

# 拟南芥 *ABI5* 基因对 BR 胁迫响应及其对下胚轴生长的调节作用

林建辉<sup>1</sup>, 刘自广<sup>2</sup>, 张楠<sup>1</sup>, 严容<sup>1</sup>, 张楠<sup>1</sup>, 何鑫森<sup>2</sup>, 王文涛<sup>2</sup>, 刘娣<sup>2</sup>, 吴娟<sup>1</sup>

1. 东北林业大学生命科学学院, 东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040
2. 黑龙江省农业科学院畜牧研究所, 农业农村部种养结合重点实验室, 哈尔滨 150028

**摘要:** 植物脱落酸不敏感蛋白 5 (abscisic acid-insensitive 5, *ABI5*) 是种子中大量表达的碱性亮氨酸拉链类型 (basic leucine zipper, bZIP) 转录因子, 在调节种子萌发和幼苗早期生长的脱落酸 (abscisic acid, ABA) 信号中起着核心作用。油菜素内酯 (brassinosteroid, BR) 是一种新型植物内源激素, 具有调节植物生长发育和逆境胁迫响应等诸多生理功能。近期研究发现, 油菜素内酯胁迫条件下, BR 信号通路中 BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2) 和 BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1) 通过抑制 *ABI5* 表达, 促进拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 种子萌发。为进一步探究 BR 胁迫下 *ABI5* 功能, 本研究分析了种子萌发期 *ABI5* 表达特性, 鉴定出拟南芥 *ABI5* 基因缺失突变体 *abi5-1* 并对 BR 胁迫下其功能进行解析。结果表明: *ABI5* 在拟南芥干种子中大量表达并响应萌发期 BR 胁迫; 正常条件下, *abi5-1* 与野生型幼苗下胚轴无明显差异; BR 胁迫下, *abi5-1* 幼苗下胚轴明显长于野生型。本研究结果揭示了 *ABI5* 调控 BR 胁迫下拟南芥下胚轴生长, 为深入了解 *ABI5* 调节植物发育的分子机制提供了依据。

**关键词:** *ABI5*; 油菜素内酯; 拟南芥; 下胚轴

收稿日期: 2021-06-07; 修回日期: 2021-08-16

**基金项目:** 中央高校基本科研业务费专项资金项目 (编号: 2572020DY09), 黑龙江省科学基金项目 (编号: LH2019C007) 和财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 [Supported by the Special Fund for Basic Scientific Research Operation Fees of Central Universities (No. 2572020DY09), Heilongjiang Science Foundation Project (No. LH2019C007), and China Agriculture Research System of MOF and MARA]

**作者简介:** 林建辉, 在读硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: 17862072380@139.com

**通讯作者:** 吴娟, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 植物生理学和 RNA 分子生物学。E-mail: wuj1970@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.21-199

网络出版时间: 2021/9/13 10:45:25

URI: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20210910.1807.003.html>

## Stress response of *ABI5* to BR stress and its regulation on hypocotyls growth in *Arabidopsis thaliana*

Jianhui Lin<sup>1</sup>, Ziguang Liu<sup>2</sup>, Nan Zhang<sup>1</sup>, Rong Yan<sup>1</sup>, Nan Zhang<sup>1</sup>, Xinmiao He<sup>2</sup>, Wentao Wang<sup>2</sup>, Di Liu<sup>2</sup>, Juan Wu<sup>1</sup>

1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Key Laboratory of Northeast Salinity and Vegetation Restoration and Reconstruction, Ministry of Education, Harbin 150040, China

2. Institute of Animal Husbandry, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Combination of Planting and Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin 150028, China

