

·学科进展·

小麦春化相关基因在成花过程中的功能研究

种 康 许智宏 谭克辉

(中国科学院植物研究所,北京 100093)

[摘要] 通过实验工作提出了“*ver203* 基因有可能是控制冬小麦成花启动和花发育过程中的主要基因之一”的观点。同时简要总结了本实验室小麦春化相关基因克隆的研究系统,分析了目前国际植物发育生物学家对春化作用分子机理研究的最新进展。

[关键词] 春化相关基因功能,翻译 RNA,花粉管通道,转基因小麦

1 研究背景

春化作用是指冬性及2年生高等植物必需经过一个低温(2—10℃)处理过程才能开花的现象。许多农作物及花卉的成花都需要在营养生长期春化处理,而且经常同时需要有适当的光周期处理。因此,春化作用被认为在合适的环境条件下改变植物发育模式(营养生长向生殖发育)的机制。高等植物的成花过程(包括成花诱导即决定过程及花发端即花芽分化等过程)是植物个体发育的中心环节。它始于特定环境条件的作用下而进行的成花决定过程,此后,生长点才开始花或花序的分化。对于在高等植物开花分子机理的研究有助于人们运用基因工程技术直接控制植物花期的早晚,具有重要的理论意义和潜在的应用前景。

在近百年对开花过程的研究中,主要集中在成花的决定过程,特别是与“开花素”假说相关的研究,利用不同植物和植物组织培养系统,已在光周期诱导,春化作用,激素和代谢产物在开花过程中的生理作用等方面进行了大量的研究。但是,经过几十年的努力,未能在开花素学说研究中得到满意的结果,到70年代进入低谷,以生化为主要手段的代谢变化研究,亦因决定过程是一个漫长、复合多步骤性的复杂过程,难于找到控制点^[1,2]。80年代末和90年代初在国家自然科学基金委员会面上项目与“八五”重点项目和中国科学院重点项目的资助下,利用分子生物学技术和小麦实验系统首次克隆到春化相关基

因。使这一复杂问题找到了入手点。

植物春化作用是某些重要基因在一定条件下按一定时空顺序不断解阻遏而得到程序性表达的结果,它决定着生长点的分化方向。环境信号(如低温)刺激植物细胞后,可能通过受体引发细胞内一系列信号转导,应控制开花启动过程和花器官分化。这就是我们的学术思想。首先克隆春化相关基因cDNA全序列,利用反义RNA技术研究*ver*基因的功能,利用分子杂交技术研究冬小麦春化相关基因在其他高等植物存在的普遍性和表达特性,对进一步理解春化作用这一重要发育过程有着重要的理论意义,为在生产实际中有效的控制重要冬性作物的春化作用奠定了基础。1998年国家自然科学基金委员会和国家“九五”攀登计划项目继续给以该项目支持,开始通过反义转基因策略进行春化相关基因在成花过程功能的研究。

2 国内外研究状况

高等植物由营养生长向生殖发育转变过程是植物个体发育过程最关键的步骤,它决定着植物花期的早晚,故在学术上称之为成花的决定过程。当植物完成决定过程后,花器官形成和发育过程基本不需要特殊条件,可在正常的生长条件下进行,而决定过程则需要在特定的、以某一因子为主的综合环境条件下才能顺利进行和完成,例如,在实验条件下,人们常用日照长短(光周期)或低温(春化作用)来诱导植株开花,因此,在实验中又将成花的决定过

本文于1999年7月8日收到。

程称之为开花的诱导过程 (flowering induction process)。由于此过程与作物栽培, 引种驯化, 杂交育种等密切相关, 长期以来受到生产实践者和相关学者的关注, 并积累了许多现象, 只是到了本世纪 20—30 年代, 才被农业生物学家结合自己的实验需要, 总结出光周期现象 (photoperiodism) 及春化作用 (vernalization)。前者主要受日照长短所控制, 而后者则受低温的调节。当通过嫁接实验而提出的开花素 (hypothesis of florigen) 假说 (1936—1937) 之后, 才真正引起了各国植物学家及农学家浓厚兴趣, 并获得飞速的发展, 直到 60 年代末期, 长达 30 余年的多方努力, 仍不能确证开花素的化学性质, 而依然停留在假说阶段, 但又不能否定在光周期对叶片诱导之后, 确实有加速/抑制的信息由叶片传递到茎生长锥, 并引起后者分化的改变这个事实。所以在进入 70 年代之后, 由于没有提出新的研究思路, 研究陷入低谷, 直到 80 年代中期, 一些植物遗传学家才根据动物遗传学家应用化学或物理因子诱变果蝇在形态发生上产生改变并成功地克隆到相应的基因这一技术途径, 并在拟南芥等模式植物上, 成功地分离到控制花器官发生的多个基因, 即花发育的相关基因, 以及早花晚花等各种突变体, 从而打破了植物发育生物学的沉寂, 并使植物发育生物学的机理研究由以生理生化为主转变到以分子生物学及生理遗传学为主的研究途径, 有力地促进了植物发育生物学研究的深入和扩充。

