

蜻蜓凤梨开花相关基因 *AfFPF1* 初步研究

荆永琳¹, 薛丙涛^{1,2}, 陈莹^{1,2}, 颜航^{1,3}, 赵亚文⁴, 李志英¹, 徐立¹

(¹ 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所 / 农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室 /

海南省热带作物遗传改良与创新重点实验室 / 国家热带作物中期库, 儋州 571700; ² 海南大学园艺学院, 海口 570228;

³ 长江大学农学院, 荆州 434025; ⁴ 南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘要: *FPF1* (*flowering-promoting factor 1*) 是参与植物开花期遗传控制的重要家族之一。迄今为止, 人们对蜻蜓凤梨中 *FPF1* 家族了解有限。本研究以热带花卉蜻蜓凤梨为材料, 基于转录组测序数据, 克隆获得 *AfFPF1* 基因。该基因编码的蛋白含 103 个氨基酸, 分子质量为 12.06 kD。 *AfFPF1* 转录本在蜻蜓凤梨的根中显著高表达, 此外其表达量受外源乙烯强诱导, 且响应赤霉素。 *AfFPF1* 基因在拟南芥中异位表达使其开花时间提前, 莲座叶数目减少, 促进其根系生长。对转基因拟南芥内源开花基因进行表达量检测, 发现转基因植株中, 一些开花促进基因如 *AtFT*、*AtAPI*、*AtLFY*、*AtFUL*、*AtSOC1* 表达量显著升高, 而抑制开花基因 *AtFLC* 表达量下调, 进一步证实 *AfFPF1* 能正调控拟南芥的开花时间, 且可能与这些基因相互作用。研究结果初步证实 *AfFPF1* 可能参与调控蜻蜓凤梨开花过程, 为进一步研究 *AfFPF1* 功能、通过基因工程调控蜻蜓凤梨开花以及乙烯诱导蜻蜓凤梨开花分子机制提供了理论依据。

关键词: 蜻蜓凤梨; *AfFPF1*; 开花; 乙烯

Preliminary Study of Flowering-related Gene *AfFPF1* in *Aechmea fasciata*

JING Yong-lin¹, XUE Bing-tao^{1,2}, CHEN Ying^{1,2}, YAN Hang^{1,3}, ZHAO Ya-wen⁴, LI Zhi-ying¹, XU Li¹

(¹ Institute of Tropical Crop Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Ministry of Agriculture Key

Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China/ Hainan Province Key Laboratory of

Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation/ National Gene Bank of Tropical Crops, Danzhou

571700; ² College of Horticulture, Hainan University, Haikou 570228; ³ College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou

434023; ⁴ College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: *FPF1* (*flowering-promoting factor 1*) is one of the important family involved in the genetic control of flowering time in plant. So far, the knowledge concerning the *FPF1* family in *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker has been very much limited. In this study, the *AfFPF1* gene was cloned from *A. fasciata* (Lindl.) Baker, a tropical flower, based on the transcriptome sequencing data. The protein encoded by this gene contained 103 amino acids and had a molecular mass of 12.06 kD. The *AfFPF1* gene was ectopically expressed in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., which advanced the flowering time of *A. thaliana* (L.) Heynh., reduced the number of rosette leaves and promoted the growth of root system. Some flowering-promoting genes such as *AtFT*, *AtAPI*, *AtLFY*, *AtFUL* and *AtSOC1* were found to be significantly increased in the transgenic plants, while the expression

收稿日期: 2021-06-24 修回日期: 2021-07-22 网络出版日期: 2021-08-12

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210624001>

第一作者研究方向为分子生物学, E-mail: jingyonglinlc@163.com

通信作者: 徐立, 研究方向为种质资源学, E-mail: xllzy@263.net

基金项目: 中央级科研院所基本科研业务费专项 (1630032019039); 国家自然科学基金 (31372106); 海南省自然科学基金 (20163127); 海南省自然科学基金 (809195749021)

Foundation Projects: Special Fund for Basic Business Expenses of the Central Level Research Institutes (1630032019039), National Natural Science Foundation of China (31372106), Natural Science Foundation of Hainan Province (20163127), Natural Science Foundation of Hainan Province (809195749021)

of the flowering-inhibiting gene *AtFLC* was down-regulated. This further confirmed that *AfFPF1* could positively regulate the flowering time in *A. thaliana* (L.) Heynh. and might interact with these genes. These results demonstrated that *AfFPF1* might be involved in regulating the flowering process of *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker, providing a theoretical basis of characterization of *AfFPF1*, the regulation of *A. fasciata* (Lindl.) Baker flowering using genetic approach and the molecular mechanism of ethylene-induced flowering in the near future.

Key words: *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker; *AfFPF1*; flowering; ethylene

蜻蜓凤梨 (*Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker) 又称美叶光萼荷, 是属于凤梨科 (Bromeliaceae) 光萼荷属 (*Aechmea* Ruiz & Pav.) 的多年生常绿草本植物^[1], 原产南美巴西, 引入到中国之后, 主要在热带、亚热带温度比较高的区域种植, 成为仅次于兰花和红掌的重要热带花卉。蜻蜓凤梨的观赏性很强, 色泽鲜艳, 花期持久, 深受群众喜爱, 市场需求量大, 但其生长期较长, 导致生产中常进行人工催花以满足市场要求^[2-3]。迄今为止, 已有研究揭示了具有重要经济意义的凤梨科植物开花的分子机制, 确定了参与开花途径的几个关键因素, 尤其是与凤梨科植物中乙烯生物合成和乙烯诱导开花途径相关的基因已被报道^[4-5]。深入研究蜻蜓凤梨开花的机理, 对于克服其长生长周期极为重要, 从而进一步扩展市场应用前景。

