

高 营, 林 云, 袁星星, 等. 蚕豆 *VfGASAI* 基因的异源过表达延迟拟南芥开花[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 44-52.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.01.006

## 蚕豆 *VfGASAI* 基因的异源过表达延迟拟南芥开花

高 营<sup>1,2</sup>, 林 云<sup>2</sup>, 袁星星<sup>2</sup>, 薛晨晨<sup>2</sup>, 陈 新<sup>2</sup>, 朱月林<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** GASA(Gibberellic acid-stimulated in *Arabidopsis*)蛋白是一类受赤霉素调控的小分子蛋白质,参与植物生长发育的多条途径。本研究在蚕豆(*Vicia faba*)中同源克隆了 *VfGASAI* 基因,该基因的开放阅读框全长为 363 bp,编码 1 个包含 120 个氨基酸残基的蛋白质,*VfGASAI* 在蚕豆叶片和嫩荚中高表达,亚细胞定位结果显示,*VfGASAI* 是一个定位于质外体的分泌蛋白。异源过表达 *VfGASAI* 导致转基因拟南芥开花延迟、莲座叶数量增多,外施赤霉素能够恢复这一现象。实时荧光定量结果显示,转基因拟南芥植株中 *FT* 基因显著下调,而 *DELLA* 基因中的 *GAI* 基因显著上调,说明 *VfGASAI* 可能是通过间接抑制 *DELLA* 蛋白的表达从而调控植物开花。本研究结果为蚕豆的开花调控育种提供了理论依据。

**关键词:** 蚕豆; *VfGASAI*; 拟南芥; 开花时间; 赤霉素

**中图分类号:** S643.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)01-0044-09

## Heterologous overexpression of *Vicia faba VfGASAI* gene delays flowering in transgenic *Arabidopsis*

GAO Ying<sup>1,2</sup>, LIN Yun<sup>2</sup>, YUAN Xing-xing<sup>2</sup>, XUE Chen-chen<sup>2</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>, ZHU Yue-lin<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Gibberellic acid-stimulated in *Arabidopsis* (GASA) protein is a kind of protein with small molecular weight regulated by gibberellin and participates in various pathways of plant growth and development. In this study, the *GASA* gene *VfGASAI* in faba bean (*Vicia faba*) was got by homologous cloning. The open reading frame (ORF) of *VfGASAI* was 363 bp in length and encoded a protein containing 120 amino acid residues. *VfGASAI* was highly expressed in the leaves and capsules of faba beans, and subcellular localization showed that *VfGASAI* was a secretory protein located in the apoplast. Heterologous overexpression of *VfGASAI* in *Arabidopsis* could delay flowering and increase the number of rosette leaves, while the phenomenon could be recovered by the application of exogenous gibberellin. Results of real-time PCR (RT-PCR) showed that the expressional level of 'florigen' gene (*FT*) was significantly down-regulated in transgenic *Arabidopsis* while *GAI* (one of *DELLA* genes) was significantly up-regulated. Therefore, *VfGASAI* might regulate the flowering of plants by indirect inhibiting the expression of *DELLA* genes. This study provides theoretic basis for breeding programs targeted on the flowering control of faba bean.

**Key words:** *Vicia faba*; *VfGASAI*; *Arabidopsis*; flowering time; gibberellin

收稿日期: 2020-04-29

基金项目: 国家食用豆产业技术体系生物防治与综合防控岗位科学家项目(CARS-08-G15); 江苏特粮特经产业技术体系集成创新中心项目[JATS(2019)399]

作者简介: 高 营(1994-), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 从事豆类作物分子育种研究。(E-mail) 3099618289@qq.com

通讯作者: 朱月林, (E-mail) ylzhu@njau.edu.cn

开花是指被子植物由营养生长向生殖生长的转变,是植物生命史的重要相变,也是农作物的重要农艺性状之一;开花时间受到不同信号的影响,在拟南芥中有光周期、自主途径、春化途径及赤霉素(GA)信号途径等<sup>[1-4]</sup>。一些关键的调控因子负责整合这些信号途径,包括 *FT*、*SOC1* 以及 *LFY* 的表达<sup>[5-7]</sup>, 这

些调控因子激活 *LFY*、*API* 和 *FUL* 在花序分生组织侧部的表达,诱导花原基的产生<sup>[8]</sup>。其中,*FT* 是开花调控的整合因子和决定基因,各信号途径最终通过影响其表达水平而诱导开花。*FT* 基因的表达量受到 CO 蛋白的正向调控<sup>[9]</sup>,CO 蛋白在光照条件下积累,在黑暗条件下降解,引起 *FT* 的节律表达和蛋白质积累,从而影响开花<sup>[10]</sup>。

赤霉素是重要的植物激素之一,参与种子萌发、节间伸长、叶片发育、开花时间调控、花器官建成以及花粉成熟等生理过程<sup>[11-15]</sup>。DELLA 蛋白是赤霉素信号途径中的核心抑制因子,能够结合众多下游蛋白质,阻碍 GA 信号的传递<sup>[16]</sup>。拟南芥共有 5 个 *DELLA* 基因(*GAI*、*RGA*、*RGL1*、*RGL2* 和 *RGL3*),这些基因编码的蛋白质均可以抑制开花<sup>[17]</sup>。研究发现,DELLA 蛋白可以结合 CO 蛋白,阻止 CO 蛋白对下游 *FT* 基因的调控,从而抑制植物开花<sup>[18]</sup>;DELLA 蛋白中的 RGA 蛋白可以结合 FLC 蛋白并促进 FLC 蛋白对 *SOC1* 和 *FT* 基因的抑制作用<sup>[19]</sup>。当植物感受到 GA 信号后,GA 的受体蛋白 GID1 通过结构的改变与 DELLA 蛋白互作,使其泛素化并降解,受 DELLA 蛋白绑定的转录因子得以释放并行使功能,从而使得下游基因响应表达<sup>[20-21]</sup>。

