

拟南芥子叶发育调节子SDM4的分离与鉴定

王潇楠, 田燕, 朱自亿, 赵翔*, 张骁*

河南大学生命科学学院/棉花生物学国家重点实验室/植物逆境生物学重点实验室, 河南开封475004

摘要: 拟南芥种子储存的能源物质维持萌发后幼苗从异养到光合自养过渡起关键作用。目前关于种子萌发和幼苗建成时期储存物质的利用机理仍不清楚。本文通过EMS处理诱变拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子, 在无蔗糖培养基中筛选无法完成幼苗建成的疑似突变体, 并将其转移到含蔗糖的培养基上进行恢复培养3 d移到营养土中培养, 观察这些幼苗生长发育过程中出现的表型, 并通过单株收种子进行表型遗传稳定验证。我们成功筛选并克隆到基因SDM4 (*sucrose dependent mutant 4*), 测序证明是SCO1的等位基因突变。SDM4/SCO1基因的突变可导致拟南芥在无蔗糖培养基出现子叶白化和根生长抑制表型。在sdm4突变体中超表达SDM4/SCO1基因明显恢复突变体子叶变绿和根生长表型, 表明SDM4/SCO1调节拟南芥种子萌发后子叶发育和幼苗根生长。

关键词: 拟南芥; 子叶白化; 根生长; 图位克隆

蔗糖是植物的主要有机碳源和能源物质, 是从光合组织输送到库器官中的主要糖成分(Rolland等2006; Geiger 2011)。早期多数研究集中在提高蔗糖输出和碳利用能力上, 以使光合作用和作物产量最大化(Ainsworth和Bush 2011)。目前越来越多的证据显示, 蔗糖还能作为信号分子调控植物的基因表达和生长发育, 在植物的整个生长周期, 比如种子萌发、胚胎发育、幼苗生根、根叶分化、抽薹分蘖、逆境响应等过程都存在糖感知以及糖信号转导过程(Smeekens等2010; 贾涛等2018; Graham 2018)。

蔗糖已被证明可以通过控制分生组织的维持来调节特定的发育过程和转变(Wahl等2010; Skylar等2011)。例如, 拟南芥细胞分裂素受体突变体的根分生组织的大小可以通过在生长培养基中加入蔗糖来部分恢复(Skylar等2011)。同样地, FANTASTIC FOUR基因的超表达会抑制根分生组织的活性, 这可以通过外源性蔗糖得到补偿(Wahl等2010)。尽管蔗糖能够缓解被抑制的根分生组织活动的机制尚不清楚, 但有一种可能性是蔗糖促进细胞分裂。高等植物细胞周期的调控依赖于细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent protein kinases, CDKs)和细胞周期蛋白的活性。CDK-细胞周期蛋白复合物控制细胞周期不同阶段之间的过渡, 关键的检查点被假定在G1到S和G2到M转换之间运行(Van Leene等2010)。在无蔗糖培养基生长的活跃分裂细胞导致在细胞周期G1期的大多数细胞生长受抑制, 蔗糖的再供给会诱导处于G1期细胞进

入S期并恢复细胞分裂生长(Van't Hof和Rost 1972)。蔗糖通过控制拟南芥中D类细胞周期蛋白CYCD (cyclin D)基因的表达, 从而推动了细胞周期的进程(Riou-Khamlichi等2000)。

植物种子萌发后需要从利用自身储存能量的异养生长向光合自养生长转变(Xiong和Sheen 2012; Kircher和Schopfer 2012), 从种子内储存能量的代谢和发育程序转变为光合作用驱动的代谢途径和信号通路, 该过程受糖调控(Kircher和Schopfer 2012; 满欣雨等2018; Bewley等2013)。拟南芥种子大约30 μ g中贮存的原料能供养不超过4~5 d (25°C)的种子萌发过程。在土中种子萌发后, 贮存的营养物质最先被用于苗端下胚轴的伸长, 而根的生长处于被抑制状态。因此, 研究萌发后幼苗根生长, 在一定程度反映了幼苗发育中糖的供给和利用情况。种子萌发是从吸胀开始到胚根突破周围结构, 胚根伸出的过程(Bewley等2013)。拟南芥的根系由主根和侧根组成, 其主根生长和侧根密度与其内源蔗糖浓度呈现正相关(Kircher和Schopfer 2012)。拟南芥幼苗的形态建成会被高浓度葡萄糖抑制, 这一过程受蔗糖非发酵相关蛋白激酶SnRK1复合体活性调节(Cho等2012)。Stokes等(2013)通过研

收稿 2018-05-29 修定 2018-11-21

资助 河南省基础与前沿技术研究的计划(142300413225)、河南省高校科技创新人才支持计划(17HASTIT035)和国家自然科学基金项目(31670289和31570294)。

* 共同通讯作者: 张骁(xzhang@henu.edu.cn); 赵翔(xzhao@henu.edu.cn)

究发现,蔗糖通过诱导生长素运输和信号转导从而影响拟南芥下胚轴伸长和幼苗根生长。Mason等(2014)研究表明,植物顶端优势的早期调节者是糖,并不依赖生长素。拟南芥中,蔗糖通过光敏色素结合因子途径来提高生长素水平,光敏色素结合因子是一种转录因子家族,其成员是糖调节生长素合成的关键信号分子(Sairanen等2012; Lilley等2012)。因此,蔗糖对植物种子萌发以及植株生长至关重要,决定了植物到达自养状态这一过程能否顺利转变,然而目前关于种子萌发和幼苗建成时期储存物质的利用机理仍不清楚。我们筛选的突变体有利于更好地研究这一机制。

