

油菜素内酯生物合成和代谢研究进展

李辉, 左钦月, 涂升斌*

中国科学院成都生物研究所农业生物技术研究中心, 成都610041

摘要: 油菜素甾醇是一类甾醇类植物激素, 它们对植物的生长发育起着重要的调控作用。经过四十余年的研究, 科学家在油菜素内酯的生理功能、结构、合成与代谢途径以及信号转导通路等方面取得了一系列的重大研究进展。本文结合作者在油菜素内酯合成和功能方面的研究工作, 着重对油菜素内酯的合成和代谢途径、其中的合成和代谢基因以及催化酶进行了总结, 并且综述了油菜素内酯合成和代谢调控等方面的研究进展, 最后对油菜素内酯的研究难题和应用前景进行了讨论和展望。

关键词: 油菜素内酯; 生物合成; 代谢

Advances in Brassinosteroid Biosynthesis and Metabolism

LI Hui, ZUO Qin-Yue, TU Sheng-Bin*

Agricultural Biotechnology Research Center, Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: Brassinosteroids (BRs) are a group of steroidal phytohormones which plays essential roles in the regulation of plant growth and development. After more than 40 years' studies, a series of important progresses have been made on the physiological roles, structure, biosynthesis and metabolism pathways, and signal transduction of brassinosteroid. Combined with our study on the functions and biosynthesis of BRs, this review aims to summarize the brassinosteroid biosynthesis and metabolism pathways, related BR biosynthetic and metabolic genes, and catalyzing enzymes. We further presented an up to date overview on the recent advances in the regulation of brassinosteroid biosynthesis and metabolism pathways, and finally discussed the research problems and application prospect of brassinosteroid.

Key words: brassinosteroids; biosynthesis; metabolism

油菜素甾醇(brassinosteroids, BRs)是继生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸和乙烯之后发现的第六大类植物激素, 对植物的生长发育具有重要的调控作用。Mitchell等(1970), Mitchell和Gregory (1972)首次发现油菜(*Brassica napus* L.)花粉的提取物中有一种能促进植物生长和大豆茎伸长的物质, 并称这种物质为油菜素(brassin)。后来, Grove等(1979)首次分离出该物质, 并鉴定了其分子结构, 认为这是一种甾醇类化合物, 将其正式定名为油菜素内酯(brassinolide, BL)。不久, Ishiguro等(1980)和Fung等(1980)两个研究团队分别人工合成了油菜素内酯。80年代以后, 研究者通过人工合成或从自然界分离、鉴定出众多的BR化合物。迄今为止, 在自然界中共分离、鉴定出超过70种的BR化合物, 统称为BRs (Bajguz 2007; Yang等2011)。BR化合物由包含A、B、C、D四个碳环的类固醇骨架和烷烃侧链组成, 它们的结构变化主要在于A、B碳环及烷烃侧链上取代基的不同, 其中生理活性

最强的是BL (Yokota 1997; Bajguza和Tretynb 2003)。BR具有非常广泛的生理功能, 主要具有调节植物根的生长、茎的伸长、叶的伸展、微管系统的发育、植物在黑暗条件下的形态建成、花粉管的生长、种子的发育等生理功能; 其最突出的生理功能是促进茎的伸长生长(Choe 2006; Khripach等2000)。

对BR合成和代谢途径的研究起始于上世纪80年代末(Park等1989), Sakurai和Fujioka (1997)用放射性标记的BR合成前体饲喂长春花悬浮细胞系, 使用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)测定细胞系中产生的BR化合物, 初步揭示出植物中的BR合

收稿 2015-07-23 修定 2015-10-19

资助 中国科学院“西部之光”项目(Y5C4201)、四川省产学研创新联盟合作项目(2012ZZ0004)、四川省国际科技合作与交流研究计划项目(2013HH0015)和国家自然科学基金项目(31501379)。

* 通讯作者(E-mail: tusb@cib.ac.cn; Tel: 028-82890319)。

成途径。从90年代中期开始,研究者对拟南芥、豌豆、西红柿和水稻等植物中发现的BR突变体进行了生理、生化、分子和遗传等方面的研究,这些研究极大地促进了我们对BR合成和代谢途径的认识(Altmann 1998a, b)。利用这些BR突变体,迄今为止,研究者已从植物中克隆了24个BR合成基因(表1)和6个BR代谢基因(表2),这些基因编码的酶大部分属于细胞色素P450蛋白家族,催化BR合成或代谢途径中的反应步骤(Bishop 2003; Pereira-Netto 2007)。对这些BR合成和代谢酶的功能和催化步骤进行验证和鉴定,研究者不仅验证了已知的BR合成和代谢途径,而且发现了一些新的BR合成和代谢通路。

1 油菜素内酯合成途径

BR合成由早期和晚期C-22氧化途径、早期和晚期C-6氧化途径、早期C-22氧化途径与晚期C-6氧化途径之间的合成捷径组成(图1)。Fujioka等(1997a)首先利用长春花(*Catharanthus roseus* L.)悬浮细胞系的BR代谢研究系统,初步揭示出长春花中存在晚期C-22氧化途径,以及下游的早期和晚期C-6氧化途径这两条相互平行的BR合成途径(Fujioka和Sakurai 1997; Sakurai和Fujioka 1997)。Noguchi等(2000)和Choi等(1996, 1997)研究团队随后证实在拟南芥、烟草和水稻中也存在这些BR合成途径。Shimada等(2001)发现早期和晚期C-6氧化途径中的某些步骤通过C-6氧化酶相互贯通。Fujioka等(2002)后来发现BR合成中除了晚期C-22氧化途径外,还存在另外一条与之平行的早期C-22氧化途径。后来在拟南芥中的研究发现晚期C-22氧化途径通过C-22羟基化酶贯通到早期C-22氧化途径(Choe等1998; Fujita等2006)。Ohnishi等(2006b)进一步发现早期C-22氧化途径通过C-23羟基化合成捷径联接到下游的晚期C-6氧化途径。因此, BR合成途径呈复杂的网络状结构。BR的前体依次通过C-22氧化途径和下游的C-6氧化途径,最终被转化为生物活性最强的BL。

1.1 C-22氧化途径

BR合成的前体来源于甲羟戊酸(mevalonic acid, MA)。甲羟戊酸在甾醇合成途径中,经过多步反应过程被转化为表甾醇(episterol),表甾醇经过5-脱氢表甾醇(5-dehydroepisterol)被转化为24-亚

甲基胆固醇(24-methylenecholesterol), 24-亚甲基胆固醇第24位碳原子(C-24)再通过还原反应被转化为BR合成的前体——油菜甾醇(campesterol, CR)。从油菜甾醇开始, BR的合成出现了分支,按照油菜甾醇第22位碳原子(C-22)上的氢键被羟基化的早晚,分为早期C-22氧化途径和晚期C-22氧化途径。首先发现的是晚期C-22氧化途径,油菜甾醇通过第4、5位碳原子(C-4, C-5)上双键的异构化作用,以及第3位碳原子(C-3)上羟基的脱氢作用,而被转化为4-烯-3-酮[(24R)-ergost-4-en-3-one, 4-en-3-one]。4-烯-3-酮第5位碳原子被加氢还原,而被转化为3-酮[(24R)-5 α -ergostan-3-one, 3-one]。3-酮第3位碳原子上的羰基被还原成羟基,而被转化为晚期C-6氧化途径中的起始物——油菜烷醇(campestanol, CN)。上述油菜甾醇依次经4-烯-3-酮、3-酮而到油菜烷醇的反应步骤被称为晚期C-22氧化途径。

