

拟南芥温度诱导脂质运载蛋白TIL1参与雌配子体发育

常小艳^{1,2}, 赵丽华², 付凤玲^{1,*}, 秦源^{2,*}

¹四川农业大学玉米研究所, 成都611130; ²中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海200032

摘要: 雌配子体的正常发育是种子形成的前提条件之一, 拟南芥温度诱导的脂质运载蛋白编码基因 *TIL1* 突变使胚珠败育, 结实率下降明显。基因表达分析表明T-DNA插入使得 *TIL1* 基因敲除, 突变体 *TIL1* 基因功能缺失; 互交实验、Alexander染色、花粉离体培养和胚珠透明实验结果表明 *til1-1* 突变体雄配子体发育正常、雌配子体胚囊发育有缺陷; 通过遗传互补实验证明外源克隆的 *TIL1* 基因能恢复突变体的败育表型, 并确定了 *TIL1* 基因主要在胚珠的胚囊中表达。实验结果表明 *TIL1* 基因参与了植物雌配子体发育这一重要的生理过程。

关键词: 拟南芥; *TIL1*; 结实率; 雌配子体发育

Temperature-Induced Lipocalin TIL1 Is Required for Female Gametophyte Development in *Arabidopsis*

CHANG Xiao-Yan^{1,2}, ZHAO Li-Hua², FU Feng-Lin^{1,*}, Qin Yuan^{2,*}

¹Maize Research Institute of Sichuan Agriculture University, Chengdu 611130, China; ²Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Abstract: Mature female gametophyte formation is one of the prerequisites for seed formation. Mutation in a gene called *TIL1* which encodes a temperature-induced lipocalin causes ovule abortion and subsequent low seed set in *Arabidopsis thaliana*. Gene expression analysis indicates T-DNA insertion is localized in *TIL1* gene and results in loss of function of *TIL1*. Reciprocal cross, Alexander staining, pollen growth *in vitro*, and whole-mount ovule clearing results showed that the development of male gametophyte was normal but the female gametophyte development was defective in *til1-1* mutant. Genetic complementation experiments with *ProTIL1:TIL1-GFP* demonstrated that *til1-1* mutation phenotype was resulted from lossing function of *TIL1*, which was expressed in the embryo sac of ovule. Taken together, we conclude that the gene *TIL1* plays an important role in the female gametophyte development.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *TIL1*; seed set; female gametophyte development

脂质运载蛋白是一种细胞外小蛋白, 分布在质膜的周围并广泛存在于细菌、原生生物、节肢动物、脊索动物和植物中, 超过40种脂质蛋白现已被鉴定出来(Flower 1996; Charron等2005; Sanchez等2006)。植物中的脂质运载蛋白包括叶绿体脂质运载蛋白(chloroplastic lipocalins, CHLs)和温度诱导的脂质运载蛋白(temperature-induced lipocalin, TILs)。在单子叶植物如小麦中 *TILs* 基因有2个拷贝 *TIL1* 和 *TIL2*, *TIL1* 参与温度胁迫调控机制, *TIL2* 则与温度胁迫调控没有关联。拟南芥中的脂质蛋白只有一种, 并且与小麦中的 *TIL1* 蛋白的氨基酸序列具有很高的相似性, 因此拟南芥中的温度诱导的脂质运载蛋白称为 *TIL1* (Charron等2005)。

拟南芥 *TIL1* 基因参与的逆境胁迫调控不仅包括对温度胁迫的调控, 还包括对光照、高盐和氧

化物等胁迫的调控。环境温度过高或过低时, 拟南芥 *TIL1* 基因表达量上调, 调控温度响应机制使植物适应高温或低温环境。 *TIL1* 基因突变, 拟南芥对温度变化敏感, *TIL1* 基因过量表达拟南芥的耐热性则没有加强(Charron等2002; Kawamura和Uemura 2003; Chi等2009); 黑暗处理的突变体幼苗则表现出对光的敏感性和下胚轴变短的表型(Charron等2008); 盐胁迫下, 突变体的生长和生物学产量都受到影响, *TIL1* 蛋白能够易位至叶绿体中通过调节离子平衡而保护叶绿体不受损伤(Brinker等2010; Abo-Ogiala等2013)。

收稿 2014-01-01 修定 2014-01-24

资助 国家自然科学基金(31170290)和中科院青促会项目。

* 共同通讯作者(E-mail: fl@sicau.edu.cn, Tel: 028-86290916; E-mail: yuanqin2005@gmail.com, Tel: 021-54924312)。

目前关于 *TIL1* 基因参与植物的各种逆境胁迫的机制尚不清楚, *TIL1* 在拟南芥雌配子体发育的研究则几乎没有文献报道, 本次实验通过对拟南芥 *TIL1* 基因突变体进行结实表型观察发现, *TIL1* 基因的功能缺失导致 *til1-1* 突变体种子败育, 结实率下降。

配子体的正常发育是被子植物进行有性生殖的基础, 雄配子体和雌配子体分别在花药和胚珠中发育形成, 通过双受精过程, 雌雄配子体结合形成合子, 合子再经过细胞分裂和细胞分化最后形成成熟的胚胎或种子。拟南芥雌配子体发育包括大孢子发生和雌配子体发生两个阶段(Russell 1993): 二倍体大孢子母细胞进行一次减数分裂, 形成4个单倍体大孢子细胞, 近珠孔端的3个大孢子细胞凋亡, 仅合点端的大孢子存活, 发育为功能大孢子并参与雌配子体发生; 功能大孢子形成后连续进行3次胞质不分裂的有丝分裂, 胚囊细胞的细胞核移位和细胞分化, 最终形成七细胞八核的成熟胚囊结构(Schneitz等1995; Yadegari和Drews 2004)。