**Abstract:** Absciscic acid-insensitive 5 (*ABI5*) is a basic leucine zipper (bZIP) transcription factor that is abundantly expressed in seeds. It plays a central role in regulating the abscisic acid (ABA) signal of seed germination and early seedling growth. Brassinosteroid (BR) is a new type of plant endogenous hormone, which has many physiological functions such as regulating plant growth and development and response to adversity stress. It has recently been discovered that under brassinolide stress, BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2) and BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1) in the BR signaling pathway can inhibit the expression of *ABI5* and promote *Arabidopsis thaliana* seed germination. In order to further explore the function of *ABI5* under BR stress, this study analyzed the *ABI5* expression characteristics during seed germination, identified *Arabidopsis ABI5* gene deletion mutant *abi5-1* and analyzed its function under BR stress, the results of which indicated that *ABI5* was abundantly expressed in *Arabidopsis* dry seeds and responded to BR stress during germination. Under normal conditions, there was no significant difference between the hypocotyls of *abi5-1* and wild-type seedlings; but under BR stress, the hypocotyls of *abi5-1* seedlings were significantly longer than those of wild-type seedlings. These results reveal that *ABI5* regulates the growth of *Arabidopsis* hypocotyls under BR stress, thereby providing a basis for in-depth understanding of the molecular mechanism of *ABI5* regulation on plant development.

**Keywords:** *ABI5*; brassinosteroid; *Arabidopsis thaliana*; hypocotyl

植物脱落酸不敏感蛋白 5 (abscisic acid-insensitive 5, *ABI5*) 是成熟种子和花朵中大量表达的一类 bZIP 转录因子<sup>[1]</sup>, 干旱、高盐等胁迫环境和脱落酸(abscisic acid, ABA)条件诱导 *ABI5* 表达<sup>[2]</sup>, 多种转录因子和酶通过调节 *ABI5* 表达影响了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子萌发和幼苗早期发育<sup>[3]</sup>。MYBs 是非生物胁迫相关转录因子, MYB7 通过抑制 *ABI5* 表达, 促进 ABA 介导的盐和渗透胁迫下种子萌发<sup>[4]</sup>。非生物胁迫条件下植物体内 ABA 含量升高, 转录因子 HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5) 激活 *ABI5* 表达并与其互作促进 *ABI5* 下游 ABA 应答基因表达, 改变了拟南芥萌发种子 ABA 敏感性<sup>[5]</sup>。拟南芥核因子 Y 家族蛋白(NUCLEAR FACTOR Y FAMILY PROTEIN)NF-YC9 直接与 *ABI5* 结合, 进而

激活靶基因 *EM6* (EARLY METHIONINE-LABELED 6) 表达, 参与种子萌发对 ABA 响应<sup>[6]</sup>。此外, *ABI5* 也参与了生长素(auxin, IAA)、赤霉素(gibberellin, GA)、细胞分裂素(cytokinin, CTK)和油菜素内酯(brassinosteroid, BR)等信号传导和代谢途径并发挥重要作用。*PIN1* 编码植物 IAA 转运蛋白, *ABI5* 通过抑制 *PIN1* 积累引起根中 IAA 水平降低, 进而参与蔗糖介导的初生根生长抑制过程<sup>[7]</sup>。CTK 通过 *AHP2*、*AHP3*、*AHP5* 和 *AHK4* 等基因促进 *ABI5* 的 26S 蛋白酶体降解, 从而拮抗 ABA 介导的种子萌发后生长和子叶绿化的抑制作用<sup>[8]</sup>。

BR 是植物特有的甾醇类激素, 在种子萌发、光形态建成、衰老<sup>[9]</sup>以及环境胁迫响应等生理过程中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。BR 信号激酶 BSK5 (BRASSINO-

STEROID-SIGNALING KINASE 5)显著抑制 ABA 合成基因 *ABA3* 和 *NCED3* 表达,增强盐胁迫和 ABA 介导的干旱胁迫耐受性<sup>[11]</sup>。BR 激活的转录因子 BES1 和 BZR1 (BRASSINAZOLE-RESISTANT 1)直接与 *AGL15* (AGAMOUS-LIKE15)启动子结合,抑制其表达,进而抑制种子成熟<sup>[12]</sup>。光照条件下, BIN2 通过磷酸化 GLK1 (GOLDEN2-LIKE 1)整合了 BR 和光信号,抑制 GLK1 泛素化降解,使幼苗叶绿体正常发育<sup>[13]</sup>。此外, GA 和 BR 诱导的 *HB11* 和 *BEE2* 基因通过调节 *GASA6* (GA-STIMULATED ARABIDOPSIS 6)基因表达促进了胚乳破裂和种子萌发<sup>[14]</sup>。近期研究发现,拟南芥 BR 信号转录因子 BIN2 和 BES1 通过抑制 ABA 信号核心成员 *ABI5* 表达从而促进种子萌发<sup>[15,16]</sup>,表明 *ABI5* 可以整合 ABA 与 BR 信号的拮抗作用并促进种子萌发,这为不同信号协作调控种子萌发过程的复杂机制提供了新见解。

