

# 水稻油菜素内酯相关基因及其功能研究进展

钱文静, 刘 静, 宋 丹, 何正权\*

(三峡大学生物技术研究中心, 湖北 宜昌 443000)

**摘要:** 水稻油菜素内酯影响水稻株型的变化, 进而影响水稻的生物量和产量。体外喷施油菜素内酯与体内油菜素内酯含量的变化均能导致水稻株型的变化, 因此, 研究油菜素内酯相关基因的功能可以从分子水平揭示植物株型构成的机制, 从而通过分子操作手段提高水稻产量。综述了水稻油菜素内酯的生物合成、生物降解以及信号转导的相关基因及其生理功能。

**关键词:** 油菜素内酯; 水稻; 生物合成; 生物降解

**中图分类号:** S511 Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)09-0001-05

## Research Progress on Brassinosteroid Related Genes and Their Functions in Rice

QIAN Wen-jing, LIU Jing, SONG Dan, HE Zheng-quan\*

(Biotechnology Research Center of China Three Gorges University, Yichang 443000, China)

**Abstract:** Brassinosteroids belong to the plant hormones and play an important role in plant growth. Brassinosteroids in rice affect the plant type, thus affecting the biomass and yield of rice. Both spraying the brassinosteroids *in vitro* and changing the brassinosteroid level *in vivo* will change the rice plant type. Therefore, the study of brassinosteroid related genes in rice could reveal the mechanism of plant type in the molecular level, so as to improve the rice yield by molecular operation means. In this paper, we summarized some brassinosteroid genes and their physiological functions, which participate in biosynthesis, biodegradation and signal transduction in rice.

**Key words:** brassinosteroid; rice; biosynthesis; biodegradation

油菜素内酯(brassinosteroids, BR)是植物体内广泛存在的一类甾醇类激素, 据统计, 科学家已从不同植物中分离出超过 69 种 BR, 而芸苔素内酯(brassinolide)是迄今发现的油菜素内酯中生物活性最强的一种<sup>[1]</sup>。油菜素内酯在植物的根茎伸长、维管束分化、光形态建成、种子发芽、生殖发育和向性建成等生长发育过程中发挥着重要作用, 同时油菜素内酯还能提高植物抵抗低温、高温和盐害等不利环境的能力<sup>[2-3]</sup>。因此, 研究 BR 的合成、降解和信号转导途径具有重要意义。为此, 综述了水稻 BR 相关基因及其生理功能的研究现状, 旨在为研究 BR 在水稻中作用的分子机制提供借鉴。

### 1 BR 的生物合成途径及水稻相关基因

20 世纪 90 年代, 科学家以长春花和拟南芥为研究对象, 通过同位素示踪和 GC-MS 检测技术首先提出以油菜甾醇为起始物到最终转化为芸苔素内酯的代谢过程。其具体过程分为 3 步: 首先, 油菜甾醇转化为油菜甾烷醇, 然后油菜甾烷醇经过一系列羟化和氧化步骤转化为甾甾酮, 最后由甾甾酮转化为芸苔素内酯。其中从油菜甾烷醇到甾甾酮之间存在 2 条平行的代谢通路, 根据 C-6 氧化时间的不同, 分别被称为早期 C-6 氧化途径和晚期 C-6 氧化途径。在早期 C-6 氧化途径中, 油菜甾烷醇的 C-6 首先

收稿日期: 2013-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271686)

