

# 赤霉素合成基因的克隆以及其相关矮化突变体

武涛 曹家树\* 虞慧芳

(浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029)

**摘要** 矮化突变体在阐明植物茎的生长发育调节机制和植物育种中具有十分重要的作用。研究表明, 赤霉素(GA)与植物矮化突变体的产生有密切关系。目前运用各种不同的方法, 几乎所有编码GA合成过程中的酶的基因都被克隆出来了。近年来, 一系列新方法更加促进了GA调控的研究进展。现就GA合成过程中相关基因的克隆、GA的信号转导以及如何进行GA调控等方面进行综述。

**关键词** 矮化; 突变体; 赤霉素; 基因; 克隆

有关植物生长发育的分子基础研究常常是通过突变体的分析而得以深入的, 许多与植物生长发育相关的调节基因均是通过对突变体的研究获得的。矮化是作物育种中最有价值的特性之一, 且对于阐明植物茎的生长和发育的调节机制十分重要。半矮化品种具有更强的抗逆性, 同时能促进产量的稳定增长<sup>[1]</sup>。由于其在农艺学和园艺学上的重要性, 研究人员在许多不同的物种中(拟南芥、玉米、水稻、豌豆、番茄等)分离出了矮化突变体。

引起植物矮化的因素有多种, 植物激素如赤霉素(gibberellin, GA)或油菜素内酯的生物合成或信号转导途径受阻均会导致植物矮化。此外, 细胞壁不正常或细胞伸长不正常等也会引起植株的矮化<sup>[2]</sup>。目前研究较多的是与激素相关的植物矮化突变体。根据植物矮化突变体对外源激素的反应, 可将其分为缺陷型和不敏感型两类。激素缺陷型矮化突变体是活性激素的生物合成途径被抑制或阻断, 使得植物体内源活性激素缺乏或痕量存在。体外施用相应的活性激素后, 突变体的矮化表型可恢复到野生型表型。激素不敏感型矮化突变体的内源活性激素水平变化不大, 甚至比野生型的还高。这类突变体在体外施用相应的活性激素后不能恢复到野生型表型。

## 1 GA的生物合成

GA在高等生物不同的生长和发育阶段都起着十分重要的调控作用。例如, 种子的萌发, 茎的伸长和花的发育等<sup>[3]</sup>。GA的生物合成途径已基本确定。GA是类二萜途径的产物, 它们的形成由共同的C<sub>20</sub>前体牻牛儿牻牛儿焦磷酸(GGPP)的环化开

始。GGPP环化形成内-贝壳杉烯(ent-kaurene), 由古巴焦磷酸合成酶(CPS)和内-贝壳杉烯合成酶(KS)催化。内-贝壳杉烯通过一系列由CytP450单加氧酶和双加氧酶催化的氧化反应转化成GA<sub>12</sub>。这些过程中涉及的酶有内-贝壳杉烯氧化酶(KO)和内-贝壳杉烯酸氧化酶(KAO)。最后具生物活性GA的合成, 从GA<sub>53</sub>/GA<sub>12</sub>到GA<sub>1</sub>/GA<sub>4</sub>, 是通过两条平行的途径进行的。催化此过程的酶有GA<sub>20</sub>-氧化酶(GA<sub>20ox</sub>)、GA<sub>3β</sub>-羟基化酶(GA<sub>3ox</sub>)和GA<sub>2β</sub>-羟基化酶(GA<sub>2ox</sub>)(图1)<sup>[4]</sup>。

## 2 GA缺陷型矮化突变体

对于GA缺陷型矮化突变体, 目前研究的热点是克隆这些GA合成过程中发生作用的基因, 并对其功能验证<sup>[2]</sup>。最近几年, 利用不同的方法<sup>[5-8]</sup>, 几乎所有编码GA合成过程中的酶(CPS, KS, KO, KAO, GA<sub>20ox</sub>, GA<sub>3ox</sub>和GA<sub>2ox</sub>)的基因都被克隆出来了, 而且在不同物种上都获得了与其相关的突变体<sup>[9]</sup>。这些酶的突变体的典型性状, 除了GA<sub>2ox</sub>以外, 均表现矮化。对这些突变体施用外源GA能把它们恢复到野生型<sup>[1]</sup>。同时, Sakamoto等<sup>[1]</sup>根据对突变体和表达的分析, 还发现参与GA合成早期步骤的一些酶(如CPS, KS, KO和KAO)是由单基因编码的, 而那些参与后期步骤的一些酶(如GA<sub>20ox</sub>, GA<sub>3ox</sub>和GA<sub>2ox</sub>)是由一个小基因家族编码的。GA<sub>20ox</sub>和GA<sub>3ox</sub>分别至少有

