

*JOINTLESS/MACROCALYX/SLMBP21*多基因转化 番茄植株表型鉴定与分析

刘旦梅 张彦洁 裴雁曦*

(山西大学生命科学学院, 太原 030006)

摘要 器官脱落是植物中重要而普遍的生理现象, 同时又是一个重要的农艺性状。离区是器官脱落发生的部位, 离区发育是研究器官脱落的重要环节。植物MADS-box蛋白是一类在植物生长发育中起关键作用的转录因子, 参与多种生理过程。已有报道表明, 番茄花(果)柄离区发育受MADS-box蛋白JOINTLESS(J)、MACROCYLYX(MC)和SLMBP21的调控, 且这3个蛋白之间可发生两两互作, 但由这3个蛋白所形成的蛋白复合体是否足以决定番茄花(果)柄离区形成尚且未知。在该研究中, 作者利用一个多基因共表达植物转化系统在番茄植株中同时过表达J、MC和SLMBP21这3个基因, 并成功获得了J/MC/SLMBP21多基因过表达(3GOX)转基因植株。通过转基因植株表型观察发现, 转基因植株的果梗和果柄发生同源异型改变, 转变为类似于离区的结构, 但植株其他部位没有明显表型, 说明J-MC-SLMBP21蛋白复合体在果梗和果柄中可以诱导离区的形成, 但也暗示果梗和果柄中可能存在其他与J、MC和SLMBP21处于同一作用层面的因子。同时, 通过在3GOX植株中检测J、MC和SLMBP21的下游基因表达水平, 找到了4个可能与离区细胞形成有关的基因(*LeWUS*、*Bl*、*GDSL*和*HMG1*)。这些研究结果为离区发育分子机制的深入研究提供了线索, 奠定了基础。

关键词 *JOINTLESS*; *MACROCYLYX*; *SLMBP21*; 多基因共表达; 离区发育

Characterizing the *JOINTLESS/MACROCALYX/SLMBP21* Multi-gene Overexpression Transgenic Plant of Tomato

Liu Danmei, Zhang Yanjie, Pei Yanxi*

(School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Abscission is a ubiquitous and dynamic process during the life cycle of a plant, and it is also a critical agricultural trait. Abscission zone (AZ) is the place for abscission, and AZ formation is an important part for the study of abscission. Plant MADS-box proteins are a kind of crucial transcription factors involved in various developmental and physiological processes. Previously, it was reported that the development of the flower (fruit) AZ of tomato was controlled by JOINTLESS(J), MACROCYLYX(MC) and SLMBP21, three MADS-box proteins which could also interact with each other. However, whether the J-MC-SLMBP21 protein complex is enough to

收稿日期: 2016-02-17 接受日期: 2016-04-08

国家自然科学基金(批准号: 31501772)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0351-7010599, E-mail: peiyanxi@sxu.edu.cn

Received: February 17, 2016

Accepted: April 8, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31501772)

*Corresponding author. Tel: +86-351-7010599, E-mail: peiyanxi@sxu.edu.cn

网络出版时间: 2016-05-31 13:40:10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160531.1340.004.html>

induce the formation of AZ is still under investigation. Here, we successfully got the *J/MC/SLMBP21* multigene overexpression plant (3GOX) through using a multigene assembly and transformation vector system. And through phenotype analysis, we found that the fruit peduncle and pedicel of the transgenic plant were all converted into AZ-like structures, indicating that the J-MC-SLMBP21 protein complex was able to induce the formation of AZ in the peduncle and pedicel. But the result also hinted the existence of other factors functioning in the same level with J, MC and SLMBP21 in these two tissues. Moreover, the expression level detection of the downstream genes demonstrated that *LeWUS*, *Bl*, *GDSL* and *HMGI* might be involved in the formation of AZ cells. Our study provided the clues and made a foundation for further study of the molecular mechanisms under AZ development.

Keywords *JOINTLESS*; *MACROCALYX*; *SLMBP21*; multigene co-overexpression; abscission zone development

器官脱落是植物界中普遍存在的一种现象,是植物组织或器官脱离母体的生理过程。在自然情况下,器官脱落不仅能够帮助植物摆脱不需要的、病菌侵染的或是损坏凋亡的器官,而且由它所引起的落果和果荚开裂等还是维系植物繁衍的有利因素^[1]。同时,器官脱落又是一个重要的农艺性状^[2],在农业生产中,不当的器官脱落往往会造成经济上的损失^[3],比如果树的落花落果和棉花的落铃落桃等。器官脱落一般分为4个主要步骤:(1)离区形成;(2)获取响应脱落信号能力;(3)脱落过程激活;(4)保护层形成^[4]。其中,离区形成是器官脱落发生的前提条件,迄今为止还未发现脱落能够在没有离区形成的条件下发生^[5]。目前,围绕脱落信号的获得和脱落过程的激活,人们已经利用形态学、细胞学、生物化学以及分子生物学等方法开展了深入的研究,发现了多种调控机制,并且这些机制在许多物种中都是保守的^[6-8]。相比之下,人们关于离区形成的分子机制所知道的还比较少。

