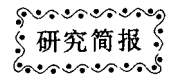


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01558



cpt1 基因与水稻根负向光性运动的关系

汪月霞^{1,2} 王 忠^{2,*} 刘全军¹ 赵会杰¹ 顾蕴洁² 钱晓旦² 袁志良¹

¹河南农业大学生命科学学院, 河南郑州 450002; ²扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州 225009

摘 要: 为了研究 *cpt1* 基因与水稻根负向光性运动的关系, 探讨 IAA 横向运输与水稻根负向光性运动的关系。检测了外源试剂 CaCl_2 、EDTA 以及 IAA 对水稻根的负向光性运动的效应, 并采用 RT-PCR 的方法验证了不同外源试剂对 *cpt1* 基因表达的影响。结果表明, 水稻根经光照 24 h 后, 与对照相比, 1 mg L^{-1} 的 CaCl_2 和 0.001 mg L^{-1} 的 IAA 能明显促进水稻根负向光性的弯曲生长, 1 mg L^{-1} 的 EDTA (CaCl_2 的抑制剂) 明显抑制水稻根负向光性的弯曲生长; *cpt1* 基因的表达受上述外源试剂诱导, 并表现与水稻根的负向光性生长呈明显的正相关性, 推测 IAA 的横向运输及其运输载体 CPT1 蛋白对水稻根的负向光性运动具重要作用。

关键词: 水稻; 根; 负向光性; IAA 载体蛋白; *cpt1* 基因

Relationship between *cpt1* Gene and the Negative Phototropism in Rice Roots

WANG Yue-Xia^{1,2}, WANG Zhong^{2,*}, LIU Quan-Jun¹, ZHAO Hui-Jie¹, GU Yun-Jie², QIAN Xiao-Dan², and YUAN Zhi-Liang¹

¹ College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ² College of Biosciences and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: With the purpose of studying the relationship between *cpt1* gene and negative phototropism in rice roots, discussing the contribution of asymmetric distribution of IAA on negative phototropism in rice roots, CaCl_2 , EDTA and IAA were assayed for their effects on the negative phototropism in rice roots, as well as effects on the expression of *cpt1* gene on the basis of reverse transcription-PCR. The result showed that, the negative phototropism in rice roots was improved by the treatment with 1 mg L^{-1} CaCl_2 and 0.001 mg L^{-1} IAA in culture solution under light for 24 h but constrained by 1 mg L^{-1} EDTA. A similar effect was shown from the analysis of *cpt1* gene expression, which suggested CPT1 protein could be induced by CaCl_2 and IAA. The effects also showed a positive correlation between the expression of *cpt1* and negative phototropism in rice roots. It could be supposed from present results that the asymmetric distribution of IAA is an important step for the negative phototropism process in rice roots, which probably is particularly associated with CPT1 protein as a carrier of IAA.

Keywords: Rice; Root; Negative phototropism; IAA carrier protein; *cpt1* gene

向光性是高等植物中广泛存在的生理现象, 是植物适应环境变化的一种体现^[1]。近年来, 以双子叶植物的模式植物拟南芥为材料, 对植物向光性运动的生理与分子机制的研究已经取得很大进展^[2]。采用构建突变体库筛选拟南芥胚芽鞘向光性缺失突变体并结合基因组学分析的方法, 已经鉴定出与向光性运动密切相关的基因或蛋白^[3-5]。NPH3 蛋白是拟南芥下胚轴向光性运动中的信号组分之一, 促进下胚轴向光性运动^[6], 在黑暗条件下它处于磷酸化状态, 而 phot1 处于去磷酸化状态, phot1 被蓝光激活后发生磷酸化, 启动光信号的转导^[7], NPH3 迅速去磷酸化^[8], 从而推动光信号的转导。RPT2 是另一种信号组

分, 该蛋白是 NPH3 的同源体^[9]。此外, PSK1、PSK2 也是拟南芥下胚轴向光性运动的信号组分^[10-11]。拟南芥突变体研究的结果也表明, NPH3、RPT2 以及 PSK1 在根的负向光性运动中也起重要的作用^[4,12-13]。

