

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.12.004

超量表达 *DWF4* 基因对芥菜生长发育的影响

兰彩耘¹, 宋洪元²

1. 重庆市江津区现代农业园区发展中心, 重庆 江津 402260; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715

摘要: 为研究 *DWF4* 基因在芥菜生长过程中的作用与功能, 也为今后开发生物技术手段调控植物生长发育奠定理论基础, 通过农杆菌介导转化法将 *DWF4* 基因导入芥菜中, 结果显示: 转基因芥菜植株生长迅速, 生长势旺盛, 其叶、花等器官都大于对照野生型。转基因植株成长过程中, 其株高、开展度、最大叶宽、最大叶长都显著高于野生型, 且植株抽薹时间和开花时间提前。pCABar*DWF4* 转基因芥菜植株与野生型植株相比, 主枝更长, 分枝更多, 总种荚数增多, 总种子数增多, 种荚率更高。对 pCABar*DWF4* 转基因芥菜植株定量 PCR 分析结果显示: 植株体内油菜素甾醇(Brassinosteroids, BR)合成途径相关基因表达增高。结果表明: *DWF4* 基因能促进植株内源 BR 的生成, 因此促进了植株的生长发育。

关键词: 芥菜; 产量; *DWF4* 基因

中图分类号: S188; Q786 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2021)12-0026-12

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of *DWF4* Gene Overexpression on Growth and Development in *Brassica juncea*

LAN Caiyun¹, SONG Hongyuan²

1. Modern Agricultural Park Development Center of Jiangjin District Chongqing City, Jiangjin Chongqing 402260, China;

2. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to understand the role and function of *DWF4* gene in the growth process of mustard (*Brassica juncea* Coss.) and to lay a theoretical foundation for the development of biotechnology to regulate plant growth and development in the future, *DWF4* gene was introduced into mustard by means of *Agrobacterium*-mediated transformation. Compared with the control, i.e. the wild type, the plants of pCABar*DWF4* transgenic mustard grew more rapidly and vigorously, with larger leaf, flower and other or-

收稿日期: 2020-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771462); 重庆市自然科学基金项目(CSTC2011jjA80014); 中央高校基本科研业务费项目(XDJK2009B024)。

作者简介: 兰彩耘, 硕士研究生, 主要从事蔬菜遗传育种及生物技术的研究。

通信作者: 宋洪元, 教授, 硕士研究生导师。

gans, had significantly greater plant height, plant expansion, maximum leaf width and maximum leaf length and longer podding branches, more branches, more pods, higher seed rate and more seeds, and their bolting time and flowering time were advanced. Quantitative PCR analysis of pCABarDWF4 transgenic mustard plants showed that *DWF4* gene enhanced the expression of the genes related to endogenous BR synthesis pathways in the plant. In conclusion, the *DWF4* gene promotes the endogenous BR synthesis in mustard and thus favors the growth and development of the plant.

Key words: mustard; yield; *DWF4* gene

BR 缺陷突变体如拟南芥中的 *DET2*, *DWARF4*(*DWF4*)和 *CPD*, 番茄中的 *DWARF*, 豆科植物中的 *LKB*; *BR* 不敏感突变体如拟南芥中的 *DWF12*, *BRI1*, *BIN2*, *BAK1*, 豆科植物中的 *LKA*, 番茄中的 *CURL-3* 等都不同程度表现为根长、株高、花序、角果、叶柄、胚轴的减短、顶端优势的减弱、育性衰减、开花和叶片卷曲、维管束和光形态建成上的变化, 显示 BR 在植株生长和发育中的重要作用^[1]. 通过在植株中超表达 *DWF4* 基因, 可以使植株更高, 叶片更多^[2]. 目前还发现 BR 和其他激素在侧根发生方面起到的协同作用^[3], 然而对于下胚轴和根的向地性方面起到的却是反作用. 低浓度水平下的 BR 促进根的伸长, 高浓度则抑制根的伸长^[3]. 多种实验结果证明 BR 能促进产量提高. 水稻 BR 缺陷突变体 *BRD2* 致使谷物颗粒变短而且缩小, 而 *DWF11* 突变体也呈现出种子减少现象^[4]. 相反, 超表达 BR 生物合成基因将增大水稻颗粒, 增加水稻产量, 转基因水稻与野生型相比, 分蘖数更多^[5]. 在拟南芥中, BR 对种子发育有决定性作用, 包括种子大小、种子形状和种子数量等^[6]. 拟南芥 BR 缺陷突变体 *DWF5* 结出的种子变小^[7], BR 缺陷突变体 *DET2* 和 *BRI1-5* 的种子也都比野生型小, 而且 *DET2* 和 *BRI1-5* 的种子质量比野生型分别轻 17% 和 10%, *BZR1* 功能获得型突变体 *BZR1-1D* 的种子与野生型相比, 不仅更小而且变得更轻^[6]. 在拟南芥中, 超表达 *DWF4* 可以提高种子数量. 就如 Choe 等^[2] 研究过表达 BR 合成关键基因, 获得了转基因拟南芥植株, 对该转基因植株的果荚和分枝数统计调查显示其数量均增加 2 倍, 种子产量增加了 59%, GC-MS 分析表明该转基因植株内源 BR 水平确实有所升高. 另外, BR 还调节植物花期和衰老. BR 相关基因 *CPD*, 可以通过光周期途径调节开花, 而 *CPD* 同系物 *GmCPDs* 促成开花发育, 调控花期^[8]. 水稻 BR 信号途径相关基因 *SDG725*, 也和花期调控相关^[9].

目前, 在 BR 的生物合成、代谢作用、信号转导途径中都有很多报道, 其中 *DWF4* 编码细胞色素 P450 酶, 与 *CPD* 基因处于同一家族不同亚族^[10]. *DWF4* 的 mRNA 水平因外源施加油菜素内酯(brassinolide, BL)而大幅下降, 因施加 BRZ(油菜素内酯抑制剂)而大幅提高, 证实 *DWF4* 在 BR 平衡调节上起到了重要的作用^[11]. *DWF4* 敲除突变体的内源 BRs 缺失将致使植株矮小, 突变体植株细胞伸长受到限制^[12]. 对野生型植株施加 BRZ, 将抑制或结合 *DWF4* 酶^[13], 也会造成内源 BRs 缺失致使植株矮小. *DWF4* 是维持 BR 平衡的关键基因, 因其可以迅速而准确地对内源 BR 水平响应表达变化^[14]. 本实验中通过农杆菌介导转化法将 *DWF4* 基因导入芥菜中, 研究 *DWF4* 基因在芥菜生长过程中的作用与功能, 为解析 *DWF4* 基因参与 BR 信号传导的机制提供直接或者间接的实验证据, 也为今后开发生物技术手段调控植物生长发育奠定理论基础.

1 材料与方法

1.1 材 料

含 pCABarDWF4 植物表达载体质粒的农杆菌由西南大学蔬菜学实验室提供, 表达载体结构示意图见图 1.