实验通过遗传学、分子生物学和细胞生物学等方法证明了拟南芥编码温度诱导的脂质运载蛋白 *TIL1* 参与拟南芥的雌配子体发育的过程, 而不影响雄配子体的发育, 并对 *TIL1* 基因参与雌配子体发育的机理做了合理的分析和探讨。

材料与方法

1 实验材料与试剂

野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 为 Columbia-0 生态型, 拟南芥 *TIL1* 基因 T-DNA 插入的突变体种子 Salk_136775c 购于拟南芥生物资源中心 (Arabidopsis Biological Resource Center)。拟南芥培养条件: 温度 22 °C, 相对湿度 70%, 光周期 16 h 光照/8 h 黑暗, 光强 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。

高保真酶 Prime STAR 购于 TaKaKa 公司; pENTR TOPO 载体, 载体构建 BP、LR 反应试剂盒购于 Invitrogen 公司; pGWB651 载体由 Tsuyoshi Nakagawa (杨贞标课题组) 提供; 卡那霉素 (kanamycin) 和盐酸大观霉素 (spectinomycin hydrochloride) 抗生素购于 Sigma 公司; DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司; RNA 提取试剂盒购于 OMEGA 公司; RNA 一步法反转录试剂盒购于 TransGen 公

司。实验中的引物用 Primer Premier 5.0 软件设计, 在 Invitrogen 公司合成, 相关序列测序在华大基因公司完成。

2 实验方法

2.1 纯合突变体的鉴定和表型观察

突变体 Salk_136775c 的 T-DNA 插入结构示意图如下, 纯合突变体的鉴定用“三引物法”, 引物序列 LBB1.3、LP 和 RP 由拟南芥网站 (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) 提供, *TIL1* 纯合突变体命名为 *til1-1*。观察 *til1-1* 表型, 取来源于不同植株的 *til1-1* 突变体成熟角果 20 个, 在解剖镜下进行解剖观察, 记录角果内种子数目, 统计结实率。

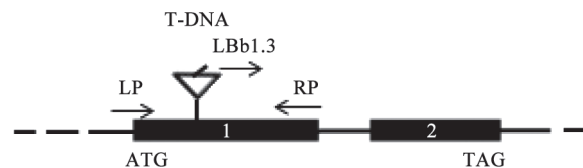


图1 T-DNA插入 *TIL1* 基因的结构示意图

Fig.1 The schematic structure of T-DNA insertion in *TIL1* genomic DNA

2.2 *til1-1* 突变体的 *TIL1* 基因表达分析

取拟南芥 WT 和 *til1-1* 花序分别进行 RNA 的提取并进行反转录合成 cDNA, 半定量 RT-PCR 和荧光实时定量 Q-PCR 分析均以第一链 cDNA 为模板。

半定量 RT-PCR 用引物 TIL1-F (5'-ATGACAG-AGAAGAAAGAGATGGAA-3') 和 TIL1-R (5'-TCATTTGCCGAAGAGAGATTTGAA-3') 进行扩增, *AtActin7* 为内参基因, 对应引物为 Actin7-F (5'-TGTTCCCAAGTATTGTTGGTTCGTC-3') 和 Actin7-R (5'-TGCTGAGGGATGCAAGGATTGATC-3'), 扩增目的片段产物为 561 bp。RT-PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min; 16 °C 10 min。荧光实时定量 Q-PCR 用引物 TIL1-F (5'-GCAACGGG-AAGAGGGGTTTAT-3') 和 TIL1-R (5'-GATTGGGAGGAAAGGAGGGACA-3') 进行扩增, *AtActin7* 为内参基因, 对应引物 Actin7-F (5'-GTATTGTGCTCGATTCTGGTGA-3') 和 Actin7-R (5'-TTCCCGTTCTGCGGTAGTGG-3'), 扩增目的片段产物为 107 bp。Q-PCR 反应程序: 95 °C 30 s;

95 °C 5 s, 55 °C 20 s, 72 °C 25 s, 共40个循环; 70 °C 5 s; 92 °C 5 s。

2.3 *till-1*突变体的互交实验

实验分3组分别进行人工授粉杂交: 第1组, 以去除雄蕊的*till-1*突变体的雌蕊为母本、野生型拟南芥的雄蕊为父本, 编号为A, ♀*till-1*×♂WT; 第2组, 以纯合的*ms-1* (Wilson等2001)雌蕊为母本、*till-1*突变体的雄蕊为父本, 编号为B, ♀*ms-1*×♂*till-1*; 第3组, 作为第1组和第2组的对照实验, 以纯合的*ms-1*雌蕊为母本、野生型拟南芥的雄蕊为父本, 编号为CK, ♀*ms-1*×♂WT。

每组实验15个重复, 授粉1周后, 在解剖镜下观察授粉杂交的角果, 统计其结实并记录。

2.4 *till-1*突变体花粉的Alexander染色和离体培养

分别选取拟南芥WT和*till-1*正处于12期的花蕾(Smyth等1990), 去其花萼、花瓣和柱头, 留下花药。卡诺固定液室温固定2 h, 再用染色液65 °C水浴20 min进行染色并制片, 放置于LEICA DM6000B显微镜下进行观察并拍照。染色方法参考Peterson等(2010)文献。

