

抱茎独行菜种皮粘液质相关基因 *TTG1* 的克隆、表达分析及功能鉴定

曹婧^{1*}, 徐栋生^{1*}, 黄代红¹, 袁军文^{1,2}, 赵娟¹, 王文艳¹, 兰海燕^{1**}

(1. 新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046;

2. 新疆生产建设兵团种子管理总站, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 抱茎独行菜 (*Lepidium perfoliatum* L.) 为十字花科具典型粘液质繁殖体植物, 而 *TTG1* 基因 (*Transparent testa glabra 1*) 所编码的蛋白是调控种皮细胞分化并影响粘液质释放的转录因子。目前关于 *TTG1* 基因在粘液质繁殖体植物中的研究报道较少, 为探究 *TTG1* 基因在抱茎独行菜粘液质发育中的作用, 本研究利用同源克隆技术获得抱茎独行菜 *TTG1* 基因 cDNA 开放阅读框 (ORF) 序列, 命名为 *LpTTG1*。序列分析表明, 该基因 ORF 全长为 1032 bp, 编码 343 个氨基酸, 含有 WD40 基序; qRT-PCR 分析结果显示, 该基因在抱茎独行菜各组织中均有表达, 反映了该基因功能的多样性; 免疫组织化学定位结果表明, *LpTTG1* 在种子发育过程中内珠被和外珠被的表达水平变化与外珠被粘液质的合成过程相一致, 推测该基因可能参与调控抱茎独行菜种皮的发育及粘液质的形成。将 *LpTTG1* 基因转化拟南芥, 该基因的过量表达显著促进了粘液质合成途径下游基因 *AtMUM4* 在角果中的表达, 表明该基因有可能参与粘液质合成途径调控, 并促进下游产物 MUM4 的产生。然而, 对 *LpTTG1* 转基因拟南芥与野生型植株表型的比较发现, 两者种子形态及粘液质分泌与释放方式均无显著差异, 这可能是因为抱茎独行菜种皮发育和粘液质形成是一个多基因调控的复杂过程, 某一基因的过量表达也许不会引起明显的表型变化。

关键词: 抱茎独行菜; 粘液质合成; 免疫组化; *TTG1* 基因; qRT-PCR

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2014)04-0371-12

Cloning, Characterization, and Functional Analysis of Seed Coat Mucilage-related Gene *TTG1* from *Lepidium perfoliatum*

CAO Jing^{1*}, XU Dong-Sheng^{1*}, HUANG Dai-Hong¹, YUAN Jun-Wen^{1,2}, ZHAO Juan¹, WANG Wen-Yan¹, LAN Hai-Yan^{1**}

(1. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046; 2. Seed Administration Bureau of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi 830011)

Abstract: *Lepidium perfoliatum*, an annual herb plant species of Brassicaceae, has a typical myxospermy. The *TTG1* (*Transparent testa glabra 1*) gene encodes a putative transcription factor, which has been identified to play a role in epidermal cell differentiation and mucilage release. Till now, research on the *TTG1* gene in myxospermy plants has been rarely reported. To identify *TTG1* gene function, mucilage related gene *LpTTG1* from *L. perfoliatum* was cloned in the present study. The full length ORF of the *TTG1* gene from *L. perfoliatum* was isolated by homologous cloning, and was found to be 1032 bp long, encoded 343 putative amino acids

收稿日期: 2014-02-12, 退修日期: 2014-03-19。

基金项目: 国家自然科学基金(30860020); 中国教育部留学回国学者基金项目(2006-2008)。

作者简介: 曹婧(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物抗逆分子生物学(E-mail: jingyu90217@163.com); 徐栋生(1988-), 男, 博士研究生, 研究方向为植物抗逆分子生物学(E-mail: xudongsheng1122@163.com)。

* 为共同第一作者。

** 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: lanhaiyan@xju.edu.cn)。

and contained WD40 motifs, named as *LpTTG1*. The qRT-PCR results showed that *LpTTG1* was widely expressed in different tissues of *L. perfoliatum*, which may reflect diverse functions of *LpTTG1*. Moreover, immunolocalization analysis indicated that the expression of *LpTTG1* changed in inner and outer integuments and corresponded to the synthesis of mucilage in outer integument cell layers, suggesting that *LpTTG1* mainly regulates the development of the seed coat then applies the effect on mucilage production. Furthermore, overexpression of *LpTTG1* in *Arabidopsis* could significantly enhance the expression of *AtMUM4* (which developmentally regulates mucilage production downstream) in silique, which means *LpTTG1* attends to the mucilage regulation pathway and generates more downstream product-MUM4 in promotion of mucilage synthesis. In our experiment, however, no significant difference in seed morphology and release pattern, or the secretion amount of mucilage between *LpTTG1* overexpression transgenic line and WT, was observed. One possible explanation may be that mucilage synthesis and release is a complex process in *Arabidopsis*, and is regulated by many genes with functional redundancy, therefore increasing the transcription level with one of them during development may not result in significant phenotype change.

Key words: *Lepidium perfoliatum*; Mucilage synthesis; Immunolocalization; *TTG1* gene; qRT-PCR

种皮粘液质是由外种皮细胞的高尔基体产生并分泌到胞腔或胞壁层的果胶类多糖物质^[1,2], 干燥种子遇水后粘液质立刻释放, 形成透明胶质包被整个种子, 此类种子即为粘液质繁殖体^[3]。抱茎独行菜 (*Lepidium perfoliatum* L.) 为十字花科 (Cruciferae) 独行菜属 (*Lepidium*) 一年或二年生草本植物, 其种子为典型粘液质繁殖体, 广泛分布于新疆干旱荒漠区的各种生境。粘液质的存在对粘液繁殖体种子的储存、扩散、萌发、防御及幼苗生长等均具有重要生物学意义^[4-7], 是粘液质繁殖体植物适应荒漠环境的有效对策之一。TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (*TTG1*) 基因编码一个经典的转录因子 WD40-repeat 蛋白, 此蛋白家族在许多植物的主要器官均有表达, 在信号转导、细胞周期调控、RNA 剪接、囊泡运输和转录等方面行使重要功能^[8]。在拟南芥粘液质合成和释放过程中, *TTG1* 基因是位于种皮分化及粘液质产生调控途径上游的调控因子^[8]。对拟南芥 *TTG1* 基因的相关研究显示, 该基因在拟南芥主要器官中均有表达; 在种子种皮形成的初始阶段不发挥作用, 但在粘液质分泌细胞形成过程中表达, 对维持细胞分化、外种皮细胞质小柱的形成以及种子吸水后粘液质的释放等过程具有重要作用^[9]。然而, 目前对于其它粘

