

王 岩,张 翔,安丽君.拟南芥表皮毛突变体 *abt2* 基因克隆及功能研究[J].江苏农业科学,2018,46(15):23-27.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.006

# 拟南芥表皮毛突变体 *abt2* 基因克隆及功能研究

王 岩,张 翔,安丽君

(旱区逆境生物学国家重点实验室/西北农林科技大学生命科学院,陕西杨凌 712100)

**摘要:**植物表皮毛广泛地分布在陆生植物地上部分,是植物表皮组织的一种特化结构,具有多种重要的生物学功能。通过甲基磺酸乙酯(ethylmethanesulphonate,EMS)诱变获得了 1 个莲座叶表皮毛分支明显增加的突变体,将其命名为 aberrant trichome 2 (*abt2*)。遗传分析结果表明,*abt2* 突变体是由细胞核单基因控制的隐性突变。图位克隆和遗传互作结果显示,*abt2* 的表型是由 *KAKTUS* (*KAK*) 基因第 +6 881 处核苷酸发生突变所导致的,这为进一步研究植物表皮毛的发育调控机制提供新的遗传材料。

**关键词:**拟南芥;表皮毛发育;*KAK*;核内复制;分支;图位克隆;遗传;调控机制

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)15-0023-04

表皮毛是植物地上部组织表皮向外突出形成的单细胞或多细胞结构<sup>[1-2]</sup>。表皮毛作为植物与环境接触的最外层屏障,具有多种生理、生态功能。表皮毛的存在能抵御植食性昆虫和病原菌对植物体的危害<sup>[3]</sup>;也可以减少植株热量的散失,提高植物对冷害的抗性<sup>[4-5]</sup>;同时也能减少植物对太阳辐射的吸收,保护组织免受紫外线和极端温度的伤害<sup>[6]</sup>;增强叶片对空气中水蒸气的储藏能力,提高植物的抗旱性等<sup>[7]</sup>,以及吸收重金属元素,提高植物对土壤重金属污染的防御<sup>[8-9]</sup>。另外,表皮毛作为一种特化的表皮细胞,也是研究细胞命运决定、细胞周期调控、细胞极性生长以及细胞成熟的优良模式系统<sup>[10]</sup>。

在模式植物拟南芥中,表皮毛存在于除下胚轴和子叶外的几乎所有气生器官上,如莲座叶、主茎、茎生叶以及花瓣等<sup>[11]</sup>。拟南芥莲座叶上的表皮毛为典型的单细胞结构,形态上通常为 3~4 个分支,其发育过程受到多种因子的调控<sup>[12]</sup>。其中 *KAK* 基因编码 1 个 HECT 泛素蛋白连接酶,抑制表皮毛细胞从有丝分裂向核内复制过程的转变,*KAK* 基因功能缺失导致细胞核 DNA 含量升高,表皮毛分支数增加<sup>[13]</sup>。

本试验在以拟南芥表皮毛突变体 *gl2-3* 为背景的 EMS 二次诱变库中,筛选获得了 1 个莲座叶表皮毛分支数明显增加的突变体 *abt2*。通过回交并观察后代的表皮毛表型,发现 *abt2* 是细胞核单基因控制的隐性突变体;图位克隆以及杂交试验证实突变基因 *abt2* 是 *KAK* 基因的一个新等位基因,*abt2* 的突变表型是由于 *KAK* 基因第 +6 881 bp 处核苷酸发生突变所导致的。

## 1 材料与方法

收稿日期:2017-03-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:31470290);中央高校基本科研业务费(编号:2014YB036、Z109021537)。

作者简介:王 岩(1990—),女,山东泰安人,硕士研究生,从事拟南芥表皮毛分化发育调控机理研究。E-mail:1209588234@qq.com。

通信作者:安丽君,博士,副教授,从事植物分子遗传与发育生物学研究。E-mail:lijunan@nwsuaf.edu.cn。

### 1.1 试验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型 *Columbia* (*Col-0*)、*Landsberg erecta* (*Ler*)、*gl2-3* (*SALK\_039825*) 突变体纯合体、*KAK* 基因 T-DNA 插入功能缺失突变体 *SALK\_037636* 由笔者所在实验室保存。*gl2-3* 背景的 EMS 突变体库由笔者所在实验室创制保存。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 植物的培养与候选突变体筛选** 将 *gl2-3* 背景的 EMS 诱变体库按库种植在充分吸水后的进口品氏基质泥炭土(pindstrup substrate peat moss)上,4℃黑暗处理 3 d 后移入植物培养间,培养温度为(22±2)℃,相对湿度为 70%,24 h 持续光照,光照度为 100 μmol/(m<sup>2</sup>·s)。待植株生长 2 周后观察莲座叶表皮毛发育状况,筛选表皮毛发育异常的植株作为候选突变体。

