

拟南芥*IQM3*基因突变减少幼苗的侧根数量和增加主根长度

徐浩, 冯奕嘉, 范甜, 吕天晓, 谢楚萍, 周玉萍, 田长恩*

广州大学生命科学学院广州市植物抗逆基因功能重点实验室, 广州510006

摘要: 在拟南芥中, *IQM*家族属于含IQ基序的钙调素结合蛋白家族, 共有6个成员。其中, *IQM3*的功能尚未有相关报道。本研究对该基因的2个突变体*iqm3-1*和*iqm3-2*幼苗的侧根数量、主根长度和赤霉素(GA_3 和 GA_4)含量进行了测定。结果表明, *iqm3-1*和*iqm3-2*比野生型Col-0具有更少的侧根、更长的主根以及更高的 GA_3 和 GA_4 含量。用5~20 mmol·L⁻¹赤霉素生物合成抑制剂多效唑处理种子后, *iqm3-1*、*iqm3-2*的侧根和主根长度与野生型接近, 说明*IQM3*可能通过抑制赤霉素的生物合成而参与对幼苗的侧根数量和主根长度的调节。

关键词: *IQM3*; 根; 赤霉素; 钙调素结合蛋白; 拟南芥

根作为一种重要的植物器官, 其作用主要是从土壤中获取水分和营养, 合成含氮有机化学物质、激素和其他营养物质, 同时固定植物。因此, 根系的活力将直接影响整株植物的生长、发育和营养状况。业已发现, 许多内外因子影响根系的生长发育。其中, 植物激素与根系的生长和发育密切相关(Wang等2015)。植物激素作为植物特定组织中合成的一类重要物质, 只需极低的浓度就可在植物的组织中发挥作用, 通过与特定蛋白质受体相互作用, 进而调节其他细胞的生理过程。如生长素(auxin, IAA)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)、乙烯(ethylene)、脱落酸(abscisic acid, ABA)和赤霉素(gibberellins, GAs)通过其特定的生物合成和信号转导途径参与植物根系生长和发育的调节(Garay-Arroyo等2012)。

IAA主要在叶片和茎尖(shoot apical meristem, SAM)中合成, 并从叶片运输到根部; 根也可以合成IAA并在一定浓度内增加侧根数量, 促进主根生长(Fukaki等2007; Petersson等2009)。CTK通过减少分裂细胞的数量和分生组织的大小来抑制侧根数和主根的生长, 但它不会改变细胞分裂速率(Dello Ioio等2008)。乙烯可通过调节细胞的纵向延伸来改变根长, 并可调节根部的细胞分化; 还可能通过调节静止中心的细胞分裂速率而影响根系发育(Dugardeyn和Van Der Straeten 2008; Hu等2017)。ABA可以诱导气孔关闭, 以促进水分胁迫条件下的根伸长; 然而, 当水分足够时, 外加ABA减少侧根数量并抑制主根生长(Sharp和LeNoble 2002; De

Smet等2006; 黄淑颜等2018); 此外, 钙离子(Ca^{2+})和 H_2O_2 也参与ABA调节的根生长和发育的信号传导(Bai等2009)。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 赤霉素(GAs)对主根顶端分生组织的生长和侧根的形成具有正调控作用(Achard等2009; Farquharson 2010; Bidadi等2014); 不过, 在杨树(*Populus*)和蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)等植物中却发现, 赤霉素对此却具有负调控作用(Gou等2010; Fonouni-Farde等2019)。然而, 迄今为止, 根生长中GAs生物合成与 Ca^{2+} /钙调素(calmodulin, CaM)信号之间的关系的研究报道很少。