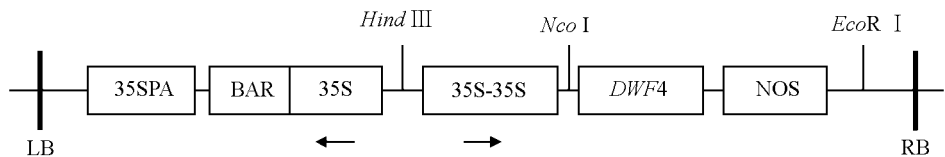


图 1 pCABarDWF4 植物表达载体结构结构图

1.2 芥菜遗传转化

利用农杆菌介导法转化芥菜，芥菜种子所需消毒时间为 75% 的乙醇消毒 1 min，0.1% 的升汞处理 8 min，所需农杆菌侵染时间为 8 min，使用的预培养基成分为 MS+2 mg/L 6-BA(6-苄基腺嘌呤)+0.2 mg/L NAA(萘乙酸)；筛选培养基成分为 MS+2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA+8 mg/L PPT(膦丝菌素)+400 mg/L Carb(羧苄青霉素)；生根培养基成分为 MS+0.2 mg/L NAA+8 mg/L PPT+400 mg/L Carb.

1.3 转基因芥菜植株的 PCR 鉴定

采用 CTAB 法提取获得的转基因芥菜植株基因组 DNA 进行 PCR 扩增，引物 DWF4-1 和 DWF4-2 用于 pCABarDWF4 转基因芥菜植株 DWF4 基因片段的检测。PCR 扩增参数：95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 40 s；56 ℃ 40 s；72 ℃ 延伸 2 min；30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。获得的扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 pCABarDWF4 转基因芥菜植株 DWF4 基因、BR 生物合成结构基因、转录调控基因的表达分析

用 TIANGEN RNA prep pure Plant Kit 提取试剂盒提取 pCABarDWF4 转基因芥菜植株总 RNA，根据 TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(TaKaRa)试剂盒说明书进行 cDNA 合成，获得的第一链 cDNA 稀释 5 倍后作为 RT-PCR 模板。以芥菜 *BjActin* 为内参，对转基因植株和非转基因植株中的 DWF4 基因 BR 生物合成结构基因的表达情况进行 Real Time RT-PCR 分析，反应在 C1000/CFX96 仪器 (Bio-Rad, 美国)上完成，具体操作按照 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书进行。利用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪 CFX Manager Software 软件($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法)和 Microsoft Excel 软件分析数据。

1.5 pCABarDWF4 转基因芥菜植株形态分析

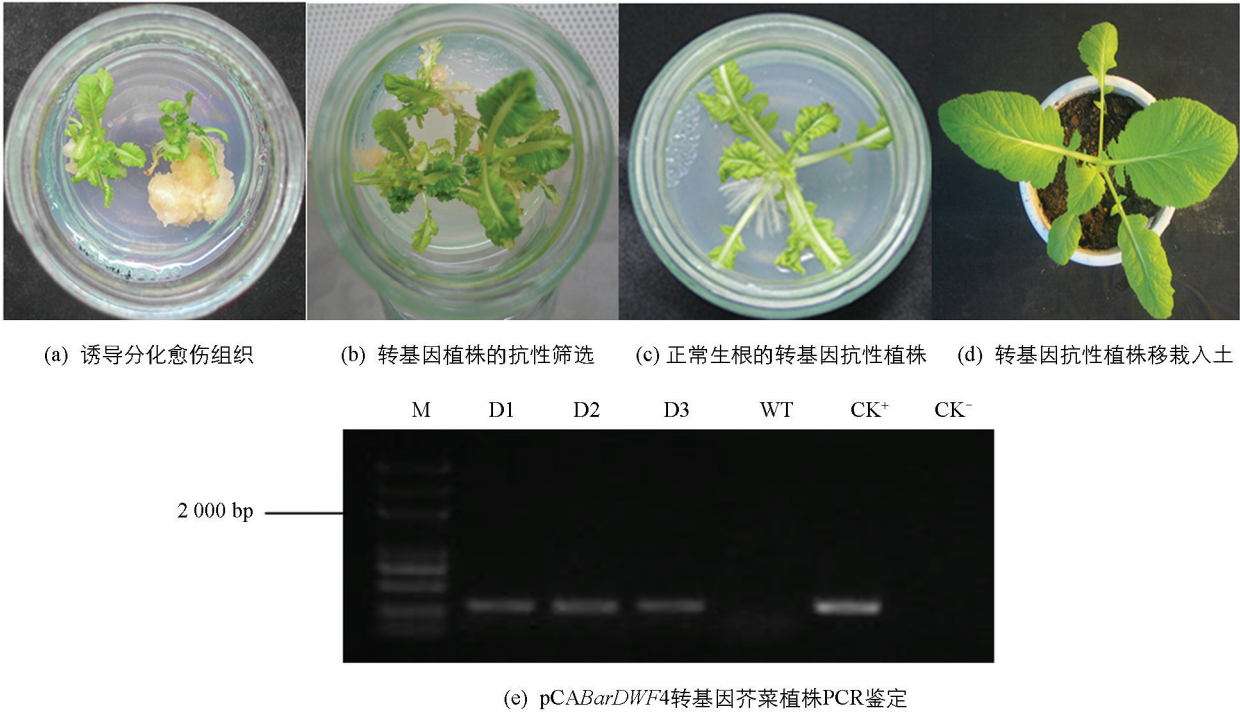
pCABarDWF4 转基因芥菜植株及非转基因植株种子播种于培养皿中，铺上滤纸，只施加蒸馏水，置于 25 ℃ 培养室中，光照条件和黑暗条件下培养 4 d，每个基因型进行 3 次重复，每个重复 20 粒种子，最后调查其根长、下胚轴长、总长，在滤纸上吸干水后测其鲜质量，最后置于 60 ℃ 烘箱中烘干测其干质量。pCABarDWF4 转基因芥菜植株及非转基因植株播种于培养盆中，播种后每隔 15 d 测量其株高、开展度、单株最大叶长和最大叶宽，自花授粉结束后测量主枝长度、主枝果荚数、主枝种子数、一次分枝数、一次分枝果荚数、一次分枝种子数、二次分枝数、二次分枝果荚数、二次分枝种子数并测量千粒质量和籽粒密度。千粒质量的测定：转基因植株和野生型植株种子分别取 100 粒称质量，3 次重复，取其平均值。籽粒密度 (D) 的测定：取 200 粒称质量记为 M ，然后将籽粒放入事先盛有定量体积 V_1 酒精的量筒中，然后读取体积 V_2 ，则籽粒体积 $V=V_2-V_1$ 。籽粒密度 $D=M/V$ ，单位 g/mL，3 次重复。

2 结果与分析

2.1 pCABarDWF4 转基因芥菜植株的获得及鉴定

PCABarDWF4 表达载体通过农杆菌介导的下胚轴转化，侵染后的下胚轴转接至含 8 mg/L PPT 和 400 mg/L Carb 的抑菌筛选培养基上，对获得的不定芽进行多代筛选，淘汰未转化的白化芽和嵌合体，获得多个具 PPT 抗性的绿色愈伤组织和芽(图 2a 和图 2b)，抗性芽接种至生根培养基上进行生根培养(图 2c)。抗性植株炼苗后，移栽至泥炭土营养钵中(图 2d)，最后定植于大田中，正常管理至植株开花。

提取 *pCABarDWF4* 转基因芥菜植株 T₀ 代基因组 DNA 从 3 株转基因植株中扩增到预期大小 300 bp 左右的目的片段(图 2e).



