

• 农业生物技术 •

高羊茅 *FaCONSTANS* 基因的表达及功能分析

陈锡^{1,2,3}, 陈莹¹, 刘晓霞¹, 舒健虹¹, 王小利¹, 赵德刚^{1,2,3}

1 贵州省农业科学院 贵州省草业研究所, 贵州 贵阳 550006

2 贵州大学 喀斯特山区植物资源利用与育种国家地方联合工程研究中心, 贵州 贵阳 550025

3 山地植物资源保护与种质创新教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

陈锡, 陈莹, 刘晓霞, 等. 高羊茅 *FaCONSTANS* 基因的表达及功能分析. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1324-1333.

Chen X, Chen Y, Liu XX, et al. Expression and function analysis of *FaCO* gene in *Festuca arundinacea*. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1324-1333.

摘要: 植物由营养生长向生殖生长转变过程中光周期调控起着重要的作用。*CONSTANS (CO)* 是光周期途径中的特有基因, 为探讨高羊茅 *FaCONSTANS (FaCO)* 基因响应日照长短从而启动植物开花的机理, 利用实时荧光定量 qRT-PCR 技术分析在长日照、短日照、持续光照、持续黑暗条件下 *FaCO* 基因的表达水平。构建过表达载体 *p1300-FaCO*, 利用农杆菌介导法遗传转化拟南芥, 构建沉默载体 *p1300-FaCO-RNAi* 遗传转化高羊茅。结果表明, *FaCO* 基因的表达受光周期调控, 与生物钟控制的昼夜节律相关。在长日照条件下 *FaCO* 基因促进拟南芥开花, 且恢复拟南芥突变体开花表型。RNAi 沉默 *FaCO* 基因的高羊茅转基因植株晚花或者一直处于营养生长阶段。本研究初步探究高羊茅 *FaCO* 基因对开花过程的调控, 这将有助于更进一步了解该基因的生物学功能。

关键词: 高羊茅, 光周期调控基因, 表达分析, 载体构建

Expression and function analysis of *FaCO* gene in *Festuca arundinacea*

Xi Chen^{1,2,3}, Ying Chen¹, Xiaoxia Liu¹, Jianhong Shu¹, Xiaoli Wang¹, and Degang Zhao^{1,2,3}

1 Guizhou Institute of Prataculture, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, Guizhou, China

2 National-Local Joint Engineering Research Center of Karst Region Plant Resources Utilization & Breeding of Guizhou Province, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

3 Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region, Ministry of Education, Guiyang 550025, Guizhou, China

Abstract: Photoperiod plays an important role in transformation from vegetative growth to reproductive growth in plants. *CONSTANS (CO)*, as a unique gene in the photoperiod pathway, responds to changes of day length to initiate flowering in the plant. In this study, the expression level of *FaCONSTANS (FaCO)* gene under long-day, short-day, continuous light and continuous darkness conditions was analyzed by real-time quantitative PCR. We constructed the over-expression vector

Received: July 28, 2020; **Accepted:** December 1, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31860674), Science and Technology Planning Project of Guizhou Province, China (No. 20191302), Youth Foundation of Guizhou Academy of Agricultural Sciences (No. 201880).

Corresponding author: Xiaoli Wang. E-mail: wangxiaolizhenyuan@126.com

国家自然科学基金 (No. 31860674), 贵州省科技计划项目 (No. 20191302), 贵州省农业科学院青年基金 (No. 201880) 资助。

p1300-FaCO and infected into *Arabidopsis thaliana* by Agrobacterium-mediated method. We constructed the silencing vector *p1300-FaCO-RNAi* and infected into *Festuca arundinacea* by Agrobacterium-mediated method. The expression of *FaCO* gene was regulated by photoperiod. The over-expression of *FaCO* promoted flowering in wild type of *Arabidopsis thaliana* under long day condition and rescued the late flowering phenotype in *co-2* mutant of *Arabidopsis thaliana*. Silencing *FaCO* gene in *Festuca arundinacea* by RNAi showed late-flowering phenotype or always kept in the vegetative growth stage. Our understanding the function of *FaCO* in flowering regulation will help further understand biological function of this gene in *Festuca arundinacea*.

Keywords: tall fescue, photoperiodic regulation gene, expression analysis, vector construction

高羊茅 *Festuca arundinacea* 为禾本科羊茅属多年生草本植物, 可作为冷季型牧草或草坪草。高羊茅是六倍体 ($2n=6x=42$), 基因组十分庞大, 属于异花授粉植株, 利用传统育种手段对其遗传改良非常困难。我国草坪在修剪时期, 耗费巨大的人力和财力, 因此抑制草坪草生长季生殖枝的形成, 将对草坪持久性及其质量有重大贡献。随着高羊茅的重要性日益提高, 结合生物技术在其品种改良方面的应用潜力, 对高羊茅品种改良将可能取得一些重要突破, 如较快获得期望的品质和性状, 这将为高羊茅分子遗传育种开辟一条崭新的途径。