FPF1 (*Flowering promoting factor 1*) 最初在拟南芥中克隆获得, 在长日照条件下, 经过光周期诱导, *FPF1* 基因在拟南芥顶端分生组织和花分生组织中瞬时表达, 预示了其在拟南芥花芽分化中的作用。*FPF1* 基因长度较短, 编码一个分子量约为 12.6 kD 的蛋白质, 在长日照或短日照条件下, 都可以促使拟南芥提前开花, 且主要受到赤霉素途径的调控^[6]。已有研究表明, *FPF1* 可能在调节顶端分生组织对花分生组织特征基因 *API* 和 *LFY* 的快速响应能力方面发挥重要作用^[7]。在拟南芥花转变过程中, *FPF1* 通常与 *LFY* 在相似的时间被激活, 但早于 *API*。在长日照和短日照条件下, *AtAPI* 和 *AtFPF1* 的过表达在缩短开花时间方面显示出协同作用^[7]。在拟南芥中, 过表达 *FLP1* 和 *FLP2* (*FPF1* 同源基因) 任一基因, 植株在长日照和短日照条件下均提前开花^[8]。*OsRAA1* 是水稻中的 *FPF1* 同源基因, 在氨基酸水平上与 *AtFPF1* 具有 58% 的相似性。有研究表明, *OsRAA1* 的过表达会导致转基因水稻植株出现多种表型变化, 包括叶片形状、抽穗时间和根发育的改变^[9]。将 *AtFPF1* 基因转入水稻中, 发现过表达株系抽穗时间比对照植株提前数天。过表达 *OsFPFL4*, 水稻具有更短的主根、更多

的侧根和更多的不定根, 而 RNA 干扰 (RNAi) 沉默该基因会显著抑制根系的生长, 延迟水稻的开花时间^[10]。Smykal 等^[11]将烟草中 *FPF1* 基因转入不同种属的烟草中, 转基因植株都出现早花现象, 在诱导开花的过程中与赤霉素具有加性效应。目前, 有关蜻蜓凤梨 *FPF1* 基因调控开花时间的报道甚少。

本研究基于转录组测序数据, 首次从蜻蜓凤梨中克隆了 *AfFPF1*, 验证了其转录本的时空表达模式及其在外源乙烯不同处理时间下的表达模式, 并将其在拟南芥中异位表达, 致力于探索 *AfFPF1* 基因与开花之间的具体分子机制, 初步验证了 *AfFPF1* 的功能, 为进一步探究凤梨科植物开花机理, 进而扩展市场应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蜻蜓凤梨材料由中国热带农业科学院品种资源研究所国家种质资源热带作物中期保存库提供。幼株为试管苗移栽后 90 d 的植株, 成株为移栽后 330~420 d 的植株。乙烯和赤霉素灌心处理样品时, 采用浓度分别为 0.06% 和 300 mg/L, 处理时间均为 0、1、6、12、24 h, 同时利用清水处理作为对照, 取样部位选择心叶, 投入液氮速冻, 保存于 -80 °C 冰箱备用。RNA 提取采用 CTAB 法, cDNA 模板合成利用 TransScript®-Uni One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (Transgene) 试剂盒, 参考说明书进行。

1.2 *AfFPF1* 基因的克隆及生物信息学分析

根据转录组测序获得 *AfFPF1* 基因的预测参考序列, 利用 Primer 5 设计全长特异引物, 并分别在上下游引物 5' 端加上 20 bp 用于进行同源重组接头 (表 1)。通过 PCR 方法, 以 cDNA 为模板获得基因全长, 琼脂糖凝胶电泳和胶回收后, 连接 Blunt 载体, 选取阳性菌液委托广州天一辉远公司测序, 将序列正确菌液与体积 50% 甘油混匀后, 于 -80 °C 保存。

分别使用 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)、ProtParam (<http://www.expasy>

org/tool/protparam.html)、TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 和 MEGA7.0 软件对目的基因序列进行开放阅读框预测、所编码蛋白质理化性质及结构域分析、基因结构预测和构建系统发育树等。

1.3 qRT-PCR 检测

根据 qPCR 引物设计原则设计特异引物, 内参基因为蜻蜓凤梨 *Afactin* 和拟南芥 *Atactin* (表 1),

反应采用 ChamQTM SYBR® Color qPCR Master Mix 试剂盒 (Vazyme), 在 QuantStudio™ 3 荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher Scientific) 上进行。反应体系为 20 μL (模板 2 μL, 正反向引物各 0.4 μL, 50 × ROX Reference Dye2 染料 0.4 μL, qPCR Master Mix 混合液 10 μL, 灭菌去离子水补齐至 20 μL)。反应程序为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。融解曲线采集使用仪器默认程序。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

基因 Gene	上游引物 (5'-3') Forward primer	下游引物 (5'-3') Reverse primer
<i>AfFPF1</i>	ATGTCGGGCGTGTGGGTGTT	CATGTCGACGACCTTGAAGT
<i>AfFPF1+</i>	CGGGGACGAGCTCGGT <u>ACCAT</u> GTCGGGCGTGTGG GTGTT	ACCATGGTGTGCACTCTAGACATGTCGACGACCTT GAAGT
<i>Afactin</i> -qPCR	TACAGTGTCTGGATTGGGGG	CGGATTCATCATACTCACCCTT
<i>AfFPF1</i> -qPCR	AGCTTAGGGTGGGAGCGATACT	GACCTTGAAGTGGTCGCGATT
<i>Atactin</i> -qPCR	TGTGCCAATCTACGAGGGTTT	TTTCCCGCTCTGCTGTTGT
<i>AtFT</i> -qPCR	GATTGGTGGAGAAGACCTCAGGA	TCATTGCCAAAGGTTGTTCCAG
<i>AtAPI</i> -qPCR	CTCTTACGCCGAAAGACAGCTTAT	AGTCTTCCCCAAGATAATGCCTCT
<i>AtLFY</i> -qPCR	ATGATTGGACAGGGTTATCTGAGG	CTTCTCCGTCTCTGCTGCTGT
<i>AtSoc1</i> -qPCR	TACTAAGGATCGAGTCAGCACCAA	AATCTGTTGCAGCTCCTCGATT
<i>AtFUL</i> -qPCR	CTCAAAAAGATTAAGGAGAGGGAGAA	AAAGCCATCTCTGGAGGAGGTTA
<i>AtFLC</i> -qPCR	GCTTTCTGTTCTCTGTGACGCAT	CTGTTTCCCATATCGATCAAGGAT

