

韩 蕾,李俊林,苏彦华. 拟南芥突变体 *kea* 的表型分析及对生长素的响应特征[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):30-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.007

拟南芥突变体 *kea* 的表型分析及对生长素的响应特征

韩 蕾^{1,2}, 李俊林^{1,3}, 苏彦华¹

(1. 土壤与农业可持续发展国家重点实验室/中国科学院南京土壤研究所, 江苏南京 210008;

2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 南京林业大学, 江苏南京 210037)

摘要:对拟南芥 *kea* 突变体表型分析的结果表明,在黑暗条件下,单个 *KEA* 缺失后下胚轴和主根伸长与野生型相比没有明显差异,而多个 *KEA* 缺失导致幼苗出现去黄化现象,表现为下胚轴伸长受到抑制,子叶完全打开,真叶开始出现,主根发育良好。qRT-PCT 结果表明,呈现去黄化现象的 *kea* 多突变体内生长素合成基因 *IAA1*、*IAA3*、*IAA17* 的表达下调,而生长素转运基因 *AUX1*、*PIN1*、*PIN3*、*PIN7* 的表达没有明显变化。外源施加生长素类似物 NAA 能够恢复 *kea* 多突变体去黄化现象。上述结果暗示 *KEA* 在调控拟南芥光调控发育的某些方面发挥重要作用。

关键词:拟南芥;去黄化;生长素;暗形态建成

中图分类号: Q945.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0030-03

植物在光照下和黑暗中表现为不同的生长特性;光照下萌发的幼苗表现为:下胚轴伸长受抑制、主根伸长、子叶展开、叶绿素累积,称为光形态建成(photomorphogenesis)。在黑暗中,植物的生长呈现出多种黄化特征,称为暗形态建成(skotomorphogenesis)^[1]。黄化苗主要特点为迅速生长和伸长的下胚轴、发育迟缓的主根、闭合的子叶形成顶端弯钩(apical hook)^[2]。在自然界中,种子发芽起始于暗形态建成过程:种子萌发后,大部分营养资源流向下胚轴,用于下胚轴伸长而不是子叶和根系的发育,这种快速伸长的方式为幼苗更早的接收光照提供了物理支持。此外,子叶通过紧闭形成顶端弯钩以保护地上部分生组织在幼苗破土而出时免遭伤害。这一生长策略能够保证幼苗在光合作用之前种子中贮备的有限营养物质更有效利用^[3]。

暗形态建成过程受多种植物激素如生长素、脱落酸、细胞分裂素、油菜素内酯、赤霉素和乙烯的调控^[2,4-7]。生长素能够促进多种植物器官的伸长,例如:下胚轴、胚芽鞘和根,其机理早在 20 世纪 70 年代由酸生长理论所解释^[8-9]。此理论表明在数分钟内,通过细胞质膜 H^+ -ATPase 生长素促进质子外排,此过程降低了质外体间 pH 值,促进细胞壁松弛^[10]。本研究筛选到几个 *kea* 突变体,其暗形态过程发生改变,通过分析下胚轴、主根的表现特征,并利用基因表达和药理学试验初步研究了其去黄化特征对生长素响应的改变,以期探讨 *KEA* 基因在拟南芥发育过程中的功能,为进一步阐述拟南芥光发育的相关机制提供良好的试验材料。

1 材料与与方法

1.1 供试材料

收稿日期:2015-03-10

基金项目:国家自然科学基金重大研究计划(编号:91125028)。

作者简介:韩 蕾(1986—),女,陕西渭南人,博士研究生,主要从事植物逆境生理生化特征研究。E-mail:lhnan@issas.ac.cn。

通信作者:苏彦华,博士,研究员,主要从事植物氮钾素高效利用。

Tel:(025)86881529;E-mail:yhsu@issas.ac.cn。

1.1.1 植物材料 拟南芥野生型 Col-0,单突变体 *kea3*、*kea4*、*kea5*、*kea6*;双突变体 *kea4/5* 和 *kea4/6*,多突变体 *kea4/5/6*。其中 *kea3*、*kea4*、*kea5*、*kea6* 单突变体种子从 ABRC 拟南芥种子资源库购得。双突变体和多突变体通过杂交方法得来。

