

赤霉素信号转导途径中 *SPINDLY* 基因及其在大豆中的研究

赵建刚, 赵琳, 张彤, 李文滨

(东北农业大学 大豆研究所, 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: *SPINDLY* (*SPY*) 作为植物一个负调控因子参与 GA 的信号转导, 在植物生长发育的整个过程中发挥着至关重要的作用。其 N-端为 34 肽重复结构 (TPR), 主要介导蛋白间的相互作用。C-端为氧连 N-乙酰葡萄糖转移酶 (OGT) 结构域, 通过其酶活性调控 GA 信号转导过程。文章综述了赤霉素信号转导途径及其中间组分, 以及 *SPINDLY* 基因的研究进展。主要包括 *SPINDLY* 基因的结构, 基因在生长发育中的作用和大豆中 *SPINDLY* 基因的研究及展望等。

关键词: 赤霉素信号转导; *SPINDLY* 基因; 大豆

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)04-0689-04

Advances on the Study of *SPINDLY* Gene in GA Signal Transduction in Soybean and Other Plants

ZHAO Jian-gang, ZHAO Lin, ZHANG Tong, LI Wen-bin

(Soybean Research Institute, Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: Many results have shown *SPINDLY* (*SPY*) is involved in gibberellin (GA) signaling as a negative regulator, it plays an important role in the growth and development stage in higher plants. The N terminus of *SPY* contains a protein-protein interaction domain consisting of 10 tetratricopeptide repeats (TPRs). The C terminus of *SPY* contains O-linked-N-acetylglucosaminetransferase (OGT) domain that catalyzes GA signaling transduction pathway. In this paper, research on the GA signal transduction, GA response pathway components and *SPINDLY* were reviewed. It included the structure of *SPINDLY*, its regulation mechanism in diverse developmental processes and research on *SPINDLY* in soybean.

Key words: GA signal transduction; *SPINDLY* gene; Soybean

SPINDLY 为拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 *SPINDLY* (*SPY*) 基因的产物, 是最先获得的 GA 信号转导组分^[1], 在植物的种子萌发, 茎的生长, 开花诱导过程中发挥着重要作用。因此研究大豆 *SPINDLY* 基因的生物学功能, 对了解大豆开花具有重要的理论意义和农业生产应用价值。

1 赤霉素调控模式研究进展

赤霉素的生理功能主要是依靠赤霉素在植物体内的信号转导来实现的。赤霉素的信号转导过程中主要有两类调控因子, 一类是反向调控因子, 如 RGA、GAI (Repressor of GA/GA-insensitive)、*SPY* (*SPINDLY*)、SHI (short internodes); 另一类是正向作用因子, 如水稻中的 *DWARF1* (*D1*) 基因, 马铃薯的 *PHOR1*、*MYB* 转录因子、*GID1*^[2-3]。

1.1 赤霉素受体

2005 年, GA 受体的研究取得了重大突破, Ueguchi-tanaka 等^[4] 在水稻中鉴定了一种 GA 不敏感的矮化突变体 *GID1*。进一步研究证明, *GID1* 蛋白位于 GA 信号转导途径的起始, 接收 GA 信号, 与具生物活性的 GA 有很强的亲和性。*GID1* 蛋白是由 *GID1* 基因编码的, 含有 354 个氨基酸, 与对激素敏感的脂肪酶 (hormone-sensitive lipases, HSL) 类似, 定位于核内。在有生物活性的 GA 存在的情况下, *GID1* 蛋白接收 GA 信号并与其结合, 从而促进与 SLR1 蛋白的相互作用, 启动 SLR1 蛋白通过 SCF^{GID2} 泛素化降解途径, 将信号传递到 DELLA 蛋白, 从而诱发一系列下游反应^[4]。

1.2 赤霉素信号转导途径中的正向调控因子

LEAFY (*LFY*) 是花分生组织的属性基因, 是开花途径中的整合子之一, 也是控制营养生长向生殖

收稿日期: 2011-05-13

基金项目: 大豆生物学教育部重点实验室开放基金资助项目 (SB08A04); 国家自然科学基金资助项目 (30971810); 农业部大豆产业技术研发中心资助项目; 黑龙江省教育厅创新团队资助项目。

