

早花相关基因 *HbFT1* 和 *HbFT2* 转化橡胶树的研究

李 季^{1,2}, 王秋润³, 郭力鑫³, 杨鸿丽³, 周权男^{1,2}, 吴日智¹, 华玉伟¹,
成 镜^{1,2,4}, 黄天带^{1,2,4*}

1. 中国热带农业科学院橡胶研究所/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南海口 571101; 2. 海口市热带植物种苗创新重点实验室, 海南海口 571101; 3. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665099; 4. 中国热带农业科学院三亚研究院, 海南三亚 572025

摘 要: 植物的开花诱导受内源和环境信号关键调控因子的严格控制, 一般分为 6 条主要途径, 其中 Flowering Locus T (FT) 作为 PEBP 家族的重要成员在不同途径中起着关键作用。橡胶树中有 2 个 FT 基因, 异位过表达拟南芥和烟草均可促进早花, 通过对一年中不同月份的叶片定量表达分析发现, 2 个基因的表达并不相同, 其中 *HbFT2* 可能是候选基因。本研究通过体细胞胚遗传转化的方法将 35S::*HbFT1* 和 35S::*HbFT2* 转到橡胶树中, 分别获得 2 个和 3 个阳性胚, 并通过 GUS 染色鉴定为阳性。当代再生植株或经次生体胚发生扩繁后再生的植株通过芽接的方式扩繁, 获得 *HbFT1* 和 *HbFT2* 的超表达转基因阳性植株, 分别有 4 株和 7 株, 但是田间定植 7 a 仍未见开花。将定植后的转基因植株取叶片进行 PCR 检测和 GUS 染色确定其均为阳性植株。对 *HbFT1*、*HbFT2* 和抑制开花基因 *HbTFL1/CEN* 的 qRT-PCR 表达分析表明, 35S::*HbFT1* 过表达阳性植株中 *HbFT1* 的表达均显著高于野生型对照, *HbFT2* 基因的表达相对较低; 而 35S::*HbFT2* 过表达阳性植株中 *HbFT2* 的表达仅有 2 株显著高于对照, 其他 5 株均与对照无差异, *HbFT1* 基因的表达也相对较低; 35S::*HbFT1* 过表达阳性植株中 *HbFT1* 的表达虽然均比对照显著提高, 但有一阳性胚芽接获得的后代间差异显著, 而且 35S::*HbFT2* 过表达阳性植株 2 个阳性胚芽接获得的后代间的差异也显著, 推测和胚状体转化的嵌合性有关。而对抑制开花基因的表达分析显示, 部分抑制开花基因均显著高于 FT 基因的表达, 推测未实现早花表型的原因可能是因为抑制开花基因的高表达所致, 且在橡胶树中也同样存在 FT/TFL 的平衡调控。

关键词: 早花; 巴西橡胶树; *HbFT1*; *HbFT2*; qRT-PCR; 遗传转化

中图分类号: S794.1 文献标志码: A

Overexpression of Early Flowering Related Genes *HbFT1* and *HbFT2* in Rubber Tree

LI Ji^{1,2}, WANG Qiurun³, GUO Lixin³, YANG Hongli³, ZHOU Quannan^{1,2}, WU Rizhi¹, HUA Yuwei¹,
CHENG Jing^{1,2,4}, HUANG Tiandai^{1,2,4*}

1. Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China; 2. Haikou Key Laboratory of Innovative Tropical Plant Seedlings, Haikou, Hainan 571101, China; 3. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665099, China; 4. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572025, China

Abstract: Plant flowering induction is strictly controlled by key regulatory factors of endogenous and environmental signals, which consist of at least 6 closely interlinked but divergent genetic regulation pathways. As an important member of the Phosphatidylethanolamine binding protein (PEBP) family, Flowering Locus T (FT), plays a key role in dif-

收稿日期 2024-11-04; 接受日期 2024-11-07

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 322RC783); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630022024025, No. 1630022022001)。

作者简介 李 季 (1984—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 橡胶树生物育种。*通信作者 (Corresponding author): 黄天带 (HUANG Tiandai), E-mail: zhuanjiyinyuzhong@163.com。

ferent pathways. There are two *FT* genes in *hevea*, ectopic overexpression in both *Arabidopsis thaliana* and tobacco can promote early flowering. Quantitative expression analysis of *hevea* leaves in different months of one year showed that the expression of the two genes was different, and *HbFT2* may be a candidate gene. In this study, 35S::*HbFT1* and 35S::*HbFT2* were transferred into rubber tree by the method of somatic embryo genetic transformation, and 2 and 3 positive embryos were obtained, respectively, and identified as positive by GUS staining. Plants that were directly regenerated by positive embryos or regenerated after secondary somatic embryo propagation were expanded by bud grafting. There were 4 and 7 overexpressing transgenic positive plants of *HbFT1* and *HbFT2*, respectively, but no flowering was seen after 7 years of field planting. The transgenic plants were confirmed as positive plants by both PCR and GUS staining. qRT-PCR analysis of inducing flowering genes of *HbFT1* and *HbFT2* and inhibiting flowering genes of *HbTFL1/CEN* showed that the expression of *HbFT1* in 35S::*HbFT1* positive plants was significantly higher than that of wild-type control, and the expression of *HbFT2* gene was relatively low. The expression results of *HbFT2* in 35S::*HbFT2* positive plants showed that only two were significantly higher than that in the control, and the other 5 plants were not different from the control, and the expression of *HbFT1* gene was relatively low. Although the expression of *HbFT1* in 35S::*HbFT1* positive plants was significantly higher than that in the control, the differences between the progeny obtained from the same positive embryos were also significant, and the expression of *HbFT2* in two 35S::*HbFT2* positive plants were significant too, which was speculated to be related to the chimerism of embryo transformation. The expression analysis of inhibitory flowering genes showed that the expression of some inhibitory flowering genes was significantly higher than that of *FT* genes. It was speculated that the early flowering phenotype was not realized because of the high expression of inhibitory flowering genes, and the balanced regulation of *FT/TFL1* also existed in *hevea*.