植物由营养生长转变到生殖生长过程中有自发途径、光周期途径、春化途径、赤霉素途径及较新的年龄途径等 5 条途径^[1]。植物开花需要外界光环境刺激, 启动内源光信号基因, *CONSTANS* (*CO*) 基因是光周期途径中调控植物开花和监测日照长度的重要基因, 通过调控下游的 *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) 和 *Flowering Locus T* (*FT*) 表达量升高, 进而促使植物开花^[2-4]。Koorneef 等^[5]研究发现, 模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 在光周期诱导途径开花转变过程中, *CO* 基因应答长日照促进植物开花。Putterill 等^[6]利用实时荧光定量分析从拟南芥中分离出的 *CO* 基因的表达情况, 发现拟南芥 *co-2* 叶中 *CO* 表达量低, 植株晚花可能由于 *CO* 表达量减少。目前, 在许多禾本科植物中 *CO* 基因也作了大量研究, 如水稻 *Oryza sativa* 突变体 *Hd1* 中 *CO* 的同源基因 *Hd1*

已被鉴定, 发现该基因在短日照条件下对水稻开花具有促进作用, 在长日照条件下则抑制水稻开花^[7]。Nemoto 等^[8]将小麦 *Triticuma estivum TaHD1* 基因转到水稻突变体 *Hd1* 中, 发现它能够恢复 *Hd1* 的功能, 短日照处理下促进抽穗, 长日照处理下延迟抽穗。Martin 等^[9]在多年生黑麦草 *Lolium perenne* 中分离克隆出的 *LpCO* 基因与水稻中的 *Hd1* 基因是同源基因, 在长日照条件下比在短日照条件下表达水平高, 呈周期性的变化, 表明该基因受生物钟的调控。进一步分析生物学功能, 发现在拟南芥中过量表达 *LpCO* 可以使拟南芥开花提前, 还使拟南芥 *co-2* 突变体开花表型恢复野生型性状。高羊茅作为草坪草时, 通过控制光周期途径关键基因抑制其开花及生殖枝形成, 可大大节省人力和物力, 节约修剪成本, 这将是一项重大的突破。

本研究利用实时荧光定量 PCR 技术分析光周期调控基因 *FaCO* 的时空表达特征, 并通过过量表达遗传转化拟南芥与在高羊茅中利用基因敲除策略研究该基因的生物学功能, 阐明光周期诱导高羊茅开花转变的分子机理, 为高羊茅光周期适应性育种提供理论依据。探索抑制高羊茅生殖枝生长的分子育种新途径, 对坪用型高羊茅品种改良具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 高羊茅黔草 1 号 (*Festuca arundinacea* Qiancao No.1), 为贵州省草业研究所

2005年育成国家审定牧草品种,种植于贵州省草业研究所独山试验基地牧草资源圃内(贵州黔南),登记号为299。它具有抗性强、产量高、绿期长等优良特性。拟南芥哥伦比亚型野生型(Wild type Col,以下简称:WT)和Atmbf1c T-DNA突变体(以下简称 *co-2*)从拟南芥生物资源中心(*Arabidopsis* biological resource center, ABRC)购买。

材料处理:选取饱满、大小均一的高羊茅种子,播种于带无菌土的种植装置中,存放于光照培养箱中(光照强度:0.54–0.67 mmol/(m·s),16 h光照、8 h黑暗,相对湿度:60%,温度:(24±2) °C)进行常规管理培养45 d,再进行光照处理,不同光照处理为长日照、短日照、持续光照、持续黑暗。采样时间为两个光周期,0、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 h共13个时间点,采集高羊茅的嫩叶用液氮速冻,置于–80 °C超低温冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取及cDNA第一链合成

称取高羊茅叶片0.1 g,利用Trizol试剂法提取总RNA,经1%琼脂糖凝胶电泳检测完整性。cDNA第一条链合成根据反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa公司)的说明书完成。

1.2.2 高羊茅FaCO基因表达分析

引物设计以前期通过克隆获得的高羊茅FaCO基因cDNA序列为模板,引物序列:FaCO-F1/R1(表1),内参基因为泛素结合酶基因(Ubiquitin-conjugating enzyme gene, UBI),引物序列UBI-F1/R1(表1)。参照宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)的SYBR Premix Ex Taq™试剂盒说明书对FaCO基因在不同光照(长日照、短日照、持续光照及持续黑暗)处理条件下进行实时荧光定量PCR表达分析。具体操作过程:将cDNA第一链稀释20倍作为模板,PCR总体系是20 μL,分别是cDNA模板2 μL、SYBR Premix Ex

Taq (2×) 10 μL、FaCO-F1 (10 μmol/L) 1 μL、FaCO-R1 (10 μmol/L) 1 μL、ddH₂O 6 μL。冰上配制混合液后混匀,置于实时荧光定量PCR仪(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Real Time System)上,设置好程序后开始反应。反应程序为:95 °C 2 min;95 °C 15 s,55 °C 15 s,45个循环。参照文献[10]的反应程序略做修改,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算结果,每个样品做3个生物学重复,每个生物学做3个技术重复。

1.2.3 载体构建

*p1300-FaCO*过量表达载体构建:设计FaCO全长CDS引物,引物序列FaCO-F2/R2(表1)。根据试剂盒说明书步骤进行操作,反应体系:0.5 μL dNTPs;1.5 μL MgCl₂;2 μL 10×缓冲液;1 μL FaCO-F2;1 μL FaCO-R2;2 μL cDNA模板;0.2 μL DNA聚合酶;12 μL dd H₂O。PCR反应程序:95 °C 1 min;循环数30个(95 °C 10 s,58 °C 10 s,72 °C 1 min);延伸:72 °C 5 min,25 °C 5 min。然后将其与pEASY-Blunt克隆载体(pEASY-Blunt Cloning Kit, Transgene)连接,测序后通过DNAMAN软件进行分析,再使用Xba I和Pst I两种酶将测序分析的目的序列与p1300载体进行酶切反应,经T4 DNA连接酶连接,获得过量表达载体p1300-FaCO(图1A)。