**1.2.2 突变体遗传背景纯化及遗传分析** 先将候选突变体进行自交并观察后代表型,选取突变表型明显且能稳定遗传的候选突变体作为目标突变体;再以拟南芥 *Col-0* 为母本,目标突变体为父本进行回交,观察 F<sub>2</sub> 代群体中出现的表型并统计分离比,判断突变基因的显隐性以及控制突变表型的基因数目;另外,通过正反交试验判断突变表型的遗传方式。

**1.2.3 图位克隆** 将确定的目标突变体与拟南芥 *Ler* 生态型进行杂交,在 F<sub>2</sub> 代植株中挑选具有突变体表型的植株作为图位克隆群体。首先提取 95 株作图群体中植株的基因组 DNA,构建 DNA 池(bulk),利用已经公布的均匀覆盖拟南芥 5 条染色体的 27 对分子标记为引物进行 PCR,通过统计突变位点与分子标记的连锁情况,判断突变位点所在的染色体区间;确定突变位点所在区间及与其连锁的侧翼分子标记后,扩大作图群体,设计新分子标记进行精细定位。

**1.2.4 候选基因的确定** 根据精细定位的区间,在拟南芥基因组数据库(www.arabidopsis.org)中下载该区间内所覆盖的全部基因,查阅相关资料,筛选出候选突变基因;然后针对这些候选突变基因设计引物进行 PCR 扩增并测序,最终确定出突变基因。

**1.2.5 *abt2* 与 *SALK\_037636* 突变体之间的遗传互作分析**

将 *abt2* 与 *SALK\_037636* 杂交,观察 F<sub>1</sub> 代植株的表型,验证 KAK 基因与 *abt2* 基因之间的等位性。

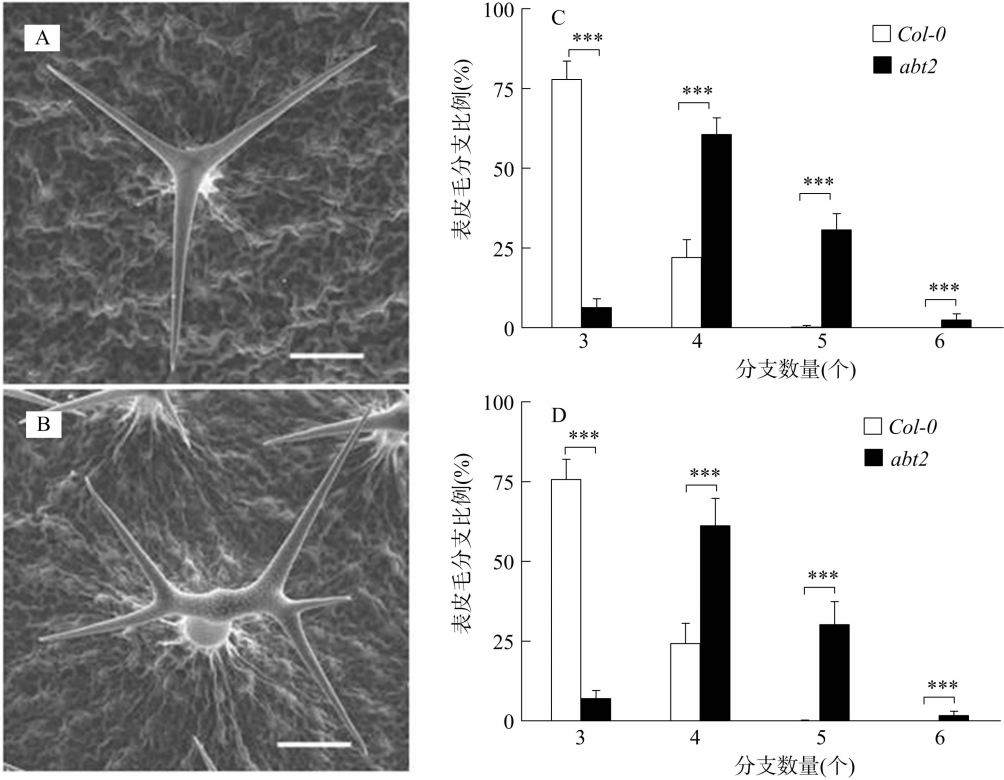
1.2.6 表皮毛分支表型分析 将 *Col-0*、*abt2*、*SALK\_037636* 及 *abt2* × *SALK\_037636* F<sub>1</sub> 代植株培养 3 周后,观察并统计第 3、第 4 张莲座叶上具有不同分支数的表皮毛数量,并计算各种类型表皮毛所占的比例。每种基因型植株至少统计 20 株,利用 GraphPad Prism 6 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 *abt2* 突变体的获得和表型分析