植物MADS-box基因是一类在植物生长发育过程中起重要作用的基因,它们广泛分布于蕨类、苔藓和开花植物(裸子植物和被子植物),并参与到植物的各种生理过程中^[9]。在植物中,MADS-box基因在花发育过程中的研究最为深入,研究人员提出了花发育的四重奏模型,即每一轮花器官的发育都是由一个MADS-box蛋白质所形成的四聚体蛋白质复合物所决定的^[10-12]。随后,通过大规模的酵母双杂交和三杂交实验,发现MADS-box蛋白质的这种作用方式可能不仅存在于花器官中,而且存在于植物生长发育的很多过程中^[13-14]。

番茄离区是位于番茄花(果)柄中部的一个显

著的解剖学结构,是研究离区发育的良好模式。在组织切片图上,番茄离区由十几层明显区别其两侧组织的小细胞构成。研究人员通过对离区发育异常突变体的分析克隆到两个决定离区形成的基因,它们分别是MADS-box基因家族的*JOINTLESS(J)*和*MACROCALYX(MC)*,在这2个基因的突变体或功能抑制转基因植株中,番茄花(果)柄离区不能形成^[15-16]。作者前期在研究番茄离区发育分子机制的过程中发现了第3个影响离区发育的MADS-box基因——*SLMBP21*。在*SLMBP21*-RNAi植株中,离区不能形成,而当*SLMBP21*被过表达时,花柄近轴端和花梗变短,形成由类似离区的小细胞所形成的组织;同时发现,*SLMBP21*、*JOINTLESS(J)*和*MACROCALYX(MC)*之间可以发生两两互作,而且*J*和*SLMBP21*自身可以形成二聚体;此外,RNA-seq数据显示,这3个基因具有共同调控的下游基因^[17]。由于这3个基因在离区处共表达,所以我们推测*SLMBP21*、*J*和*MC*可能通过形成离区特异的MADS-box蛋白质复合物来调控下游基因的表达进而影响番茄离区发育。然而,由这3个蛋白质所形成的蛋白质复合物是否足以决定离区的形成,以及该MADS-box蛋白质复合物中是否还有别的未发现的成员是目前尚未回答的问题。在本研究中,我们构建并获得了*J*、*MC*和*SLMBP21*这3个基因同时过表达的番茄转基因植株(3GOX),并对转基因植株进行了表型鉴定,发现在*J/MC/SLMBP21*多基因过表达转基因植株中果实的果梗变短,果柄没有果柄近轴端、离区和果柄远轴端的分化,而是变为一个较短的组织,该组织类似于*SLMBP21*基因过表达时的花柄近轴端以及*J*基因过表达时的花柄远轴端,说

明在*J/MC/SLMBP21*多基因过表达转基因植株中果梗、果柄近轴端和远轴端都发生了同源异型改变,形成了变短的由小细胞所构成的结构。但转基因植物的其他部位却没有表型,提示了果梗和果柄中可能存在与*J*、*MC*和*SLMBP21*处于同一作用层面上的其他因子。此外,通过实时定量PCR(Real-time PCR)分析转录水平变化,我们发现,由RNA-seq数据比较所得到的10个*J*、*MC*和*SLMBP21*的下游基因中,有4个基因可能参与离区细胞的形成过程。这些实验结果为番茄离区发育分子机制的进一步研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用番茄材料为中蔬四号(cv. Zhongshu 4, ZS4),购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所。所有番茄材料均置于培养间中培养,培养条件为24 °C/18 °C(白天/黑夜),16 h光照,8 h黑暗。

1.2 主要试剂

MS基础培养基、反式玉米素、叶酸、3-吲哚丁酸(IBA)、乙酰丁香酮均购自Sigma公司;各种限制性核酸内切酶购自New England Biolabs(NEB)公司;RNA提取试剂RNAiso Plus、克隆试剂盒(pMD™ 18-T Vector Cloning Kit)以及Real-time PCR试剂SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)购自TaKaRa公司;胶回收和反转录试剂盒购自全式金生物技术有限公司;其他常用化学试剂和全部引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 *J/MC/SLMBP21*多基因共表达重组子构建

本实验所用载体系统由华南农业大学刘耀光教授提供,载体构建过程参照已发表文献[18]。主要流程如下。首先,通过PCR将卡那霉素抗性基因*NPT II*基因连同其NOS启动子和终止序列从pBI121载体中扩增出来,然后通过*Sac I*单酶切,将*NPT II*连接进入载体pYLTAC380,形成在植物中具有卡那霉素抗性的双元转化载体pYLTAC380N。然后,把*J*、*MC*和*SLMBP21*这3个基因构建进载体pBI121和pGWB11中,其中,*J*和*MC*是以双酶切连接的方式连接进pBI121载体的,而*SLMBP21*则是通过Gateway重组进入pGWB11载体。通过PCR将这3个基因连

同其各自的35S启动子和NOS终止序列一起扩增出来,并通过酶切连接分别连入pYL322-d1(*SLMBP21*和*J*)和pYL322-d2(*MC*),其中*J*和*MC*通过*EcoR I*/*Hind III*酶切连接进入载体,而*SLMBP21*则通过*Hind III*/*EcoR I*酶切连接进入载体。最后,通过该载体系统的重组功能,将*SLMBP21*、*MC*和*J*依次重组进双元载体pYLTAC380N中,完成*J/MC/SLMBP21*多基因共表达载体的构建。重组子检测采取PCR分析和*Sac I*酶切验证两种。载体构建和检测过程中所用引物见表1。番茄转化过程参见已发表文献[19]。

