

缺磷胁迫下番茄侧根形成与 miR164 及 NAC1 表达的关系

曾后清¹, 朱毅勇^{1*}, 包勇¹, 沈其荣¹, 郭凯², 黄思齐², 杨志敏²

(1 南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏南京 210095; 2 南京农业大学生命科学学院, 江苏南京 210095)

摘要: 为了研究番茄幼苗在缺磷胁迫下根系形态发育与生长素、生长素信号转导途径中的转录因子 NAC1 以及调控 NAC1 表达的上游 miR164 之间的关系。试验以 5 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 磷浓度作为缺磷胁迫和对照, 检测了外源生长素 NAA (1-naphthalene acetic acid) 及生长素抑制剂 NPA (N-1-naphthylphthalamic acid) 对侧根形成的影响; 同时采用 RT-PCR 检测了 NAC1 和 miR164 在缺磷胁迫下的时序表达。结果表明, 缺磷胁迫下侧根大量形成与生长素及其运输密切相关, 在侧根迅速形成的 24 h 内, NAC1 的表达在缺磷胁迫下增强; 而其上游的 miR164 表达降低, 从而揭示了缺磷胁迫下侧根形成与 miR164 调节 NAC1 表达之间的关系。

关键词: 番茄; 侧根; 生长素; miRNA; NAC1

中图分类号: S641.2.061

文献标识码: A

文章编号: 1008-505X(2010)01-0166-06

Relationship between the development of tomato lateral roots and expression of miR164, NAC1 under P deficiency

ZENG Hou-qing¹, ZHU Yi-yong^{1*}, BAO Yong¹, SHEN Qi-rong¹, GUO Kai², HUANG Si-qi², YANG Zhi-min²

(1 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China;

2 College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: This study investigated the relationship between the development of tomato lateral roots and auxin, NAC1 (transcription factor involved in the auxin signal transduction) and miR164 expression under P deficiency. Effects of exogenous auxin NAA (1-naphthalene acetic acid) and its transport inhibitor NPA (N-1-naphthylphthalamic acid) on the lateral root development were analyzed under P deficiency (5 $\mu\text{mol/L}$ Pi) versus the control (500 $\mu\text{mol/L}$ Pi). The time course of the expression pattern of miR164 and its target gene, NAC1, were analyzed by RT-PCR. The results showed that the development of lateral roots was promoted by NAA and blocked by NPA. During 12 h of lateral root initiation, expression of NAC1 was strongly up-regulated, while miR164 was down-regulated in P-deficient plants. Our data suggest that miR164, together with its target (NAC1), is involved in the mediation of P-deficiency-induced lateral root development.

Key words: tomato; lateral root; auxin; miRNA; NAC1

磷是植物生长的一种重要营养元素。施入土壤中的磷肥大部分被土壤中的铁铝氧化物所吸附或与土壤中的钙形成沉淀, 还有一部分转化为有机磷。因此, 磷在土壤中的有效性较低, 是造成植物缺磷的一个主要原因。在缺磷胁迫下, 植物根系通常会产

生大量的侧根来扩大根系在土壤中的吸收面积。由于侧根的发生与磷的有效性有很好的相关性, 因此一直受到研究者的关注^[1-2]。研究表明, 缺磷对侧根的形成在某种程度上依赖于生长素作用; 缺磷时植物侧根对生长素的敏感性提高^[3], 并影响生长素

收稿日期: 2008-10-07 接受日期: 2009-05-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700488); 教育部科学技术研究重点项目(107060); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目资助。

作者简介: 曾后清(1986—)男, 江西吉安人, 硕士研究生, 主要从事缺磷胁迫下植物中 miRNA 的筛选与鉴定工作。

Tel: 025-84396393, E-mail: 2007103140@njau.edu.cn * 通讯作者 Tel: 025-84396393, E-mail: ziyong1973@njau.edu.cn

在根系中的分布^[4]。此外,侧根发生过程中生长素信号还受到转录因子 NAC1 的介导,其表达强度与生长素浓度、侧根的发生量呈高度正相关^[5-6]。最近在拟南芥中发现,NAC1 的表达受到 miR164 的调控。miR164 与 NAC1 mRNA 特异性结合,引起 NAC1 mRNA 降解,进而影响侧根的发生与形成^[7]。但是,植物在缺磷情况下侧根发生是否与 miR164 及其靶基因 NAC1 有关,国内外尚未见报道。

