

落叶松 *APETALA2-Like* 转录因子 基因的分离及功能分析

李 爱, 李少娟, 吴建强, 阎国荣

(天津农学院园艺园林学院, 天津 300384)

摘要:以落叶松转录组测序数据为基础,利用 RT-PCR 从落叶松中分离出一个 1590 bp 的 *APETALA2-Like* 转录因子基因全长编码序列,命名为 *LaAP2L1*。蛋白质特性分析显示 *LaAP2L1* 编码 529 个氨基酸,为亲水性蛋白,相对分子质量为 58.327 kD,等电点为 6.45。二级结构主要由 α -螺旋(alpha helix)、 β -折叠(strand)和环肽链(loop)组成。多重序列比对和系统进化分析表明 *LaAP2L1* 所编码的氨基酸与黑松、云杉等亲缘关系最近。同时,通过构建植物表达载体,利用浸花法转化模式植物拟南芥的功能研究发现,与转空载体对照拟南芥相比,过量表达 *LaAP2L1* 的转基因拟南芥的叶片、茎、花和株高都显著增大、增高,表明落叶松 *LaAP2L1* 转录因子可能参与了植物器官发育的调节。

关键词:落叶松; *APETALA2-Like*; 植物器官发育; 拟南芥

Isolation and Functional Characterization of *APETALA2-Like* Gene from *Larix*

LI Ai, LI Shao-juan, WU Jian-qiang, YAN Guo-rong

(College of Horticulture and Garden, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: Based on the transcriptome of *Larix kaempferi*, a 1590 bp *APETALA2-Like* gene containing initiation and terminator code was obtained by RT-PCR and named *LaAP2L1*. This cDNA encoded a predicted protein containing 529 amino acids, which formed a 58.327 kD polypeptide with a calculated pI of 6.45. The secondary structure of *LaAP2L1* contained alpha helices, extended strands, and loops. Alignment of predicted amino acid sequences of *LaAP2L1* in different plant species showed this transcription factor was highly homologous with the reported *APETALA2-like* in *Pinus thunbergii* and *Picea abies*. To elucidate the function of *LaAP2L1*, *LaAP2L1* overexpression vector driven by an enhanced CaMV 35S promoter was constructed and transformed to *Arabidopsis* via dip flower. Compared with the empty vector control lines, the *LaAP2L1* overexpressed transgenic plants had remarkably enlarged leaves, stems, flowers, and plant height, suggesting an important molecular role of *LaAP2L1* in regulating plant organ development.

Key words: *Larix*; *APETALA2-Like*; plant organ development; *Arabidopsis*

林木基因组中蕴含着丰富的基因资源,发掘和利用重要功能基因是实现林木遗传改良的有效途径。落叶松作为针叶树种的典型代表,是我国主要的用材和绿化树种,具有重要的经济价值和生态价值。同时,落叶松具有明显的生长优势和抗

逆性,并且遗传背景相对较为清晰,研究基础也较好,因此,在落叶松中挖掘控制生长和抗逆关键功能基因对提高和改善落叶松的木材产量和品质具有重要意义。

AP2/EREBP 转录因子家族是植物中最大的转

收稿日期:2013-12-26

修回日期:2014-03-13

网络出版日期:2014-10-13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141013.2028.013.html>

基金项目:国家自然科学基金青年项目(31300564);天津市应用基础与前沿技术研究计划青年项目(14JCQNJC15000)

