

拟南芥突变体 *myc234* 的鉴定及其 对 MeJA 的敏感性分析

王炎炎¹, 张斐斐², 熊娟³, 王雪³, 李林³, 冯蕊³,
董萍萍³, 殷伊君³, 张有刚⁴, 周丽娟^{3*}

(1. 云南省农业科学院 国际农业研究所, 云南 昆明 650205; 2. 云南省农业科学院
生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650205; 3. 昆明学院 农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214;
4. 云南师范大学 能源与环境科学学院, 云南 昆明 650504)

摘要: *AtMYC2* (AT1G32640), *AtMYC3* (AT5G46760) 和 *AtMYC4* (AT4G17880) 是茉莉酸信号通路的关键基因, 为深入挖掘其在拟南芥生长发育及防御反应中的基因功能, 结合 PCR, SqRT-PCR 半定量及测序技术对 *myc2*, *myc3* 和 *myc4* 单突变体杂交获得的 F3 代植株进行鉴定, 获得 7 株纯合三突变体. 并以 40 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 对纯合三突变材料进行外源处理. 结果显示, 野生型根长较对照降低 39.57%, 而 *myc234* 纯合三突变体较对照升高 3.54%, 说明其对 MeJA 敏感度明显下降. 研究结果可为 *myc234* 突变体的鉴定以及对茉莉酸敏感性相关研究提供试验依据及材料.

关键词: 拟南芥; *MYC* 转录因子; 突变体鉴定; MeJA 敏感性; 茉莉酸; SqRT-PCR

中图分类号: Q78; Q945.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2022) 03 - 0100 - 05

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2022.03.019

Identification and MeJA Sensitivity Analysis of *Arabidopsis* Mutant *myc234*

WANG Yanyan¹, ZHANG Feifei², XIONG Juan³, WANG Xue³, LI Lin³, FENG Rui³,
DONG Pingping³, YIN Yijun³, ZHANG Yougang⁴, ZHOU Lijuan^{3*}

(1. International Agricultural Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences,
Kunming, Yunnan, China 650205; 2. Biotechnology and Germplasm Resources Institute,
Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan, China 650205;
3. School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214;
4. School of Energy and Environment Science, Yunnan Normal University, Kunming, Yunnan, China 650504)

Abstract: *AtMYC2* (AT1G32640), *AtMYC3* (AT5G46760) and *AtMYC4* (AT4G17880) were the key regulators involved in the jasmonic acid signaling pathway. To further explore the gene functions during development and defense response in *Arabidopsis thaliana*, combined PCR, SqRT-PCR semi-quantitative and sequencing technology, F3 generation progenies obtained through the mutual hybridization and self-breeding of *myc2*, *myc3* and *myc4* mutants were identified to get 7 homozygous triple mutants of stable genetic. The response sensitivity of the triple mutants to exogenous MeJA treatment of 40 $\mu\text{mol/L}$ was analyzed, the result showed that the root length of wild-type reduced 39.57%, while the growth of *myc234* triple mutants increased 3.54%, showing that the sensitivity to MeJA decreased significantly. This study provided experimental basis and material for the identification of *myc234* mutant and the study of jasmonin sensitivity.

收稿日期: 2022 - 03 - 11

基金项目: 云南省农业基础研究联合专项资助项目 (2017FG001(-085)); 云南省地方本科高校基础研究联合专项项目 (2018FH001-025); 昆明学院人才引进资助项目 (YJL18005); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2021Y722); 云南省大学生创新项目 (202011393010); 云南省大学生创新项目 (202111393007).

作者简介: 王炎炎 (1983—), 女, 云南曲靖人, 助理研究员, 硕士, 主要从事植物生理与分子生物学研究.

