

胚特异性表达T-6b降低拟南芥种子中碳水化合物含量

靳云凯^{1,2}, 刘春林^{1,2,*}

¹湖南农业大学农学院, 长沙410128

²湖南农业大学湖南省作物种质创新和资源利用国家重点实验室培育基地, 长沙410128

摘要: T-6b为农杆菌T-DNA上的一个起致癌作用的基因, 在营养组织中过量表达后能导致突起和肿瘤的形成; 在胚乳中的过表达能提高胚成熟种子的生物量与含油量。本文用油菜中胚特异性表达*Napin*基因的启动子启动拟南芥T-6b基因的表达。结果显示, 当T-6b在胚表达以后, 种子褶皱, 生物量下降, 种子中多种碳水化合物含量降低。这一结果与T-6b在胚乳中表达的表型结果有所差别。

关键词: T-6b; 胚特异性表达; 种子生物量; 碳水化合物

农杆菌T-DNA中的很多基因都属于一类被称为“发育可塑性”基因家族, 包括3'、5、6a、6b、*rolB*、*rolC*、*orf8*、*orf13*和*lso*等基因, 它们都能够在双子叶植物中诱导肿瘤的产生(Helfer等2002)。6b基因定位在*tml*区域, 存在于所有不同种类农杆菌的T-DNA中, 包括A-6b、AB-6b、C-6b、CG-6b、S-6b、T-6b等6种不同的基因序列(Helfer等2002)。Hooykaas等(1988)首次报道6b基因能够在烟草和长寿花茎中诱导肿瘤的产生。不同农杆菌中的6b基因具有不同的致癌能力, 其中T-6b基因致癌性最强。已有研究表明, T-6b在双子叶植物中的异位表达能够导致多种性状的产生, 包括茎部突起、子叶肥大、异位芽的产生、叶脉增厚、叶柄下垂以及管状叶等一系列的性状(Helfer等2003; Chen和Otten 2016)。这些性状的产生推测是与6b基因在农杆菌侵染部位诱导的突起因子通过韧皮部的移动密切相关, 主要对新生组织产生影响(Helfer等2003; Grémillon等2004)。这一系列性状的产生被认为是由于6b基因过表达诱导在特定的部位聚集大量可溶性糖如葡萄糖、果糖、蔗糖, 渗透压的改变而引起的畸变(Clément等2006)。而之前, Takahashi等(2013)人的研究观察到dex-AK-6b苗中生长素与细胞激动素的异常积累现象, 意味着植物激素对6b现象的形成很重要。

以上研究都是在营养组织中进行的, 而对于T-6b对种子发育过程的影响还很少有报道。近期Jin等(2017a)研究发现, 当T-6b基因在胚乳中特异性表达以后, 不导致畸形, 而是种子体积增大, 生物量增加, 同时还可以改变成熟种子中的碳源分配, 除葡萄糖以外的可溶性糖和淀粉含量都明显

降低, 而油脂的含量明显升高, 说明T-6b在种子中的过表达能够产生出与营养器官中过表达完全不同的性状。如果让T-6b直接在胚中表达而不是在胚乳中表达, 会产生什么样的表型? 本文利用油菜胚特异性启动子启动T-6b基因在拟南芥胚中特异性表达。结果显示, 当T-6b在胚中特异性表达后, 成熟种子中的葡萄糖、蔗糖、淀粉以及种皮粘液质等类的碳水化合物含量都明显降低, 具有与胚乳中特异性表达相似的性状, 不同的是胚特异性表达T-6b的种子变皱缩, 产量降低, 说明不同部位表达的T-6b能够导致不同的生物性状, 为后期对T-6b的利用提供了更好的指导。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]哥伦比亚生态型Col-0、根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α和载体pFGC5941:p*Napin*均由湖南农业大学植物发育与表观遗传调控实验室提供, 质粒DNA微量提取试剂盒和凝胶DNA微量回收试剂盒购自Magen公司。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥生长