1.1.2 生长条件和培养基 光照培养箱(MMM,Germany)的培养条件为:温度 23℃,相对湿度 70%,连续黑暗培养。培养基修改自 Pilot 等的配方^[11],成分包括:1 mmol/L $CaSO_4$, 2 mmol/L NH_4NO_3 , 1 mmol/L KH_2PO_4 , 1 mmol/L $MgSO_4$, 50 μ mol/L NaFe-EDTA, 50 μ mol/L H_3BO_3 , 12 μ mol/L $MnCl_2$, 1 μ mol/L $CuCl_2$, 1 μ mol/L $ZnCl_2$, 30 nmol/L $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, 2.4 mmol/L MES(2-吗啉己磺酸),10 g/L 蔗糖,8 g/L 琼脂,用 1 mmol/L KOH 调至 pH 值 5.7,121℃,100 kPa 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 拟南芥种子消毒和播种 拟南芥种子,先用 70%乙醇冲洗 30 s,再用含有体积分数 1% 次氯酸钠和 5 g/L SDS(十二烷基硫酸钠)的消毒液冲洗,并且剧烈振荡 5 min,然后用无菌水冲洗 5 次,最后再加少量无菌水,4℃冰箱放置 48 h。播种于培养基,用医用胶带密封后竖直放置在生长箱培养。

1.2.2 激素处理试验 配制 10 mmol/L 生长素类似物 NAA,待培养基灭菌冷却至 65℃左右,在超净工作台中,将 NAA 母液按照一定的稀释倍数添加到培养基。

1.2.3 下胚轴和主根长测量 拟南芥野生型和突变体在正常培养基或含有不同浓度 NAA 的培养基黑暗培养 8 d 后,以直尺为参照进行拍照(Cannon G8),使用 ImageJ 软件按照直尺比例分析下胚轴和主根长。

1.2.4 拟南芥 RNA 提取及反转录 采用 Trizol(TaKaRa)分别提取野生型和突变体总 RNA,并且用 DNA 酶去除基因组 DNA 污染。取 2 份 RNA,一份用于测定在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度,通过 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 的值得出总 RNA 的纯度,此比值介于 1.8~2.2 之间为佳;另一份通过变性胶检测 RNA 完整性,如果 28S 和 18S 清晰无拖尾,而且亮度比值约为

2 : 1,说明提取的总 RNA 无降解且完整性较高。取 2 μ g RNA,用反转录试剂盒(TAKARA)合成 cDNA。

1.2.5 实时定量荧光 PCR 采用荧光染料 SYBR Green I (TaKaRa) 进行分析。本研究所用引物见表 1。定量 PCR 加样量:2 \times SYBR green I Premix 10 μ L,PrimerF (10 μ mol/L) 0.4 μ L,PrimerR (10 μ mol/L)0.4 μ L,cDNA 模板(稀释 4 倍) 2.5 μ L,去离子水补充至 20 μ L。PCR 程序如下:95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 15 s,45 个循环;熔解曲线从 65 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C,每 0.5 $^{\circ}$ C 进行记录;最后 16 $^{\circ}$ C。PCR 结束后先分析熔解曲线,每对引物的溶解曲线一致,说明该 PCR 特异,数据可信。另外分析扩增曲线,我们用 Actin2 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量的方法计算目的基因的相对表达量。cDNA 模板的 C_t 值基本保证在 15 ~ 30 之间,超出此范围,数据不可信。根据经验,一般稀释 4 倍。

表 1 荧光定量 PCR 引物 [10,12]

