

高等植物开花时间决定的基因调控研究

雍伟东 种康* 许智宏*, 谭克辉 朱至清

(中国科学院植物研究所, 北京 100093. * 联系人. † 通讯地址: 中国科学院, 北京 100864. Email: chongk@public.east.cn.net)

摘要 开花是植物从营养生长向生殖生长的转变过程, 在这一过程中植物顶端分生组织从细胞内部的代谢途径到外部表型都会发生一系列程序化的变化. 与开花相关基因的表达是实现这一转变的基础, 环境因子(春化作用和光周期)以及细胞自身的生长状况对这些基因的表达起着调控作用. 近年来在高等植物成花决定过程的基因调控研究方面已取得了很多成就, 简要综述该领域国内外的最新进展.

关键词 花发育 开花诱导 开花时间决定 基因

高等植物生活周期需要经过种子萌发、营养生长、开花、受精、胚胎发育、种子形成等一系列发育阶段. 其中开花过程是植物生殖发育过程最重要的标志, 这一过程涉及不同发育方式的转换, 各种不同花器官的发生和发育, 以及在外界环境条件的作用下, 内部信号的产生、传递和相互作用等. 开花可分为开花决定(flowering determination)或成花诱导、花的发端(flower evocation)和花器官的形成等顺序过程, 其中开花决定过程是花的发端和花器官形成的基础, 并直接控制开花的时间. 90年代初, 以成功分离花器官发育控制基因为标志, 植物发育生物学研究取得了突破性进展. 开花决定过程是植物生殖生长启动的第1个阶段, 决定开花时间, 在这一过程中茎端分生组织没有形态上的任何变化, 但在生理生化 and 基因表达的程序化方面却发生了明显的变化, 任何花器官发生与发育不可能逾越这一阶段. 同时, 开花决定过程直接控制作物生育期的早晚, 因此与作物产量品质密切相关, 该领域相关研究对农业和园艺生产具有重要的意义.

在长期的生产实践中, 人们发现植物在从不同纬度引种的过程中其开花特性会发生某些变化, 开花时间或加长或变短; 而且有些植物的开花必须经过一个低温过程. 经过多年的研究, 人们发现植物的开花过程严格受环境因子和自身内在因素控制. 为了解释植物开花这一复杂的生命现象, 近百年来人们在开花生理生化方面进行了大量有益的探索, 提出了各种假说, 概括起来主要有以下3种: (1) 开花素(florigen)学说^[1,2]. 控制开花的物质——开花素在适宜的条件下在叶中产生, 通过输导组织从供体(donor)向茎端受体(recipient)转移, 促进茎端开花. 然而经过多年的不懈努力生理学家尚未分离到开花素. (2) 营养物质转移假说(the nutrient diversion hypothesis). 这一假说认为适宜的诱导处理会导致大量的同化产物向顶端分生组织积累, 从而诱导开花^[3]. (3) 多因子控制模型(the multifactorial control model). 该假说的主要观点是在多因子控制模型中, 营养物质的积累只是诱导开花的一个方面, 另外还有大量的诱导物和抑制物, 如激素、代谢产物等, 都在开花过程中起作用. 根据这一理论, 只有限制与诱导因子在适宜的时间达到一定浓度时开花才会发生. 近年来人们通过突变体分别在拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana*)、金鱼草(*Antirrhinum majus*)中克隆到一系列控制开花过程的基因, 进一步证实了多因子控制模型^[4,5].

随着分子遗传学及分子生物学的迅速发展, 以及花器官发育基因控制方面知识的积累, 人们对开花决定这种复杂调控机理有了新的认识, 并受到高度关注, 这表明开花时间调控机

理的研究已成为植物生殖发育研究的新热点. 本文结合本实验室有关工作, 就该领域国内外的最新进展进行简要综述.

1 环境因子对开花时间决定基因的调控

植物的发育与动物发育最大的不同在于动物的各部分器官在胚胎发生期就已形成, 而植物的地上部分是在生长的过程中由顶端分生组织(the shoot apical meristem, SAM)逐渐分化而来. 顶端分生组织是植物体地上部分各器官发育的源泉, 从某种意义上说, 它相当于动物的“干细胞”(stem cell), 顶端分生组织按特定的方式不断分裂分化, 形成植物的各种器官并发育成特定的形态^[6]. 从茎端分生组织的结构来看, 在顶端分生组织的生长过程中顶端轴心附近的细胞通过分裂不断产生新的分生组织, 而轴心基部的细胞通过分裂形成次级分生组织或通过分化形成器官, 如茎、叶、花等^[7]. 顶端分生组织的正常功能是通过维持分裂与分化之间的平衡来保持的, 如果这种平衡被打破会造成植物生长的异常. 拟南芥中的 *clv* (*clavata*)和 *stm* (*shoot meristemless*)突变体是两个极端的例证. 在野生型拟南芥中 *CLV-1* 和 *CLV-3* 基因的表达只限于顶端分生组织顶端轴心附近的几层细胞, 其作用是维持顶端分生组织的功能, 而在 *clv1* 突变体中 *CLV-3* 基因的表达扩展到顶端分生组织周围的细胞中, 这样就使顶端分生组织无限扩大, 形成丛生花序^[8]. *STM* 基因的作用与 *CLV* 相反, *STM* 基因的突变导致胚胎发生过程中不能形成茎端分生组织. *STM* 基因的表达也只限于顶端分生组织中, *STM* 基因编码 Homeodomain 类的 *KN* 基因家族的一员, 很可能是通过转录调控而维持 SAM 功能^[9].

花也是植物的次生器官, 它是由茎端分生组织分化而来. 花的发育主要包括一系列顺序过程^[10,11]: 开花决定(或开花诱导)是第 1 步, 进行营养生长的植物在生长的同时会感受外界环境信号(如光周期, 春化等)及自身产生的开花信号. 当这些因素达到适宜开花的程度, 就进入第 2 个阶段, 茎端分生组织转变为花分生组织, 形成花原基. 这种转变在外部看不到如何变化, 但这时茎端分生组织中的部分细胞的功能已发生了根本的变化. 花发育的最后一个阶段是花器官的形成及其发育, 花分生组织中的细胞进一步分化形成不同的花器官.