作者简介: 钱文静(1988-), 女, 湖北黄冈人, 在读硕士研究生, 研究方向: 水稻基因组学。

\* 通讯作者: 何正权(1972-), 男, 四川宜宾人, 教授, 主要从事植物分子生物学与基因工程研究。E-mail: zhq\_he@163.com

形成 6-氧油菜甾醇,然后依次氧化为长春花甾酮、茶甾酮、3-脱氢茶甾酮、香蒲甾醇,最后形成栗甾酮。晚期 C-6 氧化途径的代谢产物则依次为:6-脱

氧长春花甾酮、6-脱氧茶甾酮、3-脱氢-6-脱氧茶甾酮、6-脱氧香蒲甾醇、6-脱氧栗甾酮和栗甾酮<sup>[4-5]</sup>(图 1)。

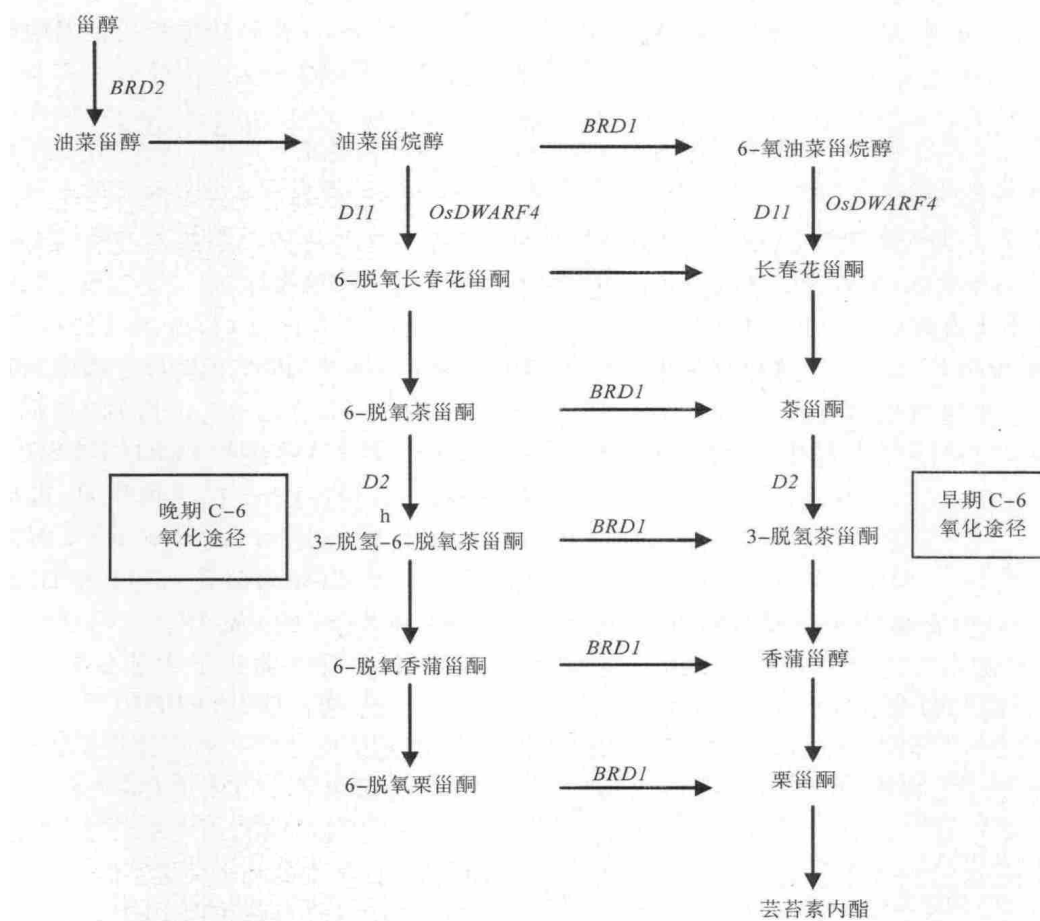


图 1 BR 合成代谢途径和水稻相关基因

近年来,随着研究的深入,BR 的合成过程不断得到补充。研究发现,晚期 C-6 氧化途径的中间产物可经 C-6 氧化转入早期 C-6 氧化途径;最初认为从油菜甾醇到油菜甾醇只需 1 步反应,现在发现需要 4 步反应;从油菜甾醇到 6-脱氧长春花甾酮存在早期 C-22 氧化分支途径;从油菜甾醇到 3-脱氢-6-脱氧茶甾酮和 6-脱氧香蒲甾醇存在绕过油菜甾醇、6-脱氧长春花甾酮和 6-脱氧茶甾酮的捷径等<sup>[6-7]</sup>。越来越多的研究显示,BR 的合成过程高度网络化。

