

大白菜包叶特异基因的克隆及其结构特征和表达方式^{*1)}

余旭红 彭洁松 冯献忠 郑志仁 杨素欣 唐向荣
沈瑞娟 刘平林 何玉科^{**}

(中国科学院上海植物生理研究所植物分子遗传国家重点开放实验室, 上海 200032)

摘要 大白菜营养生长经历幼苗期、莲座期、包心期和结球期 4 个生育时期, 每个时期分别以幼叶、莲座叶、包叶和球叶为主要形态标志. 构建了大白菜包心早期茎尖组织特异的 cDNA 文库, 分别与莲座叶和包叶 cDNA 两个探针进行差异杂交, 筛选出一个全长的 cDNA 克隆 *BcpLH*. DNA 序列和推导氨基酸序列同源性比较表明, 该基因编码的蛋白质含有两个双链 RNA 结合结构域(dsRNA-binding domains), 与人和小鼠 dsRNA 结合蛋白基因 *TRBP* 具有较高的同源区域. PCR 表达分析的结果表明, *BcpLH* 基因主要在包心期的包叶组织中表达. 在包心期用 IAA 涂抹植株显著增加了包叶中 *BcpLH* 基因的转录产物. 据此认为, *BcpLH* 基因与包叶的发生和叶球的形成有关, 它的表达受生长素的诱导调节.

关键词 大白菜 基因表达 RNA 结合蛋白 生长素 叶球

大白菜(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) 属于芸苔属植物, 在中国和远东地区是主要的蔬菜作物. 栽培条件下, 大白菜的营养生长周期比较长, 可分为 4 个发育时期: 幼苗期、莲座期、包心期和结球期. 每个发育时期都具有明显的形态标志, 其中叶片的形态特征最为明显^[1]. 幼苗期主要是幼叶的分化和生长, 莲座期主要进行莲座叶的扩张生长, 包心期分化包叶, 而结球期则表现为球叶的分化和扩张生长. 幼叶、莲座叶、包叶和球叶是 4 种不同类型的叶子, 在形状、大小、颜色和生理功能上有所不同. 其中, 包叶的形态发生标志着莲座期的结束和叶球发生的开始, 它在包心期呈现内向弯曲生长, 在结球期呈现半抱合的状态, 分布在叶球周围. 当然, 不同发育时期之间并没有严格的界限, 每一类叶子的数目和形态随着品种和环境条件的变化都有所不同^[2].

叶球由轮生的叶片相互抱合而成, 是一种典型的食用变态器官. 已经知道, 许多因素影响大白菜叶球的发生和发育进程. 生长素在叶片内的不平衡分布、较低的温度和较大的昼夜温差、弱光和短日照, 以及充足的碳素营养都可以促进叶球的发生和发育^[2]. 不难看出, 叶球

1999-05-18 收稿, 1999-12-15 收修改稿

^{*} 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39870450)

^{**} 联系人(E-mail: heyk@iris.sipp.ac.cn)

1) 本文所报道的基因序列在 DDBJ/EMBL/GenBank 数据库中的登录号为 Y16954

的发生是一个复杂的生物学过程, 是环境因子诱导下的形态学反应. 在此过程中, 基因的表达和调控是植物接受外界信号和展开发育活动的关键环节. 长期以来, 我们对叶球发育过程中基因的调控作用知之甚少, 这在很大程度上妨碍了我们对叶球形态发生过程的深入了解, 使许多生理实验的结果无法得到正确的解释和证实. 要清晰地了解叶球分化和发育的生理机制, 就必须首先分离与之相关的基因, 明确其结构特征和表达方式, 只有这样, 才能研究激素和环境因子引起基因表达的生物化学反应链, 建立环境-基因-形态三者的相互关系, 了解叶球和其他植物器官发生的复杂机理. 正因为如此, 我们从 1993 年起就致力于叶球相关基因的分离与克隆, 试图得到控制叶球分化和发育的有关基因, 为人们研究和利用基因工程调控叶球发育进程, 培育高产优质品种提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 植物材料