1.1 光周期

植物对昼夜相对长度的反应称为光周期现象(photoperiodism), 本世纪初美国科学家 Garner 和 Allar 用一种烟草突变体(Maryland Mammoth mutant)所做的实验发现, 在夏天长日照条件下这种烟草只进行营养生长, 可长至 3~5 m 不开花, 但在冬天短日条件下, 在不到 1 m 即可开花, 这一实验首次证实了光周期对开花的影响. 近几十年来科学家围绕这一问题进行了大量工作, 通过嫁接、去叶等一系列实验发现, 植物感受光周期的部位是叶, 而发生反应的部位在茎端, 植物通过输导组织将叶片产生的信号运输到茎端, 使茎端从营养生长转向生殖生长. Chailakhyan^[12]将这种在叶中产生、并能在体内远距离运输的开花刺激物质称为开花素(florigen), 并认为开花素具有以下 5 个特点: (1) 光周期反应的感受器官是叶片, 在其中产生促进开花的物质, 并运转到茎生长点, 引起后者在形态发生上的改变. (2) 这类物质可向各个方向及各种距离运转; (3) 这种开花促进物质对不同物种及具有不同光周期特性的植物是相同的, 或近似的; (4) 促进开花的物质是在特定条件下产生的, 不同于基础代谢过程中所产生的一般物质. 开花素假说的提出具有很大的诱惑性, 人们投入大量的精力希望能分离到这种物质, 但至今尚未成功^[13]. 新近发现玉米中 *ID1* 基因表达模式与开花素的某些特性相类似,

这是支持开花素学说最直接的分子生物学证据. 近年来随着光周期反应中的一系列感光受体的发现以及在拟南芥等模式植物中一些与光反应有关基因的分离, 人们对这一问题有了新的认识^[14].

在开花素学说提出的同时已经观察到嫁接实验中除去接穗上的叶片非常必要, 否则处在非诱导条件下的叶片, 产生不利于开花的信息, 甚至促使开花的植株逆转到营养生长状态, 这种现象在短日性植物上表现更为显著. 也就是说, 处于不利于开花的光周期条件下的叶片, 会产生抑制花芽分化启动及阻止花发育的信息, 或促进营养生长的信息使正在开花的植株恢复其营养生长. 显然, 植物在不同光周期条件下, 产生促进或抑制花芽分化的信息. 植物个体的生长发育进程主要是由这两种信息共同调控, 还是由叶片产生特定的促进花芽分化的信息单独决定? 近 20 年来, 我国在光敏核不育水稻的研究结果对这种看法提供了某些证据. 晚粳水稻农垦 58 及其自然突变体农垦 58S 在五叶期时, 经 8 ~ 10 d 短日照处理后, 茎生长点已经开始分化, 移到长日照下后, 穗可继续分化出花及花的各种器官, 并能正常地抽穗扬花, 但和继续保持在短日条件下的相比, 穗分化和抽穗显著延迟. 短日照不仅在诱导短日性植物开花中起决定性作用, 同时在诱导期之后, 对花本身的发育依然起着促进作用. 长日照则相反, 对花器官分化和花的发育起阻抑作用. 长日照在阻抑花器官分化、发育的同时, 还导致这两种水稻穗结实率的降低, 特别是农垦 58S 的花粉完全败育^[15]. 由此可见, 对晚粳水稻以及其他短日性植物而言, 短日照不仅在诱导期起促进作用, 而且在以后的各个发育时期都能促进发育, 而长日照完全相反, 不仅阻止成花决定过程的进行, 而且在以后花的发育过程中也有阻抑作用, 甚至可以促使正在开花的植株恢复到营养生长状态. 从植株叶片在感受日照长短的作用之际, 所产生的信息在整个个体发育过程中具有相同的特点, 或促进或抑制发育的进程. 而茎生长点对这种信息的反应特点, 则由反应部位在当时所处的发育状态而定, 如茎生长点在反应时尚处于决定过程, 则表现为生长点分化开始改变的早晚, 若处于雌雄器官分化过程中, 则由性器官作出有利或不利于发育的反应. 晚粳水稻农垦 58S 花粉形成过程, 对来自叶片的长日照抑制信息反应特别强烈, 是由于与花粉形成直接相关的雄性器官某些部位, 特别是在花药的绒毡层发生了突变, 因此对抑制信息的反应比正常品种更敏感, 表现出花粉完全败育, 而正常品种仅是育性降低. 这说明这种产生的抑制信息在正常及突变体上是相似的, 差别在于程度上或不同材料对这种抑制信息反应的敏感程度不同.

植物体内感受光的物质是光受体, 根据吸收的光谱不同将光受体分为 3 类: 隐花色素(cryptochromes)感受蓝光和紫外线 A, 光敏色素(phytochromes)感受红光和远红光, 紫外光 B 类受体感受紫外线 B. 其中光敏色素有 5 种: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* 和 *PHYE*; 隐花色素有两种: *CRY1* 和 *CRY2*. 光周期对开花影响的模式可能是: 首先是光受体, 如 *PHYA* 和 *CRY2*, 感受日长和夜长, 产生昼夜节律(circadian rhythm), 这时光受体本身或与其有关的一些物质之间形成某种平衡, 如果日长和夜长发生变化, 这种平衡就会被破坏, 结果会使一些促进或抑制开花的基因表达, 进而启动或抑制开花进程. Ni 等人^[16,17]发现光可直接诱导定位于核内的转录因子 *PIF3* 与光敏色素 B 结合, 而且证明这种与 *PHYB* 相互作用的因子 (*PIF3*) 是光诱导信号转导所必需的. 这是光敏素基因克隆 20 年后阐明其功能的重大突破.

