

## 调控拟南芥花瓣脱落的果胶甲酯酶基因表达和功能分析

张莉<sup>1</sup>, 薛金爱<sup>1</sup>, 于浩泉<sup>1</sup>, 李巧英<sup>2</sup>, 李润植<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>山西农业大学农学院, 山西太谷030801; <sup>2</sup>山西省农业种子总站, 太原030006

**摘要:** 在基因序列和表达信息分析的基础上, 重点研究初选出的两个拟南芥果胶甲酯酶基因 *At2g47550* 和 *At4g02330* 的表达和功能。半定量RT-PCR和转基因植株检测表明, *At2g47550* 主要在花粉粒中大量表达, 其次在微管组织中有明显表达。然而, *At4g02330* 在拟南芥花和荚果整个发育时期都有不同程度的表达。主要在花的离层组织、柱头、微管组织和花粉粒中表达。结果说明, *At2g47550* 可能参与花粉粒和花粉管的发育, 而 *At4g02330* 则可能通过参与细胞壁中果胶代谢, 从而达到调控细胞分离和花瓣脱落的目的。

**关键词:** 拟南芥; 花瓣脱落; 果胶甲酯酶; 基因表达和功能

## The Expression and Function Study of Pectin Methylsterase Genes which Regulate and Control the Petal Falling in *Arabidopsis*

ZHANG Li<sup>1</sup>, XUE Jin-Ai<sup>1</sup>, YU Hao-Quan<sup>1</sup>, LI Qiao-Ying<sup>2</sup>, LI Run-Zhi<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>School of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taiyu, Shanxi 030801, China; <sup>2</sup>Department of Agriculture Seed of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China

**Abstract:** This paper studied the expression and function of *At2g47550* and *At4g02330*, which were initially selected from *Arabidopsis* pectin methylsterase genes based on gene sequences and expression analysis. Semi-quantitative RT-PCR and expression analysis of transgenic plants *PAt2g47550:GUS* and *PAt4g02330:GUS* showed that *At2g47550* was mainly expressed in the pollen grain and microtubule tissues, while the expression of *At4g02330* was more widespread throughout the whole developmental process of *Arabidopsis*, being found in abscission zone, stigmatic surface, microtubule tissues and pollen grain. The results suggested that *At2g47550* may be involved in the development of pollen grain and pollen tube while *At4g02330* might play a role in cell wall pectin degradation process which leads to cell separation and floral organ abscission.

**Key words:** *Arabidopsis*; floral organ abscission; pectinesterase; gene expression and function

人们对植物器官脱落的研究, 在上个世纪才开始。Morre等在1968年提出植物器官脱落的生物化学过程, 主要是细胞壁和中胶层的水解, 从而导致了细胞分离。植物器官脱落, 是指植物将损伤的或已经衰老、成熟的枝、叶、花、果实脱离母体的过程(Roberts等2002)。具体说, 植物器官脱落有两种情况: 其一是由于植物生理活动引起的自然脱落。如植物果实、种子成熟引起的脱落, 营养生长与生殖生长竞争引起的脱落, 以及一切因生理因素引起的脱落。其二是植物受到干旱、水涝、高低温、盐碱、病虫害等逆境胁迫所发生的非自然脱落(Taylor和Whitelaw 2001)。

植物器官脱落不仅对物种的繁殖和传播有重要的生物学意义, 而且对农作物、蔬菜、水果的产量和品质, 以及对花卉观赏价值都有重要影响(Patterson 2001)。植物种子、果实的脱落, 可以使

植物种子长久保存或是繁殖后代。部分器官的脱落有益于存留下来的器官或果实发育成熟。例如, 部分花和幼果的脱落, 可以使剩下的果实得以更好生长发育等等。尽管脱落在物种的繁殖和传播以及现代农业生产中起着至关重要的正向效应, 然而, 异常脱落则会给农业生产带来消极影响和经济损失。例如, 逆境诱发的棉花蕾铃脱落率高达70%左右、大豆花荚脱落率亦可达52%, 花果脱落可使棉花和大豆产量大幅下降。

植物器官脱落涉及到一系列细胞学变化和生理生化反应。将要脱落的器官与母体连接处会形成离层区, 离层区的细胞壁和中胶层发生水解, 进

收稿 2012-02-06 修定 2012-03-01

资助 山西省留学回国人员科研项目(2011-045)。

\* 通讯作者(E-mail: rli2001@hotmail.com; Tel: 0354-6236583)。

而导致了细胞分离。这一过程主要受一系列相关酶的调控, 其中纤维素酶、果胶酶与植物器官脱落具有直接关系(Sexton和Roberts 1982)。果胶酶(pectinase)是作用于果胶复合物的各类酶的总称, 主要包括果胶甲酯酶(pectin methylesterase, PME)、多聚半乳糖醛酸酶(pectin polygalacturonase, PG)和果胶裂解酶(pectin lyases, PL)等三类遍在于植物细胞中的酶。PME主要作用是对植物细胞壁和细胞之间的果胶含量进行内源调控(Micheli 2001)。在PME去甲基后, 果胶酸就会与Ca<sup>2+</sup>结合生成不溶性物质, 进而抑制细胞分离和器官脱落。PG和PL主要功能是水解多聚半乳糖醛酸的糖苷键, 使果胶解聚, 促进细胞分离和器官脱落。

