

# iaaL 基因在烟草绒毡层中的特异表达对花粉胚胎发生的影响\*

杨洪全 卫志明 许智宏\*\*

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

**摘要** 来源于丁香假单胞杆菌的吲哚乙酰胺赖氨酸酯合成酶(indoleacetic acid-lysine synthetase)基因(iaaL)与来自烟草的在花药绒毡层特异表达(tapetal-specific)的启动子 TA29 融合后导入烟草, 在转基因烟草中研究了这种嵌合基因的表达特性, 并测定了各器官内源生长素水平。结果表明: TA29 启动子只能启动 iaaL 基因在转基因植株的花药中特异表达, 并导致转基因植株花药内源 IAA 含量的下降, 但在完整植株上并没有对花药的正常发育造成明显的影响。当转基因植株的花药在不附加任何激素的改良 Nistch H (NH)培养基上培养时, 花粉胚胎发生频率下降至 11% (对照在 50% 以上); 当在 NH 培养基上补加 0.2mg/L IAA 时, 转基因植株的花粉胚胎发生频率恢复到与对照相当(达 55.7%), 由此说明花药绒毡层细胞中 IAA 的代谢对花药培养中花粉胚的发育具有重要的意义。

**关键词** 花药绒毡层特异表达 吲哚乙酰胺赖氨酸酯合成酶基因 转基因烟草 花粉胚胎发生

iaaL 是一种来源于丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*)的编码吲哚乙酰胺赖氨酸酯合成酶(indoleacetic acid-lysine synthetase, IAAL)的基因, IAAL 催化游离的 IAA 与赖氨酸生成 IAA-lysine 复合物而使 IAA 失去生物活性<sup>[1,2]</sup>。由于植物体中不存在 IAA-lysine, 也不存在能够水解该复合物释放出游离 IAA 的酶<sup>[3]</sup>, 因此 iaaL 可以作为一种抗生长素(anti-auxin)基因, 用来研究 IAA 的生理作用。有人把 iaaL 基因置于 CaMV35S 启动子的控制之下, 导入烟草和马铃薯, iaaL 基因在转基因植株中的组成型表达导致内源游离 IAA 含量大幅度下降, 由此引起顶端优势减弱, 叶片皱缩及根系发育受阻等性状变异<sup>[3,4]</sup>。但他们的工作主要集中于研究 IAA 在完整植株生长发育过程中的生理作用, 本研究则是利用一个来源于烟草 TA29 基因 -279~+12 的在花药绒毡层特异表达的启动子 TA29<sup>[5]</sup>, 与 iaaL 构成嵌合基因后导入烟草, 通过 iaaL 基因在花药绒毡层的特异表达来调控其内源 IAA 的水平, 以研究在完整植株上及离体条件下花药 IAA 对花药发育及花粉胚胎发生的影响。

1996-01-02 收稿, 1996-03-07 收修改稿

\* 植物分子遗传国家重点实验室资助课题

\*\* 联系人, 地址: 北京市三里河路 52 号中国科学院, 邮编: 100864

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌种** 质粒 pTA29-nos(291 bp 的 TA29 启动子和 250 bp 的 nos 基因 3'端终止序列插入 pUC18 的重组子)由吕玉平(未发表)博士提供。质粒 pMON505(二元 Ti 质粒载体, 只含右边界, 带有 Pnos-npt II)、pMON690<sup>[3]</sup>(二元 Ti 质粒载体, 只有右边界, 带有 Pnos-npt II 和 P<sub>35S</sub>-*iaaL* 基因)及根癌农杆菌菌株 ASI(pTiT37-SE)均由美国 Monsanto 公司的 H. J. Klee 博士提供。

**1.1.2 植物材料的准备和培养** 烟草(*Nicotiana tabacum*)品种革新1号的种子在流水中冲洗 24 h 后, 先在 70% 乙醇中浸 30 s, 然后用含 3.0% 有效氯气的安替福民溶液灭菌 10 min, 再将灭菌种子接种于不附加任何激素的 MS 培养基<sup>[6]</sup>中发芽。培养温度为(26±1)℃, 光强为 28 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 每天光照 12 h。取苗龄为 30 d 左右的无菌苗完全展开的叶片作为遗传转化的受体材料。