收稿日期: 2004-06-30 接受日期: 2004-10-15

国家自然科学基金资助项目(No.30270909)。

\* 通讯作者。Tel: 0571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn

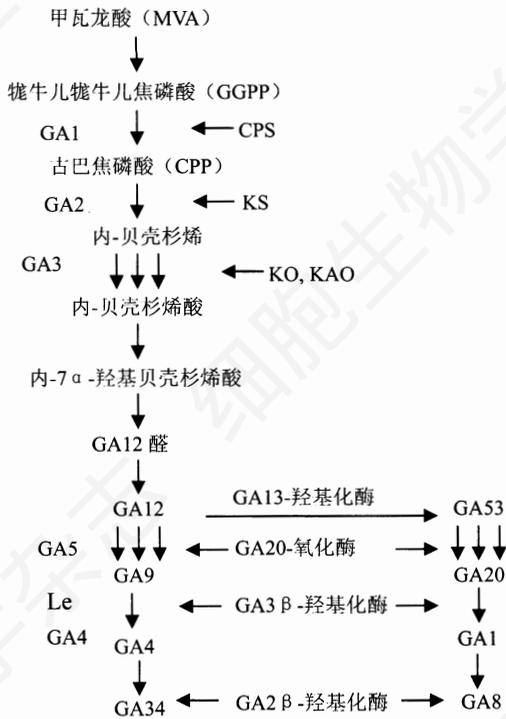


图1 GA生物合成途径<sup>[4]</sup>

4个基因编码,而GA2ox至少有6个基因编码<sup>[9]</sup>。

## 2.1 拟南芥GA缺陷型矮化突变体

根据GA缺陷型矮化突变体,目前已从拟南芥中克隆出了6个GA合成相关基因。GA1编码CPS,GA4和GA5编码GA合成过程中后面几步的双加氧酶的合成。GA2、GA3和GA6可能编码促进GA合成的一些酶或其调控因子。

拟南芥gal突变体是雄性不育的矮化突变体,对其连续施用GA能使其转变为野生型。与野生型相比,gal突变体内GA水平下降且内-贝壳杉烯合成酶的活性也非常低,其GA的合成是在形成内-贝壳杉烯之前被阻断的,但是内-贝壳杉烯形成之前的几步反应却没有受到这个突变的影响<sup>[10]</sup>。

GA反应的第一步是通过两次的环化反应,GGPP转化成内-贝壳杉烯。GGPP首先通过内-贝壳杉烯合成酶A(KSA)被环化成中间产物CPP,然后CPP马上通过内-贝壳杉烯合成酶B(KSB)转化成内-贝壳杉烯。Koornneef等<sup>[11]</sup>分离出了9个gal等位基因,其中gal-3有5 kb的缺失。利用这个缺失,采用基因组差减(genomic subtraction)的方法克隆到了GA1位点<sup>[7]</sup>,把GA1 cDNA在大肠杆菌中进行表达,结果表明拟南芥GA1编码KSA,它能促进GGPP到CPP的转化<sup>[12]</sup>。

拟南芥ga2突变体是GA缺失型矮化突变体。以前的生化研究表明,这是由于CPP转化为内-贝壳杉烯这一步受到了破坏造成的。而这一步是由KS催化的。把以前从南瓜上分离出的KS cDNA克隆在ga2中过量表达,能够使其恢复野生表现型。Yamaguchi等<sup>[3]</sup>利用南瓜(*Cucubita maxima*)(CmKS)的cDNA作为探针,从拟南芥中分离出了KS、AtKS。相应的拟南芥cDNA被分离出来且作为溶解蛋白在大肠杆菌中进行表达。结果这个溶解蛋白具有酶的活性。能把有<sup>[3</sup>H] CPP转化为<sup>[3</sup>H]内-贝壳杉烯。来自ga2-1突变体的重组AtKS在C末端被截下了14 kDa,它不含有明显的KS活性。序列分析表明,C-2099与T的碱基替换把Gln-678密码子变成了一个终止子。这与前面工作结果相符合,从而更加说明AtKS与GA2位点有关。Yamaguchi等<sup>[3]</sup>的研究结果表明,GA2位点编码KS。

Helliwell等<sup>[13]</sup>的研究表明,gal-1突变体体内KO活性减弱,并利用传统的图谱克隆和随机序列相结合的方法,鉴定出了细胞色素P450基因,它在遗传图谱上与GA3在同一位置。根据ga3体内内-贝壳杉烯的积累以及体外施用内-贝壳杉烯后并没有引起ga3突变体的生长这两个证据,他们提出ga3突变体缺乏KO活性。因此,GA3编码KO(一个依赖于细胞色素P450的单加氧酶)。GA3含有6个内含子和一个1678 bp的开放阅读框,编码一个58.1 kDa的蛋白质。另外,gal3的两个等位基因的测序结果表明,两个等位基因都含有一个碱基的替代,分别在阅读框内引入一个终止子。

Chiang等<sup>[6]</sup>在转基因拟南芥的后代中发现了与GA相关的半矮化突变体。对其进行的遗传分析表明转基因植株有一个与ga4等位的插入性突变,gal4-2。随后利用T-DNA插入标签法分离到了ga4位点<sup>[6]</sup>。这个基因拥有一个包含一个内含子的开放阅读框,编码一种40.2 kDa的酶。随后的研究表明,在拟南芥中,gal4突变体等位基因阻断了GA生物合成过程中的3β-羟基化作用,降低了内源GA1、GA8和GA4的量,增加了内源GA19、GA20和GA9的量。3β-羟基化作用的下降导致植株半矮化,即产生ga4突变体。突变了GA4基因可能编码改变了形式的3β-羟基化酶。这一点与豌豆中的le突变体很相似<sup>[14]</sup>。

