

草莓 *FaAP1* 基因植物表达载体构建 及在拟南芥中的超表达

袁友泉 李超超 许馨月 张志宏 刘月学

沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161

摘要 为研究草莓 *AP1* 同源基因 *FaAP1* 的功能, 构建了其植物表达载体 pBI121-*FaAP1*, 并导入到农杆菌菌株 GV3101 中。利用花序浸染法将该基因导入拟南芥, 经抗性筛选、PCR 检测表明获得了 3 个转化株系。结果显示, 与对照相比, 转基因株系明显早花, 成花时间可提早 10 d 以上; 同时其营养生长受到抑制, 植株个体矮小, 莲座叶数目减少; 在早花的同时, 转化株系花器官异常, 不能形成种子。表明草莓 *FaAP1* 基因参与了成花过程的调控。

关键词 草莓; *FaAP1*; 拟南芥; 超表达

中图分类号 S 668.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)05-0013-06

栽培草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 是蔷薇科草莓属植物, 果实柔软多汁, 营养丰富, 经济价值较高, 在世界范围内广泛栽培, 目前中国的草莓栽培面积和产量均居世界第一。我国草莓生产中促成和半促成栽培方式约占八成, 其中日光温室生产是我国特有的栽培模式。在草莓设施栽培生产过程中, 如何促进植株进行高质量的花芽分化是使其提早上市并提高产量和质量以最终增加经济效益的关键技术环节。同时, 草莓成花条件与模式植物拟南芥差异很大, 如在光照需求方面, 拟南芥是长日照植物, 而大部分栽培草莓的成花需要短日照。此外, GA 在拟南芥成花中起诱导作用, 而在草莓上则表现为抑制成花, 促进匍匐茎抽生, 这说明草莓的成花分子机制与拟南芥存在一定的差异; 同时, 栽培草莓中除了一季型品种外还存在着可常年开花的四季类型 (ever-bearing), 对草莓成花调控的机制进行研究既有助于指导生产中的环境因素调控, 也可为草莓育种工作提供理论参考。

对成花基因的研究自 20 世纪 80 年代末兴起至今, 对拟南芥等模式植物成花的分子机制及其遗传控制研究取得了巨大的突破^[1-3], 为果树学科中类似的研究提供了许多可以借鉴的信息和手段。*AP1* (*APETALA1*) 是拟南芥中花序分生组织向花分生

组织转变过程中所必需的基因, 编码含有 MADS 结构域的转录因子, *AP1* 基因不仅在时空上调控花分生组织的形成与花器官的发生, 而且在拟南芥等植物中参与外两轮花器官 (萼片和花瓣) 的形成^[4-6]。*AP1* 基因的转录激活可以影响其他成花相关基因的表达, 如成花抑制因子 *TFL1* (*TERMINAL FLOWER 1*) 和 *SVP* (*SHORT VEGETATIVE PHASE*)^[7] 以及其他早期花器官发育所需的基因等^[8] 的表达都受到 *AP1* 的调控。目前, 已从苹果^[9-10]、葡萄^[11]、柑橘^[12]、桃^[13]、枇杷^[14] 等多种果树中分离出了 *AP1* 同源基因, 并证实了它们在相关果树成花进程中的重要作用。而且, *AP1* 基因的异源超表达可以促进多年生木本果树提早成花^[15-16], 进一步表明该基因在植物花发育中的“开关基因”作用。

目前对草莓成花调控的研究多着眼于环境条件、激素等对其成花的影响表现, 成花过程中的生理指标变化也有所报道, 但其内在的成花调控分子机制了解甚少。我们前期的研究^[17] 表明草莓的 *AP1* 同源基因 *FaAP1* 在基因结构、序列特征等方面和 *AP1* 类同源基因保守性较高, 定量表达检测结果也表明其参与了草莓成花进程的调控。为了进一步确认该基因的功能, 本研究对其在拟南芥中进行了超

收稿日期: 2014-10-12

基金项目: 辽宁省自然科学基金优秀人才培育项目(2014027015); 辽宁省教育厅科学研究一般项目(L2013258)

袁友泉, 硕士研究生, 研究方向: 草莓功能基因, E-mail: 1441126592@qq.com

通信作者: 刘月学, 博士, 副教授, 研究方向: 果树分子生物学, E-mail: yuexueliu@aliyun.com

表达,探讨其功能,以期为深入阐述该基因在草莓成花进程中的作用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

