



论文

RNA 干涉 *AtSUS3* 影响拟南芥 *SUS* 家族表达模式及角果成熟

柴静, 强毅, 贾荣荣, 毛杰利, 屈生宪, 俞嘉宁*

陕西师范大学生命科学院, 西安 710062

* 联系人, E-mail: jnyu@snnu.edu.cn

收稿日期: 2011-04-18; 接受日期: 2011-06-03

中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: GK200902028)资助项目

doi: 10.1360/052011-36

摘要 蔗糖合成酶(SuSy)是植物蔗糖代谢的关键酶, 在植物生长发育过程中起着重要作用. 为研究拟南芥中 *SUS3* 的功能, 构建 RNAi-*SUS3* 干涉载体, 通过农杆菌介导的真空渗透法转化拟南芥. 筛选获得纯系转基因植株后, 对 *AtSUS* 家族进行表达分析, 利用环境扫描电子显微镜观察转基因植株表型, 并对转基因拟南芥角果进行木质素组织化学染色以及透射电子显微镜检测. 结果表明, RNA 干涉技术能够抑制 *AtSUS3* 的表达, 正常培养条件下该基因沉默后对拟南芥的表型没有显著影响, 但可引起角果中 *AtSUS1*, *AtSUS2* 和 *AtSUS4* 表达代偿性增加, 使转基因植株角果内果皮细胞次生细胞壁增厚, 木质化程度加深, 同时果瓣厚度也有增加趋势. 结果提示, 转基因拟南芥角果的发育较野生型植株更为优先, *AtSUS3* 基因沉默可能有利于角果的成熟.

关键词
蔗糖合成酶
RNA 干涉
代偿效应
拟南芥
角果

蔗糖合成酶(sucrose synthase, EC2.4.1.13, SuSy)是植物蔗糖代谢关键酶之一, 由 Cardini 等人^[1]于 1955 年首次在小麦(*Triticum aestivum* L.)胚芽中发现. 其基因大小约为 5.9 kb, cDNA 长度约 2.7 kb, 编码 820 个氨基酸, 是相对分子质量为 83~100 kD 亚基构成的四聚体^[2]. 已有研究证明其在植物体内有 SS I 和 SS II 两种存在形式, 大部分以可溶状态存在于细胞质中, 不溶性的 SuSy 则附着在细胞膜上^[3,4]. 该酶可催化蔗糖+UDP $\leftrightarrow$ 果糖+UDPG 的可逆反应, 但通常认为其主要起分解蔗糖的作用^[5]. SuSy 在大多数植物的贮藏器官中有明显的表达, 其活性通常与淀粉的积累或者器官的生长发育有关^[6]. 其生理功能涉及

影响库强, 蔗糖代谢, 参与细胞分化与纤维细胞壁合成, 调节淀粉合成等方面^[7].

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中编码 SuSy 的是一个多基因家族, 该家族由 6 个基因组成: *AtSUS1*, *AtSUS2*, *AtSUS3*, *AtSUS4*, *AtSUS5* 和 *AtSUS6*^[8]. 已有研究表明, 多基因家族中某一基因的缺失可能会导致其他基因表达增强来进行补偿. 如拟南芥细胞溶质转化酶基因(*AtCIN1*)缺失的突变体中, *AtCIN2* 的表达水平会增加^[9]; 但也有相反的例子, 如豌豆(*Pisum sativum* L.)中 *SUS2* 和 *SUS3* 并不能对 *SUS1* 的缺失起代偿作用^[10]. 拟南芥中 *SUS3* 在叶片失水、渗透胁迫及后熟的种子等各种脱水条件下均有表达^[8], 该基因

的沉默是否影响 *SUS* 家族中其他基因表达, 目前还不明确. 为此构建了 RNAi-*SUS3* 干扰载体, 转化野生型拟南芥, 经两代筛选后, 获得纯系植株, 对 *AtSUS1*~*AtSUS6* 表达量进行分析, 并对转基因植株的表型进行环境扫描电子显微镜、透射电子显微镜观察, 旨在了解 *AtSUS3* 基因干涉后对植株表型及该家族中其他基因表达的影响, 以深入了解该基因家族的功能.

1 材料与方法

1.1 材料

哥伦比亚野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype)种子播种于蛭石表面, 用 1/3×MS 营养液浇灌, 于温度 20℃~22℃, 相对湿度 60%~70%, 光照 16 h, 黑暗 8 h, 光照强度 120~150 mmol m⁻² s⁻¹ 的温室中培养.

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α菌株和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)GV3101菌株为本实验室

保存; pGEM-T easy 购自 Promega 公司; pKANNIBAL 和 pART-27 为江苏大学谭小力实验室惠赠.

1.2 方法

(1) RNAi-*SUS3* 干扰载体的构建. 通过 RT-PCR 方法获得拟南芥 *SUS3* 的全长 cDNA, 连入 pGEM-T easy 载体, 测序验证后将该质粒命名为 pSUS3. 在 NCBI 中 Blast 比对 *AtSUS3* 序列, 在该基因的特异性区域选择 207 bp 大小的片段作为 RNAi 片段. 设计引物 Atsus3i-1, Atsus3i-2(表 1), 分别引入 *Xho* I, *Eco*R I 和 *Xba* I, *Hind* III 等限制性内切酶识别位点. 以 pSUS3 为模板用引物 Atsus3i-1 和引物 Atsus3i-2 分别扩增正向和反向插入片段, 分别经过 *Xho* I / *Eco*R I, *Xba* I / *Hind* III 双酶切后连入 pKANNIBAL 载体中, 形成 RNAi 中间载体(图 1). 将中间载体用 *Not* I 单酶切, 连接到 pART-27 载体中, 转化大肠杆菌 DH5α, 经蓝白斑筛选获得阳性克隆, 得到 RNAi-*SUS3* 干扰载体.