1 材料与方法

1.1 植物材料的诱变与培养

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型Columbia-0 (WT)和拟南芥突变体*P2SA1*、*phot*和*phot2*作为对照。其中*P2SA1*为本课题组前期获得的一株在无糖MS培养基上表现根短表型的突变体;*phot1*和*phot1phot2*突变体参与植物光信号转导,在无糖MS培养基上可正常生长。前期用于图位克隆的是拟南芥野生型Landsberg (Ler)。

称取1.5 g拟南芥Columbia-0种子进行EMS诱变,大约有70 000粒种子,用双蒸水浸泡6~8 h,放入含有0.3% (V/V)甲基磺乙酯(EMS)的100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 7.5)中,封口后再水浴(25°C)振荡器上振荡8 h。用双蒸水漂洗种子10~15次,每次10 min。将洗净的拟南芥种子(M_1)放在滤纸上进行干燥处理,然后点种于0.6% MS培养基,置于4°C春化3 d,在22°C、光照周期为16 h光照/8 h黑暗、光照强度为90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的温室中培养2周,再均匀移种于混有蛭石的营养土中(蛭石与营养土的体积比为3:1)。每株周缘间隔大约1 cm。在温室(18~22°C,光照强度为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光照周期为16 h光照/8 h黑暗,相对湿度为65%)中继续培养。大约8周后,用直径为0.5 mm的小孔筛子对成熟的种子(M_2)进行采收,干燥2周后备用。

1.2 突变体的筛选

将EMS诱变过的 M_1 代种子点种于0.6% MS培养基上,4°C春化3 d,放于光照强度为90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照周期为16 h光照/8 h黑暗、22°C的温室培养,

待长出2~4片子叶时移入营养土中培养。待植株成熟,收种子为 M_2 。经过至少1周的后熟过程,将拟南芥 M_2 种子点在不含蔗糖的1.0% MS培养基,4°C春化3 d,放入光照材料室进行培养生长。生长期注意观察拟南芥幼苗的生根情况以及子叶发育状况。筛选出幼苗子叶呈现透明玻璃化并且根长与*P2SA1*相似,但与WT相比明显较短的幼苗。将其移到含有3%蔗糖的1.0% MS培养基使植株恢复生长7d,挑选恢复生长后子叶正常并且根长伸长的突变体。将挑选出来的突变体移到营养土中继续培养,待单株收获种子后进行生理和遗传分析。

突变体遗传分析以*sdm4*为母本与Columbia-0父本进行回交得到 F_1 代, F_1 代自交得到群体 F_2 代。将 F_2 代点种在1.0%的不含蔗糖的培养基上,4°C春化3 d之后放入光照材料室进行培养生长。观察子叶呈现透明玻璃化、根长较短的植株与幼苗发育正常的比例,以确定其遗传特性。

1.3 图位克隆

经过对*sdm4*的 M_3 代稳定遗传验证,发现*sdm4*能够稳定遗传无糖培养基下子叶白化短根表型。以Columbia-0为背景的*sdm4*突变体为父本,以Ler生态型为母本进行杂交,然后将杂交的 F_1 代自交,得到 F_2 。将 F_2 代的种子播种于1.0%无糖MS培养基上,生长5 d后,挑选出根短并且子叶白化的幼苗(接近100棵)提取DNA。选取拟南芥5条染色体中每条染色体上、中、下游分子标记,共17个(表1),进行PCR扩增,电泳检测统计每个分子标记的重组率。找出重组率最低的BAC,即可判断*sdm4*的突变位点粗定位于拟南芥几号染色体的大致位置。

进一步扩大群体,在粗定位结果的BAC前后附近选定6个有效的分子标记(表2),进行细定位。对这6个分子标记进行扩增、核酸电泳并统计重组率,确定重组率最低的BAC。结合高通量测序结果和细定位结果,预测候选基因。对于候选基因设计引物、送测序,比对该基因是否发生突变,对于发生突变的基因订购突变体种子,通过对突变体表型、以及突变体回补表型的分析确定引起子叶白化和根短表型的调控基因。

