

拟南芥 *Flowering Locus T* 基因生物功能 及其 mRNA 移动能力研究

刘旭新^{1,3}, Steve Jackson², 李春阳²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2 英国华威大学 国际园艺研究中心, CV35 9EF;

3 新疆农业职业学院, 新疆 昌吉 831100)

【摘要】【目的】研究拟南芥 *FT* (*Flowering Locus T*) 基因在拟南芥植物开花过程中的重要作用及其 mRNA 的长距离运移能力。【方法】将 *FT* 基因功能序列及其突变序列 *mFT* (起始密码子突变为终止密码子) 连接入马铃薯 X 病毒 (Potato Virus X, PVX) 载体和去除外壳蛋白 (Coat Protein, CP) 序列的芜菁缩叶病毒 (Turnip crinkle virus truncated coat protein, TCV Δ CP) 载体中, 经体外反转录得到病毒目的片段 RNA, 然后分别用 PVX-*FT* 侵染烟草, TCV Δ CP-*FT* 侵染拟南芥。【结果】人工接种 PVX-*FT* 可以诱导烟草开花; TCV Δ CP-*FT* 和 TCV Δ CP-*mFT* 人工侵染拟南芥叶片后, 经 RT-PCR 检测发现, 在侵染的叶片中与其上部新生叶片中有 TCV Δ CP-*FT* 和 TCV Δ CP-*mFT* 序列, 表明 *FT* mRNA 序列可以帮助失去细胞间移动能力的 TCV Δ CP 恢复移动能力, 并且在顶芽中检测出明显条带, 经测序证实为 *FT* 基因序列。【结论】*FT* 可以诱导短日照品种烟草在长日照条件下开花, 而且 *FT* mRNA 功能序列可以协助因失去 CP 序列而没有细胞间移动能力的 TCV Δ CP 恢复移动能力。

【关键词】 *FT* (*Flowering Locus T*) 基因; 马铃薯 X 病毒载体 (PVX); 芜菁缩叶病毒 (TCV); RT-PCR

【中图分类号】 Q945.6⁺4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)10-0179-07

Research on moving ability and function of *Arabidopsis Flowering Locus T*

LIU Xu-xin^{1,3}, Steve Jackson², LI Chun-yang²

(1 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Warwick HRI, Warwick University, CV35 9EF, UK; 3 Xinjiang Vocational and Technology College of Agriculture, Changji, Xinjiang 831100, China)

Abstract: 【Objective】The paper studied the function of *Arabidopsis FT* (*Flowering Locus T*), which plays a key role in floral pathway, and *FT* mRNA trificking ability in *Arabidopsis*. 【Method】In this research *FT* sequence was cloned and sequence *mFT* (*FT* start codon replaced by stop codon) was mutantd into PVX (Potato Virus X) and TCV Δ CP (*Turnip crinkle virus* vector truncated coat protein sequence), PVX-*FT* and TCV Δ CP-*FT* RNA were transcribed *in vitro*, inoculated on tobacco and on *Arabidopsis* respectively. 【Result】PVX-*FT* can trigger tobacco flowering. The sequence of TCV Δ CP-*FT* were found and TCV Δ CP-*mFT* were found in the new leaves on top of *Arabidopsis* by using RT-PCR checking and sequence testing, which means *FT* mRNA sequence can help TCV Δ CP sequence that lost the moving ability to move from inoculated leaves to new young leaves. 【Conclusion】All these results show *FT* can trigger short-day tobacco flowering in long-day, and *FT* mRNA can help heterogeneous viral sequence TCV Δ CP recover cell-to-cell long distance moving ability.

* [收稿日期] 2008-05-22

[基金项目] 国家留学基金委中英卓越联合培养博士生计划资助项目

[作者简介] 刘旭新(1971—), 男, 广东新会人, 讲师, 在读博士, 主要从事蔬菜生理与生物技术研究。E-mail: lxx529@yahoo.com.cn

Key words: *FT* (*Flowering Locus T*); PVX; TCV; RT-PCR

拟南芥 *FT* (*Flowering Locus T*) 基因是拟南芥诱导开花途径中的重要基因^[1-2], 在光周期途径中, 合适的光周期条件下, *CO* (*CONSTANS*) 促使 *FT* 基因在叶脉中表达, 而不是在顶端分生组织中表达^[3], *FT* mRNA 或 *FT* 蛋白从韧皮部移动到顶端分生组织, 与在顶端分生组织中表达的 *FD* (*Flowering Locus D*)^[4] 激活 *AP1* (*APETALA1*) 表达, 最终 *AP1* 和 *SOC1* (*Suppressor of Overexpression of Constans 1*) 在顶端诱导开花。