M 为 DNA 相对分子质量标准; D1,D2 和 D3 为野生型植株; WT 为野生型植株; CK⁺ 为阳性对照(质粒); CK⁻ 为阴性对照(未加入 DNA).

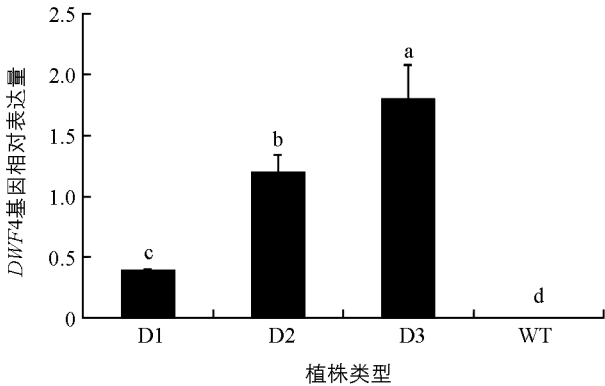
图 2 *pCABarDWF4* 转基因芥菜植株的获得及 PCR 鉴定

2.2 *pCABarDWF4* 转基因芥菜植株 *DWF4* 基因的表达分析

提取 *pCABarDWF4* 转基因芥菜植株的 RNA, 以芥菜 *BjActin* 为内参进行 *DWF4* 基因的定量表达分析. 从结果(图 3)可以看出, *pCABarDWF4* 转基因芥菜 D1,D2 和 D3 植株中, *DWF4* 基因均有不同程度的表达, 但表达量在植株之间有差异, D2 和 D3 植株中目的基因表达量较高, 对照野生型植株(WT)未检测到明显的 *DWF4* 表达.

2.3 *pCABarDWF4* 转基因芥菜植株苗期光暗处理表现分析

将 *pCABarDWF4* 转基因芥菜种子进行光照处理后调查其生长状况. 从表 1 可以看出, D2 和 D3 的根长显著高于野生型, D1 的根长虽然高于野生型但未达到统计学意义. D1 和 D3 的下胚轴长显著高于野生型. D1,D2 和 D3 苗期总长均显著高于野生型. 在鲜质量方面, 转基因植株以及野生型植株之间差异无统计学意义. 在干质量方面, D1 和 D3 显著高于野生型, D2 的干质量虽然高于野生型但差异无统计学意义. 相比之下, 苗期生长最为旺盛的是 D3. 综上所述, 在光照条件下, 在芥菜中超表达 *DWF4* 基因能一定程度上促进苗期生长.



D1,D2 和 D3 为转基因植株, WT 为野生型植株; 小写字母不同表示 $p < 0.05$, 差异有统计学意义.

图 3 *pCABarDWF4* 转基因芥菜植株 *DWF4* 基因定量表达分析

表 1 pCABarDWF4 转基因芥菜植株 T₂ 代光照下苗期调查

植株	根长/cm	下胚轴长/cm	苗期总长/cm	鲜质量/g	干质量/g
D1	3.290c	1.100b	4.390b	0.311a	0.032a
D2	3.559b	1.049bc	4.608b	0.310a	0.029ab
D3	4.132a	1.338a	5.470a	0.333a	0.034a
WT	3.108c	1.004c	4.111c	0.273a	0.024b

注：小写字母不同表示 $p<0.05$ ，差异有统计学意义。

与光照条件下相比，在黑暗中，不管是转基因植株还是野生型植株，苗期下胚轴都大幅度伸长，但植株纤弱，子叶黄化。从表 2 中可以看出，D2 和 D3 的根长显著高于野生型，D1 的根长虽然高于野生型但差异无统计学意义。D1 和 D3 苗期下胚轴长均显著高于野生型，D2 下胚轴长低于野生型。在苗期总长上，D1 和 D3 显著高于野生型，由于 D2 下胚长较短的原因，所以其总长与野生型差异无统计学意义。在鲜质量和干质量上，转基因植株与野生型植株之间差异无统计学意义。从实验结果可以看出，在黑暗条件下，DWF4 基因能在一定程度上促进苗期根和下胚轴伸长。

表 2 pCABarDWF4 转基因芥菜植株 T₂ 代黑暗处理下苗期调查

植株	根长/cm	下胚轴长/cm	苗期总长/cm	鲜质量/g	干质量/g
D1	3.351bc	1.859a	5.210ab	0.362a	0.029a
D2	3.428ab	1.531b	4.959bc	0.319a	0.027a
D3	3.563a	1.852a	5.415a	0.372a	0.030a
WT	3.165c	1.559b	4.723c	0.300a	0.027a

注：小写字母不同表示 $p<0.05$ ，差异有统计学意义。

光照条件与黑暗条件下不同的是，光照条件下苗期干质量差异有统计学意义。不论是置于光照还是黑暗条件下，D3 生长都是最为旺盛的，苗期总长和下胚轴长都显著高于野生型。通过对转基因植株苗期光照和黑暗条件下生长情况的统计，可以发现转基因植株根和下胚轴长一定程度上都高于野生型植株，而且 D3 表现最好。结合 D3 转基因株系 DWF4 基因较高的表达水平，显示 DWF4 基因表达较高者，其苗期根以及下胚轴生长速度会更快。

2.4 pCABarDWF4 转基因芥菜植株生长情况分析

将 pCABarDWF4 转基因芥菜植株置于人工气候室内培养观察，从其整个生命周期中，转基因植株比野生型植株生长更加旺盛。在 60 d 时，转基因植株就已经比野生型植株长得更壮，其叶片伸展更开(图 4a)。

到 180 d 时，转基因植株开始逐渐抽薹，而野生型植株还没有抽薹(图 4c)。转基因植株最早开花时间比野生型植株提前一个多月。转基因植株和野生型植株花器官相比，转基因植株的花瓣较大(图 4d)。对比转基因植株和野生型植株同时期的叶片，可以发现转基因植株叶片伸展更长、更宽，而且叶片颜色更加浓绿(图 4b)。从图 5 中可以发现，随着时间的延长，转基因植株和野生型植株的株高、开展度、最大叶长和最大叶宽也随着增长，但是转基因植株生长明显快于野生型植株。转基因植株之间相比，D2 和 D3 生长势明显好于 D1。

