

# 拟南芥中异源过表达黄瓜 *CsTRY* 基因对表皮毛的抑制作用

谭 峥<sup>1</sup>, 郭 芳<sup>1</sup>, 杨福强<sup>2</sup>, 刘丽英<sup>1</sup>, 张小兰<sup>1</sup>, 任华中<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业大学农学与生物技术学院蔬菜系, 北京 100193; <sup>2</sup> 湖南省长沙市蔬菜研究所, 长沙 410003)

**摘 要:** 将拟南芥表皮毛调控基因 *TRIPTYCHON* (*TRY*)、*CAPRICE* (*CPC*) 以及 *ENHANCER OF TRY AND CPC1* (*ETC1*) 的序列信息, 在黄瓜基因组数据库中进行 BLAST 比对后发现, 它们都对应于黄瓜中的同一个基因 *CsTRY*。异源过量表达黄瓜 *CsTRY* 导致拟南芥叶片表皮毛大量减少, 且使拟南芥中表皮毛起始基因 *GLABRA2* (*GL2*) 的表达量显著下降, 表明黄瓜 *CsTRY* 基因与拟南芥 *TRY* 基因可能具有功能上的保守性, 通过阻碍 GL1-GL3/EGL3-TTG1 三聚体复合物的形成来降低 *GL2* 的表达, 从而抑制表皮毛的形成。

**关键词:** 黄瓜; 表皮毛; *CsTRY*; 转基因; 表达分析

**中图分类号:** S 642.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 01-0091-10

## Overexpression of Cucumber *CsTRY* Greatly Represses Trichome Formation in *Arabidopsis*

TAN Zheng<sup>1</sup>, GUO Fang<sup>1</sup>, YANG Fu-qiang<sup>2</sup>, LIU Li-ying<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-lan<sup>1</sup>, and REN Hua-zhong<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Agronomy & Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; <sup>2</sup> Vegetable Science Institute of Changsha, Changsha 410003, China)

**Abstract:** Using the sequence information of trichome regulating genes *TRIPTYCHON* (*TRY*), *CAPRICE* (*CPC*) and *ENHANCER OF TRY AND CPC1* (*ETC1*) in *Arabidopsis* to perform BLAST analysis against Cucumber Genome Database. We find that *TRY*, *CPC* and *ETC1* all result in the same hit *CsTRY* in the cucumber genome. Overexpression of *CsTRY* in *Arabidopsis* greatly decrease the number of trichomes on the leaves, and significantly reduce the expression of trichome initiating gene *GLABRA2* (*GL2*), indicating that *CsTRY* may have the conserved function as *Arabidopsis TRY*, which inhibits trichome formation through reducing *GL2* expression resulting from inhibition of the GL1-GL3/EGL3-TTG1 complex formation.

**Key words:** cucumber; trichome; *CsTRY*; transgene; expression analysis

植物的表皮毛由表皮细胞发育而来, 形态多样, 按不同的分类方法, 可分为单细胞和多细胞的表皮毛、有分枝和无分枝的表皮毛、有腺体和无腺体的表皮毛 (Johnson, 1975)。黄瓜 (*Cucumis sativus*)

**收稿日期:** 2011 - 10 - 26; **修回日期:** 2011 - 11 - 24

**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划 (‘973’) 项目 (2009CB11900); 国家科技支撑计划项目 (2009BADB8B02, 2011BAD12B03); 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (15050702, 2011JS067); 果类蔬菜产业技术体系北京市创新团队项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: renhuazhong@cau.edu.cn)

L.)的叶片、茎、花瓣、萼片、卷须、子房上都分布着多细胞的表皮毛,其中果实上的表皮毛又称为“果刺”,是黄瓜果实商品品质的重要性状之一。

拟南芥的表皮毛为单细胞结构,其发育过程受多个基因调控(Hülkamp et al., 1994)。在表皮毛形成的起始阶段,*GLABRA1 (GL1)*编码的R2R3 MYB转录因子(Larkin et al., 1993; Kirik et al., 2005),*TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)*编码的WD40蛋白(Galway et al., 1994; Walker et al., 1999),以及*GLABRA3 (GL3)*或*ENHANCER OF GLABRA3 (EGL3)*编码的bHLH蛋白(Bernhardt et al., 2003; Zhang et al., 2003)形成三聚体复合物(Payne et al., 2000),激活下游基因*GL2*的表达,使表皮细胞分化为表皮毛(Hülkamp, 2004; Ishida et al., 2008)。而由*TRY*、*CPC*、*ETC1*等基因编码的R3 MYB转录因子(Wada et al., 1997; Schnittger et al., 1999; Kirik et al., 2004)会与GL1蛋白竞争结合GL3/EGL3蛋白,抑制GL1-GL3/EGL3-TTG1复合体的形成,导致*GL2*的表达无法被激活,表皮细胞因此不能分化为表皮毛(Schellmann et al., 2002; Esch et al., 2003; Zhang et al., 2003)。

*TRY*编码的蛋白含有一个MYB结构域,为R3MYB转录因子。表皮毛前体细胞中的GL1-GL3/EGL3-TTG1复合体可以正向调控*TRY*的表达,而*TRY*编码的蛋白可以从表皮毛前体细胞转移到相邻的表皮细胞中(Marks & Esch, 2003),形成TRY-GL3/EGL3-TTG1复合体,进而抑制该细胞向表皮毛转化(Zhang et al., 2003)。拟南芥的*try*突变体表现为表皮毛成簇生长(Schnittger et al., 1999),而过表达*TRY*的拟南芥则表现为完全无毛(Schellmann et al., 2002)。