最初 BR 代谢途径和相关基因功能的研究主要集中在拟南芥和长春花等少数双子叶植物上,近年来,随着水稻基因组学的快速发展和一系列水稻 BR 合成缺陷突变体的发现,部分水稻 BR 合成相关基因相继被克隆。水稻 *BRD1* 基因编码 BR-6 氧化酶,该酶将代谢产物从晚期 C-6 氧化途径转入早期 C-6 氧化途径(图 1)。brd1 突变体严重矮化,叶片

弯曲变形,穗和谷粒显著变小,并呈暗形态建成缺陷<sup>[8-9]</sup>。*D2* 基因催化 6-脱氧茶甾酮转化为 3-脱氢-6-脱氧茶甾酮以及茶甾酮转化为 3-脱氢茶甾酮。水稻 *d2* 突变体的株高只有正常野生型株高的 70%~80%,叶片直立,穗颈长,粒小,呈现暗形态建成缺陷<sup>[10]</sup>。*BRD2* 基因参与 BR 合成前体油菜甾醇的合成。水稻 *brd2* 突变体表现出叶片直立、叶鞘短、穗颈较野生型长、粒小等典型油菜素内酯缺陷表型,但 *brd2* 突变表型比 *brd1* 轻,研究表明,*brd2* 突变体内积累了不同栗甾酮的 BR 活性物质 dolichosterone<sup>[11]</sup>。*D11* 和 *OsDWARF4* 基因是 1 对冗余基因,作用于 C-22 的羟基化。*d11* 突变体呈现矮化、叶片直立、穗颈长、粒小、第 2 节间特异性缩短、暗形态建成缺陷等表型。*osddwarf4* 突变体除了叶直立、比野生型植株稍矮以外,无其他明显突变表型,而 *d11/osdwarf4* 双突变体的表型和 *brd1* 相似<sup>[12-13]</sup>。

目前发现的水稻 BR 合成代谢相关基因在拟南芥中均能找到同源基因,暗示着水稻和拟南芥在 BR 生物合成途径中存在着相似性,但在水稻中未检测到芸苔素内酯<sup>[11]</sup>,所以水稻 BR 的生物合成途径又不完全等同于拟南芥 BR 的生物合成途径。目前建立的 BR 生物合成代谢模型是以双子叶植物为研究对象建立的,这条代谢途径是否完全适用于水稻,还需要对一些生化反应进行确认,同时还需克隆更多参与 BR 生物合成的基因。

虽然已鉴定的水稻 BR 合成缺陷型突变体在表型上存在差异,但大部分突变体具有矮化、叶片直立、暗形态建成缺陷、穗颈长、第2节间特异性缩短和粒小等表型,根据这些性状基本可以区分 BR 缺陷型突变体和其他代谢缺失突变体,同时 BR 合成缺陷引起的部分性状,如矮化和叶片直立,可以应用于水稻育种。

## 2 BR 的降解途径

BR 是植物生长发育中的重要调节物质,因此维持体内 BR 的平衡非常重要。相对于合成代谢,对于植物体内 BR 降解和失活过程的研究要缓慢得多。Hai 等<sup>[14]</sup>利用番茄细胞悬浮培养体系研究 BR 的代谢去向,发现表油菜素内酯(24-epi-brassinolide)在细胞中首先在 C-25 和 C-26 位置被羟基化,随后新形成的羟基被糖苷化。近年来,通过突变体研究,在拟南芥中发现了 2 个参与油菜素内酯降解的基因,有趣的是,与大部分 BR 合成基因一样,2 个基因的编码蛋白也属于细胞色素 P450 家族。

拟南芥 *BASI* 基因编码 CYP734A1 蛋白,该蛋白将甾酮和芸苔素内酯的 C-26 羟基化,从而导致这些 BR 失活。过表达 *BASI* 基因突变体 *bas1-d* 与报道的拟南芥 BR 合成缺陷突变体表型相似,通过外施 BR 可将突变体表型恢复为野生型<sup>[15-16]</sup>。

*ch12-d*、*shk1-d* 和 *sob7-d* 均为拟南芥 *CYP72C1* 基因过表达突变体,这些突变体都表现出 BR 缺陷表型<sup>[17-19]</sup>。*CYP72C1* 蛋白和 *CYP734A1* 蛋白之间有 37% 的氨基酸是一致的,但是研究显示两者的生化功能并不一样。研究表明,*CYP72C1* 蛋白的作用底物是 BR 的合成前体,但是其具体的生化功能目前还不清楚<sup>[20]</sup>。