2.5 pCABarDWF4 转基因芥菜植株结籽情况分析

进一步对转基因植株结荚结籽情况进行了调查。转基因植株枝条上比野生型植株结有更多的种子(图 6a)，转基因植株果荚长度高于野生型植株果荚长度(图 6b)，且转基因植株果荚结籽数更多(图 6c 和图 6d)。



(a) 转基因植株和野生型植株 60 d 植株生长情况



(b) 转基因植株和野生型植株叶片比较



(c) 转基因植株和野生型植株 180 d 植株生长情况



(d) 转基因植株和野生型植株花器官比较

图 4 T₂ 代 pCABar*DWF4* 转基因芥菜植株的形态学比较

从表 3 中可以看出, 转基因植株主枝长度远远超过野生型植株. 除 D3 外, 主枝平均果荚数也超过了野生型, 转基因植株主枝果荚长度和所结种子数均高于野生型. 转基因植株一次分枝数和二次分枝数高于野生型, 且一次分枝果荚数、一次分枝所结种子数和二次分枝果荚数、二次分枝所结种子数也都高于野生型. 综合来看, 转基因植株种荚率、全株总种荚数和所结总种子数均高于野生型植株. 对千粒质量和籽粒密度测量数据来看, D1 和 D2 超过野生型而 D3 与野生型基本一致. 结果显示, 在芥菜中超表达 *DWF4* 基因具有明显增加种子产量的作用.

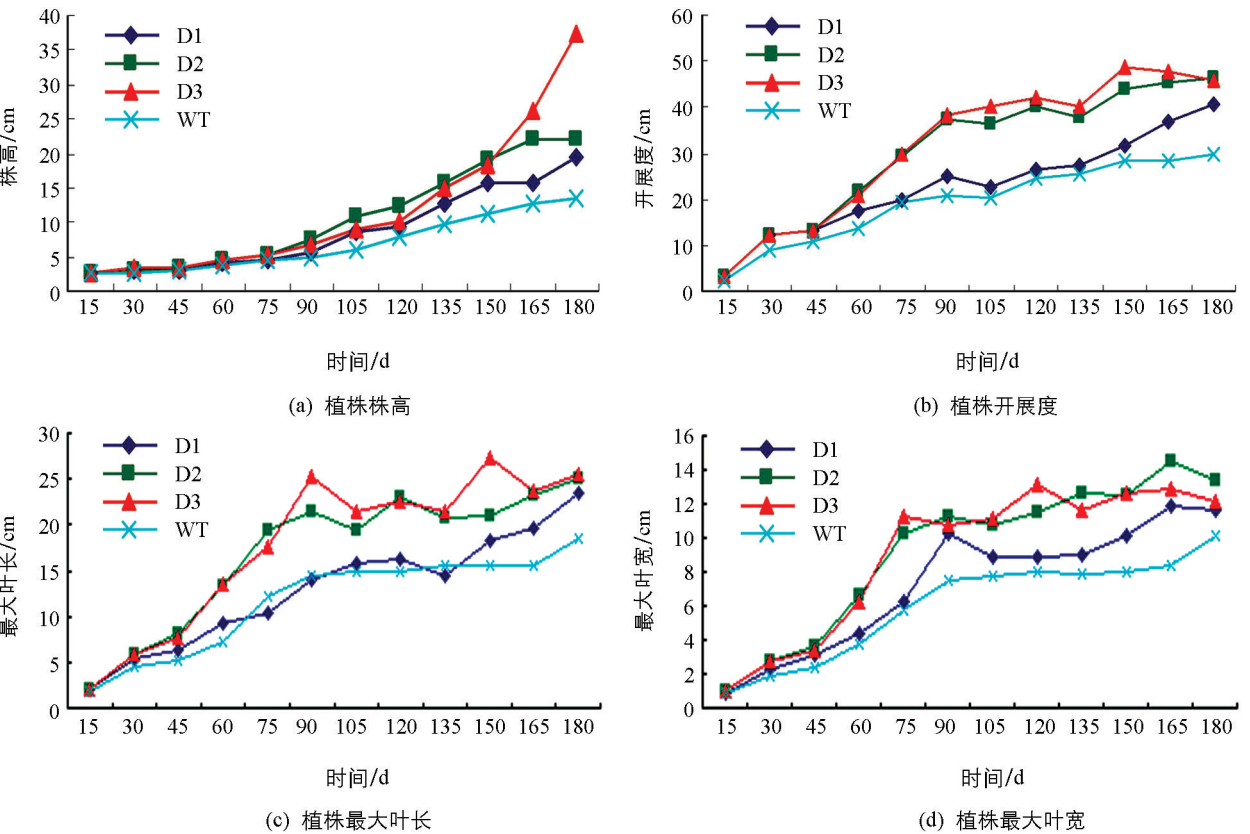
表 3 pCABar*DWF4* 转基因芥菜 T₂ 代结种数调查统计

植株(平均)	D1	D2	D3	WT
主枝长度/cm	145.17a	131.83a	139.67a	109.50b
主枝果荚数/个	45.67ab	50.67a	35.00b	37.67ab
主枝果荚长度/cm	3.50b	3.83a	3.87a	3.32b
主枝种子数/粒	436.67ab	521.33a	329.67ab	241.67b
一次分枝数/枝	7.67b	8.00ab	9.67a	5.67d
一次分枝果荚数/个	251.33a	257.33a	281.00a	175.67b
一次分枝种子数/粒	2 408.33a	2 854.33a	2 529.00a	967.00b
二次分枝数/枝	12.33b	25.67a	23.33a	9.33b

续表 3

植株(平均)	D1	D2	D3	WT
二次分枝果荚数/个	284.00b	368.67a	374.00a	216.67b
二次分枝种子数/粒	2 313.67b	3 572.67a	3 620.00a	1 281.67c
全株总种子数/粒	5 158.67b	6 948.33a	6 478.67a	2 490.33c
全株总种荚数/个	581.00b	676.67a	690.00a	430.00c
种荚率/(粒·个 ⁻¹)	8.88b	10.27a	9.39b	5.79c
千粒质量/g	1.46a	1.40a	1.28b	1.31b
籽粒密度/(g·mL ⁻¹)	0.94a	0.88ab	0.83b	0.83b

注：小写字母不同表示 $p<0.05$ ，差异有统计学意义。



D1,D2 和 D3 为转基因植株，WT 为野生型植株。

图 5 T_2 代 pCABarDWF4 转基因芥菜植株 180 d 内的生长状况调查

2.6 pCABarDWF4 转基因芥菜植株 BR 生物合成结构基因

DET2,*ROT3*,*CPD*,*CYP85A2* 等基因被认为参与了 BR 的生物合成. 在 pCABarDWF4 转基因植株中, *DWF4* 下游基因 *DET2* 在 D2 和 D3 株系中平均表达量是野生型的 2 倍, 说明超表达 *DWF4* 基因促进了下游 *DET2* 基因的表达(图 7a).

