

TPLATE复合体亚基TML调控拟南芥花粉发育的研究

曹梦醒 王昊 韩晓 高新起*

(山东农业大学生命科学学院, 作物生物学国家重点实验室, 泰安 271018)

摘要 网格蛋白介导的内吞作用参与调控花粉管的生长, 但研究人员对其在花粉发育过程中的作用了解较少。TML是拟南芥TPLATE复合体的亚基, 参与网格蛋白介导的内吞。该文利用CRISPR/Cas9技术创制了拟南芥TML的突变体 $tml-3$, 发现 $tml-3$ 突变体的花粉形态异常且不能萌发。拟南芥花发育的11时期, 花粉中能够检测到TML的表达, TML-YFP信号从花发育的12时期开始定位在花粉的质膜上。随着花粉的发育, TML表达水平逐渐升高, 同时, $tml-3$ 突变体中败育花粉的比例也随花粉发育的进程逐渐升高。与野生型相比, $tml-3$ 花粉中的胼胝质、果胶质、纤维素的含量和分布均存在异常。推测在拟南芥花粉发育过程中, TML参与的内吞作用调控花粉胼胝质、果胶质及纤维素等多聚糖的积累。

关键词 拟南芥; 内吞作用; 花粉; 多聚糖

TML, One Subunit of TPLATE Complex, Regulates Pollen Development in *Arabidopsis*

Cao Mengxing, Wang Hao, Han Xiao, Gao Xinqi*

(State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

Abstract Clathrin-mediated endocytosis plays roles in the regulation of pollen tube growth; however, its function in pollen development remains to be investigated. TML is one subunit of *Arabidopsis* TPLATE complex, which is implicated in clathrin-mediated endocytosis. In this study, we created an *Arabidopsis* mutant of TML, $tml-3$, by using CRISPR/Cas9 strategy, in which the pollen showed abnormal morphology and germination. TML was expressed in the pollen from stage 11 and its protein was localized in plasma membrane in pollen from stage 12. The expression of TML was enhanced accompanied with the development of pollen, which was correlated with the ratio of the abortion pollen in the $tml-3/+$ mutant. Furthermore, we found that the distribution and content of the polysaccharide were changed in the mutant pollen, such as callose, pectin, and cellulose, which suggests that the TML-regulated endocytosis is implicated in *Arabidopsis* pollen development by regulating polysaccharide accumulation.

Keywords *Arabidopsis*; endocytosis; pollen; polysaccharide

内吞作用(endocytosis)是细胞通过质膜的形变形成独立小泡, 将胞外物质、膜蛋白以及脂类转运到细胞内的过程。内吞作用在细胞物质运输以及

信号传递中起着重要作用^[1]。内吞作用可分为网格蛋白介导的内吞途径(clathrin-mediated endocytosis, CME)和不依赖网格蛋白的内吞途径。在植物细胞中, 参与CME的主要蛋白组分有网格蛋白复合体、衔接蛋白(adapter protein, AP)复合体、动力蛋白和一些其他调节蛋白。植物细胞中的衔接蛋白家族由五类复合体组成, 分别为AP-1、AP-2、AP-3、AP-4和AP-5, 其中AP-2主要参与网格蛋白介导的胞吞途径^[2]。此外, 拟南芥TPC复合体(TPLATE adapter complex)

收稿日期: 2018-05-15 接受日期: 2018-07-23

国家自然科学基金(批准号: 31770349)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0538-8049020, E-mail: gaioxq@sdau.edu.cn

Received: May 15, 2018

Accepted: July 23, 2018

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.31770349)

*Corresponding author. Tel: +86-538-8049020, E-mail: gaioxq@sdau.edu.cn

网络出版时间: 2018-09-29 10:40:13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180929.1039.002.html>

由TASH3、AtEH1、AtEH2、LOLITA、TML、TWD40-1、TWD40-2和TPLATE共八个亚基构成,也参与CME途径^[3]。TPC复合体亚基的功能缺失影响内吞过程中货物蛋白的分选,并导致花粉的败育。TML是TPC复合体的核心亚基之一,含有一个 μ HD结构域,这一结构域通常存在于衔接蛋白复合体的 μ 亚基中,主要参与货物蛋白的招募、识别和结合^[4]。拟南芥中的研究表明,内吞过程中TPC复合体通常与AP-2复合体协同发挥作用^[3,5]。突变体分析表明,TML功能的缺失导致花粉败育和雄配子传递效率下降^[3],但败育的原因仍缺少详细的研究。