AfFPF1 和 *AfFPF1+* 均为目的基因扩增引物。*AfFPF1+* 表示添加了酶切位点和同源重组序列, 下划线表示酶切位点

AfFPF1 and *AfFPF1+* are both amplification primers of the target gene. *AfFPF1+* indicates the added restriction sites and homologous recombination sequences, Underlined indicates the restriction sites

1.4 *AfFPF1* 基因表达载体的构建

以 *AfFPF1* 基因测序验证正确的菌液为模板, *AfFPF1+* 为引物, PCR 扩增全长, 并利用 Kpn I 和 Xba I 限制性内切酶将 pBI121 载体线性化。采用 ClonExpress™ II One Step Cloning Kit 试剂盒 (Vazyme) 构建 35S:: *AfFPF1* 重组载体。经过菌液 PCR 检测及双酶切检测验证后, 转入 GV3101 农杆菌感受态, 并获得阳性菌液, 与 50% 甘油等体积混匀后, 于 -80 °C 保存。

1.5 拟南芥遗传转化

采用农杆菌花序侵染法转化拟南芥, 经过含有潮霉素培养基的抗性筛选以及分子鉴定, 获得 35S:: *AfFPF1* 转基因拟南芥, 观察阳性植株表型来探究该基因的功能。提取转基因、野生型和转空载体拟南芥叶片总 RNA, 并反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用特异引物进行鉴定, 并对拟南芥

中开花相关基因进行表达量检测。

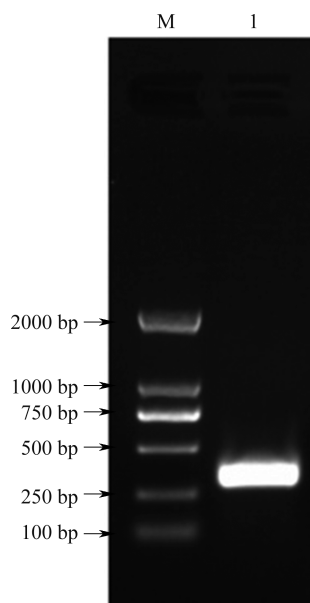
2 结果与分析

2.1 *AfFPF1* cDNA 全长的克隆与序列分析

基于转录组测序数据, 从蜻蜓凤梨中成功克隆获得目的基因, 命名为 *AfFPF1* (图 1), 包含一个 312 bp 的开放阅读框, 编码 103 个氨基酸残基。*AfFPF1* 蛋白质相对分子量为 12.06 kD, 理论等电点为 9.39, 不稳定指数 (Instability index) 和总平均亲水性 (GRAVY, grand average of hydropathicity) 分别为 36.57 和 -0.289, 表明该蛋白属于稳定蛋白类, 为亲水性蛋白。且经过 TMHMM 2.0 预测, 该蛋白不含跨膜结构域。

2.2 *AfFPF1* 蛋白的同源性、结构域及进化树分析

根据 NCBI 数据库中已提交的不同物种的 FPF 的序列, 选取拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.)

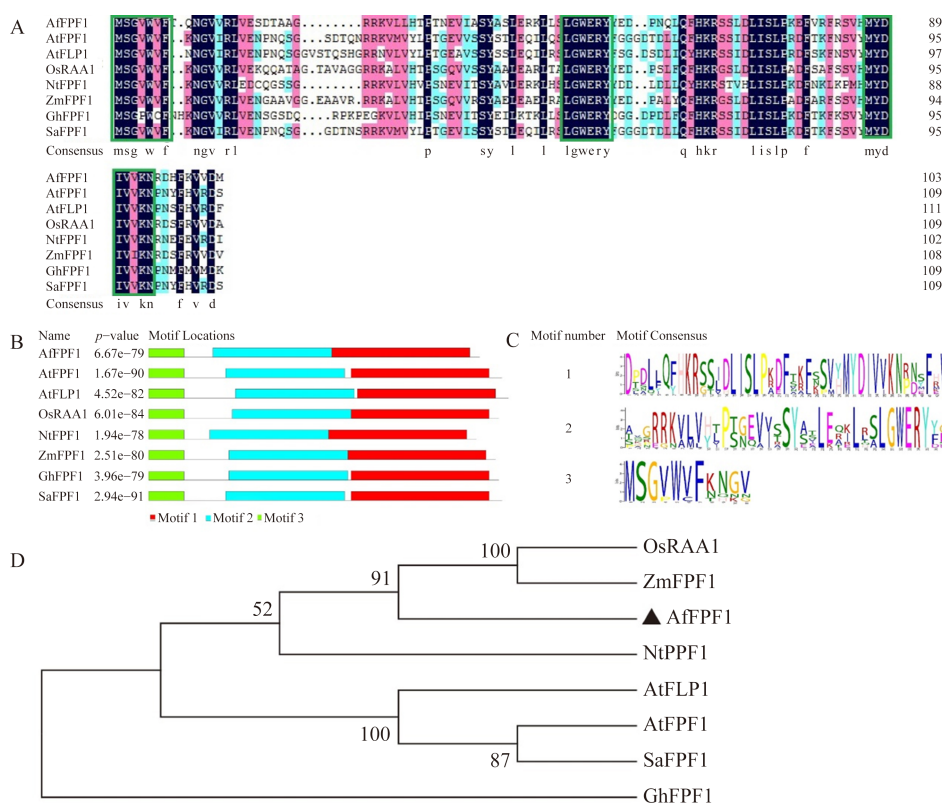


M: DL2000 DNA marker, 下同; 1: *AfFPF1* 基因扩增产物

M: DL2000 DNA marker, the same as below, 1: Amplification of *AfFPF1*

图1 *AfFPF1* 基因 cDNA 全长克隆

Fig.1 Full-length cDNA clone of the *AfFPF1* gene



A: FPF1 蛋白质多重序列比对, 绿框为碳末端、中间部分和氮末端的保守序列; B: FPF1 蛋白序列的基序分析; C: FPF1 蛋白的保守基序序列; D: FPF1 蛋白序列系统发育分析; AtFPF1 和 AtFLP1: 拟南芥, OsRAA1: 水稻, ZmFPF1: 玉米, NtFPF1: 烟草, SaFPF1: 白芥, GhFPF1: 陆地棉
A: Multiple sequence alignment of FPF1 protein family, the green box indicates conserved sequences of the carbon, intermediate and nitrogen ends, B: Motif analysis of FPF1 proteins, C: Conserved motif sequences of the FPF1 protein, D: Phylogenetic tree analysis of the FPF1 proteins, AtFPF1 and AtFLP1: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., OsRAA1: *Oryza sativa* L., ZmFPF1: *Zea mays* L., NtFPF1: *Nicotiana tabacum* L., SaFPF1: *Sinapis alba* L., GhFPF1: *Gossypium hirsutum* L.