将播种在营养土中的拟南芥种子春化3 d后放在温室中生长, 生长条件为: 温度22°C、湿度70%, 光照周期为16 h光照/8 h黑暗。

收稿 2018-01-07 修定 2018-06-11

资助 国家自然科学基金(31571707)。

* 通讯作者(liucl@hunau.edu.cn)。

1.2.2 拟南芥遗传转化及转基因植株检测

将我们已克隆的甘蓝型油菜种子储藏蛋白 *NapinA* 基因启动子(Stålberg等1993; Ellerström等1996; Peng等2010)与 *T-6b* 基因(核酸位置为1~1 101; GenBank序列号为J02798)连接, 参照胡佳等(2017)载体构建方法构建得到质粒pFGC5941-p*Napin*: *T-6b*, 通过根瘤农杆菌GV3101介导的浸花法转化拟南芥 Col-0。T₀代种子成熟后铺在含有草铵膦(25 mg·L⁻¹)的1/2MS培养基上进行筛选, 2周后将抗性植株转至装有营养土的小钵中生长。待植株生长2周后, 用CTAB法提取植株DNA进行PCR检测, 检测呈阳性的为T₁代转基因植株, 转基因植株命名为N6b。载体构建所用到的引物如表1所示。

1.2.3 种子观察及统计学分析

对得到的纯合子种子利用SMZ1000 (Nikon)型体视显微镜进行表型观察, 并按照Jin等(2017a)的方法对种子百粒重、单果荚种子重、每个果荚中种子数量以及每株种子重量进行统计学分析。

1.2.4 RNA提取及qPCR分析

在下午3:00采取授粉后天数(day after flower, DAF) 4 (胚乳发育期)、7 (胚乳发育期)、12 (胚发育期)和15 d (胚发育期)的果荚为实验材料, 用TRIzol法提取RNA (陈容钦等2017)。以1 μg RNA为模板反转录得到cDNA, 待cDNA稀释至5 ng·μL⁻¹后, 取3 μL进行荧光定量PCR (qPCR), 分析基因 *T-6b*、*IKU1*、*IKU2*、*MINI3*、*APS1*和 *Glabra2* 的相对表达水平。

qPCR程序为: 预变性95°C 4 min; 变性95°C 30 s; 退火和延伸60°C 30 s, 40个循环(包括变性、退火和延伸)。溶解曲线设置为从60°C升到95°C, 速率0.05°C·s⁻¹。qPCR结果以 *Actin2* 做内参, 用相对C_t值计算方法进行计算。qPCR分析所用到的引物如表1所示。

1.2.5 种子中葡萄糖、蔗糖和淀粉含量的测定

以发育完全成熟的拟南芥种子为实验材料, 利用Megazyme公司(Bray, Co. Wicklow, Ireland)试剂盒CFHN-SUCGL、CFHN-K-TSTA, 按照说明书对葡萄糖、蔗糖和淀粉含量进行测定, 具体操作参见Jin等(2017a)方法。

1.2.6 种皮粘液质染色

种皮粘液质的观察采用钉红染色法, 对成熟种子种皮的粘液质进行染色, 具体参见Jin等(2017a)方法进行, 染色结果用SMZ1000(Nikon)型体视显微镜进行表型观察。

2 实验结果

2.1 胚特异性表达 *T-6b* 降低拟南芥种子生物量

对转基因植株种子发育4个时期的 *T-6b* 表达谱进行分析。结果显示, 在授粉后4和7 d (胚乳为主的发育时期) *T-6b* 表达量极低, 在授粉后12和15 d (种子胚快速发育时期) 表达量很高(表2), 说明 *NapinA* 基因的启动子能够启动 *T-6b* 基因在拟南芥种子胚发育时期有较高水平的表达, 而在胚乳发育时期表达量很低。