Keywords: early flowering; *Hevea brasiliensis*; *HbFT1*; *HbFT2*; qRT-PCR; transformation

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.03.001

天然橡胶是重要的工业原料, 主要产自巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)^[1], 其经济生命周期为 30~35 a^[2]。与许多木本树种一样, 橡胶树在开始开花之前有一个 5~6 a 的幼年期 (未成熟期), 需要 28 a 以上的时间来繁殖和选择一个新的无性系用于天然橡胶的商业生产^[1, 3], 未成熟期是影响短时间内培育新橡胶树的一个严重的制约因素, 橡胶树开花调控途径的研究对提高育种效率至关重要。

植物的生长和发育, 特别是开花的诱导, 受内源和环境信号关键调控因子的严格控制, 一般分为光周期途径、温度途径、春化途径、年龄途径、赤霉素途径和自主途径等 6 条主要途径^[4-5]。这些途径并不是孤立存在的, 而是通过各种信号途径最终调控整合 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*)、*LEAFY* (*LFY*) 和 *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1* (*SOC1*) 等基因实现成花转变的调控^[6-7]。*FT* 基因是 PEBP 家族成员之一, 作为成花素, 在光周期调控途径中, 长日照条件下, 受 *CONSTANS* (*CO*) 正调控的 *FT* 蛋白从叶片运输到茎端分生组织, 与 *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) 形成 *FT-FD* 复合物, 从而促进植物开花^[8]。*TFL1* 是和 *FT* 序列相似、功能相反的植物开花调控基因^[9], 通过抑制茎端分生组织形成花原基,

延迟植物由营养生长向生殖生长的转变, 在植物体内, 通过 *FT* 和 *TFL1* 两个开花相关蛋白的平衡调控而诱导开花^[10]。

FT 基因在大多数植物体内具有保守的功能, *FT* 超表达能促进水稻、烟草、野甘菊和龙胆草等短日照植物、拟南芥等长日照植物和番茄等中性植物提早开花, 而且能使柑橘、毛果杨、苹果、猕猴桃、蓝莓和小桐子等多年生植物提早开花^[11-12]。但是 *FT* 同源物同样存在抑制开花的情况^[13-18], 如向日葵、甜菜、烟草、龙眼、大豆和甘蔗。

本课题组前期的研究发现, 橡胶树中 2 个 *FT* 的同源基因 *HbFT1* 和 *HbFT2* 转化拟南芥后均有早花的表型, 转化烟草和同为大戟科的小桐子也有早花的表型 (结果未发表), 对橡胶树一年中不同月份的表达分析初步确定 *HbFT2* 可能是橡胶树 *FT* 的候选基因^[19]。因此, 本研究将这 2 个基因的超表达载体均进行橡胶树的遗传转化, 获得了阳性胚, 对阳性胚进行编号, 如正常胚则直接出苗, 畸形胚则通过次生体胚发生进行再次体胚发生, 将再次体胚发生获得的正常胚进行植株再生, 并通过芽接的方式对阳性植株扩繁转基因阳性植株, 通过对其进行表型观察、转基因验证及目的基因表达分析, 对橡胶树开花调控基因 *FT* 的功能进一步分析, 并为橡胶树转基因研究提供实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的转基因外植体材料为热研 87-6-62 的体细胞胚，2014 年通过转化体细胞胚的方法^[20]侵染体细胞胚，分别获得 *HbFT1* 阳性胚状体 2 个，*HbFT2* 阳性胚状体 3 个，并通过 GUS 染色鉴定为阳性，当代再生植株或经次生体胚发生扩繁后再生的植株通过芽接的方式扩繁获得 *HbFT1* 和 *HbFT2* 的超表达转基因阳性植株分别有 4 株和 7 株，于 2017 年 9 月定植在中国热带农业科学院儋州五队隔离网室，具体的阳性植株情况见表 1。

表 1 *HbFT1* 和 *HbFT2* 转化橡胶树热研 87-6-62 体细胞胚获得的阳性植株

Tab. 1 The positive plantlets of *HbFT1* and *HbFT2* transformed into somatic embryos of rubber tree Reyan 87-6-62

外植体 Explant	外源基因 Exogenous gene	阳性植株编号 No. of positive plant- let
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT1</i>	Ft2014604-2
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT1</i>	Ft2014604-3
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT1</i>	Ft2014557-2
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT1</i>	Ft2014557-3
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT2</i>	2014D276-2
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT2</i>	2014D276-3
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT2</i>	2014D214-1
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT2</i>	2014D214-3
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT2</i>	2014D187-1
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT2</i>	2014D187-2
热研 87-6-62 体细胞胚	<i>HbFT2</i>	2014D187-3

1.2 方法

1.2.1 阳性植株 PCR 鉴定 选择 *HbFT1* 和 *HbFT2* 转基因阳性植株淡绿期的叶片，DNA 提取方法详见天根生化科技（北京）有限公司的 DNA 提取试剂盒（DP320），采用 NanoDrop 2000 分光光度计和凝胶电泳检测 DNA 样品的浓度和完整性。根据 *HbFT1* 和 *HbFT2* 的 CDS 区设计基因的特异引物（表 2），设计 *GUS* 和 *Npt* 基因引物（表 2），采用 PCR 鉴定阳性植株，PCR 扩增的酶使用 TOLOBIO 的 2×Magic Green *Taq* SuperMix（21502），PCR 反应体系为：2 μL DNA 模板，引物各 0.3 μL（10 μmol/L），7.5 μL 2×Magic Green *Taq* SuperMix，4.9 μL ddH₂O。PCR 反应程序为：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，引物 58 ℃复性 10 s，72 ℃延伸 1 min，35 个循环；72 ℃终延

伸 10 min；4 ℃保存。PCR 产物采用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。每次 PCR 反应过程中，分别以 ddH₂O 做空白对照（CK），未经转化的橡胶树叶片基因组 DNA 为阴性对照（CK⁻），含有目的基因的表达载体质粒为阳性对照（CK⁺）。

