

蕙兰 Flowering locus T 基因的克隆及其对开花的影响

孙崇波, 向林, 李小白, 秦德辉, 李伯钧, 郭方其, 吴超

(浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

摘要:【目的】探讨 CfFT 基因在蕙兰成花中的作用。【方法】采用 RT-PCR 结合 RACE 技术从蕙兰 (*Cymbidium faberi*) 中克隆 Flowering locus T (*FT*) 同源基因 CfFT。采用实时定量 RT-PCR 对不同组织及不同花发育时期 CfFT 进行表达分析。将该基因克隆到 PBI121 载体上导入烟草中, 并对不同转基因烟草株系中的 CfFT、NFL、NtFUL 和 NAP1 基因进行实时定量 RT-PCR 分析。【结果】对蕙兰花芽分化不同时期的 CfFT 的表达分析表明, CfFT 在花芽分化初期的表达量最高, 之后随着花芽的成熟表达量逐渐降低。将 CfFT 导入烟草进行异源表达, 转基因株系表现出明显的早花表型。对开花时间不一的转基因株系中的 CfFT 表达分析表明, 其表达量与转基因烟草开花时间早晚成正比。进一步对这些株系内源的 NFL、NAP1 和 NtFUL 表达分析表明, NFL、NAP1 和 NtFUL 基因的表达量与 CfFT 表达成正比, 说明 NFL、NAP1 和 NtFUL 的表达受 FT 基因的上游调控。【结论】在烟草中异源表达蕙兰中的 CfFT 基因能促进烟草提前开花。

关键词: 蕙兰; FT 基因; 成花诱导; 烟草; 实时荧光定量表达

Isolation of Flowering Locus T Ortholog and the Effects on Blooming of *Cymbidium faberi*

SUN Chong-bo, XIANG Lin, LI Xiao-bai, QIN De-hui, LI Bo-jun, GUO Fang-qi, WU Chao

(Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

Abstract: 【Objective】The objective of this study was to analyze the function of Flowering locus T (*FT*) on blooming in *Cymbidium faberi*. 【Method】The full-length cDNA sequence of CfFT was obtained by RT-PCR and RACE cloning technology. The expression patterns of CfFT in different tissues and flower buds of different developmental stages were analyzed by real-time quantitative RT-PCR. To investigate the function of CfFT, an expression vector was constructed for transformation into tobacco by using agrobacterium-mediated method. 【Result】In flowers, CfFT was expressed more in young flower buds than in mature flowers and was predominantly expressed in young ovary. Ectopic expression of CfFT in transgenic tobacco plants showed novel phenotypes by flowering earlier than wild-type plants. Real-time quantitative RT-PCR analysis suggested that expression levels of CfFT closely related with the flowering time of different 35S::CfFT transgenic tobacco lines. Further analysis of the flower time related genes indicated that the expression of genes *LEAFY (LFY)*, *APETALLA1 (API)*, *FRUITFULL (FUL)* and *SEPALLATA1 (SEPI)* were closely related with the expression of FT in 35S::CfFT transgenic tobacco plants. 【Conclusion】Ectopic expression of CfFT gene promote flowering in transgenic tobacco.

Key words: *Cymbidium faberi*; FT gene; flower induction; tobacco; real time quantitative RT-PCR

0 引言

【研究意义】蕙兰 (*Cymbidium faberi*) 是兰科兰

属中国兰地生种类的主要种之一, 也是中国十大传统名花之一。江、浙一带盛产蕙兰, 其香气馥郁, 花色淡雅, 深受东南亚人们的喜爱, 许多优良的蕙兰品种栽培

收稿日期: 2012-05-15; 接受日期: 2013-01-16

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y3080378, Y3110438) 浙江省花卉产业重点科技创新团队项目 (2009R50034) 浙江省花卉新品种选育重大科技专项 (2012C12909-10) 浙江省农业科学院创新工程项目 (2011R05Y01E03)