***通信作者:** 周丽娟 (1981—), 女, 云南昆明人, 高级工程师, 博士, 主要从事植物生理与分子生物学研究,
E-mail: zhoulijuan1201@163.com.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; MYCs gene; mutants identified; MeJA sensitivity; JA; SqRT-PCR

茉莉酸 (Jasmonates, JA) 及其衍生物是植物体内重要的信号分子, 其具有调节多个发育过程及抗逆防御反应的功能^[1-2]. 在茉莉酸参与的众多生物学信号传导过程中, 所依赖的大多为其下游的 bHLH 转录因子 MYCs. 不同的 JA 的信号转导过程中主要以 MYC 家族成员的 MYC2 为主, 同时还有其同系物 MYC3 和 MYC4 发挥同功能冗余作用^[3-6]. 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, 茉莉酸参与诱导芥子油苷合成所介导的防御反应. 其中 MYC2, MYC3 和 MYC4 能够与 MYBs 互作促进下游基因的转录, 也能够结合到下游芥子油苷相关合成酶启动子激活转录因子转录^[5-7]. 在茉莉酸调控叶片衰老的发育过程中, MYC2/3/4 结合到 PAO 的启动子上, 促进叶绿素降解关键酶的表达^[8], 同时 MYC2, MYC3, MYC4 及 MYC5 还可以协同调控病虫害防御、叶片衰老以及侧根的发育^[9]. 而 JA 响应反应中的几个 MYCs 转录因子在功能上存在冗余, 单个基因的突变体表型往往不明显, 只有获得纯合多突变体才能更好地对其基因功能丧失后的表型进行观察, 从而确定其基因功能. 因此, 为研究 JA 及其下游转录因子的功能, 制备 *myc234* 三突变体显得至关重要. 基于此, 本研究拟通过单突变体的杂交、自交获得初步确定的 *myc234* 纯合三突变体的 F3 代种子, 结合 PCR 技术、SqRT-PCR 技术以及 JA 敏感性试验综合验证纯合三突变体, 旨在为 JA 相关研究提供材料, 同时也可对相关突变体的鉴定提供具体的方法和数据.

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为 Columbia (Col-0) 生态型, *myc2* 为点突变, *myc3* (GK44B11), *myc4* (GK491E10) 为 T-DNA 插入^[10], 上述材料由云南大学陈小兰教授惠赠. 3 个单突变体通过杂交、自交后对其 F2 代进行初筛, 并将初筛成功的植株进行单株收种, 获得稳定遗传的 F3 代. 在茉莉酸羧基甲基转移酶催化下形成茉莉酸甲酯 (Methyl jasmonate, MeJA), MeJA 是植物体内主要的 JA 活性物质^[4]. 本研究对野生型拟南芥及三突变体外源施加 MeJA, 分析突变体对 MeJA 的敏感

性变化.

1.2 材料培养

种子用 V (30% 过氧化氢) : V (75% 乙醇) = 4:1 混合液消毒 30 s, 无菌水洗 3 次, 分别点播于浓度为 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 的 1/2MS 固体培养基上, 以不含 MeJA 的 1/2MS 培养基为对照, para-film 膜封口. 倒置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱春化 48 h, 移至光照培养箱中进行垂直培养. 培养条件为光照 16 h/d, 22 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 60% ~ 70%, 在培养的第 21 天观察根的生长情况.

1.3 突变体的鉴定

植物总 DNA 的提取采用 CTAB 法, 并将其保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 环境中.

引物设计: *myc2* 为点突变^[10], 在其突变位点上下游设计引物, 对 PCR 扩增片段进行测序鉴定. *myc3* 和 *myc4* 的突变信息于 SIGnAL 数据库查询 (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress/>), 结合“双引物法”进行鉴定^[11]. 利用 primer 5 进行引物设计 (表 1), 并由生工生物工程 (上海) 有限公司合成.

PCR 扩增体系 (20 μL): GreenTaqMix (南京诺唯赞), 10.0 μL , 上下游引物各 0.5 μL , ddH₂O 8.0 μL , 模板 DNA 1.0 μL . 扩增条件: 预变性 (94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min), 变性 (94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s), 退火 (60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s), 延伸 (72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s), 33 个循环, 延伸 (72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min).