1.4 转基因植株阳性鉴定和表型分析

从转基因植株及其野生型中蔬四号叶片中提取DNA,利用*J*、*MC*和*SLMBP21*的基因特异引物检测这3个基因是否成功转化进入番茄中;从转基因植株及其野生型叶片和幼嫩的花梗和花柄组织中提取RNA,反转录成cDNA后,利用*J*、*MC*和*SLMBP21*的编码区扩增引物,通过RT-PCR比较分析转基因植株叶片中这3个基因的表达水平,*ACTIN*基因被用作内参;通过Real-time PCR分析转基因植株花梗和花柄中这3个基因的相对表达量,*SAND*基因被用作内参。

同时种植转基因植株及其野生型,于番茄生长发育的各个时期观察转基因植株和野生型之间的表型差异,尤其是在花柄中的表型差异,并用相机拍照记录。

1.5 实时定量PCR检测差异表达基因

提取转基因植株及其野生型整个花序中的花梗和花柄RNA(第一朵花长约5 mm),反转录成cDNA后,以*SAND*基因为内参,Real-time PCR检测已有报道中*J*、*MC*和*SLMBP21*可能下游基因的表达情况(引物见表1)。

1.6 统计分析

采用SPSS 17.0系统进行数据的显著性差异分析。实验结果表示为平均值±标准误(mean±S.D.), $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 *J/MC/SLMBP21*多基因共表达重组子的获得与鉴定