表 2 *HbFT1*、*HbFT2*、*GUS*、*Npt* 基因扩增引物
Tab. 2 The amplification primers of *HbFT1*, *HbFT2*, *GUS* and *Npt* genes

基因 Gene	引物名称 Primer name	序列（5'-3'） Sequence（5'-3'）
<i>HbFT1</i>	HbFT1-528-F1	ATGCCTAGTGACAGAGATCCTCTT
	HbFT1-528-R1	TTAGCATCTTCTTCCCCCGG
<i>HbFT2</i>	HbFT2-528-F1	ATGCCTAGAGATCCTCTGGTTGT
	HbFT2-528-R1	TTATTGTCCTCGCCTTCTTCCCC
<i>GUS</i>	GUS-5M	GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG
	GUS-6M	GTTTACGCGTGTGCTTCCGCCA
<i>Npt</i>	Npt-F	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
	Npt-R	ATCATGGCTGATGCAATGCG

1.2.2 阳性植株 GUS 染色分析 利用 Biosharp 的 GUS 染色剂试剂盒（BL622A）进行 GUS 染色。将配置好的 X-gluc 溶液和缓冲液按照比例混合配成 GUS 染色工作液，取每个单株的适量叶片置于 1.5 mL 的离心管中，加入配制好的 GUS 染色工作液，置于 37 ℃培养箱过夜，弃染色液，并加入浓度为 75%的酒精洗脱叶片的颜色，直至变成白色或者浅黄色，拍照观察。

1.2.3 qRT-PCR 分析 对上述转基因阳性植株进行 qRT-PCR 验证，分析促进开花和抑制开花基因在不同阳性植株的表达模式。根据橡胶树早花基因 *HbFT1*、*HbFT2* 和抑制开花基因 *HbTFL1*、*HbTFL2*、*HbTFL3*、*HbCEN1*、*HbCEN2* 的基因组序列，设计特异 RT-qPCR 引物（表 3）。利用天根生化科技（北京）有限公司的 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（DP441）提取样品总 RNA。采用 NanoDrop 2000 分光光度计和凝胶电泳检测 RNA 样品的浓度和完整性。利用全式金反转录试剂盒（TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix）反转录成 cDNA。将上述反转录得到的 cDNA 作为模板，以 *HbYLS8* 为内参基因，利用 2×Q3 SYBR qPCR Master Mix（Universal）（22204，TOLOBIO）进行 qPCR，反应体系与扩增程序按照说明书进行，实验设置 3 个技术重复。采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算基因的相对表达水平。

表 3 qRT-PCR 引物
Tab. 3 Primers for qRT-PCR

引物名称 Primers name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
HbYLS8-F	CCTCGTCGTCATCCGATTC
HbYLS8-R	CAGGCACCTCAGTGATGTC
HbFT1-F	TACACATCAACGGTACACACCAGTC
HbFT1-R	CCAAAACATCCCTATCACACG
HbFT2-F	ATCTTTCTACCATTTGACCCCATATA
HbFT2-R	ATAACTCGCCGCTTGTAATCT
HbTFL1-F	CCTCCTTAATCCCTGGCTACG
HbTFL1-R	ACATCGCCTACAACCTCTCCCT
HbTFL2-F	GCCACATTTGGAAGGGAGATAG
HbTFL2-R	TAACACTTATTATTGAAGGCCACTTG
HbTFL3-F	ATACACCTCTTAGCCAGACGCTC
HbTFL3-R	TGTCGCCTCCTTGGACCTCA
HbCEN1-F	CTAATGGCGAAGACAACAGAT
HbCEN1-R	CACCTCCCTGGACCTCAAC
HbCEN2-F	GAAACAGCAGCAAGGAGACG
HbCEN2-R	ATTGGTGC GACTGATACGAC

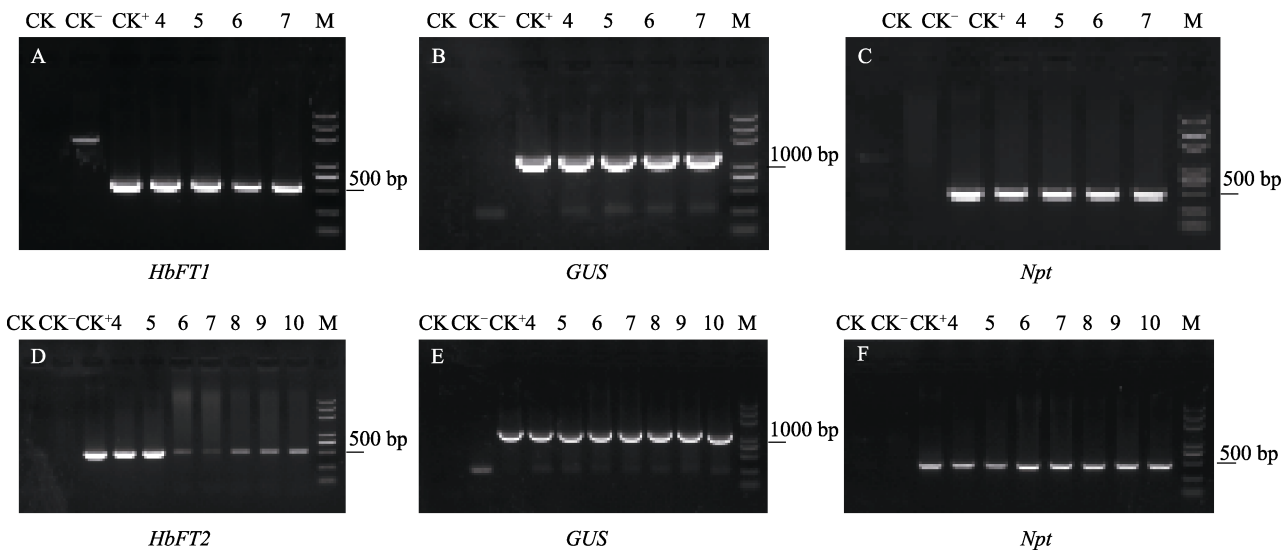
2 结果与分析

2.1 转 *HbFT1* 和 *HbFT2* 阳性植株的 PCR 鉴定

利用 3 对 PCR 特异引物对上述的转基因植株进行扩增,结果如图 1 所示,在空白对照 (CK)、阴性对照 (CK⁻) 中均未扩增出相应片段大小的产物,而在阳性对照 (CK⁺) 和全部阳性单株中均能扩增出符合目标基因的片段大小,带型清晰。结果表明,所有的 *HbFT1* 和 *HbFT2* 阳性植株检测结果均为阳性。

