

拟南芥中 *PLC4* 基因的超表达对花粉发育的影响

吕丽敏 孙春丽 王冬梅 潘延云*

河北农业大学生命科学院, 河北保定 071000

提要 从 salk 库中取得 1 种 *PLC4* 基因突变体, PCR 检测表明其 T-DNA 插入位点比网上的位置有 235 bp 的偏差, 在 *PLC4* 基因的 3' 非翻译区, 位点的插入造成该基因的超表达。表型分析表明, 该突变株的花粉形态与野生型有差异。推测该基因的超表达对花粉发育造成影响。

关键词 拟南芥; *PLC4*; 花粉

Effects of *PLC4* Overexpression on Pollen Development in *Arabidopsis thaliana*

LÜ Li-Min, SUN Chun-Li, WANG Dong-Mei, PAN Yan-Yun*

College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China

Abstract A *PLC4* gene mutant was obtained from Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. Insertion site of T-DNA differed about 235 bp from that of Salk Laboratory by PCR, T-DNA inserted 3' UTR. This insertion site resulted in *PLC4* overexpression. Mutant pollen appeared morphologically unnormal compared with wide-type. So we presumed that *PLC4* overexpression affected pollen development.

Key words *Arabidopsis thaliana*; *PLC4*; pollen

肌醇磷脂特异的磷脂酶C (phosphoinositide-specific phospholipase C, PI-PLC, 简称PLC) 是肌醇磷脂信号系统中的一个关键酶。自 1995 年第 1 个编码有功能的植物 PLC 的 cDNA 在拟南芥中被克隆 (Yamamoto 等 1995) 后, 人们又在大豆、马铃薯、烟草、水稻、番茄、豌豆和百合以及苔藓植物等多个物种中克隆到 PLC 基因 (Shi 等 1995; 林芳等 2001; Mikami 等 2004; Pan 等 2005)。此种基因在植物对外界刺激如渗透胁迫、ABA、光、重力、病原侵染、授粉以及缺氧等的应答反应和生理活动中起作用 (Legendre 等 1993; Munnik 等 1998; Perera 等 1999; Staxén 等 1999; Stevenson 等 2000; Reggiani 和 Laoreti 2000; Kim 和 Huang 2004)。

PLC 在动植物细胞中都是以多基因家族的形式存在。Lin 等 (2004) 的实验表明, 拟南芥基因组中 *PLC* 和 *PLC* 基因亚型有 17 种, 他们用基因芯片的方法对各种亚型作了高通量分析的结果表明, 多数 *PLC* 亚型在叶中呈高水平表达, 还有些亚型分别在花、茎等组织中表达量占优势, 一些亚型在不同激素处理和逆境条件下表达量有明显变化。说明不同亚型的 *PLC* 可能参与不同的生理过程。Hunt 等 (2004) 用转基因的方法检测 4 种 *PLC*

亚型的组织水平表达特征, 也证实不同亚型的组织特异性表达各具特点。但究竟是哪些亚型参与花粉的发育及其萌发生长的生理过程, 仍属未知。

花粉发育及其萌发和生长是植物有性生殖发育的重要事件之一。从 1987 年开始, 有关 PLC 可能参与调节花粉管萌发和生长的报道时有出现, 从而为 PLC 可能参与花粉萌发和伸长生长的生理过程提供了药物学和初步的分子生物学证据, 但这些证据依然不能断定 PLC 中哪个或哪些亚型在起作用, 所以也难以深入研究 PLC 参与调节花粉萌发的分子机制和信号转导途径。我们以拟南芥基因突变体为材料, 用反向遗传学的方法, 试图确定与花粉发育及生长相关的 *PLC* 亚型, 以期能为 PLC 参与这一生理过程的功能提供活体证据。

材料与方法

野生型和突变体拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 均为 Columbia 生态型, *PLC4* 突变体来自 Salk In-

收稿 2006-04-11 修定 2006-08-21

资助 国家自然科学基金 (30570993)。

*通讯作者 (E-mail: panyanyun@263.net, Tel: 0312-7528275)。

stitute Genomic Analysis Laboratory。小量胶回收试剂盒、小量 RNA 提取试剂盒购自上海华舜生物公司, Taq DNA 酶购自天为时代生物公司, 相关限制酶为宝生物工程(大连)有限公司产品。

拟南芥种子经深层(10%次氯酸钠浸泡5 min, 无菌水洗3次)消毒后, 播种在固体 MS 培养基上(3%蔗糖、0.8%琼脂粉, pH 5.8)上, 置4℃低温暗中培养3 d后, 转到光照培养箱(22℃, 每天光照16 h, 光照强度为130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)中培养。10~14 d后幼苗长出2~4片真叶时, 移栽到浸透 Hoagland 营养液的蛭石中, 于前述相同温度和光照条件下继续培养, 每周浇灌1次 Hoagland 营养液。