FT 在诱导开花过程中的重要作用, 使得人们认为 *FT* 可能就是人们长期寻找的“开花素”基因之一。Huang 等^[5] 的研究显示, *FT* mRNA 可能就是人们寻找多年的开花素或其重要部件。但是 Corbesier 等^[6] 对 *FT* 的研究表明, 开花素是 *FT* 蛋白而并非 *FT* mRNA, 推翻了 *FT* mRNA 可能是开花素的结论, 并发现在叶片中产生的 *FT* 蛋白能够在嫁接中转移到接穗植株体内并导致其开花, 但是该试验并未检测到接穗中 *FT* mRNA 的转移。

随着 RNA 分子在基因表达调控中的重要作用被发现, RNA 分子如何在植物体内运输移动, 如何在目标组织中发挥作用等问题, 引起了人们的广泛关注。在已知的 RNA 系统运输中, 内源 mRNA 在细胞间运输的生物学意义最引人注目。Lucas 等^[7] 研究表明, 玉米同源域蛋白 KN1 (*KNOTTED1*) 能够结合其自身的 mRNA 在分生组织细胞间运输; 近年来对 miRNA (micro RNA) 的研究也表明, miRNA 在植物生长发育过程中起着重要的调节作用, miR172 通过调控靶标 *AP2* (*APETALA2*) 和 *AP2*-like 基因, 来调节植物的开花时间和花的形态^[8], 这使得人们对植物 mRNA 调节植物生长发育的作用产生了极大兴趣。另外一些试验也证明, 某些 RNA 的特殊区域能引起类病毒 (Viroid) 长距离移动^[9], 还发现在植物病毒中有一种小分子 RNA 能够在植物细胞间移动传播^[10]。最近发现马铃薯的一种类病毒 (*Potato Spindle Tuber Viroid*), 其三级结构对其进入植物维管束有重要作用^[11]。一些植物蛋白和病毒蛋白可以结合 RNA 而使其具有在细胞间或植物体内长距离移动的能力^[12-13]。种种迹象表明, mRNA 序列可能在植物生长发育过程中具有移动传递重要信号的作用, 为了探明 *FT* 这一重要的诱导开花基因, 其 mRNA 序列中的顺式作用元件是否具有使其长距离移动的能力, 本研究以去除外壳蛋

白序列 (Coat Protein, CP) 而失去细胞间移动能力的芜菁缩叶病毒 (TCV Δ CP) 为载体^[14], 将 *FT* 序列连接到 TCV Δ CP 载体上人工侵染拟南芥, 研究 TCV Δ CP-*FT* 在拟南芥中的移动能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试烟草为短日照品种 *Maryland Mammoth*, 播种及生长均在长日照 (14 h) 条件下, 温度 25 ℃。供试拟南芥为野生型 WS 和 *ft-1* 突变株, 播种及生长均在短日照 (8 h) 条件下。

1.1.2 菌株与质粒 感受态细胞 *E. coli* GM242、马铃薯 X 病毒 (PVX) 载体和芜菁缩叶病毒 (TCV Δ CP) 载体, 均由英国华威大学国际园艺研究中心 Hong 博士实验室提供。野生 TCV 病毒可以系统侵染拟南芥, 故可用其作载体研究拟南芥 *FT* 基因。本试验中采用去除外壳蛋白序列 (Coat Protein, CP) 的载体 TCV Δ CP^[15]; PVX 载体含有马铃薯 X 病毒 PVX-HB 株系全长 cDNA 克隆 (GenBank 登录号: X72214), 保留其完整功能序列。载体质粒上带有抗性筛选标记, PVX 载体的为氨苄青霉素, TCV Δ CP 的为卡那霉素。

1.1.3 酶、生化试剂和仪器 质粒菌株重组抗性筛选试剂卡那霉素与氨苄青霉素为 Sigma 公司产品, *FT* 蛋白抗血清由英国华威大学国际园艺研究中心 Stephen Jackson 博士提供, 试验采用的限制性内切酶来自 Biolabs 公司, PCR 产物及质粒提纯试剂盒为 Qiagen 公司产品, Superscript II 逆转录酶 (鼠白血病病毒, 活性最适温度 42 ℃) 来自 Invitrogen 公司, *pfu* 酶和体外转录体系材料购自 Promega 公司, TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司, 电转仪采用 BIO-RAD 公司的 GENE PULSER。

