

烟草 GA 合成调控转录因子 RSG 应答甲醇和乙醇刺激的分子机理初探

刘 蕾, 杨志丽, 陈丽梅*

(昆明理工大学 生命科学与技术学院 生物工程技术研究中心, 昆明 650500)

摘 要: 为了考察甲醇或乙醇促进植物生长与赤霉素(GA)的合成关系, 该研究在 MS 固体培养基中培养并添加外源 GA 和 GA 合成抑制剂多效唑(PAC), 分析其对 2 mmol/L 甲醇或乙醇促进烟草生长的影响及 GA 合成调控转录因子 RSG(for repression of shoot growth)应答甲醇或乙醇刺激的分子机理。结果显示: (1) 外源添加 GA 可增强甲醇或乙醇对烟草生长的刺激作用, 而添加 PAC 却抑制甲醇和乙醇对烟草生长的刺激作用。 (2) 14-3-3 蛋白与 RSG 结合抑制 RSG 进入细胞核及其转录调控活性; 甲醇和乙醇诱导烟草 14-3-3 基因的转录和表达, 对 RSG 蛋白表达也有诱导作用。 (3) 甲醇和乙醇可降低 14-3-3 蛋白与 RSG 的相互作用, 同时增强 RSG 与 GA20ox1 启动子的结合。研究表明, 甲醇和乙醇刺激烟草的生长可能通过增加 RSG 表达, 且减弱 RSG 与 14-3-3 蛋白的结合来增加 RSG 细胞核定位作用, 从而增强 RSG 与 GA20ox1 启动子的结合, 最终增加 GA 的合成, 从而促进烟草的生长, 这可能是甲醇和乙醇促进烟草生长的一种重要的分子机制。

关键词: 烟草; 甲醇; 乙醇; RSG 转录因子; GA 合成

中图分类号: Q789

文献标志码: A

GA Synthesis-regulated Transcription Factor RSG in Response to Methanol and Ethanol Stimulation in Tobacco

LIU Lei, YANG Zhili, CHEN Limei*

(Biotechnology Research Center, Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Life Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: To understand whether methanol- or ethanol-promoted plant growth is related to the synthesis of gibberellin (GA), we investigated the effects of exogenous GA and paclobutrazol (PAC), an inhibitor of GA synthesis, on 2 mmol/L methanol- and ethanol-stimulated growth of tobacco on MS agar medium and analyzed the molecular mechanism of RSG, the GA synthesis-regulated transcription factor, in response to methanol- and ethanol-stimulation in tobacco. The results showed that: (1) The addition of exogenous GA enhanced the stimulation of methanol and ethanol on tobacco growth while addition of PAC inhibited their stimulation to tobacco growth. (2) The binding of 14-3-3 proteins with RSG inhibits RSG transport into nucleus and reduced its transcriptional regulatory activity. Methanol and ethanol induced transcription and expression of 14-3-3 genes as well as RSG protein expression. (3) Methanol and ethanol reduced the interaction of 14-3-3 proteins and RSG while enhanced the binding of RSG to GA20ox1 promoter. These results indicated that methanol- and ethanol-stimulated tobacco growth might be achieved through increasing nu-

收稿日期: 2013-12-21; 修改稿收到日期: 2014-03-20

基金项目: 国家自然科学基金(31260063)

作者简介: 刘 蕾(1989—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物代谢途径基因工程研究。E-mail: dawson89@126.com

* 通信作者: 陈丽梅, 教授, 硕士生导师, 主要从事植物代谢途径基因工程研究。E-mail: chenlimeikm@126.com

clear localization of RSG by inducing RSG expression and simultaneously reducing the interaction of RSG with 14-3-3 proteins. Consequently, the binding of RSG and GA20ox1 promoter was enhanced and GA protein synthesis increased, thereby promoting the growth of tobacco. These changes might consist of an important molecular mechanism underlying methanol- and ethanol-promoted tobacco growth.

Key words: tobacco; methanol; ethanol; RSG transcription factor; GA synthesis

甲醇是植物体内产生并能通过 C1 代谢和光合作用同化的一种 C1 化合物,很多研究发现甲醇能刺激植物生长,缩短植物生育期,调控植物的光合作用及基因的表达,目前关于甲醇刺激植物生长的机制主要有以下几种假说和推测:碳源假说、增强光合作用并抑制光呼吸假说、推动钙离子由成熟组织向新生组织的转移、细胞分裂素介导和影响激素生成假说^[1]。乙醇是植物细胞在无氧状态下由糖酵解产生的一种产物,在能利用乙醇为碳源的微生物如构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中证实乙醇可以强烈诱导与其代谢相关基因的表达^[2]。最近有研究报道^[3-4]在植物叶片上喷施乙醇和甲醇有相似的效果,乙醇也能刺激植物生长,增加植物气孔的导度和光合作用及生物量的积累,降低叶片中过氧化氢的含量,提高质膜 H⁺-ATP 酶的活性,有些研究还发现乙醇对植物的生长及生理生化特性的影响比甲醇还强烈。