从拟南芥WT和*till-1*植株上, 选择正在盛开的花, 将其花药分别均匀涂布于花粉培养基(Fan等2001)表面, 28 °C培养箱培养5~6 h, Olympus IX81显微镜下观察, 并分别记录拟南芥WT和突变体*till-1*各2 000粒花粉的萌发情况。

2.5 *till-1*突变体胚珠的整体透明观察

分别选取来源于不同植株的拟南芥花序, 拟南芥WT和*till-1*植株花序各5个, FAA固定液室温固定24 h, 解剖镜下透明液处理15 min再小心压片, 使胚珠从雌蕊中分散开, 用LEICA DM6000B显微镜进行相差干涉显微观察, 记录胚珠发育的时期并拍照保存。

2.6 *till-1*突变体TIL1基因遗传互补实验

*TIL1*基因克隆引物为: TIL1-F (5'-CACCAA-GGTCTCACTAGGGAAAACG-3')和TIL1-R (5'-TTTGCCGAAGAGAGATTTG-3'), 克隆片段长2 660 bp, 包含*TIL1*基因的基因组序列1 149 bp和其上游的启动子序列1 511 bp。载体构建用gateway系统, 包括BP反应和LR反应, 方法参考Invitrogen公司的Gateway® Technology with Clonase™ II手册。入门载体用pENTR TOPO, 目的载体pGWB651

在细菌中是盐酸大观霉素抗性, 在植物中为Basta抗性。

重组质粒*ProTIL1:TIL1-GFP*测序确认后, 进行农杆菌GV3101感受态细胞转化并扩大培养, 花序浸染法进行*till-1*突变体的转化。用0.1% Basta液体喷湿进行转基因阳性初步筛选, 再提取阳性苗幼叶的DNA进行进一步的GFP标签分子鉴定。观察T₂代幼苗和胚珠的GFP荧光信号、角果结实表型和统计种子的结实率。

实验结果

1 *till-1*突变体的育性降低

*till-1*突变体的结实观察发现其角果有明显败育表型(图2-A), 结实率*t*-test检验表明, *till-1*的结实率81.43%, 与WT结实率98.15%差异极其显著(图2-B)。通过观察败育的胚珠, 发现角果中没有发育成种子的胚珠为白色小点, 推测败育的胚珠可能是由于雌、雄配子体发育有缺陷, 不能成功进行双受精作用而导致, 或者雌、雄配子体发育正常, 但雌、雄配子体结合形成合子的早期发育有缺陷而不能正常发育导致。

2 *till-1*突变体TIL1基因敲除

为了进一步研究*TIL1*基因可能参与拟南芥种子形成的功能, 首先分析了*till-1*突变体*TIL1*基因的表达情况, 以确定是否由于T-DNA的插入降低了该基因的表达或者造成了该基因的敲除。

*till-1*突变体花序总RNA半定量RT-PCR结果显示: *TIL1*在野生型拟南芥WT中正常表达, 而在*till-1*突变体中的表达量几乎检测不到(图3-A); 定量Q-PCR也未检测到*TIL1*基因在突变体中的表达(图3-B)。因此T-DNA插入*TIL1*基因, 使*TIL1*基因敲除, *TIL1*基因功能完全丧失, 最终出现突变体结实率下降表型。

3 互交实验表明*till-1*育性缺陷可能来源于雌配子体

互交角果结实率分别为: A组(♀*till-1*×♂WT) 77.40%, B组(♀*ms-1*×♂*till-1*) 91.18%, CK组(♀*ms-1*×♂WT) 93.26% (图4)。

通过互交结实率结果, 可以判断败育的胚珠不是来源于合子早期发育的缺陷, 而是来源于突变体的雌配子或者雄配子体的发育缺陷, 否则3组互交角果的结实率数值应该一致。

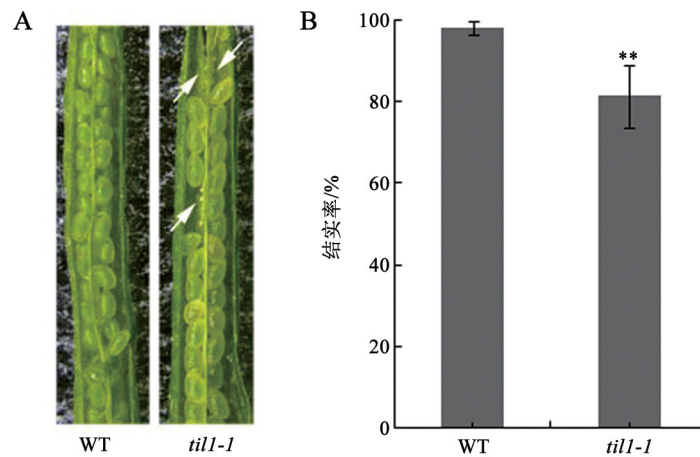


图2 *till-1*突变体角果表型(A)和结实率(B)

Fig.2 Silique phenotype of *till-1* mutant (A) and its seed setting rate (B)
白色箭头表示败育的胚珠。*till-1*结实率与WT相比有极显著性差异($P<0.01$)。

