

野生大豆 *GsAP1* 基因的克隆及功能分析

郭文雅, 崔艳梅, 喻德跃, 黄 方

(南京农业大学 大豆研究所/作物遗传与种质创新国家重点实验室/国家大豆改良中心/农业部大豆生物学与遗传育种实验室(综合性), 江苏南京 210095)

摘 要: *AP1* 转录因子在控制花器官的诱导与发育中起着重要的作用, 对植物的成花诱导, 促进植物提前开花有重要的意义。从野生大豆中分离克隆得到 1 个 *AP1*-like 基因, 并命名 *GsAP1*, 该基因全长 711 bp, 包含完整的开放阅读框, 编码 237 个氨基酸。利用实时荧光定量 PCR 技术对 *GsAP1* 在野生大豆不同组织中的表达情况进行了分析, 结果显示 *GsAP1* 只在花中表达, 在四轮不同花器官中的表达显示 *GsAP1* 在花萼中表达量比较高, 在花瓣中表达量较低, 在雄蕊和心皮中不表达。洋葱表皮细胞瞬时表达系统表明 *GsAP1* 蛋白定位于细胞核中。酵母转录激活试验显示 *GsAP1* 具有明显的转录激活活性。在转基因烟草植株中 *GsAP1* 的表达量显著提高, 并且使转基因植株的开花期比对照大幅度提前。本文探讨 *GsAP1* 在大豆成花中的作用机理, 为培育大豆新品种提供了分子资源和理论基础。

关键词: 野生大豆; 花发育; *AP1*; 转录因子; 功能研究

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.06.0919

Cloning and Functional Analysis of *GsAP1* in Wild Soybean

GUO Wen-ya, CUI Yan-mei, YU De-yue, HUANG Fang

(Soybean Research Institute, Nanjing Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement/National Center for Soybean Improvement/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Soybean, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: *AP1* plays an important role in controlling floral organ formation and development. In this report, we isolated an *AP1*-like gene, designated *GsAP1*, from the wild soybean flowers. The fragment was 711 bp and contained an open reading frame coding a polypeptide of 237 amino acids. Expression of *GsAP1* was analyzed by the method of real-time PCR. The result showed that *GsAP1* only expressed in flowers; in the four whorls of floral organs, expression of *GsAP1* was prominent in sepals while very weak in the petals, not in stamens and capels; and increased during the course of seed development. Subcellular localization assay suggested that *GsAP1* was localized in nucleus. The transcriptional activation ability of *GsAP1* protein was confirmed by the yeast assay system. Further we found that *GsAP1* caused early flowering when ectopically expressed in tobacco. The mechanism of *GsAP1* in soybean was discussed in this paper, which provided molecular resources and theoretical basis for the breeding of soybean varieties.

Keywords: Wild soybean; Floral development; *AP1*; Transcription factor; Functional analysis

SQUA 亚家族基因主要在花序和花分生组织中表达, 大多数是花分生组织决定基因。拟南芥 SQUA 亚家族有 3 个成员: *AP1*、*CAL* 和 *AGL8/FUL*。它们与分生组织决定、花器官发育功能、果荚发育有关^[1]。*APETALA 1 (AP1)* 既是花分生组织的特征基因, 又是花器官的特征基因。在花分化初期, 它在整个花原基里表达; 在花器官分化阶段, *AP1* 在萼片和花瓣中表达。

花分生组织特征基因 *AP1* 强烈影响植物的开花机理^[2-3]。*AP1* 是来源于拟南芥的花分生组织决

定的基因, 它的突变使拟南芥的花转变成花序茎, 而且也使花器官的萼片与花瓣发育异常^[4-6]。*AP1* 基因属于 ABC 模型中的 A 类基因, 它编码的蛋白属于 MADS 家族成员, 具有转录调节因子功能, 在 ABC 模型中起决定花器官作用^[7-9]。同时它自身的表达会受到花分生组织决定因子 LFY 的激活和开花时间决定因子 FCA 的影响, 同时也受到花分生组织决定因子 TEL1 的抑制^[10-11]。*AP1* 基因在幼龄的花原基上均一的表达, 而后定位于花萼和花瓣上。Mandel 等^[7]利用 CaMV35S 启动子使 *AP1* 基因在拟

收稿日期: 2016-06-22
基金项目: 国家自然科学基金(31571688)。
第一作者简介: 郭文雅(1985-), 女, 硕士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: cat3.0@163.com。
通讯作者: 黄方(1977-), 女, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: fhuang@njau.edu.cn。

南芥中组成型表达,大多数转基因植物的开花时间都比野生型植物的开花时间早。这说明 *AP1* 基因编码了1个控制花发育的开关,对从花序分生组织转变成花分生组织既是必须的又是足够的。

现在 *AP1* 同源基因已在数十种植物中分离得到。研究表明,大多数转 *AP1* 基因植物的开花时间都比野生型短,说明在植物成花过程中该基因起着至关重要的作用。Chi 等^[12] 从大豆中分离到 *AP1* 基因,在烟草中异源表达表现出早花现象。Kotoda 等^[13] 在拟南芥中异源表达苹果的 *AP1* 基因也可促使转基因拟南芥出现早花现象。Chen 等^[14] 克隆了3个百合的 *AP1* 同源基因,这3个基因过量表达后均能使转基因拟南芥提早开花;Pena 等^[15] 将 *AP1* 和 *LFY* 基因分别转入柑橘中,发现转基因植株1年后都能正常开花结果,而且这2个基因过量表达后与转基因植株效果相似,早花的特征可以稳定遗传。Qu 和 Huang 等^[16-17] 将白桦 *BpAP1* 基因在烟草和白桦中进行遗传转化,结果表明 *BpAP1* 基因在同源和异源转化中,转基因植株都提前开花,生长周期也缩短了。杨郁文等^[18] 把利用农杆菌介导法将 *AP1* 基因转化油菜,也使花期明显提前。