植物体内有大量的基因受到 GA 的调控,但这些基因是如何行使功能的,目前尚不明确。*GASA* (Gibberellic acid-stimulated in *Arabidopsis*) 是一类受赤霉素调节的基因,最早在番茄 GA 合成缺陷突变体 *gib1* 中被鉴定<sup>[22]</sup>,目前已在多种单子叶植物(如水稻、玉米)<sup>[23-24]</sup> 和双子叶植物(如拟南芥、草莓)<sup>[25-26]</sup> 中被克隆。研究发现大多数 *GASA* 基因表达量都受到赤霉素的影响,这些基因可以调控植物生长发育,包括种子萌发、细胞伸长、细胞分裂、开花时间、胁迫响应和激素信号交流等<sup>[27-28]</sup>。*GASA* 蛋白属于小分子多肽,一般长 80~120 个氨基酸,具有 3 个结构域:N 端的信号肽、中间的亲水区域和 C 端高度保守的 *GASA* 结构域<sup>[29]</sup>。在模式植物拟南芥中共有 15 个 *GASA* 家族基因(*AtGASA1* ~ *AtGASA15*)<sup>[27-28]</sup>,其中 *AtGASA4*、*AtGASA6*、*AtGASA7*、*AtGASA8* 和 *AtGASA13* 受 GA 诱导表达量上调,而 *AtGASA1*、*AtGASA5*、*AtGASA9* 和 *AtGASA11* 受 GA 诱导表达量下调<sup>[30]</sup>。*AtGASA4* 能够促进拟南芥开花<sup>[31]</sup>,而 *AtGASA5* 却抑制拟南芥开花<sup>[32]</sup>,说明 *GASA* 基因家族在植物生长发育中出现了功能分化,但有关

*GASA* 蛋白的研究还不明确。

蚕豆是重要的冬季食用豆作物,在中国有广泛的种植<sup>[33]</sup>,在南方地区,蚕豆一般在冬季播种,次年春季收获鲜荚,促进蚕豆田间适量提早开花有助于蚕豆提前上市。前人研究发现,苗期春化处理可以导致蚕豆叶片中大量 *bHLH*、*ERF* 以及 *WRKY* 基因家族转录因子的基因表达量发生显著变化<sup>[34]</sup>,此外还有 91 个参与不同路径的蛋白质在春化处理后有显著积累<sup>[35]</sup>,但是关于进一步的机理研究以及其他途径对蚕豆开花时间影响的研究未见报道。由于蚕豆的基因组巨大,测序和组装的难度极大,其可用基因组信息较少<sup>[36]</sup>,因此有关蚕豆基因的克隆和功能研究较少。

本研究以通蚕鲜 6 号为研究材料,同源克隆 *VfGASA1* 基因,对 *VfGASA1* 蛋白的同源性和亚细胞定位进行研究,并在拟南芥中过表达 *VfGASA1* 基因,以期研究该基因对蚕豆开花及其他性状的影响,丰富蚕豆开花机制研究的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及其 RNA 的提取

本试验采用的蚕豆(*Vicia faba*)品种为通蚕鲜 6 号,由江苏省农业科学院提供。按照根、茎、叶片、花、嫩荚、籽粒等组织取样后放入液氮中速冻,存于 -80 °C 冰箱备用。用 RNA 提取试剂[天根生化科技(北京)有限公司]提取总 RNA。

### 1.2 基因克隆

蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)是豆科中与蚕豆亲缘关系较近的物种<sup>[37]</sup>,根据美国国家生物信息中心(NCBI)网站([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))提供的蒺藜苜蓿 *MtGASA13* (LOC11422708)的序列信息,设计引物 *VfGASA-F1* 和 *VfGASA-R1* (表 1)进行 PCR 扩增,扩增程序:94 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 15 s,55 °C 退火 30 s,68 °C 延伸 1 min,终延伸 5 min,循环数为 33。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检测,并利用 DNA 回收试剂盒[擎科生物科技(南京)有限公司]纯化回收,测序获得 *VfGASA1* 序列。本研究所用引物根据需求按照序列信息设计,采用的软件为 Primer 5。

### 1.3 同源比对

通过在线 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 序列比对,将同源性较高、不同植物品

种的 *GASA* 家族基因进行系统进化分析,使用 DNA-MAN 软件进行多序列分析,系统进化树用 MEGA 10.0 本地软件邻接法构建;利用 InterPro 网站(www.ebi.ac.uk/interpro)对蛋白质结构进行预测。

#### 1.4 载体构建

根据 pCambia1305.1-GFP 序列设计 *VfGASA1* 的接头引物 *VfGASA1*-F2 和 *VfGASA1*-R2 并扩增, *Xba* I 酶切产生的线性化载体和 PCR 产物通过重组酶(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行重组连接,构建 35S:: *VfGASA1*-GFP 融合载体。利用 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态转化连接产物,通过测序获得正确的单克隆菌株,菌株扩繁后利用质粒提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取质粒,并将其转入农杆菌感受态中。

#### 1.5 亚细胞定位

将农杆菌在 28  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养至  $OD_{600}$  为 0.5~0.8,收集菌体并用浸染液重悬至  $OD_{600}$  为 0.1 左右,选择生长 28 d 左右健康本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 的倒三至倒五叶,利用注射器进行浸