为研究*J*、*MC*和*SLMBP21*这3个蛋白质所形成的蛋白质复合体是否足以决定番茄花柄离区的形

表1 载体构建和检测的引物序列

Table 1 Primer sequences used for construction and detection

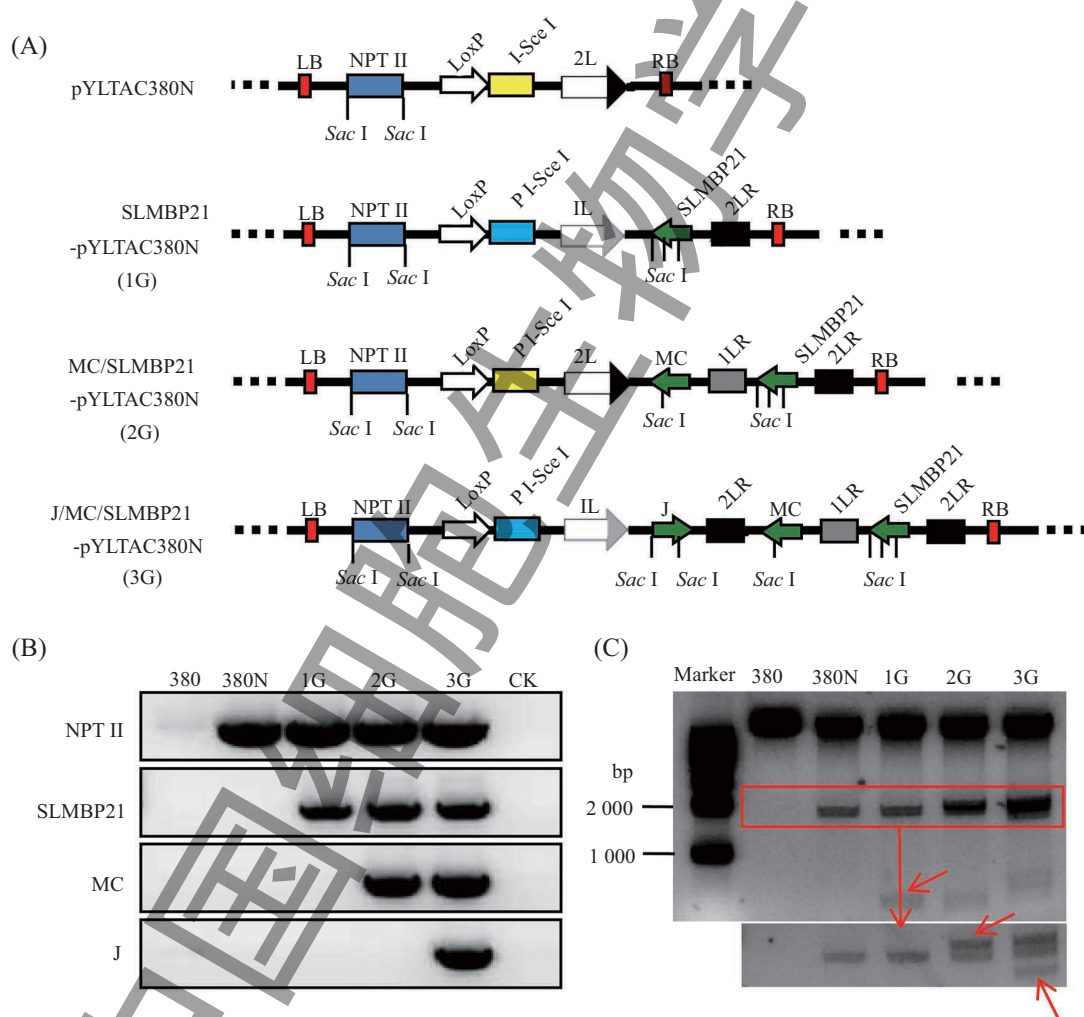
引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Sequence (5'→3')	用途 Application
NPT II-NOS-F	GCT GAG CTC TCT GAT CAT GAG CGG AGA AT	pYLTAC380N construction
NPT II-NOS-R	GCT GAG CTC AGG CCC GAT CTA GTA ACA TAG A	
NPT II-ORF-F	ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG C	Detection of the <i>NPT II</i> gene
NPT II-ORF-R	TCA GAA GAA CTC GTC AAG AAG	
MC-PB I 121-F	CAG GGA TCC ATG GGA AGA GGA AAA GTT	MC-pB I 121 construction and the detection of <i>MC</i> gene
MC-PB I 121-R	GCG GAG CTC TCA TAG ATG TTT ATT CAT G	
J-PB I 121-F	CAG GGA TCC ATG GCT AGA GAA AAA ATT	J-pB I 121 construction and the detection of <i>J</i> gene
J-PB I 121-R	CGG GAG CTC TCA GCC TGA GTA AGG TAG	
attB1-M9	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG CAT GGG AAG AGG AAG AGT AGA AC	SLMBP21-pGWB11 and the detection of <i>SLMBP21</i> gene
attB2-M9	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GAG CAT CCA CCC TGG AAT AA	
35S-F-H	GTA AAG CTT AGA TTA GCC TTT TCA ATT	SLMBP21-pYL322-d1 construction
NOS-R-E	GTA GAA TTC CGA TCT AGT AAC ATA GAT	
35S-F-E	GTA GAA TTC AGA TTA GCC TTT TCA ATT	J-pYL322-d1 and MC-pYL322-d2 construction
NOS-R-H	GTA AAG CTT CGA TCT AGT AAC ATA GAT	
GDSL-F	AAC CTT TAT GGT ATG GGA GC	Expression level analysis by RT-PCR and Real-time PCR
GDSL-R	GAA GAC GAC AAG TTT GAG GC	
BL-F	GGT AAT TGG ATT GCA CTT CCT CA	
BL-R	TGC GCC GCT ATA ATT GAC C	
EREB-F	GGT TCA ACA GCA CGC ACT A	
EREB-R	CCT TTC TTC TCC ATC TCC C	
GOB-F	AAC AAA TGT GAA CCT TGG GAA C	
GOB-R	CGA TCA CGT AGA CTG AAG AAA TAC C	
HMG1-F	TTG ATG CTT CCG ATG CTC	
HMG1-R	TTC TCA CGC CAC CTT GAT AG	
ATTRX2-F	ACT AAG CAA ACC AAA GGG AA	
ATTRX2-R	TCC GCA GAG GCA AAC AAG	
LS-F	CCA TCT CGT CTT GGC GTT G	
LS-R	TCA CTC CAC GCG TTT TCT TC	
CYP82C4-F	ATC CCA AGT AGT GCA TCT GA	
CYP82C4-R	AAG CAA TAC CTA AGC CCT CA	
WUS-F	GGT TAT GGA ACT TTG GCT ATG GAG	
WUS-R	GAA AAG GGT AAG TTG CTG GAG AAG	
Cystenine-F	CCG ATG GAA GTG AAG GAT	
Cystenine-R	TGG CAA TGA AGT TGG CTC	
ACTIN-F	GGT TTT GCT GGG GAT GAT GC	
ACTIN-R	CAT GGC TGG ACA TTG AAT GTC TC	
SAND-F	TTG CTT GGA GGA ACA GAC G	
SAND-R	GCA AAC AGA ACC CCT GAA TC	
MC-5-F	GAA GAG GTG GAT TAG TGA	
MC-5-R	CCF AGC CTT GAG TTT AGT	
SLMBP21-5-F	GGG AAG AGG AAG AGT AGA AC	
SLMBP21-5-R	CCA AAG ATG CGT AAC TGC	
J-5-F	GTG ATG CTG ATG TTG CTC T	
J-5-R	TTG AAG TTC TTC TCC CCT C	

成, 我们构建了 *J/MC/SLMBP21* 多基因共表达重组子, 试图通过同时在番茄中过表达这3种蛋白质, 观察转基因植株表型, 进而分析 *J-MC-SLMBP21* 蛋白质复合体的功能。载体构建过程中所产生的主要中间重组子通过PCR和酶切鉴定两种方法检测, 构建过程中形成的关键中间载体和重组子如图1A所示。在PCR检测中, 我们利用 *NPT II*、*SLMBP21*、*MC* 和 *J* 这4个基因的基因特异引物分别扩增 *pYLAC380* 载体、*pYLAC380N* 载体、*SLMBP21-pYLAC380N* 重组子(1G)、*MC/SLMBP21-pYLAC380N* 重组子