野生大豆往往具有农艺性状上有利的基因,如抵抗生物和非生物胁迫,因此对野生大豆的改良具有重要价值。认识野生大豆花发育的相关分子机制有利于不同生育期品种的选育,加快优良农艺性状从野生种到优异育种品系的渗入,并丰富我们在不同的作物品种中对种子进化和作物驯化的理解。但是目前有关野生大豆花发育相关基因的研究甚少,且野生大豆 *AP1* 同源基因的研究尚未报道。本试验利用基因特异性保守引物,从野生大豆中克隆了 *AP1* 同源基因,旨在对 *AP1* 基因同源序列进行克隆和序列分析,为野生大豆花发育分析提供资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试野生大豆品种江浦野生豆-5,由南京农业大学国家大豆改良中心种子资源库提供,野生型三生烟由本实验室保存。

1.1.2 菌株、载体及试剂 大肠杆菌 DH5 α 感受态购自北京天根科技有限公司,根癌农杆菌 EHA105 和表达载体 pBI121、pMDC83 由本实验室保存。GateWay 载体构建系统购自英潍捷基(上海)贸易有

限公司。酵母菌株 YRG-2、阳性对照 pGAL4 质粒、阴性对照 pBD-GAL4-Cam 质粒由北京遗传与发育研究所张万科博士馈赠。

各种限制性核酸内切酶购自晶美生物公司。TaqDNA 聚合酶、dNTP 购自鼎国生物公司,LaTaq 酶、T4 DNA Ligase、连接载体 pMDTM 19-T Vector (D102A) 购自大连宝(TaKaRa)生物工程公司。DNA Marker DL2000 及 2000 Plus 购自 TransGen 公司。RNA 提取试剂盒(DP419)、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209)、质粒小提试剂盒(DP103)购自北京天根科技有限公司。cDNA 合成试剂盒 First Strand cDNA Synthesis Kit-ReverTra Ace- α TM (Code No. FSK-100) 购至 TOYOBO 公司。PCR 引物合成及 DNA 序列测定由英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。抗生素、激素、氨基酸和常规化学试剂类购于南京基天公司。

1.2 方法

1.2.1 材料的种植与收集 江浦野生豆-5 经过种脐背部切口处理后,于6月初播种于南京农业大学网室,苗期搭架。田间管理同常规。出苗后28d 取根、茎、叶、茎尖;初花期取花芽;盛花期取花苞和盛花;开花后10,15,20,25,30,35,40,45,50 d 取种子。盛花取下后无菌条件下迅速分离各轮花器官:花萼、花瓣、雄蕊和雌蕊,分别液氮速冻后-80℃保存备用。

1.2.2 *GsAP1* 基因的克隆 野生大豆 RNA 的提取采用 RNA 提取试剂盒法进行。上样量 2 μ L,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量,参照 cDNA 合成试剂盒 First Strand cDNA Synthesis Kit-ReverTra Ace- α TM 的试验步骤合成 cDNA 的第一条链。应用 Prime 5.0 软件设计引物,交由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。上游引物 L1: ATGGGAAGGGG-TAGGGTT,下游引物 L2: TGTCAAATGCCATAC-CAAAGC。

PCR 反应体系(20 μ L)为:10 \times Taq Buffer 2 μ L,dNTP Mixture(2.5 mmol \cdot L⁻¹)2 μ L,Taq DNA Polymerase 0.5 μ L,L1(10 μ mol \cdot L⁻¹)1 μ L,L2 1 μ L,cDNA 0.5~1 μ L,补灭菌 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 反应程序为:95℃预变性 5 min;94℃变性 50 s,60℃退火 50 s,72℃延伸 90 s,32 个循环;72℃延伸 10 min。

PCR 产物采用 1.0% TAE 琼脂糖凝胶电泳检

测,目的片段长度为 1 224 bp。目的片段用胶回收试剂盒回收后检测浓度,取合适量与 pMD19-T Vector 4℃连接过夜。转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,涂布于含有筛选抗生素的培养基上。利用 PCR 技术或者提取质粒酶切鉴定的方法,进行转化后重组子的鉴定。鉴定正确后送交英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序。

1.2.3 组织表达谱分析 对野生大豆不同发育时期、不同组织器官分别提取 RNA,合成并且纯化 cDNA 第一链。以此 cDNA 为模板,进行荧光定量 RT-PCR 分析。根据上一步的测序结果,利用 Prime 5.0 设计荧光定量 PCR 引物:上游引物 L3:GGAGAAAGTGATACAGGAGCAGAAT,下游引物 L4:GCTGCGTAGCAAGAAAGATG,扩增片段长度为 105 bp。以大豆的 *Tubulin* 基因作为内参。

用 SYBR® Green PCR Master Mix 反应混合液 (ABI)进行实时荧光定量 PCR 分析。20 μL 反应体系包括 cDNA 模板 2 μL,上下游引物各 1 μL SYBR® Green PCR Master Mix 反应混合液 10 μL,补灭菌 ddH₂O 至 20 μL。反应程序为:95℃ 预变性 15 min;95℃ 变性 15 s,50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,40 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 反应结束后分析荧光值变化曲线以及溶解曲线。

1.2.4 植物表达载体的构建 利用上游引物 L1:GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGAAGGGGTAGGGTTCAGCTGA 和下游引物 L2:GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAAAGCATCCAAGGTGACAGGAA,以测序正确的连接有全长 *GsAP1* cDNA 的 pMD19-T 载体为模板,扩增出完整的开放阅读框,包含终止子。利用 GateWay 载体构建系统,经过 BP 反应,将目的片段连接到入门克隆载体 pDONOR221 中,测序正确后进行 LR 反应,经过重组交换,使目的片段连接到表达载体 pMDC83 中,构建含有目的基因的表达载体 pMDC83-*GsAP1*。经过菌液 PCR 及酶切鉴定后,转化农杆菌 EHA105 感受态细胞,涂布于含有利福平、潮霉素和卡那霉素的 YEB 固体平板上。28℃ 倒置培养 36 ~ 48 h。挑取单菌落 PCR 鉴定,正确无误后,-80℃ 保存备用。