为了进一步探究 BR 胁迫下 *ABI5* 功能,本研究分析了种子萌发期 *ABI5* 表达特性,鉴定了拟南芥 *ABI5* 基因缺失突变体 *abi5-1*,对 BR 胁迫下 *abi5-1* 表型进行观察并对 BR 信号通路相关基因表达进行了分析。本研究为深入探究 BR 胁迫下 *ABI5* 调控植物生长发育的作用机制提供了依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及培养条件

野生型拟南芥由东北林业大学生命科学学院东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室提供,拟南芥 *abi5-1* 突变体(CS\_8105,该突变体为单碱基突变,缺失了 DNA 结合的碱性亮氨酸拉链结构域,不能发挥正常功能)购自 ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center)。24-表油菜素内酯(EBR)购自上海源叶生物科技有限公司,用乙醇配成 50 mg/L 母液, -20℃保存。pMD<sup>TM</sup> 18-T Vector Cloning Kit 购自日本 TaKaRa 公司;大肠杆菌克隆表达菌株 Top 10 感受态细胞购自哈尔滨海基生物科技有限公司。

拟南芥种子经 0.1% (V/V)次氯酸钠和 75% (V/V)乙醇消毒后用无菌水反复冲洗 4~6 次,播种在 1/2MS 固体培养基(2.37 g/L MS 粉、3%蔗糖、0.8%琼脂、pH5.8)和含有 5 μmol/L BR 的 1/2MS 固体培养基上,

黑暗中 4℃春化 3 d 后,于培养箱中 22℃、16 h 明/8 h 暗进行培养。

### 1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)从 0.1 g 拟南芥干种子、吸涨阶段(1 d、2 d、3 d)、萌发阶段(1 d、2 d、3 d)和 7 d 幼苗中提取总 RNA。使用反转录试剂盒(PrimerScript<sup>RT</sup> Reagent Kit with gDNA Eraser,日本 TaKaRa 公司)进行反转录,2 μg 总 RNA 合成第一链 cDNA。

### 1.3 突变体筛选与鉴定

#### 1.3.1 植物基因组 DNA 提取

选取 3~4 片嫩叶于液氮中研磨后,加入 750 μL DNA 提取液(10 mmol/L EDTA、50 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、10 mmol/L β-巯基乙醇、1% (W/V) SDS),65℃水浴 10 min;加入 150 μL 5 mol/L 乙酸钾,冰浴 20 min,4℃、13,000 r/min 离心 10 min,取上清;加入等体积异丙醇,4℃、13,000 r/min 离心 2 min;弃上清,向沉淀中加入 75% (V/V)乙醇 800 μL,4℃、13,000 r/min 离心 2 min;向沉淀物中加入 200 μL 灭菌水,离心取上清约 180 μL;加入 20 μL 3 mol/L 乙酸钾和 500 μL 无水乙醇, -20℃静止 30 min,离心得沉淀;向沉淀中加入 75% (V/V)乙醇 800 μL,离心得沉淀;向沉淀中加入 20 μL 灭菌水充分溶解, -20℃保存。

#### 1.3.2 纯合突变体筛选及单碱基突变位点鉴定

拟南芥 *abi5-1* 突变体种子播种于含卡那霉素(50 μg/mL)的 1/2MS 培养基上培养 10 d,将正常生长幼苗移栽到土中继续培养 3 周后,提取叶片基因组 DNA 为模板,利用上下游引物(表 1)扩增 *ABI5* 基因。经电泳分离及胶回收后连接到 pMD18-T 克隆载体,转化大肠杆菌 top10 感受态细胞,挑取单克隆,经鉴定后由吉林省库美生物科技有限公司测序并进行序列分析。