为了深入考察甲醇和乙醇促进植物生长的机理,有些研究利用 DNA 芯片及其他分子生物学方法分析甲醇和乙醇对植物基因表达的影响^[5-7],结果说明甲醇和乙醇在植物中可能作为信号分子或诱导物起作用,调控很多基因的表达,且在 cDNA 芯片的数据中发现和 GA 合成及其生理功能相关基因的表达也受到甲醇和乙醇的调控,这说明甲醇和乙醇的喷施可能也通过影响植物中 GA 的合成及生理作用来调控植物的生长^[7]。在烟草中 RSG 是一个含有碱性亮氨酸拉链(bZIP)的 GA 合成调控转录因子,通过调节 GA 合成关键酶 KO(贝壳杉烯(ent-kauene)氧化酶)和 GA20ox1(GA18 氧化酶)的表达来控制内源 GA 含量^[8]。RSG 与 GA20ox1 启动子的结合受烟草体内 GA 含量的反馈调节^[9]。14-3-3 蛋白是植物体内一种重要的调控蛋白,通过与植物中的多种信号传导相关蛋白相互作用来调节植物对外界环境刺激的应答^[10]。当烟草体内 GA 含量降低或应用 PAC(内源性 GA 合成抑制剂)抑制 GA 合成时,细胞质中的 14-3-3 蛋白与 RSG 结合减少,使 RSG 定位于细胞核中,RSG 与 KO 和 GA20ox1 启动子结合,提高它们的表达水平,GA 的合成量增

加;反之,添加外源 GA 时则增强 14-3-3 蛋白与 RSG 的结合使 RSG 定位到细胞质中,RSG 与 KO 和 GA20ox1 启动子结合受到抑制,它们的表达水平下降,GA 的合成量减少^[11]。为了深入研究甲醇和乙醇刺激植物生长的分子机理,本研究以烟草为实验材料,通过比较甲醇和乙醇处理前后烟草鲜重和根长的变化,考察甲醇和乙醇刺激对烟草中 14-3-3 和 RSG 的转录和表达水平及它们相互作用、RSG 与 GA20ox1 启动子结合的影响,分析 RSG 应答甲醇和乙醇的分子机理,为甲醇和乙醇作为植物生长调节剂的广泛用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料培养与处理

为了排除微生物干扰,烟草的培养及处理均在无菌条件下进行。烟草(ecotype, *Nicotiana tabacum* cv. Xanth)种子经表面消毒后,播种到 MS 培养基(含 1%蔗糖, pH 5.7)上,在培养箱培养(25 ℃,持续光照, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)3~5 d,然后转入温室条件下(日间 30 ℃/夜间 25 ℃, 12 h 光照, 1 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)生长 2 周,选择大小均一的植株切去根后转移至 MS(CK)、MS+2 mmol/L 甲醇(或乙醇)、MS+2 mmol/L 甲醇(或乙醇)+10 $\mu\text{mol/L}$ GA(或 0.5 $\mu\text{mol/L}$ PAC)的培养基中,培养 15 d 后测量处理前后根伸长量和植株鲜重增加量。

1.2 方 法

1.2.1 RT-PCR 分析 有根的烟草幼苗转移至 MS(CK)、MS+2 mmol/L 甲醇(乙醇)、MS+2 mmol/L 甲醇(乙醇)+10 $\mu\text{mol/L}$ GA(0.5 $\mu\text{mol/L}$ PAC)的培养基中处理 0、1、3、5、7 d,收集叶片用 TRIzol® Reagent(Invitrogen 公司)提取总 RNA,取 4 μg 总 RNA 用 M-MLV Reverse Transcriptase(Promega 公司)反转录合成 cDNA,分别用烟草 14-3-3 和 RSG 基因上下游引物(表 1)进行 RT-PCR, RT-PCR 分析以烟草 18S rRNA 作为内参。