Fujioka等(2002)在拟南芥中发现了晚期C-22氧化途径的中间产物所对应的C-22羟基化产物,据此推测在植物中存在和晚期C-22氧化途径平行的BR合成途径,他们通过BR代谢实验证明这条合成途径的确存在,并将其命名为早期C-22氧化途径。在早期C-22氧化途径中,油菜甾醇先通过C-22羟基化作用被转化为22-羟基-油菜甾醇(22-hydroxyCR),再依次经22-羟基-4-烯-3-酮(22-hydroxy-4-en-3-one)、22-羟基-3-酮(22-hydroxy-3-one)而被转化为晚期C-6氧化途径中的中间产物——6-脱氧长春花甾酮(6-deoxocathasterone, 6-deoxoCT)。拟南芥、水稻和西红柿中的研究发现晚期C-22氧化途径和早期C-22氧化途径并不是完全平行的。晚期C-22氧化途径中的中间产物能被一类C-22羟基化酶转化为早期C-22氧化途径中所对应的22-羟基化中间产物,从而联通晚期C-22氧化途径和早期C-22氧化途径(Choe等1998; Sakamoto等2005; Fujita等2006; Ohnishi等2006c)。

1.2 C-6氧化途径

油菜烷醇是C-6氧化途径的起始物,根据其第6位碳原子(C-6)上氢键被氧化的先后顺序,将C-6氧化途径分为早期C-6氧化途径和晚期C-6氧化途径。由于晚期C-6氧化途径中的中间产物浓度比早期C-6氧化途径中所对应的6-氧化产物的浓度要高得多,因此晚期C-6氧化途径被认为是主要的

表1 植物中的油菜素内酯合成酶及其催化反应步骤

Table 1 Brassinosteroid synthetases and their catalytic reaction steps in plants

BR合成酶	物种	催化反应步骤	参考文献
AtDWF7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	episterol→5-dehydroepisterol	Choe等1999
AtDWF5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	5-dehydroepisterol→24-methylenecholesterol	Choe等2000
AtDWF1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	24-methylenecholesterol→campesterol (CR)	Takahashi等1995; Choe等1999
OsBRD2	<i>Oryza sativa</i>	24-methylenecholesterol→campesterol (CR)	Hong等2005
PsLKB	<i>Pisum sativum</i>	24-methylenecholesterol→campesterol (CR)	Nomura等1999; Schultz等2001
ZmDWF1	<i>Zea mays</i>	24-methylenecholesterol→campesterol (CR)	Tao等2004
AtDWF6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	4-en-3-one→3-one; 22-hydroxy-4-en-3-one→22-hydroxy-3-one	Chory等1991; Li等1996; Fujioka等1997b, 2002; Noguchi等1999
PsDET2	<i>Pisum sativum</i>	4-en-3-one→3-one; 22-hydroxy-4-en-3-one→22-hydroxy-3-one	Nomura等2004
AtCYP90B1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CR→22-hydroxyCR; 4-en-3-one→22-hydroxy-4-en-3-one; 3-one→22-hydroxy-3-one; CN→6-deoxoCT; 6-oxoCN→CT	Choe等1998, 2001; Azpiroz等1998
OsCYP90B2	<i>Oryza sativa</i>	CR→22-hydroxyCR; 4-en-3-one→22-hydroxy-4-en-3-one; 3-one→22-hydroxy-3-one; CN→6-deoxoCT; 6-oxoCN→CT	Sakamoto等2005
OsCYP724B1	<i>Oryza sativa</i>	CR→22-hydroxyCR; 4-en-3-one→22-hydroxy-4-en-3-one; 3-one→22-hydroxy-3-one; CN→6-deoxoCT; 6-oxoCN→CT	Tanabe等2005
LeCYP90B3	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CR→22-hydroxyCR; 4-en-3-one→22-hydroxy-4-en-3-one; 3-one→22-hydroxy-3-one; CN→6-deoxoCT; 6-oxoCN→CT	Ohnishi等2006c
LeCYP724B2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CR→22-hydroxyCR; 4-en-3-one→22-hydroxy-4-en-3-one; 3-one→22-hydroxy-3-one; CN→6-deoxoCT; 6-oxoCN→CT	Ohnishi等2006c
ZmCYP724B3	<i>Zea mays</i>	CR→22-hydroxyCR; 4-en-3-one→22-hydroxy-4-en-3-one; 3-one→22-hydroxy-3-one; CN→6-deoxoCT; 6-oxoCN→CT	Wu等2008
AtCYP90C1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	22-hydroxyCR→22, 23-dihydroxyCR; 22-hydroxy-4-en-3-one→22,23-dihydroxy-4-en-3-one; 3- <i>epi</i> -6-deoxoCT→6-deoxoTY; 22-hydroxy-3-one→6-deoxo3DT; 6-deoxoCT→6-deoxoTE; CT→TE	Tsuge等1996; Kim等1998, 2005; Ohnishi等2006b
AtCYP90D1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	22-hydroxyCR→22, 23-dihydroxyCR; 22-hydroxy-4-en-3-one→22,23-dihydroxy-4-en-3-one; 3- <i>epi</i> -6-deoxoCT→6-deoxoTY; 22-hydroxy-3-one→6-deoxo3DT; 6-deoxoCT→6-deoxoTE; CT→TE	Kim等2005; Ohnishi等2006b
OsCYP90D2	<i>Oryza sativa</i>	22-hydroxyCR→22, 23-dihydroxyCR; 22-hydroxy-4-en-3-one→22,23-dihydroxy-4-en-3-one; 3- <i>epi</i> -6-deoxoCT→6-deoxoTY; 22-hydroxy-3-one→6-deoxo3DT; 6-deoxoCT→6-deoxoTE; CT→TE	Hong等2003; Li等2013
OsCYP90D3	<i>Oryza sativa</i>	22-hydroxyCR→22, 23-dihydroxyCR; 22-hydroxy-4-en-3-one→22,23-dihydroxy-4-en-3-one; 3- <i>epi</i> -6-deoxoCT→6-deoxoTY; 22-hydroxy-3-one→6-deoxo3DT; 6-deoxoCT→6-deoxoTE; CT→TE	Hong等2003; Li等2013
AtDWF3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	22-hydroxyCR→22-hydroxy-4-en-3-one; 22, 23-dihydroxyCR→22, 23-dihydroxy-4-en-3-one; 22-hydroxy-3-one→6-deoxoCT; 6-deoxoTE→6-deoxo3DT; TE→3DT	Szekeres等1996; Ohnishi等2012
AtCYP85A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6-deoxoTE→TE; 6-deoxo3DT→3DT; 6-deoxoTY→TY; 6-deoxoCS→6-hydroxyCS→CS	Shimada等2001; Kwon等2005; Kim等2005; Nomura等2005
LeCYP85A1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	6-deoxoTE→TE; 6-deoxo3DT→3DT; 6-deoxoTY→TY; 6-deoxoCS→6-hydroxyCS→CS	Bishop等1996, 1999; Shimada等2001
OsDWARF	<i>Oryza sativa</i>	6-deoxoTE→TE; 6-deoxo3DT→3DT; 6-deoxoTY→TY; 6-deoxoCS→6-hydroxyCS→CS	Hong等2002; Mori等2002
AtCYP85A2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	6-deoxoTE→TE; 6-deoxo3DT→3DT; 6-deoxoTY→TY; 6-deoxoCS→6-hydroxyCS→CS; CS→BL	Shimada等2001; Kwon等2005; Kim等2005; Nomura等2005
LeCYP85A3	<i>Lycopersicon esculentum</i>	6-deoxoTE→TE; 6-deoxo3DT→3DT; 6-deoxoTY→TY; 6-deoxoCS→6-hydroxyCS→CS; CS→BL	Nomura等2005