FaCO RNA干扰载体构建:首先通过PCR酶切连接修饰向空载体p1300上添加适量酶切位点。根据禾本科植物水稻LOC_Os10g26060基因内含子(112 bp)的序列设计特异性引物:LOC_Os10g26060-F/R(表1),上游引物添加Spe I和BamH I位点,下游引物添加Sac I和Kpn I位点。将PCR扩增回收的产物克隆到经过修饰的p1300载体上,获得中间载体p1300-intron,利用目的基因FaCO序列设计引物FaCO-F3/R3、FaCO-F4/R4(表1),设计引物(正向目标序列与反向目标序列为同一条)后分别添加Spe I/Kpn I和Sac I/BamH I两对酶切位点。PCR扩增产物测序分析成功获得FaCO基因靶标序列。FaCO

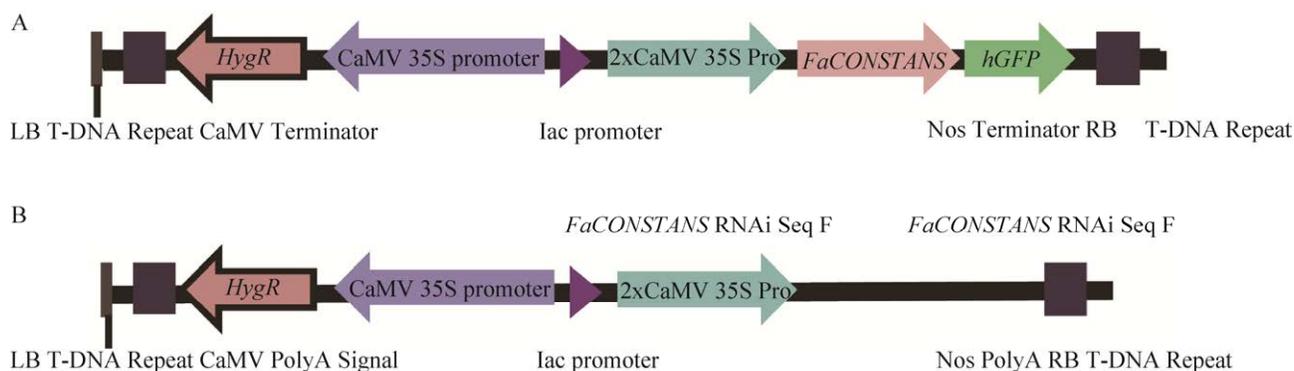


图 1 *FaCO* 过量表达 (A) 和 RNAi (B) 载体 T-DNA 结构示意图

Fig. 1 T-DNA structure of *FaCO* gene over expression vector (A) and RNAi vector (B).

表 1 本文所用引物

Table 1 List of primers used in this study

Amplification sort	Primer name	Primer sequence (5'-3')
qRT-PCR	FaCO-F1	GGTGTACTGCCACGCTGACT
	FaCO-R1	GGCGGCATTTCGAGCAC
Ubiquitin-conjugating	UBI-F1	CACCTCGATCACCCACCTCT
	UBI-R1	AGGGTCTCCGATAACCTCCA
Overexpression vector construction	FaCO-F2	GCTCTAGAATGAACTCCAATTCAAACCTGCAC
	FaCO-R2	TGCATGCATTTAAAACCATGGAACGGTACTG
CO 5'UTR RNAi	FaCO-F3	GCGAGCTCGGATCCGCTCCACACCCACACAGGT
	FaCO-R3	GGGGTACCACTAGTGAACGAGGAGGCCCTTG TG
CO CDS RNAi	FaCO-F4	GCGAGCTCGGATCCTGGAAGGGGGAATAGTACCA
	FaCO-R4	GGGGTACCACTAGTAAACCATGGAACGGTACTGTA
LOC_Os10g26060	Intron-F	AGAGGGTAATTAAGCAAAAAC
	Intron-R	AATCCTAACAATTGATTACGA
PCR verification of transgenic plants	<i>hpt</i> -F	TCCGGAGCCTCCGCTCGAAGTAG
	<i>hpt</i> -R	CTGAACTCACCGCGACGTCTGTC

基因靶标序列被限制酶切后,以正向和反向插入到中间载体内含子序列两端(图 1B),成功构建 RNA 干扰 *FaCO* 载体。

1.2.4 *p1300-FaCO* 转化拟南芥

将重组载体 *p1300-FaCO* 通过电击法转化导入农杆菌 GV3101 感受态细胞,均匀涂布于含有硫酸庆大霉素和卡那霉素的 LB 抗性筛选固体培养基上,放置于 28 °C 恒温箱中 4 h,挑取单菌落摇菌,利用 *FaCO* 反向引物和 35S 正向引物进行 *p1300-FaCO* 阳性农杆菌 PCR 检测(图 1 A)。挑 *p1300-FaCO* 阳性农杆菌单克隆到含有 25 mg/L 庆

