, A 型基因主要决定花萼的发育, 如拟南芥的 *API*。近年来, 已从许多木本植物中克隆得到了 *API* 同源基因, 如苹果的 *MdMADS2*^[15], 银桦 (*Betula pendula*) 的 *Bp-MADS3*^[16]。B 型和 A 型基因共同决定花瓣的形成, 拟南芥中以 *AP3/PISTILLATA (PI)* 最为典型, 另外还有金鱼草的 *DEFICIENS (DEF)/GLOBOSA (GLO)* 和苹果的 *AP3* 同源基因 *Md-MADS13*^[13]; C 型和 B 型基因共同决定雄蕊和雌蕊的分化和形成, 如 *AG* (拟南芥), *PLENA* (金鱼草), 白杨 *AG* 同源基因 *P TAG1/2*, 在裸子植物挪威云杉 (*Picea abies*)、买麻藤 (*Gnetum gnemon*)、辐射松等都克隆得到 *AG* 同源基因。Muriel 等^[17] 在银杏基因组中分离得到 *AG* 同源基因 *GBM5* 为单拷贝, 除了在生殖器官雄蕊、胚珠以及雌配子中有表达之外, 在雌雄株的幼叶中也有表达。结合裸子植物该基因家族成员的单拷贝和被子植物中多拷贝的特征, 说明 *AG* 基因家族成员随着植物长时间的进化, 使得家族成员进化为不同功能的 *AG* 同源基因。Purugganan 等以及 Theissen 认为, 该家族成员的基因, 在被子植物和裸子植物花发育过程中的是相当保守的^[18, 19]。而在最近的研究资料中逐渐认为, 该家族基因不仅仅在花的发育过程中发挥功能, 借助遗传学和分子生物学方法检测出它们在开花起

始, 分生组织的形成, 根、胚、维管组织中均有表达, 而不受花器官的限制^[20]。Muriel 等的工作也证实了后者的观点。

1.3 抑制开花的基因

TFL 是拟南芥开花过程中控制花序分生组织分化的一个基因, 抑制花分生组织特异基因的表达。Ahannon 等通过 T—DNA 法从拟南芥中首次分离得到该基因。*tfl* 突变体表现出早花的性状, 童期生长缩短, 正常的茎尖停止生长, 提前开花, 常常出现复合花^[21]。*TFL1* 的过量表达, 导致植物的营养生长延长, 开花较晚, 有时还会出现第 2 次花序的现象^[22, 23]。在水稻和金鱼草等植物中, *TFL* 同源基因突变体具有相似的性状^[24]。大量的研究表明, 当植物开花转换启动之后, 花分生组织特异基因如 *LFY* 和 *API* 等会抑制它的表达, 而顺利完成开花。从苹果中克隆得到的 *TFL1* 的同源基因 *MdTFL* 表达模式分析结果表明, 在花诱导前两周的萼片和成熟叶片中有较强的表达。将反义 *MdTFL* 基因转入苹果, 在嫁接后 8~15 个月后就开花, 而正常的植株需要 5 年时间才能开花^[25]。柑橘 *TFL1* 同源基因 *CsTFL* 具有 2 个不同拷贝, Real-time PCR 鉴定表明, *CsTFL* 转录水平与柑橘的童期密切相关, 它的基因表达活性与开花调节基因 (如 *LFY*, *API*) 的表达存在负调控关系^[26]。

EMF 基因也是抑制植物开花的重要花序分生组织特异性基因, 调节植物花序形成和开花转换的过程。在野生型拟南芥幼苗生长过程中, *EMF* 基因表达水平很高, *API* 和 *AG* 等基因的活性被正常抑制。拟南芥 *emf* 突变体发育过程中花结减少或者形成转化的花, 提早开花。*LFY* 的组成型表达可以增强突变体性状, 表明 *EMF* 活性受到 *LFY* 基因的抑制。在 *emf* 与 *ap1*, *ap2*, *lfy1* 等的双突变体中, *emf1-2* 表现上位性特征, 这说明 *EMF* 基因控制着开花转换的过程, 抑制下游开花相关基因的表达 (如 *API*, *LFY* 等)^[27~30]。一种观点认为, *EMF* 基因活性伴随着植物发育会逐渐下降, 当降到一定水平时, *API*, *LFY* 等基因表达量增加, 从而抑制 *EMF* 基因表达活性, 直到植物花发育成熟。但是 *EMF* 基因活性并不会被完全抑制, 因为 *emf* 弱突变体的花萼减少, 与 *ap1* 和 *ap2* 突变体性状相似, 而 *emf* 强突变体中花器官受到更严重的影响, 只有雌蕊^[27], 这说明 *EMF* 在植物花器官发育过程中仍然发挥重要的作用。另一种观点认为, *EMF* 基因活性不会随着植物生长发育而下降, 甚至在花器官