随着分子生物学和基因组学等各种组学的发展, 有关果胶甲酯酶基因的分子克隆和功能鉴定, 以及在植物的生长发育过程中调控作用的研究报道日益增多(Tieman等1992; Jiménez-Bermudez等2002; Bosch和Hepler 2005; Louvet等2006; Pelloux等2007; Guénin等2011)。例如, Bosch和Hepler (2005)通过对拟南芥基因组序列的系统分析, 已经确认拟南芥中存在66个PME基因。拟南芥作为模式植物, 完整的基因信息和大量的突变体为基因功能研究提供了基础。Louvet等(2006)采用real-time PCR研究了拟南芥的PME基因, 从花蕾到荚果成熟的5个阶段的表达谱。依据基因表达谱进行聚类分析, 将这些基因分为5类。其中C类包括16个基因, 均在花和荚果发育过程中始终表达的。然而, 包括VGD1 (*At2g47040*)和AtPPME1 (*At1g69940*)在内的D类19个基因, 则在花粉粒中特异表达, 表明D类基因与花粉的发育和花粉管的伸长有重要的关系。

迄今已有众多实验揭示果胶甲酯酶参与果实成熟(Jiménez-Bermudez等2002; Mbéguié-A-Mbéguié等2009)、花粉管伸长(Jiang等2005; Tian等2006)、种子萌发(Ren和Kermode 2000; Zhang等2010)及抗病性(Lionetti等2007)等多种植物生理活动和过程。然而, 还未见有关果胶甲酯酶调控植物器官脱落及其分子机制的详尽研究报道。

本文以野生型拟南芥为实验材料, 结合拟南芥PMEs基因序列和表达信息, 筛选和鉴定果胶甲酯酶基因家族中参与调控花瓣脱落的相关基因,

重点分析靶基因*At2g47550*和*At4g02330*的表达模式和功能, 为全面解析植物器官脱落分子机制提供新信息。

## 材料与方法

### 1 材料

#### 1.1 植物材料

拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]野生型(*Columbia-0*)。种子由英国诺丁汉大学NASC (the Nottingham Arabidopsis Stock Centre)提供。种子播于混合基质(营养土:草炭土:珍珠岩=1:1:1)中, 16 h光照/8 h黑暗, 23~25 °C温室中培养。

#### 1.2 菌株、载体和生化试剂

大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、根瘤农杆菌C58和载体pBI101.2为本实验室保存。各种抗生素、质粒抽提试剂盒以及割胶回收试剂盒均购自上海生工。各种限制性内切酶、Taq酶、T4连接酶和DNA marker均购自大连宝生生物公司(TaKaRa)。

### 2 实验方法

#### 2.1 组织总RNA提取和cDNA的合成

分别取0.1 g拟南芥幼苗、成熟的叶片、成熟的花、嫩荚果和成熟的荚果放入液氮中研磨后, 加入1 mL Trizol试剂混匀, 再加入300  $\mu$ L氯仿, 剧烈振荡混匀30 s, 4 °C离心后提取上清(重复1次), 加入等体积异丙醇, 1/10体积的NaCl (5 mol·L<sup>-1</sup>), 室温放置10 min, 4 °C离心后, 70%乙醇和100%乙醇各洗涤1次, 晾干后加入50  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O溶解。第1链cDNA合成采用Invitrogen公司的SuperScriptIII反转录系统。20  $\mu$ L反应体系: 1  $\mu$ g总RNA, 4  $\mu$ L buffer (5 $\times$ ), 1  $\mu$ L oligo-dT引物, 1  $\mu$ L dNTPs (10 mmol·L<sup>-1</sup>)和1  $\mu$ L反转录酶, 补充超纯水至20  $\mu$ L, 65 °C反应1 h, 70 °C 15 min灭活酶活性。

#### 2.2 RT-PCR扩增反应

根据NCBI数据库中*At4g02330*和*At2g47550*基因的cDNA序列, 利用Primer 5.0软件设计引物。以合成的cDNA为模板进行PCR反应。反应程序: 94 °C预变性5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 2 min, 共25个循环; 最后在72 °C下延伸8 min。

#### 2.3 表达载体的构建

应用PCR技术克隆*At4g02330*和*At2g47550*起始密码子ATG上游1 000 bp左右的启动子序列, 并

在两末端分别加上*Bam*HI和*Hind*III位点。载体pBI101.2经*Bam*HI和*Hind*III双酶切,去除原有的*GUS*基因的启动子后,再将*At4g02330*和*At2g47550*的启动子分别与双酶切的pBI101.2载体连接,从而建立*Pat4g02330:GUS*和*Pat2g47550:GUS*新的表达载体。

#### 2.4 拟南芥遗传转化及转基因植物筛选

将新构建的表达载体*Pat2g47550:GUS*和*Pat4g02330:GUS*,采用电击法分别转入农杆菌(C58)。取阳性克隆扩繁制备菌液,通过floral-dip转化导入拟南芥。在含50 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素的MS培养基上对转化的拟南芥种子进行筛选,获得卡那霉素抗性转基因植株25株。分别从转基因植株中提取基因组DNA进行PCR检测。最终获得PCR阳性植株20株。在纯系转基因种子中随机各选择5个纯系的种子播于混合基质,进行GUS染色观察和其他分析。