第一作者简介: 赵建刚 (1986-), 男, 在读硕士, 研究方向为大豆生物技术。E-mail: jiangangzhao@yahoo.com.cn。

通讯作者: 李文滨 (1958-), 教授, 博士生导师, 从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

生长转变的一个重要基因^[5]。GA通过作用 *LFY* 启动子的一个顺式作用元件而激活 *LFY* 的表达^[6]。已鉴别, GA4 是调节拟南芥 *LFY* 转录的活性赤霉素^[7]。

促花因子1 (flowering promoting factor1, *FPF1*) 是从白芥、拟南芥中克隆到的一个与 GA 诱花途径相关的促花基因, 它在花转变时的茎端分生组织中最早表达(在 *LFY* 表达量增加之前), 组成型表达 *FPF1* 的拟南芥在不同长度光照下都引起提早开花, 因此推测 *FPF1* 是赤霉素信号转导元件, 并参与 GA 诱导的花转变^[8]。

1.3 赤霉素信号转导途径中的反向调控因子

DELLA 蛋白是一类转录调节因子, 它定位于核内, 在水稻和拟南芥等植物体中起负反馈调节作用。DELLA 蛋白属于 GRAS [GAI (gibberellin-insensitive)、RGA (repressor of gal-3) 和 SCR] 家族, 包括水稻的 SLR1 (slender rice1)、拟南芥的 RGA 和大麦的 SLN (slender1)^[9]。DELLA 蛋白作为 GA 信号转导的阻遏物, 其在静息状态下大量积累在植物细胞核内, 而经外源 GA 处理后会迅速降解。

SHI 是 GA 信号转导的负调控因子, 其突变体表型为半矮化, SHI 蛋白含环状的锌指区基序。过量表达 SHI 会导致 GA 缺失性状的产生, 其中包括晚花^[10]。

SPINDY (*SPY*) 基因编码一个氧连 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 (O-lined GlcNAc transferase, OGT), 其 N 端含有 10 个 34 肽重复结构域 (tetratricopeptide repeats, TPR), *SPY* 在植物的整个生命过程中所有器官都有表达, 作为植物一个的负调控因子参与 GA 的信号转导^[11]。

2 *SPINDLY* 基因的研究概况

2.1 *SPY* 基因的结构及表达调控

Jacobsen 等^[12] 利用 T-DNA 标签法在拟南芥中最先克隆得到 *SPY* 基因, 通过对种子用多效唑 (paclobutrazol) 处理萌发筛选得到。*SPY* 基因 cDNA 全长约 3.5 kb, 编码含 914 个氨基酸的蛋白质。*SPY* 基因 C 端为蛋白质非编码区, N 端编码 TPR 结构域具有 N-乙酰葡萄糖胺转移酶活性。通过筛选得到的 14 个 *spy* 突变体表明, 这些突变集中在其中 3 个 TPR 结构域以及 C 端为蛋白质催化结构域。通过对这些突变体的表型分析表明: TPR 6, 8, 9 以及 C 端为蛋白质催化结构域对于由赤霉素调节的茎伸长, 花诱导以及可育性发挥着重要的作用。这表明 TPR 6, 8, 9 以及 C 端为蛋白质催化结构域是 *SPY* 在赤霉素途径中发挥作用不可缺少的部分。

到目前为止, 通过对种子用多效唑 (paclobutrazol) 处理萌发筛选, 在拟南芥 *SPY* 座位至少筛选出了 14 种突变。*spy* 突变体的表型包括有提早开花、叶色淡绿、部分雄性不育和单性结实等, 这些表型与用 GA 反复喷施的野生型植株相同, 但表现程度较轻。目前所知 GA 缺乏引起的表型都不同程度地受到 *SPY* 突变的抑制^[1, 11-12]。