染,浸染后 48 h 内在激光共聚焦显微镜下观察荧光。观察到荧光后利用 30% 蔗糖水溶液处理叶片 30 min,观察烟草叶肉细胞质壁分离后的荧光情况。

#### 1.6 拟南芥浸染

向 250 ml LB 液体培养基中加入农杆菌菌液, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养过夜。至菌液  $OD_{600}$  达到 1.0 左右,室温离心收集菌体,配制植物浸染液,用等体积的浸染液重悬菌体。将长势良好的拟南芥花苞浸入农杆菌浸染液中,4 min 后拿出并用保鲜膜包裹,避光倒伏放置 24 h,然后按常规方法培育植株至结实,收获  $T_0$  代种子。

#### 1.7 RT-PCR 分析

利用 TaKaRa 实时定量 PCR 试剂盒 SYBR Green II 荧光染料法进行基因的表达量分析。设计特异性引物(表 1),反应体系为:SYBR Green Premix *Ex Taq* II 10.0  $\mu\text{l}$ , Primer F/R 各 0.8  $\mu\text{l}$ , 灭菌水 6.4  $\mu\text{l}$ , DNA 模板 2.0  $\mu\text{l}$ , 总体系为 20.0  $\mu\text{l}$ 。进行 Real Time PCR 两步法扩增反应,每份样品设 3 个生物学重复。试验结果利用相对定量  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算表达量。

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
<i>VfGASA</i> -F1/R1	CACACTTGTGATATCTTGTATCT/TCAATAGTACTCAAGCTGAATAC	基因克隆
<i>VfGASA</i> -F2/R2	ATGGCAAGAAAAATGTGCATTG/AGGGCATTGGGTCCTCCT	编码序列(CDS)克隆
pCambia1305- <i>GASA</i> -( <i>Xba</i> I)-F4	CGGAGCTAGCTCTAGAATGGCAAGAAAAATGTGCA	载体构建
pCambia1305- <i>GASA</i> -R4	TGCTCACCATGGATCCAGGGCATTGGGTCCTCCT	载体构建
<i>Gm-1-alpha</i> -F/R	GTGAAGCCCGGTATGCTTGT/CTTGAGATCCTTGACTGCAACATT	蚕豆内参
<i>VfGASA</i> -qPCR-F/R	GTTGCAGTGGTAGATGCTCA/GGTCCTCCTCTTTGGGTCT	PCR 引物
<i>AtGAI</i> -qPCR-F/R	ACGCCGAGTACGATCTTAAAGC/TTTCCACGACGCCGTTTGAG	PCR 引物
<i>AtFT</i> -qPCR-F/R	AGTGCTGCGGAGGAAGAAG/AGGCATCATCACCGTTCGTTAC	PCR 引物
<i>AtSOC1</i> -qPCR-F/R	AGAAGATATGCTGAGGGGCAAAAC/AGCATCACAAAAGCACTGAGA	PCR 引物
<i>AtCO</i> -qPCR-F/R	GCCATCAGCGAGTTCCAATTCTAC/CCTTCCTCTTGATCCACCACCAG	PCR 引物
<i>AtFLC</i> -qPCR-F/R	CGTCGCTCTCTCGTCGCTC/TTCGGTCTTCTTGCTCTAGTCAC	PCR 引物