燕麦(*Avena sativa* L.)、玉米(*Zea mays* L.)以及水稻(*Oryza sativa* L.)等禾本科植物目前也已广泛作为研究植物向光性运动的材料^[11]。生长素在禾本科植物胚芽鞘向光性运动中的作用已有不少报道, 该类研究的结果遵守 Cholodny-Went 假说, 该假说认为植物的向光性运动是生长素的不对称分布造成的。生长素(吲哚-3-乙酸)在向光性运动植物体内的不对称分布已经在玉米^[14]、水稻^[15-16]以

本研究由国家自然科学基金项目(30871467)和江苏省高校研究生科技创新计划项目资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 王忠, E-mail: wangzhong@yzu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: yxwang2100@yahoo.cn

Received(收稿日期): 2008-11-15; Accepted(接受日期): 2009-02-17.

及豌豆^[17]中通过对其两侧生物量的测定而得到证明。近年来对拟南芥的研究结果也为IAA参与植物的向光性运动提供了分子依据^[18-19]。植物不同器官中的生长素水平与生长素的极性运输有着密切的联系,生长素在细胞间运输是直接由生长素载体承担的^[20]。在拟南芥中已经鉴定一种载体蛋白PIN1^[21]。Friml等^[22]研究发现当植物受到单向刺激后,体内的生长素载体PIN3蛋白发生不对称的分布和动态运动。这对生长素的侧向运输起着较大的作用。Haga等^[16]的研究结果表明,CPT1 (coleoptile phototropism 1)蛋白是水稻胚中拟南芥NPH3的高度同源体,该蛋白可能是水稻胚芽鞘向光性运动过程中IAA横向运输的重要载体,*cpt1*基因缺失突变体的胚芽鞘无向光性弯曲发生。

我们首先发现了水稻根具有明显的负向光性^[23-24],并初步认为是由于IAA横向运输不均导致的^[15]。然而,有关IAA横向运输的载体蛋白CPT1的编码基因在水稻根负向光性运动中的功能尚没有报道。高等植物向光性运动机理的复杂性也使我们需对*cpt1*基因在水稻根负向光性运动过程中的功能做独立的研究。本实验将对生长素在植物向性运动中的作用以及向光性运动中的信号转导途径提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻(*Oryza sativa* L.)品种日本晴(粳)。

1.2 不定根的培养

取分蘖期的秧苗,剥除分蘖,剪去根系,将主茎以泡沫塑料板固定插入盛水的玻璃方缸,泡沫塑料板具适宜的圆孔,稻株植入圆孔中,使茎基部垂直插入水下2 cm。待根原基长出后进行试验。分别用0.001 mg L⁻¹ IAA、1 mg L⁻¹ CaCl₂、1 mg L⁻¹ EDTA作为培养液,以H₂O作为对照。暗室中培养,设置光照和不光照两组处理,光照条件为室温下的540 Cd。24 h后取出,测量稻根弯曲度,每样重复3次,取平均值,结果用±SE表示。

1.3 引物设计

根据GenBank数据库中登录的水稻(*Oryza sativa* L.) *cpt1*基因的序列(登录号为AB186127),采用Primer Premier 5.0软件设计1对可用于cDNA扩增的PCR引物(*cpt1* F: 5'-TTGCAGTGCATAGCCAGTAC-3'; *cpt1* R: 5'-TTTC CACGTACTTCTCGTCC-3')。并根据水稻β-action基因设计引物,作为RT-PCR内参(β-action F: 5'-CTGGGTTCGC CGGAGATGAT-3'; β-action R: 5'-TGAGATCACGCCAG CAAGG-3')。引物序列由上海生物工程有限公司合成。