联系方式: 孙崇波, Tel: 0571-86404336; Fax: 0571-86404336; E-mail: chongpo1230@sina.com

历史达数百年之久。但由于自身繁殖速度较慢,某些品种几百年来仍只有数株。且现有多数栽培种均是由野生自然变异种筛选而来,加上人类的滥采乱挖,目前,中国野生兰花资源日趋紧缺,新品种更新速度较慢。在蕙兰常规育种过程中,从杂交到开花需要5—7年,大大制约了国兰育种的进程。因此促进蕙兰开花、缩短开花周期成为了蕙兰育种的主要目标。Flowering locus T (FT) 蛋白被认为是研究者多年来寻找的‘成花素’,在植物成花诱导过程中扮演着重要作用^[1-5]。【前人研究进展】植物成花诱导过程受众多基因的调控,如 *LEAFY(LFY)*、*APETALA 1(API)*、*AP2*、*CALIFLOWER (CAL)*、*FT*、*TERMINAL FLOWER(TFL)*、*CONSTANS(CO)* 等。FT 基因是植物成花诱导过程中控制植物开花时间的关键基因,它可以整合来自光周期途径、春化途径和自主途径等不同花发育途径的信号^[5],在植物花发育中发挥着重要作用,光周期途径、春化途径和自主途径的信号均汇集到 FT 基因处,由光周期诱导的 *CO* 直接转录激活 *FT* 的表达^[6],然后 FT 基因在 *FD* 的共同作用下激活花特性基因 *API* 和 *LFY* 的表达,促进花的形成,而春化途径和自主途径通过 *FLC* 基因抑制 FT 基因的表达,或抑制 FT 靶基因对 FT 信号的响应,从而抑制开花^[7]。FT 基因编码一个类似哺乳动物磷脂酰乙醇胺结合蛋白 PEBP (Phosphatidyl ethanolamine binding protein),该蛋白是一类高度保守的小分子蛋白,广泛存在于各种生物中。对拟南芥的研究表明,FT 蛋白可能作为一种“成花素”类的物质,在叶片中合成,然后从叶片转运到茎尖,诱导植物开花^[1-5]。最近,从拟南芥^[8]、水稻^[9]、杨树^[10-11]、文心兰^[12]、苹果^[13-14]、向日葵^[15]、紫花苜蓿^[16]以及生菜^[17]等植物中克隆了 FT 类基因,对这些基因进行转基因分析表明 FT 基因可以明显促进植物开花。【本研究切入点】目前对 FT 基因的研究主要集中在一些模式植物中,而对单子叶植物国兰类 FT 基因如何行使功能的研究鲜有报道。

【拟解决的关键问题】本研究以蕙兰‘大一品’为材料,克隆了 FT 同源基因 CfFT,对其在蕙兰不同花期以及不同花组织的表达进行分析,并将该基因转化烟草,对其功能进行初步研究。通过本研究,期望为调控蕙兰花芽分化,促进蕙兰开花,缩短育种周期,加速蕙兰育种进程奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以种植于浙江省农业科学院园艺研究所花卉中心

大棚内蕙兰品种‘大一品’为试验材料,于2010年将材料采集后立即冻存于液氮中,带回浙江省农业科学院园艺研究所花卉育种实验室,保存在-80℃的冰箱中备用。

遗传转化受体植物材料为野生型烟草‘云烟87’ (*Nicotiana tabacum* cv. Yunyan 87) 的组织培养苗。遗传转化所用菌种为根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105。

1.2 蕙兰总 RNA 的提取及 CfFT 基因的克隆

采用北京天恩泽基因公司 RNAout 2.0 试剂盒提取总花芽 RNA,用美国 Clontech 公司 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 合成 cDNA 第一链,以反转录模板直接进行 PCR 反应。

为了克隆蕙兰 FT 基因,根据此类基因的保守区域设计简并引物进行 PCR 扩增,扩增 FT 基因上游引物 FT1 为:5'-GTSATGGTNGATCCWGATGC-3',下游引物 FT2 为:5'-TGGCAGTTRAARTAGACGGC-3'。PCR 扩增条件为:94℃ 变性 4 min,94℃ 变性 30 s,54—44℃ 复性 30 s (每 5 个循环退火温度下降 2℃),72℃ 延伸 1 min,共进行 35 个循环后再 72℃ 延伸 8 min。

PCR 产物以 1%琼脂糖凝胶电泳回收,连接到 pMD18-T 载体上,热激转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选。选取白色菌落进行液体培养,PCR 检测阳性克隆,送上海英骏生物技术公司测序。

根据扩增产物的测序结果设计 RACE 引物,FT 基因 3'RACE 引物 FT3 5'-ATCCAGATGCTCCAA GTCCAAGTG-3';巢式引物 FT4 5'-GTGCTATGAG AGCCCACGCCCAA-3';5'RACE 引物 FT5 5'-GCTG ATGAAAGAGCACGAAGACGA-3';巢式引物 FT6 5'-GAAGACGAAGCGGTGTATGCCTA-3'。

以之前反转录的 cDNA 为模板,采用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒进行 3'端和 5'端的 RACE 扩增。将 3'端和 5'端的 RACE 反应产物分别回收,连接 pMD18-T 载体,转化测序。拼接后获得基因全长。

