

*mir160*和*WOX5*过量表达对拟南芥根冠细胞的不同影响

张腾腾, 严欢欢, 张汉马

重庆师范大学生命科学学院, 植物环境适应分子生物学重庆市重点实验室, 重庆
Email: hanmazhang@126.com

收稿日期: 2021年3月15日; 录用日期: 2021年5月6日; 发布日期: 2021年5月17日

摘要

*WOX5*和*mir160*过量表达均可在拟南芥根冠中诱导未分化的细胞累积, 但这些根冠细胞间是否存在差异目前并不十分明了。本研究发现在*mir160*和*WOX5*过表达诱导产生的根冠细胞对秋水仙素呈现出不同的响应模式。在相同秋水仙素浓度处理条件下, *WOX5*过表达诱导产生中央根冠细胞(即柱细胞和柱干细胞)显著膨大($p < 0.01$), 而侧根冠细胞无明显膨大; 相反, 经秋水仙素处理后*mir160*过量表达的幼苗中侧根冠细胞明显膨大, 而柱细胞膨大的幅度相对较小。*mir160*和*WOX5*过表达诱导的根冠细胞对秋水仙素的不同响应表明该两条途径诱导产生的根冠细胞间存在差异, 暗示其诱导机理可能不同。

关键词

拟南芥, 根冠细胞, *WOX5*, *mir160*, 秋水仙素

Differential Impacts of *mir160*- and *WOX5*-Overexpression on Arabidopsis Root Cap Cells

Tengteng Zhang, Huanhuan Yan, Hanma Zhang

Chongqing Key Laboratory of Molecular Adaptations of Plants, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing
Email: hanmazhang@126.com

Received: Mar. 15th, 2021; accepted: May 6th, 2021; published: May 17th, 2021

文章引用: 张腾腾, 严欢欢, 张汉马. *mir160* 和 *WOX5* 过量表达对拟南芥根冠细胞的不同影响[J]. 植物学研究, 2021, 10(3): 225-230. DOI: 10.12677/br.2021.103032

Abstract

Both *WOX5*- and *mir160*-overexpression can induce the accumulation of undifferentiated cells in the Arabidopsis root cap, but it is not clear whether there are any differences between the induced undifferentiated root cap cells. In this study, we have found that root cap cells induced by *mir160* and *WOX5* showed different response patterns to colchicine. Under the same colchicine concentration, *WOX5*-induced root cap cells in the central region (*i.e.* columella stem cells and columella cells) expand significantly, while lateral root cap cells did not; on the other hand, in colchicine treated seedlings with *mir160*-overexpressing seedlings, lateral root cap cells expanded more significantly than columella stem cells and columella cells. The different responses of root cap cells induced by *WOX5*- and *mir160*-overexpression to colchicine indicate that the root cap cells induced by the two different genes show distinct characteristics and suggest that the induction mechanisms may be different.

Keywords

Arabidosis, Root Cap Cells, *WOX5*, *mir160*, Colchicine

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

与其它所有陆生植物一样,拟南芥的根尖分生组织的顶端有一个保护性器官,称之为根冠,里面含两种不同类型的细胞,即柱细胞和侧根冠细胞。这两类根冠细胞虽然源于不同的干细胞,但在正常根的发育过程中它们的分裂与分化活动保持高度同步[1] [2] [3]。