1.2.2 Western blotting 分析 烟草植株处理见 1.2.1,各取 0.5 g 烟草叶片提取可溶性总蛋白,烟

表 1 RT-PCR 所用引物序列

Table 1 Primer sequences used in RT-PCR analysis

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence(5' - 3')	退火温度 T _m /℃	产物大小 Product size/bp
14-3-3a	Forward	AATGAAGGGAGATTATTACAGG	52.8	211
	Reverse	ATTACAAGCACGGTCAGGAG	55.1	
14-3-3b	Forward	CAGAGGAACTCACGGTAGAGG	56.4	420
	Reverse	CCAGTCCAAGTCGGATAGGG	59.3	
14-3-3c	Forward	TCGTGGCGTATTATCTCATC	59.3	267
	Reverse	ACTTTCAGCAGCCTCCTTAC	53.9	
14-3-3d	Forward	TAGTGATGTTTGTGCTGGAA	51.8	393
	Reverse	AATAACTGCATGATAAGGGTG	52.4	
14-3-3e	Forward	AAGGTCGCAAAGACAGTAGATG	56.6	244
	Reverse	AATGGGACTCAAGGAGGTTC	55.4	
14-3-3f	Forward	TCTGTAACGGTATCCTCAAGC	54.7	418
	Reverse	ATGTCCGAGGTCCACAAAGT	56.5	
14-3-3g	Forward	AGCCGAACGCTATGAAGAAA	57.9	301
	Reverse	AGAAGCAGATGGCACGAGAT	57.1	
14-3-3h	Forward	GGAActAACCGTCGAAGAAC	54.0	303
	Reverse	TTAAACTCAGCCAAATAGCG	53.9	
14-3-3i	Forward	GGGTCTCCTTGAGTCCCATTT	59.5	416
	Reverse	CAGCATCCTCCGCATTATCT	57.7	
RSG	Forward	ATGGACCCGAAGTTCAGCGGAAAGC	72.4	1076
	Reverse	TCAACCCCTGTTATTGAAGTTCATG	62.4	
18S rRNA	Forward	GGGCATTTCGTATTTTCATAGTCAG	58.6	287
	Reverse	AAGGGATACCTCCGCATAGC	58.5	

草叶片分别在液氮中充分研磨至粉末状,加入 10 mL 蛋白抽提液(100 mmol/L Tris-HCl,5% PVP,1 mmol/L PMSF,10 mmol/L 巯基乙醇,10% 甘油),继续研磨至充分混匀。抽提液转移到 2 mL 离心管中,在 4 ℃、12 000 r/min 下,离心 15 min。收集上清液加入固体硫酸铵至终浓度约 1.9 mol/L,沉淀蛋白。在 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min。收集的蛋白沉淀物溶解于 500 μL PBS buffer (2.7 mmol/L KCl,135 mmol/L NaCl,1.7 mmol/L KH₂PO₄,10 mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O)中。蛋白质浓度用 Bradford 法测定。

取可溶性总蛋白 50 μg 进行 Western blotting 分析,总蛋白通过 12% SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜(Millipore 公司)上。由于大豆 14-3-3 蛋白氨基酸序列和烟草的一致性极高,因此分别用大豆 14-3-3a 蛋白(anti-14-3-3a)或烟草 anti-RSG 蛋白的兔抗作为一抗与 PVDF 膜进行孵育,孵育后的膜分别与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗进行结合反应。最后用 ECL(北京康为世纪生物科技有限公司)发光试剂盒在成像系统 Chemidoc XRS(Bio-Rad 公司)中观察结果。

1.2.3 蛋白质免疫共沉淀分析 用免疫共沉淀(Co-IP)技术分析磷酸化 RSG 与 14-3-3 蛋白在烟草叶片中的相互作用对甲醇和乙醇刺激的应答。取 1.2.2 中提取的可溶性蛋白进行 Co-IP 分析,在 500

μg 总蛋白里加入 30 μL 有磷酸化修饰的烟草 RSG 特异多肽片段[RSGp,ESVVKLKGLDIDTIQQHY(p-T)V]制备的多克隆抗体(兔抗 anti-RSGp)沉淀与 RSG 结合的蛋白,用 PBS buffer 定容至 1 mL,室温振荡(45 r/min)孵育 2 h,然后往蛋白混合液里加入 30 μL protein A/G 琼脂糖,4 ℃振荡(45 r/min)孵育过夜。再将孵育后的蛋白混合液 4 ℃、3 500 r/min 离心 5 min,收集的蛋白沉淀复合物用遇冷的 PBS buffer 洗涤 3 次,蛋白沉淀物溶解于 40 μL 1×电泳上样缓冲液中,加入 8 μL 蛋白上样缓冲液并于沸水中加热处理 8 min,经冰浴后取 20 μL 蛋白沉淀复合物通过 12% SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上,膜首先用 anti-14-3-3a 或 anti-RSGp 抗体作为一抗进行 Western blot 分析,然后加入 5 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(北京康为世纪生物科技有限公司)后用 ECL 试剂盒显影观察结果。