Ca^{2+} 作为一种通用的第二信使, 在调节不同真核细胞功能时充当“刺激-反应耦合”的中介(McAinsh和Pittman 2009; Steinhorst和Kudla 2013)。细胞受到刺激后, 引起了细胞内的 Ca^{2+} 浓度的改变, 从而通过 Ca^{2+} 传感蛋白及其靶蛋白来调节多种生化和细胞反应。钙调素(CaM)和钙调素类似蛋白(CaM-like, CML)是主要的 Ca^{2+} 传感蛋白(Zeng等2015)。CaM或CML通过与其靶蛋白——钙调素结合蛋白(calmodulin-binding protein, CaMBP)结合来调控细胞的生理(Bouche等2005)。根据与CaMBP结合时需要或不需要 Ca^{2+} 的参与, 可将CaM分为 Ca^{2+} 不依赖型和 Ca^{2+} 依赖型(O'Day 2003)。 Ca^{2+} 不依赖型的钙调素蛋白(CaM)含有IQ基序

收稿 2019-04-15 修定 2019-04-30

资助 国家自然科学基金(311770342)和广州市科技计划(2016-07010297)。

* 通讯作者(changentian@aliyun.com)。

IQxxxRGxxxR, 其中“I”可以被“VFL”代替, “x”代表任何氨基酸残基(Bähler和Rhoads 2002)。在植物中主要有5个含有IQ基序的钙调素结合蛋白家族, 包括IQM (IQ motif containing protein)家族、CAMTA (calmodulin-binding transcription activator)家族、IQD (IQ67-domain containing protein)家族、CNGC (cyclic nucleotide-gated channel)家族和myosin家族(Zhou等2010)。不同家族成员的重要结构域、所含IQ基序的数量等各不相同(田长恩和周玉萍2013)。

本研究组曾发现, IQM家族成员与豌豆重金属诱导蛋白质6A和天花粉素(一种核糖体失活蛋白质)具有同源序列(Zhou等2010); 该家族有6个成员, 不同成员的表达模式在不同器官和不同的环境条件下均不同, 提示它们可能有着不同的功能(Zhou等2018)。IQM1可通过介导茉莉酸甲酯信号转导来促进根系生长(周玉萍等2013; 莫忠蓁等2015)。IQM3是IQM家族的第3个成员, 由At3g52870编码, 其功能未见报道。为了研究IQM3基因的功能, 本研究组前期鉴定获得了2个该基因的T-DNA插入突变株系*iqm3-1*和*iqm3-2*(周玉萍等2009)。本文研究*iqm3-1*和*iqm3-2*对侧根数、主根长的影响, 并分析了赤霉素含量变化, 为揭示IQM3基因调节侧根数和主根长的机制提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料培养

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) *iqm3-1*、*iqm3-2*和Col-0的种子为本实验室保存。100 mmol·L⁻¹多效唑(paclobutrazol, PAC)母液配置: 称取29.4 mg PAC粉末溶于1 mL无水乙醇中, 过滤除菌。经高压灭菌的1/2MS培养基温度下降到55°C时, 添加多效唑母液, 配置出含有PAC浓度为0.5、1、5、10和20 mmol·L⁻¹的1/2MS培养基。

将放在4°C冰箱中处理48 h的种子表面灭菌后, 等间距的平铺在含有不同PAC浓度的1/2MS培养基的方型培养皿上, 不含PAC的1/2MS培养基为对照组。在恒温恒湿的光照培养室中, 以长日照条件平板垂直培养9 d。

1.2 侧根数量统计和主根长度测量

用肉眼对9 d苗龄的幼苗进行侧根计数; 使用

Digimizer软件对9 d苗龄的幼苗主根长度进行测量和统计, 并使用SPSS软件对数据进行Student's *t*-检验。每个株系测量统计 $n \geq 20$, 进行3次生物学重复。

1.3 赤霉素(GA₃和GA₄)含量检测

以异丙醇/水/盐酸提取方法提取样品中植物内源激素(Pan等2010), 以安捷伦1290高效液相色谱仪串联AB公司Qtrap6500质谱仪测定植物内源激素GA₃和GA₄。

