

赤霉素对根尖径向生长的调节作用研究

钮世辉¹ 李伟¹ 陈晓阳^{1,2}

(1 北京林业大学生物科学与技术学院, 林木育种国家工程实验室 2 华南农业大学林学院)

摘要:通过转基因与 RNAi 基因沉默技术,获得了由 35S 组成型启动子和 *TobRB7* 根尖特异表达型启动子分别启动表达的 *PtGA20ox*、*PtGA2ox1* 烟草转基因株系和 *NtGA20ox* RNAi 株系,对转基因植株根尖进行大样本 ($n > 100$) 显微观察。统计结果显示:转基因植株根尖径向生长与对照相比具有极显著差异,外源施用 GA_3 与赤霉素合成抑制剂 PAC 可以逆转这种差异,表明赤霉素对根尖径向生长具有负调控作用;此外,利用 *TobRB7* 启动子在根尖分生组织特异上调和下调内源赤霉素水平可以得到与组成型调控转基因植株相似的表型,表明赤霉素对根尖径向生长的负调控作用主要是通过对根尖分生组织生长发育的调控实现的。

关键词:赤霉素; 根径; 径向生长; 根尖分生组织

中图分类号:S718.43 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2013)03-0071-06

NIU Shi-hui¹; LI Wei¹; CHEN Xiao-yang^{1,2}. **Negative regulation of gibberellin on root tip diameter.**

Journal of Beijing Forestry University (2013) **35**(3)71-76 [Ch,34 ref.]

1 National Engineering Laboratory for Tree Breeding, College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

2 College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, P. R. China.

We conducted our study on tobacco plants for altered rates of biosynthesis and catabolism of GA constitutively or in specific tissues by transgenic approach and RNAi gene silencing technology. In the present study, *PtGA20ox* and *PtGA2ox1* were over-expressed under the control of 35S promoter or root meristem-specific promoter (*TobRB7*) respectively and *NtGA20ox* was silenced. Root tips of transgenic plants and *NtGA20ox* RNAi lines were microscopic observation ($n > 100$). It showed that transgenic plants compared with control had a very significant difference. This difference can be reversed by the exogenous application of GA_3 and gibberellin synthesis inhibitor PAC. Moreover, similar phenotypes were obtained for root tip meristem-specific up-and down-regulation and constitutive regulation of endogenous gibberellin levels. The results provide evidence that GA negative regulates the root tip diameter through effects on the meristem.

Key words gibberellin; root tip diameter; radial growth; root meristem

赤霉素 (gibberellins, GAs) 是四环二萜类植物激素,参与调节植物整个生命周期中生长发育的许多方面^[1-2]。最近的研究表明,在植物根的生长发育中,赤霉素发挥着重要的调控作用^[3]。对豌豆 (*Pisum sativum*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的相关 GA 突变体的研究发现,活性 GA 促进根的伸长^[4-7],利用遗传转化表达 GA 生物代谢途径中的关

键酶进一步证实了此效应。随后分子生物学研究发现该过程需要 DELLA 蛋白 (GA 信号转导中最重要的一类阻遏蛋白) 和生长素参与^[5,8],生长素是 GA 介导的在根尖内皮层 DELLA 蛋白降解以解除其对根伸长生长的阻遏所必需的^[5,8];然而,越来越多的研究表明:GA 在侧根及不定根的发生过程中具有明显的抑制效应^[9-12],促进 GA 生物合成的转基因

收稿日期:2012-06-21 修回日期:2012-09-17

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(ZD2011-4)。

第一作者:钮世辉,博士生。主要研究方向:林木生物技术。Email:arrennew@126.com 地址:100083 北京市 清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者:李伟,副教授。主要研究方向:林木生物技术。Email:liweili@bjfu.edu.cn 地址:同上。陈晓阳,教授,博士生导师。主要研究方向:林木基因工程。Email:xychen@scau.edu.cn 地址:510642 广东省广州市天河区五山华南农业大学林学院。