我们分析了拟南芥花粉发育过程中TML的表达模式,利用CRISPR/Cas9方法创制了TML突变体 $tml-3$,并对其花粉发育的表型进行了观察。我们发现,突变体花粉壁相关的多聚糖,包括胼胝质、纤维素及果胶质都存在不同程度的异常积累。初步推测,TML可能通过内吞作用参与花粉发育过程中细胞壁多聚糖的积累。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

实验材料为哥伦比亚生态型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Col-0),主要包括野生型、T-DNA插入的突变体GK_088H05和SALK_071882以及CRISPR突变体 $tml-3$ 、 $pTML::TML-YFP$ 转基因植株(由Daniel Van Damme博士馈赠)和 $pTML::GUS$ 的转基因植株。上述拟南芥植株种子均通过70%乙醇、2.6%次氯酸钠处理后在拟南芥生长培养基中培养,4℃黑暗处理2~3天后,移入22℃培养箱生长7天,随后移栽入基质中继续培养。生长条件为:22℃,日光灯16 h光照/8 h黑暗。

1.2 $pTML::GUS$ 载体的构建及GUS染色

选取TML上游1 018 bp序列作为启动子序列,利用GTT TCA ACC AAA TCC GTA ACC TG(正向)和GAT CCC GAT TCG AAA TTG ATC(反向)为引物,以基因组DNA为模板进行扩增。将测序正确的片段酶切连接GUS载体($pBII21::GUS$),转化拟南芥,花粉的GUS染色方法参照文献[6]。

1.3 创制CRISPR突变体 $tml-3$

目的序列(需要突变的序列)靶位点引物的设计及脱靶测评均参照CRISPR-P网站(<http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>)进行,选取效率高、不易脱靶的引物GAT TGA TGG CTG TTG AAT CGC ATG(正

向)和AAA CCA TGC GAT TCA ACA GCC ATC(反向)。两条引物进行退火(37℃ 30 min, 95℃ 5 min, 缓慢降温至25℃),形成双链片段。酶切连接AtU6s-gRNA载体,测序验证,克隆进pPZP211表达载体,转化拟南芥。从后代植株中筛选不包含Cas9序列并且靶位点突变的植株进行研究。

1.4 花粉活力的染色

利用亚历山大染色方法鉴定花粉的活力,染色方法参照文献[7]。

1.5 多聚糖的染色

0.01%(W/V) S4B(Direct Red 23, SIGMA-ALDRICH)避光染色20~30 min,标记纤维素,激光共聚焦显微镜下(激发光543 nm和发射波长585~625 nm)观察;用20%(W/V)钨红染色果胶质(染15 min),显微镜下观察。0.1%脱色苯胺蓝(0.1 mol/L的磷酸氢二钾缓冲液配制, pH11)染胼胝质,荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 tml 突变体的创造及互补分析

Gadeyne等^[3]鉴定了TML的两个T-DNA插入的突变体GK_088H05($tml-1$)和SALK_071882($tml-2$),这两个突变体的花粉败育,不能萌发。我们对TML基因及 $tml-1$ 、 $tml-2$ 突变体的T-DNA插入位点进行分析,发现TML基因上游存在一个与之转录方向相反的基因ARABIDOPSIS THALIANA HOMOLOG OF X-RAY REPAIR CROSS COMPLEMENTING 3(*AtXRCC3*),两个基因起始密码子之间的间隔仅有398 bp(图1A)。 $tml-1$ 、 $tml-2$ 突变体的T-DNA插入在TML的编码区,同时插入在*AtXRCC3*的启动子区。之前的研究表明,*AtXRCC3*参与同源染色体的重组和DNA损伤修复,其功能缺失后会导致雌雄配子体的败育^[8]。qRT-PCR分析表明, $tml-2$ 中*AtXRCC3*和TML的表达均被下调(图1C)。因此,Gadeyne等^[3]观察到的 $tml-1$ 和 $tml-2$ 突变体花粉的表型^[3]可能来自于两个基因突变。

