

AT-hook 基因 *AHL27* 过量表达延迟拟南芥开花

肖朝文, 陈福祿, 傅永福

(中国农业科学院作物科学研究所, 大豆分子遗传国家重点实验室, 北京 100081)

摘要:拟南芥中有 29 个被称为 AHL 的蛋白质(AT-hook motif nuclear localized protein),但是大多数 AT-hook 蛋白的功能未知,其中 *AHL27* 蛋白含有一个 AT-hook 基序和一个 PPC 结构域。*AHL27* 在不同器官的 mRNA 表达和 GUS 组织化学染色分析表明,*AHL27* 主要在根和花中表达;GFP-*AHL27* 亚细胞定位显示 *AHL27* 蛋白是一个核定位蛋白。*AHL27* 基因的过量表达,可抑制开花基因 *FT* 的表达,同时促进 *FLC* 的表达,从而延迟拟南芥在长日和短日条件下的开花时间。研究表明,*AHL27* 基因在拟南芥的生长发育中起重要作用。

关键词:拟南芥;*AHL27*;AT-hook;开花时间

中图分类号:Q751 文献标识码:A 文章编号:1008-0864(2009)04-0089-06

Over-expression of AT-hook Gene *AHL27* Can Delay the Flowering of *Arabidopsis*

XIAO Chao-wen, CHEN Fu-lu, FU Yong-fu

(National Key Laboratory for Soybean Molecular Genetics, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract:There are 29 AHL proteins (AT-hook motif nuclear localized proteins) in *Arabidopsis*, but the functions of their majorities remain unknown. The *AHL27* protein, reported in this study, contains an AT-hook motif and a PPC domain. The analysis of mRNA expression in different tissue organs and GUS histochemical staining showed that *AHL27* was mainly expressed in roots and flowers. The sub-cellular localization of GFP-*AHL27* indicated that *AHL27* was a nuclear protein. *AHL27* over-expression could inhibit the expression of flowering gene *FT* and promote the *FLC* expression, therefore, delay the *Arabidopsis* flowering time both under long daylight and short daylight conditions. Our data suggested that *AHL27* could play a very important role in *Arabidopsis* growth and development.

Key words:*Arabidopsis thaliana*; *AHL27*; AT-hook; flowering time

在拟南芥中有一类含有 AT-hook 基序的核定位蛋白,这类蛋白被命名为 AHL(AT-hook nuclear localized proteins)蛋白,AHL 蛋白家族有 29 个成员,它们对整个拟南芥的生长发育起着重要的调控作用^[1]。AT-hook 是一种短的 DNA 结合蛋白基序,首先是在哺乳动物染色体非组蛋白的高移动群蛋白 HMG-I/Y 中发现的^[2]。AT-hook 基序是以精氨酸-甘氨酸-精氨酸-脯氨酸(RGRP)4 个氨基酸残基为中心的小基序结构,这个短的保守氨基酸序列对蛋白与 DNA 的结合是必须的^[3]。目前对拟南芥 AHL 蛋白的功能研究相对较少,大多数基因的功能还不清楚。Fujimoto

等^[1]发现 AHL1 蛋白通过 AT-hook 基序与染色体的核基质附着区(MAR)结合^[1]。*AHL25* 能够调控赤霉素 *AtGA3ox1* 基因的表达而影响 GA₃ 氧化酶的活性^[4]。*AHL27* (*At1g20900*) 过量表达可降低叶片衰老基因 mRNA 的表达水平,同时提高叶片的光合效率和叶绿素含量,从而延缓植物叶片的衰老^[5]。*AHL27* 还能够结合到豌豆基因 *PRA2* 启动子中富含 AT 碱基的区域^[5]。*AHL27* 和 *AHL29* 能够抑制拟南芥下胚轴的伸长,并且基因功能冗余^[6]。虽然 Weigel 等^[7]发现 *AHL27* 基因过量表达会导致拟南芥晚开花的表型,但是

