

拟南芥 DELLA 下游的 GASA 基因表达研究

张盛春, 王小菁*

华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631

* 联系人, E-mail: wangxj@scnu.edu.cn

2008-09-01 收稿, 2008-10-10 接受

国家自然科学基金(批准号: 30570165)和广东省科技攻关(批准号: 2005B20901014 和 2006A20101007)资助项目

摘要 赤霉素(gibberellins, GAs)信号转导途径相关组分的分离与功能研究对于最终阐明 GA 作用机制十分重要, 目前赤霉素信号途径关键因子 DELLA 的下游组分研究较少. 拟南芥中受 GA 调控的 GASA (*GA-Stimulated in Arabidopsis*)家族共有 15 个基因, 预测所有 GASA 蛋白的 N 端均有一可剪切的信号肽, C 端含有 12 个半胱氨酸的 GASA 保守结构域. RT-PCR 结果证实, 在 DELLA 突变体 *gai-16* 和 *rga-24* 以及二者双突变体中, *GASA4* 和 *GASA6* 的表达上调而 *GASA1* 和 *GASA9* 下调, 与 *GASA4* 和 *GASA6* 表达受外源赤霉素(GA₃)促进而 *GASA1* 和 *GASA9* 表达受 GA₃ 抑制的结果相一致. 除此之外, 其他一些 GASA 基因表达也分别受 GA₃ 和脱落酸(ABA)的独立或共同调控. 大部分 GASA 基因在根、茎、叶、花和幼嫩荚果中均有表达. 利用启动子驱动 GUS 报告基因的方法研究了 *GASA6*, *GASA7*, *GASA8*, *GASA9*, *GASA10*, *GASA11* 和 *GASA12* 等 7 个基因的器官表达特异性, 发现在生长分化旺盛的组织器官及离层区均有这些基因的表达, 可能与细胞的分裂和生长有关. 本研究为 GASA 基因家族在 GA 和 ABA 信号途径中的功能研究提供重要依据.

关键词
拟南芥
GASA
DELLA
赤霉素
脱落酸

赤霉素(gibberellins, GAs)对植物生长发育, 包括种子萌发、茎的伸长、花的诱导与发育、果实发育等有重要的调控作用^[1]. GA受体GID1^[2]和关键因子DELLA蛋白^[3,4]的发现使GA信号转导途径的研究取得了重要进展. 目前, GA信号途径主要有依赖和不依赖DELLA蛋白的两条途径. 尽管有研究表明, DELLA蛋白可通过抑制下游的GIS和GL1来控制表皮毛的分化^[5], 通过抑制AP3等来调控花的发育^[6], 通过调控miR159及GAMYB来调控花粉囊的发育和开花^[7]. 但仍需要分离鉴定更多DELLA下游的信号组分, 特别是将DELLA蛋白与细胞分裂和伸长直接相关的靶基因连接起来, 为最终阐明GA调控生长的机制提供证据.

Shi等人^[8]在赤霉素缺失的番茄突变体*gib1*中获得了*GAST1* (GA-stimulated transcript 1)基因, 并陆续从番茄(*Lycopersicon esculentum*)^[8,9]、矮牵牛(*Petunia hybrida*)^[10,11]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[12,13]、水稻(*Oryza sativa*)^[14]、非洲菊(*Gerbera hybrida*)^[15]、草莓(*Fragar-*

iaxananassa)^[16]以及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[17,18]中获得了同源基因, 由此组成了GASA (GA-stimulated in *Arabidopsis*)基因家族. GASA蛋白的结构包含3个部分: (i) N-端的信号肽序列, 一般由18~29个氨基酸残基组成; (ii) 亲水区域, 紧接着信号肽的后面, 主要由极性氨基酸残基组成; (iii) C-端是由60个左右氨基酸组成的高度保守的结构域, 即GASA结构域. 对已分离获得的GASA基因进行的分析表明, 该基因家族编码的蛋白可能与细胞分裂或伸长相关.

已有的研究表明, 大多数GASA基因受GA调控. GA诱导*GAST1*的表达^[8], 番茄中*GAST1*的另一个同源基因*RSI-1*的表达则受生长素的诱导^[9]. GA诱导非洲菊(*Gerbera hybrida*) *GEG*基因在花冠和心皮中表达^[15]. 赤霉素(GA₃)诱导矮牵牛中分离得到的4个GIP同源基因(*GIP1*, *GIP2*, *GIP4*和*GIP5*)的表达^[19]; GA₃促进水稻和GA合成缺失突变体中*OsGASR1*和*OsGASR2*的表达^[14]; 外施GA₃可以增加*FaGAST*在草莓果实中的转录水平^[16].

在拟南芥中, *GAS1*~*GAS4* 在GA的作用下有不同的表达模式, 尽管GA诱导*GAS1*和*GAS4*的表达, 但*GAS2*和*GAS3*的表达并不受GA的影响^[17,18]. 通过对拟南芥*GASA*家族基因的启动子进行生物信息学分析发现, 启动子区域存在较多的GA顺式作用元件GARE和脱落酸(ABA)顺式作用元件ABRE, 暗示*GASA*家族基因与GA和ABA的相关性较大. 至今还缺乏对拟南芥*GASA*家族 15 个成员的特征、表达模式以及与GA和ABA的关系进行全面分析的研究, *GASA*基因与*DELLA*基因的关系也未见报道. 本研究通过生物信息学方法分析各成员之间的结构特征, 利用RT-PCR和启动子连接GUS报告基因的方法研究*GASA*基因家族的时空表达模式, 同时研究*GASA*基因对外源GA₃和ABA的响应以及在赤霉素信号关键组分*DELLA*基因缺失突变体中的表达, 为研究GA信号途径提供线索, 同时为阐明*GASA*家族蛋白如何协同调控生长发育奠定基础.