通过构建 *SPY::GUS* 报告基因表明: *SPY* 在植物的整个生命周期与各个器官都呈组成型表达。而 *SPY::GFP* 报告基因蛋白在细胞质与细胞核部位都有出现, 但大部分出现在后者。*SPY* 基因的转录不受 GA 的调节, 或影响微弱, 可能受遗传背景的影响, 在 No-O 生态型植株经 GA₃ 处理对 *SPY::GUS1* 的表达具有诱导作用, 但这在 Columbia 型植株上没有效果。通过萘乙酸、苄氨基嘌呤和脱落酸及黑暗、高温和低温等处理对植物 *SPY* 基因的表达也没有作用^[11], 这些表明 *SPY* 可能受到 GA₃ 的表达调控。而这一结论与通过赤霉素处理诱导 GAI, RGA 等的表达相一致, 从而说明 GA 作用与 GA 反应可能处于一种反馈调节中。

2.2 *SPY* 蛋白结构

SPINDLY (*SPY*) 基因编码一个氧连 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 (O-lined GlcNAc transferase, OGT), 其 N-端为 34 肽重复结构 (TPR), 主要介导蛋白与蛋白的相互作用。TPR 介导的蛋白与蛋白的相互作用对于植物的信号转导有重要的作用, 因为体外表达 *SPY* 的 TPR 结构域可以影响 GA 反应。C-端为氧连 N-乙酰葡萄糖转移酶 (OGT) 结构域, 可能通过其酶活性调控 GA 信号转导过程^[11], RGA、GAI 参与 GA 信号转导途径的组分有可能是 *SPY* 相互作用与修饰的对象^[14], RGA、GAI 的蛋白序列中具有丰富的 Ser 和 Thr2 种氨基酸, 而这 2 种氨基酸是氧连 N-乙酰葡萄糖胺转移酶的作用位点。

2.3 *SPY* 在 GA 信号转导中的功能

目前已经证明 *SPY* 参与 GA 反应途径, 在筛选得到的拟南芥突变体中, 都不同程度地抑制因 GA 缺乏造成的表型变化, 同时 *spy* 突变体的表型与用 GA 反复喷施的野生型植株相同, 但表现程度较轻, 因此, *SPY* 被认为是 GA 信号转导途径中的一个负调节子^[15]。

GA 通过增加细胞的大小与个数来调节植物茎的伸长, 在 GA 缺乏的 GAL-3 突变体中, 所有的 *spy* 突变体茎都增长, 细胞的大小与个数都有所增加。但是在所有的 *spy* 突变体节间距在减小, 而节的数目在增多, 这表明 *SPY* 对于茎的调节是复杂的, 而不能简单的说仅仅通过 GA 信号转导途径来调节。

在 *RGA-17* 突变体中 *SPY* 也可以抑制植株的矮化,虽然目前 *SPY* 作用的目标蛋白还没被确定,但 *DELLA* 蛋白很可能是 *SPY* 相互作用与修饰的对象^[15]。

GA 对于花的诱导及生长起着重要的作用,GA 缺乏 *GAL-3* 突变体是雄性不育的,但是这种不育性可以由 *SPY* 突变得以抑制,而 *spy* 突变体的结实率都有所提高,但是 *TPR6,8,9* 以及 C 端对于调节植物的结实是必不可少的。GA 缺乏的 *GAL-3* 突变体在长日条件下开花很晚,而在短日条件下基本上不开花。而大部分 *spy* 突变体开花时间都缩短,这些表明 *SPY* 是 GA 信号转导途径中的一个负调节子。

作为 GA 信号转导途径的一个负调节子,大部分 *SPY* 定位于细胞核。影响 *TPR* 结构域或 *OGT* 催化结构域的错义突变都能够影响 GA 的信号转导^[12],表明 *SPY* 正常功能的发挥包括了与其它核蛋白相互作用和(或)对这些蛋白进行氧连 N-乙酰葡萄糖胺修饰的过程。

