

· 研究报告 ·

甘蓝型油菜 *BnTTG1-1* 基因的功能分析

刘凯歌, 齐双慧, 段绍伟, 李东, 金倡宇, 高晨浩, 刘绚霞, 陈明训*

西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100

摘要 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) AtTTG1 作为 WD40 重复转录因子存在于细胞核中, 对表皮毛形成、花青素合成和储藏物质积累等具有重要调节作用。该研究从甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 品种秦优7号中克隆获得了 *BnTTG1-1* 基因的全长 CDS 序列, 对其进行了烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 叶片细胞的亚细胞定位研究, 检测了 *BnTTG1-1* 在油菜 (*B. campestris*) 中的时空表达模式, 并比较分析了 *BnTTG1-1* 对多个生物学过程的影响作用。结果表明, *BnTTG1-1* 定位于烟草叶片细胞的细胞核中, 推测其作为转录因子发挥调节作用。*BnTTG1-1* 广泛存在于油菜营养组织和发育的种子中。在突变体 *ttg1-13* 背景下, 异源表达 *BnTTG1-1* 基因能够完全恢复该突变体的多个表型, 如无表皮毛形成和花青素合成、种皮呈黄色、种子脂肪酸和储藏蛋白含量高以及在种子萌发和幼苗形态建成过程中对高葡萄糖和高盐胁迫耐受力差等。由此可知, 甘蓝型油菜 *BnTTG1-1* 与拟南芥 AtTTG1 在植物生长发育的多个生物学过程中具有类似的功能。

关键词 TTG1, 甘蓝型油菜, 拟南芥, 功能互补

刘凯歌, 齐双慧, 段绍伟, 李东, 金倡宇, 高晨浩, 刘绚霞, 陈明训 (2017). 甘蓝型油菜 *BnTTG1-1* 基因的功能分析. 植物学报 52, 713–722.

甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 是我国最重要的油料作物之一。菜籽油不仅是良好的食用油, 而且是制造医药品和化妆品等多种化工产品的原料。1960年, 瑞典科学家首次从人工合成的甘蓝型油菜中找到了黄籽单株。1975年, 我国科学家也发现了甘蓝型黄籽油菜 (刘后利等, 1979)。该类油菜具有种皮薄、木质素和多酚含量低、油与饼粕蛋白质含量高 (张子龙和李加纳, 2001) 等优点, 备受全球油菜育种学家的青睐。尽管我国在甘蓝型油菜黄籽育种方面取得了重要成就, 已育成黄杂1号、华黄1号、宁油10号、湘杂油631、渝黄1号、渝黄4号、油研817和油研9号等多个代表性优良品种, 但到目前为止, 甘蓝型黄籽油菜种子含油量高的分子机制及其调控网络仍不清楚, 且该方面仍是油菜研究中的一个重要热点。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中含有丰富的类黄酮, 主要包括原花青素、花青素和黄酮醇3种, 它们的存在使得花、茎和种子等组织呈现不同的颜色 (Koes et al., 1994; Shirley, 1996; Mol et al., 1998; Nesi et al., 2001; Lepiniec et al., 2006)。拟南芥中 AtTT2 (TRANSPARENT TESTA 2)、AtTT8 (TRANS-

PARENT TESTA 8) 以及 AtTTG1 (TRANSPARENT TESTA GLABRA 1) 分别作为 MYB、bHLH 与 WD40 型转录因子通过形成转录复合体进而调控类黄酮的生物合成 (Debeaujon et al., 2003; Lepiniec et al., 2006; Xu et al., 2014)。此外, AtTTG1 在调控种子发育和储藏物质积累 (Tsuchiya et al., 2004; Chen et al., 2015)、种皮黏液产生 (Shirley et al., 1995; Western et al., 2001; Nguyen et al., 2013)、种子休眠 (Debeaujon et al., 2000)、表皮毛形成 (Walker et al., 1999; Chen et al., 2015) 和根毛发育 (Koornneef, 1981) 等方面起着重要作用。

油菜是与拟南芥亲缘关系最近的油料作物之一, 两者基因组同源性很高。因此, 拟南芥的研究成果可以作为油菜研究的重要参考。对油菜的研究表明, *BnTTG1-1* (NCBI 编号为 EF175930) 在油菜种子和根中表达量较低, *BnTTG1-2* (NCBI 编号为 EF175931) 在油菜各个组织中均有表达 (Lu et al., 2009)。目前, 关于 *BnTTG1* 在表皮毛形成、花青素合成、种子储藏物质积累以及非生物逆境胁迫等方面的调节作用尚未见报道。本研究从甘蓝型油菜品种秦优7号中获得

收稿日期: 2016-12-05; 接受日期: 2017-04-03

基金项目: 国家自然科学基金 (No.31501336)、西北农林科技大学引进人才启动经费 (No.Z111021402) 和优青培养科研专项 (No. Z109021517)

* 通讯作者。E-mail: cmx786@nwfau.edu.cn

了*BnTTG1-1*基因的全长CDS序列,检测了该基因在油菜不同组织中的表达模式,推测它作为转录因子发挥调节作用。同时,在拟南芥缺失突变体*ttg1-13*基础上异源表达该基因能够完全恢复突变体的一系列表型,如无表皮毛形成和花青素合成、种皮呈黄色、种子脂肪酸和储藏蛋白含量高、在种子萌发和幼苗形态建成过程中对高葡萄糖与高盐胁迫耐受力差等。本研究不仅为深入阐明*BnTTG1*基因在油菜中的调控机制奠定了坚实的基础,而且有助于人们进一步了解黄籽油菜油脂积累的调控机制,从而为油菜育种提供基因元件和理论支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料与培养

