

AtCPS V326M 突变显著影响赤霉素合成

赵三增¹, 孔丹宇², 辛培勇³, 褚金芳^{3,5}, 万迎朗¹, 凌宏清^{4,5}, 刘毅^{2,4}

1. 海南大学热带作物学院, 海口 570228
2. 中国科学院庐山植物园, 江西庐山 332900
3. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 国家植物基因研究中心(北京), 中国科学院种子创新研究院, 北京 100101
4. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 中国科学院种子创新研究院, 北京 100101
5. 中国科学院大学现代农学院, 北京 100039

摘要: 赤霉素(gibberellins, GA)是植物激素之一, 调控植物生长和发育。植物体中赤霉素合成量直接影响植物的形态和生物量。在赤霉素合成途径中, 柯巴基焦磷酸合酶基因(copalyl diphosphate synthase, CPS)是第一个合酶基因, 该基因突变会严重影响赤霉素合成量。本研究通过对根和下胚轴缩短、晚花、丛生、矮化的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)突变体 *gal-168* 进行图位克隆, 鉴定出 *AtCPS* 的一个等位基因 *AtCPS-168*。该等位基因的突变位点是 *AtCPS* 基因的第 2768 位核苷酸, 鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A), 导致 *AtCPS* 蛋白萜类合酶(Terpene_synth)结构域中的第 326 位缬氨酸(V)突变成蛋氨酸(M)。通过等位分析确定 *AtCPS-168* 是 *AtCPS* 的等位基因。遗传互补实验显示 *AtCPS V326M* 突变导致植物丛生、矮化等发育缺陷表型。赤霉素含量测定结果证明 *AtCPS V326M* 突变导致赤霉素的合成量减少。外施赤霉素实验结果表明, 外施赤霉素能恢复拟南芥突变体 *gal-168* 赤霉素合成量降低导致的植株丛生、矮化等发育缺陷表型。因此, 本研究为通过定点突变赤霉素合成酶基因的特定位点改变赤霉素含量来塑造植物理想株高和株型提供理论指导。

关键词: 赤霉素; *AtCPS* 基因; 根长; 株型; 株高

AtCPS V326M significantly affect the biosynthesis of gibberellins

Sanzeng Zhao¹, Danyu Kong², Peiyong Xin³, Jinfang Chu^{3,5}, Yinglang Wan¹,
Hong-Qing Ling^{4,5}, Yi Liu^{2,4}

1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou 570228, China
2. Lushan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Lushan 332900, China
3. National Centre for Plant Gene Research (Beijing), Innovation Academy for Seed Design, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China
4. State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Innovation Academy for Seed Design, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China
5. College of Advanced Agricultural Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: Gibberellins are a class of typical phytohormones, which regulate plant growth and development. The

收稿日期: 2021-11-26; 修回日期: 2022-01-19; 网络发布日期: 2022-02-22

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(编号: 31900171)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31900171)]

作者简介: 赵三增, 在读硕士研究生, 专业方向: 分子遗传学。E-mail: 834395875@qq.com

通讯作者: 凌宏清, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: hqling@genetics.ac.cn

刘毅, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: yiliu609@outlook.com

DOI: 10.16288/j.ycz.21-405

contents of gibberellins dramatically affect the morphology and biomass of plant. The encoding protein of copalyl diphosphate synthase gene (*CPS*) catalyzes the first-step in the biosynthetic pathway of gibberellins. The mutation in this gene may significantly affect the contents of gibberellins in plants. In this study, we found an EMS-triggered mutant, *gal-168*, showing short roots, short hypocotyls, late flowering and dwarf. Map-based cloning revealed that the causal gene of *gal-168* was *AtCPS-168*, an allele of *AtCPS* gene. The encoding protein of *AtCPS-168* was AtCPS V326M which was resulted from a single-point mutation (guanine to adenine at nucleotide 2768) of *AtCPS* gene. Protein domain analysis showed that V326 was located in the Terpene_synth domain. The allelism test demonstrated that *AtCPS-168* was an allele of *AtCPS* gene. The transgenic complementation of *gal-168* indicated that AtCPS V326M led to the dwarf and bushy phenotype of *gal-168*. The endogenous gibberellins contents analysis suggested that the gibberellins contents of *gal-168* were much lower than that of wild-type. The exogenous GA₃ application assay uncovered that application of GA₃ can complement the dwarf and bushy phenotype of *gal-168* caused by low endogenous gibberellins contents. Therefore, this study suggested that it is an elegant way to create the ideal plant architecture and height by site-directed mutating the gibberellin biosynthetic genes.