1.4 SqRT-PCR

采用 TRIzol 法提取总 RNA, 按照 MonScript™ RTIIIAll-in-OneMixMonad (购于莫纳生物) 说明书的方法建立 20 μL 标准反转录体系, 并去除基因组 DNA 及合成 cDNA. 利用 primer 5 进行引物设计 (表 1), 并由生工生物工程 (上海) 有限公司合成. SqRT-PCR 以 ACTIN 基因为内参, 分别在野生型 col-0 和 *myc234* 中扩增 ACTIN, MYC2, MYC3 和 MYC4. PCR 扩增体系 (20 μL): GreenTaqMix (南京诺唯赞), 10.0 μL , 上下游引物各 0.5 μL , ddH₂O 8.0 μL , 模板 DNA 1.0 μL . 扩增条件: 预变性 (94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min), 变性 (94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s), 退火 (60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s), 延伸 (72 $^{\circ}\text{C}$, 30 s), 28 个循环, 延伸 (72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min).

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	备注
MYC2	LP:GGAGATGGTTATTATTACAAAGGTGAAGA RP:CATTAATCCACATAGACGGGTCG	基因型鉴定
MYC3	LP:AGAAGAAGCCGAGGAAACGG RP:GCTCCCATCTTCACCGTAG LB:GCAAATTCTTCTGTGTATTCCAC	基因型鉴定
MYC4	LP:CGCTACACACACCATTGTTTGTA RP:TCTCCGACGAATGTTCAAGTAAC LB:GCAAATTCTTCTGTGTATTCCAC	基因型鉴定
ACTIN	F:ACCGTTTCGCTTTCCTTAGTGTTAGCT R:AGCGAACGGATCTAGAGACTCACCTTG	SqRT-PCR
MYC2	F:TGAGCTCTTCCGATATCTCAAC R:GTGTGTTCTTCAATCAAAGCT	SqRT-PCR
MYC3	F:TAGGTTGGGATGTGATGATACG R:CAACGGATAAACTCGCATGATT	SqRT-PCR
MYC4	F:GTAACAGAGTTGTGGTTGAACC R:TTCAGCCTTTTGCAACTTAGAC	SqRT-PCR

1.5 数据统计与分析

MeJA 敏感性试验中，用游标卡尺准确测量培养了 21 d 拟南芥各处理的根长，并利用 SPSS 21.0 软件对测量数据进行方差分析.

2 结果与分析

2.1 myc2 纯合突变体的鉴定

myc2 突变位点是位于 582 bp 的 G 颠换为 A. 通过 PCR 扩增，扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测，显示条带清晰，且与目标条带一致，结果详见图 1 (a). 通过测序及序列比对可知 7 株突变体材料在突变位点均为碱基 A 的单峰，而 Col-0 野生型对照 (8 号样) 为碱基 G 的单峰 (结果见图 1 (b)), 说明所鉴定的 7 株突变体样品均为 myc2 的纯合突变体.

2.2 myc3 纯合突变体的鉴定

myc3 (GK445B11) 为拟南芥 MYC3 (AT5G46760) 基因的 T-DNA 插入突体，其插入位置为 1 587 bp 处外显子^[10]. 通过双引物法，分别以 LP + RP 和 RP + LB 为引物进行两组 PCR 扩增. PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳结果分析可知，以 LP + RP 为引物时仅有 Col-0 野生型有目标条带，而 7 株突变体均无目标条带 (图 2 (a)); 在 RP + LB 为引物进行 PCR 扩增时仅 Col-0 无目标条带，而 7 株突变体均有目标条带 (图 2 (b)), 综合两组试验结果说明 1 ~ 7 号植株均为 myc3 纯合突变体.