1.4 根长测量

根长测量选取在0%、0.5%、1%和3%蔗糖浓度的培养基上生长7 d的拟南芥幼苗,用镊子小心

表1 粗定位引物
Table 1 Rough positioning primer

BAC	Marker位置	引物序列
T23J18	1号染色体上部	F: 5' GATATTTGTTTGTCTAACAC 3' R: 5' TAATAAAAGTTCCAGCTTTGA 3'
F28H19	1号染色体中部	F: 5' TGCGGGAGTGTGATAGAATA 3' R: 5' TCCTCGAAAAGATTCATTGAT 3'
T17F3	1号染色体下部	F: 5' GGACCGACGGTTACGAGAGT 3' R: 5' TAACGGGCCGTTGCAAGA 3'
T23K3	2号染色体上部	F: 5' CGTGTTTACCGGGTCGGA 3' R: 5' AAAACCCCTGAAGAATACG 3'
F3P11	2号染色体中部	F: 5' ATGTATTTGTTGCAAAATAA 3' R: 5' TGCACAGAAGAAAAAATA 3'
T16B24	2号染色体下部	F: 5' ATGAACGGAGTAGCTATC 3' R: 5' CGCGTAGAACATAATCTGTA 3'
F20H23	3号染色体上部	F: 5' CAATGGGAAGAAGGTGTGAG 3' R: 5' CGCATTTCCATAAGTTTGTT 3'
K1G2	3号染色体中部	F: 5' ATGAGCTTTAGGAGTGTGTA 3' R: 5' AATTTGTCCCAAAAAGAATA 3'
T26I12	3号染色体下部	F: 5' GAGCAACATTAAGGATAGAA 3' R: 5' ATCTCATACTCATAATATGTAG 3'
T4I9	4号染色体上部	F: 5' TTATAGCAAACGTACAAGTC 3' R: 5' CTGCATACACGTCGTC 3'
FCA8	4号染色体中部	F: 5' TTCGGAGAAAGAAACGACAT 3' R: 5' ATGGAATATTTCAGGCATTA 3'
T4L20	4号染色体下部	F: 5' ACCCTAAAACAATGTCTCTT 3' R: 5' TGCTAACATGGAAATTTGTC 3'
MBK20	5号染色体上部	F: 5' CTCTGTTGGGGCAAAACC 3' R: 5' GATGCTGGAGAGTAGCTTAG 3'
MYJ24	5号染色体中上部	F: 5' TTCATGAGAGCGGCATTC 3' R: 5' GCAAAATGTTTGGACAATTA 3'
T26D22	5号染色体中部	F: 5' CACAGGCCATTGGATGTA 3' R: 5' TGTTAGAACCCACCATTTG 3'
K6M13	5号染色体中下部	F: 5' CCTGTTCCAATGAATATG 3' R: 5' TGTAGCTGCTGAGTTGTC 3'
MQB2	5号染色体下部	F: 5' AAAAGGCGACTACTAGCA 3' R: 5' GCCATTATTGGTCAAC 3'

移入1.0% MS培养基上使下胚轴和根部紧贴培养基表面。用数码相机照相。用软件E-尺测量根长。重复实验3~5次, 统计数据并且求平均值。数据结果用*t*-检验进行差异显著性分析。

1.5 转基因材料的获得

通过提取野生型拟南芥叶片RNA并将其进行反转录合成cDNA, PCR扩增*SCO1* CDS片段全长并回收目的片段, 将目的基因与相关载体空质粒同时进行双酶切, 将连接产物转化大肠杆菌, 37℃过夜培养后, 选取生长状态良好的菌落, PCR鉴定是否为阳性菌落, 阳性菌落提取的质粒, 再经过双

酶切和质粒PCR验证。将上述阳性质粒转化到农杆菌GV-3101, 鉴定后保存阳性菌落菌种。选取生长旺盛、开花较多的拟南芥进行转化, 转化前剪掉长出的果荚。将其花浸于菌液(含有目的片段质粒的农杆菌GV-3101)中保持30 s, 然后拿出来标记好, 平放于专用的铁托盘中。浸染完所有植株后, 用保鲜膜包裹使其处于湿润状态, 并将其置于避光处放置24 h。随后将浸染过的材料取出正常培养。为增加农杆菌的转化效率, 可在第1次转化1周待新的花蕾长出后, 进行第2次转苗。收获种子后, 使用潮霉素(Hyg)筛选潜在的转基因植株。挑

表2 细定位引物
Table 2 Fine positioning primer

BAC	引物序列
T25B24	F: 5' AAGACTATCGAATATCAGTA 3' R: 5' ATCCACAGCGTAATAGTTG 3'
F19K23	F: 5' GAATTCTGTAAACATCCCATTTC 3' R: 5' GGTCTAATTGCCGTTGTTGC 3'
F23N19	F: 5' ACATGTATTTCGTTTTTACAC 3' R: 5' CATATTTTACATGGCATTCA 3'
F16M19	F: 5' ACCGCGGACTCCAAATTC 3' R: 5' TTTCTAGCAGTCAGTATC 3'
F9N12	F: 5' GTTGCTTTGGTTGAAGACT 3' R: 5' TCTTCCTCGTGGATCCGTTA 3'
T12P18	F: 5' TAGAAGGGGCACATATTAAG 3' R: 5' TTTGTTAATGTGCGTGTAAG 3'

选出可以在含有潮霉素的培养基上生长的阳性植株, 移入营养土中, 抽提DNA进行PCR检测, 获得转基因植株。

2 实验结果

2.1 拟南芥糖依赖突变体筛选条件的确定

野生型WT和*phot1*、*phot1phot2*、*p2sa1*突变体种子在含有不同浓度的蔗糖培养基上萌发并培养7 d, 其根长变化如图1-A所示。随着糖浓度的降低, 野生型WT和*phot1*、*phot1phot2*根长无明显差

异, 但*p2sa1*的根长与WT、*phot1*、*phot1phot2*相比明显变短。在无糖培养基上培养7 d, 野生型WT和*phot1*、*p2sa1*、*phot1phot2*平均根长分别为2.175、2.147、0.550和2.374 cm; 突变体*p2sa1*相比WT根长较短且子叶表现为玻璃化, 与其他拟南芥相比差异最为明显。因此, 我们以无糖1.0% MS为培养基, 4℃春化3 d, 在22℃、光暗周期为16 h光照/8 h黑暗、光照强度为90 μmol·m⁻²·s⁻¹的温室中培养7 d为拟南芥糖依赖突变体的筛选条件。