本实验所用遗传材料有甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)品种秦优7号、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)哥伦比亚野生型Col-0和功能缺失突变体*ttg1-13* (Liu et al., 2017)。秦优7号种植于陕西杨凌西北农林科技大学南校区科研温室。拟南芥种植于人工生长箱内,温度为22°C,16小时光照/8小时黑暗,光照强度为160 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

1.2 总RNA提取和cDNA合成

利用MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa, Code No.9769)提取秦优7号不同组织和开花后不同发育时期(15、20、25、28、33和35天)种子以及拟南芥幼嫩叶片总RNA。使用NanoDrop ND-1000检测RNA的浓度和质量,用琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。使用PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Code No.6210A)完成cDNA第1链的合成。

1.3 基因表达分析

利用半定量RT-PCR和荧光定量qRT-PCR技术分析基因的表达情况。按照SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa, Cat No. DRR820A)使用说明书对本研究相关基因的表达量进行荧光定量PCR分析。PCR体系: SYBR[®]Premix Ex Taq 10 μL , 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各1 μL , cDNA 2 μL (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), RNase Free

ddH₂O加至20 μL 。在Bio-Rad荧光定量PCR仪上进行反应,反应程序为: 95°C预变性60秒; 95°C20秒, 58°C20秒, 72°C45秒, 40个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线以及溶解曲线,采用2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法分析结果 (Livak and Schmittgen, 2001)。每个样品设3次重复。荧光定量PCR过程中所需的引物序列见表1。

1.4 基因克隆和植物表达载体构建

依据NCBI数据库中*BnTTG1*全长CDS序列(编号分别为EF175930、EF175931、EU192030和EU192031)设计特异引物(表1),以秦优7号发育种子cDNA为模板,进行PCR扩增。具体扩增程序如下: 98°C变性30秒; 98°C10秒, 58°C15秒, 72°C60秒, 32个循环; 72°C延伸5分钟。切胶回收后连接pMD18-T载体 (Code No. D101A),随机挑选6个阳性克隆进行测序。测序结果序列一致,表明我们从秦优7号中成功获得了*BnTTG1-1*基因的全长CDS序列。用限制性内切酶*Xma*I和*Spe*I进行双酶切,并与用相同限制酶酶切处理的pGreen和pGreen-GFP载体连接转化大肠杆菌DH5 α ,筛选出阳性克隆,得到该基因植物表达载体35S:*BnTTG1-1*和35S:*BnTTG1-1-GFP*。提取阳性克隆质粒,转化农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101),在含有50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那(Kana)以及25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平(Rif)的培养基上挑取单克隆进行PCR鉴定。使用农杆菌花序浸泡法(Clough and Bent, 1998)转染拟南芥突变体*ttg1-13*,将收获的种子均匀散播在营养土上,待真叶长出后喷施除草剂(Basta)。将抗性苗移至新的营养土中生长,待成熟后收集种子即获得T₀代,继续筛选,直至获得T₃代纯合体种子(作为实验材料备用)。

1.5 烟草叶片细胞的亚细胞定位

取100 μL 在-80°C超低温冰箱保存的阳性农杆菌菌株(35S::*BnTTG1-GFP*),放入3 mL LB培养液(含有50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那和20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平)中摇菌。菌液混浊至OD₆₀₀达1.8-2.0时,在常温下1 800 $\times\text{g}$ 离心10分钟。弃上清液,用重悬液(10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS)重悬菌体使OD₆₀₀达0.4-1.0,将重悬菌液静置2-3小时,用注射器将其从烟草叶片下表皮注射入叶片内。72小时后,用注射

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Annotation
AtACTIN7-F	GCCCCTGAGGAGCACCCAGTT	RT-PCR
AtACTIN7-R	CCGGTTGTACGACCACTGGCA	
BnTTG1-1-F	GCCAGTATCCGTCCTCAACA	RT-PCR
BnTTG1-1-R	CTCCCAGATAAGAGCCTGCG	
BnACTIN7-F	GGAGCTGAGAGATTCCGTTG	qRT-PCR
BnACTIN7-R	GAACCACCACTGAGGACGAT	
BnTTG1-1-F	CTGCAGTGGTCTTCTTCGTT	qRT-PCR
BnTTG1-1-R	GTTACAATCACATAGATGCAGAGAC	
BnTTG1-1-Xma1-F	TATTcccgggATGGACAACCTCAGCTCCAGACTC	35S: <i>BnTTG1-1-GFP</i> and 35S: <i>BnTTG1-1</i>
BnTTG1-1-Spe1-R	GGactagtAACTCTAAGGAGCTGCATTTTGTAGC	

器吸取适量DAPI染液($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris pH7.4, $5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DAPI)注入上述烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片。20分钟后,剪取小块成功染色的非注射区域叶片,用PBS Buffer洗去未染色的游离DAPI染液,制成临时装片,然后在共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.6 种子脂肪酸含量的测定