#### 1.3.3 纯合突变体 RNA 水平鉴定

使用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)从 7 d 幼苗中提取总 RNA,用反转录试剂盒(PrimerScript<sup>RT</sup>

Reagent Kit with gDNA Eraser, 日本 TaKaRa 公司)合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,用特异引物 qRT-PCR 扩增突变体相应的 *ABI5* 基因,以 *Actin2* (At3g18780)为内参(表 1)。使用 Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪(美国安捷伦科技有限公司)进行 qRT-PCR,根据样品特有 *Ct* 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 *ABI5* 基因在突变体中的相对表达量。

#### 1.4 实时荧光定量 PCR

使用 Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪(美国安捷伦科技有限公司)进行 qRT-PCR 扩增。以合成好的 cDNA 为模板,用 *ABI5*、*BIN2*、*BES1*、*BZR1*、*PIN7*、*EXP3* 的定量特异性引物进行 PCR 扩增,以 *Actin2* (At3g18780)为内参(表 1)。qRT-PCR 扩增体系包括:2×UltraSYBR Mixture (Low ROX) 10  $\mu$ L, 正向引物和反向引物(20  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, cDNA 模板(约 50 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L。采用 3 步法反应程序进行扩增:95℃ 15 min; 95℃ 10 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。根据各样品特有 *Ct* 值,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因在不同处理条件下的相对表达量。

#### 1.5 植株表型观测及统计分析

随机选取 30 株正常生长和 5  $\mu$ mol/L BR 胁迫处理 7 d 的野生型和 *abi5-1* 拟南芥植株,使用实体显微镜(SZX9, 日本 OLYMPUS 公司)观测并记录下胚轴长度。每组实验重复 3 次,通过 *t* 检验确定统计学上的显著性差异,其中 \**P*<0.05、\*\**P*<0.01 和 \*\*\**P*<0.001 为显著性阈值。

#### 1.6 BR 胁迫下野生型和 *abi5-1* 中 BR 信号通路相关基因表达分析

将 1/2MS 培养基上萌发 4 d 的野生型和 *abi5-1* 幼苗移入 1/2MS 培养基和含有 5  $\mu$ mol/L BR 的 1/2MS 培养基中分别培养 24 h 后,提取总 RNA。使用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)从 7 d 幼苗中提取总 RNA,用反转录试剂盒(PrimerScript<sup>RT</sup> Reagent Kit with gDNA Eraser, 日本 TaKaRa 公司)合成 cDNA。以合成的 cDNA 为模板,用 *BIN2*、*BES1*、*BZR1*、*PIN7*、*EXP3* 的定量特异性引物进行 PCR 扩增,以 *Actin2* (At3g18780)为内参(表 1)。使用 Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪(美国安捷伦科技有

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Information on primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	复性温度(℃)	用途
Actin2-F	GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG	58	qRT-PCR
Actin2-R	AACGACCTTAATCTTCATGCTGC		
abi5-1-F	CGAGGGTGGTGTGGTGTCTTTA	60	突变体鉴定
abi5-1-R	CTACTCCATACTGACCTCCTA		
ABI5-F(q)	AACCTAATCCAACCCGAACC	60	qRT-PCR
ABI5-R(q)	ACCCTCCTCCTCCTGTCC		
BIN2-F(q)	ACAAAAGGATGCCCCAGAA	59	qRT-PCR
BIN2-R(q)	TGAAGTTGAAGAGAGGCGGG		
BES1-F(q)	GCAATTGTCTCCAAACACAGCAG	61	qRT-PCR
BES1-R(q)	CTCCAATCCTTCCTTCCGACATG		
BZR1-F(q)	GCAGATGTCTCCAAATACTGCTG	61	qRT-PCR
BZR1-R(q)	GACATGCCATTGGGTTTGCCTAG		
PIN7-F(q)	GTGGGATGTGGCAATGCCTAA	60	qRT-PCR
PIN7-R(q)	TCCAATAGCCATTGCTGCCAC		
EXP3-F(q)	GGAACCTGTACAGCCAAGGATA	57	qRT-PCR
EXP3-R(q)	AATAGATGGATTTCCTCGGAACA		