(2) 转 RNAi-*SUS3* 拟南芥的获得及分子检测. 电转化农杆菌 GV3101 感受态细胞, 挑取含目的基因

表 1 PCR 扩增引物^{a)}

引物	引物序列 5'→3'	
	正向序列	反向序列
Atsus3i-1	TA <u>ACTCGAG</u> TGCTTCGAGCTAAGTGTTG	TTAGA <u>ATTCCGGA</u> ACATAACAGAAGACAAG
Atsus3i-2	TAAT <u>CTAGAT</u> GTCTTCGAGCTAAGTGTTG	TTAA <u>AGCTTCGGA</u> ACATAACAGAAGACAAG
35s	ATTTGCCACTATTACAGAGG	ATTACTTGCCCTTGGTTTATG
Atsus3-1	TGTCTTCGAGCTAAGTGTTG	CGGAACATAACAGAAGACAAG
Atactin	AGCTATGAGTTGCCTGATGG	ATTGTAAGTGGTCTCGTGAATAC
Atsus1	GAACGCTCGAGAGAGTTTATGATTCTG	GTATCAGCAGCCTGATCACCATTGGTAAG
Atsus2	TAGTGGTACAGAACACGCACACATTCTG	GTCTCAAAGAAGCTGACCAAGGTAGCTG
Atsus3	CAGCGAACAGAGCATACTCATATTCTC	ATCAGCCATTATGTTACCCGCTTGCTCA
Atsus4	GCTGCTTCCTGACGCAGCAGGAACCACTTGT	CTCTCAGCTGCCTTGTCAACCATGATATGGA
Atsus5	ATGCAACCAAGAGTTGGAACCTATTTTC	CAATAATCAGGATCCATACCGGATTCTC
Atsus6	GAACTAGAAGCCATTGAAGGAACCAAGC	ATACAAACCATCTGAACGGCATTGCTG
Real-Atsus1	CTCGTCCAACACTCCACAA	TCTTCATACAGCGTTTCGG
Real-Atsus2	AGGGTGTACCAAAATCTCAT	CATAGTGAAAGCTGTGTGG
Real-Atsus3	GAGATACCGCAGGGAGAGTT	CAGCATTTCACTCTCAAGGG
Real-Atsus4	CAAGTGTAAGCATGACCC	AGGAACAGCTTGAGCCAG
Real-Atsus5	CGAACAAGAAACGGTGAAC	TTCGTTTATGCGTTGTAGCC
Real-Atsus6	GATGAAGATTGCGTATGGAC	AGCCGAGTTAGACCAAAAG

a) 引物 Atsus3i-1 正、反向序列中下画线分别表示 *Xho* I, *Eco*R I 识别序列, 引物 Atsus3i-2 正、反向序列中下画线分别表示 *Xba* I, *Hind* III 识别序列

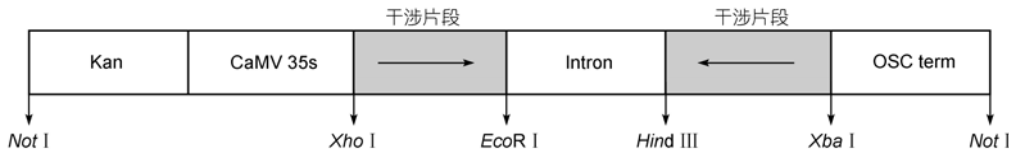


图 1 pKANNIBAL 载体中插入的正向和反向 *AtSUS3* 基因片段

的阳性农杆菌菌株至 400 mL 的 LB 液体培养基中(含 50 mg/L 利福平, 50 mg/L 卡那霉素), 28°C, 220 r/min 振荡培养 12~16 h 至菌悬液 A_{600} 为 2.0 左右. 收菌后, 4000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 用转化液(0.5%蔗糖, 2.15 g/L $MgCl_2$, 50 μ L/L Silwet-77)重悬沉淀至 A_{600} 值达到 0.8 左右. 将生长至盛花期的拟南芥植株倒浸于含农杆菌的转化液中, 0.05 MPa 抽真空, 维持 5 min. 取出植株侧放, 暗培养 24 h 后, 置温室中正常培养至收种.

将收获的 T_0 代种子经表面消毒后, 均匀播种于 MS 固体筛选培养基表面(含 50 mg/L 卡那霉素和 150 mg/L 头孢霉素), 于上述温室中培养. 10~14 天后挑选阳性植株幼苗, 移栽至蛭石中培养至收种. 再经过两代筛选, 获得纯系转基因植株. 正常培养 30 天后分别提取转基因植株和野生型植株的总 DNA(CTAB 法^[11]), 以质粒为阳性对照, 用引物 35S 扩增干涉片段中的 35S 启动子序列. PCR 体系为 25 μ L, 其中 DNA 模板 50 ng, 上下游引物各 2 μ L, 扩增参数为 95°C 10 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min 共 30 个循环; 72°C 10 min. 取扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

(3) 转基因拟南芥的干涉效率分析. 选取相同条件下培养 30 天的转基因植株和野生型植株, 单株提取其总 RNA(TRIpure Reagent 总 RNA 提取试剂, 北京百泰克生物公司), 逆转录为 cDNA(PrimeScript™ RT reagent Kit, 大连 TaKaRa 有限公司). 选取 *AtSUS3* 基因中 207 bp 长度的特异性序列设计引物 *Atsus3-1* 进行扩增, 以引物 *Atactin11* 扩增的 *Atactin11* 基因为内参. PCR 体系为 25 μ L, 其中 cDNA 模板 50 ng, 上下游引物各 2 μ L, 扩增参数为 95°C 10 min; 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min 共 28 个循环; 72°C 10 min. 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

(4) 转基因拟南芥 *SUS* 家族表达模式分析. 选取相同条件下培养 50 天左右的转基因植株和野生型植株, 提取花、叶、茎、莲座叶以及角果中的总 RNA, 逆转录为 cDNA. 通过 Blast 比对 *AtSUS1*(At5g20830), *AtSUS2*(At5g49190), *AtSUS3*(At4g02280), *AtSUS4*(At3g43190), *AtSUS5*(At5g37180)和 *AtSUS6*(At1g73370)的特异性区域设计引物 *Atsus1*~*Atsus6*, 以 *Atactin11* 基因为内参进行 RT-PCR 分析. PCR 体系为 25 μ L, 其中 cDNA 模板 50 ng, 上下游引物各 2 μ L, 扩增参数为 95°C 10 min; 95°C 30 s, 50°C 40 s, 72°C 1.5 min 共 29 个循环; 72°C 10 min. 取扩增产物进行 1% 琼脂

糖凝胶电泳检测, 应用 Fluor Chem 凝胶成像系统(美国 Alpha)扫描 PCR 扩增产物的电泳条带灰度, 计算出 *AtSUS* 家族各个基因与内参 *Atactin11* 基因的灰度比值(*AtSUS/Atactin11*), 得出目标基因的相对表达量.