**1.1.3 限制性内切酶和其它试剂的来源** 限制性内切酶和 T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司。Taq DNA 聚合酶为 Promega 公司产品。标准 IAA 样品为 Sigma 公司产品。dNTPs 购自 Boehringer 公司。α-<sup>32</sup>P-ATP 为北京瑞福公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 植物表达载体 pYL516(TA29-*iaaL*-nos3')的构建及向根癌农杆菌的转移** 用 Bgl II 酶切消化 pMON690, 然后用 Klenow 酶补平切口, 再用 Xho I 酶切, 电泳分离 1.5 kb 的片段; 与此同时, 先用 Nco I 消化 pTA29-nos 然后也用 Klenow 酶将切口填平, 再用 Sal I 酶切, 电泳分离大片段为载体, 并与上述 1.5 kb *iaaL* 基因用 T4 DNA 连接酶相连, 从得到的重组质粒中挑选 pTA29-nos 中插入有 *iaaL* 基因的 pYL513。

pYL513 和 pMON505 分别用 EcoR I 和 Bgl II 双酶切后用 T4 DNA 连接酶连接, 从重组质粒中挑选到了 pMON505 中插入有 TA29-*iaaL*-nos 3'的 pYL516(图 1)。

用液氮处理的冻融直接转移法<sup>[7]</sup>分别将 pYL516 及只含 T-DNA 区不携带外源基因的 pMON505 转移至根癌农杆菌 ASI(pTiT37-SE), 微量提取其质粒 DNA 进行酶切分析, 结果表明 pMON505 和 pYL516 均已成功地导入了根癌农杆菌菌株 ASI(pTiT37-SE)构成双质粒系统。

**1.2.2 植物的转化** 烟草无菌苗叶片切成 1 cm×0.5 cm 大小的切块, 用根癌农杆菌菌株 ASI(pTiT37-SE: pMON505) 和 ASI(pTiT37-SE: pYL516)感染, 试验设 2 个对照, 对照 1(CK1)为未经农杆菌转化的切块在不含 Km 的分化培养基上再生成的植株; 对照 2(CK2)为 ASI(pTiT37-SE:

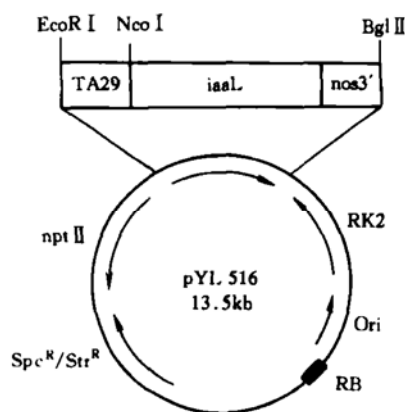


图 1 植物表达载体 pYL516 的构建

Ori——pBR322 复制起始基因, Spc<sup>R</sup>/Str<sup>R</sup>——壮观霉素/链霉素抗性基因, nos 3'——nos 基因 3'端非翻译区, RB——T-DNA 右边界, npt II——新霉素磷酸转移酶基因, RK7——pTJS75 小质粒复制起始基因

pMON505)的转化植株. 在含有 1.0mg/L BAP 的 MS 培养基上共培养 2d 后, 将切块转移至附加 250mg/L Km 和 500mg/L Cb 的原培养基上进行分化培养. 当抗性芽长至 0.5~1cm 时, 将其转移至附加 100mg/L Km 和 300mg/L Cb 的 MS 无激素培养基上生根.

**1.2.3 转基因植株的 PCR 分析** PCR 扩增用的 5'端引物为 *iaaL* 基因的 +599~+623 的 25bp 的序列, 即为: 5'GGC AAG CCT TTG GCG AAC AAG TCT C 3'; 3'端引物与 *nos* 基因终止序列 3'端互补, 即为: 5'AAT CAT CGC AAG ACC GGC AAC AGG 3', 共 24bp. 引物采用固相亚磷酸胺法在美国 ABI 公司 381A 型 DNA 合成仪上合成. PCR 扩增条件为: 94℃ 变性 1min, 50℃ 复性 2min, 72℃ 延伸 3min, 循环 30 个周期.

**1.2.4 转基因植株的 Southern blot 和 Northern blot 分析** 植物总 DNA 的提取基本按照 Mettler<sup>[8]</sup> 的微量提取法, 植物 RNA 的提取按 Chomczynski 和 Sacchi<sup>[9]</sup> 的一步提取法, 经 *EcoR* I 和 *Bgl* II 完全消化的植物基因组 DNA 及经变性的总 RNA 分别在 0.8% 和 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳后转移到 Hybond N<sup>+</sup> 尼龙膜上. DNA 和 RNA 的杂交参照文献[10]的方法进行, 杂交的探针为用 <sup>32</sup>P 标记的以质粒 pYL516 为模板进行 PCR 扩增得到的 1.0kb 的包含部分 *iaaL* 基因的 +599~+1186 的 586bp 编码区的片段.