收稿日期:2009-03-23;修回日期:2009-06-29

基金项目:中国农业科学院杰出人才基金资助。

作者简介:肖朝文,博士研究生,研究方向为植物发育分子生物学。通讯作者:傅永福,研究员,主要从事植物发育分子生物学研究。
Tel:010-82105864; E-mail:fufu19cn@163.com

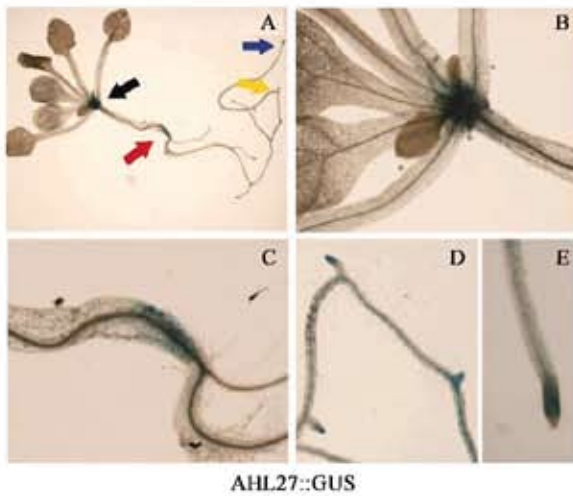


图2 AHL27::GUS 转基因植株的 GUS 染色检测
Fig. 2 GUS staining assay of AHL27::GUS transgenic plants.

A. 整株幼苗(14 d); B. 分生组织; C. 下胚轴和根的连接处; D. 根; E. 根尖。B,C,D,E 分别是黑色,红色,黄色,蓝色箭头处的局部放大图(放大倍数为8倍)。
A. The whole seedling(14 d); B. The meristem; C. The hypocotyl-root transition zone; D. The root; E. The root tip. The black, red, yellow and blue arrows indicate the focus sites which display in the close-up images in B, C, D, E(8×).

位。这与 Genevestigator 生物网站对 AHL27 表达模式的预测结果和实时定量 PCR 的检测结果一致,证明了 AHL27 在不同组织的表达水平。根据

基因的表达模式推测基因功能, AHL27 在根和下胚轴中的高表达说明 AHL27 可能参与根和下胚轴的生长发育;同时, AHL27 在幼苗的顶端分生组织中有较强的 GUS 活性,表明 AHL27 可能通过在顶端分生组织的高表达调控植物的开花。

2.2 AHL27 蛋白的细胞定位

AT-hook 蛋白含有一个 AT-hook 基序和一个 PPC 结构域,这些结构都有利于蛋白质的核定位。同时,AT-hook 蛋白作为一种转录因子与 DNA 结合,主要在细胞核中起作用,调控目标基因的表达。以表达载体 35S::GFP::AHL27 转化拟南芥野生型,得到 GFP::AHL27 过量表达的转基因植株。以 CRY1 蛋白为对照,利用 GFP 抗体作为探针检测转基因植株中 GFP-AHL27 蛋白的表达,结果表明融合蛋白 GFP-AHL27 已经过量表达(图 3-A)。取长日照条件下,发芽后生长 3 d 的 35S::GFP::AHL27 和 35S::GFP 幼苗,以 35S::GFP 幼苗中的 GFP 为对照,利用显微共聚焦观察 AHL27 蛋白的定位。在图 3-B 中可以清楚的观察到作为对照的 GFP 在细胞质和细胞核中都有表达,而 GFP-AHL27 蛋白只在叶片保卫细胞和下胚轴细胞中的细胞核中表达,在细胞质中没有表达,证明 AHL27 蛋白定位于细胞核。