为获得参与调控拟南芥表皮毛发育的新基因,构建了以植物表皮毛发育的关键调控因子 *GL2* 功能缺失突变体 *gl2-3* 为背景的 EMS 诱变库,并进行了大规模的遗传筛选。在此过

程中获得了 1 个莲座叶表皮毛分支数明显增加的突变体,将其命名为 *abt2* (aberrant trichome 2)。通过统计第 3、第 4 张莲座叶上不同类型的表皮毛数量,发现与 *Col-0* 相比,*abt2* 突变体中表皮毛分支数显著增加。在 *Col-0* 中,表皮毛主要以 3 个分支为主,约占表皮毛总数的 77.83% (第 3 张莲座叶)、75.69% (第 4 张莲座叶),仅存在极少数 5 个分支的表皮毛;而在 *abt2* 突变体中,表皮毛主要以 4、5 个分支为主,4 个分支的表皮毛约占叶片表皮毛总数的 60.55% (第 3 张莲座叶)、61.19% (第 4 张莲座叶);5 个分支表皮毛约占叶片表皮毛总数的 30.69% (第 3 张莲座叶)、30.14% (第 4 张莲座叶),并且能观察到一定数量的 6 个分支的表皮毛 (第 3 张莲座叶上为 2.42%,第 4 张莲座叶上为 1.66%) (图 1)。



A—*Col-0*, Bar=60 μm; B—*abt2* 突变体, Bar=60 μm; C—不同基因型植株第 3 张莲座叶上的表皮毛分支比例; D—不同基因型植株第 4 张莲座叶表皮毛分支比例。\*\*\*表示 *P* < 0.001