关媛(2008)利用棉花和拟南芥的*TTG1*基因进行同源克隆,分离得到了黄瓜*CsTTG1*基因,并通过功能互补试验证明*CsTTG1*能恢复拟南芥*tgl1*突变体的表型,推测在黄瓜中可能存在与拟南芥类似的表皮毛发育机制。

为进一步了解黄瓜表皮毛发育的分子机制,本研究中利用拟南芥表皮毛负调控基因*TRY*、*CPC*和*ETC1*的CDS序列在黄瓜基因组数据库中进行BLAST同源搜索,发现它们均对应于黄瓜中的同一个基因*CsTRY*,通过基因克隆、序列比对和结构分析,对黄瓜*CsTRY*的功能进行预测,并在拟南芥中异源过量表达*CsTRY*,观察转基因植株的表型,分析表皮毛起始形成相关基因的表达情况,以初步验证*CsTRY*在表皮毛形成过程中的功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以中国农业大学黄瓜育种课题组选育的黄瓜高代自交系ZND407为试材。该材料植株表皮毛明显,刺瘤密集。于2010年春季将其种子播于日光温室中(中国农业大学科技园),待植株开始结瓜时,取开花当天的果实用液氮速冻,存于-80℃冰箱备用。

所用拟南芥材料为本实验室保存的野生型Columbia-0(Col-0),其表现为表皮毛明显。种子消毒后播于MS固体培养基上,4℃处理2d后放入人工气候室,培养条件为16h光照/8h黑暗,恒温22℃。

### 1.2 总RNA的提取与cDNA的合成

采用柱式植物RNAout试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司)提取黄瓜果实的总RNA,并用DNase I(天根生化科技有限公司)去除RNA样品中残留的DNA。利用M-MLV Reverse Transcriptase(Promega)合成单链cDNA。

### 1.3 *CsTRY* 基因的克隆与序列分析

利用拟南芥 *TRY*、*CPC*、*ETC1* 基因 CDS 序列和氨基酸序列在黄瓜基因组数据库(<http://cucumber.genomics.org.cn/page/cucumber/index.jsp>) 中分别进行 BLAST 同源搜索, 发现与这 3 个基因相似度最高的序列为同一条, 命名为 *CsTRY*, 根据 *CsTRY* 的全长 CDS 序列设计引物为 5'-ATGGACAATC ATCGTCACCA-3' 和 5'-TCATCCTCTTCTTCTTTTCCA-3'。

用高保真酶 primer star (TaKaRa) 进行 PCR 扩增, 凝胶回收后连接 PBSK 中间载体 (载体预先用 *EcoRV* 酶切成平末端, 图 1, A), 42 °C 热激 90 s 转化大肠杆菌 TOP10 (采用天根公司大肠杆菌 TOP10 转化方案), PCR 鉴定后将阳性菌的菌液送华大公司测序验证。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 48 °C 复性 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

将 *CsTRY* 蛋白与拟南芥 *TRY* 蛋白在蛋白质网站进行预测分析, 分析的内容及相应的在线工具和网址分别为: 蛋白质的理化性质 (ProtParam tool, <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>), 信号肽 (SignalP 3.0 Server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 跨膜结构域 (TmPred, [http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)), 糖基化位点 (DiyCOgly 1.1, <http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/>), 亚细胞定位 (WolfSort, <http://wolfsort.org/>), 高级结构 (SWISS-MODEL Workspace, [http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling\\_simple1](http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1))。

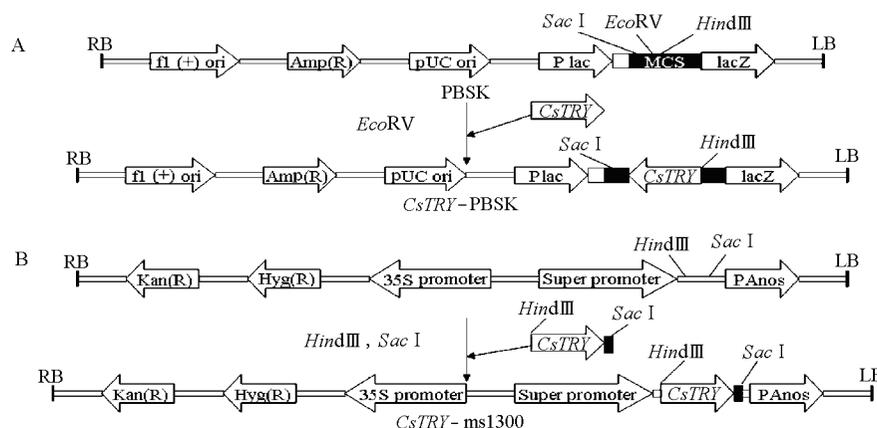


图 1 *CsTRY*-PBSK 载体 (A) 和 *CsTRY*-ms1300 (B) 载体的构建流程图

Fig. 1 Schematic flow of *CsTRY*-PBSK (A) and *CsTRY*-ms1300 (B) vector constructions

