

GA2ox8 基因过量表达诱导蓝光下拟南芥光形态建成

李妍, 赵小英, 郭明, 李旭, 黄绿红, 唐冬英, 郭新红, 刘选明*

湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与材料研究中心, 长沙410082

摘要: 检测不同光照强度蓝光下, 过量表达 *GA2ox8* 基因的转基因植株光形态建成表型的结果表明, 突变体比各自的母本的下胚轴短, 茎尖角度和子叶开张度较大, 花青素和叶绿素的含量较高, 并且其差异与 *GA2ox8* 基因的表达量呈正相关。RT-PCR 检测光调节基因表达水平的结果显示, 暗培养条件下其突变体幼苗中的水平比各自的母本高, 蓝光下 *35S::GFP-GA2ox8-1*、*35S::GFP-GA2ox8-8* 与母本 *col-4* 之间差异不明显, 但 *scc7-D* 中的水平比母本 *cry1cry2* 高。这似乎说明, *GA2ox8* 基因过量表达可诱导蓝光下拟南芥幼苗光形态建成。

关键词: *GA2ox8* 基因; 蓝光; 拟南芥; 光形态建成

Overexpression *GA2ox8* Gene Induces *Arabidopsis* Photomorphogenesis under Blue Light

LI Yan, ZHAO Xiao-Ying, GUO Ming, LI Xu, HUANG Lü-Hong, TANG Dong-Ying, GUO Xin-Hong, LIU Xuan-Ming*

Bioenergy and Biomaterial Research Center, Institute of Life Science and Technology, Hunan University, Changsha 410082, China

Abstract: By analyzing photomorphogenic phenotypes in overexpression *GA2ox8* gene mutants under different influence rate of blue light, the results indicated that compared to their parents, mutants showed shorter hypocotyls, larger cotyledons opening and remaining hook angle, higher chlorophyll and anthocyanin contents under blue light, and these distinctions were positive related to *GA2ox8* gene expression. In agreement with this, RT-PCR analysis showed that light-dependent gene expression levels were higher in mutants than in their parents in the dark, and higher in *scc7-D* than in *cry1cry2* under blue light, but there was no obvious difference between *35S::GFP-GA2ox8-1*, *35S::GFP-GA2ox8-8* and *col-4* under blue light. It appeared that these results suggested overexpression *GA2ox8* gene may induce *Arabidopsis* seedlings photomorphogenesis under blue light.

Key words: *GA2ox8* gene; blue light; *Arabidopsis*; photomorphogenesis

赤霉素(gibberellins, GAs)调节高等植物生长发育的各个方面, 如下胚轴伸长、子叶开张、茎尖角度以及光调节基因的表达调控等。在已发现的126种赤霉素中, 只有 GA_1 、 GA_3 、 GA_4 和 GA_7 具有生物活性。参与 GAs 合成和代谢的酶有很多种, 如内根-贝壳杉烯合酶、依赖细胞色素 P450 的单加氧酶和双加氧酶, 其中双加氧酶 $GA20ox$ 和 $GA3ox$ 催化合成有生物活性的 GAs, 而 $GA2ox$ 则将有生物活性的 GAs 或其前体代谢为无生物活性的 GAs (Hedden 和 Phillips 2000; Lange 等 1994)。另有研究表明, GAs 参与拟南芥和大豆的暗形态建成, 抑制暗培养条件下幼苗的光形态建成 (Alabadi 等 2004)。众所周知, 植物蓝光受体隐花素(cryptochrome, CRY1 和 CRY2), 也参与光形态建成的各个方面, 如抑制下胚轴的伸长、去黄化、子叶伸展, 还调节光调节基因的表达以及花青素和叶绿素的积累(Ahmad 和 Cashmore 1993;