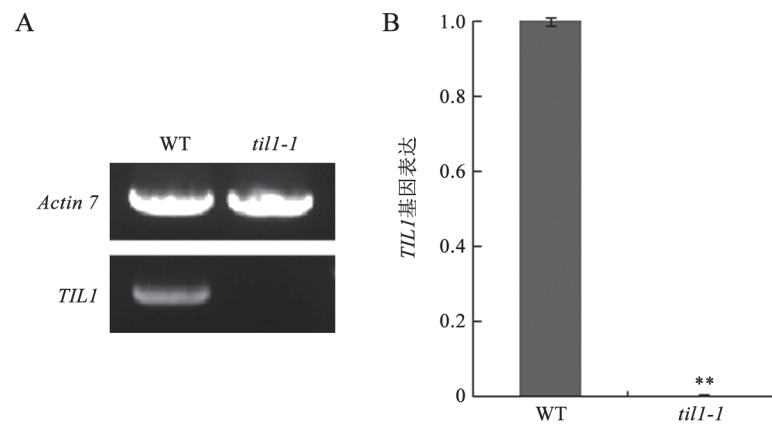


图3 野生型和突变体拟南芥中TIL1基因的表达分析

Fig.3 Expression profile of *TIL1* gene in wild type and *till-1* mutant
A: RT-PCR; B: Q-PCR。*till-1*的TIL1表达与WT相比有极显著性差异($P<0.01$)。

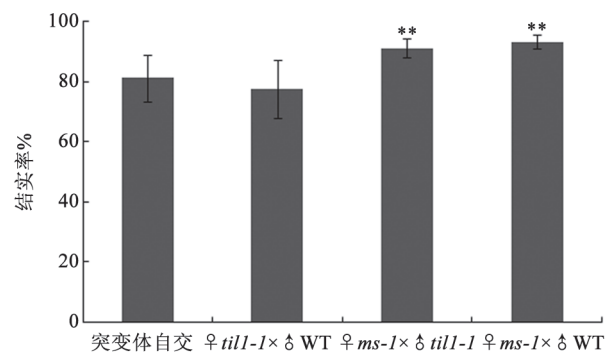


图4 *till-1*突变体互交角果结实率

Fig.4 Seed setting rate of *till-1* mutant's reciprocal cross

突变体自交结实率与♀*till-1* × ♂WT相比无显著性差异, ♀*ms-1* × ♂*till-1*和♀*ms-1* × ♂WT的结实率与♀*till-1* × ♂WT结实率相比均有极显著性差异($P<0.01$)。

结实率 t -test检验表明: A组结实率74.04%与突变体自交结实率81.17%无显著性差异、与CK组结实率93.26%有极显著差异, 推测突变体雄配子体发育正常, 突变体育性缺陷不是来源于雄配子体; B组结实率91.18%与突变体自交结实率81.17%有极显著差异、与CK组结实率93.26%无显著差异, 推测突变体雌配子体发育有缺陷, 突变体育性缺陷来源于雌配子体。由于人工授粉会对雌蕊柱头造成损伤等实验误差, 因此试验A组结实率77.40%稍低于突变体自交结实率81.17%, CK组结实率93.26%低于理论值100%。

4 *till-1*雄配子体发育正常

花粉活力检测可作为判断雄配子体是否正常

发育的标准之一,通过Alexander染色实验,活力正常的花粉会呈现品红色,活力异常的花粉会呈现蓝绿色(Peterson 2010)。*till-1*的花药通过染色,跟拟南芥WT的花药一样,几乎所有的花粉粒细胞被染成品红色(图5)。花粉的萌发能力则是检测花粉生活力的指标之一,*till-1*和WT的花药离体培养结果显示,*till-1*的花粉能正常萌发、花粉管能正常伸长(图6);并且花药的萌发率与野生型花粉的萌发率无显著性差异(图7)。

Alexander染色和花药离体培养实验进一步证明了*till-1*突变体雄配子体发育正常,突变体育性缺陷不是来源于雄配子体。

5 TIL1雌配子体发育有缺陷

胚珠透明观察发现,*till-1*突变体胚珠功能大

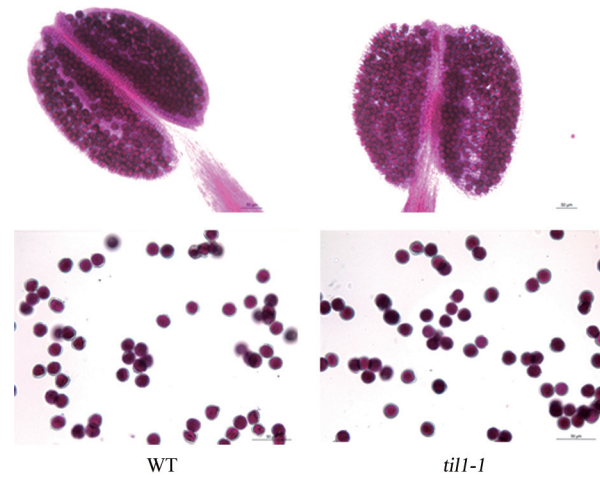


图5 野生型和突变体拟南芥花粉Alexander染色
Fig.5 Pollen Alexander stain of wild type and *till-1* mutant

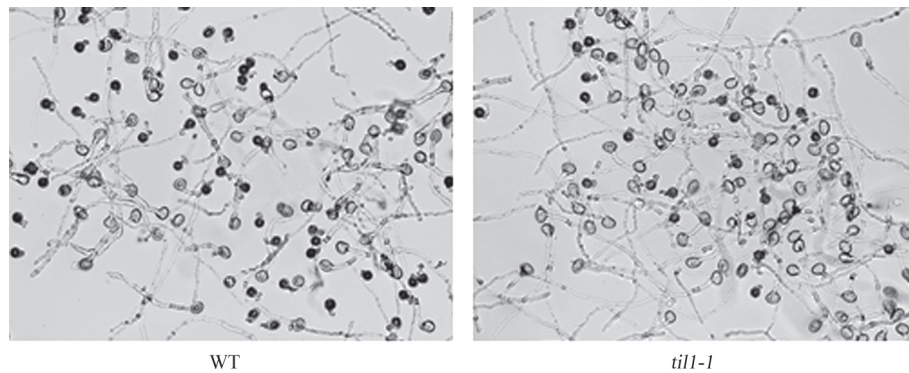


图6 野生型和突变体花粉离体培养
Fig.6 Pollen cultivate *in vitro* of wild type and *till-1* mutant