图2 *AfFPF1* 蛋白序列比对及进化关系分析

Fig.2 Alignment and phylogenetic analysis of *AfFPF1* in contrast with closely related proteins

Heynh.)、玉米 (*Zea mays* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、白芥 (*Sinapis alba* L.) 和陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 6 个物种的 FPF 蛋白序列与 *AfFPF1* 蛋白序列进行多重比对。结果表明, FPF1 蛋白长度均比较短, *AfFPF1* 与其他 FPF1 蛋白具有高度相似性, 如氮末端的 MSGVWVF, 中间部位的 LGWERY 以及碳末端的 MYDIVVKN (图 2A)。利用在线软件 MEME 对其他物种的保守基序进行解析, 它们的保守基序数量和种类均相同 (图 2B), 与同源比对结果相似, 其中 motif 1、motif 2 和 motif 3 分别包括碳末端、中间部分和氮末端保守序列 (图 2C), 推测 *AfFPF1* 在功能上具有一定的保守性。用邻接法 (NJ method, neighbor-joining method) 构建了系统进化树 (图 2D), *AfFPF1* 位于靠近玉米的 *ZmFPF1* 蛋白和水稻的 *OsRAA1* 的分支, 暗示其可能与单子叶植物在生长发育过程中具有相似的功能。

2.3 *AfFPF1* 在蜻蜓凤梨中组织特异性表达分析及对外源激素的响应

为了探究 *AfFPF1* 在蜻蜓凤梨根、茎、叶中的表达特性,利用 qRT-PCR 对其进行组织特异性表达分

析。利用 SigmaPlot 软件进行作图。由图 3A 可知, *AfFPF1* 基因在各组织器官中均有表达,且在心叶、成熟叶和茎中表达量很低,在根中表达量高,推测该基因在蜻蜓凤梨根的发育中起着重要的作用。

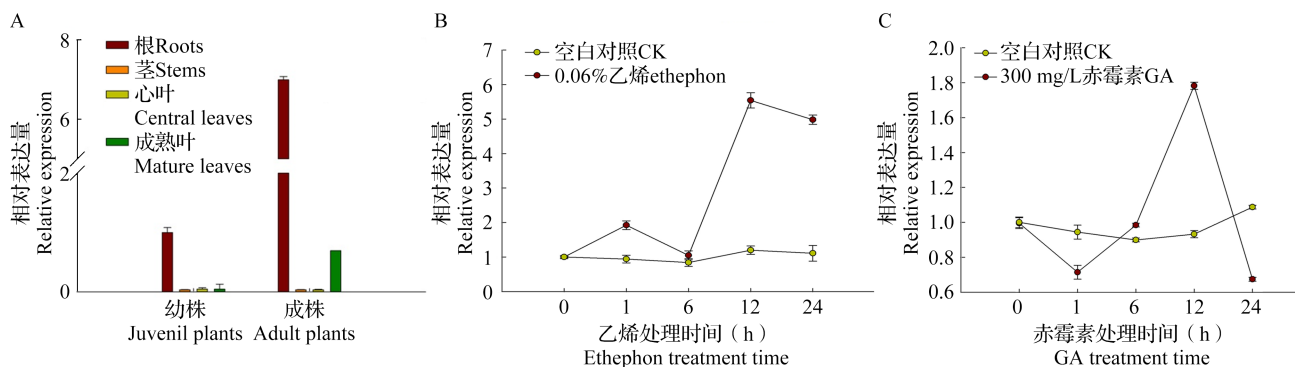


图 3 *AfFPF1* 基因的组织特异性表达及对外源激素的响应

Fig.3 Tissue-specific expression of the *AfFPF1* gene and its response to exogenous hormones

外源乙烯可通过启动内源乙烯合成来促进凤梨科植物开花。为了检测 *AfFPF1* 对内源乙烯的响应特性,通过对蜻蜓凤梨施加外源乙烯后,检测蜻蜓凤梨成株心叶中 *AfFPF1* 不同处理时间的相对表达量变化。*AfFPF1* 基因的表达量在 0~6 h 先上升后下降,随后表达量迅速上升,在 24 h 表达量约为处理前的 4.6 倍(图 3B)。以上结果表明, *AfFPF1* 基因的表达受外源乙烯处理时间的影响。

由于 *AfFPF1* 启动子区含有一些与植物胁迫相关的元件,例如激素类茉莉酸甲酯、赤霉素和水杨酸的响应元件,采用赤霉素处理蜻蜓凤梨来研究 *AfFPF1* 对外源赤霉素的响应。蜻蜓凤梨成株心叶中, *AfFPF1* 基因的表达量在赤霉素处理后 0~1 h 呈现下降趋势,随后一直上升,在 12 h 达到最高而后降低,整体呈波动变化(图 3C),说明 *AfFPF1* 基因参与赤霉素的应答反应。