#### 2.5 GUS组织化学染色

将纯系的拟南芥转基因植株组织浸入GUS染色液中(100 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸缓冲液,0.5 mmol·L<sup>-1</sup>高铁氰化钾、0.5 mmol·L<sup>-1</sup>亚铁氰化钾、1.0 mmol·L<sup>-1</sup>X-Gluc)37℃下温育12~24 h,室温下70%乙醇脱色5 h,期间更换乙醇数次,显微镜(Nikon Digital Camera DXM1200F)下观察和拍照。

### 实验结果

#### 1 参与拟南芥器官脱落候选PME基因的初选

通过对拟南芥基因组序列的系统分析,已经确认拟南芥中存在66种PME基因(Bosch和Hepler 2005)。使用生物信息学工具(如,GO and Genvestigator)对这些蛋白质的氨基酸序列进行分析表明(Zimmermann等2004; Micheli 2001),这66种编码PME的基因中有23个只包含果胶甲酯酶(PME)活性域,而另外43个既具有果胶甲酯酶活性域,还包含果胶甲酯酶抑制剂(PMEI)域。因此,根据它们的域结构,可将拟南芥果胶甲酯酶细分为两大组(图1),第I组只含有一个果胶甲酯酶(PME)域,分子量30~45 kDa,蛋白质较小。第II组除了一个果胶甲酯酶域外还含有1~3个果胶甲酯酶抑制剂域(PMEI),分子量为55~105 kDa,蛋白质较大。

图1中属于第I类的5个PME蛋白虽有PME酶活性结构域,还未见它们参与细胞壁解离的报

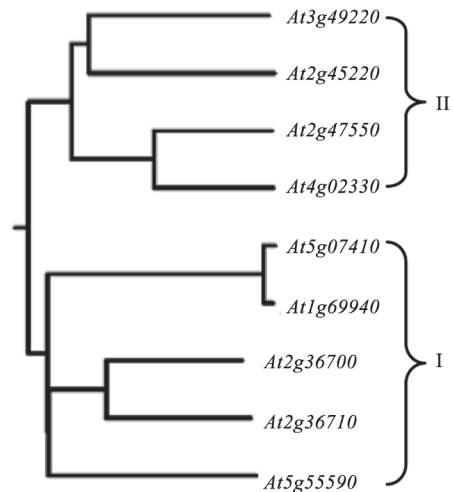


图1 拟南芥9个果胶甲酯酶蛋白的聚类分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of PME proteins from *Arabidopsis* 用于构建进化树的PME蛋白序列为图中所示9个序列。

道。其中I类的*At1g69940* (AtPPME1) (Tian等2006)和*At5g55590* (QRT1) (Francis等2006)被认为是与花粉管发育相关的基因。图1中II类的4个PME蛋白*At3g49220*、*At2g45220*、*At2g47550*和*At4g02330*尽管含有果胶甲酯酶抑制剂域,但它们可能与器官脱落时离层形成相关(Cai和Lashbrook 2008)。我们前期应用拟南芥基因芯片和花器官离层组织细胞所做的转录组图谱分析亦表明这4个II类PME基因,特别是*At2g47550*和*At4g02330* (序列同源性达到82%)可能参与花瓣脱落过程(Zhang等2009)。为此,本文选取*At2g47550*和*At4g02330*为拟南芥器官脱落候选PME基因,进一步对其基因表达和功能进行深入研究。