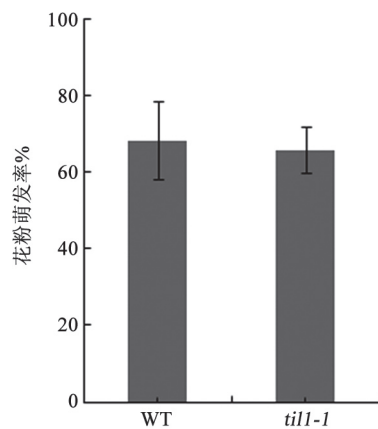


图7 野生型和突变体花粉离体培养萌发率
Fig.7 Pollen germination of pollen cultivate *in vitro* of wild type and *till-1* mutant
*till-1*的花粉萌发率与WT相比无显著性差异。

孢子能正常的形成,说明*till-1*突变体大孢子发生正常。FG1~FG6 (Christensen等1997)时期的胚珠发育正常,说明功能大孢子能正常进行3次有丝分裂,但是观察发现突变体的FG7时期的胚珠与WT比较有异常。

实验统计表明,野生型拟南芥WT中的230个胚珠全部处于成熟期FG7 (图8-A)时期,而突变体*till-1*中,只有182个胚珠处于正常的FG7时期,另外有44个胚珠有异常表型(表1):胚囊靠株孔端膨大,合点端胚囊呈现系带(图8-B);或胚囊则株孔端胚囊突出靠近了株孔处(图8-C);另外有少数胚珠则发现胚囊缩小,胚囊近乎消失,胚囊中的卵细胞和中央细胞则几乎观察不到(图8-D)。胚囊中无细胞核,就不能提供中央细胞和卵细胞,达不到完成双受精的基本条件;胚囊畸形,则不能提供正常的双

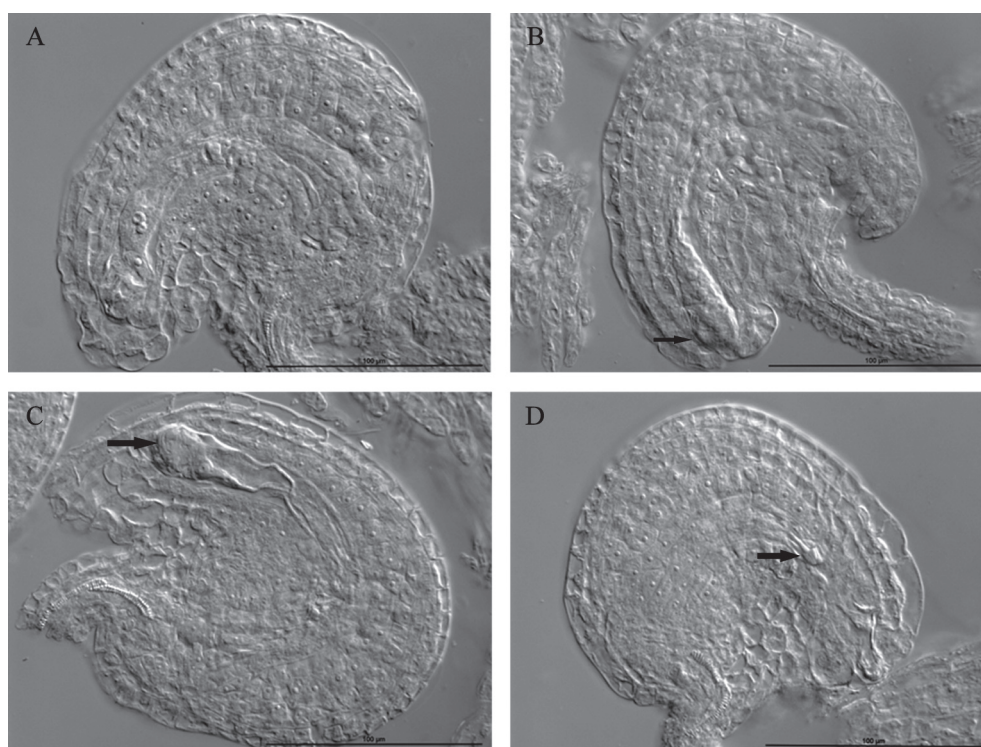
图8 *till-1*突变体胚珠整体透明观察

Fig.8 Whole clearing observation of mutant ovule

A: FG7; B-D: 异常胚囊。黑色箭头标示异常, bar=100 μm。

表1 *till-1*胚珠整体透明观察统计

Table1 Statistics of mutant ovule whole cleaning

基因型	角果数	胚珠总数	FG7时期胚珠数	异常胚珠(胚囊畸形)数
WT	5	230	230	0
<i>till-1</i>	5	226	182	44

受精的环境,不能正常完成双受精。突变体中的正常胚珠数占胚珠总数的80.53%,与突变体*till-1*自己的结实率81.73%相近,因此,可认为异常的胚珠不能正常完成双受精作用,从而导致种子败育,最终造成结实率下降。

