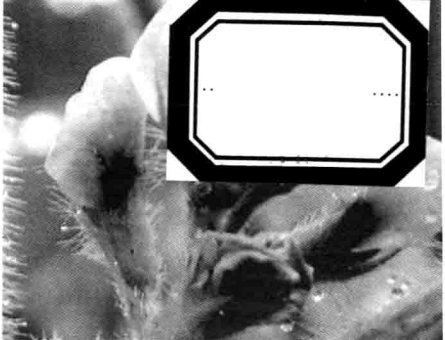


大豆光周期和 赤霉素开花信号传导 基因功能研究



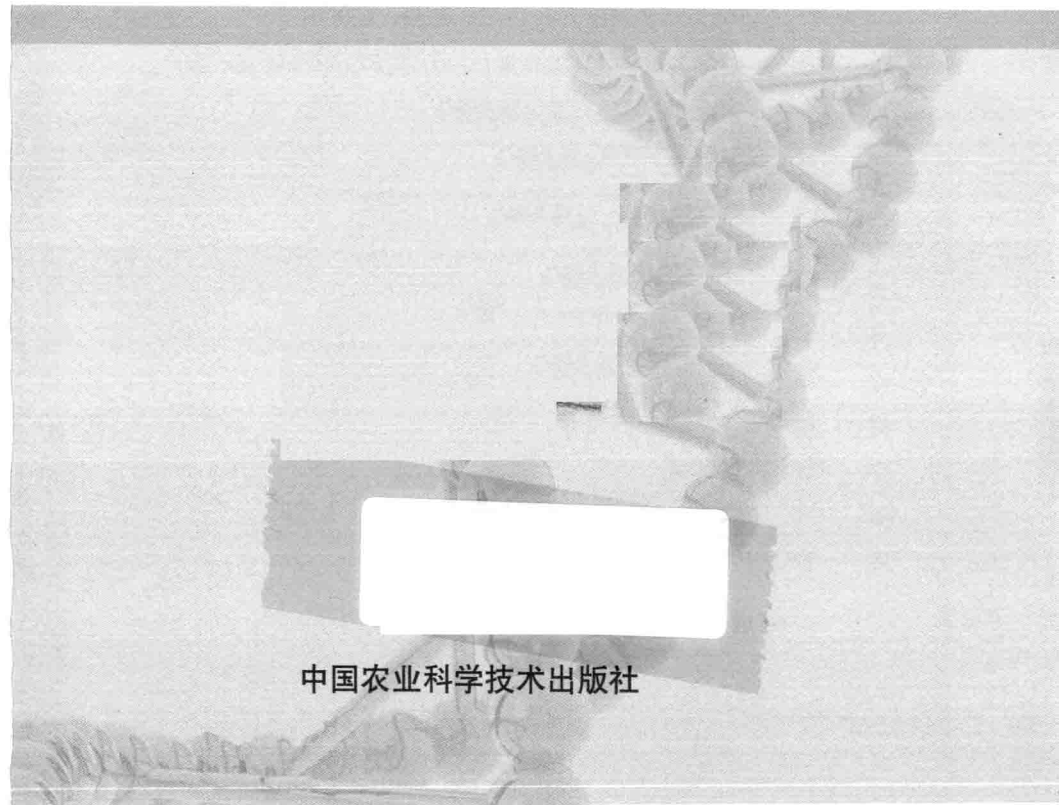
赵琳 著
李文滨 主审

中国农业科学技术出版社



大豆光周期和 赤霉素开花信号传导 基因功能研究

赵琳 著
李文滨 主审



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

大豆光周期和赤霉素开花信号传导基因功能研究 / 赵琳著. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2013. 6

ISBN 978 - 7 - 5116 - 1295 - 3

I. ①大… II. ①赵… III. ①大豆 - 光周期 - 研究②大豆 - 赤
霉素 - 开花习性 - 基因变异 - 研究 IV. ①S565. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 116013 号