在拟南芥中已找到一些与光敏色素有关的对植物的形态建成和开花有影响的突变体, 如 *cop1*, *det1*, *det2*, *hy1*, *hy2*, *hy4*, *phyA*, *phyB*, *pef1*, *pef2*, *pef3*, *elf3*, *elg*, *fha* 和 *lhy* 等^[18]. 过量表达

PHYA 可使拟南芥提前开花, 说明光敏色素 A 具有促进开花的作用. *PHYB* 的作用却相反, 因为 *phyB* 突变体形成早花, 说明这种光敏色素对开花起抑制作用. 蓝光受体 *CRY2* 由 *FHA* 基因编码, 它在长日条件下促进开花^[19]. 通过分析 *cry2/phyB* 双突变在不同条件下的表型, 发现 *cry2* 通过 *phyB* 对开花起抑制作用. 长日条件下 *cry2* 突变体中 *CO* 的表达量减少, 而在过量表达 *CRY2* 的转基因拟南芥中 *CO* 的表达增加^[19], 这说明 *cry2* 在开花诱导条件中位于 *CO* 的上游. *cry1* 对开花同样起着促进作用, 因为如果编码 *CRY1* 的基因 *hy4* 发生突变, 突变体的开花也推迟^[20].

光周期诱导植物开花需要适当的昼夜节律, 最近从拟南芥中克隆到影响昼夜节律的基因 *cca1*, *lhy*^[21] 和 *gi*^[22]. *CCA1* 和 *LHY* mRNA 的水平会随着昼夜节律的变化而改变, 而且过量表达 *CCA1* 或 *LHY* 会导致下胚轴变长和晚花. *CCA1* 或 *LHY* 的过量表达还会改变它们本身和其他一些基因的节律性表达^[21]. 从结果分析可以看到, 这些基因位于光周期诱导途径的上游, 它们直接感受光周期信号后诱导下游基因的表达.

叶中产生的信号如何作用于茎端分生组织是证实开花素学说的关键所在. 最近关于 *CO* 的工作使这一问题又向前进了一步^[14]. 一般认为 *CO* 在茎端表达, 诱导 *LFY* 和 *AP1* 的表达后, 使茎端分生组织转变为花分生组织, 现在人们发现如果使 *CO* 只在叶中表达, 而不在茎端表达, 同样可以促进拟南芥提前开花. 这说明 *CO* 的表达对叶子中形成促进茎端开花的物质(开花素?)起着重要作用(图 1). 玉米为日中型植物, 其开花主要受植株生长状态的控制, 只有当叶片长到一定数量才能开花, 而 *id1* 突变体中植株的开花时间推迟. 最近通过转座子插入突变从玉米中克隆了 *id1*^[23], *id1* 同样编码一个锌指蛋白. *id1* 只在玉米叶中表达而不在茎尖表达, 该基因的突变使开花推迟. 这种表达模式与开花素学说中认为开花素在叶中产生、在茎端作用的特性相类似. 通过 *Ac-Ds* 转座系统得到的突变植株, 其开花时间会由于部分细胞中转座子的离开使该基因的活性恢复而提前. 因此, *ID1* 基因在叶中的表达对叶子中形成促进茎端开花的物质(开花素?)可能与 *CO* 一样起着重要作用(图 1).

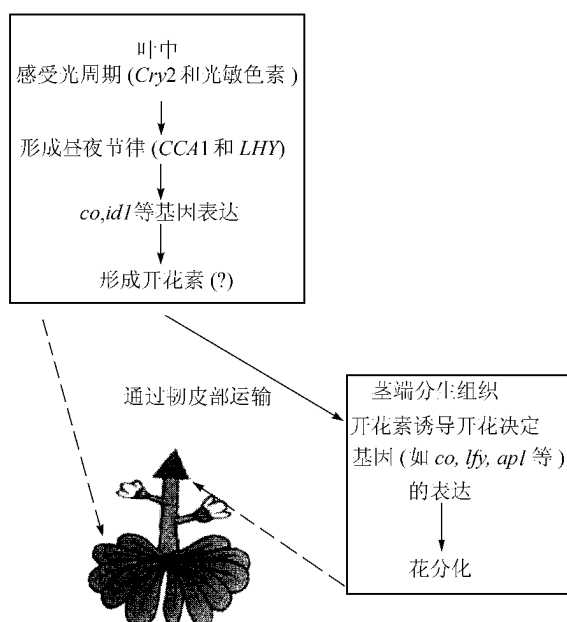


图 1 光周期诱导模式^[14]

1.2 春化作用

不同于光周期现象的另一个影响植物开花的环境因子是低温, 低温对开花的促进作用称为春化作用(vernalization). 冬性和两年生植物开花必须经过一段时间的低温诱导. 如果这些植物不经春化处理, 其开花过程可以推迟几周甚至几个月^[24]. 植物春化作用具有以下几个明显的特点:

(1) 植物对春化的感应部位和效应部位都在茎端, 而且发生反应的时间与发生效应的时间间隔很大, 这一点不同于光周期反应^[25];

(2) 春化过程是一个缓慢的量变过程(一般需要 4℃, 2~8 周), 但需要细胞具有旺盛的代谢活性, 代谢抑制剂实验证明, 春化过程的代谢方式具有严格的顺序性和多步骤性^[26~29];

(3) 春化效应可以被高温所解除, 即脱春化作用(devernalization), 冬小麦一般(33±2)℃, 5 d 可使春化效应消失^[28];

(4) 春化作用产生的效应随着有丝分裂一直保留在茎端生长点, 当其他因素, 如生长状态、光周期适合时促进开花. 低温产生的这种效应会因减数分裂或其他有性生殖过程而消失, 而不能遗传给子代.