液繁殖体中的 *TTG1* 基因还鲜见报道, 克隆抱茎独行菜 *TTG1* 基因并分析其在不同组织及角果不同发育阶段的表达情况, 可为研究种子粘液质形成的分子机制提供理论依据。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 是十字花科具粘液繁殖体的代表种及模式植物, 前人通过分子生物学、结构化学及形态观察等方法, 对其种皮及粘液分泌细胞的结构、粘液质的产生及分泌、粘液质的组成等方面进行了较为深入和系统的研究, 已取得较大进展^[10-17]。拟南芥种皮粘液质的形成是种皮外层细胞协调分化过程的一部分^[4,18], 目前已从拟南芥中分离到一些粘液质突变体 (简称 mum), 如 *mum1*、*mum2*^[14]、*mum3*^[10,14]、*mum4*^[10,19]、*mum5*^[10,15]、*ap2*^[20]、*ttg1*^[9,21]、*ttg2*^[22]、*gl2*^[23]、*myb61*^[9]、*tt8*^[24]、*egl3*^[25] 等, 这些材料为深入研究种皮细胞分化、粘液质生物合成及分泌的分子机制奠定了基础。一些经典的转录因子参与了外种皮的发育, 其突变体种子在水合状态下不能释放粘液质, 如 *APETALA2* (*AP2*) 基因功能缺失的拟南芥不能形成细胞质小柱 (拟南芥表皮细胞中的一个结构), 且不能合成粘液质^[20]; *GLABRA2* (*GL2*) 是表皮细胞质小柱形成及吸胀后粘液质释放必不可少的基因^[21]。而 *TTG1* 基因在拟南芥表皮细胞分化

过程中具有重要作用^[26],它能够调控表皮毛和根毛的形态发生、花青素的生物合成及种皮发育过程中粘液质的积累^[27-29];该基因突变体形成的细胞质小柱异常且粘液质遇水不能释放^[9]。据报道,*TTG1* 基因是粘液质合成信号途径上游的调控因子^[8],并与其它基因相互作用,调控下游相关基因 *TTG2*、*MUM2*、*MUM4* 等的表达^[11,22]。我们前期的研究结果显示,抱茎独行菜外种皮细胞发育及种皮粘液质形成的细胞生物学过程与同科植物拟南芥具有明显差异。通过观察发现,抱茎独行菜外种皮发育及粘液质形成和释放与拟南芥^[2,6]所经历的细胞质重排、火山状细胞质小柱形成、围绕火山产生粘液质“口袋”等一系列过程不同的是,抱茎独行菜种子外种皮不发生细胞质重排,其种皮扫描结构也不是火山状。抱茎独行菜外种皮(外珠被)最外层细胞在发育成熟过程中不断增大,且其内切向壁和纵向壁均增厚,而外切向壁保持初生壁(便于粘液质释放);外种皮最外层及其紧邻内层细胞在成熟发育过程中合成大量造粉体(通过形态和碘染观察),当造粉体逐渐消失,最外层就成为一层死细胞,其中充满了吸水后可以释放的粘液质(此粘液质具有一定的结构;未发表数据)。粘液质的合成与释放是一个复杂的过程,涉及许多调控因子和相关功能基因^[30]。*TTG1* 基因位于粘液质合成途径上游,尽管在拟南芥中已明确该基因的主要功能,但其在抱茎独行菜粘液质形成和分泌过程中的作用尚不清楚。

为探究 *TTG1* 基因在抱茎独行菜粘液质繁殖体中的相关功能,本实验利用同源克隆方法获得了抱茎独行菜 *TTG1* 基因 ORF 序列(简称为 *LpTTG1*),并将其克隆到原核表达载体 pET30a(+)中,获得重组质粒 pET30a-*LpMUM4* 并转化至大肠杆菌 BL21,重组蛋白 *LpTTG1* 经诱导表达及纯化后免疫新西兰兔制备了多克隆抗体,随后对抱茎独行菜种皮发育过程进行免疫组织化学定位研究。同时,通过荧光定量 qRT-PCR 检测 *LpTTG1* 基因在抱茎独行菜不同组织及不同发育阶段角果中的表达模式,以及转基因拟南芥株系中 *LpTTG1* 过表达对粘液质调控途径下游基因 *MUM4* 的影响,最后观察比较过表达 *LpTTG1* 拟南芥株系和野生型拟南芥的

种子形态及粘液质释放的方式,并推测与分析 *LpTTG1* 基因在抱茎独行菜种皮粘液质形成过程中的作用,以期对种子粘液质形成的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及处理

抱茎独行菜(*Lepidium perfoliatum*)成熟种子于2005年6月采自新疆古尔班通古特沙漠南缘,干燥后冷藏(4℃)备用。于当年选择地表温度相对较低的深秋季节(10月下旬),将抱茎独行菜种子露地播种到新疆大学生命科学与技术学院院内试验地中。当花苞微张且最长的雄蕊高过柱头时,用不同颜色标记角果基部并记录授粉时间(day after pollination, 以下简称为 DAP)。收集 0~18 DAP 不同发育阶段的角果进行 qRT-PCR 检测。

野生型拟南芥为 Columbia 生态型, *ttg1* 突变体(编号为 CS89)购自哥伦比亚俄亥俄州立大学拟南芥生物资源中心(ABRC)。种子经表面灭菌后播于 MS 培养基,约 10 d 左右能明显观察到两片真叶出现时,将幼苗移入花盆(蛭石:珍珠岩 = 1:3),于 22℃、16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 制备

用 RNAprep Pure Plant Kit (Bioteke)试剂盒提取抱茎独行菜新鲜叶片(100 mg)的总 RNA。按照 TAKARA 反转录酶 M-MLV 说明书步骤,在 20 μL 体系中,加入 800 ng 总 RNA,以 oligo(dT)15 为引物,于 42℃ 孵育 1 h 合成 cDNA。

1.3 基因克隆及生物信息学分析

根据 GenBank 发表的拟南芥与油菜 *TTG1* 基因 cDNA 全长序列(NM180739.2 与 EF175932.1)设计同源引物(上游引物:5'-GCGGTACCACCATGGATA-ATTCAGCTC-3'和下游引物:5'-GCGTCGACCT-CAAACTCTAAGGAGCTGC-3'),克隆抱茎独行菜 *LpTTG1* 基因开放阅读框序列(ORF),且在上、下游引物中分别引入 *Kpn* I 和 *Sal* I 酶切位点(下划线部分),还在上游引物酶切位点后面引入起始密码子附近的 KOZAK 序列(ACCA),以增强外源基因 *TTG1* 在转基因植株中的表达。运用 multi-alignment 和 BLAST 程序分析不同 *TTG1* 基

因的序列同源性以及氨基酸序列, 并使用在线服务器程序 ProtScale (<http://au.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 计算 LpTTG1 蛋白推测分子量; 采用软件 SMART 4.0 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 MotifScan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 分别分析 LpTTG1 蛋白功能结构域及基序。

1.4 原核表达载体的构建及多克隆抗体的制备

将 *LpTTG1* 基因编码区插入原核表达载体 pET30a 的多克隆位点, 构建重组质粒 pET30a-*LpTTG1*, 诱导表达带 His 标签的融合蛋白以备后续纯化。pET30a-*LpTTG1* 含诱导型 T7 启动子及终止子, 并以卡那霉素抗性基因作为选择标记。重组蛋白 LpTTG1 经诱导表达和纯化后免疫新西兰兔, 用弗氏不完全佐剂增强免疫反应, 每次免疫加强间隔 1 周, 共免疫 3 次。通过 ELISA 和 Western blot 检测抗体的效价和特异性。