1.2 *FT* 功能序列的克隆

拟南芥野生型品种 WS 播种于长日照条件下 (12 h), 于开花前长日照结束时采集叶片, 采用异硫氰酸胍法, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 采取两步法 RT-PCR, 合成全 cDNA 采用 *pfu*-PCR 法, 用引物 PVX-UP、PVX-DOWN 扩增出全长 *FT* 基因序列, 经测序与 GenBank 比对完全符合 (GeneID: 842859), 将其作为对照序列。将 *FT* 功能序列突变为终止密码子 TAG 的全长序列, 突变采用的上游引物为 PVX-UP2 和 TCV-UP2, 所用引物序列见表 1。

表 1 克隆 *FT* 序列所用的引物
Table 1 Primers for cloning *FT* sequence

载体 Vector	引物序列 Primers
PVX	PVX-UP:5'TCAAGATCCGGA AT GTCTATAAAATATAAGAGACCC3'
	PVX-UP2:5'TCAAGATCCGGA TA GTCTATAAAATATAAGAGACCC3'
	PVX-DOWN:5'AGGAAGAAGTCGACTAAAGTCTTCTTCCTCCGCAG3'
TCV△CP	TCV-UP:5'TTCAAGTGATCAG AT GTCTATAAAATATAAGAGAC3'
	TCV-UP2:5'TTCAAGTGATCAG TA GTCTATAAAATATAAGAGAC3'
	TCV-DOWN:5'AAGGAAGTTTAAACCTAAAGTCTTCTTCCTCCGCA3'

注:表中下划线为酶切位点,黑体为起始密码子与终止密码子。
Note:The underlined refer to the site of enzyme,bold letters refer to start code and stop code.

1.3 *FT* 克隆片断的酶切及与载体的连接

1.3.1 *FT* 克隆片断的酶切 *FT* 功能片段经过限制性内切酶酶切使其具有两个粘性末端,这样可以方便与载体的多克隆位点相连。在克隆 *FT* 片段时,引物设计均带有相应酶切位点,用 *Bci*I、*Pme*I 进行酶切可以与 TCV△CP 载体相连,用 *Sal*I、*Bsp*EI 进行酶切可以与 PVX△CP 载体连接。酶切在 37℃条件下保温 3 h,反应完后采用 QIAGEN 公司的 PCR 产物纯化试剂盒进行提纯。

1.3.2 *FT* 克隆片断与载体的连接 载体具有多克隆位点,分别采用相同限制性内切酶进行酶切反应后,再经酚氯法纯化,备用。经相应酶酶切纯化后的 *FT* 基因片段分别与 PVX、TCV△CP 载体用 T4 连接酶进行连接反应,反应中分别加入 8 μL 的高压灭菌水、3 μL 的 10×T4 缓冲液、3 μL 的 20 ng/μL PVX 或 TCV△CP 载体、15 μL 酶切纯化后的 *FT* 或 *mFT* 基因、1 μL T4 连接酶,总体积 30 μL。体系在室温 15℃条件下反应过夜,酚氯法提纯后溶解于 20 μL 高压灭菌水中,待转化。

1.4 电转化及克隆菌株的筛选

采用电击转化法,设定电压 1.5 kV,电阻 200 Ω,电容 20 μF,将感受态细胞 GM242 从 -70℃低温冰箱取出后,放于冰上稍升温,与连接产物混合后 0℃冰上放置 1 min,移入电转杯小室,电击<5 ms,然后用 500 μL 恢复培养基 SOB 洗出,于 37℃摇床 260 r/min 条件下培养 1 h 后涂 LB 平板,LB 平板加入 50 mg/mL 的抗生素(体积比 1 000 : 1),PVX-*FT* 用氨苄青霉素,TCV△CP-*FT* 用卡那霉素作抗性筛选。然后置于 37℃温箱里培养过夜,次日选择用 PCR 法重组克隆菌株,PVX-*FT* 所用引物为 PVX-UP、PVX-DOWN,TCV△CP-*FT* 所用引物为 TCV-UP、TCV-DOWN。选择阳性菌株后,于 LB+50 mg/mL 抗生素(体积比 1 000 : 1)平板上培养