#### 2 *At2g47550*和*At4g02330*启动子序列分析

为了进一步推测*At2g47550*和*At4g02330*基因的表达和功能,通过生物信息分析工具PLACE对*At2g47550*上游1 620 bp和*At4g02330*上游1 200 bp启动子序列进行了分析(图2、3)。结果表明,*At2g47550*和*At4g02330*的启动子序列分别含有两种相同的与逆境相关的顺式作用元件,它们是MYB (AACCA)和WRKY (TGAC)。另外,在*At2g47550*和*At4g02330*的启动子序列还分别发现了DPBF (ACACA)和ABRE-Like (ACGTG),它们同样是与逆境相关的顺式作用元件。这些与干旱、防御和抗病等逆境胁迫相关的响应元件的存在,为*At2g-*

```

1 620  tgccgaattt agaggattta tttaaaaaat attaaataaa taacgcatga taatgataat
1 560  ttataaaaag tatMYBaaccaaaaa aaaatatctc ttaaPOLLEN POLLENagaaaagaaagaaaac aaaatgtagt
1 500  tttgagttta ttggttatct ggatttcgga agatatatat gattcataat tttttaggag
1 440  ttaaatttat tttttaagac tttaaaPOLLEN POLLENagaaaagaaaaaaaag ttagtagaca ttgtttccca
1 380  taaaaaaca ccaggctctt taagtctcaa gtctMYBaaacca tttttccttt tctggtcaga
1 320  taattctatc DPBFacacattgctt gaatttgaat POLLENagaaaagacaa caaaagatgg tttaaaaaaa
1 260  aaaaaaaaa aaaaaaaga caacaaaaga caacactggg aacatattta cccaaaattc
1 200  gataatggac aagctacatt caatctatgc ttatgttttc gttgcatggcg aatgcatgtt
1 140  gtattacgtt tatgagggtt gtgctctacg atgtatactc ttcacaWRKYtgaca aattatgtaca
1 080  ctaatctaca ttgataatac atatatttgt taagttcaaa tagcattatc acaaatgatt
1 020  aagctatatg tatgtttggg tgaattttcc ataaataatt tgtcatctgt caataaaatt
960  ttaatgtata ttctataacg gaattacggt cagatacatg ttaggtaat gaattaagta
900  agatattaat atctgtcgcac aaataaaagc atcaattgt atgtacattc tcttaaaact
840  gattcgattt cattgtgtca ctgtgtatat tgtatPOLLENagaaaa catatccaaa tacgtatctc
780  atgcctgtcc tctaacttaa aaacaaagaaaaaattatc ataccagcca atttaatgca
720  caagattaac taattgatca ataattggat acgttacaac tctataaaat catatccatt
660  acgctttggg caatggcaaa ttggcaatgg aagtaaaatc aaaagttaa caaatgaatt
600  accatttgaa acactccaaa ttggtattcg tgtccaaaat aatttttcca aatgtcccat
540  cattctaaag tttttcacct tatgcatgga accttctag tatatataca gttctaaaac
480  gaattttatt tgcaatggtc tatcagagat tataatgtca agatcWRKYtgaca tttttgctga
420  tgtgtagtgt aatgtgctgt tttaccaaca tgttatatat ataatcgaat tttttctga
360  aatgcctaac gttggWRKYtgaca aatttttatat tacgaaaacc tttccctgat tatgcatatt
300  caaattgWRKYcgg taacagaagt ttggWRKYtcaaaa ttWRKYtgacatttc atgtaaaaa aaaaaaactc
240  aatWRKYtgacactt aaacttaaat taaacacca tttatatata attatcacgg atggaatta
180  ctcttaatt acagtgatta tttatctaat ttttggWRKYtgag agacagatct atgcgtgtga
120  atattatcac aattatggtat atWRKYatgWRKYttgaa tttttWRKYtgaca ccgccacaat tatattatgta
60  gtatgtDPBFacaca cacattatc atWRKYtgacattga attttgtatgt atatttcaaat tcaacgttct

```

图2 *At2g47550*启动子序列及分析  
Fig.2 Sequence analysis of *At2g47550* promoter

*47550*和*At4g02330*可能参与调控植物体应对逆境胁迫(例如器官的脱落)的推测提供了一定的依据。此外*At2g47550*的启动子序列中发现的多个与花粉特异表达相关元件POLLEN1LELAT52 (AGAAA) (Bate和Twell 1998), 为其在花粉中的特异性表达提供一定的理论基础。

### 3 拟南芥器官组织中*At2g47550*和*At4g02330*的表达分析

采用半定量RT-PCR分析*At2g47550*和*At4g02330*基因在拟南芥5种组织(幼苗、成熟叶片、成熟花、嫩荚果和成熟荚果)中的表达情况。分别从

0.1 g的拟南芥幼苗、0.1 g成熟的叶片、0.5 g成熟的花、0.1 g嫩荚果和0.1 g成熟的荚果中提取RNA。首先分别以1  $\mu$ g不同组织的RNA为模板合成cDNA, 然后以cDNA为模板, 以特异性的引物进行PCR扩增反应, 共25个循环。结果显示, 内参基因(*Ubiquitin*)在不同组织中的表达水平基本一致, *At2g47550*在成熟花和嫩荚果中高水平表达, 其他组织中没有表达或甚微(成熟荚果)。然而, *At4g-02330*在所测试的样品中都有表达, 其中在成熟花和成熟荚果中表达量是其他组织中表达量10倍之多(图4)。

```

1200 taagatagtt actttaggcg aaacgacgga gaatttaagg acaatTgactt atTgaaaaaga
1140 ctctatatta tactattcac agtgtcccaa atatatataa attgcctaac acattgccac
1080 cgtcgtTgacT aagttttctt agattcaaaa tttagtagat agtatatatt atataattta
1020 taaacctaag aatgaagga aggtggatct taatatgtat aattaataga ggcaagacat
960 gaaggaagat ggatctttac caaaaacagc tgggcagctt tgaaaatgca atgttcgatg
900 ataataatat ctcaataaca aacaacgcgt ttttatctca gaagactcca atatatTgacT
840 ttggTaaCCaC taaaagtgcg attattattg ttttggtata tatatatata atccccaaaa
780 gtaaacaaac aaaaaataaa atacaaacta ttgCGGaaca atacaatata tatatatata
720 tatatgtaat tcttattgat tcaattttga aTgaaaaTttc tttgtctata tattatTTTg
660 tgtTTTTgt gtttaacctca tgaatagaga gataattctc cggcttggtg aacaatatcg
600 ttggattggt tttttacaaa caaatctca atatatTTTc aactttagcc ctacgTaaCCaC
540 aactacaggt caataaacgTaaCCaC agctaaatgg caaattatta gaattagtcc
480 gaataataaa caaattcgtc taaaattgta gaaaattttg ggatctaaga atgagactac
420 atcatTTTTt tttatcaaca actacatcat tttTaaCCaC acttagaatt gttaggtctc
360 aaacttctaa caccgatttg ctgcaaaaac aattatggat cggatcaaga tatagagagg
300 atttcacatt TgacTtctat tgcttactca ttccaaaaga cggtttggtc tagtTTTTgA
240 aattTaaCCaC atcttgaaaa tacggaattt gtaatgtact ttacaaaaat tgtatatgct
180 aattataatt ttgtgatctc aatattcat gtttatatga taagataaga gataacatga
120 atgcattatt atataatacc atagaagata gaatgtatac agtctcaaaa taacaaaatt
60 taatacggac ccacatccca aacctctccc actctatata tttggtctct ataaaaacca