2.2 *sdm4*突变体的筛选与遗传分析

糖对植物种子的萌发以及植株生长至关重要, 决定了植物能否由种子提供能量的异养到通过光合作用的自养的转变。因此, 筛选条件确立后, 我们利用0.3%甲基磺酸乙酯(EMS)诱变Columbia-0种子, 种下M₁代, 自交得到M₂代。从大约90 000粒M₂代种子中初步筛选出3种类型与WT存在明显不同的突变体(图2-A)。

我们将挑选出的4株突变体分别命名为*sdm1* (*sucrose dependent mutant 1*)、*sdm2*、*sdm3*和*sdm4*。*sdm1*、*sdm2*、*sdm3*和*sdm4*相比与WT均具有根短表型, 其中*sdm4*突变体除根短外, 还表现出子叶白化。将筛选出的4株突变体移至含有3%蔗糖的正常MS培养基恢复生长, 发现*sdm1*、*sdm2*和*sdm3*相比WT除生长缓慢之外, 均可进行正常的光合作用,

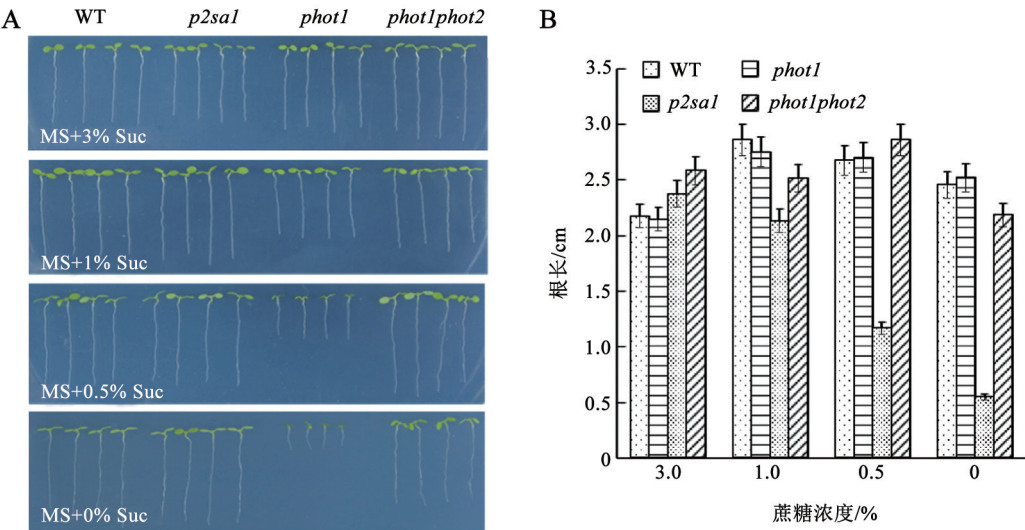


图1 野生型和不同突变体拟南芥在不同蔗糖浓度培养基上的表型分析

Fig.1 Phenotype analysis of wild type and different mutants of *Arabidopsis thaliana* in different sucrose concentration medium

A: 表型分析; B: 根长统计。

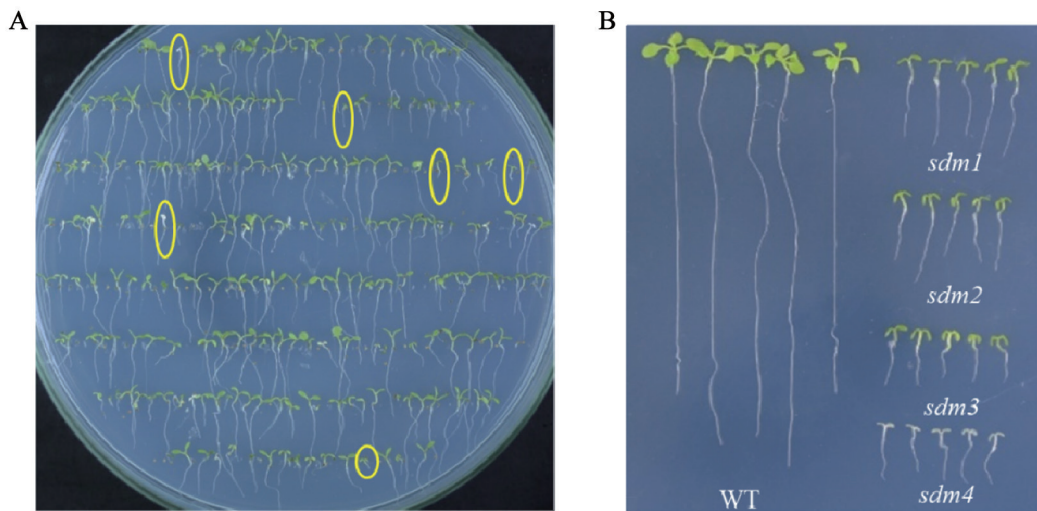


图2 *sdm4*突变体的筛选与遗传分析
Fig.2 Screening and genetic analysis of *sdm4* mutants
A: 采用无糖培养条件筛选拟南芥M₂代; B: 3种类型拟南芥异养向光合自养转变缺失突变体。

