

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00655

拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因影响茎秆次生细胞壁增厚的分子机理

王增光^{1,2}, 柴国华², 王芝瑶^{1,2}, 唐贤丰², 孙长江³, 周功克², 马三梅¹

1. 暨南大学生命科学技术学院生物工程学系, 广州 510632;
2. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛 266103;
3. 北京旭阳化工技术研究院有限公司, 北京 100070

摘要: 赤霉素不仅对植物的种子萌发、叶片伸展和开花结果有重要的影响, 而且在茎秆的发育过程中扮演关键的角色。它的生物合成受到多种酶的调控, 其中赤霉素 3-氧化酶(GA3OX)是关键的限速酶, 备受重视。拟南芥 *AtGA3OX* 基因由 4 个成员组成, 其中 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因在茎中超量表达, 可能与茎的发育有关。目前, 尚未见到 *AtGA3OX1*、*AtGA3OX2* 基因调控次生细胞壁增厚的报道。文章以拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因双突变体 *atga3ox1atga3ox2* 为材料, 系统研究了 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因对次生细胞壁的影响。结果表明: 同时突变 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因不仅显著抑制了茎秆次生细胞壁纤维细胞的增厚(对导管细胞没有影响), 而且也明显降低了次生细胞壁 3 个组分(纤维素、半纤维素和木质素)的含量。利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 进一步分析次生细胞壁 3 个组分生物合成基因及相关的转录因子的表达情况, 结果显示这些基因在双突变体中均受到显著影响, 表明拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因可能是通过调控这些转录因子进而调控了次生细胞壁的加厚。研究结果为基因工程调控拟南芥 *AtGA3OX1*、*AtGA3OX2* 基因(或其他物种同源基因), 进而增强粮食作物抗倒伏性和提高能源植物纤维生物质量提供了理论依据。

关键词: *AtGA3OX*; 拟南芥; 次生细胞壁; 转录因子

Molecular mechanism of *AtGA3OX1* and *AtGA3OX2* genes affecting secondary wall thickening in stems in *Arabidopsis*

WANG Zeng-Guang^{1,2}, CHAI Guo-Hua², WANG Zhi-Yao^{1,2}, TANG Xian-Feng², SUN Chang-Jiang³, ZHOU Gong-Ke², MA San-Mei¹

1. Department of Biotechnology, School of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Qingdao Institute Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266103, China;
3. Beijing Risun Chemical Industry Technology Research Institute Co. Ltd, Beijing 100070, China

Abstract: Bioactive gibberellins (GAs) are a type of important plant growth regulators, which play the key roles in mul-

收稿日期: 2012-11-25; 修回日期: 2013-01-21

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目(编号: KSCX2-EW-J-10)和中科院“百人计划”项目(编号: 428)资助

作者简介: 王增光, 硕士研究生, 专业方向: 发育细胞生物学。Tel: 18659975902; E-mail: wzglucky@163.com

通讯作者: 马三梅, 博士, 副教授, 研究方向: 植物生殖生物学。E-mail: msmwdw@163.com

网络出版时间: 2013-2-19 14:31:59

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130219.1431.001.html>

multiple processes, such as seed germination, leaf expansion, flowering, fruit bearing, and stem development. Its biosynthesis is regulated by a variety of enzymes including gibberellin 3-oxidase that is a key rate-limiting enzyme. In *Arabidopsis*, gibberellin 3-oxidase consists of four members, of which *AtGA3OX1* and *AtGA3OX2* are highly expressed in stems, suggesting the potential roles in the stem development played by the two genes. To date, there are few studies on *AtGA3OX1* and *AtGA3OX2* regulating secondary wall thickening in stems. In this study, we used the *atga3ox1atga3ox2* double mutant as the materials to study the effects of *AtGA3OX1* and *AtGA3OX2* genes on secondary wall thickening in stems. The results indicated that simulations repression of *AtGA3OX1* and *AtGA3OX2* genes resulted in significantly reduction of secondary wall thickening of fiber cells, but not that of vessel cells. Three main components (cellulose, hemicelluloses, and lignin) were also dramatically suppressed in the double mutants. qRT-PCR analysis demonstrated that the expressions of secondary wall biosynthetic genes and the associated transcription factors were obviously affected in *AtGA3OX1* and *AtGA3OX2* double mutant. Therefore, we presume that *Arabidopsis AtGA3OX1* and *AtGA3OX2* genes might activate the expression of these transcription factors, thus regulate secondary wall thickening in stems. Together, our results provide a theoretical basis for enhancing the lodging resistance of food crops and improving the biomass of energy plants by genetically engineering *Arabidopsis AtGA3OX* homologs.

Keywords: *AtGA3OX*; *Arabidopsis*; secondary wall; transcription factor

植物茎秆包括了大量的次生细胞壁, 不仅是植物茎秆赖以支撑的基础, 而且也是纤维生物的主要成分, 被广泛应用于造纸、建筑行业等。因而, 研究植物次生细胞壁增厚(包括纤维素、半纤维素和木质素的生物合成和沉积)的分子机理能够为提高纤维物质产量、增加农作物抗倒伏性提供理论依据。植物次生细胞壁的合成受到一个复杂的多级网络的调控, 目前研究表明, 主要是 NAC、MYB 这两类转录因子在次生细胞壁生物合成过程中起关键调控作用。其中, 5 个 NAC 转录因子 NST1、NST2、SND1、VND6 和 VND7^[1] 处在这个调控网络的最上游, 能够级联调控下游转录因子从而激活次生细胞壁的生物合成^[2,3]。MYB46 和 MYB83 是 SND1 的直接靶, 能够进一步激活下游转录因子促进次生细胞壁的生物合成^[4,5], 可见这几个转录因子在次生细胞壁中处于中心枢纽的位置。而且, 一些 NAC、MYB 转录因子对细胞壁三组分的影响存在特异性。例如: MYB58、MYB63、MYB85 只调控木质素的合成^[3,6]。

赤霉素(Gibberellin, GA)不仅影响植物的种子萌发、叶片伸展、开花结果, 而且在茎秆的伸长发育过程中起关键作用。在植物体内, GA 主要是通过调控 GA 合成代谢的关键酶来参与植物生长发育^[7,8]。其中, GA20-氧化酶(GA20OX)和 GA3-氧化酶(GA3OX)是形成活性 GA 的限速酶, 而 GA2-氧化