Lin 2002)。Folta 等(2003)认为, 拟南芥 CRY1 是通过控制GA和生长素的平衡或信号转导抑制下胚轴伸长的。我们实验室的研究结果也表明, 拟南芥 GA 平衡与隐花素介导的去黄化有关, *GA2ox8* 基因表达量增加, 能促使有活性 GA 转变为无活性 GA, 从而增强拟南芥幼苗下胚轴对光的敏感性 (Zhao 等 2007)。但还不清楚 GAs 是否影响蓝光下拟南芥幼苗的光形态建成以及编码 *GA2ox8* 的基因过量表达是否诱导拟南芥幼苗的光形态建成。

本文以蓝光受体突变体 *cry1cry2*、以 *cry1cry2* 为遗传背景的 T-DNA 插入突变体 *scc7-D*

收稿 2008-01-16 修定 2008-04-19

资助 国家自然科学基金(30600368, 30770200)和湖南省自然科学基金(05JJ30038)。

致谢 美国加州大学洛杉矶分校林辰涛先生曾给予指导。

* 通讯作者(E-mail: sw_xml@hnu.cn; Tel: 0731-8821721)。

(suppressors of *cry1cry2* 7-dominant)以及过量表达 *GA2ox8* 的转基因株系为材料,观察和检测分析了不同蓝光条件下这些突变体的光形态建成表型。

材料与方法

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型Col-4是哥伦比亚生态型, *cry1cry2*、*35S::GFP-GA2ox8-1*、*35S::GFP-GA2ox8-8* 转基因植株的遗传背景为Col-4, *scc7-D* 突变体是美国加州大学洛杉矶分校Lin实验室以*cry1cry2*为母本通过T-DNA插入突变筛选分离出来的。

拟南芥种子用70%的乙醇表面灭菌30 s, 0.1%氯化汞灭菌8 min, 然后用无菌水冲洗5次, 播种于含1.5%蔗糖的MS培养基上, 每个光处理播大约100粒种子。播种后将其放入4℃处理4 d, 先用白光处理12 h以促进种子萌发, 再转入光照强度分别为0.05、0.5、5和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的蓝光下, 22~23℃培养6 d, 测量下胚轴长度; 或转入光照强度为8 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的蓝光和22~23℃下培养6 d后, 以液氮速冻后储存于-80℃中以用于基因表达分析。

不同蓝光下培养6 d的幼苗, 用测量角度工具ImageJ软件(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)测得子叶和茎尖张开度(Neff和Chory 1998); 用直尺测量下胚轴长度。每个处理至少测15株幼苗, 测得的数据取平均值。

测定叶绿素含量时, 称取0.5 g 16 d苗龄幼苗, 用匀浆器匀浆后加入10 mL 80%的丙酮(加塞), 在暗中室温长时间提取, 直至材料发白, 过滤, 得到提取液, 用80%丙酮定容到50 mL。测波长633 nm和645 nm处吸收值, 用 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 表示。每个样品重复3次。

测定花青素含量, 称0.5 g 16 d苗龄的幼苗, 加入4.5 mL 1%盐酸(甲醇配置), 于4℃下轻摇过夜, 加入3 mL去离子水, 7.2 mL氯仿抽提离心(2 655 \times g, 30 min), 取上清液, 测波长535 nm和657 nm处吸收值。花青素含量由公式 $A_{535} - 0.25A_{657}$ 算得。每个样品重复3次。

采用安比奥公司生产的RNA提取试剂盒, 提取总RNA。按照Promega试剂说明书在总RNA溶液中加入适量的RNase free DNaseI得到去DNA的RNA, 约2 μg 的总RNA用M-MLV逆转录酶转

录得到cDNA。将cDNA稀释10倍, 20 μL PCR反应体系中加1 μL 稀释的cDNA模板。用RT-PCR定量检测 *CHS* (At5g13930)、*CAB2* (At1g29920)和*RBCS* (At1g67090) mRNA的水平, 以持家基因 *Actin2* (*ACT2*)的PCR产物作为分子内标。PCR反应程序为: 95℃预变性5 min; 接着95℃变性30 s, 55~60℃(因目的基因而异)退火30 s, 72℃延伸30 s; 循环数为24~35个(因目的基因而异)。反应结束后, 取16 μL PCR反应液, 在1.5%的琼脂糖凝胶上进行电泳。每个试验的RT-PCR反应至少重复3次, 然后选用一张电泳图。