上述新技术和新思路的结合, 为植物发育生物学注入了新的活力, 近十几年来发展很快。植物春化作用机理研究方面, Peacock 实验室仅根据用去甲基化学因子处理可部分取代春化处理的实验结果^[3], 提出了基因去甲基化是植物春化作用的分子基础, 但他们尚未得到春化特异基因。Ronemus 等人亦根据胞嘧啶甲基化转移酶转反义基因在成花过程表型的变化, 提出 DNA 甲基化是营养生长向生殖生长转化必需的过程^[4]。遗传学研究表明冬小麦中至少有 4 个基因 (Vrn1, Vrn4, Vrn3, Vrn5) 控制春化特性。Law 等人^[5]在拟南芥观察到春化敏感性的基因。利用拟南芥的突变体已定位了约 80 个位点影响开花时间 (包括促进开花和抑制开花基因)。通常可将参与开花诱导的基因按表达的时间和空间特性分成 2 类: 即与开花时间有关的基因 (flowering time gene) 和分生组织特征基因 (meristem-identity gene)。前一类基因的突变体会使突变体的开花时间提早或延迟, 这类基因中促进开花的包括: CO、LD、

FCA、ELF3 等基因, 抑制开花的如 EMF1。后一类基因决定新形成的原基的发育方向, 是继续营养生长的发育方式, 还是转向花的发育, 这类基因如 TFL1 和 TFL2、CLF、LFY、API 和 AP2、CAL 等。

根据影响开花时间的突变体对环境因子 (春化和光周期) 的反应, 结合遗传分析, 在拟南芥中已确立至少存在 4 条途径影响开花时间, 其中 2 条是调控植物本身的发育状态, 即 (1) 开花抑制途径 (floral repression pathway), 此途径中有关的基因的功能是在植物发育到一定大小或年龄之前抑制开花 (如 TFL1、CLF、WLC、EMF 等); (2) 自主促进途径 (autonomous promotion pathway), 其有关的基因随植物的发育, 起着拮抗上述抑制开花的作用 (如 LD、FCA、FVE、FPA, 等)。另 2 条途径受环境因子的影响, 即光周期促进途径 (photoperiodic promotion pathway) 及春化促进途径 (vernalization promotion pathway)。像春化作用相关基因 *fca* 和 *fri* 被认为是编码组成型促进开花途径组分 (constitutively promotes flowering)。春化相关基因 *co* 和 *fca* 已被美国和英国科学家分别通过突变体途径在拟南芥中克隆。新近图位克隆的春化相关基因 *FLC* 编码一个新的 MADS 域蛋白, 它是通过类似变阻器 (rheostat-like) 的机制控制植物开花^[6]。这些研究大大推动了对植物开花机理的认识, 但突变体途径多以形态发生的变化为指标, 所克隆到基因多是与形态发生直接相关, 而漫长的成花决定过程中并不发生形态发生的变化, 只是一种生理状态的改变, 或者以生化变化为主的多步骤性的复合过程。但至今未找到一个可以接受的指标, 来检验决定过程进行的程度。而是以茎生长锥分化或开花的早晚, 快慢以及开花的整齐度来间接推测决定过程进行的情况, 这种间接指标只能说明总的结果。而不是此过程进行的具体特点, 因此也很难据此提出深入研究的手点, 为此, 我们将注意点集中在成花决定过程中具体步骤的分析, 并取得如下主要研究成果。

2.1 研究开花决定过程的实验系统

与光周期诱导不同, 低温诱导不需要长距离的信息传导, 因为植物接受春化处理器官和反应器官均是茎生长点, 叶片仅起供给营养物质的作用。对冬小麦生长点在春化过程的代谢变化的研究曾观察到, 在春化作用中期对核酸及蛋白质抑制剂很敏感, 蛋白质组份的 PAGE 分析及 mRNA 体外翻译的实验证实了在这一时期有新的 mRNA 及蛋白质的形成^[7]。有人通过 DNA-RNA 体外杂交实验曾发现冬