酶(GA2OX)是 GA 水解活性 GA 的关键酶^[9]。在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, *AtGA20OX* 基因由 5 个成员组成, 其中, *AtGA20OX1* 和 *AtGA20OX2* 基因对茎秆的发育和节间的生长有影响^[10]。*AtGA2OX* 基因有 8 个成员, 只有 *AtGA2OX1* 和 *AtGA2OX2* 与茎秆的发育相关, 过表达这两个基因均会降低植株节间的长度和茎秆的高度^[11]。拟南芥 *AtGA3OX* 基因包括 4 个成员, 其中只有 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 在茎秆中表达, 可能参与调控茎秆的发育, 过量表达 *AtGA3OX1* 基因促进了 GA 的合成, 从而影响植株的茎高。相比而言, *AtGA3OX3* 和 *AtGA3OX4* 主要在花和果荚中表达, 推测其可能参与了生殖期活性 GA 的合成^[12~14]。

GA 合成调控基因在其它植物中也被广泛研究。在豌豆(*Pisum sativum*)中, 突变 GA 合成酶基因 *LS*、*LH*、*NA*、*PSGA2ox1* 或 *PsGA3ox1*, 表现出 GA 缺陷的矮秆表型。突变调控 GA 分解的 GA2-氧化酶的 2 个基因 *PsGA2ox1* 和 *PsGA2ox2* 则株高显著增高。有意思的是, 温度能够调控 *PsGA2ox2* 的表达, 提高 GA2-氧化酶的水平, 降低 GA1 的水平, 进而影响植株茎秆的伸长^[15]。在水稻中, 编码 GA20-氧化酶的 *Sd1* 基因也是通过调节 GA 的生物合成而影响株高的^[16]。

最近研究表明, 拟南芥 *AtGA20OX* 基因能够影

响植株茎秆木质部的发生及木质纤维的伸长^[17], 然而, 未见到 GA 合成的另外一个酶 *AtGA3OX* 调控茎秆次生细胞壁增厚的报道。本文以拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因的双突变体 *atga3ox1atga3ox2* 为材料, 详细分析了 *AtGA3OX1*、*AtGA3OX2* 基因对次生细胞壁 3 个组分(纤维素、半纤维素、木质素)合成的影响, 初步探讨 *AtGA3OX1*、*AtGA3OX2* 基因调控次生细胞壁增厚的分子机理, 为利用基因工程改造植物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

拟南芥赤霉素 *AtGA3OX* 基因双突变体 *atga3-ox1atga3ox2* (CS6944) 订购于美国 ABRC(Arabidopsis Biology Resource Center <https://abrc.osu.edu/donate-stocks>)。拟南芥野生型 COL-0 和 *atga3ox1atga3ox2* 突变体种植于温室(温度: 22 °C; 湿度 55%)。

1.2 方法

1.2.1 序列鉴定及进化分析

以拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 蛋白序列为诱饵, 在杨树(*Populus trichocarpa*)、水稻(*Oryza sativa*)和甜高粱(*Sorghum bicolor*)的蛋白数据库(www.phytozome.net)中搜索它们的同源蛋白, 共得到 8 个同源蛋白(Potri.001G176600.1、Potri.003G057400.1、Potri.006G247700.1、Potri.018G033600.1、LOC_Os05g08540.1、LOC_Os01g08220.1、Sb09g005400.1、Sb03g004020.1)。利用在线程序 *bl2seq* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)对这 10 个 *GA3OX* 蛋白的序列进行比较。利用 *ClustalX*(8.3)软件对 10 个 *GA3OX* 蛋白的全序列进行聚类后, 使用 *MEGA5.0* 软件 (<http://www.megasoftware.net/index.php>) 中的 Neighbor-Joining 方法进行进化分析。为了增加聚类的准确性, Bootstrap 值设置为 1 000。

1.2.2 总 RNA 提取和 cDNA 的合成

利用 *Trizol*(Invitrogen 公司)提取拟南芥主茎样品的总 RNA, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的完整性。DNaseI(Fermentas 公司)进行消化后, 使用 *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit*(Fermentas 公司)反转录合成 cDNA 第一链。

1.2.3 半定量 PCR(RT-PCR)及实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

使用 *Beacon Designer v7.0* (Premier Biosoft International 公司)软件设计引物, 复性温度设置 58 ~ 60 °C, 引物序列长度设置 20 ~ 25 bp, 扩增序列长度设置 150 ~ 200 bp。引物序列如表 1 所示。

半定量 PCR: 以 7 周野生型和 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体的总 RNA 反转录合成的 cDNA 第一链为模板, 基于内参基因 *ACTIN2* 浓度, 确定目的基因的表达式。反应体系: 2**Taq* PCR Master Mix(天根公司)10 μ L, cDNA 模板 1 μ L, 正向及反向引物各 1 μ L, 补加超纯水至终体积 20 μ L。PCR 反应在 *Thermal Cycle PTC-1000*(BioRad 公司)上进行。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 25 个循环(扩增 *ACTIN2* 基因)/35 个循环(扩增目的基因); 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

实时荧光定量 PCR: 按照 *SYBR® Premix Ex Taq™ II* (Perfect Real Time)(TaKaRa 公司)试剂盒配制如下反应体系: 2**SYBR® Premix Ex Taq™ II* 混合液 10 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 正向及反向引物各 0.4 μ L, 补加超纯水至终体积 20 μ L。PCR 反应在 *Light Cycler® 480* 实时荧光定量 PCR 系统(Roche 公司)上进行。反应条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 58 °C 复性 20 s, 72 °C 延伸 10 s, 45 个循环(产物扩增); 65 °C, 2 min, 以 0.1 °C/s 的速率升温至 95 °C, 测定溶解曲线。基线与循环阈值(Ct 值)使用 *LightCycler® 480* 软件自动生成。利用 Kenneth 和 Thomas 报道的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[18], 计算相对表达量和标准误 S.E.。拟南芥 *ACTIN2* 基因用作内参。设置 3 次技术重复, 3 次生物学重复。

1.2.4 拟南芥茎横切面的石蜡切片分析

以拟南芥基部茎为材料, 利用石蜡切片观察野生型及突变体茎次生细胞壁的发育情况。具体步骤为: (1) 材料的选取及固定: 利用锋利刀片取第 8 周拟南芥茎基部 0.5 cm 长小段为材料, 置于 4% 多聚甲醛固定液中真空抽气(0.7 MPa)2 h, 直到材料沉于管底, 4 °C 过夜。(2) 脱水: 1 倍 PBS 清洗一次后, 依次利用 10%、30%、50%、70%、85%、95%、100% 乙醇对其脱水, 每步 1 h。(3) 透明: 利用无水乙