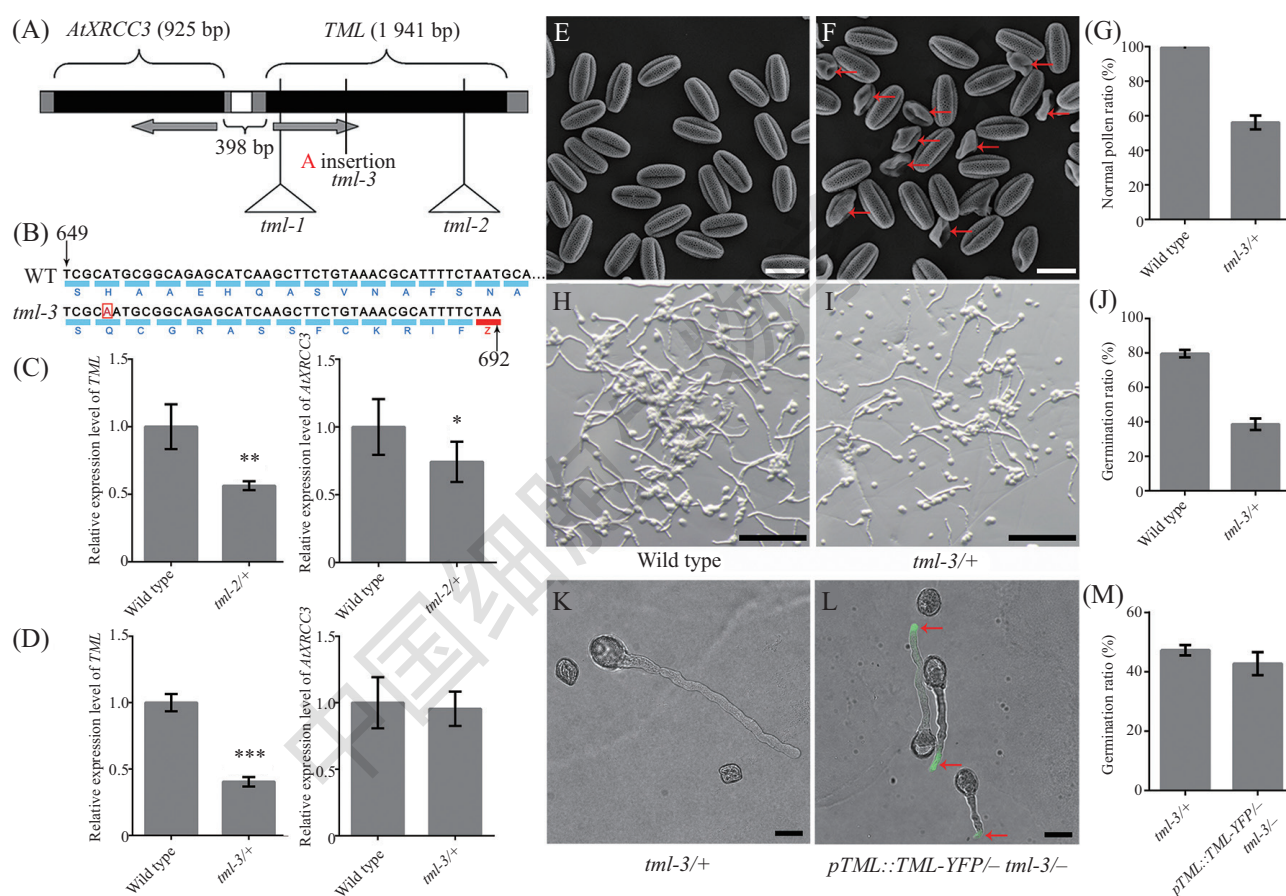
为了排除*AtXRCC3*对花粉发育的影响,我们利用CRISPR/Cas9技术获得了TML的一个突变体,命名为 $tml-3$ 。测序表明, $tml-3$ 的起始密码子ATG后652 bp处插入了一个腺嘌呤(A),造成翻译提前终止(图1B),并且没有分离到 $tml-3$ 的纯合突变体。qRT-PCR分析表明, $tml-3/+$ 花序中TML的表达水平与野生型相比有极显著的下调,而*AtXRCC3*的表达量与野生型相比没有明显的差异(图1D)。扫描电子显微

镜观察 $tml-3/+$ 成熟的花粉粒中约有一半的花粉表现出形态异常(图1E~图1G)。花粉体外萌发实验表明, $tml-3/+$ 的萌发率只有野生型的50%左右(图1H~图1J),表明突变体的形态异常的花粉粒不能正常萌发。通过 $pTML::TML-YFP$ 转基因植株^[3]与 $tml-3/+$ 突变体杂交获得了 $pTML::TML-YFP/- tml-3/-$ 植株,该植株部分花粉能正常萌发,且萌发的花粉管都带有YFP的荧光信号(图1K、图1L)。统计发现,与 $tml-3$ 的花粉不能萌发相比, $pTML::TML-YFP/- tml-3/-$ 花粉的萌发率上升到40%左右(图1M)。这些结