小麦胚在经 30 d 春化后有新的 RNA 出现。因此推断与春化作用相关基因表达的控制位点在基因转录水平上。低温对植物的作用是多方面的,在自然条件下,春化过程进行的同时,也在进行植物对抗冻性的锻炼。而这种对低温胁迫的适应性反应,发生较早,在前 7 d 已经达到较高的水平。抗冻基因在低温处理开始后 2—3 h 已经开始表达,随后可以观察到蛋白的合成,随低温处理的延长而不断增加其量,转移到正常温度下数小时后,这些基因则已停止表达。而与冬小麦春化作用相关的基因表达起始较晚,通常在 14 d 以后才能检测到特异蛋白质的形成,在春化过程结束之前经 5 d 35℃ 高温暗处理(脱春化),会引起这些特异蛋白质的消失^[2]。显然,植物春化、脱春化和未春化或进行短时期的低温处理(4—5 d)植物开花时间的变化可能受程序化基因表达的调控,这一作用是在基因转录水平上进行的。这种与开花启动过程相伴随的特异生理生化行为,即为基因克隆提供了可以检测和验证的实验系统。

2.2 春化相关基因的分子克隆

近年来国际上主要应用遗传突变体来克隆花器官形态发生及其发育控制基因。已在金鱼草^[7]和拟南芥^[8]等植物中成功地克隆到花器官发生的控制基因,而且证明与 homeotic 基因有很高同源性。这是成花过程中花发端研究的重大突破。然而,在高等植物成花决定过程方面,在高等植物成花决定过程(即成花过程的上游工作)研究方面,不同的实验室分别试图通过逆转录途径克隆光周期诱导的特异基因,但由于光周期检测系统的缺陷而未成功。而我们基于春化作用过程中重要基因转录的程序化改变的观点,通过小麦未春化-春化-脱春化实验系统,运用差异筛选技术(differential screening)和差异显示技术(differential display)、而不是利用别人已发表序列,从 1994 年相继分离到一系列春化相关基因 cDNA 克隆。

我们根据春化过程中转录水平的差异,通过减法杂交以去除了春化与未春化材料中共同表达的 mRNA,并构建了富集低温诱导冬小麦 cDNA 文库。用春化、未春化和脱春化材料的 cDNA 作探针筛选到仅在春化材料中表达、而在未春化和脱春化材料中不表达的数个 cDNA 克隆(如 vrc203(Genbank/EMBL/DDBJ AB003130), vrc17(Genbank/EMBL/DDBJ AB003279), Vrg79)。利用差异显示技术获得 2 个特异表达的 cDNA 克隆(Vrg49, Vrg54)。Northern blot 证明了这些克隆与春化处理的特异性。GenBank/

EMBL/DDBJ 基因序列数据库同源分析结果表明它们是新的基因序列^[9—12]。新近还克隆到一个对春化处理有特异性的基因半全长 cDNA 序列(Genbank/EMBL/DDBJ AB012103)^[13]。它与大麦茉莉酸诱导的蛋白基因有较高的同源性。因此,推测这个基因可能是处于茉莉酸介导的信号转导途径中茉莉酸下游的信号转导元件,从而勾画出植物对低温环境因子应答模式和控制开花过程的可能机理。

2.3 春化相关基因的功能分析

已克隆到的这些基因在春化诱导的开花过程中确切功能可以用反义基因的理论和技术来证明。反义 RNA 技术是通过构建并在植物体内表达的反义基因,来阻遏体内该基因正义基因表达和功能发挥,以推测该基因功能或定向调控基因表达的研究策略,是目前国际流行的验证某个被分离基因在植物体内详细功能最有效的方法之一。反义 RNA 调节其基因表达,第一个例子是矮牵牛和烟草 CHS 基因^[14]。利用反义 RNA 调节蕃茄 PG 酶基因表达来控制其果实软化或通过这种技术将某些病毒互补 RNA 导入植物来产生抗病毒植株^[15]都获得成功。最近,我们通过这一思路首次初步证明了一个由我们实验室独立克隆的春化基因在开花过程中的功能^[16]。

众所周知,通过农杆菌介导的转基因方法转化小麦虽然有成功的报道,但至今仍非易事。由我国科学家周光宇教授实验室创立的花粉管途径转基因技术,具有操作简便、完全利用植物生命活动自然特性,不受激素等人为外加因子影响等优点,特别适于其他方法较难转化的作物(如小麦等禾谷类)。国内外学者利用花粉管途径已在棉花、水稻、高粱和小麦中得到转基因植株。我们实验室和曾君祉教授合作是第一个在小麦中利用该方法成功地证明功能目的基因的表达。阐明了春化相关基因在冬小麦开花启动和花器官发育中具有重要的控制作用^[16]。