在GA的形成过程中,在GA12醛后还有一系列的氧化步骤,从而形成具生物活性的GA。利用

南瓜 cDNA 克隆作为异源探针, Xu 等<sup>[15]</sup>从长日照拟南芥的基因组文库中分离得到了编码 GA20ox 的基因组克隆。它包含了 GA-20ox 基因, 这个基因包含了 3 个外显子和两个内含子。这 3 个外显子共 1131 bp 长, 编码了 377 个氨基酸残基。用 RT-PCR 的方法获得了与 GA20ox 基因组序列相应的 cDNA 文库, 并在大肠杆菌中对其进行了验证。它能将 GA53 转变为 GA44, 把 GA19 转变为 GA20。在衍生氨基酸水平, 拟南芥 GA20ox 与南瓜 GA20ox 具有 55% 的一致性和大于 80% 的相似性。两种 GA20ox 均与其他 2- 酮戊二酸依赖性双加氧酶有同源性, 但是它们两者之间的同源性却是最高。图谱分析结果表明, 拟南芥中 GA20ox 基因与 GA5 有紧密连锁关系。GA5 半矮化突变体有一个 G 到 A 的点突变, 它在蛋白质编码序列中插入一个翻译性终止密码子, 于是表明 GA5 位点编码 GA20ox。

拟南芥 Heynh 的化学突变产生了 4 种半矮化的突变体<sup>[16]</sup>, 它们可能都是 GA 合成突变体。它们均具有非典型的 C20-GA 反应性状, 这表明每一种突变体都削弱了 GA20ox 的表达。11.2 这个突变体被证明是和 *ga5* 等位的, 命名它为 *ga5-2*。另外两种突变体 2.1 和 10.3, 都有着短的花序和长角果, 两者互为等位基因, 但它们与已知的与 GA 相关的突变体 *gal* 到 *ga5* 是没有等位关系的。于是将其命名为 GA6, 它可能编码花序和长角果表达的 GA20 氧化酶。第 4 种突变体 1.1, 其表现型类似与 *ga5*, 但是与任何一个 *ga* 突变体都不是等位的。

## 2.2 豌豆 GA 缺陷型矮化突变体

目前在豌豆 (*Pisum sativum*) 中发现的 GA 缺陷型矮化突变位点主要有 4 个, 即: LS, LH, LE 和 NA。它们分别编码 KS<sup>[17]</sup>、KO<sup>[18]</sup>、3 $\beta$ - 羟化酶<sup>[19]</sup>和 KAO<sup>[20]</sup>。

以前的一些生化实验表明, 豌豆中的 *ls-1* 突变体降低了 KSA 的活性。为了更详细的研究 *ls-1* 突变体, Ait-Ali 等<sup>[17]</sup>克隆了编码豌豆 KSA 的 cDNA, 且证明是由 LS 位点编码的。内含子中 G 到 A 的碱基替代造成的 *ls-1* 突变导致了 RNA 拼接的削弱。利用南瓜 KSB 基因构建了一个 KSA 和 KSB 结合的离体化实验系统来证明 KSA 是由 LS 和 *ls-1* 等位基因编码的。利用重组的野生型 KSA 和 KSB 溶解蛋白, GGDP 在离体状态下转化成了内 - 贝壳杉烯。根据 RT-PCR 产物的序列, Ait-Ali 等<sup>[17]</sup>预测在 *ls-1* 突变体中存在 3 个不同的短缩的 KSA 蛋白。虽然在离体条件下没检测

到最丰量的突变 KSA 蛋白, 但是 *ls-1* 等位基因并不是一个无意义的突变。它至少能够部分地编码一个功能性蛋白质。

豌豆 *lh* 突变体是 GA 缺陷型突变体, 与野生型相比, 其节间和根的生长都受到了抑制。Davidson 等<sup>[18]</sup>分离到了一个名为 *PsKOl* 的基因。它编码来自于 701A 亚家族的细胞色素 P450。把 *PsKOl* 在酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中进行表达能促进 GA 合成过程中从内 - 贝壳杉烯到内 - 贝壳杉烯酸的三步氧化反应。进一步的研究表明 *PsKOl* 具有 KO 活性。在 3 个独立的突变基因 (*lh-1*, *lh-2*, *lh-3*) 中, *PsKOl* 的序列都发生了改变。在酵母中表达 *lh-1*, 结果体内的内 - 贝壳杉烯得到了积累。从而说明 LH 编码 *PsKOl*。

在豌豆中, 调控茎伸长的主要 GA 是 GA1, 它是由 GA20ox 通过 3 $\beta$ - 羟化作用形成的。这一步骤在豌豆中由 *Le* 位点调控。这一位点的突变会导致植株的矮化。*Le* 位点几乎是被两组人员同时克隆出来的<sup>[14,17]</sup>。Martin 等<sup>[14]</sup>从一系列含有 *Le*、*le*、*le-3* 和 *led* 的等位基因豌豆中分离出了编码 GA 3 $\beta$ - 羟化酶的 cDNA 克隆。每一个 cDNA 克隆都在大肠杆菌中进行了表达。结果表明, *Le* 编码 3 $\beta$ - 羟化酶。*Le* 转录产物在许多部位, 比如正在萌发幼苗的根、茎和子叶, 幼苗的节间和叶片, 还有正在发育的种子中都有表达<sup>[14]</sup>。