2.4 *SPY* 在光周期诱导途径中的作用

SPY 蛋白 N 末端的 *TPRs* 区域与蛋白之间互作有关,经酵母双杂交筛选法表明,光周期诱花途径中 *GI* 基因的蛋白能够与 *TPRs* 结构域作用,*SPY* 可能参与长日照诱花途径;在长日照诱花途径中 *gi-2* 可以引起晚花,同时降低 *CO* 和 *FT* 的表达,而 *spy-4* 突变体能够部分抑制 *gi-2* 植株中 *CO* 和 *FT* 的 RNA 丰度降低,也抑制 *gi-2* 的晚花表型。*spy* 突变体可以抑制由于 *gi* 突变引起的表型变化,包括在红光条件下下胚轴增长,晚花,以及 *CO* 和 *FT* 的 mRNA 丰度的降低,由此推断 *SPY* 在 *GI* 的下游和 *CO* 的上游起作用,*GI* 负调控 *SPY*,*SPY* 负调控 *CO*。这些表明 *SPY* 与花转变、花分生组织属性的建立密切相关^[16]。

GI 在长日照条件下作为 *CO* 和 *FT* 的上游,对于 *CO* 和 *FT* 的积累发挥着重要的作用,在 *gi-2* 突变体中 *spy* 突变可以抑制 *CO* 和 *FT* 的 mRNA 丰度的降低。同时 *spy* 突变对于 *gi-4* 晚花的抑制作用比 *co-2* 和 *ft-1* 更加有效^[9]。

同时 *SPY* 还受到生物节律钟的调节,在 *spy-3*、*spy-4*、*spy-5* 突变体中生物周期延长,而在 *35S-SPY* 中生物周期相应的缩短^[9],这表明 *SPY* 在光周期途径中发挥着重要的作用。

3 *SPINDLY* 基因在大豆中的研究

东北农业大学大豆生物学重点实验室克隆得到了大豆的 *SPINDLY* 基因,与其它物种的 *SPINDLY* 基因比对,得到了其保守的 *TPR* 结构域,大豆

SPINDLY 与拟南芥的同源率为 74.81%。初步确定 *SPINDLY* 表达的蛋白定位于细胞核中,可能与它作为转录因子的作用有关。通过对不同基因型植株株高,花期等的表型的差异分析,证明了大豆 *SPINDLY* 基因是作为 GA 信号转导途径的一个负调节子。通过研究 *Constans* 和 *Ft* 基因在不同基因型植株的表达表明:*SPINDLY* 基因光周期诱导途径中也发挥着一定的作用,但是究竟是在长日照还是在短日途径中发挥作用尚没有定论。这表明 *SPINDLY* 可能通过多种途径调节植物的开花,而不只通过赤霉素信号转导途径。同时预测了该基因的启动子序列,通过转基因拟南芥 *GUS* 染色表明其具有启动功能(待发表)。

随着大豆基因组测序工作的完成,通过序列比较的手段可以全面快速的挖掘大豆中和开花相关的基因,但是也有一定的缺点。首先,运用同源序列克隆法得到的 *SPINDLY* 基因与 *SPINDLY* 基因存在 3 种可能关系:1. *SPINDLY* 基因同源序列与 *SPINDLY* 基因无关;2. *SPINDLY* 基因同源序列与 *SPINDLY* 基因紧密连锁;3. *SPINDLY* 基因同源序列本身就是 *SPINDLY* 基因或为其假基因的一部分。其次,开花基因在大豆中多成簇或以家族基因的形式存在,难以确定克隆的片段是否为目的基因片段,因此克隆得到的基因必须进行转基因检验,以最终确定是否为真正的开花相关基因。通过同源序列法克隆得到的大豆 *SPINDLY* 基因通过转基因检验验证其功能表明:*SPINDLY* 基因同源序列本身就是 *SPINDLY* 基因。第三,在进行同源性比对的过程中发现,*SPINDLY* 基因在大豆中以家族基因的形式存在,作者只是克隆得到其中的 1 个基因。