表 1 半定量 PCR 及实时荧光定量 PCR 引物

基因	ID 号	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
<i>ACTIN2</i>	AT3G18780	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC
<i>AtGA3ox1</i>	At1g15550	CCATTCACCTCCCACACTCT	GCCAGTGATGGTGAAACCTT
<i>AtGA3ox2</i>	At1g80340	TGGTCCGAAGGTTTCAC	GGGTGCGAGTCTGTATGG
<i>CesA1</i>	At4g32410	GGTATTTATTGCGGCAACCT	ATCCAACCAATCTCTTTGCC
<i>CesA3</i>	At5g05170	ACAGCCAACACAGTGCTCTC	TGGTACCCATTTACGAGCAA
<i>CesA4</i>	At5g44030	GGATCAGCTCCGATCAATTT	ACCACAAAGGACAATGACGA
<i>CesA7</i>	At5g17420	CAGGCGTACTCACAAATGCT	TGTCAATGCCATCAAACCTT
<i>CesA8</i>	At4g18780	ACGGAGAGTTCTTTGTGGCT	GGTCTGTGTTGGAACAATGG
<i>IRX8</i>	At5g54690	GTGGTCACAGGGAAAGGATT	AGCAAGAGAGGAGCAAGGAG
<i>IRX9</i>	At2g37090	TTTGC GGACTAAACAACAT	ATCGGAGGCTTTGTCTCTGT
<i>FRA8</i>	At2g28110	GACTTGTTGAATCGGTGGCTC	GAAAGAGTTTGACCTTCTAAC
<i>4CL1</i>	At1g51680	TCAACCCGGTGAGATTTGTA	TCGTCATCGATCAATCCAAT
<i>CCOMT 1</i>	At4g34050	CTCAGGGAAGTGACAGCAAA	GTGGCGAGAAGAGAGTAGCC
<i>IRX4</i>	AT1G15950	CGTTATCTCCTAGCCGAGAGTGCTC	TGCCATTTTCCACGATTCTTGCGATGC
<i>SND1</i>	AT1G32770	CAAGCTTGAGCCTTGGGATA	TGGTCCC GGTTGGATACTT
<i>NST1</i>	AT2G46770	TCATCCGACCGAGGAAGAGC	GAAGCTCCTCCGACGGGACT
<i>SND3</i>	AT1G28470	GCGCTGAAACTCCCATCACGACT	ACTCCTGCCGGTAAGCTTGGT
<i>VND6</i>	AT5G62380	GCCATGGGACATCCAAGA	TGTGGCTAAAGAAATACCATTCC
<i>VND7</i>	AT1G71930	GGACGAATAAAGATCAGAACGA	ATGCGGATGTATGACTTGTGTC
<i>MYB20</i>	AT1G66230	AGGTGGTTGCAAGGCTTACCCA	TGTCACAGCATGGTTGTCTCCCCA
<i>MYB42</i>	AT4G12350	GAACAACACTGCTGCCGAGGA	ACCCGTCTTCATGGAGCTTTGACC
<i>MYB43</i>	AT5G16600	TTGACCTCAAGTGGCTTTCATCCGA	AGCTGCTCAAATCATTGATGTCCCA
<i>MYB46</i>	AT5G12870	GAATGTGAAGAAGGTGATTGGTACA	CGAAGGAACCTCAGTGTTTCATCA
<i>MYB52</i>	AT1G17950	TCCCGGTGCAACTGATAACGCTGT	CATGGCCAAGGCCTCGTGGA
<i>MYB54</i>	AT1G73410	GGAGTTTTTCACCGGAAAGATCGCT	TGGTGTCCGAGTCACTGCGT
<i>MYB58</i>	AT1G16490	CCAGAGAACAGAGCTCTTCAAGAG	ATGTATGAGGAGCTCGTAACTCTC
<i>MYB63</i>	AT1G79180	GAACGACTCAGGCTCAAGAGCAAC	ATGTATCATGAGCTCGTAGTTCTT
<i>MYB69</i>	AT4G33450	CATGGCTAGACGCAAACGGGAA	AGTAAGGCCAGAGACCGCAACT
<i>MYB83</i>	AT3G08500	AACGTGGATCCTTCTCTCCTC	AGCCGAGTAGCTATTTGAGACC
<i>MYB85</i>	AT4G22680	TCGATCCTATGACCCATCAACCCCT	TGTTGTCTGACACTTATCTCCACG
<i>XCP1</i>	AT4G35350	TTGACCCATGAAGAGTTCAAAGGAAGA	GAAAGCGAACTCAGATTCCTGTGG
<i>XCP2</i>	AT1G20850	TTGCGAGATGCAAAAGGAT	GCCAATGCCTTCAAGAGACT
<i>XND1</i>	AT5G64530	ACCCTGATGTCATCCCCGACCTT	TGGCTCGTCCATTCCCATGTATCCC
<i>LBD30</i>	AT4G00220	CTATCTACGGCTGCGTCTCTCACATCGT	TAGAGATCCTGAAGATGACACCGGAAC

醇(A)和二甲苯(B)按照 A/B=3/1, A/B=1/1, A/B=1/3, B, B 的比例透明,每步 1 h。(4)浸蜡及包埋:利用二甲苯(B)和石蜡(C)按照 B/C=3/1, B/C=1/1, B/C=1/3, C, C, C 的比例浸蜡,每步 3 h, 62 °C 烘箱中进行。(5)切片、展片及烘片:利用 LeicaRM2235 切片机(Leica 公司)将材料切成 8 μm 的薄片,置于 42 °C 水浴锅中展片 1~2 min,使之吸附于世泰 REF188105 粘附载玻片(世泰公司)上,37 °C 烘片 2 d。(6)脱蜡、二甲苯及染色:将附着有材料的载玻片置于二甲苯中脱蜡 5

min 后,经 A(无水乙醇)/B(二甲苯)=1/1, A, A, 95 % A, 85 % A, 75 % A, 50 % A, 30 % A 梯度脱于水中,每步 30 s。最后在 0.5 % TBO 染液中染色 15 s。(7)脱水及封片:将清水洗过的玻片依次在 30 % A, 50 % A, 75 % A, 85 % A, 95 % A, A, A, B, B 中脱水至二甲苯中,每步 30 s,随后利用加拿大树胶将其封存。(8)切片的观察:利用 OLYMPUS DX51 光学显微镜(Olympus 公司)进行观察,拍照。利用 OLYMPUS DP2-BSW 软件分别统计木质纤维、束间纤维、导管