第一作者研究方向为植物分子与细胞遗传学。E-mail: lovelee19840204@163.com

通信作者: 阎国荣,研究方向为果树种质资源及生理生态。E-mail: gryan311@tjau.edu.cn

录因子家族之一,研究发现该转录因子家族的成员都含有 1~2 个保守的由 60 个氨基酸组成的 AP2/ERF 结构域^[1-3]。20 世纪 90 年代首次从拟南芥中分离克隆到一个 AP2/EREBP 转录因子 *APETALA2*, 功能分析发现该转录因子在花分生组织的建立和花器官的识别过程中发挥重要作用^[4]。随后,该家族的大量成员逐渐被分离出来^[5-6]。功能分析发现, AP2/EREBP 转录因子主要在植物的生长发育及生物和非生物胁迫响应中发挥重要作用^[7-8]。据 AP2/ERF 保守结构域数目的不同, AP2/EREBP 转录因子可分为 2 个亚家族: ERF 亚家族(含有 1 个 AP2/ERF 结构域)和 AP2 亚家族(含有 2 个 AP2/ERF 结构域)。研究发现, AP2 亚家族转录因子主要参与植物生长发育的调控^[9]。 *AINTEGUMENTA* (*ANT*) 属于 AP2 亚家族的一员, 主要参与调节与器官生长相协调的细胞分裂^[10]。 *ANT* 基因的功能缺失突变体由于细胞数目减少而使花器官和叶变小^[11-12]。然而, 该基因的过量表达增加了叶、花序轴和花器官的大小, 这些表型变化是由总细胞数目变化引起的^[13-14]。研究发现, 该基因通过维持细胞的分生能力来调节器官的生长程度, 因而产生了较大的器官^[13]。除此之外, AP2 亚家族的多个成员, 例如 *APETALA2*、*PLT*、*BBM* 和 *AIL* 等相继在拟南芥、水稻、玉米和葡萄等物种中分离出来^[15-16]。然而, 木本植物, 特别是裸子植物中, 该类转录因子的研究还较为稀少。因此, 本研究从落叶松中分离 AP2 亚家族转录因子 *LaAP2LI*, 并研究该转录因子的分子结构特征及功能, 对于揭示落叶松生长发育的分子调控机制具有重要意义, 同时对于发掘、克隆落叶松优质基因用于作物遗传改良具有较好的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 试验材料

日本落叶松 (*Larix kaempferi*) 的新鲜叶片取自辽宁大孤家林场, 液氮保存备用。拟南芥的种子在 4℃ 放置 3 d, 经表面消毒后播种于 MS 培养基中, 置于 22℃, 16 h 光照/8 h 黑暗的组织培养箱中进行培养, 待长出 4 片真叶后, 移栽入营养土中, 放在拟南芥培养室培养。

1.2 落叶松 RNA 的提取及 *LaAP2LI* 的分离

以日本落叶松当年生幼嫩叶片为试验材料, 采用改良的 CTAB 法提取总 RNA 后送往华大基因公司进行转录组测序分析, 经过序列组装获得 *LaAP2LI* 的全长编码序列。根据转录组拼接序列设

计特异引物 *LaAP2LI*-F (5'-GTCTCTAGAATGTGG-GATCTGAATCATATGC-3') 和 *LaAP2LI*-R (5'-GAT-GAGCTCTCAACCTAGAGACAAATTCAATG-3') (带下划线的碱基为 *Xba*I 和 *Sac*I 酶切位点), 以反转录产物为模板进行 RT-PCR 扩增。PCR 扩增反应参数为 94℃ 预变性 1 min; 94℃ 变性 20 s, 52℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经检测后连接到 pEASY-T1 (Tansgene, 北京) 克隆载体中, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆送往上海生工进行测序分析。

1.3 *LaAP2LI* 序列生物信息学分析

LaAP2LI 序列同源性通过 NCBI 数据库中的 BLAST 进行比对分析; 氨基酸多重序列比对由 MEGA 5.0 软件的 Clustal W 完成, 并进一步采用 NJ 法构建系统进化树。利用 ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 在线分析软件推测蛋白质的氨基酸组成、等电点、相对分子质量等理化性质; 通过 TMHMM 在线工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行蛋白质跨膜区预测; 利用 Predictprotein (<http://www.predictprotein.org/>) 在线分析软件预测蛋白的二级结构; 利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 同源建模法模拟蛋白的三级结构。

1.4 35S::*LaAPLI* 转基因表达载体构建

利用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Sac*I 分别双酶切含有目的基因的克隆载体 pEASY-T1 和表达载体 pBI121, 酶切体系包括质粒 1 μ g, 10 \times T buffer 2 μ L, 10 \times BSA 2 μ L, *Xba*I 8 U, *Sac*I 8 U, 无菌水补至 20 μ L, 37℃ 温浴 3 h。将回收的目的基因片段连接入带相应酶切位点的 pBI121 载体中。连接体系为 pBI121 质粒 1 μ g, 目的基因片段 3 μ g, 10 \times ligase buffer 1 μ L, T₄ DNA 连接酶 350 U, 无菌水补至 10 μ L。16℃ 水浴连接 12 h。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒进行酶切和 PCR 鉴定。提取含有目的基因的重组质粒, 通过冻融法转化农杆菌 LBA4404, 经鉴定的阳性菌株于 -20℃ 保存备用。

1.5 拟南芥转化及阳性植株筛选

将 -20℃ 保存的农杆菌接种于 10 mL YEB 培养基中 (50 mg/L 卡那霉素, 50 mg/L 利福平), 28℃ 200 r/min 活化过夜。1:100 稀释菌体于 250 mL YEB 培养基中, 培养至 OD₆₀₀ = 1.2~1.6, 离心收集菌体, 重悬于等体积转化缓冲液 (5% 蔗糖) 中。将拟南芥倒置于重悬菌体的转化缓冲液, 浸染 10 s, 取出植株, 侧放暗培养 24 h 后在正常条