MicroRNA (miRNA) 是近年来在真核细胞中发现的一类内源具有调控其他基因表达的、非编码(蛋白质)的小分子 RNA,长度为 20~24 nt^[8]。目前对 miRNA 作用机制的研究显示,成熟的 miRNA 先与 RISC (RNA-induced silencing complex) 的复合物结合,再特异性地与碱基互补的同源 mRNA 配对结合,若是碱基完全互补,则引起靶 mRNA 的降解^[9];若 miRNA 与靶 mRNA 不完全互补时,则与对应的靶 mRNA 的 3'端非翻译区(3'UTR)结合阻止转录后翻译^[10-11]。前者主要存在于植物中,而后者主要在动物中比较常见。miRNA 主要参与基因后转录水平的调控,通过调节其对应的靶基因来控制植物生长发育,包括根、叶、花和输导组织的形态发生与分化等^[12-16]。此外,miRNA 在调节植物对干旱、盐害及植物养分等环境胁迫的反应方面也起着重要作用^[17]。番茄是一种重要的蔬果,也是研究根系形态发育(如侧根和根毛)的模式植物。因此,本试验利用番茄幼苗研究了不同供磷水平下根系的形态变化和磷素缺乏情况下侧根发生与生长素的关系,以及缺磷情况下其根系中调控生长素信号的转录因子 NAC1 与 miR164 在转录水平上的表达关系,为研究植物在缺磷胁迫下的生理机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养和处理

番茄(*Lycopersicon esculentum*)品种为苏红 2008(江苏省农科院提供)。种子用 2% 的次氯酸钠消毒 8 min,在 1 mmol/L CaSO₄ 溶液中浸泡 6 h 后于 22℃ 黑暗中发芽。2 d 后将露白的种子均匀地播在漂浮于营养液面的尼龙网上。营养液组成为:0.7 mmol/L Ca(NO₃)₂、0.5 mmol/L NH₄H₂PO₄、1.5 mmol/L KNO₃、4.75 μmol/L FeSO₄、0.5 mmol/L MgSO₄、11.5 μmol/L H₃BO₃、1.25 μmol/L MnCl₂、0.2 μmol/L ZnSO₄、0.32 μmol/L CuSO₄、0.025 μmol/L H₂MoO₄ 和 4.75 μmol/L Na₂EDTA (pH 5.5)。对于磷浓度处理,加入 0、0.005、0.05、0.5 mmol/L

NH₄H₂PO₄,不足 0.5 mmol/L 的部分以 NH₄Cl 代替。植物在生长箱中培养,温度为 23℃,每天光照 12 h。营养液每天更换一次,到第 5 d 时采样分析。外加生长素抑制剂与外源生长素的浓度分别为 50 nmol/L NPA 与 10 nmol/L NAA,在每天更换营养液时根据试验设计要求加入。由于所有番茄培养时间均为 5 d,如无特别说明,则外加生长素抑制剂与外源生长素时间均为 5 d,如加入时间为 4 d 表示移栽 1 d 后加入,依次类推;不加生长素抑制剂和外源生长素的为对照,试验均重复 3 次。

1.2 测定项目与方法

根系形态分析:将番茄幼苗在茎与根的交界处切开,根长、侧根数和侧根原基测量在体视镜下进行。根长,侧根长用直尺测量,侧根原基数在体视镜下计数。

植物磷含量测定:将幼苗在液氮中迅速冷冻,研磨后称取 50 mg 冻干粉溶解于 50 mL 10%(v/v) TCA 中,4℃ 往复振荡 15 min。12000 × g 离心 5 min 后取上清液,用钼蓝比色法测定磷含量^[18]。