果表明, $pTML::TML-YFP$ 能够互补 $tml-3$ 突变体中花粉萌发异常的表型。

2.2 TML在花粉中的表达模式及定位分析

已有研究表明,TML定位于花粉管的亚顶端质膜上及细胞质中^[3]。我们利用 $pTML::GUS$ 和 $pTML::TML-YFP$ 转基因植株研究了TML在花粉发育过程中的表达模式和蛋白的亚细胞定位。花粉发育时期的划分参考Wang等^[9]的描述(图2A)。 $pTML::GUS$ 转基因株系的花粉经GUS染色发现,花粉发育到11时期时,GUS信号较弱;从12时期开始花

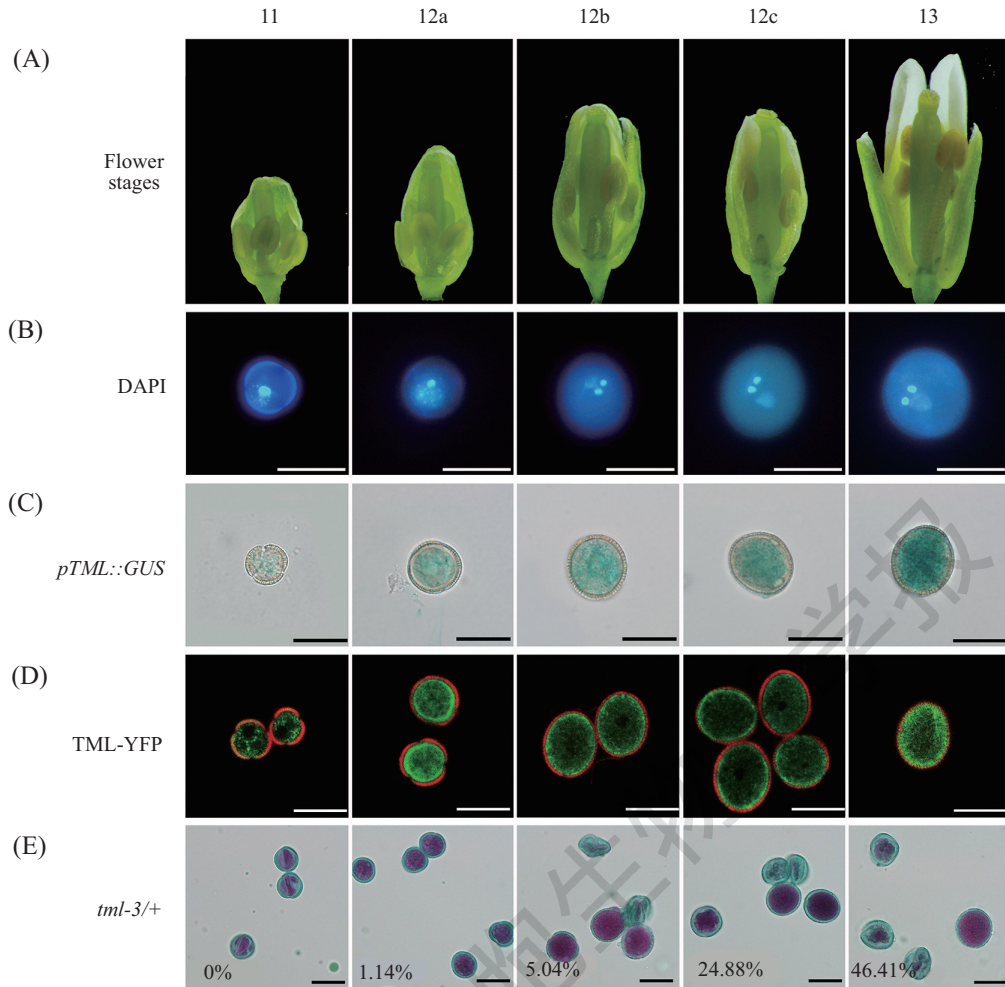


A: *AtXRCC3*与*TML*的连锁图谱,显示 $tml-1$ 、 $tml-2$ 突变体中T-DNA插入位置以及 $tml-3$ 突变体中腺嘌呤的插入位置;B:野生型(WT)以及 $tml-3$ 突变体中突变位点附近的序列,突变体中插入的腺嘌呤用红色方框标记;C: $tml-2/+$ 中*AtXRCC3*及*TML*的相对表达水平(Student's *t*检验, **P*<0.05, ***P*<0.01);D: $tml-3/+$ 中*AtXRCC3*及*TML*的相对表达水平(Student's *t*检验, ****P*<0.001);E-G:扫描电子显微镜下 $tml-3/+$ 和野生型花粉形态及统计,箭头所示为异常花粉(标尺=20 μm);H-J: $tml-3/+$ 和野生型花粉萌发及萌发率的统计(标尺=500 μm);K-M: $tml-3/+$ 及互补株系花粉萌发及萌发率统计,箭头所示为互补的花粉管(标尺=20 μm)。