PCR引物序列如下: *ACT2F* (5' CACTGTGCAATCTACGAGGGT-3'); *ACT2R* (5' CACAAACGAGGGCTGGAACAAG-3'); *CHSF* (5' CGGACATTTGAGGGAAGT-3'); *CHSR* (5' GAAGGCAAGCGTTCTGTT-3'); *CAB2F* (5' TGGGACACCGCTGGACTTTC-3'); *CAB2R* (5' CATAGCCAATCTTCCGTTCTT-3'); *RBCSF* (5' CGGATACATGATGGACG-3'); *RBCSR* (5' GTAGGCAATGAAACTGATG-3'); *GA2ox8F* (5' -CGGAATCAGAGGCATTAGC-3'), *GA2ox8R* (5' -CCACCTTTGGGTTTCGTCAT-3')。

结果与讨论

1 *GA2ox8*过量表达诱导蓝光下拟南芥光形态建成

首先以*cry1cry2*为背景的T-DNA插入突变体*scc7-D*为材料, 分析*GA2ox8*基因过量表达是否影响蓝光下拟南芥的光形态建成。*scc7-D*中T-DNA的右边界含有4个增强子且位于*GA2ox8*基因启动子的附近, 因此增强了突变体中*GA2ox8*基因的表达, 使该基因的mRNA水平比母本*cry1cry2*中高(Zhao等2007)。实验结果表明, *scc7-D*突变体的下胚轴在较弱蓝光下(0.05~5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)比*cry1cry2*短, 且随着光照强度的增强两者差异越明显, 而在黑暗中两者则无明显差异(图1), 这与Zhao等(2007)的结果一致, 说明*GA2ox8*基因过量表达可能会增强*scc7-D*对光的敏感性以及由此引起的生物活性GAs水平下降, 从而抑制下胚轴伸长。

为了证实这一推测, 我们又对以Col-4为遗传背景的*GA2ox8*基因过量表达株系*35S::GFP-GA2ox8-1*和*35S::GFP-GA2ox8-8*的表型进行了分

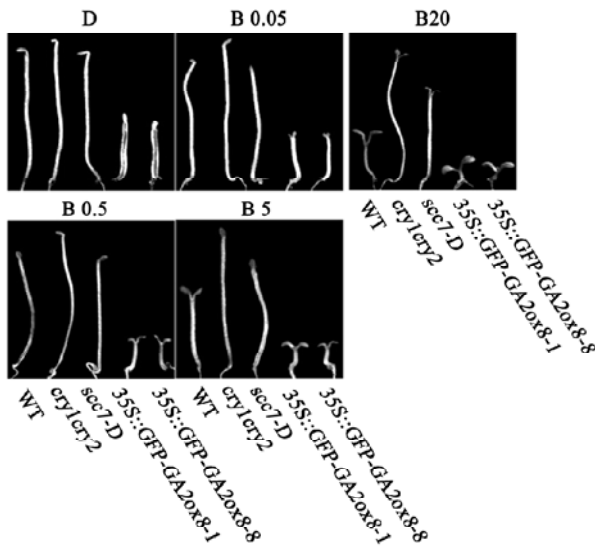


图1 不同光照强度蓝光下生长6 d的35S::GFP-GA2ox8-1、35S::GFP-GA2ox8-8、*sec7-D*、*cry1cry2*突变体和野生型(WT)幼苗

Fig.1 6-day-old seedlings of 35S::GFP-GA2ox8-1, 35S::GFP-GA2ox8-8, *sec7-D*, *cry1cry2* mutants and wide type (WT) grown under different influence rates of blue light