DET2 基因下游的 *ROT3* 基因在转基因植株中的平均表达量高出野生型植株的 40%(图 7b).

CPD 基因代谢油菜甾醇(campesterol)和其他中间产物, 而 *DWF4* 基因也参与代谢油菜甾醇, *DWF4* 基因与 *CPD* 基因可能存在竞争作用. 在本实验中, pCABarDWF4 转基因芥菜植株的 *CPD* 基因表达量都低于野生型, 其平均表达量只达到野生型植株表达量的一半, 说明 *DWF4* 基因与 *CPD* 基因表达呈负相关(图 7c).

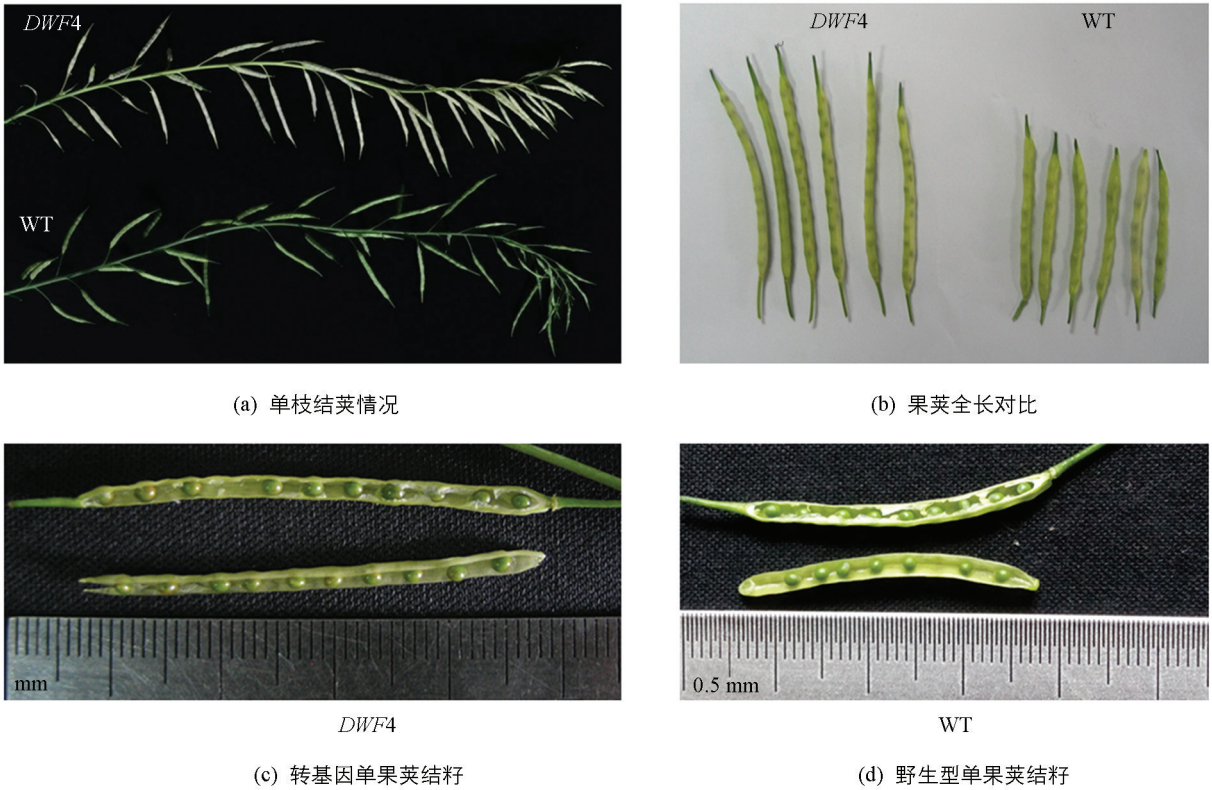
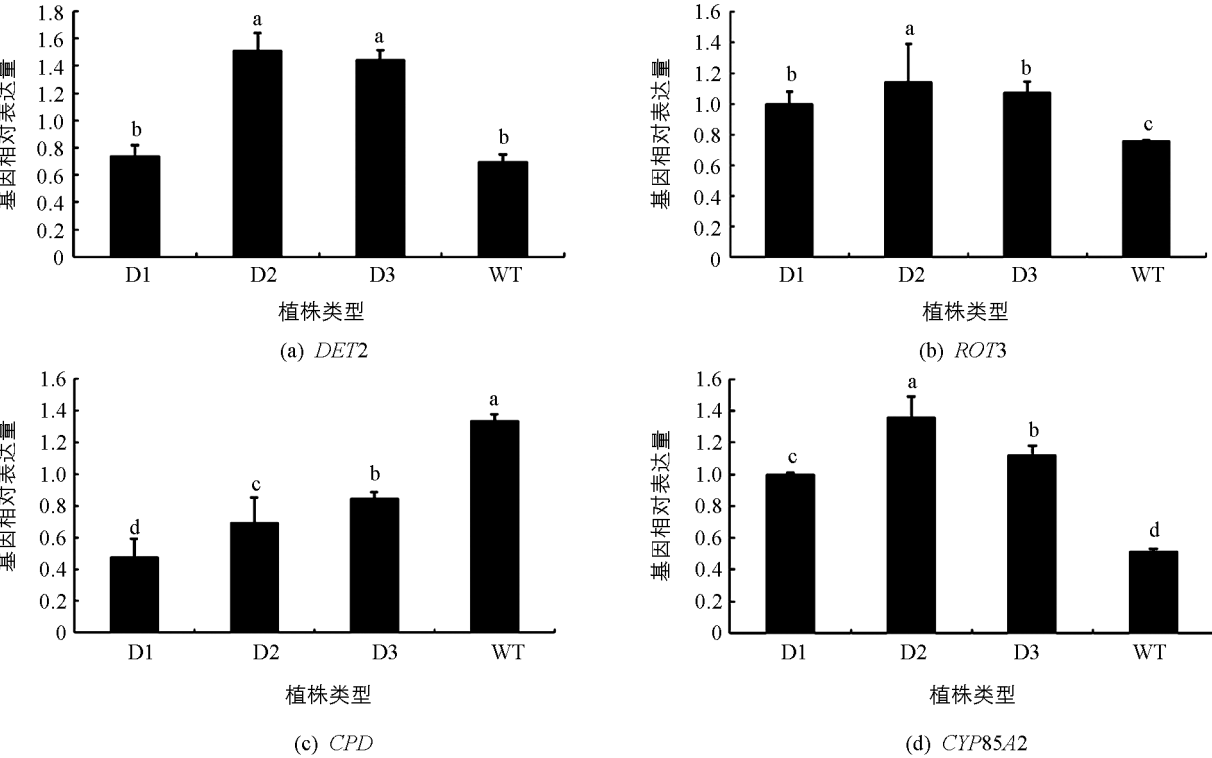