1.2.4 染色质免疫共沉淀分析 烟草植株的处理同 RT-PCR 分析,取 1.5 g 烟草叶片放入含 35 mL crossing buffer (0.4 mmol/L 蔗糖,10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),1 mmol/L EDTA,1 mmol/L PMSF,1% 甲醛)中,于真空干燥器中交联 15 min 后,加入 2.5 mL 1 mol/L 甘氨酸抽真空 5 min 终止交联,用超纯水清洗 2~3 次后,投入液氮中,-80 ℃保存备用。用染色质免疫共沉淀(ChIP)分析

RSG 和 GA20ox1 启动子的结合对甲醇和乙醇刺激的应答,ChIP 参照 Ricardi 等^[12]的方法进行,在 ChIP 分析中用 anti-RSGp 抗体沉淀与 RSG 结合的 GA20ox1 启动子 DNA 片段,以 ChIP 沉淀的 DNA 片段为模板进行 PCR 反应,在 PCR 反应中使用 GA20ox1 启动子引物 Forward (5'-tgtggaattaagtattacatcaatc-3') 和 Reverse (5'-ttaagataaatacaacgctcgaacc-3') 扩增包含 RSG 结合位点的 DNA 片段,用图像分析软件 ImageJ 对 PCR 扩增条带的亮度进行相对定量分析。

1.3 数据处理

所有的生理生化指标分析均进行 3 次生物学重复。图中的数值为 3 组独立实验的均值±SD,用 DPS(软件)中 LSD 法进行统计学和差异显著性分析。不同字母表示不同处理后指标间的显著性差异($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 烟草应答甲醇和乙醇刺激的表型变化与 GA 相关性分析

本研究的前期实验结果说明,在 MS 培养基中添加 2 mmol/L 甲醇或乙醇都能促进烟草幼苗的生长^[13]。为了分析甲醇和乙醇刺激烟草的生长与 GA 合成是否有关联,根据相关文献报道 PAC 和 GA 用量^[14],在含有 2 mmol/L 甲醇或乙醇的 MS 培养基上添加 10 μ mol/L GA 或 0.5 μ mol/L PAC,比较在 MS(对照,CK)、MS+2 mmol/L 甲醇(乙醇)及 MS+2 mmol/L 甲醇(乙醇)+PAC(GA)的培养基上

处理 15 d(约 2 周)后烟草鲜重的相对增长量(图 1, A)和根的相对生长量(图 1, B)。图 1, A 的数据说明在含甲醇和乙醇的 MS 培养基中,烟草鲜重增长量分别是 CK 的 1.28 和 1.23 倍,在添加甲醇或乙醇及 PAC 的 MS 培养基中,烟草鲜重显著降低,约为 CK 的 0.82 和 0.87 倍,而在同时添加有甲醇(乙醇)及 GA 的 MS 培养基中,烟草鲜重增加的量比单独添加甲醇和乙醇的培养基显著,分别为仅添加甲醇(乙醇)处理的 1.3 和 1.25 倍。这些结果说明 PAC 的存在降低甲醇和乙醇对烟草生长的刺激作用,添加 GA 增强甲醇和乙醇对烟草生长的刺激作用。图 1, B 的数据表明在含有甲醇和乙醇的 MS 培养基中,烟草根的相对生长量分别为对照组 CK 的 1.42 和 1.35 倍(图 1, B),在同时添加有甲醇(乙醇)及 GA 的 MS 培养基中,烟草根相对生长量分别为 CK 的 1.75 和 1.64 倍,而在同时添加有甲醇或乙醇及 PAC 的 MS 培养基中,烟草根相对生长量明显减少,分别为只添加甲醇和乙醇的 0.84 和 0.86 倍。这些结果表明添加 GA 增强甲醇和乙醇对烟草根生长的刺激作用,而添加 PAC 抑制甲醇和乙醇对烟草生长的刺激作用。以上这些结果证实甲醇和乙醇可能是通过增加植物内源性 GA 的合成来促进烟草的生长,且甲醇刺激烟草生长的效果比乙醇更显著。