表3 *sdm4*突变体的遗传分析
Table 3 genetic analysis of *sdm4* mutant

杂交类型	F ₁ 植株数量		F ₂ 植株数量		总计	卡平方
	X ² 绿色子叶	白化子叶	绿色子叶	白化子叶		
WT (Col) ♀× <i>sdm4</i> ♂	93	0	732	213	945	0.12
WT (Ler) ♀× <i>sdm4</i> ♂	131	0	2 643	903	3 546	0.05

但是*sdm4*突变体子叶在短暂的恢复期后并未去白化。因此, 为探索子叶白化表型的调控机理, 我们对*sdm4*突变体进行深入研究(图2-B)。

将*sdm4*突变体与WT (Col)回交, 回交F₁代在无糖培养条件下表型均与WT相似, 说明*sdm4*为隐性基因突变导致。而F₂代出现绿色子叶与白化子叶表型分离比3.4:1, 接近3:1。将*sdm4*突变体与拟南芥野生型(Ler生态型)杂交, 发现与WT回交结果相似, F₁代均为绿色子叶, F₂表型出现2.9:1分离, 也接近3:1 (表3), 再次证明*sdm4*突变体表型是单基因隐性突变。同时为对其突变位点的克隆提供材料。

2.3 *SDM4*基因的图位克隆

粗定位过程中, 我们通过对17个分子标记进行PCR扩增、电泳检测统计, 发现F28H19这个BAC的重组率最低为12.36% (表4), 可以判断*sdm4*的突变位点, 可能位于拟南芥第1条染色体的中部。

表4 粗定位重组率计算

Table 4 recombination calculation of rough positioning

BAC	样数	重组率/%
T23J18	96	32.15
F28H19	96	12.36
T17F3	95	23.16
T23K3	96	51.23
F3P11	95	49.26
T16B24	96	48.23
F20H23	96	49.32
K1G2	95	47.36
T26I12	95	45.26
T4I9	96	46.12
FCA8	95	45.16
T4L20	96	51.23
MBK20	96	50.13
MYJ24	96	51.23
T26D22	95	49.26
K6M13	96	48.56
MQB2	95	47.25

为此,我们在第1条染色体F28H19的BAC前后选定了6个有效的分子标记,进行细定位。结果如表5所示, F23N19这个BAC上的重组率最低为0.31%,因此将*sdm4*突变基因定位到F23N19的BAC上。

F23N19这个BAC全长95.32 kb, 共有17个基因, 右端与F19K23有5.23 kb重叠, 左端与F16M19有8.21 kb重叠。根据拟南芥网站(<http://arabidopsis.org/>)上报道基因功能信息, 针对F23N19以及与F19K23、F16M19相重叠的基因进行功能注释, 发现F23N19所在BAC上含有一个参与调节拟南芥叶片白化的基因*AT1G62750*, 其所编码的蛋白SCO1能够特异控制子叶白化, 真叶生长正常(表6), 因此推测可能是基因*AT1G62750*发生了突变。我们根据*SOC1*基因的cDNA设计测序引物, 对*sdm4*纯合

突变体提取基因组DNA, 在生工生物工程(郑州)股份有限公司进行*SOC1*基因测序, 寻找*SOC1*基因中的突变位点。

对突变体*sdm4*中的*AT1G62750*基因进行测序。通过序列比对, 发现*AT1G62750*基因的1 528 bp处发生了点突变, 由原来A变为T (图3-A和B)。即基因组编码区的第4个外显子上的1 402碱基发生突变(图3-B)。蛋白质序列分析发现, 是三联子密码AAA突变为TAA (即由第468个氨基酸赖氨酸突变为终止密码子) (图3-C), 即第468个氨基酸以后的编码丢失, 导致其功能发生巨大的差异, 拟南芥缺失糖诱导的白化子叶反应。

