

铝抑制拟南芥根尖PIN2 循环和囊泡运输

沈宏^①, 侯凌艳^①, SCHLICHT Markus^②, WAN Ying Lang^②, MANCUSO Stefano^③,
BALUSKA Frantisek^②

① 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642;

② Institute of Cellular and Molecular Botany, University of Bonn, Bonn D-53115, Germany;

③ Electrophysiology Laboratory, Department of Horticulture, University of Florence, Florence I-50019, Italy

E-mail: hshen@scau.edu.cn

2008-03-20 收稿, 2008-05-21 接受

国家自然科学基金(批准号: 30771294, 30471040)、国际科学基金(批准号: C/3042-1, 2)和 DAAD(批准号: Ref423)资助项目

摘要 铝对植物毒害作用最明显的症状是迅速抑制根尖生长。然而, 铝抑制根尖生长的机制并不清楚。本文研究了铝对生长素和生长素运输载体(PIN2)囊泡运输的影响。结果表明, 铝抑制拟南芥根尖生长素运输, 其中过渡区生长素抑制率最高, 达 66%。布雷菲尔德菌素(Brefeldin A, BFA, 一种囊泡运输抑制剂)明显诱导 PIN2 囊泡在细胞内形成点状结构, 铝处理降低点状结构的大小, 表明铝抑制 PIN2 囊泡在细胞内的运输。实时定量 PCR 和蛋白印迹反应发现, 铝增加 PIN2 基因的转录表达, 促进 PIN2 蛋白在细胞膜水平方向累积。细胞骨架解聚药物处理表明, 铝抑制 PIN2 囊泡的运输, 主要通过破坏肌球蛋白微丝来完成。铝处理下, 拟南芥根尖伸长区细胞比过渡区具有较少的铝吸收和较低的囊泡运输频率。上述结果表明, 通过调节生长素运输载体(PIN2)在质膜与胞内移动, 阻碍生长素的运输, 铝抑制了拟南芥根尖的生长。

关键词

铝处理

PIN2

拟南芥

细胞骨架

生长素运输

铝毒是酸性红壤上影响作物生长最重要的限制因素之一, 其对植物的最初效应是抑制根系生长。一直以来, 根尖被认为是铝毒害的主要部位。根尖在感知重力和铝信号传递过程中起了重要作用^[1]。Hou 等人^[2]和 Baluska 等人^[3]利用细胞骨架去稳定剂(Latrunculin)破坏根尖肌动蛋白微丝, 导致了根尖向地性增强, 表明根尖细胞肌动蛋白微丝参与了根向地性信号传递的调节过程。近来研究表明, 根尖过渡区是根系感受铝胁迫最敏感的部位; 局部施铝显著抑制根尖过渡区的生长^[4-6]。然而铝抑制过渡区生长的原因并不清楚。

PIN 基因是生长素最重要输出载体, 原位可视化研究表明, PIN 蛋白的极性定位指导了生长素极性运输和非对称分布^[7-9]。在拟南芥和玉米上, PIN 蛋白能迅速完成质膜与胞内分室之间的囊泡运输^[10]。光照对生长素输出载体 PIN2 在细胞内分布起了决定性作

用^[11]。铝减少高尔基体的分泌作用, 导致维管束细胞重组, 诱导细胞骨架发生变化^[12-14]。目前, 并不清楚铝对 PIN 转录翻译及其在细胞内分布的影响。因此, 本研究将借助共聚焦激光显微镜, 明确铝对 PIN2 蛋白及生长素运输的影响, 为阐明铝抑制根尖生长的分子基础提供证据; 研究结果对定向选育耐铝毒的作物品种具有指导意义。

1 材料和方法

(i) 材料培育。拟南芥转基因材料包括生长素输出载体(PIN2::GFP)、肌动蛋白微丝(fimbrin actin-binding domain 2, ABD2::GFP)、微管蛋白(MAP4::GFP), 来源于俄亥俄州立大学拟南芥生物资源中心(Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC Ohio State University)和波恩大学细胞与分子植物研究所(Institute of Cellular and Molecular Botany, University of Bonn)。拟南芥种子转入灭菌的离心管中, 用 75%

乙醇消毒 2 min, 然后用 10%次氯酸钠溶液浸泡 5 min, 再用无菌水清洗 3 次. 在超净工作台中用灭菌的牙签将种子均匀播在 1/6 MS 培养基上, 培养基 pH 5.8, 1%葡萄糖. 播种完毕后, 将培养皿垂直放在光照培养箱中生长, 光照/黑暗时间分别为 14 h/10 h, 生长 6 d 后, 用于不同处理. 所有试剂购于 Sigma 公司(St. Louis, MO, USA). BFA (brefeldin A), Latrunculin B, Oryzalin 均溶于 DMSO 中, 先配成 10^{-2} mol/L 贮备液, 使用时稀释成工作液. 每个处理重复 5 次, 处理时间根据不同要求而定, 处理完毕后, 收获材料进行观察或进一步实验.

(ii) 根系生长实验. 无菌条件下, 将拟南芥种子种植在固态 MS 培养基上, 生长 6 d 后, 选取大小一致幼苗转移到 0, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 溶液中处理 10 min, 然后将幼苗转移到含有 0, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理的培养基上, 用毛笔尖将中性红标计在根尖不同位置, 每 1 mm 标计一下, 然后放在光照培养箱中生长 24 h, 用尺子测量, 计算拟南芥不同根段的生长量.