按照文献报道的方法(Mu et al., 2008; Chen et al., 2012a)提取并测定拟南芥种子脂肪酸含量。操作步骤如下:称取8 mg种子放入4 mL $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸甲醇溶液提取液(内标浓度为 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)中, 80°C 水浴2小时提取脂肪酸并酯化,避光冷却至室温后,加入2 mL 0.9% NaCl (w/v)终止酯化反应,再加入1 mL正己烷进行萃取,在振荡器上充分振荡混匀后,以 $250\times\text{g}$ 转速离心5分钟,随后吸取上层的有机相700 μL 至气相GC小瓶中, 4°C 避光保存。利用日本岛津公司生产的气相色谱仪(GC-2014)进行脂肪酸分析,用面积归积法计算脂肪酸含量。

1.7 种子储藏蛋白含量的测定

取20粒拟南芥种子于1.5 mL离心管中,放入液氮中研磨,磨碎后加入200 μL 的提取液($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 苯甲基磺酰氟, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 10% (v/v) pH7.5乙二醇,少许不溶性交联PVP)。 4°C 、 $22\ 000\times\text{g}$ 离心10分钟后,吸取上清液,依据Brad-

ford (1976)的方法对上清液中的蛋白质含量进行定量分析。

1.8 非生物胁迫下种子发芽和幼苗形态建成分析

同时收获在同一时间种植并在相同条件下生长的拟南芥野生型Col-0、突变体*ttg1-13*和纯合转基因株系*ttg1-13 35S::BnTTG1*的种子,室温下放置4周至完全成熟,放入 -20°C 冰箱中保存备用。用于抗性实验的种子先在 4°C 冰箱中预冷5天,再用75% (v/v)的乙醇清洗种子表面30–60秒,重复2次,之后用 ddH_2O 冲洗5遍,铺种于含3% (w/v)蔗糖和 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的MS固体培养基平板上,以无任何胁迫处理的MS平板作为对照。将胚根露出种皮定义为种子萌发,将幼苗长出2片真叶能够独立进行光合作用定义为幼苗完成形态建成(Cernac et al., 2006)。每天统计各株系种子的发芽率,并在铺种17天对拟南芥幼苗进行拍照。

2 结果与讨论

2.1 *BnTTG1-1*在种子发育过程中的表达模式分析

从甘蓝型油菜秦优7号中克隆得到的QINYOU.*BnTTG1*蛋白质序列与NCBI数据库中的*BnTTG1-1* (编号为EF175930)蛋白质序列完全相同,因此, QIN-YOU.*BnTTG1*在本文中命名为*BnTTG1-1*。*BnTTG1-1*基因在秦优7号不同营养组织中的表达模式与前人的研究结果一致(Lu et al., 2009)。我们发现,在种子发

育过程中, *BnTTG1-1*基因的表达从15天开始平稳增加, 28天时达到最大值, 随后逐步下降(图1)。

2.2 *BnTTG1-1*定位于烟草叶片细胞的细胞核中

油菜与拟南芥同属十字花科, 是与拟南芥亲缘关系最近的经济作物之一。拟南芥基因组中的每个基因在甘蓝型油菜基因组中都有2–8个同源拷贝(Osborn et al., 1997; Cavell et al., 1998)。由图2可知, *BnTTG1-1*定位于烟草叶片细胞的细胞核中。拟南芥*AtTTG1*为WD40型转录因子, 因此可以推测*BnTTG1-1*也作为转录因子发挥调节作用。

2.3 *BnTTG1-1*参与调节表皮毛的形成和花青素的合成

为了鉴定*BnTTG1-1*基因的功能, 我们构建了35S:*BnTTG1-1*植物表达载体, 并转入拟南芥突变体*ttg1-13*中, 通过抗除草剂筛选, 成功获得了T₁代转基因植株。通过对其中4个单株进行PCR鉴定, 结果显示, *ttg1-13* 35S:*BnTTG1-1*转基因植株#1、#2、#3和#4在DNA及RNA水平上均检测到该基因的存在(图3A), 说明成功获得了*ttg1-13* 35S:*BnTTG1-1*转基因植株。之后, 对T₃代纯合植株进行表型鉴定(图3B), 与突变体*ttg1-13*相比, 转基因植株能够完全恢复突变体无表皮毛和花青素的表型, 表明*BnTTG1-1*具有与拟南芥*AtTTG1*类似的功能, 参与调节表皮毛形成和花青素合成等生物学过程。

2.4 *BnTTG1-1*对种皮颜色具有调节作用

在突变体基础上异源表达*BnTTG1-1*基因能够完全恢复*ttg1-13*突变体黄色种皮至野生型水平(图4A)。然而, 对种子大小和重量无明显影响(图4B), 表明*BnTTG1-1*与*AtTTG1*均不影响种子的大小和重量, 但可以通过调节花青素的合成影响种皮的颜色。

2.5 *BnTTG1-1*调节种子储藏物质的积累

由图5可知, 与野生型Col-0相比, 突变体*ttg1-13*种子脂肪酸和蛋白质的含量都显著增加, 而*ttg1-13* 35S:*BnTTG1-1*转基因植株种子的储藏蛋白和脂肪酸含量与野生型相比无显著差异, 表明*BnTTG1-1*参与调节种子储藏物质的积累, 并与*AtTTG1*具有相似的调节作用。

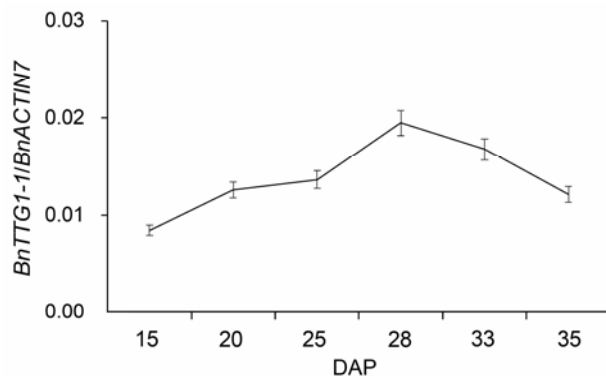


图1 qRT-PCR分析*BnTTG1-1*基因在甘蓝型油菜秦优7号种子不同发育时期的表达模式(平均值±标准差)
DAP: 授粉后的天数。 *BnACTIN7*为内参基因。

Figure 1 qRT-PCR analysis of *BnTTG1-1* expression in developing seeds at different developmental stages in *Brassica napus* cv. 'QINYOU Seven' (means±SD)
DAP: Days after pollination. The qRT-PCR result was normalized against the expression of *BnACTIN7* as an internal control.