件下培养至收获种子。转基因拟南芥种子消毒后播种于 MS 固体培养基中(含 50 mg/L 卡那霉素),待长出 4 片真叶后挑取绿色、根系发达的植株移栽入营养土中培养。不同株系的转基因植株连续自交至 T_3 ,用于进一步的表型分析。对照组和转基因拟南芥表型特征数据采用 SAS 统计软件进行差异显著性分析。

1.6 转基因拟南芥的分子鉴定与表达特征分析

采用 CTAB 法提取转基因拟南芥植株与对照组新鲜叶片基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板,利用 *LaAP2L1* 特异引物 *LaAP2L1-F* 和 *LaAP2L1-R* 进行 PCR 扩增,扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

拟南芥叶片 RNA 的提取采用 Invitrogen RNA 提取试剂盒 Trizol Reagent。RNA 经 DNaseI (TaKaRa, Japan) 处理后,利用 M-MLV 反转录试剂盒进行 cDNA 第 1 条链的合成 (Promega, USA)。以 100 ng 第 1 条链 cDNA 为模板,利用 iQ SYBR Green supermix (Roche, Switzerland) 在 iCycler iQ5 system (Bio-Rad, USA) 上对目标基因进行定量分析。qRT-PCR 扩增条件为 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min; 55 ~ 95 °C 延伸 10 s (+0.5 °C/cycle), 81 个循环。为避免误差每个样品进行 3 次生物学重复和 3 次技术重复。最后以拟南芥 *ACTIN2* 基因为内参,采用 $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ 法对基因的表达水平进行分析。

2 结果与分析

2.1 日本落叶松 *APETALA2-Like* 序列的获得

本研究中,采用 Solexa 高通量测序技术对落叶松的转录组特征进行分析。经过进一步的序列拼接和功能注释,获得一个 2076 bp 的日本落叶松 AP2/ERF 转录因子 cDNA 序列。根据所获得的 Unigene 序列设计特异引物,利用 RT-PCR 在日本落叶松 RNA 中扩增获得该转录因子基因序列,序列比对结果显示,转录组测序获得的拼接序列与 PCR 扩增序列相似度达 100%,证实了该序列的准确性。利用 ORF Finder 对该转录因子基因的开放读码框进行分析,发现该转录因子基因包含一个 1590 bp 的 ORF 框,编码 529 个氨基酸的蛋白质。同源性分析发现,该转录因子与葡萄、云杉、火炬松等物种的 *APETALA2-Like* 转录因子序列相似性很高。同时,蛋白功能结构域分析显示该转录因子含有 2 个保守的 AP2/ERF 结构域,进一步证实了该转录因子属于

AP2/ERF 家族,将其命名为 *LaAPL1*, GenBank 登录号为 JN851868。

2.2 *LaAPL1* 同源性分析及系统进化分析

AP2/ERF 转录因子都含有较为保守的结构域,采用 Clustal W 程序对落叶松 (JN851868)、拟南芥 (NP_195410)、大豆 (XP_003524643)、高粱 (XP_003611692)、云杉 (AAG32658)、黑松 (BAD16603)、杨树 (XP_002310715)、番茄 (NP_001233886) 和葡萄 (NP_001267881) *APETALA2-Like* 的氨基酸序列进行多重序列比对,结果显示, *LaAPL1* 与其他物种 *APETALA2-Like* 转录因子具有较高的相似性。在此基础上,利用 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,对不同植物 *APETALA2-Like* 氨基酸序列进行系统进化分析,发现 *LaAPL1* 与云杉和黑松的 *APETALA2-Like* 位于同一进化分支,亲缘关系最近,而与其他被子植物的 *APETALA2-Like* 亲缘关系稍远 (图 1)。

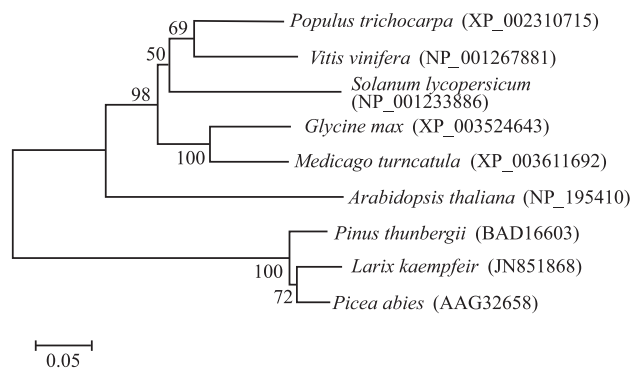


图 1 不同物种中 *APETALA2-Like* 同源基因系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *APETALA2-Like* homogene in different plant species