### 1.4 *CsTRY* 过表达载体的构建与拟南芥转化

将测序正确的阳性菌质粒和过表达载体 ms1300 同时进行 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切后回收, 连接回收的目的片段与 ms1300 载体片段 (图 1, B), 42 °C 热激 90 s 转化大肠杆菌 TOP10, PCR 鉴定和质粒酶切鉴定筛选得到阳性菌后将阳性菌的质粒电击转化农杆菌 GV3101 (黄小贞, 2010), 最后用携带 *CsTRY*-ms1300 质粒的农杆菌菌液对拟南芥进行花序侵染 (Clough & Bent, 1998)。

### 1.5 35S::*CsTRY* 转基因拟南芥植株的筛选与鉴定

收获转化植株的  $T_0$  代种子, 消毒后播种于含有  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  潮霉素的 MS 培养基上进行筛选, 1~2 周后将阳性苗移入营养土中生长。Col-0 野生型种子的播种时期及生长条件与转化株  $T_0$  代一致。待植株长至 8 叶期时, 统计前 6 片真叶的表皮毛数。统计方法为: (1) Col-0: 将叶片在显微镜下照相, 保证能清楚地看到叶片所有区域的表皮毛, 然后在电脑上放大, 逐区计数, 各个区域表皮毛数

量的总和即为该叶片表皮毛的总数；(2) 转化株：由于表皮毛数较少，直接将叶片在显微镜下观察并计数。所用相机为 Canon G12，显微镜为 OLYMPUS SZ61。

拟南芥抽薹后，分别取野生株和转化株 T<sub>0</sub> 代 (3 个株系) 的莲座叶，以莲座叶的 cDNA 为模板，扩增 *CsTRY* 的全长 CDS 序列。

## 1.6 半定量 RT-PCR

以野生株和转化株幼苗 (苗龄两周) 的 cDNA 为模板，检测拟南芥中与表皮毛起始形成相关的 11 个基因的表达情况。利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物，并委托华大公司合成。所用引物及其序列见表 1，所用内参为 *ACTIN2*。

PCR 反应体系为：10 × PCR Buffer 2.0 μL，dNTP (10 mmol · L<sup>-1</sup>) 0.2 μL，上游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 0.4 μL，下游引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 0.4 μL，*Taq* 酶 (2.5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.2 μL，MgCl<sub>2</sub> (25 mmol · L<sup>-1</sup>) 1.2 μL，cDNA 模板 1.0 μL，最后用无菌的去离子水补足至 20 μL。

PCR 反应程序如下：94 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，T<sub>m</sub> (表 1) 复性 30 s，72 °C 延伸 (延伸时间根据产物大小确定)，27 ~ 32 个循环 (循环数根据各个基因的表达量进行优化)；72 °C 延伸 5 min。

表 1 半定量 RT-PCR 所用的引物序列、退火温度和扩增产物大小

Table 1 Primer sequence, annealing temperature and product size for semi-quantitative RT-PCR

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature (T <sub>m</sub> )	产物大小/bp Product size
<i>GL1</i>	CTCATTATTCGTCTCCACAAG CTAAAGGCAGTACTCAACATC	52.0	453
<i>GL2</i>	TGGGCAGAAGAGTAGTTGACG TGTGACTGAGACGAGGTTTGT	55.5	2 069
<i>GL3</i>	ATGGTATCTTTTGGTCTGTCTC TGCCCTAGTCTTTGAACTCTAC	52.0	925
<i>EGL3</i>	AGTGTGGAGTGGGGAGATG CGACTGAACCGAGTGAGAAT	55.5	1 558
<i>TTG1</i>	ATGGATAATTCAGCTCCAG TCAAACCTAAGGAGCTGC	51.2	1 026
<i>TRY</i>	ATGGATAACACTGACCGTCG CTAGGAAGGATAGATAG	47.0	321
<i>TCL1</i>	ATGGATAACACAAACCGTC TCATTTGTGGGAGAAATAGTC	48.5	255
<i>CPC</i>	ATGTTTCGTTTCAGACAAGGC TCATTTCTAAAAAAGTCTC	47.5	285
<i>ETC1</i>	ATGAATACGCAGCGTAAGTC TCAACGTAATTGAGATCTTCG	51.2	252
<i>ETC2</i>	ATGGATAATACCAACCGTC TTACAATTTAGATTTTCTTG	42.0	339
<i>ETC3</i>	ATGGATAACCATCGCAGGAC TCAATTTTCATGACCCAAAAC	50.0	234
<i>ACTIN2</i>	CACGTGCCAATCTACGAGGGT GCTGGAATGTCTGAGGGAAG	55.0	578

注：*TCL1*、*ETC2*、*ETC3* 基因的全称分别为 *TRICHOMELESS1*、*ENHANCER OF TRY AND CPC2* 以及 *ENHANCER OF TRY AND CPC3*。

Note: The full name of *TCL1*, *ETC2* and *ETC3* is *TRICHOMELESS1*, *ENHANCER OF TRY AND CPC2* and *ENHANCER OF TRY AND CPC3* respectively.