前期研究发现根冠细胞的调控牵涉很多基因,如 *WOX5* (*WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5*)、*mir60*、*ARF10* (*AUXIN RESPONSE FACTOR10*)、*ARF16*、*FEZ*、*SMB* (*SOMBRERO*)、*ACR4*、*CLE40* (*CLAVATA3/Endosperm surrounding region-related40*)等[4]-[10]。其中 *WOX5* 和 *mir60* 的调控功能比较特殊,它们单独过量表达后均可抑制根冠细胞的分化,导致未分化细胞在根冠区中累积[4] [5] [6] [7]。*WOX5* 编码一个同源异型域(homeobox)转录因子家族蛋白[4],在静止中心细胞中特异性表达。该基因功能的缺失导致柱干细胞和侧根冠细胞分化,而其过量表达可抑制根冠细胞分化[4] [5]。*mir160* 编码一个 microRNA,在拟南芥中下调两个目标基因, *ARF10* 和 *ARF16*。由于该两个目标基因编码生长素信号响应通路中的重要转录因子, *mir160* 在根冠细胞中的调控作用是生长素调控功能的一部分。*arf10/arf16* 功能缺失性双突变体和 *mir160* 过量植株都呈现与 *WOX5* 过量表达植株有非常相似的表型,即未分化细胞在根冠中累积, *mir160* 和 *WOX5* 介导的根冠细胞调控通路间的关系是植物发育学研究中的一个热点问题。现有主流观点认为 *ARF10/ARF16* 可能通过直接调控 *WOX5* 的表达参与对根冠细胞的调控,即 *ARF10/ARF16* 和 *WOX5* 可能同一条调控通路中起作用[7]。

我们实验室在前期研究中发现 *WOX5* 过量表达对未分化的柱细胞与侧根冠细胞对秋水仙素的敏感性有不同的影响[11]。在 *WOX5* 过量表达幼苗中,秋水仙素处理可导致未分化的柱细胞膨大,但对未分化

的侧根冠细胞形态的影响相对较弱[11]。本研究中我们比较了 *WOX5* 和 *mir160* 过量表达对根冠细胞的秋水仙素响应的影响,发现这两个基因过量表达诱导的根冠细胞间呈现出不同的响应模式,表明这些根冠细胞具有不同的细胞学特性,暗示 *mir160* 和 *WOX5* 对根冠细胞的调控可能经由独立的调控通路。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

本实验所用转基因材料 *35SSGVG/UAS::WOX5* 种子[4]由日本奈良科技大学 Keiji Nakajima 教授赠与, *35S::mir160* 种子[7]由中科院上海植物生理生态所陈晓亚院士赠与。秋水仙素和地塞米松(英文名 dexamethasone, 简称 DEX)购自天根生化科技有限公司。