1.5 转基因植株的获得和检测

将 *LpTTG1* 基因 ORF 序列插入植物表达载体 pCAMBIA1301 的多克隆位点, 获得重组载体 pCAMBIA1301-*LpTTG1*。采用冻融法将重组质粒 pCAMBIA1301-*LpTTG1* 转入农杆菌 EHA105, 利用花序浸染法转化拟南芥野生型植株^[31]。收集拟南芥 T₀ 代种子, 播种到含 30 mg/L 潮霉素与 300 mg/L 链霉素的 MS 培养基上, 培养 8 ~ 10 d 后, 将阳性苗移至无抗生素的 MS 培养基上, 恢复培养 1 周后再移栽至花盆中(蛭石:珍珠岩 = 1:3)。分别提取野生型拟南芥及其抗性植株莲座叶的基因组 DNA 和总 RNA, 利用 *LpTTG1* 特异性(非 *AtTTG1*)引物(上游引物: 5'-CTCCTCCACTCGTTC-CGGCCAAAGG-3', 下游引物: 5'-CCAGGCAAT-GTCGTGAACCTCCTTA-3')进行 PCR、RT-PCR 扩增。PCR 扩增体系为 20 μ L, 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 50 s, 55℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

1.6 目的基因的表达分析

1.6.1 qRT-PCR 分析 *LpTTG1* 基因在抱茎独行菜不同组织和不同发育阶段角果中的表达模式

分别提取抱茎独行菜根、茎、叶、角果等不同组织及不同发育阶段角果(1、5、8、11、15

DAP) 的总 RNA, 并利用 GeneAmp 5700 实时 PCR 系统及 SYBR Green (Invitrogen) 进行定量 PCR 分析。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环。以抱茎独行菜的 β -actin 基因为内参(上游引物: 5'-CCAAAGGCCAACAGAGAGAAGAT-3', 下游引物: 5'-TGAGACACACCATCACCAGAAT-3')。

1.6.2 qRT-PCR 分析 *AtMUM4* 基因在转基因拟南芥不同组织中的表达模式

分别提取野生型和过表达 *LpTTG1* 拟南芥根、茎、叶、角果等不同组织的总 RNA, 并利用特异引物(上游引物: 5'-GTGAGGGACATGAAGGAAAAGCT-3', 下游引物: 5'-AGACACTGTACTTCCTCTCTGGTG-3')对 *AtMUM4* 进行扩增, PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环。以拟南芥的 β -actin 基因作为内参。

1.6.3 *LpTTG1* 在抱茎独行菜种子发育过程中的免疫组织化学定位

用 4% 多聚甲醛固定液固定 0 ~ 20 DAP 的角果, 于 4℃ 静置 24 h 后制作石蜡切片。利用超薄切片机 Lica RM2126 将其切成厚度 5 ~ 10 μ m 的切片, 展平至载玻片上。与抗体孵育之前, 用 1% 牛血清白蛋白(BSA)配置的 10% 山羊血清缓冲液(pH 7.4)于 37℃ 孵育载玻片 15 min。将一抗(抗 β -1,3-D-glucan 抗体)按 1:100 稀释后, 在每张切片组织上滴加 100 μ L, 37℃ 孵育 1 h; 然后用加入 Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBST, pH 7.4)洗脱, 再将按 1:500 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗, 滴加到每张切片组织上(100 μ L), 37℃ 孵育 1 h; 最后按照二氨基联苯胺(DAB)染色试剂盒说明书对切片组织进行染色, 并置于光学显微镜 Motic B5 professional series (Bock Optonics Inc., Canada)下观察、拍照。

1.7 目的基因的功能分析

利用体式显微镜(Nikon SMZ 800, Japan)观察拟南芥野生型、*ttg1* 突变体及 *LpTTG1* 过表达株系种子形态, 并通过钉红(针对多聚糖的染料)染色观察种子种皮粘液质的释放过程及着色程度。

1.8 数据分析

本实验所有数据均采用 3 次重复并取其平均值，使用 GraphPad Prism Version 4.02 (Graph-Pad Software, San Diego, CA) 软件对数据进行分析；对独立样本数据采用未配对 *t* 检验和单因素方差分析，若差异显著则在 *P* = 0.05 水平上进行多重比较 Tukey 检验。

2 结果与分析

2.1 *LpTTG1* 的 cDNA 克隆

通过同源克隆获得抱茎独行菜 *LpTTG1* 基因 cDNA 的开放阅读框序列 (ORF)，BLAST 分析显示该基因 ORF 全长为 1032 bp，编码 343 个氨基酸，分子量为 38.11 kD，等电点为 4.71。多序列比对结果表明，抱茎独行菜 *LpTTG1* 基因与 GenBank 公布的拟南芥 *AtTTG1* 以及油菜 (*Brassica napus*) *BnTTG1* 核酸序列分别具有 88.95% 与 79.55% 的同源性，氨基酸序列分别有 96.79% 与 91.55% 的同源性。抱茎独行菜、拟南芥^[28]、油菜^[32] *TTG1* 氨基酸序列之间 blast 结果如图 1 所示，其中方框内的序列是 WD40 蛋白家族的必要基序 (表 1)，这说明从抱茎独行菜中克隆得到了 *TTG1* 基因。

2.2 抱茎独行菜 *LpTTG1* 基因的表达分析

2.2.1 qRT-PCR 分析

为了解 *LpTTG1* 基因在抱茎独行菜不同组织中的表达水平，分别提取抱茎独行菜根、茎、莲座叶、抱茎叶及角果的总 RNA 进行 qRT-PCR 表达检测，结果显示，抱茎独行菜 *TTG1* 基因在不同组织中均有表达 (相对表达量为 1.0~3.21)，反映了该基因功能的多样性 (图 2)。 *LpTTG1* 相对转录水平在根中最高，抱茎叶中最低，然而单因素方差分析显示不同组织中的表达量无显著差异 (*P* = 0.1194)。为探究 *LpTTG1* 基因在抱茎独行菜种子成熟过程中的表达情况，分别采集授粉后 1、5、8、11、15 d 的角果提取总 RNA 并进行 qRT-PCR 表达检测。结果显示 (图 3)， *LpTTG* 基因的 mRNA 积累量在角果发育后期 (授粉后 11~15 d) 上升趋势更为明显，但不同发育阶段之间无显著差异 (*P* = 0.0760)。

2.2.2 免疫组织化学定位分析

为进一步探究抱茎独行菜不同发育阶段角果中 *LpTTG1* 蛋白表达水平的变化，制作了石蜡切片并纯化重组蛋白 *LpTTG1* 制备了多克隆抗体 (数据未列出)，经一抗 (抗 β -1,3-D-glucan 抗体) 和 HRP 标记的山羊抗兔二抗分别孵化切片组织后染色。据