## 1.7 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 所用试剂盒为 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)，仪器为 ABI 7500，引物设计分别为：*GL1F*: 5'-CGACTCTCCACCGTCATTGTT-3'，*GL1R*: 5'-TTCTCGTAGATATTTCTTGTGTTGATGATG-3'；*GL2F*: 5'-ATGAAGCTCGTCGGCATGAGTGGG-3'，*GL2R*: 5'-TGG ATTGCCACTGAGTTGC

CTCTG-3'; *GL3F*: 5'-ACATTGGTGAAGGAATGCCTGGAC-3', *GL3R*: 5'-TTACTATCCGCCGTATGAGCGTTG-3'; *EGL3F*: 5'-TGAAACCGCCGATAGCAAAG-3', *EGL3R*: 5'-CTCCAAGAAACGGGAAGCAA-3'; *TTG1F*: 5'-GCGATTCCTCCGTCTTTGG-3', *TTG1R*: 5'-CGCTCGTTTTGCTGTTGTTG-3', 所用内参为 *AT4G34270*, 引物序列为 5'-GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA-3' 和 5'-TCAACTGGATACCCTTTCGCA-3'。所用拟南芥材料与半定量 RT-PCR 一致。

实时荧光定量 PCR 的反应体系为:  $2 \times$  SYBR Premix Ex *Taq* 10.0  $\mu$ L, 上游引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.4  $\mu$ L, 下游引物 ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.4  $\mu$ L,  $50 \times$  ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 1.0  $\mu$ L, 无菌去离子水补足至 20  $\mu$ L。实时荧光定量 PCR 反应程序如下: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  复性 40 s, 40 个循环。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜 *CsTRY* 基因的克隆

利用拟南芥 *TRY*、*CPC*、*ETC1* 基因的 CDS 序列和氨基酸序列, 在黄瓜基因组数据库中分别进行 BLAST 同源搜索, 发现与这 3 个基因相似度最高的序列为同一条, 命名为 *CsTRY*。依据黄瓜基因组数据库中 *CsTRY* 的序列信息设计引物, 通过 RT-PCR 扩增得到一条 249 bp 的序列, 测序结果与数据库中序列一致。*CsTRY* 在黄瓜基因组中 BLAST 的结果表明它是单基因, 除自身外, 其它序列与 *CsTRY* 的相似度均非常低 ( $E$  值  $> 0.13$ )。利用 DNAMAN 软件进行序列比对后发现 *CsTRY* 与拟南芥 *TRY*、*ETC1* 和 *CPC* 基因的同源性分别为 60.6%、45.8%和 53.0% (图 2)。

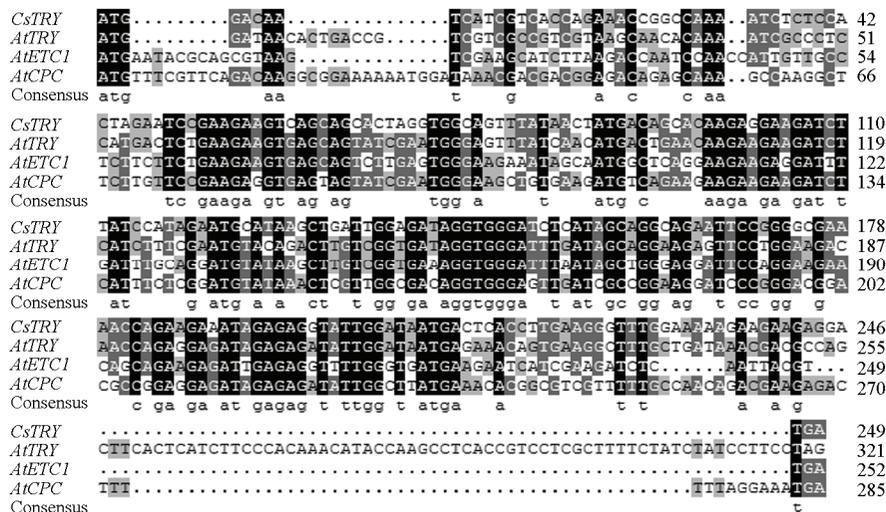


图 2 黄瓜 *CsTRY* 基因与拟南芥 *TRY*、*ETC1*、*CPC* 基因的 CDS 全长序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of the full-length CDS of cucumber *CsTRY* with *Arabidopsis TRY*, *ETC1* and *CPC*

*CsTRY* 基因编码的蛋白质由 82 个氨基酸组成, 分子量 9 835.25 D, 等电点 9.29。*CsTRY* 与拟南芥 *TRY*、*ETC1*、*CPC* 氨基酸序列的同源性分别为 65.9%、50.0%和 57.3%。同拟南芥 *TRY*、*ETC1*、*CPC* 蛋白一样, *CsTRY* 蛋白也含有 1 个 Myb DNA-binding 结构域 (图 3), 该结构域含有 3 个保守的 Trp (W) 残基, 是一段具有螺旋—转角—螺旋构象的不完全重复序列。另外, *CsTRY* 和拟南芥 *TRY* 的蛋白分析结果表明这两个蛋白均属于小分子量、不稳定、疏水性蛋白, 不存在信号肽、糖基

化位点及跨膜结构域,均定位于细胞核中,并且都具有相似的高级结构(图4)。据此推测黄瓜 *CsTRY* 基因编码的蛋白和拟南芥 *TRY* 基因编码的蛋白可能有着相似的功能。