1 材料与方法

(i) 实验材料. 所用的野生型拟南芥为 *Columbia* (Col-0)和 *Landsberg erecta* (Ler), 购于 *Arabidopsis* Biological Resource Center, 并繁殖获得. 突变体 *gai-t6*, *rga-24* 以及 *gai-t6/rga-24* 为 Ler 型背景, 由中国科学院遗传与发育生物学研究所傅向东研究员惠赠.

激素处理实验以 15 d (从播种开始计算) Col 拟南芥为材料, 将植株的根部置于浸泡无菌水, 100 $\mu\text{mol/L}$ GA₃, 10 $\mu\text{mol/L}$ 多效唑(Paclobutrazol, PAC)和 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 的滤纸上, 黑暗处理 4 h, 提取 RNA. GA₃ 与 PAC 为 Sigma 产品.

采用在 MS 培养基中生长 15 d 的 Ler, *gai-t6*, *rga-24* 以及 *gai-t6/rga-24* 为材料提取 RNA 进行 RT-PCR, 检测 *DELLA* 突变体中 *GASA* 基因的表达. 采用 15 天龄拟南芥的根, 35 天龄拟南芥的莲座叶, 45 d 龄的茎生叶、茎、花及幼嫩荚果进行各组织中 *GASA* 基因表达检测. 采用 12 d 的转基因及对对照植株幼苗进行 GUS 染色.

(ii) GUS组织化学染色. 参考Jefferson等人^[20]的方法, 在含有 1 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, 100 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素, 2 mmol/L铁氰化钾, 2 mmol/L亚铁氰化钾的 50 mmol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)中加入 100 mg/mL X-Gluc母液(*N,N*-二甲基甲酰胺溶解), 使

X-Gluc终浓度为 1 mg/mL. 取幼苗或组织剪成小块置于 1 mL配制好的上述染色液中, 37°C温育 12 h, 期间摇动数次, 70%乙醇脱色至透明, 在Nikon显微镜下(10 $\times$ 10倍)观察并拍照. X-Gluc为Genview公司产品.

(iii) 载体构建. *GUS* 基因的植物表达载体为 pBI101. 把含有目的启动子连接的 T 载体克隆后, 测序正确的各基因启动子片段利用 *Hind*III和 *Bam*H I 双酶切后, 与相同酶切后的植物表达载体连接. 以 pBI101 质粒为对照, 连接后的质粒转化农杆菌 LBA4404, 利用花粉管浸泡法转化拟南芥, 卡那霉素筛选转基因植株并用 PCR 进行检测.

(iv) RT-PCR. 利用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA 后, 用 DNAase I (TaKaRa) 处理以消除基因组 DNA 的污染. 定量后取等量的 RNA 利用 PrimeScript™ 反转录试剂盒(TaKaRa)进行 cDNA 第一链合成, 再取等量的 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 反应 26 个循环, 取 15 μL PCR 产物电泳检测. RT-PCR 电泳后利用 BioImage (Gene company Ltd.)系统拍照, 采用 Gene Tools 软件(Gene Company Ltd.)对 PCR 产物进行量化计算, 目的基因的相对表达量以基因电泳条带的吸光度峰值与内参基因 *Actin* 的吸光度峰值的比值来表示. 在严格保证样品处理, 总 RNA 提取, cDNA 合成, PCR, 拍照等过程中各条件和参数条件一致的情况下进行 3 次重复实验.

(v) 实时荧光定量 PCR. 利用 7300 Real Time PCR 扩增仪(Applied Biosystems Company)进行实时荧光定量 PCR 实验, 荧光染料试剂盒采用 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa), 总 RNA 提取和纯化方法同上. 利用 PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa)试剂盒对 0.5 μg 总 RNA 进行 cDNA 合成, cDNA 产物稀释 10 倍. 每 20 μL PCR 反应体系中含 1 $\times$ SYBR Premix Ex Taq, 上下游引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 以及 2 μL 稀释的 cDNA. 按以下程序进行 PCR 反应: 95°C, 15 s; 95°C, 4 s, 60°C, 15 s, 72°C, 31 s, 40 个循环; 最后采集融解曲线. 利用 7300 仪器系统自带软件(SDS V1.3)对数据进行统计分析, 以 18S rRNA 为内参对照对数据进行均一化处理, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示目的基因的相对表达量, 实验重复 3 次.

2 结果与分析

2.1 拟南芥 *GASA* 基因的命名

在 TAIR 7.0 中, 拟南芥 *GASA* 家族共有 15 个成

员, 把 15 个 *GASA* 基因命名为 *GASA1*~*GASA15*, 各基因在 NCBI 和 TAIR 等数据库中相对应的基因号码见表 1. 大多数 *GASA* 蛋白含有 100 个左右的氨基酸, 所有 *GASA* 蛋白的 N 端均有一可剪切的信号肽, C 端含有 60 个左右氨基酸的 *GASA* 保守结构域, *GASA* 结构域中含有 12 个位置保守的半胱氨酸.