的细胞壁厚度, 对于每种器官, 至少统计 100 个细胞。利用 SAS 软件(SAS Institute Inc., USA)对细胞壁的厚度进行显著性分析。

1.2.5 拟南芥茎横切面的免疫组化分析

以 1.2.3 中提到的脱完蜡的切片为材料, 分别利用 Calcoflor White(Sigma 公司)、多糖单克隆抗体 LM10 和 HCl-间苯三酚检测次生细胞壁 3 个组分(纤维素、半纤维素和木质素)在野生型和突变体茎中的分布情况。

检测木质素: 先将脱完蜡的切片梯度脱于水中, 然后在切片上加入数滴 HCl-间苯三酚, 显色 3 min 后立刻照相。

检测半纤维素: (1)向脱完蜡的切片上加入 10 μ L 3% MP/PBS 封闭 1.5 h; (2)吸去 MP/PBS, PBS 洗 5 min, 2 次, 加入 10 μ L 含有单克隆抗体 LM10 的 MP/PBS, 室温孵育 1.5 h; (3)吸去 MP/PBS, PBS 洗 5 min, 3 次, 加入 10 μ L 含有 anti-rat 抗体的 MP/PBS (1:100), 室温孵育 1.5 h; (4)吸去 MP/PBS, PBS 洗 5 min, 3 次, 加入 10 μ L 含有 FITC 偶联的二抗的 MP/PBS, 室温孵育 1.5 h; (5)吸去 MP/PBS, PBS 洗 5 min, 3 次。

检测纤维素: (1)向脱完蜡的切片上加入 10 μ L 3% MP/PBS 封闭 1.5 h; (2)吸去 MP/PBS, PBS 洗 5 min, 2 次, 加入 10 μ L 含有单克隆抗体 LM10 的 MP/PBS, 室温孵育 1.5 h; (3)吸去 MP/PBS, PBS 洗 5 min, 3 次, 加入 10 μ L 含有 anti-rat 抗体的 MP/PBS(1:100), 室温孵育 1.5 h; (4)吸去 MP/PBS, PBS 洗 5 min, 3 次, 加入 10 μ L 含有 FITC 偶联的二抗的 MP/PBS, 室温孵育 1.5 h; (5)吸去 MP/PBS, PBS 洗 5 min, 3 次, Calcoflor White 染色: 滴加 0.25 μ g/mL Calcoflor White 染色 5 min; (6)吸去 Calcoflor White, PBS 洗 5 min, 3 次。

使用荧光显微镜 OLYMPUS DX51(Olympus 公司)观察显色后的切片确定纤维素、半纤维素的分布。所有图像均使用 Adobe Photoshop 7.0 处理。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因在茎中的时间表达模式

有文献报道, 拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因在茎中强烈表达^[19], 本文利用实时荧光定量 PCR 进一步检测这两个基因在茎中不同发育阶段的表达情况。结果表明: *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因有相似的表达模式, 均在播种后第 6 和 7 周超量表达, 这个时期正值次生细胞壁急剧增厚。这些结果预示着拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因可能均参与茎秆次生细胞壁的发育, 而且功能冗余。

2.2 拟南芥 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体出现矮化早衰的表型

为了消除 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因在茎发育调控中的功能冗余, 本文以 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因的双突变体 *atga3ox1atga3ox2* 为材料, 分析同时抑制这两个基因对茎秆发育的影响。RT-PCR 检测表明: 在这个双突变体中, *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因的表达均受到抑制(图 2A)。进一步观察表型发现: *atga3ox1atga3ox2* 植株相对于野生型表现出植株矮小, 叶片早衰, 果荚开裂等性状(图 2B)。这些结果意味着 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因不仅参与了拟南芥茎的发育, 而且参与了器官细胞衰老。

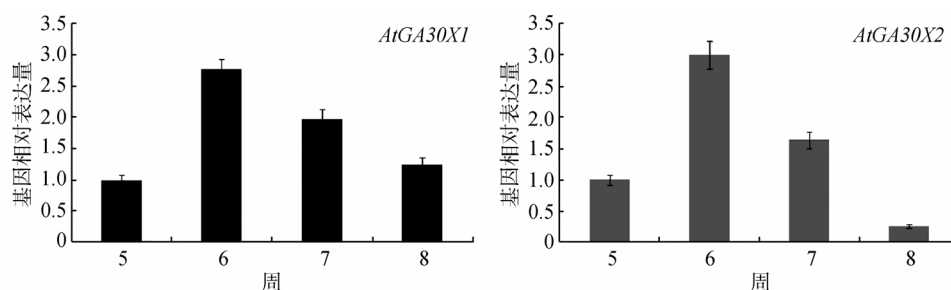


图 1 拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因在茎中的时间表达模式

播种后 5~8 周幼苗的茎秆分别用作材料, 利用 qRT-PCR 检测 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因在茎中的时间表达模式。

2.3 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体中茎秆次生细胞壁明显变薄

为了阐明 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因是否影响茎秆次生细胞壁的加厚, 本研究利用石蜡切片观察了 7 周野生型和 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体茎的横切面。如图 3 所示, 与野生型相比, *atga3ox1atga3ox2* 的木质纤维细胞和束间纤维细胞的细胞壁明显变薄, 但是导管细胞的细胞壁并未受到影响。可见, 拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因能够正调控拟南芥茎秆纤维细胞细胞壁的加厚。

2.4 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体中纤维素、半纤维素和木质素的积累受到明显抑制

atga3ox1atga3ox2 双突变体中, 茎秆次生细胞壁的明显变薄意味着次生细胞壁中 3 种最主要的组分(纤维素、半纤维素和木质素)可能也受到了影响。为了检验纤维素、半纤维素和木质素的含量是否发生变化, 本研究对拟南芥茎的横切面进行了免疫组