以 *Atactin11* 基因为内参, 设计 *Real-Atsus1*~*Real-Atsus6*(表 1)作为 Real-time RT-PCR 扩增引物. 采用 MiniOpticon 实时 PCR 检测系统(美国 Bio Rad), 实时荧光定量 PCR 方法参照 SYBY Premix Ex Taq II (大连 TaKaRa 有限公司)说明书进行. PCR 体系为 25 μ L, 其中 cDNA 模板 20 ng, 上下游引物各 1 μ L; 扩增参数为 95°C 8 min; 95°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 1 min 共 40 个循环. 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对数据进行分析.

(5) 转基因拟南芥的表型分析. (i) 转基因拟南芥组培苗分析. 将 T_2 代转基因植株种子和野生型植株种子经表面消毒后分为两组. 一组均匀播种于 MS 固体培养基上, 置温室中水平培养; 另一组播种于 MS 固体培养基的同一水平线上, 竖直培养, 用于观测根部发育; (ii) 转基因拟南芥实生苗分析. 将 T_2 代转基因植株种子和野生型植株种子播种于蛭石表面, 用 1/3×MS 营养液浇灌, 于上述温室中培养. 在生长 30 和 50 天后观察结果, 进行统计和拍照.

(6) 转基因拟南芥环境扫描电子显微镜分析. 选取培养 50 天的转基因植株及野生型植株中相同部位的叶片、茎、花以及角果, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗表面灰尘杂质, 晾干表面水分后将新鲜的植物组织置于样品台上, 于 Quanta 200(FEI 公司)环境扫描电子显微镜低真空模式下观察, 在 50~100 放大倍数下观测拍照.

(7) 转基因拟南芥木质素组织化学染色分析. 采用 Wiesner 反应法^[12], 选取开花后 8 天(8DAF)和 13 天(13DAF)角果制作徒手切片, 室温条件下在 1%(质量体积比, 溶于 95%无水乙醇)的间苯三酚溶液中染色约 5 min, 再滴加 3 mol/L 盐酸孵育约 5 min, 最后用 3 mol/L 盐酸封片, 于 Leica DFC490 显微镜下观察, 在 100~200 放大倍数下观测拍照.

(8) 转基因拟南芥透射电子显微镜分析. 切取 8DAF 的拟南芥角果(体积 ≤ 1 mm³) 放入新鲜配制的 2.5%戊二醛固定液中, 于 4°C 进行前固定 4~6 h, 然后用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗, 用 1%四氧化锇进行后固定 1~2 h, 再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗, 乙醇梯度脱水, 包埋剂渗透后用环氧树脂(Epon812)包埋, 聚合, 进行超薄切片, 醋酸铀染色, 于 JEM-2000EX 电子透

射显微镜下观察, 在 1500~8000 放大倍数下观测拍照.

(9) 转基因拟南芥角果产率及成熟率统计. 选取相同条件下培养的野生型及转基因拟南芥(两个株系)各 90 株, 生长 50 天后分别统计其角果总数和开裂的角果数目, 用以计算角果产率及成熟率. 角果产率以角果总数/植株总数表示, 角果成熟率以开裂角果总数/角果总数表示.

2 结果

2.1 转基因拟南芥的获得与分子检测

RNAi-*SUS3* 干涉载体经农杆菌介导的真空渗透法转化盛花期的野生型拟南芥, 温室条件继续培养至收获 T₀ 代种子. 该种子经表面消毒后均匀播种于含 50 mg/L 卡那霉素的 MS 固体培养基表面. 培养 12 天后可见, 转基因植株正常生长, 幼苗茁壮, 叶片鲜绿; 非转基因植株则不能正常生长, 幼苗矮小, 逐渐黄化.

经两代筛选后获得纯系植株, 进行 PCR 检测, 以含有干涉片段的质粒为阳性对照, 以野生型植株为阴性对照. 由图 2 可以看出, 转基因植株能扩增出大小约为 573 bp 的条带, 与质粒中的扩增产物大小一致, 而野生型植株中则不能扩增出目的条带, 说明目的基因已插入阳性植株中, 成功获得转基因拟南芥.

2.2 转基因拟南芥植株的干涉效率分析

单株提取转基因植株的 RNA, 并逆转录为 cDNA, 以野生型植株为对照, 以 *Atactin11* 基因为内参. 可见 *AtSUS3* 基因在各转基因拟南芥株系中的表达量大幅下降, 几乎检测不到(图 3), 说明 RNAi-*SUS3* 干涉载体转化拟南芥后, 该基因的表达被抑制.

2.3 转基因拟南芥 *SUS* 家族表达模式分析

以 *Atactin11* 为内参, 用 RT-PCR 的方法扩增

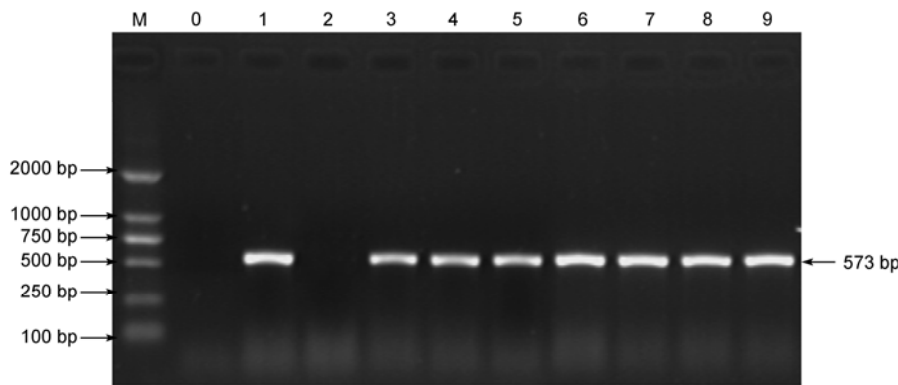


图 2 转基因植株的 PCR 检测

M: DL2000; 泳道 0: 空白对照; 泳道 1: 阳性对照; 泳道 2: 野生型植株; 泳道 3~9: 转基因植株

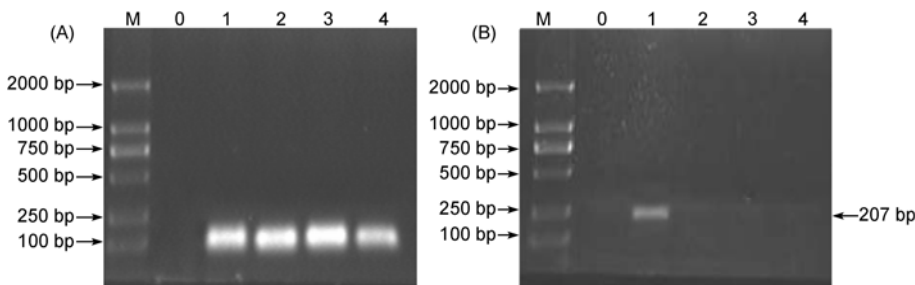


图 3 转基因拟南芥 RT-PCR 分析

(A) *Atactin11* 基因扩增产物电泳结果; (B) 转基因拟南芥 *SUS3* 基因 RT-PCR 分析. M: DL2000; 泳道 0: 空白对照; 泳道 1: 野生型植株; 泳道 2~4: 转基因植株