D、B 0.05、B 0.5、B 5 和 B 20 分别表示幼苗生长在黑暗下和光照强度分别为 0.05、0.5、5 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的连续蓝光条件。

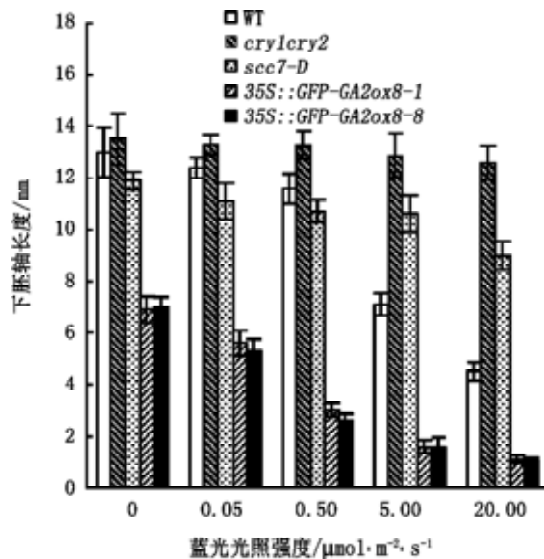


图2 不同光照强度蓝光下生长6 d的35S::GFP-GA2ox8-1、35S::GFP-GA2ox8-8、*sec7-D*、*cry1cry2*突变体和野生型(WT)幼苗的下胚轴长度

Fig.2 Hypocotyl lengths of 6-day-old seedlings of 35S::GFP-GA2ox8-1, 35S::GFP-GA2ox8-8, *sec7-D*, *cry1cry2* mutants and WT grown under different influence rates of blue light or in the dark

析。如图1和图2所示, 35S::GFP-GA2ox8-1和35S::GFP-GA2ox8-8转基因植株与*sec7-D*突变体一样, 其下胚轴对蓝光高度敏感, 突变体下胚轴的长度比母本野生型明显的短, 在暗培养条件下, 35S::GFP-GA2ox8-1和35S::GFP-GA2ox8-8转基因植株下胚轴也明显比母本野生型的短, 这与Alabadi等(2004)在黑暗中用多效唑(paclobutrazol, PAC)抑制活性GA合成的结果一致, 说明*sec7-D*的短下胚轴表型确实是由于GA2ox8基因过量表达所致。此外, 由于GA2ox8基因过量表达会导致GAs生物活性及其前体的水平下降(Schomburg等2003), 因而突变体幼苗的下胚轴短。

此外, 我们还检测了蓝光下不同基因型拟南芥幼苗的茎尖角度和子叶的张开度。结果显示暗培养条件下, 无论是野生型还是GA2ox8基因过表达突变体的6日龄幼苗子叶都未展开(图3-a), 但35S::GFP-GA2ox8-1和35S::GFP-GA2ox8-8转基因植株幼苗的茎尖角度明显大于野生型(图3-a), 表现为没有茎尖弯曲。随着蓝光光照强度的增强, 35S::GFP-GA2ox8-1和35S::GFP-GA2ox8-8转基因植株的子叶张开度逐渐变大, 而当蓝光光照强度为5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时, 野生型子叶虽然也张开, 但张开角度仍然小于35S::GFP-GA2ox8-1和35S::GFP-GA2ox8-8转基因植株。从图3-a中还可看出, 由于CRY1、CRY2基因的缺失, *cry1cry2*对不同强度蓝光均无响应, 表现出对蓝光的不敏感, 子叶始终没有张开。但不同光照强度蓝光下*sec7-D*的茎尖角度始终大于*cry1cry2*(图3-b)。由此可见, 过量表达GA2ox8基因不仅促进暗培养条件下幼苗的光形态建成, 而且还促进较弱蓝光下幼苗的光形态建成。这说明至少是在幼苗早期的阶段, 有生物活性的GA含量下降可导致蓝光下幼苗出现明显的光形态建成变化的表型。