表2 植物中的油菜素内酯代谢酶及其催化反应步骤

Table 2 Brassinosteroid metabolic enzymes and their catalytic reaction step in plants

BR代谢酶	物种	催化反应步骤	参考文献
AtCYP734A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CS→26-hydroxyCS; BL→26-hydroxyBL	Neff等1999; Turk等2003
OsCYP734A2	<i>Oryza sativa</i>	CS→26-hydroxyCS; BL→26-hydroxyBL	Park等2006; Sakamoto等2011
OsCYP734A4	<i>Oryza sativa</i>	CS→26-hydroxyCS; BL→26-hydroxyBL	Park等2006; Sakamoto等2011
OsCYP734A6	<i>Oryza sativa</i>	CS→26-hydroxyCS; BL→26-hydroxyBL	Park等2006; Sakamoto等2011
LeCYP734A7	<i>Lycopersicon esculentum</i>	CS→26-hydroxyCS; BL→26-hydroxyBL	Ohnishi等2006a
AtUGT73C5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CS→CS-23-O-glucoside; BL→BL-23-O-glucoside	Poppenberger等2003, 2005

C-6氧化途径。在植物中,首先发现的是早期C-6氧化途径,油菜烷醇首先被氧化为6-氧油菜烷醇(6-oxoCN),6-氧油菜烷醇第22、23位碳原子(C-22, C-23)上的氢键先后被羟基化,依次生成长春花甾酮(cathasterone, CT)和茶甾酮(teasterone, TE)。茶甾酮第3位碳原子上的羟基被异构化,其中经历脱氢和还原两步反应,依次形成3-脱氢茶甾酮(3-dehydroteasterone, 3DT)和香蒲甾醇(typhasterol, TY)。接下来,香蒲甾醇第2位碳原子(C-2)上的氢键被羟基化而形成栗甾酮(castasterone, CS),栗甾酮经Bayer-Villager氧化反应最终形成生物活性最高的BL。

在长春花、拟南芥和水稻等植物中都发现了早期C-6氧化途径中间产物所对应的6-脱氧产物,暗示在植物中可能存在另外一条平行于早期C-6氧化途径的BR合成途径(Abe等1995; Griffiths等1995)。后来在长春花和拟南芥中进行的BR代谢实验证实了这一BR合成途径的存在,并将其命名为晚期C-6氧化途径(Noguchi等2000; Choi等1996, 1997)。与早期C-6氧化途径中的合成顺序相似,在晚期C-6氧化途径中,油菜烷醇第22、23位碳原子(C-22, C-23)上的氢键先后被羟基化,依次生成6-脱氧长春花甾酮(6-deoxocathasterone, 6-deoxoCT)和6-脱氧茶甾酮(6-deoxoteasterone, 6-deoxoTE)。6-脱氧茶甾酮第3位碳原子上的羟基被异构化,其中经历脱氢和还原两步反应,先后形成6-脱氧-3-脱氢茶甾酮(6-deoxo-3-dehydroteasterone, 6-deoxo3DT)和6-脱氧香蒲甾醇(6-deoxytyphasterol, 6-deoxoTY)。接下来,6-脱氧香蒲甾醇第2位碳原子上的氢键被羟基化而形成6-脱氧栗甾酮(6-deoxocastasterone, 6-deoxoCS)。6-脱氧栗甾酮第6位碳原子上的氢键先后经过羟基化和脱氢作用,依次被转化为6-羟基-栗甾酮(6-hydroxyCS)和栗甾酮。

早期C-6氧化途径和晚期C-6氧化途径并不是完全平行的,晚期C-6氧化途径通过一类C-6氧化酶联接到早期C-6氧化途径。拟南芥中的AtCYP85A1, 2, 水稻中的OsDWARF, 番茄中的LeCYP85A1, 3都属于这类C-6氧化酶。它们能催化晚期C-6氧化途径中BR化合物的第6位碳原子上氢键的氧化反应。这些C-6氧化酶基因相应的突变体表现出明显的矮化表型,说明C-6氧化酶在BR合成途径中起着关键的作用。Shimada等(2001)通过体外代谢实验证明AtCYP85A1和LeCYP85A1能将晚期C-6氧化途径中的6-脱氧茶甾酮、6-脱氧-3-脱氢茶甾酮、6-脱氧香蒲甾醇和6-脱氧栗甾酮分别催化为早期C-6氧化途径中的茶甾酮、3-脱氢茶甾酮、香蒲甾醇和栗甾酮。

1.3 早期C-22氧化途径和晚期C-6氧化途径之间的合成捷径

BR合成途径除了C-22氧化途径, C-6氧化途径外,还存在早期C-22氧化途径和晚期C-6氧化途径之间的合成捷径。拟南芥AtCYP90C1和AtCYP90D1是BR合成中的C-23羟基化酶。Ohnishi等(2006b)发现它们能将早期C-22氧化途径中的22-羟基-油菜甾醇和22-羟基-4-烯-3-酮通过C-23羟基化作用而分别转化为22, 23-双羟基-油菜甾醇(22, 23-dihydroxyCR)和22, 23-双羟基-4-烯-3-酮(22, 23-dihydroxy-4-en-3-one)。22, 23-双羟基-油菜甾醇和22, 23-双羟基-4-烯-3-酮随后被转化为晚期C-6氧化途径中的下游中间产物: 6-脱氧-3-脱氢茶甾酮。同时, 22-羟基-4-烯-3-酮的下游产物22-羟基-3-酮也能被AtCYP90C1和AtCYP90D直接催化为6-脱氧-3-脱氢茶甾酮。22-羟基-3-酮也可以先经过C-3还原作用被催化为3-表-6-脱氧长春花甾酮(3-*epi*-6-deoxoCT), 随后被AtCYP90C1和AtCYP-