引物名称	引物序列(5'→3')
IAA1 - F	CACCGACCAACATCCAATCTCC
IAA1 - R	TGGACGGAGCTCCATATCTCC
IAA3 - F	AACTGAAACATCCCTCTCTC
IAA3 - R	CCATCTCTCTCAAAGTACTCTCC
IAA17 - F	CAAATCCAGATCAAAACACAGACAA
IAA17 - R	GGTGTTAATTGCTCTTTTTTTTCTTACG
IAA19 - F	GTGGTGACGCTGAGAAGGTT
IAA19 - R	CGTGCTCGAAGCTTCCTTAC
PIN1 - F	CGTGGAGAGGGAAGAGTTTA
PIN1 - R	AACATAGCCATGCTTAGACC
PIN3 - F	CAAGTGGAGATTTTCGGAGGA
PIN3 - R	GGCGTCTTTTGGTCTCTCTCTG
PIN7 - F	TGGGCTCTTGTTGCTTTCA
PIN7 - R	AACCCCAAAGTGAACATTGC
AUX1 - F	GAACCAAGTAATCCATCAAG
AUX1 - R	CAGGAATAGTACTTCAGATC

1.2.6 数据统计与作图 所得统计结果用 Microsoft Excel 软件进行计量,用 Sigmaplot 10.0 软件进行计算和作图。

2 结果与分析

2.1 KEA 多突变体黄化苗出现去黄化现象

试验发现,在黑暗条件下生长 5 d,与野生型(WT)相比,KEA 单突变体的下胚轴长度略长或者没有差别(图 1 - A);而 KEA 多突变体,除了 *kea4/5* 外,*kea4/6* 和 *kea4/5/6* 与单突变体或野生型相比,下胚轴长度较小,主根较长,特别是 *kea4/5/6*,其下胚轴长度比野生型减小了 2/3(图 1 - B、图 1 - C)。另外还发现,除了 *kea4/5*,大多数多突变体 *kea4/6* 和 *kea4/5/6* 子叶已经完全展开,而野生型和单突变体子叶还处于弯钩(hook)状态(图 1 - B)。

为了更进一步了解多突变体黄化苗发育状况,连续测量黄化苗在生长 3 d 至 8 d 的生长情况。如图 2 - A、图 2 - B 所示,从生长 4 d 开始,多突变体就开始表现为根伸长量增加而下胚轴伸长量减少。具体到生长 8 d 时,野生型和双突变 *kea4/5* 表现为典型的黄化现象(etiolated),即较长的下胚轴,较短的主根;而多突变体则表现出明显的去黄化现象(de-etiolated),除了主根和下胚轴外,子叶完全展开,真叶开始冒出,呈现出类似于光照下的表型(图 2 - C)。