基因组 DNA 小量提取参照的方法(Edwards 等 1991)有改动。

引物设计用<http://signal.salk.edu/>网站上提供的插入位点(图1)相邻的旁侧序列, 然后用 Omega 软件与该基因比对找到突变基因的 T-DNA 插入位点, 分别在插入位点上下游设计引物 1、2 及引物 LBb1, 用 PCR 的方法鉴定突变体。引物 1: 5' CCCGAGTAAATTCCTCCAAC 3'; 引物 2: 5' GTGAAACCGCATGAGAAGTG 3'; LBb1: 5' AGTTGCAGCAAGCGGTCCACGC 3'。经过 PCR 鉴定发现网上提供的插入位点有误, 找出 T-DNA 的正确插入位点后设计引物 3 (图3), 引物 3: 5' TGCATCAAACTTCTTTTAGAGG 3', 并用它与上述引物 1 及引物 LBb1 重新鉴定突变纯合体。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。

确定 *PLC4* 基因 T-DNA 插入位点时以 LBb1 为测序引物, 将 LBb1 和引物 1 通过 PCR 扩增出的条带进行序列测定, 测得的序列用 Omega 软件与 *PLC4* 基因序列比对, 从而找出正确的插入位点。

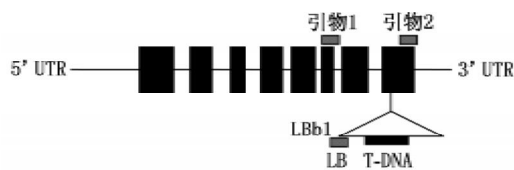


图1 拟南芥 *PLC4* 基因突变体中 T-DNA 插入的位置
Fig.1 Location of T-DNA insertion in *AtPLC4* mutant
根据<http://signal.salk.edu/> 提供信息绘制。

RNA 提取用上海生工的小量 RNA 提取试剂盒; RT-PCR 采用 Invitrogen 公司产品。RT-PCR 反应用引物 4、5。引物 4: 5' GCTCTAGAATGGG-GAGTTACAAAATGGG 3'; 引物 5: 5' CGGGAT-CCCAAGAAAGTGAAACCGCATG 3', 预计扩增片段为 1.7 kb。

观察 *PLC4* 基因突变体花粉表型, 取当天盛开的花约 50 朵放入 1.5 mL 离心管, 加入 700 μL BK 萌发液, 漩涡震荡、离心收集花粉, 用 25 μL 培养液悬浮花粉粒(Fan 等 2001)。光学显微镜(Nikon)观察。

结果与讨论

1 *PLC4* 突变体 T-DNA 为 3' 非翻译区(3' UTR) 单拷贝插入

Salk Institute Genomic Analysis Laboratory 提供的 *PLC4* 基因 T-DNA 插入位点是在第 8 外显子上(图1)。根据这个位置设计引物 1、2 进行 PCR 扩增, 引物 1、2 扩增片段预期为 800 bp, 与实际扩增的条带分子量相符(图2, 1号泳道); 而 LBb1 和引物 1 扩增的片段预期为 780 bp, 实际却扩出 1 000 bp 左右的条带(图2, 2号泳道)。这一结果表明, 实际的插入位点比预期约有 200 bp 的偏差。电泳条带回收后测序, 用 Omega 生物学分析软件与 *PLC4* 基因序列进行比对的结果显示, T-DNA 插入位点在 *PLC4* 基因的 3' UTR (图3)。根据该位点重新设计引物 3, 结合引物 1 和 LBb1 进行 PCR 鉴定的结果表明, 若 2 条染色体链的目的

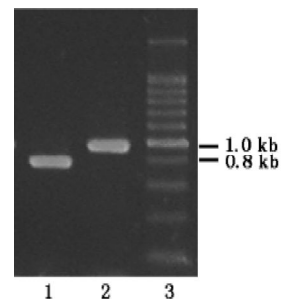


图2 按照网上的插入位点设计引物进行 PCR 扩增后的电泳图谱
Fig.2 T-DNA insertion site detection by PCR with the primers

1: 引物 1、2 扩增的条带; 2: 引物 1、LBb1 扩增的条带; 3: DNA 分子量标记。

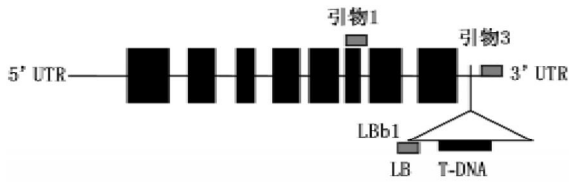


图3 拟南芥 *PLC4* 基因突变体中 T-DNA 插入的位置 (在 3' UTR 处)