**1.2.5 生长素的提取与测定** 生长素的分离、提取参照丁静等<sup>[11]</sup>的方法, 含量测定按文献[12]的高效液相色谱法. 实验重复 3 次, 取其平均值计算结果.

**1.2.6 转基因植株的花药培养** 选取处于单核晚期或双核初期的 pYL516 的转基因植株的花药, 接种于不加任何激素的添加 0.25% 活性炭的经改良的 NitschH(NH)培养基<sup>[13]</sup>上培养, 同时取对照 1(CK1)和对照 2(CK2)的花药接种于同样的培养基上培养作为对照, 以比较花粉胚胎发生的差异.

## 2 结果

### 2.1 根癌农杆菌的感染和抗性植株的再生

烟草无菌苗切块与根癌农杆菌菌株 ASI(pTiT37-SE: pMON505)和 ASI(pTiT37-SE: pYL516)共培养 2d 后, 转移至抗性筛选培养基上. 通常 2 周期左右就开始有芽点的分化, 30d 后一般可得到约 0.5~1cm 长的抗性芽(图 2). 将抗性芽切下, 转移至生根培养基上生根, 大

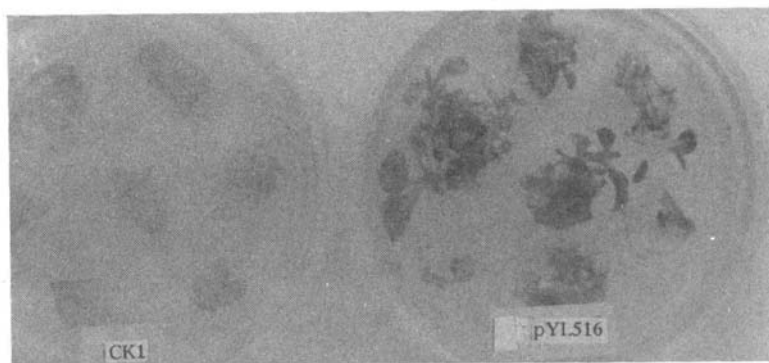


图 2 用根癌农杆菌菌株 ASI(pTiT37-SE:pYL516)转化的烟草叶片在筛选培养基上培养至 30d 的抗性芽(CK1 为对照)



约 30d 左右形成具有发达根系的植株。由此, 我们得到了大量的 pMON505 和 pYL516 各自的抗性植株。

## 2.2 转基因植株的 PCR 检测

随机取 35 棵 pYL516 转基因植株、10 棵 CK1 及 10 棵 CK2 植株的叶片, 小量提取总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。结果 31 棵 pYL516 的转化抗性植株都成功地扩增出了大约 1.0kb 的目标条带, 而 CK1 和 CK2 均没有扩增出该条带 (图 3)。

## 2.3 转基因植株的分子检测及内源 IAA 含量的测定

pYL516 的转基因植株在整个生长发育阶段无明显的表型变异。选取在 PCR 反应中扩增出特异条带的单株 pYL516-T8, 11, 15, 21, 提取总 DNA, 用 Bgl II 和 EcoR I 完全消化后用于 Southern 杂交分析, 结果所有样品在约 2.0kb 处杂交出了特异的目标条带 (图 4), 表明 *iaaL* 基因整合进了烟草的基因组。我们采取去顶的方法, 使 pYL516-T21 大量产生侧芽, 提取各个组织的 RNA 进行 Northern 杂交, 结果仅在花药中检测到了 *iaaL* RNA (图 5)。同时测定了 3 株转基因植株各组织内源 IAA 水平, 结果表明: 花药内源 IAA 含量与 CK1 和 CK2 比较降低了 54%~59% (表 1), 但 *iaaL* 基因在花药绒毡层的表达所引起的内源 IAA 水平的降低并没有对花药的发育带来明显的影响。

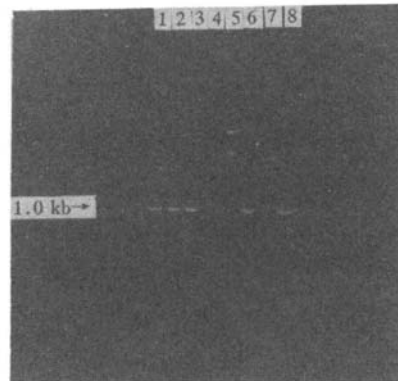


图 3 转基因植株的 PCR 分析  
1, 2, 3, 6, 8——不同的具有卡那霉素抗性的烟草植株, 4——CK2, 5——用 EcoR I 和 Hind III 消化的  $\lambda$ DNA, 7——CK1