表 1 拟南芥 *GASA* 家族基因的命名

基因	拟南芥 基因号	氨基酸长度 /个	信号肽剪切点 (后) ^{a)}	<i>GASA</i> 结构域
<i>GASA1</i>	At1g75750	98	23	39~98
<i>GASA2</i>	At4g09610	99	25	39~98
<i>GASA3</i>	At4g09600	99	26	40~99
<i>GASA4</i>	At5g15230	106	25	46~106
<i>GASA5</i>	At3g02885	97	27	38~97
<i>GASA6</i>	At1g74670	101	23	42~101
<i>GASA7</i>	At2g14900	108	23	49~108
<i>GASA8</i>	At2g39540	87	25	29~87
<i>GASA9</i>	At1g22690	119	24	60~119
<i>GASA10</i>	At5g59845	89	25	29~89
<i>GASA11</i>	At2g18420	88	23	28~88
<i>GASA12</i>	At2g30810	106	22	47~106
<i>GASA13</i>	At5g15230	275	21	215~275
<i>GASA14</i>	At1g10588	90	26	31~90
<i>GASA15</i>	At3g10185	103	20	44~103

a) 信号肽剪切位点的分析软件为 TargetP 1.1

利用 MEGA 软件(MEGA 3.1)的邻位相连法(NJ)对拟南芥 *GASA* 家族 15 个成员的氨基酸进行了聚类分析, 生成的 NJ 系统进化树如图 1 所示. 根据相互之间

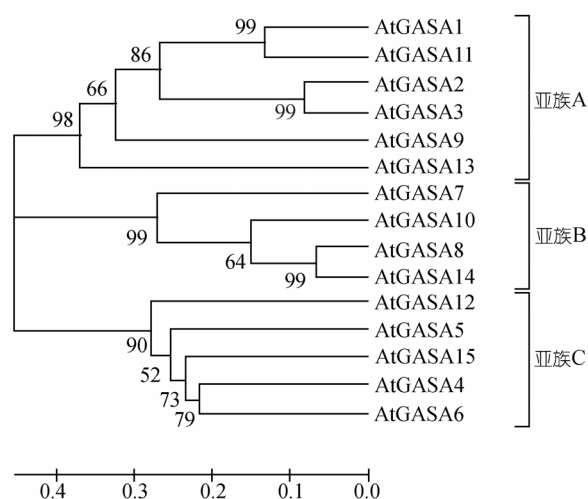


图 1 拟南芥 *GASA* 基因家族系统进化树

系统进化树利用 MEGA 软件(MEGA 3.1)的邻位相连法(NJ)生成, 经 Bootstrap 重复验证 1000 次, 分支上的数据表示重复验证可信度的百分比

的同源性可以把拟南芥 *GASA* 基因家族分为 A, B 和 C 三个亚族. 在亚族 A 中有两个同源基因对: *GASA1*-*GASA11* 和 *GASA2*-*GASA3*, 亚族 B 中有 *GASA8*-*GASA14* 同源基因对, 亚族 C 中有 *GASA4*-*GASA6* 同源基因对.

2.2 *GASA* 基因家族对 GA₃ 和 ABA 的响应

100 μmol/L GA₃, 10 μmol/L PAC 和 100 μmol/L ABA 分别处理 15 d 的拟南芥幼苗 4 h, 结果(图 2)表明, *GASA4*, *GASA6*, *GASA7*, *GASA8*, *GASA13* 的表达受 GA₃ 的诱导, 其中前 3 个基因还受 GA 合成抑制剂 PAC 的抑制. *GASA1*, *GASA5*, *GASA9* 和 *GASA11* 的表达受外源 GA₃ 的抑制, PAC 处理对这几个基因的表达的促进作用很微弱. GA₃ 对 *GASA10*, *GASA12*, *GASA14* 和 *GASA15* 的表达无明显影响. ABA 通常与 GA₃ 有拮抗作用, 它可诱导 *GASA2/3*, *GASA5* 和 *GASA14* 的表达, 其中对 *GASA2/3* 作用最明显. *GASA7* 和 *GASA9* 的表达受 ABA 的抑制, ABA 对其他基因的表达没有明显影响.

2.3 *GASA* 基因在 *DELLA* 突变体中的表达

利用 RT-PCR 检测 *DELLA* 基因缺失突变体 *gai-t6*, *rga24* 以及双突变体 *gai-t6/rga24* 中 *GASA* 基因的表达, 结果发现, 与野生型(Ler)相比, *GASA4* 和 *GASA6* 在 3 种 *DELLA* 缺失突变体中的表达含量升高, 而 *GASA1* 和 *GASA9* 的表达则降低(图 3(a)和(b)), 而其他 *GASA* 基因在这 3 种突变体中的表达水平则没有明显差异(结果未显示). 研究结果说明, *GASA1* 和 *GASA9* 表达受 *DELLA* 促进, 而 *GASA4* 和 *GASA6* 的表达则受 *DELLA* 抑制. 由于 *DELLA* 蛋白受 GA 的抑制, 因此 *GASA4* 和 *GASA6* 是受 GA 诱导的基因, 而 *GASA1* 和 *GASA9* 是受 GA 抑制的基因, 与图 2 的结果相一致.

进一步利用实时荧光定量 PCR 检测 *GASA1*, *GASA4*, *GASA6* 和 *GASA9* 在拟南芥 *DELLA* 突变体 *gai-t6*, *rga-24*, *gai-t6/rga-24* 中的表达, 与野生型相比, *GASA1* 和 *GASA9* 在突变体中的表达均明显降低, 而 *GASA4* 和 *GASA6* 的表达则明显升高, 与 RT-PCR 检测的结果相一致(图 3(c)).