下划线代表酶切位点。

#### 1.8 数据统计和分析

数据采用 Excel 软件绘图,用 SPSS 23.0 统计软件对平均数进行单因素方差分析(ANOVA)比较。

## 2 结果与分析

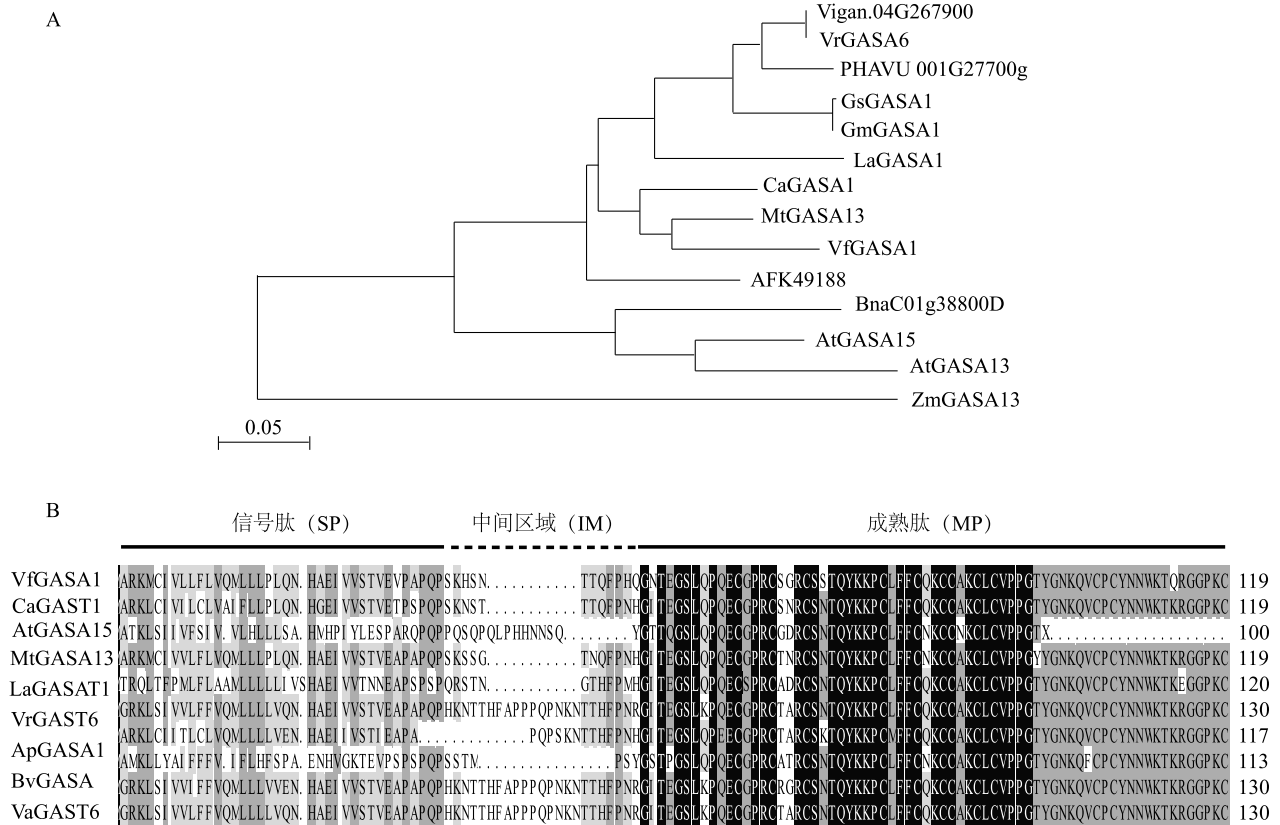
#### 2.1 蚕豆 *GASA1* 基因的克隆与同源比对

根据与蚕豆亲缘关系较近的蒺藜苜蓿中的 *Mt*-

*GASA13* (基因识别号:LOC11422708)序列设计引物(表 1),从蚕豆叶片 cDNA 中扩增出全长约 630 bp 的单一一条带,根据测序结果预测该基因编码序列(CDS)全长 363 bp,编码 1 个包含 120 个氨基酸残基的蛋白质,将该基因命名为 *VfGASA1*。进化树分析结果(图 1A)显示,与 *VfGASA1* 同源性最高的蛋白质是来自苜蓿的 *MtGASA13* (登录号:XP\_

003625068.1), 相似性为 88.3%, 其次是鹰嘴豆 *CaGASA1* 蛋白(登录号: XP\_004493436.1), 相似性为 85.8%, 这也和豆科植物与苜蓿、鹰嘴豆有较近的亲缘关系一致<sup>[38]</sup>。在模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, 与蚕豆 *VfGASA1* 蛋白同源性最高的蛋白质是 *AtGASA15* (登录号: NP\_001319515.1), 相似性约为 69.0%。根据 InterPro 网站 ([www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/)

interpro) 的预测, *VfGASA1* 蛋白的一级结构包含 3 个结构域, 前 24 个氨基酸残基是一段信号肽, 第 61 至第 120 个氨基酸是 GASA 结构域, 中间是一段不保守区域, 与其他物种中同源蛋白相比, *VfGASA1* 蛋白在 GASA 结构域内高度保守, 包含 12 个半胱氨酸残基, 而在信号肽区域的差异较大(图 1B)。



A: *VfGASA1* 与同源蛋白的进化树分析; B: *VfGASA1* 与同源蛋白的氨基酸序列比对。

图 1 *VfGASA1* 的序列分析

Fig.1 Sequence analysis of *VfGASA1*

## 2.2 *VfGASA1* 亚细胞定位

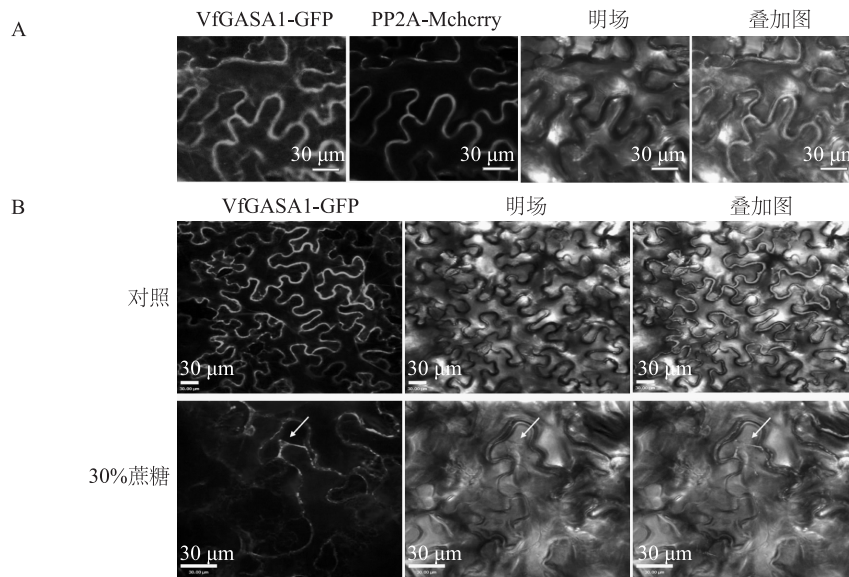
根据 TMHMM 网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 的预测, *VfGASA1* 蛋白是一个分泌蛋白, 可能定位于质外体, 这与大部分 GASA 蛋白的定位有差别, 为检测 *VfGASA1* 蛋白的亚细胞定位情况, 将重组质粒 35S:: *VfGASA1*-GFP 以及 PP2A-mCherry 共同转入本氏烟草叶片中进行瞬时表达, 结果发现绿色荧光蛋白 (GFP) 信号与膜 marker 的荧光重叠, 均出现在细胞轮廓上 (图 2A), 继续用 30% 蔗糖溶液对烟草叶片进行质壁分离处理, 发现在质壁分离后的细胞膜和细胞壁上