16~18 h,采用 MINI PREP 质粒 DNA 提取试剂盒提取 PVX-*FT* 和 TCV△CP-*FT* 的质粒 DNA 并测序。结果确认后保存质粒。

1.5 质粒的线性化与体外转录

对克隆正确的菌株,用 *Spe*I 进行酶切,使质粒线性化,经等体积酚/氯法提纯后,用乙醇沉淀,加入高压灭菌水溶解,测定浓度,进行体外转录,体外转录体系试剂来自 Promega 公司。反应体系中分别加入 20 μL 无 RNase 的高压灭菌水、5 μL 的 10×缓冲液(Biolabs)、1 μL 的 40 U/μL RNasin(Promega)、5 μL 的 10×NPT4(20 mmol/L 的 ATP、CTP、UTP,2 mmol/L 的 GTP)、5 μL 的 5 mmol/L Cap(m7GpppG,Biolabs)、10 μL 的 0.25 μg/μL 线性化质粒 DNA,总体积 46 μL。将上述试剂充分混合后于 37℃放置 5 min,加入 4 μL 的 50 U/μL T7 RNA 聚合酶(Promega),于 37℃放置 25 min,加入 5 μL 的 20 mmol/L GTP,于 37℃放置 35 min,加入 45 μL 的 EB 溶液(10 mmol/L Tris,pH 8.5),合计体积为 100 μL,然后用酚/氯法提纯,加入 1/10 体积的 NaAC(pH 5.4)和 2 倍体积的无水乙醇沉淀 RNA,离心 20 min,清洗干燥后溶于 20 μL 高压灭菌水中,获得病毒及目的基因 RNA。整个过程采用体积分数 0.1% DEPC 水处理过的一次性用具。

1.6 *FT* 基因功能验证及 PVX-*FT* 接种短日照烟草品种诱导开花试验

1.6.1 PVX-*FT* 接种烟草与对照设置 选择在长日照条件(>12 h)下播种并生长至 4~6 片真叶的短日照品种烟草,在第 5、6 片真叶上各滴 10 μL 转录好的 PVX-*FT* RNA 溶液,采用直径 0.023 mm (600 目)的高温灭菌后的石英沙磨擦接种,标记,然后在整个植株上喷水雾保湿,完成接种工作。接种后的烟草继续保持在长日照条件下生长。

本试验以 PVX-*mFT* 接种烟草为对照,其中

mFT 是将起始密码子(ATG)突变为终止密码子(TAG)的序列,观察突变的 *mFT* 序列是否具有诱导开花的能力,另设空白对照(CK)。试验重复进行 4 次,每个处理每次接种 4 个植株。

1.6.2 接种 PVX-*FT* 和 PVX-*mFT* 烟草的蛋白印迹检测 接种 PVX-*FT* 的烟草开花后,取烟草上部叶片样品 1 g,加入 3.5 mL 冰浴提取液(内含 1 mol/L tris-HCl(pH 8)45 mL、甘油 75 mL、聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpolypyrordone)6 g,定容至 300 mL),放在研钵中用液氮研磨,研磨后在冰上静置 3~4 h,4 ℃下、11 000 r/min 离心 20 min 后提取上清液。上清液用质量分数 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿法转硝酸纤维素膜上,经一抗、二抗孵育,封闭,显色成像。

1.7 TCV△CP-*FT* 和 TCV△CP-*mFT* 接种拟南芥后的 TCV△CP 恢复移动能力试验

1.7.1 TCV△CP-*FT* 和 TCV△CP-*mFT* 接种拟南芥 拟南芥选择长日照野生型 WS 和 *ft-1* 突变株,生长与播种均在短日照条件(8 h)下,选择生长至 6~8 片真叶的植株,取第 4、5、6 片真叶按 1.6.1 的方法接种。接种后的拟南芥喷水雾保湿,继续保持在短日照条件下生长。

1.7.2 对照设置 在拟南芥试验中,TCV△CP 载体连接了 *FT* 功能序列和突变 *mFT* 序列,观察 *FT* 与 *mFT* 序列的移动能力。同时,用绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein,GFP)序列作外源序列对照,同样连接到载体上(TCV △CP-*GFP*),与 TCV△CP-*FT*、TCV△CP-*mFT* 一起分别接种拟南芥。试验在序列测试无误情况下均重复 4 次,每次重复每个处理接种 2 个植株。