Keywords: gibberellins; *AtCPS* gene; root length; plant architecture; plant height

赤霉素(gibberellins, GA)是植物经典激素之一, 主要控制种子萌发、茎干伸长以及叶片、花和种子发育等重要过程^[1,2], 对植物生长和发育起着关键调控作用。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 赤霉素缺失时, DELLA 蛋白与响应 GA 信号促进植物生长的转录因子结合, 使这些转录因子不能行使转录活性, 抑制植株生长^[3]。当赤霉素与其受体 GID1 结合, 会与 DELLA 蛋白形成 GA-GID1-DELLA 复合体, E3 泛素连接酶复合体 SCF^{SLY1} 识别并结合 GA-GID1-DELLA 复合体中的 DELLA 蛋白, 将其泛素化, 促使 DELLA 蛋白通过 26S 蛋白降解途径降解, 释放与 DELLA 蛋白结合的转录因子, 启动 GA 信号响应基因的表达, 促进植株生长^[4]。

赤霉素是一类双萜次生代谢物, 目前共发现 136 种, 按照其发现顺序, 分别被命名为 GA₁~GA₁₃₆, 可分为含 20 个碳原子和 19 个碳原子两大类^[1,5,6]。其中具有生物学活性的赤霉素主要有 GA₁、GA₃、GA₄ 和 GA₇, 都属于含 19 个碳原子类赤霉素。在绝大多数植物中, GA₁ 和 GA₄ 是最主要的活性赤霉素形式, 并且 GA₄ 的活性显著高于 GA₁^[6]。赤霉素的合成以牻牛儿基焦磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGDP)为前体, 整个合成途径可按照合成场所分为 3 个阶段: 第一阶段是位于前质体的可溶性酶柯巴基焦磷酸合酶(copalyl diphosphate synthase, CPS)和

贝壳杉烯合酶(ent-kaurene synthase, KS)将牻牛儿基焦磷酸催化成贝壳杉烯^[7]; 第二阶段是在内质网中贝壳杉烯先被氧化成赤霉素的通用前体 GA₁₂, 并进一步被不同的细胞色素 P450 单氧化酶催化成多种不同的赤霉素形式或其中间体; 第三阶段是由位于细胞质中多基因家族的加双氧酶 GA₂₀ 氧化酶(GA₂₀ox)、GA₃ 氧化酶(GA₃ox)以及 GA₂ 氧化酶(GA₂ox)依次完成。通过 GA₂₀ox 和 GA₃ox 的催化作用, 生成具有生物学活性的 GA₁ 和 GA₄, 而 GA₂ox 则是将 GA₁ 和 GA₄ 代谢成不具有生物学活性的赤霉素^[5,8]。

在被子植物中, CPS 和 KS 两个独立的双萜合酶基因, 分别编码 CPS 蛋白和 KS 蛋白^[9]。其中, CPS 含有保守结构域 DXDD, 属于第二类双萜合酶, 催化完成赤霉素合成途径中的第一步反应, 使牻牛儿基焦磷酸形成焦磷酸柯巴酯^[5,6]。焦磷酸柯巴酯进一步被归属第一类双萜合酶的 KS 催化成贝壳杉烯。这两个酶共同作用完成赤霉素合成的第一阶段。而在苔藓等低等植物中, CPS/KS 双萜合酶被认为是 CPS 和 KS 的融合蛋白, 同时存在 CPS 的保守结构域 DXDD 和 KS 的保守结构域 DDXXD, 是一个既具有 CPS 酶活又具有 KS 酶活的双功能双萜合酶, 可直接将牻牛儿基焦磷酸催化成贝壳杉烯。该酶单独完成赤霉素合成的第一阶段^[10]。拟南芥中 CPS 基

因(*At4g02780*)只有一个拷贝,该基因也被称为 *GAI* 基因,突变后会导致种子萌发困难,植株极度矮小,叶片小而深绿,花瓣、萼片和雌蕊严重发育不全、雄性败育,外施赤霉素可以恢复突变体表型^[7]。过表达 *AtCPS* 基因,可以显著提高植株中内根-贝壳杉烯和内根-贝壳杉烯酸含量,但不影响赤霉素合成途径中内根-贝壳杉烯酸之后的中间产物和活性赤霉素的含量^[9]。水稻中有4个 *CPS* 基因(*OsCPS1~OsCPS4*),其中 *OsCPS1*、*OsCPS2* 负责将牻牛儿基焦磷酸催化成内根-焦磷酸柯巴酯, *OsCPS3* 是一个假基因, *OsCPS4* 将牻牛儿基焦磷酸转化成同向-焦磷酸柯巴酯。进一步研究表明在水稻中 *OsCPS1* 基因主要参与赤霉素的合成,而 *OsCPS2* 和 *OsCPS4* 参与植保素的合成^[11~14]。

20世纪60年代开始的第一次绿色革命,就是利用水稻(*Oryza sativa* L.)中的赤霉素合成基因 *sd1* 和小麦(*Triticum aestivum* L.)中的信号转导基因 *Rht* 的优异等位基因培育出矮秆、抗倒伏、高产新品种,极大推动了粮食产量的提升^[15,16]。这些研究表明赤霉素对农作物的株型、育性以及收获指数影响很大。因此,发掘赤霉素合成量适度的农作物基因型仍然是提高作物产量切实可行的办法之一。本研究在拟南芥 EMS (ethyl methyl sulfone) 诱变突变体库中通过图位克隆的方法克隆了一个 *AtCPS* 等位突变基因 *AtCPS-168*。在该突变体 *gal-168* 中, *AtCPS-168* 等位基因的第2768位核苷酸由鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A)使 *AtCPS* 第326位缬氨酸突变成蛋氨酸,致使突变体中赤霉素合成量明显的降低以及株型显著改变。本研究结果以期如何改善农作物赤霉素合成量,构建赤霉素合成量适度的农作物新品种提供新思路。