P90D1催化为晚期C-6氧化途径中的下游中间产物: 6-脱氧香蒲甾醇。Sakamoto等(2012)报道AtCYP90D1在水稻中的同源蛋白OsCYP90D2/D2和OsCYP90D3也是C-23羟基化酶, 催化水稻中的C-23羟基化反应。最近, 作者通过遗传和生理生化研究也表明OsCYP90D2/D2是BR合成途径中的关键基因, 对水稻的株型起着重要的调控作用(Li等2013)。在上述合成通路中, 早期C-22氧化途径中的中间产物不需要经过整个晚期C-6氧化途径, 只需通过晚期C-6氧化途径中的部分下游产物就能合成BL。油菜素内酯的合成步骤也随之减少, 因此这些通路被称为早期C-22氧化途径和晚期C6氧化途径之间的合成捷径。

2 油菜素内酯代谢

当有生物活性的BR行使完生理功能后, 细胞内多余的BR也会影响植物正常的生长发育, 这些多余的BR会通过代谢途径被清除掉。虽然研究者通过BR在植物体内和体外的代谢实验发现了多种BR代谢产物, 并且发现BR在代谢中可能经历了脱氢、去甲基化、表象异构化、酯化、糖基化和羟基化等转化过程, 但我们现在对植物体内BR的详细代谢机理和相关反应的催化酶还知之甚少(Bajguz 2007)。羟基化和糖基化是植物体内两条重要的BR代谢途径(图1)。已有的研究报道发现拟南芥中的AtCYP734A1/BAS1、AtCYP72C1/SOB7/CHI2/SHK1、AtUGT73C5, 水稻中的OsCYP734A2, 4, 6, 西红柿中的LeCYP734A7都催化BR代谢反应, 它们都属于细胞色素P450蛋白家族(表2)。

2.1 CYP734As催化的油菜素内酯羟基化代谢

AtCYP734A1/BAS1是一种C-26羟基化酶, 通过催化栗甾酮和BL侧链上第26位碳原子(C-26)上氢键的羟基化反应, 促进栗甾酮和BL的代谢转换。AtCYP734A1/BAS1是通过在*phyB-4*背景下筛选下胚轴伸长受抑制的突变体而最早克隆得到的油菜素内酯代谢基因。在BR代谢突变体中, 如果代谢酶活性增强, 突变体也会因为BR代谢加快、导致植株中的BR浓度降低而表现出矮化、下胚轴缩短等表型。拟南芥中的PHYB基因编码光受体蛋白, 基因功能丧失导致*phyB-4*突变体幼苗在光下出现下胚轴异常伸长的表型(Reed等1993)。Neff等(1999)通过增强子激活标签从*phyB-4*背景中筛

选得到下胚轴生长受抑制的显性突变体*bas1-D* (*phyB activation-tagged suppressor1-dominant*), 进一步克隆到AtCYP734A1/BAS1基因。AtCYP734A1/BAS1基因编码细胞色素P450蛋白家族中的一种单加氧酶, 蛋白功能预测表明AtCYP734A1/BAS1可能与甾醇代谢相关。BR内源含量测定显示, 与野生型相比, *bas1-D*中的栗甾酮等BR含量显著降低。为了研究AtCYP734A1/BAS1在BR代谢中的功能, Neff等(1999)用BL及前体处理*bas1-D*及野生型幼苗, 发现*bas1-D*中转化的26-羟基-油菜素内酯(26-hydroxyBL)比野生型显著增多。这说明AtCYP734A1/BAS1可能具有羟基化酶的活性, 催化油菜素内酯→26-羟基-油菜素内酯的转化过程。Turk等(2003)用体外代谢实验证明了这一推测。他们发现AtCYP734A1/BAS1蛋白能将放射性氘标记的栗甾酮、BL分别催化为无生理活性的26-羟基-栗甾酮(26-hydroxyCS)和26-羟基-油菜素内酯。

水稻和西红柿中还发现了另外7个AtCYP734A1/BAS1的同源基因, 分别为水稻中的OsCYP734A2-6 (Park等2006; Sakamoto等2011)和西红柿中的LeCYP734A7, 8 (Ohnishi等2006)。Park等(2006)报道了OsCYP734A6的功能缺失突变体*bla2-1* (*bending lamina*)和*bla2-2*, 它们的叶倾角异常增大。水稻叶倾角的扩张是由叶枕处近轴面薄层细胞的伸长引起的, 而这一过程受薄层细胞内的BR浓度调控。因此, *bla2-1*和*bla2-2*的叶倾角异常增大表型, 可能是由于OsCYP734A6基因功能丧失而不能降解有生物活性的BR, 导致叶枕处近轴面薄层细胞中的BR积累引起的(Park等2006)。Sakamoto等(2011)发现OsCYP734A2、OsCYP734A4和OsCYP734A6蛋白是具有多个催化底物, 能够催化几种生化反应类型的BR代谢酶, 通过催化栗甾酮及其前体的代谢来调控植株体内的BR浓度。代谢实验证明CYP734As蛋白可以用C-22羟基化BR作为底物, 通过催化侧链26位碳原子上氢键的羟基化, 以及随后的两轮氧化反应, 将底物转化为C-26-羟基-BR、C-26-酮基-BR和C-26-羧基-BR, 促进BR的代谢。

Ohnishi等(2006)通过同源性比对分析, 在西红柿中分离到2个AtCYP734A1/BAS1的同源基因, 为LeCYP734A7和LeCYP734A8。其中LeCYP734A7基因的过表达植株表现出与BR缺陷突变体类似的

极端矮化表型。内源BR含量测定发现,与野生型相比, *LeCYP734A7*过表达植株中的栗甾酮和6-脱氧栗甾酮的含量显著下降,推测*LeCYP734A7*蛋白可能催化栗甾酮的代谢。体外代谢分析证明*LeCYP734A7*蛋白能将栗甾酮转化为26-羟基-栗甾酮,说明*LeCYP734A7*是BR代谢途径中有功能的C-26羟基化酶,参与西红柿中栗甾酮的羟基化代谢反应。

2.2 *AtCYP72C1/SOB7/CHI2/SHK1*介导的油菜素内酯代谢

*AtCYP72C1*是另外一个参与BR代谢的基因,属于细胞色素P450基因家族,它编码的蛋白和*AtCYP734A1*具有36%的氨基酸序列一致性。2005年,三个研究小组分别通过增强子激活标签克隆得到这个基因。Nakamura等(2005)首先筛选到激活标签显性突变体*chi2* (*chibi2*), Takahashi等(2005)和Turk等(2005)也分别筛选到*shk1-D* (*shrink1-D*)和*sob7* (*suppressor of phyb-4 7-D*)这两个激活标签显性突变体。*chi2*、*shk1-D*和*sob7*都具有BR缺陷突变体的典型特征。在*chi2*、*shk1-D*和*sob7*突变体中,带有花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子的激活元件插入到*AtCYP72C1*基因的启动子区域,引起基因过量表达,可能造成突变体中的BR代谢增强,从而导致了*chi2*、*shk1-D*和*sob7*的BR缺陷表型。由于*AtCYP72C1*和*AtCYP734A1*蛋白的氨基酸序列具有较高的一致性,因此*AtCYP72C1*被认为可能是BR代谢酶,可能具有和*AtCYP734A1*相似的C-26羟基化酶活性。