AtSUS1~AtSUS6. 由 *Atactin11* 的扩增条带亮度一致说明 cDNA 的模板量相同(图 4(A)). 由此可见, *AtSUS3* 在野生型植株中, 除了莲座叶, 在其他组织部位均有表达, 且在角果中有较高表达, 而转基因植株除了在角果中略有表达, 在其他组织部位不表达; *AtSUS1* 在植株的各个部位均有表达, 但在转基因植株角果中的表达量明显高于野生型植株; *AtSUS2* 在野生型植株茎中有微量表达, 转基因植株中几乎没有;

在野生型植株及转基因植株角果中高度表达, 但转基因植株中该基因的表达量高于野生型; *AtSUS4* 在野生型植株的花、茎和角果中有明显表达, 转基因植株除了在花、茎、角果中有表达外, 莲座叶中也有明显表达, 且转基因植株角果中的表达量明显高于野生型植株, 但茎中的表达量低于野生型; *AtSUS5* 在野生型植株茎中的表达量略高于转基因植株, 在其他组织部位没有明显差异; *AtSUS6* 在野生型植株茎中的表达量

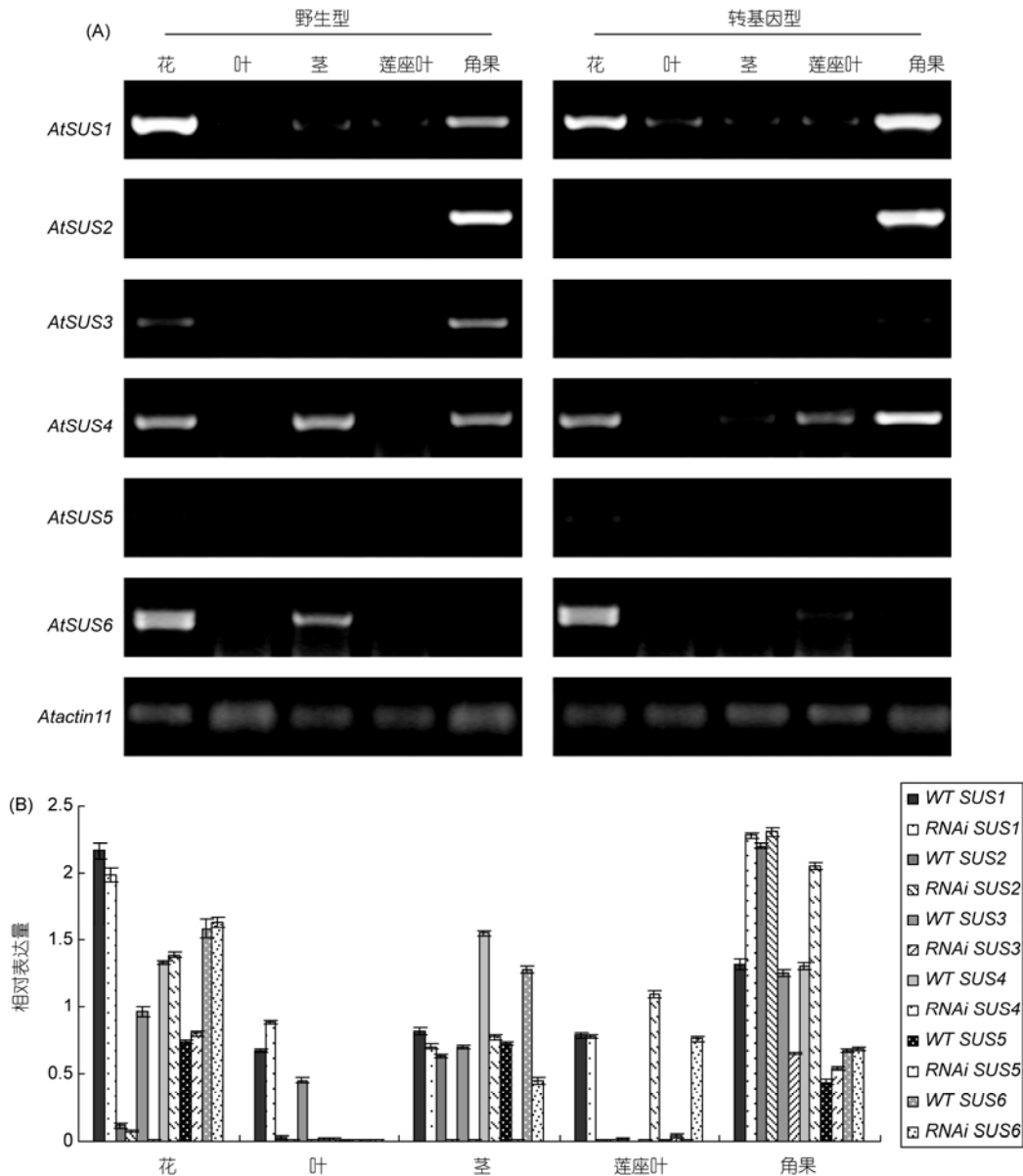
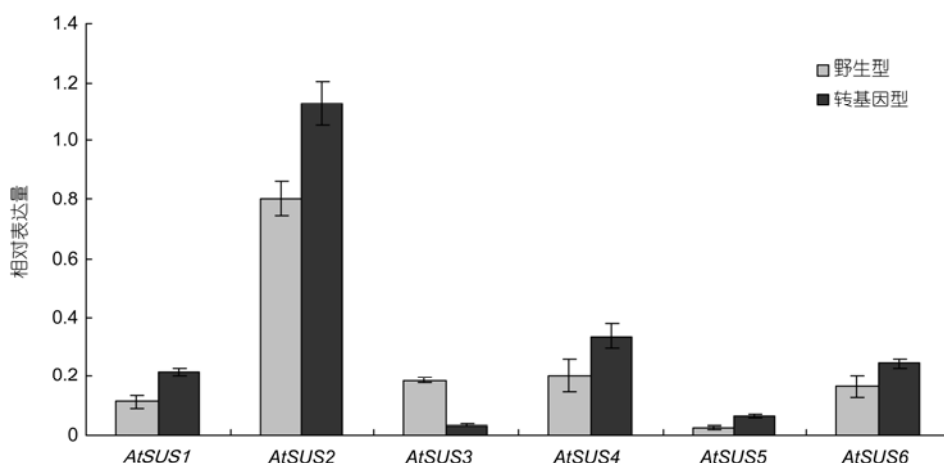