(iii) 根尖生长素运输的原位观察. 拟南芥幼苗在固态培养基上生长 6 d 后, 分别转移到含有 0, 50 $\mu\text{mol/L}$ BFA 或 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 的浓度为 0.2 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5)中处理 2 h, 处理完毕后, 将幼苗放置于 0, 50 $\mu\text{mol/L}$ BFA, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 培养基上, 然后用生长素选择微电极测定生长素在不同区域的浓度, 生长素选择微电极放在距根表 2 μm 处, 传感器振动频率为 0.1 Hz, 通过与生长素参比电极相比, 测定根尖生长素浓度, 具体方法参考文献[15].

(iv) 激光共聚焦显微观察. 拟南芥转基因材料在 MS 培养基上生长 6 d 后, 分别转移到含有 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA, 100 $\mu\text{mol/L}$ Al , 20 $\mu\text{mol/L}$ Latrunculin 或 10 $\mu\text{mol/L}$ Oryzalin 的浓度为 0.2 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5)中处理 2 h. 处理完毕后, 拟南芥幼苗放置在载玻片上, 在载玻片加 1 滴处理溶液, 盖上盖玻片, 放在激光共聚焦显微镜下观察. 观察过程中, 所有样品的显微镜与激光条件保持一致. 为防止样品因观察时间过长(超过 2 min)而脱水, 观察过程中应加相同处理溶液. 每个处理植株观察量均为 10 株以上, 获取典型图片. 根尖铝累积通过间接荧光方法测定, 铝在根尖的累积与 Morin 荧光物质强度呈正比, 荧光越亮, 铝累积越多, 具体方法参考文献[16]. 激光共聚焦显微镜为 Eclipse 800 (Nikon, Tokyo, Japan), 配

备有 Argon 激光(488 nm, 绿色; He, Ne 激光为 543 nm, 1.4 mW; 红色的二极管激光为 638 nm, 5 mW), 用于自荧光检测.

(v) RNA 提取及 RT-PCR. 拟南芥幼苗在培养基上生长 6 d 后, 取整齐一致的幼苗放置含有 0, 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 或 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA + 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 的浓度为 0.2 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5)中处理 2 h. 处理完毕后, 用 Trizol 提取根系总 RNA, 然后按 Invitrogen 公司说明书进行实时定量 RT-PCR. *PIN2* 基因正向引物为 5'-TAT CAA CAC TGC CTA ACA CG-3', 反向引物为 5'-GAA GAG ATC ATT GAT GAG GC-3'. β -tubulin 作为内参 (At5g12250). β -tubulin 的正向和反向引物分别为 5'-TGG GAA CTC TGC TCA TAT CT-3' 和 5'-GAA AGG AAT GAG GTT CAC TG-3'.

(vi) 蛋白印迹反应. 拟南芥幼苗在培养基上垂直生长 6 d 后, 然后将其转移到 0, 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 或 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA + 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 的浓度为 0.2 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5)中处理 2 h. 处理完毕后, 收获 1 cm 根尖, 采用相分离 (phase-partitioning) 方法分别提取根系质膜蛋白和囊泡蛋白, 质膜囊泡溶解在 SDS-loading 缓冲液, 含有 0.125 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 10% (质量体积比) SDS, 10% (体积比) 甘油, 0.2 mol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 0.002% (质量体积比) 溴酚兰, 5 mmol/L 苯甲磺酰氟化物. 经过 SDS-PAGE 后, 转入去氟 PVP 膜片 (0.2 μm) 上, 然后进行杂交反应. 为鉴定和量化 PIN 蛋白, 将膜片与抗玉米多克隆抗体杂交. 抗血清溶液用 Tris 缓冲液 + Tween 按 1:1000 稀释使用, 二次抗体检测使用 BCIP-NPT 方法进行, 具体方法见文献 [17].

(vii) 统计分析. 水培实验设 2~4 个处理, 每个处理重复 5~10 次, 所有数据均采用 Excel 和 SAS 软件进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 铝对拟南芥根系生长的影响

拟南芥根系比较细小, 为调查其不同根段对铝胁迫的敏感性, 采用了如下方法: 拟南芥幼苗在培养基上生长 6 d 后, 取整齐一致的幼苗, 在含有 0, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 的浓度为 0.2 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5)中处理 10 min, 然后放置在含有 0, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3

的培养基上, 用中性红标计不同根段, 密封培养皿, 垂直放在光照培养箱中生长 24 h 后, 用直尺测量不同根段的伸长量. 分析不同根段对铝的敏感性发现(图 1), 铝明显降低拟南芥根系生长, 其中根尖 0~1 mm 区域对铝最为敏感, 其他根段(1~2, 2~3, 3~4 mm)之间对铝胁迫反应没有明显差异. Baluska 等人^[18]认为, 生长 5~7 d 的拟南芥, 根尖 0.2~0.4 mm 为其过渡区, 该区细胞分裂比较频繁. 在玉米上, Kollmeier 等认为^[19]为根尖过渡区 1~2 mm 的区域对铝最为敏感. 在菜豆上, Rangel 等人^[5]也认为根尖 1~2 mm 的区域对铝最敏感.