大霉素和 50 mg/L 卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中培养活化 24 h(温度为 28 °C,转速为 220 r/min)。将活化的菌液(比例为 1:50)接种到含有 25 mg/L 庆大霉素和 50 mg/L 卡那霉素的 200 mL LB 液体培养基中培养 8-12 h(温度为 28 °C,转速为 220 r/min)。置于离心机中 5 000 r/min 室温下离心 15 min,弃上清液,利用移液枪将农杆菌沉淀悬浮于新鲜配制的重悬缓冲液中(缓冲液配比为 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 2-(N-吗啡啉)乙磺酸, 200 mmol/L 乙酰丁香酮, 0.5% 葡萄糖, pH 5.7)。将野生型 WT 和突变体 *co-2* 整个花序剪掉,用农杆菌悬浮液

浸染 30 s, 同时轻轻旋转, 暗培养 12 h, 培养条件为相对湿度: 60%, 温度: (24±2) °C, 混合收获种子记为 T₀ 代转基因拟南芥。利用含有卡那霉素抗性的平板培养基筛选拟南芥转基因 T₁ 代植株, 常规种植转基因拟南芥, 收获种子后继续筛选获得 T₂ 代阳性苗, 种植收种后再继续筛选并通过 PCR 验证获得纯合体 T₃ 代, 分别将 40 株拟南芥野生型和 40 株转基因分别种植于长日照 (16 h 光照, 8 h 黑暗, 相对湿度: 60%, 温度: (24±2) °C), 短日照 (8 h 光照, 16 h 黑暗, 相对湿度: 60%, 温度: (24±2) °C) 的培养箱中, 从种植到成熟期, 记录开花时间及莲座叶的数目。

1.2.5 高羊茅遗传转化

浓硫酸处理高羊茅种子约 30 s, 玻璃棒拌匀, 自来水冲洗 5 次, 然后用洗衣粉搓洗种子, 自来水冲洗 8 次, 无菌水浸泡 3 h 后 70% 乙醇消毒 5 min, 无菌水洗 3–5 次, 用 2.5% 的次氯酸钠消毒 15 min, 再用无菌水冲洗 3–5 次。消毒后的种子放到垫有灭菌纸的灭菌铁盘上, 面上覆盖无菌滤纸, 用消毒的锤子来回敲 3 次, 然后将破坏的种子放置在高羊茅愈伤诱导培养基上, 暗培养诱导愈伤。7–10 d 剪芽一次, 同一个皿中有污染的及时转移。一个月后将诱导的愈伤转移到继代培养基上, 继代的愈伤 20–30 d 后进行转化试验。

将 *FaCO* 的重组沉默载体转化到农杆菌 GV3101 感受态细胞中, 利用 LB 固体培养基划线, 28 °C 下培养 3 d, 挑取单菌落在含有 25 mg/L 庆大霉素和 50 mg/L 卡那霉素的 50 mL LB 液体培养基中培养 14–16 h。将菌液置于离心机中 5 000 r/min 室温下离心 15 min, 倒掉上清液, 收集菌体备用。菌体经重悬加入浓度为 200 μmol/L 的乙酰丁香酮溶液。在含有 25 mg/L 庆大霉素和 50 mg/L 卡那霉素的菌体培养液中浸染高羊茅黄色胚性愈伤组织 30 min。将侵染好的愈伤组织转移到灭菌滤纸上, 面上覆盖滤纸, 自然晾干, 转移到提前准备好的共培养基上, 室温 25 °C 暗培养 3 d。取出愈伤组织, 用无菌水洗涤 5–6 次。再用含有 200 mg/L 特

美汀的无菌水洗涤 5–6 次。将洗后的愈伤组织均匀摊在无菌滤纸上, 用滤纸覆盖, 超净工作台一档风吹 1.5 h。将愈伤组织转移到提前准备好的筛选培养基上, 室温 25 °C 下暗培养 3–4 周。将筛选出表现有抗性的愈伤组织转移到备好的分化培养基上, 室温 25 °C 下转光照培养 3–4 周, 再继代培养一次, 待幼苗正常长出后转移到备好的生根培养基上诱导生根即可。将成功获取的生根高羊茅置于室温条件下炼苗 3 d, 转移到含有营养土的花盆中常规培养。

1.2.6 转基因植株鉴定及表达分析

从阳性再生植株和非转化对照植株的叶片中提取总 DNA, 提取方法参照天根试剂盒说明书。设计 *hpt* 基因 PCR 检测引物, 确认外源基因已成功整合进受体植株的基因组, 将转基因植株移栽到钵钵, 观测记录转基因及对照植株的表型。通过实时荧光定量 PCR 分析转基因植株的表达, 试验方法参照 1.2.1 和 1.2.2。

2 结果与分析

2.1 高羊茅 *FaCO* 基因结构

高羊茅 *FaCO* 基因完整的 cDNA 序列, 全长为 1 557 bp, 编码蛋白含有 376 个氨基酸^[11], GenBank 登录号为 GU214996。基因结构由 2 个外显子和 1 个内含子组成 (图 2)。

2.2 高羊茅 *FaCO* 基因表达分析

在长日照和短日照处理条件下, 光周期调控基因 *FaCO* 在 1 个光周期内均出现表达高峰, 长日照条件下 *FaCO* 基因的表达高峰在有光照时出现 (ZT12), 短日照条件下 *FaCO* 基因的表达高峰在黑暗中出现 (ZT16), 但长日照处理条件下的表达峰比短日照处理条件下表达峰早 4 h, 约高 1–2 倍 (图 3A)。持续光照和持续黑暗的条件下, 光周期

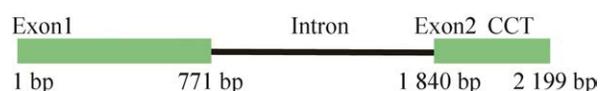


图 2 *FaCO* 基因的结构

Fig. 2 The structure of *FaCO* gene.