含目的基因 *FaAP1* 的重组质粒 pGM-FaAP1、植物表达载体 pBI121、农杆菌 GV3101、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) Col 野生型均由笔者所在实验室保存;实验中用到的 dNTPs(2.5 mmol/L、10 mmol/L)、ExTaq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、DL2000 DNA marker、 T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Sac* I、*Xba* I 购自 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 AXYGEN 公司。其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 植物表达载体构建

将重组质粒 pGM-FaAP1 和植物表达载体 pBI121 用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳后利用胶回收试剂盒分离回收所需片段。利用 T_4 DNA 连接酶将 *FaAP1* 定向插入到 pBI121 植物表达载体中 *GUS* 报告基因的位置。将连接产物转化大肠杆菌 TOP 10 感受态细胞,经 PCR、酶切和测序鉴定后,获得重组植物表达载体 pBI121-FaAP1。利用冻融法将含目的基因的重组植物表达载体质粒导入农杆菌 GV3101 中。

1.3 拟南芥转化

挑取含重组植物表达载体的 GV3101 新鲜单菌落,于附加 Kan 50 mg/L、Rif 100 mg/L 的 YEP 液体培养基中 28 $^{\circ}$ C 振荡培养至 D_{600} 为 0.6~0.8,于超净台上按照 1:100 比例取 2 mL 菌液(剩余菌液无菌保存、备用)于灭菌的新鲜 YEP 液体培养基中继续培养至 D_{600} 为 1.5~3.0,4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。用含 10% 蔗糖及 0.02% silwet 的 1/2MS 溶液稀释至 D_{600} 约为 0.8~1.0 备用。

拟南芥转化采用花序浸染法,将未开放的野生型拟南芥花序在上述菌液中浸泡 50 s 左右,避光生长 20 h 后正常培养,3~4 d 后用同样方法再重新转化 1 次。正常培养至果颊成熟,断水,收获种子。

1.4 抗性株系的获得

收获的种子晒干后于 4 $^{\circ}$ C 避光保存,筛选时在超净台上用 70% 乙醇消毒后用无水乙醇脱去多余水分,超净台吹干后播于含 Kan 50 mg/L、Amp 50 mg/L 的 1/2MS 培养基上培养筛选。挑选抗性株

系转移至营养钵中,抗性株系和野生型对照植株均于相同短日照培养条件下(12 h 光照/12 h 黑暗,22~24 $^{\circ}$ C)生长。

1.5 转化株系的 PCR 鉴定及表型分析

采用快速提取法^[18]提取不同抗性株系及野生型拟南芥的基因组 DNA,以其为模板进行 PCR 扩增,鉴定是否含有重组质粒中所含抗性基因 *Npt* II 片段(约 500 bp),以重组质粒为阳性对照,以野生型拟南芥和无菌水为阴性对照进行 PCR 扩增。引物序列为 Kan-F: GTTCTTTTTGTCAAGACCGACC、Kan-R: CAAGCTCTTCAGCAATATCACG。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 40 s,56 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

采用 CTAB 法提取野生型和转化株的 RNA,反转录采用宝生物工程(大连)有限公司的 Prime-ScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行,具体操作步骤参照其说明书。以反转录后获得的 cDNA 为模板,以扩增 *FaAP1* 基因全长序列引物 AP1FF: ATGGGAAGGGGTAGGGTT 和 AP1FR: TCATGAAGCAAAGCATCC 为扩增引物进行 PCR 扩增,检测基因是否表达。

表型分析主要观测记录转化株和对照株的成花时间、植株高度、莲座叶数量、花器官变化等。开花时间从播种日起记为 0,至初次成花日计算。采用佳能 EOS 7D 单反相机和奥林巴斯体视显微镜观察、拍照、记录表型。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建

将含 738 bp *FaAP1* cDNA 全长序列的重组克隆载体和由 CaMV 35S 组成型启动子驱动的 pBI121 植物表达载体用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳后分离 *FaAP1* 目的基因及 pBI121 载体大片段,二者经 T_4 DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌,铺含 Kan 50mg/L 的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养过夜。从平板中长出的菌落中随机挑取一些单菌落用无菌水悬浮后,用扩增 *FaAP1* 全长的引物进行 PCR 检测,取检测为阳性的菌液重新划线,再随机挑单菌落进行 PCR 检测后,获得完全为阳性菌落的平板。从阳性平板上挑取单菌落摇菌提取重组质粒 DNA,经 *Xba* I 和 *Sac* I 限制性内切酶双酶切(图 1)和测序鉴定后,获得重组植物表达载体 pBI121-FaAP1。