Nakamura等(2005)报道BL处理能互补*chi2*在黑暗条件下,下胚轴缩短的表型。在*chi2*、*shk1-D*和*sob7*突变体中, BL、栗甾酮以及C-6氧化途径中的BR中间产物浓度相比野生型显著降低(Nakamura等2005; Takahashi等2005; Turk等2005)。这些结果说明*AtCYP72C1*可能通过C-26羟基化酶活性参与BL、栗甾酮及上游BR中间产物的代谢过程。Turk等(2005)通过内源BR含量测定和拟南芥体内代谢实验发现, *AtCYP72C1*和*AtCYP734A1*蛋白存在功能冗余现象。虽然*AtCYP72C1*也参与BR代谢途径,但它并不能催化栗甾酮→26-羟基-栗甾酮以及油菜素内酯→26-羟基-油菜素内酯的羟基化反应过程。因此, *CYP72C1*并没有C-26羟基化酶活

性,它可能催化栗甾酮和BL其他碳原子上氢键的羟基化反应,也可能通过羟基化作用催化油菜素内酯前体的代谢。

2.3 *AtUGT73C5*介导的油菜素内酯糖基化代谢

糖基化在甾醇代谢中起着重要的作用。在昆虫和哺乳动物中,一类称之为尿苷二磷酸糖基转移酶——UGTs (UDP-glycosyltransferases)的代谢酶类催化甾醇的糖基化代谢过程(Turgeon等2003; Nakai等2004)。在植物中,虽然油菜素内酯的糖基化代谢机理还不太清楚,但是长春花悬浮培养细胞系中存在多种糖基化的栗甾酮和BL,这说明植物中的确存在油菜素内酯的糖基化代谢途径(Fujioka和Yokota 2003)。Poppenberger等(2003)用抗脱氧雪腐镰孢烯醇(eoxynivalenol)的酵母筛选系统从拟南芥cDNA库中分离到一个UDP糖基转移酶基因——*AtUGT73C5*。*AtUGT73C5*过表达植株出现矮化、叶片短圆等BR缺陷表型,并且体内的栗甾酮和其上游BR中间产物6-脱氧栗甾酮和香蒲甾醇的含量显著下降,外源BL处理能互补这些过表达植株的表型。这说明*AtUGT73C5*可能参与BR的代谢途径。在体内代谢试验中,当用栗甾酮和BL饲喂拟南芥幼苗后, *AtUGT73C5*过表达株系中的23-糖基-栗甾酮(CS-23-O-glucoside)和23-糖基-油菜素内酯(BL-23-O-glucoside)的含量相比野生型显著升高;而在*AtUGT73C5*干扰株系中却检测不到这两种代谢物的存在(Poppenberger等2005)。体内代谢实验证明了*AtUGT73C5*蛋白能催化栗甾酮和BL第23位碳原子的糖基化反应,使栗甾酮和BL通过糖基化代谢反应而失去生理活性。

3 油菜素内酯合成和代谢的调控

植株的生长发育过程是由各种激素及其他调节因子相互协调的精细调控过程。作为一种植物激素,油菜素内酯在植物生长发育和适应外界环境变化的过程中起着重要的调控作用。在不同的发育阶段和环境变化过程中,植物通过精细调控体内油菜素内酯的含量来调控植物的生长发育和适应环境的变化。当植物细胞中的BR过剩时,一方面细胞可以通过负反馈机制来降低BR合成的速率,另一方面可以通过代谢途径来降解过量的BR,从而精细调控细胞内的BR含量(图2)。

BR合成的负反馈调控是通过BR信号途径中的

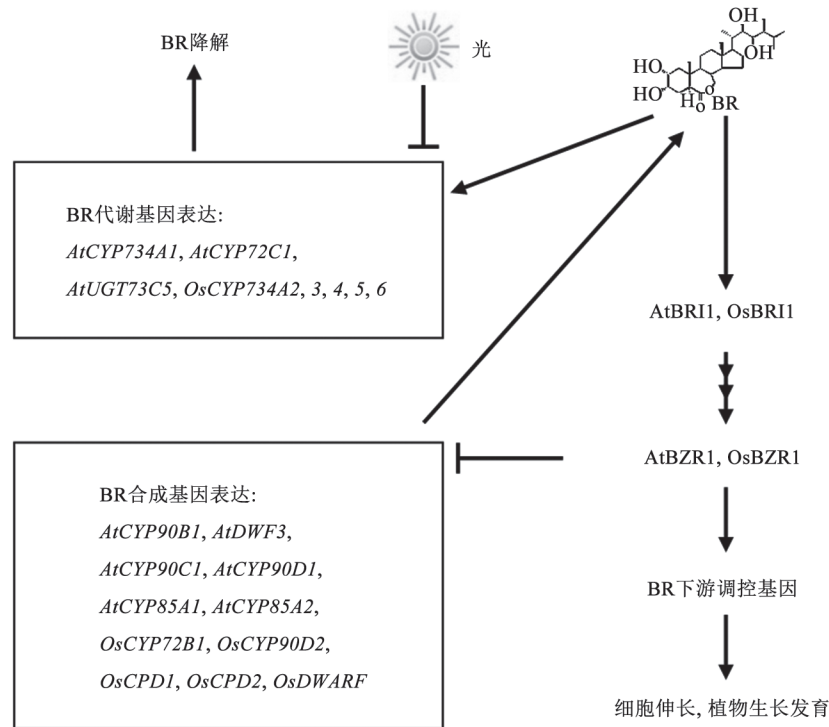


图2 油菜素内酯合成和代谢调控

Fig.2 Regulation of brassinosteroid biosynthesis and metabolism

调控元件来实现的。首先是油菜素内酯结合到细胞膜上的油菜素内酯受体激酶(*AtBRI1*, *OsBRI1*)上;然后*AtBRI1*或*OsBRI1*受体激酶通过一系列磷酸化信号传递过程,将信号传递到细胞核中;促进转录调控因子(*AtBZR1*, *OsBZR1*)在核内积累;*AtBZR1*或*OsBZR1*转录调控因子结合到下游BR调控基因的启动子区域,促进这些基因的表达;从而促进细胞的伸长和植物的生长发育等过程(Kim等2009)。当细胞中的油菜素内酯过量时,*AtBZR1*或*OsBZR1*结合到某些BR合成基因的启动子区域,通过抑制这些基因的表达,降低这些BR合成酶的含量,从而降低BR合成速率。已有的研究表明,拟南芥中的*AtCYP90B1*、*AtDWF3*、*AtCYP90C1*、*AtCYP90D1*、*AtCYP85A1*和*AtCYP85A2* (Choe等2001; Ma等2001; Bancoş等2002; Goda等2002; He等2005),水稻中的*OsCYP724B1* (Tanabe等2005)、*OsCYP90D2* (Hong等2003; Li等2013)、*OsCPD1*、*OsCPD2* (Sakamoto和Matsuoka 2006)和*OsDWARF* (Hong等2002; Mori等2002)等这些BR合成基因,都受BR的负反馈机制调控。