6 外源克隆的*TIL1*基因能互补*till-1*突变体败育表型

为进一步验证*till-1*突变体中观察到的胚珠败育表型是否是由于T-DNA插入到*TIL1*基因中造成的,通过构建*ProTIL1:TIL1-GFP*载体做了*TIL1*基因的遗传互补。选择GFP报告基因则为检测其启动子的活性和更进一步了解*TIL1*基因的表达模式。

通过Basta筛选和PCR分子鉴定,在T₁代转基因植物中,最后得到了17株阳性苗,其中结实表型有恢复的植株有3株,统计T₂代转基因植物结实率

为91.58%,与*till-1*突变体自交的结实率81.17%差异极其显著(图9),说明外源克隆*TIL1*基因能够互补*till-1*的败育表型。基因表达模式分析显示,*TIL1*在成熟雌配子中富集表达,在幼苗茎的维管组织和根中也检测到GFP信号(图10)。

讨 论

温度诱导的脂质运载蛋白TIL1,主要参与温度对拟南芥的调控。室温培养条件下,*till-1*突变体植物的生长发育跟野生型拟南芥WT相比没有明显区别,*TIL1*基因互补和过量表达的转基因植株跟野生型拟南芥比较则均有明显的晚花现象和持绿期增长的表型(Charron等2008)。本次实验通过结实表型观察发现:*till-1*突变体角果中有胚珠败

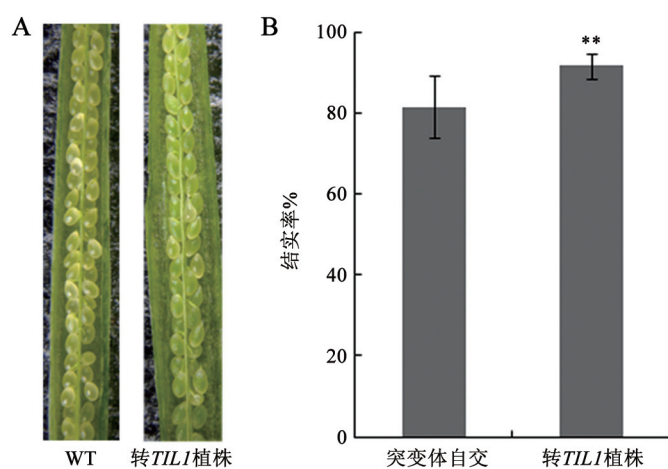


图9 *TIL1*基因互补转基因植株角果表型(A)和结实率(B)

Fig.9 The siliques phenotype of complementation of gene *TIL1* (A) and its seed setting rate (B)