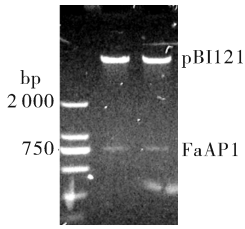


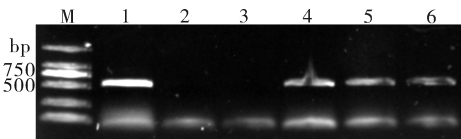
图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 Detection of the recombinant plasmid with digestion by *Xba* I and *Sac* I

2.2 抗性株系获得及 PCR 鉴定

农杆菌花序浸染后收获拟南芥种子，干燥后消毒播种于含重组质粒抗性的抗生素平板上，共筛选出 3 个能正常生根、叶片为正常绿色的抗性株系，其余种子萌发所形成的小苗则失绿、变黄，不能形成正常根系，并逐渐死亡。

对获得的 3 个抗性株系及野生型植株移栽入营养钵，成苗后分别提取其基因组 DNA，经电泳检测质量良好。针对 *Npt* II 基因片段的扩增结果表明，在质粒阳性对照及所获得的抗性植株中均可扩增出 *Npt* II 基因目的片段，而野生型拟南芥和清水阴性对照中则扩增不出该条带(图 2)，表明重组质粒已经整合进抗性株的基因组 DNA 中，确认为转化株系。



M:DL2000 marker; 1:质粒阳性对照; 2:野生型拟南芥阴性对照; 3:清水对照; 4~6:抗性株系。M:DL2000 marker; 1:Plasmid as a positive control; 2:Wild-type *Arabidopsis*; 3:Sterile water as a negative control; 4-6:Resistant lines.

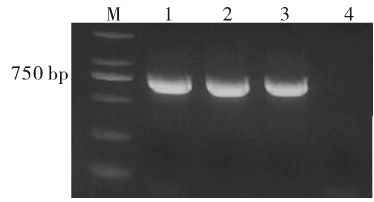
图 2 抗性株系的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR detection of resistant plants

对 3 个 PCR 鉴定为阳性的株系进行 RT-PCR 以检测目的基因是否表达。结果表明，在以所有阳性株系提取的 cDNA 为模板进行的 RT-PCR 扩增结果中均可检测到目的基因条带，而对照野生型植株中则检测不到条带(图 3)，证实了在 3 个阳性株系中所插入的目的基因都得到了表达。

2.3 表型分析

对获得并经 PCR 鉴定确认的转化株系和野生型对照拟南芥进行相同条件的培养，表型观察表明草莓 *FaAP1* 基因的超表达可以明显促进拟南芥生殖生长，并对其营养生长具有显著的抑制作用。



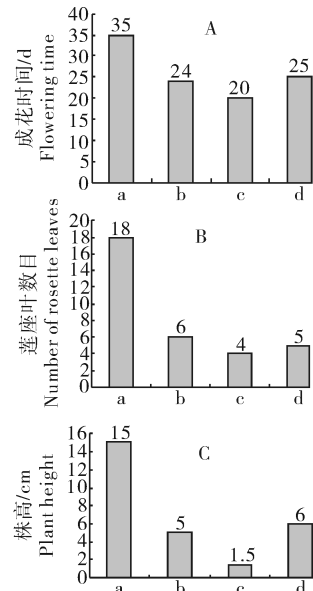
M: DL2000 marker; 1~3: 抗性株系; 4: 野生型拟南芥。
M:DL2000 marker; 1-3:Resistant lines; 4:Wild-type *Arabidopsis*.

图 3 抗性株系的 RT-PCR 检测

Fig.3 RT-PCR detection of resistant plants

1) 成花时间及成花习性。与未转化的野生型拟南芥相比，转化株系的成花时间都明显提前。在本研究设置的短日照条件下，播种 20 余天后，野生型拟南芥仍处于旺盛的营养生长期，未见花轴形成，但转化株系已经陆续成花(图 4 A, 图 5 A)，最早的株系成花时间要比野生型对照提早半个月左右(line 2)。

除了成花时间提早外，成花习性也发生明显变化。野生型拟南芥为标准的无限型花序，其花轴上可抽生大量次级花序，但在 *FaAP1* 超表达的植株中，次级花序提早转变为单独的花(图 5 D)。



a.野生型 WT; b.转化株系 1 Line 1; c.转化株系 2 Line 2; d.转化株系 3 Line 3.