表1 本文中使用的引物

Table 1 Primers used in present paper

引物名称	序列(5'→3')	用途
IKU1F	AGTTTTGGTCTAATACAGCTGAG	表达分析
IKU1R	GGTTGAGACTGAGACTGAGATT	表达分析
IKU2F	CGTGTGAGACAAGCGTTAGC	表达分析
IKU2R	GAGGAGACTTGTCCGTGCAT	表达分析
MINI3F	TTTGATGATATTGCAACGGAA	表达分析
MINI3R	GATCCTTTGTGTCTTGCTTGT	表达分析
APS1F	TTCCTGATTTTAGTTTCTATGACCG	表达分析
APS1R	TGATGAATTTTGAGTTCTTGATAA	表达分析
Glabra2F	GAAGCTCGTCGGCATGAGTGGG	表达分析
Glabra2R	TCTCTCGATTTCACTGTCTGGATTG	表达分析
Actin2F	ATGGCTGAGGCTGATGATATTCAAC	表达分析
Actin2R	TCTCAGCACCAATCGTGATGACTTG	表达分析
T-6bF	CCTTAATTAAGGCTATGCCGAAAGACGGCTTGACCCT	载体构建
T-6bR	CCTTAATTAAGGCTATGCCGAAAGACGGCTTGACCCT	载体构建

表2 在种子不同发育期T-6b基因的表达情况

Table 2 Expression levels of T-6b at different development stages of seed

授粉后时间/d	T-6b基因相对表达量
4	1.000
7	0.494
12	5 790.727
15	4 146.568

在筛选得到转基因纯合子以后, 根据种子表型的观察结果所示, 与野生型拟南芥Col-0种子相比, N6b种子明显皱缩, 体积变小(图1)。对种子百粒干重、每个果荚种子干重、每个果荚种子数目以及每株种子干重进行了统计分析, 结果显示, 与野生型相比, N6b的百粒干重、每果荚种子干重、每果荚种子数目和每株种子干重都显著降低(表3)。

根据已报道文献可知, *IKU1* (*HAIKU1*, AT2G-35230)、*IKU2* (*HAIKU2*, AT3G19700)和*MINI3* (*MINISEED3*, AT1G55600)这三个基因都与种子的大小和生物量明显相关, 它们表达量升高能够导致种子体积变大(Luo等2005)。为了研究N6b种子体积和生物量变小的原因, 本文对这三种基因进行了定

量PCR分析。结果(图2)显示, N6b种子中的*IKU1*、*MINI3*基因分别在授粉后7和12 d的表达量明显低于野生型, 而在授粉后15 d和野生型相比没有明显差异; 而*IKU2*基因在授粉后15 d明显低于野生型, 而在授粉后7和12 d与野生型相比没有明显变化。

2.2 胚特异性表达T-6b降低种子中碳水化合物的含量

根据已有报道(Clément等2006)可知, T-6b主要通过调节表达部位碳水化合物含量来改变生物表型。为了研究T-6b在胚特异性表达以后对成熟种子中碳水化合物含量的影响, 本文对成熟种子中的葡萄糖、蔗糖和淀粉含量以及控制淀粉合成的关键基因*APSI*进行了分析。根据图3显示, N6b成熟种子中的葡萄糖、蔗糖和淀粉的含量都显著低于野生型。同时, N6b中*APSI*基因在授粉后7和12 d的表达量都明显低于野生型, 与淀粉测定结果相符合(图4-A)。

种皮粘液质作为另外一类碳水化合物附着在拟南芥种皮, 其合成水平与*GLABRA2*基因的表达情况密切相关。因此本文检测了*GLABRA2*基因在不同种子发育时期果荚中的表达情况。由结果(图4)可以看出, N6b不同发育时期种子中*GLABRA2*的