2.2 转 *HbFT1* 和 *HbFT2* 阳性植株的 GUS 染色分析

叶片 GUS 染色过夜并脱色后的结果如图 2 所示,GUS 染色在叶片的边缘处居多,并且全部叶片边缘处都有深蓝色,而非转基因植株的叶片无染色。结果表明,GUS 基因在这些叶片中均有表达,这与 PCR 检测的结果一致,证明这些转化植株确实为阳性植株。



M: 2K Plus DNA marker; A、B、C 中 4~7 为转基因阳性植株 Ft2014604-2、Ft2014604-3、Ft2014557-2、Ft2014557-3; D、E、F 中 4~10 为转基因阳性植株 2014D276-2、2014D276-3、2014D214-1、2014D214-3、2014D187-1、2014D187-2、2014D187-3。M: 2K Plus DNA marker; 4~7 is the transgenic positive plants of Ft2014604-2, Ft2014604-3, Ft2014557-2 and Ft2014557-3 in picture A, B and C; 4~10 is transgenic positive plants 2014D276-2, 2014D276-3, 2014D214-1, 2014D214-3, 2014D187-1, 2014D187-2 and 2014D187-3 in picture D, E and F.

图 1 3 对 PCR 特异引物对转基因植株的扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of transgenic plants by three pairs of PCR specific primers

2.3 *HbFT1* 和 *HbFT2* 在超表达阳性植株中的 qRT-PCR 分析

为进一步解析超表达橡胶树中 *HbFT1* 和 *HbFT2* 的基因表达情况,对橡胶树 *HbFT1* 和 *HbFT2* 的超表达植株进行 qRT-PCR 分析,结果如图 3 所示,*HbFT1* 基因在超表达植株 (Ft2014604-2、

Ft2014604-3、Ft2014557-2、Ft2014557-3) 的表达量均显著高于野生型对照热研 87-6-62, 且 Ft2014557-2 和 Ft2014557-3 不同芽接树间的表达量也差异显著; 而 *HbFT2* 基因在超表达植株 2014D187-2、2014D276-2 中的表达量显著高于野生型对照热研 87-6-62, 其他超表达植株与野生型的表

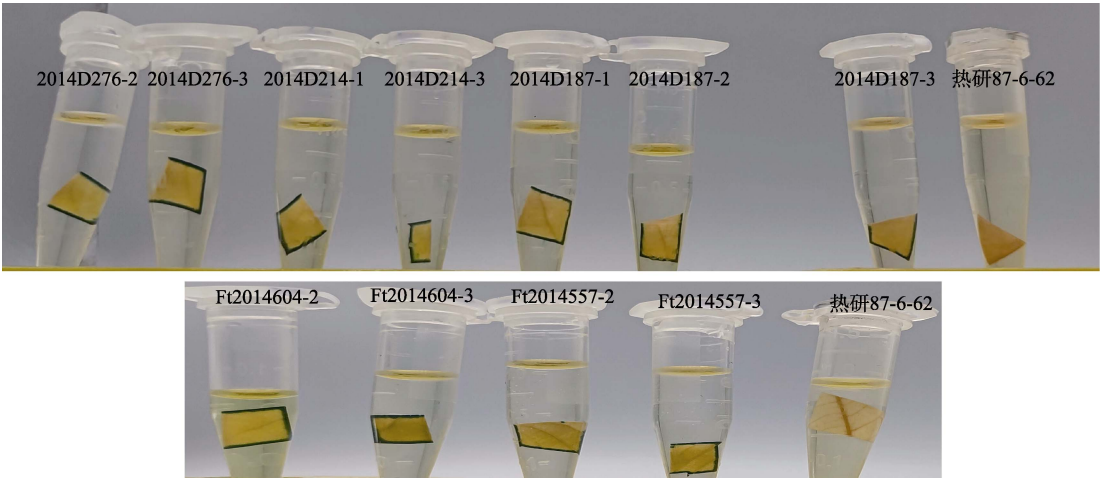
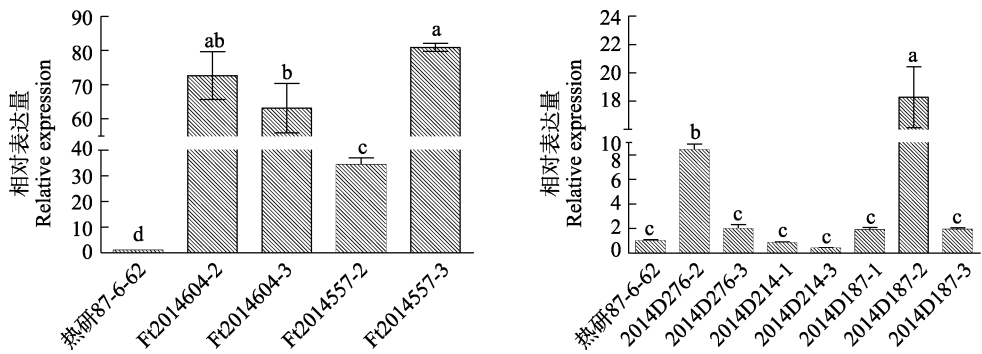


图 2 不同转基因单株的 GUS 染色结果

Fig. 2 The GUS staining of different positive plantlets



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P<0.05$).