1.4 水稻根基因组DNA的提取以及*cpt1*引物PCR扩增

1.4.1 水稻根基因组DNA的提取 取1.0 g水稻根弯曲部分,在液氮中研磨成粉末状。加提取液(含0.5 mol L⁻¹ EDTA-Na₂, 1 mol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mol L⁻¹ KCl) 1 200 μL,摇匀置65℃水浴中30 min。12 000×g离心15 min,取上清

液至1.5 mL Eppendorf管里。加入-20℃预冷的异丙醇700 μL,冷冻2~3 h。在12 000×g离心8 min,弃上清液。加70%无水乙醇800 μL,室温放置4 h,12 000×g离心5 min,弃上清液,晾干,加25 μL ddH₂O溶解,保存于4℃,备用。

1.4.2 PCR扩增及产物验证 *cpt1*引物PCR扩增体系中含200 μmol L⁻¹ dNTP、1×HiFi缓冲液、2.5 mmol L⁻¹ MgCl₂、2.5 U *Taq* DNA聚合酶(上海欣百诺生物科技有限公司)、0.4 μmol L⁻¹ *cpt1* F和*cpt1* R引物,用ddH₂O将终体积调成20 μL。反应程序为:94℃ 5 min热启动,94℃ 变性1 min,58℃ 退火1 min,72℃ 延伸1 min,36个循环,72℃ 延伸10 min后8℃ 保存。PCR反应结束后采用琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,用TIANGEN凝胶回收试剂盒(TIANGEN)回收纯化目的DNA扩增产物,并送上海生物工程有公司测序。

1.5 RT-PCR

1.5.1 总RNA的提取 取0.12 g新鲜水稻根弯曲部分,采用TRNzol试剂(TIANGEN公司)按试剂说明书提取总RNA,所用器皿均用0.1% DEPC水清洗后灭菌(121℃,15 min),并烘干,所用试剂都用无RNase的水配置。将总RNA溶于50 μL无RNase的水中。采用甲醛变性的2%琼脂糖凝胶电泳对RNA进行纯度分析和定量。

1.5.2 RT-PCR 扩增

cDNA的合成:采用TaKaRa反转录试剂盒,10 μL反应体系中含2 μL 5×PrimeScript缓冲液、0.5 μL Prime Script RT Enzyme Mix I、0.5 μL 50 mmol L⁻¹ Oligo dT Prime、0.5 μL 100 mmol L⁻¹ Random 6 mers、1 μL总RNA样品。将反应混合液65℃加热5 min,而后转入37℃,待温度稳定后,加入1 μL Superscript II RT (Lifetech产品)反转录酶。1 h后,置于65℃ 5 min,以清除剩余的反转录酶。合成产物于-20℃保存。

cDNA的PCR扩增及产物验证:先采用β-action引物,调整cDNA浓度,使得不同外源试剂处理所得的水稻根cDNA的PCR扩增结果均匀一致,再采用该cDNA浓度以及*cpt1*基因引物PCR扩增反转录得到的cDNA,这样可以较为准确地比较不同外源试剂处理对水稻根中*cpt1*基因表达的影响。25 μL cDNA的PCR扩增反应体系中含12.5 μL 2×SYBR Premix Ex*Taq*、0.5 μL 10 μmol L⁻¹ *cpt1* F、0.5 μL 10 μmol L⁻¹ *cpt1* R、2 μL 2×RT反应溶液(cDNA溶液),补充ddH₂O 9.5 μL到25 μL,反应程序为94℃ 5 min热启动,94℃ 变性30 s,53℃ 退火30 s,72℃ 延伸1 min,40个循环,72℃ 延伸时间10 min后8℃ 保存。采用TIANGEN凝胶回收试剂盒(TIANGEN)回收纯化目的DNA扩增产物,并送上海生物工程有公司测序。