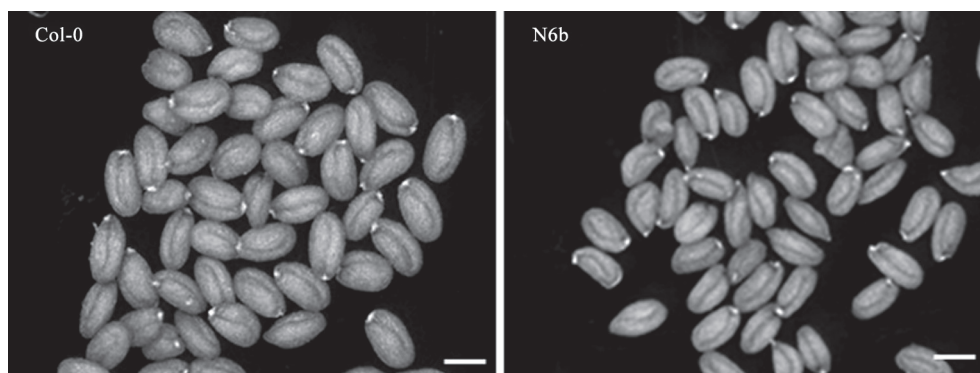


图1 野生型拟南芥(Col-0)种子与转T-6b拟南芥(N6b)种子的表型

Fig.1 The phenotype of seeds in wild type *Arabidopsis* (Col-0) and transgenic *Arabidopsis* (N6b) 标尺=300 μ m。

表3 拟南芥Col-0与N6b的成熟种子生物量的比较

Table 3 Biomass comparison of mature seeds corresponding to Col-0 and N6b

拟南芥	百粒干重/mg	每个果荚种子干重/mg	每个果荚种子数目/粒	种子干重/mg·株 ⁻¹
Col-0	2.375±0.064	0.95±0.049	44±2.22	616.3±3.90
N6b	2.000±0.083**	0.72±0.049**	40±1.33**	566.0±4.64**

**表示P<0.01水平上显著差异。

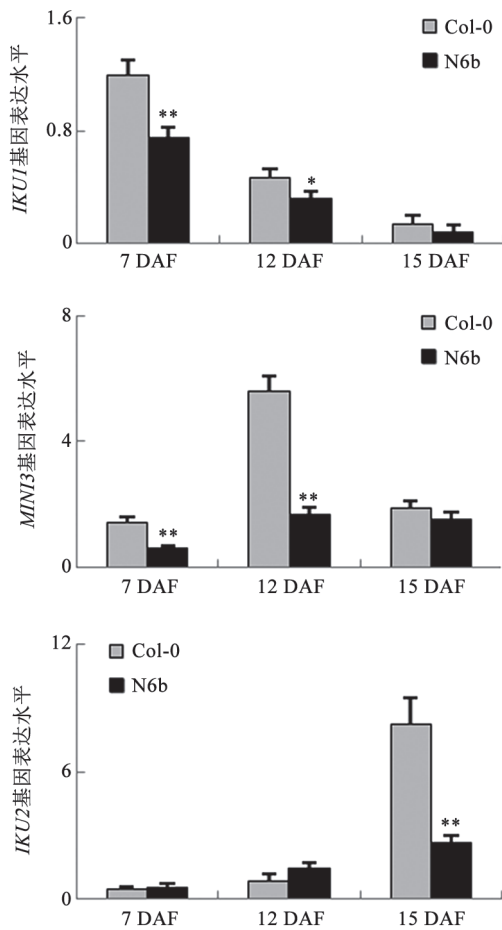


图2 不同发育时期Col-0与N6b种子中*IKU1*、*MINI3*和*IKU2*的表达情况

Fig.2 Expression level of *IKU1*, *MINI3* and *IKU2* in the seeds of Col-0 and N6b at different development stages

**和*分别表示 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$ 水平上显著差异, 下图同此。

表达量都极显著低于野生型, 推测N6b种子中种皮粘液质合成能力降低。

为了进一步验证该推测, 本文对种子表面的种皮粘液质进行了染色观察。根据染色结果显示, 在直接染色和浸泡后染色的情况下, 野生型拟南芥种子种皮粘液质的含量(图5-A和C)都明显高于N6b(图5-B和D)。

3 讨论

根据有关*T-6b*的报道可以看出, 当*T-6b*在营养器官中过表达以后, 具有很强的致癌性, 导致器官突起或畸变(Helfer等2003; Bonnard等1989; Tinland等1989)。而当*T-6b*在拟南芥胚乳发育时期特异性