责任编辑 崔改泵

责任校对 贾晓红 郭苗苗

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010)82109194 (编辑室) (010)82109704 (发行部)
(010)82109703 (读者服务部)

传 真 (010)82109708

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 880mm × 1 230mm 1/32

印 张 4. 75

彩 插 8

字 数 110 千字

版 次 2013 年 6 月第 1 版 2013 年 6 月第 1 次印刷

定 价 40. 00 元

—— 版权所有 · 翻印必究 ——

作者简介



赵琳（1980—），女，黑龙江省鹤岗市人，博士，副研究员，硕士生导师，现为东北农业大学农学院/大豆生物学教育部重点实验室科研人员，一直从事大豆光周期、赤霉素、细胞分裂素等激素调控大豆开花及生长发育机理的研究工作，在利用抑制性消减杂交技术寻找差异表达基因、基因克隆、生物信息学、植物组织培养、转基因及转基因品种培育研究等方面取得一定成就。近五年共发表论文 14 篇，其中第一作者 6 篇，3 篇发表于 SCI 期刊 *Plant Molecular Biology*, *Journal of Experimental Botany* 和 *Planta* 上，出版学术专著 1 部。2007 年至今共主持国家、省市级科研课题 12 项。

前 言

大豆是重要的粮油作物和饲料作物。发展我国大豆生产对改善人民的食物结构，满足植物蛋白、油脂需求，发展畜牧业和食品工业都具有重要的意义。当前国内大豆生产不能满足国民需要，我国每年都需要大批进口。2012 年我国大豆产量为 1 280 万 t，进口量为 5 838 万 t，对外依存度高达 80% 以上，全世界出口的大豆有一半以上要运往中国，国际大豆价格波动对国内大豆及相关产品价格影响非常大，粮油安全存在严重隐患，因此，保证国内大豆基本种植面积和产量尤为重要。我国大豆竞争力不强与我国大豆品质差、持续生产力不稳、单产低密切相关。大多数大豆的生长发育对光周期反应非常敏感，这一特性严重阻碍了大豆品种的跨区种植，降低了大豆品种的适应性，影响产量水平的有效发挥。当前世界大豆种植区域的扩展，一方面是通过选育中日性、耐低温、极早熟品种的选育，使大豆生产向高纬度、高海拔、高寒地区推进；另一方面是通过选育短光性强，适应高温条件的极晚熟品种，使大豆栽培向低纬度的热带和亚热带地区延伸。一般来说，早熟品种受光周期的影响较小，在不同光照下，生育前期及全生

育期的变化较小，而晚熟品种则相反，从而认为由早熟品种可选育出对光照反应不敏感的“中日性”品种。为了打破大豆的生长区域限制，找到光周期控制大豆开花时间的基因，通过改造或控制这些基因的表达，来降低大豆对日照长短的敏感性，这对大豆育种生产具有很重要的意义，将会带来大豆生产的飞跃发展。

本研究的目的是利用 RACE PCR 克隆技术，克隆大豆光敏感性转录因子 GmGBP1 基因，通过转化烟草进行光周期反应基因功能的验证，分析该类基因在光周期中的作用。同时，研究外源激素和热的施加对该基因表达的影响，分析其不同组织中的空间表达情况，研究上下游基因的关系和调节机理，为改造大豆现有优良品种的光周期敏感性及大豆广适应性育种奠定基础。

本书的出版承蒙“国家自然科学基金（31101169、312101199、31271748）”、“黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划（1253G010）”、转基因生物新品种培育科技重大专项（2013ZX08004-005）、十二五农村领域国家科技计划课题（2013AA102602）和“东北农业大学博士启动基金”共同资助，在此表示由衷的感谢。