春化作用是一个低温诱导体内特异基因表达的过程. 冬小麦经一定时间的春化处理后可观察到一些基于转录水平表达差异而产生特异蛋白的表达^[29]. 我们实验室通过建立差异筛选富集低温诱导冬小麦 cDNA 文库及差异显示(differential display)技术, 得到一系列春化相关的 cDNA 克隆 *verc 203*, *verc 17*(GenBank/EMBL/DBJ 注册号: AB003130, AB003279) 以及 *vrc49*, *vrc54*^[30~36], 它们只在春化后表达, 而在未春化和脱春化的材料中不表达. 利用反义基因技术, 观察到经部分春化处理的转反义基因植株开花与对照相比, 显著地被抑制, 并观察到穗的顶部和基部小花出现明显地退化. 这一结果表明, 春化相关基因 *ver 203* 和 *ver 17* 可能直接参与春化过程, 影响开花时间及花序的发育. 通过对 *ver203* 同源基因 *ver203F* 半全长序列克隆及检索分析, 发现该基因与茉莉酸诱导基因有部分同源性, 这一结果暗示该基因在春化诱导植物开花过程中的作用可能与茉莉酸参与的信号传导途径有关^[37]. 已有的研究表明茉莉酸(Jasmonates)是植物体内新发现的一类信号传导物质, 它在植物的生长、发育以及抗逆性等方面都起着重要的作用, 尤其在植物花、果实和种子的形成过程中茉莉酸都是不可缺少的, 其作用方式主要是通过诱导特异基因的表达来实现. 据此推测植物对春化处理的环境信号应答途径可能通过茉莉酸途径进行, 茉莉酸诱导特异基因表达来控制开花启动.

赤霉素(GA)在一定程度上可以代替春化作用. 赤霉素的生理作用主要表现在促进植物茎的伸长, 在一些植物中也有促进开花的作用. 如拟南芥赤霉素生物合成突变体(*ga1-3*)表现为晚花^[38]. 而且在拟南芥中证明赤霉素的合成受温度调节. 但这是否说明 GA 与春化对开花的促进是处于同一途径的呢? 通过对拟南芥野生型和春化基因突变体的研究发现, 春化作用和赤霉素都能加速植物开花过程. 但并不意味着春化作用加速开花是通过赤霉素的活性实现的. Chandler 等人^[39]认为在拟南芥中有 4 个与春化反应直接相关的基因 *VRN1*, *VRN2*, *VRN3* 和 *VRN4*. *VRN1* 和 *VRN2* 分别定位于第 3 和第 4 条染色体. 为了研究 *vrn* 突变体开花时间是否受赤霉素控制, 利用赤霉素(GA₃)和春化分别处理 *vrn1* 突变体, 发现 *vrn1* 对春化处理不敏感, 而 GA₃ 可以加速 *vrn1* 的开花进程, 这说明 *VRN1* 基因的表达位于 GA₃ 促进开花途径的上游^[39], 也就是说春化作用和赤霉素促进开花是通过各自独立的途径进行的.

关于春化作用分子机理研究近来有所进展, 澳大利亚和美国的科学家分别在拟南芥中进行的实验表明, 甲基化与春化也有着密切的关系^[40~42], 用去甲基化试剂 5-氮胞苷(5-azacytidine)处理拟南芥晚花突变体和冬小麦可使其开花提前, 而春小麦和早花型的拟南芥对 5-氮胞苷不敏感^[40]. Ronemus 等人^[41]亦根据转化胞嘧啶甲基化转移酶反义基因后转基因植物在开花表型方面的变化, 提出 DNA 甲基化是营养生长向生殖生长转化必需的过程.

Finnegan 等人^[40]又发现经低温处理一定时间(4~8周)DNA的甲基化水平可以降低到正常的86%,而且通过转化反义甲基化转移酶基因(*MET1*)可以使拟南芥细胞中DNA的甲基化水平降低10%~100%。甲基化水平的降低对拟南芥的生长影响很大,包括顶端优势减少,植株变小,叶型变化,开花时间提前等,而且在转化甲基化转移酶基因(*MET1*)反义基因的拟南芥的叶中可以检测到AG和AP3基因的表达,而在野生型拟南芥中AG和AP3基因只在顶端分生组织中表达。由此可以看出DNA的去甲基化对植物的生长发育过程都会产生影响,这种影响是通过促进基因的表达来实现的。拟南芥中有一种低甲基化水平的突变体*ddm1* (decreased DNA methylation), 突变体细胞中DNA甲基化水平比野生型低,但*DDM1*基因并不编码DNA甲基化转移酶,*ddm1*突变体在短日条件下为早花,而且开花时间与野生型经春化处理后的基本一致,这些结果表明植物在低温下的去甲基化与春化之间确实存在着密切的联系^[40]。Burn 等人^[42]根据5-氮胞苷可以部分取代春化作用的实验结果,认为分生组织贝壳杉烯酸羟基化酶基因的启动子可能通过甲基化使之钝化,直到甲基化被春化作用或5-氮胞苷去除,基因才能转录。然而甲基化与春化是否直接相关尚难于确定,因为目前所有去甲基化实验都不具备对春化过程的唯一特异性,究竟去甲基化是使春化基因得以表达造成的早花,还是使春化基因调控的下游基因得以表达而绕开了春化基因都很难确定,只有当克隆到春化基因后这一问题才有可能得到解决。

2 开花过程中的基因调控

外界环境因子对植物开花的诱导可使植物在较适宜的环境下开花,但如果缺少这种诱导,有些植物在营养生长到一定阶段后也会开花。如冬小麦(以京冬1号为例),在经过一定时间的低温处理后,开花时间一般需要85d,如果不经低温处理,当生长到一定时期(约150d)它也可以部分开花。这说明植物内部还存在着控制开花的自主途径,这一途径通过感受植物体内的发育状态(年龄、大小),并与环境信号相互作用,在不同时期抑制或促进开花。

目前通过突变体在拟南芥基因组中定位的与开花有关的位点已超过80个,其中有些已被克隆,并部分了解了其作用方式(表1)。植物控制开花过程的基因根据作用阶段的不同可分为两类,开花决定基因(floral meristem identity genes)和器官决定基因(organ identity genes)^[5]。

控制茎端分生组织转变为花序分生组织(inflorescence meristems, IMs)的基因称为开花决定基因。它的表达影响着开花的早晚,如拟南芥中的*LEAFY*(*LFY*), *APETALA 1*(*AP1*), *AP2*, *CALIFLOWER*(*CAL*), *UNUSUAL FLORAL ORGANS*(*UFO*)等^[18];单、双基因突变、基因序列分析及表达模式和转基因的研究表明,这些基因在控制和启动开花过程中起着重要作用,其中*LFY*和*AP1*被认为在开花起始的早期起作用。为了进一步鉴定它们的功能,人们进行了一系列转化的工作。35S::*LFY*转化野生型拟南芥,在转化植株中花序上低节位的次级花序枝被单花所取代,虽然“莲座”叶的数量没有减少,但“莲座”叶腋中的侧芽也长成了能够正常开放的单花,而且花序的顶端变成了顶花;在极端的情况下,在“莲座”叶之后马上就形成顶花^[56]。说明*LFY*的过量表达可以促进花分生组织的形成。用同一嵌合基因(35S::*LFY*)导入烟草和杂种杨(*Populus tremula* X *tremuloides*)后可使这些植物提早开花。杨树通常8~10年后才开花,但转基因杨在经6~7个月的营养生长后即形成顶花以及单个的腋生雄花,但花药未能开裂。这一结果说明*LFY*在亲缘关系很远的植物之间是相当保守的,同时也表明通过导入