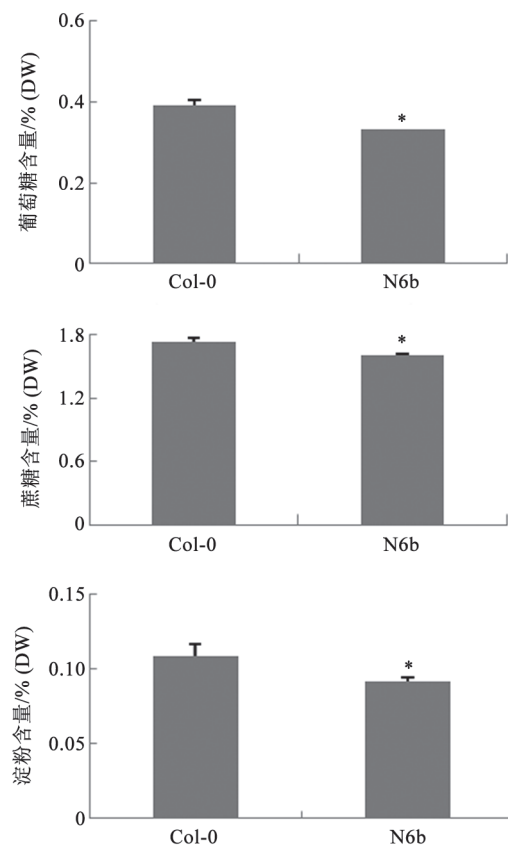


图3 Col-0和N6b成熟种子中碳水化合物含量分析
Fig.3 Analysis of carbohydrate contents in the mature seed of Col-0 and N6b