A: linkage map of *AtXRCC3* and *TML* with the insertion sites of T-DNA in *tml-1*, *tml-2* and the inserted adenine in *tml-3*; B: flanking sequences of the inserted adenine in the wild type (WT) and *tml-3*, the inserted adenine labeled by square; C: relative expression levels of *TML* and *AtXRCC3* in *tml-2/+* (Student's *t*-test, **P*<0.05, ***P*<0.01); D: the relative expression levels of *TML* and *AtXRCC3* in *tml-3/+* (Student's *t*-test, ****P*<0.001); E-G: pollen grains of the WT and *tml-3/+* under SEM. Arrows indicate the abnormal pollen grains (Bars=20 μm); H-J: germination of the pollen of the WT and *tml-3/+* (Bars=500 μm); K-M: pollen of the *tml-3/+* and $pTML::TML-YFP/- tml-3/-$, and the germination ratio of pollen. Arrows indicated the complemented pollen tubes (Bars=20 μm).

图1 *tml*突变体及互补分析

Fig.1 Analysis of *tml* mutant and complement line



A: 不同时期野生型花发育状态; B: 不同时期野生型花粉的DAPI染色; C: 不同时期 $pTML::GUS$ 植株花粉的GUS染色; D: 不同时期花粉中TML-YFP(绿色)的亚细胞定位, 红色表示花粉壁的自发荧光; E: 不同时期 $tml-3/+$ 花粉的亚历山大染色, 图片中的数值为花粉败育的比例。标尺=20 μm 。
A: floral organs of wild type at different stages; B: pollen grains of wild type at different stages with DAPI-staining; C: pollen grains of $pTML::GUS$ at different stages with GUS-staining; D: subcellular localization of TML-YFP (green signal) in $pTML::TML-YFP$ pollen grains at different stages. The red signals were the autofluorescence of the pollen wall; E: pollen grains of $tml-3/+$ at different stages with Alexsander-staining. The numbers in (E) indicated the abortive ratio of pollen. Bars=20 μm .

图2 TML在花粉中的表达模式和蛋白的定位以及 $tml-3/+$ 突变体中花粉的育性

Fig.2 Gene expression and subcellular localization of TML in pollen and analysis for the fertility of $tml-3/+$ pollen