2 实验结果

2.1 IQM3突变减少侧根数量、增加主根长度

在长日照条件下, 垂直培养幼苗9 d, 测量与统计*iqm3-1*、*iqm3-2*和Col-0的主根长和侧根数的结果表明, *iqm3-1*和*iqm3-2*的侧根数均显著少于Col-0(图1-A和B), 其主根均显著长于Col-0(图1-C)。说明IQM3基因突变减少了幼苗的侧根数量和增加了幼苗的主根长度。

2.2 IQM3参与调控赤霉素的生物合成

利用ESI-HPLC-MS/MS技术, 检测*iqm3-1*、*iqm3-2*和Col-0的幼苗内生理活性赤霉素(GA₃和GA₄)含量。结果显示, 突变体*iqm3-1*和*iqm3-2*的GA₃和GA₄含量均显著高于野生型Col-0(图2), 说明IQM3可能参与了GAs的合成从而调控侧根数和主根长。

在长日照条件下, 含不同PAC浓度的1/2MS培养基上垂直培养幼苗9 d, 测量与统计*iqm3-1*、*iqm3-2*和Col-0的主根长和侧根数的结果表明, 在低浓度PAC (0.5 mmol·L⁻¹)处理下, *iqm3-1*和*iqm3-2*的侧根数均显著少于Col-0(图3-A); 而*iqm3-1*和*iqm3-2*的主根均显著长于Col-0(图3-B)。但是, 随着PAC浓度的增加, *iqm3-1*、*iqm3-2*和Col-0的侧根数和主根长度基本趋于相等(图3)。这些数据表明, IQM3很可能是通过抑制GAs的生物合成而调控侧根数量和主根长度的。

3 讨论

CaM作为最重要的Ca²⁺传感蛋白, 大量存在于植物的细胞和组织中。CaM与靶蛋白CaMBP相互结合才可调控细胞的生理(Bouche等2005)。在根系发育中, CaM/CaMBP起到十分重要的作用, 如参

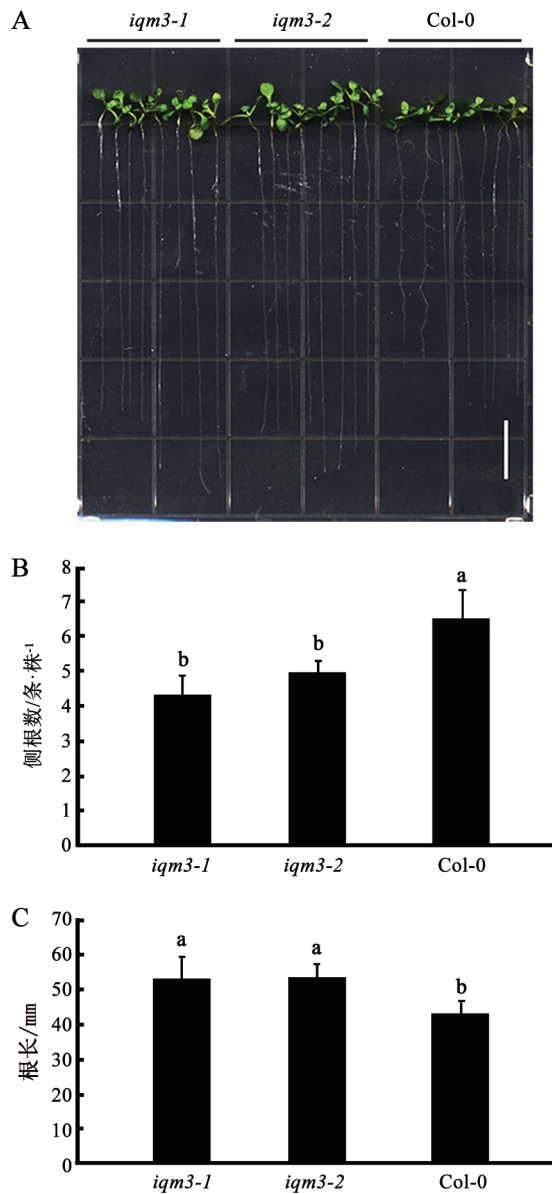


图1 不同基因型幼苗的主侧根数量和主根长度

Fig.1 Root length and lateral root number in seedlings of different genotypes

A: 长日照条件下竖直培养9 d的幼苗, Bar=10 mm; B: 主根根长; C: 侧根数量。柱状图中不同的小写字母表示不同基因株系之间的显著性差异($P<0.05$), 图2同此。