Fig. 3 Location of T-DNA insertion in *AtPLC4* mutant

基因都有 T-DNA 的插入 (即突变纯合体), 则只有引物 1 和 LBb1 可扩增出 1 个条带, 预计分子量为 1 015 bp, 引物 1、3 不能扩增出条带; 若只有 1 条链上有 T-DNA 插入, 即杂合体植株, 那么引物 1、3 也会有条带扩出, 预计分子量为 1 119 bp。野生型植株因为没有 T-DNA 插入, 所以只有引物 1、3 能够扩出条带。鉴定结果分别得到了 3 种植株, 如图 4 所示。

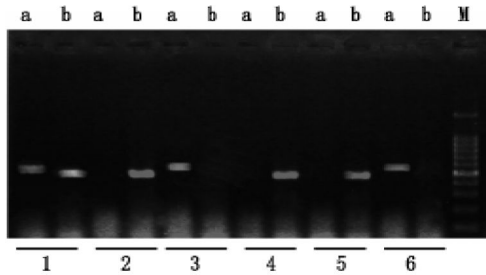


图4 *PLC4* 基因突变纯合体鉴定的电泳图谱

Fig. 4 Identification of *PLC4* gene T-DNA insertion mutant by PCR

1: 杂合体; 2、4、5: 突变纯合体; 3: 筛出的野生型; 6: 野生型对照; M: DNA 分子量标记。泳道 a: 引物 1、3 扩增的条带; 泳道 b: 引物 1 与 LBb1 扩增的条带。

将鉴定好的纯合体、杂合体和野生型的种子分别挑放在 MS (Kan^r) 的平板上, 见到的纯合体均为抗 Kan 的绿色苗, 野生型均为黄色苗, 而杂合体的平板上绿苗数为 362 株、黄苗为 119 株, 二者的比例为 3:1, 说明该突变株为单拷贝插入。

2 *PLC4* 突变体为 *PLC4* 基因超表达体

PLC4 为花粉特异表达的基因 (Hunt 等 2004)。我们用 RT-PCR 的方法分别检测野生型和突变体花粉中该基因表达的结果显示, 野生型拟南芥的花粉中, 该基因的表达量非常低, 而突变体中表达量明显高于野生型 (图 5)。说明 T-DNA 的插入影

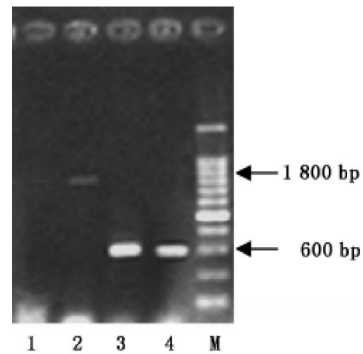


图5 突变体花粉和野生型花粉中 *PLC4* 基因的 RT-PCR 检测

Fig. 5 Identification of *PLC4* gene transcript in homozygous mutant and WT plants by RT-PCR

1: 野生型花粉; 2: 突变体花粉; 3: 野生型的 actin 对照; 4: 突变体的 actin 对照; M: DNA 分子量标记。

响了 *PLC4* 突变体的基因表达, 它在 3' UTR 的插入, 不仅没有破坏目的基因的表达, 反而使得这个基因表达水平增强。动物细胞中研究 3' UTR 的结果表明, 该区域的 AU 富含单元 (A、U 含量高达 72%) 对基因有负调控的作用 (戴冰冰等 2003)。另有研究表明, AU 富含单元能够调节 mRNA 的稳定性及控制其正确定位 (Julie 等 2000); Veyrone 等 (1996) 也报道 AUUUA 序列是存在于 3' UTR 内的关键定位信号。*PLC4* 基因的 3' UTR 也存在 AU 富含单元, 全区域 A、U 含量达 74%。因此推测, 该 *PLC4* 基因亚型也可能存在 3' UTR 的负调控, 而 T-DNA 的插入则破坏了这种负调控, 所以该基因的表达水平提高。

