

拟南芥突变体 *amos2* 对外源激素的响应特征研究^①

李光杰^{1,2}, 董刚强¹, 李保海¹, 施卫明^{1*}

(1 土壤与农业可持续发展国家重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 210008; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 检测拟南芥突变体 *amos2* 对外源激素响应的结果表明, 该突变体主根伸长对外源生长素有明显的抗性, 其主根抗性强于拟南芥野生型(WT), 但弱于已知的生长素突变体 *aux1-7* 和 *axr4-2*。该突变体的主根伸长对生长素转运抑制剂 TIBA 也表现出较强抗性, 而对一定浓度的 ACC 表现敏感, 但主根伸长对外源 6-BA 和 ABA 的响应与野生型一致。外源添加生长素或乙烯抑制剂可同时增加 *amos2* 和野生型的可见侧根数量, 但突变体的增加百分比要显著高于野生型。虽然 *amos2* 突变体的荚果败育率比野生型显著增加, 但并未表现出其他生长素突变体特有的胚轴弯钩消失及根系向重性缺失的表型。上述结果暗示突变基因 AMOS2 在控制拟南芥生长发育的某些方面发挥重要作用。

关键词: 拟南芥; 突变体; 生长素; 向重性; 荚果败育

中图分类号: Q945.12

根系对于植物完成生命周期至关重要, 它的主要功能是从土壤中获取矿物元素和水分, 并起到固定植株的作用^[1]。根系作为连接土壤与植物地上部之间物质交换的枢纽, 强壮的根系是植物蓬勃茂盛的前提。因此, 根系发育的好坏直接影响着植物体的生长状况, 与农林业生产紧密相关。根系发育过程是在植物内部因素和外界环境影响相互作用下进行的。植物激素生长素、ABA、乙烯等是植物内部调控根系发育的重要因子。生长素几乎是主根及侧根发育大多数阶段的参与者和调控者^[2-6]。此外生长素可以控制花的形成与分化, 生长素在雌蕊形态建成过程中可以控制花粉管的形成^[7-10], 而花的发育则是果实形成的基础。最近研究表明, 乙烯参与主根伸长及侧根发育的过程, 乙烯对主根伸长的抑制主要通过诱导体内生长素在伸长区大量累积而产生^[11-12]; 乙烯也可以调控侧根的发育, 根部高水平乙烯会促进根部生长素向顶和向基运输, 从而阻碍生长素在侧根原基的累积, ^[13-14]抑制侧根形成。虽然对根系、花及种子发育已有广泛研究, 但是对其详细的机制仍需进一步探索, 利用突变体技术揭示植物根系响应激素水平、环境胁迫的生物学机制是非常方便有效的, 本实验室曾筛选得到一株新的铵敏感突变体 *amos2*^[15], 该突变体除具有铵敏感的特

征外还具有独特的发育表型, 该突变体在根系及果实发育等多个方面均表现出明显的缺陷, 这暗示 AMOS2 基因在拟南芥正常的生长及发育过程中也可能发挥着作用, 为了验证该假设, 并进一步揭示拟南芥发育的相关机制, 本文研究了 *amos2* 突变体根系、花及果实发育的表观特征, 并利用药理学实验初步研究了其根系对激素, 尤其是对生长素响应的改变, 并详细讨论了曾经报道的该突变体 Ca^+ 、 Mg^+ 离子改变^[15]可能对这些发育过程产生的影响, 以期探讨 AMOS2 基因在拟南芥发育中的功能, 为进一步揭示拟南芥根系及果实发育的相关机制提供直接的实验材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 拟南芥野生型(WT)及以野生型为背景的 *amos2*、*aux1-7*、*axr4-2* 突变体。其中 *aux1-7*、*axr4-2* 突变体种子购自 ABRC 拟南芥种质资源库。