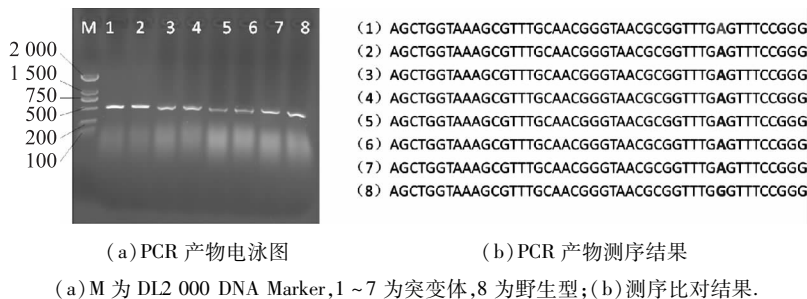


图 1 myc2 突变体的 PCR 及测序比对结果

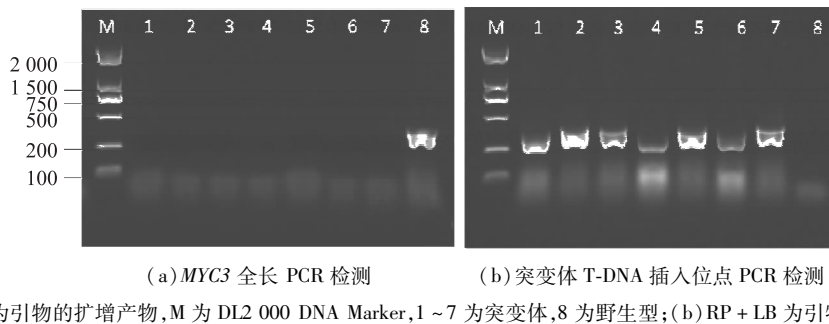


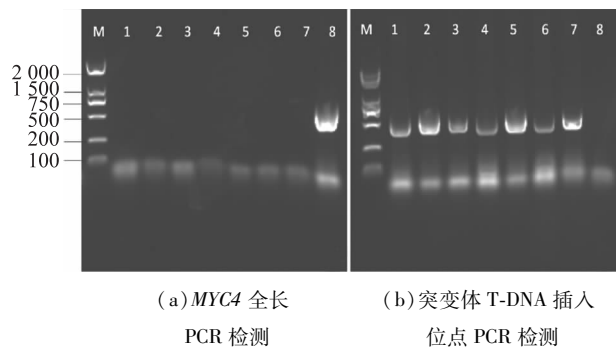
图 2 myc3 突变体基因型鉴定

2.3 myc4 纯合突变体的鉴定

myc4 (GK491E10) 为拟南芥 MYC4 (AT4G17880) 基

因的正向 T-DNA 插入突体，其插入位置为外显子 271 bp 处^[10]. 试验分别以 LP + RP 和 LP + LB 为引物

进行两组 PCR 扩增并进行琼脂糖凝胶电泳, 以 LP + RP 为引物的扩增结果显示仅有 Col-0 野生型有目标条带, 7 株突变体均无目标条带 (图 3 (a)); 在 LP + LB 为引物进行 PCR 扩增的试验结果中显示 7 株突变体均有目标条带, 而 Col-0 无目标条带 (图 3 (b)). 因此, 7 株突变体均为 *myc4* 的纯合突变体.



(a) *MYC4* 全长 PCR 检测 (b) 突变体 T-DNA 插入位点 PCR 检测
(a) LP + RP 为引物的扩增产物, M 为 DL2 000 DNA Marker, 1~7 为突变体, 8 为野生型; (b) RP + LB 为引物的扩增产物.

图 3 *myc4* 突变体基因型鉴定

2.4 突变体基因表达量分析

将 qRT-PCR 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳的结果显示 (图 4), 内参 *ACTIN* 在突变体 *myc234* 和野生型 Col-0 的植株中均能正常扩增出清晰条带, 而 *MYC2*, *MYC3*, *MYC4* 这 3 个基因在 *myc234* 中表达量较野生型对照明显下降, 进一步证实 PCR 鉴定出的纯合三突变体植株中 *MYC2*, *MYC3* 和 *MYC4* 基因

在转录水平上几乎无表达.