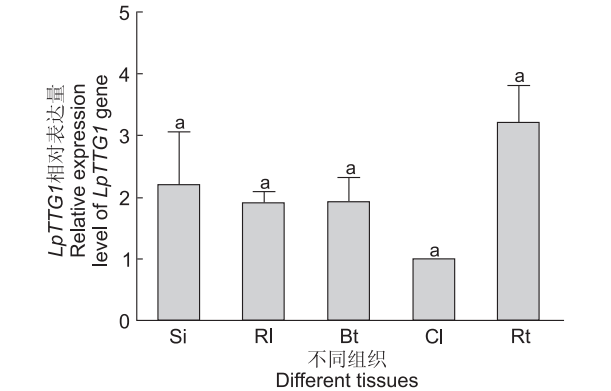


At: 拟南芥; Bn: 油菜; Lp: 抱茎独行菜; Con: 氨基酸保守序列; 方框 I, II, III, IV: WD40 基序。
At: *Arabidopsis thaliana*; Bn: *Brassica napus*; Lp: *Lepidium perfoliatum*; Con: Conservative sequence of amino acids; Sequences in the boxes marked with I, II, III, IV indicate WD40 motifs.

图 1 3 种十字花科植物 *TTG1* 氨基酸序列多重比对结果
Fig. 1 Multiple alignment of *TTG1* amino acid sequences from three Cruciferae species

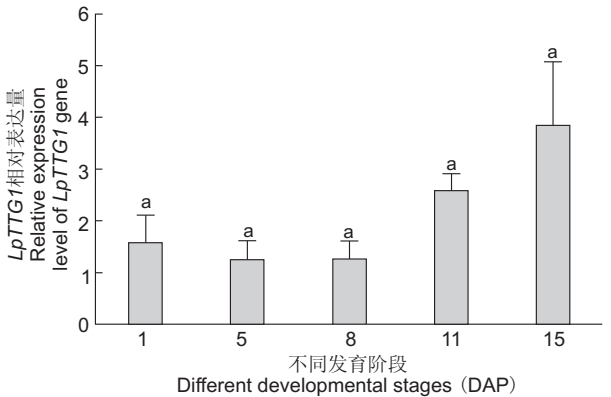
表 1 LpTTG1 蛋白结构域、重复序列、基序及其特性预测
Table 1 Confidently predicted domains, repeats, motifs and features of protein LpTTG1

名称 Name	开始 Begin	结束 End	期望值 E-value
WD40 motif I	From 66	To 111	3.42e + 01
WD40 motif II	From 118	To 163	4.48e - 02
WD40 motif III	From 166	To 204	1.52e - 04
WD40 motif IV	From 255	To 295	1.66e - 05



Si: 角果; RI: 莲座叶; Bt: 薹; CI: 抱茎叶; Rt: 根。以 β -actin 为内参计算相对表达水平, 误差线表示 3 次重复平均值的标准误差, 相同小写字母表示在 $P = 0.05$ 水平上差异不显著。
Si: Silicle; RI: Rosette leaf; Bt: Bolt; CI: Clasp leaf; Rt: Root. The expression fold is given relative to β -actin. The error bars represent the standard deviation of the mean ($n=3$). The same lowercase letter on the bars indicates no significant difference among different tissues at $P = 0.05$ level.

图 2 qRT-PCR 分析抱茎独行菜不同组织 LpTTG1 的表达
Fig. 2 qRT-PCR analysis of the expression of LpTTG1 in different tissues of *Lepidium perfoliatum*



以 β -actin 为内参计算相对表达水平, 误差线表示 3 次重复平均值的标准误差, 相同小写字母表示在 $P = 0.05$ 水平上差异不显著。
The expression fold is given relative to β -actin. The error bars represent the standard deviation of the mean ($n=3$). The same lowercase letter on the bars indicates no significant difference among different tissues at $P = 0.05$ level.

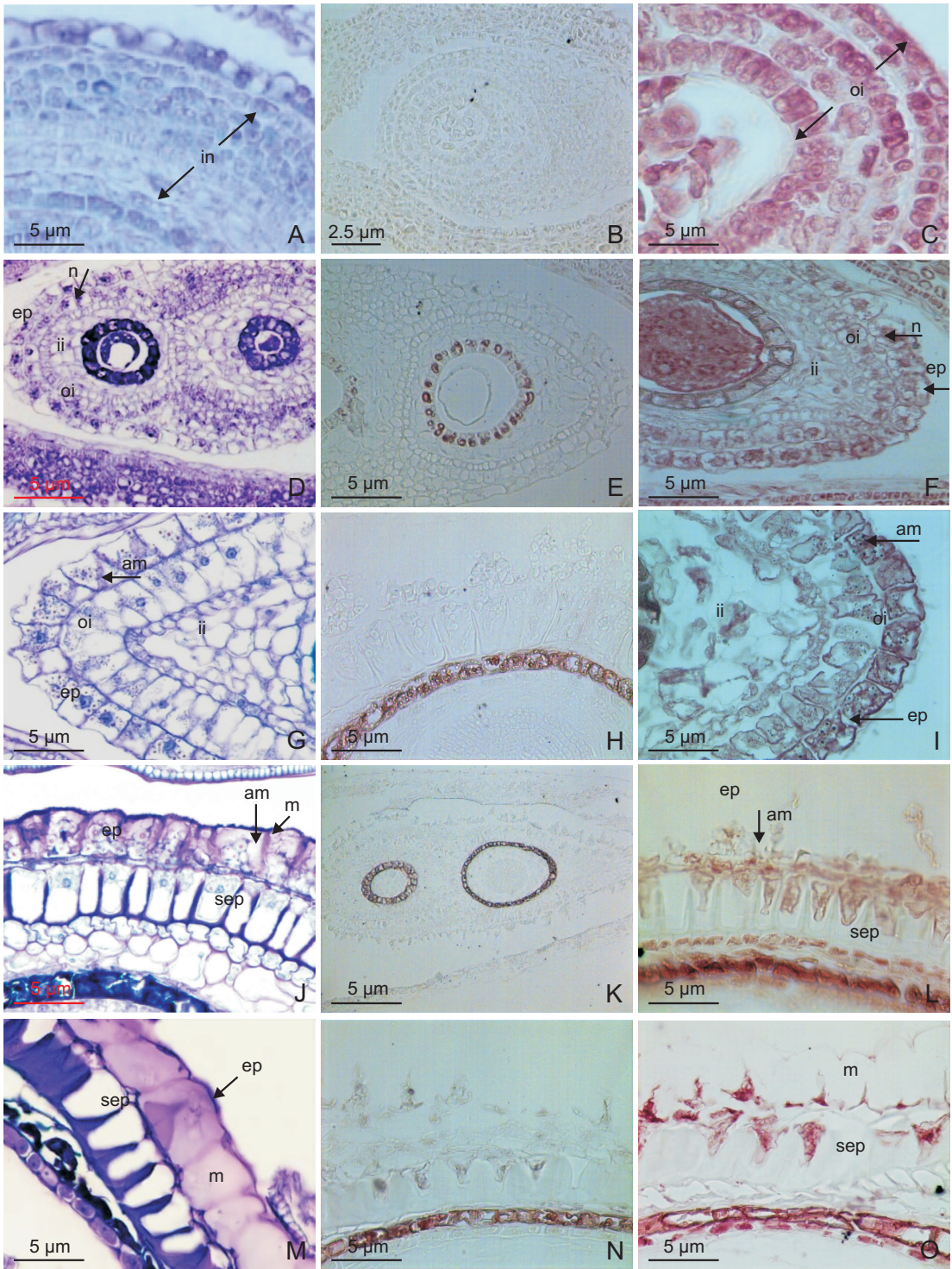
图 3 qRT-PCR 分析抱茎独行菜不同发育阶段角果中 LpTTG1 的表达
Fig. 3 qRT-PCR analysis of the expression of LpTTG1 in different development stages of *Lepidium perfoliatum* silicle