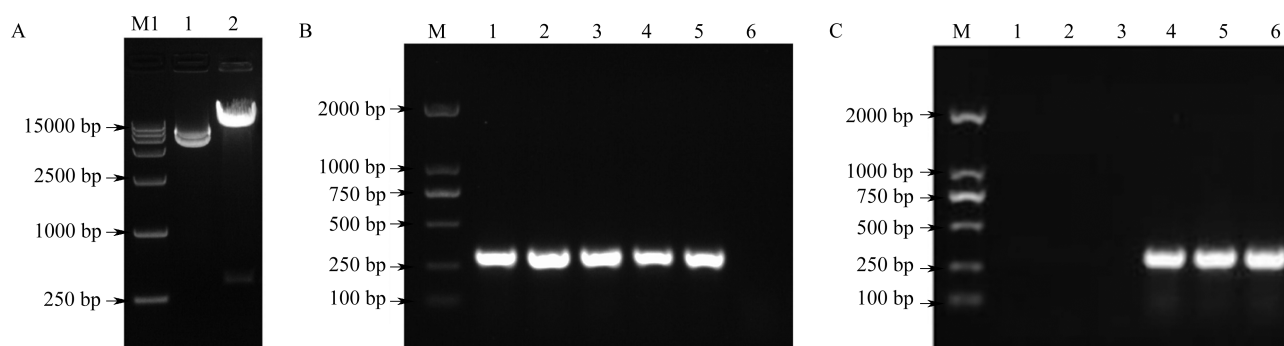
2.4 *AfFPF1* 基因表达载体的构建及转基因阳性拟南芥鉴定

使用重组酶 Exnase[®]II 连接带有同源臂的目的基因片段和线性化空表达载体,转化 Trans-T1 大肠杆菌感受态细胞。对质粒 35S::*AfFPF1* 进行双酶切,完整的 35S::*AfFPF1* 载体电泳速度比酶切后快,酶切重组质粒后得到分离的两条条带,且出现与目的基因大小一致的条带,约为 312 bp,说明该基因表达载体构建完成(图 4A)。将构建成功的表达载体转

入 GV3101 农杆菌感受态细胞,并利用菌液 PCR 检测到目的基因已成功转化到农杆菌菌株(图 4B)。

提取 35S::*AfFPF1* 转基因拟南芥、野生型和转空载体拟南芥叶片总 RNA,并反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,使用特异引物 *AfFPF1* 进行 PCR 检测,琼脂糖凝胶电泳显示转基因拟南芥植株中扩增出目的基因条带,即 312 bp 处条带,而野生型拟南芥和转空载体拟南芥中没有条带,证明基因 *AfFPF1* 已经成功转入拟南芥中(图 4C),共获得 35S::*AfFPF1* 转基因拟南芥 6 个株系,均出现早花表型,根系也发生变化。

将 T3 代 35S::*AfFPF1* 转基因拟南芥、野生型和转空载体拟南芥种子同时播种于基质中,对其生长状况进行观察统计,分别统计其抽薹时间和莲座叶数目情况。结果表明 35S::*AfFPF1* 转基因拟南芥与转空载体拟南芥、野生型相比开花早 5 d,且莲座叶数目少,统计发现野生型莲座叶一般在 10 片,转基因株系的莲座叶则在 8 片,减少达到显著水平(图 5)。经过 10 d 在 MS 培养基上的垂直培养,野生型和转基因拟南芥长出 2 片真叶时,测量主根长。野生型平均主根长为 1.752 cm, T3 代 35S::*AfFPF1* 转基因拟南芥 35S::*AfFPF1*-L1、35S::*AfFPF1*-L2 主根长分别为 2.10 cm、2.33 cm,与野生型和转空载体拟南芥相比,转基因拟南芥的主根较长且差异达到显著水平(图 5C、表 2)。

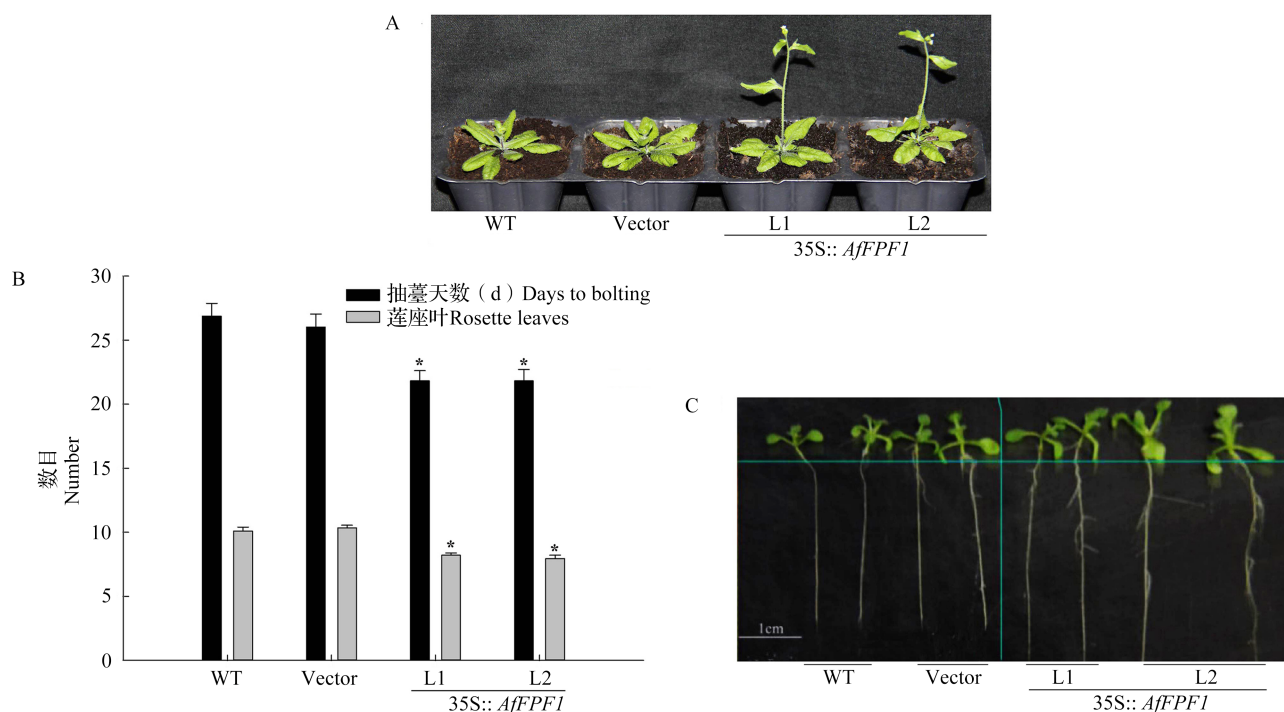


A: 表达载体的双酶切, M1: DL15000 DNA marker, 下同, 1: 35S::*AfFPF1* 质粒, 2: 35S::*AfFPF1* 质粒双酶切; B: 农杆菌的 PCR 检测, 1~4: 35S::*AfFPF1* 农杆菌阳性克隆, 5: 阳性对照为 *AfFPF1* 基因表达载体, 6: 阴性对照为 ddH₂O; C: 35S::*AfFPF1* 转基因植株 PCR 鉴定, 1~2: 野生型拟南芥, 3: 转空载拟南芥, 4: 阳性对照; 5~6: 35S::*AfFPF1* 转基因拟南芥