均能观察到 GFP 荧光 (图 2B), 综合以上结果推测 *VfGASA1* 是一个定位在质外体的分泌蛋白。

## 2.3 *VfGASA1* 基因的表达模式

GASA 家族基因参与植物侧根、叶片、茎秆、花器官和种子的生长发育, 因此 *VfGASA1* 的表达模式会决定其最终功能。我们通过 RT-PCR 对蚕豆不同部位 *VfGASA1* 的表达量进行测定, 结果显示, *VfGASA1* 在嫩荚中表达量最高, 在叶中也有很高的表达量, 在花器官中有一定的表达量, 但是在茎和籽粒中表达量很低, 而在根中几乎检测不到表达 (图 3), 说明 *VfGASA1* 是一个在嫩荚和叶片中高表达的基因。

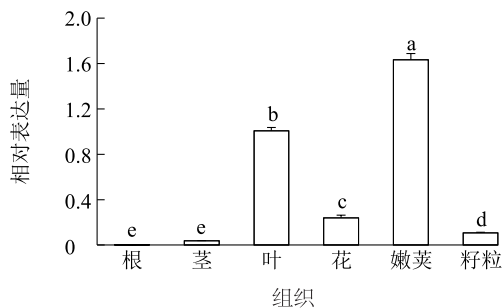




A: 本氏烟草叶片中 VfGASA1-GFP 与细胞膜 marker 的共定位; B: 质壁分离后 VfGASA1-GFP 在本氏烟草叶片中的定位情况; 白色箭头指向发生质壁分离的部位。