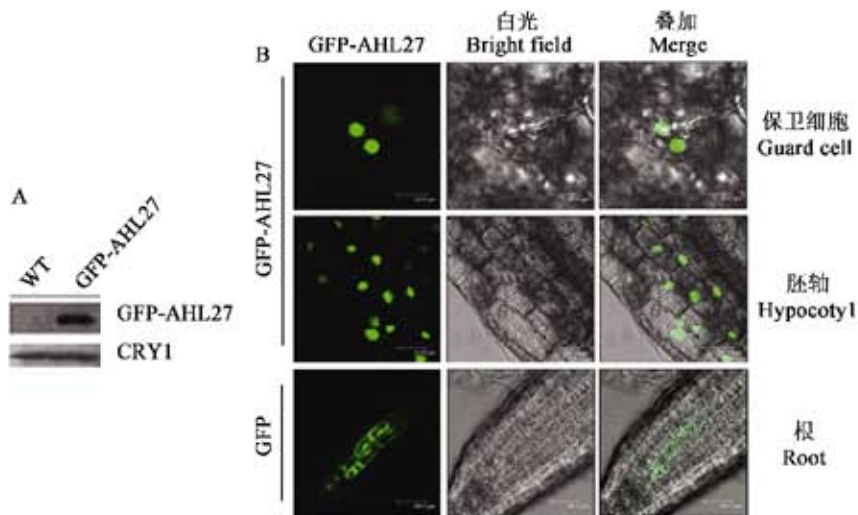


图3 蛋白免疫检测和 GFP-AHL27 亚细胞定位

Fig. 3 Protein immunodetection and subcellular localization of GFP-AHL27.

A. 35S::GFP::AHL27 幼苗中 GFP-AHL27 蛋白,以 CRY1 蛋白为对照。B. 显微共聚焦观察 35S::GFP::AHL27 和 35S::GFP 幼苗中的 GFP 荧光。左边一列为 GFP 荧光图,中间一列为白光下的图片,右边为左图和中间图的叠加图,35S::GFP 为对照。
A. GFP-AHL27 protein in 35S::GFP::AHL27 seedlings. The CRY1 protein is used as a control. B. Confocal images show the presence of GFP in of 35S::GFP::AHL27 and 35S::GFP seedlings. Left panels, fluorescence images of GFP; middle panels, bright field images; right panels, merged fluorescence images of GFP and bright field images. GFP in 35S::GFP is used as control.

2.3 *AHL27* 基因过量表达延迟拟南芥的开花时间

二元载体 p35S::*AHL27* 通过农杆菌浸沾花序的方法,转化拟南芥野生型,获得转基因植株。将拟南芥野生型和 *AHL27* 基因过量表达植株播种在长日照和短日照条件下,统计植株开花时莲座叶和茎生叶的数目。相对于野生型,35S::*AHL27* 过量表达植株在长日和短日条件下都表现为晚开花;同时,叶片有向上卷曲的现象(图 4-A,B,C,D)。RT-PCR 的结果证明了 *AHL27* 基因已经过量表达(图 4-E)。因此,无论是在长日照还是在短日照条件下,*AHL27* 基因的过量表达都可延迟拟南芥的开花时间。

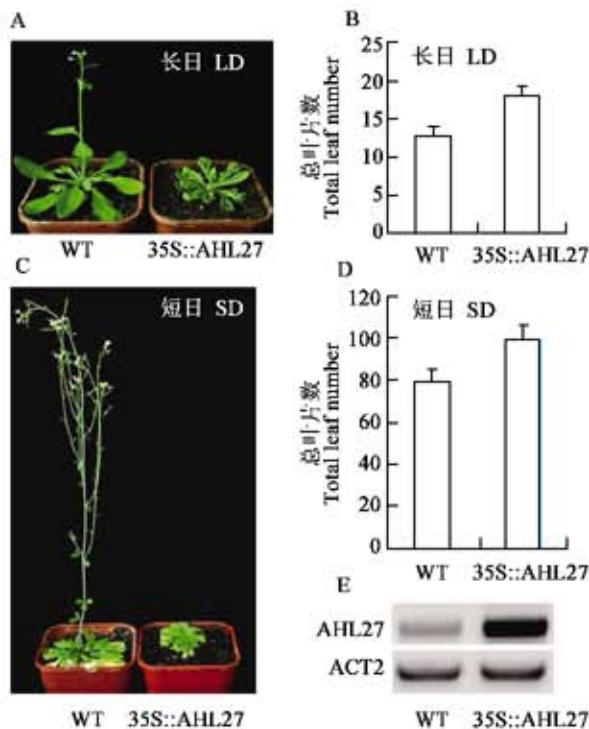


图 4 *AHL27* 过表达植株在长日和短日条件下的开花时间
Fig. 4 The flowering time of *AHL27* overexpress plants in long day and short day conditions.