甲苯胺蓝染色部位, 可将抱茎独行菜粘液质的形成及种皮分化过程分为 4 个阶段: 首先, 在种皮发育早期(0 ~ 4 DAP), 表层细胞均含有细胞核、中央大液泡及被挤压到边缘的细胞质; 其次, 在 5 ~ 7 DAP 阶段, 表皮细胞开始产生粘液质但仍存在造粉体; 第三, 在 8 ~ 12 DAP 阶段, 表皮细胞中的造粉体和内物逐渐消失; 最后的 13 ~ 18 DAP 阶段, 表皮细胞变成匀质的粘液细胞, 此时种子完全成熟。

免疫组织化学定位分析结果显示, 在刚结束授粉的成熟胚珠阶段, 各层珠被细胞形态大小一致(图 4: A), 与空白血清作为阴性对照的染色结果相比(图 4: B), LpTTG1 在各层珠被细胞中均有表达, 且表达量一致(图 4: C)。随后, 两层外珠被细胞开始分化并产生造粉体(图 4: D), 和空白对照相比(图 4: E), LpTTG1 在内外珠被各层细胞和胚中均有表达, 在外珠被表皮细胞中的表达量最高, 且集中在细胞核周围(图 4: F)。外珠被两层细胞的造粉体继续积累(图 4: G), 与空白对照相比(图 4: H), LpTTG1 仍在外珠被表皮细胞中围绕细胞核高表达(图 4: I)。授粉后 8 ~ 15 d 的角果, 外珠被表皮细胞产生粘液质, 造粉体退化、减少并呈锥状堆积, 内珠被退化、层数减少(图 4: J), 与空白对照相比(图 4: K), LpTTG1 在内外珠被各层细胞和胚中都有表达; 在珠被(种皮)各层细胞中, LpTTG1 在外珠被两层细胞中的表达量有所下降, 内珠被最外层细胞中表达量突然增高(图 4: L)。随后, 外珠被表皮细胞产生大量的粘液质, 造粉体退化、减少, 几乎完全消失, 内珠被只剩下细胞质浓厚的栅栏层(图 4: M), 和空白对照相比(图 4: N), LpTTG1 在胚中仍有表达, 但在种皮细胞中的表达量已显著降低(图 4: O)。最后, 在成熟种子的外种皮中 LpTTG1 的表达量降至最低。

2.3 抱茎独行菜 LpTTG1 基因的功能分析

为探究 LpTTG1 在抱茎独行菜种皮分化及粘液质形成中的作用, 构建了植物表达载体 pCAM-BIA1301-LpTTG1 并转化拟南芥。提取转基因拟南芥 T₁ 代植株的基因组 DNA, 并以抱茎独行菜 TTG1 cDNA 的特异性引物(选择抱茎独行菜和拟南芥 TTG1 cDNA 序列中差异最大的区段分别设计



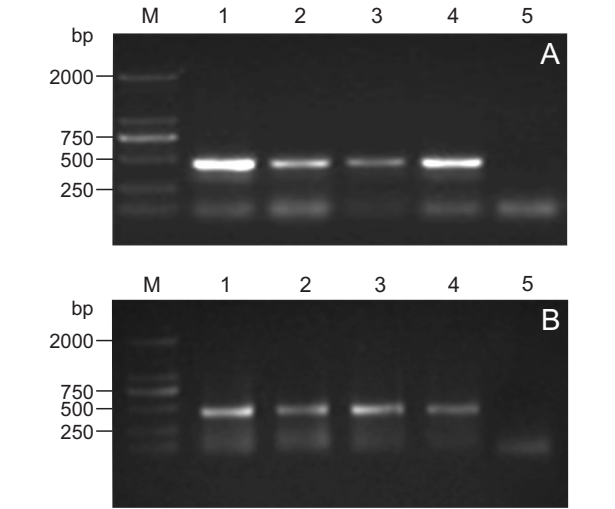
图片示抱茎独行菜种子横切面。A、D、G、J、M：用甲苯胺蓝染色作为对照；B、E、H、K、N：用空白血清作为阴性对照；C、F、I、L、O：与抗 LpTTG1 血清相互作用的样本；in：珠被；ii：内珠被；oi：外珠被；ep：表皮；sep：亚表皮；n：细胞核；am：造粉体；m：粘液质。

All pictures are transverse sections of *Lepidium perfoliatum* seeds. A、D、G、J、M are control with armour aniline blue staining; B、E、H、K、N are negative control with blank serum; C、F、I、L、O are samples with anti-LpTTG1 serum; in: Integument; ii: Inner integument; oi: Outer integument; ep: Epidermis; sep: Subepidermal; n: Nucleus; am: Amyloplasts; m: Mucilage.

图 4 抱茎独行菜 LpTTG1 在种皮各发育阶段的免疫组织化学定位

Fig. 4 Immunohistochemical localization of LpTTG1 in the developmental process of seed coat in *Lepidium perfoliatum*

上、下游引物，并确认只能扩增出各自的相应片段)进行 PCR 扩增，结果显示，在预期位置扩增出了目的条带(图 5: A, 460 bp)。挑选 PCR 阳性植株提取总 RNA，以抱茎独行菜 *TTG1* cDNA 特异性引物进行 RT-PCR 扩增，检测外源基因在拟南芥中的表达(图 5: B)，确认获得了转基因株系。



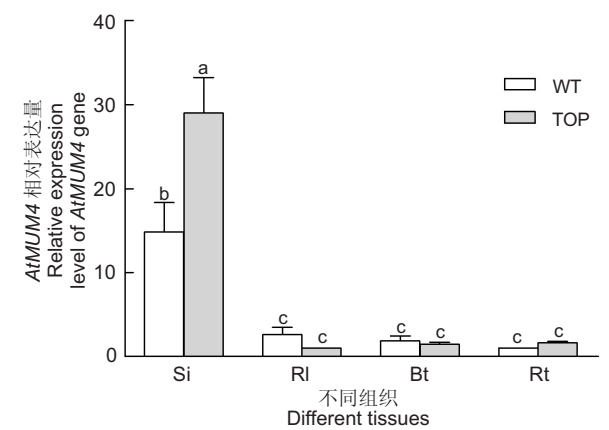
M: DNA marker DL2000; 1 ~ 4: 转基因植株; 5: 野生型植株。
M: DNA marker DL2000; 1 ~ 4: Transgenic plants. 5: Wild type plant.

