

毛白杨 *PtAUX1* 超表达对光照反应的影响

于淑惠, 左曼曼, 闫 辉, 郎庆雯, 樊金会

(山东农业大学 林学院, 山东 泰安 271018)

摘 要:利用构建好的 *PtAUX1* 的表达载体, 转化毛白杨, 获得转基因植株。通过 PCR 技术检测 *PtAUX1* 的转基因植株, 分析转化植株在不同的光照长度和光照强度下的形态变化。结果表明: *PtAUX1* 基因影响毛白杨对光照的敏感性, 在低光照强度下, 转基因毛白杨生长缓慢且叶片卷曲; 表明 *PtAUX1* 基因通过生长素输入载体的不对称分布影响生长素的极性运输, 进而参与叶片极性的建立, 影响了器官形态和发育过程。

关键词:生长素; 极性运输; 毛白杨

中图分类号:S 792. 117 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2012)13—0122—03

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)为杨柳科落叶大乔木, 是一个优良的造林绿化树种。然而目前, 在一些较为极端的环境条件下, 比如在光照较弱的环境中, 现有毛白杨的生长状况不尽人意。利用基因工程方法将外源基因转入毛白杨中, 是实现毛白杨抗逆转化的一条重要途径^[1]。光照是影响植物生长发育的重要环境因子之一, 不仅能给植物提供能量, 而且也作为信号调控植物生长发育。而生长素则是参与植物生长发育的重要激素之一。拟南芥生长素反应因子 ARF8 (Auxin response factor 8) 受光诱导表达的影响, 涉及光信号的转导^[2]。有光照时, 拟南芥中 ARF8 基因的表达量会增加^[3], 拟南芥中 *OxARF8* 的表达量会微量减少^[4]。生长

素响应因子在调控生长素所诱导的基因表达中起着关键的作用^[5]。

生长素的极性运输对建立和维持植物体的轴性有着紧密的关系, 调控着植物体的生长发育和器官形成。迄今为止, 已知的激素中只有生长素具极性运输的特征。生长素的极性运输(PAT)是指生长素在植物体内由形态学的上端向下端单向运输, 由一个细胞到下一个细胞连续进行的^[6]。由极性运输所形成的生长素浓度梯度调控了植物的许多生理过程, 如顶端优势、维管发生和向性生长等, 可以说, 生长素的极性运输在植株形态发生中起着重要的作用。

木本植物具有复杂的树体结构和发达的次生组织, 研究生长素在树木器官形态发生中的作用具有很重要的意义。课题组长期研究毛白杨生长素受体和诱导响应因子作用^[7]。通过分离毛白杨生长素内运载体蛋白基因 *PtAUX1* (基因登记号为: Bankit545669), 以毛白杨为受体植物进行超表达, 对获得的转化植株形态进行观察, 了解生长素信号在不同的光照条件下对植株形态的作用。

第一作者简介:于淑惠(1984-), 女, 在读硕士, 现主要从事园林分子植物育种研究。E-mail: shuhui19841015@126.com.

责任作者:樊金会(1965-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事园林分子植物育种研究工作。E-mail: hjf2003@sdaa.edu.cn.

基金项目:山东省科技计划资助项目(J07YF08)。

收稿日期:2012-04-26

Application of Climber in Parks of Guangzhou

LAI Qiao-hui^{1,2}, WENG Shu-fei², HU Jing-kai³

(1. Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou, Guangdong 510507; 2. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642; 3. Guangzhou Municipal Engineering Design and Research Institute, Guangzhou, Guangdong 510060)

Abstract: The survey of application of climber in 15 parks of Guangzhou was studied, the plants species and application form in climber greening were recorded. The results showed that climber plants in Guangzhou had 42 species. The highest frequency in climber greening were *Bougainvillea spectabilis*, *Parthenocissus dalzielii*, *Quisqualis indica*, *Pyrostegia venusta*, and followed by *Wisteria sinensis*, *Ficus pumila*, *Epipremnum aureum*. There were 5 application forms in climber greening, the main style was capopy frame.