1.3 CfFT 序列分析

对于获得基因的全长 cDNA 序列,先在 <http://au.expasy.org/tools/dna.html> 进行开放阅读框的分析;用 ProtParam 软件分析 FT 蛋白的基本性质,再使用 ClustalX 1.83 软件进行氨基酸水平的序列比对,用 Boxshade 3.21 软件进行显示。运用 BLAST 搜索基

因的同源基因, 使用 ClustalX 1.83 软件对搜索得到基因的 cDNA 序列进行多重序列比对, 再使用 MEGA4 软件中的邻位相连法进行系统发生树的构建, 并进行 Bootstrap 检测^[18]。

1.4 CfFT 基因的表达分析

分别取 0.1 g 2010 年 10 月到 2011 年 4 月份的蕙兰花芽 (每月取 1 次), 成熟花的侧瓣、唇瓣、萼片、蕊柱和幼嫩子房, 以及不同转基因烟草株系花芽, 按照北京天恩泽基因公司 RNAout 2.0 试剂盒说明书提取总 RNA。分别以 200 ng RNA 为模板, 按照天根生化科技 (北京) 有限公司的 Quantscript RT Kit 说明书进行反转录, 反转录后的 cDNA 贮存于 -20 °C 备用。用蕙兰 18S rRNA 基因和烟草 Actin 基因分别作为在蕙兰和转基因烟草表达分析的内标。18S rRNA 基因上游引物: 5'-TGCCGTTTCCTGTTGATTC-3', 下游引物: 5'-TGCTGCCTTCCTGGATGTG-3'; Actin 基因上游引物: Actin1 5'-CCATTGGCTCAGAGAGGTTTC-3', 下游引物: Actin2 5'-GTTGGAAGGTGCTGAGAG-3'。其它各基因引物序列如下: FT 基因上游引物: FT7 5'-GCAGGTGTCCGCATAAATC-3', 下游引物: FT8 5'-TCTGCCTGATCTCCCTTCTCA-3'; NtFUL 基因上游引物: NtFUL1 5'-GCTTTGCAAGAAGGTGAAGG-3', 下游引物: NtFUL2 5'-TCTGATATGCTTCCCAAGG-3'; NAP1 基因上游引物: NAP1-1 5'-ATCTTGAGCACCAGCTCGAT-3', 下游引物: NAP1-2 5'-TGTTGCTCCCACTGAGTCTG-3'; NFL 基因上游引物: NFL1 5'-GGAGCGAGGAGAGAATGTTG-3', 下游引物: NFL2 5'-AGCGTTGCTTCGTTTCAGAAAT-3', 采用荧光染料法对上述样品进行实时荧光定量表达分析。20 μL 反应体系中包括 9 μL 2.5 × Sybr Green mix, 9 μL ddH₂O, 1 μL cDNA, 1 μL 引物混合物 (正向引物和反向引物, 10 μmol·L⁻¹)。反应程序为: 95 °C 3 min, 然后 95 °C 15 s, 60 °C 1 min 下循环 40 次, 每个处理 3 次重复, 整个过程在 IQ5 荧光定量 PCR 仪 (BioRad 公司) 上进行。数据通过 Sequence Detector Version 1.3.1 输出, 并转换为 Excel 格式再分析, 按相对定量法计算基因的表达量。

1.5 CfFT 的载体构建及烟草转化

根据前面拼接结果, 在基因两端设计特异性引物, 进行 PCR 扩增后获得基因全长用于构建表达载体。引物为 FT9 5'-GCTCTAGAAATGAATAGAGAGAGAGAC-3' (下划线部分为 Xba 酶切位点) 和 FT10 5'-CGGAATTCTCAATCTGCATCCTTCT-3' (下划线部

分为 EcoR 酶切位点)。将连在测序载体 pMD18-T 上的 CfFT 用 Xba 和 EcoR 双酶切后, 与同样用 Xba 和 EcoR 双酶切带有 CaMV 35S 启动子 PBI121 质粒的大片段连接, 得到终载体 PBI121-CfFT。使用冻融法^[19]将 PBI121-CfFT 表达载体导入根癌农杆菌 EHA105 中, 用叶盘法转化烟草 (品种为 '云烟 87'), 在含 100 μg·mL⁻¹ 卡那霉素和 400 μg·mL⁻¹ 头孢霉素的 MS 培养基上筛选幼苗, 转基因阳性苗经过炼苗后, 移栽至花盆中, 在温室培养。转基因烟草开花后进行表型观察。