根系总 RNA 采用 Trizol(Invitrogen)提取:由于成熟 miRNA 片段太短,因此先对其进行 polyA 加尾处理^[16]。反应体系为 25 μL(1.5 μg total RNAs, 1 mmol/L ATP、2.5 mmol/L MnCl₂ 和 2 U polyA polymerase),反应条件 37℃ 60 min。加尾后的 RNA 直接进行反转录,反应体系为 25 μL,其中含有 12.5 μL polyA 加尾的产物,0.5 mmol/L dNTP, 200 U MLV 反转录酶(Promega),1 μL 锚定引物[5'-CGAA-CATGTACAGTCCATGGATAG d(T)30(A,G or C)A,G,C or T-3']],获得 cDNA 产物。以 EF-1a 作为内参,其扩增所用引物为:正义链 5'-AGACCACCAAG-TACTACTGCAC-3';反义链 5'-CCACCAATCTTGTA-CACATCC-3'。扩增 NAC1 的引物为:正义链 5'-CC-CITGGACTTTGATACAC-3';反义链 5'-TGGCTTCC AGTAACCAGATACG-3'。扩增 miR164 的引物为:正义链即为 miRNA 序列,反义链为加尾所含序列(5'-CGAACATGTACAGTCCATGGATAG-3')。反应体系:25 μL[包括 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl₂、0.01% Gelatin、0.01% Triton X-100、0.2 mmol/L dNTP、2U Taq DNA polymerase (TaKaRa)、0.5 mmol/L primer]。反应条件为:94℃ 预变性 3 min。25 循环:1)94℃ 变性,30 s;2)72℃ 退火,30 s;3)65℃ 延伸,40 s,最后保持 72℃ 5 min。

实验数据均使用 SPSS 13.0 进行统计与分析。

2 结果与分析

2.1 磷有效性对番茄幼苗根系形态的影响

番茄种子发芽后,直接转移到含有不同磷浓度的营养液中。培育5 d后发现,完全缺磷营养液下的番茄幼苗侧根数量最多,平均有6条;5 $\mu\text{mol/L}$ Pi处理下的幼苗平均有5条侧根。当磷浓度达到50 $\mu\text{mol/L}$ 时,侧根数目明显减少,仅有2~3条;当磷浓度达到500 $\mu\text{mol/L}$ 时,侧根数量平均为1条(图1A)。同时,侧根的总长度也随着营养液中磷浓度

的升高而降低,其变化趋势与侧根数目的变化一致(图1B)。相比之下,培养5 d后主根的长度在0~5 $\mu\text{mol/L}$ 磷浓度范围内无显著差异,而且比50~500 $\mu\text{mol/L}$ 磷浓度下培养的主根略长一些(图1C)。幼苗体内的磷含量随着营养液中磷浓度的增高而显著增加(图1D)。

为了避免完全缺磷可能带来的其他影响,我们选取了5 $\mu\text{mol/L}$ 和500 $\mu\text{mol/L}$ 的供磷浓度作为缺磷胁迫处理(-P)与供磷对照(+P)进行以下研究。