Key words: climber; parks of Guangzhou; landscape application

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为毛白杨‘易县雌株’(*Populus tomentosa* cv. ‘hopeinica’)。野生型和转基因型毛白杨的组织培养方法主要参考崔澄等^[8]的方法。毛白杨组织培养条件为:温度 24~26℃;光/暗条件为 16h/8h;光照强度为 2 000 lx。用冻融法将表达载体 35 S::*PtAUX1* 转入农杆菌 GV3101 中,采用王善平等^[9]的叶圆盘法转化毛白杨,获得抗性植株。野生型对照植株和遗传转化植株均栽植于营养土、蛭石和沙等按体积比例混合的盆中,定期浸 1/8MS 液体培养基。栽培温室条件:温度 18~28℃,光期/暗期为 16h/8h,光照强度至少 2 000 lx。

1.2 试验方法

1.2.1 转基因植株的 PCR 检测 用 TIANGEN 试剂盒提取毛白杨叶的 DNA。用 35S 启动子两端的引物进行 PCR 扩增。引物 1:5'-agtggattgatgtgatctcca-3';引物 2:5'-cttggctaatacatgggtcatagctgt-3'。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统拍照。

1.2.2 *PtAUX1* 转基因毛白杨的形态观察 以野生型植株为对照,在光期/暗期为 8h/16h 的环境条件下,观察植株形态变化;在光照强度低于 50 lx 的条件下观察盆栽转基因植株的叶片生长情况。

1.2.3 *PtAUX1* 转基因植株叶绿素含量的测定 称取 0.5~1.0 g 新鲜的毛白杨叶片,剪碎后加入 5 mL 80% (质量分数) 丙酮置于研钵中研磨,直到研成匀浆,然后将其全部转移到 10 mL 离心管中,并用丙酮加至管满。然后在 4℃ 冰箱内静置 1 h,取出后 1 500 r/min 离心 10 min。叶绿素提取液在波长为 645、663 nm 下分别测定其光密度值,根据 Aron 公式计算出叶绿素 a、叶绿素 b 及叶绿素总量^[10]。

2 结果与分析

2.1 *PtAUX1* 转基因毛白杨的形态分析

通过叶圆盘转化法,获得 5 个转基因株系。提取 DNA 进行 PCR 扩增分析,以野生型植株的 DNA 作对照,由图 1-A 可知,目的基因已经整合到毛白杨的基因组中。经观察发现,转基因植株长势旺盛(图 1-B),且叶片数量要比野生型植株的多。在同一条件下,以叶面积大于 2.0 cm² 为标准统计叶片数量,35S::*PtAUX1* 转基因植株的叶片要比野生型的多约 2/3(表 1)。

表 1 野生型植株与 35S::*PtAUX1* 植株叶片数量

Table 1 Leaf number of wild type and 35S:: <i>PtAUX1</i> transgenic plants of the poplar						
植株	植株 1	植株 2	植株 3	植株 4	植株 5	平均值
Plant	Plant 1	Plant 2	Plant 3	Plant 4	Plant 5	Average value
野生型	13	13	15	14	15	14
Wild type						
35S:: <i>PtAUX1</i>	24	23	24	25	24	24

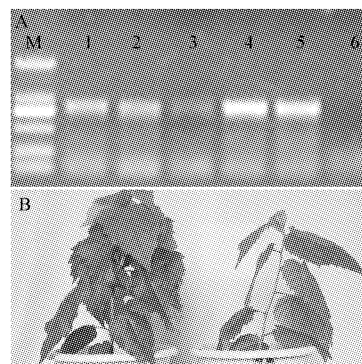


图 1 转基因植株及 PCR 检测

注:A:转基因毛白杨的 PCR 鉴定(M:Marker DL 2000,1~5:转基因植株,6:野生型);B:转基因毛白杨及野生型的生长状况。

Fig. 1 Transgenic plants and detection by PCR

Note: A: The results of PCR identifying the *PtAUX1* transgenic plants(M:Marker DL 2000,1~5:transgenic plants,6:wild type plants); B: the phenotypes of transgenic plant and the wild type.