2.2 甲醇和乙醇对烟草 14-3-3 和 RSG 基因转录及表达水平的影响

分析甲醇(乙醇)对烟草中 14-3-3 和 RSG 基因的转录(图 2, A)和蛋白表达(图 2, B)的影响。结果

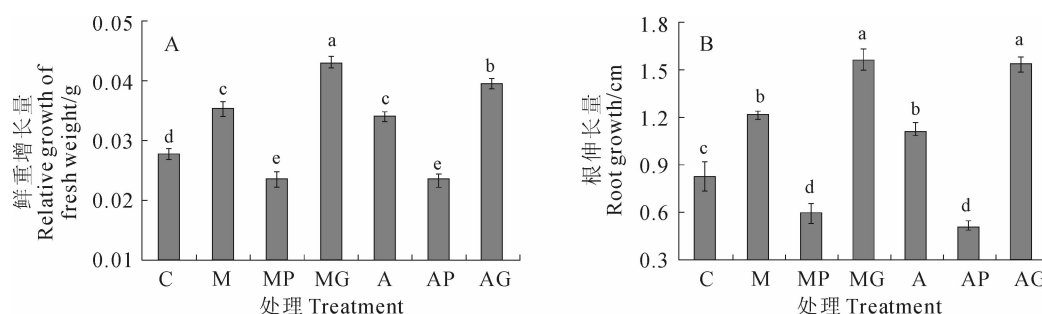


图 1 添加 PAC 和 GA 对 2 mmol/L 甲醇(乙醇)刺激烟草鲜重增长量(A)和根伸长量(B)的影响
C 表示对照处理;M、MP 和 MG 分别表示甲醇、甲醇+PAC 和甲醇+GA 处理 15 d;A、AP 和 AG 分别表示乙醇、乙醇+PAC、乙醇+GA 处理 15 d;不同小写字母表示处理间在 0.05 水平存在显著性差异;图上的棒线表示标准差($n=3$)

Fig. 1 Effects of PAC and GA additions on 2 mmol/L methanol- or ethanol-enhanced fresh weight and root growth in tobacco

C indicates control treatment for 15 d; M, MP and MG indicate methanol, methanol+PAC and methanol+GA treatment for 15 d, respectively; M, MP and MG indicate ethanol, ethanol+PAC and ethanol+GA treatment for 15 d, respectively; The different normal letters indicate significant difference at 0.05 level; The bar line on the map shows the standard deviation ($n=3$)

表明,随着甲醇(乙醇)处理时间的增加,几乎所有 14-3-3 蛋白基因的转录都呈上调趋势(图 2,A),其中 14-3-3*a*、14-3-3*d*、14-3-3*e*、14-3-3*f*、14-3-3*g* 和 14-3-3*i* 的上调较显著,这说明大部分 14-3-3 基因的转录都被甲醇和乙醇刺激诱导,RSG 转录水平变化不明显(图 2,A),说明 RSG 转录对甲醇(乙醇)刺激不产生应答。Western blotting 分析结果表明,随着甲醇和乙醇处理时间的增加,14-3-3 蛋白表达量也逐渐增加,RSG 蛋白的表达水平也上升(图 2,B),这说明甲醇(乙醇)刺激增强 14-3-3 和 RSG 蛋白的表达。

2.3 甲醇和乙醇对 14-3-3 蛋白与 RSG 互作水平的影响

在烟草体内 14-3-3 蛋白通过与 RSG 结合来调控 RSG 进入细胞核的水平,从而控制 GA 合成

量^[15]。研究表明 RSG 需要被磷酸化修饰后才能与 14-3-3 蛋白结合,Co-IP 分析甲醇和乙醇处理烟草叶片中 14-3-3 蛋白和 RSG 相互作用。结果表明随着处理时间的增加,甲醇或乙醇(图 3)处理烟草叶片中 14-3-3 蛋白和 RSG 互作水平逐渐降低,说明甲醇或乙醇的刺激减弱烟草叶片中 14-3-3 蛋白和 RSG 的相互作用。

2.4 甲醇和乙醇对 RSG 与 GA20ox1 启动子结合水平的影响

Igarashi 等^[15]的研究用来普霉素 B(Leptomycin B,出核转运抑制剂)处理 RSG-GFP 转基因烟草叶片,发现当 14-3-3 蛋白与 RSG 结合增加时,进入细胞核的 RSG 量会相应减少,从而 RSG 与 GA20ox1 启动子的结合水平也会相应降低。用 RSGp抗体做ChIP分析甲醇和乙醇处理烟草叶片

