

领域前沿 · 中国



王佳伟, 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所研究员, 博士生导师。2005年毕业于上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 获植物分子遗传学博士学位。2005年至2011年在德国马普发育生物学研究所从事博士后研究。王佳伟研究员主要从事植物小分子RNA的功能研究, 鉴定了调控植物生长发育的年龄途径。从事科研工作以来共发表研究论文16篇, 代表性研究成果发表在*Cell*、*Science*、*eLife*、*PNAS*、*Plant Cell*和*Plos Genetics*等国际核心期刊上。2012年在*Plant Cell*上发表论文, 解析了赤霉素诱导植物开花的分子机理。2013年在*eLife*杂志上报道, 糖是植物的体内年龄途径的上游调控因子。最近, 在*Science*杂志上发表了关于多年生草本植物开花机理的最新研究成果(Zhou CM, et al. *Science*, 2013)。2012年, 王佳伟研究员获得中组部“青年千人计划”、国家基金委“优秀青年基金”和上海市科委“浦江人才计划”支持。

多年生草本植物开花的分子机理

周川苗 王佳伟*

(中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032)

万千的自然环境造就了万千的植物种类, 而各种植物的开花又具有多样性。不同的植物可以在一年中不同的季节开花, 还可以在一天中不同的时间开花。植物按照开花次数来分类, 可以分为单次开花和多次开花植物。单次开花植物例如竹子, 一生只开一次花, 然后全株死亡; 多次开花植物可以在每年的固定时间开花。植物按照生活周期来分类, 可以分为一年生(annual)、二年生(biennial)及多年生植物(perennial)。一年生植物在一年内完成生命过程, 然后全株死亡。多年生植物生活周期比较长, 一般为两年以上^[1-3]。

植物由营养生长到生殖生长的转换, 称为开花诱导, 它直接影响着植物能否正常地繁衍后代, 并直接关系到农作物的产量。在进化过程中, 植物产生出一套适应机制, 在外界环境最适宜的条件下开花结果。通过对一年生植物拟南芥的研究, 目前鉴定了5条开花途径。春化和光周期途径对外源的环境

信号作出反应, 从而调节开花; 而自主、赤霉素和年龄途径感知内源信号, 影响开花。在不断变化的外部环境条件和内部生理条件下, 这些途径通过一些主要的整合基因如*SOC1*、*FT*和*LFY*等实现了对拟南芥开花时间的精确调控^[4-10]。

温度和光照是影响植物开花的最重要的外界环境因素。大多数冬性一年生或者二年生植物在种子萌动期或营养生长初期必须经过一定时期的低温处理(通常为4 °C, 2~8周)才能开花。这一低温处理一定时期而促进植物开花的作用称为春化作用(vernalization)。近年来, 通过对拟南芥的研究, 人们发现*FLOWERING LOCUS C(FLC)*基因是受春化途径调控的主要基因。*FLC*编码MADS-box转录因子, 是开花时间调控中的抑制因子^[11]。*FLC*在顶端分生组织和维管组织中分别结合到*FLOWERING LOCUS T(FT)*和*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1(SOC1)*启动子的CaRG盒抑制它们的表达, 从而抑制花分生组织决定基因延迟植物成花^[12-13]。作为开花途径中的一个关键因子, *FLC*的表达不但受来自环境和生长发育的信号

*通讯作者。Tel: 021-54924263, E-mail: jwwang@sibs.ac.cn

*Corresponding author. Tel: +86-21-54924263, E-mail: jwwang@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2013-07-31 15:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130731.1549.001.html>

调控,而且非编码RNA同样参与到 FLC 在春化中的表观遗传学修饰,其中就包括 FLC 的反向转录本、内含子上的非编码RNA以及反向转录本启动子区域的短RNA^[14-16]。

光周期是指一天之中,白天和黑夜的相对长度。作为兼性长日照植物拟南芥,长日照条件可以促进其开花。在长日照条件下,植物的叶片在接收到光周期信号后,转录因子CONSTANS(CO)会快速积累,从而激活成花素基因 FT 的表达促进开花。而在短日照条件下,CO蛋白不能快速积累激活 FT ,从而抑制开花^[17-23]。