2.3 *LaAPL1* 蛋白的理化特性分析

利用 expasy 网站提供的 ProtParam 工具对 *LaAPL1* 编码的氨基酸序列进行基本特性分析。结果表明,该基因所编码的蛋白质相对分子质量为 58.327 kD,等电点为 6.45,不稳定系数为 52.61,属于不稳定蛋白。氨基酸组成中带有负电荷的氨基酸 (Asp + Glu) 共计 60 个,占 11.3%,带正电荷的氨基酸 (Arg + Lys) 共计 57 个,占 10.8%。亲水性氨基酸 229 个,占 43.3%,疏水氨基酸 215 个,占 40.6% (表 1)。进一步利用 ProtScale 工具对 *LaAPL1* 蛋白的亲水性进行分析,结果显示组成该蛋白质的氨基酸的亲水性明显高于其疏水性,其中亲水性最高的氨基酸是第 189 位的甘氨酸

(G),GRAVY(grand average of hydropathicity)值为-0.568,证实了 LaAPL1 蛋白是亲水性蛋白(图 2a)。TMHMM 预测结果表明该蛋白不是膜蛋白,无跨膜区(图 2b)。

表 1 LaAPL1 蛋白的氨基酸组成及含量
Table 1 Amino acid composition of LaAPL1 protein

氨基酸 Amino acid	数量 Number	百分比(%) Percentage	氨基酸 Amino acid	数量 Number	百分比(%) Percentage
丙氨酸 Ala (A) *	43	8.1	亮氨酸 Leu (L) *	37	7.0
精氨酸 Arg (R) #	33	6.2	赖氨酸 Lys (K) #	24	4.5
天冬酰胺 Asn (N)	26	4.9	甲硫氨酸 Met (M) *	12	2.3
天冬氨酸 Asp (D) #	24	4.5	苯丙氨酸 Phe (F) *	24	4.5
半胱氨酸 Cys (C)	9	1.7	脯氨酸 Pro (P) *	32	6.0
谷氨酰胺 Gln (Q) #	25	4.7	丝氨酸 Ser (S) #	58	11.0
谷氨酸 Glu (E) #	36	6.8	苏氨酸 Thr (T) #	28	5.3
甘氨酸 Gly (G)	40	7.6	色氨酸 Trp (W) *	9	1.7
组氨酸 His (H) #	11	2.1	酪氨酸 Tyr (Y) *	13	2.5
异亮氨酸 Ile (I) *	13	2.5	缬氨酸 Val (V) *	32	6.0

#:亲水氨基酸;*:疏水氨基酸
#:Hydrophilic amino acids,*:Hydrophobic amino acids

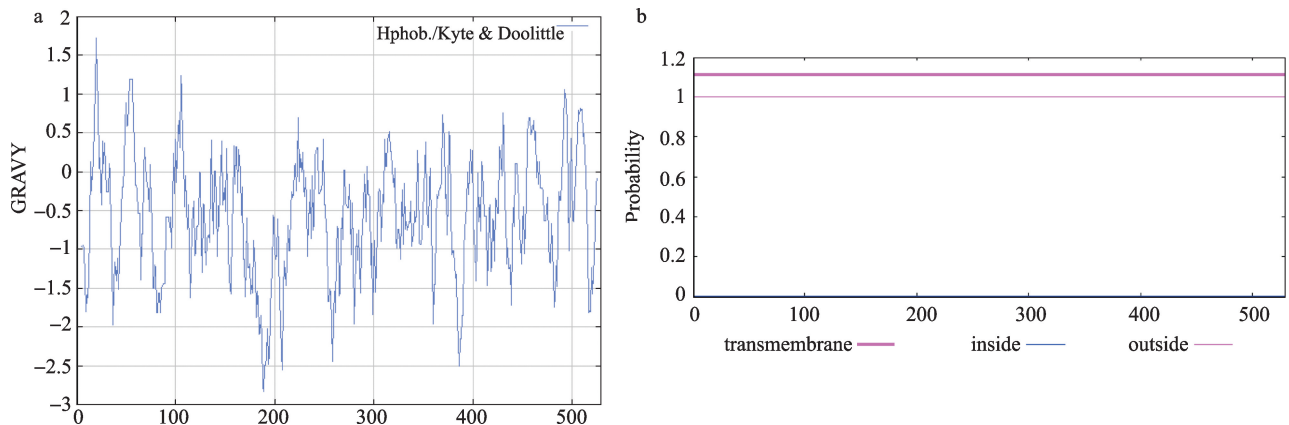
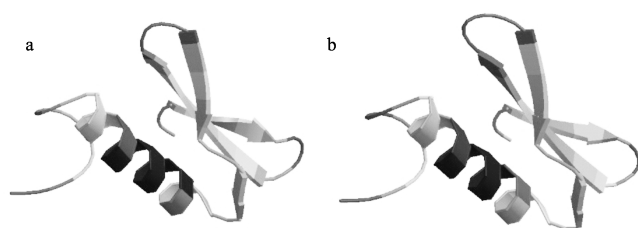