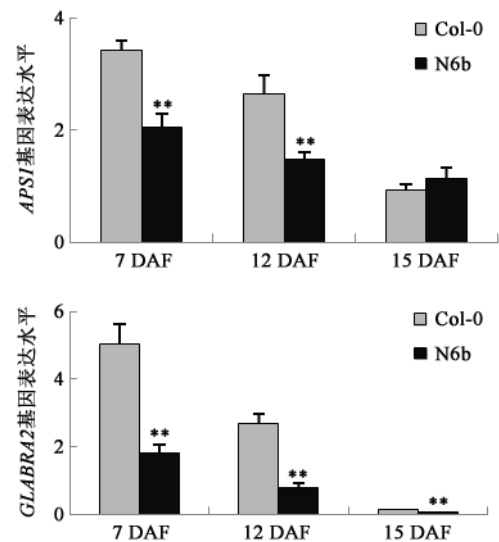


图4 淀粉合成关键基因*APS1*和种皮粘液质代谢关键基因*GLABRA2*的表达分析

Fig.4 Analysis of expression of *APS1* and *GLABRA2* gene

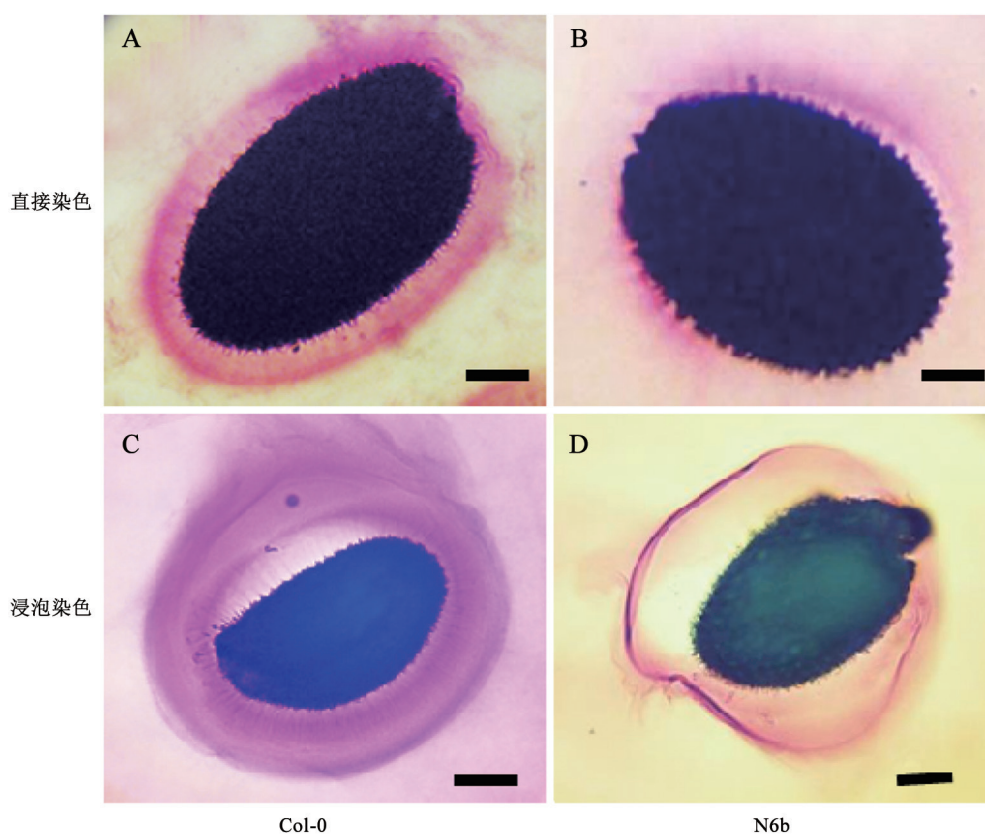


图5 Col-0和N6b的种皮粘液质染色分析

Fig.5 Analysis of mucilage staining in Col-0 and N6b

A和B: Col-0和N6b的种子经钨红染色后直接观察的结果; C和D: Col-0和N6b的种子经水浸泡1 h后钨红染色观察结果。标尺A和B=100 μ m, C和D=200 μ m。

表达以后,并不导致种子的畸形发育,而是导致成熟种子的生物量和含油量都明显高于野生型(Jin等2017b)。根据本文研究结果可以看出,当T-6b基因在拟南芥胚中特异性表达以后,得到了与在胚乳表达不同的结果,即拟南芥种子皱缩,种子生物量降低,T-6b在种子胚乳中的作用与在胚中正好相反。说明T-6b在不同组织中表达的作用效果不同。另外,当T-6b在胚乳中特异性表达以后,成熟种子中的蔗糖、淀粉以及种皮粘液质的含量都明显低于野生型,而葡萄糖含量高于野生型(Jin等2017a)。本文实验结果显示,N6b成熟种子的蔗糖、淀粉和种皮粘液质的含量也都明显低于野生型,与T-6b在胚乳中特异性表达不同的是N6b中葡萄糖含量也明显低于野生型。以上结果说明,T-6b在营养器官和生殖器官中表现出的生物学功能都与其对糖代谢与碳分配调控结果密切相关。本文的研究进一步补充了T-6b的生物学功能,为后期对T-6b的利用和研究提供基础。

参考文献(Reference)

- Bonnard G, Tinland B, Paulus F, et al (1989). Nucleotide sequence, evolutionary origin and biological role of a rearranged cytokinin gene isolated from a wide host range biotype III *Agrobacterium* strain. *Mol Gen Genet*, 216 (2-3): 428-438
- Chen K, Otten L (2016). Morphological analysis of the *6b* oncogene-induced enation syndrome. *Planta*, 243 (1): 131-148
- Chen RQ, Shu W, Ge K, et al (2017). Effect on growth and expressions of stress-related genes in peanut under drought stress training. *Plant Physiol J*, 53 (10): 1921-1927 (in Chinese with English abstract) [陈容钦, 舒文, 葛奎等 (2017). 干旱胁迫训练对花生生长及胁迫相关基因表达的影响. *植物生理学报*, 53 (10): 1921-1927]
- Clément B, Pollmann S, Weiler E, et al (2006). The *Agrobacterium vitis* T-6b oncoprotein induces auxin-independent cell expansion in tobacco. *Plant J*, 45 (6): 1017-1027
- Ellerström M, Ståhlberg K, Ezcurra I, et al (1996). Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Mol Biol*, 32 (6): 1019-1027