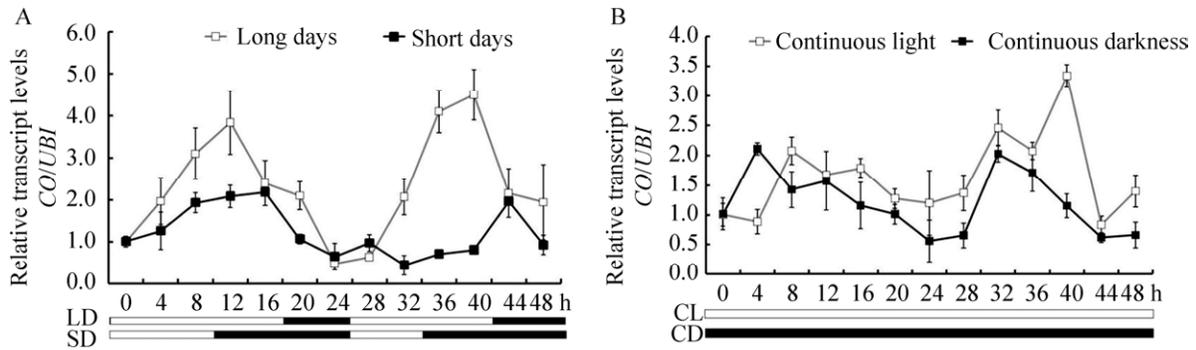


图3 长日照、短日照、持续光照和持续黑暗条件下高羊茅 *FaCO* 基因的表达水平

Fig. 3 *FaCO* gene transcript level of tall fescue leaves under long days, short days, continuous light and continuous darkness conditions.

调控基因 *FaCO* 在 1 个光周期内表达均出现表达高峰, 持续光照条件下 *FaCO* 基因表达水平比持续黑暗条件下高 (图 3B)。这表明 *FaCO* 基因的表达受光周期调控。

2.3 高羊茅 *FaCO* 基因促进拟南芥开花

构建 *p1300-FaCO* 过量表达载体, 转化拟南

芥野生型 WT 和突变体 *co-2*, 长日照条件下, *FaCO* 基因过量表达拟南芥植株表现出早花 (图 4A), *co-2* 突变体恢复了野生型的开花表型 (图 4B), 表明高羊茅 *FaCO* 基因促进拟南芥开花。

将拟南芥野生型和转基因植株种植在长日照和短日照条件下, 结果显示: 在长日照条件下,

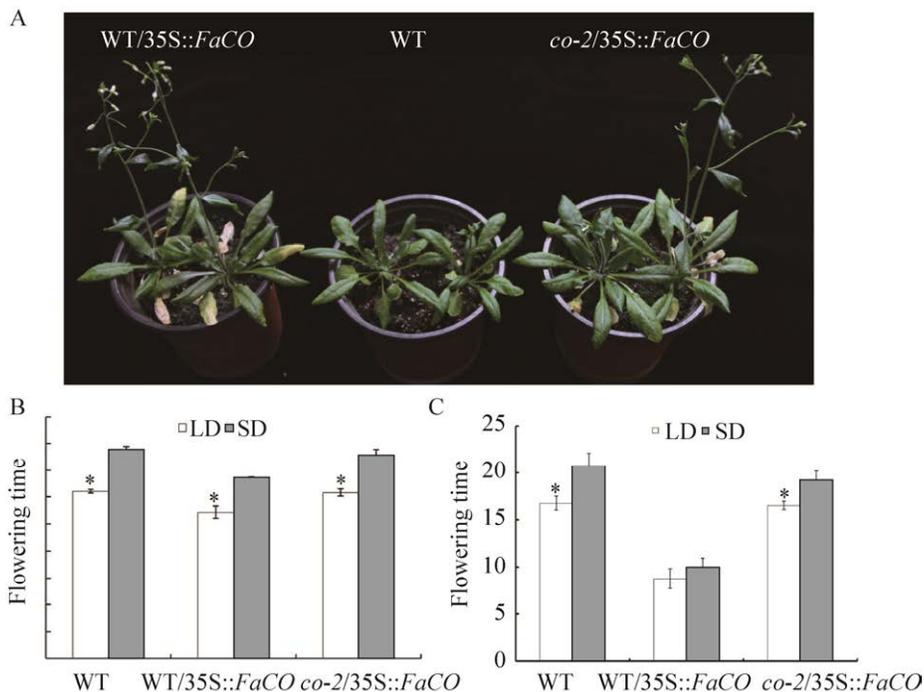


图4 转 *FaCO* 基因拟南芥开花表型

Fig. 4 Phenotype of transgenic *FaCONSTAN Arabidopsis thaliana*. (A) Flowering phenotypes of 35S::*FaCONSTAN*/WT, WT and 35S::*FaCO*/*co-2* in *Arabidopsis thaliana* under long day condition. (B) Days to flowering in *Arabidopsis thaliana* under long day and short day conditions. (C) Numbers of rosette leaves when *Arabidopsis thaliana* was flowering under long day and short day conditions. * and ** represented significant differences ($P < 0.05$) and very significant differences ($P < 0.01$) in WT and transgenic plants, respectively.