所选大白菜品种为自交系 Da1-12. 该自交系为早熟品种, 其植株生长和叶球发育对温度和光照等条件比较敏感. 该自交系的种子经仔细挑选后按上海地区正常播种期(1994 年 8 月 20 日)播种在中国科学院上海植物生理研究所实验农场内, 经 30 d 的育苗后移栽到大田. 于 10 月 13 日待植株生长到 12~14 展开叶, 即刚刚进入包心早期时, 从一部分植株上切取 5 mm 长的茎尖 (带有 5~8 片未展开叶), 从另一部分植株上切取长度为 5 mm 以下的未展开叶. 所取茎尖样品在液氮中速冻保存, 用于提取和分离 mRNA 和构建 cDNA 文库. 在此之前, 于 10 月 5 日待植株生长到 8~10 片展开叶时, 即开始进入莲座早期时, 切取长度为 5 mm 以下的未展开叶, 连同包心早期的未展开叶在液氮中速冻保存, 分别用于提取 mRNA 和同位素标记探针.

1.2 cDNA 文库构建和差异杂交

用酚-SDS 抽提和氯化锂沉淀的方法从植物材料中提取总 RNA, 经 Oligo(dT)纤维柱富集 poly(A) RNA, 采用 Universal RiboClone cDNA Synthesis System (Promega) 合成 cDNA. 将 cDNA 与 *EcoR* I adaptor 连接, 插入到 LamdaGEM-2 载体中, 用 Packagene Lamda DNA Packaging System (Promega) 包装.

在大白菜莲座早期和包心早期, 用异硫氰酸胍法分别从未展开叶中提取总 RNA^[3], 在寡核苷酸随机引物的作用下以 ³²P-dCTP 为同位素标记物, 合成与单链 RNA 互补的总 cDNA 探针. 从茎尖组织特异的 cDNA 文库中制备两套重复拷贝, 转移在硝酸纤维素滤膜上, 然后在 42 °C 预杂交 4 h. 预杂交缓冲液含有 25% 甲酰胺, 100 µg/mL 变性的鲑精 DNA, 10 µg/mL 酵母 RNA, 5 × Denhardt 试剂, 50 mmol/L 磷酸钠 (pH 6.5), 5 × SSC 和 0.2% SDS. 在预杂交缓冲液内分别加入莲座早期和包心早期叶片的 cDNA 探针, 与 cDNA 文库杂交 20 h. 在室温下用漂洗缓冲液 (0.05 mol/L NaH₂PO₄, 0.05 mol/L Na₂HPO₄, 5 × SSC 和 25% 甲酰胺) 漂洗杂交膜, 然后在 42 °C 下用 2 × SSC/0.02% SDS 继续漂洗. 滤膜烘干后加增感屏对 X 射线片曝光. 挑选差异性噬斑, 在降低噬斑密度的情况下再次筛选, 确定那些与包心期 cDNA 杂交而与莲座期 cDNA 不能杂交的噬斑作为候选克隆. 以 T7 和 SP6 引物为引物, 用 PCR 扩增所选克隆的 cDNA 插入片段, 其 PCR 产物克隆在 pBluescript KS⁺ 质粒上.

1.3 DNA序列分析

用外切核酸酶Ⅲ和 S1 核酸酶创造 *BcpLH* 基因 cDNA 片段的嵌套缺失突变体.质粒 DNA 在碱解后用 Sanger 方法人工测序,其序列通过测序仪二次测序得到验证.借助 Blast 软件进行同源性分析,ProDom 软件搜索特异结构域.

1.4 PCR 表达分析

在大白菜不同发育时期的植株上切取根、茎和叶等组织,以同样方法提取总 RNA.用 Oligo(dT)_{12~18} 作引物,经反转录合成 cDNA 第 1 条链.通过浓缩或稀释的办法使各组总 RNA 的含量相等,以保证各样品中 *BcpLH* 基因的转录产物有可比性.根据 *BcpLH* 基因的 cDNA 序列,合成一对引物: 5' -AATGAAGTTTCCTCTGGT-3' (正义)和 5' -ACAGCTATGCTTGCTTGC- 3' (反义).以不同植物器官来源的 cDNA 组分作模板进行 RT-PCR.在 PCR 扩增前,注意在每个反应混合液中加入等量的 cDNA 样品、引物和其他 PCR 试剂.为消除反应误差,实验采用两种对照,一种是各植物材料的总 RNA,另一种是 *BcpLH* 基因的 cDNA(阳性对照).每个 PCR 的反应体积为 50 μ L,包括 1.25 mmol/L MgCl₂, 20 pmol 引物,3 单位 *Taq* DNA 聚合酶.反应共进行 40 个循环,每循环包括 1 min 变性(94℃),2 min 退火(58℃)和 2.5 min 延伸(72℃).