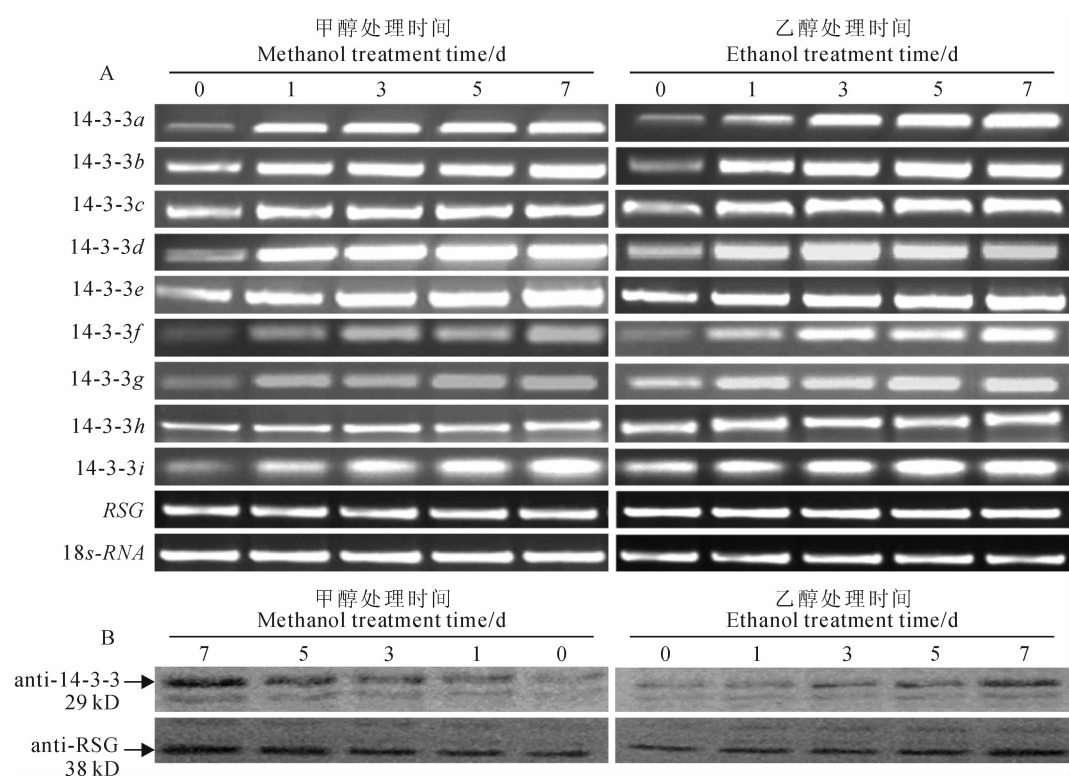


图 2 2 mmol/L 甲醇(乙醇)处理后烟草 14-3-3 和 RSG 基因转录(A)及蛋白表达水平(B)
Fig. 2 Transcription and expression of 14-3-3 and RSG genes in tobacco with 2 mmol/L methanol (ethanol) treatment

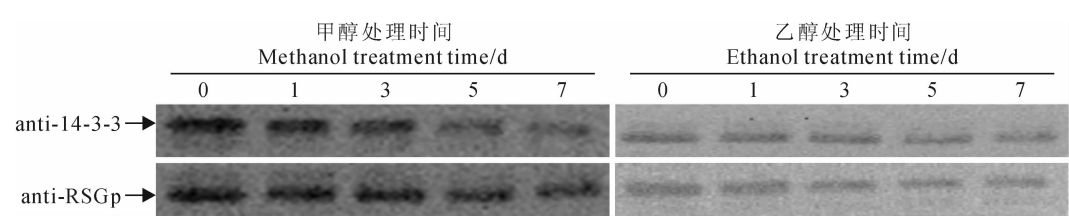


图 3 2 mmol/L 甲醇(乙醇)对烟草叶片 14-3-3 和 RSG 互作水平的影响
Fig. 3 Effects of 2 mmol/L methanol(ethanol) on the interaction of 14-3-3 protein and RSG

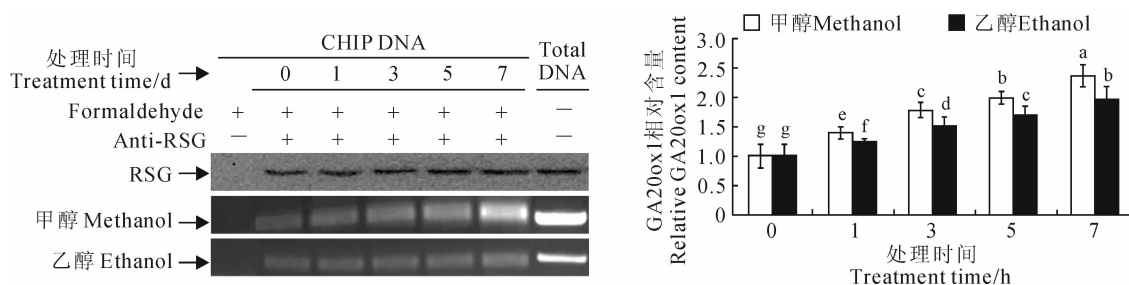


图 4 2 mmol/L 甲醇(乙醇)对烟草 RSG 与 GA20ox1 启动子结合的影响

Fig. 4 Effects of 2 mmol/L methanol(ethanol) on RSG binding with GA20ox1 promoter