1.2.5 亚细胞定位 利用上游引物 L1:GGGGA-CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGAAGGGGTAGGGTTCAGCTGA,和下游引物 L5:GGGGAC-

CACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAAGCATCCAAAGGTGACAGGAA,以测序正确的连接有全长 *GsAP1* cDNA 的载体为模板,扩增出完整的开放阅读框,不含终止子。利用 GateWay 载体构建系统,经过 BP 和 LR 反应,构建含有目的基因与 *GFP* 融合的表达载体 pMDC83-*GsAP1-GFP*。农杆菌介导法侵染经 MS 培养基预培养 24 h 的洋葱表皮细胞,暗培养 36 ~ 48 h 后,利用 Leica TCS SP2 激光扫描共聚焦荧光显微镜观察 *GFP* 报告基因的定位情况。

1.2.6 转录激活功能分析 根据阴性对照 pBD-GAL4-Cam 载体特点,选择 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切位点,设计双酶切引物 *Eco*RI-A:CCGGAATTCATGGGAAGGGGTAGGGTTCAG;*Pst*I-L:AAAAGTGCAGTCAAAAGCATCCAAGGTGACA,下划线处为酶切位点。以连接有全长 *GsAP1* cDNA 的载体为模板,扩增出完整的开放阅读框。目的片段及阴性对照 pBD-GAL4-Cam 经过 *Pst* I 和 *Eco*R I 双酶切后回收,T4 连接酶连接,构建与 GAL4-BD 融合的效应质粒 pBD-*GsAP1*,涂布于含有氯霉素的 LB 平板上。经过测序及酶切验证 *GsAP1* 与 GAL4-BD 融合表达的读码框正确后,按照 Stratagene 公司的 GAL4 Two-Hybrid Phagemid Vector Kits 的标准酵母转化步骤,将重组质粒 pBD-*GsAP1*、阴性对照质粒 pBD-GAL4-Cam 和阳性对照质粒 pGAL4 分别转化酵母菌株 YRG-2。pBD-*GsAP1* 和阳性对照 pGAL4 质粒涂布于 SD/-His 缺陷培养基上;阴性对照 pBD-GAL4-Cam 涂布于 SD/-Try 缺陷培养基上,30℃ 倒置培养 4 ~ 6 d。结合菌液 PCR 筛选转化子。YPAD 培养基摇菌培养 2 ~ 3 d 后,在 SD/-His 缺陷平板和 YPAD 固体划板上分别划线培养,观察转化子的生长情况。按照酵母表达载体的功能活性检测步骤进行 β-半乳糖苷酶活性显色检测。

1.2.7 *GsAP1* 对烟草的遗传转化及相关功能分析 (1)烟草的遗传转化:采用 1.2.4 保存的菌液,经过划线活化后,大量扩繁,要求菌液 OD₆₀₀ 为 0.5。采用农杆菌介导的烟草改良叶盘转化法侵染烟草叶片,生长于 MS1 基本培养基上,48 h 后更换为分化培养基 MS2;再生植株长大后更换至 MS3 生根培养基上。生根 10 d 左右后炼苗,移植到盆中营养土上生长。注意浇水及管理,同时记录相关性状的变化。空载体作为对照。

(2)阳性植株的鉴定:采用 CTAB 法,提取转基

因烟草植株的 DNA,运用不同的引物组合进行 PCR 扩增,初步鉴定阳性植株。

(3)阳性植株 *GsAP1* 表达量检测:提取典型的阳性植株叶片的 RNA,反转录后得到 cDNA,以此为模板进行荧光定量 PCR 检测。以转化 pMDC83 空载体的转化烟草作为对照,以烟草的 *Actin* 基因作为内参,检测 *GsAP1* 在转基因烟草中的表达情况。

2 结果与分析

2.1 *GsAP1* 基因的克隆

以拟南芥 *AP1* 序列为信息序列,通过 BLAST 程序搜索大豆 EST 数据库,根据序列拼接的结果,设计引物,以野生大豆盛花期的花 cDNA 为模板 PCR 扩增(图 1),胶回收后克隆测序得到 1 个大小为 711 bp 的片段,测序结果在 NCBI 上运行 BLAST 程序,以及在线 ORF 预测,该序列包括完整的 ORF 711 bp,编码了 237 个氨基酸残基(图 2)。BioXM 程序推测完整序列推导的氨基酸产物分子量为 27.46 kDa, pI9.07,将其命名为 *GsAP1*。

2.2 组织表达谱分析

为了研究 *GsAP1* 的组织表达情况,试验通过实时定量 RT-PCR 的方法检测了基因在根、茎、茎尖、叶、花和种子以及不同花器官中的表达情况。结果显示:该基因主要在花中表达,根及种子中有微弱的表达,茎、叶、茎尖中几乎不表达(图 3A),此结果表明 *GsAP1* 的表达具有显著的组织特异性。进一

步对 *GsAP1* 在花瓣、雄蕊、心皮和萼片中的表达情况的分析结果显示:*GsAP1* 在花萼中表达量比较高,花瓣中有少量表达,在雄蕊和心皮中基本不表达(图 3B),说明 *GsAP1* 最有可能参与萼片的发育。为了更细致的研究 *GsAP1* 在不同开花时期中表达的情况,试验研究了该基因在花芽、花蕾和盛花期的表达变化,结果显示:*GsAP1* 在花芽和盛花期表达量较高,在花蕾期较低(图 3C),说明 *GsAP1* 可能在野生大豆花的起始和花发育的后期起着一定的作用;而在种子发育的不同时期中 *GsAP1* 的表达量一直处于上升的趋势,尤其在开花后 30 d 以后,种子发育的中后期表达量较高,说明 *GsAP1* 在种子发育的后期可能起着一定的作用(图 3D)。