图 6 T₂ 代 pCABarDWF4 转基因芥菜植株结籽情况



D1,D2 和 D3 为转基因植株, WT 为野生型植株; 小写字母不同表示 $p<0.05$, 差异有统计学意义。

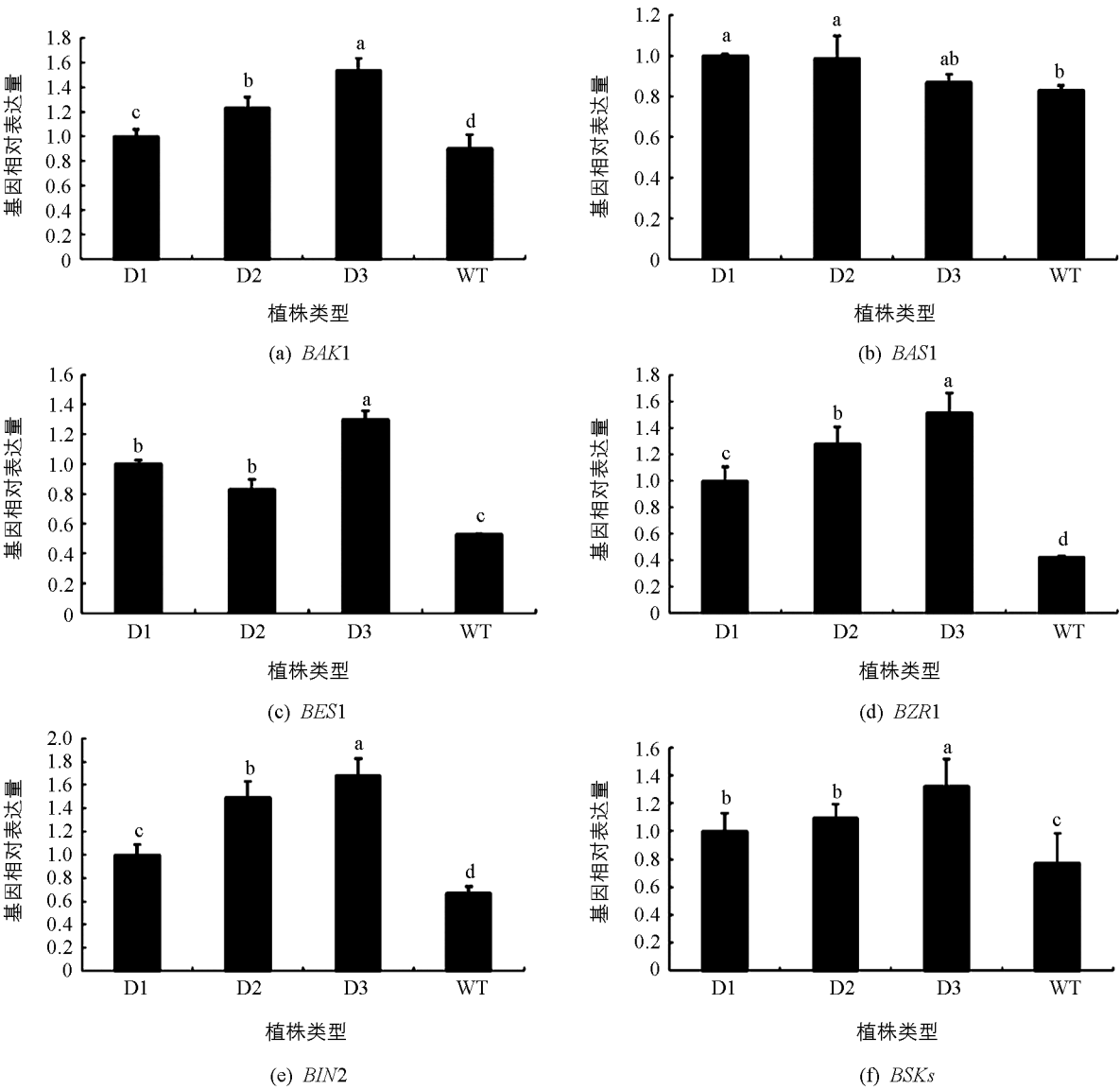
图 7 转基因芥菜植株 BR 合成结构基因定量表达分析

CYP85A2 是 BR 生物合成途径中的重要因子, 在 pCABarDWF4 转基因芥菜植株中, 他们的相对表达量都不同程度高于野生型, *CYP85A2* 是在 BR 合成途径中最后一步反应的基因, 说明转基因 pCABarDWF4 芥

菜中,超表达 *DWF4* 基因促进了下游相关 BR 合成基因的表达,促进了 BR 的生物合成.

2.7 pCABarDWF4 转基因芥菜植株 BR 转录调控相关基因表达分析

BR 生物合成除了结构基因的表达外,还受到细胞内其他转录激活或者转录抑制基因的调控. *BAK1* 是一类重要的类受体蛋白,参与调控 BR 的合成,调节植物生长发育.在 pCABar*DWF4* 转基因植株中,*BAK1* 基因表达量均比野生型植株表达量升高,且平均值高出近 40%(图 8a). *BAS1* 基因表达被外源 BR 诱导,功能应该是维系内源 BR 的恒定水平,其羟化 C₂₆,影响植株体内 BR 量,是一个油菜素内酯失活基因.在本研究中,虽然转基因植株中 *BAS1* 的平均表达量 0.95 高于野生型植株表达量 0.83,但随着 *DWF4* 基因表达水平上升,*BAS1* 基因表达水平降低(图 8b).



D1,D2,D3 为转基因植株,WT 为野生型植株;小写字母不同表示 $p<0.05$,差异有统计学意义.

图 8 转基因芥菜植株 BR 转录调控基因表达分析

BES1 和 *BZR1* 是油菜素甾醇信号途径下游最重要的一类转录因子,参与油菜素甾醇合成转录的诱导和抑制调控.在本研究中,转基因株系中 *BES1* 和 *BZR1* 的平均表达量分别是野生型植株的 2~3 倍(图 8c 和图 8d),说明超表达 *DWF4* 基因导致细胞内 BR 积累水平上升后,引起 *BES1* 和 *BZR1* 基因表达水平上升,促进细胞内积累更多的 BR.