PCR 扩增后,在琼脂糖凝胶上进行电泳,每个泳道上样 20 μ L.不同大小的 DNA 片段转移到硝酸纤维素滤膜上,与前述的 *BcpLH* 基因的 cDNA 探针进行 Southern 杂交.杂交膜进行自显影和照相.

2 结果

2.1 *BcpLH* 基因的 cDNA 克隆

根据大白菜不同生长发育阶段生长点的动态变化,确定 12~14 片展开叶为莲座期转向包心期的形态标志,因为在此阶段后植株分化的叶子具有了包叶的特征.为此,我们选择这一发育时期的茎尖组织,从中提取和分离 mRNA,经反转录合成 cDNA,在此基础上构建了包心早期茎尖特异的 cDNA 文库.文库的滴度达到了 5.4×10^5 pfu.与此同时,从未展开的莲座叶和包叶中提取 mRNA,经反转录后标记成莲座期 cDNA 探针和包心期 cDNA 探针,分别用两个探针与 cDNA 文库进行差异杂交,结果筛选出了 9 个差异性克隆,经复筛后得到 3 个克隆.这 3 个克隆与包叶 cDNA 探针有明显杂交信号,而与莲座叶 cDNA 探针无杂交信号.以这 3 个克隆的噬菌体 DNA 为模板,进行预期的 cDNA 插入片段的 PCR 扩增,结果出现了 3 个不同长度的 PCR 产物.将该产物克隆在 pBluescript 质粒中,用多种限制性内切酶酶切,建立了 DNA 片段的酶切图谱.Southern 杂交的结果显示,这 3 个 DNA 片段均来源于大白菜包心早期茎尖特异的 cDNA 文库.将其中 1 个长约 1.1 kb 的 DNA 片段作为重点进行序列分析,在序列缺失、亚克隆和测序后发现,该 DNA 的 3' 端含有较长的 poly (A)序列,5' 端呈现 mRNA 典型的帽子结构.据此推断该 DNA 为全长的 cDNA,命名为 *BcpLH* (图 1).将 *BcpLH* 基因 cDNA 序列中的第 1 个 ATG 确定为翻译起始位点,其理由之一是,该翻译起始位点的旁邻序列 ATAATGA 符合真核翻译起始位点的一致性序列(A/G)NNATGg^[4],同时,该 ATG 起始密码子上游第 6 个碱基处有符合可读框的 TGA 终止密码子.

```

1  GTTTCGACTAACATCTTTCTCGCTCATCTCTTCAGCTAACATTCTGCTC
51  TTGAATAATGACGGCGAATGAAGTTTCTCTGGTGTTCGAATTGCTATG
    M T A N E V S S G V S N C Y V 15
101 TGTTCAGAGACCGGTTGCAGGAATATGCTCAGAGATACAAGCTACCAACG
    F K S R L Q E Y A Q R Y K L P T 31
151 CCTCTCTACGAGACTATCAAAGAAGGCCCTCCACAAACCTCTCTTTCA
    P L Y E T I K E G P S H K P L F Q 48
201 GTCTACAGTGATTGTCAATGATGTCAGATACGATTCTTGCTGGATTCT
    S T V I V N D V R Y D S L P G F F 65
251 TCAATCGTAAAGCTGCTGAGCAATCAGCTGCCGAGGTTGCTCTCCAGGAA
    N R K A A E Q S A A E V A L Q E 81
301 TTAGCAAAATCCAGTGACCTAACCAATCTGTTTCACTGCCTGTTTACGA
    L-A K S S D L T Q S V S L P V H E 98
351 GATGGGGCTATGCAAGAATCTTCTCAAGAGTACGCTCAAAAGATGAAC
    M G L C K N L L Q E Y A Q K M N Y 115
401 ACGCGATTCCACTCTATCAGTGCCAAAGGAGCGAGACTCTCGGGAGAGCT
    A I P L Y Q C Q R S E T L G R A 131
451 CCACAGTTCACATGTACTGTGGAGATCGGAGGCATTAAGTACACAGGAGC
    P Q F T C T V E I G G I K Y T G A 148
501 TGCAACAAAGACTAAAAAGAGGCTGAGATAAGCGCTGGGAGAACGGCTC