本刊网址: <http://journal.bjfu.edu.cn>

植株往往会表现出生根困难的性状^[13],相反,抑制GA生物合成的转基因植株则有更多的侧根发生^[14-16],但其分子机制尚不清楚。

尽管最近几年对于GA在根的生长发育过程中作用的认识在不同层次上有了长足的进步,然而与生长素相比,对GA在植物生长发育过程中的调控作用的研究相对进展缓慢;因为赤霉素在植物体内种类超过上百种,而且含量很低,对相关研究造成了很大的阻碍^[9]。近年来,编码GA生物代谢途径相关酶的各个基因已从不同物种中克隆^[17],其中,GA20ox与GA2ox分别是活性赤霉素生物合成代谢和氧化失活代谢过程中的限速酶,响应活性GA的反馈调节,是植物体内是GA代谢途径中被调控的最关键的位点^[18-19]。通过在不同组织特异表达这2个关键酶基因以调控内源活性GA的水平,为相关研究带来了新的思路^[20]。

目前的研究成果主要将重点放在根的纵向生长即伸长性生长上,而对于GA在根的径向生长中的作用尚未见报道。为此,我们克隆了毛白杨(*Populus tomentosa*)GA代谢中的2个关键酶^[10]——*PtGA20ox*与*PtGA2ox1*,利用转基因手段,获得了35S组成型启动子和根部特异表达启动子*TobRB7*^[21]分别启动的烟草(*Nicotiana tabacum*)转基因植株,即35S::*PtGA20ox*,35S::*PtGA2ox*,*TobRB7*::*PtGA20ox*及*TobRB7*::*PtGA2ox*表达植株(下文标记为35:G20,35:G2,T:G20及T:G2),并利用RNAi技术获得了烟草*NtGA20ox*基因沉默植株^[22](下文标记为RNAi)。本文对这些植株根的径向生长进行统计分析,研究GA在其中的调控作用,为GA对根生长发育调控研究提供了新的视野。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以本实验室转化获得的35:G20,35:G2,T:G20,T:G2及RNAi烟草转基因株系^[22-25]及野生型烟草为研究材料,其中*PtGA20ox*(AJ001326)与*PtGA2ox1*(JX102472)基因克隆于毛白杨1316株系,转基因受体为野生型烟草W38株系。所有植物材料均于无激素1/2 MS培养基上,在25℃,16 h/8 h光照条件下继代培养。

外源施用GA₃,GA合成抑制剂PAC(paclbutrazol)及IAA均购于sigma公司;显微拍照用显微镜购于Motic(BA210)公司;根径测量用ImageJ 1.45软件(<http://rsbweb.nih.gov>),双尾t检验用Microsoft Excel软件进行。

1.2 实验处理

取培养4周的野生型烟草植株,保留顶芽,除去所有叶片,切成3 cm茎段,分别移至含有GA₃、PAC、IAA、IAA+GA₃、IAA+PAC的1/2 MS培养基上,其中GA₃与PAC含量为1 mg/L,IAA为0.2 mg/L。以无激素1/2 MS培养基为对照,每个处理至少40个生物学重复,培养3周后每株随机选取3条不定根,保存于70%乙醇,用0.1%固绿简单染色后对根尖进行显微观察并拍照。

转基因植株均培养于无激素1/2 MS培养基,每个处理至少60个生物重复,培养3周后每株随机选取4条不定根进行测量。

1.3 数据处理

用ImageJ软件测量根尖根毛区即成熟区直径,野生型数据以50 μm等级进行频率计数,转基因植株根尖数据进行降序排序处理后进行比对,利用双尾t检验衡量处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 GA₃及PAC对野生型烟草根尖径向生长的影响

对野生型烟草不定根进行显微观察发现,根尖的结构包含4个部分:根冠、分生区、伸长区和根毛区。分生区、伸长区的细胞致密而大小不一,根径变化较大,到根毛区根径基本稳定(图1),此区域的根径能够反映根尖的径向生长情况。对从不同培养基上收获的不定根进行统计后发现:样本均呈正态分布,对照组主峰在300~400 μm之间,外源施用GA₃极显著($P < 0.01$)地抑制根的径向生长,主峰向左偏移至250~350 μm之间;相反,PAC处理会极显