- Grémillon L, Helfer A, Clément B, et al (2004). New plant growth-modifying properties of the *Agrobacterium* T-6*b* oncogene revealed by the use of a dexamethasone-inducible promoter. *Plant J*, 37 (2): 218–228
- Helfer A, Clément B, Michler P, et al (2003). The *Agrobacterium* oncogene AB-6*b* causes a graft-transmissible enation syndrome in tobacco. *Plant Mol Biol*, 52 (2): 483–493
- Helfer A, Pien S, Otten L (2002). Functional diversity and mutational analysis of *Agrobacterium* 6B oncoproteins. *Mol Genet Genom*, 267: 577–586
- Hooykaas PJJ, den Dulk-Ras H, Schilperoort RA (1988). The *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA gene 6*b* is an oncogene. *Plant Mol Biol*, 11 (6): 791–794
- Hu J, Zeng WJ, Liu CL (2017). The establishment of oil body content determination system with GUS staining observation in leaves. *Plant Physiol J*, 53 (2): 185–190 (in Chinese with English abstract) [胡佳, 曾文婕, 刘春林(2017). 叶片中GUS染色观测油体含量技术体系的建立. *植物生理学报*, 53 (2): 185–190]
- Jin Y, Fei M, Rosenquist S, et al (2017b). A dual-promoter gene orchestrates the sucrose-coordinated synthesis of starch and fructan in barley. *Mol Plant*, 10: 1556–1570
- Jin Y, Hu J, Liu, X, et al (2017a). T-6*b* allocates more assimilation product for oil synthesis and less for polysaccharide synthesis during the seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Biotechnol Biofuels*, 10: 19
- Luo M, Dennis ES, Berger F, et al (2005). *MINISEED3* (*MINI3*), a WRKY family gene, and *HAIKU2* (*IKU2*), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (48): 17531–17536
- Peng Q, Hu Y, Wei R, et al (2010). Simultaneous silencing of *FAD2* and *FAE1* genes affects both oleic acid and erucic acid contents in *Brassica napus* seeds. *Plant Cell Rep*, 29: 317–325
- Stålberg K, Ellerström M, Josefsson LG, et al (1993). Deletion analysis of a 2S seed storage protein promoter of *Brassica napus* in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, 23 (4): 671–683
- Takahashi S, Sato R, Takahashi M, et al (2013). Ectopic localization of auxin and cytokinin in tobacco seedlings by the plant-oncogenic AK-6*b* gene of *Agrobacterium tumefaciens* *AKE10*. *Planta*, 238 (4): 753–770
- Tinland B, Huss B, Paulusn F, et al (1989). *Agrobacterium tumefaciens* 6*b* genes are strain-specific and affect the activity of auxin as well as cytokinin genes. *Mol Genet*, 219 (1): 217–224

The special expression of T-6*b* in embryo decreases carbohydrates contents in seed of *Arabidopsis thaliana*

JIN Yun-Kai^{1,2}, LIU Chun-Lin^{1,2,*}

¹College of Agriculture, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China

²Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China

Abstract: As an oncogene located in T-DNA region in *Agrobacterium tumefaciens*, T-6*b* can induce enation and tumors with its over-expression in vegetative tissues and increase the biomass and oil contents of mature seeds expressed in endosperm. In this paper, T-6*b* was fused to the promoter of *Napin* that could be specially expressed in the embryo of *Brassica napus* seed. The results showed that with the expression of T-6*b* in the embryo of *Arabidopsis thaliana* seed, the seed became wrinkled, and the contents of biomass and carbohydrates were decreased. These results were different from the phenotypic results of T-6*b* expression in endosperm.

Key words: T-6*b*; embryo-special expression; seed biomass; carbohydrates

Received 2018-01-07 Accepted 2018-06-11

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31571707).

*Corresponding author (liucl@hunau.edu.cn).