1.1.2 生长条件及培养基 光照培养箱(Sanyo, Japan), 温度为 $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$, 24 h 连续光照, 光照强度为 $50 \mu\text{mol}/(\text{m}\cdot\text{s})$ 。萌发培养基(GM)修改自 Cao 等^[16], 组成成分为: 2 mmol/L KH_2PO_4 , 5 mmol/L NaNO_3 , 2 mmol/L MgSO_4 , 1 mmol/L CaCl_2 , 0.1 mmol/L

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(No.2013CB127402)、国家自然科学基金研究项目(30771285)资助。

* 通讯作者(wmshi@issas.ac.cn)

作者简介: 李光杰(1984—), 男, 山东济南人, 博士研究生, 主要从事植物营养学研究。E-mail: liguangjie2009@163.com

Fe-EDTA, 50 $\mu\text{mol/L}$ H_3BO_3 , 12 $\mu\text{mol/L}$ MnSO_4 , 1 $\mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 , 1 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , 0.2 $\mu\text{mol/L}$ Na_2MoO_4 , 0.5 g/L MES (2-吗啉已磺酸), 1% (w/v)蔗糖, 0.8% (w/v)琼脂, 用 1 mmol/L NaOH 调至 pH 5.7 后, 于 121 $^\circ\text{C}$, 100 kPa 灭菌 20 min。播种后当天作为 0 天, 播种板竖直培养。

1.2 试验方法

1.2.1 外源激素处理实验 为了研究外源激素对主根伸长的影响, 萌发 5 天的幼苗转移到含有不同浓度的 2,4-D、IAA、NAA、6-BA、ABA、ACC 及生长素转运抑制剂 TIBA 的培养基中再生长 5 天, 然后进行主根长度的测定, 标记萌发 5 天的幼苗移苗时主根根尖的位置, 处理 5 天后测量标记处到主根根尖的长度。以不加激素的培养基为对照, 进行百分数比较, 其中野生型、*axr4-1*、*amos2* 和 *aux1-7* 对照条件下的主根伸长量分别为 43.8、44.6、44.8 和 38.8 mm。

1.2.2 根系向重性及弯钩实验 将在正常培养基中萌发 5 天, 大小一致的苗移到新的培养基中, 在培养基背面标记根尖位置, 然后旋转 90 度进行向重性处理。在向重性处理后指定的时间点进行观察拍照(照片由 Cannon G7 相机拍摄), 使用 ImageJ 软件分析弯曲角度。进行弯钩实验时, 首先将拟南芥种子直播于正常萌发培养基中, 竖直、避光培养 3 天, 然后观察拍照胚轴顶端弯钩。

1.2.3 主根伸长及侧根数量的测定 萌发 5 天的拟南芥野生型和 *amos2* 幼苗移到含有 0.03 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 的培养基中(标记移苗时主根根尖的位置)生长 5 天, 用直尺直接量取主根长度。文中所用的主根伸长量是指移至处理板后主根新增的长度。侧根数量在体视显微镜下观察获取, 在本文中, 已冒出的但未活化的侧根原基(lateral root primordium)仍被视为未成熟侧根^[17], 只有长度大于 0.5 mm 的可见侧根才被视为成熟侧根^[18], 侧根密度通过成熟侧根数量除以主根总长度计算获得。

1.2.4 数据处理 数据用软件 SPSS 13.0 进行方差分析和相关性分析, 方差分析采用 One-way ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 突变体 *amos2* 的主根伸长改变了对生长素和 ACC 的响应

生长素在主根发育中发挥着重要作用^[3-4]。为此, 首先测定了拟南芥野生型(WT)及突变体 *amos2* 的主根伸长对外源生长素的响应, 结果显示 *amos2*

的主根伸长比野生型(WT)有更明显的生长素(2,4-D)抗性(图 1a, b)。例如在 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D 处理下, *amos2* 的主根伸长量是野生型(WT)的 4 倍(图 1b)。通过 *amos2* 与已知的生长素抗性突变体 *aux1-7* 和 *axr4-2* 进行比较发现, *aux1-7* 和 *axr4-2* 主根比 *amos2* 有更明显的生长素抗性(图 1b)。此外, *amos2* 对一定浓度范围内的 NAA(生长素类)也有部分抗性(图 1c)。