BIN2 在 BR 途径中起到调控 *BES1* 和 *BZR1* 的作用,在转基因植株中 *BIN2* 基因的平均表达量是野

生型植株的 2 倍(图 8e), *BES1* 和 *BZR1* 表达量较高, 那么 *BIN2* 表达量应和这两个基因表达量相一致。

BSKs 是一类参与油菜素内酯信号转导的植物特异受体类胞质激酶, 参与 BR 信号转导途径, 在转基因植株中其平均表达量高于野生型植株近 50%(图 8f)。

BAK1, *BAS1*, *BES1*, *BZR1*, *BIN2*, *BSKs* 都参与了 BR 合成的转录调控, 调节内源 BR 水平, 在 *pCABarDWF4* 转基因芥菜植株中, 随着 *DWF4* 基因表达水平的提高, 大多数调控基因 *BAK1*, *BZR1*, *BIN2* 和 *BSKs* 的表达量与 *DWF4* 表达量呈正相关, 出现明显上调。而维系细胞内内源 BR 稳定水平的 *BAS1* 基因, 则在不同植株之间的表达水平变化小。

3 讨 论

3.1 *DWF4* 基因超表达对芥菜生长发育的影响

DWF4 编码 C_{22} 羟基化酶, 其转录水平受 BR 反馈抑制, 其可以迅速而准确地对内源 BR 水平响应表达变化^[11, 14], 是 BR 合成关键基因之一。在拟南芥中, 不论是光照还是黑暗条件下, 通过超表达 *DWF4* 基因, 拟南芥幼苗下胚轴长度远远高于对照野生型^[2], 本实验中, 在芥菜中超量表达 *DWF4* 基因后, 与野生型相比, 转基因苗期根茎伸长变快, 与在拟南芥中的实验结果一致。在拟南芥和烟草中超表达 *DWF4* 基因, 其成熟植株花序高度分别增加了 35% 和 14%, 与野生型相比, 在拟南芥中超表达 *DWF4* 基因将增加近两倍的分枝数和结荚数, 结子量升高^[2]。而在本实验中, 通过在芥菜中超表达 *DWF4* 基因, 转基因芥菜所结种子数是野生型的近 2.5 倍, 说明超表达 *DWF4* 基因可以大幅度促进植株产量提高。在拟南芥中超表达 *DWF4* 基因将使植株叶片叶柄伸长, 开花时间提前, 转基因植株生长更加旺盛^[15]。在本文图 4 和图 5 中可以看出, 芥菜超表达 *DWF4* 基因使植株株高、开展度、最大叶长和最大叶宽皆比同时期野生型增高, 转基因植株抽薹开花时间提前, 说明 *DWF4* 基因对植株生长发育有促进作用, 因此增强了植株生长势, 植株生长更加旺盛可能也与转基因植株产量提高息息相关。

3.2 *DWF4* 基因超表达对 BR 合成调控途径相关基因表达的影响

DWF1 诱导 24-亚甲基胆固醇(24-methylenecholesterol)转变为芸薹甾醇(Campesterol)^[16], 是 BR 前期合成的重要基因。在本文中, 超表达 *DWF4* 基因并没有太多影响 *DWF1* 基因的表达, 可能是 *DWF1* 作用与 *DWF4* 基因上游有关。DET2, 5- α 还原酶被认为是油菜素内酯生物合成酶关键元件, 其催化菜油甾醇转化为菜油甾烷醇, 是油菜素内酯合成过程中催化较早反应的酶^[17]。在本实验中, 超表达 *DWF4* 基因促进了 *DET2* 的表达, 特别是 D2 和 D3 植株, 表达量超出了野生型植株约 2 倍, 说明 *DWF4* 基因正调控 *DET2* 的表达。*ROT3* 编码细胞色素 P450(*CYP90C1*), 在叶和花的形成发展期间, 与细胞极性伸长相关^[18], 在 BR 生物合成途径中, *ROT3* 与 *CYP90D1* 起着共同催化 C_{23} 羟基化的作用^[19]。在本实验中, *ROT3* 表达量在转基因植株中表达较高, 远远超过野生型植株, 说明超量表达 *DWF4* 基因促进了 *ROT3* 基因的表达。有报道称 *CPD* 基因编码一种重要的 BR 合成酶(*CYP90A1*), 催化 C_{23} 羟化反应, 代谢油菜甾醇(campesterol)和其他中间产物, Ohnishi 等^[20]则发现 *CPD* 基因参与 C_3 氧化反应。在本实验中, 超表达 *DWF4* 基因使得 *CPD* 表达量降低, 说明 *DWF4* 负调节 *CPD* 基因, 这可能是 *DWF4* 基因和 *CPD* 基因具有相似性, 在 BR 合成途径中作用位点有相同之处, 因此两者产生了抑制作用。*CYP85A2* 调节内源 CS 水平从而控制 BR 中 C_{28} 和 C_{27} 生物合成途径, 在 C_6 氧化途径中, *CYP85A2* 比 *CYP85A1* 更加有活性, 通过超表达和对两个基因突变体的观察研究也证实了此结论。在拟南芥中, *CYP85A1* 对 *CYP85A2* 起到辅助作用促进 BR 合成^[21], 在本实验中, 超表达 *DWF4* 基因促进了 *CYP85A1* 和 *CYP85A2* 的表达, 而且 *CYP85A2* 基因表达量升高更多, 佐证了 *CYP85A2* 基因比 *CYP85A1* 基因活性更强、作用更强的结论, 而 *CYP85A2* 基因是 BR 生物合成途径中最后一步反应的重要因子, 因此 *CYP85A2* 基因表达量的升高证实转基因植株体内 BR 浓度水平的升高。所以, 超表达 *DWF4* 基因促进了植株体内 BR 合成途径中的相关基

因,促进了内源 BR 的生成.

BAK1 编码一个由 615 个氨基酸组成的蛋白,是一个典型的受体激酶,其在植物体内广泛表达,参与调控 BR 信号^[22],在芥菜中超表达 *DWF4* 基因促进了 *BAK1* 的表达. *BAS1* 编码一种 C_{26} 羟化酶,催化 CS 和 BL 分别生成 26-OH-CS 和 26-OH-BL,从而使 BL 功能失活,以维持体内活性 BL 的静态平衡,在内源 BL 含量高的组织器官中活跃表达^[23]. 但是在本实验中,超表达 *DWF4* 基因并没有显著提高 *BAS1* 的表达量,其中的内在机理还需进一步研究. 核内蛋白 *BZR1* 和其同系物 *BES1* 是 BR 信号途径中的两个重要转录因子,被 PP2A 蛋白介导脱去磷酸化,去磷酸化后的 *BZR1* 和 *BES1* 在细胞核中调节将近 1 000 个靶基因,从而调节植物生长. ChIP-qPCR 实验显示 *BZR1* 和 *BES1* 可以结合 *DWF4* 基因和 BR 诱导基因 *SAUR-AC1*^[24]. 在本文中, *BES1* 和 *BZR1* 两个基因在转基因植株中表达量远远高于野生型植株,说明超表达 *DWF4* 基因促进了转基因植株内源 BR 提高,因此 *BES1* 和 *BZR1* 基因转录水平升高从而维持植株体内 BR 平衡. BR 结合 BRI1 感受器激活 *BIN2*,调节植株生长, *BIN2* 对 *BES1* 和 *BZR1* 这两个转录因子的磷酸化起着重要作用,是 BR 信号途径中重要的调控因子^[25]. *BIN2* 基因的表达应与 *BES1* 和 *BZR1* 基因表达相一致. 在本文实验结果中, *BIN2* 基因的表达与 *BZR1* 基因表达趋势基本一致,在转基因植株中表达量升高,这与理论结果相同. 拟南芥质膜蛋白组学研究发现 BR 信号激酶 *BSKs*,磷酸化的 *BSKs* 可以和 BR 受体激酶 BRI1 相互作用^[26]. 在图 8 中可以得知,超表达 *DWF4* 基因促进了 *BSKs* 的表达. 综上所述,通过定量 PCR^[27] 实验结果显示,超表达 *DWF4* 基因促进了植株内源 BR 水平的提高,因此维持体内 BR 平衡的 *BAK1*,*BAS1*,*BES1*,*BZR1*,*BIN2*,*BSKs* 基因都各有升高.