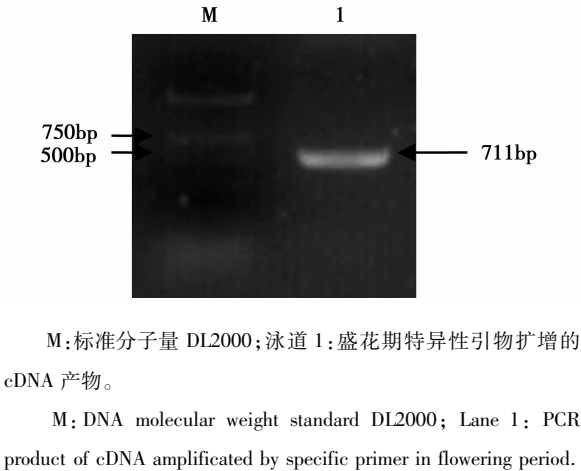


图 1 野生大豆基因 *GsAP1* 的克隆
Fig. 1 Cloning of *GsAP1* from the wild soybean flower

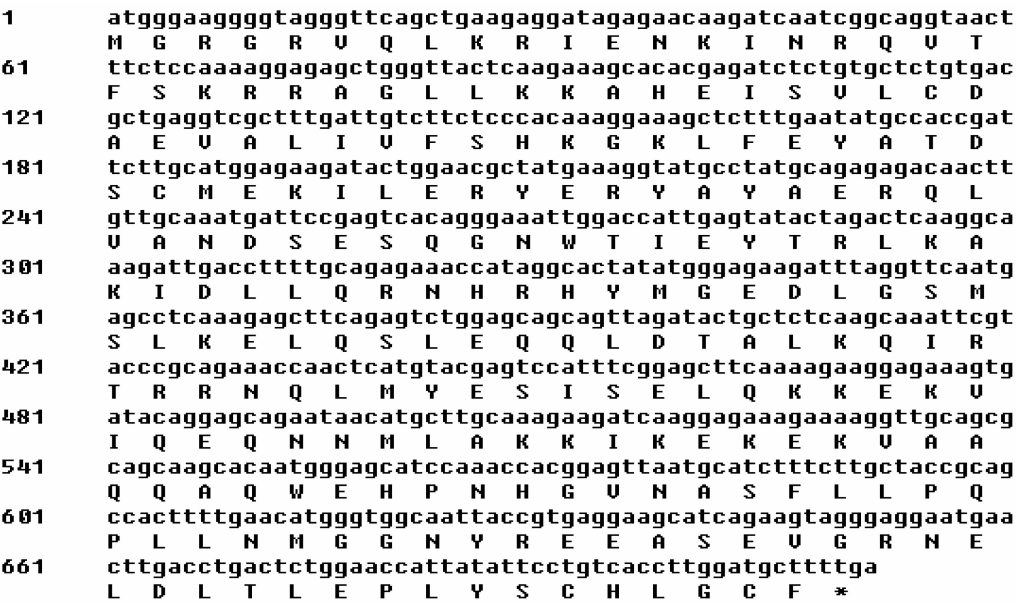
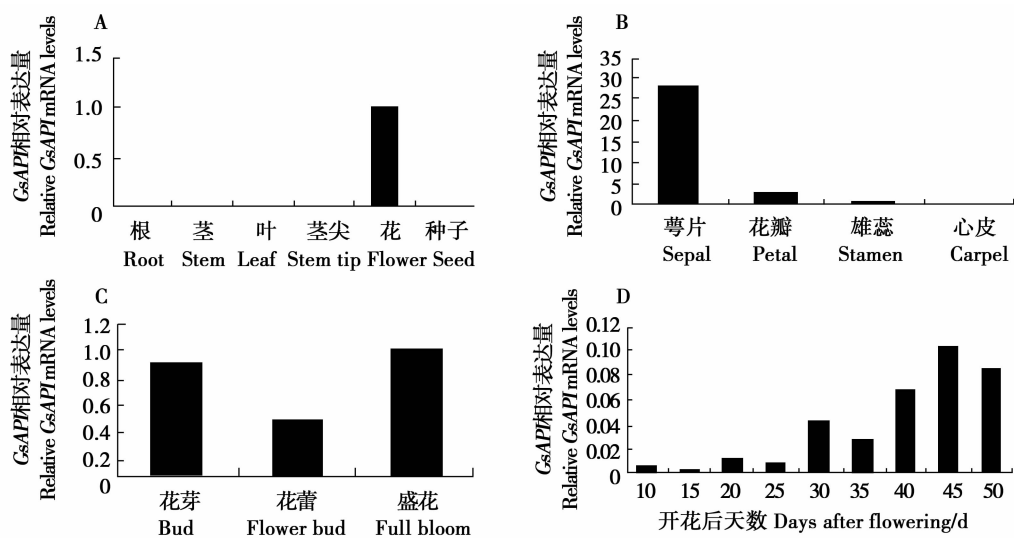


图 2 *GsAP1* 的 cDNA 序列和推导的氨基酸序列
Fig. 2 The nucleotide acid sequence of *GsAP1* and its deduced amino acid sequence



A: *GsAP1* 在野生大豆不同组织中的表达;B: *GsAP1* 在野生大豆四轮花器官中的表达;C: *GsAP1* 在野生大豆不同花发育时期的表达;D: *GsAP1* 在野生大豆不同种子发育时期中的表达。

A: Expression of *GsAP1* in different tissues of wild soybean; B: Expression of *GsAP1* in the four round flower organ of wild soybean; C: Expression of *GsAP1* in different flower development stages of wild soybean; D: Expression of *GsAP1* in different stages of seed development of wild soybean.