(2G) 和 *J/MC/SLMBP21-pYLAC380N* 重组子(3G)。结果显示, 这4个基因按照构建顺序, 依次出现在构建好的载体或重组子中(图1B), 说明多基因共表达重组子构建成功。同时, 还用 *Sac I* 酶切检测验证了结果(图1C)。

2.2 *J/MC/SLMBP21*多基因过表达(3GOX)转基因植株的阳性鉴定

通过番茄转化, 我们共得到15株转基因植株, 提取这些转基因植株的DNA, 然后利用 *J*、*MC* 和 *SLMBP21* 这3个基因的基因特异引物对转基因植株



A: 载体构建过程中的主要中间重组子示意图。B: PCR鉴定构建的重组子; 380: *pYLAC380*; 380N: *pYLAC380N*; 1G: *SLMBP21-pYLAC380N*; 2G: *MC/SLMBP21-pYLAC380N*; 3G: *J/MC/SLMBP21-pYLAC380N*; CK: 阴性对照。C: *Sac I*酶切鉴定构建的重组子, 箭头指向新基因组合进载体时所产生的酶切条带。

A: schematic representation of the main intermediate constructs. B: PCR identification of the constructs; 380: *pYLAC380*; 380N: *pYLAC380N*; 1G: *SLMBP21-pYLAC380N*; 2G: *MC/SLMBP21-pYLAC380N*; 3G: *J/MC/SLMBP21-pYLAC380N*; CK: negative control. C: identification of the constructs by *Sac I* digestion. Arrows point to the newly generated digestion bands caused by the combination of a new gene.

图1 *J/MC/SLMBP21-pYLAC380N*重组子的构建与鉴定

Fig.1 *J/MC/SLMBP21-pYLAC380N* construct development and identification

进行分析,发现在这些转基因植株当中共有13株是阳性植株(3个基因皆有扩增条带)。但在RNA水平上,我们只发现1株阳性植株——3GOX-4。我们分别利用RT-PCR在叶片中和实时定量PCR在幼嫩的花梗和花柄组织中分析了*J*、*MC*和*SLMBP21*这3个基因在转基因植株中的相对表达水平,结果显示,这3个基因在这2个组织中都是上调表达的(图2)。

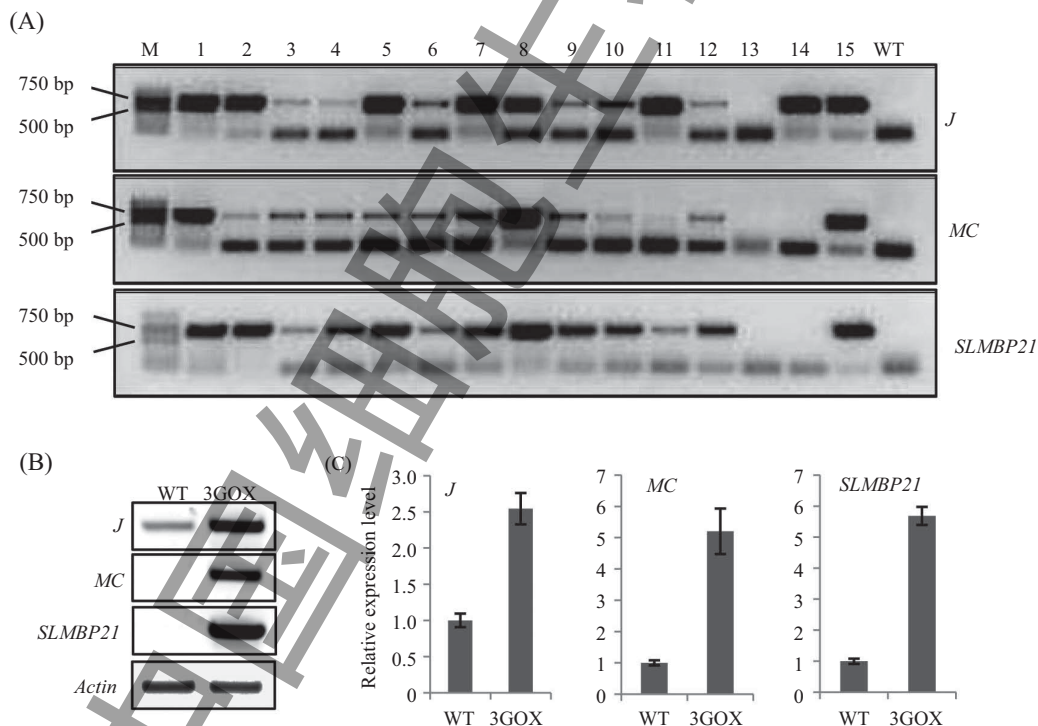
2.3 3GOX转基因植株的表型分析

接下来我们对该植株的表型进行观察分析,发现该转基因植株在营养生长阶段其表型跟野生型相比并无明显差别;但在生殖生长阶段,发现该转基因植株的果梗和果柄明显比野生型要短,而且其果柄没有果柄近轴端、离区和果柄远轴端的分化(图3A和图3D)。近距离观察野生型和3GOX转基因植株的果梗和果柄部位,发现在野生型中,果梗、果柄近轴端和果柄远轴端上遍布着较长的白色表皮毛,而离区部位表面则相对缺少这种表皮毛;但在3GOX