转 *FaCO* 基因拟南芥比野生型开花提前约 8 d, 与野生型莲座叶 (16.8 ± 0.74) 相比, 转 *FaCO* 基因拟南芥莲座叶数目为 (8.8 ± 1.06), 表现为早花表型; 转基因材料 35S::*FaCO/co-2* 莲座叶数达到 (16.5 ± 0.45) 植株开花, 恢复 *co-2* 晚花表型。在短日照条件下具有相似的表型, 转 *FaCO* 基因拟南芥莲座叶达到 (10 ± 0.98) 出现了开花表型, 而野生型莲座叶达到 (20.75 ± 1.32) 后才开花。长日照下野生型开花比短日照下提前约 16 d, 莲座叶数少 4 片; 长日照下转基因拟南芥开花比短日照下提前 13 d, 莲座叶少 1 片 (图 4C)。这表明 *FaCO* 基因在长日照和短日照条件下均能促进拟南芥开花。

利用潮霉素 (*hpt*) 基因对转基因植株进行 PCR 检测, 结果显示, 转基因植株出现明亮条带,

而野生型植株无条带 (图 5A)。通过实时荧光定量 PCR 技术对拟南芥中 *FaCO* 的表达水平进行分析, 发现转基因拟南芥中 *FaCO* 基因表达量均高于野生型, 其表达量最大值可达到野生型的 20 倍以上 (图 5B), 这说明该外源基因已成功整合进受体植株的基因组。

2.4 RNA 干扰沉默高羊茅 *FaCO* 基因抑制开花

构建 *FaCO* RNA 干扰载体转化高羊茅植株, 利用 *hpt* 基因对转基因植株进行 PCR 检测, 发现转基因植株有明亮条带, 而野生型植株没有出现条带 (图 6C), 进一步分析转基因高羊茅中 *FaCO* 的表达水平, 发现该基因表达量下降达到极显著水平 (图 6D), 这表明该基因的转录水平呈现负调控, 推断出该基因已成功被沉默。转基因高羊

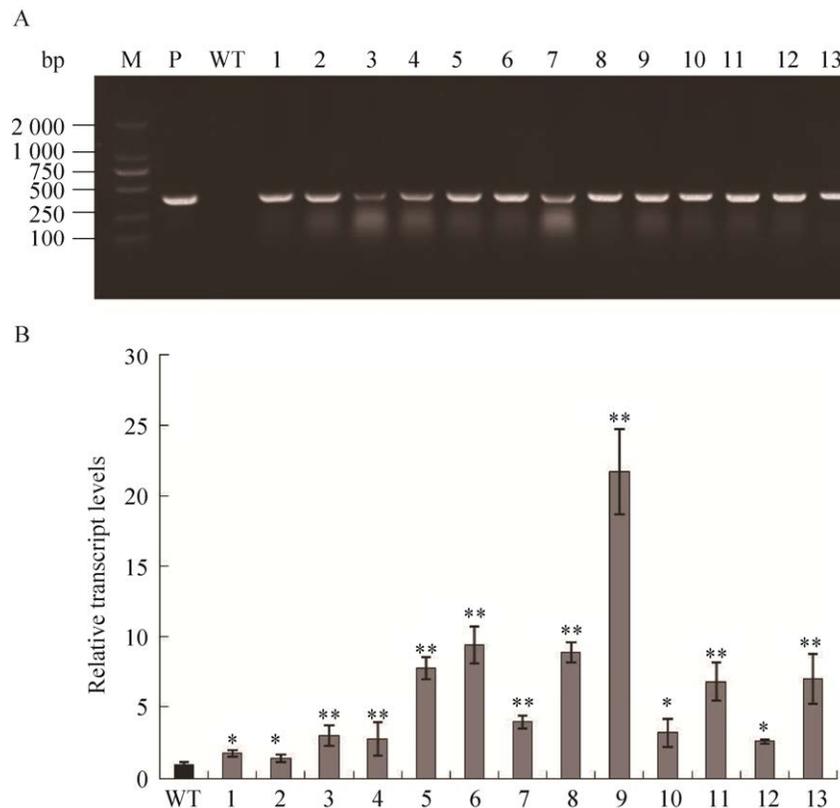


图 5 转基因拟南芥叶片 PCR 检测及 *FaCO* 基因的转录水平分析

Fig. 5 PCR detection and transcript level of *FaCO* gene in leaves of transgenic *Arabidopsis thaliana*. (A) PCR detection of *hpt* gene in leaves of transgenic *Arabidopsis thaliana*. (B) Analysis of *FaCO* transcript level in leaves of transgenic *Arabidopsis thaliana*. * and ** represented significant differences ($P < 0.05$) and very significant differences ($P < 0.01$) in WT and transgenic plants, respectively.