突变体是研究 BR 代谢途径的重要材料,2 个 BR 降解基因的发现均与相关突变体的发现有关。与 BR 合成基因相反,BR 降解基因在过表达的情况下出现 BR 缺陷型表型,过表达产生突变体为显性

突变体,而显性突变体获得比较困难,客观上造成了 BR 降解途径研究进展缓慢。

## 3 BR 信号转导途径和水稻相关基因

通过对拟南芥信号转导相关基因的研究,科学家提出了一个简单的 BR 信号转导模型。*BRI1* 蛋白是一个富含亮氨酸重复序列的跨膜受体激酶,研究表明其为 BR 的受体蛋白,BR 在细胞表面与受体 *BRI1* 结合,诱导 *BRI1* 和激酶抑制蛋白 *BKI1* 解离,同时介导 *BRI1* 与另一个跨膜受体激酶 *BAK1* 结合,*BRI1* 和 *BAK1* 蛋白相互磷酸化,信号放大,诱导一系列生理生化反应,介导 BR 信号的转导。*BIN2* 和 *BSU1* 是 BR 信号转导过程中的重要组分,当 BR 和 *BRI1* 蛋白结合时激活 *BSU1* 同时使 *BIN2* 失活,从而导致下游蛋白 *BZR1* 和 *BES1* 去磷酸化而激活,*BZR1* 和 *BES1* 在核内积累,直接调控 BR 调节相关基因的表达;当 BR 和 *BRI1* 解离时,*BIN2* 被激活,进而 *BIN2* 磷酸化 *BZR1* 和 *BES1*,从而导致 *BZR1* 和 *BES1* 的失活<sup>[21]</sup>。

近年来,水稻中报道了大量参与 BR 信号转导的基因,包括:*D61/OsBRI1*<sup>[22]</sup>、*OsMDPI*<sup>[23]</sup>、*DI*<sup>[24]</sup>、*OsBZR1*、*14-3-3*<sup>[25]</sup>、*OsLIC*<sup>[26]</sup>、*OsBAK1*<sup>[27]</sup>、*BUI*<sup>[28]</sup>、*DLT/D62*<sup>[29]</sup>、*OsGSR1*<sup>[30]</sup>、*IL11*、*IBH1*<sup>[31]</sup> 和 *RAVL1*<sup>[3]</sup> 等,下面仅简单介绍一下 BR 信号传导中的几个关键基因。

*D61* 编码 BR 受体蛋白 *BRI1*,水稻 *d61* 突变体表现为叶片直立、第2节间不伸长、叶鞘短、长穗颈和暗形态形成缺陷等典型 BR 缺陷型表型,外施 BR 试验显示 *d61* 突变体对 BR 不敏感<sup>[22,32]</sup>。

*BZR1* 蛋白为转录因子,调控一系列 BR 响应基因的表达。RNA 干涉抑制 *OsBZR1* 的表达导致水稻植株矮小、叶片直立、对 BR 的敏感性降低,同时 RNA 干涉植株中 BR 合成相关基因的表达水平发生明显变化。酵母双杂交发现 *14-3-3* 蛋白和 *OsBZR1* 蛋白发生相互作用,*14-3-3* 和 *OsBZR1* 结合,使后者滞留在细胞质中,无法进入核内调控 BR 响应基因<sup>[25]</sup>。

*BAK1* 蛋白与 *BRI1* 相互作用,是 BR 信号转导中的一个正调控因子。抑制水稻 *OsBAK1* 基因的表达,对水稻的株高和育性影响不大,但 RNA 干涉植株叶片直立,对 BR 敏感性降低<sup>[27]</sup>。

虽然目前已经克隆了大量水稻 BR 信号转导相关基因,但是仍有许多问题需要解决。例如,这些基因之间的上下游关系如何,怎样把这些基因整合成一个完整的信号传导途径,哪些下游基因的表达和