通过基因的超表达 (gain-of-function) 从表型分析基因的功能是基因功能研究的基本方法。但是大豆现有遗传转化体系仍然存在周期长、转化率低、稳定性和重复性差、基因型限制等突出问题,转化效果极大地依赖于物种、基因型、外植体以及其它一些未知因素。因此作者通过模式植物拟南芥来研究基因功能。拟南芥具有形态个体小、生长周期快、种子多、形态特征简单、基因组小、转基因技术成熟等优点,为研究大豆基因功能提供了便利。但是也存在一定的缺点:首先大豆基因在拟南芥细胞中的表达是基因功能研究的关键。有时转基因在拟南芥受体植株内的遗传与表达往往事与愿违,转基因表达水平很不稳定,常常不表达或表达水平降低,这种现象便是转基因沉默现象。采用农杆菌介导法产生的拷贝数相对较少,可以在一定程度上避免这个问题。同时应该避免基因间的同源性,在

构建载体时尽量降低所设计的序列与内源基因的同源性,以减少和避免配对。其次大豆 *SPINDLY* 基因只有通过大豆转基因技术才能充分研究大豆中该基因完整的功能,因此转拟南芥只能初步的判断 *SPINDLY* 所具有的功能。

参考文献

- [1] Jacobsen S E, Olszewski N E. Mutations at *SPINDLY* locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction[J]. *The Plant Cell*, 1993, 5: 887-896.
- [2] Fan L M, Feng X Y, Wang Y, et al. Gibberellin signal transduction in rice [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49: 731-741.
- [3] Schwechheimer C. Understanding gibberellic acid signaling are we there yet? [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11: 9-16.
- [4] Ueguchi-tanaka M, Ashi Kari M, Nakajima M, et al. Gibberellin insensitive *DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin[J]. *Nature*, 2005, 437: 693-698.
- [5] Blázquez M A, Soowal L N, Lee I, et al. *LEAFY* expression and flower initiation in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 1997, 124: 3835-3844.
- [6] Blázquez M A, Weigel D. Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2000, 404: 889-892.
- [7] Eriksson S, Böhlenius H, Moritz T, et al. *GA4* is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation[J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 2172-2181.
- [8] Kania T, Russenberger D, Peng S, et al. *FPP1* promotes flowering in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 1327-1338.
- [9] Olszewski N, Sun T P, Gubler F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 61-80.
- [10] Fridborg I, Kuusk S, Moritz T, et al. The *Arabidopsis* dwarf mutant *shi* exhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 1019-1031.
- [11] Swain S M, Tseng T S, Thornton T M, et al. *SPINDLY* is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129: 605-615.
- [12] Jacobsen S E, Binkowski K A, Olszewski N E. *SPINDLY*, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 1996, 93: 9292-9296.
- [13] Robertson M, Swain S M, Chandler P M, et al. Identification of a negative regulator of gibberellin action, *HvSPY*, in Barley[J]. *The Plant Cell*, 1998, 10: 995-1007.
- [14] Silverstone A L, Ciampaglio C N, Sun T P. The *Arabidopsis* *RGA* gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway [J]. *The Plant Cell*, 1998, 10: 155-169.
- [15] Swain S M, Tseng T, Olszewski N E. Altered expression of *SPINDLY* affects gibberellin response and plant development[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1174-1185.
- [16] Tseng T S, Salome P A, McClung C R, et al. *SPINDLY* and *GIGANTEA* interact and act in *Arabidopsis thaliana* pathways involved in light responses, flowering, and rhythms in cotyledon movements[J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 1550-1563.

欢迎订阅 2012 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的学术期刊。前身可追溯到 1919 年创办的《中华农学会丛刊》。主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。办刊宗旨是报道本领域最新研究动态和成果,为繁荣我国作物科学研究、促进国内外学术交流、加速中国农业现代化建设服务。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》为月刊,2012 年定价 50 元/册,全年 600 元。可通过全国各地邮局订阅,刊号:ISSN 0496 - 3490, CN 11 - 1809/S, 邮发代号:82 - 336。也可向编辑部直接订购。

地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号,中国农业科学院作物科学研究所《作物学报》编辑部(邮编 100081)

电话:010 - 82108548; 传真:010 - 82105793; 网址: <http://www.chinacrops.org/zwxzb/>

E - mail: zwxzb301@mail.caas.net.cn; xbzw@chinajournal.net.cn