图 3 *GsAP1* 在野生大豆不同组织器官中的表达

Fig.3 The mRNA expression pattern of *GsAP1* in various wild soybean tissues

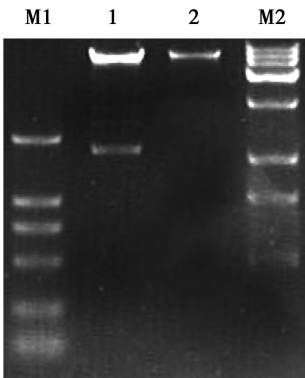
2.3 *GsAP1* 融合蛋白的亚细胞定位

用于转化洋葱的植物表达载体 pMDC83-*GsAP1* 经过 PCR 鉴定、酶切鉴定(图 4)及测序后,确认构建成功。

洋葱表皮细胞亚细胞定位结果如图 5 所示, pMDC83-GFP 融合蛋白绿色荧光分布在整个细胞中(图 5D);pMDC83-*GsAP1*-GFP 的洋葱表皮细胞中,细胞核部位观察到有绿色荧光,*GsAP1* 融合蛋白定位于细胞核(图 5A)。

2.4 转录激活功能验证

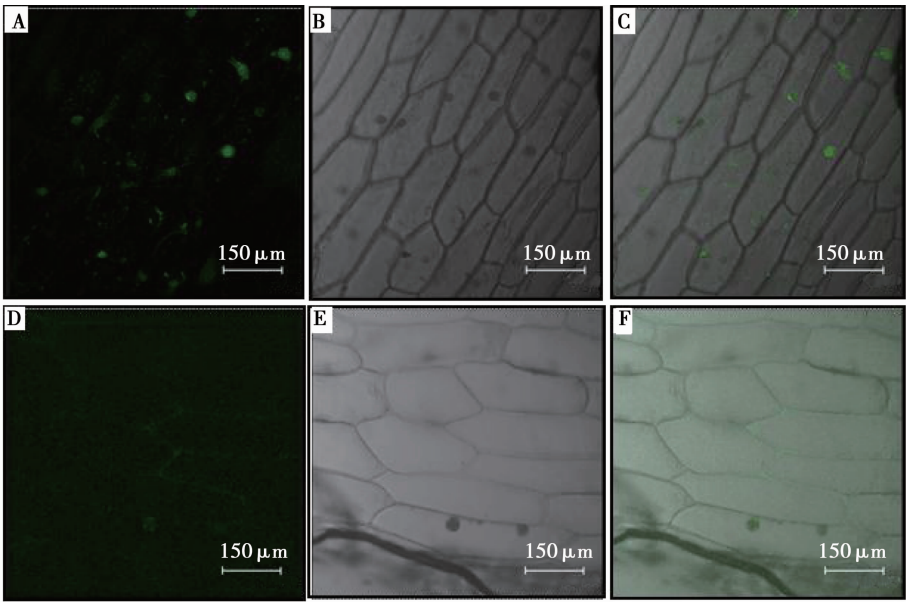
经过测序及酶切鉴定确认酵母表达载体 pBD-*GsAP1* 构建成功(图 6)。将酵母表达载体 pBD-*GsAP1* 转入酵母菌株 YRG-2 中,含有质粒 pBD-*GsAP1* 的酵母菌落能够在缺少 His 的 SD 培养基上生长,说明 pBD-*GsAP1* 质粒已成功转化入酵母菌株 YRG-2 中;含有 pBD-GAL4-Cam 空质粒的阴性对照菌株未能在 SD/-His 平板上生长(图 7A);同时,β-半乳糖苷酶活性的滤纸检测呈现出蓝色反应(图 7C),说明 *GsAP1* 蛋白具有转录激活功能,激活了下游的 *His* 和 *LacZ* 基因。以上结果表明,*GsAP1* 具有明显的转录激活功能。



M1: 核酸分子量标准 DL2000;泳道 1: pMDC83-*GsAP1* *EcoR* I 和 *Bgl* II 双酶切;泳道 2: pMDC83 空载 *EcoR* I 和 *Bgl* II 双酶切;M2: 核酸分子量 DL15000。

M1: Nucleic acid molecular weight standard DL2000; 1: pMDC83-*GsAP1* *EcoR* I and *Bgl* II double restriction enzyme digestion; 2: pMDC83 no-load *EcoR* I and *Bgl* II double restriction enzyme digestion; M2: Nucleic acid molecular weight standard DL15000.

图 4 植物表达载体 pMDC83-*GsAP1* 酶切鉴定结果
Fig.4 Enzyme digestion identification of plant expression vector pMDC83-*GsAP1*



A、B 和 C:植物表达载体 pMDC83-*GsAP1*-GFP 转化洋葱表皮细胞后 GFP 在细胞内的定位;D、E 和 F:空载体 pMDC83-GFP 转化洋葱表皮细胞后 GFP 在细胞内的定位;A 和 D 为荧光信号;B 和 E 为光学显微镜下的细胞结构;C 和 F 为 A 和 B、D 和 E 视野复合后的结果。

A, B and C:The plant expression vector pMDC83-*GsAP1*-GFP transformed in onion epidermal cells, the location of GFP in the cell; D, E and F: No-load pMDC83-GFP transformed in onion epidermal cells, the location of GFP in the cell; A and D were fluorescence signal; B and E were viewed under a confocal microscope; C was the vision composition of A and B; F was the vision composition of D and E.