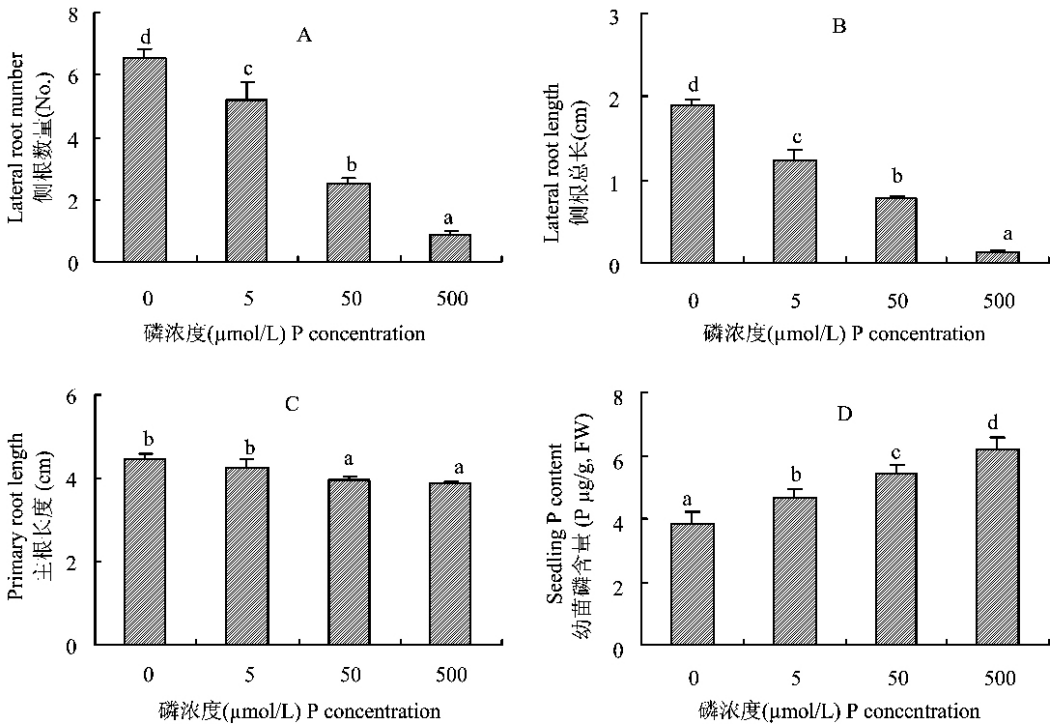


图1 不同供磷浓度下番茄幼苗的根系形态及其体内磷含量

Fig. 1 Morphology of root system and phosphate content of tomato seedlings cultivated under different P levels

2.2 生长素对番茄幼苗侧根发育的影响

生长素是影响根系形态变化的一个重要因素。在缺磷与供磷营养液中分别加入生长素运输抑制剂NPA和外源生长素NAA,结果发现,在外加NPA的情况下,缺磷和供磷植物的侧根发生都受到强烈的抑制,植株几乎没有长出侧根;而加入NAA后,供磷植物也产生了大量的侧根,与不加NAA的缺磷植物的侧根数目相近;缺磷植物在外加NAA的情况下,也产生了更多的侧根,并且有显著差异(图2A)。植物侧根的总长度变化在外加NPA与NAA时,与侧根的发生量变化一致(图2B)。除了侧根以外,侧根原基的数目在NPA的处理下也受到明显的抑制,

外加NAA显著促进了侧根原基的数目(图2C)。

2.3 磷有效性与生长素运输对侧根发育的交互作用

为了进一步研究缺磷诱导侧根发生与生长素之间的关系,将缺磷番茄幼苗用NPA进行不同时间段的连续处理5 d。结果发现,移栽1和2 d后用NPA处理,即连续处理4和3 d,几乎完全抑制了侧根形成(图3A),侧根的伸长生长也相应地受到抑制(图3B)。相比之下,移栽3~4 d后的缺磷幼苗用NPA连续处理2和1 d,虽然也减少了侧根的形成数量,但与对照相比,仅减少了30%(图3A)。因此,第3和第4 d是侧根形成的重要时期。相对而言,侧根

的伸长生长却受到了强烈的影响,表现为侧根总长度下降了 80%(图 3B)。为了明确生长素对侧根形成早期的调控影响,观察了 NPA 处理对侧根原基数量的发生的影响(图 3C),结果发现,连续 3 和 4 d 的 NPA 处理均明显减少了侧根原基的数量,达 50%以

上;连续用 NPA 处理 1 及 2 d 对侧根原基数量的抑制分别减弱为 20% 和 30% 左右。与侧根形成数量受 NPA 抑制的结果相比(图 3A),生长素抑制剂 NPA 对侧根原基是否发育成侧根的影响更大。

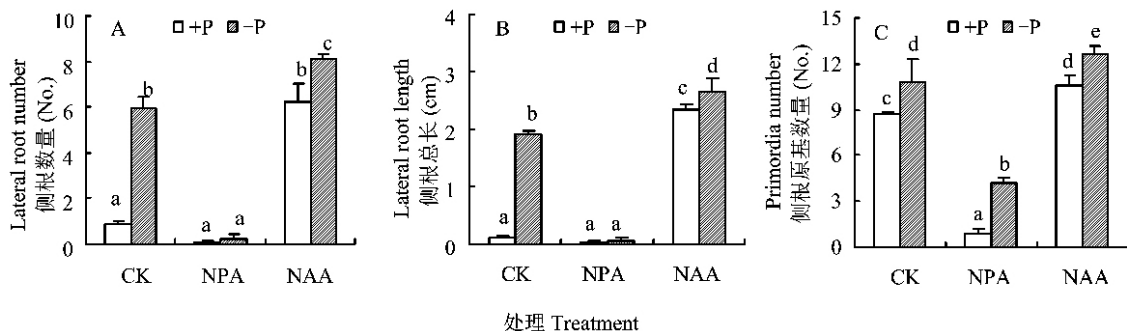


图 2 生长素抑制剂 NPA 与外源生长素 NAA 对缺磷与供磷番茄幼苗侧根发育的影响

Fig.2 Effect of NPA and NAA on the development of tomato lateral roots under P deficiency and sufficient conditions