与AHL、NO和 H_2O_2 信号的转导调控根系的发育(Zhao等2016; Liao等2012; Niu等2017)。IQM3是IQM家族的1个成员, 该家族属于含IQ基序的钙调素结合蛋白家族(田长恩和周玉萍2013)。该家族的成员之一IQM1可通过介导茉莉酸甲酯信号转导

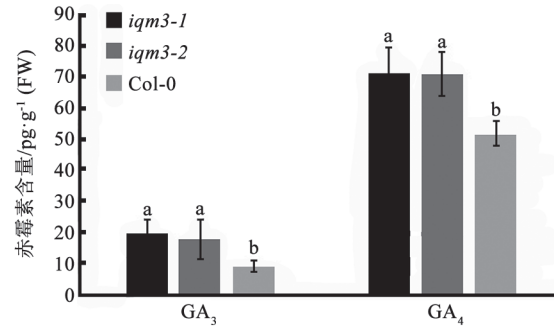
图2 不同基因型幼苗的GA₃或GA₄的含量

Fig.2 Content of gibberellic acid 3 or 4 in seedlings of different genotypes

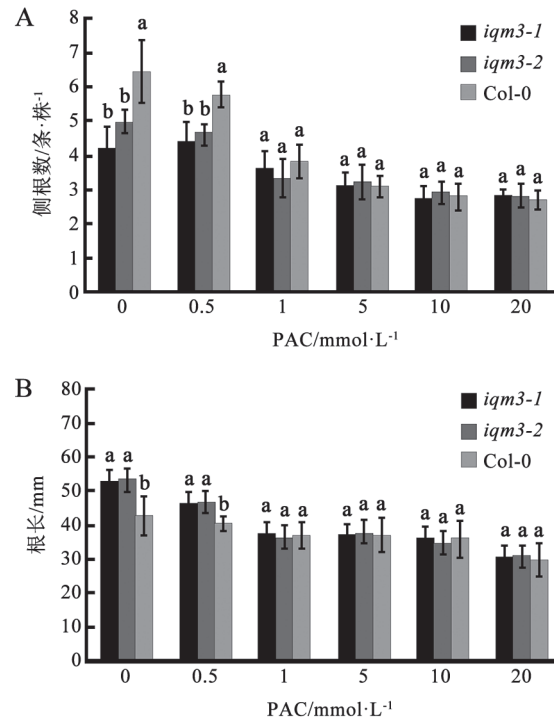


图3 多效唑(PAC)处理对不同基因型幼苗侧根数量和主根长度的影响

Fig.3 Effects of paclobutrazol (PAC) treatment on lateral root number and root length of seedlings of different genotypes

A: 侧根数量; B: 主根根长。图中不同的小写字母表示同一PAC培养浓度不同基因株系之间的显著性差异($P<0.05$)。

来促进根系生长(周玉萍等2013; 莫忠蓁等2015)。本研究的结果表明, 与Col-0比较, *iqm3-1*和*iqm3-2*的侧根数减少, 主根长度增加(图1), 推测IQM3可能参与植物激素调控根系的发育。已有报道, 拟

南芥幼苗中叶、茎和根的内源GAs的增加会导致侧根数减少、主根长增加(Achard等2009),可能体内积累GA可抑制侧根的发生,增强根顶端分生组织的活性,促进主根伸长(Tanimoto 2005; Holdsworth等2008; Bidadi等2014)。*iqm3-1*和*iqm3-2*突变体植株内生理活性的GA₃和GA₄含量均显著高于Col-0(图2),当PAC处理浓度达到5~20 mmol·L⁻¹时,*iqm3-1*、*iqm3-2*和Col-0的根长和侧根数趋于相同(图3)。说明IQM3的突变促进了赤霉素的合成,从而抑制侧根的发生,促进主根伸长。这是关于CaMBP调节GAs生物合成影响植物根系生长发育的第一个报告。后续将进一步研究IQM3是否介导CaM信号调控及其调控根中GAs生物合成的机制,进一步深刻理解IQM家族成员在植物生理和发育中的作用以及更好的理解CaM信号在植物激素调控生长发育中的作用。