本文同时研究了 *amos2* 的主根伸长对外源 6-BA(细胞分裂素类)、ABA(脱落酸)、ACC(乙烯类)及生长素转运抑制剂 TIBA 的响应。与野生型(WT)相比, *amos2* 的主根伸长对外源 6-BA 和 ABA 并未表现出明显的敏感或抗性(图 1); 而 *amos2* 的主根伸长对一定浓度的 ACC(0.2 $\mu\text{mol/L}$ 和 1 $\mu\text{mol/L}$ ACC)表现出敏感特性; 由图 1 可知 *amos2* 的主根伸长对生长素转运抑制剂 TIBA 也具有明显的抗性。综合上述结果显示: AMOS2 基因的突变导致了拟南芥主根伸长对生长素的抗性, 但是未改变对其他激素的响应特征。

2.2 外源生长素和乙烯抑制剂能明显恢复 *amos2* 侧根数量

在正常培养基条件下, *amos2* 的侧根密度明显少于野生型(WT)(图 2a), 这说明 AMOS2 基因可能是正常生长条件下拟南芥侧根发育所必需的。由于生长素可以调控侧根的发育过程^[6,19], 且 *amos2* 的主根伸长改变了对生长素的响应过程, 因此本文首先验证了生长素在 *amos2* 的侧根发育过程中的作用。结果显示外源生长素能显著增加野生型(WT)和突变体 *amos2* 的侧根密度(图 2a), 但 *amos2* 增加幅度更为显著, 例如在 0.07 $\mu\text{mol/L}$ IAA(吲哚乙酸)处理时, 野生型(WT)侧根密度比正常时增加约 160%, 而突变体增加近 400%(图 2b), 这说明 AMOS2 基因突变导致的体内生长素失衡可能是影响其侧根发育的重要诱因。此外, 外源乙烯抑制剂(AgNO_3)也更明显促进了 *amos2* 的侧根密度(野生型(WT)增加 50%, *amos2* 增加 100%, 图 2b), 该结果暗示 AMOS2 基因突变可能会导致拟南芥体内乙烯的增加并进而影响了侧根发育。

2.3 突变体 *amos2* 根系向重性未改变

生长素是根系向重性及胚轴顶部弯钩形成的重要调控者, 已知的生长素抗性突变体, 如 *axr1-3*, *axr4*, *axr6* 和 *tir1*^[20-23] 都改变了其根系的向重性反应, 但本文发现, 与野生型(WT)相比, 突变体 *amos2* 的根系向重性并未发生明显变化(图 3a); 且 *amos2* 突变体并未显现胚轴顶端弯钩消失的特征(图 3b)。