图 5 *LpTTG1* 转基因植株基因组 PCR(A) 和 RT-PCR(B) 检测

Fig. 5 Genomic DNA PCR (A) and RT-PCR (B) of *LpTTG1* transgenic plants

为探究 *LpTTG1* 过量表达对粘液质合成途径中其它相关基因的影响，分析了野生型 (WT) 和 *TTG1* 过表达拟南芥植株 (TOP) 不同组织 (根、茎、叶、角果) 中 *TTG1* 下游基因 *AtMUM4* 的表达变化。qRT-PCR 结果显示，*LpTTG1* 在拟南芥中过量表达显著增强了角果中 *AtMUM4* 的表达(图 6, $P < 0.05$)，表明该基因在转基因株系中表达且参与角果发育过程相关事件。

为进一步明确 *TTG1* 基因在种皮分化及粘液质沉积中的作用，观察了拟南芥野生型、*ttg1* 突变体及 *TTG1* 过表达株系种子形态及粘液质释放过程。结果显示，*ttg1* 突变体种子花青素合成能力下降(图 7: A1)且几乎不分泌粘液质(图 7: A2, A3); 而过表达株系与野生型种子表皮细胞的形态、粘液质的释放方式及数量等均无显著差异(图 7: I, II, III)。



Si: 角果; RI: 莲座叶; Bt: 茎; Rt: 根。WT: 野生型; TOP: *TTG1* 过表达植株。以 β -actin 为内参计算相对表达水平，误差线表示平均值的标准误差，不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。
Si: Siliques; RI: Rosette leaf; Bt: Bolt; Rt: Root. WT: Wild type; TOP: *TTG1* overexpression plant. The expression fold is given relative to β -actin. The error bars represent the standard deviation of the mean ($n = 3$). The different lowercase letter on the bars indicates significant difference among different tissues at $P < 0.05$ level.

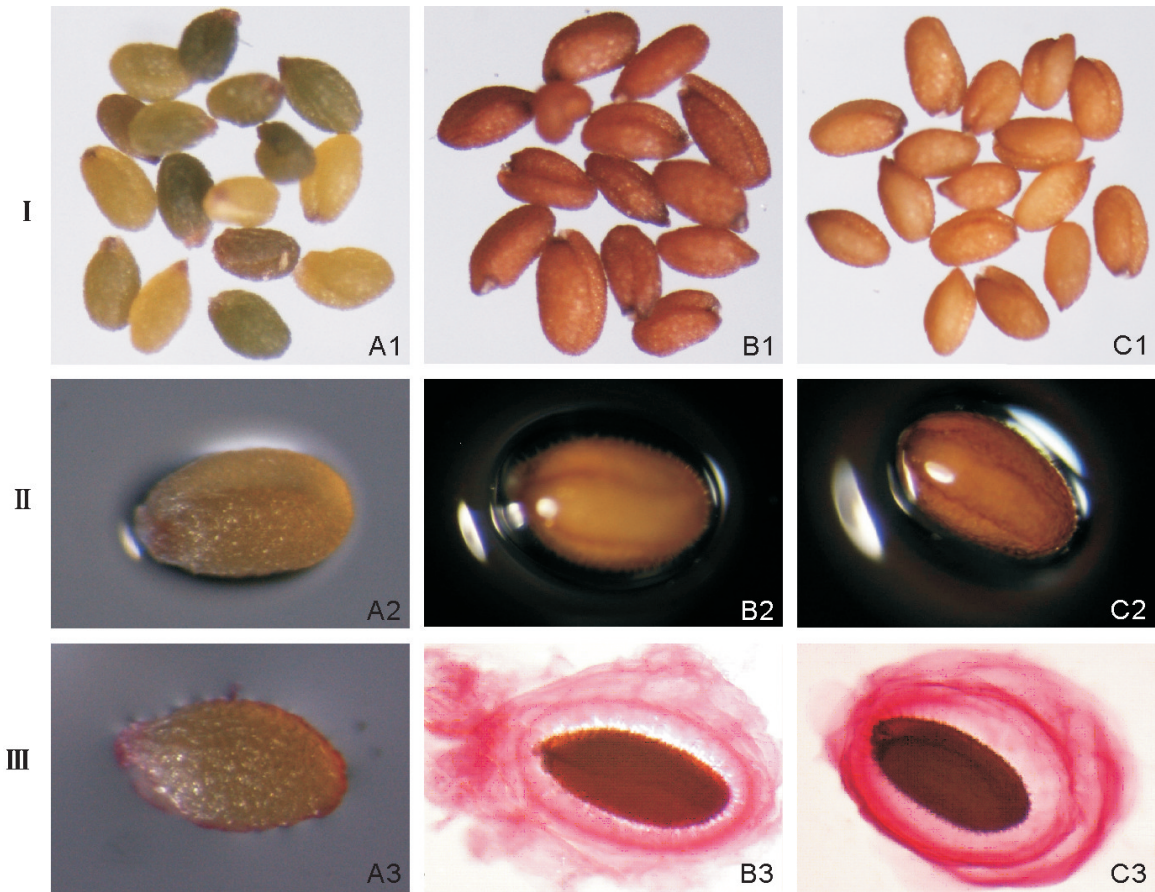
图 6 qRT-PCR 分析野生型和 *LpTTG1* 转基因拟南芥植株 *AtMUM4* 基因表达

Fig. 6 qRT-PCR analysis of expression of *AtMUM4* in *LpTTG1* transgenic and WT plants of *Arabidopsis thaliana*

3 讨论

本实验通过同源克隆得到了抱茎独行菜种皮粘液质调控基因 *TTG1* 的 cDNA 序列，并对其进行了初步的功能鉴定。*LpTTG1* 基因 ORF 序列及氨基酸序列的多重比对结果显示，*LpTTG1*、拟南芥 *AtTTG1* 和油菜 *BnTTG1* 基因具有较高同源性，且不同 *TTG1* 基因编码的 WD40 蛋白拥有共同基序。qRT-PCR 和免疫定位分析显示，*LpTTG1* 与抱茎独行菜角果发育、种皮分化及粘液质合成相关。该基因过量表达增加了转基因拟南芥粘液质调控途径下游基因 *AtMUM4* 的转录水平，但对种子形态及粘液质分泌与释放方式无显著影响。

有研究表明，拟南芥粘液质的合成与分泌是一个复杂过程，涉及许多调控因子和相关功能基因，*AtTTG1* 就是位于该调控网络上游的一个调控基因^[9,33]。*AtTTG1* 含有 4 个 WD 序列，形成功能性 β -螺旋折叠结构最少需要 4 个 WD 重复序列 (也称 Trp-Asp 或 WD40 基序，通常由大约 40 个氨基酸残基构成，存在保守的 GH 和 WD 序列)^[34]。WD 重复序列蛋白由一个很大的基因家族编码，在拟南



A1, A2, A3: *ttg1* 突变体种子; B1, B2, B3: 野生型种子; C1, C2, C3: *TTG1* 过表达植株种子。
A1, A2, A3: Seeds of *ttg1* mutant; B1, B2, B3: Seeds of WT; C1, C2, C3: Seeds of *TTG1* overexpression plant.