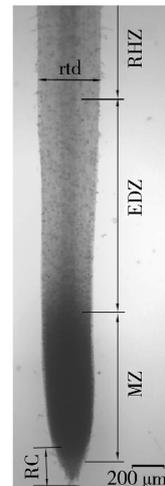


图1 烟草根尖组织结构

Fig.1 Structure of root tip of tobacco

注:RHZ,根毛区;EDZ,伸长区;MZ,分生区;RC,根冠;rtd,根径测量位区。

著($P < 0.01$)增加处理植株的根径,主峰向右偏移到450~550 μm 之间;此外,赤霉素对根直径的作用

不受外源 IAA 的影响(图2)。

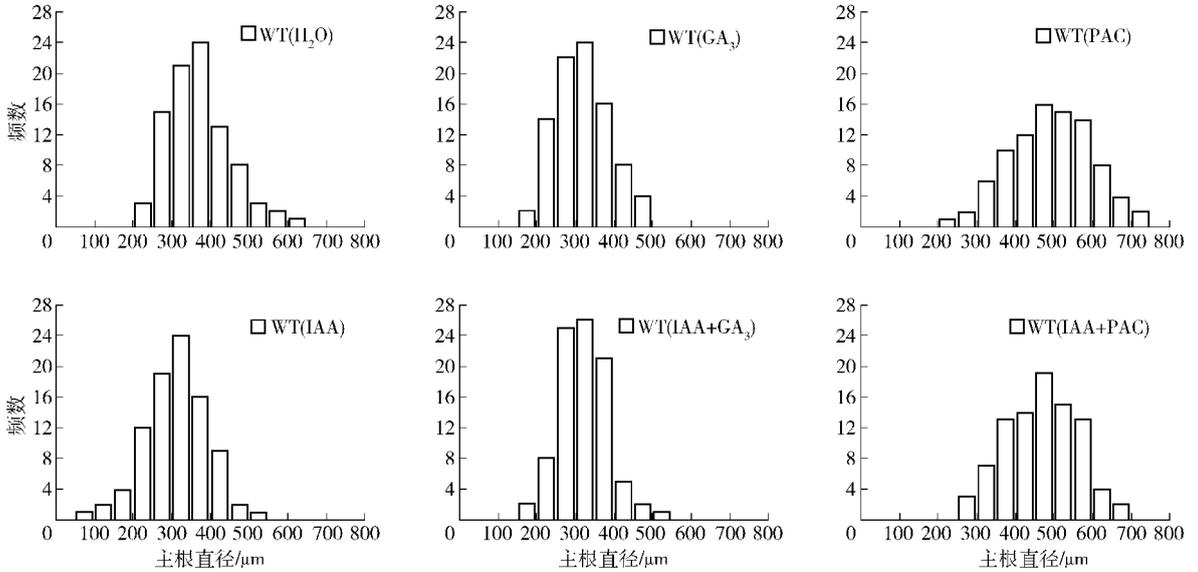


图2 外源激素处理对野生型烟草不定根尖径向生长的影响

Fig. 2 Effects of exogenous hormones treatment on radial growth of adventitious roots