2.4 RT-PCR 检测 *GASA* 基因在植物体不同组织的表达

利用 RT-PCR 检测了根、茎、莲座叶、茎生叶、花和幼嫩荚果等不同组织中 *GASA* 基因的表达. 结果发现(图 4), *GASA1*, *GASA4*, *GASA5*, *GASA7*, *GASA8*,

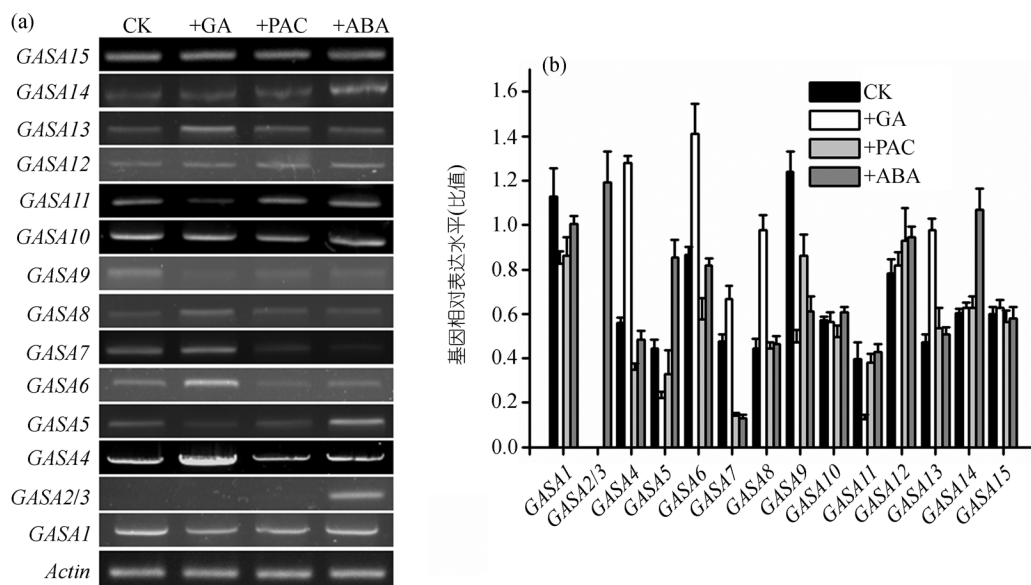


图2 外源 GA_3 和 ABA 对 *GASA* 家族基因表达的影响

(a) RT-PCR 检测外源 GA_3 和 ABA 处理后 *GASA1*~*GASA15* 基因的表达。用无菌水(CK), 100 $\mu\text{mol/L}$ GA_3 (+GA), 10 $\mu\text{mol/L}$ PAC (+PAC)和 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA (+ABA)分别处理 15 d 的野生型拟南芥幼苗 4 h. (b) RT-PCR 结果的量化。比值=目的基因电泳条带的吸光度峰值/*Actin* 的吸光度峰值, 数值为平均值 $\pm$ 标准差

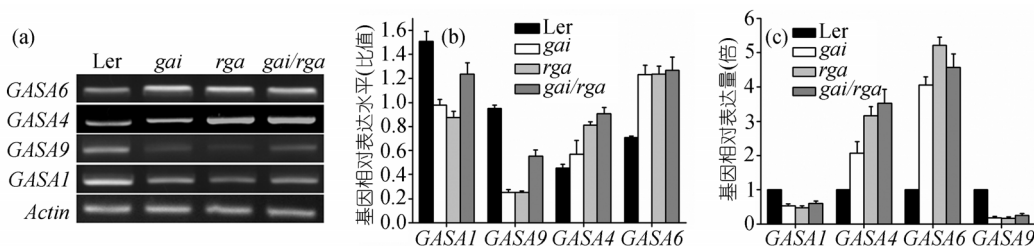


图3 *DELLA* 突变体中 *GASA* 基因的表达

(a) RT-PCR 检测 *DELLA* 突变体中 *GASA1*, *GASA9*, *GASA4* 和 *GASA6* 的表达变化. (b) RT-PCR 结果的量化。比值=目的基因电泳条带的吸光度峰值/*Actin* 的吸光度峰值, 数值为平均值 $\pm$ 标准差. (c) Real-Time PCR 检测 *DELLA* 突变体中 *GASA1*, *GASA4*, *GASA6* 和 *GASA9* 的表达, 通过以 18S rRNA 为内参对照对数据进行均一化处理后, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示目的基因的相对表达量, 倍数表示相对于野生型(Ler)对照, 基因在突变体中表达量的变化, 数值为平均值 $\pm$ 标准差. *gai*, *gai-t6*; *rga*, *rga-24*; *gai/rga*, *gai-t6/rga-24*

GASA10, *GASA11* 和 *GASA13* 在各个组织均有表达. *GASA2* 和 *GASA3* 因为在染色体上的位置非常近, 且 cDNA 的同源性高达 73% (氨基酸同源性为 86%), 在设计引物的时候不能够区别开来, 所以我们用同一对引物来检测 *GASA2/GASA3* 的表达水平. 结果发现, 这两个基因在茎中有较弱的表达, 其他器官没有表达. *GASA6* 在根和莲座叶中没有检测到表达. *GASA9* 除在根中没有表达外, 在其他组织中均能检测到它的表达, 但在茎和花中的表达水平较低. *GASA12* 则只是特异地在幼嫩的荚果中表达, *GASA14* 特异地在拟南芥

的根中表达, 而 *GASA15* 在根和荚果中没有表达.