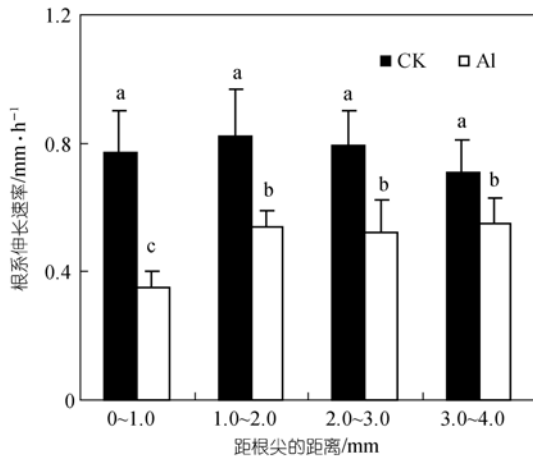


图 1 铝对拟南芥根尖不同根段生长的影响

数据为平均值±标准差($n = 10$), 不同字母表示差异显著($P < 0.05$). CK, Al 分别表示 0, 100 $\mu\text{mol/L}$ Al 处理

2.2 铝抑制生长素运输

由于生长素在根系伸长过程中具有重要作用, 为探讨铝抑制根尖伸长的机理, 借助生长素选择微电极, 研究了铝处理下根尖 0~1.5 mm 区域的生长素运输(图 2). 结果表明, 正常生长条件下, 生长素在根尖 0.25 mm 处浓度最高, 为 $183 \text{ fmol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 显著高于其他根段(0~0.125, 0.5~1.5 mm). 铝和 BFA 处理明显降低生长素浓度. 在根尖 0.25 mm 处, 铝和 BFA 处理的生长素浓度分别仅为正常生长条件下的 34.3% 和 25.1%. 铝处理显著降低拟南芥根尖 0.125~0.5 mm 处生长素的浓度(图 2). BFA 处理对生长素的抑制效果大于铝处理. 在根尖 0.5~1.5 mm 处, 铝降低生长素浓度, 但降低幅度没有过渡区(0.1~0.4 mm)大.

2.3 铝抑制 PIN2 囊泡的循环

囊泡运输抑制剂布雷菲尔德菌素(BFA)对植物高

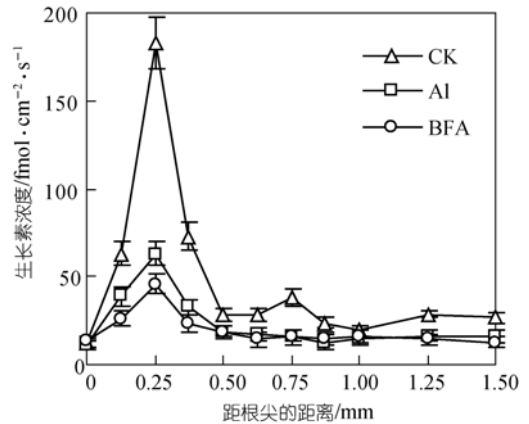


图 2 拟南芥根尖生长素浓度的实时观察

拟南芥根系在含有 0, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 , 50 $\mu\text{mol/L}$ BFA 的浓度为 0.2 mmol/L CaCl_2 溶液(pH 4.5)中处理 2 h, 然后放在培养基上, 用生长素选择电极测定不同根段生长素浓度, 数据为平均值±标准差($n = 5$)

尔基体、内膜的分泌具有可逆反应^[20,21]. BFA 抑制细胞胞吐作用, 但不影响其内吞作用^[22]. 为研究铝抑制生长素运输的机理, 利用 BFA 研究了铝对生长素输出载体(PIN2)囊泡运输的影响(图 3). 结果发现, 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA 处理能诱导 PIN2 在根尖过渡区细胞内形成明显的点状结构(图 3(b)); 单独铝处理并不能诱导细胞内点状结构的形成(图 3(c)); 但是, 铝预处理或铝+BFA 处理能降低 BFA 诱导 PIN2 点状结构的大小(图 3(d)和(e)). 并且随着铝处理时间延长或铝处理浓度增加, BFA 诱导的点状结构变小. 而且 BFA 诱导的点状结构经过 2 h 铝溶液淋洗后, 点状结构消失(图 3(f)). 有趣的是, 铝处理下, 位于细胞水平方向上质膜荧光强度加深, 即 PIN2 囊泡有累积趋势(图 3(c)).

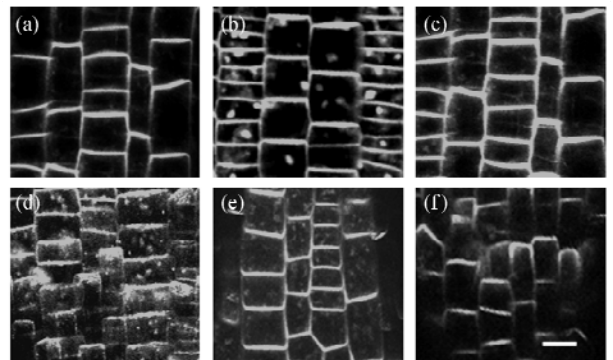


图 3 拟南芥根尖 PIN2 的囊泡运输

(a) 对照; (b) 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA 处理 2 h; (c) 100 $\mu\text{mol/L}$ Al 处理 2 h; (d) 100 $\mu\text{mol/L}$ Al 预处理 1 h, 然后 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA 处理 2 h; (e) 100 $\mu\text{mol/L}$ Al + 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA 处理 2 h; (f) 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA 处理 2 h, 然后 100 $\mu\text{mol/L}$ Al 淋洗 2 h. 标尺示 8 μm

2.4 PIN2 基因的转录、翻译变化

铝抑制 PIN2 蛋白在细胞内形成点状结构大小(图 3), 为探讨其内在机理, 研究了铝和 BFA 对 PIN2 基因的转录影响. 图 4 表明, 铝处理增加 PIN2 的转录表达, 但 BFA 对铝处理或非铝处理下 PIN2 的转录表达不产生影响(图 4). 图 5 结果表明, BFA 降低 PIN2 囊泡蛋白在质膜上的分布, 增加其在核内体的分布; 相反, 铝处理增加 PIN2 囊泡蛋白在质膜上的分布, 并降低其在核内体中的分布(图 5). 结合图 4 和 5 可以看出, 铝影响 PIN2 的转录、翻译变化, 但 BFA 仅影响 PIN2 囊泡蛋白在质膜与核内体之间的分配, 表明它们对 PIN2 囊泡蛋白的影响机理不同.