化分析。如图 4 所示, 与野生型相比, *atga3ox1atga3ox2* 双突变体中, 次生细胞壁三组分纤维素、半纤维素和木质素的积累明显受到抑制。

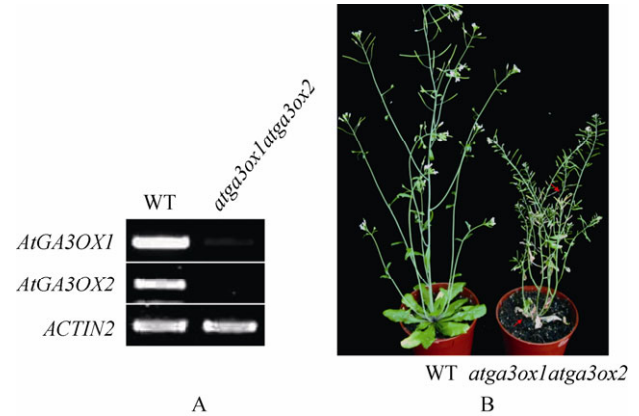


图 2 7 周野生型(WT)和 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体的分子检测及表型分析

A: 半定量 RT-PCR 检测 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体中 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因的表达量变化; B: 7 周野生型和 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体的表型。红色箭头分别指示早衰的莲座叶和开裂的果荚。

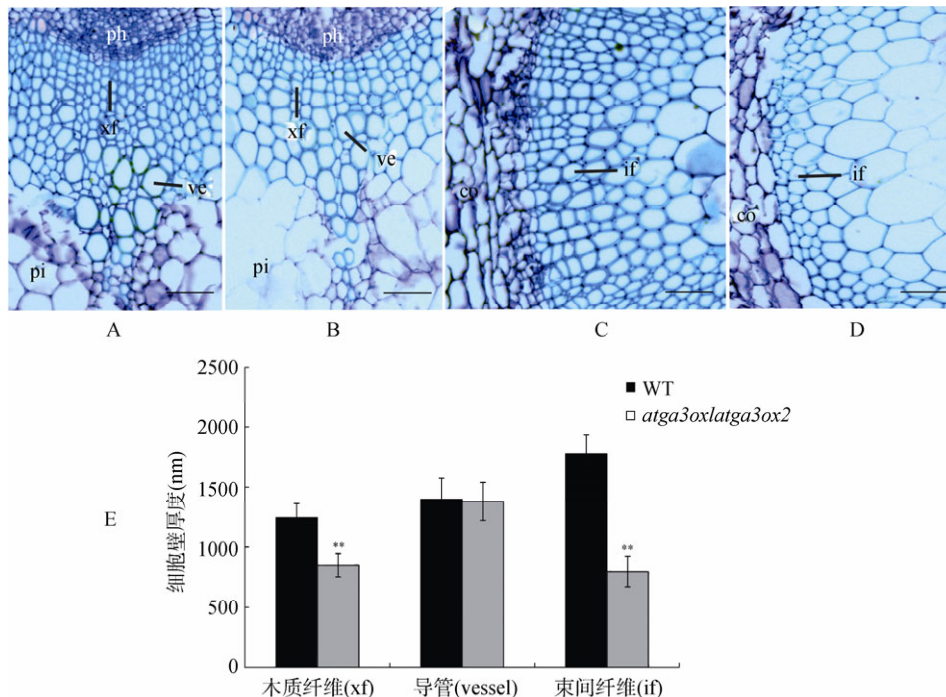


图 3 野生型和 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体茎的次生细胞壁变化

利用石蜡切片检测第 8 周野生型和 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体基部茎次生细胞壁的变化情况。A, C: 野生型茎的横切面; B, D: *atga3ox1atga3ox2* 双突变体茎的横切面; A, B: 维管束; C, D: 维管束间纤维。Ph, 韧皮部; xf, 木质纤维; ve, 导管; co, 皮层; if, 维管束间纤维; Bar=50 μ m。E: 统计分析木质纤维细胞、导管和束间纤维细胞的厚度。各取 100 个细胞用于统计。木质纤维细胞和束间纤维细胞的细胞壁厚度在野生型和突变体中存在极显著差异($P < 0.001$)。

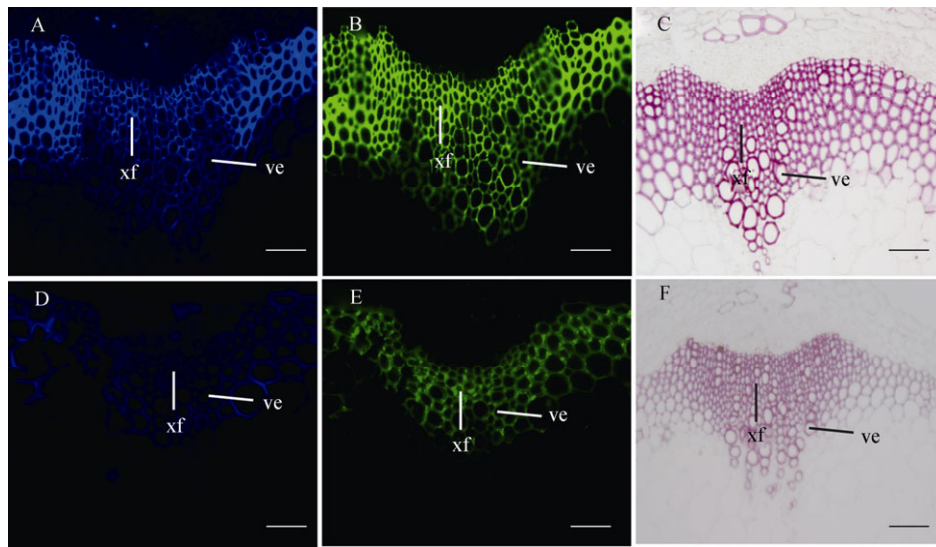


图 4 拟南芥茎横切片的免疫组化染色

免疫组化染色分析第 8 周野生型和 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体基部茎细胞壁三组分(纤维素、半纤维素和木质素)的变化情况。A,D : Calcoflor White 检测纤维素的分布; B,E : 多糖单克隆抗体 LM10 检测半纤维素的分布; C,F : HCl-间苯三酚检测木质素的分布。A,B,C : 野生型茎横切面; D,E,F : *atga3ox1atga3ox2* 双突变体茎横切面。xf : 木质纤维; ve : 导管; Bar=50 μm 。

2.5 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体中次生细胞壁合成基因及相关转录因子的表达量显著下调