注: WT(GA_3)指处理样本基因型为野生型(WT),施加 GA_3 处理。

2.2 遗传调控内源 GA 水平对植物生根的影响

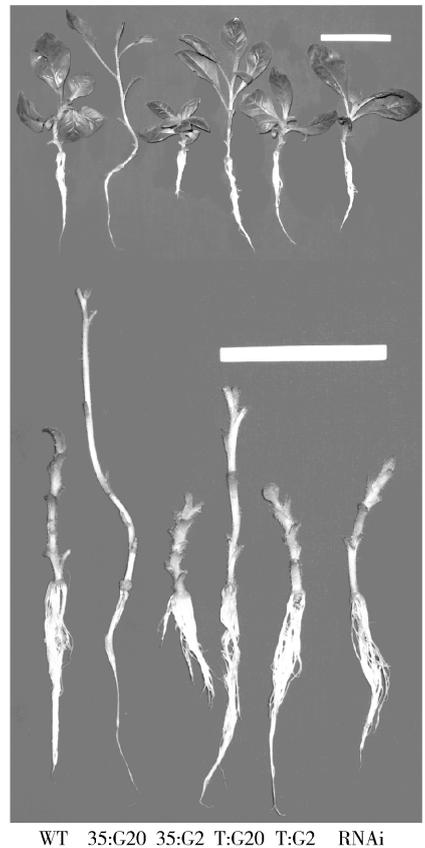
与前人的研究一致,通过转基因手段上调内源 GA 水平(35:G20, T:G20)会显著促进植株节间伸长,但节数并不增多(图3);伴随生根数量的减少,但促进根的伸长,不过根部特异表达植株不定根数量与 WT 相比并无显著差异(图4),主要是它介导的基因表达是发生在根原基形成之后的^[21]。与此相应的是下调内源 GA 水平(35:G2, T:G2 及 RNAi)会抑制植株节间伸长,并且同样抑制根的伸长(图3、4)。

2.3 根尖分生组织低 GA 水平促进根的径向生长

对转基因植株不定根进行大样本($n > 200$)统计分析结果表明,内源 GA 对根的径向生长具有调控作用(图5、6)。35:G20 植株根径平均值为314 μm ,与对照相比(338 μm)有极显著($P < 0.001$)差异, T:G20 植株引起的效应相对较弱(326 μm)。而35:G2, T:G2 与 RNAi 植株根径改变非常接近,平均值均增加到360 μm 左右(图6),说明低 GA 水平促进根的径向生长;而这种作用并非直接的激活作用,而与缺乏足够活性 GA 情况下根的正常伸长被抑制有关。

外源施加 GA_3 和 PAC 可以逆转转基因造成的差异,进一步证实这种影响是内源 GA 水平的改变引起的(图7)。在根尖分生组织调控 GA 的代谢可以得到组成型表达相似的效果,说明 GA 处理引起

根径改变是通过调节根尖分生组织的分化实现的。



WT 35:G20 35:G2 T:G20 T:G2 RNAi

图3 转基因植株的表型与生根情况

Fig. 3 Phenotypes and rooting of transgenic plants
注:上下图对应的为同一植株,白色标尺长度为5 cm。

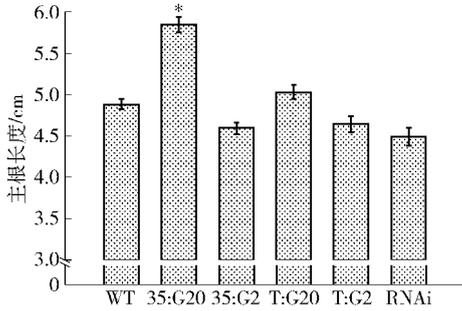


图4 遗传调控内源 GA 水平对转基因植株根伸长的影响

Fig. 4 Effects of modification of endogenous GA levels on primary root elongation of transgenic plants