图 2 LaAPL1 蛋白亲水性分析(a)及跨膜域分析(b)
Fig.2 The hydrophilicity analysis (a) and transmembrane domains analysis (b) of LaAPL1 protein

2.4 LaAPL1 蛋白的结构特征分析

利用 Predictprotein 在线分析软件对 LaAPL1 蛋白进行二级结构预测,结果显示,落叶松 LaAPL1 蛋白具有 3 种二级结构,其中 α -螺旋(alpha helix)结构占 6.81%, β -折叠(strand)结构占 6.05%,环肽链(loop)占 87.15%。同时,采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 同源建模法对落叶松 LaAPL1 蛋白的三级结构进行预测,模型的构建依

据 1gccA (99.9 A)同源建模法,共获得 2 个三级结构模型,第 1 个从第 196 个氨基酸(Gln)到第 254 个氨基酸(Asp),共模拟 59 个氨基酸,为第 1 个 AP2/ERF 结构域,预测其含有 1 个 α -螺旋,后面连接 4 个 β -折叠。第 2 个从第 288 个氨基酸(Lys)到第 347 个氨基酸(Glu),共模拟 60 个氨基酸,为第 2 个 AP2/ERF 结构域,与第 1 个结构域类似,预测其也含有 1 个 α -螺旋和 4 个 β -折叠(图 3)。



a;第1个 AP2/ERF 结构域三级结构图;

b;第2个 AP2/ERF 结构域三级结构图

a;The three-dimensional structure of the first conserved AP2/ERF domain,b;The three-dimensional structure of the second conserved AP2/ERF domain

图3 *LaAPL1* 蛋白2个 AP2/ERF 结构域三级结构预测Fig.3 The three-dimensional structure of two conserved AP2/ERF domains in the predicated *LaAPL1* protein

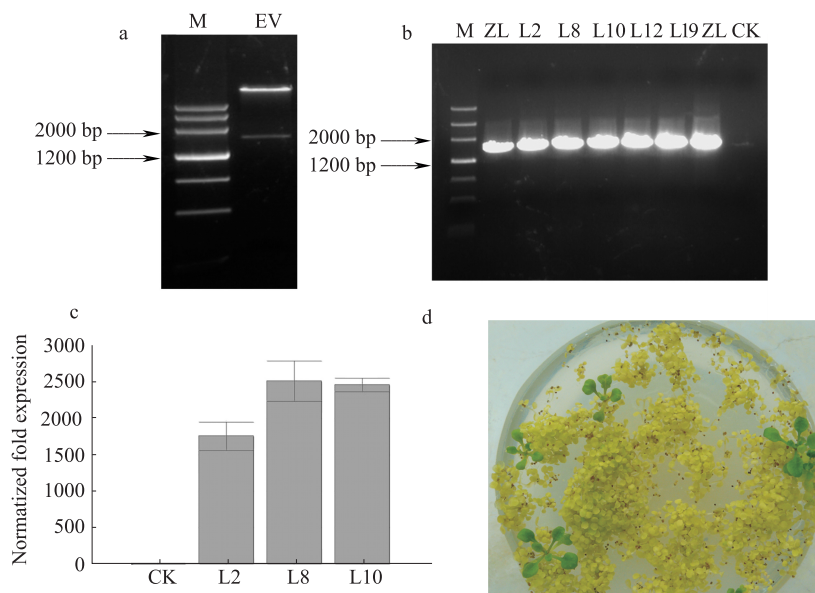
2.5 *LaAPL1* 转基因表达载体的构建与转基因植株鉴定和表达分析

为进一步探究落叶松 *LaAPL1* 基因的功能,将 *LaAPL1* 插入到植物表达载体 pBI121 中,构建 35S::*LaAPL1* 正义表达载体,经过酶切鉴定确定了载体构建的准确性(图 4a)。利用含有表达载体的农杆菌侵