图 3 *HbFT1* 和 *HbFT2* 基因在超表达植株中的表达分析

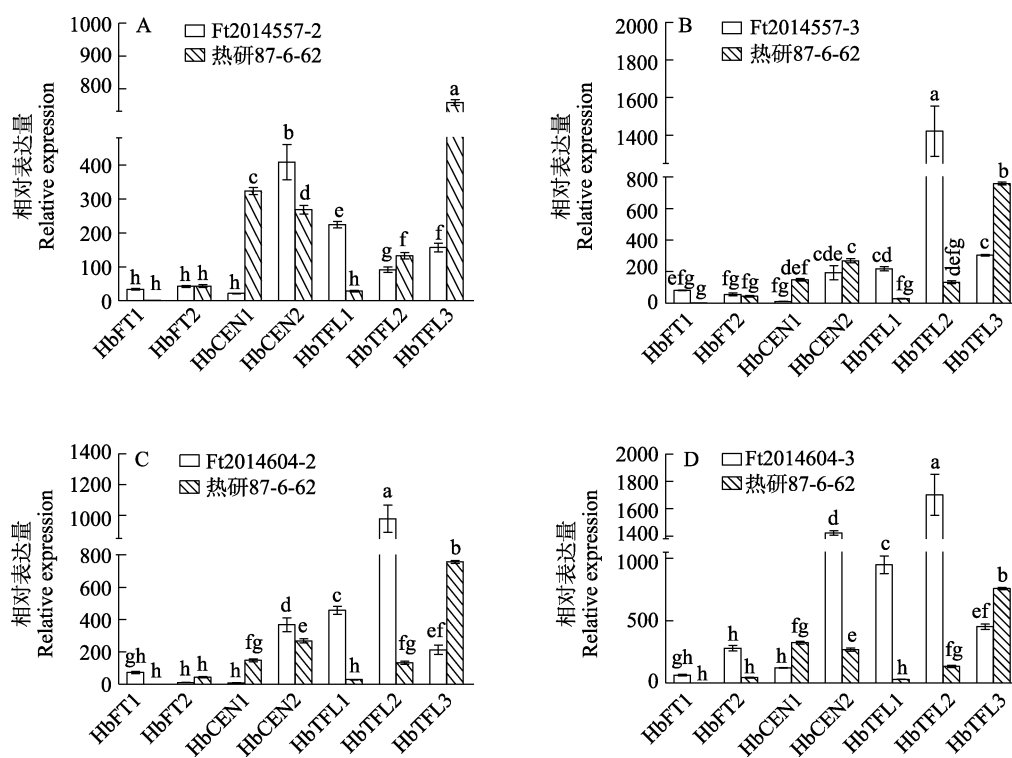
Fig. 3 The qRT-PCR analysis of *HbFT1* and *HbFT2* in over-expressed plantlets

达相当或者不及野生型的表达，不同芽接树间的表达差异较大，尤其是在 2014D276 胚和 2014D187 胚之间的差异达到显著水平。目前转基因阳性植株均已定植 7 a，但获得的所有提早开花基因超表达植株均未提前开花。

2.4 抑制开花基因在超表达阳性植株中的 qRT-PCR 分析

橡胶树中也存在抑制开花基因 *HbTFL1*、*HbTFL2*、*HbTFL3*、*HbCEN1* 和 *HbCEN2*^[21]，为更好地解析提早开花超表达植株未得到早花表型的原因，本研究同时在这些植株中进行抑制开花基因的表达分析。选择 *HbFT1* 和 *HbFT2* 超表达植株进行抑制开花基因的表达分析，结果如图 4 所示，在 *HbFT1* 超表达植株中，抑制开花的基因的表达绝大多数高于促进开花基因的表达，其中在 Ft2014557-2 中，抑制开花基因 *HbCEN2* 和 *HbTFL1* 的表达较高，均高于野生型及 *HbFT1* 的

表达。而芽接扩繁的另一株 Ft2014557-3 中，*HbTFL1* 和 *HbTFL2* 的表达较高，也均高于野生型和 *HbFT1* 的表达，但两株间表达有所差异。在 Ft2014604-2 和 Ft2014604-3 中，抑制开花基因 *HbCEN2*、*HbTFL1*、*HbTFL2* 的表达均高于野生型及 *HbFT1* 的表达。在 *HbFT2* 超表达植株中，抑制开花的基因的表达同样显著高于促进开花的基因表达(图 5)，表达不尽相同。在 2014D214-1 中，抑制开花的基因 *HbCEN2*、*HbTFL1* 和 *HbTFL2* 显著高于野生型和 *HbFT2* 的表达；而在芽接扩繁的另一株 2014D214-3 中，*HbCEN2* 和 *HbTFL1* 的表达显著高于野生型和 *HbFT2* 的表达，但 *HbTFL2* 的表达与野生型无差异。在 2014D276-2 中，除 *HbCEN1* 的表达没有野生型高之外，其他抑制开花的基因的表达均显著高于野生型和 *HbFT2* 基因的表达；而在芽接扩繁的另一株 2014D276-3 中，只有 *HbTFL1*、*HbTFL2* 和 *HbTFL3*



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 4 *HbFT1* 转基因阳性植株中不同开花基因的表达

Fig. 4 The qRT-PCR analysis of flowering genes in over-expressed *HbFT1* plantlets