图 2 VfGASA1 的亚细胞定位

Fig.2 Subcellular localization of VfGASA1



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图 3 VfGASA1 的表达模式

Fig.3 Expression pattern of VfGASA1

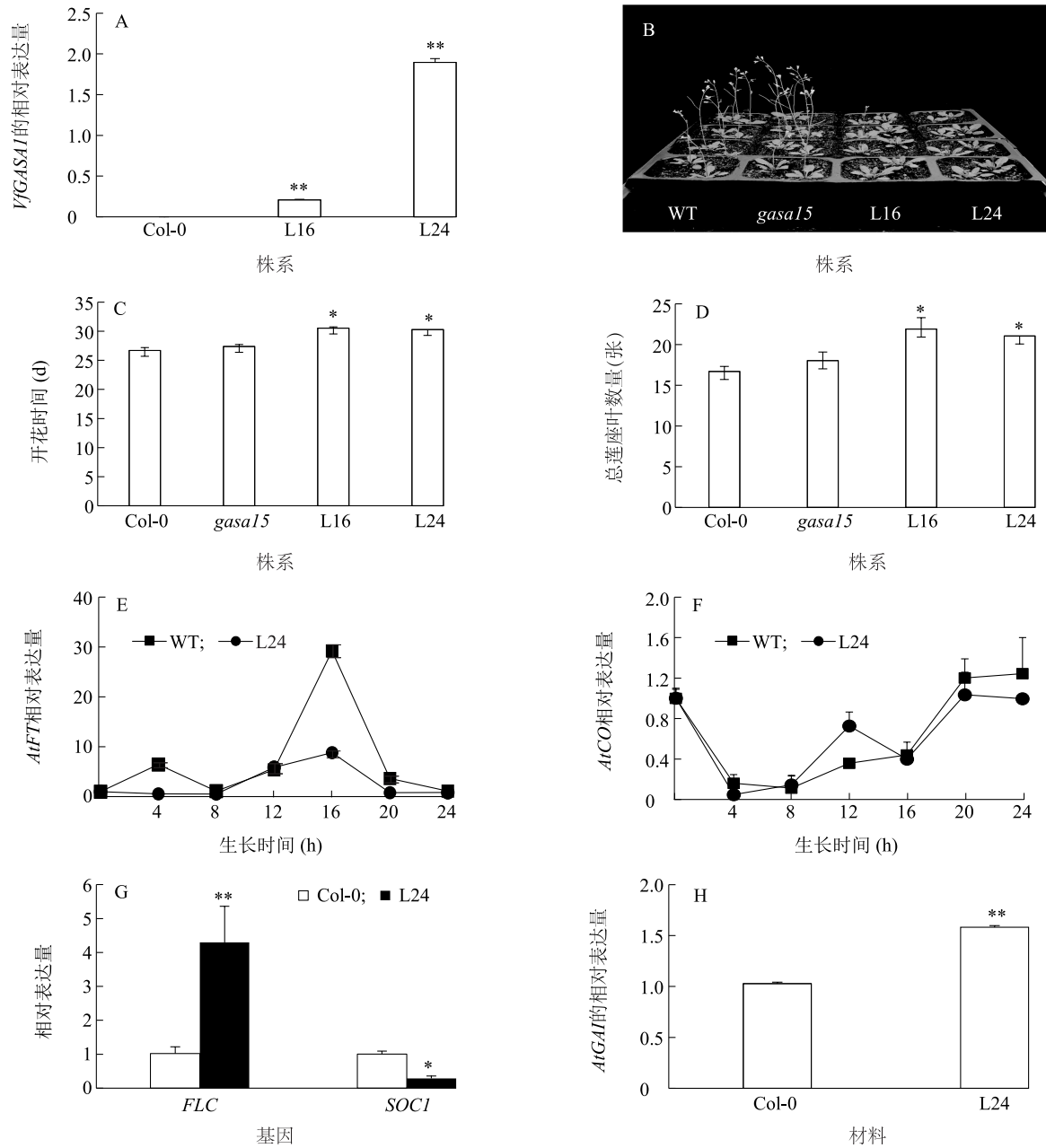
## 2.4 VfGASA1 在拟南芥中抑制开花的机制

VfGASA1 蛋白与拟南芥体内 *AtGASA15* 编码蛋白高度同源, 此前未有关于 *AtGASA15* 功能的研究, 为进一步研究 VfGASA1 在植物体内的作用, 我们购买了拟南芥突变体 *gasa15*, 并在 Col-0 型 (野生型) 拟南芥中过表达了 VfGASA1, 在 T<sub>2</sub> 代筛选得到阳性转基因株系 L16 和 L24。定量结果显示, 在这 2 个阳性株系体内的 VfGASA1 有较高的表达量 (图 4A), 过表达株系在长日照条件下 (光照 16 h/黑暗 8 h), 开花时间明显延迟 (图 4B、图 4C), 播种后第 23 d, 野生型以及 *gasa15* 突变体拟南芥均已开花, 而 L16、L24 仍未抽薹 (图 4B), L16、L24 株系在开花时莲座

叶数量也较野生型及 *gasa15* 突变体拟南芥显著增加 (图 4D), 说明外源 VfGASA1 基因的过表达可以延迟拟南芥的开花, *gasa15* 突变体开花时间与野生型拟南芥比没有差异, 这可能是由其他 GASA 基因的功能冗余导致的。

为明确 VfGASA1 是否参与开花信号途径, 我们对长日照条件下拟南芥开花途径中的关键基因进行了连续定量检测, 结果发现过表达植株 *AtFT* 的表达模式与野生型一致, 但是转基因植株中 *AtFT* 的表达量显著降低, 尤其在光照 16 h 后 (图 4E)。 *AtCO* 的表达模式及表达量在野生型与转基因拟南芥之间没有明显差异 (图 4F), 此外, 开花途径负调控基因 *FLC* 的相对表达量在 L24 植株中极显著上调, 而正向调控基因 *SOC1* 的相对表达量显著下调 (图 4G), 这些结果表明在过表达植株中开花途径被抑制。GA 途径主要通过解除 DELLA 对 CO 的绑定, 促进 *FT* 的表达从而诱导开花, 因此我们对比了野生型和转基因株系 *DELLA* 基因的表达量, 5 个 *DELLA* 基因中, *GAI* 在过表达株系 L24 中极显著上调 (图 4H)。

通过对开花基因以及 *GAI* 的定量分析, 我们推测 VfGASA1 参与了赤霉素调控开花的过程, 为验证这一猜想, 我们对转基因拟南芥植株外施 GA<sub>3</sub> 处理, 结果发现赤霉素处理后过表达 VfGASA1 株系 L24 与

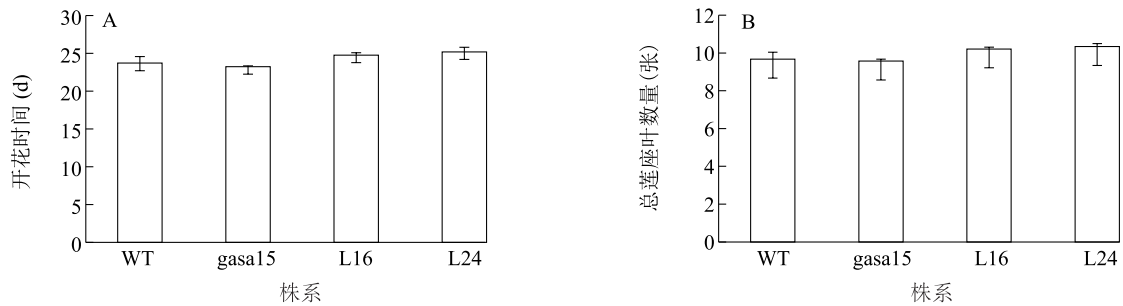


A:  $T_3$  代转基因拟南芥 *VjGAS1* 基因相对表达量的 qPCR 检测结果; WT 表示野生型拟南芥; L16、L24 表示转基因的拟南芥株系; B: 播种后第 23 d 野生型、*gasa15* 突变体以及 *VjGAS1* 过表达拟南芥株系 (L16、L24) 的开花表型; C: 野生型、*gasa15* 突变体以及 *VjGAS1* 过表达拟南芥株系 (L16、L24) 的开花时间; D: 野生型、*gasa15* 突变体以及 *VjGAS1* 过表达拟南芥株系 (L16、L24) 开花时莲座叶数量; E: *AtFT* 在野生型和过表达拟南芥株系中的节律表达; F: *AtCO* 在野生型和过表达拟南芥株系中的节律表达; G: *FLC*、*SOC1* 基因在转基因拟南芥植株中的定量分析; H: 20 d 大小的野生型和过表达拟南芥株系中 *AtGAI* 的相对表达量; \* 表示经 *t* 检验在 0.05 水平差异显著, \*\* 表示经 *t* 检验在 0.01 水平差异显著。

图 4 过表达 *VjGAS1* 延迟拟南芥开花  
Fig.4 Overexpression of *VjGAS1* in *Arabidopsis* delayed flowering

野生型的开花时间没有明显差异 (图 5), 并且相对于未处理的植株, 开花时间明显提前, 外源赤霉素可以恢复 *VjGAS1* 对开花的延迟作用, 说明 *VjGAS1*

缺失参与了赤霉素对开花时间的影响, 并且起到负调控的作用, 可能是通过促进 *DELLA* 基因中 *GAI* 基因的表达, 从而抑制开花。



A:  $GA_3$ 处理后,野生型、*gasa15* 和过表达拟南芥植株的开花时间统计;B:  $GA_3$ 处理后,野生型、*gasa15* 和过表达拟南芥植株的总莲座叶数量统计。