表 1 拟南芥菜中影响开花的基因

基因	基因产物	突变体表型或功能	文献
自主控制途径			
EMF		早花, 幼胚期直接开花, 无营养生长	[43]
TFL		早花, 抑制花在顶端形成, 维持无限花序; 延迟营养生长向生殖生长的转变	[44]
LFY	转录因子	抑制开花, 花转变成花序	[45]
AP1	MADS domain	花转变成花序, 花萼变成花苞, 形成不正常花瓣	[46,47]
AG	MADS domain	形成多萼片和多花瓣, 雄蕊和雌蕊被萼片和花瓣所代替	[48]
AP2		增强 AP1 和 LFY 的表型	[49]
CAL		增强 AP1 的表型	[50]
FCA	RNA-binding domain	晚花, 对春化敏感	[51]
LD		晚花, 对春化敏感	[52]
FPA, FVA, FY		晚花, 对春化敏感	[53]
CLV		分生组织扩大	[8]
光周期控制途径			
CO	锌指蛋白转录因子	晚花, 对春化不敏感	[54]
FHA	蓝光受体 CRY2	晚花, 对春化不敏感	[19]
HY4	蓝光受体 CRY1	晚花, 对春化不敏感	[55]
FD, FE, FT, FWA, GI		晚花, 对春化不敏感	[52]
LHY, CCA1		晚花, 破坏昼夜节律	[21]
春化控制途径			
VRN1, VRN2, RN3, VRN4		晚花, 对春化不敏感	[39]

LFY 基因, 有可能调控开花的时间^[45]. 35S::*AP1* 转化的野生型拟南芥也表现出次级花序枝转化为单花以及出现顶花等促进开花的表型, 同时还导致“莲座”叶数目减少. 用 35S::*LFY* 转化 *ap1* 突变体, 并没有出现突变体的表型恢复^[45], 而 35S::*AP1* 转化 *lfy* 突变体则可以使突变表型逆转为野生型^[57]. 这说明两点, 首先 *AP1* 和 *LFY* 对拟南芥菜花发育的起始阶段起着重要作用, 其次, 在基因的作用顺序上 *AP1* 在 *LFY* 的下游发挥作用, *AP1* 的表达晚于 *LFY* 的表达^[58]. *LFY* 基因编码的蛋白为一转录因子, 它的表达可以直接影响其他开花相关基因, 如 *AG* 的表达^[59].

在植物的顶端分生组织中营养生长和生殖生长是一对矛盾, 而体内多重因子对维持这一矛盾的平衡起着重要作用, 有些促进营养生长、抑制开花, 有些则相反. 根据在开花决定中的作用途径不同, 将开花决定过程分为抑制途径和促进途径两种.

2.1 开花抑制途径

通过拟南芥菜功能缺失突变体发现有些突变体的开花时间提前, 这说明在野生型中这些基因起着抑制开花的作用. *EMF1*(*EMBRYONIC FLOWER 1*)基因在开花的启动中起着主要的作用, *emf* 突变体在胚胎刚刚萌发后就开花, 而不进行任何营养生长, 在突变体的子叶表面直接长出生殖器官, 如柱头乳突和子房状结构, 而不生成任何莲座叶^[43,60]. 通过在 *emf* 突变体中表达 *AP1* 基因的启动子控制的 *GUS* 基因发现, *AP1* 在突变体中早期表达, 从而促进开花^[61]. 从目前的实验证据看, *EMF* 在开花控制中起着主要的抑制作用, 这种抑制作用随着植物的发育而逐渐降低, 当降低到一定程度时茎端分生组织开始分化为花序分生组织, 进而形成花. 在 *emf* 与一些晚花突变体(*co* 和 *gi*)形成的双突变中, *emf* 突变体的表型并未受到改变, 这说明这些开花基因在正常情况下是抑制 *EMF* 基因的活性, 在缺失 *CO* 和 *GI* 的突变体中开花时间延迟主

要是 *EMF* 基因活性的增强^[53,56]. 从 *emf* 突变体可以看出植物的生殖生长应是其发育的基态^[43], 后期的生长发育是一个不断解阻遏的过程.

另一个抑制开花的基因 *TFL1* (*TERMINAL FLOWER 1*) 已被克隆, *tfl 1* 突变体的表型是早花, 同时在茎的顶部形成花, 使茎端分生组织的生长终止. *TFL1* 的主要作用是在茎端分生组织中抑制花的形成, 通过转基因发现转化 35S::*TFL1* 的拟南芥菜在应形成花位置被新的营养生长所代替. 在正常情况下这些位置 *TFL1* 的表达很弱, 有利于花的形成, 而过量组成型表达 *TFL1*, 使得花的分化受到抑制而继续进行营养生长. 一些双突变研究发现, *TFL1* 可能通过抑制其他一些促进开花的基因, 如 *FCA*, *FVE*, *FPA* 等的表达来起到抑制开花的作用. *TFL1* 编码的蛋白质与动物细胞内的一种膜结合蛋白很相似, 在动物体内这种蛋白是与膜蛋白形成复合体^[44,63]. 原位杂交发现 *TFL1* 一般只在茎端分生组织下的几层细胞中表达, 因此有人认为 *TFL1* 在茎端分生组织中起传导开花抑制因子的作用^[63].