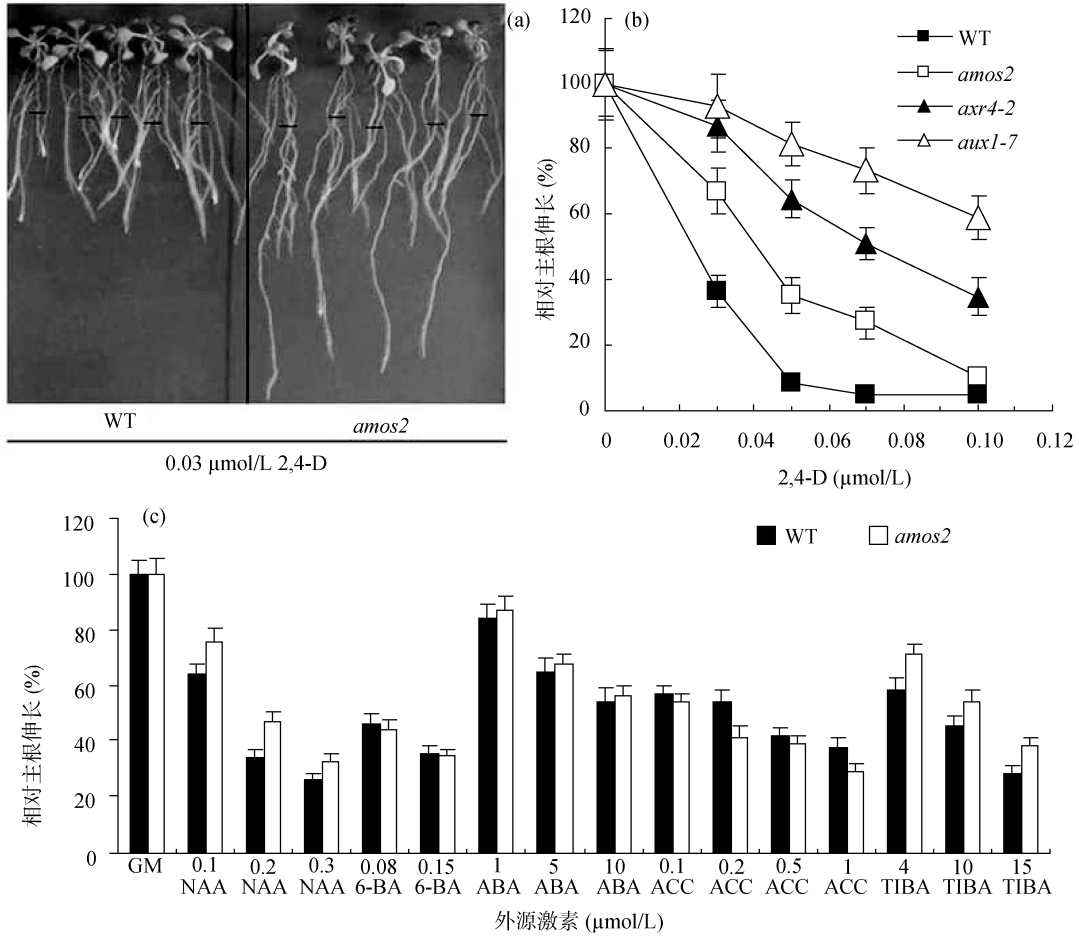


图 1 外源激素对拟南芥野生型(WT)和突变体 *amos2* 主根伸长的影响

Fig. 1 Effects of hormones on the elongation of primary root of wild type and *amos2* mutant in the agar medium

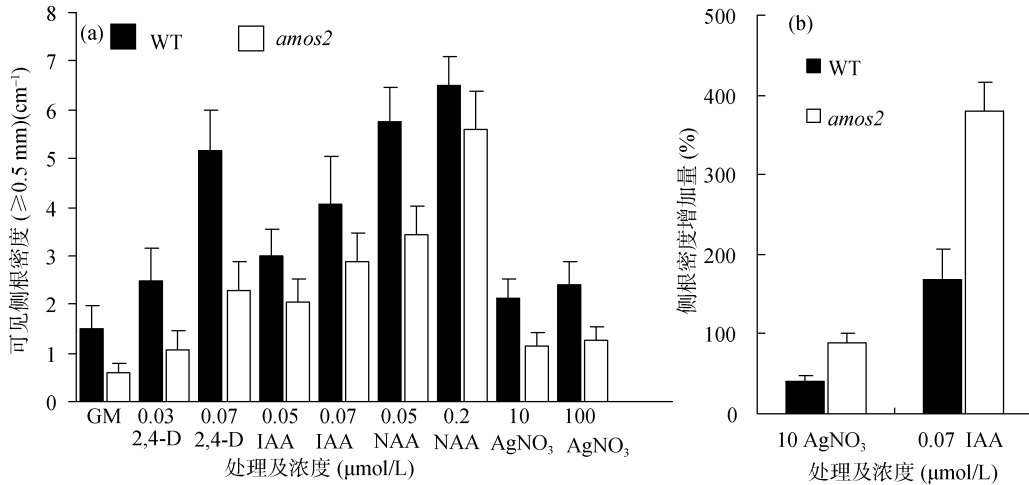


图 2 外源生长素和硝酸银对拟南芥野生型(WT)和突变体 *amos2* 侧根数量的影响

Fig. 2 Effects of auxin and AgNO₃ on the lateral root number of wild type and *amos2* mutant in the agar medium

