

*AhHDA1*异源表达对拟南芥根系生长的影响

曾丽丹, 吴鑫泉, 李晓云, 李玲*

华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州510631

摘要: *AhHDA1*是花生中的组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC), 与拟南芥中的HDA6高度同源, 二者都具有保守的组蛋白去乙酰化酶活性结构域。本文对7日龄野生型拟南芥(Col-0)、*hda6*突变体和*AhHDA1*异源表达株系*AhHDA1/hda6*的主根长度和侧根数量进行测量统计。结果表明, 以*hda6*为对照, *AhHDA1/hda6*的主根生长速度明显减缓, 侧根数量也显著减少; *AhHDA1/hda6*的分生区长度和伸长区的细胞长度与Col-0相近, 与*hda6*突变体相比显著缩短; *AhHDA1/hda6*根部的细胞周期和生长素极性运输相关基因的表达水平皆显著低于*hda6*突变体。说明*AhHDA1*可能影响了生长素极性运输从而下调细胞周期相关基因的表达, 抑制根尖分生区的细胞分裂和伸长区的细胞伸长, 进而抑制拟南芥主根生长和侧根发生。

关键词: *AhHDA1*; 拟南芥; 根; 生长素; 细胞分裂

根是植物重要的器官, 其生长发育受外界环境和植物激素以及转录调控因子等各方面的调控(Sat-bhai等2015)。如根系生长受细胞增殖、分裂、伸长等过程共同调控, 而在根生长发育过程中细胞分裂和细胞伸长又受生长素调控(Beemster和Baskin 1998; Himanen等2002)。研究表明拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)响应生长素时, 会激活细胞周期蛋白CYCD2;1的活性, 从而促进侧根发生(Sanz等2011)。生长素极性运输极易受非生物胁迫影响而改变生长素在根部的浓度和分布, 进而调控主根生长。Wakeel等(2018)报道重铬酸盐处理拟南芥诱导生长素输入载体AUX1表达, 导致生长素在根部大量积累, 最终抑制拟南芥主根生长(Inahashi等2018)。干旱是植物经常面临的胁迫之一, 在应对干旱胁迫时, 主根伸长和侧根数量增加都是根为维持植物生存而在结构上所发生的改变。根系发育的这种可塑性使得人们可以通过改良根系形态以提高植物的抗旱性。

研究表明组蛋白去乙酰化修饰对植物根系生长发育具有调控作用。用组蛋白去乙酰化酶抑制剂trichostatin A (TSA)和sodium butyrate (NaB)处理拟南芥后促进生长素输出载体PIN1的降解, 导致PIN蛋白在根尖积累减少, 进而显著抑制拟南芥主根生长(Nguyen等2013)。TSA处理杨树(*Populus*)幼苗显著抑制根的再生和生长, 说明木本植物根的再生、生长受表观遗传调控, 组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)促进杨树根再生和

生长(张冰等2017)。水稻(*Oryza sativa*)超表达*Os-HDAC1*后主根生长速率明显提高(Jang等2010)。而后研究表明, *OsHDAC1*通过降低*OsNAC6*启动子上H3、H4的乙酰化水平从而抑制*OsNAC6*基因的表达, 进而促进水稻主根的生长(Chung等2010)。HDAC除影响主根生长外, 也影响侧根的生长发育。侧根发育受生长素应答因子(auxin response factor, ARF)的调节, 拟南芥中*LAAL4*突变后抑制生长素响应因子ARF7/19的活性, 从而抑制侧根发生, 这个过程受HDAC介导(Fukaki等2006)。由此可见, 组蛋白去乙酰化修饰对根的生长发育具有显著影响。

课题组在前期研究中发现了花生叶片中的一类组蛋白去乙酰化酶*AhHDA1*, 该酶与拟南芥中的HDA6高度同源, 并发现拟南芥异源表达*AhHDA1*后抗旱性降低(邓斌等2016), 而*AhHDA1*是否影响根的生长尚不清楚。本文研究*AhHDA1*对异源表达拟南芥根系生长的影响及机制, 为进一步了解*AhHDA1*的功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)野生型Colum-