图1 *Col-0* 及 *abt2* 突变体莲座叶表皮毛发育表型分析

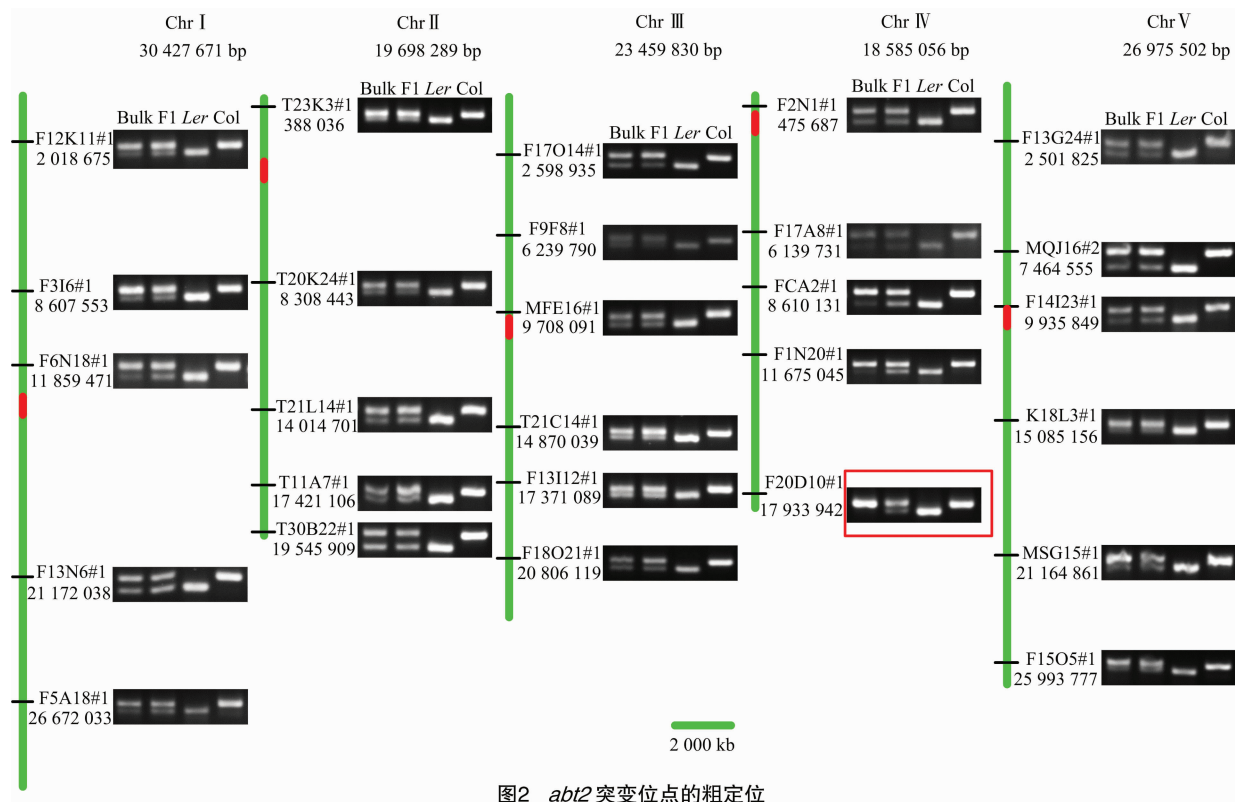
2.2 *abt2* 突变基因的定位

2.2.1 *abt2* 突变位点的遗传分析 由于 *abt2* 突变体表皮毛发育缺陷表型非常明显,所以期望通过图位克隆分离突变基因,以进一步研究其调控表皮毛发育的机制。在进行图位克隆之前,首先对 *abt2* 突变位点进行遗传分析。通过将 *Col-0* 与 *abt2* 突变体进行正反交并观察表皮毛表型,发现所获得的 F<sub>1</sub> 代植株均表现野生型表皮毛表型,表明 *abt2* 突变体是细胞核基因控制的隐性突变体;F<sub>2</sub> 代植株中野生型表型与突变体表型个体的分离比约为 3 : 1,符合孟德尔隐性单基因遗传定律,从而说明 *abt2* 突变体的发育表型是由单基因控制的。

2.2.2 *abt2* 突变位点的粗定位 在确定了 *abt2* 突变体的遗传特性之后,对 *abt2* 的突变位点进行粗定位。首先将 *Ler* 生态型植株与 *abt2* 突变体进行杂交,在 F<sub>2</sub> 代中挑选具有 *abt2*

表型的植株作为作图群体,利用实验室已有的均匀分布在拟南芥 5 条染色体的 27 个分子标记 (图 2) 和由 95 株作图群体植株的基因组 DNA 构成的 DNA 池进行 PCR 扩增,根据与突变位点连锁的分子标记所扩增出条带的遗传背景偏向突变体来源的 *Col-0*,而用于杂交的另一亲本 *Ler* 条带不能扩增或扩增量弱于对照的原理,发现突变位点与第 4 条染色体上分子标记 F20D10#1 (17933942) 连锁较为紧密,说明突变位点可能位于该分子标记附近 (图 2)。

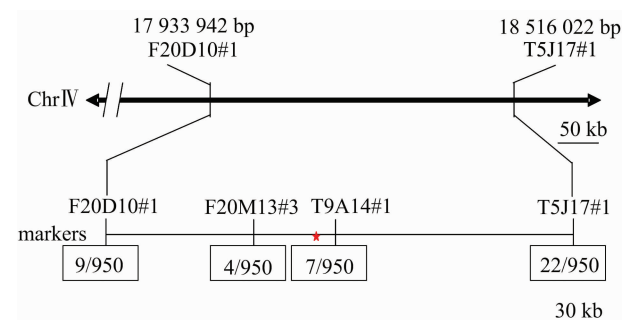
2.2.3 突变位点的精细定位 确定突变位点与染色体的连锁关系后,为了进一步确定突变位点在染色体上所在的区间,以 95 个突变体 DNA 为模板,以 F20D10#1 (17933942) 及在 F20D10#1 下方增加的新的分子标记 T5J17#1 (18516022) 为引物进行 PCR 扩增,结果 (表 1) 显示突变位点位于分子标记