1.7.3 接种后拟南芥叶片样品采集 供试拟南芥植物均生长在短日照条件(8 h)下,生长 7 d 后分 4 层采收,分别为接种叶片、新生一轮叶片、新生二轮叶片、新叶及顶芽。采样后立刻放置于液氮中,保存于-80 ℃超低温冰箱中。

1.7.4 拟南芥叶片样品的 RT-PCR 检测及测序 RT-PCR 检测采用异硫氰酸胍法,用 TRIZOL 试剂于低温下研磨拟南芥叶片提取总 RNA^[16]。取制备好的总 RNA 加 1 μL DNAase I (RNAase-Free),放置于 37 ℃条件下 40 min 后再升温 75 ℃保持 10 min,加入 1 μL 10 mmol/L dntp4,同时加入 1 μL 特异引物(包括 500 μg/mL Oligo dT、2 mmol/L 随机引物、设计提取 *FT* 基因下游引物等各 1 μL),在 65 ℃条件下放置 5 min 后置于冰上,加入 4 μL 的 5×

第一链缓冲液、2 μL 的 0.1 mol/L DTT、1 μL 的 RNAase Out(Invitrogen),充分混匀并离心后放置于 42 ℃条件下 2 min,加入 1 μL 的 Superscript II 逆转录酶(MMLV)(Invitrogen),放置于 42 ℃条件下 50 min,然后升温到 70 ℃保温 15 min,反应产物放置于-25 ℃保存。

制备的 cDNA 可以用于 PCR 检测。检测 TCV△CP-*FT* 与 TCV△CP-*mFT* 的人工接种及侵染效果用 TCV-1 与 TCV-2 引物进行,分别处于 TCV 与 *FT* 序列片段上,可以检测 370 bp 大小的片段。引物序列为 TCV-1:5'AGA AAA GTC ATG AAG GTT CTG CTA GCC ACG G3';TCV-2:5' TTA GTC ACG TCG ACT TGG CCA TAA GTA ACC TTT G3'。检测 TCV△CP-*GFP* 以 TCV-1 为上游引物,下游引物为 TCV-G:5'GGG TAA GTT TTC CGT ATG TTG 3',可以检测 400 bp 大小的片段。

2 结果与分析

2.1 PVX-*FT* 对短日照烟草品种开花的诱导

PVX-*FT* 侵染短日照烟草品种 *Maryland Mammoth* 后,结果在长日照条件下开花(图 1)。构建 PVX-*FT* 时,将 *FT* 克隆入 PVX 病毒的 ORF4 (Open Read Frame)与 ORF5 之间及外壳蛋白编码 CP 之前,这样可以在病毒侵染烟草后转录出 *FT* 序列的 mRNA,并且 PVX-*FT* 具有完整的病毒功能,可以在植物体内继续侵染。*FT* 随 PVX 的侵染移动到烟草的各个部位,说明试验中克隆的 *FT* 是具有诱导开花完整功能的序列。试验重复 4 次,结果接种 PVX-*FT* 的烟草均开花,而接种 PVX-*mFT* 的烟草和空白对照(CK)没有开花(图 1)。

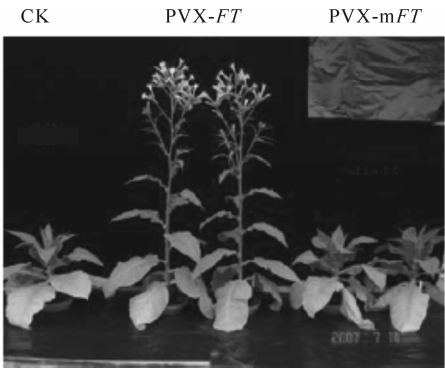


图 1 PVX-*FT* 诱导烟草的开花试验
Fig. 1 PVX-*FT* triggering flowering on Tobacco

2.2 开花烟草的蛋白印迹检测

提取开花烟草与未开花烟草样品进行蛋白印迹检测,结果(图 2)从 PVX-FT 侵染的烟草叶片里检测到了 FT 蛋白,这说明由 PVX 病毒载体所介导的外源基因 *FT* 可以在烟草中成功表达。PVX-mFT 因没有起始密码子,所以侵染烟草后并不表达 FT 蛋白,也没有开花。