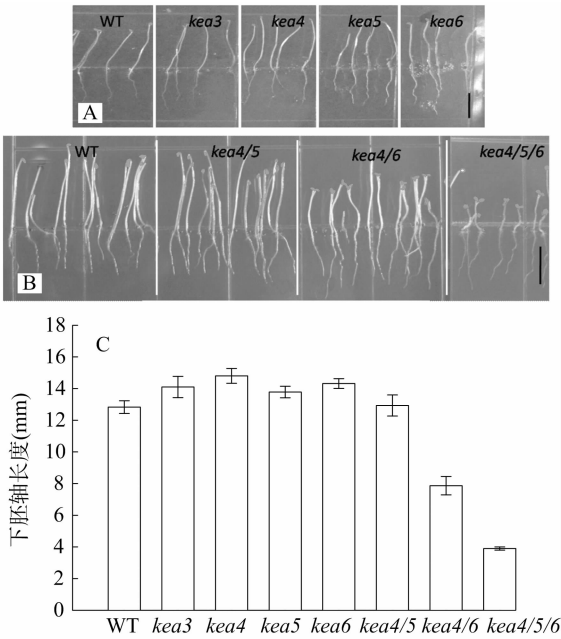


图 1 kea 突变体表型分析

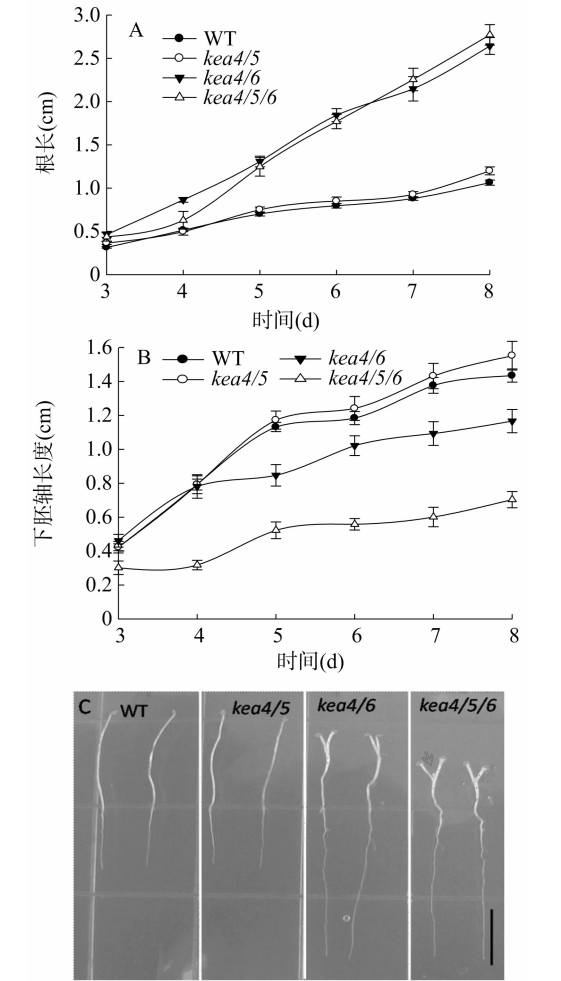


图 2 黄化苗主根长和下胚轴长

2.2 kea 突变体内生长素合成基因表达下调

通过定量 PCR,发现突变体内生长素合成相关基因下调,如 IAA1、IAA3、IAA17,而生长素运输基因 AUX1 或 PIN 等表达

没有发现明显变化(图 3),因此推断,突变体的去黄化表型可能是与生长素的合成有关,而与生长素运输关系不大。

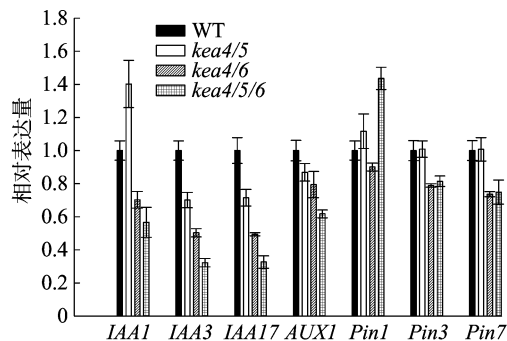


图3 野生型(WT)和 *kea* 突变体黄化苗 qRT-PCR 分析

2.3 生长素类似物 NAA 能够恢复 *kea* 突变体去黄化现象

为了验证 *kea* 突变体去黄化现象是否与生长素合成有关,向培养基添加一系列浓度(0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$)生长素类似物萘乙酸 NAA,如图 4 所示,黑暗条件下,低浓度 NAA(0.01、0.1 $\mu\text{mol/L}$)对野生型和突变体 *kea4/5* 下胚轴生长没有明显的抑制作用,当 NAA 浓度达到 1 $\mu\text{mol/L}$ 时,其下胚轴生长明显受到抑制,抑制率约为 17%、21%。而对于突变体 *kea4/6* 和 *kea4/5/6*,NAA 对其下胚轴生长有明显的促进作用,