图5  $GA_3$ 处理后野生型、*gasa15* 以及过表达拟南芥的表型

Fig.5 Phenotypes of Col-0, *gasa15* and overexpressing *Arabidopsis* after  $GA_3$  treatment

### 3 讨论

中国是世界第一大蚕豆消费国和生产国<sup>[39]</sup>,在蚕豆生产中晚花会导致蚕豆受到高温胁迫,从而使产量降低<sup>[40]</sup>以及异交率大幅提升<sup>[41]</sup>。近年来,蚕豆晚花给蚕豆的产量提升以及育种工作带来了极大的困扰,因此蚕豆晚花是亟待解决的问题。目前生产上常用苗期春化处理的方式促进蚕豆早花,但是这种方式需要大量前期投入,而且对某些春化不敏感品种没有效果,因此寻找其他办法,例如外源赤霉素处理等来促进早花对于蚕豆生产非常重要。

赤霉素信号途径通过解除 DELLA 蛋白对 CO 蛋白的抑制,提升 CO 蛋白对 *FT* 的转录激活能力,提高 *FT* 的表达,从而促进植物开花<sup>[18-19]</sup>。但是关于赤霉素下游基因如何行使功能的研究较少,*GASA* 家族基因是一类赤霉素下游响应基因<sup>[27-28]</sup>,前人的研究发现部分 *GASA* 成员可以参与赤霉素对植物开花的调控,例如 *AtGASA4* 能够促进拟南芥提早开花<sup>[31]</sup>,*AtGASA5* 能够抑制拟南芥开花<sup>[32]</sup>,此外 *GASA* 家族成员还能够调控株型建成以及种子大小等<sup>[27-28]</sup>,显示出该家族成员在分子育种中的潜力。

蚕豆庞大的基因组是蚕豆基因克隆和分子育种的巨大障碍<sup>[36]</sup>,前期关于蚕豆的研究较少,大部分集中于抗病和抗列当寄生基因的 QTL 定位<sup>[42]</sup>,以及产量相关性状的 QTL 定位<sup>[43]</sup>,关于蚕豆开花时间的研究仅有春化的相关报道<sup>[34-35]</sup>。本研究通过同源比对的方式从蚕豆 cDNA 中克隆出 1 个

*GASA* 家族基因并命名为 *VfGASA1*,发现 *VfGASA1* 是一个定位在质外体的分泌蛋白,受到赤霉素的调控,在拟南芥中异源过表达 *VfGASA1* 能够显著延迟拟南芥的开花时间,荧光定量的结果显示在转基因植株中拟南芥 *DELLA* 基因中 *GAI* 基因的相对表达量显著上调,说明 *VfGASA1* 可能是通过影响 *DELLA* 基因的表达,从而参与赤霉素对开花时间的调节,考虑到 *VfGASA1* 定位在质外体,因此 *VfGASA1* 不会直接调控 *DELLA* 基因的表达,应该存在某种间接途径影响 *DELLA* 基因的表达,这需要后续的深入研究。

### 参考文献:

- [1] SONG Y H, SHIM J S, KINMONTH-SCHULTZ H A, et al. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves[J]. Annual Review of Plant Biology, 2015, 66: 441-464.
- [2] TURCK F, FORNARA F, COUPLAND G. Regulation and identity of florigen; *FLOWERING LOCUS T* moves center stage[J]. Annual Review of Plant Biology, 2008, 59: 573-594.
- [3] KING R W, EVANS L T. Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the "florigen" black box[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54(1): 307-328.
- [4] KIM D H, DOYLE M R, SUNG S, et al. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2009, 25(1): 277-299.
- [5] PIN P A, NILSSON O. The multifaceted roles of *FLOWERING LOCUS T* in plant development[J]. Plant Cell and Environment, 2012, 35(10): 1742-1755.
- [6] LEE J, LEE I. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator[J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(9): 2247-2254.
- [7] MOYROUD E, KUSTERS E, MONNIAUX M, et al. *LEAFY* blos-