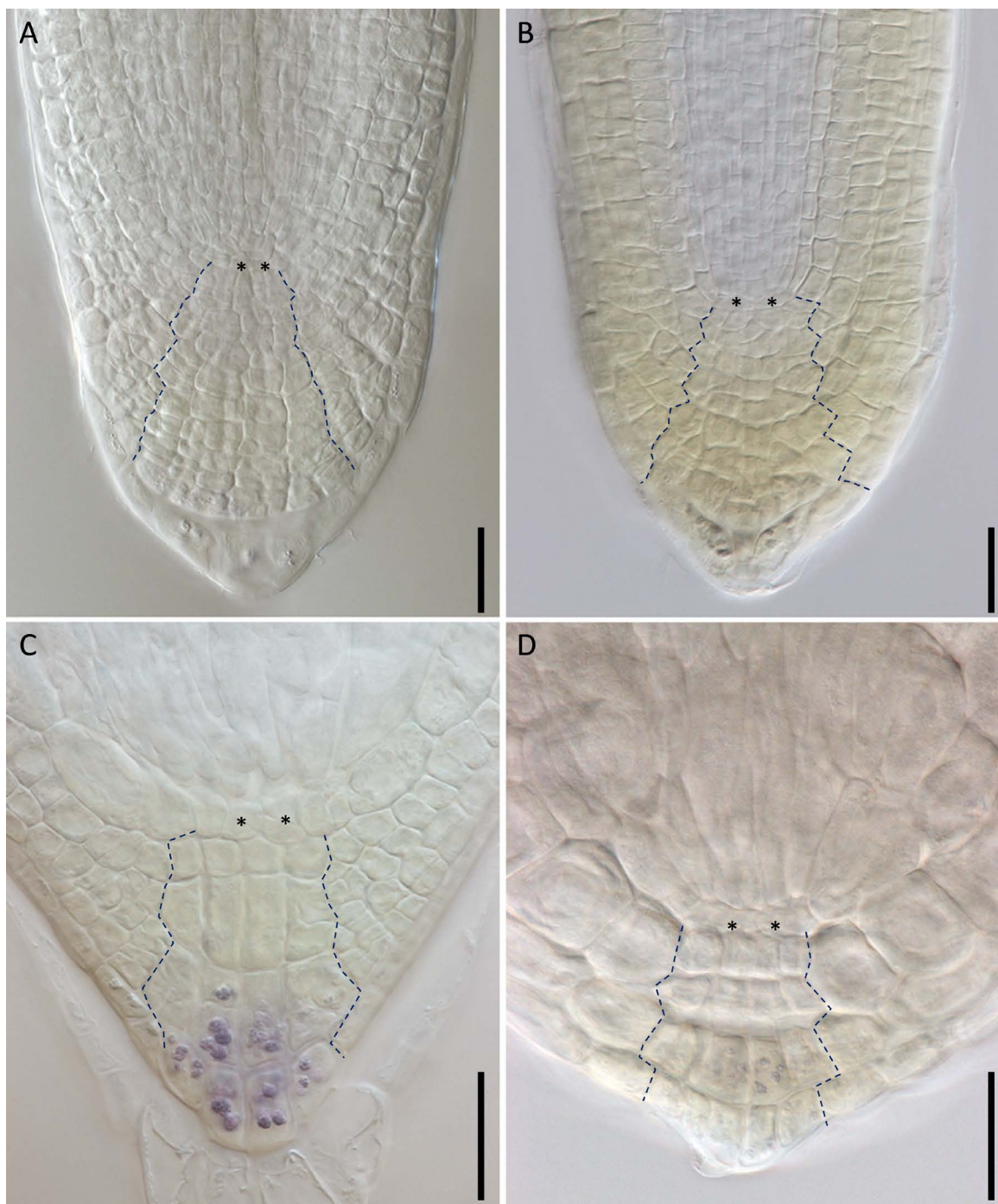
2.2. 植物的培养和生长条件

种子消毒,幼苗培养条件,秋水仙素处理,以及显微镜观察方法如前报道[11]。种子用 10%次氯酸+90%酒精混合液灭菌消毒,在 1/2 MS 琼脂(1%, w/v)培养基上,于 22℃, 16 h 光照/8 h 黑暗,光照强度为 12,000 LX 的条件下萌发和生长。秋水仙素和地塞米松溶液通过过滤膜灭菌,在培养基经高温(121℃, 20 分钟)灭菌,冷却后加入。光学显微观察时幼苗根用 50%乳酸:30% H₂O:20% 卢戈耳氏溶液(Lugol's solution)混合液装片,用 Nikon ECLIPSE 80i 显微镜观察和 DS-Ri1 数码相机拍照。数据来自 3 次重复实验,数据处理用 Microsoft Excel 软件中的相关功能(即 AVERAGE, STDEV)。