A: Double enzyme digestion of expression vector, M1: DL15000 DNA marker, the same as below, 1: 35S::*AfFPF1* plasmid, 2: Double enzyme digestion of 35S::*AfFPF1* plasmid, B: *Agrobacterium* PCR detection, 1-4: 35S::*AfFPF1* positive clone, 5: Positive control using expression vector bacteria solution of *AfFPF1* as template, 6: Negative control using ddH₂O as template, C: Identification of 35S::*AfFPF1* transgenic plants by PCR, 1-2: Wide-type *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., 3: CaMV35S transgenic *A. thaliana* (L.) Heynh., 4: Positive control, 5-6: 35S::*AfFPF1* transgenic *A. thaliana* (L.) Heynh

图 4 *AfFPF1* 基因表达载体的构建及转基因阳性拟南芥鉴定

Fig.4 The construction of *AfFPF1* gene expression vector and identification of transgenic plants



A: 野生型和转基因植株表型; B: 野生型和转基因植株抽薹时间和莲座叶数目统计; C: 转基因拟南芥根系的生长情况; WT: 野生型, Vector: 转空载拟南芥, 35S::*AfFPF1*: 35S::*AfFPF1* 转基因拟南芥, * 表示在 $P<0.05$ 水平上显著差异, 下同

A: Phenotype of WT and transgenic plants, B: Days to bolting and number of rosette leaves of WT and transgenic plants, C: Root growth of transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, WT: wild type, Vector: empty vector transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, 35S::*AfFPF1*: 35S::*AfFPF1* transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh,

* indicates significant difference at the $P<0.05$ level, the same as below

图 5 35S::*AfFPF1* 转基因植株表型分析

Fig.5 Phenotype analysis of 35S::*AfFPF1* transgenic plants

表 2 拟南芥根系生长情况

Table 2 Root growth of transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

拟南芥植株 <i>A. thaliana</i> plants	根长 (cm) Root length
WT	1.752 ± 0.15
Vector	1.749 ± 0.17
35S:: <i>AfFPF1</i> -L1	2.10 ± 0.23*
35S:: <i>AfFPF1</i> -L2	2.33 ± 0.17*

数据为平均数 ± 标准差, n=16

Data are average ± standard deviation, n=16

2.5 阳性株系开花相关基因的表达量检测

选取生长 18 d 的 35S:: *AfFPF1* 转基因拟南芥, 对拟南芥中开花相关基因进行表达量检测, 以探究 *AfFPF1* 基因调控开花与拟南芥中内源基因的相互作用。结果显示在 *AfFPF1* 转基因的株系中开花促进因子 *AtFT* (*FLOWERING LOCUS T*)、*AtFUL* (*FRUITFULL*)、*AtSOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS*)、*AtLFY* (*LEAFY*) 和 *AtAPI* (*APETALA1*) 的表达量都不同程度的上调且差异显著, 尤其是 *AtFT* 的表达量比野生型的高达几十倍, 而开花抑制因子 *AtFLC* 的表达则受到抑制, 以上结果与 *AfFPF1* 转基因植株提前开花表型相符 (图 6)。

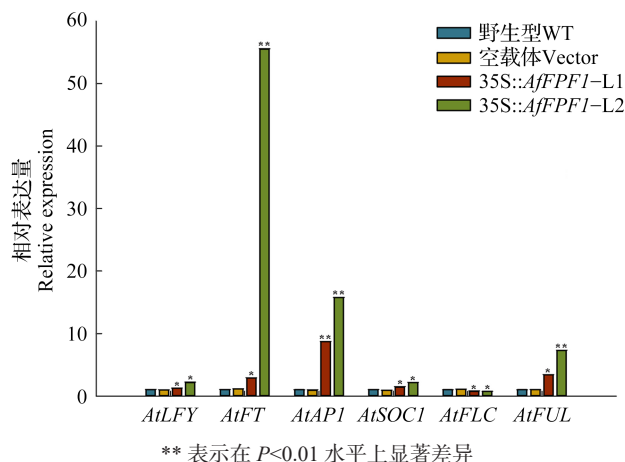
** 表示在 $P < 0.01$ 水平上显著差异** indicates statistically highly significant difference ($P < 0.01$)

图 6 转基因拟南芥中开花相关基因的相对表达量检测

Fig.6 Transcript analysis of some genes related to flowering in transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