CLF 和 *WLC* 两个早花突变体中, *AG* 和 *AP3* 的表达加强, 可从叶、花序分枝以及花中检测到其表达^[64], 而在正常情况下 *AP3* 和 *AG* 只在花序分生组织中表达^[48]. 可以看出在野生型拟南芥菜中, *CLF* 和 *WLC* 的功能是抑制营养生长的组织中开花决定基因的表达. 近年来人们发现 DNA 的甲基化及去甲基化对真核生物发育过程中的基因的表达起着重要的作用. 在突变体 *wlc* 中, 位于染色体着丝点附近的 DNA 重复序列的甲基化水平不足, 而且通过降低甲基化水平可以直接缓解叶子中 *AG*, *AP3* 基因表达的抑制^[65~67]. Finnegan 等人^[40]的研究同样发现, 通过组成型表达甲基化转移酶的反义基因使甲基化水平降低后, 可提高 *AG* 和 *AP3* 的表达, 从而形成早花.

2.2 开花促进途径

拟南芥菜突变体中还有一类为晚花突变. 目前, 在拟南芥菜中报道的晚花突变体已超过 29 个, 在所有这些突变体中, 还没有发现一个绝对不开花的, 即只进行营养生长而不进行花的分化的. 这说明这些突变所造成的功能缺失的基因在开花中所起的作用可被其他基因所补偿. 这些晚花突变体根据对环境因子的不同反应可分为两类^[52], 一类包括 *fca*, *fpa ld*, *fve*, *fy* 等, 这些突变体所具有的一个共同特点是无论长日或短日开花都晚于野生型, 但如果给予一定的低温处理 (春化), 突变体的开花时间可以提前^[51, 68], 这表明这些基因在正常的植物体内是通过一条自主的途径促进开花, 而不受环境因子的影响. 这类突变体中 *LD* 和 *FCA* 的基因已被克隆. *LD* 编码的蛋白质含有 953 个氨基酸残基, 包括两个特异的与核结合的区域, 在 C 端还有一富含 Gln 的区域, 这类结构与动物细胞中转录起始因子的结构非常相似^[69]. *FCA* 基因编码的蛋白含有两个 RNA 结合区 (RNA-binding domain) 和一个蛋白互作区 (WW protein interaction domain). *FCA* 在转录过程中通过可变剪切 (alternative splicing) 可产生 4 种不同的转录产物 (α , β , γ 和 δ), 其中 γ 为全长的 *FCA* 转录产物, 对促进开花有直接作用^[70]. 最近的研究对 *FCA* 与其他几个抑制开花基因间的关系有了进一步的了解^[70]. *tfl1* 和 *fca* 的双突变表现为晚花, 表明 *tfl1* 突变体形成的早花是由于 *TFL1* 对 *FCA* 功能的抑制减少造成的. 在 *tfl1/fpa*, *tfl1/fve* 的双突变中也可看到同样的表型. 另一个早花突变体 *emf* 的表型在与 *fca* 的双突变中也发生变化, 但不同于 *tfl1/fca* 双突变. *emf/fca* 表现为早花, 但在花器官产生前出现一些类似叶子的结构. 说明在 *emf* 突变体开花过程的早期需要 *FCA* 的作用, 而 *FCA* 与 *EMF* 的作用途

径是相对独立的^[71]. *LD* 和 *FCA* 两个基因都编码调节蛋白, 一个是转录因子, 一个是 RNA 结合蛋白, 但这些因子是如何在同一途径中诱导开花还不清楚.

第2类晚花突变体, *co*, *fd*, *fe*, *fha*, *ft*, *fwa* 和 *gi*, 对春化都不敏感, 在长日条件下的表型与野生型在短日条件下相同, 认为这些基因所起的作用与开花的长日诱导途径相关. *CO* 基因编码一锌指结构的转录因子^[54]. 组成型表达 *CO* 可使拟南芥提前开花, 而且转基因拟南芥的开花时间与 *CO* 基因的拷贝数正相关, 这些现象说明 *CO* 基因具有促进开花的功能, 并且其活性的高低是开花早晚的限制因子之一. Northern 分析表明 *CO* 的表达量在长日条件下要远远高于短日条件. 将 *CO* 与糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor)组成融合蛋白(*CO-GR*)后, *CO* 的表达就可以受到激素的诱导, 因此可以通过人为诱导 *CO* 的表达, 来观察其对其他基因表达的影响, 发现 *LFY* 的表达不论长日或短日都可随 *CO* 的表达而提高, 而 *AP1* 表达只在长日条件下提高. *35S::LFY* 可使 *co* 突变体提前开花, 这说明 *CO* 基因的表达在 *LFY* 和 *AP1* 的上游, *LFY* 和 *AP1* 的表达可被 *CO* 诱导, 但 *AP1* 的表达还需要长日下产生的其他因子的作用^[54]. 在转 *CO-GA* 的拟南芥中, *TFL1* 基因的表达同样可被 *CO* 诱导. 转化 *35S::CO* 的 *fca* 突变体开花较未转化植株提前, 但晚于转 *35S::CO* 的野生型, 这表明这两类开花诱导途径之间是相互作用的, *CO* 的过量表达可以部分补偿自主途径中基因功能缺失造成的晚花现象. *FHA* 的功能与光更为密切, *FHA* 编码的蛋白是一蓝光受体^[19], *FT* 基因编码的蛋白与磷脂酰乙醇胺结合蛋白(phosphatidylethanolamine binding proteins)相似. 从双突变和转基因的结果来看, *FWA*, *FT* 和 *FE* 在长日条件下诱导开花的作用与 *CO* 有所不同, *fwa/lfy* 和 *ft/lfy* 双突变表现为严重晚花而不形成任何花结构, 而且 *35S::LFY* 也不能使 *ft*, *fwa* 或 *fe* 突变体的开花时间提前, 这说明 *FWA*, *FT* 和 *FE* 基因在促进开花中所起的作用与 *LFY* 的关系不大^[72]. *LD* 与 *FHA*, *CO*, *FWA*, *LFY* 等之间的关系见图2.