已有的研究发现BR代谢受反馈调节和光信号的调节。外源BR促进*AtCYP734A1* (Turk等2003)、*AtCYP72C1* (Nakamura等2005; Takahashi等2005; Turk等2005)、*AtUGT73C5* (Poppenberger等2005)和*OsCYP734A2*, 3, 4, 5, 6 (Kim等2009)等BR代谢基因的表达;而光则抑制这些BR代谢基因的表达。这说明BR和光信号对BR代谢途径的调控是相互拮抗的。当细胞内BR浓度过高时,细胞通过上调BR代谢基因的表达量,来增加这些BR代谢酶的含量,接下来通过促进BR代谢来降低细胞内的BR含量。在拟南芥中,相对黑暗条件下生长的幼苗,光照条件下生长的幼苗中的BR含量较高(Choe等2001)。这可能和光对BR代谢途径的调控有关,因为光抑制BR代谢基因的表达可能会降低BR的代谢速率,从而使BR在光照条件下生长的幼苗中的积累量增加。现在研究者对光信号如何调控BR代谢的详细机理还知之甚少,需要对这方面进行深入的研究。

4 讨论和展望

在发现BR之后的四十余年中,研究者在BR的

生理功能、结构、合成和代谢等研究方面取得了巨大的进展。生理方面的研究表明BR对植物的生长发育具有重要的调控作用。通过长春花悬浮细胞系中的BR代谢研究,研究者发现了BR合成的晚期C-22氧化途径和C-6氧化途径。而拟南芥、西红柿、豌豆和水稻等BR合成和代谢突变体的发现和研究,是BR合成和代谢研究过程的重大突破。对这些突变体进行的遗传、分子和生化方面的研究不仅证明长春花中发现的BR合成和代谢途径在拟南芥等植物中也普遍存在,而且还发现早期C-22氧化途径、早期C-22氧化途径和晚期C-6氧化途径之间的合成捷径以及BR羟基化和糖基化代谢途径。通过BR合成和代谢缺陷突变体,研究者克隆到了一系列的BR合成和代谢基因,并确定了其中部分BR合成和代谢酶的催化反应步骤,这进一步完善了BR合成和代谢途径。

另一方面,我们在BR合成、代谢及其调控等方面也存在一些尚待解决的问题。第一,在植物中可能还存在一些未知的BR合成和代谢途径,特别是BR代谢途径,需要进一步探索这些未知的BR合成和代谢途径。第二,在BR合成和代谢途径中,有些反应步骤的催化酶还未被发现。这需要进一步筛选新的BR合成和代谢突变体,分离和鉴定BR合成和代谢途径中新的基因和酶,分析这些酶的功能,以确定它们在BR合成或代谢中的催化反应步骤。第三,在一些已经分离的BR合成突变体中,虽然通过BR中间产物饲喂实验和测定突变体的内源BR中间产物,确定了这些突变体中BR的合成受阻步骤;但是还未克隆到对应的BR合成基因,也未能对相应BR合成酶的功能和催化反应步骤进行鉴定和验证。因此需要通过基因克隆、酶活检测和代谢实验确定这些BR合成突变体中对应酶的功能和催化步骤。第四,在有些BR合成突变体中,虽然分离了对应的BR合成基因,但是这些基因编码的BR合成酶的功能和催化步骤却是通过BR中间产物互补实验和测定突变体中的内源BR中间产物含量,或是通过它们已知的同源基因的功能推测而来。因此也需要通过酶活检测和代谢实验来进一步确定这些BR合成基因所编码酶的功能和催化步骤。第五,有些基因完全缺失功能的BR合成突变体并不表现出极端的形态和生长发育缺陷。除了

这些基因的同源基因可能部分弥补了缺失基因的功能外,还可能是其他的BR合成酶同时具有多种功能,能同时催化几个不同的反应步骤,因此可能部分互补了缺失的BR合成酶的功能。这些酶的功能和催化步骤比较复杂,需要进一步研究。第六,现在的研究表明BR的合成和代谢受光的调控,但是由于其中还有不少未知的调控因子尚未被发现,我们对光调控BR合成和代谢的机理还知之甚少。因此需要分离、鉴定更多新的调控因子,并对这些调控因子进行深入的研究,从而阐明光调控BR代谢的详细机理。第七,在水稻中,有些轻微矮化的BR合成突变体的叶倾角变小。在谷类作物中,叶倾角是一个影响株型的重要性状。在水稻中,虽然可以利用叶倾角变小的突变体,通过提高种植密度来提高生物量和产量。但是这些水稻BR突变体通常伴随着育性降低,谷粒变小的不利性状,使它们在育种中的应用受到限制。第八,由于BR在植物中的含量比较低,其生产成本要比赤霉素等其他植物生长物质高得多,因此BR在农业生产中并未得到大规模的应用。但是可以通过基因工程的方法,通过在农作物中过表达BR合成中的关键基因,来提高农作物中的内源BR含量,从而提高农作物的产量。这是一个经济有效的方法。在拟南芥、烟草和水稻中都有这方面的报道,但是需要在这方面进行更多的研究和探索。解决上述问题不仅能完善BR合成和代谢途径,深入阐述BR合成和代谢的调控机理,而且有利于BR在农业生产上的应用,最终达到提高农作物产量的目的。

参考文献

- Abe H, Takatsuto S, Okuda R, Yokota T (1995). Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, and typhasterol in the pollen of *Robinia pseudo-acacia* L. *Biosci Biotech Biochem*, 59 (2): 309~310
- Altmann T (1998a). A tale of dwarfs and drugs: brassinosteroids to the rescue. *Trends Genet*, 14 (12): 490~495
- Altmann T (1998b). Recent advances in brassinosteroid molecular genetics. *Curr Opin Plant Biol*, 1 (5): 378~383
- Azpiroz R, Wu Y, LoCascio JC, Feldmann KA (1998). An *Arabidopsis* brassinosteroid-dependent mutant is blocked in cell elongation. *Plant Cell*, 10 (2): 219~230
- Bajguza A, Tretynb A (2003). The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry*, 62 (7): 1027~1046
- Bajguz A (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant*