    A T K T K K E A E I S A G R T A L 165
551 TTATAGCCATCCAGTCAGAATCCAAATGGACCTTGCCAACTACAGC
    I A I Q S E S K M D L A N N Y S 181
601 ACTCAGCTTACTGTATTCTTGGGAGAAGAAGACAGTAGAGGTAGCAAG
    T Q L T V I P C E K K T V E V A S 198
651 TCCGGTGAAAGAAACCATCATCAAGACTCCAAAGCCAGGAGGGCTCAGT
    P V K E T I I K T P K A R R A Q F 215
701 TCAAGAAGAAGGCTCGGAAAGGAAAGCTCAAAGTCGCTAAGGATCTTGAA
    K K K A R K G K L K V A K D L E 231
751 GACAGTACCATCCCTCCTCAACCTACAGAGCATTGTCAAAACCAACAGTT
    D S T I P P Q P T E H C Q N Q Q L 248
801 AAATCTGGAACCTTCTTCGTGCGTGAACGGGTTAAGGAGGCAGCATTG
    N L E P S S C V N G F K E A A F A 265
851 CGAGTGTGGAGACAGAAGCAAGCCAAGCATAGCTGTCTCAAGACGAGGTC
    S V E T E A S Q A * 274
901 TTTGTGAGTGTAGTTATATAGCCATTTGTAAATTTAATTGGTGTGAC
951 ATGTTTGAACGCCATTTTGGTCTTGTGTTAGTTATACAAGATCATTGTTTC
1001 TTTGTTTTTAGTATTAAGATACATGAAGCTGCTTTGGCCTTGAAAAAAA
1051 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 *BcpLH* 基因 cDNA 和推导氨基酸的序列

起始密码子和终止密码子分别用方框和划线表示, 阴影部分代表两个 dsRNA 结合结构域

为了解大白菜基因组中 *BcpLH* 基因的拷贝数, 对基因组 DNA 进行 Southern 杂交. 在高严紧度(杂交温度为 58℃)条件下, *BcpLH* 基因的 cDNA 探针与基因组 *Hind*Ⅲ酶切片段杂交后出现 8.0 和 4.8 kb 两条杂交带, 与 *Eco*R I 酶切片段杂交后出现 5.8 kb 条带, 与 *Bam*H I 酶切片段杂交有 1 个 4.5 kb 杂交带(图 2). 在低严紧度(50℃)条件下, 基因组 3 种内切酶的酶切片段分别出现 5 个以上的杂交带. 这表明, 大白菜中存在多种 *BcpLH* 基因的同源片段, 其编码

的蛋白质也可能含有 RNA 结合结构域. 因此, 还不能确切的认为大白菜基因组仅存在一个拷贝的 *BcpLH* 基因. 一个排除了 RNA 结合结构域的 DNA 片段将用来标记同位素探针, 并在此基础上进行定量的 Southern 杂交.

2.2 *BcpLH* 基因的结构

BcpLH 基因的 cDNA 全长 1 092 bp, 其中 5' 非翻译区(5' UTR)为 57 bp, 3' UTR 为 160 bp (图 1), 推导的氨基酸序列全长 274 个氨基酸残基. 在数据库登录(EMBL Y16954)后进行同源性比较, 没有发现与 *BcpLH* 基因高度同源的已知基因. 为此, 我们采用专门分析结构域的 ProDom 程序搜索, 结果发现 *BcpLH* 多肽链中有 3 个片段与双链 RNA 结合结构域(dsRNA-binding domains, 缩写为 DRBM)一致(图 3). DRBM 是一些 RNA 结合蛋白的结构特征, 在所有 RNA 结合蛋白中, 人 TRBP [5], 小鼠 TRBP (Prbp)[6], 果蝇 Stauf[7], 爪蟾 TRBP[8], 鼠 DRADA[9]和人 DRARA[10] 的 DRBM 与 *BcpLH* 相比同源性较高. 其中, *BcpLH* 的前两个 DRBM 与人类 RNA 结合蛋白 TRBP 的对应区域分别有 59%和 51%的一致性, 而且, 不同 DRBM 之间的氨基酸残基数很接近, 不同蛋白 DRBM 上游区域的同源性也比较高.