收稿 2018-12-20 修定 2019-01-21

资助 国家自然科学基金(31471422)。

* 通讯作者(liling502@126.com)。

bia-0 (Col-0)、*hda6*突变体及*AhHDA1*异源表达拟南芥*AhHDA1/hda6*为本实验室筛选保存。图1所示为*AhHDA1/hda6*株系的鉴定结果。参照黄淑颜等(2018)方法清洗拟南芥种子,均匀播撒于1/2MS培养基上后置于4°C冰箱春化2 d,取出于光照培养室(室温22°C,光周期为16 h光照/8 h黑暗)内培养,3 d后将萌发的幼苗移至带有刻线的方形培养皿上竖直培养7 d。

1.2 主根长度测量和侧根数量统计

利用Digimazer软件测量7日龄拟南芥幼苗(在1/2MS培养基上竖直生长7 d)的主根长度并统计侧根数量(每根主根上的侧根数),每个株系统计20株以上的幼苗。

1.3 荧光显微镜观察根尖

将7日龄拟南芥幼苗置于载玻片上制成临时装片,在Leica DM6 B正置荧光显微镜(Leica Microsystems, 德国)下观察根尖分生区和伸长区细胞。

1.4 RT-qPCR检测基因表达水平

取7日龄拟南芥幼苗的根,参照Trizol RNA试剂盒(购买自TaKaRa Bio Inc.)说明书提取根部总RNA,采用5X All-In-One RT MasterMix反转录试剂盒[购买自Applied Biological Materials (abm) Inc.]合成cDNA,以cDNA为模板使用Bio-Rad CFX96 Touch荧光定量PCR仪(购买自美国Bio-Rad)检测基因的相对表达量。扩增程序参照文献(陈容钦等2017),检测所用引物见表1。

2 实验结果

2.1 *AhHDA1*抑制拟南芥主根伸长和侧根发生

在1/2MS培养基上竖直生长7 d后,测量Col-0、

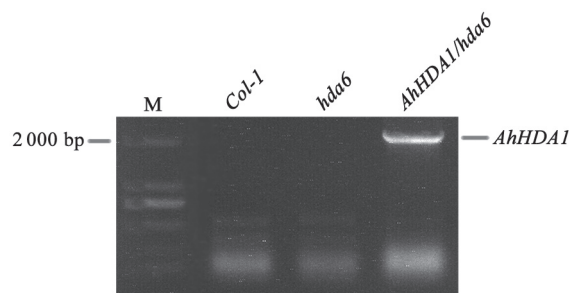


图1 异源表达株系*AhHDA1/hda6*的鉴定

Fig.1 Identification of heterologous lines *AhHDA1/hda6*

表1 RT-qPCR检测拟南芥相关基因表达所用的引物
Table 1 RT-qPCR primers for detection of related gene expression in *Arabidopsis*

基因	引物序列(5'→3')
<i>Atactin</i>	F: GATTGGAATGGAAGCTGCTG R: CGGTCAGCAATACCAGGGAA
<i>AtCYCD1;1</i>	F: GCGAACGAGTTACCTTCTCTATCC R: GCTCAATCCGTCACACCAAGTC
<i>AtE2Fb</i>	F: CCGATGAAAGAGGAAAGCACCG R: CGCCTACCTCTGATCGAAACC
<i>AtPIN1</i>	F: AACAACATAAGCAACAAAACGACGC R: CTTGAAGGAAATGAGGGACCAGGTG
<i>AtPIN2</i>	F: TGGTCTTGAATGGCTATGT R: ATCGCAAACCCTGCTACTGA

*hda6*突变体和*AhHDA1/hda6*的主根长度(图2-A和B)。*hda6*突变体的主根显著长于Col-0 ($P < 0.05$),*AhHDA1/hda6*的主根长度显著短于*hda6*突变体和Col-0,说明异源表达*AhHDA1*的拟南芥主根生长受到抑制。从侧根数量上看(图2-A和C),*hda6*突变体的侧根数量最多,*AhHDA1/hda6*的侧根与*hda6*突变体相比少而且短,与Col-0无显著差异($P > 0.05$),说明*AhHDA1*抑制了拟南芥侧根发生。