图 4 转化株与野生型性状比较

Fig.4 Characteristics comparison of transformants and WT

2) 营养生长状况。与成花时间所代表的生殖生长提前相反，代表营养生长的莲座叶数量在野生型和转化株间也具有明显差别。在抑制其成花的短日照条件下，野生型拟南芥莲座叶数量多，大而厚，而

在超表达株系中,莲座叶数量明显减少,叶片小而薄(图4 B,图5 A)。同时由于过早成花,转化植株高度也远矮于野生型对照,其中一个株系仅生长到1.5 cm就停止生长(图4 C)。

3)花器官特征变化。除了成花时间明显提早

外,转化株的花器官也发生了一定变化。在转化株中可发现有顶端花中重新抽生新的花器官的现象(图5 C),花器官畸形的现象同样存在(图5 B)。由于花器官的形态发生了变异,转化株系都表现为败育,不能产生正常的种子。



A:野生型(左)和提早成花的转化株(右); B:种子败育的畸形花; C:复合花; D:转变为单花的次级花序 A: WT (left) and early-flowering transgenic *Arabidopsis* plant (right); B: Abnormal flowers which couldn't germinate seeds; C: Duplicated flowers; D: Secondary inflorescence turning into single flower.

图5 超表达 *FaAP1* 基因拟南芥表型

Fig.5 Phenotypes of *Arabidopsis* plants overexpressing *FaAP1*

3 讨论

作为草本水果,草莓的成花并不像多年生木本果树那样存在童期等问题,但生产中也存在如何合理调节花期以提高草莓的商品价值等问题。同时,栽培草莓中存在不同成花习性的品种类型,了解其成花的分子调控机制对于指导生产和育种工作具有同样重要的意义。

分子生物学研究已经揭示了 *AP1* 类基因在植物成花进程中的关键作用,多个成花分子调控通路的产物如 *LFY* (*LEAFY*) 和 *FT* (*FLOWER LOCUST*) 等都可以与 *AP1* 基因互作,并启动其表达进而促进成花^[19-20]。拟南芥中 *AP1* 基因既是花分

生组织特征基因,又是花器官形态特征基因,与萼片和花瓣的发育有关^[21-22]。很多其他物种中的该类同源基因也被证实参与了成花调控^[10-14],*AP1* 类基因的表达标志着成花的启动。

我们前期的研究已从栽培草莓中分离出了该同源基因,其序列结构和表达特性都揭示了其很可能在草莓成花的分子调控网络中发挥重要作用^[17],本研究对其在拟南芥中的超表达证明了这一点。*FaAP1* 基因的超表达明显促进了拟南芥的提早成花,表明该基因与拟南芥中的 *AP1* 基因功能类似,苹果^[9]、柑橘^[12]等植物中的 *AP1* 类基因也具有相同的作用。花序分生组织的形成和花分生组织的形成是两个不同的过程,在转化株系中顶花序和次级

花序被单花代替的表型表明 *FaAP1* 基因的超表达抑制了花序分生组织的形成而强烈刺激了花分生组织的形成。

生殖生长和营养生长在植物生长发育过程中存在着既相关又竞争的关系, *FaAP1* 的超表达使拟南芥的生殖生长进程显著提前的同时明显抑制了其营养生长, 因此, 在本研究中, 明显早花的转化株系表现出植株矮小、莲座叶数量减少等营养生长缩短的现象。

除了启动花分生组织的形成外, 拟南芥中的 *AP1* 基因还参与花器官的形成, 是成花的 ABC 模式中的 A 类型基因, 与萼片和花瓣的形成有关^[6]。但在其他植物中的研究表明虽然有些该类同源基因也参与了花器官的形成, 但并不局限于 A 类型基因的作用。如柑橘^[12] 和番红花^[23] 中该同源基因在所有的四轮花器官中都有表达。我们的前期研究表明 *FaAP1* 基因也参与了草莓部分花器官的形成。其在草莓的萼片中表达强度最高, 在花瓣中有痕量表达, 在内两轮花器官中检测不到其表达^[17]。在拟南芥中的超表达导致转化株中多数花器官畸形, 证实了其参与花器官形成的调控。另外, 拟南芥中 *AP1* 基因不仅决定着外两轮花器官的形成, 而且也影响控制其他花器官形成基因的表达^[5], 这可能也是导致转化株中花器官畸形的原因。

