

# 植物生长素合成酶 *iaaM* 基因在烟草韧皮部的特异表达对其发育的影响

彭彦, 王亚红, 黄丽华, 张学文\*

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:**为探讨生长素过度合成对植物韧皮部发育的影响,利用韧皮部特异表达的拟南芥蔗糖合成酶基因启动子与色氨酸单加氧酶基因(*iaaM*)重组,构建载体,通过根癌农杆菌介导的叶盘转化法将其转入烟草,获得了转化的烟草植株。大多转基因烟草都表现出叶片卷曲、植株生长异常的生长素过度表型。转基因烟草植株生长较野生型烟草(对照)植株明显迟缓,但其茎横切面韧皮部细胞显著增多,排列更加紧密整齐,木质部也较早开始分化。转基因烟草茎段有大量不定根分化,其根部则在韧皮部薄壁细胞处诱生大量根原基,在 不定根上有大量侧根和根毛的分化。

**关键词:**烟草;色氨酸单加氧酶基因;韧皮部;过表达

中图分类号:Q786 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2012)01-0032-04

## The effects of over expression of auxin synthesis gene *iaaM* in *Nicotiana tabacum*'s Phloem

PENG Yan, WANG Ya-hong, HUANG Li-hua, ZHANG Xue-wen\*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** We constructed a plant phloem-specific expression *iaaM* vector to study the effect of IAA over-expression on phloem development. The vector was constructed by recombining the tryptophan monooxygenase gene (*iaaM*) with the phloem-specific promoter and the sucrose synthesis gene promoter of *Arabidopsis thaliana*. The recombinant was transformed into *Nicotiana tabacum* and several transgenic plants were screened out. Most of the transgenic plants showed abnormal morphologies as leaf curling and delayed development and the seedlings grew slower compared to the wild control. The section observation of the stem showed that more secondary xylem and phloem cells were produced in transgenic plants compared to the wild-type. In addition, there were many adventitious roots abnormally grown out in the transgenic stems and numerous root hairs and lateral roots occurred in transgenic root.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*; tryptophan monooxygenase gene (*iaaM*); phloem; over expression

自从1886年Charles Darwin阐释了植物的向光运动,1928年Went证实了生长素(auxin)的存在,1934年揭示生长素的化学本质为吲哚乙酸(IAA)<sup>[1]</sup>,关于生长素的研究一直是植物学研究的重要领域。吲哚乙酸作为植物生长素在植物生长及发育过程

中具有极其重要的作用,在细胞水平上,生长素可促进形成层细胞分裂,促进细胞伸长、抑制根细胞生长,促进木质部、韧皮部细胞分化,促进愈伤组织的分化和形态建成。在器官和整株水平上,生长素控制胚轴极性的建立,调控根尖向地

收稿日期:2011-10-14

基金项目:湖南省教育厅项目(SCX1103)

作者简介:彭彦(1986—),女,土家族,湖南怀化人,硕士研究生,py225666@163.com; \*通信作者,xwzhang@hunau.net

性和顶端的向光性；生长素建立起植株的顶端优势；延缓叶片衰老；生长素促进开花，诱导单性果实的发育，延迟果实成熟等。生长素功能的发挥通过生长素合成、极性运输及调控其他植物激素的合成来实现。

尽管生长素是人们最先揭示的植物激素，但至今对植物体内生长素合成过程的认识仍不全面。有研究表明，从病原菌中分离的色氨酸单加氧酶基因 *iaaM* 和 *iaaH* 可以在植物体内利用色氨酸合成吲哚乙酸<sup>[2-4]</sup>，因而这些基因常用于研究植物生长素调控发育的工具。