2.4 *SDM4*基因功能的验证

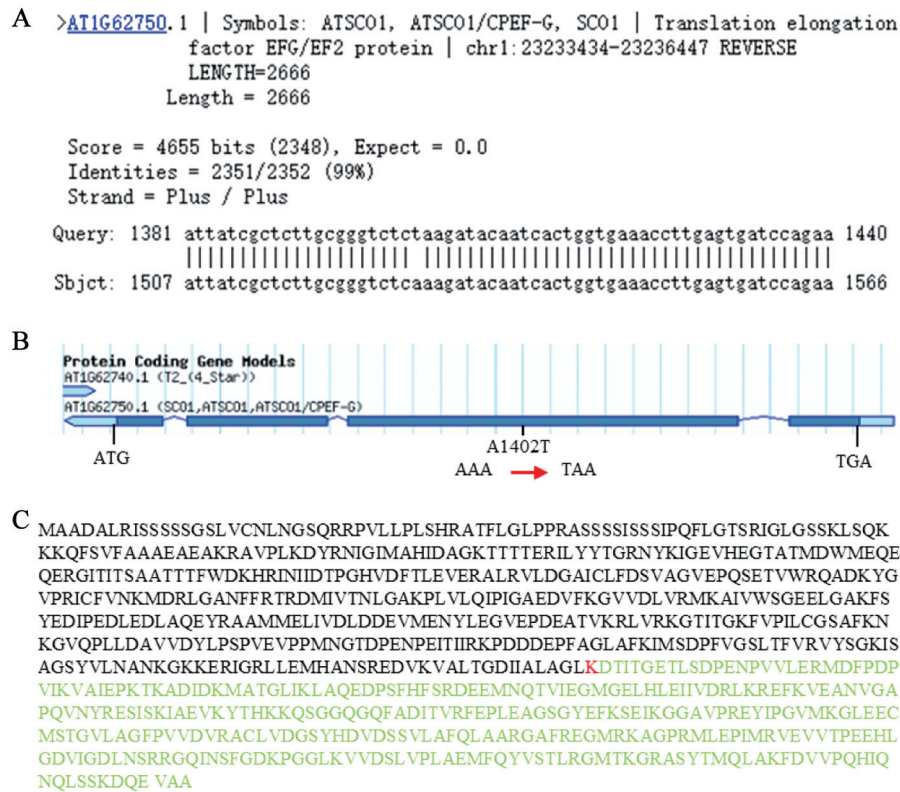
为进一步证明*sdm4*突变体表型确实是*AT1G-62750*基因突变所致, 在*sdm4*突变体背景下, 构建了*SCO1*的超表达植株。如图4所示, *sdm4*突变体背景下超表达*SCO1* (*AT1G62750*)基因确实恢复了*sdm4*突变体下白化子叶的表型, 类似于野生型(Col)和*phot1*突变体, 不同于突变体*sdm4*白化子叶的拟南芥; 以上子叶表型如图4-A和图4-B所示。野生型WT和突变体*sdm4*、*scol-2*、*scol-4*、*sdm4 SCO1-OX1*、*sdm4 SCO1-OX2*种子分别点种于无蔗糖的0.6% MS培养基萌发并培养7 d, 其根长测量统

表5 细定位重组率计算

Table 5 recombination rate of fine positioning		
BAC	样数	重组率/%
T25B24	1 096	2.02
F19K23	1 082	1.23
F23N19	1 085	0.31
F16M19	1 082	0.53
F9N12	1 082	1.11
T12P18	1 083	2.64

表6 F23N19基因功能预测

Table 6 function prediction of F23N19 gene		
BAC	基因名称	功能描述
F23N19	AT1G62660	糖苷水解家族32蛋白质
	AT1G62730	类萜合成酶超家族蛋白, 位于叶绿体
	AT1G62690	假定蛋白
	AT1G62770	PMEI9果胶甲基化酶抑制剂, 在许多植物组织中表达
	AT1G62800	编码天冬氨酸转氨酶(Asp4)
	AT1G62780	焦磷酸二甲基, 腺苷tRNA甲硫基转移酶
	AT1G62750	在光生长的突变体 <i>scol1</i> 幼苗中, 子叶的绿化严重受损, 而在野生型植物中, 真叶正常发育
	AT1G62850	I类肽链释放因子
	AT1G62840	锚蛋白重复序列/KH结构域蛋白
	AT1G62740	具有与HSP90/HSP70相互作用的蛋白作为共伴侣
	AT1G62710	编码一种属于新型的半胱氨酸蛋白酶的液泡加工酶, 这种酶是在种子中特异性表达的, 对适当加工储存蛋白至关重要
	AT1G62790	双功能抑制剂/脂质转移蛋白/种子储存2S白蛋白超家族蛋白
	AT1G62820	CML14, 具有钙结合功能的家族蛋白
	AT1G62830	参与靶基因的H3K4甲基化, 包括开花时间位点FLC和FWA; 负调节根伸长
	AT1G62810	有助于脱落酸和聚胺诱导的一氧化氮生物合成和脱落酸信号转导
	AT1G62720	参与种子萌发的位于线粒体的PPR蛋白
	AT1G62680	内酯肽重复序列(PPR)超家族蛋白

图3 *SDM4*的定位及测序突变位点分析Fig.3 Map-based cloning of *SDM4* gene and sequencing result of the mutant geneA: *sdm4*的突变位点; B: *sdm4*的突变分析; C: *SDM4*基因的蛋白序列。

计如图1-A所示。野生型WT和*sdm4 SCO1-OX1*、*sdm4 SCO1-OX2*平均根长分别为13.769 cm、13.186 cm、12.677 cm; 突变体*sdm4*、*scol-2*和*scol-4*平均根长分别为3.230 cm、2.368 cm和2.505 cm。野生型WT和*sdm4 SCO1-OX1*、*sdm4 SCO1-OX2*根长无明显差异, 但*sdm4*、*scol-2*、*scol-4*的根长与WT、*sdm4 SCO1-OX1*、*sdm4 SCO1-OX2*相比明显变短。上述结果进一步证实, *sdm4*突变体生理表型的确是*SCO1 (AT1G62750)*基因突变所致。

3 讨论

所有的生物体都需要感知和响应营养物质的变化, 比如糖的可用性。由于植物是固定的, 不能移动的, 更加需要适应环境中变化的可以有效利用的营养物质来促进植物的有效发育(Mishra等2009)。糖类的可用性也会导致初级和次级代谢的许多组分的转录调控, 其中包括氧化戊糖磷酸化、花青素的生物合成途径和淀粉合成途径(Lejay等

2008; Solfanelli等2006)。正向遗传学研究的广泛实施, 成功揭开了多种糖感知和糖信号转导途径的遗传基础(Zhou等1998; Xiao等2000; Rook等2006)。