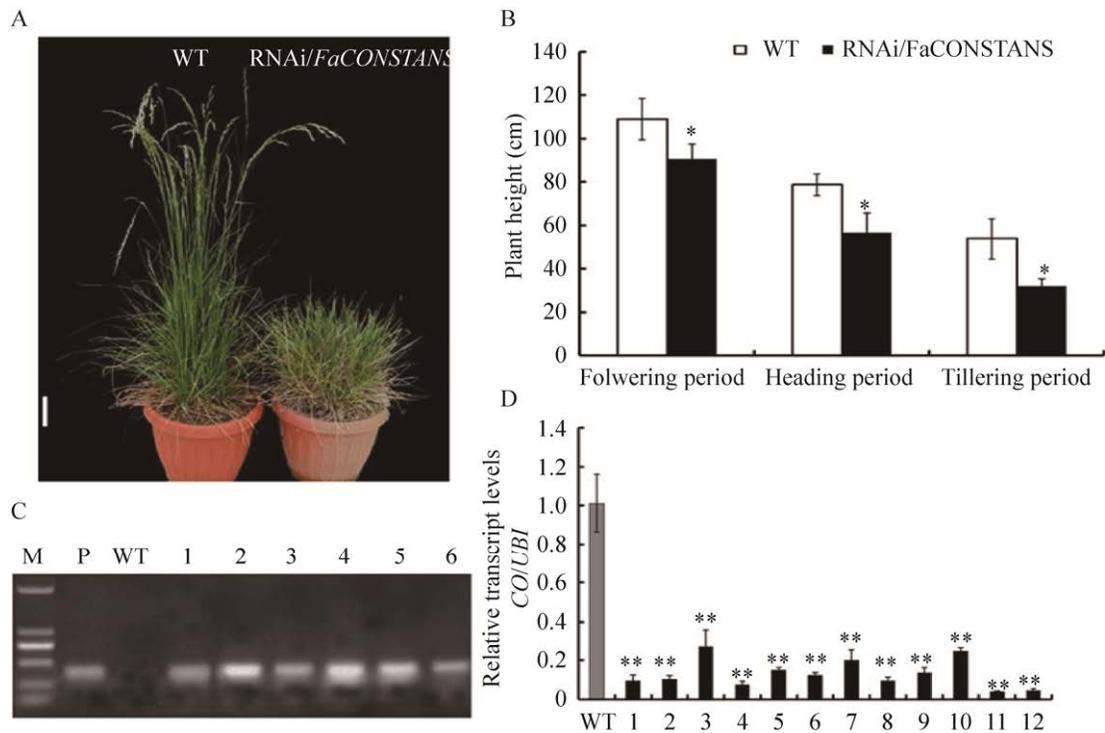


图 6 转基因高羊茅植株的表型及叶片中 *FaCO* 的转录水平分析

Fig. 6 Phenotype of transgenic tall fescue and analysis of *FaCO* transcript level in leaves. (A) Phenotypes of wild type and transgenic tall fescue. (B) Height of wild type and transgenic tall fescues. (C) PCR detection of *hpt* gene in leaves of transgenic tall fescue. (D) Analysis of *FaCO* transcript level in leaves of transgenic tall fescue. * and ** represented significant differences ($P < 0.05$) and very significant differences ($P < 0.01$) in WT and transgenic plants, respectively.

茅植株表型观察及株高测定,发现转基因高羊茅表现出植株矮化,无开花或晚花表型(图 6A)。无开花表型的转基因高羊茅植株分蘖增加后即不再出现抽穗期和开花期。晚花表型的转基因高羊茅分蘖期株高为 (31.94 ± 3.38) cm、抽穗期株高为 (56.62 ± 9.03) cm 和开花期为 (90.60 ± 6.67) cm,均矮于野生型(分蘖期和抽穗期野生型株高分别为 (53.79 ± 9.25) cm 和 (78.57 ± 5.01) cm,开花期株高达到 (108.83 ± 9.57) cm(图 6B)。

3 讨论

目前,植物光周期途径调控相关基因的研究大多数集中在模式植物拟南芥和模式农作物水稻上,开花基因的发现,加深了人们对开花途径的

认识及理解^[12-14]。高羊茅是一种长日照植物,*CO* 基因是植物光周期途径中关键的开花调控基因,与其他开花基因一起组成了一个复杂的调控网络。王小利等从高羊茅中克隆了一个 *CO* 基因,发现其包含 1 个长度为 1 122 bp 的开放阅读框^[11],基因组序列包含 2 个外显子和 1 个内含子。这与拟南芥的 *CO* 基因结构相似^[6]。

Suarez-Lopez 等^[12] 研究了拟南芥 *AtCO* 基因的表达情况,发现长日照条件下有光时表达量出现峰值,短日照条件下黑暗时转录水平达峰值。长日照条件下给予拟南芥连续光照处理,*CO* 基因的表达水平受昼夜节律性调控,表明生物钟控制 *CO* 基因节律性表达。Hayama 和 Coupland^[13] 研究了典型短日照模式农作物水稻,发现水稻中 *CO*