2.3 *BcpLH* 基因的表达方式

通过 mRNA 的反转录和 cDNA 的 PCR 分析, 我们研究了 *BcpLH* 基因在大白菜不同发育时期和不同组织内的时空表达. 首先, 在大白菜幼苗期、

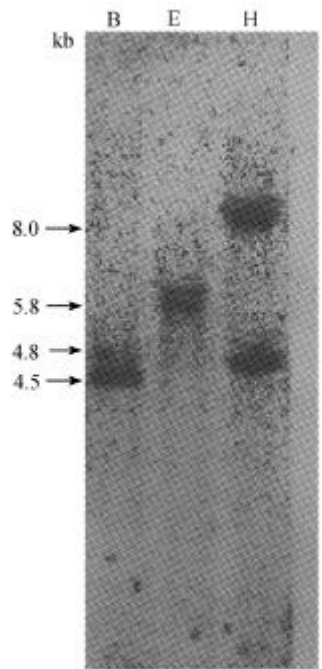


图 2 大白菜基因组 *BcpLH* 基因的 Southern 杂交
基因组 DNA 分别用限制性内切酶 *Hind* III (H), *Eco* R I (E)和 *Bam* H I (B)酶切, 在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳. 将 DNA 样品转移到硝酸纤维素滤膜上, 与 *BcpLH* 的 cDNA (³²P 标记)杂交

莲座期、包心期和结球期切取根、茎、叶及茎尖组织, 提取总 RNA. 不同组织和器官的提取样品中所含的总 RNA 及其杂质含量是不一样的, 只有各组样品中的总 RNA 相等, 其 PCR 产物才能与模板中相应的 mRNA 量成比例, 然后各种来源的材料在基因表达分析方面才有可比性. 为此, 我们通过稀释或浓缩调整不同组分的总 RNA 含量, 使其基本相等. 在进行 PCR 扩增时, 同一组样品常常在同一时间、同一条件下进行反应和扩增. PCR 所用的引物见 1.4 小节. PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后转移在硝酸纤维素膜上, 与 *BcpLH* 基因的 cDNA 探针杂交. 结果显示, *BcpLH* 基因的表达呈现明显的时空性(图 4). 在幼苗期, 根、茎和叶中均未检测

<i>BcpLH</i> 2	76~92	NRKAAEQSAAEVALQEL
<i>BcpLH</i> 2	182~198	TKKEAEISAGRTALIAI
DSRA-HUMAN	553~569	SKKVAKQDAAMKAMTIL
DSRA-RAT	503~519	SKKVAKQDAAVKAMAIL
DSRA-HUMAN	674~690	SKKVAKQMAAEEAMKAL
DSRA-RAT	602~628	SKKVAKQMAAEEAMKAL
TRBP-HUMAN	79~95	SKKAAKHKAAEVALKHL
TRBP-MOUSE	79~95	SKKAAKHKAAEVALKHL
TRBP-XENLA	69~85	SKKTPKQKAAEFALNIL
STAU-DROME	527~543	GKKVSKKRAAEKMLVEL
KP68-HUMAN	59~75	SKKEAKNAAKLAVEIL
KP68-MOUSE	58~74	SKQEARNAAKLAVDIL
consensus		SKKhAKQpAAEhAhpXL

图 3 *BcpLH* 基因和其他 RNA 结合蛋白基因 dsRNA 结合结构域同源性比较

已知的 RNA 结合蛋白基因包括: 人 *DRADA*(DSRA-HUMAN), 鼠 *DRADA*(DSRA-RAT), 人 *TRBP* (TRBP-HUMAN), 爪蟾 *TRBP*(TRBP-XENLA), 果蝇 *Stauf*(STAU-DROME), 人 *KP68* (KP68-HUMAN). 根据 Gatignol 等人的方法将氨基酸分类^[5]:
h 为疏水性氨基酸残基; p 为极性氨基酸残基; x 为未定

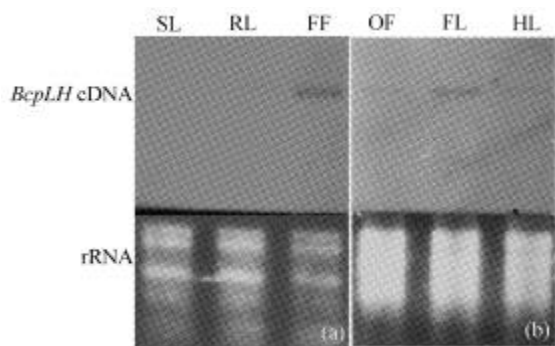


图 4 大白菜 *BcpLH* 基因的时空表达

(a) 不同发育时期叶中的表达. SL 为幼苗期未展开叶; RL 为莲座期未展开叶; FF 为包心期未展开叶. (b) 结球期叶中的表达. OF 为外叶; FL 为包叶; HL 为球叶. 图中下半部分的 rRNA 作为对照显示每个样品的 RNA 浓度是基本相等的

种诱导作用在包叶中很明显, 在莲座叶中不明显. 当包叶用生长素处理后, 在不同时间间隔采样, 发现 *BcpLH* 基因的表达在 2~8 h 内随着时间的延长而增加.

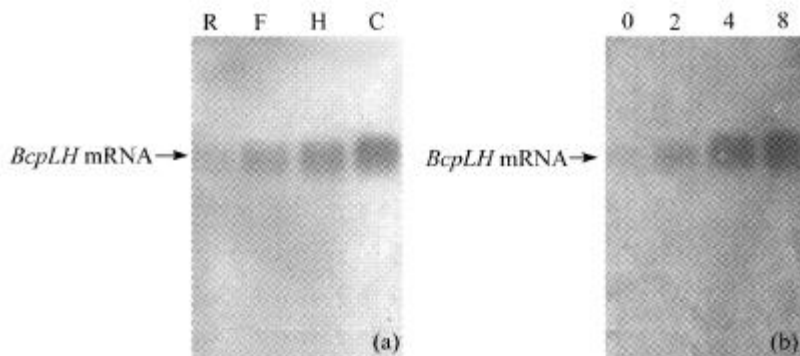


图 5 生长素处理对大白菜 *BcpLH* 基因转录表达的影响