组织中还能检测到很高的 RNA 水平,但是尽管如此,EMF 基因的表达并不影响 *API*, *LFY* 等基因的功能,这可能是由于 *EMF* 蛋白质形成过程中不同折叠、磷酸化修饰等作用造成的^[29]。目前在拟南芥、水稻、竹子(*Dendrocalamus latiflorus*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、白芥(*Silene latifolia*)、菠萝(*Ananas comosus*)等植物中得到了 *EMF* 的全长或部分核酸序列。

2 异位表达开花调控基因缩短银杏童期

随着植物开花功能基因组研究的逐渐深入,为遗传改良植物童期生长提供了强有力的工具。将开花相关基因转入植物可以缩短童期生长,提早开花结果。现今植物开花基因童期控制的应用主要集中在拟南芥和烟草等模式植物上^[31]。将分离克隆得到的许多木本开花调节基因(如 *LFY*-like 和 *API*-like 基因)在拟南芥和烟草中的诱导表达能明显促进开花,说明它们确实调节着植物花的发育和开花转换过程。有理由相信,将分离克隆得到的银杏开花相关基因,通过转基因手段转入拟南芥和烟草,甚至银杏中,诱导转入基因正确表达,同样具有调节童期生长的作用。因此开展银杏开花相关基因的功能基因组研究,有利于应用分子遗传手段,避免了通过嫁接、扦插等形态学手段缩短银杏童期生长。

但是由于银杏各组织含有大量的酚、类黄酮、萜类等次生代谢产物,使得银杏组织培养过程中愈伤组织容易褐变、坏死,给银杏转基因再生体系的建立带来极大的障碍^[32]。通常也只能将银杏中分离的开花基因转入拟南芥、番茄和烟草中异位表达,研究基因对开花时间的影响。因此,银杏转基因体系的建立成为银杏童期遗传改良的主要问题之一。

3 问题与展望

植物开花基因的分离克隆,为揭示植物花发育的分子机理提供了理论依据。基因分离的目的是为了更好的研究基因的功能,而利用转基因形成突变体是最直接和便捷的手段。*LFY* 及其同源基因的转化研究表明,转基因植株均能不同程度地提早开花^[33]。进一步说明这些同源基因在促进开花方面有着相同的作用,因此将开花基因转入那些童期特别长的植物中,得到的转基因植株应该具有早花性状。这对于此类植物来说,找到了缩短其童期的有效方法,因此研究银杏开花基因的功能基因组对其童期的缩短具有重要意义。然而要将开花基因转入

银杏里面得到早花性状的转基因银杏,就必须解决银杏组织培养、离体再生和基因转化技术等问题。相信随着组织培养技术和分子生物学的不断发展,银杏童期遗传改良的步伐将会大大加快。

参考文献:

- [1] Thomas J. Molecular and genetic mechanisms of floral control[J]. *Plant Cell* 2004, 16(Supplement): 1—17.
- [2] Lemmetyinen J, Keinonen-Metälä K, Lannenpää M, et al. Activity of the CaMV 35S promoter in various parts of transgenic early flowering birch clones[J]. *Plant Cell Rep* 1998, 18: 243—248.
- [3] Pena L, Martín-Trillo M, Juárez J. Constitutive expression of *Arabidopsis LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time[J]. *Nat Biotechnol* 2001, 19: 263—267.
- [4] Aoyama J, Konishi S, Nemoto K, et al. Down-regulation of *RFL*, the *FLO/ LFY* homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 1979—1982.
- [5] Coen E S, Romero J M, Doyle S, et al. *Floricula*, a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*[J]. *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[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 225—234.
- [7] Frohlich M W, Parker D S. The mostly male theory of flower evolutionary origins: from genes to fossils[J]. *Sys Bot*, 2000, 25: 155—170.
- [8] 张建业, 陈力耕, 胡西琴, 等. 银杏 *LEAFY* 同源基因的分离和克隆[J]. *林业科学*, 2002, 38(4): 167—170.
- [9] Mellerowicz E J, Horgan K, Walden A, et al. *PRFLL*—a *pinus radiata* homologue of *FLORICAULA* and *LEAFY* is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordial[J]. *Planta*, 1998, 206: 619—629.
- [10] Mouradov A, Glassick T, Hamdorf B, et al. *Needly*, a *pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/ LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 6537—6542.
- [11] 曹秋芬, 和田雅人, 孟玉平, 等. 苹果 *LEAFY* 同源基因的 cDNA 克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 2003, 30(3): 267—271.
- [12] Weigel D, Alvarez J, Smyth D R, et al. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*[J]. *Cell*, 1992, 69: 495—500.