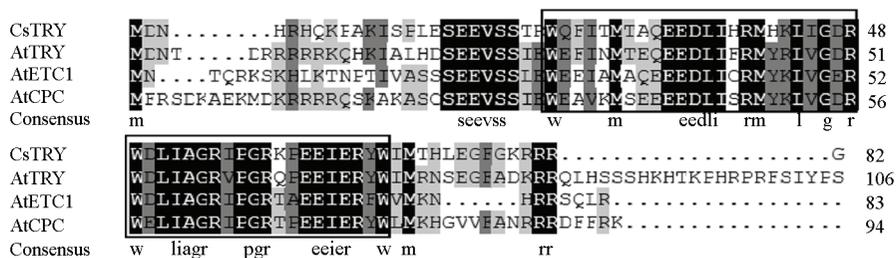


图3 黄瓜 *CsTRY* 基因与拟南芥 *ETC1*、*CPC*、*TRY* 基因所编码氨基酸的序列比对  
黑色方框代表 Myb DNA-binding 结构域。

Fig. 3 Sequence alignment of the amino acid sequences encoded by cucumber *CsTRY* and *Arabidopsis TRY*, *ETC1* and *CPC*  
The black box shows the position of the Myb DNA-binding domain.

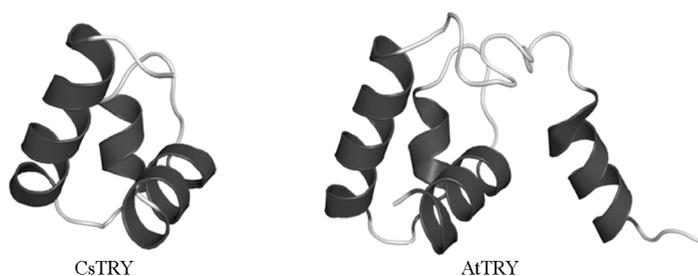


图4 黄瓜 *CsTRY* 蛋白和拟南芥 *TRY* 蛋白高级结构预测图

Fig. 4 Putative three-dimensional structure of cucumber *CsTRY* and *Arabidopsis TRY*

## 2.2 *CsTRY* 基因过表达载体的验证

为进一步了解 *CsTRY* 在表皮毛发育调控中的作用,构建了 *CsTRY* 基因的过表达载体,并转入到野生型拟南芥中。*CsTRY* 的 PCR 扩增产物先克隆到 PBSK 中间载体中,然后连接到 ms1300 过表达载体中。*CsTRY*-ms1300 重组质粒经 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切后,正确切出了载体片段和含有目的基因的小片段(图5),表明 *CsTRY* 基因的编码框已正确连接到表达载体中。

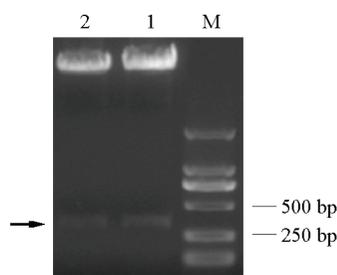


图5 *CsTRY*-ms1300 重组质粒双酶切(1~2)鉴定电泳图  
M: DNA marker 2 kb; 箭头指含 *CsTRY* 全长 CDS 的酶切片段。  
Fig. 5 Verification of recombinant plasmid *CsTRY*-ms1300 digested with *sac* I and *Hind* III (lane 1 to 2)  
M: DNA marker 2 kb; The arrow shows the band of *CsTRY* CDS.

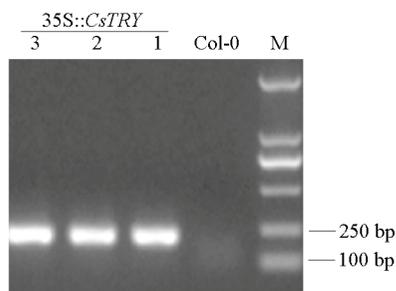


图6 转基因拟南芥植株(1~3)的 PCR 检测  
M: DNA 标准分子量 2 kb。  
Fig. 6 PCR detection of transgenic *Arabidopsis* (lane 1 to 3)  
M: DNA marker 2 kb.

### 2.3 转基因拟南芥植株的鉴定与表型分析

利用 *CsTRY* 基因的引物在拟南芥 35S::*CsTRY* 转基因植株中扩增出了约 250 bp 明亮清晰的特异性条带, 说明 *CsTRY* 基因已经整合到拟南芥植株的基因组中并实现表达 (图 6)。通过对 27 个过表达株系的观察分析, 发现相比于野生型植株, 35S::*CsTRY* 植株叶片的表皮毛数量明显减少, 叶片变得光滑 (图 7; 表 2)。野生型植株前 6 片真叶的总表皮毛数平均为 281, 而 *CsTRY* 过表达株系平均为 47, 降低了 83.3%, 表明异源过表达黄瓜 *CsTRY* 基因显著抑制了拟南芥表皮毛的形成。

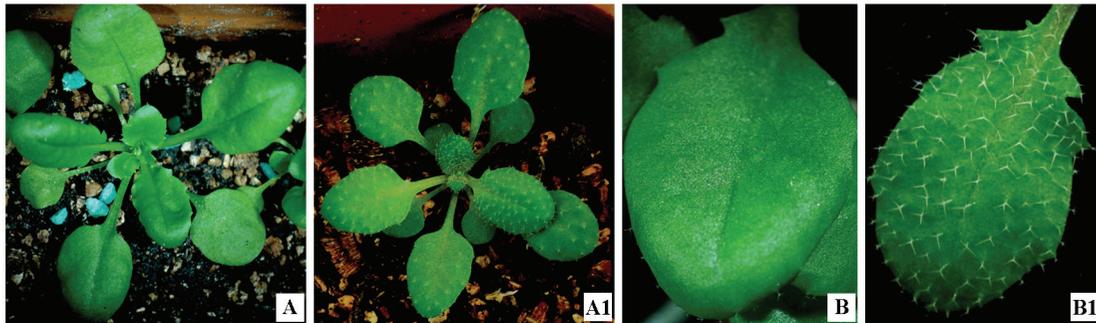


图 7 35S::*CsTRY* 转基因拟南芥植株表型

35S::*CsTRY* (A) 与 Col-0 (A1) 拟南芥植株表型对比; 35S::*CsTRY* (B) 与 Col-0 (B1) 拟南芥叶片表皮毛对比。