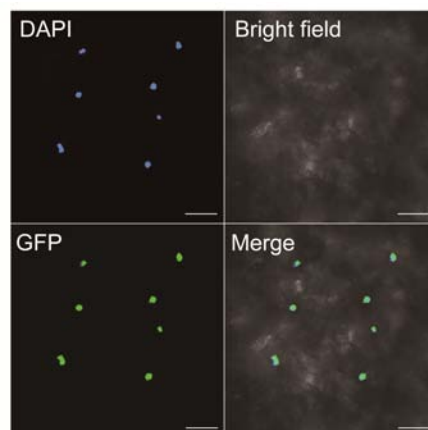


图2 *BnTTG1-1*在烟草叶片细胞中的亚细胞定位
DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚; GFP: 绿色荧光蛋白; Merge: DAPI、GFP和亮场3个图像的合并图像。Bars=5 μm

Figure 2 Subcellular localization of *BnTTG1-1* protein fused with GFP (35S:*BnTTG1-1*-GFP) in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) leaf cells

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; GFP: Green fluorescent protein; Merge: Merged picture of bright, DAPI, and GFP fields. Bars=5 μm

2.6 非生物胁迫下*BnTTG1-1*对种子萌发和幼苗形态建成的影响

在无胁迫处理的MS培养基上, 野生型、突变体*ttg1-13*和转基因植株*ttg1-13* 35S:*BnTTG1-1*的种子萌发

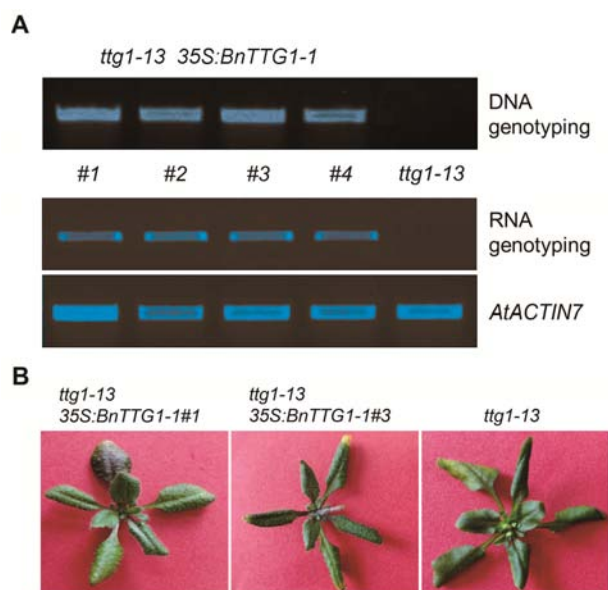


图3 *ttg1-13 35S:BnTTG1-1*转基因植株的鉴定

(A) 在DNA和RNA水平鉴定 *ttg1-13 35S:BnTTG1-1*转基因植株, *AtACTIN7*为内参基因; (B) 在突变体 *ttg1-13*背景下异源表达 *BnTTG1-1*能够完全恢复突变体的表型, 如无表皮毛和花青素等。

Figure 3 Identification of *ttg1-13 35S:BnTTG1-1* transgenic plants

(A) PCR-based DNA and RNA genotyping of *ttg1-13 35S:BnTTG1-1* transgenic plants, *AtACTIN7* was regarded as an internal control; (B) Heterologous expression of *BnTTG1-1* in the *ttg1-13* background fully rescued no trichomes and anthocyanins phenotypes of *ttg1-13*.

与幼苗形态建成无明显差异(图6)。在含3% (w/v)葡萄糖的MS培养基上, *ttg1-13*突变体的发芽率明显低于野生型。7天时, 野生型种子的发芽率接近100%, 而突变体 *ttg1-13*的发芽率仅有70%左右(图6A)。17天时, 野生型已完成幼苗的形态建成, 而突变体大部分种子仍未长出真叶(图6B)。同样, 在含有100 mmol·L⁻¹ NaCl的MS培养基上, *ttg1-13*突变体的发芽率明显低于野生型, 但在7天时, 两者发芽率无明显差异, 均接近100% (图6A)。17天时, 野生型完成了幼苗的形态建成, 而 *ttg1-13*突变体幼苗未完成形态建成, 并且根的生长明显受到抑制(图6B)。在两种非生物逆境胁迫下, *ttg1-13 35S:BnTTG1-1*转基因植株的种子发芽率、幼苗的形态建成和根长等表型均明显强于 *ttg1-13*突变体, 并能够完全或者部分恢复至野生型水平