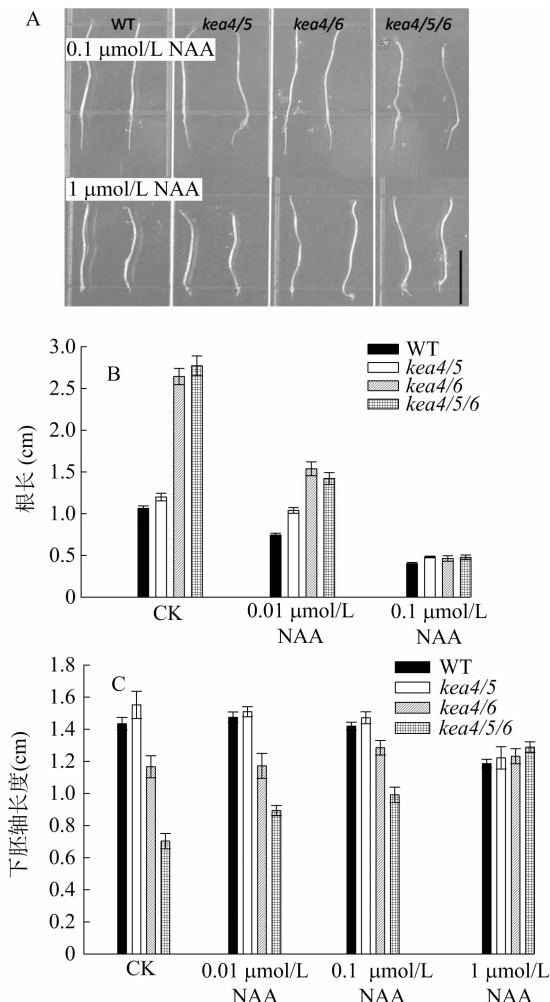


图4 黑暗条件下外源生长素类似物NAA对野生型(WT)和 *kea* 突变体下胚轴和主根长影响

特别是对 *kea4/5/6*,1 $\mu\text{mol/L}$ NAA 使其下胚轴伸长增加约 82%。同时发现,NAA(0.01、0.1 $\mu\text{mol/L}$)对野生型和突变体根系都有明显抑制作用,尤其是当浓度达到 1 $\mu\text{mol/L}$,所试株系的主根伸长均被抑制。

总之,NAA 处理后,去黄化突变体 *kea4/6* 和 *kea4/5/6* 恢复或部分恢复黄化苗特征:较长的下胚轴,较短的主根,子叶保持弯钩状态或部分展开。

3 讨论

在正常生长条件下,不同于单突变,*kea* 多突变体 *kea4/6* 和 *kea4/5/6* 呈现出明显的发育表型:下胚轴较短,主根较长,弯钩消失,子叶完全展开,真叶开始出现,这说明 *KEA* 基因在控制拟南芥生长发育的某些方面发挥重要作用。同样作为双突变体,*kea4/5* 的表型明显不同于 *kea4/6*,这可能是由于 *KEA4* 和 *KEA5* 之间存在功能冗余。生长素在植物地上部和根系发育过程起着重要的调控作用,*kea* 多突变体内生长素合成基因表达变化,暗示 *KEA* 基因突变可能影响了拟南芥体内的生长素相关路径。外源添加一定浓度的生长素类似物 NAA,*kea* 多突变体下胚轴长度能够恢复到野生型的水平。生长素也促进植物根系的伸长生长,但生长素促进根系生长的最适浓度比促进下胚轴生长的最适浓度要低,稍高浓度的生长素就会抑制根系的伸长生长。在本研究所使用的 NAA 浓度下,野生型和突变体主根均被抑制。此外,黑暗条件下萌发的幼苗,顶端弯钩的作用在于,降低其地上部顶端分生组织在冲破泥土接收光照过程中所受的伤害^[13]。如果在地上部冲破泥土前弯钩过早打开,其子叶和分生组织会遭到破坏;此外,黑暗条件下,下胚轴快速生长能够加速地上部冲破泥土的进程。以上结果显示,*KEA* 参与了拟南芥暗形态建成过程。

