

刘广志,陈炳佑,侍福梅. MAP18 参与了脱落酸调控的拟南芥气孔关闭及根生长[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):55-57.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.015

MAP18 参与了脱落酸调控的拟南芥气孔关闭及根生长

刘广志,陈炳佑,侍福梅

(聊城大学生命科学学院,山东聊城 252059)

摘要:以拟南芥野生型、GFP- α -tubulin-6 转基因拟南芥及微管结合蛋白 MAP18 相关突变体为材料,利用药理学试验及激光扫描共聚焦显微技术研究了在脱落酸(ABA)诱导叶片气孔关闭过程中保卫细胞微管骨架的动态变化、根生长情况及其可能的调控因子。结果表明,微管结合蛋白 MAP18 过表达拟南芥 *OE* 的叶片气孔关闭现象敏感,MAP18 RNAi 沉默株 *R18* 现象相对不敏感。外源 ABA 抑制拟南芥幼苗初生根的生长试验中,突变体 *OE* 根伸长减慢的现象显著,伸长速率由 0.60 cm/d 降低至 0.12 cm/d,未处理时 WT、*map18* 的伸长速率都要低于 *OE* 的伸长速率,而用 5 μ mol/L ABA 处理之后,WT、*map18* 的伸长速率高于 *OE* 的伸长速率。在此基础上研究了参与其中的作用因子,推测 MAP18 通过影响微管的动态重组参与到 ABA 诱导拟南芥气孔关闭和根伸长的生理过程。

关键词:MAP18;拟南芥;脱落酸;气孔;幼根;微管结合蛋白

中图分类号:Q945 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)11-0055-03

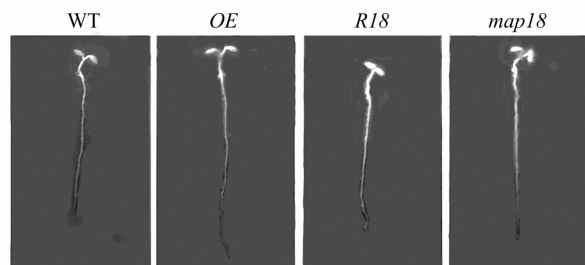
脱落酸(abscisic acid, ABA)是一种重要植物激素,有多种生物功能,在气孔关闭和开放^[1]、侧根发生^[2]、初生根伸长生长^[3]过程中有重要作用。微管是植物细胞骨架成分之一,在维持细胞形态与结构、参与胞内物质运输、信号转导^[4-5]上有重要作用。现在越来越多的证据表明微管骨架的组装与解聚在气孔运动中发挥着作用^[5-9],并有研究报道保卫细胞微管骨架直接参与调节气孔运动^[10],G 蛋白作为调节因子参与到气孔运动中^[11],是否还有其他蛋白也参与其中?

微管是由微管蛋白组成,而微管蛋白在结合蛋白的影响下,进行着微管的组装与解聚,微管结合蛋白中的 MAP18 是一种植物微管的去稳定因子,可以影响周质微管的排列方式,进而影响细胞的生长^[12]。MAP18 在花粉的生长中起着作用^[13],并且有研究表明 ABA 可能通过 MAP18 共同调控花粉的生长^[14]。本研究以拟南芥为研究对象,探讨研究微管骨架在 ABA 诱导气孔关闭过程中的动态变化、根伸长情况及 MAP18 在其中的作用,为进一步了解 ABA 影响气孔运动及根生长发育的生理过程提供很多信息。

1 材料与与方法

1.1 材料

供试植物为拟南芥野生型拟南芥 WT、GFP- α -tubulin-6 转基因拟南芥及微管结合蛋白 MAP18 相关突变体:MAP18 过表达植株 *OE*、MAP18 沉默株 *R18* 和 MAP18 T-DNA 插入突变株 *map18*。



1.2 方法

1.2.1 拟南芥的种植 用 75% 乙醇处理野生型拟南芥、GFP- α -tubulin-6 转基因拟南芥和相关突变型拟南芥种子 2 min,0.5% 次氯酸钠浸泡 8 min,无菌水漂洗 4~6 次,用移液枪点播在 MS 培养基上,4 $^{\circ}$ C 放置 3 d,置于温度为(21 \pm 2) $^{\circ}$ C、光-暗周期为 14 h-10 h 的光照培养箱中培养。

1.2.2 微管骨架动态排布的观察 MS 培养基中生长 7 d 的 GFP- α -tubulin 转基因拟南芥幼苗分别在 0、1.0、2.5、5.0 μ mol/L ABA 溶液中浸泡 30 min 后,每隔 15 min 在激光共聚焦显微镜(奥林巴斯,FluoView FV 1200)下观察气孔保卫细胞的微管排布的变化(物镜 60 \times 油镜;480 nm 激发光激发)。