此外, 实验中还观察到, 不同强度蓝光下*sec7-D*突变体幼苗的下胚轴比35S::GFP-GA2ox8-1和35S::GFP-GA2ox8-8转基因植株幼苗的要长(图1、2), 且*sec7-D*突变体幼苗子叶并未张开, 而35S::GFP-GA2ox8-1和35S::GFP-GA2ox8-8转基因植株幼苗子叶的张开度达到80~120度(图3-a), 这可能是前者的遗传背景为*cry1cry2*突变体, 此突变体是遗传背景为Col-4的蓝光受体缺失突变

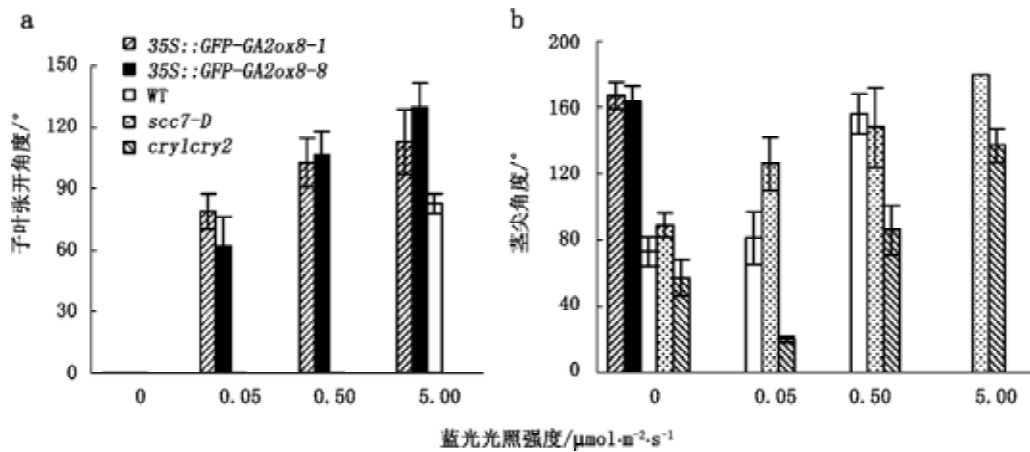


图3 不同光照强度蓝光下 *GA2ox8* 过量表达转基因株系幼苗子叶和茎尖的张开角度

Fig.3 Cotyledon opening and hook angel of *GA2ox8* overexpression seedlings under different influence rates of blue light

体,而后者的遗传背景为 Col-4,因此蓝光下 *scc7-D* 突变体幼苗对蓝光的敏感性弱。还有,在暗培养条件下, *scc7-D* 突变体幼苗的下胚轴比 *35S::GFP-GA2ox8-1* 和 *35S::GFP-GA2ox8-8* 转基因植株幼苗的也长(图 1),茎尖角度大约小 1 倍(图 3-b)。这可能是 *35S::GFP-GA2ox8-1* 和 *35S::GFP-GA2ox8-8* 转基因植株幼苗中 *GA2ox8* 基因的表达量明显比 *scc7-D* 突变体幼苗中高,因而有生物活性的 GA 含量低(Zhao 等 2007), *GA2ox8* 基因过量表达对幼苗光形态建成的诱导与 *GA2ox8* 基因的表达量呈正相关。

2 *GA2ox8* 过量表达诱导叶绿素和花青素的合成

植物见光后,通过光受体包括蓝光受体隐花素和红光受体光敏素感受光,并开始合成叶绿素

以进行光合作用,同时合成查尔酮和花青素等次生代谢物,因而植物叶片呈现紫色,这些都是植物光形态建成的典型表型(Kendrick 和 Kronenberg 1994; Wei 等 1994)。从图 1 可看出,随着蓝光光照强度的增强,幼苗表现出从黄化到深绿色的剧烈变化,并且同一光照强度下不同基因型拟南芥幼苗的颜色呈现出不同程度的差异。检测 16 日龄幼苗花青素和叶绿素含量的结果表明,蓝光下, *35S::GFP-GA2ox8-1* 和 *35S::GFP-GA2ox8-8* 转基因植株的叶绿素的含量比野生型明显高, *scc7-D* 比 *cry1cry2* 高(图 4-a)。花青素的含量与此显现出相同的变化趋势,从黑暗到 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的蓝光下 *35S::GFP-GA2ox8* 转基因植株株系中花青素含量明显增加,比野生型的高, *scc7-D* 突