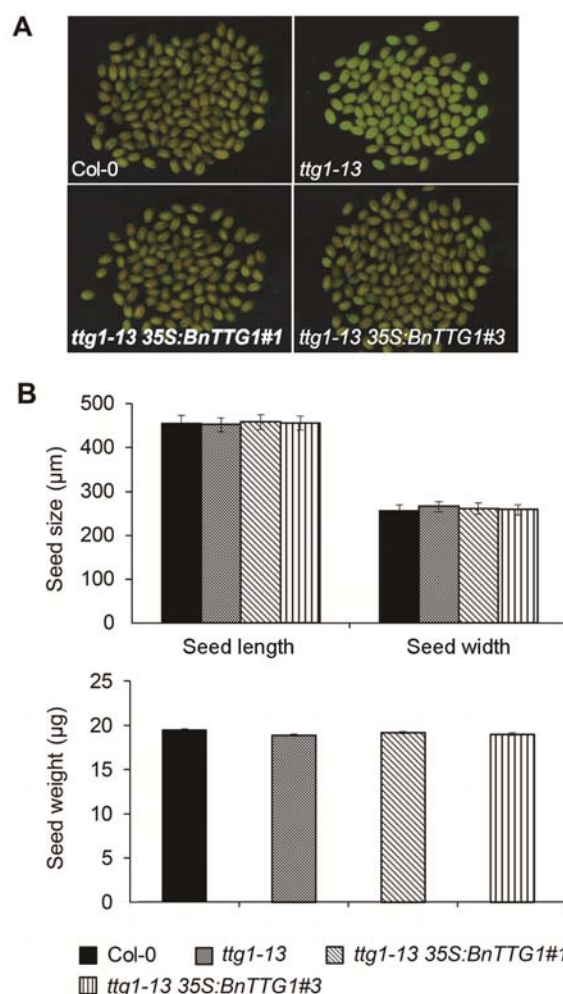


图4 比较拟南芥野生型(Col-0)、突变体 *ttg1-13*和转基因植株 *ttg1-13 35S:BnTTG1-1*的种皮颜色、种子大小和重量(平均值±标准差)

(A) 成熟种子的显微观察; (B) 成熟种子的大小和重量比较

Figure 4 Comparison of seed coat color, seed size and seed weight among the wild-type (Col-0), *ttg1-13*, and *ttg1-13 35S:BnTTG1-1* transgenic plants of Arabidopsis (means±SD) (A) Microscopic observation of mature seeds; (B) Comparison of seed size and weight of mature seeds

(图6)。这些结果表明, *AtTTG1*基因功能缺失导致种子萌发和幼苗形态建成对高浓度葡萄糖及盐分敏感, *BnTTG1-1*参与植株应对非生物逆境胁迫过程, *BnTTG1-1*与 *AtTTG1*在种子萌发以及幼苗形态建成过程中具有类似的功能。

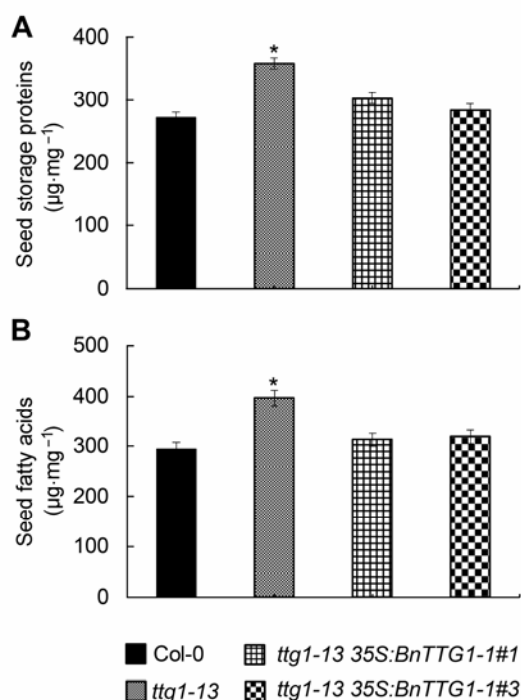


图5 比较拟南芥野生型(Col-0)、突变体*ttg1-13*和转基因植株*ttg1-13 35S:BnTTG1-1*种子的储藏蛋白与脂肪酸含量(平均值±标准差)

(A) 种子储藏蛋白含量; (B) 种子脂肪酸含量。*表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。

Figure 5 Comparison of seed storage compounds among the wild-type (Col-0), *ttg1-13*, and *ttg1-13 35S:BnTTG1-1* transgenic plants of *Arabidopsis* (means±SD)

(A) The content of seed storage proteins in different lines; (B) The content of seed fatty acids in different lines. Asterisks denote statistically significant differences between the wild-type and *ttg1-13* mutant (Student's *t* test, $P < 0.05$).

2.7 讨论

越来越多的证据表明, 拟南芥AtTTG1参与调控表皮毛的形成(Walker et al., 1999; Chen et al., 2015)、花青素的合成(Debeaujon et al., 2003; Lepiniec et al., 2006; Xu et al., 2014)、种子储藏物质的积累(Tsuchiya et al., 2004; Chen et al., 2015)和非生物逆境胁迫响应(Liu et al., 2017)等多个生物学过程。油菜是与拟南芥亲缘关系最近的油料作物之一。尽管早在2006和2007年, 我国(编号为EF175930和EF175931)和法国(编号为EU192030和EU192031)科学家已分别向NCBI数据库提交了甘蓝型油菜TTG1的