1.2.3 拟南芥气孔的观察 将于 MS 培养基中生长 7 d 的野生型拟南芥和突变体幼苗分别放入 0、1.0、2.5、5.0 μ mol/L ABA 溶液中浸泡 90 min 后,取叶片观察下表皮气孔的关闭情况。

1.2.4 对拟南芥在 ABA 诱导下根生长的分析 MS 培养基中生长 7 d 的野生型拟南芥和突变体幼苗转移至 ABA 浓度为 0、1.0、2.5、5.0 μ mol/L 的 MS 培养基上倒置培养,转移至光照培养箱中培养,幼苗生长 4 d 后进行拍照及长度统计。

1.2.5 数据统计分析 在 ABA 浓度为 0、1.0、2.5、5.0 μ mol/L 的 MS 培养基上倒置培养野生型拟南芥和突变体 4 d 后,测量弯根后的长度,分析数据得出伸长速率。重复 3 次,每次重复 20 组。平均日伸长速率(cm/d)=弯根伸长长度(cm)/弯根时间(d)。

收稿日期:2014-12-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:31240035);山东省自然科学基金(编号:ZR2010CQ002)。

作者简介:刘广志(1989—),男,山东聊城人,硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:liuguangzhi_568@163.com。

通信作者:侍福梅,博士,副教授,从事模式植物及重要农作物环境应答的信号转导研究。E-mail:shifumei@lcu.edu.cn。

2 结果与分析

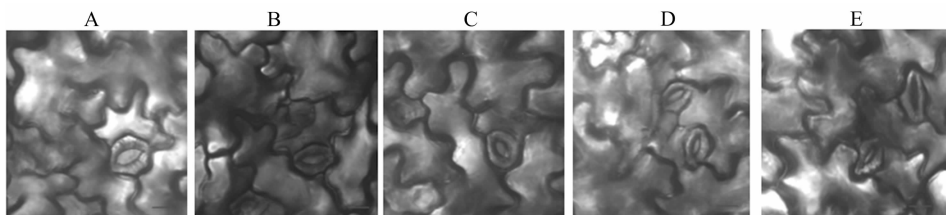
2.1 ABA 和微管特异性药物诱导拟南芥幼苗气孔关闭的情况

将于 MS 培养基中生长 7 d 的野生型拟南芥幼苗分别放入 0、1.0、2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ ABA 溶液中浸泡 90 min,发现在 5 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理下,气孔关闭更显著,随 ABA 浓度的升高,叶片气孔关闭越来越显著(图 1)。为了探究微管骨架是否主动参与到 ABA 诱导气孔关闭过程,用氨磺乐灵和 ABA 处理

拟南芥幼苗叶片表皮细胞,发现在 ABA 和氨磺乐灵共同处理下,气孔关闭更显著(图 1-E)。

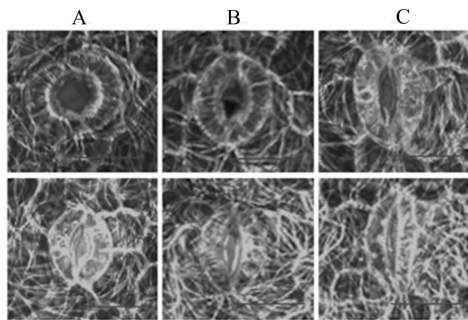
2.2 ABA 对气孔保卫细胞微管骨架的影响

对拟南芥叶片未作处理的情况下,通过激光扫描共聚焦显微镜可以清楚地观察到保卫细胞周质微管长纤维丝由细胞背壁到腹壁辐射排列(图 2-A)。随后用 5 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理拟南芥叶片,随时间增长,越来越多的微管发生解聚(图 2-B 至图 2-E),90 min 后,可见气孔关闭,其保卫细胞微管骨架基本解聚,弥散状荧光随机充满整个细胞(图 2-F)。



A—野生型拟南芥叶片气孔开度; B—1 $\mu\text{mol/L}$ ABA 浸泡叶片 90 min 之后气孔的开度; C—2.5 $\mu\text{mol/L}$ ABA 浸泡叶片 90 min 之后气孔的开度; D—5 $\mu\text{mol/L}$ ABA 浸泡叶片 90 min 之后气孔的开度; E—氨磺乐灵和 ABA 共同浸泡叶片 90 min 之后气孔的开度。Bar=10 μm

图1 拟南芥叶片气孔在 ABA 诱导下气孔开度的变化



A 为拟南芥叶片气孔保卫细胞微管骨架的排布; B、C、D、E、F 分别为用 5 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理拟南芥叶片 30、45、60、75、90 min 后的微管骨架排布。Bar=20 μm