2 结果与分析

2.1 外源试剂处理对水稻根负向光性的影响

如表1所示,水稻根经过24 h培养后,在黑暗条件下

水稻根垂直向下生长,而在单侧光照下,水稻根背光弯曲生长,不同的试剂对水稻根弯曲度的影响不同。 1 mg L^{-1} CaCl_2 最显著促进水稻根负向光性生长,其弯曲度比对照提高 19.0%。 0.001 mg L^{-1} IAA也能明显促进水稻根的负向光性弯曲。 CaCl_2 的抑制剂EDTA则明显抑制水稻根负向光性生长,与对照相比,使水稻根弯曲度下降 27.9%。

表 1 IAA、 CaCl_2 和EDTA处理对水稻根负向光性的影响
Table 1 Effects of IAA, CaCl_2 , and EDTA on the negative phototropism of rice roots

处理试剂与浓度 Treatment reagent and concentration	弯曲角度 Curvature($^{\circ}$)	
	黑暗 Dark	单侧光照 Unilateral light
0.001 mg L^{-1} IAA	0	38.1 ± 3.6
1 mg L^{-1} CaCl_2	0	42.9 ± 1.7
1 mg L^{-1} EDTA	0	26.0 ± 4.3
H_2O (CK)	0	36.1 ± 3.1

处理后 24 h 考察平均数 \pm 标准偏差。

Determined after 24 h of treatment, means \pm SD.

2.2 外源试剂对水稻根负向光性运动过程中 *cpt1* 基因表达量的影响

采用RT-PCR的方法研究了光照及黑暗条件下外源试剂对稻根中该基因表达量的影响,以 β -action基因的表达式作为内参(图 1-A),并采用测序的方法验证RT-PCR 的反应结果与PCR扩增水稻根基因组DNA结果的序列一致性。结果表明,通过RT-PCR得到的产物序列与通过PCR扩增水稻基因组DNA的结果序列相同,均位于GenBank中已经登录的水稻 *cpt1* 的 mRNA 序列上(登录号为 AB186127)。光照条件下该基因的表达量显著增大。其中, 1 mg L^{-1} CaCl_2 处理的水稻根中 *cpt1* 基因的表达量最高,其次是 0.001 mg L^{-1} IAA处理,二者均高于光照条件下的对照处理。EDTA处理的水稻根中 *cpt1* 基因的表达量最低,明显低于光照条件下的对照处理,但仍明显高于黑暗条件下该基因的表达量,而黑暗条件下水稻根中 *cpt1* 基因的表达量很低(图 1-B)。

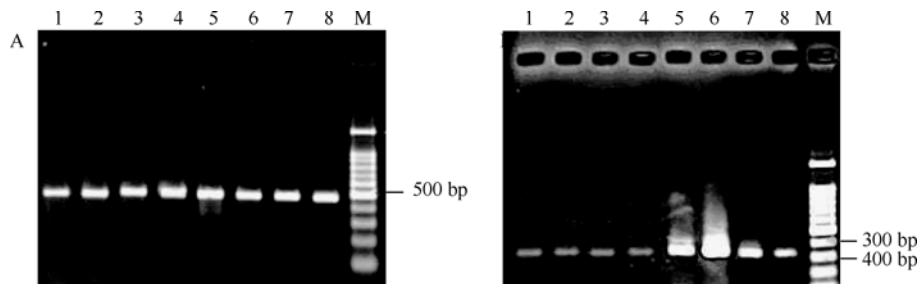


图 1 IAA、 CaCl_2 和EDTA处理对水稻根负向光性中 *cpt1* 基因表达的影响

Fig. 1 The effects of IAA, CaCl_2 and EDTA on the expression of *cpt1* gene during negative phototropism of rice roots

A: β -action基因; B: *cpt1* 基因。M: 1500 bp marker; 1~4: 黑暗处理的水稻根: 1 为 0.001 mg L^{-1} IAA处理; 2 为 1 mg L^{-1} CaCl_2 处理; 3 为 1 mg L^{-1} EDTA处理; 4 为水处理。5~8: 水稻根在光照下处理; 5 为 0.001 mg L^{-1} IAA处理; 6 为 1 mg L^{-1} CaCl_2 处理; 7 为水处理(对照); 8 为 1 mg L^{-1} EDTA处理。