实验中, 通过设置不添加蔗糖的培养条件筛选由异养向光合自养转变缺失的突变体以解析植物通过光形态建成完成光合自养的关键调节机制。通过图位克隆技术, 成功克隆基因*SDM4*, 该基因的突变导致拟南芥缺失绿色子叶正常发育。测序比对和功能回补验证该突变体缺失绿色子叶正常发育*SCO1*基因的突变所致。

*SCO1*编码一个具有叶绿体定位序列的转录延伸因子G (Albrecht等2006)。已有研究表明T-DNA插入*SCO1*基因导致胚胎致死(Ruppel和Hangarter 2007), 所以拟南芥中*SCO1*基因编码的EF-G对植物生长起着至关重要的作用。已发表的一些拟南芥突变体, 如白色子叶1 (*wcol1*) (Yamamoto等2000), 显示了苗期特异性的叶绿体发育异常。与*scol-1*相似的*SIG6*基因突变对叶绿体发育幼苗表现时期

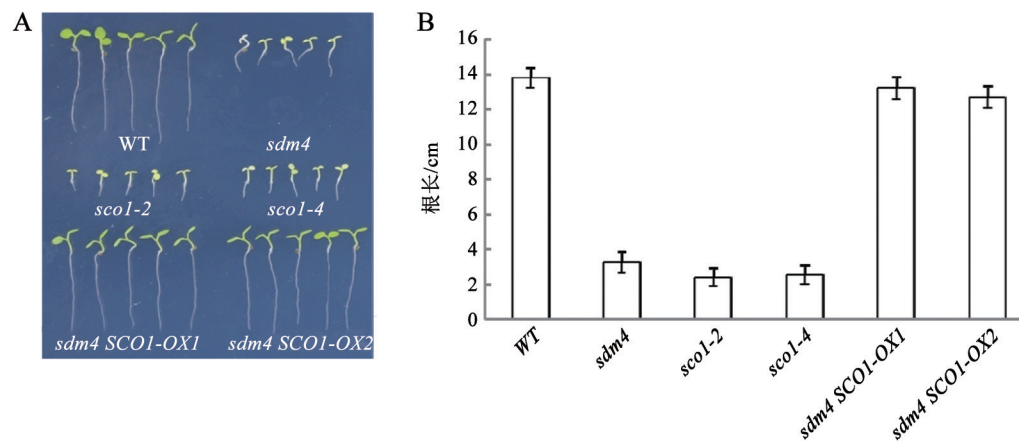


图4 SDM4调节子叶绿色发育

Fig.4 SDM4 regulated the development of green cotyledons

A: 无蔗糖培养6 d不同基因型拟南芥子叶发育和根系生长表型; B: 不同基因型拟南芥根长统计。*sco1-2*和*sco1-4*为基因*SCO1*的2个突变株系, *sdm4 SCO1-OX1*和*sdm4 SCO1-OX2*为突变体*sdm4*的*SCO1*基因超表达回补株系。图中每个数据分别来自3次独立重复试验, 18~21株苗的平均值±标准误。

特异性效应, 从白化子叶到浅绿色子叶再到正常的叶发育。这表明, *sig6*突变体能够在成熟组织中产生正常的叶绿体, 因为在整个发育过程中, sigma因子的作用是冗余的。在*sco1*突变体中, 白色子叶表型高度依赖于光强。除了幼苗白化外, 植物还表现出其他各种缺陷, 包括成熟莲座叶中叶绿素含量明显减少。*sco1*表型是由于干扰16 S核糖体RNA成熟而导致的, 使其成为影响16 S rRNA成熟并破坏叶绿体发育的突变体之一(Bisanz等2003)。

已有研究表明*sco1*突变体中, 前质体到叶绿体的转变过程存在缺陷(Ruppel和Hangarter 2007), 因此*SCO1*活性在叶绿体到前质体转变过程, 或者萌发后前质体再分化为叶绿体的过程中尤为重要。研究发现*SCO1::GFP*除定位于叶绿体外, 也定位于如根和花瓣细胞中的非光合作用质体。即使在白色的*sco1*子叶中, 维管结构周围细胞中通过叶绿素荧光和显微镜观察到叶绿体的存在(Ruppel和Hangarter 2007)。已经发现的*sco1*突变体的阶段特异性表型(Ruppel和Hangarter 2007), 揭示了源于胚胎和顶端分生组织的细胞中质体发育的根本差异。该研究方法的建立将为异养向光合自养转变关键代谢调控因子的筛选提供研究思路。蛋白*SCO1*介导拟南芥绿色子叶发育功能解析, 将为揭开植物异养向光合自养转变关键代谢调控的机制提供重要理论基础。

参考文献(Reference)