注: * 表示在 $P < 0.05$ 水平显著。

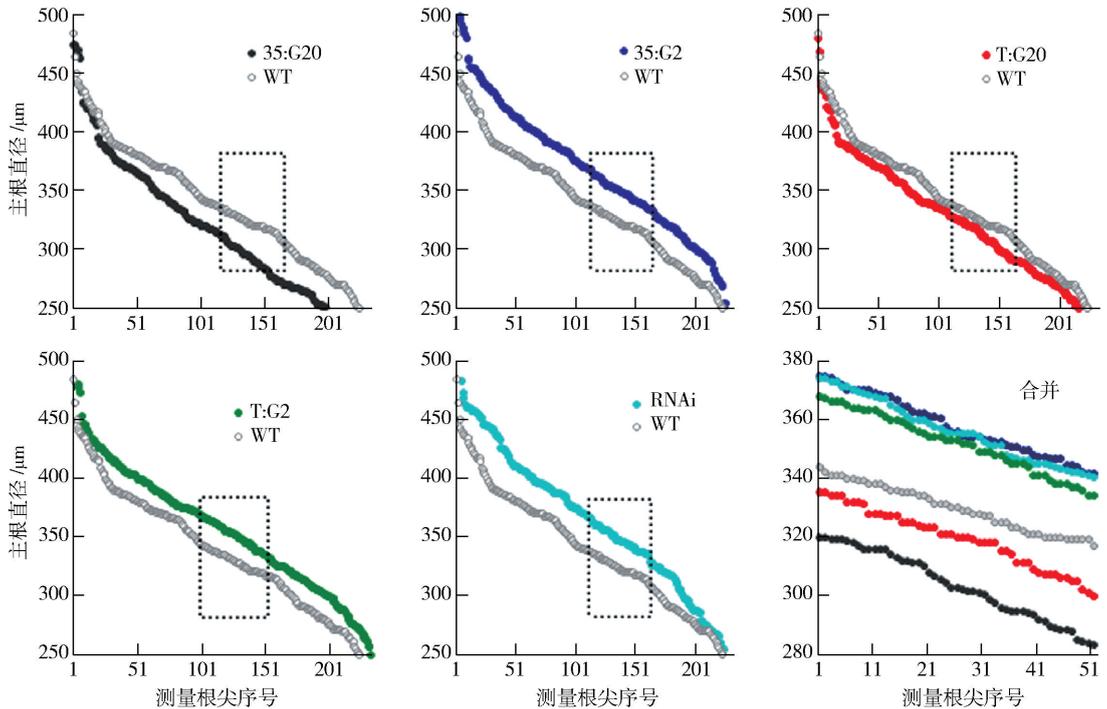


图5 遗传调控内源 GA 水平对转基因植株根尖径向生长的影响

Fig. 5 Effects of modification of endogenous GA levels on primary root diameter of transgenic plants

注: 每一个点对应一条不定根, 数值为对该样本显微图像中根径 3 次测量值的平均值。

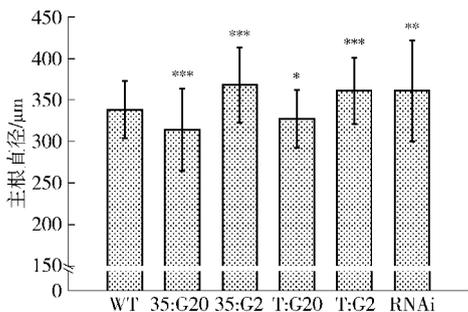


图6 遗传调控内源 GA 水平对转基因植株根径的影响

Fig. 6 Effects of modification of endogenous GA levels on the average primary root diameter of transgenic plants

注: *、** 和 *** 分别表示在 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 水平显著。

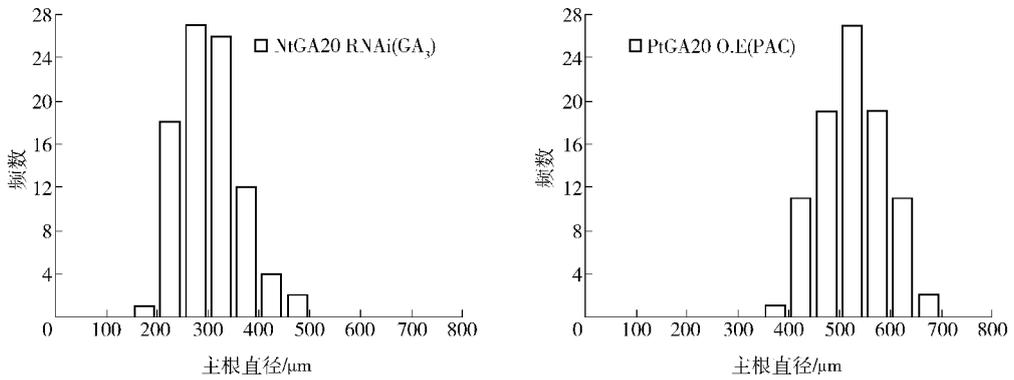
3 结论与讨论

由于在整个生命周期中,植物不能像动物那样自由移动,因此根系的发育对植物极其重要^[26],根系的生长也是改善作物产量的关键^[27];所以不同激素对植物根系的发育调控一直以来都是植物科学研究领域的热点。