图 4 转基因拟南芥 *SUS* 基因家族 RT-PCR 分析及相对表达水平

(A) 转基因拟南芥 *SUS* 基因家族 RT-PCR 分析; (B) 转基因拟南芥 *SUS* 基因家族相对表达水平. 目标基因相对表达水平以该基因 PCR 产物灰度/内参 *Atactin11* 灰度表示

图5 *AtSUS1*~*AtSUS6* 基因在拟南芥角果中的 RT-PCR 分析

高于转基因植株,而在莲座叶中的表达量则低于转基因植株(图 4(A)和(B)). 用 Real-time RT-PCR 分析 *AtSUS1*~*6* 在角果中的表达模式,结果与 RT-PCR 的分析结果有相似性,即 *AtSUS3* 在转基因拟南芥角果中的表达被抑制;而 *AtSUS1*, *AtSUS2*, *AtSUS4* 的表达较野生型显著增加; *AtSUS5*, *AtSUS6* 表达在二者之间没有明显差异.

2.4 转基因拟南芥表型分析

为了分析转基因拟南芥表型是否受影响,比较了野生型植株与转基因植株组培苗与实生苗的生长差异. 结果表明,培养在 MS 固体培养基上 10 天的转基因拟南芥生长状态正常,幼苗茁壮,植株大小及真叶数目与野生型一致(图 6(A)). 竖直培养的转基因植株及野生型植株的根长及侧根数目没有明显差异(图 6(B)). 生长于蛭石基质上 30 和 50 天的转基因拟南芥及野生型拟南芥状态正常,莲座叶形态数目、茎粗、开花时间及角果的发育基本相同(图 6(C)和(D)). 表明 *AtSUS3* 基因沉默对植株的表型可能没有显著影响.

2.5 转基因拟南芥环境扫描电子显微镜分析

为了观察转基因植株与野生型植株的表观结构差异,将生长 50 天的植物样品置于环境扫描电子显微镜下观察. 结果显示,转基因植株及野生型植株叶的表皮毛数量及单个表皮毛的形态没有明显差异(图 7(A)和(E)),二者茎的粗度基本一致且都长有茎表皮毛(图 7(B)和(F)),花和角果的形态也基本相同,花朵结构完整,角果表面平滑度一致(图 7(C), (D),

(G)和(H)).

2.6 转基因拟南芥木质素组织化学染色分析

组织化学染色技术可以检测出植物组织中细胞壁木质素含量的差异. 木质素成分用间苯三酚和盐酸溶液处理后,可以呈现出红色反应,染色深浅代表木质化程度的高低. 对转基因植株进行组织化学染色并观测. 结果显示,转基因植株与野生型植株的茎中木质化程度大致相同,没有明显差异(图片未显示). 但转基因植株 8DAF 的角果果瓣(valve)内果皮层(endocarp)细胞的红色区域较野生型多,且边缘较厚,颜色较深,说明其木质化程度较之野生型植株要高(图 8(A), (B), (E)和(F));在 13DAF 的角果中,与野生型植株相比,转基因植株染色区域颜色仍较深,但与野生型植株相比,差异不如 8DAF 的角果中显著,此外转基因植株的果瓣有显著增厚趋势(图 8(C), (D), (G)和(H)).

2.7 转基因拟南芥透射电子显微镜分析

对 8DAF 的角果经前固定、漂洗、后固定、脱水、浸透、包埋、聚合、超薄切片及染色等处理后,应用透射电子显微镜观察细胞内的超微结构. 由图 9 可见,野生型拟南芥角果果瓣中,中果皮是由含叶绿体的薄壁细胞组成,细胞排列疏松且无规则;内果皮层的细胞木质化,排列紧密有序. 转基因拟南芥角果果瓣与野生型植株相比,中果皮细胞无明显变化,但内果皮层细胞的次生细胞壁有增厚现象,尤其在细胞的非弯折区域,增厚现象更为显著.

2.8 转基因拟南芥角果产率及成熟率统计

选取生长 50 天的同龄野生型植株及两个转基因株系各 90 株, 统计角果产率和角果成熟率. 结果如表 2 所示, 拟南芥生长 55 天时, 野生型角果产率为转基因型的 76%, 表明转基因植株的角果产率高于野生型; 至 60 天时, 二者的差异减小. 65 天角果开始开裂时进行成熟度统计, 野生型角果成熟率为转基因型的 60%;

至 75 天时, 野生型角果成熟率为转基因型的 80%, 转基因植株的角果成熟率均高于野生型植株.