2 结果

2.1 蕙兰 FT 基因全长 cDNA 的克隆

根据 FT 基因保守序列设计引物, 以蕙兰花芽 cDNA 为模板, 扩增得到 1 个 293 bp 的中间片段, 测序分析表明, 获得了 FT 基因的部分序列。之后用 RACE 法分别获得 FT 基因的 3' 和 5' cDNA 末端, 最后通过序列拼接得到基因全长 cDNA 序列。BLASTX 的结果显示, 全长 cDNA 与其它植物 FT 类基因具有 80% 以上的同源性, 因此将基因命名为 CfFT。CfFT 全长 768 bp, 含有长度为 531 bp 的开放阅读框, 编码 176 个氨基酸, 分子量 19.8 kD, 预测等电点为 6.42, GenBank 登录号为 HQ164434。

2.2 基因序列分析

CfFT 氨基酸序列分析表明, CfFT 蛋白含有 FT 类基因共有的关键氨基酸位点 (84 位的酪氨酸和 139 位的谷氨酰胺, 图 1 中用上划线表示) (图 1), 其氨基酸序列与苹果、梅花、无花果、黄瓜、番木瓜、黑杨、毛果杨、棉花、文心兰和春兰的 FT 基因分别有 83%、82%、82%、82%、83%、83%、84%、85%、94% 和 99% 的同源性 (图 1)。系统进化分析表明, CfFT 归类于 FT 基因的单子叶类群一组, 与其它 FT 类基因序列之间的高度相似性说明 CfFT 为 FT 的同源基因, 与同为兰科的 OGRFT 以及同属的 CgFT 最为相近 (图 2)。

2.3 CfFT 基因的表达分析

为了确定 CfFT 基因在蕙兰不同时期花芽以及不同组织的表达差异, 提取了 10 月到次年 4 月份的蕙兰花芽和成熟花的侧瓣、唇瓣、萼片、蕊柱、子房的 RNA, 以 18S rRNA 为对照, 进行实时荧光定量表达分析。结果表明 (图 3), 在蕙兰不同时期的花芽中, CfFT 在 10 月份的幼嫩花芽中的表达量最高, 之后逐渐下降, 4 月份成熟花芽中的表达量约为 10 月份的

MdFT 1 MPRDRDPLVVGRRVIGDVLDLPPFTRSVSLRVTYGNKEVNNGCELKPSQVQHQPVRVDTGGDDL
PmFT 1 MPRDRDPLVVGRRVIGDVLDLPPFTRSVSLRVTYGLKEVNNGCELKPSQVHQQPVRVDTGGDDL
FcFT 1 MPRERDPLVVGRRVIGDVLDLPFTRSI SLRVTYGNKEVNNGCELKPSQVVSQPRVDTGGDDL
CsFT 1 MPRDRDPLVVGRRVIGDVLDLPPFTRSVSLRVTYSTKEVNNGCELKPSQVVNSQPVRVDTGGDDL
CpFT 1 MTRDRDPLVVGRRVIGDVLDLPPFTRSI SLRVTYNSREVNNGCELKPSQVVSQPRVDTGGDDL
GhFT 1 MPRDRDPLVVGRRVIGDVLDLPPFTRSI SLRVTYATRDVSNGLVGLKPSQVVNSQPVRVDTGGDDL
PnFT 1 MSRRDRDPLSVGRVIGDVLDLPPFTRSI SLRVTYSSREVNNGCELKPSQVANQPVRVDTGGEDL
PtFT 1 MSRRDRDPLSVGRVIGDVLDLPPFTRSI SLRVTYSSREVNNGCELKPSQVANQPVRVDTGGEDL
CjFT 1 MNRERDSLIVGRVIGDVLDLPPFTRRVALRVTYSSRDVTNGLELKPSSAVVEQPVRVEVGGNDL
CgFT 1 MNRERDSLIVGRVIGDVLDLPPFTRRVALRVTYSSRDVTNGLELKPSSAVVEQPVRVEVGGNDL
OGFT 1 MNRERDSLIVGRVIGDVLDLPPFTRSVSLRVTYTRCITNGLELKPSSVVVEQPVRVEVGGNDL