豌豆 GA 缺陷型矮化突变体 *na* 节间严重短缩, 根的生长减少, 叶片缩小, 种子能正常萌发。Davidson 等<sup>[20]</sup>首先克隆了编码 CYP88A 亚家族细胞色素 P450 单加氧酶的两个基因, *PsKAO1* 和 *PsKAO2*, 在酵母中对这两个基因进行表达, 两者都具有 KAO 的活性, 能够促进 GA 合成途径中从内 - 贝壳杉烯到 GA12 这三步的反应。除了中间产物内 - 7 $\alpha$ - 羟基贝壳杉烯酸 (ent-7 $\alpha$ -hydroxykaurenoic acid) 和 GA12 醛外, 一些其他的豌豆 KAO 活性产物也被检测了出来, 其中包括内 - 6 $\alpha$ , 7 $\alpha$ - 二羟贝壳杉烯酸 (ent-6 $\alpha$ , 7 $\alpha$ -dihydroxykaurenoic acid) 等。在两个独立的等位突变体 *na-1* 和 *na-2* 中, *PsKAO1* 改变了序列。另外, *PsKAO1* 中 5 个碱基的缺失是与 *na-1* 等位基因联系在一起的, 而 *na-1* 等位基因是与 *na* 表现型共分离的, 从而说明 NA 编码 *PsKAO1*。在茎、顶芽、叶片、荚和根等一些 *na* 突变体上的实验结果表明, *PsKAO1* 可以在降低了的 GA 水平的器官中得到表达。*PsKAO2* 只是在种子中得到了表达, 这一

点可能可以解释为什么 *na* 突变体的种子能够正常发育且其体内有正常的 GA 合成。

### 3 GA 不敏感型矮化突变体

这一类突变体是研究 GA 信号接收、传递过程和机制的好材料。在拟南芥、水稻、豌豆、番茄、大麦、小麦、玉米等植物中都发现了一些 GA 不敏感型突变体，这些突变体一般根据其表型的不同而分为两类：一类是 GA 不敏感型矮化突变体，这类突变体的表现型与 GA 生物合成突变体相似，半矮化或者完全矮化，发芽率降低，叶片浓绿紧缩，开花延迟，花发育不正常，其中一些突变体是隐性的，如水稻的 *dwarf1 (dl)* 突变体，拟南芥的 *pickle (pk1)* 突变体和 *sleepy1 (sly1)* 突变体等；另一些突变体为半显性或显性，如拟南芥的 GA- 不敏感型突变体 *l(gail)*，玉米的 *D8*、*D9* 突变体和拟南芥的短节间 (*shi*) 突变体等。另一类突变体为组成型 GA 不敏感型突变体 (constitutive GA insensitive mutants)，这类突变体植株的 GA 含量只有正常对照的几十分之一，但突变体表现出与 GA 过量处理过的野生型相似的表型，叶柄和茎变长，叶片颜色变浅，育性降低，且这些性状不受外加 GA 或 GA 抑制剂的影响。这类突变体很可能是由于这些基因在 GA 信号的吸收和传递过程中起着负调节的作用，基因突变后这种负调节作用被解除，从而表现出与野生型 GA 处理后的表型相似的表型。这类突变体包括拟南芥的 *spindly (spy)*、*rga* 突变体，豌豆的 *la: cry* 突变体，大麦的 *sln* 突变体和水稻的 *slr1* 突变体等，这些突变体都是隐性的。

通过对 GA 不敏感型突变体的遗传分析，已发现和鉴定了一些与 GA 信号转导相关的基因，根据它们在 GA 信号转导中是起正向调节或负调节作用而把它们分为正向作用因子 (positively acting components) 和反向作用因子 (negatively acting components)。

#### 3.1 正向作用因子

3.1.1 *DWARF 1* *DWARF1* 是水稻里唯一一个编码 GTP 结合蛋白的基因<sup>[21]</sup>，其突变体表现出典型的 GA 不敏感性状。与野生型相比，突变体的节间伸长对外施加 GA 的敏感度不高，第二片叶对 GA 的敏感度与野生型相比是看不出区别的，但是这个突变体的生长还是被抑制了。*dl* 与 *slr1* 突变体均表现弱小的表现型，这表明 *SLR1* 做为 GA 反应过程中的一个负调控因子，在 *D1* 的下游发挥功能。尽管 *dl*

突变株的一些表现型与一些 G 蛋白有关，而这些 G 蛋白在 GA 反应的过程中也表现出正作用，但是突变体第二片叶对赤霉素正常的敏感性表明这些蛋白质可能并不是和 GA 反应中的一切过程均有关。拟南芥功能缺失型突变体影响了 G 蛋白的活性，尽管它们只是影响了信号转导中的几个步骤且并没有造成如 GA 缺陷型那样典型的矮化性状。因此，G 蛋白对 GA 反应的重要性在不同物种间可能是不同的。