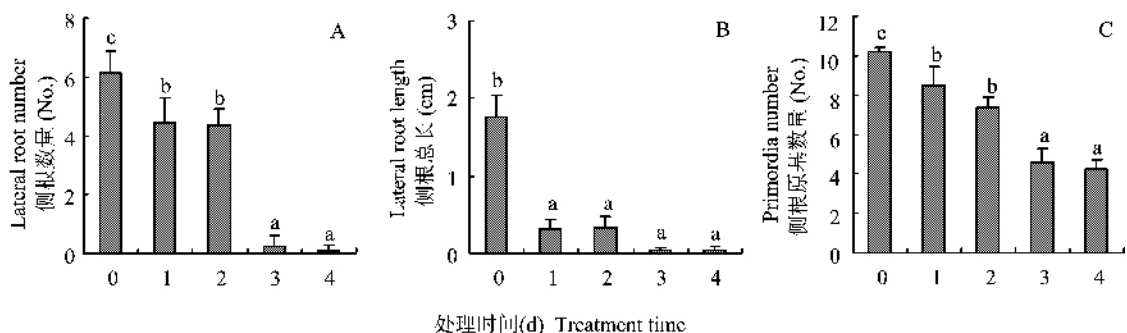


图 3 不同时间段 NPA 处理对缺磷番茄侧根发育的影响

Fig.3 Effect of NPA on the development of tomato lateral roots under P deficiency

2.4 NAC1 与 miR164 在侧根形成过程中的表达变化

为了验证转录因子 NAC1 与 miR164 在侧根发育过程中可能的作用,本试验观察了番茄根系侧根发生的过程。如图 4A 所示,番茄幼苗从第 3 d 开始长出侧根,到第 4 d 时是侧根大量形成的时期。通过半定量 RT-PCR 分析发现,在第 3 和第 4 d 的 24 h 中 NAC1 在缺磷植物与供磷植物的根系中的表达都有上升的趋势,但缺磷植物的 NAC1 表达量要明显高于供磷植物。与此同时,miR164 的表达量在缺磷植物中始终低于供磷植物(图 4B)。

3 讨论

土壤中磷素缺乏的主要原因是磷在土壤中被固定,移动性差,因此截获是植物根系获得土壤中

磷素的一个主要方式。植物根系通过分枝,产生大量侧根以扩大吸收范围。本试验中,随着营养液中供磷浓度的降低,侧根数逐渐增加,侧根总长度也随之增加,与磷有效性之间体现了较好的负相关(图 1)。说明外界环境中磷的有效性是决定植物根系形态变化的一个重要因素。相比之下,主根的长度与外界供磷浓度之间没有类似的关系。主根在缺磷胁迫下(0~5 $\mu\text{mol/L}$)比不缺磷时(50~500 $\mu\text{mol/L}$)略有伸长。类似的情况在拟南芥中也有发现^[3],并且只有在供磷水平低于 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,根系鲜重才显著增加;但是在各个低磷浓度处理之间无显著差异。结合本试验结果(图 1A、C),在缺磷胁迫下,植物根系(包括主根与侧根)生长得到了促进;同时从图 1D 可知,外界磷浓度是造成植物体内磷含量差异的一个主要原因。