图2 ABA 诱导气孔开度减小时叶片保卫细胞的微管骨架随时间的动态变化

2.3 ABA 诱导微管结合蛋白 MAP18 相关突变体气孔关闭情况

为了研究 MAP18 是否参与调控 ABA 诱导气孔关闭,分别用 5 $\mu\text{mol/L}$ ABA 处理野生型拟南芥和突变体的叶片 90 min,发现在 ABA 诱导拟南芥叶片气孔关闭过程中,野生型叶片气孔很少完全关闭,75% 的 *OE* 叶片气孔完全关闭,

R18 相对来说现象不显著(图 3),处于半关闭状态。

2.4 ABA 诱导拟南芥幼苗的弯根生长

将生长 7 d 的野生型和突变体幼苗转移至含不同浓度 ABA 的 MS 培养基中进行弯根培养。如图 4-A 所示,野生型及突变体在 ABA 浓度升高后,*OE* 的根伸长明显减慢,*R18* 在 ABA 浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 MS 培养基上根伸长几乎停止。对根的伸长做数据统计(图 4-B),在未加 ABA 时 *OE* 的根伸长速率为 0.60 cm/d,比 WT、*R18*、*map18* 的伸长速率都要高。随着 ABA 的浓度升高,*OE* 的伸长速率降低至 0.12 cm/d,比 WT、*map18* 的伸长速率小。

3 讨论

3.1 ABA 诱导的叶片保卫细胞微管骨架的解聚与重组

ABA 诱导气孔关闭作为一个经典体系,被广泛关注并应用到很多试验,并且很多证据表明,在气孔开关运动中保卫细胞的微管骨架组装发生了解聚与重组^[7-8,15]。ABA 与微管在气孔关闭运动中是否存在联系尚不清楚。本试验发现,正常气孔保卫细胞中微管骨架呈纤维状从腹壁到背壁辐射状排列,这与 Yu 等的研究结果^[15]相一致。进一步用外源 ABA 处

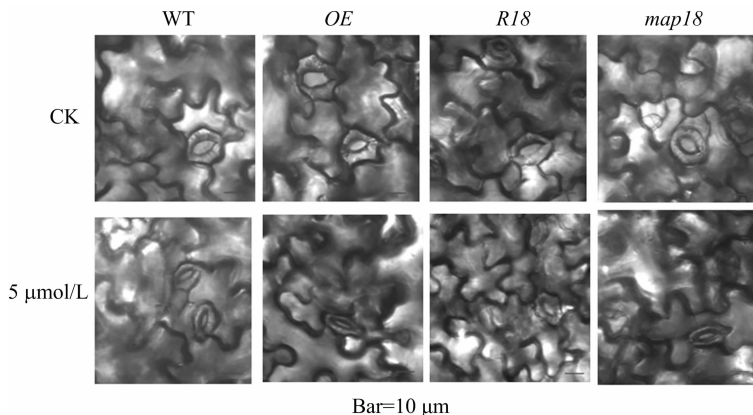


图3 ABA 胁迫诱导野生型拟南芥和 MAP18 突变体的气孔关闭

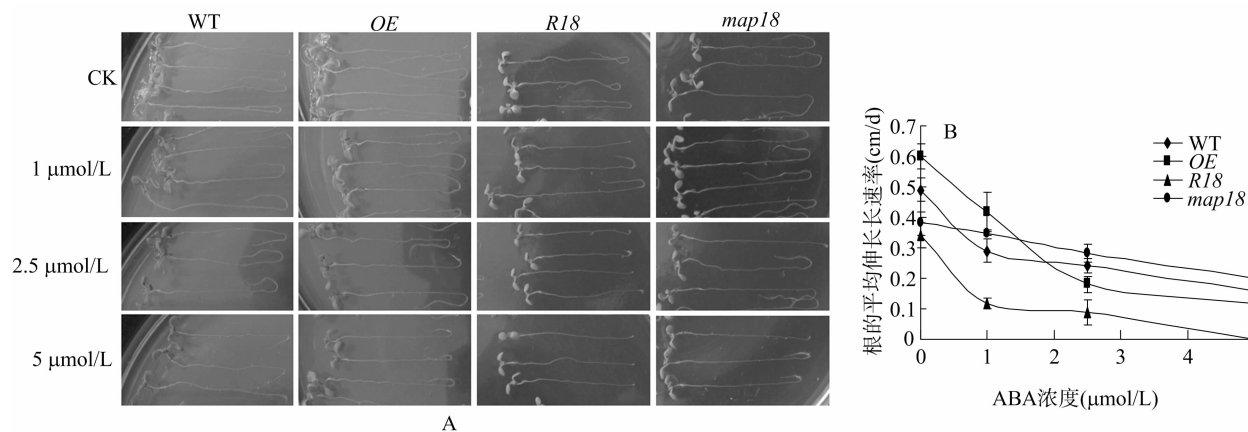


图4 ABA抑制野生型拟南芥和 MAP18 突变体的根伸长(A)和根的平均日伸长速率(B)