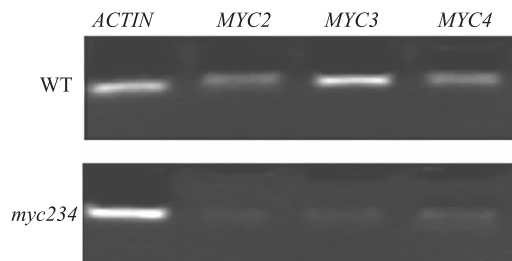
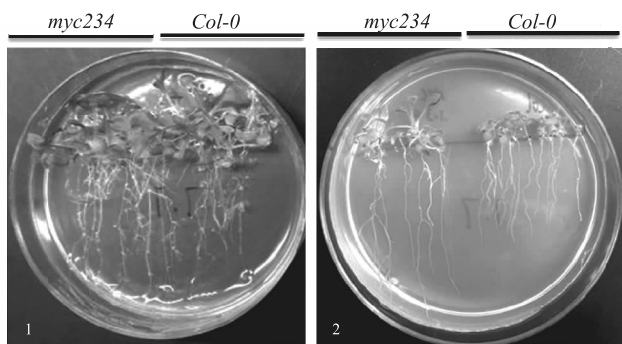


图 4 *MYCs* 基因 SqRT-PCR 扩增产物

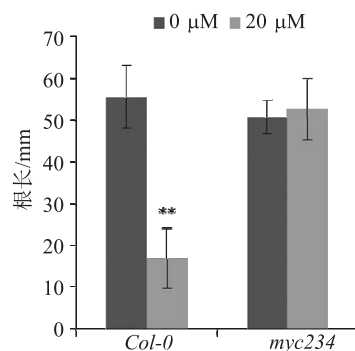
2.5 突变体对茉莉酸的敏感性试验

试验将消毒后的野生型 Col-0 及纯合三突变体种子点种于含有 40 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 的 1/2MS 培养基上, 并设不含 MeJA 的 1/2MS 的培养基为对照, 通过垂直培养观察幼苗根的发育的情况 (图 5). 试验结果表明, 培养 21 d 后, MeJA 对野生型幼苗根的发育造成了严重的抑制作用, 而 *myc234* 突变体对 MeJA 的抑制效应的敏感性较对照明显下降. 野生型植株在 40 $\mu\text{mol/L}$ 处理试验中的平均根长比空白组下降了 39.57%, 差异有统计学意义; 而 *myc234* 纯合突变体根长反而上升 3.54%, 差异无统计学意义. 上述结果表明, *myc234* 突变体的根发育对 JA 的调控作用不敏感.



(a) 拟南芥野生型和突变体根生长对 MeJA 敏感性表现

(a) 1 为空白对照, 2 为 40 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 处理; (b) 根长数据统计, 标尺为 1 cm, ** 表示 $P < 0.01$.



(b) 拟南芥野生型和突变体根生长对 MeJA 敏感性统计分析

图 5 野生型与 *myc234* 根对茉莉酸甲酯的敏感性检测

3 讨论与结论

3.1 讨论

在茉莉酸调控的根发育、气孔发育、雄蕊发育及芥子油苷合成的生物学过程中^[12-15], *MYC2*, *MYC3*, *MYC4* 均以功能冗余的方式参与其中, 但在某些发育过程中三者也具有各自独立的特异性功

能, 如 *MYC2* 在整个植物中都有表达, 特别是在根组织中表达强烈, *MYC3* 主要在营养组织中表达, *MYC4* 在维管组织中表达^[16]. 就目前的研究报道来看, *MYCs* 的三个成员的基因功能还有很多不清楚的地方. 同时, 对于 *myc234* 三突变体的鉴定方法也存在很多差异, 因此鉴定获得 *myc234* 纯合三突变体材料, 建立其鉴定方法体系, 对于研究 JA

相关调控机制, 深入了解 MYC2, MYC3, MYC4 的具体生物学功能具有重要的意义。

本研究利用 40 $\mu\text{mol/L}$ MeJA 对拟南芥进行外源化学处理以确定突变体对 JA 的敏感度。在野生型中, MeJA 处理后其根长较未处理对照下降了 39.57%, 两者差异有统计学意义; 而在 *myc234* 纯合三突变体中, 处理样较对照样根长未受抑制, 反而增加了 3.54%, 说明该 *myc234* 纯合三突变体对 JA 的敏感性明显下降。这一结果与 Chen 等^[12] 的研究结论的总体趋势一致。但本研究发现, 在对 JA 敏感的度的测试试验中与多篇文章所用的 MeJA 浓度有所区别, Chen 等^[12] 用的是 20 $\mu\text{mol/L}$, 乔菊香等^[14] 用的是 28 $\mu\text{mol/L}$, Zhuo 等^[15] 用的是 5 $\mu\text{mol/L}$, 而且在处理的时间上也各不相同, 由此可以看出, 在对拟南芥进行外源化学处理的敏感试验中, 虽然各个试验的总体趋势一致, 但未形成统一的处理标准, 在数据的具体细节方面存在一定的差异。因此, 在后续试验中应考虑浓度梯度的问题, 加强试验的全面性及系统性。