1 材料和方法

1.1 植物材料及培养方法

本研究所用的植物材料是由本实验室保存的拟南芥的两种生态型 Columbia-0 (Col-0) 和 Landsberg *erecta* (Ler); 突变体 *gal-t* 是本实验室保存的 *AtCPS* 基因的 T-DNA 插入缺失突变体。突变体 *gal-168* 从拟南芥 EMS 诱变突变体库中(Col-0 背景)筛选获得。

拟南芥培养基平板培养:将消毒后的拟南芥种子播种在 1/2 MS (Murashige and Skoog) 固体培养基上, 竖直倾斜 30° 放置在 22°C 培养箱中, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度为 15,000 Lx。拟南芥土中培养:将 10 d 的拟南芥幼苗移栽到培养土中, 放置在 22°C 培养间, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度为 15,000 Lx。

1.2 菌株、质粒、引物合成

本实验所用的菌株包括:大肠杆菌菌株 DH5 α ; 农杆菌菌株 GV3101; 本实验所用的转化载体为 *pBINPLUS*; 本研究所有引物由上海生工生物技术服务有限公司合成。

1.3 根长和下胚轴测定实验

对在 22°C、16 h 光照/8 h 黑暗条件下 1/2 MS 固体培养基上竖直培养 10 d 的拟南芥幼苗的主根和下胚轴的长度进行测定,进行 3 次生物学重复,每次重复每个基因型不少于 20 株。根长和下胚轴的显著性差异的统计分析采用 *t*-test 检验。

1.4 F₂ 群体构建

利用拟南芥 Col-0 为母本,突变体 *gal-168* 为父本进行杂交,杂交 F₁ 植株用来验证 *gal-168* 突变基因的显隐性,杂交 F₁ 植株自交后得到的 F₂ 群体用来考察性状分离比。以 Ler 为母本,突变体 *gal-168* 为父本进行杂交得到杂交 F₁ 植株, F₁ 植株经自交一代获得 F₂ 分离群体,选取矮化单株用于后续图位克隆。

1.5 图位克隆

图位克隆方法详见参考文献[17],分子标记引物序列见表1。

1.6 拟南芥基因组 DNA、RNA 提取及反转录

取拟南芥 Col-0 植株幼嫩莲座叶,放入 2 mL 离心管中,细胞破碎仪破碎后,加入 500 μ L 65°C 预热的 CTAB 溶液,振荡摇匀。65°C 水浴中放置 20 min。冷却至室温后,加入 300 μ L 氯仿:异戊醇(24:1),颠倒混匀。1000 r/min 离心 10 min,吸上层液体至新离心管中,加入等体积异丙醇,颠倒混匀。-20°C 放置 40 min。12,000 r/min 离心 20 min,弃上清,

表 1 分子标记引物序列

Table 1 Marker primers in this study

用途	引物名称	序列(5'→3')
SSLP 分子标记	CIW5 LP	GGTTAAAAATTAGGGTTACGA
	CIW5 RP	AGATTTACGTGGAAGCAAT
	F4C21 LP	GAGATTGCTCGGTTTGATTG
	F4C21 RP	ACAAGGATACGGTGTAGAG
	T4I9 LP	ACAGAACTGATGGAATATG
	T4I9 RP	AACTATTGTGCGTAAACATC
CAPS 分子标记	T5J8 <i>Dde</i> I LP	AGAGTGGTTTGAATCTGAAG
	T5J8 <i>Dde</i> I RP	CTGTCCTAGCTTATAACTTG
	T5J8 <i>Hpy</i> 178 III LP	ATAGCTATGTGCAGAACAAG
	T5J8 <i>Hpy</i> 178 III RP	TATCATACTGAGATACTCCG

沉淀用 70%乙醇清洗 1~2 次,干燥后加入超纯水溶解,放入-80℃储存。

取拟南芥 Col-0 植株幼嫩莲座叶,使用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)依照说明书提取总 RNA。反转录使用 SuperScript III Reverse Transcriptase 试剂盒(美国 Invitrogen 公司),使用方法参照说明书。

1.7 *gal-168* 遗传互补载体的构建、转化与筛选

利用引物 pCPS-*Kpn* I LP(5'-GGTACCGTTTTG-CAAACCTCGATCTAC-3')和 pCPS-*Xma* I(5'-CCCGG-GGGCTTTAAAAAGCTCTGT-3'),以 Col-0 基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增 *AtCPS* 基因的启动子区。用引物 CPS CDS-*Xma* I(5'-CCCGGGATGTCT-CTTCAGTATCATG-3')和 CPS CDS-*Pst* I(5'-CTGCA-GCTAGACTTTTTGAAACAAG-3'),以反转录的 Col-0 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增出 *AtCPS* 的基因编码区。通过酶切连接的方法,将 *AtCPS* 启动子和编码区片段连接到 pBINPLUS 载体中。将连接好的载体转化大肠杆菌 DH5 α 菌株,转化载体经扩繁后转入农杆菌 GV3101 菌株中。取生长状况良好,有大量花苞的 *gal-168* 突变体植株,通过滴花转化法转化植株,利用 Kan 抗性筛选获得互补株系。