理 GFP- α -tubulin-6 转基因拟南芥叶片,激光扫描共聚焦显微镜观察发现 ABA 处理引起微管骨架的排布发生变化,整齐的辐射状排列逐步散乱,推测微管排布的动态变化可能参与了 ABA 诱导气孔关闭的信号转导的过程。

3.2 MAP18 参与 ABA 诱导的叶片保卫细胞微管骨架降解、根伸长减慢的过程

微管是植物细胞的骨架,在植物生理方面有许多重要作用,周质微管排列的变化显著影响细胞形态及生长方向,在快速伸长的细胞中,周质微管以横向排列为主,而在伸长比较缓慢或停止伸长的细胞中,周质微管以斜向或纵向排列为主^[16-18]。当用 ABA 处理拟南芥幼苗初生根时,根生长减缓,其微管骨架也会随之发生变化,且微管结合蛋白 MAP18 过表达植株 OE 的生长速率降低显著,WT 和突变株 map18 没有 OE 敏感,由此推测,MAP18 在 ABA 抑制根伸长中起着一定的促进作用。在 ABA 诱导气孔关闭的试验中,OE 更敏感,MAP18 RNAi 沉默株 R18 相对来说不敏感,推测 ABA 在诱导气孔关闭中,MAP18 促进 ABA 降解气孔保卫细胞微管骨架。

本研究深入探讨了 ABA 在诱导气孔关闭中的作用和可能的作用机制,为微管骨架参与气孔运动提供了又一新思路;但是在 ABA 诱导气孔关闭和抑制根生长过程中,MAP18 如何与 ABA 相互作用的机制等一系列问题尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Schroeder J I, Allen G J, Hugouvieux V, et al. Guard cell signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2001, 52 (1): 627 - 658.
- [2] 戴艳红, 郭栋梁, 李 玲. ABA 抑制花生侧根发生[J]. 植物生理学报, 2011, 47 (1): 75 - 79.
- [3] Sharp R E, Poroyko V, Hejlek L G, et al. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55 (407): 2343 - 2351.
- [4] Staiger C J. Signaling to the action cytoskeleton in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2000, 51 (1): 257 - 288.
- [5] Wasteneys G O, Galway M E. Remodelling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54 (1): 691 - 722.
- [6] Dzierzynska A. The role of cytoskeleton in stomata functioning[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2006, 28: 59 - 79.

- [7] Zhang W, Fan L M, Wu W H. Osmo - sensitive and stretch - activated calcium - permeable channels in *Vicia faba* guard cells are regulated by actin dynamics [J]. Plant Physiology, 2007, 143 (3): 1140 - 1151.
- [8] Wang X L, Gao X Q, Wang X C. Stochastic dynamics of actin filaments in guard cells regulating chloroplast localization during stomatal movement[J]. Plant Cell & Environment, 2011, 34 (8): 1248 - 1257.
- [9] Higaki T, Kutsuna N, Sano T, et al. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells [J]. The Plant Journal, 2010, 61 (1): 156 - 165.
- [10] 叶 子, 黄聪聪, 于 荣. 保卫细胞微管骨架参与蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸化调节的气孔运动[J]. 中国农业科学, 2012, 45 (21): 4351 - 4360.
- [11] 张媛华. G 蛋白在暗调控气孔运动中的作用[J]. 湖北农业科学, 2013 (4): 840 - 841, 845.
- [12] Wang X, Zhu L, Liu B Q, et al. *Arabidopsis* microtubule - associated protein18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules[J]. Plant Cell, 2007, 19 (3): 877 - 889.
- [13] Zhu L, Zhang Y, Kang E F, et al. MAP18 regulates the direction of pollen tube growth in *Arabidopsis* by modulating F - Actin organization[J]. Plant Cell, 2013, 25 (3): 851 - 867.
- [14] 林 坤, 周生波, 王 超, 等. MAP18 参与 ABA 调控拟南芥花粉生长的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40 (13): 7629 - 7630, 7734.
- [15] Yu R, Huang R F, Wang X C, et al. Microtubule dynamics are involved in stomatal movement of *Vicia faba* L. [J]. Protoplasma, 2001, 216 (1/2): 113 - 118.
- [16] Mathur J. Plant cytoskeleton: reinforcing lines of division in plant cells[J]. Current Biology, 2004, 14 (7): R287 - R289.
- [17] Yuan M, Shaw P J, Warn R M, et al. Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant - cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91 (13): 6050 - 6053.
- [18] Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, et al. A novel localization pattern for an EBI - like protein links microtubule dynamics to endomembrane organization [J]. Current Biology, 2003, 13 (22): 1991 - 1997.