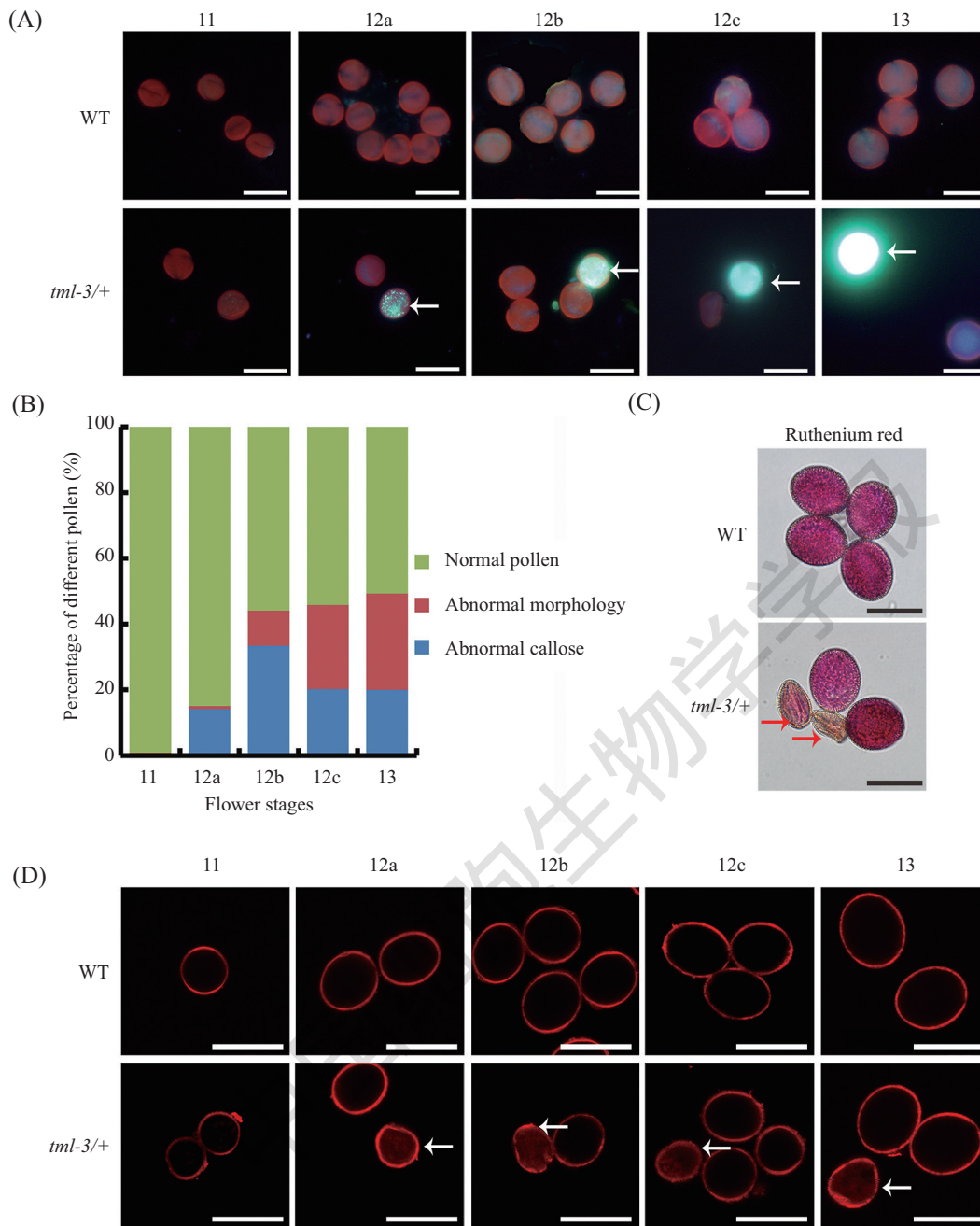
粉中出现较强的GUS信号, 随着花粉发育, GUS信号逐渐增强, 表明随花粉发育成熟TML的表达量逐渐升高(图2C)。利用共聚焦显微镜观察 $pTML::TML-YFP$ 转基因植株的花粉, 发现在11时期的花粉中检测到荧光信号; 从12时期开始质膜上的荧光信号逐渐增强(图2D)。利用亚历山大染色鉴定 $tml-3/+$ 不同发育时期花粉的活力。结果发现, $tml-3/+$ 花粉从12时期开始出现败育, 且随着发育进程, 败育花粉所占比例逐渐升高(图2E), 表明TML的表达水平与花粉活力的维持相关。

2.3 $tml-3/+$ 花粉粒中多聚糖类的积累

为了研究 tml 突变体花粉形态异常的原因, 我们

通过染色的方法, 分析了花粉发育过程中多聚糖成分的变化。利用脱色苯胺蓝对 $tml-3/+$ 突变体花粉的胼胝质进行染色, 发现在12时期的花粉中出现胼胝质的异常积累, 随着花粉的发育, 积累的胼胝质逐渐增多, 部分花粉出现形态异常(图3A), 而且形态异常和异常积累胼胝质的花粉所占比例逐渐升高(图3B)。花粉发育到13时期时, 异常积累胼胝质的花粉和形态异常的花粉总和约为50%。这一结果表明, 突变的花粉粒异常积累胼胝质并且最终表现为形态异常。

花粉壁的主要成分除了胼胝质还有果胶质、纤维素等其他多聚糖。我们利用钉红和荧光染料S4B分别对 $tml-3/+$ 的花粉的果胶质和纤维素进行了染



A: 不同时期 $tml-3/+$ 花粉的苯胺蓝染色(箭头所示为胼胝质异常积累的花粉); B: 苯胺蓝染色结果统计; C: $tml-3/+$ 花粉的果胶质染色(箭头所示为果胶质异常的花粉); D: 不同时期 $tml-3/+$ 花粉的纤维素染色(箭头所示为纤维素异常的花粉)。标尺=20 μm 。

A: pollen grains at different stages staining with aniline blue (arrows indicate the pollen grains with abnormal callose); B: the statistics of pollen grains after aniline blue staining (arrows indicate the pollen grains with abnormal pectin); C: pollen grains of WT and $tml-3/+$ staining with Ruthenium Red; D: pollen grains at different stages staining with S4B (arrows indicate the pollen grains with abnormal cellulose). Bars=20 μm .