图2 *abt2* 突变位点的粗定位

F20D10#1 和 T5J17#1 之间, 所以将分子标记 F20D10#1 和 T5J17#1 作为后续定位的侧翼分子标记 (flanking marker) (图3)。接着通过在 Flanking marker 区间内增加新的分子标记对 *abt2* 突变位点进行精细定位。利用 1 个新的 dCAPS 引物 F20M13#3 (18010126) 和 1 个新的插入/删除 (In/Del) 分子标记 T9A14#1 (18053432) (表1) 对 F2 作图群体中 475 株突变体表型植株的基因型进行分析, 最终将突变基因定位在分子标记 F20M13#3 和 T9A14#1 的区间内, 该区间的物理距离为 43 306 bp (图3)。

表1 精细定位所用分子标记

标记名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
F20D10#1	CTCAATGACTTGCTCTTGAC	GGTACTTAATTGACAGGGTG
F20M13#3	GAAGCTGATGCGTGCAAGAG	ACATTGATGTTTTTGCATG
T9A14#1	ATGTTTGACAAAGAAAGAGC	CATTACGGTTAATACCAAGG
T5J17#1	TTCCTACGAGGTTCGATCCT	ACGGGACGAGTTCGAGG

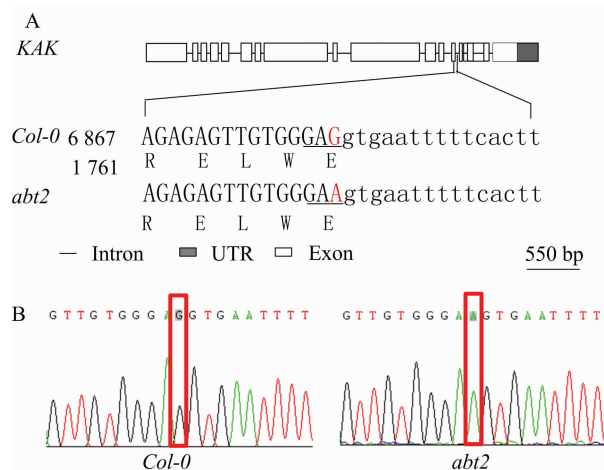


分子标记下方方框内数字表示染色体交换个数;

星号表示 *abt2* 突变基因所在位置

图3 *abt2* 突变位点的精细定位

2.2.4 候选基因的筛选与确定 确定了 *abt2* 突变位点所在的区间后, 利用拟南芥基因组数据库对该区间内所覆盖的全部基因进行分析, 重点关注与表皮毛发育相关的基因。通过查阅文献发现, 在该区间内基因 *At4g38600* 被报道与表皮毛发育有关。 *At4g38600* 基因也被称为 *KAKTUS/Ubiquitin Protein Ligase3 (KAK/UPL3)*, 编码 E3 泛素蛋白连接酶, *KAK* 基因的功能缺失会导致拟南芥莲座叶上的表皮毛分支数显著增加, 与 *abt2* 突变体的表皮毛发育缺陷表型相似<sup>[14-15]</sup>。因此推测 *abt2* 突变体的表型很可能是由于 *KAK* 基因的功能缺失所导致的。为了验证 *abt2* 是否为 *KAK* 的新等位基因, 首先对 *abt2* 突变体背景中的 *KAK* 基因进行测序, 发现在 *abt2* 突变体中 *KAK* 基因的第 6 881 bp 处发生了单碱基突变, 由鸟嘌呤 (G) 突变为腺嘌呤 (A) (图4), 这表明 *abt2* 突变表型的产生