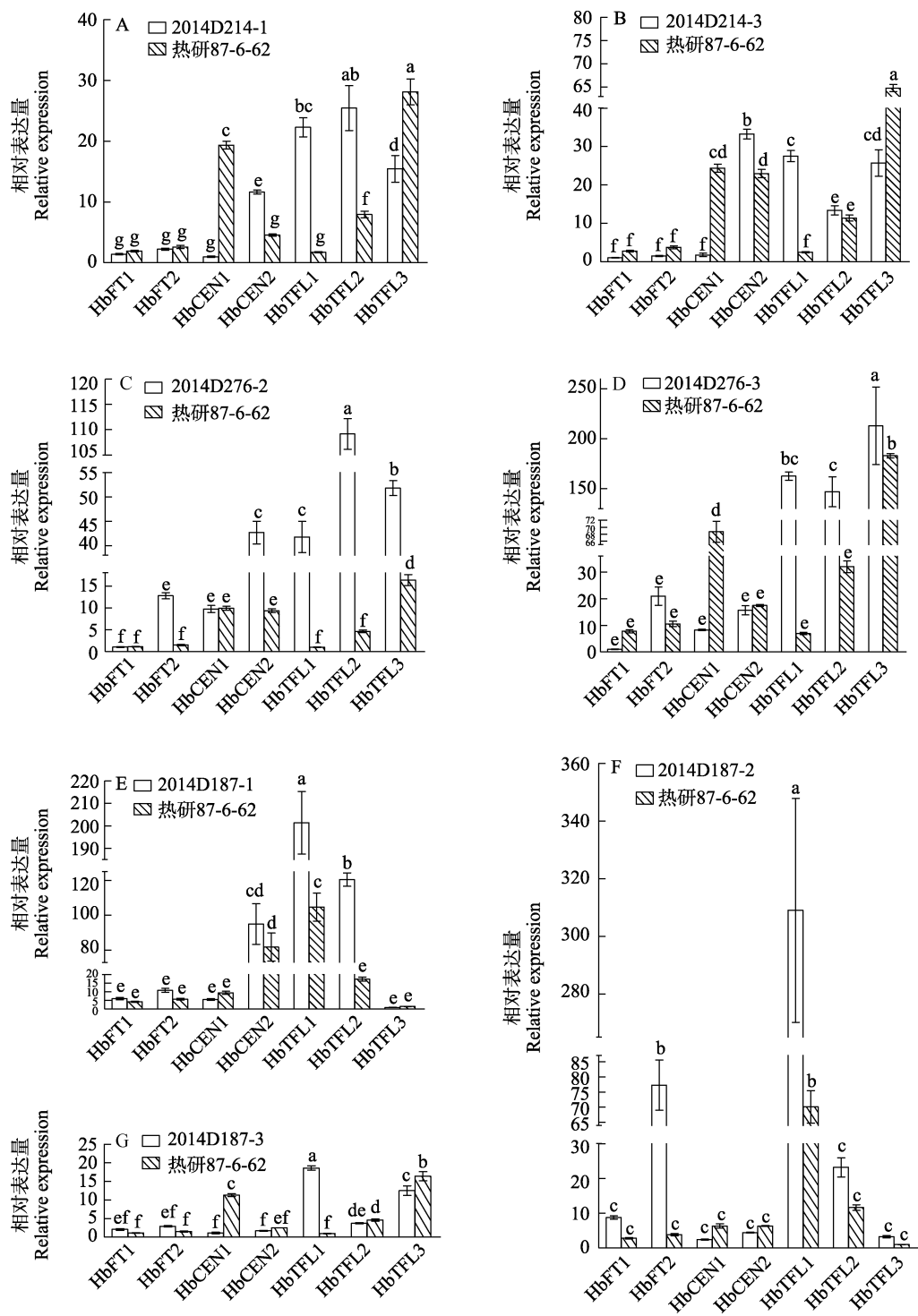
显著高于野生型和 *HbFT2* 基因的表达。在 2014D187-1 中, *HbTFL1* 和 *HbTFL2* 的表达显著高于野生型和 *HbFT2* 基因的表达;而在芽接扩繁的另外两株 2014D187-2 和 2014D187-3 中,只有 *HbTFL1* 的基因表达显著高于野生型和 *HbFT2* 基因的表达。

3 讨论

3.1 橡胶树体胚遗传转化的嵌合型导致芽接树之间的表达量差异较大

体细胞胚胎发生是一个能有效减少嵌合体植物产生的再生体系,因为诱导产生胚胎的是单个细胞^[22]。在橡胶树的次生体胚发生中体细胞胚形成的石蜡切片观察研究发现,橡胶树次生体胚属于直接体胚发生途径,具有以体胚子叶表皮层中的胚性原始细胞的单细胞起源及子叶内部的多细胞起源 2 种起源方式^[23-24],而且显微镜下瞬时 GUS 表达分析证实,表皮细胞和表皮下细胞均存在农杆菌的侵染^[20]。理论上讲,单细胞起源方式的体细胞胚胎发生应该可以得到遗传稳定的转基因植株,并且还可以有效地避免嵌合体的出现,但是橡胶树次生体胚的产生是单细胞起源和多细

胞起源 2 种方式均存在。本研究获得的不同芽接树之间基因的表达量差异较大,而不同芽接树均来自于同一个阳性体细胞胚。*HbFT2* 的表达结果显示,7 株转基因材料中仅有 2 株 *HbFT2* 的表达高于野生型,其他 5 株均与野生型持平,而与这 2 株分别来自同一个阳性胚的另外的芽接苗与其表达差异大。*HbFT1* 的表达结果也类似,虽然 2 个株系的 2 个植株的表达均高于野生型,但是其中 1 个阳性胚芽接产生的 2 个单株间的表达也呈现显著的差异。因此推测造成株系间表达差异大的原因是和阳性体细胞胚为嵌合体有关,UDAYABHANU 等^[24]也提出嵌合现象需要在进一步的转基因实验中得到证实。关于转基因嵌合体现象,一般有以下几种解释机制,如转化细胞和未转化细胞混合产生的芽,转基因的短暂表达或转基因的丢失。嵌合体经常存在于初代转基因植物中,对于杨树等多年生木本乔木,获得纯合子也相对比较困难,也需要经过二次再生获得较高频率的纯合子^[25]。而在最新的橡胶树基因编辑的研究中也发现,超过 90% 的第 0 代转化胚胎是嵌合的,因此,从 T_0 阳性胚胎中再生转基因植株不合适。在 T_1 代纯合子胚的比例显著提高接近 50%^[26]。针对以橡胶