2.5 *GASA* 基因启动子驱动 *GUS* 在植物体不同组织的表达

通过将转基因拟南芥不同发育时期的组织器官进行 *GUS* 染色, 从图 5 中可以看出, 在根中, *pGASA6::GUS* 的表达主要集中在根尖(a)和侧根发生位点(b); 在幼苗生长时期的地上部分, *pGASA6::GUS* 的表达在茎尖生长点、子叶叶柄、真叶叶柄、下胚轴的维管组织(c)以及子叶的叶肉细胞(d)中有非常强的表达. 在生殖生长阶段, *pGASA6::GUS* 主要在花序轴(e)、

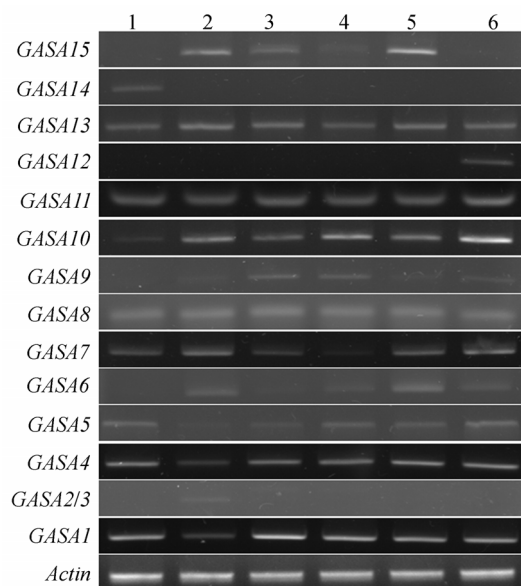


图 4 *GASA* 基因在拟南芥不同组织中的表达

1, 15 d 龄植株的根; 2, 45 d 龄植株的茎; 3, 35 d 龄植株的莲座叶; 4, 45 d 龄植株的茎生叶; 5, 45 d 龄植株的花; 6, 45 d 龄植株的幼嫩荚果

茎生叶的维管以及茎生叶基部新生的花序轴分枝(f), 花萼的微管组织、花药、花丝、未成熟的种子以及各轮花器官着生处即离层区有较强表达(g). Roxrud 等人^[21]报道 *pGASA10::GUS* 在根、子叶、莲座叶、种子等部位表达. 我们还在刚萌发幼苗的子叶和胚轴中检测到非常强的 GUS 染色(h), GUS 在幼苗茎尖以及刚生长出的真叶中有很强的表达(i). 在生殖阶段, 还能在花器官萼片的维管组织(j)、花丝以及柱头顶端检测到 GUS 染色(k). 在 *pGASA8::GUS* 转基因幼苗中, 除 Roxrud 等人^[21]报道的根和幼嫩的种子外, 我们在幼苗子叶叶柄、子叶、茎尖以及刚长出的真叶叶柄(l), 下胚轴和下胚轴维管组织中(m)检测到了非常强的 GUS 表达, 成熟的莲座叶中 GUS 表达也较强(n). 进入生殖期后, GUS 的表达主要集中在花萼、花瓣基部的维管组织、花丝和柱头顶端(o), 荚果中果柄与果荚的交界处即离层区也能检测到基因的表达(p).

在 *pGASA11::GUS* 转基因植株中(图 6), GUS 在

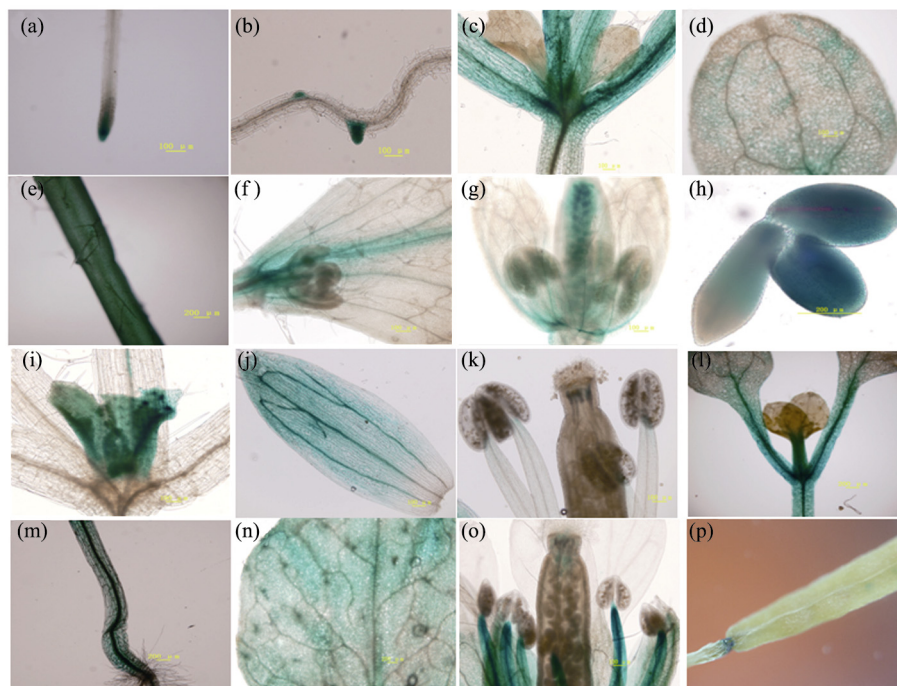


图 5 *GASA6*, *GASA8*, *GASA10* 基因启动子驱动 GUS 的表达模式

(a)~(g) *pGASA6::GUS* 植株: (a) 根尖; (b) 侧根发生点; (c) 幼苗的茎尖生长点、子叶叶柄、真叶叶柄、下胚轴的维管组织; (d) 子叶; (e) 花序轴; (f) 茎生叶及花序轴分枝; (g) 花萼、花药、花丝、未成熟的种子以及离层区. (h)~(k) *pGASA10::GUS* 植株: (h) 子叶和胚轴; (i) 茎尖; (j) 花萼; (k) 花丝和柱头. (l)~(p) *pGASA8::GUS* 植株: (l) 幼苗子叶叶柄、子叶、茎尖以及刚长出的真叶叶柄; (m) 下胚轴; (n) 成熟莲座叶; (o) 花器官; (p) 离层区