植物维管组织的分化也是由生长素调控的发育过程。为了研究生长素对植物维管分化的调控作用，大多研究都通过控制植物体内生长素运输量的方法来进行。如对植物体特定部位施用外源生长调节剂(生长素)后观察其生长特点，或者使用生长素运输抑制剂以限制局部生长素浓度等。研究发现，施用外源生长素的部位可以决定维管组织的分化区域，在该区域产生向下延伸的新维管束，且这些新维管束是以外源生长素的施加部位为起点的<sup>[5-6]</sup>。如果能内源特异控制维管组织中生长素的合成，特异提高或降低维管组织中生长素浓度来研究生长素对维管发育的影响，必为该研究提供良好的补充。

笔者通过构建 *iaaM* 与韧皮部特异性启动子的植物表达载体，转化烟草后获得转基因植株，对转基因烟草进行形态观察和显微观察，试图从韧皮组织内部入手，研究和认识生长素对植物韧皮部、维管束乃至整体发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

烟草 W38、大肠杆菌 InvaF<sup>+</sup>、根癌农杆菌 LBA4404、载体 pWM101、克隆有 *iaaM* 基因的质粒 pMD18-T-*iaaM*，由湖南农业大学细胞生物学实验室保存；*Taq* 酶和限制性内切酶购于海扬生物公司；DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购于安比奥公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 植物表达载体的构建

根据 NCBI 中已报道的拟南芥 *ASUS1* 基因序列，设计扩增该基因启动子全序列的引物，以提取的拟南芥总 DNA 为模板，进行 PCR 扩增。扩增产物经 A-T 克隆后送华大基因生物公司测序，测序结果与 NCBI 上报道的序列相一致。用 *Hind*、*Kpn*I 双酶切 P<sup>ASUS1</sup> 和载体 pWM101，2 片段在 16 °C 连接过夜，连接产物转化感受态大肠杆菌，进一步筛选阳性菌落，提取阳性克隆质粒并命名为 pWM101-P<sup>ASUS1</sup>。经 *Kpn*I、*Sal*I 双酶切载体 pWM101-P<sup>ASUS1</sup> 和 pMD18-T-*iaaM*，将酶切所得的 pWM101-P<sup>ASUS1</sup> 大片段和 *iaaM* 基因连接，获得植物表达载体 pWM101-P<sup>ASUS1</sup>-*iaaM*。

#### 1.2.2 烟草的转化及再生

利用根癌农杆菌介导转化烟草小叶盘，经共培养后转入含有 3 mg/L 6-BA 和 0.05 mg/L NAA 的 MS 筛选培养基(250 mg/L Cef, 50 mg/L Hygromycin B) 上进行筛选。10 d 后大多数外植体逐渐褪绿，变黄，最终萎蔫并逐渐变白，仅有少数叶盘切口处形成愈伤组织并逐渐转变为浅绿色，随后的培养过程中，一些愈伤组织逐渐开始形成芽点，并分化出小芽。待小芽长至 1~2 cm 高时转至含有潮霉素的生根培养基中进行生根培养，最终获得 16 株抗潮霉素的抗性植株。

#### 1.2.3 抗性植株的分子检测

提取抗潮霉素的抗性植株叶片的总 DNA 和 RNA。利用 P<sup>ASUS1</sup> 启动子特异性引物对总 DNA 进行 PCR 扩增。以质粒 pMD18-T-P<sup>ASUS1</sup> 为阳性对照，以野生型烟草为阴性对照，以无菌水为模板做空白对照。对烟草总 RNA 进行反转录后利用 *iaaM* 基因引物对其进行 PCR 扩增，以质粒 pMD18-T-*iaaM* 为阳性对照，以未转化的烟草叶片做阴性对照。

#### 1.2.4 转基因植株的形态观察和显微观察

观察转基因烟草和野生型烟草形态；制作烟草的茎石蜡切片，对茎的横切面的维管组织进行显微观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因烟草的 PCR 和 RT-PCR 扩增检测