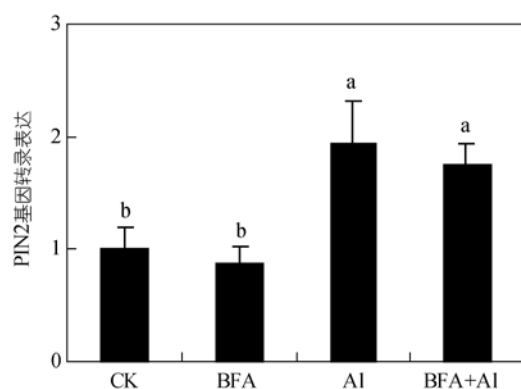


图 4 拟南芥根尖 PIN2 基因转录表达

拟南芥幼苗在培养基上生长 6 d, 挑选大小一致的幼苗转入不同处理(CK, 对照; BFA, 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA 处理; Al, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理; BFA + Al, 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA + 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理)溶液中生长 2 h, 处理完毕后, 收获 1 cm 根尖, 提取 RNA, 实时定量 RT-PCR, β -tubulin 基因为内标; 数据为平均值 $\pm$ 标准差($n=5$)

2.5 PIN2 囊泡蛋白的运输

铝抑制 PIN2 囊泡蛋白在细胞内运输, 增加其在质膜上的累积(图 5). 为探讨铝阻碍 PIN2 囊泡蛋白在胞内运输的机理, 借助细胞骨架解聚剂研究了 PIN2 囊泡蛋白沿细胞骨架的运输情况(图 6). 图 6(b)为 BFA 诱导 PIN2 囊泡形成清晰的点状结构. Latrunculin B(Lat), 一种肌动蛋白微丝解聚剂, 处理拟南芥根尖过渡区细胞 2 h, 发现, Lat 处理使 BFA 诱导形成的点状结构消失(图 6(c)). 而 Oryzalin, 一种微管蛋白解聚剂, 处理拟南芥根尖过渡区细胞发现, Oryzalin 并不影响 PIN2 囊泡在细胞内形成的点状结构(图 6(d)). 这表明, 破坏肌动蛋白微丝, 使 BFA 诱导 PIN2 囊泡的点状结构消失(图 6(c)), 而破坏微管蛋白, 并不影响点状结构(图 6(d)), 因此, PIN2 囊泡在细胞内运输很

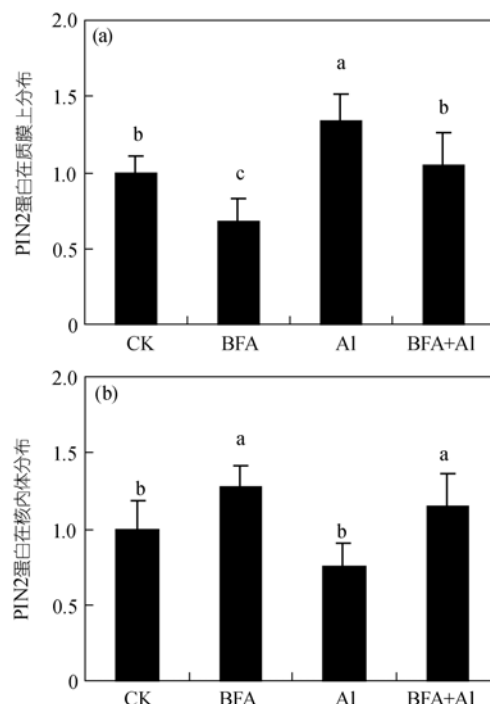


图 5 拟南芥根尖 PIN2 囊泡蛋白在质膜(a)及核内体(b)的分布

拟南芥幼苗在培养基上生长 6 d, 挑选大小一致的幼苗转入不同处理(CK, 对照; BFA, 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA 处理; Al, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理; BFA + Al, 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA + 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理)溶液中生长 2 h, 处理完毕后, 收获 1 cm 根尖, 按照相分离的方法, 提取质膜蛋白和核内体蛋白, 蛋白印迹分析. 数据为平均值 $\pm$ 标准差($n=5$)

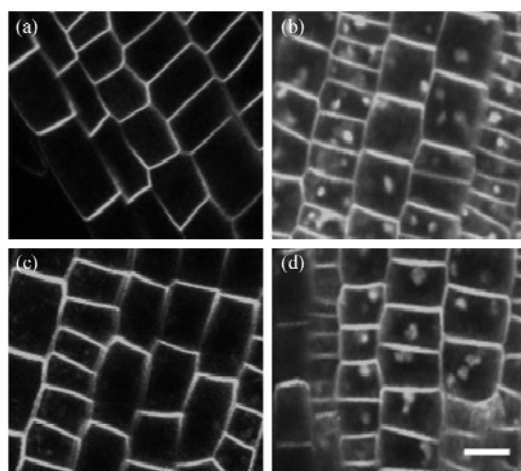


图 6 细胞骨架解聚剂对 PIN2 囊泡在细胞内形成点状结构的影响

拟南芥幼苗在培养基上生长 6 d, 挑选大小一致的幼苗转入不同处理((a) 对照; (b) 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA 处理; (c) 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA + 20 $\mu\text{mol/L}$ Latrunculin 处理; (d) 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA + 10 $\mu\text{mol/L}$ Oryzalin 处理)溶液中生长 2 h, 处理完毕后, 取根尖过渡区细胞进行观察. 标尺示 8 μm