2.2 *AhHDA1*抑制拟南芥根尖细胞分裂和伸长

为了在细胞水平检测*AhHDA1*对拟南芥主根和侧根生长的影响,在荧光显微镜下观察3个株系的主根根尖细胞。图3-A所示,Col-0和*hda6*突变体的根尖呈细直状,*AhHDA1/hda6*根尖较粗且呈弯曲状。此外,*hda6*突变体的根尖分生区显著长于Col-0,而*AhHDA1/hda6*的根尖分生区长度与Col-0无显著差异,但显著短于*hda6*突变体(图3-B)。以上结果说明*hda6*突变体的分生区细胞分裂旺盛、分生区细胞数量多,因而主根生长旺盛,侧根数量多;而*AhHDA1/hda6*的根尖分生区细胞的分裂能力弱,细胞数量少,因此主根生长缓慢,侧根数量少。说明*AhHDA1*可能抑制分生区细胞分裂进而抑制拟南芥主根生长和侧根发生。

Col-0和*hda6*突变体伸长区的细胞呈细长状,而*AhHDA1/hda6*的伸长区细胞较短且粗(图3-C)。*hda6*突变体根尖伸长区细胞的长度显著长于Col-0,*AhHDA1/hda6*的伸长区细胞长度显著比*hda6*突变体短,与Col-0无显著差异(图3-D)。以上结果说

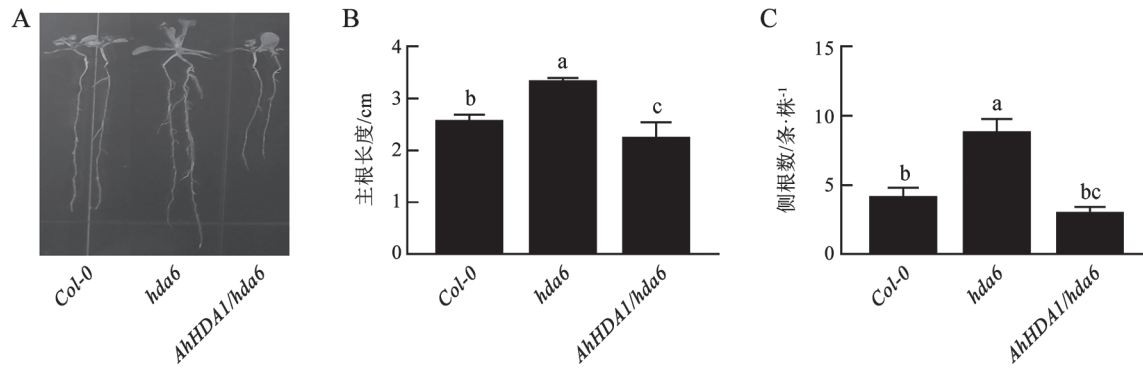


图2 不同株系拟南芥在1/2MS上生长7 d后主根长度和侧根数量

Fig.2 Primary root length and lateral root numbers of different lines growing on 1/2MS for 7 days