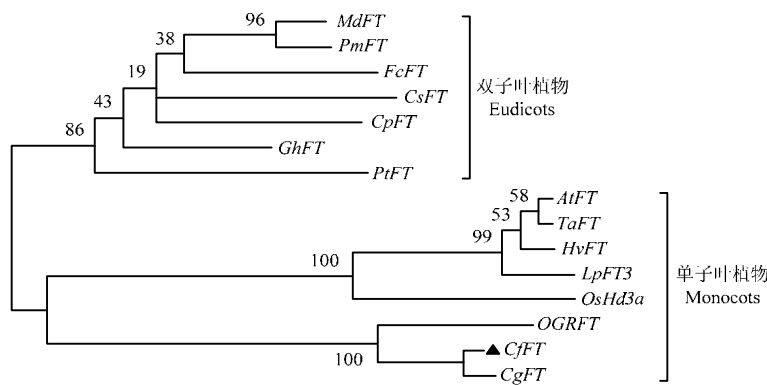
MdFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDNLKREYLHHLVTDIPATTAASFGQELVCYESPRPTVGIHRFV
PmFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDNLKREYLHHLVTDIPATTAASFGQELVCYESPRPTVGIHRFV
FcFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDNLREYLHHLVTDIPATTGASFGQELVCYESPRPTVGIHRFV
CsFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDNLREYLHHLVTDIPATTGATFGQELVCYESPRPTVGIHRFV
CpFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDNLREYLHHLVTDIPATTGASFGQELVCYESPRPTVGIHRFV
GhFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDNLREYLHHLVTDIPATTGASFGQELVCYESPRPTVGIHRFV
PnFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDNLREYLHHLVTDIPATTGASFGHEVVCYESPRPTMGHRFV
PtFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDNLREYLHHLVTDIPATTGASFGHEVVCYESPRPTMGHRFV
CjFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDHLREYLHHLVTDIPATTGATFGSEIVCYESPRPSLGIHRFV
CgFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPDHLREYLHHLVTDIPATTGATFGSEIVCYESPRPSLGIHRFV
OGFT 61 RTFYTLVMVDPDAPSPSPNQLREYLHHLVTDIPATTAATFGSEIVCYESPRPSLGIHRFV

MdFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGLPVAAVYFNCQRESGSGGRRV----
PmFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGLPVAAVYFNCQRESGSGGRRV----
FcFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGLPVAAVYFNCQRESGSGGRRV----
CsFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGLPVAAVYFNCQRESGSGGRRVQDDY
CpFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGLPVAASVYFNCQRESGSGGRRV----
GhFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGLPVAAVYFNCQRESGSGGRRV----
PnFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAEVLNGLSPVAAVYFNCQRESGSGGRRV----
PtFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAEVLNGLSPVAAVYFNCQRESGSGGRRV----
CjFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGSPVAAVYFNCQREAGSGGRRMQD---
CgFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGSPVAAVYFNCQREAGSGGRRMQD---
OGFT 121 FVLFRLQLGRQTVYAPGWRQNFNTRDFAELYNLGSPVAAVYFNCQREAGSGGRRMQD---

各序列分别为苹果的 MdFT (ACR16053)、梅花的 PmFT (BAH82787)、无花果的 FcFT (BAI60052)、黄瓜的 CsFT (BAH28253)、番木瓜的 CpFT (ACX85427)、黑杨的 PnFT (BAD02371)、毛果杨的 PtFT (XP_002311264)、棉花的 GhFT (ADK95113)、文心兰的 OGRFT (ACC59806) 和春兰的 CgFT (ADI58462)。黑色线条表示 FT 基因保守的关键氨基酸位点
 CfFT sequences was aligned with FT from *Malus×domestica* (MdFT, ACR16053); *Prunus mume* (PmFT, BAH82787); *Ficus carica* (FcFT, BAI60052); *Cucumis sativus* (CsFT, BAH28253); *Carica papaya* (CpFT, ACX85427); *Populus nigra* (PnFT, BAD02371); *Populus trichocarpa* (PtFT, XP_002311264); *Gossypium hirsutum* (GhFT, ADK95113); *Oncidium Gower Ramsey* (OGRFT, ACC59806); *Cymbidium georingii* (CgFT, ADI58462) using ClustalW. The black lines indicate amino acids that are critical to definition of proteins in the FT genes

图 1 CfFT 与其它植物 FT 类基因氨基酸序列同源比较

Fig. 1 Alignment of the deduced amino acid sequences of CfFT from *Cymbidium faberi* with those of FT orthologs from other plant species



除了图 1 中用于多序列比对的基因序列外 其它序列来源为 黑麦草的 LpFT3 (ABC33722)、水稻的 OsHd3a (BAB61027)、粗山羊草的 AtFT (ABI34864)、小麦的 TaFT (AAW23034)、大麦的 HvFT (AAZ38709)。各节点处数字表示 Bootstrap 值 (重复 1 000 次)
 The FT-like genes listed in the tree are as follows: *Lolium perenne* (LpFT3, ABC33722); *Oryza sativa* (OsHd3a, BAB61027); *Aegilops tauschii* (AtFT, ABI34864); *Triticum aestivum* (TaFT, AAW23034); *Hordeum vulgare* (HvFT, AAZ38709). The numbers at node represent the Bootstrap values (with 1 000 replicates)

图 2 不同物种 FT 类基因系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of FT-like genes in plant species