可能通过肌动蛋白微丝途径进行。

2.6 铝对拟南芥根尖细胞骨架的影响

Sivaguru等人^[23]通过酶联免疫分析方法研究发现, 90 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理 1 h能诱导玉米根尖过渡区细胞肌动蛋白微丝发生明显变化。借助拟南芥肌动蛋白微丝(*ABD2::GFP*)和微管(*MAP4::GFP*)转基因材料, 研究了铝对细胞骨架的影响。从图 7 可以看出, 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理 2 h明显改变根尖过渡区细胞肌动蛋白微丝排列, 使肌动蛋白微丝排列无序化(图 7(b))。铝对细胞微管束也有一定影响, 铝处理后, 微管束之间排列偏向疏松(图 7(d))。相比之下, 微丝比微管对铝更敏感。由于铝胁迫主要破坏细胞肌动蛋白微丝(图 7), 且PIN2 囊泡蛋白的胞内运输主要通过肌动蛋白微丝来完成(图 6), 这表明铝抑制PIN2 囊泡在细胞内分布, 很可能通过破坏肌动蛋白微丝的途径来实现。

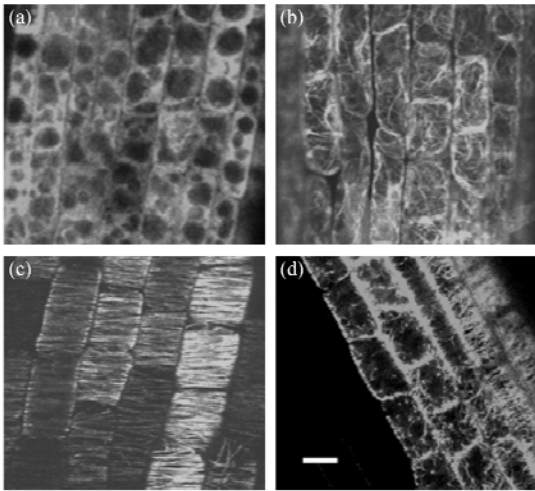


图 7 铝对拟南芥根尖细胞骨架的影响

拟南芥幼苗在培养基上生长 6 d, 挑选大小一致的幼苗转入不同处理((a) 对照; (b) 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理; (c) 对照; (d) 100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理)溶液中生长 2 h, 处理完毕后, 取根尖过渡区细胞进行观察。标尺示 6 μm

2.7 PIN2 囊泡在根尖过渡区与伸长区细胞中的运输与铝累积

在实验过程中, 我们还发现PIN2 囊泡在根尖过渡区和伸长区细胞中运输频率差异较大(图 8)。BFA 处理条件下, 根尖过渡区细胞内的点状结构明显多于伸长区细胞(图 8(b)~(d))。Illes等人^[24]发现, 根尖过渡区细胞比伸长区细胞对铝更敏感。借助荧光物质(morin)染色, 研究了拟南芥根尖过渡区和伸长区细

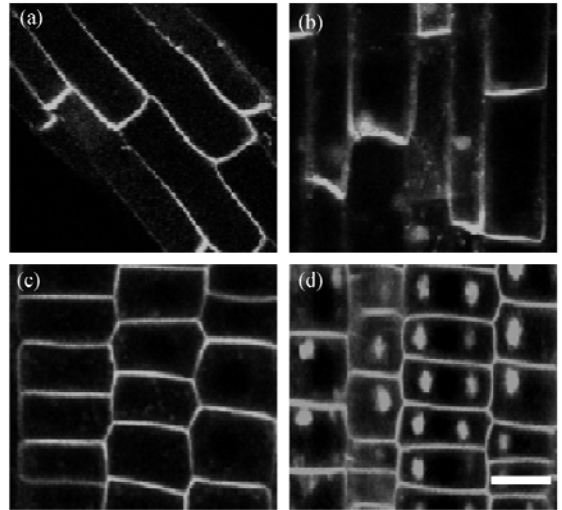


图 8 拟南芥根尖过渡区和伸长区细胞 PIN2 囊泡运输

(a)和(b) 伸长区细胞; (c)和(d) 过渡区细胞。(a)~(c) 对照; (b)~(d) 20 $\mu\text{mol/L}$ BFA 处理。拟南芥幼苗在培养基上生长 6 d 后, 挑选大小一致的幼苗在不同处理溶液中生长 2 h, 处理完毕后, 取根尖细胞进行观察。标尺示 8 μm

胞的铝累积, 发现铝处理条件下, 根尖过渡区细胞荧光强度明显高于伸长区细胞(图 9(b)~(d)), 表明根尖过渡区细胞积累的铝多于伸长区细胞。不加铝条件下, 根尖过渡区和伸长区细胞有少量荧光强度 (图 9(a)~(c)), 这主要是 morin 吸附在根表, 难以完全洗掉。

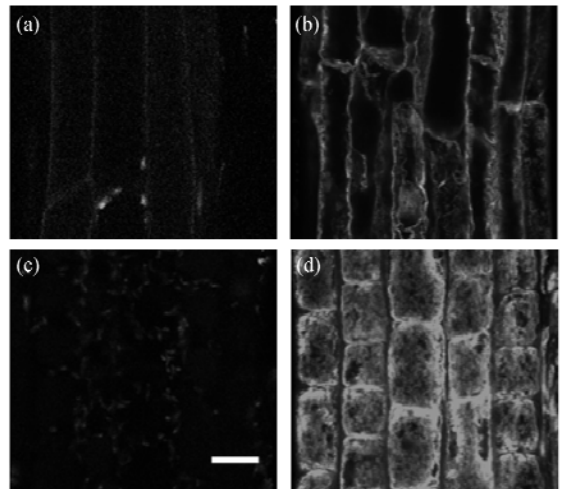


图 9 拟南芥根尖过渡区和伸长区细胞的 morin 染色

(a)和(b) 伸长区细胞; (c)和(d) 过渡区细胞。(a)~(c) 对照; (b)~(d) 100 $\mu\text{mol/L}$ Al 。拟南芥幼苗在培养基上生长 6 d 后, 挑选大小一致的幼苗在不同处理溶液中生长 2 h, 处理完毕后, 进行 morin 染色、洗脱。取根尖细胞进行观察。标尺示 6 μm