全长CDS序列, 但该基因在表皮毛形成、花青素合成、种子储藏物质积累以及非生物逆境胁迫响应等方面的调控作用尚未见报道。

我们根据NCBI数据库中已有的甘蓝型油菜TTG1基因全长CDS序列, 从甘蓝型油菜品种秦优7号中成功克隆了*BnTTG1-1*基因的全长CDS序列。*BnTTG1-1*在秦优7号的时空表达模式显示其可能在油菜生长发育的多个生物学过程中发挥作用(图1)。烟草叶片细胞的亚细胞定位结果显示, *BnTTG1-1*定位于细胞核, 推测其作为转录因子发挥调节作用(图2)。拟南芥*ttg1-13*突变体表现出无表皮毛和花青素、黄种皮以及种子脂肪酸和储藏蛋白含量显著升高等表型(图3–图5)。拟南芥AtTTG1作为重要转录因子能够独立地发挥功能或者与其它转录因子互作, 进而参与调控表皮毛形成和花青素合成的多个重要结构基因的表达来影响它们的形成与合成(Walker et al., 1999; Debeaujon et al., 2003; Lepiniec et al., 2006; Xu et al., 2014; Chen et al., 2015)。拟南芥中几个与种皮发育相关的重要转录因子(AtTT2、AtTT8和AtGL2)相对应的突变体均表现出种子脂肪酸含量升高和种皮黏液合成受阻(Chen et al., 2012b, 2014; Shi et al., 2012)。拟南芥AtTTG1也具有类似的功能, 其相对应的突变体*ttg1*种子的脂肪酸含量升高, 种皮黏液合成减少(Koornneef, 1981; Walker et al., 1999; Chen et al., 2015; Liu et al., 2017)。Zhang和Rock (2004)与Wang等(2014)的研究表明, 花青素可能从种皮渗入种胚, 通过抑制编码脂肪酸碳链延伸的重要酶基因的表达进而抑制种胚中脂肪酸的积累。此外, 种子脂肪酸和种皮黏液的生物合成均需要利用光合作用的C源。我们的研究表明, AtTTG1在拟南芥种子发育过程中既可通过间接抑制多个脂肪酸和蛋白合成途径上重要基因的表达, 也可通过母体效应影响种子脂肪酸和储藏蛋白的积累(Chen et al., 2015)。拟南芥突变体*ttg1-13*种子脂肪酸含量升高可能是以上多个因素共同作用的结果。在该突变体基础上异源表达*BnTTG1-1*能够完全恢复突变体表皮毛、花青素、种皮颜色以及种子脂肪酸和储藏蛋白含量等方面的表型(图3–图5), 表明从秦优7号中获得的*BnTTG1-1*在调控以上多个生物学过程中与AtTTG1具有类似的功能。

前人的研究表明, 类黄酮作为次级代谢产物不仅

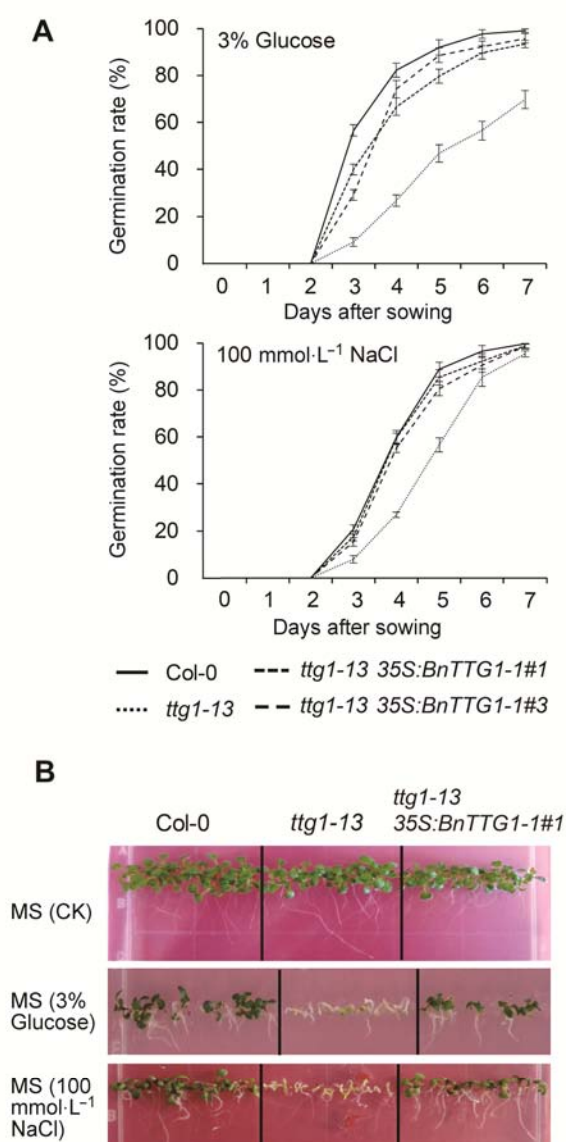


图6 非生物胁迫条件下(含有3%葡萄糖和100 mmol·L⁻¹ NaCl)拟南芥野生型Col-0、突变体*ttg1-13*和转基因植株*ttg1-13* 35S:*BnTTG1-1*的发芽率和幼苗形态建成

(A) 种子发芽率; (B) 幼苗的形态建成。数据为3个生物学重复的平均值±标准差, 每个生物学重复统计100粒种子。

Figure 6 Seed germination rate and seedling establishment on MS agar medium containing 3% (w/v) Glucose and containing 100 mmol·L⁻¹ NaCl among the wild-type (Col-0), *ttg1-13*, and *ttg1-13* 35S:*BnTTG1-1* transgenic plants of Arabidopsis

(A) Seed germination rate; (B) Seedling establishment. Values are the means±SD from three independent experiments evaluating 100 seeds.