染野生型拟南芥植株,收获种子后,在含有卡那霉素的培养基上进行筛选,共获得 19 株具有卡那霉素抗性的拟南芥。随机选取 5 株拟南芥利用 PCR 技术扩增外源 *LaAPL1* 基因,均得到约 1600bp 的目的片段,表明这 5 株拟南芥是含有 *LaAPL1* 基因的阳性转基因植株(图 4b、4d)。在 T₃ 转基因拟南芥中随机选取 3 个不同的株系进行 qRT-PCR 分析,结果显示外源基因都处于明显的高表达状态,其中 L8 和 L10 株系中表达量最高,L2 株系中表达量次之(图 4c)。

2.6 35S::*LaAPL1* 转基因拟南芥表型特征分析

相同生长条件下,转基因拟南芥(35S::*LaAPL1*)与对照拟南芥(vector control)相比,在各个生长时期生物量明显增大(图 5)。主要表现为转基因植株叶片与对照组相比明显增大,取完全展开的 5 周龄第 5 片叶片进行测量发现($n = 10$),35S::*LaAPL1* 转基因拟南芥叶长 27 ± 4.63 mm,叶宽 20 ± 3.02 mm,对照组拟南芥叶长 15 ± 2.12 mm,叶宽 8 ± 2.55 mm(表 2)。除此之外,35S::*LaAPL1* 转基因拟南芥较对照组茎更加粗壮,花枝较多,花器官变大,单个花序中

a;35S::*LaAP2L1* 表达载体酶切鉴定;b;35S::*LaAP2L1* 转基因拟南芥 DNA 水平 *LaAP2L1* 扩增鉴定;c;35S::*LaAP2L1* 转基因拟南芥 *LaAP2L1* 表达量分析;d;35S::*LaAP2L1* 转基因拟南芥 T₁ 筛选;EV;35S::*LaAP2L1* 表达载体;L2、L8、L10、L12、L19;35S::*LaAP2L1* 转基因拟南芥;CK;空载体对照;ZL;含目的基因的质粒;M;DNA marker IIIa:Agarose electrophoresis of 35S::*LaAP2L1* expression vector digested by *Xba*I and *Sac*I,b:The amplification of *LaAP2L1* with DNA as template in 35S::*LaAP2L1* plants,c:Expression analysis of *LaAP2L1* in 35S::*LaAP2L1* plants,d:The screening of T₁ generation,EV;35S::*LaAP2L1* expression vector,L2,L8,L10,L12,and L19;35S::*LaAP2L1* *Arabidopsis*,

CK;Vector control,ZL;Plasmid containing the target gene,M;DNA marker III

图4 35S::*LaAP2L1* 转基因拟南芥的筛选及鉴定Fig.4 The screening and identification of 35S::*LaAP2L1* *Arabidopsis*

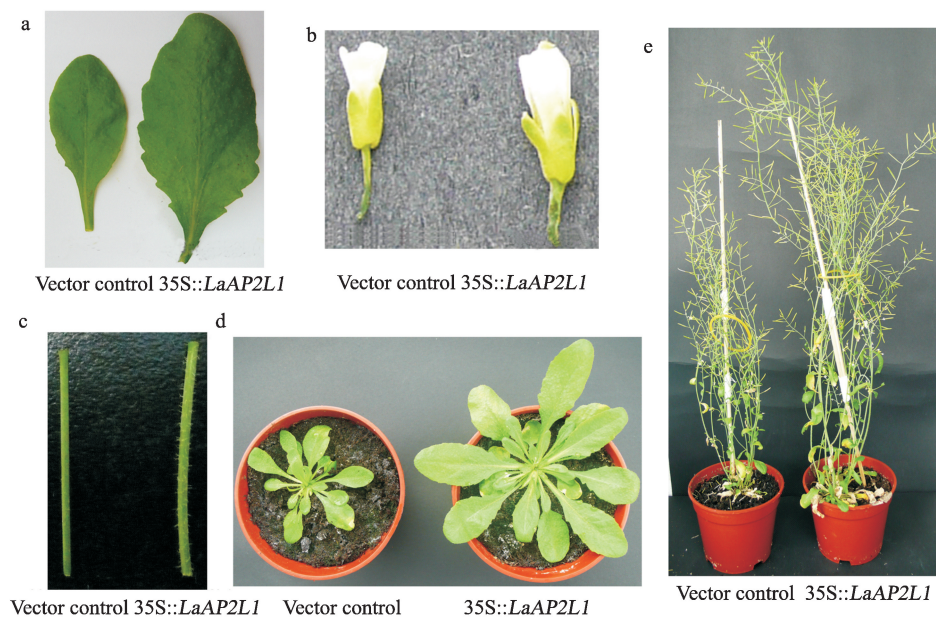


图5 35S::*LaAP2L1* 转基因拟南芥(右)叶片(a)、花(b)、茎(c)、3周龄植株(d)、7周龄植株(e)与对照组(左)表型特征分析

Fig. 5 The phenotype characterization of leaves (a) ,folwers (b) ,stems (c) ,3-week-old plants (d) , 7-week-old plants (e) of 35S::*LaAP2L1* plants (right) and vector control plants (left)