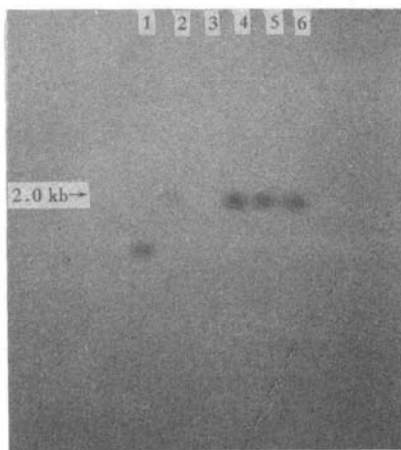


图 4 转基因植株的 Southern blot 分析

1——1.0kb 的探针, 2——pYL516-T11 植株, 3——CK2 植株, 4——pYL516-T8 植株, 5——pYL516-T21 植株, 6——pYL516-T15 植株。烟草基因组 DNA 量均为 50 $\mu$ g, 用 EcoR I 和 Bgl II 完全酶切

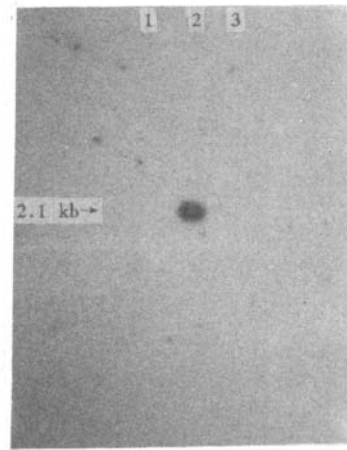


图 5 转基因植株 pYL516-T21 的 Northern blot 分析

1——来自叶片的 RNA, 2——来自花药的 RNA, 3——来自幼嫩果实的 RNA。总 RNA 均为 30 $\mu$ g

表 1 转 TA29-iaaL 基因烟草组织中生长素的水平(ng/g, 鲜重)<sup>a)</sup>

| 材料         | 叶片       | 花序       | 雌蕊       | 花药                                 | 幼嫩果实     |
|------------|----------|----------|----------|------------------------------------|----------|
| CK1        | 40.2±1.6 | 91.5±9.0 | 83.3±6.1 | 60.7±6.2                           | 98.1±8.3 |
| CK2        | 37.8±4.1 | 88.2±6.8 | 81.9±8.3 | 59.1±4.2                           | 92.9±8.3 |
| pYL516-T21 | 41.4±2.5 | 87.5±6.2 | 81.2±5.5 | 24.9±3.0<br>(59, 58) <sup>a)</sup> | 93.6±6.2 |
| - T11      | 43.7±3.4 | 89.5±4.4 | 85.9±5.6 | 27.0±2.1<br>(56, 54)               | 94.2±6.2 |
| - T15      | 43.9±3.9 | 87.9±6.6 | 81.1±6.9 | 25.9±2.8<br>(57, 56)               | 96.5±7.8 |

a)表中括号内左边的数据为转基因植株组织内源 IAA 水平与 CK1 比较降低的百分率(%), 括号内右边的数据为转基因植株组织内源 IAA 水平与 CK2 比较降低的百分率(%)

## 2.4 转基因植株的花药在培养中的反应

处于单核晚期或双核初期的 CK1 和 CK2 植株的花药, 接种于不加任何激素的添加 0.25% 活性碳的经改良的 NH 培养基上在暗处培养 15d 后, 置于光下培养 1 星期即明显可见大量花粉胚形成, 不久形成绿色的小植株(图 6(a)、(b)), 至 2 周时的胚胎发生率分别为 53.6% 和 54.2%(表 2), 而 pYL516 转基因植株的花药在光下培养 1 星期后仅有少数花药的花粉开始形成花粉胚(图 6(c)), 至 3 星期时的胚胎发生率为 10.7%(表 2). 当在 NH 培养基中附加 0.2mg/L IAA 时, pYL516 转基因植株的花药经过 15d 的暗培养即可见花粉胚的形成, 在光下培养 1 星期后花粉胚变绿(图 6(d)), 培养至 2 星期时胚胎发生率达 55.7%, 即恢复到