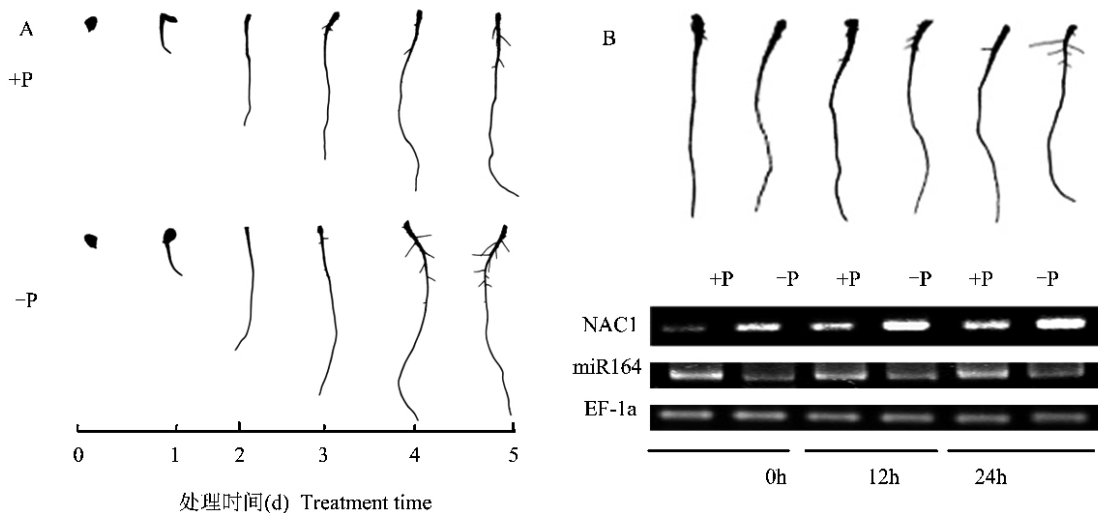


图4 番茄幼苗根系发育过程及其侧根发育过程中 NAC1 与 miR164 的表达变化

Fig.4 Root morphology of tomato seedlings and expression pattern of NAC1 and miR164 during the development of lateral roots

根系形态的改变与外界环境中供磷水平密切相关,但最终还是通过影响植物体内的激素调控来实现的。在本试验中(图2A),外加生长素运输抑制剂 NPA 严重抑制了缺磷植物的侧根发生,而施用外源生长素 NAA 则导致供磷植物也产生大量的侧根。说明缺磷时番茄幼苗侧根的生长依赖于生长素;相应的,侧根长度的变化也与此一致(图2B)。尽管侧根原基的数量变化也有上述类似的趋势(图2C),但是供磷植物所形成的侧根原基亦达到缺磷植物的75%左右,即使在加入生长素抑制剂 NPA 的情况下,无论供磷还是缺磷植物的侧根原基数量都没有完全受到抑制,相比之下侧根形成则完全受到抑制(图2A)。此外,即使加入了外源生长素 NAA 后,供磷和缺磷植物所增加的侧根原基数量也很少,这与 NAA 处理下侧根大量形成有着明显的差别。说明侧根原基的形成也需要生长素,但是对生长素的敏感性及依赖性不如侧根发生过程时那么强烈。由此可知,缺磷是诱导侧根原基增多的一个主要原因,缺磷信号通过植物体内的生长素使更多的侧根原基发育成侧根。

由于生长素是在植物的地上部分合成并运输到根系组织,因此生长素的极性运输决定了生长素在根系中的浓度与分布^[19]。NPA 是抑制生长素极性运输的一种化学试剂。通过 NPA 对缺磷胁迫下的番茄幼苗进行处理时发现,前期开始处理彻底抑制了侧根的形成,而后期处理则无法完全抑制侧根的形成(图3A)。表明前期处理可能导致缺磷诱导产

生的生长素在向地性运输过程中受到抑制而无法在根系中积累,以至于侧根形成受阻。尽管侧根原基的数量并没有受到完全的抑制(图3C),而后期 NPA 处理可能无法改变根系中已有的生长素的作用,植物仍能够形成侧根。但是,由于处理后生长素的运输开始受到抑制,导致侧根形成数量减少。相比之下,无论处理时间长短,侧根的伸长生长都受到了 NPA 强烈的抑制(图3B),说明生长素对侧根的伸长生长影响更大。