3. 结果与分析

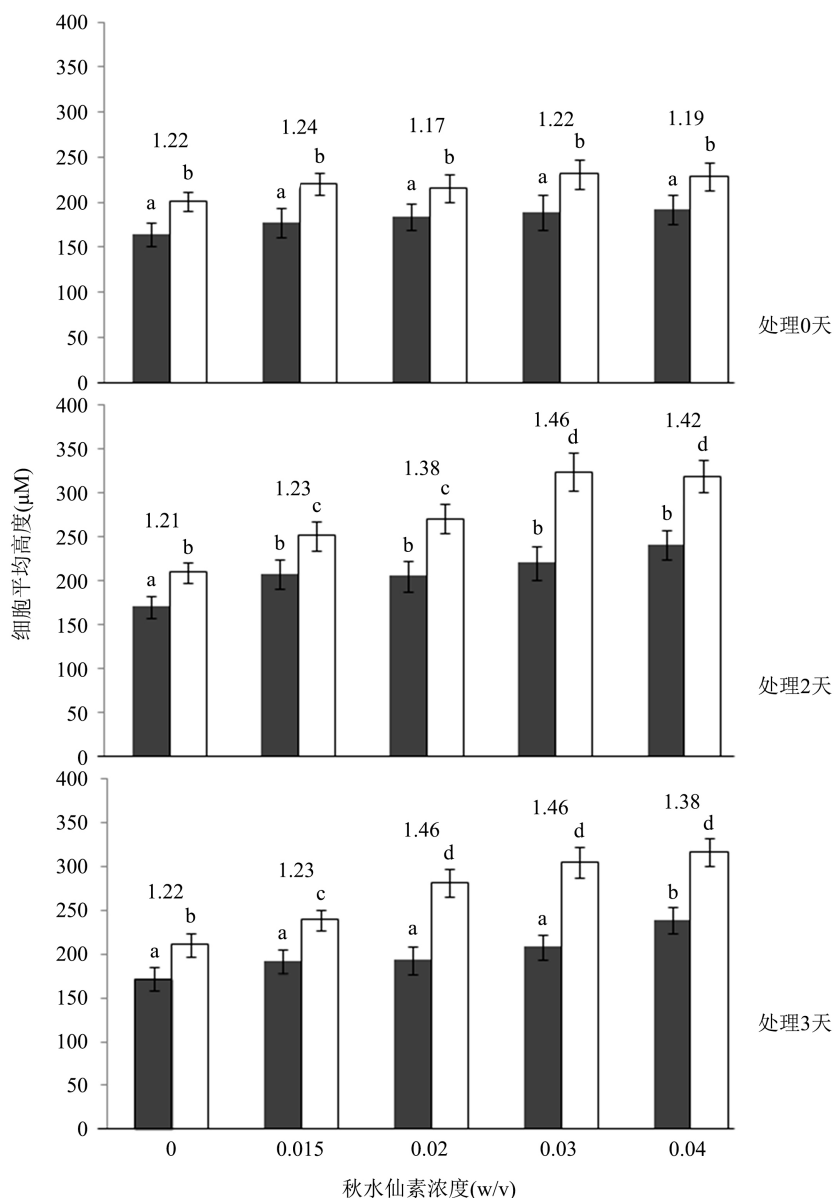
为了比较 *WOX5* 和 *mir160* 过量表达对根冠细胞的影响,我们将 *35S::GVG/UAS::WOX5* 和 *35S::mir160* 幼苗先在 1/2MS 培养基上萌发。萌发 2 天后将 *35S::GVG/UAS::WOX5* 幼苗转移至只含 5.0 μM DEX (dexamethasone)和含 5.0 μM DEX + 0.03% (w/v)秋水仙素的 1/2MS 培养基上,将 *35S::mir160* 幼苗转移至不含秋水仙素和含 0.03% (w/v)秋水仙素的 1/2MS 培养基上继续培养 3 天,取根尖经碘液染色后进行光学观察。未经秋水仙素处理的 *35S::GVG/UAS::WOX5* 和 *35S::mir160* 幼苗的根尖中,根冠细胞大多数都不含淀粉粒,表明这些细胞尚未分化,柱细胞区和侧根冠区的细胞在大小和形态上无显著差异($p < 0.01$) [图 1(A), 图 1(B)]。在秋水仙素处理的 *35S::GVG/UAS::WOX5* 幼苗的根尖中,柱细胞区中根冠细胞出现明显膨大,该变化在纵轴方向尤为显著,而侧根冠区的细胞的形态相对较小[图 1(C)],这些观察与我们之前所报道的结果一致[11]。在秋水仙素处理的 *35S::mir160* 幼苗的根尖中,侧根冠区细胞的形态明显膨大,该形态变化在纵轴和横轴方向均明显,柱细胞区细胞在形态上变化相对较小[图 1(D)]。上述观察显示虽然 *WOX5* 和 *mir160* 过量表达均可抑制根冠细胞的分化,诱导未分化根冠细胞的增加,但通过这两种途径诱导产生的未分化细胞间存在明显差异。