年龄和植物激素途径是调控拟南芥开花的重要内源信号。其中,植物年龄途径是由一个小分子RNA(microRNA, miRNA)——miR156调控的。miRNA是一类长度约为21 nt、具有基因表达调控能力的非编码的RNA。miR156是目前已知的植物年龄途径中最上游的调控分子,它是介导年龄与植物生长发育的重要中介分子^[10]。miR156的表达受到年龄调节,其含量随着植物的生长而逐渐降低,它的靶基因 $SQUAMOSA\ PROMOTER\ BINDING\ PROTEIN-LIKE(SPL)$ 类转录因子的积累则呈现逐渐上升的趋势。SPL可以直接激活 $SOC1$ 、 FUL 和 API 等 $MADS-box$ 基因的表达诱导植物开花^[10]。miR156的靶基因 $SPL9$ 还可以结合到miR172的启动子上促进其表达,而miR172通过下调AP2类开花抑制因子的表达促进开花^[24]。

赤霉素(gibberellin, GA)是调控植物生长发育的重要激素之一。在拟南芥中,GA是短日照条件下开花诱导的关键因子。GA通过与受体蛋白GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1(GID1)结合,促进转录调节蛋白DELLA的泛素化降解,DELLA蛋白包括REPRESSOR OF GA1-3 1(RGA),GA INSENSITIVE(GAI),RGA-LIKE1(RGL1)、RGL2和RGL3^[25-27]。GA可以通过激活 $MADS-box$ 基因和 LFY 的表达调控开花。最近的研究发现,DELLA可以和SPL相互作用,DELLA与SPL异源二聚体的形成降低了SPL的转录激活活性,导致下游基因miR172、 FUL 和 $SOC1$ 的激活受到阻遏,进而延迟了植物的开花^[28]。

拟南芥开花的途径并不是孤立的,而是根据外部环境条件和拟南芥内在生理条件的变化,通过控制一些开花途径的关键整合因子,激活或抑制下游花序分生组织基因和花器官基因的表达,从而使植

物适应环境条件和自身生理条件的变化,最大程度上优化其生长及发育的需要。目前,对一年生植物拟南芥开花途径已经有了比较清楚的了解,最近对多年生植物开花调控的分子机理有了新的认识。

高山南芥(*Arabis alpina*)是一种多年生的草本,拟南芥 FLC 的同源基因 $PERPETUAL\ FLOWERING\ 1(PEPI)$ 调控了高山南芥开花和春化反应。与拟南芥 FLC 不同,PEPI仅短暂地被低温抑制,当植株开花后会被重新激活^[29]。但是对于高山南芥的研究并没有揭示内源信号途径(如:年龄途径)对多年生植物开花调控的贡献。由于多年生植物大多具有生长周期长,遗传转化困难等缺点,我们试图寻找一种新的适合研究多年生的模式植物。最终,我们找到一种称为弯曲碎米荠的多年生草本,研究内源途径中年龄途径对开花的贡献及其与其他开花途径的整合。

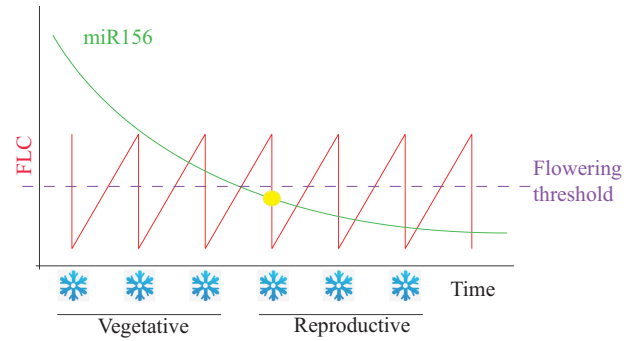
弯曲碎米荠(*Cardamine flexuosa*),属于十字花科碎米荠属,广泛分布于欧洲和亚洲各地,是多年生草本。弯曲碎米荠具有以下优点:(1)生长周期快:从种子萌发到种子成熟约5个月;(2)植物体型小,易于实验室操作;(3)稳定的遗传:弯曲碎米荠是自花授粉植物;(4)简单高效的遗传转化方式:弯曲碎米荠和拟南芥一样,可以通过浸花法进行遗传转化^[30];(5)与拟南芥基因组的类似性:弯曲碎米荠同拟南芥同属于十字花科,但是却有着明显不同的生活习性,是比较基因组研究的良好材料。因此,我们选取弯曲碎米荠为研究对象。

在实验室温室种植时我们发现,弯曲碎米荠的成花诱导需要春化。不经历春化,弯曲碎米荠则一直处于营养生长期,不会抽薹开花。在拟南芥中, FLC 是春化途径的关键负调控因子。于是我们首先利用同源基因克隆的方法,克隆了弯曲碎米荠中的 $FLC(CfFLC)$ 。与野生型相比, $CfFLC$ 敲除的转基因植株不经历春化即可开花。这个结果表明, $CfFLC$ 也是调控春化反应的关键基因。基因表达分析显示, $CfFLC$ 的表达量在春化之前处于一个较高的水平,春化之后, $CfFLC$ 的表达量明显降低,但是随着时间的推移, $CfFLC$ 的表达量逐渐上升到春化之前的水平。这一点在一年生拟南芥和多年生弯曲碎米荠中是不一样的。在拟南芥中, FLC 的表达在春化之后降到较低的水平,并且会维持在较低的水平。 $CfFLC$ 的这种表达模式与弯曲碎米荠多年生的习性是相吻合的。