A: 7日龄拟南芥幼苗; B: 主根长度; C: 侧根数量。柱状图中的不同小写字母代表不同株系之间差异显著 $P < 0.05$ (邓肯检验), 下图同此。

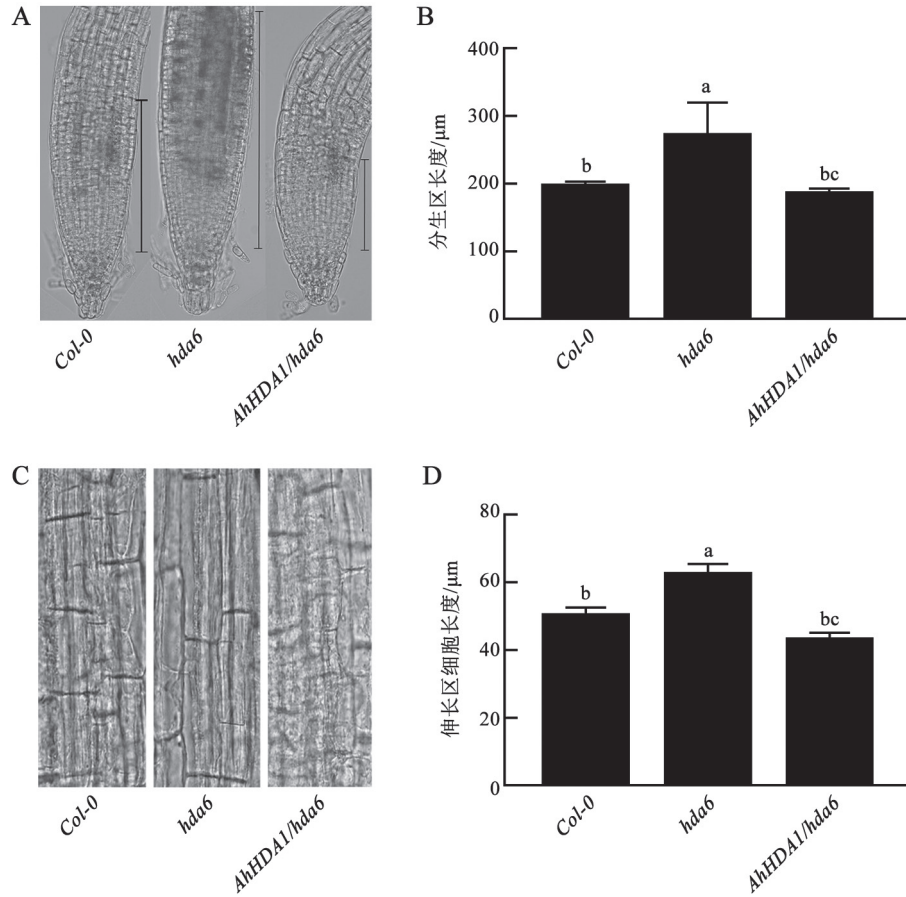


图3 7日龄拟南芥幼苗根尖分生区长度以及伸长区细胞长度

Fig.3 Length of apical meristem and elongation zoon cells in 7-day-old *Arabidopsis* seedlings

A、B: 分生区细胞; C、D: 伸长区细胞。

明*AhHDA1*抑制了拟南芥根尖伸长区细胞的伸长,从而抑制主根伸长。

2.3 *AhHDA1*抑制拟南芥根部细胞周期和生长素极性运输相关基因的表达

通过RT-qPCR检测拟南芥根部细胞周期相关基因和生长素极性运输相关基因的表达水平。*CYCD1;1*和*E2Fb*是细胞周期相关基因,其中*CYCD1;1*编码D型细胞周期蛋白,*E2Fb*编码细胞周期相关基因的转录因子。*CYCD1;1*和*E2Fb*在*hda6*突变体根部的表达水平皆显著高于Col-0,而在*AhHDA1/hda6*根部这两个基因的表达水平显著低于*hda6*突变体(图4-A和B),说明*AhHDA1*可能下调细胞周期相关基因的表达水平。

*PIN1*和*PIN2*是编码生长素输出载体蛋白的基因,图4-C和D显示,在*hda6*突变体根部*PIN1*和*PIN2*的表达量高于Col-0,而它们在*AhHDA1*异源表达株

系*AhHDA1/hda6*的根部表达量相比*hda6*突变体显著下调(*PIN1*下调的程度更显著)。说明*AhHDA1*下调拟南芥根部*PIN1*、*PIN2*的表达水平。

3 讨论

组蛋白去乙酰化酶对植物的主根和侧根生长发育皆具有调控作用。本文结果表明*AhHDA1*抑制拟南芥主根生长和侧根发生,主要表现在:与Col-0相比,*hda6*突变体的主根长度和侧根数量都显著增加;而*AhHDA1*异源表达株系*AhHDA1/hda6*的主根短,侧根数量少(图2-A)。目前认为HDAC促进拟南芥主根生长、抑制侧根的发生(Nguyen等2013; Fukaki等2006);过表达*OsHDAC1*对水稻主根生长具有促进作用(Jang等2010; Chung等2010)。HDAC对根系生长的不同作用可能是因为它是一个复合体,其中不同成员在根生长过程中的调控机制有所不同。