因水平有限，疏漏、错误在所难免，恳请有关专家、同仁和广大读者批评指正。

赵琳

2013 年 4 月于哈尔滨

目 录

第一章 引言	(1)
1.1 大豆光周期现象的研究进展	(1)
1.1.1 大豆生育期性状的光周期反应特性	(1)
1.1.2 光周期对大豆农艺性状和籽粒品质的 影响	(6)
1.1.3 大豆中光敏感性 E 等位基因及光周期 基因的研究进展	(7)
1.1.4 大豆开花时间基因图谱的绘制	(10)
1.2 拟南芥开花诱导的分子生物学研究进展	(13)
1.2.1 光周期途径	(14)
1.2.2 春化促进途径	(21)
1.2.3 自主途径	(22)
1.2.4 赤霉素途径	(24)
1.2.5 染色质结构和开花抑制	(24)
1.2.6 拟南芥开花途径的整合	(26)
1.2.7 植物中的拟南芥开花途径的基因	

保守性	(27)
1.3 赤霉素与植物生长发育相关研究进展	(33)
1.3.1 赤霉素在植物生长发育中的作用	(33)
1.3.2 GA 的生物合成途径和信号转导途径 ...	(35)
1.4 SKIP/SNW 转录因子研究进展	(36)
1.5 研究目的和意义	(37)
第二章 材料和方法	(39)
2.1 实验材料和试剂	(39)
2.1.1 植物材料	(39)
2.1.2 菌种及载体	(39)
2.1.3 主要试剂	(40)
2.2 实验方法	(40)
2.2.1 RACE 方法克隆大豆 <i>GmGBP1</i> 基因	(40)
2.2.2 实时荧光定量 Real-time RT-PCR 分析 <i>GmGBP1</i> 的表达	(48)
2.2.3 植物表达载体 pBI121 - <i>GmGBP1</i> 的构建	(51)
2.2.4 农杆菌介导法转化烟草叶盘	(56)
2.2.5 转 <i>GmGBP1</i> 基因烟草 T ₃ 及后代功能 分析	(62)
2.2.6 <i>GmGBP1</i> 基因亚细胞定位	(65)
第三章 结果与分析	(67)
3.1 大豆 <i>GmGBP1</i> 基因克隆	(67)
3.1.1 大豆总 RNA 的提取	(67)

3.1.2	大豆 <i>GmGBP1</i> 基因 5'RACE 和 3'RACE 克隆	(68)
3.1.3	大豆 <i>GmGBP1</i> 基因全长序列的生物信息 学及系统进化分析	(69)
3.1.4	<i>GmGBP1</i> 全长基因组 DNA 序列的 获得	(74)
3.2	大豆 <i>GmGBP1</i> 基因表达研究	(75)
3.2.1	大豆叶片中 <i>GmGBP1</i> 基因在 LD 和 SD 条件下基因表达	(75)
3.2.2	<i>GmGBP1</i> 基因在 LD 和 SD 条件下的昼 夜节律表达分析	(75)
3.2.3	<i>GmGBP1</i> 基因在不同时间过程中的表达 分析	(76)
3.2.4	<i>GmGBP1</i> 基因组织特异性表达分析	(77)
3.2.5	植物生长调节剂及热压对 <i>GmGBP1</i> 基因表达影响分析	(78)
3.3	植物表达载体 pBI121 - <i>GmGBP1</i> 的构建	(79)
3.4	烟草的遗传转化	(83)
3.4.1	丛生芽和根的诱导	(83)
3.4.2	转基因烟草的 PCR 检测	(83)
3.4.3	转基因烟草的 PCR - Southern 检测	(85)
3.4.4	转基因烟草的 RT - PCR 检测	(86)
3.5	转 <i>GmGBP1</i> 基因烟草功能分析	(87)
3.5.1	转基因烟草的 T ₃ 代表型观察	(87)