转*TIL1*植株结实率与*til1-1*突变体自交相比有极显著性差异($P < 0.01$)。

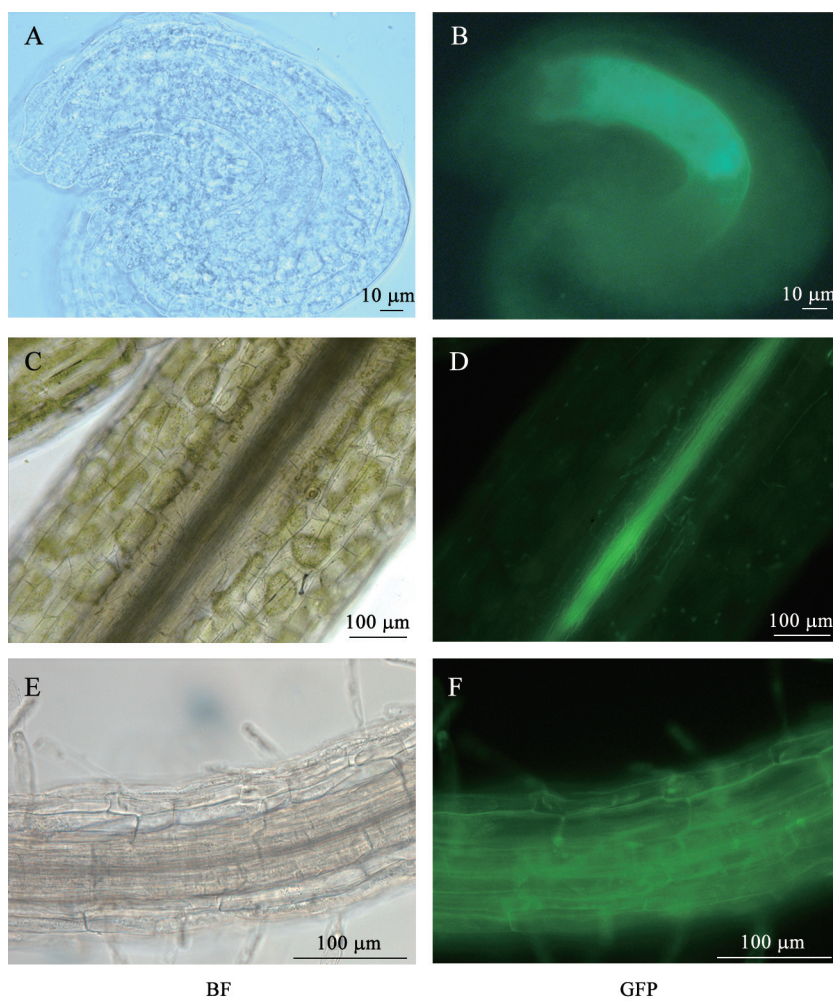


图10 *TIL1*基因的表达模式

Fig.10 The expression mode of *TIL1* gene

A、B: 胚珠; C、D: 茎; E、F: 根。

育,未发育为种子的胚珠呈白色小点(图2-A),结实率则下降约20%(图2-B),由此可知*TIL1*参与了拟南芥种子的形成过程。

基因表达分析表明T-DNA插入导致*TIL1*基因敲除,*til1-1*突变体的*TIL1*基因功能丧失。互交实验表明,胚珠败育来源可能是雌配子体发育缺陷。Alexander染色和花粉离体培养实验结果显示*til1-1*突变体花粉的活力、萌发和花粉管的生长、伸长均正常,进一步证明*til1-1*突变体的雄配子发育没有缺陷。胚珠整体透明结果显示*til1-1*突变体胚珠的胚囊发育有缺陷:胚囊近珠孔端膨大,或近珠孔端突出靠近珠孔,或皱缩甚至无法辨别胚囊中卵细胞和中央细胞的细胞核,胚囊异常,不能提供双受精环境和条件,影响双受精作用造成突变体胚珠败育,种子结实率下降,因此,推测突变体败育来源于雌配子体。

*TIL1*基因定位在细胞质膜,并在拟南芥的各个组织(根、茎、叶、花和角果)和整个生活周期(种子萌发、营养生长、生殖生长和成熟角果中)均有表达并且表达量一致(Charron等2008)。遗传互补实验中,外源克隆的*TIL1*基因转入*til1-1*突变体则可以明显回复败育表型,通过构建*ProTIL1:TIL1-GFP*载体,利用GFP荧光信号检测到了GFP在根、茎、叶和花中的表达,在T₂代转基因植株的胚珠中,观察到荧光蛋白在成熟的雌配子体中富集表达,说明*TIL1*基因主要在胚囊中表达。这一结果也与*TIL1*基因功能丧失的*til1-1*突变体中胚珠胚囊发育缺陷相呼应。

*TIL1*基因敲除的拟南芥突变体对温度变化和百草枯(Bishop等1987)较敏感,黑暗生长的突变体幼苗见光后会迅速的死掉。在突变体内过氧化氢和一些活性氧类(reactive oxygen species, ROS)过多的积累,从而引起氧化胁迫,因此突变体的下胚轴较野生型短,并且对光敏感。低温环境下,*TIL1*基因突变的拟南芥突变体叶片出现了严重的损伤和坏死,相同条件下野生型拟南芥的叶片的损伤程度则较轻(Charron等2008),低温诱导的叶片损伤可能是由于低温环境中植物会产生有害的活性氧

类(Chatterjee和Gagnon 2001)。

ROS广泛存在动植物中,是生物有氧代谢过程中的副产物之一,包括氧离子、过氧化物和含氧自由基等(Apel和Hirt 2004)。植物体中,ROS过多会对生物体有害,另一方面ROS作为一种信号分子参与了一系列重要的发育过程,对植物体的生长发育具有重要作用:对外界各种生物的和非生物的胁迫(如强光、干旱、高温等)产生相应的响应机制(Prasad等1994; Tsugane等1999);参与激素信号传导、细胞生长伸长、顶端优势、细胞的程序性衰老和死亡等(Foreman等2003; Van Breusegem和Dat 2006; Gapper和Dolan 2006; Carol和Dolan 2006)。此外,研究发现ROS还参与了植物的有性生殖发育过程(Dennery 2007)。拟南芥雌配子体“八核七细胞”结构形成时,除参与双受精的卵细胞和中央细胞,反足细胞和助细胞都会进行细胞程序性死亡。在拟南芥*oiwa*突变体中,雌配子体发育停在FG3或FG4时期,与此同时还检测到高浓度的ROS含量,推测ROS可能影响了胚囊中微管组织的功能,从而障碍了大形配子形成过程中的有丝分裂(Martin等2013)。另外,ROS还能调节细胞的周期进行、细胞内的钙离子浓度和周期蛋白依赖性激酶等(Livanos等2012)。通常,植物体内ROS的产生和多余ROS的净化清除需要保持良好的平衡,才能维持植物体正常的生长和发育(Bailey-Serres和Mittler 2006)。

此外,脂质运载蛋白是一种小型配合基结合蛋白,能结合视黄酸(retinoic acid, RA) (Flower 1994)。视黄酸是视黄醇(又名维生素A)的衍生物,类维生素是跟维生素A结构相关的化合物,越来越多的实验证明,类维生素A在动物胚胎发育的细胞生长和细胞分化中作为分子信号参与(Gudas 1994)。Thompson等(1969)通过用缺少维生素A但含有维甲酸的食物饲养母鸡发现,母鸡能很好的生长,但是母鸡下的鸡蛋不能孵化成小鸡,可能由于鸡蛋中缺少视黄酸;Heine等(1985)通过用鹌鹑做实验材料对这一结果做出了解释:由于胚胎中类维生素A的缺乏,因此心脏和血管系统的发育受到了阻

碍, 最终胚胎不能正常的发育。

人们对*TIL1*基因的研究, 主要是集中在植物的各种逆境胁迫, 本次试验则首次发现*TIL1*基因参与拟南芥雌配子体发生, 增加了人们对*TIL1*功能的认识。拟南芥雌配子体的发育是个复杂而又精细的过程, 有许多基因共同参与和调控。*till-1*突变体, 胚囊的形态发育异常, 雌配子体双受精的进行受到阻碍。*TIL1*基因缺失使得突变体*till-1*失去了*TIL1*基因参与的各种生长发育以及生理调控机能, 但是突变体中ROS的积累是否对*till-1*突变体胚囊的发育有影响? *TIL1*是否与ROS一起参与了胚囊的发育? *till-1*突变体中是否还有其他的生物化学物质一起参与胚囊的发育? *TIL1*基因参与雌配子体的发育过程的分子机制跟脂质运载蛋白在影响动物胚胎发育的机制是否类似? *TIL1*基因具体是如何通过下游的机制介导调控雌配子体的发育? *TIL1*作为温度响应的蛋白, 它在调控雌配子体发育过程中是否也是温度依赖的? 这一系列的问题则有待更深入的实验研究和验证。