3 讨论

开花是植物从营养生长进入生殖生长的重要转变过程, 受环境因子和内源信号的双重调控。目前在模式植物拟南芥中开花诱导至少包含光周期途

径、春化途径、赤霉素途径、自主途径、年龄途径和温敏途径 6 种类型^[12]。

AfFPF1 属于 1 个小蛋白质家族 FPF1, 其基因组序列中没有内含子, 参与调控植物开花时间的过程^[10, 13]。本研究发现 *AfFPF1* 基因表达具有明显的组织特异性, 主要在根中表达, 可能参与蜻蜓凤梨根系的生长发育过程。目前已有报道在拟南芥中大多数与调控开花时间相关的基因都在茎顶端分生组织或根尖中优先表达, 比如基因 *FLC*^[14] 和 *PHYA*^[15] 等。少数基因在叶片中表达量较高, 如成花素基因 *FT*^[14-15]。对于感知外界环境如温度、光照、光质等, 茎和叶片都是重要的器官, 而植物根系负责吸收土壤中的营养和水分, 对周围环境的变化做出相应反应从而影响开花^[15]。乙烯作为一种气态激素, 在植物生长发育的许多方面发挥着重要调节作用, 包括植物根茎生长^[16]、开花^[17-18]、叶片脱落^[19]、果实成熟^[20]等。外源乙烯可诱导凤梨科作物提前开花, 而在拟南芥中延迟开花。乙烯处理后的凤梨科成株, 解剖其组织发现顶端分生组织明显伸长, 随后逐渐分化形成花原基^[21-22]。生产上, 普遍利用乙烯或乙烯衍生物促进凤梨科植物开花。另有研究表明, 施加外源乙烯能够促进内源乙烯的合成, 进而促进凤梨科植物开花^[23-24]。乙烯处理拟南芥后, 赤霉素受到乙烯信号的影响, 活性下降, 使 DELLAs 积累, 进一步抑制了花分生组织决定基因 *LFY* 和 *SOC1* 的表达, 拟南芥开花延迟^[3]。赤霉素参与植物生命过程多种调节活动, 如促进植物节间的伸长生长, 诱导开花, 打破休眠, 促进种子萌发, 延长花期等^[25]。赤霉素处理后 *AfFPF1* 的表达量呈现波动趋势, 推测蜻蜓凤梨中 *AfFPF1* 对于开花过程的调控可能参与赤霉素调节途径, 同时在胁迫过程中可能也发挥作用。

本研究中 35S:: *AfFPF1* 转基因拟南芥的莲座叶数目减少, 开花时间提前, 主根较长。水稻中 *FPF1* 的同源基因 *OsRAA1*, 过表达的水稻根系发生变化, 初生根生长受到抑制, 次生根增多, 根系相对发达, 这与 *AfFPF1* 在拟南芥中对根的影响很相似^[9]。并且过表达植株的叶片伸长, 在抽穗时期, 穗状花序出现异常小花, 且雄蕊花丝异常, 激素处理后基因在水稻中发挥作用, 受到生长素的调控, 与拟南芥中的表达模式不同^[9]。水稻中 *OsRAA1* 对转基因植株根系的影响主要受生长素的调控, 下一步可据此对 *AfFPF1* 在蜻蜓凤梨的根中发挥作用的分子机制进行更深入的研究。Guo 等^[10]研究表明

OsFPF4 的过表达并没有明显导致水稻早花,降低了初生根长度,但大大增加了侧根密度和不定根数,而其基因沉默株系表现出延迟开花性状。Jarwar 等^[26-27]获得的 *GhFPF1* 转基因陆地棉与野生型相比,株高更高,根系相对发达,单株棉铃数更多,单铃籽棉重更高,且高于当地标准品种。有一些基因同时参与根和花的生长发育,已知调节花发育网络中的 MADS-box 基因也在根发育的信号转导中起作用^[28-29]。MADS-box 转录因子 *API*,作为花分生组织功能基因,能影响花瓣的发育以及整个花序的形态^[30]。另一种 MADS-box 转录因子 *FLC* 是拟南芥开花的主要抑制因子,它与 *FT* 的第一个内含子和 *SOC1* 的启动子结合抑制转录活性。*FT* 蛋白与 *FD* 相互作用以刺激 *API* 的活性。*SOC1* 可以与 *LFY* 的启动子结合以激活其转录。*API* 和 *LFY* 的作用促进花序分生组织的发育,进而加快开花进程^[31-32]。同时 *FPF1* 基因与前两者基因有协同作用,调节茎尖分生组织的开花能力。对转基因拟南芥内源开花基因进行表达量检测,分析后发现拟南芥中的一些促进开花基因如 *AtFT*、*AtAPI*、*AtLFY*、*AtFUL*、*AtSOC1* 表达量都不同程度的上调,尤其是 *AtFT* 的表达量上调几十倍,开花抑制基因 *AtFLC* 的表达量受到抑制,推测 *AfFPF1* 可能影响拟南芥开花相关基因的表达水平,从而促进其开花,其作用机制还需进一步探究。

通过本研究,证实 *AfFPF1* 可能参与调控蜻蜓凤梨开花过程,在根系中也发挥重要作用,暗示其可能在蜻蜓凤梨中表现出多功能性。对 *AfFPF1* 基因功能的研究还较浅显,还需进行拟南芥突变体互补、蜻蜓凤梨中基因沉默等试验,对其调控机制进行更深入的探究。