图 5 *GsAP1* 亚细胞定位

Fig. 5 Subcellular localization of *GsAP1*

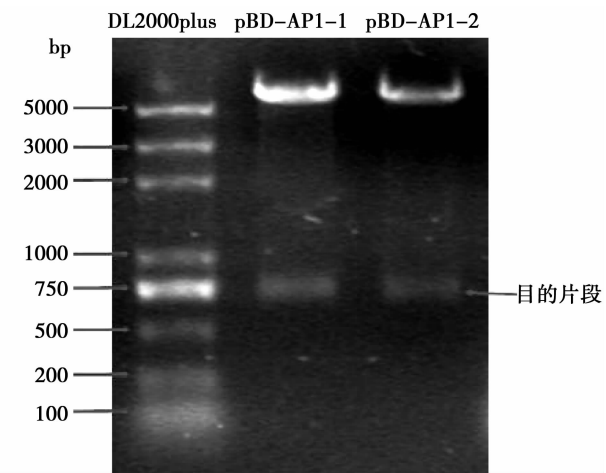
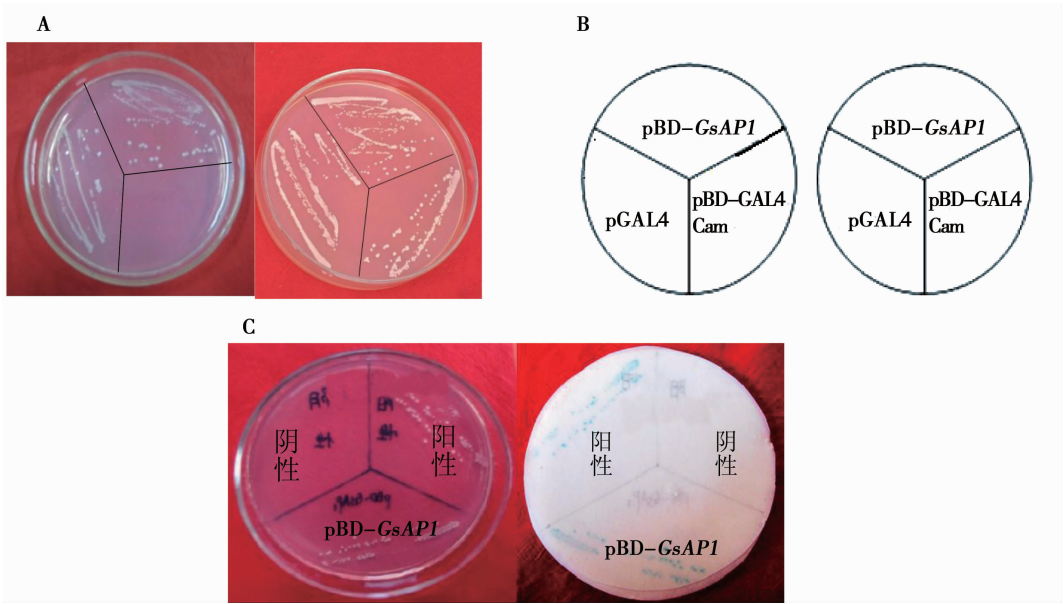


图 6 酵母表达载体 pBD-*GsAP1* 的酶切鉴定

Fig. 6 Enzyme digestion identification of yeast expression vector pBD-*GsAP1*

2.5 转基因烟草阳性植株的检测

转 *GsAP1* 基因烟草阳性植株相对表达量的检测结果如图 8 所示,在株系 4、15、25、27、28 及 30 的叶片中 *GsAP1* 大量表达,而转入空载体的烟草植株中不表达。分别统计了 50 株 *GsAP1* 转基因阳性植株和对照植株,结果显示转基因植株平均开花期为 105.05 d,而对照平均开花期为 170.75 d,转基因植株比对照提前了 65.7 d(图 9)。因此 *GsAP1* 在控制开花时间方面可能发挥重要的作用。



A:转化酵母 YRG-2 后 3 个载体在 YPDA(右)和 SD/-His(左)平板上的生长情况;B:各个酵母菌株在 SD/-His 平板上的位置示意图;C: β -半乳糖苷酶活性分析。

A:The growth situation of three carriers on YPDA and SD/-His after transformation of yeast YRG-2; B: The position of each yeast strain on the plate; C: The analysis of the activity of beta gal.