实验中另一个有趣的现象是: 弯曲碎米荠对低温的感受是依赖于年龄的。幼年的弯曲碎米荠(1~2周)即使经历春化, 仍不会开花; 只有成年(大于4周)的植株才能感受低温, 出现正常的春化反应。这一现象使我们猜想, 年龄途径很可能参与弯曲碎米荠的春化反应, 于是我们开始探索年龄途径和春化途径的关系。已有的研究表明, miR156是目前已知的年龄途径最上游的调控因子。在弯曲碎米荠中, miR156的含量随着年龄的增加逐渐降低, 它的靶基因*CfSPL9*的表达量逐渐上升。这个结果表明, miR156是一类进化上非常保守的小分子RNA。为了进一步的功能分析, 我们首先构建了miR156上调和下调的转基因植株。研究发现, 不经历春化, miR156上调和下调的转基因植株都不会开花。但是, miR156下调的转基因植株呈现出明显的成年态化, 幼年(生长1周)的植株即可出现正常的春化反应, 抽薹开花; 与之相反, miR156上调的转基因植株则呈现出幼态化, 即便是生长10周的植株仍然对春化反应不敏感。因此, 年龄途径的miR156设定了春化反应的敏感性阈值。

在拟南芥中, *SOC1*是开花整合基因之一。过量表达弯曲碎米荠的*SOC1*(*CfSOC1*)可以不经春化即可开花, 表明*CfSOC1*位于春化途径的下游。*CfSOC1*的表达与*CfFLC*的表达在春化前后呈现出相反的趋势。幼年和成年的弯曲碎米荠春化前后, *CfFLC*的表达量都会明显降低, 但是*CfSOC1*的表达却明显不同。成年的弯曲碎米荠春化之后, *CfSOC1*的表达量明显升高, 而幼年的植株经历春化后, *CfSOC1*的表达量没有变化。我们推测, 幼年的弯曲碎米荠对春化作用不敏感是因为无法激活下游整合基因*CfSOC1*的表达, 而不是对春化途径的负调控因子*CfFLC*的抑制。春化前后, *CfFLC*的表达水平变化趋势不因miR156的上调或下调而发生变化, 但是*CfSOC1*的表达水平变化却随着miR156含量的高低发生改变。生长1周的miR156下调的转基因植株与野生型相比, *CfSOC1*的表达水平在春化之后明显升高; 而生长5周的miR156上调的转基因植株与野生型相比, *CfSOC1*的表达水平在春化之后没有明显变化。

在拟南芥中, miR156通过miR172促进幼年期到成年期的转换^[24,31]。在弯曲碎米荠中, miR172的含量随着年龄的增长而逐渐增加。过量表达miR172



*FLC*的表达(红色)感受温度变化, 呈现四季振荡状态。其含量在每年的冬天来临之间最高, 越冬之后其含量降至最低。miR156(绿色)感受植物的年龄, 其含量逐渐下降。黄色圆圈代表首次开花时间。弯曲碎米荠的首次开花需要*FLC*和miR156的含量同时降低到开花阈值线(紫色)以下。在此之前, 弯曲碎米荠处于营养生长期, 而此之后则在每年的春天开花。

The expression of *FLC* (red line) is oscillating, with the highest level before winter and lowest level in spring. miR156 (green line) is regulated by age. The level of this miRNA is gradually decreased. The first flowering (yellow circle) of *C. flexuosa* occurs when the levels of *FLC* and miR156 are below the flowering threshold (violet dot line). *C. flexuosa* stays in vegetative phase before the first flowering, whereas it shows typical polycarpic growth habit afterwards.