进一步通过 qRT-PCR 研究了次生细胞壁三组分合成基因在 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体中的表达情况(图 5A)。结果显示: 双突变 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因均显著抑制纤维素合成酶基(*CesA4*, *CesA7*, *CesA8*)^[20], 木聚糖合成基因(*FRA8*, *IRX8*, *IRX9*)^[21], 木质素合成基因 (*4CL1* 和 *CCoAOMT1*)^[22] 的表达。这表明 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因通过正调控次生壁合成基因的表达, 进而影响次生细胞壁的加厚。有意思的是, 双突变 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因也显著抑制了两个初生细胞壁合成基因 *CesA1* 和 *CesA3*^[23] 的表达, 意味着 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因也可能参与了初生细胞壁的形成。*atga3ox1atga3ox2* 双突变体表现出早衰的表型提示我们 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因可能参与了细胞程序性死亡。为此, 本研究检测了 4 个细胞程序性死亡相关基因(*XCP1*, *XCP2*, *XND1*, *LBD30*)^[24-26] 的表达情况(图 5B)。结果显示: *atga3ox1atga3ox2* 双突变体中, *XCP1*、*XCP2* 表达量明显提高, *XND1*、*LBD30* 表达量明显降低。这说明 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因可能通过调控 *XCP1*、*XCP2*、*XND1* 和 *LBD30* 的表达从而促进植株早衰。大量研究证明,

存在一个转录网络协同调控拟南芥次生细胞壁的生物合成, 而在这个网络中, NAC、MYB 两类转录因子起了关键作用^[27,28]。利用 qRT-PCR 检测了一些关键的 NAC, MYB 转录因子(图 5C)。结果显示, 所有检测的 NAC, MYB 转录因子均在 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体中受到显著抑制, 从而推断 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因可能处在这个调控网络的上游, 通过调控这些转录因子进而影响次生细胞壁的形成。

2.6 GA3OX1 和 GA3OX2 蛋白在植物中相对保守

为了探讨拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因是否在植物中保守, 除了双子叶草本植物拟南芥, 分别从双子叶木本植物杨树, 单子叶粮食植物水稻, 单子叶能源植物甜高粱中鉴定了 8 个 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 的同源基因。其中, 杨树包括 4 个 (Potri.001G176600.1, Potri.003G057400.1, Potri.006G247700.1, Potri.018G033600.1), 水稻包括 2 个 (LOC_Os05g08540.1, LOC_Os01g08220.1), 甜高粱包括 2 个 (Sb09g005400.1, Sb03g004020.1)。氨基酸全序列比较表明, 这些 GA3OX 蛋白相对保守, 序列一致性分布在 34%~87% (表 2)。进化分析显示, 来源于双子叶植物的 GA3OX 聚在一起, 来源于单子叶植物的 GA3OX 聚在一起(图 6)。这些结果表明聚在一起 GA3OX 可能具有更加类似的功能。

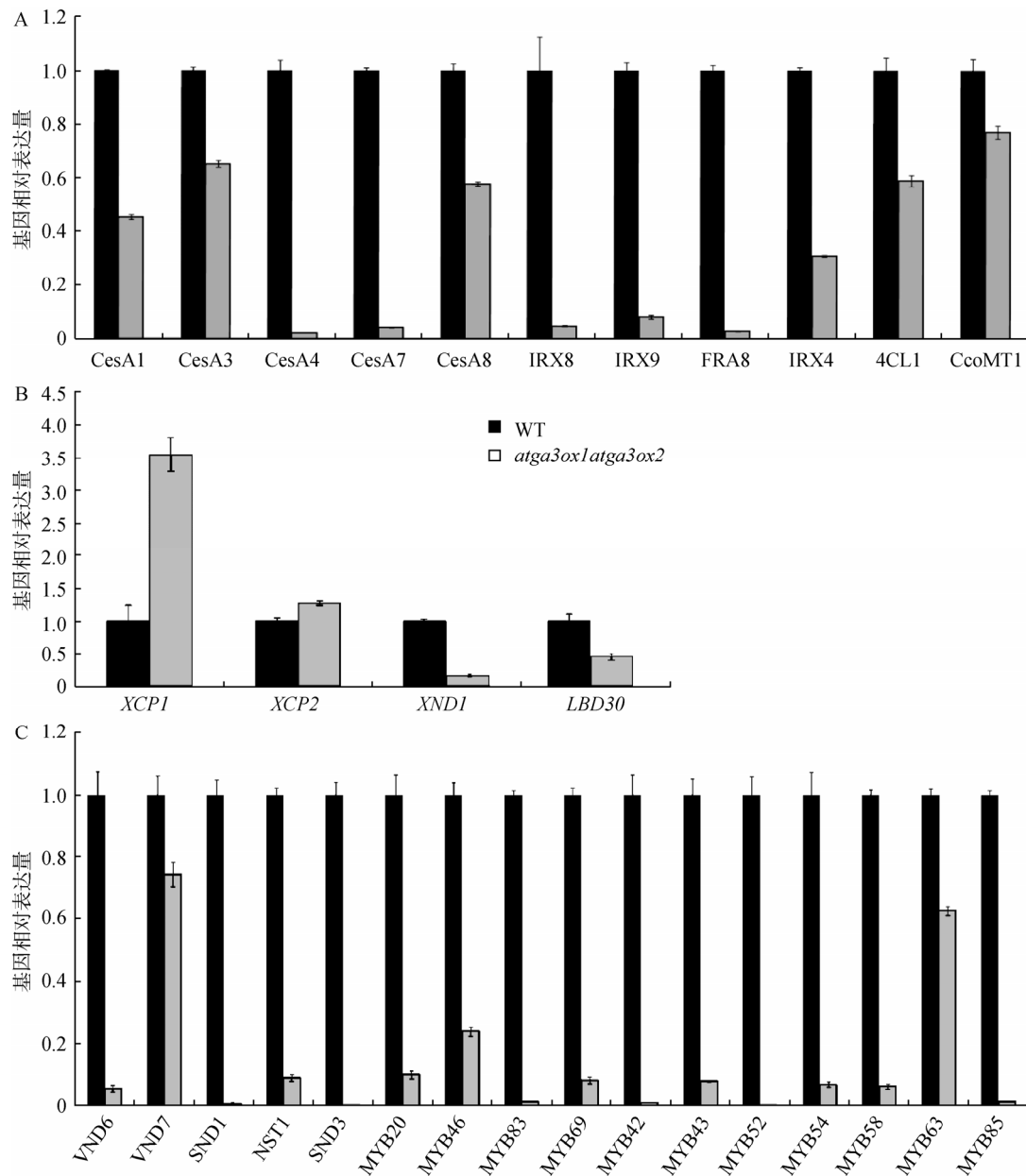


图 5 qRT-PCR 检测 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因对次生细胞壁相关基因表达量变化的影响