```

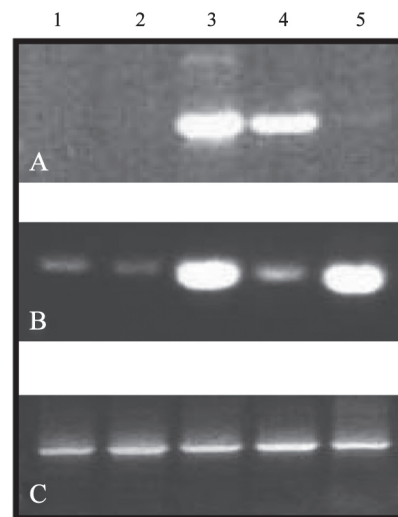
图3 *At4g02330*启动子序列及分析Fig.3 Sequence analysis of *At4g02330* promoter

#### 4 候选基因启动子驱动*GUS*基因表达载体的构建和转基因拟南芥植株的获得

为了进一步研究基因*At2g47550*和*At4g02330*在拟南芥全株不同器官及发育时期表达情况, 将它们的启动子片段分别与*GUS*基因融合, 成功地构建了表达载体*Pat2g47550:GUS*和*Pat4g02330:GUS* (图5)。采用农杆菌介导转化拟南芥, 在含50 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素的MS培养基上进行筛选, 获得了卡那霉素抗性转基因植株25株。分别从卡那霉素抗性转基因植株中提取基因组DNA, 用PCR法进一步验证, 通过多次自交, 最终获得纯系转基因植株6株。在纯系转基因种子中随机各选择一个纯系的种子播于混合基质, 种子萌发, 生长成幼苗用于后续检测分析。

#### 5 *At2g47550*在转基因拟南芥中的时空表达

从图6可以看出, *At2g47550*启动子驱动的*GUS*基因在花粉粒中表达量极高(图6-B)。其次在花萼

图4 *At2g47550*和*At4g02330* RT-PCR分析电泳检测Fig.4 RT-PCR analysis of genes *At2g47550* and *At4g02330*

A: *At2g47550* RT-PCR分析; B: *At4g02330* RT-PCR分析; C: 内参基因(*Ubiquitin*) RT-PCR分析。数字1~5分别为: 1: 幼苗; 2: 成熟叶片; 3: 成熟的花; 4: 嫩荚果; 5: 成熟的荚果。

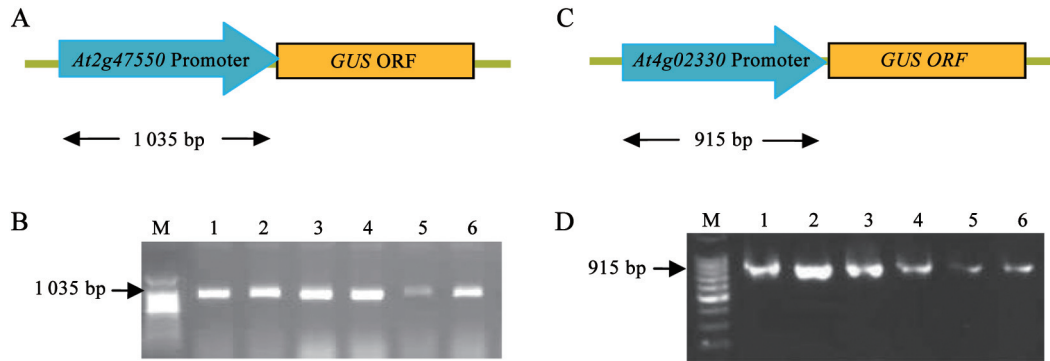


图5 转基因表达载体构建和转基因植株鉴定

Fig.5 The construction of *Pat2g47550:GUS* and *Pat4g02330:GUS* and PCR analysis of transgenic plants

A: *Pat2g47550:GUS*表达载体的构建; B: *Pat2g47550:GUS*转基因植株的PCR检测; C: *Pat4g02330:GUS*表达载体的构建; D: *Pat4g02330:GUS*转基因植株的PCR检测。M为Maker; 泳道1~6为转基因植株; 1 035 bp和915 bp分别为*At2g47550*和*At4g02330*的启动子片段。