NAC1 是 NAC 家族中的一员,是一个转录因子,能激活生长素信号途径中两个下游基因 DBP 和 AIR3。NAC1 不仅本身受生长素诱导,同时也调控生长素信号来促进侧根的形成和发育。因此,NAC1 的过表达与反义转基因拟南芥分别显示出侧根增加与侧根减少两种表型^[5]。从图4A中可知,番茄幼苗生长到第3~4d,是侧根迅速形成的主要时期。在24h之内(图4B),无论是缺磷还是供磷植物的 NAC1 表达都有上升的趋势,但是缺磷植物的 NAC1 表达量明显高于供磷植物。因此推测,在这个侧根迅速形成的过程中,NAC1 的表达增强是激活侧根发育的重要原因之一。而与 NAC1 互补的 miR164 表达水平则始终表现为缺磷处理比供磷要低,在趋势上与 NAC1 的表达差异相反。说明 miR164 在缺磷胁迫时下调,是 NAC1 的表达水平升高的一个重要原因,对缺磷植物大量形成侧根起到重要的调控作用。但是缺磷又是如何来调控 miR164 的表达,还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Sánchez-Calderón L , López-Bucio J , Chacón-López A *et al.* . Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol.* , 2005 , 46 : 174–184.
- [2] 刘鹏 , 区伟贞 , 王金祥 , 等 . 磷的有效性性与植物侧根的发生发育 [J]. *植物生理学通讯* , 2006 , 42 (3) : 395–400.
- Liu P , Qu W Z , Wang J X *et al.* . Phosphorus availability and lateral root initiation and development of plants [J]. *Plant Physiol. Commun.* , 2006 , 42 (3) : 395–400.
- [3] López-Bucio J , Hernandez-Abreu E , Sanchez-Calderon L *et al.* . Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system [J]. *Plant Physiol.* , 2002 , 129 : 244–256.
- [4] López-Bucio J , Hernandez-Abreu E , Sanchez-Calderon L *et al.* . An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation [J]. *Plant Physiol.* , 2005 , 137 : 681–691.
- [5] Xie Q , Frugis G , Colgan D , Chua N H. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development [J]. *Genes Devel.* , 2000 , 14 : 3024–3036.
- [6] 王友华 , 段留生 , 卢孟柱 , 等 . NAC1 上游调控区表达特征及其与侧根激素诱导的关系 [J]. *中国科学 C 辑(生命科学)* , 2006 , 36 (3) : 217–222.
- Wang Y H , Duan L S , Lu M Z *et al.* . Expression of NAC1 up-stream regulatory region and its relationship to the lateral root initiation induced by gibberellins and auxins [J]. *Sci. China Ser. C (Life Sci.)* , 2006 , 36 (3) : 217–222.
- [7] Guo H , Xie Q , Fei J , Chua N. MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development [J]. *Plant Cell.* 2005 , 17 : 1376–1386.
- [8] Bartel D. MicroRNAs : Genomics , biogenesis , mechanism and function [J]. *Cell* , 2004 , 116 : 281–297.
- [9] Hammond S M , Bernstein E , Beach D , Hannon G J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells [J]. *Nature.* 2002 , 404 : 293–296.
- [10] Chen X. microRNA biogenesis and function in plants [J]. *FEBS Lett.* , 2005 , 579 : 5923–5931.
- [11] Zhang B , Pan X , Cobb G P , Anderson T A. Plant microRNA : A small regulatory molecule with big impact [J]. *Devel. Biol.* , 2006 , 289 : 3–6.
- [12] Jones-Rhoades M W , Bartel D P. Computational identification of plant microRNAs and their targets , including a stress-induced miRNA [J]. *Mol. Cell.* 2004 , 14 : 787–799.
- [13] Mallory A C , Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants [J]. *Nat Genet.* , 2006 , 38 : 31–37.
- [14] Wang J W , Wang L J , Mao Y B *et al.* . Control of root cap formation by microRNA – targeted auxin response factors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell* , 2005 , 17 : 2204–2216.
- [15] Zhang B , Pan X , Anderson T A. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets [J]. *FEBS Lett.* , 2006 , 580 (15) : 3753–3762.
- [16] Zhou Z S , Wang S J , Yang Z M. Bioinformatic identification and expression analysis of new microRNAs from *Medicago truncatula* [J]. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* , 2008 , 374 : 538–542.
- [17] Sunkar R , Zhu J K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell* , 2004 , 16 : 2001–2019.
- [18] Rytcher A M , Milkulka D D. The relationship between status and cyanide-resistant respiration in bean roots [J]. *Physiol. Plant.* , 1990 , 79 : 383–388.
- [19] Nancy P , Canivenc G , Muller B *et al.* . A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol.* , 2005 , 138 : 2061–2074.