图1 年龄和春化作用共同调控弯曲碎米荠开花时间

Fig.1 Integration of age and vernalization pathways in *C. flexuosa*

的转基因植株对春化呈现出不同程度的反应。高表达miR172的转基因碎米荠可以不经春化即可开花。遗传分析表明, miR172与*CfFLC*处于不同的开花途径平行调控开花。

以上的研究结果表明, 春化途径和年龄途径共同调控了弯曲碎米荠的初次开花(图1)。当年龄途径的miR156含量降低到开花阈值之下, 并且同时经历春化, 弯曲碎米荠就会初次开花。在此之后, miR156的含量一直处于开花阈值之下, 是否开花主要取决于*CfFLC*的含量, *CfFLC*的含量在每年的春天降到最低, 因此弯曲碎米荠在每年的春天开花。年龄途径和春化途径的偶联与多年生植物的生长习性密切相关, 它可以确保植物在获得足够的生物量(即进入成年期)后才能感受外界环境的变化, 开花结果, 繁衍后代。尽管拟南芥中同样存在年龄途径和春化途径, 但是拟南芥并未出现年龄依赖的春化反应。这表明, 开花的多样性可能是由于不同的物种间, 不同开花途径贡献率不同决定的。这些结果第一次阐明植物利用年龄信号对外界环境信号作出反应并且可能影响植物进化。

参考文献 (References)

- 1 Amasino R. Floral induction and monocarpic versus polycarpic life histories. *Genome Biol* 2009; 10(7): 228.
- 2 Albani MC, Coupland G. Comparative analysis of flowering in annual and perennial plants. *Curr Top Dev Biol* 2010; 91: 323-48.
- 3 Bergonzi S, Albani MC. Reproductive competence from an annual and a perennial perspective. *J Exp Bot* 2011; 62(13): 4415-22.
- 4 Samach A, Wigge PA. Ambient temperature perception in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; 8: 483-6.
- 5 Kobayashi Y, Weigel D. Move on up, it's time for change: Mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev* 2007; 21(19): 2371-84.
- 6 Farrona S, Coupland G, Turck F. The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19(6): 560-73.
- 7 Turck F, Fornara F, Coupland G. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Ann Rev Plant Biol* 2008; 59: 573-94.
- 8 Kim DH, Doyle MR, Sung S, Amasino RM. Vernalization: Winter and the timing of flowering in plants. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2009; 25: 277-99.
- 9 Mutasa-Gottgens E, Hedden P. Gibberellins a factor in floral regulatory networks. *J Exp Bot* 2009; 60(7): 1979-89.
- 10 Wang JW, Czech B, Weigel D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 2009; 138(4): 738-49.
- 11 Michaels SD, Amasino RM. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 1999; 11(5): 949-56.
- 12 Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Krober S, *et al.* The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2006; 20(7): 898-912.
- 13 Helliwell CA, Wood CC, Robertson M, Peacock WJ, Dennis ES. The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly *in vivo* with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *Plant J* 2006; 46(2): 183-92.
- 14 Swiezewski S, Liu F, Magusin A, Dean C. Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature* 2009; 462(7274): 799-802.
- 15 Heo JB, Sung S. Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 2011; 331(6013): 76-9.
- 16 Turck F, Coupland G. When vernalization makes sense. *Science* 2011; 331(6013): 36-7.
- 17 Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, Ikeda Y, *et al.* FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 2005; 309(5737): 1052-6.
- 18 Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, Lohmann JU, *et al.* Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science* 2005; 309(5737): 1056-9.
- 19 Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, *et al.* FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 2007; 316(5827): 1030-3.
- 20 Jaeger KE, Wigge PA. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2007; 17(12): 1050-4.
- 21 Lin MK, Belanger H, Lee YJ, Varkonyi-Gasic E, Taoka K, Miura E, *et al.* FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* 2007; 19(5): 1488-506.
- 22 Mathieu J, Warthmann N, Küttner F, Schmid M. Export of FT protein from phloem companion cells is sufficient for floral induction in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2007; 17(12): 1055-60.
- 23 Taoka K, Ohki I, Tsuji H, Furuita K, Hayashi K, Yanase T, *et al.* 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* 2011; 476(7360): 332-5.
- 24 Wu G, Park MY, Conway SR, Wang JW, Weigel D, Poethig RS. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 2009; 138(4): 750-9.
- 25 Harberd NP. Botany. Relieving DELLA restraint. *Science* 2003; 299(5614): 1853-4.
- 26 Schwechheimer C, Willige BC. Shedding light on gibberellic acid signalling. *Curr Opin Plant Biol* 2009; 12(1): 57-62.
- 27 Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T. Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 2008; 456(7221): 459-63.
- 28 Yu S, Galvao V, Zhang YC, Horrer D, Zhang TQ, Hao YH, *et al.* Gibberellin regulates *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. *Plant Cell* 2012; 24(8): 3320-32.
- 29 Wang RH, Farrona S, Vincent C, Joecker A, Schoof H, Turck F, *et al.* PEP1 regulates perennial flowering in *Arabis alpina*. *Nature* 2009; 459(7145): 423-7.
- 30 Clough SJ, Bent AF. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1998; 16(6): 735-43.
- 31 Chen X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science* 2004; 303(5666): 2022-5.