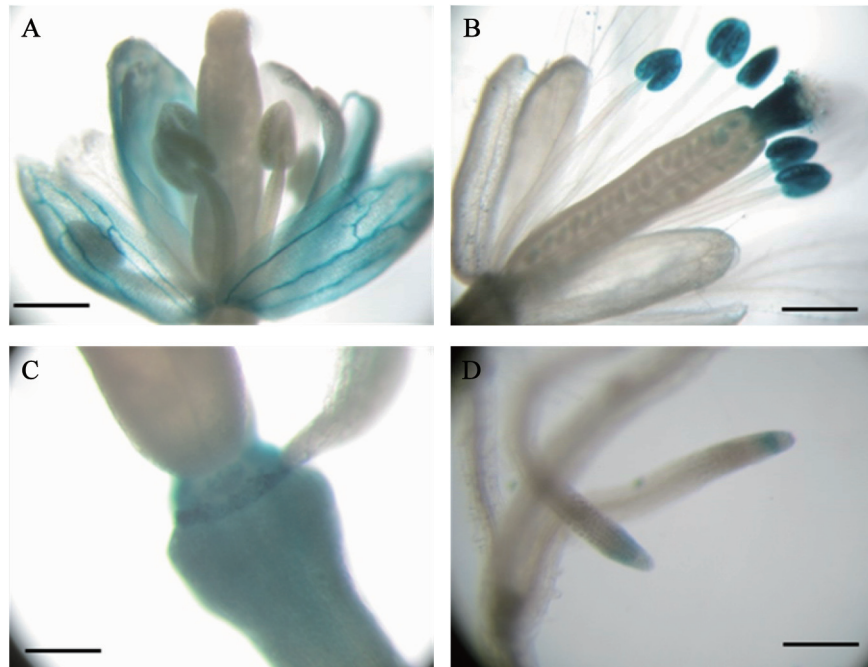
图6 *Pat2g47550:GUS*转基因拟南芥幼苗的GUS染色

Fig.6 GUS-staining of *Pat2g47550:GUS* transgenic *Arabidopsis* plant

A: 第1朵花; B: 第3朵花; C: 成熟荚果的果柄连接处; D: 8 d幼苗的根尖部。比例尺均为1 mm。

片的微管组织中有明显表达(图6-A), 另外, 在成熟荚果的果柄连接处和根尖部也有微弱表达(图6-C、D)。这表明*At2g47550*基因可能主要与花粉发育相关。

#### 6 *At4g02330*在转基因拟南芥中的时空表达

分析转基因拟南芥从种子萌发、幼苗至果实成熟植株的GUS染色反应, 可知*At4g02330*在拟南芥不同发育阶段的许多部位都有不同程度的表

达。如图7所示, 在幼苗发育早期(图7-A、B), *At4g02330*仅在根尖、胚轴和子叶边缘表达。当真叶出现和形成后(图7-C~E), 该基因则开始在真叶的叶片和叶柄组织以及表皮毛中大量表达, 同时在子叶微管组织及叶肉细胞中逐渐显示微弱表达。