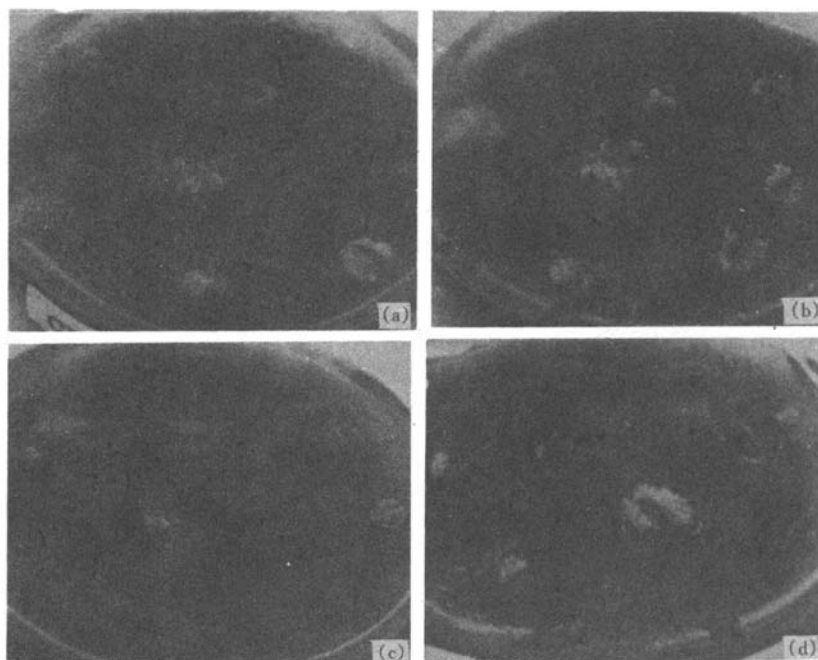


图 6 iaaL 基因在烟草绒毡层中的特异表达对花粉胚胎发生的影响

(a)、(b)为 CK1 和 CK2 植株的花药分别在添加 0.25% 活性碳的改良的无任何生长调节剂的 NH 培养基上花粉的胚胎发生情况, (c)为 pYL516 转基因植株的花药在 NH 培养基上花粉的胚胎发生情况, (d)为 pYL516 转基因植株的花药在补加 0.2mg/L IAA 的 NH 培养基上花粉的胚胎发生情况

与对照相似(表2),以上结果表明:*iaaL* 基因在花药绒毡层的表达引起的内源 IAA 水平的下降阻碍了花药离体培养过程中花粉的胚胎发生,而在培养基中补充一定浓度的 IAA 后,花药外植体的花粉胚胎能力大幅度上升,从而证明了在花药绒毡层中一定水平的 IAA 对花粉胚胎发生的重要作用。

表2 TA29-*iaaL* 基因的转基因植株(pYL516-T)的花药在离体培养中反应

| 材料       | 培养基              | 接种的花药<br>数目 | 产生花粉胚的药<br>数目 | 花药胚胎发生<br>频率/% |
|----------|------------------|-------------|---------------|----------------|
| CK1      | NH               | 110         | 59            | 53.6           |
| CK2      | NH               | 120         | 65            | 54.2           |
| pYL516-T | NH               | 150         | 16            | 10.7           |
| pYL516-T | NH + 0.2mg/L IAA | 140         | 78            | 55.7           |

### 3 讨论

IAA 是一种重要的参与调节植物生长与分化的植物激素。通过运用外加与内源水平的检测的研究手段,常因 IAA 的吸收与运转、内外因素干扰和因果关系不明等问题,限制了对 IAA 生理作用进行直接而有效的研究。通过将调节 IAA 水平的基因置于不同的特异表达的启动子的调控之下,导入植物获得转基因植株便可直接研究 IAA 在不同发育时期、或在特定的器官和组织中,或在特定的环境条件下所发挥的生理功能,从而克服使用传统方法来研究 IAA 的生理功能时所产生的弊端。

虽然已经有人通过增加或降低转基因植株内源 IAA 水平来研究 IAA 在生长发育中的作用<sup>[3,4,14]</sup>。但他们的工作主要是通过用组成型的启动子启动与 IAA 代谢有关的基因在转基因植株中的表达,来研究 IAA 在整个植株生长发育过程中的作用。而本研究采用的花药绒毡层特异表达启动子 TA29<sup>[5]</sup>则可直接地研究 *iaaL* 基因在花药绒毡层的特异表达导致的内源 IAA 含量的降低对花药发育及花粉胚胎发生的影响。