3 讨论

Baluska等人^[18]及Verbelen等人^[25]认为,拟南芥幼苗根尖主要由根冠、分生区、过渡区、伸长区及成熟区细胞组成,其中过渡区细胞主要位于距根尖0.2~0.4 mm的区域.该区细胞处于有丝分裂的旺盛期,为细胞迅速伸长作准备,这个区域对一系列环境刺激特别敏感.图1结果表明,根尖0~1 mm区域对铝处理最敏感,这与上述观点相一致.Sivaguru等人^[23]发现,玉米根尖过渡区对铝最敏感,局部施铝不影响伸长区细胞生长,但抑制过渡区细胞生长.在玉米^[4,19]和菜豆^[5]上,铝处理最敏感的区域主要位于根尖1~2 mm的区域.由于作物种类不同,根尖过渡区细胞距根尖距离也不同,这与不同物种的遗传特性有关.玉米和菜豆根尖0~1 mm区域对铝具有较低的敏感性,可能是根冠黏胶质与铝结合,保护了铝对根尖细胞的损害^[4,5].生长素由地上部合成,通过韧皮部向根尖分生组织运输,并从中柱细胞进入皮层和表皮细胞,然后基性运输到伸长区细胞^[26,27].抑制生长素的基性运输将导致根尖膨胀、根尖过渡区细胞生长素累积^[8,28].在玉米根尖,铝、NPA (*n*-1-Naphtyl-phthamic acid)、TIBA (2,3,5-triiodobenzoic acid)处理明显抑制生长素从根尖过渡区向伸长区运输,抑制效果表现为NPA>Al>TIBA,且铝敏感性品种抑制率更大^[19,29].图2结果表明,根尖0.25 mm处生长素累积最高,对铝毒胁迫最敏感,铝对生长素抑制率达66%;BFA对过渡区生长素运输具有强烈的抑制作用.铝对根尖0.1~0.5 mm区域细胞生长素运输的抑制效果较其他根段明显,这与Kollmeier等人^[19]和Schlicht等人^[29]报道的结果一致.上述结果表明,铝主要抑制根尖过渡区细胞生长素的运输,从而抑制根尖生长.在农业生产中,可通过施用有机肥和石灰降低根际土壤pH或者熟化耕作层土壤,可以避免根尖最敏感部位直接接触铝离子,缓解铝对根系的毒害作用.另外,通过滴灌施肥等现代施肥技术,直接对根系施肥,定位调控根系生长,也可以降低铝对根系的毒害作用.

Petrasek等人^[30]研究发现,PIN2的表达与细胞定位调节了生长素的基性运输;且PIN2主要在根尖上端的皮层细胞中表达,指导生长素从根尖向伸长区运输.重力作用下,伸长区细胞较低一侧累积有含量较高的生长素,调节根系弯曲^[31].Doncheva等人^[32]研

究发现,短期铝处理可以逆转生长素运输.本研究中,铝增加PIN2基因的转录表达、阻碍PIN2蛋白从质膜向细胞内运输、增加PIN2在质膜上的累积(图4和图5),从而阻碍生长素运输(图2).铝抑制PIN2蛋白运输卷入了转录、翻译调节过程;而BFA仅影响PIN2蛋白的分配.Schwarzerova等人^[14]研究发现,铝对烟草悬浮细胞骨架影响非常迅速,几小时内,铝诱导了皮层细胞形成额外维管束,延长铝处理时间导致维管束方向定位发生明显改变,大大降低细胞的活性.借助肌动蛋白微丝(*ABD2::GFP*)和微管(*MAP4::GFP*)拟南芥转基因材料,结果发现,100 $\mu\text{mol/L}$ AlCl_3 处理2 h明显影响肌动蛋白微丝排列,铝能诱导肌动蛋白微丝弯曲、疏松、无序化(图7(b)).Mathur等人^[33]对过氧化物酶(peroxisome)和细胞骨架元素同时进行可视化研究发现,过氧化物酶主要沿着肌动蛋白微丝移动.这表明肌动蛋白微丝可能是细胞响应铝胁迫的一个敏感因子.结合图6和图7的结果可以推断,铝可能通过破坏肌动蛋白微丝,阻碍PIN2囊泡蛋白向胞内运输,从而抑制根尖过渡区生长素运输.这些结果对指导定向选育抗铝毒作物品种具有重要意义.例如,通过超量表达耐铝且编码肌动蛋白微丝的基因,可以有效避免铝离子对肌动蛋白微丝破坏作用,从而保证生长素的正常运输及根系生长,这为定向选育耐铝的作物品种提供了理论依据.包方等人^[34]应用cDNA阵列技术成功鉴定出生长素应答基因,这为进一步研究铝与生长素相互作用机制奠定了工作基础.

Yang等人^[6]研究发现,水稻细胞壁多糖含量与水稻耐铝性相关.Hossain等人^[35]发现,作物铝累积与细胞壁果胶内质化有关.Illes等人^[24]发现根尖过渡区细胞果胶内质化比较频繁.图8表明,BFA诱导PIN2点状结构在过渡区细胞的数目明显多于伸长区细胞,PIN2蛋白在过渡区的频繁运输与铝在细胞内的内质化,即铝累积有关.图8和图9的结果正好支持了这一假设,即过渡区细胞中铝累积高于伸长区细胞.上述研究表明,铝调节拟南芥根尖过渡区生长素运输载体(PIN2基因)的转录、翻译过程.沿着肌动蛋白微丝途径,铝抑制PIN2囊泡在细胞内形成点状结构,诱导PIN2蛋白在细胞质膜水平方向上累积,通过该过程,铝破坏生长素基性运输,从而抑制根系生长过程.