2.4 突变体 *amos2* 荚果败育率提高

amos2 的果实发育也发生了变异。在盆栽条件下, *amos2* 的荚果败育程度比野生型(WT)更加明显(图 4)。对盆栽 50 天的野生型(WT)和突变体 *amos2* 进行荚果败育统计发现野生型(WT)的正常荚果数

占所统计的荚果总数的约 95%, 败育率仅有 5%左右(图 4); 而 *amos2* 的正常荚果数仅占荚果总数的约 43%, 败育程度高达 57%左右(图 4), 这说明 AMOS2 基因对拟南芥植株果实发育也有重要的调控作用。

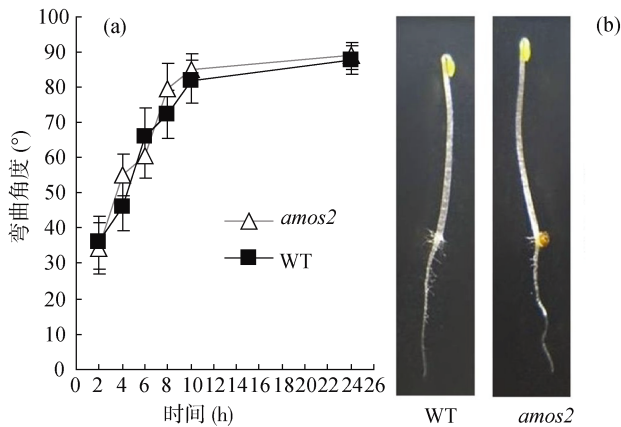


图 3 拟南芥野生型(WT)和突变体 *amos2* 胚轴顶勾表型及根系向重力性分析

Fig. 3 Phenotype of hook and root gravitropic response of wild type and *amos2* mutant

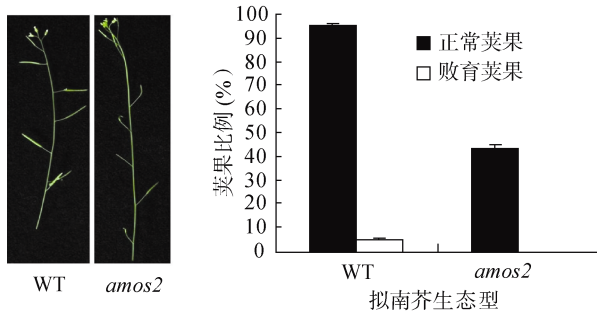


图 4 突变体 *amos2* 荚果败育率比野生型(WT)明显增加
Fig. 4 *amos2* mutant has higher abortion ratio than wild type

3 讨论

在正常生长条件下，拟南芥突变体 *amos2* 显示出明显的发育表型：侧根数量下降、果实败育率高及主根伸长改变对生长素的响应特征，这说明 AMOS2 基因在控制拟南芥生长发育的某些方面发挥重要作用。生长素是植物根系及地上部发育的重要调控者^[6,19,24]，*amos2* 突变体的这些发育特征暗示 AMOS2 基因突变引起了拟南芥相关生长素路径的变化。此外，该突变体也表现出对外源乙烯响应的改变，如主根伸长对一定浓度的 ACC 敏感，侧根发育能被乙烯抑制剂(AgNO₃)更好地恢复(图 1 和图 2)。生长素与乙烯的相互作用是根系发育的重要调控机制^[13-14]，*amos2* 突变体对生长素和乙烯响应特征的改变，为进一步研究激素在调控根系发育中的互作机制提供了很好的切入点。本实验室曾报道 AMOS2 基因的突变导致了拟南芥地上部 Ca⁺、Mg⁺ 含量的下降^[15]。Ca⁺ 已知参与植物发育的多个方面^[25-26]，包括参与花及营养器官形成的多条路径^[27-28]、不定根形成^[29-31]。Mg⁺ 是控制植物光合作用的关键离子^[32-33]。