图 7 *LpTTG1* 过表达植株、*ttg1* 突变体和野生型拟南芥种子的形态 (I)、水合作用 (II) 和钉红染色 (III) 结果
Fig. 7 Morphology of intact dry seed (I), and seeds after hydration (II) and ruthenium red staining (III) of *LpTTG1* overexpression plant, *ttg1* mutant and WT, respectively, in *Arabidopsis thaliana*

芥中已鉴定出 59 种^[34,35]。到目前为止，推测所有 WD 蛋白在一系列细胞事件中均具有调控作用^[35]。本研究结果显示，*LpTTG1* 与拟南芥氨基酸序列具有高度同源性，也具有 4 个 WD 重复序列，推测抱茎独行菜 *TTG1* 蛋白与拟南芥 *TTG1* 蛋白具有相似的多重生物学功能。

AtTTG1 在各器官均有表达，调控多种性状，如表皮毛与根毛发生、种子花青素合成、种皮发育及粘液质的形成与释放等^[11,36-38]。本实验发现抱茎独行菜 *TTG1* 基因能在不同组织中表达且转录水平无显著差异，这可能暗示了该基因功能的多样性^[27]。此外，qRT-PCR 结果显示 *LpTTG1* 基因的 mRNA 在角果中逐渐积累，表明该基因可能在角

果和种子成熟过程中发挥作用。拟南芥 *TTG1* 基因负责调控种皮发育和粘液质合成^[33]。*LpTTG1* 免疫组织化学分析揭示了该蛋白的变化趋势，即：早期在内珠被和外珠被细胞均有表达，随后外珠被细胞内的表达增强，最后只在表皮和亚表皮细胞之间表达，表达模式与种皮分化和粘液质合成相一致。然而在种子发育中后期，*LpTTG1* 蛋白表达量降低，这与角果发育中 *LpTTG1* 的 qRT-PCR 结果不相符。我们在研究过程中注意到，抱茎独行菜种子表皮和亚表皮细胞是独特的细胞类型，在发育后期会演变成无生命的细胞层，从而导致其中的标记强度变弱。除了种子本身，角果其它组织和细胞都会进入正常的后期发育，*LpTTG1* 蛋白将会影响这些

组织细胞的花青素合成等^[36-38]。

AtMUM4 编码一种 NDP-L-鼠李糖合成酶基因, 调节拟南芥种皮的分化及粘液质合成, 是转录因子 *TTG1* 级联途径下游的靶基因。本研究通过构建过表达 *LpTTG1* 转基因拟南芥植株, 分析了该基因的表达情况, 结果显示, *AtMUM4* 在野生型和转基因株系角果中表达量最高(与其它组织相比), 而且 *LpTTG1* 在拟南芥中的过量表达显著增强了角果中 *AtMUM4* 基因的表达, 显示 *LpTTG1* 在拟南芥中获得了表达, 并促进了下游基因 *MUM4* 的表达增强, 由此参与了粘液质合成途径的调控。

本实验中拟南芥野生型及 *LpTTG1* 过表达转基因株系的种子形态及粘液质释放方式无显著差异, 原因可能是拟南芥粘液质的合成与分泌过程较为复杂, 受众多功能冗余的基因共同调控, 因此只增加种皮发育过程中某一基因的转录水平并不会引起明显的表型变化。先前类似的研究显示, 过表达 *AtTTG1* 的拟南芥并未出现多余毛状体的发育^[39]。以上结果也可能是由于粘液质合成所需的其它底物(例如 UDP-半乳糖醛酸)供应不足, 而该底物的合成不受 *LpTTG1* 上调表达影响。

本研究结果揭示抱茎独行菜 *TTG1* 基因可能与拟南芥 *TTG1* 基因具有相似的功能, 因为 *LpTTG1* 与抱茎独行菜角果发育、种皮分化及粘液质的合成密切相关; 此外, 该基因明显激活了转基因拟南芥角果中粘液质调控基因 *AtMUM4* 的表达。为了深入解析抱茎独行菜 *TTG1* 在种子发育和粘液质合成中的作用, 还需开展功能互补实验, 将 *LpTTG1* 转化到 *ttg1* 突变体中进一步验证该基因的功能。

参考文献:

- [1] Gutterman Y, Shem-Tov S. Structure and function of mucilaginous seed coats of *Plantago coronopus* inhabiting the Negev Desert of Israel[J]. *Isr J Plant Sci*, 1996, 44(2): 125-133.
- [2] Western TL, Skinner DJ, Haughn GW. Differentiation of mucilage secretory cells of *Arabidopsis* seed coat[J]. *Plant Physiol*, 2000, 122(2): 345-356.
- [3] 马君玲, 刘志民. 粘液繁殖体及其生态功能[J]. 生态学杂志, 2006, 25(11): 1400-1404.
- [4] Beeckman T, De Rycke R, Viane R, Inze D. Histological study of seed coat development in *Arabidopsis thaliana*[J]. *J Plant Res*, 2000, 113(2): 139-148.
- [5] Young JA, Evans RA. Mucilaginous seed coats[J]. *Weed Sci*, 1973, 21: 52-54.
- [6] Windsor JB, Symonds VV, Mendenhall J, Lloyd AL. *Arabidopsis* seed coat development: morphological differentiation of the outer integument[J]. *Plant J*, 2000, 22(6): 483-493.
- [7] Huang Z, Boubriak I, Osborne DJ, Dong M, Gutterman Y. Possible role of pectin-containing mucilage and dew in repairing embryo DNA of seeds adapted to desert conditions[J]. *Ann Bot-London*, 2008, 101(2): 277-283.
- [8] Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K. The WD repeated: a common architecture for diverse functions[J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24(5): 181-185.
- [9] Penfield S, Meissner RC, Shoue DA, Carpita NC, Bevan MW. MYB61 is required for mucilage deposition and extrusion in the *Arabidopsis* seed coat[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(12): 2777-2791.
- [10] Western TL, Burn J, Tan WL, Skinner DJ. Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(3): 998-1011.
- [11] Western TL, Young DS, Dean GH. *MUCILAGE-MODIFIED4* encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by *APETALA2*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*, and *GLABRA2* in the *Arabidopsis* seed coat[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(1): 296-306.
- [12] Usadel B, Kuschinsky AM, Rosso MG. *RHM2* is involved in mucilage pectin synthesis and is required for the development of the seed coat in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(1): 286-295.
- [13] Willats WG, McCartney L, Knox JP. *In-situ* analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Planta*, 2001, 213(1): 37-44.
- [14] Dean G, Zheng H, Tewari J. The *Arabidopsis* *MUM2* gene encodes a β -galactosidase required for the production of seed coat mucilage with correct hydration properties[J]. *Plant Cell*, 2007, 19