3.1.2 *PHOR1* *PHOR1 (photoperiod-responsive1)* 是在筛选短日照下马铃薯哪些基因的 mRNA 水平会上升的过程中鉴别出来的基因<sup>[22]</sup>。反义抑制 *PHOR1* 的表达会造成植株的半矮化，使植株对 GA 的敏感性下降，增加内源 GA 的水平。过量表达 *PHOR1* 则会使植株生长过度，对 GA 的敏感度增强。GA 处理能促进番茄 BY2 细胞中 *PHOR1-GFP* 溶解蛋白的核定位。而 GA 合成抑制物会使这个溶解蛋白定位在胞液中。对缺失突变体的分析表明：有两个区域对于 GA 调控的 *PHOR1* 基因的定位是非常重要的。缺失突变分析鉴定了两个对 GA 调节 *PHOR1* 蛋白定位起重要作用的区域，其中一个区域是保守的半胱氨酸-脯氨酸-异亮氨酸模体 (CPI)，CPI 缺失引起 *PHOR1:GTP* 融合蛋白组成性地定位于核内，表明 CPI 是 *PHOR1* 的胞质溶胶定位信号，但其作用可以被 GA 所抑制。另一个与 *PHOR1* 蛋白定位有关的区域是 *armadillo* 重复序列，*armadillo* 重复序列是最早在果蝇中发现的一种 42 个氨基酸的多拷贝序列，在其他生物中也存在，具有核定位的功能。*PHOR1* 含有 7 个 *armadillo* 重复序列，缺失实验证明这些 *armadillo* 重复序列是 *PHOR1* 的核定位信号，但其核定位功能可为 CPI 所逆转，据此可以推测出 *PHOR1* 发挥作用的模式，当 GA 信号不存在时，CPI 使 *PHOR1* 保持在胞质溶胶中，这时 *PHOR1* 处于非活性状态；当 GA 信号转导时，CPI 受到抑制，*armadillo* 重复序列使 *PHOR1* 定位到核内，从而促进 GA 反应中的正向作用因子基因的转录。

3.1.3 *MYB* *GAMYB* 是 GA 诱导的转录因子。它能使大麦  $\alpha$ -淀粉酶启动子活化，因而被人们所鉴定。在糊粉层细胞中，来自拟南芥的 3 种 *GAMYB* 蛋白已被证明能够功能性地替代大麦中的 *GAMYB* 蛋白<sup>[23]</sup>。其中的一种蛋白质，AtMYB33 可能与 GA 诱导的植物开花有关。诱导植物开花的过程中 AtMYB33 在茎尖得到了表达，且它的表达是受 GA 诱导的。花的分裂组织基因 *LEAFY (LFY)* 的表达同

样受 GA 的诱导。一个特定的启动子组件, *GOF9*, 被证明给予了 GA 感应。*AtMYB33* 与 *GOF9* 结合在一起表明, 在诱导花形成的过程中, 受 GA 诱导的 *AtMYB33* 与 *GOF9* 结合在一起, 促进了 *LFY* 的表达。因为 *AtGAMYBs* 是在种子和植物组织中得到表达, 所以除了植物的开花以外, 它们还可能参与了 GA 反应。

另一个来自拟南芥调控 GA 的 MYB 基因 *GLA-BROUS1 (GLI)*, 可能在反应的初始阶段和香毛簇的分支方面发挥作用。拟南芥的 *gal* 突变体与野生型相比含有更少的香毛簇, 但是用 GA 处理能逆转这种作用。因为 *GLI* 的 mRNA 在 *gal* 中丰度不高, 且 GA 处理能增加受 *GLI* 启动子驱使的一个报告基因的表达, 所以受 GA 诱导的 *GLI* 的表达可能会同时促进初始阶段和香毛簇的分支。

**3.1.4 SLEEPY1** 遗传筛选 GA 反应途径中的正向作用因子的一个潜在的困难是受那些因子作用的突变体不能萌发。受 GA 合成影响的突变体的萌发能通过降低脱落酸的合成水平或敏感性这样的突变而被恢复<sup>[24]</sup>。与野生型相比, *abil-1* 突变体对脱落酸的敏感性较低, 因此它能够在 3  $\mu\text{mol/L}$  的脱落酸条件下萌发, 而 3  $\mu\text{mol/L}$  则能抑制野生型种子的萌发。对于在 3  $\mu\text{mol/L}$  脱落酸条件下不能萌发而在去除脱落酸能萌发的突变体进行的 *abil-1* 抑制筛选已经鉴定出了新的 GA 合成突变体和 *sleepy1 (sly1)* 基因。*Sly1 abil-1* 植株是墨绿色的矮化株, 它不能被施用 GA 而恢复其野生型性状。在没有 *abil-1* 等位基因的情况下, *sly1* 的种子是不能萌发的。

**3.1.5 PICKLE** 拟南芥 PICKLE (PKL) 蛋白包含具有 CH3 染色质改造特点的区域。并且一些 *pk1* 突变体表现型表明 PKL 蛋白参与了 GA 反应<sup>[25]</sup>。功能缺失型 *pk1* 突变体是体内 GA 含量增加的 GA 不敏感型矮化株。关于开花的时间, *pk1* 和 *gai-1* 表现出协同作用, 表明两种突变体影响了 GA 的反应途径。与双亲单突变有关的是, *pk1 gai-1* 植株在 SD 条件下开花严重推迟。除了上述几种表现型, *pk1* 还有其他表现型, 这表明 PKL 与 GA 的反应有着复杂的关系。*pk1* 植株种子萌发后胚胎特性继续发生最明显的证据便是在主根膨胀的根尖上油脂的积累和贮藏蛋白基因的表达。令人感兴趣的胚胎学现象是它们并不是完全渗透的, 用 GA 合成抑制剂能够增加这种表现型的渗透性, 而 GA 处理却能降低其渗透性。PKL 同样在 GA 调节方面还发挥着作用。