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 5 *HbFT2* 转基因阳性植株中不同开花基因的表达

Fig. 5 The qRT-PCR analysis of flowering genes in over-expressed *HbFT2* plantlets

树体细胞胚为外植体获得初代阳性胚存在嵌合体的问题，笔者认为可以通过 3 个方面加以改进：一是继续将初代阳性胚次生体胚发生增殖到第二代或者第三代，再进行出胚及出苗；二是在转基因筛选过程中，选择可视化或者荧光显微镜可以

很好地观察阳性胚的报告基因，如 *RUBY*、*DsRed* 或 *RFP* 等进行实时跟踪，将有指示标记的胚块或者胚进行后续继代实验；三是进一步研究橡胶树体细胞胚次生体胚发生过程中的细胞起源模式，从源头上避免嵌合体的产生。这些措施可以在将

来的转基因过程中减少嵌合体的产生。

3.2 拮抗基因的平衡调控决定表型性状

拮抗基因是一对序列相似但功能相反的调控基因,最早承认 SFT/SP 影响植株形态和产量是从番茄 SP 基因对于表型的影响^[27-28]。如 PARK 等^[29]利用人工 EMS 诱变 *sp* 番茄,获得弱功能的 SP 和 SFT 突变基因,然后使杂合的 SP 和 SFT 基因达到一定的平衡状态,提高花序密度的同时,提高了营养生长能力,植株变得更加茂盛,最终提高了番茄单株的产量;棉花的 *GhSFT* 和 *GhSP* 基因产物的有目的的操作为增强有限花序的形状和在区域特异性环境下改变棉花的农耕带来希望^[30]。在大豆中,功能性拮抗基因 *GmFT4* 和 *GmFT2a/5a* 的平衡决定了大豆的开花时间^[17], FT 和 TFL1 通过竞争共同的下游 FD 与 14-3-3 等蛋白形成的复合体实现植物开花控制^[31-34]。FT/TFL1 平衡关系或剂量效应与植株形态建成具有显著相关性,即 FT/TFL1 表达比值决定了开花时间的长短与形态建成^[12, 35]。一般橡胶树在定植 3~4 a 即可开花,而本研究中转化早花基因在定植 7 a 也未得到早花表型,推测可能是由于橡胶树抑制开花基因的高表达所致。qRT-PCR 分析结果显示 *HbTFL1* 在所有超表达促进开花基因的植株中均显著高于野生型与对应的超表达基因,推测该基因可能与抑制开花相关,因超表达促进开花的基因后,打破了 FT/TFL1 的平衡关系,抑制开花的基因表达也上调,而且超过促进开花基因的表达,最终导致超表达促进开花基因的橡胶树并未提前开花。本研究认为,在橡胶树这种基因组复杂的物种中,多拷贝基因经常存在,橡胶树转基因研究需要获得较大群体观察表型才具有可靠性,另外通过对拮抗基因的 RNAi 来改变剂量效应,以期获得需要的表型。

参考文献

- [1] CUCO S M, BANDEL G. Hermaphroditism in the rubber tree *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. de Juss.) Muell. Arg. - II[J]. General and Molecular Biology, 1998, 21(4): 523-526.
- [2] RAO P S, SARASWATHYAMMA C K, SETHURAJ M R. Studies on the relationship between yield and meteorological parameters of para rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. Agricultural and Forest Meteorology, 1998, 90(3): 235-245.
- [3] DORNELAS M C, RODRIGUEZ A P M. The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) homologue of the *LEAFY/FLORICAULA* gene is preferentially expressed in both male and female floral meristems[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(417): 1965-1974.
- [4] FORNARA F, MONTAIGU A D, COUPLAND G. Snap-Shot: control of flowering in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2010, 141(3): 550.
- [5] SRIKANTH A, SCHMID M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2011, 68 (12): 2013-2037.
- [6] 张艺能, 周玉萍, 陈琼华, 黄小玲, 田长恩. 拟南芥开花时间调控的分子基础[J]. 植物学报, 2014, 49(4): 469-482. ZHANG Y N, ZHOU Y P, CHEN Q H, HUANG X L, TIAN C E. Molecular basis of flowering time regulation in *Arabidopsis*[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2014, 49(4): 469-482. (in Chinese)
- [7] JIN S, NASIM Z, SUSILA H, AHN J H. Evolution and functional diversification of FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 family genes in plants[J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2020, 109(5): 20-30.
- [8] CORBESIER L, VINCENT C, JANG S, FORNARA F, FAN Q, SEARLE L, GIAKOUNTIS A, FARRONA S, GISSOT L, TURNBULL C. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*[J]. Science, 2007, 316(5827): 1030-1033.
- [9] GORETTI D, SILVESTRE M, COLLANI S, LANGENEC-KER T, MENDEZ C, MADUENO F, SCHMID M. *TERMINAL FLOWER1* functions as a mobile transcriptional cofactor in the shoot apical meristem[J]. Plant Physiology, 2020, 182(4): 2081-2095.
- [10] ZHU Y, KLASFELD S, WAGNER D. Molecular regulation of plant developmental transitions and plant architecture via PEPB family proteins: an update on mechanism of action[J]. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(7): 2301-2311.
- [11] WICKLAND P D, HANZAWA Y. The FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 gene family: functional evolution and molecular mechanisms[J]. Molecular Plant, 2015, 8(7): 983-997.
- [12] PUTTERILL J, VARKONYI-GASIC E. FT and florigen long-distance flowering control in plants[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2016, 33: 77-82.
- [13] BLACKMAN B, STRASBURG J, RADUSKI A, MICHAEL S, RIESEBERG L. The role of recently derived FT paralogs in sunflower domestication[J]. Current Biology, 2010, 20(7): 629-635.
- [14] PIN P A, BENLLOCH R, BONNET D, WREMERTH-WEICH E, KRAFT T, GIELEN J, NILSSON O. An antagonistic pair of FT homologs mediates the control of flowering time in sugar beet[J]. Science, 2010, 330(6009): 1397-1400.
- [15] HARIG L, BEINECKE F A, OLTMANNS J, MUTH J,