- Ainsworth EA, Bush DR (2011). Carbohydrate export from the leaf: a highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *Plant Physiol*, 155: 64–69
- Albrecht V, Ingenfeld A, Apel K (2006). Characterization of the snowy cotyledon 1 mutant of *Arabidopsis thaliana*: the impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality. *Plant Mol Biol*, 60: 507–518
- Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, et al (2013). *Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd edn. Switzerland: Springer
- Bisanz C, Begot L, Carol P, et al (2003). The *Arabidopsis* nuclear DAL gene encodes a chloroplast protein which is required for the maturation of the plastid ribosomal RNAs and is essential for chloroplast differentiation. *Plant Mol Biol*, 51: 651–663
- Cho YH, Hong JW, Kim EC, et al (2012). Regulatory functions of SnRK1 in stress and responsive gene expression and in plant growth and development. *Plant Physiol*, 158: 1955–1964
- Geiger D (2011). Plant sucrose transporters form a biophysical point of view. *Mol Plant*, 4: 395–406
- Graham IA (2018). Seed storage oil mobilization. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 115–142
- Jia T, Peng Y, Sun AQ, et al (2018). QTL mapping of sugar triggered lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol J*, 54 (5): 736–744 (in Chinese with English abstract) [贾涛, 彭瑜, 孙爱清等(2018). 糖诱导拟南芥侧根发育的QTL分析. *植物生理学报*, 54 (5):

- 736–744]
- Kircher S, Schopfer P (2012). Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 11217–11221
- Lejay L, Wirth J, Pervent M, et al (2008). Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiol*, 146: 2036–2053
- Lilley JL, Gee CW, Sairanen I, et al (2012). An endogenous carbon and sensing pathway triggers increased auxin flux and hypocotyls elongation. *Plant Physiol*, 160: 2261–2270
- Man XY, Guo YR, Ge HJ, et al (2018). Advances in mutual regulation mechanisms between below- and above-ground of plants. *Plant Physiol J*, 54 (6): 931–942 (in Chinese with English abstract) [满欣雨, 郭亚蓉, 葛红娟等(2018). 植物地下部与地上部远端相互调控研究进展. *植物生理学报*, 54 (6): 931–942]
- Mason MG, Ross JJ, Babst BA, et al (2014). Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111: 6092–6097
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JM et al (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol Cell Biol*, 20: 4513–4521
- Rook F, Corke F, Baier M, et al (2006). Impaired sucrose induction1 encodes a conserved plant-specific protein that couples carbohydrate availability to gene expression and plant growth. *Plant J*, 46: 1045–1058
- Rolland F, Baena-Gonzalez EJ, Sheen J (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Plant Biol*, 57: 675–709
- Ruppel NJ, Hangarter RP (2007). Mutations in a plastid-localized elongation factor G alter early stages of plastid development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 7: 37
- Sairanen I, Novak O, Pencik A, et al (2012). Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24: 4907–4916
- Smeeckens S, Ma J, Hanson J, et al (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr Opin Plant Biol*, 13: 274–279
- Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, et al (2006). Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 140: 637–646
- Stokes ME, Chattopadhyay A, Wilkins O, et al (2013). Interplay between sucrose and folate modulates auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 162: 1552–1565
- Van Leene J, Hollunder J, Eeckhout D, et al (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Syst Biol*, 6: 397
- Van't Hof J, Rost T (1972). Cell proliferation in complex tissues: the control of the mitotic cycle of cell populations in the cultured root meristem of sunflower (*Helianthus*). *Am J Bot*, 53: 970–976
- Wahl V, Brand LH, Guo YL, et al (2010). The FANTASTIC FOUR proteins influence shoot meristem size in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 10: 285
- Xiao W, Sheen J, Jang JC (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol Biol*, 44: 451–461
- Xiong Y, Sheen J (2012). The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiol*, 164: 499–512
- Yamamoto YY, Puente P, Deng XW (2000). An *Arabidopsis* cotyledon-specific albino locus: a possible role in 16S rRNA maturation. *Plant Cell Physiol*, 41: 68–76
- Zhou L, Jang JC, Jones TL, et al (1998). Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an *Arabidopsis* glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 10294–10299

Isolation and characterization of regulator SDM4 involved in the seedling establishment of *Arabidopsis*

WANG Xiao-Nan, TIAN Yan, ZHU Zi-Yi, ZHAO Xiang*, ZHANG Xiao*

Key Laboratory of Plant Stress Biology/State Key Laboratory of Cotton Biology/College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China

Abstract: Gluconeogenesis stored nutrition determining seedling establishment after germination. However, the mechanism of using stored substances during seed germination and seedling establishment still remain elusive. Here, the seeds of *Arabidopsis* were mutated by EMS to screen mutants that were not able to achieve seedling establishment in sucrose-free medium. Then, these mutants were transferred to sucrose-containing medium to promote seedling establishment for 3 days and were transplanted to the nutrient soil for continued cultivation. The phenotype appearing during the growth and development of these seedlings were observed, and the seeds were collected by single plants to test the genetic stability verification. We successfully screened and cloned the gene *SDM4* (*sucrose dependent mutant 4*). The gene *SDM4* turned out to be the allelic of *SCO1* by sequencing. The mutation of gene *SDM4* could result in cotyledons albino and root short of *Arabidopsis sdm4* mutants in sucrose-free medium. In the background of *sdm4* mutants, overexpression of *SDM4* gene could restore green cotyledons and root growth of *sdm4* mutants. The present results show that the *SDM4* regulates the development of cotyledon and plays an important role in the process of photosynthesis and root growth.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; cotyledons albino; root growth; map-based cloning

Received 2018-05-29 Accepted 2018-11-21

This work was supported by the Basic and Advanced Technology Research Project of Henan (142300413225), Science and Technology Innovation Talent Research Project of Henan (17HASTIT035) and the National Natural Science Foundation of China (31670289 and 31570294).

*Corresponding authors: Zhang X (xzhang@henu.edu.cn), Zhao X (xzhaoh@henu.edu.cn).