与 *asymmetric1* 或 *asymmetric2* 突变结合, *pk1* 能在叶子的凹陷处形成异位的托叶, 在极少的时候甚至形成异位的分裂组织。与 *crab claw* 结合, *pk1* 能形成异位的近轴的心皮组织。

尽管 PKL 在 GA 反应过程中的作用还不清楚, 人们通过 CH3 染色质改造因素还是提出了一些可能的机制。CH3 蛋白是具有能抑制转录的组蛋白脱乙酰基酶活性的一个大的复合物。因此, PK1 表现型可能是异位基因的表达造成的。但是它仍然遗留了一个问题, 那就是异位表达的基因在 GA 反应过程中是起直接作用还是间接的作用。

**3.1.6 GIBBERELLIN-INSENSITIVE DWARF1 Sasaki** 等<sup>[26]</sup> 在水稻 GA 缺陷植株中观察到了隐性的 GA 不敏感型矮化突变体, *gibberellin-insensitive dwarf1v(gid1)* 的表现型。其第二片叶扩张, 且用 GA 处理没有诱导出  $\alpha$ -淀粉酶的产生。另外, 在突变体中 GA-20 氧化酶的表达得到了增加。*GID1* 这个基因已经得到了克隆, 尽管预测的 *GID1* 蛋白与水解酶家族成员有相似性(解酶包括酯酶、脂肪酶和蛋白酶), 但是 *GID1* 蛋白的功能还没有被确定。对 *gid1* 和 *sly1* 两个突变体的分析表明, 作为对 GA 负调控的 *GAI/RGA* 家族的一员, *GID1* 在 *SLR1* 的上游起作用。与 *GID1* 在 *SLR1* 的上游起作用一致的是, 一个 *SLR1-GFP* 溶解蛋白在 GA 处理后在野生型中含量降低而在 *gid1* 中对 GA 处理却没有反应。

### 3.2 负作用因子

**3.2.1 RGA/GAI 蛋白** 许多 GA 敏感型突变体改变了编码 RGA/GAI 家族的基因。影响 RGA/GAI 蛋白的突变体已经在拟南芥(*rga* 和 *gai*)、大麦(*sln1*)、玉米(*d8*)、水稻(*slr1*)、小麦(*rht*)等物种中得到了鉴定。可以把它们分为两种类型: 拟南芥、玉米、小麦、大麦中的半显性突变, 它能导致植株矮化; 在拟南芥、大麦、水稻中的功能缺失型隐性突变, 它能加速植株的生长。功能型缺失的隐性突变型的等位基因分析表明那些蛋白质在 GA 反应过程中起负调控作用。在大麦和水稻中, 单基因的产物 *SLN1* 和 *SLR1* 在植物所有的发育阶段分别对 GA 的反应起负调控的作用。相反, 拟南芥含有一个基因家族编码 RGA, GAI 和 3 个类似于 RGA(RGL) 的重叠作用的蛋白。

RGA 是在筛选抑制 GA 缺失型 *gai-1* 突变的植株矮化的突变体的过程中被鉴定的。功能缺失型 *gai1* 突变能够在某种程度上抑制 *gai1* 植株大部分的表现

型,使植株矮化且降低顶端优势的作用。与 *rga* 等位基因相反的是,一种功能缺失型等位基因, *gai-t6*,只是能稍稍地抑制 *gal* 的表达。然而,在 *rga* 和 *gai-t6* 之间却有一个协同作用。*rag* 和 *gai-t6* 两者结合起来并没有加倍 *gal* 植株开花延迟等表现型,甚至产生了 GA 过量的表现型。这表明, RGA 和 GAI 是那些过程的主要的抑制者。*Rag*、*gai-t6*、*gal* 这 3 个突变体不能萌发且在花瓣和其他的发育过程中不表现缺失,这表明 RGLs 与那些过程有关。最近,人们发现 RGL1 与萌发有关。转基因的拟南芥种子, RGL1 在其体内没有表达,对 GA 合成抑制剂 Pacllobutrazol 类的萌发抑制物有抵抗作用。

**3.2.2 SPINDLY** 对 Pacllobutrazol 能同时抑制种子的萌发和植株的矮化的基因进行筛选,结果得到了一些 SPINDLY 的隐性等位基因<sup>[27]</sup>。对 *gal* 和 *gai-1* 的抑制物进行筛选同样得到了另外的一些 *spy* 等位基因。尽管在许多方面这些抑制只是部分的,所有被鉴定出来的 GA 缺失型表型都受到了 *spy* 的抑制。在野生型背景下, *spy* 能够使得连续施用 GA3 的野生型(其中包括直立的圆花饰叶子的表现型)变成叶子白绿色,提早开花,且结实率降低这样的表现型。在控制花椰菜镶嵌病毒 35S 启动子的条件下,在拟南芥和矮牵牛中过量表达拟南芥 SPY,产生了与降低了的 GA 活性一致的表现型。根据以上结果, SPY 应该是 GA 反应过程中的一个负调控因子。在大麦糊粉层中过量表达大麦 SPY 这一实验也证明了这个假设。

用 SPY::GUS 报告基因来检测拟南芥 SPY 的表达,和通过 RT-PCR 来检测矮牵牛 SPY 的表达这些实验发现,它们组成性地在所有的发育阶段都得到了表达,并且它们的表达不受 GA、其他激素或光的调控。在细胞质和细胞核中都发现了拟南芥 SPY 蛋白。