在前期研究中我们发现在 *WOX5*-过量表达的幼苗中,柱细胞和侧根冠细胞对秋水仙素响应的差异幅度与处理时间和秋水仙素浓度有关[11]。为了检测 *mir160* 过量表达对柱细胞和侧根冠细胞的影响是否与时间和剂量有关,我们将 *35S::mir160* 幼苗在萌发 2 天后分别转到含 0%, 0.015%, 0.02%, 0.03%, 0.04%秋水仙素的培养基上。转移后每天取样拍照和测量细胞高度(图 2)。未经秋水仙素处理前,侧根冠细胞和柱细胞的平均高度比为 1.20。经秋水仙素处理 2 天后,侧根冠细胞和柱细胞的平均高度比上升,且升幅与秋水仙素浓度呈正相关。进一步延长秋水仙素处理时间至 3 天,侧根冠细胞和柱细胞的平均高度比没有进一步上升,表明秋水仙素对 *35S::mir160* 幼苗中根冠细胞高度的影响在处理 2 天后已基本完成。



注: (A) 经 DEX 处理 3 天的 *35S::GVG/UAS::WOX5* 拟南芥幼苗根尖光学照片; (B) 萌发 5 天未经秋水仙素处理的 *35S::mir160* 拟南芥幼苗根尖光学照片; (C) 经 DEX + 秋水仙素同时处理 3 天的 *35S::GVG/UAS::WOX5* 拟南芥幼苗根尖光学照片; (D) 萌发 5 天并经秋水仙素处理 3 天的 *35S::mir160* 拟南芥幼苗根尖光学照片。DEX (dexamethasone) 浓度为 $5 \mu\text{M}$; 秋水仙素(浓度为 0.03%)。*标注静止中心细胞, 断续线标示柱细胞与侧根冠细胞区的边界; 标尺线为 $500 \mu\text{m}$ 。注意未经秋水仙素处理的 *35S::GVG/UAS::WOX5* 幼苗(A)和 *35S::mir160* 幼苗(B)的根尖中柱细胞和侧根冠细胞在形态上无显著差别, 但经秋水仙素处理的幼苗中(C&D)上述两类细胞形态出现明显差异, 且秋水仙素的影响在 *35S::GVG/UAS::WOX5*(C)和 *35S::mir160*(D)幼苗中正好相反。在 *35S::GVG/UAS::WOX5* 幼苗中秋水仙素处理导致柱细胞显著膨胀, 特别在纵长方向, 对侧根冠细胞形态的影响相对较弱; 在 *35S::mir160* 幼苗中秋水仙素处理导致侧根冠细胞显著膨胀, 但对柱细胞形态的影响相对较弱

Figure 1. Differential effects of *WOX5*- and *mir160*-overexpression on the responses of *Arabidopsis* root cap cells to colchicine
图 1. *WOX5* 和 *mir160* 过量表达对拟南芥根冠细胞对秋水仙素响应的不同影响



注: 35S::*mir160* 种子先在 1/2MS 琼脂培养基上萌发 2 天后转到含不同秋水仙素浓度的 1/2MS 琼脂培养基继续培养。幼苗根尖经碘液染色后在显微镜观察并拍照。细胞高度用 ImageJ 软件测量。每个数据代表 15 个幼苗主根的数据平均值, 误差线为标准误差。图中显示的数值为所对应的侧根冠细胞平均高度/柱细胞平均高度的比值, 字母(a, b, c, d)代表在同一处理时间点里统计学上有显著差异($p < 0.01$)的不同数据组别

Figure 2. Differential and dose-dependent effects of colchicine on columella and lateral root cap cells in the primary roots of 35S::*mir160* seedlings

图 2. 秋水仙素处理对 *mir160* 过表达幼苗主根中的柱细胞和侧根冠细胞的差异性影响与剂量效应

4. 结论与讨论

根冠细胞对根尖分生组织具有至关重要的保护功能, 在根的生长发育过程中需要不断更新和补充。在模式植物拟南芥中已知根冠细胞的调控涉及众多调控基因, 其中 *WOX5* 和 *mir160* 的作用尤为特殊, 以它们过量表达均可诱导产生未分化根冠细胞的累积。虽然现有证据比较倾向于 *WOX5* 和 *mir160* 作用于