参考文献(References)

- Achard P, Gusti A, Cheminant S, et al (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 19: 1188–1193
- Bähler M, Rhoads A (2002). Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett*, 513: 107–113
- Bai L, Zhang GZ, Zhou Y, et al (2009). Plasma membrane-associated proline-rich extension-like receptor kinase 4, a novel regulator of Ca²⁺ signaling, is required for abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 60: 314–327
- Bidadi H, Matsuoka K, Sage-Ono K, et al (2014). *CLE6* expression recovers gibberellin deficiency to promote shoot growth in *Arabidopsis*. *Plant J*, 78: 241–252
- Bouche N, Yellin A, Snedden WA, et al (2005). Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 435–466
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, et al (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science*, 322: 1380–1384
- De Smet I, Zhang H, Inzé D, et al (2006). A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci*, 11: 434–439
- Dugardeyn J, Van Der Straeten D (2008). Ethylene: fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Sci*, 175: 59–70
- Farquharson KL (2010). Gibberellin-auxin crosstalk modulates lateral root formation. *Plant Cell*, 22 (3): 540
- Fonouni-Farde C, Miassod A, Laffont C, et al (2019). Gibberellins negatively regulate the development of *Medicago truncatula* root system. *Sci Rep*, 9: 2335
- Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M (2007). Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int Rev Cytol*, 256: 111–137
- Garay-Arroyo A, De La Paz Sánchez M, García-Ponce B, et al (2012). Hormone symphony during root growth and development. *Dev Dyn*, 241: 1867–1885
- Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, et al (2010). Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell*, 22 (3): 623–639
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ (2008). Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol*, 179: 33–54
- Hu Y, Vandenbussche F, Van Der Straeten D (2017). Regulation of seedling growth by ethylene and the ethylene-auxin crosstalk. *Planta*, 245: 467–489
- 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]
- Liao WB, Zhang ML, Huang GB, et al (2012). Ca²⁺ and CaM are involved in NO- and H₂O₂- induced adventitious root development in marigold. *J Plant Growth Regul*, 31 (2): 253–264
- McAinsh MR, Pittman JK (2009). Shaping the calcium signature. *New Phytol*, 181: 275–294
- Mo ZZ, Huang ZK, Zhou YP, et al (2015). IQM1 is involved in response of primary root growth to methyl jasmonate in *Arabidopsis*. *Lett Biotech*, 26 (3): 399–402 (in Chinese with English abstract) [莫忠蓁, 黄章科, 周玉萍等(2015). 拟南芥IQM1涉及主根生长对茉莉酸甲酯的反应. 生物技术通讯, 26 (3): 399–402]
- Niu LJ, Yu J, Liao WB, et al (2017). Calcium and calmodulin are involved in nitric oxide-induced adventitious rooting of cucumber under simulated osmotic stress. *Front Plant Sci*, 8: 1684
- O'Day DH (2003). CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding protein. *Cell Signal*, 15: 347–354
- Pan XQ, Welti R, Wang XM (2010). Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nat Protoc*, 5 (6): 986–992
- Petersson SV, Johansson AI, Kowalczyk M, et al (2009). An

- auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell*, 21: 1659–1668
- Sharp RE, LeNoble ME (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J Exp Bot*, 53: 33–37
- Steinhorst L, Kudla J (2013). Calcium - a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochim Biophys Acta*, 1833 (7): 1573–1581
- Tanimoto E (2005). Regulation of root growth by plant hormones-roles for auxin and gibberellin. *Crit Rev Plant Sci*, 24: 249–265
- Tian CE, Zhou YP (2013). Research progress in plant IQ motif-containing calmodulin-binding proteins. *Chin Bull Bot*, 48 (4): 447–460 (in Chinese with English abstract) [田长恩, 周玉萍(2013). 植物具IQ基序的钙调素结合蛋白的研究进展. *植物学报*, 48 (4): 447–460]
- Wang GL, Jia XL, Xu ZS, et al (2015). Sequencing, assembly, annotation, and gene expression: novel insights into the hormonal control of carrot root development revealed by a high-throughput transcriptome. *Mol Gen Genomics*, 290: 1379–1391
- Zeng HQ, Xu LQ, Singh A, et al (2015). Involvement of calmodulin and calmodulin-like proteins in plant responses to abiotic stresses. *Front Plant Sci*, 6: 600
- Zhao Q, Zhang C, Jia ZH, et al (2016). Involvement of calmodulin in regulation of primary root elongation by N-3-oxo-hexanoyl homoserine lactone in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*, 5: 807
- Zhou YP, Chen QH, Chen JS, et al (2013). Overexpression of *Arabidopsis IQM1* gene affects stomatal movement and root growth. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 33 (5): 904–910 (in Chinese with English abstract) [周玉萍, 陈琼华, 陈洁珊等(2013). *IQM1*基因过量表达对拟南芥气孔运动及根系生长的影响. *西北植物学报*, 33 (5): 904–910]
- Zhou YP, Chen YZ, Yamamoto KT, et al (2010). Sequence and expression analysis of the *Arabidopsis* IQM family. *Acta Physiol Plant*, 32 (1): 191–198
- Zhou YP, Wu JH, Xiao WH, et al (2018). *Arabidopsis* IQM4, a novel calmodulin-binding protein, is involved with seed dormancy and germination in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 9: 721
- Zhou YP, Zhao J, He T, et al (2009). Expression analysis of *Arabidopsis thaliana IQM3* gene and identification of *iqm3* mutants. *J Trop Subtrop Bot*, 17 (4): 365–370 (in Chinese with English abstract) [周玉萍, 赵军, 何滔等(2009). 拟南芥*IQM3*基因的表达分析及其突变体的鉴定. *热带亚热带植物学报*, 17 (4): 365–370]

Disruption of *IQM3* reduces the number of lateral roots and increases the length of primary root in *Arabidopsis* seedlings

XU Hao, FENG Yi-Jia, FAN Tian, LÜ Tian-Xiao, XIE Chu-Ping, ZHOU Yu-Ping, TIAN Chang-En*

Guangzhou Key Laboratory for Functional Study on Plant Stress-Resistant Genes, School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China

Abstract: In *Arabidopsis thaliana*, the IQM family belongs to the calmodulin binding protein (CaMBP) families with the IQ motif, and has six members. So far *IQM3* has not been functionally characterized. In this study, the number of lateral roots, the length of primary root and the content of gibberellins (gibberellic acid 3, GA₃ and gibberellic acid 4, GA₄) in seedlings of two mutants *iqm3-1* and *iqm3-2* were determined. The results showed that two mutants, *iqm3-1* and *iqm3-2*, had fewer lateral roots, longer roots and higher content of GA₃ and GA₄ than wild-type Col-0. After treatment with 5–20 mmol·L⁻¹ paclobutrazol, a gibberellin biosynthesis inhibitor, the number of lateral roots and the length of primary root of *iqm3-1*, *iqm3-2* and Col-0 tended to be equal. These results suggest that *IQM3* may be involved in regulating the number of lateral roots and the length of primary roots of seedlings through inhibiting the biosynthesis of gibberellin.

Key words: *IQM3*; root; gibberellin; CaMBP; *Arabidopsis thaliana*

Received 2019-04-15 Accepted 2019-04-30

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (311770342) and the Science and Technology Planning Project of Guangzhou Municipality, China (201607010297).

*Corresponding author (changentian@aliyun.com).