Fig. 7 The phenotypes of 35S::*CsTRY* transgenic *Arabidopsis*

Phenotypic comparison between 35S::*CsTRY* (A) and Col-0 (A1) *Arabidopsis* plants; Leaves trichomes from 35S::*CsTRY* (B) and Col-0 (B1) *Arabidopsis* plants.

表 2 野生型与 35S::*CsTRY* 拟南芥植株前 6 片真叶表皮毛数统计结果

Table 2 Trichome number of the first six true leaves from the Col-0 and 35S::*CsTRY* *Arabidopsis* plants

基因型 Genotype	株号 Plant number	叶片号 Leaf number						总表皮毛数 Total number of trichomes
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	
Col-0	1	26	22	21	47	67	124	307
	2	23	25	32	52	68	100	300
	3	16	18	22	34	75	102	267
	4	20	26	26	33	48	96	249
35S:: <i>CsTRY</i>	1	0	0	2	2	8	14	26
	2	0	0	0	0	7	2	9
	3	0	0	0	30	20	29	79
	4	1	2	5	7	3	3	21
	5	0	0	0	6	22	18	46
	6	9	3	19	24	24	23	102

### 2.4 35S::*CsTRY* 拟南芥植株中表皮毛起始形成相关基因的表达分析

为明确黄瓜 *CsTRY* 抑制拟南芥表皮毛形成的分子机理, 对 35S::*CsTRY* 拟南芥植株中已知的与表皮毛起始形成相关的 11 个基因进行了表达分析, 其中 *GL1*、*GL2*、*GL3*、*EGL3* 及 *TTG1* 为表皮毛起始形成的正调控基因; *TRY*、*TCL1*、*CPC*、*ETC1*、*ETC2* 及 *ETC3* 为负调控基因。同野生型植株相比, 35S::*CsTRY* 拟南芥植株中 *GL2* 的表达量明显下降, 降低了 90% 以上 (图 8, 图 9), 这可能是由于 *CsTRY* 蛋白通过竞争性结合 *GL3* 蛋白, 阻碍了 *GL1*-*GL3*/*EGL3*-*TTG1* 三聚体的形成, 从而抑制了 *GL2* 的表达; *GL1* 的表达量下降了 58% ~ 83% (图 8, 图 9), 推测可能是由于 *GL1* 无法与 *GL3* 结合, 导致 *GL1* 蛋白冗余从而反馈抑制其自身的表达; *GL3* 的表达量增加了 1.5 倍左右 (图 8, 图 9), 可能是由于过量的 *CsTRY* 与其结合, 导致其消耗量增大, 从而正反馈促进了其自身的表达;

而 *CPC*、*ETC1*、*TRY* 等负调控基因表达量的下降 (图 8), 则可能是由于 *CsTRY* 基因和它们之间的同源抑制作用 (同源基因的共抑制效应) 引起的。其它调控基因如 *EGL3*、*TTG1*、*TCL1*、*ETC2* 和 *ETC3* 的表达量变化不明显 (图 8, 图 9)。

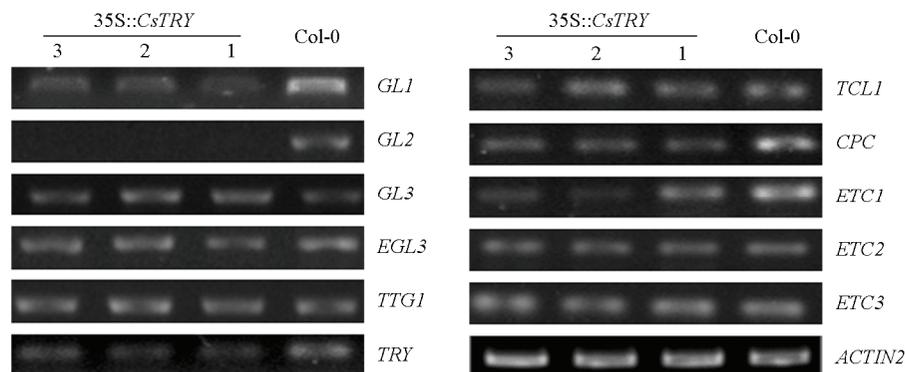


图 8 35S::CsTRY 拟南芥幼苗中表皮毛起始形成相关基因的半定量 RT-PCR 分析结果

1、2、3 分别为 35S::CsTRY 植株的 3 个株系。GL1、GL2、GL3、EGL3 和 TTG1 为表皮毛起始形成的正调控基因；TRY、TCL1、CPC、ETC1、ETC2 及 ETC3 为负调控基因，ACTIN2 为内参。

Fig. 8 Semi quantitative RT-PCR analysis of trichome initiation-related genes in 35S::CsTRY Arabidopsis seedlings

Lane 1 to 3 represents three independent lines of 35S::CsTRY Arabidopsis. GL1, GL2, GL3, EGL3 and TTG1 are known as positive regulators during trichome initiation, whereas TRY, TCL1, CPC, ETC1, ETC2 and ETC3 are negative regulators, ACTIN2 was used as the internal control.