红色字体表示突变位点

图4 *abt2* 突变体中 *KAK* 基因的克隆

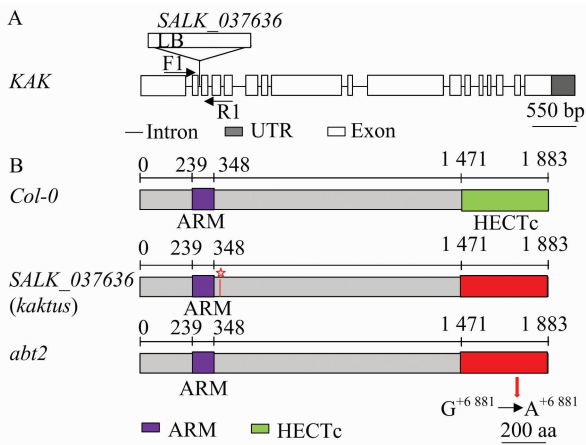
很可能是由 *KAK* 基因的单碱基突变造成的, *KAK* 可能就是 *abt2* 的突变基因。

2.2.5 *abt2* 和 *KAK* 基因间的遗传互作分析 为了进一步确定 *KAK* 基因的突变是造成 *abt2* 突变表型产生的原因, 利用 *KAK* 基因的功能缺失突变体 *SALK\_037636* 对 *abt2* 和 *KAK* 基因之间的等位性进行分析。 *SALK\_037636* 的突变表型是由于在 *KAK* 基因的第 +1 241 bp 处插入了 T-DNA, 导致 *KAK* 的表达量降低所造成的 (图 5)。

将 *abt2* 与 *SALK\_037636* 进行杂交并获得了 F<sub>1</sub> 代植株, 通过观察 F<sub>1</sub> 代植株第 3、第 4 张莲座叶上的表皮毛发育表型, 发现其与 *abt2* 和 *SALK\_037636* 的表型相似, 表皮毛分支数明显增加 (图 6), 这表明 *abt2* 基因突变与 *KAK* 基因突变不能互补彼此的突变表型, *abt2* 的突变基因就是 *KAK*, *abt2* 是 *KAK* 的新等位基因。

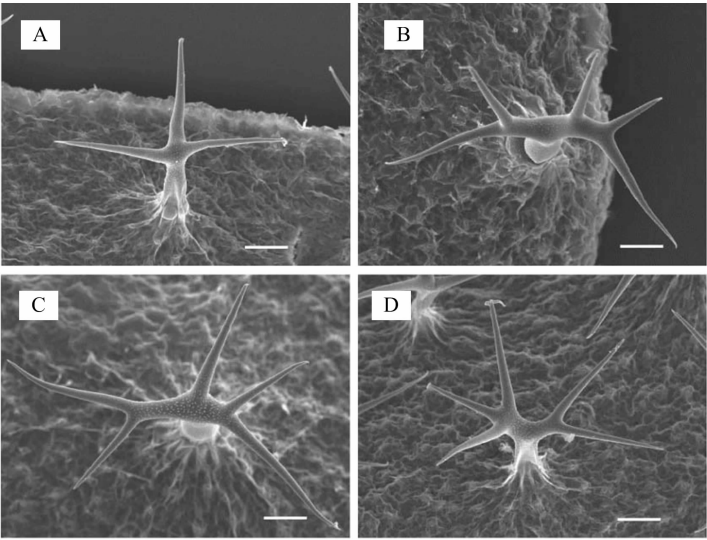
3 讨论与结论

特色遗传材料的获得是研究基因功能的强有力手段。为



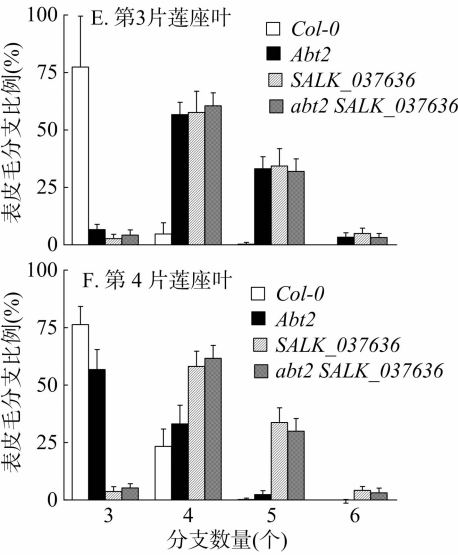
A—*KAK* 基因结构模式图及 *SALK\_037636* 突变体中 T-DNA 插入位点示意图; B—*Col-0*、*SALK\_037636*、*abt2* 背景中推测的 *KAK* 蛋白结构模式图及其结构域, 红色星号表示 *SALK\_037636* 中 T-DNA 插入位点, 红色箭头表示 *abt2* 中碱基突变位点