A: β -action gene; B: *cpt1* gene; M: 1500 bp marker. Lane 1: dark-grown rice roots incubated with 0.001 mg L^{-1} IAA; lane 2: dark-grown rice roots incubated with 1 mg L^{-1} CaCl_2 ; lane 3: dark-grown rice roots incubated with 1 mg L^{-1} EDTA; lane 4: dark-grown rice roots incubated with water (CK); lane 5: light-grown rice roots incubated with 0.001 mg L^{-1} IAA; lane 6: light-grown rice roots incubated with 1 mg L^{-1} CaCl_2 ; lane 7: light-grown rice roots incubated with water (CK); lane 8: light-grown rice roots incubated with 1 mg L^{-1} EDTA.

3 讨论

近年来对以拟南芥为模式植物开展的高等植物向光性运动的研究结果指出, NPH3 对拟南芥的向光性运动生长具有重要的作用,在拟南芥中有很多 NPH3 的同源体^[6,9,12]。Haga等^[16]通过筛选突变体的方法得到了与水稻胚芽鞘向光性运动密切相关的基因 *cpt1*, 该基因与拟南芥中的 NPH3 具有高度的同源性。目前已有的研究表明, NPH3 和 CPT1 均是高等植物向光性运动过程中光信号传递的重要成分,与 NPH3 类似, CPT1 也是通过与光受体相互作用参与植物向光性运动的^[6,16]。

本实验表明,施加外源 IAA、 CaCl_2 、EDTA^[24]对稻根中 *cpt1* 基因表达量的影响与这些试剂对水稻根弯曲度的影响结果是一致的, *cpt1* 基因的表达对水稻根的负向光性运动起着重要的作用。

Ca^{2+} 是拟南芥向光性运动过程中光信号转导的重要介质^[25],在拟南芥和烟草幼苗细胞内 Ca^{2+} 均是 NPH1 依赖的向光性运动的重要信号转导物质^[26]。本试验结果也表明, Ca^{2+} 对水稻根的负向光性运动具有重要的作用,这种作用可能是通过影响细胞光信号转导过程和 *cpt1* 基因的表达来实现的。

有关 IAA 对高等植物向光性运动的影响很早就有报道。虽然目前 Cholodny-Went 假说存在不少异议^[27],但仍是高等植物向光性运动机理的最合理的解释之一。我们在前期研究中将暗中垂直生长的水稻根尖光照 1 h 后,其 4 mm 处自向光侧和背光侧间均匀纵切,然后用 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)法测定两部位的生长素含量,结果显示背光侧的比向光侧的生长素浓度高出 2~4 倍,表明水稻根的负向光性是由于生长素在根尖内的不均匀分布所致^[15]。这与 Haga等^[16]在水稻胚芽鞘中两侧

IAA含量分析的结果一致。但在水稻*cpt1* 基因缺失突变体中, 未有这种不对称分布的情况。因此可以推测, 与NPH3类似, CPT1 蛋白不仅是水稻胚芽鞘发生向光性弯曲过程中IAA的重要载体, 可能也是在根中介导负向光性弯曲的IAA的重要载体。