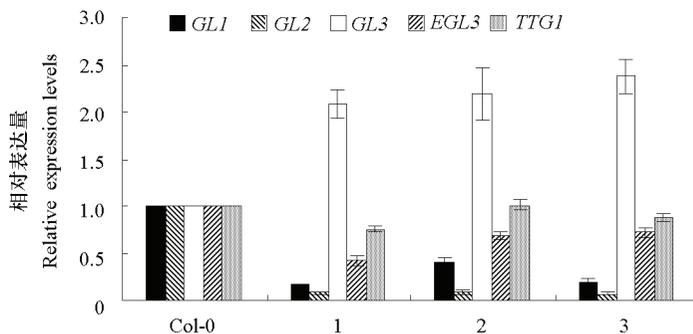


图 9 35S::CsTRY 拟南芥幼苗中表皮毛起始形成相关基因的实时荧光定量 PCR 分析

1、2、3 分别表示 35S::CsTRY 植株的 3 个株系。

Fig. 9 Real-time PCR analysis of trichome initiation-related genes in 35S::CsTRY Arabidopsis seedlings

1 to 3 represents three independent lines of 35S::CsTRY Arabidopsis.

### 3 讨论

MYB 蛋白家族是植物中最大的转录因子家族之一, 其共同特征是均含有 MYB 结构域 (DNA 结合结构域)。该结构域由 51 ~ 53 个氨基酸组成, 含有 3 个保守的 Trp (W) 残基, 是一段具有螺旋—转角—螺旋构象的不完全重复序列 (Ogata et al., 1996), 可以和 DNA 双螺旋的大沟结合 (Jia et al., 2004)。本研究中发现黄瓜 *CsTRY* 蛋白的氨基酸序列的第 25 位、49 位和 68 位均为 Trp, 第 25 位到第 68 位形成螺旋—转角—螺旋的构型。这些特点与 MYB 结构域完全符合, 同时黄瓜 *CsTRY* 蛋白的 MYB 结构域与拟南芥 TRY 蛋白、ETC1 蛋白和 CPC 蛋白的 MYB 结构域都有很高的同源性

(图 3), 表明黄瓜 *CsTRY* 蛋白也属于 R3 MYB 转录因子家族, 可能发挥着和拟南芥 R3 MYB 转录因子类似的功能。

拟南芥表皮毛起始发育模式的核心是 GL1-GL3/EGL3-TTG1 蛋白复合体驱动下游基因 *GL2* 的表达, 使表皮细胞分化成为表皮毛。*TRY* 基因编码的 R3 MYB 蛋白可以通过竞争机制打破 GL1 蛋白和 GL3 蛋白的结合 (Marks & Esch, 2003), 从而阻碍 GL1-GL3/EGL3-TTG1 蛋白复合体的形成, 导致 *GL2* 无法正常表达, 抑制表皮毛的形成。本研究中发现异源过表达的黄瓜 *CsTRY* 基因可显著抑制拟南芥叶片表皮毛的形成, 且 35S::*CsTRY* 拟南芥植株中 *GL2* 基因的表达量显著降低 (图 8, 图 9), 因此推测黄瓜 *CsTRY* 蛋白可能也是通过与 GL3 蛋白互作, 阻碍了 GL1-GL3/EGL3-TTG1 蛋白复合体的形成, 从而降低了拟南芥 *GL2* 基因的表达, 抑制了表皮毛的形成。但 *CsTRY* 基因是否影响黄瓜自身表皮毛的发育, 其作用方式和影响程度是否与拟南芥一致等问题尚待深入研究。

黄瓜、烟草、矮牵牛和番茄的表皮毛是多细胞的, 而拟南芥表皮毛是单细胞的。前人研究发现: 黄瓜 *CsTTG1* 基因可以互补拟南芥 *ttg1* 突变体的表型 (关媛, 2008); 棉花 *TRY* 基因可以抑制烟草叶片表皮毛的发育 (郑鹏, 2010); 但拟南芥 *GL1* 基因的过表达并不影响烟草表皮毛的形成 (Payne et al., 1999); 玉米中的一个 *R-like bHLH* 基因与玉米表皮毛的形成无关, 它的过表达却可以使拟南芥的叶和茎上的表皮毛数量增加 (Lloyd et al., 1992), 但对烟草 (Lloyd et al., 1992; Payne et al., 1999)、矮牵牛 (Quattrocchio et al., 1993; Spelt et al., 2000) 和番茄 (Mooney et al., 1995) 表皮毛的形成却没有影响。这些研究结果说明单细胞和多细胞表皮毛的形成机制有相似之处, 但又不尽相同。与单细胞表皮毛相比, 多细胞表皮毛的形成机制可能更为复杂。本研究中黄瓜 *CsTRY* 基因可以抑制拟南芥叶片表皮毛的形成, 进一步表明调控表皮毛形成的关键基因可能存在进化上的保守性, 这将为多细胞表皮毛形成机制的研究提供重要参考。