- MULLER O, RUPING B, TWYMAN R M, FISCHER R, PRUFER D, NOLL G. Proteins from the *FLOWERING LOCUS T*-like subclade of the PEBP family act antagonistically to regulate floral initiation in tobacco[J]. The Plant Journal, 2012, 72(6): 908-921.
- [16] WINTERHAGEN P, TIYAYON P, SAMACH A, HEGELE M, JENS W. Isolation and characterization of *FLOWERING LOCUS T* subforms and *APETALA1* of the subtropical fruit tree *dimocarpus longan*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2013, 71: 184-190.
- [17] ZHAI H, LU S X, LIANG S, WU H Y, ZHANG X Z, LIU B H, KONG F J, YUAN X H, LI J, XIA Z J. *GmFT4*, a homolog of *FLOWERING LOCUS T*, is positively regulated by *E1* and functions as a flowering repressor in soybean[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89030.
- [18] COELHO C P, MINOW M A A, CHALFUN-JUNIOR A, COLASANTI J. Putative sugarcane *FT/TFL1* genes delay flowering time and alter reproductive architecture in *Arabidopsis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2014, 5: 221-233.
- [19] BI Z H, HUANG H S, HUA Y W. Cloning and characterization of two *FLOWERING LOCUS T*-like genes from rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2019, 38(3): 919-930.
- [20] HUANG T D, LI J, LI Y T, HUANG H S, HUA Y W. Somatic embryo an alternate target tissue for *Agrobacterium* mediated transformation in *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Rubber Research, 2015, 18(3): 171-188.
- [21] BI Z H, AYESHA T, HUANG H S, HUA Y W. Cloning and functional analysis of five *TERMINAL FLOWER1 (TFL1)/CENTRORADIALIS (CEN)*-like genes from *Hevea brasiliensis*[J]. Physiologia Plantarum, 2018, 166(2): 612-627.
- [22] 苏南. 基于体细胞胚胎发生的甜瓜转基因体系构建[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- SU N. Construction of melon transgenic system based on somatic embryogenesis[D]. Hangzhou: Zhejiang University, (in Chinese)
- [23] WANG T D, HUANG T D, HUANG H S, HUA Y W. Origin of secondary somatic embryos and genetic stability of the regenerated plants in *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Rubber Research, 2017, 20(2): 101-116.
- [24] UDAYABHANU J, HUANG T D, XIN S C, CHENG J, HUA Y W, HUANG H S. Optimization of the transformation protocol for increased efficiency of genetic transformation in *Hevea brasiliensis*[J]. Plants, 2022, 11(8): 1067-1081.
- [25] DING L P, CHEN Y J, MA Y, WANG H Z, WEI J H. Effective reduction in chimeric mutants of poplar trees produced by CRISPR/Cas9 through a second round of shoot regeneration[J]. Plant Biotechnology Reports, 2020, 14(5): 549-558.
- [26] YANG X F, LIN Q F, UDAYABHANU J, HUA Y W, DAI X M, XIN S C, WANG X Y, HUANG H S, HUANG T D. An optimized CRISPR/Cas9-based gene editing system for efficiently generating homozygous edited plants in rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. Industrial Crops and Products, 2024, 222: 119740.
- [27] YEAGER A F. Determinate growth in the tomato[J]. Journal of Heredity, 1927, 18(6): 263-265.
- [28] PNUELI L, CARMEL-GOREN L, HAREVEN D, GUTFIN-GER T, ALVAREZ J, GANAL M, ZAMIR D, LIFSCHITZ E. The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*[J]. Development, 1998, 125(11): 1979-1989.
- [29] PARK S J, JIANG K, TAL L, YICHIE Y, GAR O, ZAMIR D, ESHED Y, LIPPMAN Z B. Optimization of crop productivity in tomato using induced mutations in the florigen pathway[J]. Nature Genetics, 2014, 46(12): 1337-1342.
- [30] MCGARRY R C, PREWITT S, CULPEPPER S, ESHED Y, LIFSCHITZ E, AYRE B G. Monopodial and sympodial branching architecture in cotton is differentially regulated by the *Gossypium hirsutum* *SINGLE FLOWER TRUSS* and *SELF-PRUNING* orthologs[J]. New Phytologist, 2016, 212(1): 244-258.
- [31] HANANO S, GOTO K. *Arabidopsis* *TERMINAL FLOWER1* is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression[J]. The Plant Cell, 2011, 23(9): 3172-3184.
- [32] TAOKA K, OHKI I, TSUJI H, FURUITA K, HAYASHI K, YANASE T, YAMAGUCHI M, NAKASHIMA C, PURWESTRI Y A, TAMALI S, OGAKI Y, SHIMADA C, NAKAGAWA A, KOJIMA C, SHIMAMOTO K. 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen[J]. Nature, 2011, 476(7360): 332-335.
- [33] QIN Z R, WU J J, GENG S F, FENG N, CHEN F J, KONG X C, SONG G Y, CHEN K, LI A L, MAO L, WU L. Regulation of *FT* splicing by an endogenous cue in temperate grasses[J]. Nature Communications, 2017, 8(1): 14320.
- [34] KANEKO-SUZUKI M, ISHIKAWA R, TERAKAWA C, KOJIMA C, FUJIWAWA M, OHKI I, TSUJI H, SHIMAMOTO K, TAOKA K. TFL1-like proteins in rice antagonize rice FT-like protein in inflorescence development by competition for complex formation with 14-3-3 and FD[J]. Plant and Cell Physiology, 2018, 59(3): 458-468.
- [35] LIFSCHITZ E, EVIATAR T, ROZMAN A, SHALIT-KANEH A, GOLDSCHMIDT A, AMSELLEM Z, ALVAREZ J P, ESHED Y. The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(16): 6398-6403.