参考文献

- Abo-Ogiala A, Carsjens C, Diekmann H, Fayyaz P, Herrfurth C, Feussner I, Polle A (2013). Temperature-induced lipocalin (TIL) is translocated under salt stress and protects chloroplasts from ion toxicity. *J Plant Physiol*, 171: 250~259
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373~399
- Bailey-Serres J, Mittler R (2006). The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol*, 141 (2): 311
- Bishop T, Powles SB, Cornic G (1987). Mechanism of paraquat resistance in *Hordeum glaucum*. II. Paraquat uptake and translocation. *Aust J Plant Physiol*, 14: 539~547
- Brinker M, Brosché M, Vinocur B, Abo-Ogiala A, Fayyaz P, Janz D, Ottow EA, Cullmann AD, Saborowski J, Kangasjärvi J et al (2010). Linking the salt transcriptome with physiological responses of a salt-resistant *Populus* species as a strategy to identify genes important for stress acclimation. *Plant Physiol*, 154: 1697~1709
- Carol RJ, Dolan L (2006). The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J Exp Bot*, 57: 1829~1834
- Charron JBF, Breton G, Badawi M, Sarhan F (2002). Molecular and structural analyses of a novel temperature stress-induced lipocalin from wheat and *Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 517: 129~132
- Charron JBF, Ouellet F, Houde M, Sarhan F (2008). The plant apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biol*, 8: 86
- Charron JBF, Ouellet F, Pelletier M, Danyluk J, Chauve C, Sarhan F (2005). Identification, expression, and evolutionary analyses of plant lipocalins. *Plant Physiol*, 139: 2017~2028
- Chatterjee S, Gagnon C (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, 59: 451~458
- Chi WT, Fung RWM, Liu HC, Hsu CC, Charng YY (2009). Temperature-induced lipocalin is required for basal and acquired thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 32: 917~927
- Christensen CA, King EJ, Jordan JR, Drews GN (1997). Megagametogenesis in *Arabidopsis* wild type and *Gf* mutant. *Sex Plant Reprod*, 10: 49~64
- Dennery PA (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 81: 155~162
- Fan LM, Wang YF, Wang H, Wu WH (2001). *In vitro Arabidopsis* pollen germination and characterization of the inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts. *J Exp Bot*, 52: 1603~1614
- Flower DR (1994). The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Lett*, 354: 7~11
- Flower DR (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318: 1~14
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JD et al (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422: 442~446
- Gapper C, Dolan L (2006). Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol*, 141: 341~345
- Gudas LJ (1994). Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem*, 269: 15399~15402
- Heine UI, Roberts AB, Munoz EF, Roche NS, Sporn MB (1985). Effects of retinoid deficiency on the development of the heart and vascular system of the quail embryo. *Virchows Arch Cell Pathol*, 50: 135~152
- Kawamura Y, Uemura M (2003). Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of *Arabidopsis* leaves associated with cold acclimation. *Plant J*, 36: 141~154
- Livanos P, Apostolakis P, Galatis B (2012). Plant cell division: ROS homeostasis is required. *Plant Signal Behav*, 7: 771~778
- Martin MV, Fiol DF, Sundaresan V, Zabaleta EJ, Pagnussat GC (2013). *oiwa*, a female gametophytic mutant impaired in a mitochondrial manganese-superoxide dismutase, reveals crucial roles for reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25: 1573~1591
- Peterson R, Slovin JP, Chen C (2010). A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *Inter J Plant Biol*, 1: 66~69

- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6: 65~74
- Russell SD (1993). The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. *Plant Cell*, 5: 1349~1359
- Sanchez D, Ganfornina MD, Gutierrez G, Jauneau ACG, Risler JL, Salier JP (2006). Lipocalins genes and their evolutionary history. In: Åkerström B, Borregaard N, Flower DR, Salier JP (eds). *Lipocalins*. Georgetown: Landes Bioscience, 5~16
- Schneitz K, Hülskamp M, Pruitt RE (1995). Wide-type ovule development in *Arabidopsis thaliana*: a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J*, 7: 731~749
- Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM (1990). Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2: 755~767
- Thompson JN, Howell JM, Pitt GAJ, McLaughlin CI (1969). The biological activity of retinoic acid in the domestic fowl and the effects of vitamin A deficiency on the chick embryo. *Br J Nutr*, 23: 471~490
- Tsugane K, Kobayashi K, Niwa Y, Ohba Y, Wada K, Kobayashi H (1999). A recessive *Arabidopsis* mutant that grows photoautotrophically under salt stress enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell*, 11: 1195~1206
- Van Breusegem F, Dat JF (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol*, 141: 384~390
- Wilson ZA, Morroll SM, Dawson J, Swarup R, Tighe PJ (2001). The *Arabidopsis* *MALE STERILITY1 (MS1)* gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. *Plant J*, 28: 27~39
- Yadegari R, Drews GN (2004). Female gametophyte development. *Plant Cell*, 16: S133~S141