参考文献:

- [1] Josse E M, Halliday K J. Skotomorphogenesis: the dark side of light signalling[J]. Current Biology, 2008, 18(24): R1144 – R1146.
- [2] Barrero J M, Rodríguez P L, Quesada V, et al. The *ABAI* gene and carotenoid biosynthesis are required for late skotomorphogenic growth in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell and Environment, 2008, 31(2): 227 – 234.
- [3] Alabadi D, Blázquez M A. Integration of light and hormone signals[J]. Plant Signaling & Behavior, 2008, 3(7): 448 – 449.
- [4] Alabadi D, Gallego – Bartolomé J, Orlando L, et al. Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent *Arabidopsis* seedling de-etiolation in darkness[J]. Plant Journal, 2008, 53(2): 324 – 335.
- [5] Wu S H. Gene expression regulation in photomorphogenesis from the perspective of the central dogma[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65: 311 – 333.
- [6] Alabadi D, Blázquez M A. Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(4): 409 – 417.
- [7] Symons G M, Reid J B. Hormone levels and response during de-etiolation in pea[J]. Planta, 2003, 216(3): 422 – 431.
- [8] Rayle D L, Cleland R. Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions[J]. Plant Physiology, 1970, 46(2): 250 – 253.
- [9] Hager A, Debus G, Edel H G, et al. Auxin induces exocytosis and the

霍如雪,刘振宇,杨青,等.桃 *PG* 基因家族的鉴定与分析[J].江苏农业科学,2016,44(6):33-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.008

桃 *PG* 基因家族的鉴定与分析

霍如雪¹,刘振宇²,杨青¹,王光全¹

(1.聊城大学生命科学学院,山东聊城 252000;2.浙江大学农业与生物技术学院,浙江杭州 310058)

摘要:多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase, *PG*) 属于一个大的水解酶家族,它通过降解果胶在植株生长发育过程中的细胞分离事件中发挥重要作用。为深入研究桃 *PG* 基因家族的功能,利用生物信息学方法对桃基因组中 *PG* 基因家族成员进行鉴定,对其基因和蛋白特征、保守结构域、基因进化树分类和基因表达模式等方面进行研究。结果表明,在桃基因组中共鉴定出了 84 个 *PG* 基因,可以聚类成 7 个分支 A ~ G;*PG* 基因在 8 条染色体上呈现不均匀分布,并存在明显的串联重复现象,共发现 16 个串联重复基因簇;利用 UniGene 数据库进行的组织表达分析。说明有 10 个基因在数据库中有表达数据,其中有 6 个基因具有组织表达特异性。

关键词:桃;多聚半乳糖醛酸酶;基因家族;生物信息学

中图分类号: S662.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0033-08

多聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase, *PG*) 是一种细胞壁结合蛋白,具有水解酶性质,广泛存在于细菌、真菌和植物中。*PG* 大约在 52 年以前被鉴定,并被证明参与植株生长发育各个时期中果胶的降解。在降解果胶的诸多酶类中,*PG* 属于其中最大的水解酶家族。目前,已经在拟南芥、水稻、杨树、白菜、黄瓜、甜瓜、卷柏、小立碗藓等物种中对其基因家族进行了鉴定,并在进化上进行了分析^[1-8]。*PG* 从性质上主要分成 3 种,即内切 *PG*、外切 *PG*、鼠李糖 *PG*。根据不同的分类标准,不同研究者将 *PG* 聚类为不同的亚类。拟南芥 A ~ F 等 6 类中的 *PG* 基因在表达模式上存在差异,有些亚类的成员趋向于在营养组织中表达,而有些则趋向于在生殖器官中表达^[8]。不同亚类的 *PG* 可能具有独特的生物学功能。Park 等认为, A 类和 B 类含有陆生植物的 *PG* 基因, E 类含有从藻类到开花植物的 *PG* 基因,而 C、D、F 类则只含有开花植物的 *PG* 基因^[8]。对水稻、杨树、苔藓、小立碗藓和拟南芥 5 个物种中的 225 个 *PG* 的研究表明, A 类和 B 类为内切 *PG*, C 类和 D 类为外切 *PG*, E 类为鼠李糖 *PG*, 而 F 类的成员不能被归类于不同性质 *PG* 中的任何一种^[6]。