## References

- Bernhardt C, Lee M M, Gonzalez A, Zhang F, Lloyd A, Schiefelbein J. 2003. The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development*, 130 (26): 6431 - 6439.
- Clough S J, Bent A F. 1998. Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16 (6): 735 - 743.
- Esch J J, Chen M, Sanders M, Hillestad M, Ndkium S, Idelkope B, Neizer J, Marks M D. 2003. A contradictory *GLABRA3* allele helps define gene interactions controlling trichome development in *Arabidopsis*. *Development*, 130 (24): 5885 - 5894.
- Galway M E, Masucci J D, Lloyd A M, Walbot V, Davis R W, Schiefelbein J W. 1994. The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Developmental Biology*, 166 (2): 740 - 754.
- Guan Yuan. 2008. Mapping and cloning of related gene for fruit spines formation in cucumber [Ph. D. Dissertation]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University. (in Chinese)
- 关媛. 2008. 黄瓜果刺形成相关基因的定位与克隆 [博士论文]. 上海: 上海交通大学.
- Huang Xiao-zhen. 2010. Cloning and functional analysis of chilling-sensitive mutants *chs2* and *chs4* in *Arabidopsis* [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 黄小贞. 2010. 拟南芥冷敏感突变体 *chs2* 和 *chs4* 的基因克隆及其功能分析 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Hülkamp M. 2004. Plant trichomes: A model for cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5 (6): 471 - 480.
- Hülkamp M, Miséra S, Jürgens G. 1994. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell*, (3), 76: 555 - 566.
- Ishida T, Kurata T, Okada K, Wada T. 2008. A genetic regulatory network in the development of trichomes and root hairs. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 365 - 386.
- Jia L, Clegg M T, Jiang T. 2004. Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies *indica* and *japonica* genomes. *Plant Physiology*, 134 (2): 575 - 585.

- Johnson H B. 1975. Plant pubescence: An ecological perspective. *The Botanical Review*, 41 (3): 233 - 258.
- Kirik V, Lee M M, Wester K, Herrmann U, Zheng Z, Oppenheimer D, Schiefelbein J, Hülkamp M. 2005. Functional diversification of *MYB23* and *GL1* genes in trichome morphogenesis and initiation. *Development*, 132 (7): 1477 - 1485.
- Kirik V, Simon M, Hülkamp M, Schiefelbein J. 2004. The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Developmental Biology*, 268 (2): 506 - 513.
- Larkin J C, Oppenheimer D G, Pollock S, Marks M D. 1993. *Arabidopsis GLABROUS1* gene requires downstream sequences for function. *The Plant Cell*, 5 (12): 1739 - 1748.
- Lloyd A M, Walbot V, Davis R W. 1992. *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science*, 258: 1773 - 1775.
- Marks M D, Esch J J. 2003. Initiating inhibition: Control of epidermal cell patterning in plants. *EMBO Reports*, 4 (1): 24 - 25.
- Mooney M, Desnos T, Harrison K, Jones J, Carpenter R, Coen E. 1995. Altered regulation of tomato and tobacco pigmentation genes caused by the *delila* gene of *Antirrhinum*. *The Plant Journal*, 7 (2): 333 - 339.
- Ogata K, Kanei-Ishii C, Sasaki M., Hatanaka H, Nagadoi A, Enari M, Nakamura H, Nishimura Y, Ishii S, Sarai A. 1996. The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 3 (2): 178 - 187.
- Payne C T, Zhang F, Lloyd A M. 2000. *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics*, 156 (3): 1349 - 1362.
- Payne T, Clement J, Arnold D, Lloyd A. 1999. Heterologous myb genes distinct from *GL1* enhance trichome production when overexpressed in *Nicotiana tabacum*. *Development*, 126 (4): 671 - 682.
- Quattrocchio F, Wing J F, Leppen H T C, Mol J N M, Koes R E. 1993. Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *The Plant Cell*, 5 (11): 1497 - 1512.
- Schellmann S, Schnittger A, Kirik V, Wada T, Okada K, Beermann A, Thumfahrt J, Jürgens G, Hülkamp M. 2002. *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *EMBO J*, 21 (19): 5036 - 5046.
- Schnittger A, Folkers U, Schwab B, Jürgens G, Hülkamp M. 1999. Generation of a spacing pattern: The role of *TRIPTYCHON* in trichome patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 11 (6): 1105 - 1116.
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol J N M, Koes R. 2000. *Anthocyanin1* of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *The Plant Cell*, 12 (9): 1619 - 1631.
- Wada T, Tachibana T, Shimura Y, Okada K. 1997. Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, *CPC*. *Science*, 277: 1113 - 1116.
- Walker A R, Davison P, Bolognesi-Winfield A C, James C M, Srinivasan N, Blundell T L, Esch Jeffrey J, Marks M D, Gray J C. 1999. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *The Plant Cell*, 11 (7): 1337 - 1350.
- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne C T, Lloyd A. 2003. A network of redundant bHLH proteins functions in all *TTG1*-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development*, 130 (20): 4859 - 4869.
- Zheng Peng. 2010. In silico cloning of *TRIPTYCHON* in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and preliminary confirmation of *TRIPTYCHON* gene function[M. D. Dissertation]. Urumchi: Xinjiang Agricultural University. (in Chinese)
- 郑 鹏. 2010. 棉花 *TRIPTYCHON* 基因的电子克隆和功能初步验证[硕士论文]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学.