参考文献

- [1] 雷明,李志英,王之,徐立. 蜻蜓凤梨 *TERMINAL FLOWER 1* 基因的克隆及组织表达分析. 分子植物育种, 2016, 14(1): 5-50
- Lei M, Li Z Y, Wang Z, Xu L. Cloning and tissue specific expression analysis of *TERMINAL FLOWER 1* in *Aechmea fasciata*. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(1): 5-50
- [2] 李志英. 凤梨科植物组织培养技术. 北京: 中国农业出版社, 2014: 1-3
- Li Z Y. Tissue culture techniques of Bromeliaceae. Beijing: China Agriculture Press, 2014: 1-3
- [3] 丛汉卿. 乙烯诱导蜻蜓凤梨开花相关基因表达分析及其催花分子机制的初步研究. 海口: 海南大学, 2012
- Cong H Q. Expression characterization of flowering related genes after ethylene treatment in *Aechmea fasciata* and preliminary study on molecular mechanism of flower induction. Haikou: Hainan University, 2012
- [4] Lei M, Li Z Y, Wang J B, Fu Y L, Ao M F, Xu L. *AfAP2-1*, an age-dependent gene of *Aechmea fasciata*, responds to exogenous ethylene treatment. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(3): 303
- [5] Lei M, Li Z Y, Wang J B, Fu Y L, Ao M F, Xu L. Constitutive expression of *Aechmea fasciata SPL14 (AfSPL14)* accelerates flowering and changes the plant architecture in *Arabidopsis*. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(7): 2085
- [6] Kania T, Russenberger D, Peng S, Apel K, Melzer S. *FPF1* promotes flowering in *Arabidopsis*. Plant Cell, 1997, 9(8): 1327-1338
- [7] Melzer S, Kampmann G, Chandler J, Apel K. *FPF1* modulates the competence to flowering in *Arabidopsis*. The Plant Journal, 1999, 18(4): 395-405
- [8] Borner R, Kampmann G, Apel K, Melzer S. The *FPF1* gene family and flowering time control in *Arabidopsis*//Mary L G, Jeff D, Detlef W. 11th International Conference on Arabidopsis Research. Madison: University of Wisconsin, 2000: 308
- [9] Ge L, Chen H, Jiang J F, Zhao Y, Xu M L, Xu Y Y, Tan K H, Xu Z H, Chong K. Overexpression of *OsRAA1* causes pleiotropic phenotypes in transgenic rice plants, including altered leaf, flower, and root development and root response to gravity. Plant Physiology, 2004, 135(3): 1502-1513
- [10] Guo Y M, Wu Q, Xie Z Z, Yu B, Zeng R F, Min Q, Huang J L. *OsFPFL4* is involved in the root and flower development by affecting auxin levels and ROS accumulation in rice (*Oryza sativa*). Rice, 2020, 13(1): 2
- [11] Smykal P, Gleissner R, Corbesier L, Apel K, Melze S. Modulation of flowering responses in different *Nicotiana* varieties. Plant Molecular Biology, 2004, 55(2): 253-262
- [12] Srikanth A, Schmid M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(12): 2013-2037
- [13] Wang X Y, Fan S, Song M Z, Pang C Y, Wei H L, Yu J W, Ma Q F, Yu S X. Upland cotton gene *GhFPF1* confers promotion of flowering time and shade-avoidance responses in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE, 2014, 9(3): e91869
- [14] Michaels S D, Amasino R M. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. Plant Cell, 1999, 11(5): 949-956
- [15] Tóth R, Kevei E, Hall A, Millar A, Millar A J, Nagy F, Kozma-Bognar L. Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 2001, 127(4): 1607-1616
- [16] Iqbal N, Khan N A, Ferrante A, Trivellini A, Francini A, Khan M I R. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. Frontiers in Plant Science, 2017, 8(9): 475
- [17] Achard P, Baghour M, Chapple A, Hedden P, Straeten D V D, Genschik P, Moritz T, Harberd N P. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. Proceedings of the

- National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104 (15): 6484-6489
- [18] Switzenberg J A, Little H A, Hammar S A, Grumet R. Floral primordia-targeted ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) expression in transgenic *Cucumis melo* implicates fine tuning of ethylene production mediating unisexual flower development. *Planta*, 2014, 240 (4): 797-808
- [19] Khan N A, Mir M R, Nazar R, Singh S. The application of ethephon (an ethylene releaser) increases growth, photosynthesis and nitrogen accumulation in mustard (*Brassica juncea* L.) under high nitrogen levels. *Plant Biology*, 2008, 10 (5): 534-538
- [20] Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser E J W, Voesenek L A C J. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, 2006, 11 (4): 176-183
- [21] 石兰蓉, 吴岚芳, 徐立, 黄绵佳. 乙烯促进观赏凤梨花芽分化的生理机制初探. *热带农业科学*, 2005, 25 (1): 10-13
Shi L R, Wu L F, Xu L, Huang M J. A preliminary exploration into mechanism of Ethrel promoted flower bud differentiation in *Aechmea fasciata* cv. Vaniegata. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2005, 25 (1): 10-13
- [22] 信彩云, 符运柳, 丛汉卿, 李志英. 阿蒂擎天和斑叶红苞鸾哥催花后莲尖的形态学观察. *广西热带农业*, 2009, 120 (1): 8-10
Xin C Y, Fu Y L, Cong H Q, Li Z Y. Morphological changes in shoot tips of *Guzmania Attita* and *Vriesea splendens* after flower induction. *Guangxi Tropical Agriculture*, 2009, 120 (1): 8-10
- [23] Dukovski D, Bernatzky R, Han S. Flowering induction of *Guzmania* by ethylene. *Scientia Horticulturae*, 2006, 110 (1): 104-108
- [24] Wang R, Hsu Y, Bartholomew D. Delaying natural flowering in pineapple through foliar application of aviglycine, an inhibitor of ethylene biosynthesis. *HortScience*, 2007, 42 (5): 1188-1191
- [25] Hedden P, Sponsel V. A century of gibberellin research. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2015, 34 (4): 740-760
- [26] Jarwar A H, Wang X, Long W, Mangi N, Iqbal M S, Ma Q, Shuli F. Evaluation of transgenic cotton line using univariate and multivariate evaluation techniques based on agronomic and fiber quality traits. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 2020, 30 (1): 13
- [27] Jarwar A H. *GhFPF1* 调控棉花株型及根系发育的分子机制研究. 北京: 中国农业科学院, 2019
Jarwar A H. Molecular mechanism of *GhFPF1* participating in plant shape and root development in *Gossypium hirsutum* L. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019
- [28] Yu L H, Wu J, Zhang Z S, Miao Z Q, Zhao P X, Wang Z, Xiang C B. *Arabidopsis* MADS box transcription factor AGL21 acts as environmental surveillance of seed germination by regulating *ABI5* expression. *Molecular Plant*, 2017, 10 (6): 834-845
- [29] Zhang G P, Xu N, Chen H L, Wang G X, Huang J L. *OsMADS25* regulates root system development via auxin signalling in rice. *The Plant Journal*, 2018, 95 (6): 1004-1022
- [30] Kaufmann K, Wellmer F, Muino J M, Ferrier T, Wuest S E, Kumar V, Serrano-Mislata A, Madueño F, Krajewski P, Meyerowitz E M, Angenent G C, Riechmann J L. Orchestration of floral initiation by APETALA1. *Science*, 2010, 328 (5974): 85-89
- [31] Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C, Coupland G. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science*, 2007, 316 (5827): 1030-1033
- [32] Helliwell C A, Wood C C, Robertson M, James Peacock W, Dennis E S. The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal*, 2006, 46 (2): 183-192