3.5.2	转基因烟草 T_4 代 LD 和 SD 下表型观察	… (88)
3.5.3	半定量 RT-PCR 分析烟草 <i>NtCO</i> 基因在 LD 和 SD 下烟草中表达	… (90)
3.5.4	烟草茎扫描电镜观察	… (90)
3.5.5	GA_3 对转基因烟草生长及基因表达的 影响	… (91)
3.5.6	ABA 对转基因烟草生长的影响	… (92)
3.5.7	NaCl 和甘露醇对转基因烟草生长的 影响	… (94)
3.5.8	热对转基因烟草生长的影响	… (97)
3.5.9	<i>GmGBP1</i> 基因表达的洋葱表皮亚 细胞定位	… (98)
第四章	讨论	… (101)
4.1	<i>GmGBP1</i> , SKIP/SNW 同系物为光周期信号通路 中新的正调节子, 通过调节 <i>CO</i> 表达 促进开花	… (101)
4.2	GA 诱导 <i>GmGBP1</i> 表达, <i>GmGBP1-ox</i> 烟草 表现出增加的 GA 效应	… (102)
4.3	<i>GmGBP1</i> 正向调节热压耐受性	… (104)
第五章	结论	… (106)
附录 1	溶液的配制	… (108)
附录 2	培养基的配制	… (111)
附录 3	实验用抗生素	… (113)
	参考文献	… (114)

第一章

引 言

1.1 大豆光周期现象的研究进展

1.1.1 大豆生育期性状的光周期反应特性

植物对昼夜相对长度的反应称为光周期现象 (photoperiodism), 20 世纪初美国科学家 Garnar 和 Allard (1920) 发现光周期影响开花。日长的变化能影响许多有机体的生理活动、发育过程及其行为, 光周期调控开花、结实及其他生理过程。光周期对地下贮藏器官的形成、叶片形态、落叶和休眠等也有很大影响。植物通常要达到一定生理年龄才能发生光周期反应。如大豆在子叶伸展期、水稻在接近 7 叶期、洋麻在接近 6 叶期才开始对光照长度反应敏感。大豆品种的适应范围很窄 (纬度差别 $1^{\circ} \sim 1.5^{\circ}$), 这在一定程度上限制了优良大豆品种的大面积推广。

一些植物在低于临界日长时开花被促进,而一些植物则在高于临界日长时开花才被促进,这两种植物分别被称为短日照植物和长日照植物。不同的植物对光周期的反应是各不相同的,对许多植物来说,光周期信号像开关一样,可以使分生组织稳定地转向生殖生长的分化。自光周期现象发现以来,科学家们对其表现和机制进行了大量的研究,开花素学说的提出、光受体的发现,以及光周期反应有关基因的分离,都大大深化了人们对光周期反应机制的认识 (Ma, 1998)。植物的花发育分为开花诱导、花的发端和花器官发育 3 个阶段。开花是植物在生命周期过程中从营养生长向生殖发育所进行的重要转变,所以,植物必须精确地控制开花,才能确保在适当的时间进行有性生殖和种子成熟。开花的时间由开花诱导所决定,植物在光周期诱导开花的过程中,感受光周期的部位主要是展开的叶片,在叶片不存在时也可通过茎感受日照长度的变化,产生长距离信号通过韧皮部传输到茎端分生组织引起其特性发生改变 (Bernier & Périlleux, 2005)。使分生组织由营养器官的分化转向生殖器官的分化。期间茎端分生组织的特性发生变化:在营养发育期,茎端分生组织细胞反复分裂产生不定的次生枝条和叶子,但在开花诱导时,分生组织则产生花芽生成花,而不产生叶或枝条。

大多数植物的开花时间受环境和内源信号的共同控制,由许多因素调控。一些植物中,开花诱导主要受环境因素光周期 (日照长度)、光质 (光谱成分)、光量 (光

子流量密度)、春化作用(长期暴露于低温)、营养成分和水分等影响,对控制开花时间的环境暗示尤其是季节变化作出反应,此外,内源信号也调控开花的过渡,许多植物通过不能开花的幼苗期为确保有足够的维持花发育和种子产生的累积物。而对环境因素不太敏感的植物,开花时间则主要受内源信号,如植株年龄、大小或营养节数目的影响。外界给予植物的压力如营养缺乏、干旱、密植(光量输入不同)和热对开花也能起到促进作用(Levy & Dean, 1998)。