在种子休眠和种子活力方面起着重要作用, 而且参与调控植物逆境胁迫响应过程(Winkel-Shirley, 2002; Peer and Murphy, 2007; Petrusa et al., 2013; Nakabayashi et al., 2014)。表皮毛也有助于提高植物对非生物逆境的抵抗能力(Szymanski et al., 2000)。因此, 我们研究了AtTTG1在非生物逆境胁迫中的作用, 结果表明, *ttg1-13*突变体在种子萌发和幼苗形态建成过程中对高盐和高葡萄糖等非生物逆境胁迫较野生型更敏感(图6)。高盐和高葡萄糖非生物胁迫均依赖于脱落酸合成和转导途径(Gibson, 2001; Finkelstein et al., 2002; Cutler et al., 2010)。在高盐和高葡萄糖胁迫条件下, 参与脱落酸合成和转导以及对逆境胁迫响应的多个基因在*ttg1-13*突变体幼苗中均被显著下调, 这可能导致该突变体对非生物逆境胁迫敏感(Liu et al., 2017)。Hong等(2008)和Mu等(2008)的研究表明, 脂肪酸作为信号分子参与非生物逆境胁迫响应过程。此外, 由种皮花青素合成缺失所引起的*ttg1-13*种皮变薄可能使得逆境胁迫分子对种胚和胚乳的伤害更大。这些因素可能通过协同作用的方式影响拟南芥突变体*ttg1-13*种子萌发和幼苗形态建成。转基因植株*ttg1-13* 35S:*BnTTG1-1*能够恢复突变体在高盐以及高葡萄糖条件下的表型(图6), 这表明*BnTTG1-1*在响应非生物逆境胁迫方面具有与AtTTG1类似的功能。最近的研究表明, 禾本科单子叶植物谷子(*Setaria italica*) *SiTTG1*基因在调控植物生长发育方面也与拟南芥AtTTG1功能类似(Liu et al., 2017)。可见, *TTG1*基因的功能在双子叶和单子叶植株中高度保守。

综上所述, 甘蓝型油菜*BnTTG1-1*调控表皮毛形成、花青素合成、种子储藏物质积累以及非生物胁迫响应等多个生物学过程。该研究结果为深入揭示油菜*BnTTG1-1*作用机制奠定了坚实的基础。

参考文献

- 刘后利, 傅廷栋, 陈怀庆, 易淑梅, 熊双娥 (1979). 甘蓝型黄籽油菜的发现及其遗传行为的初步研究. 遗传学报 6, 54.
- 张子龙, 李加纳 (2001). 甘蓝型黄籽油菜粒色遗传及其育种研究进展. 作物杂志 (6), 37-40.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

- principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Cavell AC, Lydiate DJ, Parkin IAP, Dean C, Trick M** (1998). Collinearity between a 30-centimorgan segment of *Arabidopsis thaliana* chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome. *Genome* **41**, 62–69.
- Cernac A, Andre C, Hoffmann-Benning S, Benning C** (2006). WR11 is required for seed germination and seedling establishment. *Plant Physiol* **141**, 745–757.
- Chen MX, Du X, Zhu Y, Wang Z, Hua SJ, Li ZL, Guo WL, Zhang GP, Peng JR, Jiang LX** (2012a). *Seed Fatty Acid Reducer* acts downstream of gibberellin signaling pathway to lower seed fatty acid storage in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **35**, 2155–2169.
- Chen MX, Wang Z, Zhu YN, Li ZL, Hussain N, Xuan LJ, Guo WL, Zhang GP, Jiang LX** (2012b). The effect of *TRANSPARENT TESTA2* on seed fatty acid biosynthesis and tolerance to environmental stresses during young seedling establishment in Arabidopsis. *Plant Physiol* **160**, 1023–1036.
- Chen MX, Xuan LJ, Wang Z, Zhou LH, Li ZL, Du X, Ali E, Zhang GP, Jiang LX** (2014). *TRANSPARENT TESTA8* inhibits seed fatty acid accumulation by targeting several seed development regulators in Arabidopsis. *Plant Physiol* **165**, 905–916.
- Chen MX, Zhang B, Li CX, Kulaveerasingam H, Chew FT, Yu H** (2015). *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* regulates the accumulation of seed storage reserves in Arabidopsis. *Plant Physiol* **169**, 391–402.
- Clough SJ, Bent AF** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735–743.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR** (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 651–679.
- Debeaujon I, Léon-Kloosterziel KM, Koornneef M** (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol* **122**, 403–414.
- Debeaujon I, Nesi N, Perez P, Devic M, Grandjean O, Caboche M, Lepiniec L** (2003). Proanthocyanidin-accumulating cells in Arabidopsis testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* **15**, 2514–2531.
- Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD** (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14**, S15–S45.
- Gibson SI** (2001). Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol* **125**, 2203–2203.
- Hong JK, Choi HW, Hwang IS, Kim DS, Kim NH, Choi DS, Kim YJ, Hwang BK** (2008). Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, *CaGLIP1*, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta* **227**, 539–558.
- Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM** (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* **16**, 123–132.
- Koornneef M** (1981). The complex syndrome of *ttg* mutants. *Arabidopsis Inf Serv* **18**, 45–51.
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M** (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 405–430.
- Liu KG, Qi SH, Li D, Jin CY, Gao CH, Duan SW, Feng BL, Chen MX** (2017). *TRANSPARENT TESTA GLABRA 1* ubiquitously regulates plant growth and development from Arabidopsis to foxtail millet (*Setaria italica*). *Plant Sci* **254**, 60–69.
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**, 402–408.
- Lu J, Li JN, Lei B, Wang SG, Chai YR** (2009). 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. *Genes Genom* **31**, 129–142.
- Mol J, Grotewold E, Koes R** (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci* **3**, 212–217.
- Mu JY, Tan HL, Zheng Q, Fu FY, Liang Y, Zhang J, Yang XH, Wang T, Chong K, Wang XJ, Zuo JR** (2008). *LEAFY COTYLEDON1* is a key regulator of fatty acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **148**, 1042–1054.
- Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, Michael AJ, Tohge T, Yamazaki M, Saito K** (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *Plant J* **77**, 367–379.
- Nesi N, Jond C, Debeaujon I, Caboche M, Lepiniec L** (2001). The Arabidopsis *TT2* gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**, 2099–2114.
- Nguyen HN, Kim JH, Hyun WY, Nguyen NT, Hong SW, Lee H** (2013). *TTG1*-mediated flavonols biosynthesis al-