1.8 CPS 蛋白序列的比对

小立碗蕨(*Physcomitrium patens*)、江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*)、无油樟(*Amborella trichopoda*)、甜菜(*Beta vulgaris*)、甘蓝(*Brassica oleracea*)、

毛果杨(*Populus trichocarpa*)、大豆(*Glycine max*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、水稻、玉米(*Zea mays*)和高粱(*Sorghum bicolor*) CPS 蛋白序列在 Ensemble Plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>)通过 AtCPS 蛋白比对获得,CPS 蛋白序列比对结果通过 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)完成。

1.9 GA₃ 喷施实验

对土中培养 2 周的拟南芥幼苗,喷施 50 μ mol/L GA₃,每天喷施一次,连续喷施 7 d 后观察表型。

1.10 赤霉素测定

赤霉素的定量测定方法参照文献[18]。取土里正常培养 30 d 的野生型 Col-0 和突变体 *gal-168* 地上部,在研钵中用液氮充分研磨后,用 90%的甲醇水溶液提取 100 mg 的液氮研磨粉末,加入需要检测 GA 的标记物各 2 ng 作为内参。将赤霉素初提物通过固相萃取柱萃取后融入 40%甲醇中,通过 UPLC-MS/MS 进行定量检测。

2 结果与分析

2.1 *gal-168* 的突变基因是 *AtCPS* 基因

通过筛选拟南芥 Col-0 EMS 诱变突变体库,筛选出一个突变株 *gal-168* (图 1: A 和 B)。该突变体生长 1 周的幼苗根较野生型短,为野生型根长的 4/5;下胚轴的长度也较野生型短,仅为野生型的 2/5 (图 1C)。在 16 h 光照/8 h 黑暗的光照条件下,突变体的抽薹时间比野生型晚一周左右。株型呈丛生状,株高是野生型的一半(图 1D)。以野生型 Col-0 和 *gal-168* 为亲本,构建 F₂ 分离群体,在 1348 株 F₂ 植株中呈现突变体表型(根短、下胚轴短、晚花)的个体为 342 株,其余 1006 个植株表型与野生型相近。经卡方检验发现 F₂ 群体分离比符合 3:1 的理论值($\chi^2=0.0989$, $\chi^2_{0.05,1}=3.84$),由此推测,突变体表型是受单个隐性基因控制。

利用拟南芥 Ler 生态型与 *gal-168* 杂交得到的 F₂ 分离群体进行图位克隆,突变体基因定位于 4 号染色体短臂的 SSLP 分子标记 CIW5 与 F2C21 之间。通过进一步遗传精细定位分析,将突变基因定位于

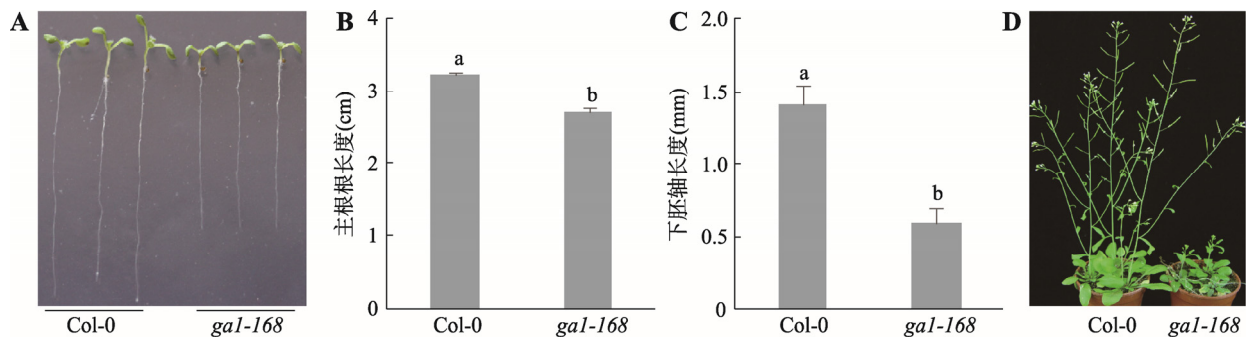


图 1 突变体 *gal-168* 的表型分析

Fig. 1 Phenotypic analysis of *gal-168*

A: Col-0 和 *gal-168* 幼苗在 1/2 MS 培养基上生长 7 d 的根长表型; B: Col-0 和 *gal-168* 幼苗在 1/2 MS 培养基上生长 7 d 后主根长度统计分析; C: Col-0 和 *gal-168* 幼苗在 1/2 MS 培养基上生长 7 d 后下胚轴长度统计分析; D: Col-0 和 *gal-168* 幼苗在土中生长的株高表型。误差线上方不同的小写字母标示代表彼此间有统计学差异($P < 0.05$), 若无标示或用相同字母标示则代表无统计学差异。

CAPS 分子标记 T5J8 *Dde* I 和 T5J8 *Hyp*178 III 之间。通过对这两个分子标记之间的 9 个基因进行测序分析, 发现突变位点位于 *AtCPS* 基因的第 7 个外显子的第 2768 位, 核苷酸从鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A), 导致 *AtCPS* 蛋白第 326 位的缬氨酸(V)突变成蛋氨酸(M)。经 Pfam domain 分析, 发现 V326 位于 Terpene_synth(272~478 aa)结构域中(图 2)。