- soms[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(6): 346-352.
- [8] WELLMER F, RIECHMANN J L. Gene networks controlling the initiation of flower development[J]. Trends in Genetics, 2010, 26(12): 519-527.
- [9] SAMACH A, ONOUCH H, GOLD S E, et al. Distinct roles of *CONSTANS* target genes in reproductive development of *Arabidopsis* [J]. Science, 2000, 288(5471): 1613-1616.
- [10] TIWARI S B, SHEN Y, CHANG H C, et al. The flowering time regulator *CONSTANS* is recruited to the *FLOWERING LOCUS T* promoter via a unique cis-element[J]. New Phytologist, 2010, 187(1): 57-66.
- [11] DAVIERE J M, ACHARD P. Gibberellin signaling in plants[J]. Development, 2013, 140(6): 1147-1151.
- [12] LIU Z, BOACHON B, LUGAN R, et al. A conserved cytochrome P450 evolved in seed plants regulates flower maturation[J]. Molecular Plant, 2015, 8(12): 1751-1765.
- [13] OGAWA M, HANADA A, YAMAUCHI Y, et al. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination[J]. The Plant Cell, 2003, 15(7): 1591-1604.
- [14] SRIKANTH A, MARKUS S. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68(12): 2013-2037.
- [15] WANG Y, ZHAO J, LU W, et al. Gibberellin in plant height control: old player, new story[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(3): 391-398.
- [16] MURASE K, HIRANO Y, SUN T, et al. Gibberellin-induced *DELLA* recognition by the gibberellin receptor *GIDI* [J]. Nature, 2008, 456(7221): 459-463.
- [17] GALVAO V C, HORRER D, KUTTNER F, et al. Spatial control of flowering by *DELLA* proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. Development, 2012, 139(21): 4072-4082.
- [18] XU F, LI T, XU P B, et al. *DELLA* proteins physically interact with *CONSTANS* to regulate flowering under long days in *Arabidopsis* [J]. FEBS Letters, 2016, 590(4): 541-549.
- [19] Li M, AN F, LI W, et al. *DELLA* proteins interact with *FLC* to repress flowering transition[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 58(7): 642-655.
- [20] GRIFFITHS J, MURASE K, RIEU I, et al. Genetic characterization and functional analysis of the *GIDI* gibberellin receptors in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell Online, 2006, 18(12): 3399-3414.
- [21] WILLIGE B C, GHOSH S, NILL C, et al. The *DELLA* domain of *GA INSENSITIVE* mediates the interaction with the *GA INSENSITIVE DWARF1A* gibberellin receptor of *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell Online, 2007, 19(4): 1209-1220.
- [22] SHI L, GAST R T, GOPALRAJ M, et al. Characterization of a shoot-specific,  $GA_3$ - and ABA-regulated gene from tomato [J]. The Plant Journal; for Cell and Molecular Biology, 1992, 2(2): 153-159.
- [23] LEE S C, KIM S, HAN H K, et al. A gibberellin-stimulated transcript, *OsGASRI*, controls seedling growth and alpha-amylase expression in rice[J]. Journal of Plant Physiology, 2017, 214: 116-122.
- [24] ZIMMERMANN R, SAKAI H, HOCHHOLDINGER F. The *Gibberellic Acid Stimulated-Like* gene family in maize and its role in lateral root development[J]. Plant Physiology, 2010, 152(1): 356-365.
- [25] SUN S, WANG H, YU H, et al. *GASA14* regulates leaf expansion and abiotic stress resistance by modulating reactive oxygen species accumulation[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(6): 1637-1647.
- [26] DE LA FUENTE JOSE I, IRAIDA A, CRISTINA C, et al. The strawberry gene *FaGAST* affects plant growth through inhibition of cell elongation [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(10): 2401-2412.
- [27] ZHANG S, WANG X. One new kind of phytohormonal signaling integrator: up-and-coming *GASA* family genes[J]. Plant Signaling & Behavior, 2017, 12(2): 6453-6459.
- [28] NAHIRNAK V, NATALIA INES A, HORACIO ESTEBAN H, et al. Snakin/*GASA* proteins: involvement in hormone crosstalk and redox homeostasis[J]. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(8): 1004-1008.
- [29] AUBERT D, CHEVILLARD M C, DORNE A M, et al. Expression patterns of *GASA* genes in *Arabidopsis thaliana*: the *GASA4* gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 36(6): 871-883.
- [30] ZHANG S C, WANG X J. Expression pattern of *GASA*, downstream genes of *DELLA*, in *Arabidopsis* [J]. Chinese Science Bulletin, 2008, 53(24): 3839-3846.
- [31] ROXRUD I, LID S E, FLETCHER J C, et al. *GASA4*, one of the 14-member *Arabidopsis* *GASA* family of small polypeptides, regulates flowering and seed development[J]. Plant & Cell Physiology, 2007, 48(3): 471-483.
- [32] ZHANG S, YANG C, PENG J, et al. *GASA5*, a regulator of flowering time and stem growth in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(6): 745-759.
- [33] O'SULLIVAN D M, DEEPTI A. Advances in faba bean genetics and genomics[J]. Frontiers in Genetics, 2016(7): 150-160.
- [34] GAO B, BIAN X C, YANG F, et al. Comprehensive transcriptome analysis of faba bean in response to vernalization [J]. Planta, 2019, 251(1): 22-41.
- [35] CAO Y Y, BIAN X C, CHEN M X, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis in vernalization-treated faba bean (*Vicia faba* L.) [J]. PLoS One, 2017, 12(11): 10-28.
- [36] COOPER J W, WILSON M H, DERKS M F L, et al. Enhancing faba bean (*Vicia faba* L.) genome resources[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(8): 1941-1953.



- [37] CRUZ-IZQUIERDO S, AVILA C M, SATOVIC Z, et al. Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: stability of QTLs for flowering and yield-related traits[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125 (8): 1767-1782.
- [38] YANG K, TIAN Z, CHEN C, et al. Genome sequencing of adzuki bean (*Vigna angularis*) provides insight into high starch and low fat accumulation and domestication[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(43): 13213-13218.
- [39] LIU Q, DONNER E, YIN Y, et al. The physicochemical properties and in vitro digestibility of selected cereals, tubers and legumes grown in China[J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 470-477.
- [40] NAYAK G K, ROBERTS S P M, GARRATT M, et al. Interactive effect of floral abundance and semi-natural habitats on pollinators in field beans (*Vicia faba*) [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 2015, 199(27): 58-66.
- [41] BISHOP J, JONES H E, O' SULLIVAN D M, et al. Elevated temperature drives a shift from selfing to outcrossing in the insect-pollinated legume, faba bean (*Vicia faba*) [J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(8): 2055-2063.
- [42] KAUR S, KIMBER R B E, COGAN N O I, et al. SNP discovery and high-density genetic mapping in faba bean (*Vicia faba* L.) permits identification of QTLs for ascochyta blight resistance[J]. Plant Science, 2014, 217/218(41): 47-55.
- [43] CRUZ-IZQUIERDO S, AVILA C M, SATOVIC Z, et al. Comparative genomics to bridge *Vicia faba* with model and closely-related legume species: stability of QTLs for flowering and yield-related traits[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 125 (8): 1767-1782.

(责任编辑:陈海霞)