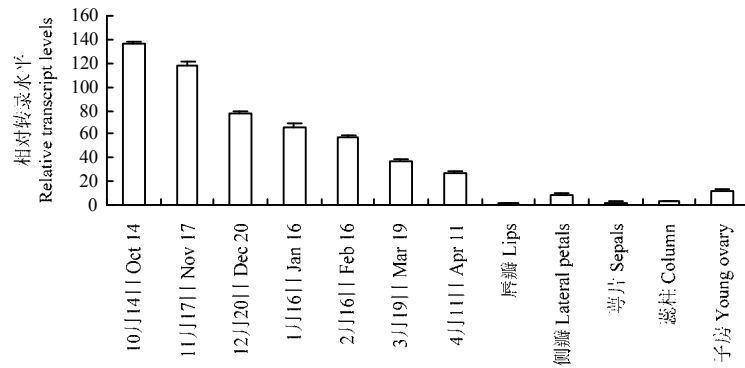


图3 *CfFT*在蕙兰花芽发育不同时期以及各花器官中的表达分析

Fig. 3 Expression patterns of *CfFT* at different developmental stage flower buds and different flower organs

20%。在蕙兰不同组织中，*CfFT* 在幼嫩子房中的表达量较高，在侧瓣中的表达量次之，在唇瓣、萼片和蕊柱中的表达量则很少。

2.4 烟草转化植株的表型观察及 *CfFT*在转基因烟草中的表达分析

为了验证 *CfFT* 基因的功能，将 *CfFT* 基因进行烟草转基因分析，共获得 25 个 T_0 代转化植株，其中 4 个转基因株系在转化 (74.5±3.3) d 后可形成花苞，但只有花萼，没有花筒和雌雄蕊，且植株不产生根系 (图 4-A)；另外 16 个转基因株系在移栽 (54.5±4.1) d 后

可开花，花形态正常，但植株明显高于野生型烟草，茎秆变细，节间变长，叶片变小 (图 4-B)；还有 5 个转化株系平均在移栽后 (41.6±3.8) d 开花，植株产生多个分枝 (图 4-C)。

对不同转基因株系中 *CfFT* 基因的表达分析表明，*CfFT* 的表达量与转基因烟草开花时间的早晚成正比。*CfFT* 在野生型烟草中不表达，在开花较迟的 35S::*CfFT-13* 中的表达量最低，在瓶内开花的 35S::*CfFT-2* 中的表达量最高，为最低表达量的 8 倍多 (图 5)。



A. 转化 69 d 后开花的转基因烟草株系 35S::*CfFT-2*。B. 移栽后 48 d 开花的 35S::*CfFT-13*。C. 移栽后 36 d 开花的 35S::*CfFT-22*

A. Transgenic tobacco 35S::*CfFT-2* initiated flower 69 days after transformation. The transgenic line with rooting and flowering abnormalities were only able to survive under culture conditions. B. A 48-day-old 35S::*CfFT-13* transgenic tobacco plant (left) grown on soil flowered earlier than the wild-type plant (right). C. A 36-day-old 35S::*CfFT-22* transgenic tobacco plant (left) grown on soil flowered earlier than the wild-type plant (right). Plant form changed greatly and no visible main stem was observed in this line

图4 转 35S::*CfFT* 基因烟草的表型分析

Fig. 4 Phenotypic analyses of transgenic tobacco plants ectopically expressing *CfFT*

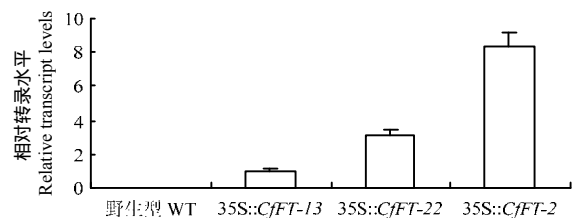


图5 *CfFT*在转基因烟草中的实时定量表达分析

Fig. 5 Real-time quantitative RT-PCR analysis for *CfFT* in the flower buds of 35S::*CfFT* transgenic tobacco plants

2.5 35S::*CfFT* 对烟草 NFL、NAP1 和 NtFUL 基因表达量的影响

LFY、AP1、FRUITFULL (FUL) 等基因在植物成花诱导过程中扮演重要作用，为了检测 35S::*CfFT* 对烟草 *LFY* 同源基因 NFL 以及 NAP1 和 NtFUL 表达的影响情况，对几个转基因株系花芽中 NFL、NAP1 和 NtFUL 基因的表达进行了实时荧光定量分析。结果如图 6 所示，NFL、NAP1 和 NtFUL 基因的表达量与