A, C. 长日下生长 40 d 和短日下生长 150 d 的野生型和 35S::*AHL27* 过量表达植株。B, D. 长日条件和短日条件下野生型和 35S::*AHL27* 过表达植株开花时的莲座叶和茎生叶的总叶片数。E. 以拟南芥 *ACTIN2*(*ACT2*) 基因为内参基因,半定量 RT-PCR 检测野生型,35S::*AHL27* 过表达植株中 *AHL27* 基因的 mRNA 表达。

A, C. 40-old-day and 150-old-day wild type (WT) and 35S::*AHL27* overexpression plants grown in long day (LD) and short day (SD) conditions, respectively. B, D. The total leaf number (rosette leaf and cauline leaf) of WT and 35S::*AHL27* overexpression plants after flowering in LD and SD, respectively. E. Detection of *AHL27* mRNA expression in WT, 35S::*AHL27* overexpression plants by semi-quantitative RT-PCR, *ACTIN2* (*ACT2*) acts as control gene.

2.4 *AHL27* 过量表达对开花基因的影响

CO 和 *FT* 是拟南芥开花途径中光周期途径的两个关键基因,而 *FLC* 是春花途径和自主途径中的一个关键基因;*CO* 和 *FT* 促进植物开花,而 *FLC* 抑制植物开花。通过实时定量 PCR,检测了 *CO*, *FT* 和 *FLC* 在 *AHL27* 过量表达植株中的 mRNA 表达水平。结果表明,相对于野生型,在 *AHL27* 过量表达植株中,*FT* 和 *FLC* 的 mRNA 表达水平明显改变,而 *CO* 没有变化。*FT* 的 mRNA 表达水平明显下调,而 *FLC* 的 mRNA 表达水平却显著升高(图 5),所以,*AHL27* 过量表达的晚开花表型是 *FT* 和 *FLC* 的 mRNA 表达水平变化共同作用的结果。因此,*AHL27* 基因是通过调节主要开花基因的表达水平参与拟南芥开花时间的调控。

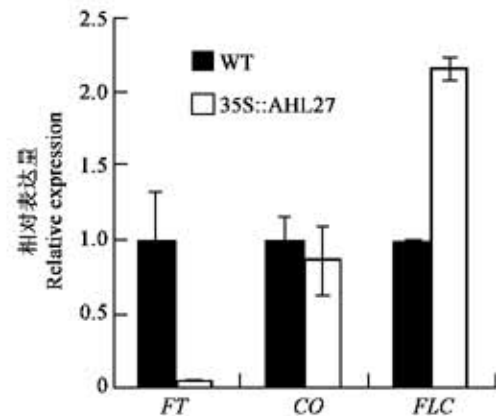


图 5 实时定量 PCR 检测野生型和 35S::*AHL27* 过表达植株中 *FT*, *CO* 和 *FLC* 的 mRNA 表达水平
Fig. 5 The mRNA expression levels of *FT*, *CO* and *FLC* were detected by quantitative real-time PCR in wild type (WT) and 35S::*AHL27* seedlings.

3 讨论

AHL27 基因过量表达不但会延缓植物叶片的衰老^[5],抑制下胚轴的伸长^[6],同时也会延迟拟南芥的开花时间^[7]。*AHL27* 过量表达延缓植物叶片衰老主要是由于抑制了叶片衰老基因 *SEN4* 和 *SAG12* 的 mRNA 表达,同时还提高了叶片的光合效率和叶绿素含量^[5],但其对开花的调节机理尚无深入的研究^[7]。本研究表明,*AHL27* 基因过量表达延迟拟南芥的开花时间,是通过调节开花基因 *FT* 和 *FLC* mRNA 的表达实现的,一方面是抑制了开花促进因子 *FT* 的 mRNA 表达,另一方面