小花个数增多(图5)。7周后,统计拟南芥的植株高度,结果表明,35S::*LaAPL1* 转基因拟南芥株高约为 42.31 ± 3.68 cm,而对照组拟南芥株高约为 34.87 ± 1.46 cm,转基因拟南芥比对照平均高约23.5% ($n=10$) (表2)。上述结果表明,拟南芥中过量表达落叶松 *LaAP2L1* 转录因子可使拟南芥地上器官显著增大,这说明落叶松 *LaAP2L1* 转录因子在植物的生长和发育过程中起着至关重要的作用。

表2 35S::*LaAP2L1* 转基因植株表型特征分析

Table 2 Morphology analysis of 35S::*LaAP2L1* transgenic plants

表型	对照组拟南芥	35S:: <i>LaAPL1</i> 转基因拟南芥
Phenotype	Vector control	35S:: <i>LaAPL1</i>
叶长 (mm)	15 ± 2.12 (n = 10) B	27 ± 4.63 (n = 10) A
Leaf length		
叶宽 (mm)	8 ± 2.55 (n = 10) B	20 ± 3.02 (n = 10) A
Leaf width		
株高 (cm)	34.87 ± 1.46 (n = 10) B	42.31 ± 3.68 (n = 10) A
Plant height		

表中数值为平均值 ± 标准偏差;n 表示在表型统计分析中植株的数量;同行不同字母表示不同处理组在 $P < 0.05$ 水平存在显著差异
Values are mean ± SD,n indicates the numbers of individual plants in the statistical analysis,The different letters represent significant difference among treatments at 0.05 level

3 讨论

LaAP2L1 是 AP2/EREBP 转录因子家族成员之一,分子结构特征分析发现落叶松 *LaAP2L1* 含有 2 个 AP2/ERF 结构域,这 2 个结构域在不同物种中具有很高的保守性。但其整个编码序列与其他植物 *APETALA2-Like* 转录因子的系统进化研究显示,落叶松 *LaAP2L1* 与云杉和火炬松等裸子植物的亲缘关系较近,而与其他被子植物,例如拟南芥、大豆和高粱等物种的亲缘关系较远,这说明落叶松 *LaAP2L1* 在进化上相对较为保守。

AP2/EREBP 转录因子家族是植物中最大的转录因子家族之一^[17]。功能分析发现,AP2/EREBP 家族中的 AP2 亚家族转录因子主要参与植物生长发育的调控,例如 *APETALA2*、*BBM*、*ANT* 等^[9,18-19]。在本实验室之前的研究中,通过对落叶松双亲及其杂交子代的表达谱分析发现,AP2/EREBP 类转录因子在杂交子代中表现为明显的上调表达,暗示了此类转录因子可能与落叶松杂种在胸径、株高方面表现出的明显生长优势性状的形成密切相关^[20]。为深入揭示落叶松 *LaAP2L1* 的功能特征和作用机制,本研究构建转基因表达载体,在模式植物拟南芥中对 *LaAP2L1* 的功能进行了详细探讨。研究结果显示 *LaAP2L1* 过表达可使转基因拟南芥表现出叶片

明显增大,茎明显增粗等性状,这表明落叶松 *LaAP2L1* 可调控植物器官的大小,*LaAP2L1* 的高表达可使植物器官明显增大,生物量显著提高。该结果暗示落叶松 *LaAP2L1* 在通过利用基因工程手段获得高产作物、牧草及能源植物等方面具有巨大应用潜力。*LaAP2L1* 来源于木本植物,木本植物相比于多数草本植物特别是水稻、玉米等农作物,具有很多优势,例如可以长得更加高大、具有更加发达的根系,可以多年生长等。这就预示着一些木本植物的基因资源在改良作物性状如提高生物量等方面更具有优势。同时,该研究结果也为落叶松中其他 AP2/EREBP 家族成员的鉴定和进化分析,以及进一步揭示不同 AP2/EREBP 成员在落叶松生长发育过程中的功能,提供了极为有价值的线索,具有重要的现实意义。