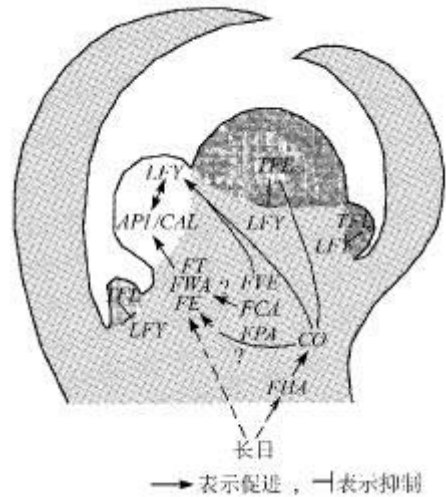


图2 拟南芥中长日对开花启动过程中基因表达的影响^[63]

3 展望

高等植物的成花研究是一个富有挑战性的问题, 最近几年来开花控制的分子生物学发展很快, 不断有新的基因被克隆, 而且对已知基因的功能了解也不断深入, 开花启动过程中的基因调控机理已成为植物发育生物学的研究热点. 随着越来越多基因的分离, 要了解各控制途径内部和途径之间相互作用的关系, 必须首先了解单个基因的性质和功能. 因此了解基因产物的生化特性、细胞学特性以及对基因表达模式的分析变得越来越重要. 植物的成花是内、外界因子共同协调的结果, 从目前的资料来看, 光周期与春化作用在植物由营养生长转向生

殖发育的转换中起着重要的作用,而顶端分生组织如何接受诱导的机理还不清楚.突变体的引入使得花的发育研究取得了很大飞跃,但它也存在很大的缺陷,因为某些性状的突变可能是致死性的突变,人们没有办法观察到其表型,另外在成花的过程中可能存在着一些并不能表现为某种明显性状的过程,因而研究成花过程不能完全依赖于突变体.植物体内各类基因的时空顺序表达是生长发育的基础,要从整体上认识植物的生长发育,还需要有新的手段和思路.拟南芥菜和水稻等多种植物的基因组研究计划以及正在启动的重要植物功能基因组计划,正为人们从整体上了解参与植物生殖和发育的基因及其作用模式和机理提供前所未有的机会.随着拟南芥、水稻等模式植物基因组计划中遗传图谱、物理图谱和DNA序列分析的完成,人们对植物生长发育过程中的基因调控的认识必将产生很大的突破,同时通过对克隆到的发育调控基因的认识以及它们与各种功能基因间相互作用关系网络的了解,通过基因工程手段改良作物品种达到高产优质的目的已指日可待.

致谢 本工作作为国家“九五”攀登计划资助项目、国家自然科学基金资助项目(批准号:39870060)和中国科学院知识创新工程重大项目.

参 考 文 献

- 1 Lang A. Physiology of flowering. *Annu Rev Plant Physiol*, 1952, 3: 265~306
- 2 Evans L T. Flower induction and the florigen concept. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1971, 22: 365~394
- 3 Bernier G. The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1988, 39: 175~219
- 4 Weller J L, Reid J B, Taylor S A, et al. The genetic control of flowering in pea. *Trends Plant Sci*, 1997, 2: 412~418
- 5 Koornneef M, Alonso-Blanco C, Peeters A J M, et al. Genetic control of flowering time in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, 49: 345~370
- 6 许智宏. 植物发育与生殖的研究: 进展和展望. *植物学报*, 1999, 41(9): 909~920
- 7 Hudson A, Goodrich J. Cell signaling keeps the balance. *Current Biology*, 1997, 7: 427~429
- 8 Fletcher J C, Brand U, Running M P, et al. Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science*, 1999, 283(5409): 1911~1914
- 9 Barton M K, Poethig S R. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development the wild type and shoot meristemless mutant. *Development*, 1993, 119: 823~831
- 10 Meyerowitz E M, Bowman J L, Brockman L L, et al. A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. *Development (suppl.)*, 1991, 1: 157~167
- 11 Ma H. The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analyses. *Genes and Development*, 1994, 8: 745~756
- 12 Chailakhyan M H. Concerning the hormonal nature of plant development process, C. R. (Dokl.). *Acad Sci URSS*, 1937, 16: 227~230
- 13 Bernier G, Havelange A, Houssa C, et al. Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell*, 1993, 5: 1147~1155
- 14 Ma H. To be, or not to be, a flower: control of floral meristem identity. *Trends in Genetics*, 1998, 14(1): 26~32
- 15 薛光行, 邓景扬. 对光周期敏感雄性不育水稻的初步研究. *遗传学报*, 1991, 18(1): 59~66
- 16 Ni M, Tepperman J, Quail P. Phytochrome B binding to its nuclear signaling partner *PIF3* is reversibly induced by light. *Nature*, 1999, 400(6746): 781~784
- 17 Ni M, Tepperman J, Quail P. *PIF3*, a phytochrome interaction factor necessary for photoinduced signal transduction, is a basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 1998, 95: 657~667
- 18 Levy Y Y, Dean C. Control of flowering time. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, 1: 49~54
- 19 Guo H, Yang H, Mockder T C, et al. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science*, 1998, 279:

- 1360~1363.
- 20 Bagnall D J, King R W, Whitelam G C, et al. Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1495~1503
- 21 Wang Z Y, Tobing E M. Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1(CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. *Cell*, 1998, 93: 1207~1217
- 22 Park D H, Somers D E, Kim Y S, et al. Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis GIGANTEA* gene. *Science*, 1999, 285: 1579~1582
- 23 Colasanti J, Yuan Z, Sundaresan V. The *indeterminate* gene encodes a zinc finger protein and regulates a leaf-generated signal required for the transition to flowering in *Maize*. *Cell*, 1998, 93: 593~603
- 24 Laurie D A. Comparative genetics of flowering time. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 167~177
- 25 Curtis O F, Chang H T. The relative effectiveness of the temperature of the crown as contrasted with that of the rest of the plant upon the flowering of celery plants. *Am J Bot*, 1930, 17: 1047~1048
- 26 Chouard P. Vernalization and its relation to dormancy. *Annu Rev Plant Physiol*, 1960, 11: 191~238
- 27 谭克辉, 张玉竹. 胰蛋白酶在冬小麦春化过程中的作用. *植物学报*, 1982, 24(3): 241~246
- 28 谭克辉. 低温诱导植物开花的机理. *植物生理生化进展*, 1983, 2: 90~107
- 29 谭克辉. 春化过程中特异蛋白质的合成. *植物学集刊*, 1992, 6: 13~16
- 30 种康, 谭克辉, 黄华樑, 等. 春化相关基因 cDNA 克隆(verc203)序列分析研究. *植物生理学报*, 1997, 23: 99~102
- 31 种康, 谭克辉, 黄华樑, 等. 冬小麦春化作用相关基因的 cDNA 分子克隆研究. *中国科学, B辑*, 1994, 24(9): 964~970
- 32 Chong K, Bao S L, Xu T, et al. Functional analysis of the *ver* gene using antisense transgenic wheat. *Physiol Plant*, 1998, 102: 87~92
- 33 Chong K, Wang L P, Tan K H, et al. Molecular cloning and characterization of vernalization-related (*ver*) genes in winter wheat. *Physiol Plant*, 1994, 92: 511~515
- 34 赵大中, 陈民, 种康, 等. 运用差异显示克隆春化相关基因. *科学通报*, 1998, 43(9): 965~969
- 35 赵大中, 种康, 万莉, 等. 冬小麦春化作用相关 cDNA 克隆 *Vrc 79* 的分子克隆. *植物学报*, 1999, 41(1): 34~39
- 36 种康, 雍伟东, 谭克辉. 高等植物春化作用研究进展. *植物学通报*, 1999, 16(5): 481~487
- 37 雍伟东, 种康, 梁铁兵, 等. 春化相关基因 *ver203F* cDNA 3' 末端的克隆及序列分析研究. *科学通报*, 1999, 44(6): 623~627
- 38 Silberstone A L, Ciampaglio C N, Sun T P. The *Arabidopsis RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell*, 1998, 10: 155~170
- 39 Chandler J, Wilson A, Dean C. *Arabidopsis* mutants showing an altered response to vernalization. *Plant J*, 1996, 10(4): 637~644.
- 40 Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 8449~8454
- 41 Ronemus M J, Galbiati M, Ticknor C, et al. Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science*, 1996, 273(2): 654~657
- 42 Burn J E, Bagnall D J, Metzger J D, et al. DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 287~291
- 43 Sung Z R, Belachew A, Bai S -N, et al. *EMF*, an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development. *Science*, 1992, 258: 1645~1647
- 44 Bradley D, Ratcliffe J, Wincent C, et al. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*, 1997, 275: 80~83
- 45 Weigel D, Alvarez J, Smith D R, et al. *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell*, 1992, 69: 843 ~ 854
- 46 Irish V F, Sussex I M. Function of the *APETALA1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell*, 1990, 2: 741~751
- 47 Mandel M A, Guatafson-Bown C, Savidge B, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature*, 1992, 360: 273~277

- 48 Mizukami Y, Ma H. Determination of *Arabidopsis* floral meristem identity by AGAMOUS. *Plant Cell*, 1997, 9: 393~408
- 49 Jofuku K D, de Boer B G W, Van Montagu M, et al. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell*, 1994, 6: 1211~1225
- 50 Bowman J L, Alvarez J, Weigel D, et al. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by APETALA1 and interaction gene. *Development*, 1993, 119: 721~743
- 51 Koornneef M, Hanhart C J, van der Veen J H. A genetic and physiological analysis of late-flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 1991, 229: 57~66
- 52 Pineiro R P, Coupland G. The control of flowering time and floral identity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1998, 117: 1~8
- 53 Martinez-Zapater J M, Coupland G, Dean C, et al. The transition to flowering in *Arabidopsis*. In: Meyerowitz E M, Somerville C R, eds. *Arabidopsis*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994. 403 ~ 433
- 54 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: 847~857
- 55 Koornneef M, van der Veen J H. Induction and analysis of gibberellin-sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. *Theor Appl Genet*, 1980, 58: 257~263
- 56 Weigel D, Nilsson O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature*, 1995, 377: 495~500
- 57 Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, et al. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene AGAMOUS resembles transcription factors. *Nature*, 1990, 346: 35~39
- 58 Yanofsky M F. Floral meristems to floral organs: Genes controlling early events in *Arabidopsis* flower development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 167~188
- 59 Busch M A, Bomblies K, Weigel D. Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 285: 585~587
- 60 Castle L A, Sung A R. The EMBRYONIC FLOWER genes of *Arabidopsis* control shoot maturation. *Flowering Newsletter*, 1995, 19: 12~19
- 61 Chen L J, Cheng J C, Castle L, et al. EMF genes regulate *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell*, 1997, 9: 2011~2024
- 62 Bradley D, Carpenter R, Sommer H, et al. Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a transposon at the plena locus of *Antirrhinum*. *Cell*, 1993, 72: 85~95
- 63 Pidkowich M S, Klenz J E, Haughn G W. The making of a flower: control of floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 1999, 4(2): 64~70
- 64 Goodrich J, Puangsomlee P, Martin M, et al. A polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature*, 1997, 386: 44~51
- 65 Bird A. The essentials of DNA methylation. *Cell*, 1992, 70: 5~8
- 66 Martienssen R A, Richards E J. DNA methylation in eukaryotes. *Curr Opin, Genet Dev*, 1995, 5: 234~242
- 67 Finnegan E J, Genger R K, Kovac K, et al. DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5824~5829
- 68 Martinez-Zapater J M, Somerville C L. Effects of light quality and vernalization on late-flowering mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1990, 92: 770~775
- 69 Lee I, Aukerman M J, Gore S L, et al. Isolation of LUMINIDEPENDENS: A gene involved in the control of flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1994, 6: 75~83
- 70 Macknight R, Bancroft I, Page T, et al. A gene controlling flowering time in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-binding domains. *Cell*, 1997, 89: 737~745
- 71 Page T, Macknight R, Yang C, et al. Genetic interactions of the *Arabidopsis* flowering time gene FCA, with genes regulating floral initiation. *Plant J*, 1999, 17(30): 231~239
- 72 Simon R, Igeno M I, Coupland G. Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature*, 1996, 382: 59~62

(1999-08-02 收稿, 1999-12-06 收修改稿)