- [13] Dilusha A W, Yanhui S, Michael R S, *et al.* Genomic identification of direct target genes of *LEAFY*[J] . Pro Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 1775—1780.
- [14] 郭长禄, 陈力耕, 何新华, 等. 银杏 *LEAFY* 同源基因的时空表达[J] . 遗传, 2005, 27(2): 241—244.
- [15] Van der linden C G, Vosman B, Smulders M J M. Cloning and characterization of four apple *MADS* box genes isolated from vegetative tissue[J] . J Exp Bot, 2002, 53: 1025—1036.
- [16] Elo A, Lemmetyinen J, Turunen M L. Three *MADS*-box genes similar to *APETALA1* and *FRUITFULL* from silver birch (*Betula pendula*) [J] . Physiol Plant, 2001, 112: 95—103.
- [17] Muriel J, Alexandre H, Michael M, *et al.* *MADS*-box genes in *Ginkgo biloba* and the evolution of the *AGAMOUS* family[J] . Mol Biol Evol, 2003, 20(5): 842—854.
- [18] Purugganan M D, Rounsley S D, Schmidt R J, *et al.* Molecular evolution of flower development: diversification of the plant *MADS*-box regulatory gene family [J] . Genetics, 1995, 140: 345—356.
- [19] Theissen G. Development of floral organ identity: stories from the *MADS* house[J] . Curr Opin Plant Biol, 2001, 4: 75—85.
- [20] Ohshima S, Murata M, Sakamoto W, *et al.* Cloning and molecular analysis of *Arabidopsis* gene *Terminal flower 1*[J] . Mol Gen Genet, 1997, 254: 186—194.
- [21] Nancy A E. Functional divergence of *AP3* genes in the *MAD* world of flower development[J] . Plant Cell, 2006, 18: 1779—1781.
- [22] Levy Y Y, Dean C. The transition to flowering[J] . Plant Cell, 1998, 10: 1973—1989.
- [23] Aidyn M, Frederic C, George C. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity [J] . Plant Cell, 2002, 14(Supplement 1): 111—130.
- [24] Nakagawa M, Shimamoto K, Kyoizuka J. Overexpression of *RCN1* and *RCN2*, rice *TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS* homologs confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice[J] . Plant J, 2002, 29: 743—750.
- [25] Kotoda N, Wada M, Masuda T. The break-through in the reduction of juvenile phase in apple using transgenic[J] . Acta Hort, 2003, 625: 337—343.
- [26] Lynn J P, Carol J L, Linda L W. Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER* homolog and its correlation with juvenility in *Citrus*[J] . Plant Physiol, 2004, 135: 1540—1551.
- [27] Chen L J, Cheng J C, Castle L, *et al.* *EMF* genes regulate *Arabidopsis* inflorescence development[J] . Plant Cell, 1997, 9: 2011—2024.
- [28] Yang C H, Chen L J, Sung Z R. Genetic regulation of shoot development in *Arabidopsis*: Role of the *EMF* genes[J] . Dev Biol, 1995, 169: 421—435.
- [29] Moon Y H, Chen L J, Pan R L, *et al.* *EMF* genes maintain vegetative development by repressing the flower program in *Arabidopsis*[J] . Plant Cell, 2003, 15(3): 681—693.
- [30] Yoshida N, Yanai Y, L J Chen, *et al.* *EMBRYONIC FLOWER2*, a novel polycomb group protein homolog mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*[J] . Plant Cell, 2001, 13: 2471—2481.
- [31] Nancy A E. A time to grow, a time to flower[J] . Plant Cell, 2005, 17: 2615—2617.
- [32] 郭长禄, 陈力耕, 何新华, 等. 银杏幼胚离体培养再生植株的研究[J] . 园艺学报, 2005, 32(1): 105—107.
- [33] Boss P K, Bastow R M, Mylne J, *et al.* Multiple pathways in the decision to flower: enabling promoting and resetting[J] . Plant Cell, 2004, 16: 18—31.

欢迎订阅 2008 年《河南农业科学》

《河南农业科学》是河南省农业科学院主办的综合性农业科技期刊, 主要报道粮食作物、经济作物、土壤肥料、植物保护、果树蔬菜、畜牧兽医、特种种植及养殖等方面的研究成果和先进技术。多年来, 深受省内外农业科技人员、农业院校师生、基层干部和农民的喜爱, 曾多次得到有关部门的奖励, 连续被评为“全国中文核心期刊”、“全国优秀农业期刊”, “中国科技核心期刊”、“中国农业核心期刊”。连续获“河南省优秀科技期刊一等奖”。为了进一步扩大信息量, 满足多层次读者的需求, 本刊将进一步突出创新性、学术性、指导性; 进一步加大对重大、重点项目以及基金项目、创新性成果的报道力度。同时, 继续加强对科技新动态、生产新动向、市场新需求的报道。

本刊为月刊, 国际标准 16 开本, 120 页, 彩色封面, 每期定价 5.00 元, 全年 60 元。各地邮局均可订阅, 邮发代号: 36—32。如错过订期, 可直接与本刊编辑部联系订阅。

地址: 郑州市农业路 1 号

E-mail: hnnykx@163.com

hnny@chinajournal.net.cn

邮编: 450002

电话: 0371—65739041

传真: 0371—65712747