对获得的经潮霉素抗性筛选的 16 株转基因烟草苗进行启动子  $P^{ASUS1}$  的 PCR 检测,有 6 株烟苗为转基因阳性株(图 1)。

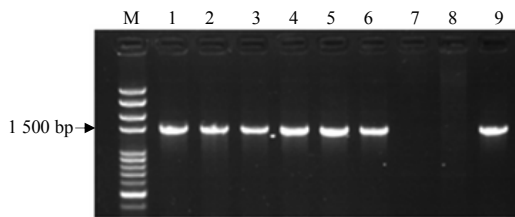


图 1 启动子  $P^{ASUS1}$  的 PCR 检测  
M 100 bp plus DNA marker; 1~6 转基因个体扩增; 7 空白对照; 8 阴性对照; 9 以质粒为模板的阳性对照。

图 1 启动子  $P^{ASUS1}$  的 PCR 检测

Fig.1 PCR verify the transgenic seedlings with specific primers to  $P^{ASUS1}$

采用 RT-PCR 方法对转基因 *iaaM* 的表达情况进行检测,以烟草 Actin 为内标分子。结果表明,在转基因植株中 *iaaM* 得到了有效表达(图 2)。

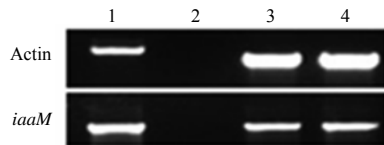


图 2 *iaaM* 基因表达的 RT-PCR 检测  
1 以转基因烟草 DNA 为模板的扩增对照; 2 空白对照; 3~4 目的片段 RT-PCR 扩增。

图 2 *iaaM* 基因表达的 RT-PCR 检测

Fig.2 RT-PCR amplification of *iaaM* expression with actin as internal reference

### 2.2 转基因烟草与野生型烟草对比分析

观察比较转基因烟草和对照野生烟草植株形态(封三图 3),发现转基因烟草植株比较矮小,叶片卷曲,茎上长出大量不定根,不定根上有较多侧根和大量根毛,为典型生长素代谢异常表型。

对转基因烟草茎进行石蜡切片(封三图 4)观察,发现在其茎的韧皮薄壁细胞处有一团分裂能力很强的细胞团,细胞体积小、排列紧密、细胞质浓、染色较深,与周围的皮层薄壁细胞明显不同,这应是初期的不定根原基,这团细胞继续分裂分化发育成根原基。根原基进一步生长,最后突破皮层伸出体外(封三图 4-2、3、4)。对比野生型烟草茎的石蜡切片图,发现转基因烟草茎的韧皮部较对照发

达,韧皮细胞排列更加紧密整齐,木质部的发育也较野生的早(封三图 4-5)。

## 3 讨论

生长素能促进植物根的发育,生长素对植物不定根的形成起着关键的作用<sup>[7-8]</sup>。植物根(包括不定根)由根源基发育而来,转基因烟草可能是受到外源生长素在体内韧皮部特异表达的影响,其茎的韧皮部薄壁组织恢复了分生能力,分化出根原基发端细胞,出现了根原基的发端<sup>[9]</sup>。

生长素是植物韧皮部和木质部发育的调控因子和限制因素。Aloni<sup>[10]</sup>研究发现,对植株局部施用外源生长素后,该部位及其周围区域维管组织都比对照发达。Klee 等<sup>[11]</sup>研究指出,生长素过量表达的转基因植物中,其维管数量一般多于正常植株。在植物维管组织发育过程中,包括经组织培养的植株的维管组织发育过程中,一般韧皮部较木质部先开始发育,且在韧皮部未分化之前木质部一般不分化。较低的生长素浓度下能诱导筛管的分化,但对导管的分化没有作用,但在较高生长素浓度下能均能诱导筛管和导管的分化<sup>[12]</sup>。由于转基因烟草茎的韧皮部受到外源生长素的刺激较早的分化,木质部也提前发育,维管组织较对照发达。