用 2 mg/L IAA 涂抹叶的背面, 从特定阶段处理叶子中提取总 RNA. 以 *BcpLH* 基因 cDNA 作为探针进行 Northern 杂交. (a) IAA 处理对不同叶中基因表达的诱导. R 为莲座期莲座叶; F 为包心期包叶; H 为结球期包叶; C 为阳性对照. (b) IAA 处理包叶后 *BcpLH* 基因的转录产物随时间的动态变化. 0, 2, 4, 8 分别表示生长素涂抹处理后采样的时间(h)

3 讨论

植物器官变态是指器官形态和生理功能的转化^[11]. 大白菜的莲座叶和球叶是叶的两种形式, 前者主要进行光合作用, 而后者主要进行碳水化合物和其他营养物质的积累与贮藏^[2]. 包叶在形态和生理功能上介乎于莲座叶和球叶之间, 因此是一种中间形式. 不同发育时期叶子形态的规律性变化受茎顶端分生组织的控制, *BcpLH* 基因在包心期包叶中的优势表达说明了该基因在包叶形态发生过程中有重要调控作用, 而它的结构特征展示了形态发生过程中一种新的调控途径.

RNA 结合蛋白是一种重要的发育调节因子^[12], 在结构上存在不同的基序, 如富集精氨酸

到 *BcpLH* 基因的转录产物; 进入莲座期后, 未展开叶子有微弱的杂交信号, 在包心期包叶中的杂交信号很强, 在结球期的包叶中依然有较强的表达, 很明显, 未展开的包叶是 *BcpLH* 基因优势表达的区域.

2.4 生长素与 *BcpLH* 基因的表达

在大白菜莲座期, 分别用 2 mg/L IAA 涂抹处理莲座叶的背面, 然后从莲座叶中提取总 RNA, 与 *BcpLH* 基因的 cDNA 探针进行 Northern 杂交, 结果观察到的杂交信号很弱 (图 5). 在包心期, 用同样浓度的 IAA 处理包叶和莲座叶, 包叶出现了明显的杂交信号, 可见, IAA 可诱导 *BcpLH* 基因的表达, 这

种诱导作用在包叶中很明显, 在莲座叶中不明显. 当包叶用生长素处理后, 在不同时间间隔采样, 发现 *BcpLH* 基因的表达在 2~8 h 内随着时间的延长而增加.

基序、富集甘氨酸基序和锌指纹基序.结构域分析的结果表明, BcpLH 蛋白的某些片段与许多 RNA 结合蛋白的 dsRNA 结合结构域同源.这些 RNA 结合蛋白通过 RNA 编辑、多聚腺苷化、信息识别或核定位调节发育进程.其中, 人和鼠 RNA 结合蛋白 TRBP 与大白菜 BcpLH 蛋白除了有同源的 dsRNA 结合结构域外, 在结构域旁临序列上也有较高的同源性.因此, BcpLH 基因可能是植物 RNA 结合蛋白基因.人 TRBP 能够结合艾滋病毒 1 型 TAR 序列, 可作为蛋白激酶 PKR 的抑制剂, 而后者受干扰素的诱导^[13], 鼠 TRBP 可以结合鱼精蛋白 mRNA 的非翻译区, 抑制该基因的翻译表达^[6].植物中的器官和组织与动物明显不同, 那么在植物中 BcpLH 蛋白是如何与 dsRNA 结合的? 在植物器官的发生过程中有什么调节作用? 目前, 植物中发现的 RNA 结合蛋白基因还很少, 而且仅仅局限于线粒体和叶绿体内. BcpLH 基因是核基因, 因此在组织定位和生理功能上有别于已发现的 RNA 结合蛋白基因.然而, 将动物 RNA 结合蛋白的研究成果应用于植物有助于我们对 BcpLH 基因的了解.

BcpLH 基因在大白菜中的表达量很低, 用常规的 Northern 杂交不能检测到. RT-PCR 扩增使 BcpLH 基因的转录信号放大. 在大白菜包心期, BcpLH 基因主要在包叶中表达, 在莲座叶和根中不表达, 这一结果表明, 包叶是 BcpLH 基因优势表达的场所.

叶子向内弯曲是叶球发生的显著特征, 包叶的分化预示着叶球发生的开始. 尽管包叶不是叶球的组成部分, 但是它启动叶球形态发生的过程. 在包叶外表面涂抹生长素, 可诱导其进行内向弯曲生长^[2]; 在幼叶和莲座叶外表面涂抹生长素则不能使其弯曲.在我们先前的研究中, 向大白菜和甘蓝中转移生长素基因可提高转基因植株的生长素水平, 其结果促进叶球的提前发生^[14]. 我们现在的实验结果表明, 在包叶内有 BcpLH 基因的转录表达, 在幼叶和莲座叶内则无明显的表达. 由此可见, 包叶不同于其他类型的叶子, 它可以接受外界环境条件的刺激, 并将信号转换为形态转化的生物学功能. 在此过程中, BcpLH 基因在信息俘获或传导过程中很可能起调节作用, 这种调节作用的间接结果是包叶的分化和叶球的发生.