3.2 结论

通过 PCR 鉴定, SqRT-PCR 半定量试验以及 MeJA 敏感试验, 证明了通过杂交获得的突变体材料为 *myc234* 的纯合三突变体。该突变体材料中 MYC2, MYC3 和 MYC4 在转录水平基本无表达, 其根发育对 MeJA 的敏感程度明显低于野生型, 结果可为深入研究 MYC2, MYC3 和 MYC4 参与 JA 以及其他激素调控生理生化过程中发挥的功能提供研究材料。

【参考文献】

- [1] 刘亚洲, 张翠, 孙一丁, 等. 水杨酸和茉莉酸诱导水稻感关键基因 C4H 的表达分析 [J]. 西南农业学报, 2019, 32 (9): 1967–1972.
- [2] 苏岳峰, 郑其向, 马晓, 等. 茉莉酸和水杨酸诱导胡椒抗瘟病中生理生化的变化研究 [J]. 西南农业学报, 2021, 34 (8): 1630–1636.
- [3] JEWELL J B, BROWSE J. Epidermal jasmonate perception is sufficient for all aspects of jasmonate-mediated male fertility in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2016, 85 (5): 634–647.
- [4] WASTERACK C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development [J]. *Annals of Botany*, 2007, 100 (4): 681–697.
- [5] ZHANG L, ZHANG F, MAELI M, et al. Jasmonate signaling and manipulation by pathogen sandin sects [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68 (6): 1371–1385.
- [6] NAKATA M, MITSUDA N, HERDE M, et al. A bHLH-type transcription factor, ABA-INDUCIBLE BHLH-TYPE TRANSCRIPTION FACTOR/JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE1, acts as a repressor to negatively regulate jasmonate signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25 (5): 1641–1656.
- [7] HUANG H, LIU B, LIU L, et al. Jasmonate action in plant growth and development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68 (6): 1349–1359.
- [8] ZHU Z Q, LEE B J. Friends or foes: new insights in jasmonate and ethylene co-actions [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2015, 56 (3): 414–420.
- [9] SONG S S, HUANG H, WANG J J, et al. MYC5 is involved in jasmonate-regulated plant growth, leaf senescence and defense responses [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2017, 58 (10): 1752–1763.
- [10] ABE H, TAKESHI U, TAKUYA I, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell*, 2003, 15 (1): 63–78.
- [11] 李敏, 杨双, 阮燕晔, 等. 拟南芥 T-DNA 插入突变体 ATSUC3 的 PCR 鉴定 [J]. 植物生理学通讯, 2006, 42 (1): 91–94.
- [12] CHEN Q, SUN J Q, ZHAI Q Z, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses PLETHORA expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23 (9): 3335–3352.
- [13] HAN X, HU Y, ZHANG G, et al. Jasmonate negatively regulates stomatal development in *Arabidopsis* cotyledons [J]. *Plant Physiology*, 2018, 176 (4): 2871–2885.
- [14] 乔菊香, 杨红玉, 吴嘉, 等. 拟南芥突变体 *jar1* 的鉴定及其 MeJA 感受性分析 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学版), 2018, 38 (6): 69–73.
- [15] ZHUO M N, SAKURABA Y, YANAGISAWA S. A jasmonate-activated MYC2-Dof2.1-MYC2 transcriptional loop promotes leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2019, 32 (1): 242–262.
- [16] FERNANDEZ-CALVO P, CHINI A, FERNANDEZ-BARBERO G, et al. The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23 (2): 701–715.