转基因植株中,果梗和果柄组织表面相对光滑,提示这些组织已发生同源异型改变,形成了类似于离区组织的结构(图3B和图3E)。同时,组织细胞学观察结果显示,3GOX植株的花柄各组织细胞皆转变为类似于离区的小细胞,跟野生型相比,其花柄近轴端、远轴端以及离区的细胞已无明显差别(图3C和图3F)。该表型类似于*SLMBP21*基因被过表达时果柄近轴端或是*J*基因被过表达时果柄远轴端所发生的变化,但不同的是,在*SLMBP21*和*J*的过表达转基因植株(*SLMBP21-OX*和*J-OX*)中果柄仍有果柄近轴端、远轴端和离区的分化,但在3GOX转基因植株中这种分化已随着果柄近轴端和远轴端细胞的同时变小而消失。

2.4 *J*、*MC*和*SLMBP21*下游基因表达水平分析

在前期工作中,我们通过比较分析*j*/WT、*MC-Antisense*(*MC-AS*)/WT和*SLMBP21-RNAi*/WT的芯片或RNA-seq数据发现,*J*、*MC*和*SLMBP21*这3个蛋白

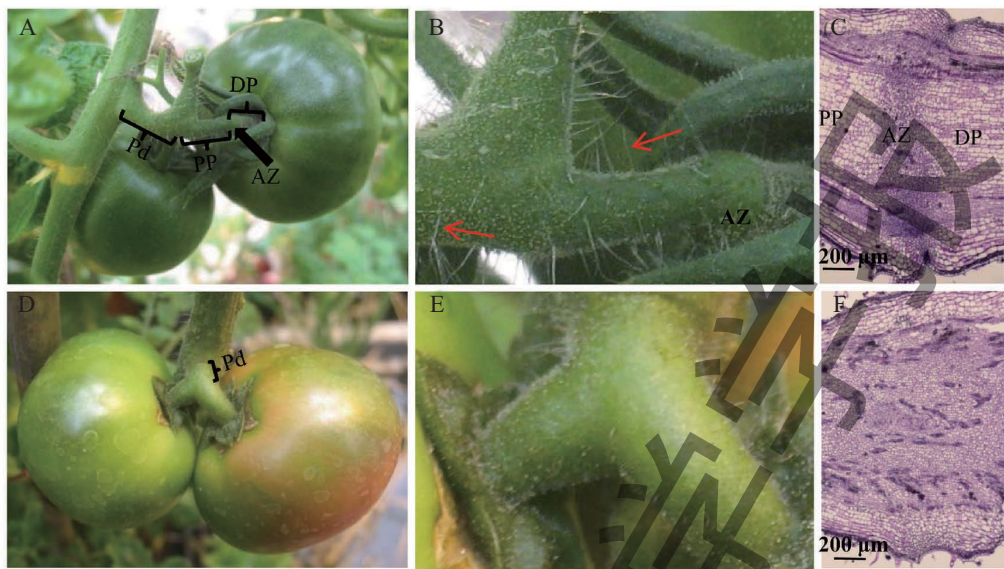


A: 转基因植株在DNA水平上的鉴定,上面的数字代表不同的转基因植株,WT代表野生型;B: 反转录PCR分析*J*、*MC*和*SLMBP21*在叶片中的表达水平,*Actin*基因被用作对照;C: 实时定量PCR分析*J*、*MC*和*SLMBP21*在花柄中表达水平。

A: positive identification in the DNA level; numbers above indicated different transgenic lines; WT: wild type. B: RT-PCR detection of the expression levels of *J*, *MC* and *SLMBP21* between WT and 3GOX leaves, *Actin* gene was used as an internal control; C: Real-time PCR detection of the relative expression levels of *J*, *MC* and *SLMBP21* in 3GOX pedicels.

图2 *J*/*MC*/*SLMBP21*-pYLTAC380N(3GOX)转基因植株阳性鉴定

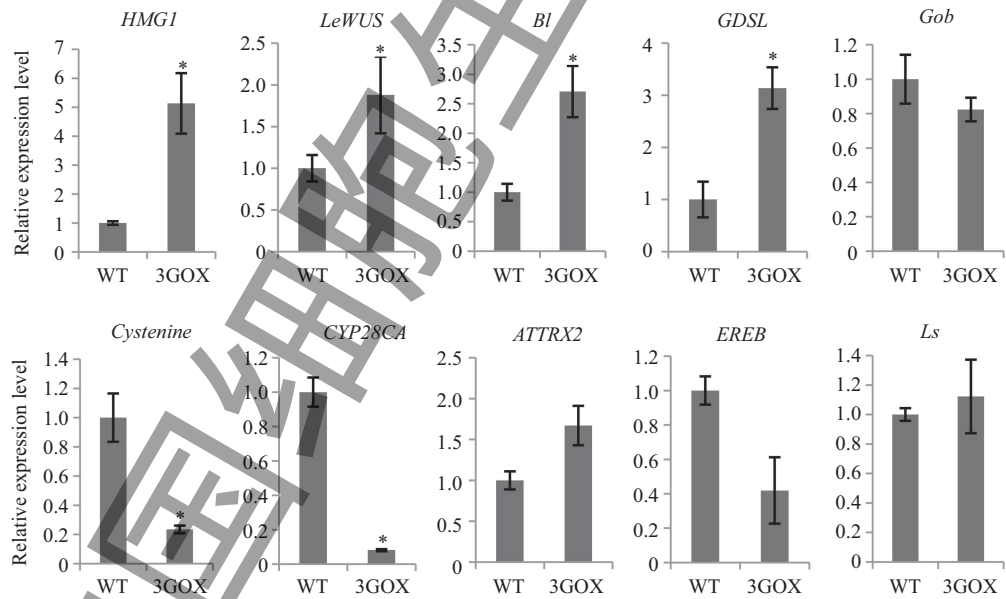
Fig.2 Positive identification of *J*/*MC*/*SLMBP21*-pYLTAC380N (3GOX) transgenic lines