本研究以草莓的 *AP1* 类基因为切入点, 通过在拟南芥中的异源超表达初步证实了 *FaAP1* 基因在诱导花分生组织形成和花器官形成中的作用。同时, 鉴于该类基因在植物成花进程中所扮演的“开关基因”的重要作用, 本研究中对 *FaAP1* 基因功能的初步确认也可为后续阐明草莓成花分子调控网络的研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] RATCLIFFE O J, BRADLEY D J, COEN E S. Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 1999, 126(6): 1109-1120.
- [2] ARAKI T. Transition from vegetative to reproductive phase [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(1): 63-68.
- [3] BATTEY N H, TOOKE F. Molecular control and variation in the floral transition [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(1): 62-68.
- [4] PARCY F, NILSSON O, BUSCH M A, et al. A genetic framework for floral patterning [J]. *Nature*, 1998, 395(6702): 561-566.
- [5] MEDARD N G, YANOFSKY M F. Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by *APETALA1* [J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(4): 739-753.
- [6] KAUFMANN K, WELLMER F, MUÑO J M, et al. Orchestration of floral initiation by *APETALA1* [J]. *Science*, 2010, 328(5974): 85-89.
- [7] WELLMER F, RIECHMANN J L. Gene networks controlling the initiation of flower development [J]. *Trends in Genetics*, 2010, 26(12): 519-527.
- [8] MANDEL M A, YANOFSKY M F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1995, 377(6549): 522-524.
- [9] SUNG S K, YU G H, AN G. Characterization of *MdMADS2*, a member of the *SQUAMOSA* subfamily of genes in apple [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120(4): 969-978.
- [10] KOTODA N, WADA M, KOMORI S, et al. Expression pattern of homologues of floral meristem identity genes *LFY* and *AP1* during flower development in apple [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2000, 125(4): 398-403.
- [11] CALONJE M, CUBAS P, MARTÍNEZ-ZAPATER J M, et al. Floral meristem identity genes are expressed during tendrill development in grapevine [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(3): 1491-1501.
- [12] PILLITTERI L J, LOVATT C J, WALLING L L. Isolation and characterization of *LEAFY* and *APETALA1* homologues from *Citrus sinensis* L. Osbeck Washington [J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2004, 129(6): 846-856.
- [13] LI C, XIE H, ZHANG L, et al. Molecular characterization of the *PpMADS1* gene from peach [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2012, 8(4): 831-840.
- [14] LIU Y, SONG H, LIU Z, et al. Molecular characterization of loquat *EjAP1* gene in relation to flowering [J]. *Plant Growth Regulation*, 2013, 70(3): 287-296.
- [15] PEÑA L, MARTÍN-TRILLO M, JUÁREZ J, et al. Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(3): 263-267.
- [16] FLACHOWSKY H, PEIL A, SOPANEN T, et al. Overexpression of *BpMADS4* from silver birch (*Betula × pendula* Roth.) induces early-flowering in apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. *Plant Breeding*, 2007, 126(2): 137-145.
- [17] 邹冬梅. 草莓成花相关基因的克隆及表达分析 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学园艺学院, 2012.
- [18] 徐平丽, 赵晋平, 孟静静, 等. 一种适宜拟南芥 PCR 检测的 DNA 提取方法 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(13): 6653-6654.
- [19] WAGNER D, SABLÓWSKI R W M, MEYEROWITZ E M. Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY* [J]. *Science*, 1999, 285(5427): 582-584.
- [20] WIGGE P A, KIM M C, JAEGER K E, et al. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Ar-*

- abidopsis* [J]. *Science*, 2005, 309 (5737): 1056-1059
- [21] HUIJSER P, KLEIN J, LONNIG W E, et al. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus* [J]. *The EMBO Journal*, 1992, 11(4): 1239-1249.
- [22] MANDEL M A, GUSTAFSON-BROWN C, SAVIDGE B, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* [J]. *Nature*, 1992, 360(6401): 273-277.
- [23] TSAFTARIS A S, PASENTSIS K, ILIOPOULOS I, et al. Isolation of three homologous *AP1*-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.) and characterization of their expression [J]. *Plant Science*, 2004, 166(5): 1235-1243.

Constructing *FaAP1* expression vector of strawberry and its ectopic-expression in *Arabidopsis*

YUAN You-quan LI Chao-chao XU Xin-yue ZHANG Zhi-hong LIU Yue-xue

College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Abstract To evaluate the function of *FaAP1*, an *AP1* homologue of strawberry, the plant expression vector pBI121-*FaAP1* was constructed and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101. *FaAP1* was transferred into *Arabidopsis* with floral-dip method. Three transgenic lines were successfully obtained and verified by antibiotic screening and PCR. The flowering time of transformants was over 10 days earlier than that of the wild-type. The vegetative growth of transformants was inhibited, with a dwarf plant height and less rosette leaf numbers. The floral organs of the transformants were abnormal and did not produce fertile seeds. It is indicated that *FaAP1* may be involved in regulating the flowering process. It will provide a basis for further studying the role of this gene in the flowering processing of strawberry.

Key words strawberry; *FaAP1*; *Arabidopsis*; ectopic-expression

(责任编辑: 张志钰)