有报道认为,生长素和乙烯是植物根毛发育的关键性激素,它们在拟南芥根表皮细胞分化的晚期对根毛的形成起重要作用<sup>[13]</sup>;Schiefelbein 等研究认为这些激素主要在下流或者独立于一些与根毛形成有关的基因(*TTG* 和 *GL2*)来进行调控<sup>[14]</sup>。Michael 认为其他各种环境因子(包括生长素)对根毛发育的影响都是直接或间接地通过乙烯的调控实现的<sup>[15]</sup>,例如乙烯能调控根毛发生的选择位点,而乙烯的这种调节又受到生长素的影响。Schiefelbein 进一步研究表明,乙烯和生长素能通过各自不同的调控途径来影响根毛的发育,生长素单方面就能促进根毛的形成和伸长<sup>[13-14]</sup>。在本研究结果中,转基因烟草根上长出大量根毛,很可能是直接或者间接受到 *iaaM* 基因的影响。

植物维管组织分化是多因素共同作用的结果,其中生长素对该过程起着重要的作用,其他植物激素起辅助或者增强作用<sup>[16]</sup>。植物维管组织生长素浓度通常较高,这对于其发育至关重要,但如果进一步提高生长素浓度,即在植物韧皮部过量表达生长素,可能会导致维管的异常发育和大量根原基在茎段的异常形成。此外维管作为植物的疏导组织,可以通过韧皮部或以一种定向的或极性的运输系统在植物中对生长素进行运输,导致植物在局部甚至整株形态上产生一系列的变化,因此转基因烟草整体发育异常。值得注意的是,生长素浓度的提高并没有引起植株的快速生长,转基因植株反而较对照野生植株生长迟缓,这些变化可帮助探讨生长素对植物发育及整体生长调节功能。

#### 参考文献:

- [1] Tomasz Paciorek, Jir'í Friml. Auxin signaling[J]. Cell Science at a Glance, 2006, 119: 1199–1202.
- [2] 倪迪安,于晓红,王凌健.基因在烟草花粉中的表达及其在花粉发育中的作用[J].实验生物学报,2002,35(3): 1–6.
- [3] 刘迪,李群,李冠. IAA合成关键基因*iaaM*研究进展[J].生物技术,2008,18(2): 87–90.
- [4] Schomburg D, Schomburg I, Chang A. Springer Handbook of Enzymes [K]. 2 eds. Berlin :Springer, 2006: 687–691.
- [5] Fukuda H. Tracheary element differentiation [J]. Plant Cell, 1997, 9(7): 1147–1156.
- [6] Aloni R, Aloni E, Langhans M, et al. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture[J]. Annals of Botany, 2006, 97: 883–893.
- [7] Geneve Robert L. Patterns of adventitious root formation in English ivy[J]. Plant Growth Regulation, 1991, 10:215–220.
- [8] Lall S, Mandegaran Z, Roberts A V. Shoot multiplication and adventitious regeneration in *Sorbus aucuparia*[J]. Plant Cell, 2006, 85(1): 23–29.
- [9] Geert-Jan de Klerk, Win van der Keieken, Joke C de Jone. The formation of adventitious roots[J]. In Vitro Cellular & Development Biology Plant, 1999, 35: 189–199.
- [10] Aloni R. Role of auxin and gibberellin in differentiation of primary phloem fibers[J]. Plant Physiol, 1976, 63(4): 609–614.
- [11] Klee H J, Horsch R B, Hinchee M A, et al. The effects of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants[J]. Genes and Development, 1987, 1(1): 86–96.
- [12] Roni Aloni. Differentiation of vascular tissues[J]. Plant Physiol, 1987, 38: 179–204.
- [13] James D, Masucci, John W Schiefelbein. Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root[J]. Plant Cell, 1996(8): 1505–1517.
- [14] Schiefelbein J. Cell-fate specification in the epidermis: A common patterning mechanism in the root and shoot[J]. Curr Opin Plant Biol, 2003, 6(1): 74–78.
- [15] Michael G. The control of root hair formation: Suggested mechanisms[J]. Plant Nutr Soil Sc, 2001, 164(2): 111–119.
- [16] Aloni R. Role of cytokinin in differentiation of secondary xylem fibers[J]. Plant Physiol, 1982, 70(6): 1631–1633.

责任编辑: 罗慧敏