转基因烟草开花早晚成正比, 3 个基因都在瓶中开花
的 35S::CfFT-2 株系中表达量最高。

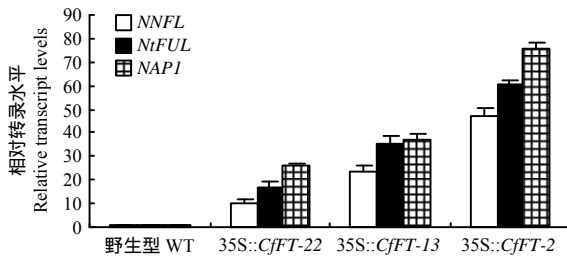


图 6 转 35S::CfFT 烟草 NFL、NAP1 和 NtFUL 基因表达量分析

Fig. 6 Expression analysis of NFL, NAP1 and NtFUL genes in the flower buds of 35S::CfFT transgenic tobacco

3 讨论

为了研究 FT 基因对蕙兰花期的调控作用, 从蕙兰中克隆了 1 个 CfFT 基因。序列同源分析以及系统进化分析表明, CfFT 蛋白具有 FT 类蛋白的两个保守基序, 属于 FT 亚家族成员 (图 1, 图 2)。

CfFT 在蕙兰花芽中的表达量较高 (图 3), 与文心兰^[12]、苹果^[14]、葡萄^[20]和钻天杨^[21]中的 FT 基因的表达类似, 并且在不同时期的花芽中, CfFT 与文心兰、苹果以及笔者克隆的春兰 (论文未发表) 中的 FT 基因一样都是在幼嫩花芽表达量最高, 然后在成熟花芽中表达逐渐降低。但这种表达模式却与拟南芥的 FT 和番茄的 TSF 基因的表达相反, 它们在花芽成熟过程中表达量逐渐增加^[9], 这可能与植物的生活型有关, 蕙兰是多年生的, 而拟南芥和番茄都是一年生的。

研究表明, 将水稻、文心兰、苹果、向日葵、紫花苜蓿以及生菜等植物中的 FT 类基因导入拟南芥, 转基因拟南芥均表现出明显的早花表型, 说明 FT 基因可以明显促进植物开花^[9-17]。笔者将 CfFT 导入烟草植株中, 转基因株系表现出明显的早花表型。另外部分转基因株系高度明显高于野生型烟草, 茎秆变细, 节间变长, 这与番茄^[22]和悬铃木^[23]中的 FT 类基因功能类似。还有部分株系产生多个分枝, 与柑橘^[24]以及悬铃木的 FT 基因功能也相似, 这些结果都表明 CfFT 与其它植物 FT 类基因功能类似。

在拟南芥中超量表达自身的 FT 基因后, 不同开

花时间的转基因拟南芥株系中的 API、FUL、SEP3 的表达量与 FT 的表达量成正比^[25]; 将文心兰的 OnFT 转入拟南芥超量表达后, 不同转基因拟南芥株系中的 API 的表达量与 OnFT 的表达量成正比^[12]; 将苹果 MdFT1 转入苹果超量表达后, 不同转基因苹果株系中的 LFY、API、FUL、SOC1 的表达量也与 MdFT1 的表达成正比^[14], 这些结果说明在转基因植株中 FT 基因上游调控这些基因的表达进而促进转基因植株开花。笔者对转基因烟草 35S::CfFT-3 等株系的 CfFT 基因的表达分析表明, CfFT 的表达量与转基因烟草开花时间的早晚成正比 (图 5)。进一步对烟草内源开花相关基因 NFL、NAP1 和 NtFUL 的表达分析发现其表达水平与 CfFT 的表达一致, 都与转基因烟草开花时间的早晚成正比 (图 6), 说明 CfFT 与文心兰、苹果中的 FT 类基因一样, 都能激活开花相关的 LFY、API、FUL 等下游基因从而促进植株开花。

4 结论

利用同源克隆并结合 RACE 技术克隆了蕙兰成花基因 CfFT 的全长 cDNA, 序列分析表明克隆到的基因为拟南芥 FT 基因的同源基因。实时定量表达分析表明 CfFT 在幼嫩花芽中的表达量最高。将 CfFT 导入烟草进行过表达, 可以显著促进烟草开花, 并且可以激活烟草开花相关的 LFY、API、FUL 等下游基因从而促进植株开花。该研究结果为深入探讨 CfFT 基因在蕙兰中的成花诱导作用奠定了理论基础。

References

- [1] Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, Ichinoki H, Notaguchi M, Goto K, Araki T. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral path-way integrator FT at the shoot apex. *Science*, 2005, 309 (5737): 1052-1056.
- [2] Wigge P A, Kim M C, Jaeger K E, Busch W, Schmid M, Lohmann J U, Weigel D. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science*, 2005, 309: 1056-1059.
- [3] 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: 1030-1033.
- [4] Jaeger K E, Wigge P A. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 2007, 17: 1050-1054.
- [5] Parcy F. Flowering : a time for integration. *International Journal of Developmental Biology*, 2005, 49: 585-593.