图5 *abt2* 和 *SALK\_037636* 突变体分析



A—*Col-0*; B—*abt2*; C—*SALK\_037636*; D—*abt2 SALK\_037636* F<sub>1</sub> (Bar = 60 μm); E—第 3 张莲座叶表皮毛分支比例; F—第 4 张莲座叶表皮毛分支比例

图6 突变体表皮毛扫描电镜图及表皮毛分支统计分析



了获得新的参与调控植物表皮毛发育的新因子, 本试验利用 EMS 高效诱变拟南芥 *gl2-3* 所建立的二次突变体库进行了大规模的遗传筛选。在此过程中获得了 1 个莲座叶上表皮毛分支数明显增加的突变体, 并将其命名为 *abt2*。通过图位克隆及遗传互作分析, 表明 *abt2* 的突变表型是由 *KAK* 基因的 +6 881 bp 处发生由鸟嘌呤到腺嘌呤的单碱基突变所造成的, *abt2* 基因是 *KAK* 基因的一个新等位基因。同时也发现, 尽管在 *abt2* 突变体背景中 *KAK* 基因发生了单核苷酸突变, 但是该突变并未造成所编码的相关氨基酸发生改变, 因此为无义突变。该无义突变如何造成了 *abt2* 突变体表现出了显著的表皮毛发育缺陷表型将是下一步研究的重点。另外, *KAK* 是表皮毛核内复制的抑制基因, *KAK* 功能缺失突变体的莲座叶表皮毛呈现过度分支的表型, 并伴随表皮毛细胞核 DNA 含量增加<sup>[16]</sup>, 本试验所获得的 *abt2* 突变体为进一步研究 *KAK* 基因与表皮毛调控之间的关系提供了新的遗传材料, 也为深入研

究 *KAK* 参与调控植物表皮毛发育的可能机制奠定了基础。

参考文献:

[1] Johnson H B. Plant pubescence: an ecological perspective [J]. Botanical Review, 1975, 41 (3): 233 - 258.  
[2] Yang C X, Li H X, Zhang J H, et al. A regulatory gene induces trichome formation and embryo lethality in tomato [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108 (29): 11836 - 11841.  
[3] Loughner R, Goldman K, Loeb G, et al. Influence of leaf trichomes on predatory mite (*Typhlodromus pyri*) abundance in grape varieties [J]. Experimental and Applied Acarology, 2008, 45 (3/4): 111 - 122.  
[4] Karabourniotis G, Papadopoulos K, Papamarkou M, et al. Ultraviolet - B radiation absorbing capacity of leaf hairs [J]. Physiologia Plantarum, 1992, 86 (3): 414 - 418.  
[5] Huttunen P, Karkkainen K, Loe G, et al. Leaf trichome production and

孟 丹,孟庆玲,乔 军,等.牛源 MRSA 新疆流行株毒力基因检测及 Agr 分子分型研究[J].江苏农业科学,2018,46(15):27-30.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.007

# 牛源 MRSA 新疆流行株毒力基因检测 及 Agr 分子分型研究

孟 丹,孟庆玲,乔 军,蔡扩军,于伟伟,伍晔晖,才学鹏,陈创夫

(石河子大学动物科技学院,新疆石河子 832003)

**摘要:**为了解新疆地区引起奶牛乳房炎和子宫内膜炎的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)流行株的分子特征及毒力基因分布状况,对采集的 221 份样品进行金黄色葡萄球菌的分离,采用生化试验和分子生物学方法进行了鉴定,通过药敏试验对 MRSA 进行判定;应用多重 PCR 方法对 MRSA 新疆流行株进行 Agr 基因分型研究,并检测了 MRSA 流行株的部分毒力基因。结果表明,在新疆地区 71 株金黄色葡萄球菌临床分离株中共检出 13 株 MRSA,检出率为 18.3%;13 株 MRSA 检出 *hld*、*lukED* 和 *tst* 这 3 种毒力基因,其中 3 株检出 *hld*,10 株检出 *lukED*,13 株检出 *tst*;不同地区来源的 13 株 MRSA 均检出 Agr I 和 Agr IV 2 种 Agr 型。本研究表明新疆地区 MRSA 流行株的毒力基因以 *lukED* 和 *tst* 为主,Agr 分型以 Agr I 和 Agr IV 基因型为主。