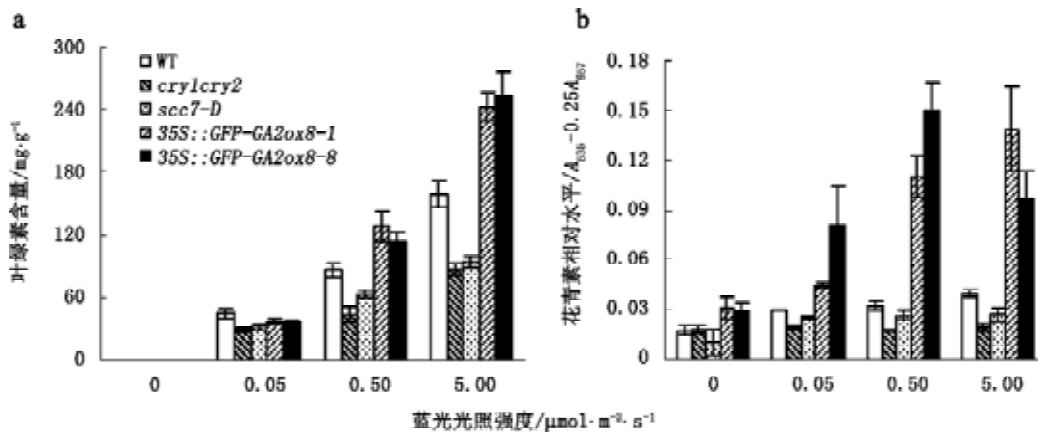


图4 不同光照强度蓝光下 *GA2ox8* 过量表达转基因株系 16 日龄苗的花青素和叶绿素含量变化

Fig.4 Changes of anthocyanin and chlorophyll contents of 16-day-old seedlings of *GA2ox8* overexpression lines under different influence rates of blue light

体的花青素含量则比 *cry1cry2* 高(图4-b)。这说明, *GA2ox8* 基因过量表达可诱导叶绿素和花青素合成, 并随着光照强度的增强这种诱导作用越明显, 因而可以认为不同光照强度蓝光下拟南芥呈现深绿色表型可能是叶绿素和花青素积累的结果, 与活性 GA 水平降低有关。

3 *GA2ox8* 过量表达诱导拟南芥光调节基因的表达

通常将光诱导基因的表达水平是否增加作为衡量幼苗光形态建成的标准(Ma 等 2003)。典型的光调节基因包括参与光合作用的核酮糖二磷酸羧化酶小亚基(*RBCS*)和叶绿素 A/B- 结合蛋白(*CAB*)基因, 以及参与花青素合成的查尔酮合成酶基因(*CHS*)。PCR 半定量分析的结果显示, 暗培养条件下 *35S::GFP-GA2ox8-1* 和 *35S::GFP-GA2ox8-8* 转基因植株中 *CHS*、*CAB2* 和 *RBCS* 基因的表达量比野生型中高(图5)。无论是暗培养还是不同光照强度蓝光下, *scc7-D* 中 *CHS*、*CAB2* 和 *RBCS* 基因的表达量比 *cry1cry2* 中高(图5), 与花青素和叶绿素的含量水平呈正相关(图4)。这表明 *GA2ox8* 基因的过量表达, 不仅可诱导暗培养拟南芥幼苗中光调节基因的表达, 而且可诱导蓝光下缺失蓝光受体的拟南芥幼苗的光调节基因的表达。野生型光调节基因 mRNA 表达量在黑暗中低, 这与 Alabadi 等(2004)和 Sun 等(1992)的研究结果一致。用 PAC 处理后拟南芥野生型暗培养下幼苗中光调节基因包括 *CAB2* 和 *RBCS* 基因的表达量比未经过 PAC 处理的高; 黑暗中 *gal-3* 突变体由于缺少 GA 合成途径而引起 *CAB2* 和 *RBCS* 基因表达增加。但