- Physiol Bioch, 45 (2): 95~107
- Bancoş S, Nomura T, Sato T, Molnár G, Bishop GJ, Koncz C, Yokota T, Nagy F, Szekeres M (2002). Regulation of transcript levels of the *Arabidopsis* cytochrome P450 genes involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 130 (1): 504~513
- Bishop GJ, Harrison K, Jones JD (1996). The tomato *dwarf* gene isolated by heterologous transposon tagging encodes the first member of a new cytochrome P450 family. *Plant Cell*, 8 (6): 959~969
- Bishop GJ, Nomura T, Yokota T, Harrison K, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Jones JD, Kamiya Y (1999). The tomato DWARF enzyme catalyses C-6 oxidation in brassinosteroid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (4): 1761~1766
- Bishop GJ (2003). Brassinosteroid mutants of crops. *J Plant Growth Regul*, 22 (4): 325~335
- Choe S, Dilkes BP, Fujoka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmann KA (1998). The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 10 (2): 231~243
- Choe S, Dilkes BP, Gregory BD, Ross AS, Yuan H, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tanaka A, Yoshida S et al (1999). The *Arabidopsis dwarf1* mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 119 (3): 897~907
- Choe S, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Tissier CP, Gregory BD, Ross AS, Tanaka A, Yoshida S, Tax FE et al (1999). The *Arabidopsis dwf7/ste1* mutant is defective in the Δ^7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 11 (2): 207~221
- Choe S, Tanaka A, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ross AS, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA (2000). Lesions in the sterol Δ^7 reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *Plant J*, 21 (5): 431~443
- Choe S, Fujioka S, Noguchi T, Takatsuto S, Yoshida S, Feldmann KA (2001). Overexpression of *DWARF4* in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant J*, 26 (6): 573~582
- Choe S (2006). Brassinosteroid biosynthesis and inactivation. *Physiol Plant*, 126 (4): 539~548
- Choi YH, Fujioka S, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A (1996). A brassinolide biosynthetic pathway via 6-deoxocastasterone. *Phytochemistry*, 43 (3): 593~596
- Choi YH, Fujioka S, Nomura T, Harada A, Yokota T, Takatsuto S, Sakurai A (1997). An alternative brassinolide biosynthetic pathway via C-6 oxidation. *Phytochemistry*, 44 (4): 609~613
- Chory J, Nagpal P, Petob CA (1991). Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 3 (5): 445~459
- Fujioka S, Sakurai A (1997). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Physiol Plant*, 100 (3): 710~715
- Fujioka S, Li J, Choi YH, Seto H, Takatsuto S, Noguchi T, Watanabe T, Kuriyama H, Yokota T, Chory J et al (1997). The *Arabidopsis deetiolfed2* mutant is blocked early in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 9 (11): 1951~1962
- Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S (2002). An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. *Plant Physiol*, 130 (2): 930~939
- Fujita S, Ohnishi T, Watanabe B, Yokota T, Takatsuto S, Fujioka S, Yoshida S, Sakata K, Mizutani M (2006). *Arabidopsis* CYP90B1 catalyses the early C-22 hydroxylation of C27, C28 and C29 sterols. *Plant J*, 45 (5): 765~774
- Fujioka S, Yokota T (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol*, 54 (1): 137~164
- Fung S, Siddall JB (1980). Stereoselective synthesis of brassinolide: a plant growth promoting steroidal lactone. *J Am Chem Soc*, 102 (21): 6580~6581
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S (2002). Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 130 (3): 1319~1334
- Griffiths PG, Sasse JM, Yokota T, Cameron DW (1995). 6-deoxytaphasterol and 3-dehydro-6-deoxoteasterone, possible precursors to brassinosteroids in the pollen of *Cupressus arizonica*. *Biosci Biotech Biochem*, 59 (5): 956~959
- Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC (1979). Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*, 281: 216~217
- Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, Inukai Y, Fujioka S, Shimada Y, Takatsuto S, Agetsuma M, Yoshida S, Watanabe Y et al (2002). 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. *Plant J*, 32 (4): 495~508
- Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, Uozu S, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2003). A rice brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf (d2)*, is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450. *Plant Cell*, 15 (12): 2900~2910
- Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2005). 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. *Plant Cell*, 17 (8): 2243~2254
- He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science*, 307 (5715): 1634~1638
- Ishiguro M, Takatsuto S, Morisaki M, Ikekawa N (1980). Synthesis of brassinolide, a steroidal lactone with plant-growth promoting activity. *J Chem Soc Chem Commun*, 20: 962~964
- Khripach V, Zhabinskii V, Groot A (2000). Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better Crops for the XXI century. *Ann Bot*, 86 (3): 441~447
- Kim GT, Tsukaya H, Uchimiya H (1998). The *ROTUNDIFOLIA3* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a new member of the cytochrome P-450 family that is required for the regulated polar elongation of leaf cells. *Gene Dev*, 12 (15): 2381~2391
- Kim GT, Fujioka S, Kozuka T, Tax FE, Takatsuto S, Yoshida S,

- Tsukaya H (2005). CYP90C1 and CYP90D1 are involved in different steps in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 41 (5): 710~721
- Kim TW, Hwang JY, Kim YS, Joo SH, Chang SC, Lee JS, Takatsuto S, Kim SK (2005). *Arabidopsis* CYP85A2, a cytochrome P450, mediates the Baeyer-Villiger oxidation of castasterone to brassinolide in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 17 (8): 2397~2412
- Kim TW, Guan S, Sun Y, Deng Z, Tang W, Shang JX, Sun Y, Burlingame AL, Wang ZY (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol*, 11 (10): 1254~1260
- Kwon M, Fujioka S, Jeon JH, Kim HB, Takatsuto S, Yoshida S, An CS, Choe S (2005). A double mutant for the *CYP85A1* and *CYP85A2* genes of *Arabidopsis* exhibits a brassinosteroid dwarf phenotype. *J Plant Biol*, 48 (2): 237~244
- Li H, Jiang L, Youn JH, Sun W, Cheng ZJ, Jin TY, Ma XD, Guo XP, Wang JL, Zhang X et al (2013). A comprehensive genetic study reveals a crucial role of *CYP90D2/D2* in regulating plant architecture in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol*, 200 (4): 1076~1088
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science*, 272 (5260): 398~401
- Ma L, Li J, Qu L, Hager J, Chen Z, Zhao H, Deng XW (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell*, 13 (12): 2589~2607
- Mitchell JW, Mandava N, Worley JF, Plimmer JR, Smith MV (1970). Brassins—a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature*, 225 (5237): 1065~1066
- Mitchell JW, Gregory LE (1972). Enhancement of overall plant growth, a new response to brassins. *Nature*, 239 (95): 253~254
- Mori M, Nomura T, Ooka H, Ishizaka M, Yokota T, Sugimoto K, Okabe K, Kajiwarra H, Satoh K, Yamamoto K et al (2002). Isolation and characterization of a rice dwarf mutant with a defect in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 130 (3): 1152~1161
- Nakai M, Shiotsuki T, Kunimi Y (2004). An entomopoxvirus and a granulovirus use different mechanisms to prevent pupation of *Adoxophyes honmai*. *Virus Res*, 101 (2): 185~191
- Nakamura M, Satoh T, Tanaka S, Mochizuki N, Yokota T, Nagatani A (2005). Activation of the cytochrome P450 gene, *CYP72C1*, reduces the levels of active brassinosteroids *in vivo*. *J Exp Bot*, 56 (413): 833~840
- Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Seto H, Tsubuki M, Honda T, Takatsuto S, Yoshida S et al (1999). *BASI*: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96 (26): 15316~15323
- Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Yoshida S, Li J, Chory J (1999). *Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholest-4-en-3-one to (24R)-24-methyl-5 α -cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 120 (3): 833~839
- Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA (2000). Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 124 (1): 201~209
- Nomura T, Kitasaka Y, Takatsuto S, Reid JB, Fukami M, Yokota T (1999). Brassinosteroid/sterol synthesis and plant growth are affected by *lka* and *lkb* mutations of pea. *Plant Physiol*, 119 (4): 1517~1526
- Nomura T, Jager CE, Kitasaka Y, Takeuchi K, Fukami M, Yoneyama K, Matsushita Y, Nyunoya H, Takatsuto S, Fujioka S et al (2004). Brassinosteroid deficiency due to truncated steroid 5 α -reductase causes dwarfism in the *lk* mutant of pea. *Plant Physiol*, 135: 2220~2229
- Nomura T, Kushiro T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yamaguchi S (2005). The last reaction producing brassinolide is catalyzed by cytochrome P-450s, CYP85A3 in tomato and CYP85A2 in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 280 (18): 17873~17879
- Ohnishi T, Nomura T, Watanabe B, Ohta D, Yokota T, Miyagawa H, Sakata K, Mizutani M (2006a). Tomato cytochrome P450 CYP734A7 functions in brassinosteroid catabolism. *Phytochemistry*, 67 (17): 1895~1906
- Ohnishi T, Szatmari AM, Watanabe B, Fujita S, Bancos S, Koncz C, Lafos M, Shibata K, Yokota T, Sakata K et al (2006b). C-23 hydroxylation by *Arabidopsis* CYP90C1 and CYP90D1 reveals a novel shortcut in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, 18 (11): 3275~3288
- Ohnishi T, Watanabe B, Sakata K, Mizutani M (2006c). CYP724B2 and CYP90B3 function in the early C-22 hydroxylation steps of brassinosteroid biosynthetic pathway in tomato. *Biosci Biotech Biochem*, 70 (9): 2071~2080
- Ohnishi T, Godza B, Watanabe B, Fujioka S, Hategan L, Ide K, Shibata K, Yokota T, Szekeres M, Mizutani M (2012). CYP90A1/CPD, a brassinosteroid biosynthetic cytochrome P450 of *Arabidopsis*, catalyzes C-3 oxidation. *J. Biol. Chem*, 287 (37): 31551~31560
- Park KH, Saimoto H, Nakagawa S, Sakurai A, Yokota T, Takahashi N, Syono K (1989). Occurrence of brassinolide and castasterone in crown gall cells of *Catharanthus roseus*. *Agric Biol Chem*, 53 (3): 805~811
- Park W, Kim HB, Kim WT, Park PB, An G, Choe S (2006). Rice *bending lamina 2 (bla2)* mutants are defective in a cytochrome P450 (CYP734A6) gene predicted to mediate brassinosteroid catabolism. *J Plant Biol*, 49 (6): 46~476
- Pereira-Netto AB (2007). Genes involved in brassinosteroids's metabolism and signal transduction pathways. *Braz Arch Biol Techn*, 50 (4): 605~618
- Poppenberger B, Berthiller F, Lucyshyn D, Sieberer T, Schuhmacher R, Krska R, Kuchler K, Glössl J, Luschnig C, Adam G (2003). Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 278 (48): 47905~47914
- Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, George GL, Vaistij FE, Hiranuma S, Seto H, Takatsuto S, Adam G, Yoshida S et al (2005). The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (42): 15253~15258
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter

- cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 5 (2): 147~157
- Sakamoto T, Morinaka Y, Ohnishi T, Sunohara H, Fujioka S, Ueguchi-Tanaka M, Mizutani M, Sakata K, Takatsuto S, Yoshida S et al (2005). Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nat Biotechnol*, 24 (1): 105~109
- Sakamoto T, Matsuoka M (2006). Characterization of *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM* homologs in rice (*Oryza sativa* L.). *J Plant Growth Regul*, 25 (3): 245~251
- Sakamoto T, Kawabe A, Tokida-Segawa A, Shimizu B, Takatsuto S, Shimada Y, Fujioka S, Mizutani M (2011). Rice CYP734As function as multisubstrate and multifunctional enzymes in brassinosteroid catabolism. *Plant J*, 67 (1): 1~12
- Sakamoto T, Ohnishi T, Fujioka S, Watanabe B, Mizutani M (2012). Rice CYP90D2 and CYP90D3 catalyze C-23 hydroxylation of brassinosteroids *in vitro*. *Plant Physiol Biochem*, 58: 220~226
- Sakurai A, Fujioka S (1997). Studies on biosynthesis of brassinosteroids. *Biosci Biotech Biochem*, 61 (5): 757~762
- Schultz L, Kerckhoffs LH, Klahre U, Yokota T, Reid JB (2001). Molecular characterization of the brassinosteroid-deficient *lkb* mutant in pea. *Plant Mol Biol*, 47 (4): 491~498
- Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, Kushihiro M, Takatsuto S, Nomura T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yoshida S (2001). Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, 126 (2): 770~779
- Szekeres M, Németh K, Koncz-Kálmán Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Rédei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell*, 85 (2): 171~182
- Takahashi N, Nakazawa M, Shibata K, Yokota T, Ishikawa A, Suzuki K, Kawashima M, Ichikawa T, Shimada H, Matsui M (2005). *shk1-D*, a dwarf *Arabidopsis* mutant caused by activation of the *CYP72C1* gene, has altered brassinosteroid levels. *Plant J*, 42 (1): 13~22
- Takahashi T, Gasch A, Nishizawa N, Chua NH (1995). The DIMINUTO gene of *Arabidopsis* is involved in regulating cell elongation. *Gene Dev*, 9 (1): 97~107
- Tanabe S, Ashikari M, Fujioka S, Takatsuto S, Yoshida S, Yano M, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Fujisawa Y et al (2005). A novel cytochrome P450 is implicated in brassinosteroid biosynthesis via the characterization of a rice dwarf mutant, *dwarf11*, with reduced seed length. *Plant Cell*, 17 (3): 776~790
- Tao YZ, Zheng J, Xu ZM, Zhang XH, Zhang K, Wang GY (2004). Functional analysis of *ZmDWF1*, a maize homolog of the *Arabidopsis* brassinosteroids biosynthetic DWF1/DIM gene. *Plant Sci*, 167 (4): 743~751
- Tsuge T, Tsukaya H, Uchimiyama H (1996). Two independent and polarized processes of cell elongation regulate leaf blade expansion in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Development*, 122 (5): 1589~1600
- Turgeon D, Carrier JS, Chouinard S, Bélanger A (2003). Glucuronidation activity of the UGT2B17 enzyme toward xenobiotics. *Drug Metab Dispos*, 31 (5): 670~676
- Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Denzel MA, Torres QI, Neff MM (2003). CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: an intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction. *Plant Physiol*, 133 (4): 1643~1653
- Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Wang H, Torres QI, Ward JM, Murthy G et al (2005). BAS1 and SOB7 act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant J*, 42 (1): 23~34
- Wu CY, Trieu A, Radhakrishnan P, Kwok SF, Harris S, Zhang K, Wang J, Wan J, Zhai H, Takatsuto S et al (2008). Brassinosteroids regulate grain filling in rice. *Plant Cell*, 20 (8): 2130~2145
- Yang CJ, Zhang C, Lu YN, Jin JQ, Wang XL (2011). The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development. *Mol Plant*, 4 (4): 588~600
- Yokota T (1997). The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids. *Trends Plant Sci*, 2 (4): 137~143