根据 Hadfield 等对植物 *PG* 功能的分类, *PG* 可以分为三

大类,与果实成熟相关的 *PG*、与器官脱落相关的 *PG*、与花粉发育相关的 *PG*^[9]。研究表明, cp*PG1* 和木瓜果肉软化有关, cp*PG1* 在木瓜中的过表达能够促进果肉的软化^[10]。Roongsatham 等在油棕果实成熟和脱落的过程中鉴定出 14 个 *PG* 基因,这些基因均在果实成熟时基部的脱落区表达^[11]。RD-*PG1* 是油菜中的一个 *PG* 基因,主要在果荚和花药的开裂区表达,并且在花器官的脱落区、花粉管生长过程中的花柱组织、茎和花梗的节点中表达,表明 RD*PG1* 可能与器官脱落有关^[12]。在拟南芥花粉发育过程中,花粉母细胞减数分裂形成四分体小孢子,研究发现, *PG* 基因 *QRT3* 参与了四分体小孢子的分离。在花粉发育的早期, *QRT3* 由绒毡层分泌降解四分体小孢子周围的花粉母细胞壁,从而使得四个小孢子能够正常分离^[13]。

桃 (*Prunus persica*) 是蔷薇科 (*Rosaceae*) 李属 (*Prunus*) 植物,是世界上广泛栽培的落叶果树之一^[14]。与蔷薇科木本植物如李和酸樱桃等多倍体果树相比,桃是二倍体 ($n=8$),具有相对较小的基因组 (230 Mbp),而且具有相对短的童期 (2~3 年),这些独特的优点使得桃成为李属及其他蔷薇科植物的模式基因组物种^[15]。桃基因组测序的完成和序列释放^[16]使得在全基因组水平上对桃的重要功能基因的发掘比较和功能研究成为可能。本研究利用生物信息学方法对桃 *PG* 基因家族成员进行了鉴定和基因组注释,分析了其基因结构和保守域,以期为进一步对桃 *PG* 家族基因的功能研究提供基础信息并最终在分子水平上对桃品种的改良提供明确的候选基因。

收稿日期:2016-02-21

基金项目:山东省科技攻关项目(2009GG10031)。

作者简介:霍如雪(1988—),女,山东临沂人,硕士研究生,主要从事系统与资源植物学研究。E-mail:huoruxue@126.com。

通信作者:王光全,教授,主要从事果树学研究。E-mail:wqg@lcu.edu.cn。

- rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H^+ -ATPase[J]. *Planta*, 1991, 185(4): 527-537.
- [10] Takahashi K, Hayashi K I, Kinoshita T. Auxin activates the plasma membrane H^+ -ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(2): 632-641.
- [11] Pilot G, Gaymard F, Mouline K, et al. Regulated expression of *Arabidopsis* shaker K^+ channel genes involved in K^+ uptake and distribution

- in the plant [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51(5): 773-787.
- [12] Lilley J L, Gee C W, Sairanen I A, et al. An endogenous carbon-sensing pathway triggers increased auxin flux and hypocotyl elongation [J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(4): 2261-2270.
- [13] Mazzella M A, Casal J J, Muschietti J P, et al. Hormonal networks involved in apical hook development in darkness and their response to light [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5(1): 52-58.