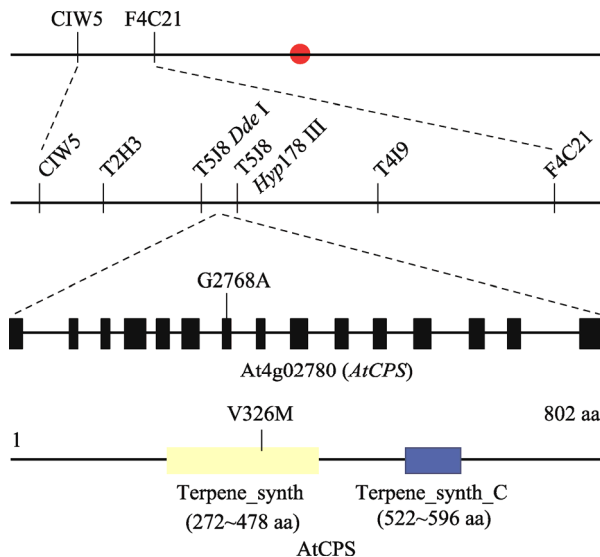


图 2 突变体 *gal-168* 的图位克隆

Fig. 2 Map-based cloning of *gal-168*

黑色竖线代表分子标记; 虚线指示为两标记间区段的放大; 黑色方框代表外显子, 黑色方框之间的线代表内含子; 淡黄色方框代表 *AtCPS* 蛋白的(Terpene_synth) (272~478 aa)结构域, 其中第 326 位的缬氨酸(V)突变成蛋氨酸(M)。红色圆点代表染色体着丝粒, 蓝色方框代表 *AtCPS* 蛋白的萜类合酶 C (Terpene_synth_C) (522~596 aa)结构域。

2.2 V326 在植物进化过程中高度保守

为检测 V326 的保守性, 利用 *AtCPS* 的蛋白序列在 EnsemblePlants 网站比对, 获取小立碗藓、江南卷柏、无油樟、甜菜、甘蓝、毛果杨、大豆、葡萄、水稻、玉米和高粱共 11 个物种的 17 个同源基因。通过 Clustal Omega 比对发现, V326 位点在所检测物种的同源基因中都是保守的。仅在参与植保素合成, 而不参与赤霉素合成的水稻 *OsCPS4* 蛋白中该位点突变演化成亮氨酸(L)(图 3)。该结果提示 V326 位点对 CPS 的蛋白功能十分重要。

PpCPS/KS	P N V Y P	↓	D L F E R	371
SmCPS	P N V Y P	↓	D L F E H	437
SmCPS1	P N V Y P	↓	D L F E H	241
SmCPS2	P N V Y P	↓	D L F E H	241
AtrCPS	P N A Y P	↓	D L F E R	331
BvCPS	P N V Y P	↓	D L F E H	334
BoCPS	P N V F P	↓	D L F E H	313
AthCPS	P N V F P	↓	D L F E H	331
PtTPS1	P N V Y P	↓	D L F E H	313
PtTPS2	P N V Y P	↓	D L F E H	340
PtTPS3	P N V Y P	↓	D L F E H	326
GmCPS	P N V Y P	↓	D L F E H	339
VvCPS	P N V Y P	↓	D L F E H	334
OsCPS1	P N V Y P	↓	D L F E H	372
OsCPS2	P C T Y P	↓	D N F D R	328
OsCPS4	P C I Y P	↓	L D V Y E R	319
ZmCPS	P N V Y P	↓	D L F E H	333
SbCPS	P N V Y P	↓	D L F E H	372

图 3 CPS V326 区域比对结果

Fig. 3 The blast result of CPS V326 region

利用 Clustal Omega 在 17 个物种中对 CPS 蛋白序列进行比对, 红色*代表 V326 位点, 最后的一列数字代表其左侧氨基酸在 CPS 蛋白中的位置。Pp: 小立碗藓; Sm: 江南卷柏; Atr: 无油樟; Bv: 甜菜; Bo: 甘蓝; Pt: 毛果杨; Gm: 大豆; Vv: 葡萄; Os: 水稻; Zm: 玉米; Sb: 高粱。

2.3 *AtCPS* V326M 导致 *gal-168* 生长发育缺陷表型

为确定 *AtCPS* 基因突变导致了 *gal-168* 的表型, 本研究采用 *AtCPS* 基因的启动子驱使自身的基因编码序列, 通过转基因的方式构建出互补株系 *com gal-168*。 *com gal-168* T₂ 代纯合单插入株系的根长与野生型 Col-0 一致(图 4A), 株型和株高也与野生型一致(图 4: B 和 C), 这说明 *AtCPS* 基因能完全互补突变体 *gal-168* 的生长发育缺陷表型。将 *AtCPS* T-DNA 插入突变体 *gal-t* 与 *gal-168* 进行杂交, 杂交 F₁ 植株的根长与 *gal-168* 一致(图 4: B 和 C), F₁ 植株的株型和株高也与 *gal-168* 一致(图 4A), 等位分析表明 *gal-t* 与 *gal-168* 的突变基因是等位基因。