赤霉素在根的生长发育过程中发挥着重要的调控作用。对于根的纵向生长,已经有大量的研究积累,然而对于 GA 在根的径向生长中的作用机制还未阐明。这可能是由于相对于纵向生长,径向生长的差异不明显,在模式植物的根系中很难用肉眼区

分。另外,经长期的进化选择,植物根系的生长对环境反应很敏感,只有通过大量样本进行观测并进行统计分析后才能区分这些差异。本文对野生型和转基因烟草植株在组织培养条件下的根系进行了大样本($n > 100$)显微观测,分析后发现 GA 对根的径向生长具有负调控作用,外施 GA 或利用转基因手段上调根中活性 GA 水平会造成根系的细长表型;相反,利用外施 GA 合成抑制剂或转基因手段下调根中的活性 GA 水平则会促进根的增粗。

研究表明,GA 对根伸长生长的调控定位于根尖分生区内皮层细胞^[8,28-29],此过程需要生长素和 DELLA 蛋白参与^[5]。本研究发现,GA 对根的径向生长的调控也定位于根尖分生区。超表达 GA 合成

图7 GA₃与PAC逆转外源基因表达对根径的影响Fig. 7 Effects of exogenous gene expression on the average primary root diameter were GA₃-and PAC-reversible

基因植株与根部特异表达植株相比对根径的影响更大,而单独施加 IAA 也会降低根径。有研究表明,外源施加 IAA 促进 GA 的合成^[30-32],反之,GA 对生长素的极性运输具有促进作用^[33]。生长素主要是由顶端分生组织产生并极性向下运输的^[34],因此可以推测组成型表达引起的效应很可能是伴随生长素极性运输的增强以及 GA 与生长素在根部的互作共同产生的;因而 GA 对根的径向生长的抑制作用与对根的伸长的促进作用是紧密相关的,很可能是同一效应的不同反映。

此外,与野生型相比,高于正常浓度的 GA 对根的径向生长的抑制具有剂量效应,而低于正常浓度的 GA 对根径增长的促进受到影响较小。由此推测,低水平 GA 对根尖径向生长的促进作用并非直接的激活而是通过抑制内皮层细胞的正常伸长达到的。在内皮层特异表达 GA 响应功能缺失突变的 DELLAs 蛋白会引起旁侧组织细胞的堆叠^[29]的研究结果支持这一观点。本研究首次证实了 GA 在根的径向生长上具有负调控作用,为 GA 对根生长发育调控机制研究提供了有益的补充。

参 考 文 献

- [1] GABRIELE S, RIZZA A, MARTONE J, et al. The Dof protein DAG1 mediates PIL5 activity on seed germination by negatively regulating GA biosynthetic gene *AtGA3ox1* [J]. *Plant J*, 2010, 61 (2): 312-323.
- [2] OGAWA M, HANADA A, YAMAUCHI Y, et al. Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(7): 1591-1604.
- [3] UBEDA-TOMAS S, BEEMSTER G T, BENNETT M J. Hormonal regulation of root growth: Integrating local activities into global behaviour [J]. *Trends Plant Sci*, 2012, 17(6): 326-331.
- [4] UEGUCHI-TANAKA M, NAKAJIMA M, KATOH E, et al. Molecular interactions of a soluble gibberellin receptor, GID1, with a rice DELLA protein, SLR1, and gibberellin [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(7): 2140-2155.
- [5] FU X, HARBERD N P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response [J]. *Nature*, 2003, 421 (6924): 740-743.
- [6] WILLIGE B C, GHOSH S, NILL C, et al. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(4): 1209-1220.
- [7] GRIFFITHS J, MURASE K, RIEU I, et al. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(12): 3399-3414.
- [8] UBEDA-TOMAS S, FEDERICI F, CASIMIRO I, et al. Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size [J]. *Curr Biol*, 2009, 19(14): 1194-1199.
- [9] EL-SHARKAWY I, EL K W, PRASATH D, et al. Identification and genetic characterization of a gibberellin 2-oxidase gene that controls tree stature and reproductive growth in plum [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(3): 1225-1239.
- [10] ERIKSSON M E, ISRAELSSON M, OLSSON O, et al. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(7): 784-788.
- [11] GOU J Q, STRAUSS S H, TSAI C J, et al. Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(3): 623-639.
- [12] GOU J, MA C, KADMIEL M, et al. Tissue-specific expression of *Populus* C₁₉ GA 2-oxidases differentially regulate above-and below-ground biomass growth through control of bioactive GA concentrations [J]. *New Phytol*, 2011, 192(3): 626-639.
- [13] FAGOAGA C, TADEO F R, IGLESIAS D J, et al. Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(6): 1407-1420.
- [14] CHANEY W R. Tree growth retardants: Arborists discovering new uses for an old tool [J]. *Tree Care Industry*, 2003, 54: 2-6.
- [15] BEROVA M, ZLATEV Z. Physiological response and yield of paclobutrazol treated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [J]. *Plant Growth Regul*, 2000, 30(2): 117.
- [16] GILMAN E F. Effects of amendments, soil additives, and irrigation on tree survival and growth [J]. *Journal of Arboriculture*, 2004, 30(5): 301-310.