图3 $tml-3/+$ 花粉胼胝质、果胶质和纤维素染色

Fig.3 Analysis of callose, pectin and cellulose in $tml-3/+$ pollen

色。不同于野生型的花粉, 突变体形态异常花粉的钨红染色较浅, 表明果胶质的含量降低(图3C)。野生型的花粉中, 纤维素主要分布在花粉壁上(图3D); 而突变体从12时期开始花粉粒内部也出现了纤维素的异常积累, 且多集中于形态异常的花粉之中(图

3D)。我们推测, $tml-3/+$ 花粉的异常发育可能与胼胝质、果胶质和纤维素等多聚糖的异常代谢有关。

3 讨论

内吞作用在植物发育过程中起到重要的调控

作用^[10]。研究表明, 内吞作用参与调控花粉管的生长以及花粉管与柱头组织的互作过程^[11-12]。但是对内吞作用如何调控花粉的发育了解。TML是拟南芥TPC复合体的亚基, 该复合体参与CME过程。Gadeyne等^[3]利用两个T-DNA插入突变体(*tml-1*、*tml-2*)的研究表明, TML调控花粉的发育。但是我们发现, 这两个突变体同时影响了上游基因*AtXRCC3*的表达, 而*AtXRCC3*也参与拟南芥花粉的发育过程。为了排除*AtXRCC3*表达下调对花粉表型可能造成的影响, 我们用CRISPR/Cas9系统创造了TML的一个新突变体*tml-3*。该突变体中*AtXRCC3*的表达不受影响, 只是造成了TML翻译的提前终止。我们发现, *tml-3*突变体花粉败育, 不能萌发。拟南芥花粉发育过程中, TML从12时期开始质膜上的定位逐渐增强。*tml-3/+*突变体花粉随着花粉发育的进程, 败育的比率逐渐提高, 表明TML参与的内吞调控花粉的发育。内吞过程中, TPC复合体通常与AP-2复合体协同发挥作用^[3,5]。有研究表明, AP-2复合体的 μ 亚基AP2M参与质膜上纤维素合成酶复合体的内吞, 该亚基的突变也会造成花粉的败育^[4]。因此, 两者在调控花粉发育过程的功能并非冗余, 可能在内吞过程的不同阶段起作用。

*tml-3*突变体花粉的胼胝质、果胶质和纤维素的含量和分布也发生了明显的变化。多聚糖积累和代谢对花粉壁的发育至关重要, 研究发现, 与多聚糖代谢相关基因的突变通常会导致花粉壁的异常发育^[13-14]。果胶质多聚糖是花粉壁的重要组分, 与果胶质合成和降解相关的突变体, 例如果胶质裂解酶^[15]和一些果胶质修饰酶^[16]的突变体通常表现出花粉外壁、内壁等结构的缺陷。此外, 胼胝质生物合成和降解异常同样会导致花粉壁发育缺陷^[17]。转录组分析发现, 大豆雄性不育系中与多聚糖代谢相关基因的表达量明显下调, 这些基因包括编码蔗糖酶类、己糖激酶类和果胶裂解酶类的蛋白^[18]。因此, TML作为衔接蛋白复合体的亚基, 可能参与内吞质膜上与胼胝质、纤维素及果胶质合成相关的酶, 调控它们的定位和循环, 进而影响细胞壁相关多聚糖的含量与分布, 在花粉发育中起作用。除了在花粉中, 在花粉管亚顶端的质膜上也观察到TML的定位^[3]。而胼胝质、纤维素和果胶质对花粉管顶端细胞壁的机械强度的建立以及花粉管的生长都有着重要功能, 我们推测, TML参与的内吞作用可能在

花粉管的生长中起作用。由于*tml-3*突变体的花粉不能萌发, 需要通过构建TML的弱突变体来研究它在花粉萌发和花粉管生长过程中的功能。这些研究有助于进一步理解内吞作用如何调控花粉萌发和花粉管的生长。

参考文献 (References)