图 7 *GsAP1* 转录激活活性分析

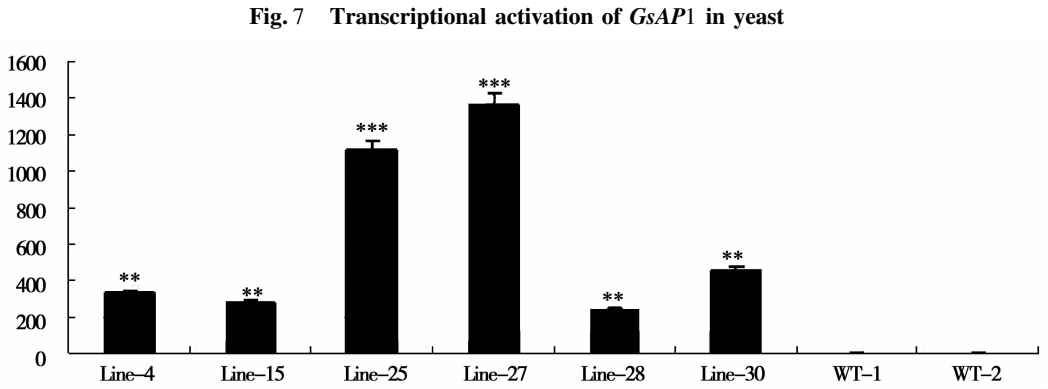


图 8 转 *GsAP1* 基因烟草阳性植株相对表达量检测

Fig. 8 Relative expression of *GsAP1* gene in transgenic tobacco

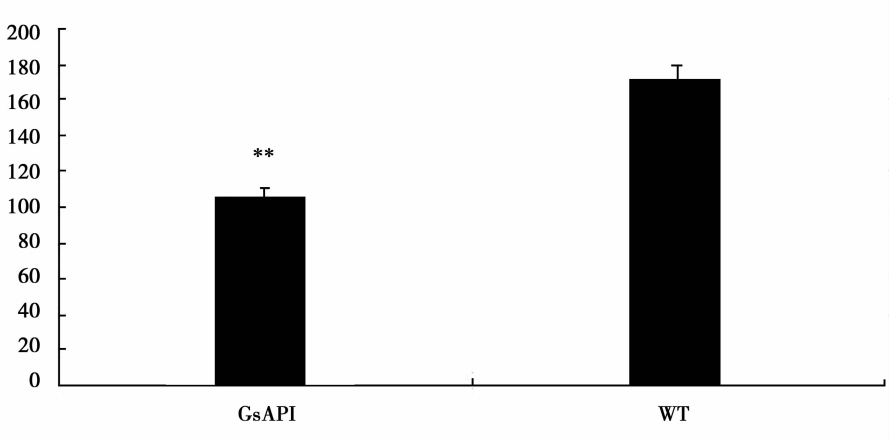


图 9 转基因烟草与对照的开花期比较

Fig.9 Comparision of flowering time of WT and transgenic tobacco

3 结论与讨论

植物发育是指从种子萌发经过营养生长、开花与花器官发育、受精结果形成新一代的有序过程。*APETALA1* (*AP1*) 在植物从营养生长向生殖生长转变过程和花发育过程中起着至关重要的作用^[19], 它决定着后面整个生殖过程的成功。不同植物中的 *AP1* 同源基因具有不同的时空表达模式。水稻 *AP1* 的同源基因 *OsMADS18* 在根、叶片、花序及所有的花器官中表达^[20]; 枇杷 *AP1* 基因在萼片中表达量最高, 而在花瓣、雄蕊和雌蕊中表达量比较低^[21]。在木兰中分离的 *AP1* 基因在雄蕊、心皮、苞片及叶片中高度表达^[22]; 桃 *AP1* 的同源基因 *PpMADS1* 在花萼、花瓣、雄蕊中均有表达^[23]; 日本晚樱 *AP1* 基因在花芽的萼片、雄蕊、雌蕊和花瓣中表达, 但在叶中不表达^[24]; 番红花和柑橘中 *AP1* 的同源基因在所有的四轮花器官中都有表达^[25-26]。本试验利用同源克隆的方法从野生大豆中克隆了 1 个 *AP1-like* 同源基因, 命名为 *GsAP1*, 采用荧光定量 PCR 技术分析 *GsAP1* 基因在野生大豆不同组织中的表达情况, 结果显示: *GsAP1* 基因主要在花中表达, 属于花组织特异性基因。在四轮花器官中, *GsAP1* 在花萼中表达量比较高, 花瓣中有少量表达, 在雄蕊和心皮中基本不表达。这种时空上的表达差异可能反映了 *AP1* 同源基因的表达与植物本身花结构的进化有关, 也表明 *AP1* 同源基因在植物的发育过程中具有广泛的作用。

AP1 同源基因不仅控制着花器官的发育, 而且在果实发育及叶形态建成方面也起重要作用。种子发育是个复杂的过程, 涉及到许多基因包括转录因子基因的表达, 已有报道指出 *MADS-box* 转录因子与种子发育有关^[27], Buchner 等^[28] 在豌豆中发现了 1 个种皮特异的 *AP1/AGL9* 亚家族的 *MADS box* 蛋白。Pabón-Mora 等^[29] 发现罂粟花中 *AP1-like* 同源基因不仅控制花时、分枝, 还在花瓣的确定以及果实发育中起到重要的作用。蕙兰 *AP1* 基因在盛花期时, 花梗和子房的表达量明显高于其它组织, 表明 *CfAP11* 也可能参与果实的形成^[30]。芒果 *AP1* 基因在幼叶、花和果实中均有表达, 说明芒果 *AP1* 同源基因不仅参与花器官的发育, 而且在果实发育中也起调控作用^[31]。本研究发现在野生大豆种子发育的不同时期中 *GsAP1* 的表达量一直处于上升的趋势, 尤其在开花 30 d 以后种子发育的中后期表达量较高, 说明 *GsAP1* 在种子发育的后期可能起着一定的作用。

不同植物 *AP1* 同源基因转基因植株的表达效

果也不同。安利忻等^[32] 将 *AP1* 基因克隆入植物中间载体 p208, 通过根癌土壤杆菌介导的方法转化矮牵牛, 对转基因植株进行了 PCR 和 Southern 检测, 所得到的两个株系的转基因矮牵牛在 R0 代即表现出提前且持续不断地开花的特性, 与对照差异显著。吕山花^[33] 从太行花中克隆了 1 个 *AP1* 基因, 过量表达的转基因拟南芥的雄蕊出现瓣化的现象。Fernando 等^[34] 在拟南芥中异源表达柳树的 2 个 *AP1* 基因, 不仅能使拟南芥提前开花, 而且出现花瓣、雌蕊和雄蕊等畸形的现象。Li 等^[35] 从短柄草中克隆了 4 个 *AP1/FUL* 基因, 发现它们异源表达都能促进植物提前开花。Zheng 等^[36] 发现在烟草和拟南芥中过表达小黑杨的两个 *PsnAP1* 基因都能提前开花。本研究构建了 *GsAP1* 基因植物表达载体并转化烟草, 发现野生大豆的 *GsAP1* 过表达使转基因烟草开花期比对照明显提前。这说明 *GsAP1* 基因编码了 1 个控制花发育的开关, 对从花序分生组织转变成花分生组织具有重要作用。同时进一步证明把外源花发育调控基因导入植物中, 有可能获得改变花期的植物新品种, 有助于野生大豆花期的研究和改良。

参考文献

[1] Irish V F, Sussex I M. Function of the *APETALA1* gene during *Arabidopsis* floral development[J]. *Plant Cell*, 1990(2): 741-754.

[2] Chen Z, Ye M, Su X, et al. Overexpression of *AtAP1M3* regulates flowering time and floral development in *Arabidopsis* and effects key flowering-related genes in poplar[J]. *Transgenic Research*, 2015, 24: 705-715.

[3] Pandey D K, Chaudhary B. Domestication-driven *Gossypium* profilin 1 (*GhPRF1*) gene transduces early flowering phenotype in tobacco by spatial alteration of apical/floral-meristem related gene expression[J]. *BMC plant biology*, 2016, 16(1): 112.

[4] Mandel M A, Gustafson-Brown C, Savidge B, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* [J]. *Nature*, 1992, 360: 273-277.

[5] Bowman J L, Alvarez J, Weigel D, et al. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes[J]. *Development*, 1993, 119: 721-743.

[6] Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky M F. Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* [J]. *Cell*, 1994, 76(1): 131-43.

[7] Mandal M A, Yanofsky M F. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1995, 377(6549): 522-524.

[8] Thomas J. Molecular and genetic mechanisms of floral control[J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 1-17.