是增加了开花抑制因子 FLC 的表达。生物信息学分析表明 AHL27 含有一个 AT-hook 基序,与 DNA 的结合有强的亲和性,属于 I 型 AT-hook 蛋白^[3]。Lim 等^[5]证明 AHL27 作为 AT-hook 蛋白,能够与豌豆 PRA2 基因的启动子中富含 AT 碱基的区域相结合^[5],但是到目前为止,都没有筛选到 AHL27 蛋白的直接靶基因。通过序列分析发现 FT 和 FLC 基因启动子具有富含 AT 碱基的序列,因此推测 FT 和 FLC 可能是 AHL27 蛋白的靶基因,但是,AHL27 蛋白与 FT 和 FLC 基因启动子富含 AT 碱基的 DNA 序列直接结合而调控植物的开花还需要进一步的实验来研究验证。

基因表达分析和 GUS 组织化学染色结果表明 AHL27 基因主要表达在顶端分生组织、下胚轴和根的部位,在其他器官中的表达相对较低,这也与 Genevestigator 生物网站对 AHL27 表达模式的预测结果一致。这表明 AHL27 基因很可能在顶端分生组织调节植物开花,在根和下胚轴中的表达则可能与根和下胚轴的生长发育有关^[17],Street 等^[6]已证明 AHL27 的确参与拟南芥下胚轴生长的调控。

本研究证明 AHL27 过量表达影响了重要的开花基因 FT 和 FLC 的表达,为进一步揭示 AHL27 在拟南芥开花调控网络中的位置和作用,阐明植物开花机理及其在农业生产上的应用具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Fujimoto S, Matsunaga S, Yonemura M, *et al.*. Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces [J]. *Plant Mol. Biol.*, 2004, 56: 225-239.
- [2] Eckner R, Birnstiel M L. Cloning of cDNAs coding for human HMG I and HMG Y proteins; both are capable of binding to the octamer sequence motif[J]. *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17: 5947-5959.
- [3] Aravind L, Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26:4413-4421.
- [4] Matsushita A, Furumoto T, Ishida S, *et al.*. AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of AtGA3ox1 encoding GA 3-oxidase[J]. *Plant Physiol.*, 2007, 143:1152-1162.
- [5] Lim P O, Kim Y, Breeze E, *et al.*. Overexpression of a chromatin architecture-controlling AT-hook protein extends leaf longevity and increases the post-harvest storage life of plants[J]. *Plant J.*, 2007, 52:1140-1153.
- [6] Street I H, Shah P K, Smith A M, *et al.*. The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in *Arabidopsis* [J]. *Plant J.*, 2008, 54:1-14.
- [7] Weigel D, Ahn J H, Blazquez M A, *et al.*. Activation tagging in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.*, 2000, 122:1003-1013.
- [8] Blazquez M A, Weigel D. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2000, 404:889-892.
- [9] Komeda Y. Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 2004, 55: 521-535.
- [10] Mouradov A, Cremer F, Coupland G. Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity[J]. *Plant Cell*, 2002, 14 Suppl:S111-130.
- [11] Percy F. Flowering a time for integration [J]. *Int. J. Dev. Biol.*, 2005, 49:585-593.
- [12] LeClere S, Bartel B. A library of *Arabidopsis* 35S-cDNA lines for identifying novel mutants[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2001, 46: 695-703.
- [13] Cutler S R, Ehrhardt D W, Griffiths J S, *et al.*. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97:3718-3723.
- [14] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J.*, 1998, 16:735-743.
- [15] Logemann E, Birkenbihl R P, Ulker B, *et al.*. An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol[J]. *Plant Methods*, 2006, 2:16.
- [16] Lin C, Ahmad M, Cashmore A R. *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development[J]. *Plant J.*, 1996, 10: 893-902.
- [17] Oyama T, Shimura Y, Okada K. The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl[J]. *Genes Dev.*, 1997, 11:2983-2995.