同源基因的生物功能与拟南芥中相反,长日照条件下抑制水稻开花,短日照条件下则促进开花。本研究对高羊茅的转录水平进行分析,结果发现高羊茅长日照下 *FaCO* 基因的表达高峰在有光照时出现,短日照下 *FaCO* 基因的表达高峰在黑暗中出现,但长日照处理条件下的表达峰比短日照处理条件下表达峰早。持续光照和持续黑暗条件下, *FaCO* 基因均出现表达高峰,这表明该基因表达受光周期调控,与生物钟控制的昼夜节律有关。高羊茅与模式植物拟南芥同为长日照植物,本研究结果与 Suarez-Lopez 等^[12]研究拟南芥 *co* 基因表达结论类似。同时也表明长日照植物光周期应答途径的保守性,但功能有待进一步深入研究。

本文构建过表达载体遗传转化模式植物拟南芥,另还构建 RNA 干扰载体转化高羊茅,均成功获取转基因植株,对其生物学功能进行分析。在拟南芥 *co-2* 突变体中过量表达高羊茅 *FaCO* 基因可恢复其晚花表型,高羊茅中 *FaCO* 基因被沉默后也抑制开花,这说明 *CO* 基因在调控单子叶植物和双子叶植物成花方面具有保守性。Liu 等^[15]研究发现油菜 *BnCO1* 基因能够互补拟南芥 *co-2* 突变体的晚花表型,郑本川等^[16]研究早熟和晚熟甘蓝型油菜品系的 *CO* 基因以叶片中的表达量最高,在整个生育期内,花蕾和茎中表达量次之,且早晚表达量高于中午时分;在不同生育时期内,抽薹期表达量最大,且早熟甘蓝型油菜品系 *CO* 基因在叶片和花蕾中的表达明显高于晚熟甘蓝型油菜品系。Martin 等^[9]研究表明牵牛花 *PnCO* 基因可以互补拟南芥 *co-1* 突变体的晚花表型,单子叶植物黑麦草 *LpCO* 基因也可以互补拟南芥 *co-2* 突变体的晚花表型。RNAi 沉默 *FaCO* 基因的高羊茅植株晚花或者一直处于营养生长阶段,还表现出种子不实,无法繁育下一代,这表明转基因高羊茅是不育的,可通过分蘖繁殖的手段进行下一阶段的研究,为抑制植物生殖枝形成奠定研究基础。

REFERENCES

- [1] 刘永平, 杨静, 杨明峰. 植物开花调控途径. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1553-1566.
Liu YP, Yang J, Yang MF. Pathways of flowering regulation in plants. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1553-1566 (in Chinese).
- [2] Holefors A, Opseth L, Rosnes AKR, et al. Identification of *PaCOL1* and *PaCOL2*, two *CONSTANS*-like genes showing decreased transcript levels preceding short day induced growth cessation in Norway spruce. Plant Physiol Biochem, 2009, 47(2): 105-115.
- [3] Almada R, Cabrera N, Casaretto JA, et al. *VvCO* and *VvCOL1*, two *CONSTANS* homologous genes, are regulated during flower induction and dormancy in grapevine buds. Plant Cell Rep, 2009, 28(8): 1193-1203.
- [4] Hassidim M, Harir Y, Yakir E, et al. Over-expression of *CONSTANS-LIKE 5* can induce flowering in short-day grown *Arabidopsis*. Planta, 2009, 230(3): 481-491.
- [5] Putterill J, Robson F, Lee K, et al. The *CONSTANS* gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. Cell, 1995, 80(6): 847-857.
- [6] Koornneef M, Hanhart CJ, Van Der Veen JH. A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet, 1991, 229(1): 57-66.
- [7] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, et al. *Hdl*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. Plant Cell, 2000, 12(12): 2473-2483.
- [8] Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, et al. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice. Plant J, 2003, 36(1): 82-93.
- [9] Martin J, Storgaard M, Andersen CH, et al. Photoperiodic regulation of flowering in perennial ryegrass involving a *CONSTANS*-like homolog. Plant

- Mol Biol, 2004, 56(2): 159-169.
- [10] Li XD, Yu ER, Fan CC, et al. Developmental, cytological and transcriptional analysis of autotetraploid *Arabidopsis*. *Planta*, 2012, 236(2): 579-596.
- [11] 王小利, 刘晓霞, 杨义成, 等. 高羊茅光周期调控基因 *CONSTANS* 的克隆与分析. *分子植物育种*, 2010, 8(1): 45-52.
- Wang XL, Liu XX, Yang YC, et al. Cloning and analysis of *CONSTANS* gene from tall fescue, photoperiodic regulation gene. *Mol Plant Breed*, 2010, 8(1): 45-52 (in Chinese).
- [12] Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, et al. *CONSTANS* mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*, 2001, 410(6832): 1116-1120.
- [13] Hayama R, Coupland G. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol*, 2004, 135(2): 677-684.
- [14] Searle I, Coupland G. Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod. *EMBO J*, 2005, 23(6): 1217-1222.
- [15] Liu JY, Yu JP, McIntosh L, et al. Isolation of a *CONSTANS* ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering. *Plant Physiol*, 2001, 125(4): 1821-1830.
- [16] 郑本川, 张锦芳, 李浩杰, 等. 甘蓝型油菜开花调控转录因子 *CONSTANS* 的表达分析. *中国农业科学*, 2013, 46(12): 2592-2598.
- Zheng BC, Zhang JF, Li HJ, et al. Analysis of quantitative expression of the flowering-regulating transcription factor *CONSTANS* gene in *Brassica napus* L. *Sci Agric Sin*, 2013, 46(12): 2592-2598 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)