图7-F显示, *At4g02330*在花和荚果整个发育时期都有不同程度的表达。数字1~20代表拟南芥总状花絮上, 从顶端开始数, 第一朵花为1, 然后依次

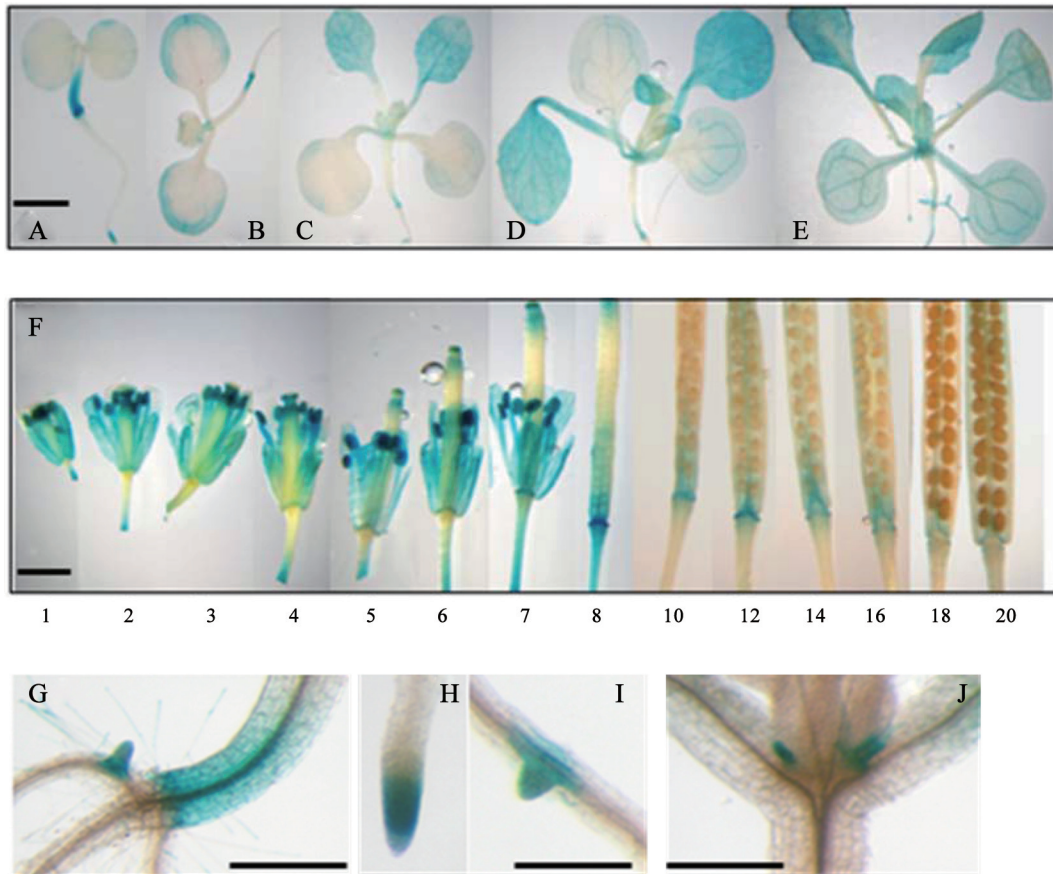


图7 *Pat4g02330:GUS*转基因拟南芥幼苗的GUS染色

Fig.7 GUS-staining of *Pat4g02330:GUS* transgenic *Arabidopsis* plant tissues

A: 2 d幼苗; B: 4 d幼苗; C: 6 d幼苗; D: 8 d幼苗; E: 11 d幼苗; F: 在拟南芥总状花序上, 第1个到第20个拟南芥花和荚果; G: 11 d幼苗的下胚轴; H: 11 d幼苗的根尖; I: 11 d幼苗的侧根; J: 托叶着生部位。比例尺: A~F, 0.5 mm; G~I, 1.5 mm。数字1~20代表拟南芥总状花序上, 从顶端开始数, 第一朵花为1, 然后依次往下。

往下。从第1朵花出现至荚果中种子开始成熟时(1~7), *At4g02330*在花药、花粉和柱头组织中大量表达, 其次在花瓣、花萼、花托和花(果)梗组织也有明显表达。种子和荚果成熟后(8~20), *At4g02330*仅在原花托处(荚果与果梗连接处)大量表达。另外, *At4g02330*在拟南芥幼苗的茎、根尖和侧根中有较强表达(图7-G、H和I), 在托叶着生部位也有少许表达(图7-J)。

## 讨 论

植物发育至衰老阶段, 或受逆境胁迫影响, 枝、叶、花、果等器官常发生脱落。这一过程涉及到一系列细胞学变化和生理生化反应, 影响着作物和果蔬产量及品质的形成。调控细胞壁果胶含量、具有多个成员的果胶甲酯酶是否直接参与

植物器官脱落, 目前还不清楚。通过细胞解剖研究发现, 在位于器官脱落的位置有特定的细胞群的分化, 称为离层细胞。这些细胞在器官脱落的过程中变得很紧密, 呈哑铃型, 并且含有很多高尔基体和内膜系统(Sexton和Roberts 1982)。尽管不清楚是什么信号引起了离层细胞的分离, 但是相关研究表明他们一定激活了离层细胞中相关酶类, 降解细胞壁, 导致离层细胞的分离(Agusti等2008)。本实验以模式植物拟南芥为试材, 通过对参与降解细胞壁的果胶酶家族的果胶甲酯酶基因时空表达的分析, 以探究果胶甲酯酶基因参与调控植物器官脱落的分子机制。

如前所述, 通过对拟南芥基因组序列的系统分析, 已经确认拟南芥中存在66种编码果胶甲酯酶的基因(Bosch和Hepler 2005)。Louvet等(2006)

对这些基因在拟南芥花和荚果发育过程5个不同发育时期的表达进行了检测,发现包括*At2g47550*和*At4g02330*在内C类16个基因,在花和荚果发育的整个过程中都有表达,而D类的19个基因包括*VGDI* (*At2g47040*) (Jiang等2005)和*AtPPME1* (*At1g69940*) (Tian等2006)在内的19个基因属于花粉粒特异表达的基因。

我们的*Pat2g47550:GUS*转基因植株活体GUS检测显示,虽然在微管组织和成熟的荚果的果柄连接处发现有微弱GUS染色,但很强的GUS信号在花粉粒中发现(图6-B)。野生型拟南芥RT-PCR(图4-A)亦揭示*At2g47550*在成熟花器官中表达量显著高于幼荚中表达,而在其他所测组织中未检测到表达。结合两个实验的结果可见*At2g47550*主要在花粉中表达。*At2g47550*可能与*AtPPME1*和*VGDI*有类似的功能,在花粉的发育和花粉管的伸长中起着重要的作用(Tian等2006; Jiang等2005),尽管参与器官脱落的功能还不能排除。

与*At2g47550*表达模式不同,*At4g02330*在转基因植株的许多部位都有不同程度的表达,如:花粉粒、柱头、成熟花与花托结合处的离层区、成熟果实与果梗结合处的离层区、根(尖)部、侧根形成部位、叶片和微管组织等(图7)。野生型拟南芥RT-PCR(图4-B)显示*At4g02330* mRNA在成熟花和成熟荚果组织中表达显著高于其他所测组织。*At4g02330*这种时空表达模式与已报道参与拟南芥器官脱落的*PG*和*IDA*基因(González-Carranza等2002; Butenko等2003)表达谱相似。据此推测*At4g02330*在细胞分离和器官脱落过程中行使一定功能,可能是果胶甲酯酶基因*At4g02330*在花离层形成后,将离层细胞壁中果胶分子脱甲基,使得果胶随后在多聚半乳糖醛酸酶(PG)和果胶裂解酶(PL)等酶的共同作用下降解。