**3.2.3 SHORT INTERNODES** 通过活化标签 Ds 转座子,对 *SHORT INTERNODES (SHI)* 等位基因的过量表达产生了半矮化的表现型,且这种表现型不能被 GA 处理或增加内源 GA 的浓度而逆转<sup>[28]</sup>。野生型的 *SHI* 基因在未经受过快速延长生长的年幼器官中得到了表达,这表明 *SHI* 阻止了年幼器官在 GA 作用条件下初始的不相称延长生长。因为 *SHI* 在正在进行延长生长的细胞里通常不表达,过量表达 *SHI* 等位基因产生半矮化的作用可能要归功于异位表达。在大麦糊粉层中表达 *SHI* 降低了 GA 对  $\alpha$ -淀粉

酶的诱导作用,这表明在不同的物种中过量表达 *SHI* 能够对 GA 的反应起负调控作用。它仍然遗留了一些问题,是否 *SHI* 在 GA 反应中起作用,或者说是否过量表达一些干扰 GA 反应的基因。尽管功能缺失型 *shi* 等位基因没有产生相应的表现型,但是 *SHI* 是拥有 9 个成员的基因家族的一部分,提高了在功能缺失型表现型决定前必须突变几个成员的可能性。

#### 4 对 GA 合成相关基因的调控以控制株高以及其他激素之间的关系

以前在农业或园艺学上对植株的调控主要是采用一些化学的方法。在了解了 GA 生物合成途径的基础上就可以利用生物技术从基因水平上对植株特定组织特定基因进行调控。比如可以只对控制节间伸长的基因进行调控就可以达到控制株高的目的,且不会对果实的成熟的其他方面产生影响。这与化学方法相比是一大优势。人们普遍认为对 GA 生物合成的调控分布于几个接触反应步骤,改变其中的一个对于整体上的 GA 合成没有太大的影响。所以,过量表达 CPS,对拟南芥的生长和发育没有产生巨大的影响<sup>[12]</sup>。但是,与此相反的是,调控 GA 合成过程中后面步骤中的几个酶(GA20ox, GA3ox 和 GA2ox)的表达,却对活性 GA 的合成产生了影响。Niki 等<sup>[29]</sup>在莴苣上用强的组成性启动子盒(E12-35S- $\Omega$ )转化的方法,过量表达一种南瓜 GA20ox,表明在 T<sub>2</sub> 代,在矮化莴苣中,内源性 GA1 和 GA4 水平下降,而 GA17 和 GA25,作为南瓜 GA20ox 无生物活性的产物,却大量在矮化莴苣体内积累。同时,人们也还采用其他一些不同的方法来降低转基因植株中有生物活性 GA 的水平。Coles 等<sup>[30]</sup>利用反义 RNA 的方法抑制拟南芥 GA20ox 的表达,部分地鉴别了基因家族中不同个体的作用。在两个转基因系中,抑制 *AtGA20ox1* 的表达都起到了作用,降低了植株体内活性 GA 的水平且使得植株半矮化<sup>[30]</sup>。

最近的一些研究对激素间的相互作用给予了高度的重视。Ross 等<sup>[31]</sup>阐明了生长素和 GA 的一种新关系。在野生型豌豆品种中,去除顶芽后大大地降低了节间中内源活性 GA1 的含量。同时,还降低了 LE 基因的转录水平,LE 基因编码 GA3 氧化酶(PsGA3ox1)从而在豌豆嫩芽完成从 GA20 到 GA1 的转化。另外还增加了 SLN 基因的转录水平,它编

码 GA2 氧化酶(PsGA2ox1)从而完成从 GA20 到非活性 GA29 的转化。但是体外施用 IAA 后能够恢复活性 GA1 的水平。IAA 已被证明能够促进豌豆嫩芽活性 GA1 的合成。O'Neill 等<sup>[32]</sup>利用 Northern 杂交的方法分析了 IAA 对于豌豆中 GA1 合成与代谢后期一些关键基因在转录水平的诱导时间, 比如说 PsGA3ox1 (Mende's LE), PsGA2ox1, PsGA2ox 和 PsGA20ox1。施用 IAA 后在 PsGA3ox1、PsGA2ox1、PsGA2ox2 的转录水平发生了较快的变化(2~4 h)。GA1 的代谢研究表明 IAA 抑制了 GA1 的钝化且这个与 IAA 抑制 PsGA20ox1 (SLN)转录水平的结果是一致的。对 sln 突变体幼苗的研究同样表明 PsGA20ox1 的活性与 GA1 的钝化作用有关。通过节间离体组织培养表明 IAA 的浓度也是 GA1 合成的一个关键因素。

## 5 小结

从最近的一些研究结果来看, GA 合成和作用可能发生在不同组织, 也可能发生在同一组织的不同发育阶段。对 GA 生物合成途径中基因的克隆为研究 GA 合成部位和生物合成酶的结构和功能提供了一些新的信息, 从而使得利用转基因的方法对特定步骤特定部位进行遗传调控成为可能, 它还帮助人们认识到了影响植物株高的许多突变的分子基础。但是这些进展只是研究 GA 对植物调控的初始阶段。