A~C: 野生型植株; Pd: 果梗; PP: 果梗近轴端; AZ: 离区; DP: 果梗远轴端; A中黑色箭头指向离区, B中红色箭头指示表皮毛, C为野生型植株花柄组织切片。D~F: 3GOX转基因植株, 其中F为3GOX植株花柄组织切片。
A-C: wild type plant, Pd: peduncle; PP: the proximal part of the fruit pedicel; AZ: abscission zone; DP: the distal part of the fruit pedicel; the black arrow in (A) points to AZ, and the red arrows in (B) indicate the trichomes, C represent the histological analysis of flower pedicel in wide type plant. D-F: 3GOX transgenic plant, F represent the histological analysis of the flower pedicel in wide type plant.

图3 *J/MC/SLMBP21*多基因过表达(3GOX)转基因植株的表型分析

Fig.3 Phenotype analysis of the *J/MC/SLMBP21* multigene overexpression (3GOX) transgenic plant



*SAND*基因被用作内参, * $P < 0.05$, 与WT组相比较。
SAND gene was used as an internal control, * $P < 0.05$ compared with WT group.

图4 3GOX转基因植株中J、MC和SLMBP21下游基因的表达量检测

Fig.4 Relative expression level analysis of the downstream genes of J, MC and SLMBP21 in 3GOX transgenic line

质具有10个共同调控的下游基因, 这10个基因可能参与离区发育和脱落过程。本研究在3GOX植株的花梗和花柄组织中分析了这10个基因的表达变化,

试图更进一步寻找跟离区发育直接相关的基因。实时定量PCR分析结果表明, 在3GOX转基因植株花梗和花柄中, *GDSL*、*Blind*(*Bl*)、*LeWUS*和*HMG1*这

4个基因上调表达,其表达变化同它们在*J*突变体以及*MC-AS*和*SLMBP21-RNAi*转基因植株中的变化恰好相反;*Cystenine*、*CYP28C4*、*EREB*和*ATTRX2*的表达变化同其在*J*、*MC*和*SLMBP21*突变体或功能抑制转基因植株中的表达变化一致;而*Lateral suppressor(Ls)*和*Goblet(Gob)*的基因的表达则几乎没有变化。这些结果提示,*GDSL*、*Bl*、*LeWUS*和*HMG1*可能在离区发育过程中具有重要作用(图4)。

3 讨论

番茄花(果)柄离区是位于番茄花(果)柄中部的显著解剖学结构,是番茄花或果实发生脱落的部位。已有研究表明,*MADS-box*基因*J*、*MC*和*SLMBP21*都能影响离区的形成,同时还发现,在*SLMBP21-OX*植株中花(果)柄近轴端变短^[17],在*J-OX*植株中花(果)柄远轴端变短^[15],并且这两种植株中发生改变的部位皆形成类似于离区的组织,而在*MC*过表达的转基因植株(*MC-OX*)中,其花(果)柄则没有明显的表型变化。结合野生型植株中*SLMBP21*在花柄近轴端表达较弱、*J*在花柄远轴端表达较弱以及*MC*的表达贯穿整个花柄的表达模式,并考虑到*J*、*MC*和*SLMBP21*这3个蛋白质之间可以发生两两互作,同时*J*和*SLMBP21*本身都能够形成二聚体,我们推测,这3个蛋白质可能是通过形成一个离区特异的*MADS-box*蛋白质复合体来行使其促进离区发育的功能^[17]。但该复合体是否足以决定番茄花柄离区形成、其成员是否只有*J*、*MC*和*SLMBP21*这3个,是尚未解答的问题。本研究通过在番茄植株中同时过表达*J*、*MC*和*SLMBP21*这3个基因,发现转基因植株的果柄和果梗组织被转变成成为类似离区组织的结构,说明在果梗和果柄部位这3个基因具有决定离区细胞形成的能力。同时,转基因植株在除了果梗和果柄之外的组织并无明显表型,暗示在果梗和果柄中应该还有其他因子参与离区形成,并且该因子是在这两个组织中特异表达的,并且该因子很有可能是与*J*、*MC*和*SLMBP21*处在同一作用层面上的,但该因子的身份确定还需要进一步的实验证据。

在前期工作中,我们通过芯片和RNA-seq数据的比较发现了10个能够被*J*、*MC*和*SLMBP21*一致性调节的下游基因,这些基因在*J*突变体以及*MC*和