同一条调控通路实现对根冠细胞的调控[7], 但形成定论还缺少充足的实验证据。在这个意义上, 本研究提供了支持 *WOX5* 和 *mir160* 通过不同机理调控根冠细胞的证据, 即由它们诱导产生的根冠细胞存在明显细胞学差异。如在 *WOX5* 过量表达的背景下, 柱细胞区的细胞对秋水仙素的敏感性明显强于侧根冠区的细胞(图 1), 此一结果与我们以前报道的结果一致[11]; 而在 *mir160* 过量表达的背景下, 侧根冠区的细胞对秋水仙素的响应幅度明显强于柱细胞区的细胞的响应幅度(图 1)。虽然我们目前并不知道导致这一相反的秋水仙素响应模式的背后的机理, 但这种差异的存在显示 *WOX5* 和 *mir160* 诱导形成的根冠细胞具有不同的细胞学特性, 暗示它们可能通过不同的调控机理起作用。本研究的结果为进一步研究 *WOX5* 和 *mir160* 的调控机理提供了依据。

基金项目

本研究得到了重庆师范大学人才基金(12XLR36)的资助。

参考文献

- [1] Kumpf, R.P. and Nowack, M.K. (2015) The Root Cap: A Short Story of Life and Death. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 5651-5662. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv295>
- [2] Wenzel, C.L and Rost, T.L. (2001) Cell Division Patterns of the Protoderm and Root Cap in the “Closed” Root Apical Meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, **218**, 203-213. <https://doi.org/10.1007/BF01306609>
- [3] Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K. and Scheres, B. (1993) Cellular Organisation of the *Arabidopsis thaliana* Root. *Development*, **119**, 71-84. <https://doi.org/10.1242/dev.119.1.71>
- [4] Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R. and Laux, T. (2007) Conserved Factors Regulate Signalling in *Arabidopsis thaliana* Shoot and Root Stem Cell Organizers. *Nature*, **446**, 811-814. <https://doi.org/10.1038/nature05703>
- [5] Pi, L., Aichinger, E., van der Graaff, E., Llavata-Peris, C.I., Weijers, D., Hennig, L., Groot, E. and Laux, T. (2015) Organizer-Derived *WOX5* Signal Maintains Root Columella Stem Cells through Chromatin-Mediated Repression of *CDF4* Expression. *Developmental Cell*, **33**, 576-588. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.04.024>
- [6] Wang, J. W., et al. (2005) Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 2204-2216. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.033076>
- [7] Ding, Z. and Friml, J. (2010) Auxin Regulates Distal Stem Cell Differentiation in *Arabidopsis* Roots. *PNAS*, **107**, 12046-12051. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000672107>
- [8] De Smet, I., et al. (2008) Receptor-Like Kinase ACR4 Restricts Formative Cell Divisions in the *Arabidopsis* Root. *Science*, **322**, 594-597. <https://doi.org/10.1126/science.1160158>
- [9] Stahl, Y., Wink, R.H., Ingram, G.C. and Simon, R. (2009) A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in *Arabidopsis* Root Meristems. *Current Biology*, **19**, 909-914. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.060>
- [10] Willemsen, V., Bauch, M., Bennett, T., Campilho, A., Wolkenfelt, H., Xu, J., Haseloff, J. and Scheres, B. (2008) The NAC Domain Transcription Factors FEZ and SOMBRERO Control the Orientation of Cell Division Plane in *Arabidopsis* Root Stem Cells. *Developmental Cell*, **15**, 913-922. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.09.019>
- [11] 陈玉洁, 严欢欢, 陈丽华, 王甜, 张汉马. *WOX5* 过量表达和秋水仙素处理对拟南芥根冠柱细胞与侧根冠细胞的影响差异[J]. 植物学研究, 2019, 8(3): 212-217.