因此，*amos2* 突变体侧根及果实的发育过程除了受到内源激素失衡影响外，是否也受到其体内 Ca⁺、Mg⁺ 缺失的影响，值得进一步探究。以上结果显示：AMOS2 基因在参与高铵胁迫下 NH₄⁺-K⁺ 互作的同时^[15]，还可能参与了 Ca⁺ 依赖的植物形态建成，为进一步探究拟南芥钙素营养的分子生物学机制提供了有价值的遗传资源。

参考文献：

- [1] 严小龙, 廖红, 年海. 根系生物学原理与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 1-16
- [2] Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao R, Zhang H, Casero P, Sandberg G, Bennett MJ. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development[J]. Trends in Plant Science, 2003, 8: 165-171
- [3] 段留生主译, Davies PJ 主编. 植物激素: 合成、信号转导和作用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2008: 26-46
- [4] Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfet J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B. An auxin dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root[J]. Cell, 1999, 99: 463-472
- [5] Fukaki H, Tasaka M. Hormone interactions during lateral root formation[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69: 437-449
- [6] Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplace L, Beeckman T, Bennett MJ. *Arabidopsis* lateral root development: An emerging story[J]. Trends in Plant Science, 2009, 14: 399-408
- [7] Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y. Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation[J]. Plant Cell, 1991, 3: 677-684
- [8] Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA. *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism[J]. Science, 1996, 273: 948-950
- [9] Oka M, Miyamoto K, Okada K, Ueda J. Auxin polar transport and flower formation in *Arabidopsis thaliana* transformed with indoleacetamide hydrolase (*iaaH*) gene[J]. Plant Cell Physiology 1999, 40: 231-237
- [10] Reinhardt D, Pesce E-R, Stieger P, Mandel T, Baltensperger, Bennett M, Traas J, Friml J, Kuhlemeier C. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport[J]. Nature, 2003, 426: 255-260
- [11] Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorska R, Beeckman T, Friml J, Benkova E. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution[J]. Plant Cell, 2007, 19: 2197-2212
- [12] Swarup K, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GT, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis*