3 *PLC4* 突变体中部分花粉呈现败育状态

以野生型为对照, 分别观察 *PLC4* 突变体和

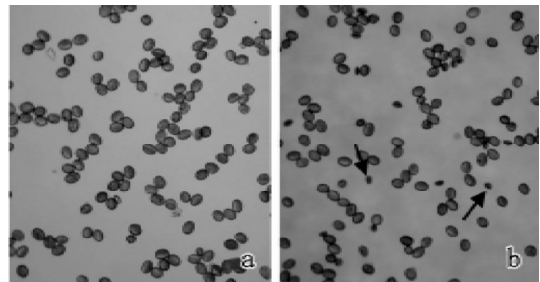


图6 显微镜下花粉形态

Fig. 6 Morphology of mature pollen

a: 野生型花粉粒; b: 突变体花粉粒。箭头所指为变形的花粉。

野生型花粉粒状态的结果显示, 野生型成熟花粉饱满, 而突变体的花粉粒中有一部分干瘪和变形(图6)。变形的花粉占10%, 说明该基因表达水平有变化, 这一变化会影响花粉的正常发育过程。至于它影响花粉发育的作用机制和信号途径, 还有待进一步探讨。

参考文献

- 戴冰冰, 卢健, 王家敏, 梅文瀚, 王楚, 钱关祥(2003). PI3K γ mRNA 3' 非翻译区可能存在基因表达负调控区. 中国生物化学与分子生物学报, 19 (5): 630~635
- 林芳, 许智宏, 薛红卫(2001). 植物信号传导中的磷脂酶. 植物学报, 43 (10): 991~1002
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res, 19: 1349
- Fan LM, Wang YF, Wang H, Wu WH (2001). *In vitro Arabidopsis* pollen germination and characterization of inward potassium currents in *Arabidopsis* pollen grain protoplasts. J Exp Bot, 52 (361): 1603~1614
- Hunt L, Otterhag L, Lee JC, Lasheen T, Hunt J, Seki M, Shinozaki K, Sommarin M, Gilmour DJ, Pical C, Gray JE (2004). Gene-specific expression and calcium activation of *Arabidopsis thaliana* phospholipase C isoforms. New Phytol, 162: 643~654
- Julie MT, Datta S, Kishore R, Kolosov M, Majo JA, Yoshihiro O, Hamilton TA (2000). Interleukin-1-mediated stabilization of mouse KC mRNA depends on sequences in both 5' and 3' untranslated regions. J Biol Chem, 275 (17): 12987~12993
- Kim HU, Huang HC (2004). Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 134 (3): 1206~1216
- Legendre L, Yueh YG, Crain R, Haddock N, Heinsteins PF, Low PS (1993). Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. J Biol Chem, 268 (33): 24559~24563
- Lin WH, Y Re, Ma H, Xu ZH, Xue HW (2004). DNA chip-based expression profile analysis indicates involvement of the phosphatidylinositol signaling pathway in multiple plant responses to hormone and abiotic treatments. Cell Res, 14 (1): 34~45
- Mikami K, Alexander R, Elena GA, Hartmann E (2004). Isolation of cDNAs encoding typical and novel types of phosphoinositide-specific phospholipase C from the moss *Physcomitrella patens*. J Exp Bot, 55 (401): 1437~1439
- Munnik T, Irvine RF, Musgrave AP (1998). Phospholipid signaling in plants. Biochim Biophys Acta, 1389 (3): 222~272
- Pan YY, Wang X, Ma LG, Sun DY (2005). Characterization of phosphatidy-specific phospholipase C (PI-PLC) from *Lilium daviddi* pollen. Plant Cell Physiol, 46 (10): 1657~1665
- Perera IY, Heilmann I, Boss WF (1999). Transient and sustained increases in inositol 1, 4, 5-trisphosphate precede the differential growth response in ravistimulated maize pulvini. Proc Natl Acad Sci USA, 96 (10): 5838~5843
- Reggiani R, Laoreti P (2000). Evidence for the involvement of phospholipase C in the anaerobic signal transduction. Plant Cell Physiol, 41 (12): 1392~1396
- Shi J, Gonzales RA, Bhattacharyya MK (1995). Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. Plant J, 8 (3): 381~390
- Staxén I, Pical C, Montgomery LT, Gray JE, Hetherington AM, Mcainsh MR (1999). Abscisic acid induces oscillations in guard-cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. Proc Natl Acad Sci USA, 96 (4): 1779~1784
- Stevenson JM, Perera IY, Heilmann I, Persson S, Boss WF (2000). Inositol signaling and plant growth. Trends Plant Sci, 5 (6): 252~258
- Veyrune JL, Campbell GP, Wiseman J, Blanchard JM, Hesketh JE (1996). A localisation signal in the 3' untranslated region of *c-myc* mRNA targets *c-myc* mRNA and β -globin reporter sequences to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-bound polysomes. J Cell Sci, 109: 1185~1194
- Yamamoto YT, Conkling MA, Sussex IM, Irish VF (1995). An *Arabidopsis* cDNA related to animal phosphoinositide-specific phospholipase C genes. Plant Physiol, 107 (3): 1029~1030