- [6] Bohlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa L, Brunner A M, Jansson S, Strauss S H, Nilsson O. *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science*, 2006, 312(5776): 1040-1043.
- [7] Helliwell C A, Wood C C, Robertson M, Peacock W J, 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. *Plant Journal*, 2006, 46(2): 183-192.
- [8] Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, Iwabuchi M, Araki T. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 1999, 286:1960-1962.
- [9] Kardailsky I, Shukla V K, Ahn J H, Dagenais N, Christensen S K, Ngyen J T, Chory J, Harrison M J, Weigel D. Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science*, 1999, 286: 1962-1965.
- [10] Hsu C Y, Liu Y, Luthe D S, Yuceer C. Poplar *FT2* shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering in poplar trees. *Plant Cell*, 2006, 18: 1846-1861.
- [11] Zhang H, Harry D E, Ma C, Yuceer C, Hsu C Y, Vikram V, Shevchenko O, Etherington E, Strauss S H. Precocious flowering in trees: the *FLOWERING LOCUS T* gene as a research and breeding tool in *Populus*. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(10): 2549-2560.
- [12] Hou C J, Yang C H. Functional analysis of *FT* and *TFL1* orthologs from orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) that regulate the vegetative to reproductive transition. *Plant Cell Physiology*, 2009, 50(8): 1544-1557.
- [13] Trankner C, Lehmann S, Hoenicka H, Hanke M V, Fladung M, Lenhardt D, Dunemann F, Gau A, Schlangen K, Malnoy M, Flachowsky H. Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta*, 2010, 232: 1309-1324.
- [14] Kotoda N, Hayashi H, Suzuki M, Igarashi M, Hatsuyama Y, Kidou S-i, Igasaki T, Nishiguchi M, Yano K, Shimizu T, Takahashi S, Iwanami H, Moriya S, Abe K. Molecular characterization of *FLOWERING LOCUS T*-like genes of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Cell Physiology*, 2010, 51: 561-575.
- [15] Blackman B K, Strasburg J L, Raduski A R, Michaels S D, Rieseberg L H. The role of recently derived *FT* paralogs in sunflower domestication. *Current Biology*, 2010, 20: 629-635.
- [16] Laurie R E, Diwadkar P, Jaudal M, Zhang L, Hecht V, Wen J, Tadege M, Mysore K S, Putterill J, Weller J L, Macknight R C. The medicago *FLOWERING LOCUS T* homolog, *MtFTa1*, is a key regulator of flowering time. *Plant Physiology*, 2011, 156: 2207-2224.
- [17] Fukuda M, Matsuo S, Kikuchi K, Kawazu Y, Fujiyama R, Honda I. Isolation and functional characterization of the *FLOWERING LOCUS T* homolog, the LsFT gene, in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(13): 1602-1607.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406-425.
- [19] 金冬雁, 黎孟枫. 叶分子克隆实验指南. 2 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- Jin D Y, Li M F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1992. (in Chinese)
- [20] Carmona M J, Calonje M, Martínez-Zapater J M. The *FT / TFL1* gene family in grapevine. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63: 637-650.
- [21] Igasaki T, Watanabe Y, Nishiguchi M, Kotoda N. The *FLOWERING LOCUS T / TERMINAL FLOWER 1* family in Lombardy poplar. *Plant Cell Physiology*, 2008, 49: 291-300.
- [22] Lifschitz E, Eviatar T, Rozman A, Shalit A, Goldshmidt A, Amsellem Z, Alvarez J P, Eshed Y. The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2006, 103: 6398-6403.
- [23] Zhang J, Liu G, Guo C, He Y, Li Z, Ning G, Shi X, Bao M. The *FLOWERING LOCUS T* orthologous gene of *Platanus acerifolia* is expressed as alternatively spliced forms with distinct spatial and temporal patterns. *Plant Biology*, 2011, 13: 809-820.
- [24] Endo T, Shimada T, Fujii H, Kobayashi Y, Araki T, Omura M. Ectopic expression of an *FT* homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research*, 2005, 14: 703-712.
- [25] Teper-Bamnolker P, Samach A. The flowering integrator *FT* regulates *SEPALLATA3* and *FRUITFULL* accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell*, 2005, 17: 2661-2675.

(责任编辑 曲来娥)