2.3 TCVΔCP-FT 的克隆位置与功能分析

TCV 是一个正译单链 RNA 病毒(4 053 nt),有 5 个主要阅读框架,p28 与 p88 是一个组合阅读框,其翻译蛋白对病毒复制起作用;p8 与 p9 为重叠阅读框架编码的蛋白,参与 TCV 在细胞间的移动和系统侵染能力的形成^[17];其后的 3'端是编码外壳蛋白 CP 的序列,CP 序列也是参与 TVC 在细胞间移动与系统侵染能力的重要组件^[14],没有 CP 序列,TCV 将失去在细胞间的移动能力。在 TCVΔCP-FT 与 TCVΔCP-mFT 上,FT 与 mFT 序列代替了原来 CP 序列的位置(图 3),体外转录成 RNA 病毒后,人工接种拟南芥可用于观察病毒 RNA 和目的基因 RNA 的移动能力。

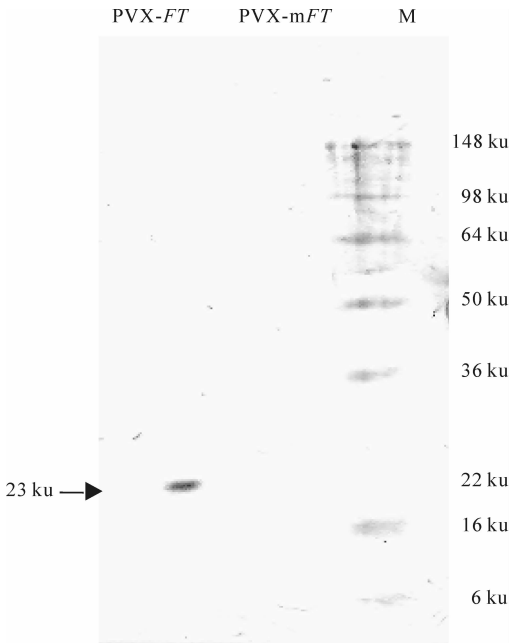


图 2 PVX-FT 和 PVX-mFT 侵染烟草的蛋白印迹检测
Fig. 2 The West blot result of tobacco inoculated by PVX-FT and PVX-mFT

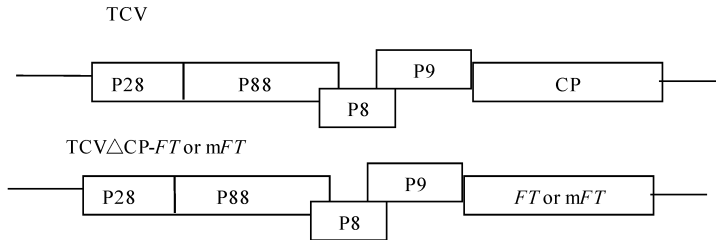


图 3 TCVΔCP-FT 与 TCVΔCP-mFT 的构建图
Fig. 3 Construction map of TCVΔCP-FT and TCVΔCP-mFT

2.4 TCVΔCP-FT 和 TCVΔCP-mFT 侵染拟南芥后的 RT-PCR 检测结果

由图 4 可以看出,没有在接种叶片外检测到外源对照序列 TCVΔCP-GFP,但是分别在新生一轮叶片、新生二轮叶片、新叶及顶芽这 3 层叶片上均检测到了 TCVΔCP-FT 和 TCVΔCP-mFT,而且在

顶端叶片检出明亮条带。这说明 TCVΔCP 在 *FT*-mRNA 序列的帮助下,恢复了病毒本身具有的长距离移动能力,并且其移向新生叶及芽的趋势明显。在野生种 WS 与突变种 *ft-1* 上均检测到同样的结果。

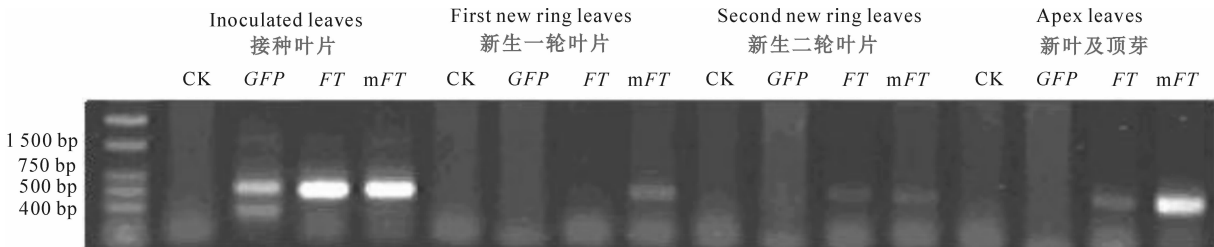


图 4 接种拟南芥不同位置叶片的 RT-PCR 检测结果
Fig. 4 RT-PCR results on different leaves for inoculated Arabidopsis