参考文献

- 1 Ryan P R, Tomaso J M, Kochian L V. Aluminum toxicity in roots: An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J Exp Bot*, 1993, 44: 437—446 [\[doi\]](#)
- 2 Hou G, Mohamalawari D R, Blancaflor E B. Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton. *Plant Physiol*, 2003, 131: 1360—1373 [\[doi\]](#)
- 3 Baluska F, Volkmann D, Barlow P W. Specialized zones of development in roots: View from the cellular level. *Plant Physiol*, 1996, 112: 3—4
- 4 Sivaguru M, Horst W J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of *Zea mays* L. *Plant Physiol*, 1998, 116: 155—163 [\[doi\]](#)
- 5 Rangel A F, Rao I M, Horst W J. Spatial aluminium sensitivity of root apices of two common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes with contrasting aluminium resistance. *J Exp Bot*, 2007, 58(14): 3895—3904 [\[doi\]](#)
- 6 Yang J L, Li Y Y, Zhang Y J, et al. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiol*, 2007, 146: 602—611 [\[doi\]](#)
- 7 Galweiler L, Guan C H, Muller A, et al. Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 1998, 282: 2226—2230 [\[doi\]](#)
- 8 Muller A, Guan C, Galweiler L, et al. *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J*. 1998. 17: 6903—6911 [\[doi\]](#)
- 9 Wisniewska J, Xu J, Seifertova D, et al. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 2006, 312 (5775): 883 [\[doi\]](#)
- 10 Boutte Y, Crosnier M T, Carraro N, et al. The plasma membrane recycling pathway and cell polarity in plants: Studies on PIN proteins. *J Cell Sci*, 2006, 119: 1255—1265 [\[doi\]](#)
- 11 Laxmi A, Pan J, Morsy M, et al. Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 2008, 3(1): 1510—1518 [\[doi\]](#)
- 12 Bennet R J, Breen C M. The aluminum signal: New dimensions to mechanisms of aluminum tolerance. *Plant Soil*, 1991, 134: 153—166
- 13 Blancaflor E B, Jones D L, Gilroy S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiol*, 1998, 118: 159—172 [\[doi\]](#)
- 14 Schwarzerova K, Zelenova S, Nick P, et al. Aluminum-induced rapid changes in the microtubular cytoskeleton of tobacco cell lines. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 207—216 [\[doi\]](#)
- 15 Mancuso S, Marras AM, Volker M, et al. Noninvasive and continuous recording of auxin fluxes in intact root apex with a carbon-nanotube-modified and self-referencing microelectrode. *Anal Biochem*, 2005, 341: 344—351 [\[doi\]](#)
- 16 Zheng S J, Yang J L, He Y F, et al. Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiol*, 2005, 138: 297—303 [\[doi\]](#)
- 17 Shen H, He L F, Sasaki T, et al. Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress: Up-regulation of transcription, translation and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol*, 2005, 138: 287—296 [\[doi\]](#)
- 18 Baluska F, Vitha S, Barlow P W, et al. Rearrangements of F-actin arrays in growing cells of intact maize root apex tissues: A major developmental switch occurs in the postmitotic transition region. *Euro J Cell Biol*, 1997, 72: 113—121
- 19 Kollmeier M, Felle H H, Horst W J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? *Plant Physiol*, 2000, 122: 945—956 [\[doi\]](#)
- 20 Baluska F, Hlavacka A, Samaj J, et al. F-actin dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from brefeldin A-induced compartmentss. *Plant Physiol*, 2002, 130: 422—431 [\[doi\]](#)
- 21 Samaj J, Read N D, Volkmann D, et al. The endocytic network in plants. *Trend Cell Biol*, 2005, 15(8): 425—433 [\[doi\]](#)
- 22 Baluska F, Volkmann D, Menzel D. Plant synapses: Actin-based adhesion domains for cell-to-cell communication. *Trend Plant Sci*, 2005, 10: 106—111
- 23 Sivaguru M, Baluška F, Volkman D, et al. Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short-term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiol*, 1999, 119: 1073—1082 [\[doi\]](#)
- 24 Illes P, Schlicht M, Pavlovkin J, et al. Aluminium toxicity in plants: Internalization of aluminum into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices relates to changes in plasma membrane potential, endosomal behaviour, and nitric oxide production. *J Exp Bot*, 2006, 57: 4201—4213 [\[doi\]](#)
- 25 Verbelen J P, De Cnodder T, Le J, et al. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of cellular activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone, and growth terminating zone. *Plant Signal Behav*, 2006, 1: 296—304
- 26 Estelle M. Polar auxin transport: New support for an old model. *Plant Cell*, 1998, 10: 1775—1778 [\[doi\]](#)
- 27 Hasenstein K H, Blancaflor E B, Lee J S. The microtubule cytoskeleton does not integrate auxin transport and gravitropism in maize roots. *Physiol Plant*, 1999, 105: 729—738 [\[doi\]](#)
- 28 Hasenstein K H, Evans M L. Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiol*, 1988, 86: 890—894