**关键词:**耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA);毒力基因;Agr 分型

**中图分类号:**S855.1<sup>+</sup>1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)15-0027-04

金黄色葡萄球菌是一种感染人畜最为常见的病原菌<sup>[1]</sup>。目前,人类医源感染的病原菌多为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*,MRSA),会引起深

收稿日期:2017-03-06

基金项目:新疆生产建设兵团中青年科技创新领军人才计划(编号:2016BC001);国家“十三五”重点研发计划子课题(编号:2016YFD0500900);新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目(编号:XJGR12016040);乌鲁木齐市科学技术局现代服务业促进计划(编号:F141310002)。

作者简介:孟 丹(1990—),女,安徽宿州人,硕士,主要从事病原分子生物学研究。E-mail:2393802294@qq.com。

通信作者:乔 军,教授,主要从事畜禽病原分子生物学研究。E-mail:qj710625@163.com。

responses to defoliation and drought in *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae)[J]. *Annales Botanici Fennici*,2010,47(3):199-207.

[6] Levin D A. The role of trichomes in plant defence[J]. *The Quarterly Review of Biology*,1973,48(1):3-15.

[7] Saltveit M E, Hepler P K. Effect of heat shock on the chilling sensitivity of trichomes and petioles of African violet (*Saintpaulia ionantha*)[J]. *Physiologia Plantarum*,2004,121(1):35-43.

[8] Davidian J C, Grill D, de Kok L, et al. Sulfur transport and assimilation in plants: regulation, interaction, signaling[M]. Leiden: Backhuys Publishers,2003:1933-1949.

[9] Li W X, Chen T B, Chen Y, et al. Role of trichome of *Pteris vittata* L. in arsenic hyperaccumulation[J]. *Science in China Series C - life Sciences*,2005,48(2):148-154.

[10] 高 英,郭建强,赵金凤.拟南芥表皮毛发育的分子机制[J]. *植物学报*,2011,46(1):119-127.

[11] Schellmann S, Hülkamp M. Epidermal differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a model system [J]. *International Journal of*

部感染以及皮肤感染,具有较高的发病率和病死率<sup>[2]</sup>。动物源特别是牛源 MRSA 感染易引起奶牛严重的乳房炎和子宫内膜炎,给奶牛养殖业带来严重的经济损失。美国疾病预防控制中心报告,在细菌感染引起的疾病中,由金黄色葡萄球菌引起的感染占第 2 位,仅次于大肠杆菌<sup>[3]</sup>。此外,一些致病性金黄色葡萄球菌能够产生多种致病因子,如 *lukF*、*lukS*、*hla*、*hly* 等,这些致病因子可诱发炎症,并引起组织损伤,加剧了临床治疗难度<sup>[4]</sup>。

金黄色葡萄球菌能够分泌多种毒素和酶,这些毒力蛋白的表达由 RNA III 调控,它是 Agr (accessory gene regulator) 位点转录的一个中心多向调节因子。目前,认为 RNA III 至少是由 2 个双组分系统激活,这 2 个双组分系统一个是由 agr 位

Developmental Biology,2005,49(5/6):579-584.

[12] Yang C, Ye Z. Trichomes as models for studying plant cell differentiation[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*,2013,70(11):1937-1948.

[13] Perazza D, Herzog M, Hülkamp M, et al. Trichome cell growth in *Arabidopsis thaliana* can be derepressed by mutations in at least five genes[J]. *Genetics*,1999,152(1):461-476.

[14] Bensussan M, Lefebvre V, Ducamp A, et al. Suppression of dwarf and irregular xylem phenotypes generates low - acetylated biomass lines in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*,2015,168(2):452-463.

[15] Downes B P, Stupar R M, Gingerich D J, et al. The HECT ubiquitin - protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: UPL3 has a specific role in trichome development[J]. *Plant Journal*,2003,35(6):729-742.

[16] El Refy A, Perazza D, Zekraoui L, et al. The *Arabidopsis* KAKTUS gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles[J]. *Molecular Genetics and Genomics*,2004,270(5):403-414.