2.5 受侵染拟南芥顶部叶片检测到 TCV△CP-mFT 的测序分析

RT-PCR 检测结果发现,出现在拟南芥新叶及顶芽的强条带,经分离提纯测序后证实为 TCV△CP-mFT 序列,结果见图 5,图 5a 为 mFT 序

列,图 5b 为正常功能的 FT 序列。测序结果与试验设计序列结果吻合。因为 PCR 所用引物为跨 TCVCP 与 FT 序列,所以测序结果说明 mFT mRNA 序列和 TCV△CP 一起移动到了顶端新生叶片中,但其具体作用机理还需进一步研究。

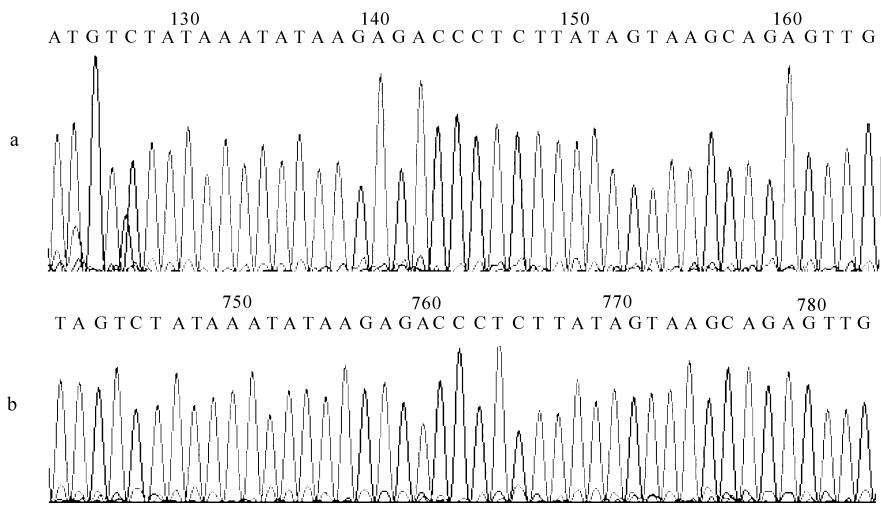


图 5 接种 TCV△CP-mFT 拟南芥顶部叶片 RT-PCR 产物的测序结果
a. mFT 测序序列;b. FT 测序序列

Fig. 5 Results of sequence testing of RT-PCR from *Arabidopsis* apex leaves inoculated by TCV△CP-mFT
a. The sequence of mFT;b. The sequence of FT

2.6 接种后拟南芥的生长状况

接种 TCV△CP-FT 和 TCV△CP-mFT 的拟南芥,其生长状况与正常植株相同,在短日照条件下会先后在 40 d 内开花,并没有什么差别。病毒侵染的植株从外观看不出明显症状,病毒所带外源序列在宿主中常不能正常表达,即发生基因沉默现象^[18]。据此可以认为,病毒带同源基因 FT 侵染拟南芥并不会对开花有影响,而且在拟南芥中很多途径都可以诱导开花,所以接种 TCV△CP-FT 与 TCV△CP-mFT 的拟南芥,与正常植株相比,并未表现出开花时间的差异。

3 讨论

本试验克隆的拟南芥 FT 基因,可以诱导短日照烟草在长日照条件下开花,说明在不同植物间,FT 蛋白诱导的开花功能在遗传物种间具有保守性;在开花烟草的蛋白印迹检测中,检测到了 FT 蛋白,说明能起诱导开花作用的是 FT 蛋白。Huang 等^[5]研究认为,FT mRNA 能从叶片移动到顶端分生组织,有可能就是诱导开花的主要物质。但从本试验来看,起始密码子突变为终止密码子的 FT 序列并没有任何诱导开花的能力,只有能翻译成蛋白