[9] Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, et al. Constans mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2001, 410: 1116-1120.

[10] Gocal G F, King R W, Blundell C A, et al. Evolution of floral

- meristem identity genes. Analysis of *Lolium temulentum* genes related to *APETALA1* and *LEAFY* of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2001, 125(4): 1788-1801.
- [11] Shimada S, Ogawa T, Kitagawa S, et al. A genetic network of flowering-time genes in wheat leaves, in which an *APETALA1/FRUITFULL*-like gene, *VRN1*, is upstream of *FLOWERING LOCUS T* [J]. *Plant Journal*, 2009, 58(4): 668-681.
- [12] Chi Y J, Huang F, Liu H C, et al. An *APETALA1*-like gene of soybean regulates flowering time and specifies floral organs [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(18): 2251-2259.
- [13] Kotoda N, Wada M, Kusaba S, et al. Overexpression of *MdMADS5*, an *APETALA1*-like gene of apple, causes early flowering in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Science*, 2002, 162(5): 679-687.
- [14] Chen M K, Lin I C, Yang C H. Functional analysis of three lily (*Lilium longiflorum*) *APETALA1*-like MADS box genes in regulating floral transition and formation [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49: 704-717.
- [15] Pena L, Martin-Trillo M, Juarez 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] Qu G Z, Zheng T, Liu G, et al. Overexpression of a MADS-box gene from birch (*Betula platyphylla*) promotes flowering and enhances chloroplast development in transgenic tobacco [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63398.
- [17] Huang H, Wang S, Jiang J, et al. Over expression of *BpAP1* induces early flowering and produces dwarfism in *Betula platyphylla* × *Betula pendula* [J]. *Physiologia plantarum*, 2014, 151(4): 495-506.
- [18] 杨郁文, 张保龙. 花分生组织决定基因 *APETALA1* 转化油菜 [J]. *江苏农业学报*, 2007, 23(6): 564-567. (Yang Y W, Zhang B L. Flower meristem gene *APETALA1* transformed into rape [J]. *Jiangsu Agricultural Journal*, 2007, 23(6): 564-567.)
- [19] Chen Z, Ye M X, Su X X, et al. Overexpression of *AtAP1M3* regulates flowering time and floral development in *Arabidopsis* and effects key flowering-related genes in poplar [J]. *Transgenic Research*, 2015, 24(4): 705-715.
- [20] Fornara F, Parenicova L, Falasca G, et al. Functional characterization of *OsMADS18*, a member of the *AP1/SQUA* subfamily of MADS box genes [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(4): 2207-2219.
- [21] Liu Y X, Song H W, Liu Z L, et al. Molecular characterization of loquat *EjAP1* gene in relation to flowering [J]. *Plant Growth Regulation*, 2013, 70(3): 287-296.
- [22] Kim S, Koh J, Ma H, et al. Sequence and expression studies of A-, B-, and E-class MADS-box homologues in *Eupomatia* (*Eupomatiaceae*): Support for the bracteates origin of the calyptra [J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2005, 166(2): 185-198.
- [23] Zhang L, Xu Y, Ma R. Molecular cloning, identification, and chromosomal localization of two MADS box genes in peach (*Prunus persica*) [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, 35: 365-372.
- [24] 刘志雄, 王莹, 吕小蒙, 等. 日本晚樱花器官特征基因 *ClAP1* 的克隆与表达分析 [J]. *园艺学报*, 2010, 37(4): 649-654. (Liu Z X, Wang Y, Lyu X M, et al. Cloning and expression analysis of a floral organ identity gene *ClAP1* from *Prunus lannesiana* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37(4): 649-654.)
- [25] Tsaftaris A S, Pasentsis K, Iliopoulos, 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.
- [26] 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.
- [27] Kohler C, Hennig L, Spillane C, et al. The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1* [J]. *Genes & Development*, 2003, 17: 1540-1553.
- [28] Buchner P, Boutin J P. A MADS box transcription factor of the *AP1/AGL9* subfamily is also expressed in the seed coat of pea (*Pisum sativum*) during development [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38(6): 1253-1255.
- [29] Pabón-Mora N, Ambrose B A, Litt A, et al. Poppy *APETALA1/FRUITFULL* orthologs control flowering time, branching, perianth identity and fruit development [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(4): 1685-1704.
- [30] Tian Y F, Yuan X Y, Jiang S H, et al. Molecular cloning and spatiotemporal expression of an *APETALA1/FRUITFULL*-like MADS-box gene from the orchid (*Cymbidium faberi*) [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29(2): 203-13.
- [31] 罗聪, 何新华, 陈虎, 等. 芒果 *AP1* 同源基因的克隆及其生物信息学分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(5): 851-858. (Luo C, He X H, Chen H, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *AP1* homologous gene from mango [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(5): 851-858.
- [32] 安利忻, 刘荣维. 花分生组织决定基因 *AP1* 转化矮牵牛的研究 [J]. *植物学报*, 2001, 43(1): 63-66. (An L X, Liu R W. Flower meristem identity gene *AP1* transformation of *Petunia* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(1): 63-66.)
- [33] 吕山花. 太行花 MADS-box 基因克隆、表达模式及功能分析 [D]. 北京: 中国科学院植物研究所, 2006. (Lyu S H. Taihangia MADS-box gene cloning, expression pattern and functional analysis [D]. Beijing: Academy of Sciences Chinese, 2006.
- [34] Fernando D D, Zhang S L. Constitutive expression of the *SAP1* gene from willow (*Salix discolor*) causes early flowering in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development Genes and Evolution*, 2006, 216(1): 19-28.
- [35] Li Q, Wang Y, Wang F, et al. Functional conservation and diversification of *APETALA1/FRUITFULL* genes in *Brachypodium distachyon* [J]. *Plant Physiology*, 2016.
- [36] Zheng T, Li S, Zang L, et al. Overexpression of two *PsnAP1* genes from *Populus simonii* × *P. nigra* causes early flowering in transgenic tobacco and *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2013, 9(10): e111725.