3 讨论

RNA 干涉(RNA interference, RNAi)是指将与内源性 mRNA 序列同源的双链 RNA(dsRNA)导入细胞,

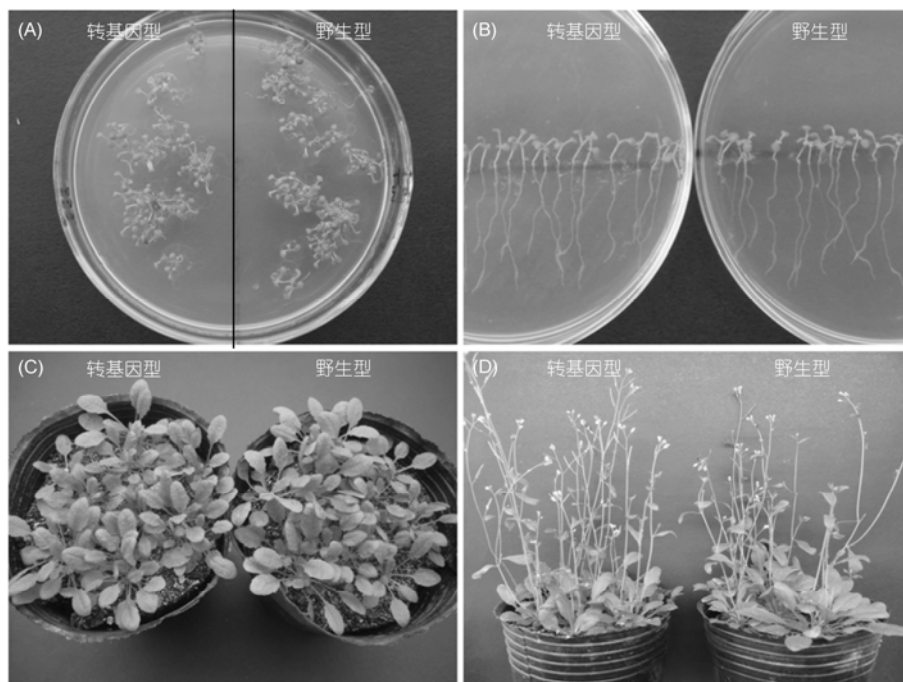


图 6 野生型及转基因拟南芥表型对比
(A)和(B) 10 天组培苗; (C) 30 天实生苗; (D) 50 天实生苗

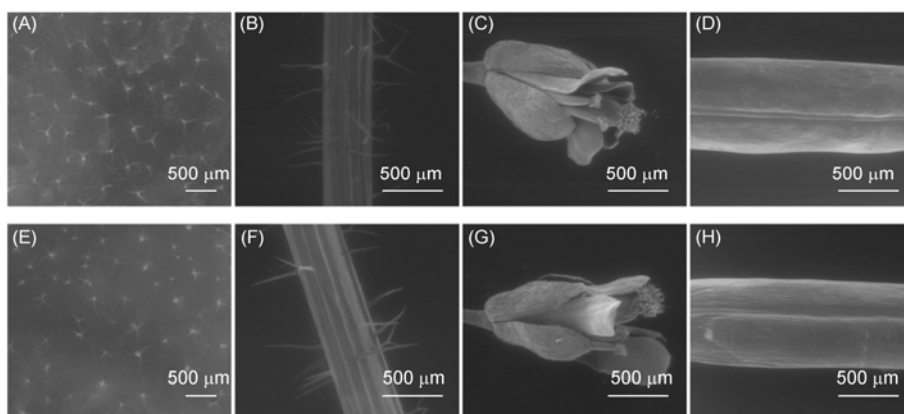


图 7 野生型及转基因拟南芥扫描电子显微镜图对比
(A) 野生型植株叶片及表皮毛; (B) 野生型植株茎; (C) 野生型植株花; (D) 野生型植株角果; (E) 转基因植株叶片及表皮毛; (F) 转基因植株茎; (G) 转基因植株花; (H) 转基因植株角果

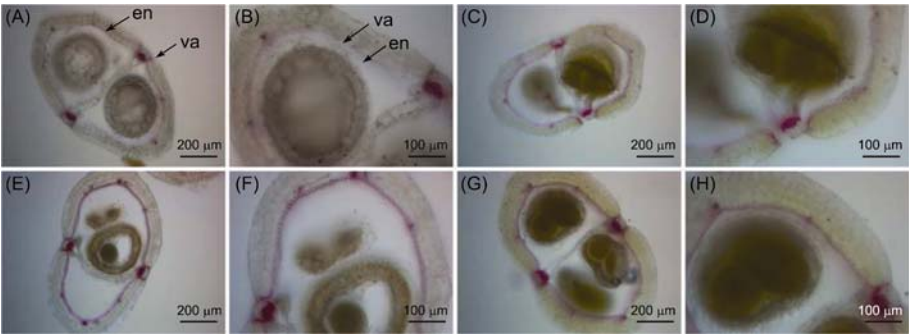


图 8 野生型及转基因拟南芥角果木质素组织化学染色对比

(A)和(B) 野生型植株 8DAF 角果; (C)和(D) 野生型植株 13DAF 角果; (E)和(F) 转基因植株 8DAF 角果; (G)和(H) 转基因植株 13DAF 角果.
va: 果瓣; en: 内果皮

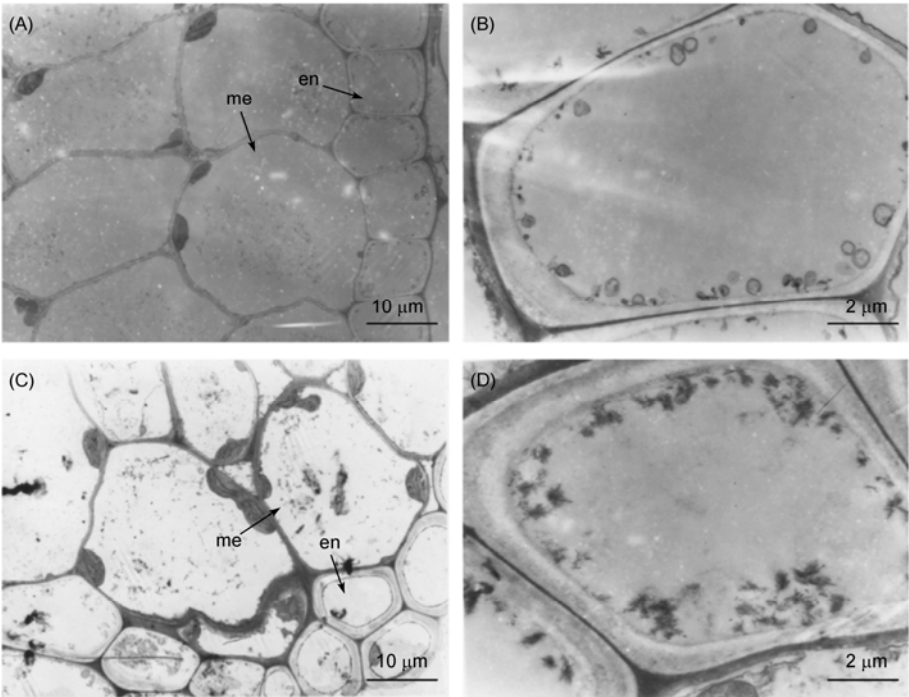


图 9 野生型及转基因拟南芥角果透射电子显微镜图对比

(A) 野生型植株角果果瓣细胞; (B) 野生型植株角果内果皮层细胞; (C) 转基因植株角果果瓣细胞; (D) 转基因植株角果内果皮层细胞.
me: 中果皮; en: 内果皮