- 1 邢晶晶, 刘海娇, 范路生, 宋凯, 陈彤, 林金星. 植物细胞胞吞途径及其研究方法. 电子显微学报(Xing Jingjing, Liu Haijiao, Fan Lusheng, Song Kai, Chen Tong, Lin Jinxing. The endocytosis pathway of plant cells and its research methods. J Chin Electr Microsc Soc 2014; 33(5): 449-60.
- 2 Lee MH, Hwang I. Adaptor proteins in protein trafficking between endomembrane compartments in plants. J Plant Biol 2014; 57(5): 265-73.
- 3 Gadeyne A, Sanchez-Rodriguez C, Vanneste S, Di Rubbo S, Zauber H, Vanneste K, *et al*. The TPLATE adaptor complex drives clathrin-mediated endocytosis in plants. Cell 2014; 156(4): 691-704.
- 4 Bashline L, Li S, Anderson CT, Lei L, Gu Y. The endocytosis of cellulose synthase in *Arabidopsis* is dependent on μ 2, a clathrin-mediated endocytosis adaptin. Plant Physiol 2013; 163(2): 150-60.
- 5 Bashline L, Li S, Zhu X, Gu Y. The TWD40-2 protein and the AP2 complex cooperate in the clathrin-mediated endocytosis of cellulose synthase to regulate cellulose biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 2015; 112(41): 12870-5.
- 6 Chen T, Teng N, Wu X, Wang Y, Tang W, Samaj J, *et al*. Disruption of actin filaments by latrunculin B affects cell wall construction in *Picea meyeri* pollen tube by disturbing vesicle trafficking. Plant Cell Physiol 2007; 48(1): 19-30.
- 7 Dai XR, Gao XQ, Chen G H, Tang LL, Wang H, Zhang XS. ABNORMAL POLLEN TUBE GUIDANCE1, an endoplasmic reticulum-localized mannosyltransferase homolog of GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL10 in yeast and PHOSPHATIDYLINOSITOL GLYCAN ANCHOR BIOSYNTHESIS B in human, is required for *Arabidopsis* pollen tube micropylar guidance and embryo development. Plant Physiol 2014; 165(4): 1544-56.
- 8 Bleuyard JY, White CI. The *Arabidopsis* homologue of *Xrcc3* plays an essential role in meiosis. EMBO J 2004; 23(2): 439-49.
- 9 Wang W, Wang L, Chen C, Xiong G, Tan XY, Yang KZ, *et al*. *Arabidopsis* *CSLD1* and *CSLD4* are required for cellulose deposition and normal growth of pollen tubes. J Exp Bot 2011; 62(14): 5161-77.
- 10 Barbieri E, Di Fiore PP, Sigismund S. Endocytic control of signaling at the plasma membrane. Curr Opin Cell Biol 2016; 39(10): 21-7.
- 11 Hao L, Liu J, Zhong S, Gu H, Qu LJ. AtVPS41-mediated endocytic pathway is essential for pollen tube-stigma interaction in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA 2016; 113(22): 6307-12.
- 12 Grebnev G, Ntefidou M, Kost B. Secretion and endocytosis in pollen tubes: models of tip growth in the spot light. Front Plant Sci 2017; 8(11): 154.
- 13 Jiang J, Zhang Z, Cao J. Pollen wall development: the associated enzymes and metabolic pathways. Plant Biol (Stuttg) 2013; 15: 249-63.
- 14 Lou Y, Zhu J, Yang Z. Molecular cell biology of pollen walls. Applied Plant Cell Biol 2014; 22: 179-205.
- 15 Jiang J, Yao L, Yu Y, Liang Y, Jiang J, Ye N, *et al*. PECTATE LY-

- ASE-LIKE 9 from *Brassica campestris* is associated with intine formation. *Plant Sci* 2014; 229(11): 66-75.
- 16 Cankar K, Kortstee A, Toonen MA, Wolters-Arts M, Houben R, Mariani C, *et al.* Pectic arabinan side chains are essential for pollen cell wall integrity during pollen development. *Plant Biotechnol J* 2014; 12(4): 492-502.
- 17 Wan L, Zha W, Cheng X, Liu C, Lv L, Liu C, *et al.* A rice β -1,3-glucanase gene *Osg1* is required for callose degradation in pollen development. *Planta* 2011; 233(2): 309-23.
- 18 Li J, Han S, Ding X, He T, Dai J, Yang S, *et al.* Comparative transcriptome analysis between the cytoplasmic male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybean (*Glycine Max* (L.) Merr.). *PLoS One* 2015; 10(5): 0126771.

中国细胞生物学学报