- leviates root growth inhibition in response to ABA. *Plant Cell Rep* **32**, 503–514.
- Osborn TC, Kole C, Parkin IAP, Sharpe AG, Kuiper M, Lydiate DJ, Trick M** (1997). Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**, 1123–1129.
- Peer WA, Murphy AS** (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci* **12**, 556–563.
- Petrussa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S, Vianello A** (2013). Plant flavonoids-biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *Int J Mol Sci* **14**, 14950–14973.
- Shi L, Katavic V, Yu YY, Kunst L, Haughn G** (2012). *Arabidopsis glabra2* mutant seeds deficient in mucilage biosynthesis produce more oil. *Plant J* **69**, 37–46.
- Shirley BW** (1996). Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends Plant Sci* **1**, 377–382.
- Shirley BW, Kubasek WL, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel FM, Goodman HM** (1995). Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant J* **8**, 659–671.
- Szymanski DB, Lloyd AM, Marks MD** (2000). Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **5**, 214–219.
- Tsuchiya Y, Nambara E, Naito S, McCourt P** (2004). The *FUS3* transcription factor functions through the epidermal regulator *TTG1* during embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **37**, 73–81.
- Walker AR, Davison PA, Bolognesi-Winfield AC, James CM, Srinivasan N, Blundell TL, Esch JJ, Marks MD, Gray JC** (1999). The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* **11**, 1337–1350.
- Wang Z, Chen MX, Chen TL, Xuan LJ, Li ZL, Du X, Zhou LH, Zhang GP, Jiang LX** (2014). *TRANSPARENT TESTA2* regulates embryonic fatty acid biosynthesis by targeting *FUSCA3* during the early developmental stage of *Arabidopsis* seeds. *Plant J* **77**, 757–769.
- Western TL, Burn J, Tan WL, Skinner DJ, Martin-McCaffrey L, Moffatt BA, Haughn GW** (2001). Isolation and characterization of mutants defective in seed coat mucilage secretory cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**, 998–1011.
- Winkel-Shirley B** (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 218–223.
- Xu WJ, Grain D, Bobet S, Le Gourrierc J, Thévenin J, Kelemen Z, Lepiniec L, Dubos C** (2014). Complexity and robustness of the flavonoid transcriptional regulatory network revealed by comprehensive analyses of MYB-bHLH-WDR complexes and their targets in *Arabidopsis* seed. *New Phytol* **202**, 132–144.
- Zhang YM, Rock CO** (2004). Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *J Biol Chem* **279**, 30994–31001.

Functional Analysis of *Brassica napus* *BnTTG1-1* Gene

Kaige Liu, Shuanghui Qi, Shaowei Duan, Dong Li, Changyu Jin, Chenhao Gao, Xuanxia Liu
Mingxun Chen*

College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract AtTTG1 existing in the nucleus as a WD40 repeat transcription factor plays important roles in regulating trichome initiation, anthocyanin biosynthesis, and storage reserve accumulation in *Arabidopsis thaliana*. In the present study, we cloned the full-length coding domain sequence (CDS) of the *BnTTG1-1* gene from the *Brassica napus* cv. 'QINYOU Seven', analyzed its subcellular localization, detected its temporal and spatial expression patterns in different tissues, and investigated its functions in several biological processes. BnTTG1-1 was localized in the nucleus of tobacco leaf cells, so it may function as a transcription factor. *BnTTG1-1* was widely expressed in various vegetative tissues and developing seeds in QINYOU Seven. Moreover, introducing 35S:*BnTTG1-1* into the mutant *ttg1-13* fully rescued many phenotypes of the mutant, such as no trichomes and anthocyanins, yellow seed coat, higher contents of seed fatty acids and storage proteins, and sensitivity to higher sucrose or salinity stresses during seed germination and seedling establishment. Thus, BnTTG1-1 and AtTTG1 exhibited conserved functions on many biological processes during plant growth and development.

Key words TTG1, *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, functional complementation

Liu KG, Qi SH, Duan SW, Li D, Jin CY, Gao CH, Liu XX, Chen MX (2017). Functional analysis of *Brassica napus* *BnTTG1-1* gene. *Chin Bull Bot* **52**, 713–722.

* Author for correspondence. E-mail: cmx786@nwafu.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)