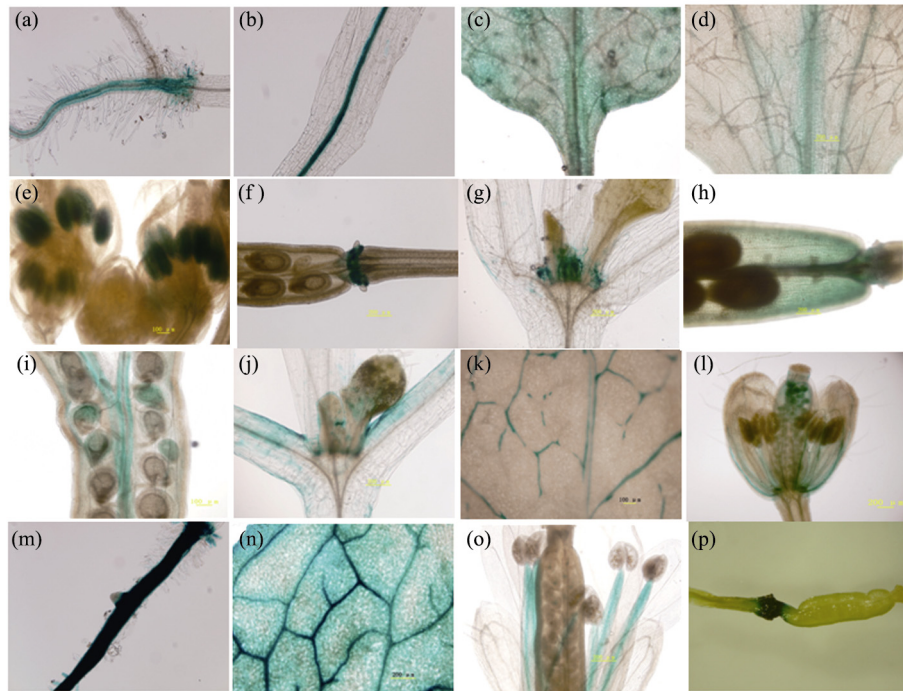


图6 *GAS11*, *GAS12*, *GAS49* 和 *GAS47* 基因启动子驱动 GUS 的表达模式

(a)~(f) *pGAS11::GUS* 植株: (a) 主根; (b) 下胚轴; (c) 莲座叶; (d) 茎生叶; (e) 花药; (f) 离层区; (g)~(i) *pGAS12::GUS* 植株: (g) 茎尖; (h) 果荚; (i) 幼嫩种子; (j)~(l) *pGAS9::GUS* 植株: (j) 茎尖、子叶叶柄和下胚轴; (k) 莲座叶; (l) 花器官; (m)~(p) *pGAS47::GUS* 植株: (m) 主根; (n) 莲座叶; (o) 花丝和胚珠; (p) 离层区

主根(a)和下胚轴的维管组织(b)表达较强,在莲座叶(c)以及茎生叶(d)中也有表达;花器官中,GUS 比较特异地在花药中表达(e);荚果中,GUS 只在果柄与果荚的交界处即离层区(f)表达明显。*pGAS12::GUS* 活性具有比较明显的专一性(图 6),在营养生长阶段,目前只在转基因植株幼苗的茎尖分生组织区(g)检测到 GUS 表达,而在生殖生长阶段,只在荚果的果荚上(h)检测到 GUS 染色,尤其是在果荚背缝线的维管组织中(i)表达明显,同时未成熟的种子中也有 GUS 表达(i)。

如图 6 所示,*pGAS9::GUS* 转基因植株的营养生殖阶段,GUS 染色主要在茎尖、子叶叶柄、下胚轴(j)以及莲座叶的维管组织(k)中被检测到,生殖生长阶段,GUS 基因主要在花萼、花丝、柱头顶端以及幼嫩的种子中表达,同时在花器官着生的基部即离层区的表达也较强(l)。在 *pGAS47::GUS* 转基因植株(图 6)中,GUS 在主根(m)和莲座叶的微管组织(n)中表达非常强,生殖阶段的花丝和胚珠(o)中能够检测到基因的表达,荚果中表达主要是集中在果柄与果荚交界离层区(p)。

3 讨论

拟南芥 *GASA* 基因家族有 15 个成员,所有成员均具有 1 个 20~27 个氨基酸长度的信号肽,并且在信号肽后面均具有一个剪切位点(表 1),整个家族蛋白可能均属于分泌型胞外蛋白。蛋白功能结构域分析发现,14 个成员均含有 1 个保守的 *GASA* 结构域,包含了 60 个左右的氨基酸。而 *GASA13* 蛋白除具有 *GASA* 结构域外,还具有一个 PRP 结构域。PRP 结构域是细胞壁蛋白一个重要的特征,彭建宗等人^[22]在非洲菊 (*Gerbera hybrida*) 中发现了一个新的细胞壁蛋白 PRGL,该蛋白与 *GASA13* 具有较高同源性,也同时具有 PRP 和 *GASA* 两个结构域。*GASA13* 基因同时含有 PRP 结构域和 *GASA* 结构域,从一个方面说明 *GASA* 结构域也可能与细胞壁相关。研究表明,水稻中的 *OsGASR1* 和 *OsGASR2*^[11] 位于细胞壁,而拟南芥 *GASA* 蛋白的定位需要进一步的实验证明。

一些植物基因的启动子序列上存在与植物激素相关的顺式作用元件,最常见的 GA 顺式作用元件是 GARE,而与之相拮抗的则是受 ABA 调控的顺式作用元件 ABRE^[23]。我们利用 PLACE^[24] 植物顺式作用元件