- seedlings to enhance inhibition of root cell elongation[J]. *Plant Cell*, 2007, 19: 2 186–2 196
- [13] Negi S, Ivanchenko MG, Muday GK. Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2008, 55: 175–187
- [14] Lewis DR, Negi S, Sukumar P, Muday GK. Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers[J]. *Development*, 2011, 138: 3 485–3 495
- [15] Li GJ, Dong GQ, Li BH, Li Q, Kronzucker HJ, Shi WM. Isolation and characterization of a novel ammonium overly sensitive mutant, *amos2*, in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Planta*, 2012, 235: 239–252
- [16] Cao Y, Class DM, Crawford NM. Ammonium inhibition of *Arabidopsis* root growth can be reversed by potassium and by auxin resistance mutations *aux1*, *axr1*, and *axr2*[J]. *Plant Physiology*, 1993, 102: 983–989
- [17] Malamy JE, Benfey PN. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Development*, 1997, 124: 33–44
- [18] Zhang H, Jennings A, Barlow PW, Forde BG. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1999, 96: 6 529–6 534
- [19] Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation[J]. *Cell*, 2003, 115: 591–602
- [20] Lincoln C, Britton JH, Estelle M. Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1990, 2: 1 071–1 080
- [21] Hobbie L, Estelle M. The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation[J]. *Plant Journal*, 1995, 7: 211–220
- [22] Hobbie L, McGovern M, Hurwitz LR, Pierro A, Liu NY, Bandyopadhyay A, Estelle M. The *axr6* mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene involved in auxin response and early development[J]. *Development*, 2000, 127: 23–32
- [23] Shibasaki K, Uemura M, Tsurumi S, Rahman A. Auxin response in *Arabidopsis* under cold stress: Underlying molecular mechanisms[J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 3 823–3 838
- [24] Sun J, Xu Y, Ye S, Jiang H, Chen Q, Li U F, Zhou W, Chen R, Li X, Tietz O, Wu X, Cohen JD, Palme K, Li C. *Arabidopsis* ASA1 is important for jasmonate-mediated regulation of auxin biosynthesis and transport during lateral root formation[J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 1 495–1 511
- [25] Hepler PK. Calcium and development[A]// Greuter W, Zimmer B. *Proceedings of the XIV International Botanical Congress*[C]. Koeltz, Koningstein/Taunus, 1988: 225–240
- [26] Mahalakshmi A, Singla B, Khurana JP, Khurana P. Role of calcium–calmodulin in auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329)[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2007, 880: 167–174
- [27] Capitani F, Altamura MM. Exogenous calcium enhances the formation of vegetative buds, flowers and roots in tobacco pith explants cultured in the absence of exogenous hormones[J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2004, 77: 1–10
- [28] Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita M, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A, Takayama S. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration is essential for pollen tube growth[J]. *Plant Physiology*, 2009, 150: 1 322–1 334
- [29] Bellamine J, Penel C, Greppin H, Gaspar T. Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation[J]. *Plant Growth Regulation*, 1998, 26: 191–194
- [30] Lanteri ML, Pagnussat GC, Lamattina L. Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57: 1 341–1 351
- [31] Li XZ, Velde B, Li D. Loss of K-bearing clay minerals in flood-irrigated, rice-growing soils in Jiangxi province, China[J]. *Clay and Clay Minerals*, 2003, 51: 75–82
- [32] Pittman JK. Managing the Manganese: Molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis[J]. *New Phytologist*, 2005, 167: 733–742
- [33] Cakmak I, Kirkby EA. Role of Magnesium in carbon partitioning and alleviating photooxidative damage[J]. *Physiologia Plantarum*, 2008, 133: 692–704

The Response Characteristics of *Arabidopsis* Mutant *amos2* to Exogenous Hormones

LI Guang-jie^{1,2}, DONG Gang-qiang¹, LI Bao-hai¹, SHI Wei-ming^{1*}

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture (Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences), Nanjing 210008, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In this study, The response characteristics of the primary root and lateral root to exogenous hormones in *Arabidopsis* wild type and *amos2* mutant were investigated. The primary root elongation of mutant seedlings was less inhibited than wild-type root over a range of synthetic auxin 2,4-D concentrations; the auxin response of the *amos2* mutant was also comparable to that of two auxin-related mutants *aux1-7* and *axr4-2*, and the both known mutants, *aux1-7* and *axr4-2*, were more insensitive than *amos2*. The *amos2* mutant was also resistant to auxin transport inhibitor TIBA but hypersensitive to the ethylene precursor ACC. The *amos2* mutant did not show significant differences from wild type in root elongation responses to cytokinin benzyl adenine (6-BA) and abscisic acid (ABA). Exogenous auxin and ethylene antagonist Ag⁺ strongly induced lateral root formation in both wild-type and *amos2* seedlings, but there were slightly but significantly higher levels of lateral root induction in *amos2* seedlings than that of wild-type plants. The *amos2* mutant displayed low fertility rates in the early stage of development, but the *amos2* mutant was not different from the wild type in gravitropism and hookless hypocotyl. All the results suggested that AMOS2 plays a role in the regulation of lateral root and flower development under normal growth conditions.

Key words: *Arabidopsis*, Mutant, Auxin, Gravitropism, Abortion