虽然人们已经克隆出了编码 GA 合成过程中大部分酶的基因, 但是我们仍然有许多工作要做。人们对许多酶和基因在这些 GA 合成步骤中发生作用的机制并不是很清楚。这些基因的鉴定, 对于全面理解植物是如何调控其体内 GA 水平来说, 是必需的一个环节, 但仍需一个对单加氧酶进行功能性表达的有效系统, 而这一系统有待进一步发展。

在 GA 代谢调节方面目前有几块内容仍在正在进行之中, 并可能在未来的几年中取得进展。对重组酶结构的研究, 尤其是对环化酶和双加氧酶的研究, 会对研究其功能提供一些基本的信息。这就可能利用一些方法, 比如说改变底物特异性, 改变产品的外形和改变其对抑制剂的敏感度等, 来设计一些酶。对一些同工酶采用基因剔除和 RNA 干涉的方法, 可能会理解其对 GA 生物合成和植物发育的影

响。对转基因植株中特定组织的 GA 水平进行调控, 可能会揭示出 GA 的一些新功能。转录物和蛋白质的定位可能会确定 GA 代谢在不同组织间的区分范围。最有意义的是, 人们可能会对 GA 代谢调控的分子机制有一个清晰的认识, 从而增加对植物发育的基本理解。

植物矮化突变体总体上是由于茎不能伸长引起的。高等植物茎形态建成的机制还没有完全被人们认识。随着分子生物学等学科的飞速发展和植物基因工程技术的日益完善, 完全有理由相信人们最终会认识清楚植物矮化突变体的发生机制。

## 参考文献 (References)

- [1] Sakamoto T *et al.* *Plant Physiol*, 2004, **134**: 1642
- [2] 虞慧芳等. *生命科学*, 2002, **14**: 85
- [3] Yamaguchi S *et al.* *Plant Physiol*, 1998, **116**: 1271
- [4] Hedden P *et al.* *Plant Physiol*, 1999, **119**: 365
- [5] Phillips AL *et al.* *Plant Physiol*, 1995, **108**: 1049
- [6] Chiang HH *et al.* *Plant Cell*, 1995, **7**: 195
- [7] Sun TP *et al.* *Plant Cell*, 1992, **4**: 119
- [8] Winkler RG *et al.* *Plant Cell*, 1995, **7**: 1307
- [9] Hedden P *et al.* *Trends Plant Sci*, 2000, **5**: 523
- [10] Zeevaert JA *et al.* *Plant Physiol*, 1993, **101**: 25
- [11] Koornneef M *et al.* *Genet Res Camb*, 1983, **41**: 57
- [12] Sun TP *et al.* *Plant Cell*, 1994, **6**: 1509
- [13] Helliwell CA *et al.* *Proc Natl Aca Sci USA*, 1998, **95**: 9019
- [14] Martin DM *et al.* *Proc Natl Aca Sci USA*, 1997, **94**: 8907
- [15] Xu YL *et al.* *Proc Natl Aca Sci USA*, 1995, **92**: 6640
- [16] Sponsel VM *et al.* *Plant Physiol*, 1997, **115**: 1009
- [17] Ait-Ali T *et al.* *Plant J*, 1997, **11**: 443
- [18] Davidson SE *et al.* *Plant Physiol*, 2004, **134**: 1123
- [19] Lester DR *et al.* *Plant Cell*, 1997, **9**: 1435
- [20] Davidson SE *et al.* *Plant Physiol*, 2003, **131**: 335
- [21] Ashikari M *et al.* *Proc Natl Aca Sci USA*, 1999, **96**: 10284
- [22] Amador V *et al.* *Cell*, 2001, **106**: 343
- [23] Gocal GF *et al.* *Plant Physiol*, 2001, **127**: 1682
- [24] Nambara E *et al.* *Plant J*, 1992, **2**: 435
- [25] Ogas J *et al.* *Science*, 1997, **277**: 91
- [26] Sasaki A *et al.* *In 17th International Conference on Plant Growth Substances*, July 1-6, 2001, Brno, Czech Republic
- [27] Jacobsen SE *et al.* *Plant Cell*, 1993, **5**: 887
- [28] Fridborg I *et al.* *Plant Cell*, 1999, **11**: 1019
- [29] Niki T *et al.* *Plant Physiol*, 2001, **126**: 965
- [30] Coles JP *et al.* *Plant J*, 1999, **17**: 547
- [31] Ross JJ *et al.* *Plant J*, 2000, **21**: 547
- [32] O'Neill DP *et al.* *Plant Physiol*, 2002, **130**: 1

## The Cloning of Gibberellin Metabolism Enzyme Genes and Their Related Dwarf Mutants

Tao Wu, Jia-Shu Cao\*, Hui-Fang Yu

(*Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China*)

**Abstract** Dwarf mutant has very important effect on elucidating regulation mechanism of stem development and plant breeding. The research shows that, gibberellin (GA) has a close relationship with dwarf mutant. Approximately all of the genes involved in the biosynthesis of the biologically active GA have now been isolated, using different kinds of strategies. In recent years, a series of new strategies has promoted the research development of GA regulation. Here we summarize the cloning of the genes involved in the biosynthesis of the biologically active GA, the GA signaling transduction, and how to do with the GA regulation.

**Key words** dwarf; mutation; gibberellin; gene; cloning

---

Received: June 30, 2004      Accepted: October 15, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270909)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86971188, E-mail: jshcao@zju.edu.cn