中 RSG 和 GA20ox1 启动子序列的结合水平。结果表明随着甲醇和乙醇处理时间的增加,烟草 RSG 与 GA20ox1 启动子序列结合水平逐渐增加(图 4)。PCR 扩增相对定量分析结果说明在处理的第 7 天二者结合的水平分别为对照的 2.38 和 1.96 倍(图 4),这说明甲醇和乙醇刺激能显著增加 RSG 与 GA20ox1 启动子的结合水平。

3 讨 论

GA 是植物体内一种重要的生长调控因子,参与植物发育和生长的每个环节的调节,包括种子萌发,根和茎的伸长,叶片和叶毛的产生、花器官形成的诱导及雄蕊和果实的发育等^[16-18]。之前的一些研究报道叶片喷施甲醇可以刺激烟草的生长^[13],叶片喷施甲醇或乙醇都能促进西红柿、油菜、万年青的光合作用和叶片的生长^[3]。与这些报道的结果一致,本研究证实 MS 培养基上添加低浓度(2 mmol/L)甲醇和乙醇也刺激烟草幼苗的生长,且添加外源活性 GA 和 GA 合成抑制剂 PAC 的实验结果说明甲醇和乙醇刺激烟草的生长和 GA 的合成有关。

Smith^[19]的研究结果表明 RSG 通过控制内源 GA 的含量影响植物的生长,过量表达没有激活域或 DNA 结合域的 RSG 抑制烟草中正常 RSG 的作用,严重影响转基因烟草茎细胞的伸长和植株的生长^[17]。RSG 在烟草中的表达没有很强的组织特异性,因此有人推测 RSG 应该受到转录或翻译后调控,Igarashi 等^[15]的研究证明 14-3-3 蛋白参与 RSG 的翻译后调控,RSG 与 14-3-3 蛋白的结合抑制 RSG 的细胞核定位作用,不能与 14-3-3 蛋白结合的 RSG 突变体的转录活性比野生型 RSG 的高,RSG 突变体主要定位于细胞核中,而野生型 RSG 分布在整个细胞中,14-3-3 蛋白是 RSG 的负调控蛋白,通

过控制它的亚细胞定位控制内源 GA 的含量。RSG 分子中 Ser114 必须被磷酸化修饰后才能与 14-3-3 蛋白结合,Ito 等^[20]的研究鉴定负责对 RSG 进行磷酸化修饰的蛋白激酶(CDPK1),体内体外的实验结果表明 CDPK1 与 RSG 的结合需要钙离子。本研究的实验结果说明甲醇或乙醇的刺激虽然都增加 14-3-3 基因转录和蛋白表达水平,但却减弱 14-3-3 蛋白与 RSG 的相互作用,因此推测甲醇或乙醇的刺激可能会减弱 CDPK1 的表达量或抑制其激酶活性,因而减少 RSG 的磷酸化作用,从而减少其与 14-3-3 蛋白的结合。

GA1 是烟草中的一种主要活性 GA^[19],在转基因烟草过量表达没有激活域或 DNA 结合域的 RSG 抑制原有 RSG 的功能,使转基因烟草中 GA1 的含量只有野生型的 15%,在转基因烟草叶片上喷施 GA18 可以恢复烟草细胞的伸长作用^[21]。GA18 是一种没有生物学活性的 GA,但是可以通过 GA20-oxidase 的顺序氧化作用氧化为有活性的 GA1^[22],因此 GA-20 氧化酶(GA-20 oxidase)是一种重要的 GA 生物合成调控酶。GA20ox1 的启动子区含有能与 RSG 结合的顺式作用元件,RSG 结合顺式元件的突变可以消除转基因烟草 RSG 与 GA20ox1 启动子的结合,ChIP 分析结果说明 RSG 与 GA20ox1 启动子的结合可以对 GA 含量的变化产生应答,GA 含量减少增加二者的结合,促进 GA 合成,反之亦然。本研究发现甲醇或乙醇处理能显著增强 RSG 与 GA20ox1 启动子的结合,说明甲醇和乙醇刺激烟草的生长可能通过降低 14-3-3 蛋白与 RSG 的结合,增强 RSG 的细胞核定位作用和 RSG 与 GA20ox1 启动子的结合,增加 GA 的合成,从而促进烟草生长,这可能是甲醇和乙醇促进植物生长的一种重要的分子机制。

参考文献:

- [1] WANG SH SH(王莎莎),SUN L L(孙利利),XIAO S Q(肖素勤),*et al.* Effects of foliar spraying C1 compounds on physiological characters and expression levels of genes related to C1 metabolism,photosynthesis and stress response of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Zhejiang University* (Agriculture & Life Science)(浙江大学学报·农业与生命科学版),2011,**37**(6):631—641(in Chinese).
- [2] MATHIU M,FELENBOK B. The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator[J]. *The EMBO Journal*,1994,**13**(17):4022.
- [3] SUN L L(孙利利),ZHAO Y(赵 艳),ZHOU L(周 磊),*et al.* Effects of foliar spray of methanol and ethanol on physiological characteristics of *Rohdea japonica* [J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.* (西北植物学报),2013,**33**(3):527—533(in Chinese).
- [4] DOWNIE A,MIYAZAKI S,BOHNERT H,*et al.* Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation [J]. *Phytochemistry*,2004,**65**(16):2 305—2 316.
- [5] MORTENSEN L M. Effects of foliar sprays of methanol on growth of some greenhouse plants[J]. *Science Horticulturae*,1995,**64**(3):187—191.
- [6] ROWE R,FARR D,RICHARDS B. Effects of foliar and root applications methanol or ethanol on the growth of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill)[J]. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*,1994,**22**(3):335—337.
- [7] WU K H,CHEN Q,XIAO S,*et al.* cDNA microarray analysis of transcriptional responses to foliar methanol application on tamba black soybean plants grown on acidic soil[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*,2013,**31**(4):862—876.
- [8] FUKAZAWA J,SAKAI T,ISHIDA S,*et al.* Repression of shoot growth,a bZIP transcriptional activator,regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins[J]. *The Plant Cell*,2000,**12**(6):901—915.
- [9] JIN J,SMITH F D,STARK C,*et al.* Proteomic,functional,and domain-based analysis of *in vivo* 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization[J]. *Current Biology*,2004,**14**(16):1 436—1 450.
- [10] AITKEN A. 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways[J]. *Trends in Cell Biology*,1996,**6**(9):341—347.
- [11] TAKAHASHI Y,FUKAZAWA J,MATUSHITA A,*et al.* Involvement of RSG and 14-3-3 proteins in the transcriptional regulation of a GA biosynthetic gene[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*,2003,**22**(2):195—204.
- [12] RICARDI M M,GONZÁLEZ R M,IUSEM N D. Protocol:fine-tuning of a Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) protocol in tomato [J]. *Plant Methods*,2010,**6**(1):11.
- [13] 王莎莎. C1 化合物影响模式植物拟南芥和烟草生长的生理基础和分子机理研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2011.
- [14] TAN X(谈 心),MA X R(马欣荣). Advance in research of gibberellin biosynthesis phathway[J]. *Chin. J. Appl. Environ Biol.* (应用与环境生物学报),2008,**14**(4):571—577(in chinese).
- [15] IGARASHI D,ISHIDA S,FUKAZAWA J,*et al.* 14-3-3 proteins regulate intracellular localization of the bZIP transcriptional activator RSG[J]. *The Plant Cell*,2001,**13**(11):2 483—2 497.
- [16] DAVIES P J. The plant hormones;their nature,occurrence,and functions[M]. Plant hormones. Springer Netherlands,2010:1—15.
- [17] YAMAGUCHI S,SMITH M W,Brown R G S,*et al.* Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 β -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds[J]. *The Plant Cell*,1998,**10**(12):2 115—2 126.
- [18] ITOH H,TANAKA U M,KAWAIDE H,*et al.* The gene encoding tobacco gibberellin 3 β -hydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower organ development[J]. *The Plant Journal*,1999,**20**(1):15—24.
- [19] SMITH V A. Gibberellin A1 biosynthesis in *Pisum sativum* L. II. Biological and biochemical consequences of the lemutation[J]. *Plant Physiology*,1992,**99**(2):372—377.
- [20] ITO T,NAKATA M,FUKAZAWA J,*et al.* Alteration of substrate specificity;the variable N-terminal domain of tobacco Ca²⁺-dependent protein kinase is important for substrate recognition[J]. *The Plant Cell*,2010,**22**(5):1 592—1 604.
- [21] FUKAZAWA J,Nakata M,Ito T,*et al.* The transcription factor RSG regulates negative feedback of *NtGA20ox1* encoding GA 20-oxidase [J]. *The Plant Journal*,2010,**62**(6):1 035—1 045.
- [22] HEDDEN P,KAMIYA Y. Gibberellin metabolism;enzymes,genes and their regulation[J]. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*,1997,**48**:431—460.