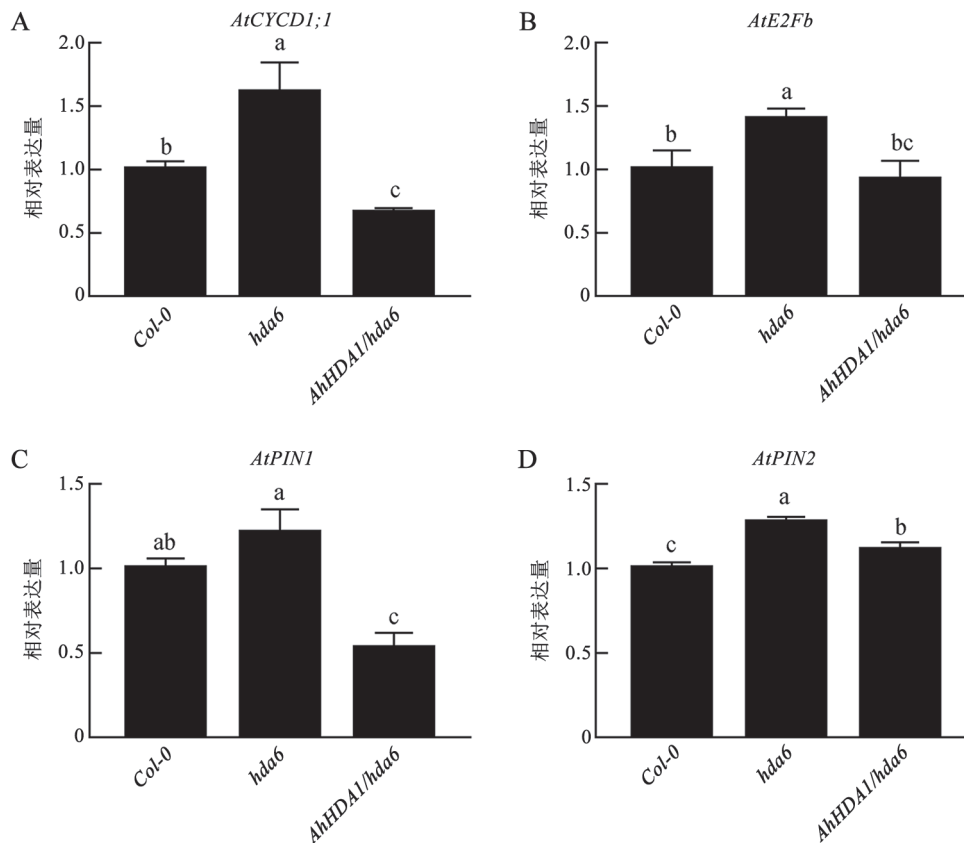


图4 7日龄拟南芥幼苗根部细胞周期相关和生长素极性运输相关基因的表达水平

Fig.4 Expression levels of cell cycle-related and auxin polar transport-related genes in root of 7-day-old *Arabidopsis* seedlings

根系长度和侧根发生与分生区细胞的分裂能力有密切关系, 而细胞分裂又受细胞周期调控 (Castro等2007; Petricka等2012)。 *hda6*突变体根部的细胞周期相关基因 *CYCD1;1*和 *E2Fb*的表达水平显著高于Col-0, 而这两个基因在 *AhHDA1/hda6*根部的表达与 *hda6*相比显著下调(图4-A和B), 说明 *AhHDA1*抑制了拟南芥根部细胞周期相关基因 *CYCD1;1*和 *E2Fb*的表达。拟南芥根部显微结构显示, *hda6*突变体的分生区比Col-0长, 而 *AhHDA1/hda6*的分生区长度与 *hda6*突变体相比明显缩短(图3-A和B), 说明 *hda6*突变体分生区细胞分裂能力旺盛细胞数量多, 而 *AhHDA1*异源表达株系 *AhHDA1/hda6*的分生区细胞分裂能力弱因此细胞数量少。以上结果表明, *AhHDA1*可能通过抑制细胞周期相关基因的表达抑制了分生区细胞分裂, 进而抑制拟南芥主根生长和侧根发生。伸长区细胞尺寸也影响根系长度, *hda6*突变体的伸长区细胞显著长于Col-0, *AhHDA1/hda6*的伸长区细胞与 *hda6*突变体相比明显缩短(图3-C和D), 说明 *AhHDA1*抑制了伸长区细胞伸长进而抑制主根伸长。