表 2 转基因拟南芥角果产率及成熟率^{a)}

	野生型拟南芥	转基因拟南芥	
		SUS3-2	SUS3-15
角果产率(角果总数/植株总数)			
55 天	8.43±0.31	11.07±0.45	10.92±0.19
60 天	17.6±0.42	18.36±0.47	18.27±0.21
成熟率(开裂角果总数/角果总数)			
65 天	0.03±0.002	0.05±0.003	0.05±0.002
67 天	0.05±0.003	0.10±0.003	0.09±0.002
75 天	0.41±0.03	0.52±0.02	0.50±0.01

a) 上述统计重复 3 次($P<0.05$)

致使该 mRNA 被高效地降解, 从而导致该基因表达沉默的现象^[13]. 由于 RNAi 能专一性地抑制基因的表达, 该技术很快成为研究基因功能的一种有效手段, 产生发卡结构 RNA 的载体被广泛应用, 通过转基因在植物中表达 dsRNA, 能有效抑制植物体内靶基因表达^[14]. 当多基因家族中某一基因表达沉默后, 可能会对其他基因的表达产生影响, 引发其他基因的代偿效应. 本实验为了研究拟南芥 *SUS3* 的功能并探究该基因沉默对同家族其他基因表达的影响, 构建了 RNAi-*SUS3* 干扰载体, 转化拟南芥, 经分子检测转基因植株具有良好的干涉效率. 在获得纯系转基因植株的基础上, 对拟南芥 *SUS* 家族进行了表达分析, 并对转基因植株进行了表型、扫描电子显微镜、透射电子显微镜和木质素染色等一系列指标的鉴定.

通过分析不同组织部位 *AtSUS* 基因家族的表达水平, 发现 *AtSUS3* 在野生型植株的花、叶、茎中有表达, 但角果中表达量最高; 在转基因植株中, 该基因在花、叶、茎、莲座叶中无表达, 在角果中仍有少量表达, 可能由于干涉未达到 100% 所致. 与野生型植株相比, 转基因植株角果中 *AtSUS1* 和 *AtSUS4* 的表达量显著增加, 二者同属于双子叶 *SUS1* 亚家族, 具有高度相似的氨基酸序列^[8,15]. 在其他研究中还发现, 这两个基因在缺氧胁迫条件下表达量增加^[8]. *AtSUS2* 基因在角果中特异性高表达, 在转基因植株中该基因的表达量高于野生型, 可能由于 *AtSUS3* 的表达量降低, *AtSUS2* 代偿性增加所引起. *AtSUS5* 和 *AtSUS6* 基因的表达不具有组织特异性, 且二者对胁迫条件无响应^[8]. 本实验发现, *AtSUS5* 基因在各个组织中均没有较高的表达, 而 *AtSUS6* 基因在花中表达量较高, 这与 Baud 等人^[8]的研究结果类似, 但 Fallahi 等人^[16]认为, *AtSUS5* 基因在角果中表达量较高, 而 *AtSUS6* 基因在各个组织中表达量都较低. 其原因可能是培养条件及植株样品采集时期的差异所致.

转基因拟南芥同野生型植株相比, 表型并没有发生明显变化. 而在其他农作物中, *SUS* 基因表达的缺失会引起显著的表型差异. 利用 RNA 干涉技术抑制棉花(*Gossypium hirsutum*)胚珠中 *SUS3* 基因的表达, 可导致纤维细胞分化数目减少, 伸长速度下降以及次生壁加厚受阻, 并产生无纤维表型^[17]. Chourey 等人^[18]的研究表明, 玉米(*Zea mays* L.)*SUS* 基因家族中的 *Sh1* 缺失会引起种粒的缩小及淀粉含量的下降. Zrenner 等人^[19]报道, 在表达 SuSy 反义 RNA 的转基因

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)中, 块茎总干重降低, 可溶性蛋白减少, 淀粉积累受到抑制, 从而导致产量下降. D'Aoust 等人^[20]发现, 番茄(*Solanum lycopersicum* L.)中 SuSy 反义 RNA 的表达导致植株生长率变慢, 座果减少, 成熟时每株果实数量明显减少. Tang 和 Sturm^[21]在研究 SuSy cDNA 反义转化的胡萝卜(*Daucus carota* L.)时发现, 转基因植株的叶片和根显著变小, SuSy 活性的降低也导致了整体植株的矮小. 对此有观点认为, 这些农作物的果实种粒密集或体积较大, 导致了组织内部氧水平的下降, 进而引起 ATP 的供给不足, 为保存能量, 依赖于 SuSy 的蔗糖代谢途径显得尤为重要, 因为该过程不需要消耗能量, 此时若 SuSy 的活性降低, 则会引起一系列有害的效应, 而在转基因拟南芥中可能由于氧限制性代谢的缺乏, 导致相关表型变化不明显^[9]. Bieniawska 等人^[22]研究表明, *AtSUS1/AtSUS4* 双基因突变体拟南芥在通风良好的条件下可正常生长, 而在氧胁迫条件下生长被抑制.

木质素组织化学染色的红色区域边缘厚度及透射电子显微镜分析结果显示, 转基因植株角果内果皮层细胞次生细胞壁有增厚现象. McCollum 等人^[23]认为, SuSy 的活性在合成淀粉或细胞壁的组织中最高, 蔗糖被 SuSy 分解为尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG), 可为细胞壁胼胝质及纤维素的合成提供底物^[3,17,24]. Ruan 和 Churey^[25]发现, 在棉花无纤维突变体中, 胚珠 SuSy 活性下降或没有 SuSy 的转录. Persia 等人^[26]研究表明, SuSy 与烟草(*Nicotiana tabacum*)花粉管细胞壁的合成有关, 从而影响花粉管的形态发生. 由此推测, 本实验转基因植株角果中 *AtSUS1*, *AtSUS2* 和 *AtSUS4* 表达代偿性增加可能引起蔗糖分解反应的加剧, 为细胞壁合成提供了更多的 UDPG, 从而造成内果皮细胞次生细胞壁增厚, 增厚的细胞壁木质化程度也较野生型高. 植物发育越成熟, 木质化程度越高^[27,28], 在 8DAF 及 13DAF 的角果中, 转基因植株内果皮层细胞的木质化程度高于野生型植株, 表明在该阶段转基因植株角果的发育更为优先, 成熟较早. 通过统计角果的产率及成熟率, 也发现转基因植株角果的这两项指标均高于野生型, 进一步支持了上述结论. Angeles-Núñez 和 Tiessen^[29]通过研究 *SUS2*, *SUS3* 突变体拟南芥 9~21DAF 的种子发现, 野生型植株与突变体植株的淀粉含量、己糖/蔗糖比率以及脂肪酸含量在 9DAF 的种子中差异显著, 突变体植株的各项指

标均高于野生型植株,随着种子的发育,差异逐渐减小.说明 *SUS* 突变体植株的种子发育早于野生型植株,这与本实验结论一致.