2.4 *gal-168* 赤霉素合成量显著降低

AtCPS 是拟南芥赤霉素合成途径中的第一个关键基因, 直接影响拟南芥的赤霉素合成量。*gal-168* 的表型也暗示在 *gal-168* 中赤霉素合成量减少。采集在 16 h 光照/8 h 黑暗条件下生长 30 d 的 Col-0 和 *gal-168* 的地上部分材料, 通过质谱检测赤霉素合成途径的 14 种关键赤霉素含量。结果发现 Col-0 中的赤霉素含量普遍高于 *gal-168*。其中 GA₁₂、GA₁₅、GA₃₄ 在 Col-0 中的含量分别为 0.603±0.048 ng/g、0.505±0.007 ng/g、1.000±0.071 ng/g, 而在 *gal-168* 中的含量仅为 0.019±0.004 ng/g、0.246±0.015 ng/g、0.149±0.018 ng/g (表 2)。另外, GA₄、GA₉、GA₂₀、GA₂₄、GA₄₄、GA₅₁ 在 Col-0 中的含量分别为 0.466±

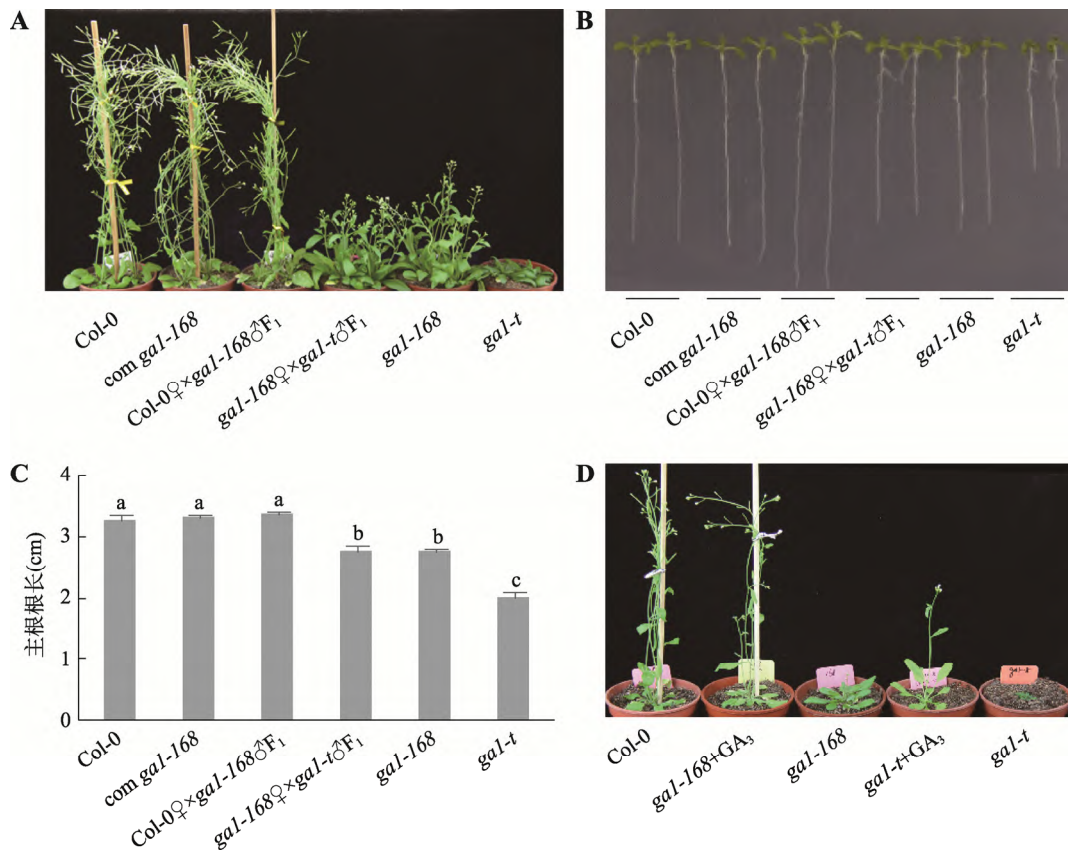


图 4 突变体 *gal-168* 突变基因的确定

Fig. 4 Identification of the causal gene of *gal-168*

A: 土中生长 40 d 的 Col-0、*gal-168*、*gal-t* 突变体、互补植株 *com gal-168* 和 Col-0♀ × *gal-168*♂ F₁、*gal-168*♀ × *gal-t*♂ F₁ 的株高表型; B: Col-0、*gal-168*、*gal-t* 突变体、互补植株 *com gal-168* 和 Col-0♀ × *gal-168*♂ F₁、*gal-168*♀ × *gal-t*♂ F₁ 在 1/2 MS 培养基上生长 7 d 的根长表型; C: Col-0、*gal-168*、*gal-t* 突变体、互补植株 *com gal-168* 和 Col-0♀ × *gal-168*♂ F₁、*gal-168*♀ × *gal-t*♂ F₁ 根长表型的统计分析; D: 对移栽到土里的 *gal-168* 和 *gal-t* 小苗连续喷施 GA₃ 7 d 后的表型。误差线上方不同的小写字母标示代表彼此间有统计学差异(P<0.05), 若无标示或用相同字母标示则代表无统计学差异。