通过花粉管通道法获得的所有转基因种子以及正常小麦种子一起萌发后,经 28 d 2—4℃ 的春化处理,和未春化处理的小麦幼苗(负对照)在常规条件下培养数月。它们在抽穗行为上有非常明显的差别。直到正常春化小麦植株和正义质粒处理小麦植株穗发育到形成籽粒的时候,反义基因处理组中许多植株仍处于拔节阶段。这种推迟开花行为与未春化处理组非常相似。它们营养生长发达,植株矮而粗壮,叶片宽大。统计分析结果表明春化的正义基因处理组和春化的正常小麦茎尖需约 102 d 开始分

化,再经过约 28 d 种子成熟。然而,反义基因处理组发育到抽穗期需要约 159 d,接近于未春化小麦抽穗所需要的时间。但与正义植株和正常春化的植株相比,其发育进程明显地推迟。反义转基因植株对春化诱导开花的迟钝反应(晚抽穗)可能是由于反义基因的高效表达所致。这已得到 Southern blot、Northern blot、PCR 扩增和 GUS 基因原位组织化学分析等实验结果的证实^[16]。

3 研究展望和发展趋势

高等植物生活周期需要经过种子萌发、营养生长、开花及花发育、受精、胚胎发育与种子形成等阶段。开花启动是植物营养生长转向生殖发育过程最重要的标志,温度和光周期是控制开花最重要的环境因子,其调控机理比花器官发生和发育更为复杂。这一过程对作物产量有直接的重要影响。随着利用拟南芥、金鱼草、水稻等重要模式植物对一系列控制花器官发生和发育基因的克隆及其功能的了解,开花启动过程基因调控机理已开始成为植物发育生物学新的研究热点。植物控制开花时间的基因倍受关注,特别是最近不断有在植物中分离到这类基因(如 *co*, *fca*, *fpf1*, *id1*, *ver203*, *ver17* 等)的研究报告和综述论文^[17],表明开花的基因调控脉络逐渐明确。同时,国际科学家合作进行的拟南芥、水稻等模式植物基因组计划中遗传图谱、物理图谱和 DNA 序列分析以及比较基因组学等取得的重要突破,还有正在兴起的功能基因组学研究的进展,已为利用模式植物进行功能基因(如生殖发育控制基因)系统分离和对生命现象的理解等研究提供了有利条件。预示着

开花基因调控网格即将被全面揭示。如,环境因子(如温度)对植物花发育的调控分子机理,植物如何接受环境信号?信号是通过何种途径转导的?等学术问题将有一个大的突破。生物学、化学、物理学和计算机科学等自然科学各个学科的相互渗透和生物各分支领域的交叉将大大加速人们对生命现象的理解和认识。

参 考 文 献

- [1] 谭克辉. 植物学集刊, 1992, 6: 13—16.
- [2] 种康, 谭克辉. 发育生物学进展, 北京: 高等教育出版社, 1994, 299—314.
- [3] Bum J E, Babbal D J, Metzger J D et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90: 287—291.
- [4] Ronemus J J, Galbiati M, Ticknor C et al. Sci., 1996, 273(2): 654—657.
- [5] Law P. The molecular biology of flowering (Ed. Jordan BR). 1993.
- [6] Michaels S D, Amasino R M. Plant Cell, 1999, 11: 949—956.
- [7] Sommer H, Beitzan J P, Huijser P et al. EMBO J, 1990, 9: 605—613.
- [8] Yanofsky M F et al. Nature, 1990, 346: 35—39.
- [9] 种康, 谭克辉, 黄华梁等. 中国科学(B辑), 1994, 24: 964—970.
- [10] Chong K, Wang L P, Tan K H et al. Physiol. Plant., 1994, 92: 511—515.
- [11] 种康, 谭克辉, 黄华梁等. 植物生理学报, 1997, 23(1): 99—102.
- [12] 赵大中, 陈民, 种康等. 科学通报, 1998, 43(14): 1201—1205.
- [13] 雍伟东, 种康, 许智宏等. 科学通报, 1999, 44(6): 623—627.
- [14] Van de Krol A R, Lenting P E, Veenstraal J et al. Nature, 1988, 333: 866—869.
- [15] Van de Krol A R, Mol JNM, Stuitje A R. Gene, 1988, 72: 45.
- [16] Chong K, Bao S L, Xu T et al. Physiol. Plant., 1998, 102: 87—92.
- [17] Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters A J M et al. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 345—370.

FUNCTIONAL ANALYSIS OF VERNALIZATION RELATED GENES DURING FLOWERING IN WHEAT

Chong Kang Xu Zhihong Tan Kehui

(Institute of Botany, CAS, Beijing 100093)

Abstract This suggests that the VER203 protein plays an important role in controlling heading and flower development in winter wheat. This paper also summarized our research system of vernalization in wheat, and reviewed the research advances on this field.

Key words vernalization related gene function, antisense RNA, pollen-tube pathway, transgenic winter wheat