*SLMBP21*功能抑制转基因植株花柄中同时上调或下调表达,并且这10个基因当中有7个是在离区特异表达的。我们推测,这些基因可能与离区形成或脱落过程有关。本研究在3GOX转基因植株及其野生型当中比较分析了这10个基因的表达变化,发现有4个基因(*LeWUS*、*Bl*、*GDSL*和*HMG1*)出现了与突变体或是功能抑制转基因植株中相反的变化,并且这4个基因在花柄中都是离区特异表达的,提示了这些基因可能在番茄花(果)柄离区发育过程中起作用。这4个基因当中,*LeWUS*和*Bl*已被报道在分生组织的形成过程中起作用,这与离区小细胞具有分生组织细胞的性质相吻合^[20-21]。剩下6个基因在3GOX植株中的表达没有出现预期中的变化,可能是这些基因参与的是后期的脱落过程,而本研究因为关注的是离区细胞的形成,因而取材时间和材料设定为未开花时的花梗和花柄,因而可能看不到这些基因的相应变化。

综上,本研究通过分析*J/MC/SLMBP21*过表达转基因植株表型发现*J-MC-SLMBP21*蛋白质复合体只能在花梗和花柄中诱导离区组织的形成,而无法引起转基因植株其他组织发生同源异型改变,从侧面说明花柄和花梗中很可能存在其他同*J*、*MC*和*SLMBP21*在同一作用层面的因子。另外,基因差异表达结果显示,*J*、*MC*和*SLMBP21*下游基因当中有4个基因是可以在转基因植株的花梗和花柄组织中被诱导表达的,暗示这些基因可能参与离区小细胞的形成。本研究为番茄离区发育分子机制的进一步研究提供了线索,奠定了基础。

致谢——

感谢华南农业大学刘耀光教授为本研究提供植物多基因共表达转化系统;感谢中国农业科学院作物科学研究所毛龙研究员在载体构建和番茄转化过程中的指导。

参考文献 (References)

- 1 Reid MS. Ethylene and abscission. *HORTScience* 1985; 20(1): 45-50.
- 2 Li C, Zhou A, Sang T. Rice domestication by reducing shattering. *Science* 2006; 311(5769): 1936-9.
- 3 Nakano T, Fujisawa M, Shima Y, Ito Y. Expression profiling of tomato pre-abscission pedicels provides insights into abscission

- zone properties including competence to respond to abscission signals. *BMC Plant Biol* 2013; 13: 40.
- 4 Estornell LH, Agusti J, Merelo P, Talon M, Tadeo FR. Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Sci* 2013; 199/200: 48-60.
- 5 Roberts JA, Elliott KA, Gonzalez-Carranza ZH. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annu Rev Plant Biol* 2002; 53: 131-58.
- 6 Jinn TL, Stone JM, Walker JC. HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev* 2000; 14(1): 108-17.
- 7 Ogawa M, Kay P, Wilson S, Swain SM. ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are Polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2009; 21(1): 216-33.
- 8 Aalen RB, Wildhagen M, Sto IM, Butenko MA. IDA: A peptide ligand regulating cell separation processes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2013; 64(17): 5253-61.
- 9 Shore P, Sharrocks AD. The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem* 1995; 229(1): 1-13.
- 10 Krizek BA, Fletcher JC. Molecular mechanisms of flower development: An armchair guide. *Nat Rev Genet* 2005; 6(9): 688-98.
- 11 Theissen G. Development of floral organ identity: Stories from the MADS house. *Curr Opin Plant Biol* 2001; 4(1): 75-85.
- 12 Honma T, Goto K. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* 2001; 409(6819): 525-9.
- 13 Tonaco IA, Borst JW, de Vries SC, Angenent GC, Immink RG. *In vivo* imaging of MADS-box transcription factor interactions. *J Exp Bot* 2006; 57(1): 33-42.
- 14 Immink RG, Tonaco IA, de Folter S, Shchennikova A, van Dijk AD, Busscher-Lange J, *et al.* SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol* 2009; 10(2): R24.
- 15 Mao L, Begum D, Chuang HW, Budiman MA, Szymkowiak EJ, Irish EE, *et al.* *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower abscission zone development. *Nature* 2000; 406(6798): 910-3.
- 16 Nakano T, Kimbara J, Fujisawa M, Kitagawa M, Ihashi N, Maeda H, *et al.* *MACROCALYX* and *JOINTLESS* interact in the transcriptional regulation of tomato fruit abscission zone development. *Plant Physiol* 2012; 158(1): 439-50.
- 17 Liu D, Wang D, Qin Z, Zhang D, Yin L, Wu L, *et al.* The SEPALLATA MADS-box protein SLMBP21 forms protein complexes with *JOINTLESS* and *MACROCALYX* as a transcription activator for development of the tomato flower abscission zone. *Plant J* 2014; 77(2): 284-96.
- 18 Lin L, Liu YG, Xu X, Li B. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(10): 5962-7.
- 19 Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* 2006; 47(3): 426-31.
- 20 Leibfried A, To JP, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, *et al.* *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 2005; 438(7071): 1172-5.
- 21 Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, Fiore C, Cellini F, Theres K. The tomato *Blind* gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(2): 1064-9.