表 2 Col-0 和 *gal-168* 中赤霉素含量(ng/g FW)Table 2 Contents of GAs in Col-0 and *gal-168* (ng/g FW)

	GA ₁₂	GA ₁₅	GA ₃₄	GA ₄	GA ₉	GA ₂₀	GA ₂₄	GA ₄₄	GA ₅₁
Col-0	0.603±0.048	0.505±0.007	1.000±0.071	0.466±0.026	0.207±0.014	0.399±0.013	1.550±0.081	0.220±0.026	0.732±0.059
<i>gal-168</i>	0.019±0.004	0.246±0.015	0.149±0.018	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: 未检测到。

0.026 ng/g、0.207±0.014 ng/g、0.399±0.013 ng/g、1.550±0.081 ng/g、0.220±0.026 ng/g、0.732±0.059 ng/g, 而 *gal-168* 中则没有检测到这几种赤霉素(表 2)。其余的赤霉素 GA₁、GA₇、GA₈、GA₁₉ 和 GA₅₃ 在 Col-0 和 *gal-168* 的样品中都没有被检测到。

2.5 外施赤霉素 GA₃ 可以恢复 *gal-168* 表型

为进一步确认 *gal-168* 的株型和株高的表型是由于赤霉素缺失导致, 本研究对移栽到土里的 *gal-168* 和 *gal-t* 小苗喷施 50 μmol/L GA₃, 连续喷施 7 d 后, *gal-168* 在株型和株高上都与野生型 Col-0 一致, 而 *gal-t* 的表型仅得到部分恢复(图 4D)。结果表明, *gal-168* 的丛生株型和较矮株高的表型是由赤霉素缺失导致。

3 讨论

3.1 CPS 基因的进化

藻类低等生物中可能没有赤霉素的内源合成, 因为比对发现莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) 没有 CPS 的同源基因。CPS 基因在细菌、真菌和植物中广泛存在。CPS 基因存在方式主要有两种: 一种是在真菌和苔藓植物中的 CPS/KS 融合蛋白, 同时具有 CPS 和 KS 酶的酶活; 另外一种方式是细菌和维管植物中独立的 CPS 蛋白。CPS 基因在某些物种中还演化成多个同源基因, 如在江南卷柏、毛果杨和水稻中都有 3 个 CPS 基因。已有报道证实水稻的 3 个 CPS 基因中, 仅 *OsCPS1* 参与赤霉素的合成途径, 而 *OsCPS2* 与 *OsCPS4* 已特化成合成植保素的合成基因^[11~14]。江南卷柏也有 CPS 同源基因存在功能特化, 不再参与赤霉素的合成^[19]。这预示毛果杨中的某些 CPS 基因也有可能不再参与赤霉素合成。另外, 虽然处于植物进化不同阶段的江南卷柏、毛

果杨和水稻都有 3 个 CPS 基因, 但这些物种中 CPS 基因的复制应该是独立进行的。因为处于这 3 个物种进化中间的一些物种, 如无油樟、大豆以及玉米等都只有一个 CPS 基因。

3.2 V326 对 CPS 酶活的重要性

本研究发现 AtCPS 蛋白的 326 位氨基酸从缬氨酸(V)突变成蛋氨酸(M)后, 拟南芥合成赤霉素的能力显著下降, 这一结果暗示 V326 对 AtCPS 酶活十分重要。V326 处于萜类合酶(Terpene synth)结构域中, 在检测的植物 CPS 中(除 *OsCPS4* 外)该位点高度保守, 且与 V326 相邻的 P325 和 D327 也都是保守的。这暗示该区域可能对 CPS 的功能十分重要。蛋白结构解析结果表明虽然 V326 不参与底物的直接结合, 但其所处位置却与底物发生成环反应的位置十分接近^[20]。因此, V326M 突变有可能直接影响底物的成环反应效率。另外, 虽然缬氨酸与蛋氨酸的极性相同, 但蛋氨酸的侧链较缬氨酸侧链长, 除 V326 可能直接影响到 CPS 酶活外, 较长的侧链影响底物的结合效率或装载效率, 这也可能是导致 CPS 酶活下降的原因。除此之外, 经 AlphaFold 分析 CPS 的蛋白结构发现 V326 与 D110 可以形成一个氢键^[21], 该氢键可能对保持 CPS 酶活非常重要, 所以 V326M 会严重影响 CPS 酶活。

3.3 赤霉素是影响粮食产量的重要激素

赤霉素作为经典的植物激素之一, 参与植物的生长发育过程。带来第一次绿色革命的是利用水稻赤霉素合成基因 *sd1* 和小麦的信号转导基因 *Rht* 的优异等位变异, 其中 *sd1* 基因编码 GA20ox, 该基因的突变导致水稻中的赤霉素合成量减少, *sd1* 优异等位变异使水稻植株变矮、抗倒伏、高产、收获指数显著提高^[15,16]。但这并不表示赤霉素在粮食产量上的潜力已经被完全挖掘。Hu 等^[22]通过 CRISPR/Cas9