参考文献

- [1] Zhang C H, Shangguan L F, Ma R J, et al. Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily in peach (*Prunus persica*) [J]. Genet Mol Res, 2012, 11: 4789-4809
- [2] Dietz K J, Vogel M O, Viehhauser A. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signaling [J]. Protoplasma, 2010, 245: 3-14
- [3] 默韶京, 刘桂茹, 郎明林. 长穗偃麦草 DREB 类基因 *EeAP2.2* 的克隆与序列分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12 (5): 764-769
- [4] Jofuku K D, den Boer B G, Van Montagu M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2* [J]. Plant Cell, 1994, 6: 1211-1225
- [5] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression [J]. Plant J, 2003, 33: 751-763
- [6] Gutterson N, Reuber T L. Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors [J]. Curr Opin Plant Biol, 2007, 10: 465-471
- [7] 赵艳红, 郎明林, 王小龙, 等. 纤毛鹅观草 DREB 类基因 *ReDREB1* 的克隆及其蛋白结合干旱应答元件 DREB 的功能验证 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14 (5): 857-863
- [8] 孙晓波, 刘金兵, 余桂红, 等. 毕氏海蓬子 *SbDREB* 基因的克隆与表达分析研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13 (1): 111-117
- [9] Okamura J K, Caster B, Villarroel R, et al. The AP2 domain of *APETALA2* defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 7076-7081
- [10] Dash M, Malladi A. The *AINTEGUMENTA* genes, *MdANT1* and *MdANT2*, are associated with the regulation of cell production during fruit growth in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. BMC Plant Biol, 2012, 12: 98
- [11] Elliott R C, Betzner A S, Huttner E, et al. *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2-like* gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth [J]. Plant Cell, 1996, 8: 155-168
- [12] Klucher K M, Chow H, Reiser L, et al. The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2* [J]. Plant Cell, 1996, 8: 137-153
- [13] Mizukami Y, Fischer R L. Plant organ size control; *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 942-947
- [14] Krizek B A. Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs [J]. Dev Genet, 1999, 25: 224-236
- [15] Licausi F, Giorgi F M, Zenoni S, et al. Genomic and transcriptomic analysis of the AP2/ERF superfamily in *Vitis vinifera* [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 719
- [16] Mudunkothge J S, Krizek B A. Three *Arabidopsis* *AIL/PLT* genes act in combination to regulate shoot apical meristem function [J]. Plant J, 2012, 71: 108-121
- [17] Kim S, Soltis P S, Wall K, et al. Phylogeny and domain evolution in the *APETALA2-like* gene family [J]. Mol Biol Evol, 2006, 23: 107-120
- [18] Boutilier K, Offringa R, Sharma V K, et al. Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth [J]. Plant Cell, 2002, 14: 1737-1749
- [19] Fu F F, Xue H W. Coexpression analysis identifies rice starch regulator1, a rice AP2/EREBP family transcription factor, as a novel rice starch biosynthesis regulator [J]. Plant Physiol, 2010, 154: 927-938
- [20] Li A, Fang M D, Song W Q, et al. Gene expression profiles of two intraspecific *Larix* lines and their reciprocal hybrids [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39: 3773-3784

欢迎订阅 2015 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的学术期刊。主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及作物生产有关的生物技术、生物数学等学科基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。办刊宗旨是报道本领域最新研究动态和成果,为繁荣我国作物科学研究、促进国内外学术交流、加速中国农业现代化建设服务。

《作物学报》从 1999 年起连续 12 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助。2006-2014 年连续 9 年获“中国科协精品科技期刊工程项目(B类和学术质量建设)”资助。从 2002 年起连续 12 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2013 年被新闻出版广电总局评为“百强科技期刊”,2011 年获“第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖”,2005 年获“第三届全国国家期刊奖提名奖”。2008 和 2011 年被中国科学技术信息研究所授予“中国精品科技期刊”称号。2012 和 2013 年被 CNKI 评为“中国最具国际影响力学术期刊”。2009 年被中国期刊协会和中国出版科学研究所授予“新中国 60 年有影响力的期刊”称号。

月刊, 192 页/期, 定价 60 元/期, 全年 720 元。可通过全国各地邮局订阅, 邮发代号: 82-336。也可向编辑部直接订购。

地址: (100081) 北京市海淀区中关村南大街 12 号

电话: 010-82108548

传真: 010-82105793

网址: <http://zxwb.chinacrops.org/>

E-mail: zxwb301@caas.cn