- (12): 4007–4021.
- [15] Macquet A, Ralet MC, Loudet O. A naturally occurring mutation in an *Arabidopsis* accession affects a β -D-galactosidase that increases the hydrophilic potential of rhamnogalacturonan I in seed mucilage[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(12): 3990–4006.
- [16] Macquet A, Ralet MC, Kronenberger J. *In-situ*, chemical and macromolecular study of the composition of *Arabidopsis thaliana* seed coat mucilage[J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(7): 984–999.
- [17] Somerville C, Bauer S, Brininstool G. Toward a systems approach to understanding plant cell walls[J]. *Science*, 2004, 306(5705): 2206–2211.
- [18] Guimil S. and Dunand C. Patterning of *Arabidopsis* epidermal cells: Epigenetic factors regulate the complex epidermal cell fate pathway[J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(12): 601–609.
- [19] Oka T, Nemoto T, Jigami Y. Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* RHM2/MUM4, a multidomain protein involved in UDP-D-glucose to UDP-L-rhamnose conversion[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(8): 5389–5403.
- [20] Jofuku KD, den Boer BGW, Montagu MV, Okamura JK. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *APETALA2* [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(9): 1211–1225.
- [21] Koornneef M. The complex syndrome of *ttg* mutants[J]. *Arabidopsis Inf Serv*, 1981, 18: 45–51.
- [22] Johnson CS, Kolevski B, Smyth DR. *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(6): 1359–1375.
- [23] Rerie WG, Feldmann KA, Marks DM. The *GLABRA2* gene encodes a homeo-domain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*[J]. *Gene Dev*, 1994, 8(12): 1388–1399.
- [24] Baudry A, Caboche M, Lepiniec L. *TT8* controls its own expression in a feedback regulation involving *TTG1* and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*, 2006, 46(5): 768–779.
- [25] Nesi N, Debeaujon I, Jond C, Pelletier G, Caboche M, Lepiniec L. The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis siliques*[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(10): 1863–1878.
- [26] Ramsay NA, Glover BJ. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(2): 63–70.
- [27] Galway ME, Masucci JD, Lloyd AM, Walbot V, Davis RW, Schiefelbein JW. The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root [J]. *Dev Biol*, 1994, 166(2): 740–754.
- [28] Walker AR, Davison PA, Bolognesi Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks DM, Gray JC. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein[J]. *Plant Cell*, 1999, 11(7): 1337–1349.
- [29] Masucci JD, Rerie WG, Foreman DR, Zhang M, Galway ME, Marks MD, Schiefelbein JW. The homeobox gene *GLABRA2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 1996, 122(4): 1253–1260.
- [30] Gonzalez A, Mendenhall J, Huo YJ, Lloyd A. *TTG1* complex MYBs, MYB5 and TT2, control outer seed coat differentiation[J]. *Dev Biol*, 2009, 32(5): 412–421.
- [31] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743.
- [32] Lu J, Li JN, Lei B, Wang SG, Chai YR. Molecular cloning and characterization of two *Brassica napus* *TTG1* genes reveal genus-specific nucleotide preference, extreme protein-level conservation and fast divergence of organ-specificity[J]. *Genes Genom*, 2009, 31(2): 129–142.
- [33] Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne CT, Lloyd A. A network of redundant bHLH proteins functions in all *TTG1*-dependent pathways of *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2003, 130(20): 4859–4869.
- [34] Yu LH, Gaitatzes C, Neer E, Smith TF. Thirty-plus functional families from a single motif[J]. *Protein Sci*, 2000, 9(12): 2470–2476.

- [35] Li D, Roberts R. WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(14): 2085–2097.
- [36] Larkin JC, Oppenheimer DG, Lloyd A, Paparozzi ET, Marks MD. The roles of *GLABROUS1* and *TRANSPARENT TESTA GLABRA* genes in *Arabidopsis* trichome development [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(8): 1065–1076.
- [37] Li SF, Milliken ON, Pham H, Seyit R, Napoli R, Preston J, Koltunow AM, Parish RW. The *Arabidopsis* MYB5 transcription factor regulates mucilage synthesis, seed coat development, and trichome morphogenesis [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 72–89.
- [38] Szymanski DB, Jilk RA, Pollock SM, Marks MD. Control of *GL2* expression in *Arabidopsis* leaves and trichomes [J]. *Development*, 1998, 125(7): 1161–1171.
- [39] Payne T, Zhang F, Lloyd AM. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1* [J]. *Genetics*, 2000, 156(3): 1349–1362.

(责任编辑: 刘艳玲)

欢迎订阅 2015 年《植物科学学报》

双月刊 大 16 开本 国内定价 50 元 全年 300 元

邮发代号 38-103(国内) BM872(国外)

刊号 CN 42-1817/Q ISSN 2095-0837

《植物科学学报》是中国科学院主管、中科院武汉植物园主办、科学出版社出版、国内外公开发行的植物学综合性学术期刊, 主要刊载植物学及各分支学科的原始研究论文。

栏目设置: 特邀综述、系统与进化、生态与生物地理、遗传与育种、生理与发育、资源与植物化学、技术与方法、研究快报、学术讨论、重要书刊评介和学术动态等。

读者对象: 科研院所和高等院校从事植物科学研究的科研人员、教师和研究生, 以及相关学科、交叉学科的科技工作者。

《植物科学学报》为中国自然科学核心期刊, 已被中国科学引文数据库核心库、《中文核心期刊要目总览》、中国科技论文与引文数据库、中国生物学文献数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知识资源总库《中国科技期刊精品数据库》、中国期刊全文数据库、《中国药学文摘》、美国《化学文摘》、美国《生物学文摘》、美国《剑桥科学文摘: 自然科学》、俄罗斯《文摘杂志》、日本《科学技术文献速报》、英国《国际农业与生物科学研究中心》文摘、波兰《哥白尼索引》、万方数据——数字化期刊群、中国学术期刊(光盘版)等二十多种国内外检索期刊、数据库作为核心期刊或统计源期刊收录。本刊曾相继获全国优秀科技期刊奖、中国科学院优秀期刊奖、湖北省优秀期刊奖。

本刊已开通了网站和远程稿件管理系统(<http://www.plantscience.cn>), 目前本刊所有过刊及现刊已全部上网, 欢迎广大新老作者和读者在线投稿、查询下载使用过刊, 继续关注和支持本刊。

订阅方式: ①全国各地邮局均可订阅(邮发代号: 38-103); ②直接与本刊编辑部联系订阅(免收邮挂费)。

通讯地址: 武汉市武昌磨山 中科院武汉植物园内《植物科学学报》编辑部, 邮编: 430074

电话: 027-87510755, 027-87510579; QQ: 424353337

E-mail: editor@wbpcas.cn; zwkxbjb@wbpcas.cn;

<http://www.plantscience.cn>

欢迎赐稿, 欢迎订阅, 欢迎刊登广告