*iaaL* 基因在花药绒毡层的表达导致的 IAA 含量的下降并没有引起整体植株上花药或其它组织、器官的生长发育发生变化。这一方面可能是因为 IAA 下降的量还不足以阻止花药的发育,另一种可能是 IAA 在植物体内易于运输,特定组织中 IAA 含量的下降由于其它部位 IAA 的输入可以得到补偿。我们利用离体花药培养的实验证实了这一点。

周燮等<sup>1)</sup>在水稻幼穗内源 IAA 的免疫定位中发现,在单核花粉期的花粉囊中,IAA 较多地存在于绒毡层细胞里,认为 IAA 通过调节绒毡层细胞的发育或直接调节花粉粒的发育而影响花粉的育性。而在花药培养中,长期以来认为花药体细胞组织,特别是绒毡层对于花粉的启动分裂具有重要的作用<sup>[15]</sup>,但多数结果是根据组织细胞学观察得出的,而对这种影响的生理生化性质几乎一无所知,本工作首次通过直接操纵与生长素代谢有关的基因在花药绒毡层的特异表达,证实了绒毡层中生长素含量的降低可导致花粉胚胎发生能力的大幅度下降,当在培养基中补加 IAA 时,转基因植株花粉的胚胎发生能力恢复正常。本研究结果为绒毡层细胞中的 IAA 代谢在花粉胚胎发生具有重要的作用提供了直接的证据。刘春明等<sup>[16]</sup>将 Ti 质粒的

1)周 燮等,中国植物生理学会第6次全国会议论文汇编

iaaM, iaaH 基因导入烟草,使之获得自主合成 IAA 的能力,结果不需在培养基中附加激素即可诱导形成体细胞胚。由之,可以确信 IAA 在花粉胚及体细胞胚胎发生中具有至关重要的作用。在本工作的基础上,通过分别构建 TA29 启动子与 iaaM, iaaH 基因和 ipt 基因的嵌合基因,将它们单独导入或同时导入烟草,利用特异表达 iaaM, iaaH 基因或/和 ipt 基因的转基因植株即可进一步研究花药体细胞组织内源 IAA 或细胞分裂素的水平的变化对花粉胚胎发生的影响。这些探索将对弄清影响花粉胚胎发生能力的花药内部因素的研究具有重要的意义。

**致谢** 美国 Monsanto 公司的 H.J. Klee 博士提供 pMON505, pMON690 质粒和根癌农杆菌菌株 ASI(pTiT37-SE),作者在此表示衷心的感谢。

### 参 考 文 献

- 1 Glass N L, Kossuge T. Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. J Bacteriol, 1986, 166:598~602
- 2 Roberto F F, Klee H J, White F, et al. Expression and fine structure of the gene encoding N-e-indole-3-acetyl-L-lysine synthase from *Pseudomonas savastanoi*. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87:5795~5801
- 3 Romano C P, Hein M B, Klee H J. Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi*. Genes Dev, 1991, 5:438~446
- 4 Spena A, Prinsen E, Fladung M, et al. The indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* induces developmental alterations in transgenic tobacco and potato plants. Mol Gen Genet, 1991, 227:205~212
- 5 Koltunow A M, Truettner J, Cox K H. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. Plant Cell, 1990, 2:1201~1224
- 6 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 1962, 15:473~497
- 7 An G. Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. Methods in Enzymology, 1987, 153:292~305
- 8 Mettler I J. A simple and rapid method for miniprep of DNA from tissue cultured plant cells. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5:346~349
- 9 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolated by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 1987, 162:156~159
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 11 丁 静,沈镇德,方亦雄,等.植物内源激素的提取分离和生物鉴定.植物生理学通讯,1979,(2):27~39
- 12 谈 峰.植物激素的高效液相色谱.植物生理学通讯,1986,(5):15~23
- 13 陆文樑.烟草(*Nicotiana tabacum* L.)离体花粉诱导形成单倍体植株的研究,见:花药培养学术讨论会文集,北京:科学出版社,1977. 136~140
- 14 Kell H J, Horsch R B, Hinchey M A, et al. The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. Genes Dev, 1987, 1:86~96
- 15 许智宏.植物单倍体的诱导形成及其应用,见:焦瑞身编.细胞工程.北京:化学工业出版社,1990. 169~204
- 16 刘春明,刘林德,姚敦义,等. Ti 质粒的基因 1,2 对烟草体细胞胚胎发生的诱导作用.实验生物学报,1990,23:1~9