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr] 是光周期反应敏感的短日照植物,大豆的开花时间是重要的农业数量遗传性状,在光周期反应的早期研究中被作为重要的模式植物(Garner & Allard, 1920; Borthwick & Parker, 1938)。大多数大豆植物的生长发育对光周期效应是敏感的,短日照促进开花,反之,长日照则推迟抑制花芽生长,临界光周期值是一组最大最小光周期值,大于或小于此值都不能诱导开花,但这并不是绝对的,开花也受温度和光质等环境因子的影响,在达到环境和基因的共同决定物累积值之后,植物就会开花。许多光照试验均表明大豆是一个感光性很强的作物,光周期对始花有着重要的作用。Brown 认为,大豆成熟期主要受光周期影响,但黑暗长短是大豆开花成熟的控制因素,即黑暗时数达到一定临界值、同时具备一定营养生长时才能开花、结实。大豆的最适温度是 $29/21 \sim 24^{\circ}\text{C}$, 对光量的要求是日光下光子辐射超过 $0.4\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 足

够饱和大豆的光周期反应。大豆的顶端花序明显，花序的形成受光周期的严格控制。韩天富等发现，某些晚熟大豆品种经长日照处理后，会发生花逆转和花序逆转，逆转花序顶端分生组织经短日照处理，可重新恢复花芽分化。

大豆感光性在品种间存在着很大的差异，但是，这种感光性的变化有着明显的规律性。王金陵等（1956）把南至广东省，北至黑龙江省北部的大豆品种，引种在哈尔滨地区进行不同光照长度的处理，结果充分反映了不同纬度地区大豆品种对短光照反应的差异。在低纬度地区，秋大豆和夏大豆比春大豆短光照性强；在高纬度地区，晚熟品种常比早熟品种短光照性强；野生大豆比同地区的半野生大豆和栽培大豆短光照性强。何言章等（1992）对国内有代表性的大豆品种进行遮光试验，结果其短光照敏感性强弱依次为南方夏大豆、北方夏大豆、南方春大豆和北方春大豆。野生大豆也是如此，我国野生大豆的熟期是随纬度升高而提早，特别是出苗至初花阶段缩短最明显，达到极显著的程度（ $r = -0.7649$ ）（李福山，1997）。

许多研究证明大豆在出苗至开花（开花期）、开花至成熟（结实期）和出苗至成熟（全生育期）都具有很强的感光性，对花原基形成和开花有显著作用（Guiamet et al., 1984）。根据大豆对光周期是否敏感可将出苗至初花的发育时期至少分为以下4个阶段：①对光周期不敏感的幼苗时期；②对光周期敏感的诱导时期；③对光周期敏

感的花发育（诱导后）时期；④对光周期不敏感的花发育（诱导后）时期（Wilkerson et al. , 1989）。尽管广泛认为大豆发育早期不受光周期影响，称之为幼苗时期，即从出苗就对光周期不敏感（Shanmugasundaram & Tsou, 1978; Ellis et al. , 1992），但近来一项对 Hutcheson 大豆（第5成熟期组）光周期转移试验研究表明（Wang et al. , 1998），在其出苗后每隔 2 ~ 5d，从非诱导 22h 光周期向 8h、10h、12h 或 14h 光周期转移，幼苗期呈非线性地依赖于光周期的。大豆在出苗后分别在 -1d、0d、1d 和 9d 对 8h、10h、12h 和 14h 光周期变得敏感，所以 Hutcheson 大豆没有所谓的明显幼苗期，当幼苗暴露于光照时就具有光周期敏感性。幼苗期的长短因大豆的品种而异，并且此转移试验还表明被转移的诱导光周期长度也影响了幼苗期的长短。不同的大豆品种在高度诱导 9h 光周期处理时，幼苗期长短是不同的，Hutcheson 大豆在小于或等于临界光周期值 12h 幼苗期长短是相似的，而在大于等于临界光周期值 14h 则有很大不同，对大豆 Johnston 的研究也发现了类似情况。