在蓝光下的表达水平与 *35S::GFP-GA2ox8-1* 和 *35S::GFP-GA2ox8-8* 转基因植株相差不多, 说明在蓝光受体存在条件下, 蓝光对这 3 个光调节基因表达的诱导作用可能比 *GA2ox8* 过量表达所引起的诱导作用大, 因而未观察到 GA 变化对光调节基因表达的影响。只有当光受体缺失时, *GA2ox8* 基因表达量增加所引起的 GA 含量降低对光调节基因的诱导作用可以被观察到。我们还将对此作进一步研究。

参考文献

- Ahmad M, Cashmore AR (1993). *HY4* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366: 162~166
- Alabadi D, Gil J, Blazquez MA, Garcia-Martinez JL (2004). Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol*, 134: 1050~1057
- Folta KM, Pontin MA, Karlin-Neumann G, Bottini R, Spalding EP (2003). Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyls growth by blue light. *Plant J*, 36: 203~214
- Hedden P, Phillips AL (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci*, 5: 523~530
- Kendrick RE, Kronenberg GHM (1994). Photomorphogenic mutants of higher plants. In: Kendrick RE, Kronenberg GHM (eds). *Photomorphogenesis in Plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 601~628
- Lange T, Hedden P, Graebe JE (1994). Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 8552~8556
- Lin C (2002). Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell*, 14 (Suppl): S207~S225
- Ma L, Zhao H, Deng XW (2003). Analysis of the mutational effects of the COP/DET/FUS loci on genome expression profiles reveals their overlapping yet not identical roles in regulating *Arabidopsis* seedling development. *Development*, 130: 969~981
- Neff MM, Chory J (1998). Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiol*, 118: 27~36
- Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JA, Amasino RM (2003). Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell*, 15: 151~163
- Sun T, Goodman HM, Ausubel FM (1992). Cloning the *Arabidopsis* *GAI* locus by genomic subtraction. *Plant Cell*, 4: 119~128
- Wei N, Kwok SF, von Arnim AG, Lee A, McNeills TW, Piekos B, Deng XW (1994). *Arabidopsis* *COP8*, *COP10*, and *COP11* genes are involved in repression of photomorphogenic development in darkness. *Plant Cell*, 6: 629~643
- Zhao XY, Yu XH, Foo E, Symons GM, Lopez J, Bendehakalu KT, Xiang J, Weller JL, Liu XM, Reid JB et al (2007). A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Physiol*, 145: 106~118

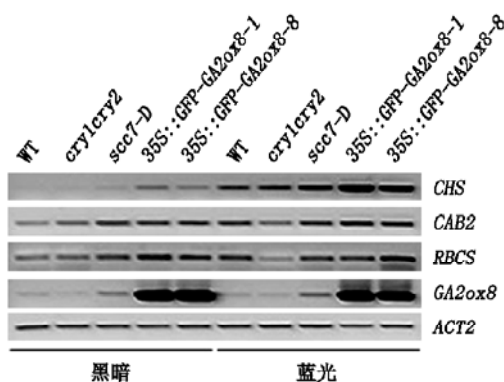


图5 蓝光下过量表达 *GA2ox8* 基因植株 *CAB*、*RBCS* 和 *CHS* 光调节基因 mRNA 的 RT-PCR 分析

Fig.5 The mRNA analysis of *CAB*, *RBCS*, and *CHS* gene using semi-quantitative PCR in *GA2ox8* overexpression seedlings under blue light