的 PVX-FT 具有诱导开花的效果。

在 FT mRNA 是否具有移动能力上,本研究用不具有细胞间与系统侵染能力的 TCV△CP 作载体,在原来 CP 序列的位置克隆入 FT 和 mFT 序列,侵染拟南芥后均在未接种过的上部新生叶及顶芽检测到了它们的序列,而作为对照加入的 GFP 序列却没有在相同的部位检测到。这一试验结果表明,FT 与 mFT 序列有恢复 TCV△CP 在细胞间移动能力的作用。玉米同源域蛋白 KN1 (KNOTTED1)能够结合其自身的 mRNA 在分生组织的细胞间运输^[19]等研究结果,也让人们在思考植物内源 mRNA 是否还具有其他一些特殊功能,而这些功能可能会在植物生长发育过程中起重要作用。在目前对 FT 的研究中,一般认为其在叶片中表达,经韧皮部转运到顶端与 FD(*Flowering Locus D*)一起激发下游基因诱导开花,其中对 FT 转运方式的研究还不清楚,是否是以 FT mRNA 的形式转运到顶端分生组织,或与 FT 蛋白结合的方式转运到顶芽分生组织参与开花诱导,还需进一步研究。

致谢:本试验得到英国华威大学国际园艺研究中心 Yiguo Hong 博士的悉心指导与大力支持,在此表示感谢。

[参考文献]

[1] Kardailsky I,Shukla V K,Ahn J H,et al. Activation tagging of the floral inducer FT [J]. Science,1999,286:1962-1965.

[2] Kobayashi Y,Kaya H, Goto K,et al. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals [J]. Science,1999,286:1960-1962.

[3] Takada S,Goto K. Terminal flower 2;an Arabidopsis homolog of heterochromatin protein1,counteracts the activation of flowering locus T by constans in the vascuLar tissues of leaves to reguLate flowering time [J]. Plant Cell,2003,15:2856-2865.

[4] Abe M,Kobayashi Y,Yamamoto S,et al. FD,a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex [J]. Science,2005,309:1052-1056.

[5] Huang T,Bohlenius H,Eriksson S,et al. The mRNA of the *Arabidopsis* gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering [J]. Science,2005,309:l694-l696.

[6] Corbesier L,Vincent C,Jang S,et al. FT protein movement contributes to long-distance sig-naling in floral induction of *Ar-abidopsis* [J]. Science,2007,316(5827):l030-1033.

[7] Lucas W J,Yoo B C,Kragler F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2001,2(11):849-857.

[8] Chen Xm,A microRNA as a translational repressor of *apetala2* in arabidopsis flower development [J]. Science. 2004,303(5666):2022-2025.

[9] Yijun Qi,Thierry Pélissier,Asuka Itaya,et al.Direct role of a viroid rna motif in mediating directional rna trafficking across a specific cellular boundary [J]. Plant Cell,2004,16(7):1741-1752.

[10] Lough T J,Lee R H,Emerson S J,et al. Functional analysis of the 5' untranslated region of potexvirus RNA reveals a role in viral replication and cell-to-cell movement [J]. Virology,2006,351(2):455-465.

[11] Zhong X H,Tao X R,Jesse Stombaugh,et al. Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking [J]. The EMBO Journal,2007,26:3836-3846.

[12] Xoconostle-Cázares B,Xiang Y,Ruiz-Medrano R. Plant paral-og to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem [J]. Science,1999,283(5398):94-98.

[13] Byung-Chun Yoo,Friedrich Kragler,Erika Varkonyi-Gasic. A systemic small rna signaling system in plants [J]. Plant Cell,2004,16(8):1979-2000.

[14] Cohen Y,Gisel A,Zambrysky P C. Cell-to-cell and systemic movement of recombinant green fluorescent protein-tagged Turnip crinkle virus [J]. Virology,2000,273:258-266.

[15] Eugene V Ryabov,Rene Van Wezel,John Walsh,et al. Cell-to-Cell,but not long-distance,spread of RNA silencing that is induced in individual epidermal cells [J]. Journal of Virology,2004,78:3149-3154.

[16] Chomczyshi P,Sacchi n a. Single-step method of RNA isola-tion by acid guanidinium thiocyanatc-phenol-chloroform ex-traction [J]. Anal Biochem,1987,162:156-159.

[17] Hacker D L,Petty I T,Wei N,et al. Truniip crinkle virus genes required for RNA replication and virus movement [J]. Virology,1992,186:1-8.

[18] Napoli C,Lemieux C,Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible cosuppression of homologous gene in trans [J]. Plant Cell,1990(2):279-289.

[19] Lucas W J,Yoo B C,Kragler F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2001,2(11):849-857.