韩天富（1995）利用原产中国主要生态区、生育期不同的代表品种研究了大豆开花后的光周期反应问题，结果表明，不同成熟期的大豆品种开花后普遍存在着对光照长度的反应。这种反应属于典型的光周期现象，而不是由温度的替代作用、光合时间的改变或前期短日照后效应引起的。开花后光周期反应不仅存在于大豆的花荚期，而且存

在于鼓粒期至近成熟期。在此基础上,认为作物开花结实对光周期的需求是一个连续的过程;光周期对发育进程的调控作用存在于出苗至成熟的全过程;光周期诱导开花和促进成熟的作用有一定的共同性;诱导效果具有特效性和可逆性。

1.1.2 光周期对大豆农艺性状和籽粒品质的影响

光照处理使大豆生殖生长期长度改变时,农艺性状也会发生相应变化。但不同的农艺性状对光周期反应的敏感程度不同。成熟时株高、节数和产量对光周期敏感,而初花节位、开花时株高、节数和百粒重受光周期影响很小(Shanmugasundaram, 1979)。短光照可使总叶片数、株高、分枝数、主茎节数和茎秆重均减少,而对单株荚数、单株粒重和百粒重的影响,不同品种反应不同(张桂茹, 1997)。长日照则使主茎节数、分枝数和分枝长度、叶数、株高等增加,叶面积扩大,叶片脱落减少,荚数、粒数增多,百粒重下降,产量基本不变或有所提高(韩天富, 1996)。

关于光周期对大豆籽粒化学品质影响的研究较少。韩天富等(1997)在人工控制条件下研究了开花后的光照长度对大豆籽粒化学品质的影响及开花后各发育阶段长度与大豆籽粒化学品质性状的相关性。结果表明,光照长度的作用不仅涉及光合时间,而且与光周期本身的机制有关。

长光照下大豆籽粒蛋白质含量下降,油分上升,棕榈酸和油酸的比例下降,亚油酸和亚麻酸的比例升高。光照长度对蛋白质含量的影响大于对油分的影响。所测5种脂肪酸受光照长度影响的顺序为:油酸>亚油酸>亚麻酸>硬脂酸>棕榈酸。开花期、结荚期和鼓粒期的光照处理均对大豆化学品质有影响。相关分析表明,花荚期和鼓粒期长度与化学品质性状关系密切,较长的开花后阶段有利于含油量和亚油酸含量的提高。品种遗传特性对大豆籽粒化学品质性状的影响大于光照长度的作用。

1.1.3 大豆中光敏感性 *E* 等位基因及光周期基因的研究进展

已报道至少有7个基因座位影响大豆的开花和成熟时间,将这些基因座位称为 *E* 系列: *E1/e1*、*E2/e2*、*E3/e3*、*E4/e4*、*E5/e5*、*E6/e6* 和 *E7/e7* (Bernard, 1971; Buzell, 1971; Buzell & Voldeng, 1980; McBlain & Bernard, 1987; Bonato & Vello, 1999; Cober & Voldeng, 2001)。大豆中大多数显性 *E* 等位基因对非诱导的光周期敏感且抑制开花;和活跃的开花抑制模型相符,在自然光照长度下,显性等位基因不同程度地推迟开花 (Cober et al., 1996a)。对于大多数基因座位来说,晚开花和晚成熟是显性或部分显性的,早开花和早成熟是隐性的。有报道认为,单独的 *E2* 和 *E3* 对光周期敏感性不强,但仅 *E1* 或 *E2* 和 *E3* 结合,尤