已有不少研究指出果胶甲酯酶相关基因表达存在于许多不同种类植物中,例如,甘蓝、玉米、烟草和拟南芥(Zhang等2010; Grabber和Hatfield 2005; Körner等2009)。然而,这些研究未揭示果胶甲酯酶相关基因是否在植物器官脱落中起作用。本研究通过对2个主要果胶甲酯酶基因的时空表达分析,为该领域研究提供了第一手试验证据和新知识。我们正在进行的*At2g47550*和*At4g02330*

基因可控减量表达和超量表达的研究将为全面解析果胶甲酯酶基因参与植物器官脱落调控机理提供更有益的信息。

### 参考文献

- Agustí J, Merelo P, Cercós M, Tadeo FR, Talón M (2008). Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves. *J Exp Bot*, 59 (10): 2717~2733
- Bate N, Twell D (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol Biol*, 37: 859~869
- Bosch M, Hepler PK (2005). Pectin methylesterases and pectin dynamics in pollen tubes. *Plant Cell*, 17: 3219~3226
- Butenko MA, Patterson SE, Grini PE, Stenvik GE, Amundsen SS, Mandal A, Aalen RB (2003). *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION* controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *Plant Cell*, 15: 2296~2307
- Cai SQ, Lashbrook CC (2008). Stamen abscission zone transcriptome profiling reveals new candidates for abscission control: enhanced retention of floral organs in transgenic plants overexpressing *Arabidopsis* ZINC FINGER PROTEIN2. *Plant Physiol*, 146: 1305~1321
- Francis KE, Lam SY, Copenhaver GP (2006). Separation of *Arabidopsis* pollen tetrads is regulated by *QUARTET1*, a pectin methyl-esterase gene. *Plant Physiol*, 142: 1004~1013
- González-Carranza ZH, Whitelaw CA, Swarup R, Roberts JA (2002). Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 128: 534~543
- Grabber JH, Hatfield RD (2005). Methyl esterification divergently affects the degradability of pectic uronosyls in nonlignified and lignified maize cell walls. *J Agric Food Chem*, 53 (5): 1546~1549
- Guénin S, Mareck A, Rayon C, Lamour R, Assoumou Ndong Y, Domon JM, Sénéchal F, Fournet F, Jamet E, Canut H et al (2011). Identification of pectin methyl-esterase 3 as a basic pectin methyl-esterase isoform involved in adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 192 (1): 114~126
- Jiang L, Yang SL, Xie LF, Puh CS, Zhang XQ, Yang WC, Sundaresan V, Ye D (2005). *VANGUARD1* encodes a pectin methyl-esterase that enhances pollen tube growth in the *Arabidopsis* style and transmitting tract. *Plant Cell*, 17: 584~596
- Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevaldo J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2002). Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol*, 128 (2): 751~759
- Körner E, von Dahl CC, Bonaventure G, Baldwin IT (2009). Pectin methyl-esterase *NaPME1* contributes to the emission of methanol during insect herbivory and to the elicitation of defence responses in *Nicotiana attenuata*. *J Exp Bot*, 60 (9): 2631~2640



- Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, Favaron F, Cervone F, Bellincampi D (2007). Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*, 143 (4): 1871~1880
- Louvet R, Cavel E, Gutierrez L, Guénin S, Roger D, Gillet F, Guérineau F, Pelloux J (2006). Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 224 (4): 782~791
- Mbéguié-A-Mbéguié D, Hubert O, Baurens FC, Matsumoto T, Chillet M, Fils-Lycaon B, Sidibé-Bocs S (2009). Expression patterns of cell wall-modifying genes from banana during fruit ripening and in relationship with finger drop. *J Exp Bot*, 60 (7): 2021~2034
- Micheli F (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci*, 6: 414~419
- Patterson SE (2001). Cutting loose. Abscission and dehiscence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 126: 494~500
- Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci*, 12 (6): 267~277
- Ren C, Kermode AR (2000). An increase in pectin methyl esterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds. *Plant Physiol*, 124 (1): 231~242
- Roberts JA, Elliott KA, Gonzales-Carranza ZH (2002). Abscission, dehiscence and other cell separation processes. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 131~158
- Sexton R, Roberts JA (1982). Cell biology of abscission. *Ann Rev Plant Physiol*, 33: 133~162
- Taylor JE, Whitelaw CA (2001). Signals in abscission. *New Phytol*, 151: 323~339
- Tian GW, Chen MH, Zaltsman A, Citovsky V (2006). Pollen-specific pectin methylesterase involved in pollen tube growth. *Dev Biol*, 294: 83~91
- Tieman DM, Harriman RW, Ramamohan G, Handa AK (1992). An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell*, 4 (6): 667~679
- Zhang GY, Feng J, Wu J, Wang XW (2010). BoPMEI1, a pollen-specific pectin methylesterase inhibitor, has an essential role in pollen tube growth. *Planta*, 231 (6): 1323~1334
- Zhang L, González-Carranza ZH, Roberts JA (2009). Expression and Manipulation of Abscission-related Genes in *Arabidopsis thaliana*. Nottingham: University of Nottingham
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, 136: 2621~2632