综上所述,拟南芥中 *SUS3* 基因的沉默不影响植株在正常条件下的生长发育,且还能促使该家族中

AtSUS1, *AtSUS2* 及 *AtSUS4* 基因表达的代偿性增加,使转基因植株的角果内果皮细胞次生细胞壁增厚,有助于角果的发育及成熟.但在逆境胁迫下, *AtSUS3* 基因的沉默是否也能促使该家族中其他基因代偿性表达,使植株正常生长,还有待进一步深入研究.

参考文献

- 1 Cardini C E, Leloir L F, Chiriboga J. The biosynthesis of sucrose. *J Bio Chem*, 1955, 214: 149–155
- 2 Moriguchi T, Yamaki S. Purification and characterization of sucrose synthase from peach (*Prunus persica*) fruit. *Plant Cell Physiol*, 1988, 29: 1361–1366
- 3 Amor Y, Haigler C H, Johnson S, et al. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9353–9357
- 4 Carlson S J, Chourey P S. Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize. *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 303–310
- 5 Elling L. Effect of metal ions on sucrose synthase from rice grains—a study on enzyme inhibition and enzyme topography. *Glycobiology*, 1995, 5: 201–206
- 6 秦巧平, 张上隆, 谢鸣, 等. 果实糖含量及成分调控的分子生物学研究进展. *果树学报*, 2005, 22: 519–525
- 7 卢合全, 沈法富, 刘凌霄, 等. 植物蔗糖合成酶功能与分子生物学研究进展. *中国农学通报*, 2005, 21: 34–37
- 8 Baud S, Vaultier M N, Rochat C. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J Exp Botany*, 2004, 55: 397–409
- 9 Barratt D H P, Derbyshire P, Findlay K, et al. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 13124–13129
- 10 Barratt D H P, Barber L, Kruger N J, et al. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol*, 2001, 127: 655–664
- 11 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 2002. 37–38
- 12 Srivastava L M. Histochemical studies on lignin. *Tappi*, 1966, 49: 173–183
- 13 Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391: 806–811
- 14 毛颖波, 薛学义, 陈晓亚. 植物小 RNA 与 RNA 干扰: 生物学功能与应用前景. *中国科学: 生命科学*, 2009, 39: 31–43
- 15 Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, et al. Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *J Exp Botany*, 2002, 53: 61–71
- 16 Fallahi H, Scofield G N, Badger M R, et al. Localization of sucrose synthase in developing seed and siliques of *Arabidopsis thaliana* reveals diverse roles for SUS during development. *J Exp Botany*, 2008, 59: 3283–3295
- 17 Ruan Y L, Llewellyn D J, Furbank R T. Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell*, 2003, 15: 952–964
- 18 Chourey P S, Taliercio E W, Carlson S J, et al. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Mol Gen Genet*, 1998, 259: 88–96
- 19 Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, et al. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J*, 1995, 7: 97–107
- 20 D'Aoust M A, Yelle S, Quoc B N. Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell*, 1999, 11: 2407–2418
- 21 Tang G Q, Sturm A. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol Biol*, 1999, 41: 465–479
- 22 Bieniawska Z, Barratt D H P, Garlick A P, et al. Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2007, 49: 810–828
- 23 McCollum T G, Huber D J, Cantliffe D J. Soluble sugar accumulation and activity of related enzymes during muskmelon fruit development. *J Am Soc Hort Sci*, 1988, 113: 399–403
- 24 Haigler C H, Datcheva M I, Hogan P S, et al. Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Mol Biol*, 2001, 47: 29–51
- 25 Ruan Y L, Churey P S. A fiberless seed mutation in cotton is associated with lack of fiber cell initiation in ovule epidermis and alterations in sucrose synthase expression and carbon partitioning in developing seeds. *Plant Physiol*, 1998, 118: 399–406

- 26 Persia D, Cai G, Casino C D, et al. Sucrose synthase is associated with the cell wall of tobacco pollen tubes. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1603–1618
- 27 吴锦程, 梁杰, 陈建琴, 等. 采收成熟度与冷藏枇杷果实木质化关系研究. *食品科学*, 2010, 31: 255–259
- 28 杨爱珍, 张志毅, 曹爱娟, 等. 桃果实内果皮发育过程中糖积累与木质素沉积的变化. *园艺学报*, 2009, 36: 1113–1119
- 29 Angeles-Núñez J G, Tiessen A. *Arabidopsis* sucrose synthase 2 and 3 modulate metabolic homeostasis and direct carbon towards starch synthesis in developing seeds. *Planta*, 2010, 232: 701–718

AtSUS3* with RNA interference affects sucrose synthase gene family expression and siliques maturation in *Arabidopsis thaliana

CHAI Jing, QIANG Yi, JIA RongRong, MAO JieLi, QU ShengXian & YU JiaNing

College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Sucrose synthase, a key enzyme to sucrose metabolism, plays an important role in plant growth and development. We constructed RNAi-*SUS3* vector and transferred it into *Arabidopsis* using *Agrobacterium tumefaciens* mediated vacuum infiltration for analyzing the function of *SUS3*. We investigated each *AtSUS*s expression pattern in transcriptional level and compared phenotype in both wild and transgenic plants. We stained lignin of siliques via Wiesner reaction and observed endocarp cells by using transmission electron microscopy. The results show that *AtSUS3* transcriptional expression is suppressed in transgenic plants with no significant phenotypes changing under normal growth condition. However, in transgenic siliques, the expression of *AtSUS1*, *AtSUS2* and *AtSUS4* increase for compensation *AtSUS3* silence. As a result, the secondary wall of endocarp cells in transgenic siliques is thickened and the lignification degree is also enhanced. Compared with wild types, the siliques matured earlier and the valves are thickened in transgenic plants during fruit development and maturity. We conclude that *AtSUS3* silence may promote siliques maturation.

sucrose synthase, RNA interference, compensation, *Arabidopsis thaliana*, silique

doi: 10.1360/052010-549