2.2 *PtAUX1* 转基因植株改变了对光照的反应

以野生型植株为对照,将盆栽转基因植株置于光期/暗期为 8h/16h 的环境条件下,转基因植株明显比野生型的生长旺盛,野生型植株下部叶片脱落,而转基因型的不受影响(图 2-A)。用 722 型分光光度计在波长为 645 和 663 nm 下分别测定绿素提取液的光密度值,计算叶绿素 a、叶绿素 b 含量浓度及叶绿素总量,结果见表 2,转基因毛白杨的叶绿素 a、叶绿素 b 和叶绿素总量明显高于野生型植株。

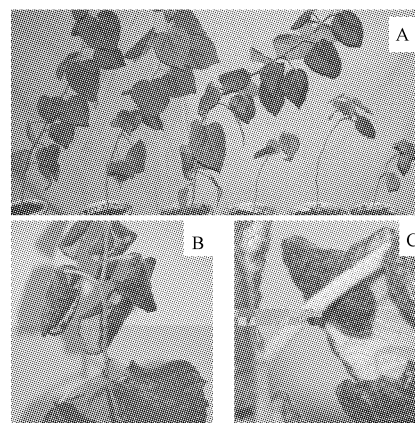


图 2 光照对转基因植株的影响

注:A:转基因型和野生型生长状况(前 3 株为转基因型,后 3 株为野生型);B:低光照强度下转基因毛白杨形态;C:低光照强度下叶片形态。

Fig. 2 Illuminate responses of transgenic plants

Note: A: the phenotypes of transgenic plant and the wild type(First 3 are transgenic plant,last 3 are the wild type); B: Morphologies of transgenic plants in low light intensity; C: Morphologies of leaves in low light intensity.

在光照强度低于 50 lx 的光照条件下,发现转基因植株生长缓慢且叶片向背面卷曲(图 2-B 和 2-C)。说明生长素的生物合成直接参与了叶片形态决定。

表 2 转基因型和野生型叶绿素含量

Table 2 Chlorophyll content of the transgenic plant and the wild type mg/L

植株 Plant	叶绿素 a Chlorophyll a	叶绿素 b Chlorophyll b	叶绿素总量 Chlorophyll
<i>PtAUX1</i> -1	9.25	4.76	14.01
WT-1	6.53	3.86	10.39
<i>PtAUX1</i> -2	8.84	4.17	13.01
WT-2	6.42	3.82	10.24
<i>PtAUX1</i> -3	9.13	4.82	13.95
WT-3	7.47	4.46	11.93
<i>PtAUX1</i> -4	8.96	4.91	13.87
WT-4	7.78	4.29	12.07
平均值(<i>PtAUX1</i>) Average value(<i>PtAUX1</i>)	9.05	4.67	13.72
平均值(WT) Average value(WT)	7.05	4.11	11.16

3 结论与讨论

杨属植物作为木本植物生物学的模式植物,研究其营养阶段的器官形态更有意义。光是对植物调控作用最明显、最广泛的环境因子。大多数植物器官的向光弯曲是由于向光侧细胞生长受到抑制,背光侧细胞生长相对较快导致的。据 Shinkle 等^[11]的研究,弱红光(dim-red light, DRL, $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)下,黄化黄瓜(*Cucumis sativus*)幼苗下胚轴切段试验证明了极性运输的^{[3]H}吲哚-3-乙酸含量增加,其运输强度和运输速率均增加。这种由光诱导引起的变化,是通过改变生长素运输载体功能来进行的。所以,在光形态建成中生长素载体是一个重要的光调控靶位点。