致谢 许智宏教授对本文提出了修改意见, 吕玉平博士在 cDNA 文库的构建过程中给予技术帮助, 特此致谢.

参 考 文 献

- 1 陈 机. 大白菜形态学. 北京: 科学出版社, 1984
- 2 Ito H. Effect of temperature and photoperiod on head formation of leafy head of Chinese cabbage. J Horticult Assoc Japan, 1957, 26: 154~162
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989
- 4 Lucke H A, Chew K C, Mickel F S, et al. Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. EMBO J, 1987, 6: 43~48
- 5 Gagnon A, Buckler W A, Berkout B, et al. Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. Science, 1991, 251: 1 597~1 600
- 6 Lee K, Fajardo M A, Braun R E. A testis cytoplasmic RNA-binding protein that has the properties of a translational repressor. Mol Cell Biol, 1996, 16: 3 024~3 034
- 7 Johnston D, Beuchle D, Nusslein-Volhard C. Stauf, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. Cell, 1991, 66: 51~63
- 8 Eckmann C R, Jantsch M F. Xlrp, a double-stranded RNA binding protein associated with ribosomes and heterogeneous

nuclear RNPs. *J Cell Biol*, 1997, 138: 239~253

- 9 Jenny A, Keller W. Cloning of cDNAs encoding mammalian double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 1 389~1 397
- 10 Kim U, Wang Y, Sanford T, et al. Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11 457~11 461
- 11 何玉科, 余旭红. 植物器官变态的方式与机制. 见: 植物科学进展. 第一卷. 北京: 高等教育出版社, 1998. 164~179
- 12 Bandziulus R J, Swanson M S, Dreyfuss G. RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev*, 1989, 3: 431~437
- 13 Park H, Davies M V, Langland J O, et al. Tar RNA-binding protein is an inhibitor of the interferon-induced protein kinase PKR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 4 713~4 717
- 14 He Y K, Wang J Y, Gong Z H, et al. Root development initiated by exogenous auxin synthesis genes in *Brassica* spp.crops. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1994, 32(4): 493~500