- 29 Schlicht M, Miroslav S, Michael J S, et al. Auxin immunolocalization implicates vesicular neurotransmitter-like mode of polar auxin transport in root apices. *Plant Sign Behav*, 2006, 1(3): 122—134
- 30 Petrasek J, Mravec J, Bouchard R, et al. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, 2006, 312: 914—918 [\[doi\]](#)
- 31 Abas L, Benjamins R, Malenica N, et al. Intracellular trafficking and proteolysis of the Arabidopsis auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(3): 249—256 [\[doi\]](#)
- 32 Doncheva S, Amenos M, Poschenrieder C, et al. Root cell patterning: A primary target for aluminium toxicity in maize. *J Exp Bot*, 2005, 56: 1213—1220 [\[doi\]](#)
- 33 Mathur J, Mathur N, Hulskamp M. Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. *Plant Physiol*, 2002, 128: 1031—1045 [\[doi\]](#)
- 34 包方, 胡玉欣, 李家洋. 用cDNA阵列技术鉴定拟南芥生长素应答基因. *科学通报*, 2001, 46(23): 1988—1992 [\[doi\]](#)
- 35 Hossain A Z, Koyama H, Hara T. Growth and cell wall properties of two wheat cultivars differing in their sensitivity to aluminum stress. *J Plant Physiol*, 2006, 163: 39—47

· 动态 ·

植物茎端分生组织调节机制研究新进展

植物可以连续不断地向上向下生长, 主要原因是茎端和根端的分生组织中存在一些具有细胞全能性特征的干细胞(stem cell)。地上部分来源于茎端分生组织(shoot apical meristem, SAM), 经典结构呈半球状穹型, 由原套-原体组成。干细胞位于分生组织的中心区域, 它们分裂后的一部分细胞转移到周围区域, 转化为器官原基, 最终发育为叶、花等器官。干细胞要保证连续不断地自我更新和平衡, *WUS-CLV3* 负反馈调节环在其中扮演重要角色, *WUS* 只在中心区域下方的几个细胞即组织中心(organization center, OC)中表达, 促进干细胞库的增大; *CLV3* 是干细胞标志基因, 抑制 *WUS* 的表达从而控制干细胞库的大小。到目前为止, 尚未发现其他能有效调控 *WUS* 表达的机制。近期, 北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室朱玉贤教授实验室发现, 一个新的调节因子 *BARD1* 可以限制 *WUS* 在组织中心区的表达^[1]。

研究发现, *bard1-3* 完全敲除突变体在茎端分生组织表现出剧烈异常, 大量细胞快速增生, 但是没有正常的组织分化, 只形成许多管状的突起。根部在形成侧根的位置形成了大量细胞堆积的瘤状结构。通过检测包括 *WUS*, *CLV3* 及 *STM* 等分生组织基因以及生长素、细胞分裂素和细胞周期等通路的共 25 个关键基因在该突变体中的转录本水平, 发现 *WUS* 的变化最剧烈, 为野生型的 238 倍左右, 同时表达区域也从 OC 转移到外面的几层细胞。凝胶阻滞实验结果表明, 野生型核提取物可以与 *WUS* 上游启动子区(F4) DNA 形成 DNA-蛋白复合物, 而在 *bard1-3* 中无法形成, 这种 DNA-蛋白复合物可以被特异性识别 *BARD1* 蛋白的抗体所识别。遗传学分析表明, *wus-1 bard1-3* 双突变体的表

型和 *wus-1* 的表型相似, 而 *bard1-3* 茎端分生组织的表型在双突变体中被抑制。过量表达的 *CaMV35S::BARD1* 转基因拟南芥的茎端分生组织也出现提前终止以及“停停走走”的模式, 与 *wus-1* 类似, 这种表型和 *WUS* 的基因转录水平下降到野生型的 25% 左右有直接关系。以上结果表明, *BARD1* 可能通过限制 *WUS* 在 OC 特异地表达进而调节茎尖分生组织功能。但是, 已报道的 *bard1-1*, *1-2* 在茎端分生组织与野生型类似, 仅在 DNA 损失修复中有重大缺陷。他们对此进行了进一步分析。发现在 *bard1-1*, *1-2* 中, T-DNA 插在 *BARD1* 基因的 5'端, 3'端仍有不同长度的转录本, 利用 5'-RACE 可以得到分别为 2027 和 1479 nt 的全长。而利用识别 *BARD1* C 末端的蛋白的抗体进行 Western blot 分析观察到这些植物里面可以正常翻译出来蛋白, 数量比野生型低。他们设计了针对 3'端的 RNA 干扰, 印证了 *BARD1* C 末端一旦被破坏, 就会导致和 *bard1-3* 类似的表型。此外, 用 *BARD1* 全长(*BARD1*; *bard1-3*)或者用 C 末端的 464 个氨基酸部分(*BARD1*: C-ter; *bard1-3*)都可以使 *bard1-3* 的表型回复, 同时植物的 *WUS* 表达水平恢复到野生型水平, 暗示 *BARD1* 对于 *WUS* 的调节主要通过 C 末端起作用。

有趣的是, 在哺乳类中, *BARD1* 同乳腺癌抑制因子 *BRCA1* 一起在基因组稳定性, 细胞增殖调控及癌症发生中有重要作用。而在植物中, *bard1-3* 突变体表现出细胞增殖和分化的剧烈异常, 究其原因, 主要是 *BARD1* 通过限制 *WUS* 特异地表达在 OC 进而调节茎端分生组织功能, 而在该基因的完全敲除突变体中, 这种平衡被打破, 导致细胞增殖分化紊乱, 植株不能正常发育。

1 Han P, Li Q, Zhu Y X. Mutation of *Arabidopsis BARD1* causes meristem defects by failing to confine *WUSCHEL* expression to the organizing center. *Plant Cell*, 2008, 20: 1482—1493

朱玉贤
(北京大学生命科学学院, 北京 100871)