生长素极性运输在主根和侧根生长发育过程中具有重要作用。生长素输出载体PIN1负责生长素在根中的向顶式运输, PIN2负责在表皮和皮层中进行反流的向基运输(Balzan等2014)。研究表明改变PIN在拟南芥根部的分布对侧根形成和生长发育都有影响(Fukaki和Tasaka 2009)。本文研究结果显示, 生长素输出载体 *PIN1*、*PIN2*在 *hda6*突变体根部的表达显著高于Col-0, 而在 *AhHDA1/hda6*根部的表达量较 *hda6*突变体显著下调(图4-C和D), 说明 *AhHDA1*抑制拟南芥根部 *PIN1*、*PIN2*的表达(对 *PIN1*的抑制作用更显著), 影响生长素向根尖运输, 改变了生长素在根尖分布。细胞分裂和伸长受生长素的调控, Himanen等(2002)研究表明, 生长素通过调控细胞周期参与根细胞的分裂、分化和伸长, 从而实现对主根伸长和侧根发生的调控(Casimiro等2003)。Kuppusamy等(2009)报道生长素能够诱导苜蓿(*Medicago*) *CDC16*的表达, 进而激活根尖分生区细胞分裂, 最终促进主根生长和侧根发生。由此推测 *AhHDA1*抑制拟南芥根系生长的机制: *AhHDA1*不同程度地下调生长素输出载体

PIN1、*PIN2*的表达水平, 改变了生长素在根尖分布, 而生长素分布的改变影响细胞周期相关基因的表达, 进而影响分生区细胞的分裂能力以及伸长区细胞的伸长, 最终抑制拟南芥主根生长和侧根发生。

参考文献(References)

- Balzan S, Johal GS, Carraro N (2014). The role of auxin transporters in monocots development. *Front Plant Sci*, 5: 393
- Beemster GT, Baskin TI (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 116 (4): 1515–1526
- Casimiro I, Beeckman T, Graham N, et al (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci*, 8 (4): 165–171
- Castro RO, Trujillo MM, Bucio JL, et al (2007). Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Sci*, 172 (1): 684–691
- Chen RQ, Shu W, Ge K, et al (2017). Effect on growth and expressions of stress-related genes in peanut under drought stress training. *Plant Physiol J*, 53 (10): 1921–1927 (in Chinese with English abstract) [陈容钦, 舒文, 葛奎等 (2017). 干旱胁迫训练对花生生长及胁迫相关基因表达的影响. *植物生理学报*, 53 (10): 1921–1927]
- Chung PJ, Kim YS, Jeong JS, et al (2010). The histone deacetylase OsHDAC1 epigenetically regulates the *OsNAC6* gene that controls seedling root growth in rice. *Plant J*, 59 (5): 764–776
- Deng B, Li L, Li XY, et al (2016). Heterologous expression of *AhHDA1* affects drought resistance of *Arabidopsis* plants. *J South China Nor Univ (Nat Sci Edn)*, 48 (5): 52–57 (in Chinese with English abstract) [邓斌, 李玲, 李晓云等 (2016). *AhHDA1*异源表达影响拟南芥植株干旱性. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 48 (5): 52–57]
- Fukaki H, Taniguchi N, Tasaka M (2006). PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant J*, 48 (3): 380–389
- Fukaki H, Tasaka M (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol*, 69 (4): 437–449
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, et al (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*, 14 (10): 2339–2351
- Huang SY, Feng JX, Chen JY, et al (2018). ABA sensitivity and drought tolerance of *Arabidopsis dmard abf3* mutant. *Plant Physiol J*, 54 (3): 386–392 (in Chinese with English abstract) [黄淑颜, 冯锦欣, 陈家逸等(2018). 拟南芥 *dmard abf3*突变体对ABA的敏感性和耐旱性能. *植物*