迄今为止,已知的植物激素中只有生长素具有极性运输这一特征。大量试验证明,植物体内生长素的不均匀分布,调控着植物的极性发育。生长素的生物合成直接参与了叶片形态的决定,35S:: *PtAUX1* 打破生长素极性运输的结果,导致叶极性建立的改变,出现叶片卷曲的现象(图 2-B),生长素极性运输抑制剂阻碍了生长素的运输,导致了生长素局部浓度的不平衡,继而引起了器官发生和形态建成的不正常^[12]。在植物的许多生理过程中,由极性运输所形成的生长素浓度梯度都参与其中,生长素的极性运输是植株形态的决定者^[13]。

光敏色素 A 是接受远红光的主要受体。生长素响

应因子 ARF 是一类转录因子,在生长素调控基因表达中起关键作用^[14]。Tian C E 提出了与 ARF8 有关的信号转导模型假说:光 \cdots →光受体 \cdots →ARF8 \cdots →GH3 \cdots →IAA \cdots →生长反应^[3]。后来在水稻中得到了验证^[15]。

该试验结果表明, *PtAUX1* 符合生长素的作用特点,通过极性运输调节生长素在植物体内的形态建成,光信号转导与生长素信号转导存在一定的联系。

参考文献

- [1] 林善枝,肖基洪,张志毅.杨树抗性基因工程研究进展[J]. 北京林业大学学报,2000(22):85-88.
- [2] 王海,周玉萍,王小兰,等.破坏光敏色素 A 改变生长素反应因子 8 的表达谱[J]. 植物学报,2009(44):434-441.
- [3] Tian C E, Muto, Hideki. Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of Arabidopsis affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition[J]. Plant Journal, 2004, 40:333-343.
- [4] Wang D K, Pei K M, Fu Y P. Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. Gene, 2007, 394:13-24.
- [5] Hagen G, Guilfoyle T J. Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors[J]. Plant Mol Biol, 2002, 49:357-372.
- [6] Morris D A, Rubery P H, Jarman J. Effects of inhibitors of protein synthesis on transmembrane auxin transport in *Cucurbita pepo* L. Hypocotyl segments[J]. Journal of Experimental Botany, 1991, 42:773-783.
- [7] 李静. 毛白杨 *PtAUX1* 基因的分离及超表达植株的表型分析[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.
- [8] 崔澄, 桂跃林. 经济植物的组织培养与快速繁殖[M]. 北京: 农业出版社, 1985.
- [9] 王善平, 许智宏, 卫志明. 毛白杨叶外植体的遗传转化[J]. 植物学报, 1990(32):172-177.
- [10] 苏正淑, 张宪政. 几种测定植物叶绿素含量的方法比较[J]. 植物生理学通讯, 1989(25):77-78.
- [11] Shinkle J R, Kadakia R, Jones A M. Dim-red-light-induced increase in polar auxin transport in cucumber seedlings[J]. Plant Physiol, 1998(116):1505-1513.
- [12] 谢志霞. 钙和生长素对棉花幼苗侧根发生的协同调控效应[J]. 棉花学报, 2006(18):99-103.
- [13] Friml J. Auxin transport-shaping the plant[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003(6):7-12.
- [14] Woodward A W, Bonnie B. Auxin: Regulation, Action, and Interaction [J]. Annals of Botany, 2005(95):707-735.
- [15] Yang J H, Han S J, Yoon E K. Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells[J]. Nucleic Acids Research, 2006(34):1892-1899.

Over-expression *PtAUX1* of *Populus tomentosa* Carr. Affects the Reaction of Light

YU Shu-hui, ZUO Man-man, YAN Hui, LANG Qing-wen, FAN Jin-hui
(College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018)

Abstract: *PtAUX1* vector constructed by our laboratory were transformed into *Poplar*, then get transgenic plants. The transgenic plants were detected by PCR, and the phenotypes were analyzed in the different illumination length and illumination intensity. The results showed that the transgenic plants influenced the sensitivity of light, leaves were curling in the low light intensity. These results indicated that *PtAUX1* influence auxin polar transport by nonuniform distribution of import carrier, then participated in leaf polarity establishment, and influenced morphology and development of the organs.

Key words: auxin; auxin polar transport; *Populus tomentosa* Carr.