分析软件, 对拟南芥 15 个 *GASA* 基因 ATG 上游 1200 bp 左右的序列进行了分析, 发现每个 *GASA* 基因的启动子序列中均含有 1~4 个 GARE 和 1~5 个 ABRE, 还存在着其他类型与 GA 和 ABA 相关的顺式作用元件, 说明 *GASA* 基因可能受 GA 和 ABA 的双重调控. 外源 GA_3 和 ABA 处理后进行基因表达分析的实验结果(图 2)表明, 除 *GASA10*, *GASA12*, *GASA14* 和 *GASA15* 这 4 个基因不受外源 GA_3 的影响, 其他成员都对 GA_3 有响应; 5 个成员对 ABA 处理有响应, 其中 *GASA4*, *GASA6* 和 *GASA7* 对外源激素的响应基本一致, 都受 GA_3 的诱导, 受 PAC 和 ABA 的抑制, *GASA4* 和 *GASA6* 在进化中也处于同一亚族的相邻位置, 属于同源基因对(图 1). *GASA2/3* 在对照及 GA, PAC 处理过的材料中均未能检测到表达, 但是对 ABA 则非常敏感, 在 ABA 处理的材料中能够检测到较高浓度的表达. *GASA2*, *GASA3* 和 *GASA4* 对外源 GA 的响应与前人的研究结果^[17,18]一致. 另外, 受 GA_3 抑制及 ABA 诱导的基因为 *GASA5*. GA_3 和 ABA 对 *GASA9* 基因都具有抑制作用. 本研究结果表明, 部分拟南芥 *GASA* 基因可能是 GA 和 ABA 这两种重要植物激素信号的整合子, 为研究 GA 和 ABA 的相互作用提供了重要线索.

DELLA 蛋白是赤霉素信号途径中的关键组分, 在植物的生长发育过程中起着非常重要的作用^[1]. 目前, 对 DELLA 蛋白下游组分基因的发现和功能研究是植物信号转导研究中的一个热点. GA 能够促进或者抑制 *GASA* 的表达, 这种调控作用是否经过 DELLA 蛋白而起作用? *GASA* 是否作为 DELLA 蛋白的下游靶组分来起作用? 这些目前还未见报道. 本研究研究表明, GA_3 调控 *GASA1*, *GASA4*, *GASA6* 和 *GASA9* 的表达可能通过 DELLA 蛋白起作用, DELLA 蛋白抑制 *GASA4* 和 *GASA6* 的表达, 促进 *GASA1* 和 *GASA9* 的表达(图 3). 而其他 *GASA* 基因的表达在 DELLA 突变体中则没有明显变化(结果未列出), GA 对其他 *GASA* 基因的调控有可能是通过不依赖于 DELLA 蛋白的通路起作用. 我们的实

验结果暗示 *GASA1*, *GASA4*, *GASA6* 和 *GASA9* 是 DELLA 蛋白的下游靶基因. 这些基因的功能以及与 DELLA 之间的详细关系都需要更深入的研究. 我们的研究为进一步研究 *GASA* 基因的功能提供了重要依据.

Roxrud 等人^[21]首次报道了 *GASA8*, *GASA10* 和 *GASA13* 启动子驱动 GUS 的表达模式, 并对前人报道的 *GASA1*~*GASA4* 的 GUS 表达模式进行了补充. 本研究通过对 7 个转基因植株进行 GUS 染色后的观察可以看出, GUS 的表达主要集中在根、维管组织、下胚轴、子叶、茎尖、叶、花、荚果、花器官与花柄交界以及荚果与果柄交界的离层区、种子等器官中, 各个基因在不同器官中的表达总结于表 2. 从表 2 中可以看出, *GASA6*, *GASA8* 和 *GASA10* 在不同器官中均有表达, 但是 RT-PCR 并没有检测到 *GASA6* 在根中的表达, 从 GUS 染色图(图 5)可以看出, *GASA6* 启动子驱动 GUS 在根中的表达仅出现在根尖和侧根生长点, 而在根的其他部位和成熟的侧根中则检测不到 GUS 的表达, 因此, 根生长点 RNA 比例少, 检测不到基因的表达是可能的原因. *GASA12* 表达也有相似的差异, RT-PCR 发现在荚果中有表达, 但 GUS 染色发现它还在茎尖中有较强的表达. 与 Roxrud 等人^[21]的结果相比, 本研究发现 *GASA10* 还在茎尖以及花器官的花萼、花丝以及柱头中有表达. 此外, Roxrud 等人^[21]报道了 *GASA8* 在根和种子中有表达, 而本研究则发现该基因还在维管组织、下胚轴、子叶、茎尖、莲座叶、花萼、花瓣、花丝、柱头、荚果与果柄交界处的离层区等器官中均有较强的表达.

从 RT-PCR 结果(图 4)中可以看出, 大多数 *GASA* 基因均在花序轴即茎中有表达, 有些基因在茎中的 GUS 染色只是较弱地存在于部分维管组织中, 但茎的切口则会有较强的 GUS 表达(结果未显示). 由于 *GASA* 中的 12 个半胱氨酸的保守结构属于植物抗菌肽保守结构的一种^[25], 因此推测 *GASA* 蛋白在植物防御反应中可能会起作用.