7 周幼苗的茎秆用作材料。A: 次生细胞壁三组分(纤维素、半纤维素和木质素)生物合成基因的表达量变化情况。纤维素合成酶基因: *CesA4*, *CesA7*, *CesA8*; 木聚糖合成基因: *FRA8*, *IRX8*, *IRX9*; 木质素合成基因: *4CL1* 和 *CCoAOMT1*。B: 4 个细胞程序性死亡相关基因(*XCP1*, *XCP2*, *XND1* 和 *LBD30*)的表达量变化情况。C: 次生细胞壁调控网络中 16 个关键 NAC, MYB 转录因子的表达量变化情况。WT: Col-0 野生型; *atga3ox1atga3ox2*: *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因的双突变体。

3 讨论

关于 GA 对茎秆发育影响的研究多集中在茎秆伸长方面, GA 对次生细胞壁增厚的报道还不多。本研究以 GA 生物合成的限速酶 GA3OX 为突破口, 以 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因的双突变体

为材料, 详细研究了 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因对茎秆次生细胞壁增厚的影响, 并初步阐明了 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因调控茎秆增粗的分子机理。虽然本研究只是利用 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因功能缺失的双突变体为材料, 进而研究其功能, 尚未通过转基因对其过量表达进行研

究, 但是本文的结果对了解这两个基因对茎秆次生细胞壁的影响具有一定的指导意义。

表 2 代表性植物中 10 个 GA3OX 蛋白的序列相似性

	AtGA3OX2 (%)	Potri.001G176600.1 (%)	Potri.003G057400.1 (%)	Potri.006G247700.1 (%)	Potri.018G033600.1 (%)
AtGA3OX1	74	61	60	49	48
AtGA3OX2	-	58	59	46	47
Potri.001G176600.1	-	-	87	52	51
Potri.003G057400.1	-	-	-	52	51
Potri.006G247700.1	-	-	-	-	84
Potri.018G033600.1	-	-	-	-	-
LOC_Os05g08540.1	-	-	-	-	-
LOC_Os01g08220.1	-	-	-	-	-
Sb09g005400.1	-	-	-	-	-

	LOC_Os05g08540.1 (%)	LOC_Os01g08220.1 (%)	Sb09g005400.1 (%)	Sb03g004020.1 (%)
AtGA3OX1	39	39	37	39
AtGA3OX2	38	39	35	38
Potri.001G176600.1	36	42	35	41
Potri.003G057400.1	35	42	36	41
Potri.006G247700.1	35	39	34	38
Potri.018G033600.1	37	40	34	39
LOC_Os05g08540.1	-	58	61	61
LOC_Os01g08220.1	-	-	57	82
Sb09g005400.1	-	-	-	56

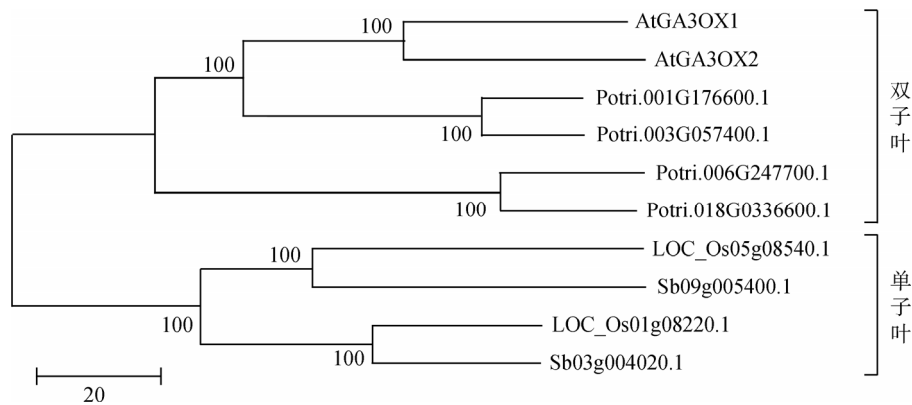


图 6 代表性植物中 10 个 GA3OX 蛋白的进化分析

利用 ClustalX (8.3) 软件对 10 个 GA3OX 蛋白的全序列进行聚类后, 使用 MEGA5.0 软件中的 Neighbor-Joining 方法进行进化分析。Bootstrap 值设置为 1 000。

植物次生细胞壁的形成受到一个复杂网络的调控, 涉及到大量的 NAC、MYB 转录因子。本文以拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因双突变体 *atga3ox1atga3ox2* 为材料, 通过 qRT-PCR 检测了 16 个次生木质部相关的转录因子, 发现所有这些转录因子都在双突变体中受到抑制, 表明 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因可能在这些转录因子

的上游。通过 qRT-PCR 检测次生木质部 3 个组分 (纤维素、半纤维素和木质素) 合成基因的变化情况, 结果显示在双体突变体中所有被检测的基因都受到抑制, 表明 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因通过正调控次生壁合成基因的表达, 进而影响次生细胞壁的加厚。次生细胞壁加厚完成后, 紧接着出现细胞程序性死亡, 检测了 4 个细胞程序性死亡相关的转录

因子, 结果显示在双突变体中 *XCP1* 和 *XCP2* 受到明显诱导, 而 *XND1* 和 *LBD30* 受到抑制。以前研究显示, 在细胞程序性死亡过程中, *XCP1* 和 *XCP2* 起到正调控作用, 而 *XND1* 和 *LBD30* 起到负调控作用^[24-26]。因此我们推测, *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因可能通过调控这些转录因子来影响细胞程序性死亡的。

植物次生细胞壁不仅是粮食植物茎秆支撑的基础, 而且也是纤维生物质能源和板材、造纸工业的主要原料。本研究也探讨了 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因在模式林木植物杨树, 粮食作物水稻和能源植物甜高粱中的保守性, 结果显示 GA3OX 蛋白在这些物种中高度保守。既然拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因能够正调控次生细胞壁的增厚, 那么我们的研究结果就可能在利用基因工程遗传改良木材、甜高粱茎秆从而增加生物量, 并对粮食作物, 例如小麦、水稻增加茎秆抗倒伏能力有一定的指导意义。

参考文献(References):