- [17] YAMAGUCHI S. Gibberellin metabolism and its regulation [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59: 225-251.
- [18] HUANG Y, YANG W, PEI Z, et al. The genes for gibberellin biosynthesis in wheat [J]. *Funct Integr Genomics*, 2012, 12(1): 199-206.
- [19] PUGLIESI C, FAMBRINI M, SALVINI M. Molecular cloning and expression profile analysis of three sunflower (*Helianthus annuus*) diterpene synthase genes [J]. *Biochem Genet*, 2011, 49(1-2): 46-62.
- [20] MAURIAT M, SANDBERG L G, MORITZ T. Proper gibberellin localization in vascular tissue is required to control auxin-dependent leaf development and bud outgrowth in hybrid aspen [J]. *Plant J*, 2011, 67(5): 805-816.
- [21] YAMAMOTO Y T, TAYLOR C G, ACEDO G N, et al. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco [J]. *Plant Cell*, 1991, 3(4): 371-382.
- [22] ZHOU B B, CHEN X Y. RNAi plasmid construction of *PttGA20* oxidase gene [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008(4): 56-59.
- [23] 周冰彬. 赤霉素合成酶基因沉默诱导植物矮化的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009: 20-73.
- [24] 李伟. 转双价基因促进植物生根及顶端优势的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2004: 29-59.
- [25] 贾香楠, 李伟, 沈俊岭, 等. 基于 Cre/loxP 重组系统的多基因载体构建及烟草转化研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(5): 121-125.
- [26] NIBAU C, GIBBS D J, COATES J C. Branching out in new directions: The control of root architecture by lateral root formation [J]. *New Phytol*, 2008, 179(3): 595-614.
- [27] GEWIN V. Food: An underground revolution [J]. *Nature*, 2010, 466(7306): 552-553.
- [28] ACHARD P, GUSTI A, CHEMINANT S, et al. Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis* [J]. *Curr Biol*, 2009, 19(14): 1188-1193.
- [29] UBEDA-TOMAS S, SWARUP R, COATES J, et al. Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5): 625-628.
- [30] WOLBANG C M, ROSS J J. Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants [J]. *Planta*, 2001, 214(1): 153-157.
- [31] WOLBANG C M, CHANDLER P M, SMITH J J, et al. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(2): 769-776.
- [32] FRIGERIO M, ALABADI D, PEREZ-GOMEZ J, et al. Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(2): 553-563.
- [33] BJORKLUND S, ANTTI H, UDDESTRAND I, et al. Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: Gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin [J]. *Plant J*, 2007, 52(3): 499-511.
- [34] JACOBS M, GILBERT S F. Basal localization of the presumptive auxin transport carrier in pea stem cells [J]. *Science*, 1983, 220(4603): 1297-1300.

(责任编辑 赵 勃)