在实验中发现一个比较特殊的现象, 即大部分

表 2 *GASA* 基因的器官表达模式

基因	根	下胚轴	子叶	茎尖	叶	花	荚果	种子	维管束	离层
<i>GASA6</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>GASA7</i>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>GASA8</i>	+(R) ^{a)}	+	+	+	+	+	+	+(R)	+	+
<i>GASA9</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>GASA10</i>	+(R)	+(R)	+(R)	+	+(R)	+	+	+(R)	+(R)	-
<i>GASA11</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
<i>GASA12</i>	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+

a) (R)表示Roxrud等人^[21]的研究结果

*GASA*基因都在花器官与花柄交界处以及果荚和果柄交界处的离层区有较强的表达, 离层区主要是在植物的器官脱落过程中起作用, ABA在离层区的形成过程中起重要作用^[26], *GASA*基因的启动子大都存在ABA顺式作用元件ABRE, 因此可以推测, *GASA*基因在离层区的表达可能是受ABA所调控的。

大部分基因在茎尖分生组织中有表达, 并且在

其他分生区如根尖、侧根发生点以及花序轴分枝处也可检测到较强的表达, 推测拟南芥*GASA*基因可能与细胞的分裂有关。所有*GASA*基因在营养丰富的生殖器官中尤其是在花器官中表达都较强, 已有的研究发现非洲菊GEG蛋白与花器官的发育相关^[15], 在拟南芥中, *GASA*蛋白是否与花发育及开花基因相关还有赖于进一步对它们的功能进行详细研究。

参考文献

- Fleet C M, Sun T P. A DELLAcate balance: The role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(1): 77—85^[DOI]
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, et al. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 2005, 437(7059): 693—698^[DOI]
- Peng J, Carol P, Richards D E, et al. The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev*, 1997, 11(23): 3194—3205^[DOI]
- Silverstone A L, Mak P Y, Martínez E C, et al. The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 1997, 146(3): 1087—1099
- Gan Y, Kumimoto R, Liu C, et al. GLABROUS INFLORESCENCE STEMS modulates the regulation by gibberellins of epidermal differentiation and shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2006, 18(6): 1383—1395^[DOI]
- Yu H, Ito T, Zhao Y X, et al. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(20): 7827—7832^[DOI]
- Achard P, Herr A, Baulcombe D C, et al. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 2004, 131(14): 3357—3365^[DOI]
- Shi L, Gast R T, Gopalraj M, et al. Characterization of a shoot-specific, GA₃- and ABA-regulated gene from tomato. *Plant J*, 1992, 2(2): 153—159
- Taylor B H, Scheuring C F. A molecular marker for lateral root initiation: The RSI-1 gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is activated in early lateral root primordia. *Mol Gen Genet*, 1994, 243(2): 148—157
- Ben-Nissan G, Lee J Y, Borohov A, et al. GIP, a *Petunia hybrida* GA-induced cysteine-rich protein: A possible role in shoot elongation and transition to flowering. *Plant J*, 2004, 37(2): 229—238
- Ben-Nissan G, Weiss D. The petunia homologue of tomato *gast1*: Transcript accumulation coincides with gibberellin-induced corolla cell elongation. *Plant Mol Biol*, 1996, 32(6): 1067—1074^[DOI]
- Segura A, Moreno M, Madueno F, et al. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*, 1999, 12(1): 16—23^[DOI]
- Berrolcal-Lobo M, Segura A, Moreno M, et al. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. *Plant Physiol*, 2002, 128(3): 951—961^[DOI]
- Furukawa T, Sakaguchi N, Shimada H. Two *OsGASR* genes, rice GAST homologue genes that are abundant in proliferating tissues, show different expression patterns in developing panicles. *Genes Genet Syst*, 2006, 81(3): 171—180^[DOI]
- Kotilainen M, Helariutta Y, Mehto M, et al. GEG participates in the regulation of cell and organ shape during corolla and carpel development in *Gerbera hybrida*. *Plant Cell*, 1999, 11(6): 1093—1104^[DOI]
- de la Fuente J I, Amaya I, Castillejo C, et al. The strawberry gene FaGAST affects plant growth through inhibition of cell elongation. *J Exp Bot*, 2006, 57(10): 2401—2411^[DOI]
- Herzog M, Dorne A, Grellet F. *GASA*, a gibberellin-regulated gene family from *Arabidopsis thaliana* related to the tomato *GAST1* gene. *Plant Mol Biol*, 1995, 27(4): 743—752^[DOI]
- Aubert D, Chevillard M, Dorne A-M, et al. Expression patterns of *GASA* genes in *Arabidopsis thaliana*: The *GASA4* gene is up-regulated by gibberellins in meristematic regions. *Plant Mol Biol*, 1998, 36(6): 871—883^[DOI]
- Izhaki A, Swain S M, Tseng T S, et al. The role of SPY and its TPR domain in the regulation of gibberellin action throughout the life cycle of *Petunia hybrida* plants. *Plant J*, 2001, 28(2): 181—190^[DOI]
- Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3901—3907
- Roxrud I, Lid S E, Fletcher J C, et al. *GASA4*, one of the 14-member *Arabidopsis* *GASA* family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(3): 471—483^[DOI]
- 彭建宗, 赖柳静, 王小菁. PRGL: 非洲菊细胞壁中一种含 *GASA* 结构域的富脯氨酸蛋白. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2008, 38(5): 458—463
- Rogers J C, Rogers S W. Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid *cis*-acting hormone response complexes. *Plant Cell*, 1992, 4(11): 1443—1451^[DOI]
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 297—300^[DOI]
- Silverstein K A, Moskal-Jr W A, Wu H C, et al. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant J*, 2007, 51(2): 262—280^[DOI]
- Jackson M B, Osborne D J. Abscisic acid, auxin, and ethylene in explant abscission. *J Exp Bot*, 1972, 23(3): 849—862