- 生理学报, 54 (3): 386–392]
- Inahashi H, Shelley IJ, Yamauchi T, et al (2018). *OsPIN2*, which encodes a member of the auxin efflux carrier proteins, is involved in root elongation growth and lateral root formation patterns via the regulation of auxin distribution in rice. *Physiol Plant*, 164 (2): 216–225
- Jang IC, Pahk YM, Song SI, et al (2010). Structure and expression of the rice class-I type histone deacetylase genes *OsHDAC1-3*: *OsHDAC1* overexpression in transgenic plants leads to increased growth rate and altered architecture. *Plant J*, 33 (3): 531–541
- Kuppusamy KT, Ivashuta S, Bucciarelli B, et al (2009). Knockdown of *CELL DIVISION CYCLE16* reveals an inverse relationship between lateral root and nodule numbers and a link to auxin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol*, 151 (3): 1155–1166
- Nguyen HN, Kim JH, Chan YJ, et al (2013). Inhibition of histone deacetylation alters *Arabidopsis* root growth in response to auxin via PIN1 degradation. *Plant Cell Rep*, 32 (10): 1625–1636
- Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annu Rev Plant Biol*, 63: 563–590
- Sanz L, Dewitte W, Forzani C, et al (2011). The *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD2;1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation. *Plant Cell*, 23 (2): 641–660
- Satbhai SB, Ristova D, Busch W (2015). Underground tuning: quantitative regulation of root growth. *J Exp Bot*, 66 (4): 1099–1112
- Wakeel A, Ali I, Upreti S, et al (2018). Ethylene mediates dichromate induced inhibition of primary root growth by altering *AUX1* expression and auxin accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 41 (6): 1453–1467
- Zhang B, Xia DA, Ma XJ (2017). Function of histone deacetylase in poplar root regeneration and growth. *Jiangsu Agric Sci*, 45 (5): 40–43 (in Chinese) [张冰, 夏德安, 马旭俊(2017). 组蛋白去乙酰化酶在杨树根再生和生长中的功能. *江苏农业科学*, 45 (5): 40–43]

AhHDA1 affecting root growth of *Arabidopsis thaliana*

ZENG Li-Dan, WU Xin-Quan, LI Xiao-Yun, LI Ling*

Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for Plant Development, School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: *AhHDA1* is a histone deacetylase of peanut, which is highly homologous to *HDA6* in *Arabidopsis thaliana*. Both *AhHDA1* and *AtHDA6* have conserved histone deacetylase activity domain. 7-day-old Col-0, *hda6* mutant and *AhHDA1/hda6* lines were obtained to analyze the length of primary root and the number of lateral roots. The results showed that, the growth of primary root of *AhHDA1/hda6* was obviously slowed down and its number of lateral roots also decreased significantly compared to *hda6* mutant. The root tip of three lines were observed by Leica DM6 fluorescence microscope, the results revealed that the length of meristem and elongation cells of *AhHDA1/hda6* were significantly shortened compared with *hda6* mutant, however, it had no significant difference compared with Col-0. Further detection of gene expression levels showed that, the expression of cell cycle-related and auxin polar transport-related genes in root of *AhHDA1/hda6* was significantly lower than that of *hda6* mutant. All the results showed that *AhHDA1* may down-regulate the expression of cell cycle-related genes through affecting the polar transport of auxin to inhibit cell division and elongation, contributing to repress the growth of primary root and generation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*.

Key words: *AhHDA1*; *Arabidopsis thaliana*; roots; auxin; cell division

Received 2018-12-20 Accepted 2019-01-21

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31471422).

*Corresponding author (liling502@126.com).