抑制最终导致特异表型的出现,水稻与拟南芥 BR 信号转导途径有哪些异同等。

#### 4 BR 代谢在提高水稻产量上的应用

BR 可以促进生长、改变株型、增加生物量、提高植物的抗逆性,实践证明,喷施 BR 可以提高多种作物的产量,但是 BR 使用易受天气、使用时机及方法的影响,效果不稳定<sup>[33]</sup>。而利用分子操作改变 BR 合成或信号转导中关键基因的表达模式,不仅可以精细调控 BR 在体内的分布和响应水平,从而达到甚至超过体外喷施的效果,而且还能大大提高劳动效率,节约生产成本。不仅如此,通过分子手段还可以在特定部位降低 BR 的含量和响应水平,从而最大限度地发挥 BR 在产量上的贡献。

Morinaka 等<sup>[32]</sup>通过转基因技术在水稻特定部位抑制 *OsBR11* 基因的表达,获得了叶片直立、粒质量未受影响的转基因水稻,预计这些转基因水稻在密植条件下相同面积能增产 30%。Wu 等<sup>[33]</sup>利用特异性启动子使拟南芥、玉米和水稻(*OsDWARF4*)的 C-22 羟化酶基因在水稻根、茎、叶中超表达,获得的转基因水稻穗大、粒重,无论在温室还是田间种植情况下,就单株水平比较,转基因植株可以增产 15%~40%。水稻 *Osdwarf4* 突变体除了叶直立,比野生型植株稍矮以外,其他表型均正常,Sakamoto 等<sup>[12]</sup>比较了 *Osdwarf4* 突变体和野生型植株在密植条件下的地上部分生物量和产量,结果发现,突变体在不同施肥条件下生物量和产量均有明显增加。

#### 5 展望

目前,克隆出来的水稻 BR 相关基因非常多,特别是 BR 信号转导以及生物合成基因,但是这些基因是如何通过相互作用调控水稻体内 BR 含量的,需要更进一步地研究。鉴于 BR 在促进生长、调控株型、增加产量、提高抗逆性中的重要作用,随着对 BR 代谢途径和作用方式的深入研究,并在此基础上实现对 BR 代谢的精细调控,完全有可能带来一场新的绿色革命。

#### 参考文献:

[1] Bajguz A. Suppression of *chlorella vulgaris* growth by cadmium, lead, and copper stress and its restoration by endogenous brassinolide[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011, 60(3): 406-416.

[2] Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress responses [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2003, 22(4):

289-297.

[3] Je B I, Piao H L, Park S J, *et al.* *RAV-Like1* maintains brassinosteroid homeostasis via the coordinated activation of *BR11* and biosynthetic genes in rice[J]. *The Plant Cell Online*, 2010, 22(6): 1777-1791.

[4] Noguchi T, Fujioka S, Choe S, *et al.* Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(1): 201-210.

[5] Kim T W, Hwang J Y, Kim Y S, *et al.* *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome p450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis[J]. *The Plant Cell Online*, 2005, 17(8): 2397-2412.

[6] Fujioka S, Yokota T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54(1): 137-164.

[7] Ohnishi T, Szatmari A M, Watanabe B, *et al.* C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis [J]. *The Plant Cell Online*, 2006, 18(11): 3275-3288.

[8] Hong Z, Ueguchi T M, Shimizu S S, *et al.* Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, C-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem[J]. *The Plant Journal*, 2002, 32(4): 495-508.

[9] Mori M, Nomura T, Ooka H, *et al.* Isolation and characterization of a rice dwarf mutant with a defect in brassinosteroid biosynthesis [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(3): 1152-1161.

[10] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, *et al.* A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf* (d2), is caused by a loss of function of a new member of cytochrome p450[J]. *The Plant Cell Online*, 2003, 15(12): 2900-2910.

[11] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Fujioka S, *et al.* The rice brassinosteroid-deficient dwarf2 mutant, defective in the rice homolog of *Arabidopsis* DIMINUTO/DWARF1, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive brassinosteroid, dolichosterone[J]. *The Plant Cell Online*, 2005, 17(8): 2243-2254.

[12] Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, *et al.* Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 24(1): 105-109.