References

- [1] Iino M. Phototropism in higher plants. In: Hader D, Lebert M, eds. Photomovement: ESP Comprehensive Series in Photosciences, Vol. 1, Amsterdam: Elsevier, 2001. pp 659–811
- [2] Tokutomi S, Matsuoka D, Zikihara K. Molecular structure and regulation of phototropin kinase by blue light. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1784: 133–142
- [3] Khurana J P, Poff K L. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered phototropism. *Planta*, 1989, 178: 400–406
- [4] Liscum E, Briggs W R. Mutants of *Arabidopsis* in potential transduction and response components of the phototropic signaling pathway. *Plant Physiol*, 1996, 112: 291–296
- [5] Kang B, Grancher N, Koyffmann V, Lardemer D, Burney S, Ahmad M. Multiple interactions between cryptochrome and phototropin blue-light signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 2008, 227: 1091–1099
- [6] Motchoulski A, Liscum E. *Arabidopsis* NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science*, 1999, 286: 961–964
- [7] Inoue S I, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama K I, Doi M, Shimazaki K. Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 5626–5631
- [8] Pedmale U V, Liscum E. Regulation of phototropic signaling in *Arabidopsis* via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *J Biol Chem*, 2007, 282: 19992–20001
- [9] Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz T E, Christie J M, Briggs W R, Wada M, Okada K. *Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6969–6974
- [10] Fankhauser C, Yeh K C, Lagarias J C, Zhang H, Elich T D, Chory J. PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science*, 1999, 284: 1539–1541
- [11] Lariguet P, Schepens I, Hodgson D, Pedmale U V, Trevisan M, Kami C, de Carbonnel M, Alonso J M, Ecker J R, Liscum E, Fankhauser C. Phytochrome kinase substrate 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 10134–10139
- [12] Sakai T, Wada T, Ishiguro S, Okada K. RPT2: A signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2000, 12: 225–236
- [13] Boccacando H E, Simone S N D, Bergmann-Honsberger A, Schepens I, Fankhauser C, Casal J J. PHYTOCHROME KINASE DSUBSTRATE1 regulates root phototropism and gravitropism. *Plant Physiol*, 2008, 146: 108–115
- [14] Iino M. Mediation of tropisms by lateral translocation of endogenous indole-3-acetic acid in maize coleoptiles. *Plant Cell Environ*, 1991, 14: 279–286.
- [15] Mo Y W, Wang Z, Qian S Q, Gu Y J. Effect of indoleacetic acid (IAA) on the negative phototropism of rice root. *Rice Sci*, 2004, 11(3): 125–128
- [16] Haga K, Takano M, Neumann R, Iino M. The rice COLEOPTILE PHOTOTROPISM1 gene encoding an ortholog of *Arabidopsis* NPH3 is required for phototropism of coleoptiles and lateral translocation of auxin. *Plant Cell*, 2005, 17: 103–115
- [17] Haga K, Iino M. Asymmetric distribution of auxin correlates with gravitropism and phototropism but not with autostraightening (autotropism) in pea epicotyls. *J Exp Bot*, 2006, 57: 837–847
- [18] Harper R M, Stowe-Evans E L, Luesse D R, Muto H, Tatematsu K, Watahiki M K, Yamamoto K, Liscum E. The *NPH4* locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell*, 2000, 12: 757–770
- [19] Tatematsu K, Kumagai S, Muto H, Sato A, Watahiki M K, Harper R M, Liscum E, Yamamoto K T. MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2004, 16: 379–393
- [20] Muday G K, Murphy A S. An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell*, 2002, 14: 293–299
- [21] Geldner N, Friml J, Stierhof Y D, Jurgens G, Palme K. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 2001, 413: 425–428
- [22] Friml J, Wisniewska J, Benkova E, Mendgen K, Palme K. Lateral relocation of Auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 2002, 415: 806–809
- [23] Gu Y-J(顾蕴洁), Wang Z(王忠), Wang W-X(王维学). The negative phototropism of rice root. *Plant Physiol Commun (植物生理学通讯)*, 2001, 37(5): 396–398 (in Chinese)
- [24] Wang Z, Mo Y W, Qian S Q, Gu Y J. Negative phototropism of rice root and its influencing factors. *Sci China (Ser C)*, 2002, 45(5): 485–496
- [25] Harada A, Shimazaki K. Phototropins and blue light-dependent calcium signaling in higher plants. *Photochem Photobiol*, 2007, 83: 102–111
- [26] Baum G, Long J C, Jenkins G I, Trewavas A J. Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca^{2+} . *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13554–13559
- [27] Iino M, Neumann R. Phototropism of rice seedlings: Characterization and mutant isolation. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(suppl): S56