- [1] Demura T, Ye ZH. Regulation of plant biomass production. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13(3): 299–304.
- [2] Zhong R, Richardson EA, Ye ZH. The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2007, 19(9): 2776–2792.
- [3] Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL, Ye ZH. A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20(10): 2763–2782.
- [4] Nakano Y, Nishikubo N, Goué N, Yamaguchi M, Katayama Y, Demura T. MYB transcription factors orchestrating the developmental program of xylem vessels in *Arabidopsis* roots. *Plant Biotechnol*, 2010, 27(3): 267–272.
- [5] McCarthy RL, Zhong RQ, Ye ZH. MYB83 is a direct target of SND1 and acts redundantly with MYB46 in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(11): 1950–1964.
- [6] Zhou JL, Lee CH, Zhong RQ, Ye ZH. MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21(1): 248–266.
- [7] Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 59(1): 225–251.
- [8] Olszewski N, Sun TP, Gubler F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 2002, 14(Suppl): 61–80.
- [9] Appleford NEJ, Evans DJ, Lenton JR, Gaskin P, Croker SJ, Devos KM, Phillips AL, Hedden P. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta*, 2006, 223(3): 568–582.
- [10] Plackett AR, Powers SJ, Fernandez-Garcia N, Urbanova T, Takebayashi Y, Seo M, Jikumaru Y, Benlloch R, Nilsson O, Ruiz-Rivero O, Phillips AL, Wilson ZA, Thomas SG, Hedden P. Analysis of the developmental roles of the *Arabidopsis* gibberellin 20-Oxidases demonstrates that GA20ox1, -2, and -3 are the dominant paralogs. *Plant Cell*, 2002, 24(3): 941–960.
- [11] Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JAD, Amasino RM. Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 151–163.
- [12] Hedden P, Phillips AL, Rojas MC, Carrera E, Tudzynski B. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *J Plant Growth Regul*, 2002, 20(4): 319–331.
- [13] Mitchum MG, Yamaguchi S, Hanada A, Kuwahara A, Yoshioka Y, Kato T, Tabata S, Kamiya Y, Sun TP. Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development. *Plant J*, 2006, 45(5): 804–818.
- [14] Chiang HH, Hwang I, Goodman HM. Isolation of the *Arabidopsis* GA₄ locus. *Plant Cell*, 1995, 7(2): 195–201.
- [15] Stavang JA, Lindgård B, Erntsen A, Lid SE, Moe R, Olsen JE. Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea. *Plant Physiol*, 2005, 138(4): 2344–53.
- [16] Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong DH, An G, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M. Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science*, 2003, 299(5614): 1896–1898.
- [17] Mauriat M, Moritz T. Analyses of GA20ox- and GID1-over-expressing aspen suggest that gibberellins play two distinct roles in wood formation. *Plant J*, 2009, 58(6): 989–1003.
- [18] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [19] Hu J, Mitchum MG, Barnaby N, Ayele BT, Ogawa M, Nam E, Lai WC, Hanada A, Alonso JM, Ecker JR, Swain SM, Yamaguchi S, Kamiya Y, Sun TP. Potential sites of

- bioactive gibberellin production during reproductive growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2008, 20(2): 320–336.
- [20] Taylor NG, Gardiner JC, Whiteman R, Turner SR. Cellulose synthesis in the *Arabidopsis* secondary cell wall. In: Brown RM Jr, Saxena IM eds. *Cellulose: Molecular and Structural Biology*. Netherlands: Springer, 2007: 49–61.
- [21] Peña MJ, Zhong R, Zhou GK, Richardson EA, O'Neill MA, Darvill AG, York WS, Ye ZH. *Arabidopsis irregular xylem8* and *irregular xylem9*: implications for the complexity of glucuronoxylan biosynthesis. *Plant Cell*, 2007, 19(2): 549–563.
- [22] Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2003, 133(3): 1051–1071.
- [23] Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, Höfte H, Plazinski J, Birch R, Cork A, Glover J, Redmond J, Williamson RE. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*, 1998, 279(5351): 717–720.
- [24] Avci U, Petzold HE, Ismail IO, Beers EP, Haigler CH. Cysteine proteases XCP1 and XCP2 aid micro-autolysis within the intact central vacuole during xylogenesis in *Arabidopsis* roots. *Plant J*, 2008, 56(2): 303–315.
- [25] Funk V, Kositsup B, Zhao CS, Beers EP. The *Arabidopsis* xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog. *Plant Physiol*, 2002, 128(1): 84–94.
- [26] Kubo M, Udagawa M, Nishikubo N, Horiguchi G, Yamaguchi M, Ito J, Mimura T, Fukuda H, Demura T. Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Dev*, 2005, 19(16): 1855–1860.
- [27] Demura T, Fukuda H. Transcriptional regulation in wood formation. *Trends Plant Sci*, 2007, 12(2): 64–70.
- [28] Zhong RQ, Ye ZH. Regulation of cell wall biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(6): 564–572.

•综合信息•

2013 年 35 卷第 5 期《遗传》封面说明

植物茎秆包括了大量的次生细胞壁,不仅是植物茎秆赖以支撑的基础,而且也是纤维生物的主要成分,被广泛应用于造纸、建筑、生物能源等行业。因而,研究植物次生细胞壁增厚的分子机理能够为提高纤维生物质产量、增加农作物抗倒伏性提供理论依据。本研究以拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因双突变体为材料,系统研究了 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因对次生细胞壁的影响。同时突变 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因不仅显著抑制了茎秆次生细胞壁纤维细胞的增厚,而且也明显降低了次生细胞壁 3 个组分(纤维素、半纤维素和木质素)的含量。qRT-PCR 分析显示,次生细胞壁 3 个组分的生物合成基因及次生细胞壁相关转录因子在双突变体中均受到显著抑制,表明拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因可能是通过调控这些转录因子进而调控了次生细胞壁的加厚。本文的研究结果为基因工程调控拟南芥 *AtGA3OX1*、*AtGA3OX2* 基因(或其他物种同源基因),进而增强粮食作物抗倒伏性和提高能源植物纤维生物质量提供了理论依据。详见本期第 655~665 页王增光,柴国华,王芝瑶,唐贤丰,孙长江,周功克,马三梅的文章“拟南芥 *AtGA3OX1* 和 *AtGA3OX2* 基因影响茎秆次生细胞壁增厚的分子机理”一文。封面图片展示的是第 8 周野生型和 *atga3ox1atga3ox2* 双突变体基部茎细胞壁三组分(纤维素、半纤维素和木质素)的免疫组化结果。相比于野生型,双突变体中纤维素(Calcoflor White 检测)、半纤维素(多糖单克隆抗体 LM10 检测)和木质素(HCl-间苯三酚检测)的含量均受到抑制。

(柴国华,王增光,马三梅)