[13] Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, *et al.* A novel cytochrome p450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length[J]. *The Plant Cell*

- Online, 2005, 17(3): 776-790.
- [14] Hai T, Schneider B, Adam G. Metabolic conversion of 24-epi-brassinolide into pentahydroxylated brassinosteroid glucosides in tomato cell cultures[J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(2): 443-448.
- [15] Neff M M, Nguyen S M, Malanchruvil E J, *et al.* *BASI*: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(26): 15316-15323.
- [16] Turk E M, Fujioka S, Seto H, *et al.* *CYP72B1* inactivates brassinosteroid hormones; An intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(4): 1643-1653.
- [17] Nakamura M, Satoh T, Tanaka S I, *et al.* Activation of the cytochrome p450 gene, *CYP72C1*, reduces the levels of active brassinosteroids *in vivo* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(413): 833-840.
- [18] Takahashi N, Nakazawa M, Shibata K, *et al.* *shkl-D*, a dwarf *Arabidopsis* mutant caused by activation of the *CYP72C1* gene, has altered brassinosteroid levels [J]. *The Plant Journal*, 2005, 42(1): 13-22.
- [19] Turk E M, Fujioka S, Seto H, *et al.* *BASI* and *SOB7* act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms [J]. *The Plant Journal*, 2005, 42(1): 23-34.
- [20] Thornton L E, Rupasinghe S G, Peng H, *et al.* *Arabidopsis CYP72C1* is an atypical cytochrome p450 that inactivates brassinosteroids [J]. *Plant Molecular Biology*, 2010, 74(1): 167-181.
- [21] Divi U K, Krishna P. Brassinosteroid: A biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance [J]. *New Biotechnology*, 2009, 26(3): 131-136.
- [22] Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, *et al.* Loss of function of a rice brassinosteroid insensitive homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint [J]. *The Plant Cell Online*, 2000, 12(9): 1591-1605.
- [23] Duan K, Li L, Hu P, *et al.* A brassinolide-suppressed rice MADS-box transcription factor, *OsMDPI*, has a negative regulatory role in BR signaling [J]. *The Plant Journal*, 2006, 47(4): 519-531.
- [24] Wang L, Xu Y Y, Ma Q B, *et al.* Heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunit is involved in rice brassinosteroid response [J]. *Cell Research*, 2006, 16(12): 916-922.
- [25] Bai M Y, Zhang L Y, Gampala S S, *et al.* Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(34): 13839-13844.
- [26] Wang L, Xu Y, Zhang C, *et al.* OsLIC, a novel CCCH-type zinc finger protein with transcription activation, mediates rice architecture via brassinosteroids signaling [J]. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3521.
- [27] Li D, Wang L, Wang M, *et al.* Engineering *OsBAK1* gene as a molecular tool to improve rice architecture for high yield [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(8): 791-806.
- [28] Tanaka A, Nakagawa H, Tomita C, *et al.* *BRASSINOSTEROID UPREGULATED1*, encoding a helix-loop-helix protein, is a novel gene involved in brassinosteroid signaling and controls bending of the lamina joint in rice [J]. *Plant Physiology*, 2009, 151(2): 669-680.
- [29] Tong H, Jin Y, Liu W, *et al.* DWARF AND LOW-TILLERING, a new member of the GRAS family, plays positive roles in brassinosteroid signaling in rice [J]. *The Plant Journal*, 2009, 58(5): 803-816.
- [30] Wang L, Wang Z, Xu Y, *et al.* *OsGSR1* is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice [J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(3): 498-510.
- [31] Zhang L Y, Bai M Y, Wu J, *et al.* Antagonistic HLH/bHLH transcription factors mediate brassinosteroid regulation of cell elongation and plant development in rice and *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell Online*, 2009, 21(12): 3767-3780.
- [32] Morinaka Y, Sakamoto T, Inukai Y, *et al.* Morphological alteration caused by brassinosteroid insensitivity increases the biomass and grain production of rice [J]. *Plant Physiology*, 2006, 141(3): 924-931.
- [33] Wu C, Trieu A, Radhakrishnan P, *et al.* Brassinosteroids regulate grain filling in rice [J]. *The Plant Cell Online*, 2008, 20(8): 2130-2145.