参考文献:

- [1] KOKA C V, CERNY R E, GARDNER R G, et al. A Putative Role for the Tomato Genes *DUMPY* and *CURL-3* in Brassinosteroid Biosynthesis and Response [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(1): 85-98.
- [2] CHOE S, FUJIOKA S, NOGUCHI T, et al. Overexpression of *DWARF₄* in the Brassinosteroid Biosynthetic Pathway Results in Increased Vegetative Growth and Seed Yield in Arabidopsis [J]. *The Plant Journal*, 2001, 26(6): 573-582.
- [3] BAO F, SHEN J J, BRADY S R, et al. Brassinosteroids Interact with Auxin to Promote Lateral Root Development in Arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(4): 1624-1631.
- [4] TANABE S, ASHIKARI M, FUJIOKA S, et al. A Novel Cytochrome P450 is Implicated in Brassinosteroid Biosynthesis via the Characterization of a Rice Dwarf Mutant, *Dwarf11*, with Reduced Seed Length [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(3): 776-790.
- [5] WUC Y, TRIEU A, RADHAKRISHNAN P, et al. Brassinosteroids Regulate Grain Filling in Rice [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(8): 2130-2145.
- [6] JIANG W B, HUANG H Y, HU Y W, et al. Brassinosteroid Regulates Seed Size and Shape in Arabidopsis [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(4): 1965-1977.
- [7] CHOE S, TANAKA A, NOGUCHI T, et al. Lesions in the Sterol Delta Reductase Gene of Arabidopsis Cause Dwarfism Due to a Block in Brassinosteroid Biosynthesis [J]. *The Plant Journal*, 2000, 21(5): 431-443.
- [8] WANG M, XU X, ZHANG X, et al. Functional Analysis of *GmCPDs* and Investigation of Their Roles in Flowering [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118476.
- [9] SUI P, SHI J, GAO X, et al. H3K36 Methylation is Involved in Promoting Rice Flowering [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(3): 975-977.
- [10] DURST F, NELSON D R. Diversity and Evolution of Plant P450 and P450-Reductases [J]. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 1995, 12(3-4): 189-206.
- [11] TANAKA K, ASAMI T, YOSHIDA S, et al. Brassinosteroid Homeostasis in Arabidopsis is Ensured by Feedback Expressions of Multiple Genes Involved in Its Metabolism [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(2): 1117-1125.

- [12] CHOE S, DILKES B P, FUJIOKA S, et al. The *DWF₄* Gene of Arabidopsis Encodes a Cytochrome P450 that Mediates Multiple 22 α -Hydroxylation Steps in Brassinosteroid Biosynthesis [J]. The Plant Cell, 1998, 10(2): 231-243.
- [13] ASAMI T, MIN Y K, NAGATA N, et al. Characterization of Brassinazole, a Triazole-Type Brassinosteroid Biosynthesis Inhibitor [J]. Plant Physiology, 2000, 123(1): 93-100.
- [14] BANCOSI S, NOMURA T, SATO T, et al. Regulation of Transcript Levels of the Arabidopsis Cytochrome P450 Genes Involved in Brassinosteroid Biosynthesis [J]. Plant Physiology, 2002, 130(1): 504-513.
- [15] LIU T S, ZHANG J P, WANG M Y, et al. Expression and Functional Analysis of *ZmDWF₄*, an Ortholog of Arabidopsis *DWF₄* from Maize (*Zea Mays* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2007, 26(12): 2091-2099.
- [16] CHOE S, NOGUCHI T, FUJIOKA S, et al. The Arabidopsis *Dwf7/Ste1* Mutant is Defective in the Delta7 Sterol C-5 Desaturation Step Leading to Brassinosteroid Biosynthesis [J]. The Plant Cell, 1999, 11(2): 207-221.
- [17] ASAMI T, YOSHIDA S. Brassinosteroid Biosynthesis Inhibitors [J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(9): 348-353.
- [18] KIM T, TSUKAYA H, SAITO Y, et al. Changes in the Shapes of Leaves and Flowers Upon Overexpression of Cytochrome P450 in Arabidopsis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(16): 9433-9437.
- [19] OHNISHI T, SZATMARI A M, WATANABE B, et al. C-23 Hydroxylation by Arabidopsis *CYP90C1* and *CYP90D1* Reveals a Novel Shortcut in Brassinosteroid Biosynthesis [J]. The Plant Cell, 2006, 18(11): 3275-3288.
- [20] OHNISHI T, GODZA B, WATANABE B, et al. *CYP90A1/CPD*, a Brassinosteroid Biosynthetic Cytochrome P450 of Arabidopsis, Catalyzes C-3 Oxidation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(37): 31551-31560.
- [21] KIM T W, HWANG J Y, KIM Y S, et al. Arabidopsis *CYP85A2*, a Cytochrome P450, Mediates the Baeyer-Villiger Oxidation of Castasterone to Brassinolide in Brassinosteroid Biosynthesis [J]. The Plant Cell, 2005, 17(8): 2397-2412.
- [22] 田 荣, 杨 勇, 王晓峰. 植物受体激酶 *BAK1* 研究进展 [J]. 西北植物学报, 2014, 34(3): 636-644.
- [23] NEFF M M, NGUYEN S M, MALANCHARUVIL E J, et al. *BAS1*: a Gene Regulating Brassinosteroid Levels and Light Responsiveness in Arabidopsis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(26): 15316-15323.
- [24] YIN Y H, WANG Z Y, MORA-GARCIA S, et al. *BES1* Accumulates in the Nucleus in Response to Brassinosteroids to Regulate Gene Expression and Promote Stem Elongation [J]. Cell, 2002, 109(2): 181-191.
- [25] YAN Z Y, ZHAO J, PENG P, et al. *BIN₂* Functions Redundantly with other Arabidopsis GSK3-Like Kinases to Regulate Brassinosteroid Signaling [J]. Plant Physiology, 2009, 150(2): 710-721.
- [26] TANG W Q, KIM T W, OSES-PRIETO J A, et al. *BSKS* Mediate Signal Transduction from the Receptor Kinase *BRI1* in Arabidopsis [J]. Science, 2008, 321(5888): 557-560.
- [27] 陈 蒙, 刘海峰. 山葡萄 *C4H* 基因的克隆表达及遗传转化分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(10): 11-21.

责任编辑 周仁惠