系统编辑水稻 *SD1* 基因, 得到一系列高产的 *sd1* 突变体。本研究发现的 V326 位点是一个影响 AtCPS 酶活的关键位点, 该位点的突变会显著降低体内赤霉素的合成量。因此, 可以通过定点编辑粮食作物中 *CPS* 基因的这一位点或其他一些影响 *CPS* 酶活的关键位点^[20,23], 实现粮食作物最适赤霉素合成量, 从而进一步提高粮食作物的收获指数和产量。

参考文献(References):

- [1] Hedden P, Sponsel V. A century of gibberellin research. *J Plant Growth Regul*, 2015, 34(4): 740–760.
- [2] Hernández-García J, Briones-Moreno A, Blázquez MA. Origin and evolution of gibberellin signaling and metabolism in plants. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, 109: 46–54.
- [3] Davière JM, Achard P. Gibberellin signaling in plants. *Development*, 2013, 140(6): 1147–1151.
- [4] Claeys H, De Bodt S, Inzé D. Gibberellins and DELLAs: central nodes in growth regulatory networks. *Trends Plant Sci*, 2014, 19(4): 231–239.
- [5] Hedden P, Thomas SG. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J*, 2012, 444(1): 11–25.
- [6] Salazar-Cerezo S, Martínez-Montiel N, García-Sánchez J, Pérez-Y-Terrón R, Martínez-Contreras RD. Gibberellin biosynthesis and metabolism: a convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiol Res*, 2018, 208: 85–98.
- [7] Sun TP, Kamiya Y. The *Arabidopsis* GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. *Plant Cell*, 1994, 6(10): 1509–1518.
- [8] Hedden P. The current status of research on gibberellin biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 2020, 61(11): 1832–1849.
- [9] Fleet CM, Yamaguchi S, Hanada A, Kawaide H, David CJ, Kamiya Y, Sun TP. Overexpression of AtCPS and AtKS in *Arabidopsis* confers increased ent-kaurene production but no increase in bioactive gibberellins. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 830–839.
- [10] Hayashi K, Kawaide H, Notomi M, Sakigi Y, Matsuo A, Nozaki H. Identification and functional analysis of bifunctional ent-kaurene synthase from the moss *Physcomitrella patens*. *FEBS Lett*, 2006, 580(26): 6175–6181.
- [11] Otomo K, Kenmoku H, Oikawa H, König WA, Toshima H, Mitsuhashi W, Yamane H, Sassa T, Toyomasu T. Biological functions of ent- and syn-copalyl diphosphate synthases in rice: key enzymes for the branch point of gibberellin and phytoalexin biosynthesis. *Plant J*, 2004, 39(6): 886–893.
- [12] Pristic S, Xu MM, Wilderman PR, Peters RJ. Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant Physiol*, 2004, 136(4): 4228–4236.
- [13] Toyomasu T, Usui M, Sugawara C, Kanno Y, Sakai A, Takahashi H, Nakazono M, Kuroda M, Miyamoto K, Morimoto Y, Mitsuhashi W, Okada K, Yamaguchi S, Yamane H. Transcripts of two ent-copalyl diphosphate synthase genes differentially localize in rice plants according to their distinct biological roles. *J Exp Bot*, 2015, 66(1): 369–376.
- [14] Xu MM, Hillwig ML, Pristic S, Coates RM, Peters RJ. Functional identification of rice syn-copalyl diphosphate synthase and its role in initiating biosynthesis of diterpenoid phytoalexin/allelopathic natural products. *Plant J*, 2004, 39(3): 309–318.
- [15] Gao SP, Chu CC. Gibberellin metabolism and signaling: Targets for improving agronomic performance of crops. *Plant Cell Physiol*, 2020, 61(11): 1902–1911.
- [16] Hedden P. The genes of the Green Revolution. *Trends Genet*, 2003, 19(1): 5–9.
- [17] Ling HQ, Bauer P, Berezcky Z, Keller B, Ganai M. The tomato *fer* gene encoding a bHLH protein controls iron-uptake responses in roots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(21): 13938–13943.
- [18] He J, Chen QW, Xin PY, Yuan J, Ma YH, Wang XM, Xu MM, Chu JF, Peters RJ, Wang GD. CYP72A enzymes catalyze 13-hydrolyzation of gibberellins. *Nat Plants*, 2019, 5(10): 1057–1065.
- [19] Shimane M, Ueno Y, Morisaki K, Oogami S, Natsume M, Hayashi K, Nozaki H, Kawaide H. Molecular evolution of the substrate specificity of ent-kaurene synthases to adapt to gibberellin biosynthesis in land plants. *Biochem J*, 2014, 462(3): 539–546.
- [20] Köksal M, Hu HY, Coates RM, Peters RJ, Christianson DW. Structure and mechanism of the diterpene cyclase ent-copalyl diphosphate synthase. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(7): 431–433.
- [21] Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, 596(7873): 583–589.
- [22] Hu XM, Cui YT, Dong GJ, Feng AH, Wang DY, Zhao CY, Zhang Y, Hu J, Zeng DL, Guo LB, Qian Q. Using CRISPR-Cas9 to generate semi-dwarf rice lines in elite landraces. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19096.
- [23] Köksal M, Potter K, Peters RJ, Christianson DW. 1.55Å-resolution structure of ent-copalyl diphosphate synthase and exploration of general acid function by site-directed mutagenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(1): 184–190.

(责任编辑: 储成才)