限公司)进行 qRT-PCR, 根据样品特有 *Ct* 值, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因在不同处理条件下的相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥生长发育过程中 *ABI5* mRNA 表达特性分析

为研究拟南芥生长发育过程中 *ABI5* mRNA 表达特性, 分别提取干种子、吸涨阶段(1 d、2 d、3 d)、萌发阶段(1 d、2 d)和 7 d 幼苗总 RNA, 使用 *ABI5* 特异性引物进行 qRT-PCR 分析。结果表明, *ABI5* mRNA 大量积累于干种子中, 此后随着萌发进行积累量逐渐降低(图 1)。

### 2.2 BR 胁迫条件下, 拟南芥幼苗中 *ABI5* mRNA 表达特性分析

为了探究 BR 胁迫条件下 *ABI5* mRNA 表达特性, 将 1/2MS 培养基上萌发 4 d 的野生型拟南芥幼苗移到含有 5  $\mu\text{mol/L}$  BR 的 1/2MS 培养基上分别培养 0 h、12 h、24 h、36 h 后, 提取总 RNA 进行 qRT-PCR 分析。结果表明, 5  $\mu\text{mol/L}$  BR 胁迫处理下, 随着胁迫时间增加, 拟南芥幼苗中 *ABI5* mRNA 开始积累, 并在 36 h 时达到最高值(图 2)。

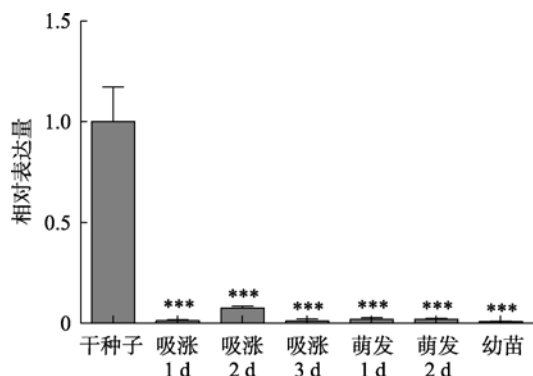


图 1 拟南芥生长发育过程中 *ABI5* mRNA 表达特性分析

Fig. 1 Expression analysis of *ABI5* mRNA in the development of *Arabidopsis*

提取不同生长阶段野生型拟南芥总 RNA, 反转录成 cDNA, 以 *Actin2* 为内参, 使用 *ABI5* mRNA 特异引物进行 qRT-PCR 分析。数值为 3 次独立实验平均值, 误差为标准误差; \*\*\* $P < 0.001$ 。

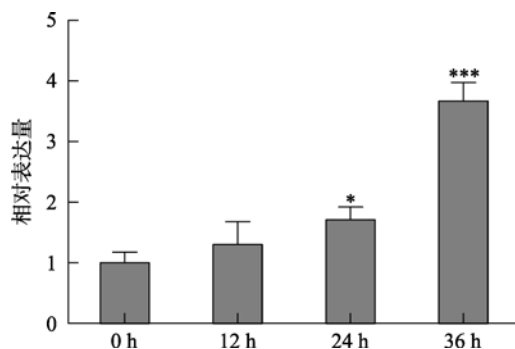


图 2 BR 胁迫条件下拟南芥萌发早期幼苗中 *ABI5* mRNA 表达特性分析

Fig. 2 Expression analysis of *ABI5* mRNA in *Arabidopsis* germination early seedlings under BR stress

提取 BR 胁迫处理 0 h、12 h、24 h 和 36 h 萌发 4 d 的野生型拟南芥总 RNA, 反转录成 cDNA, 以 *Actin2* 为内参, 使用 *ABI5* 特异引物进行 qRT-PCR 分析。数值为 3 次独立实验平均值, 误差为标准误差; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

### 2.3 *ABI5* 缺失突变体鉴定

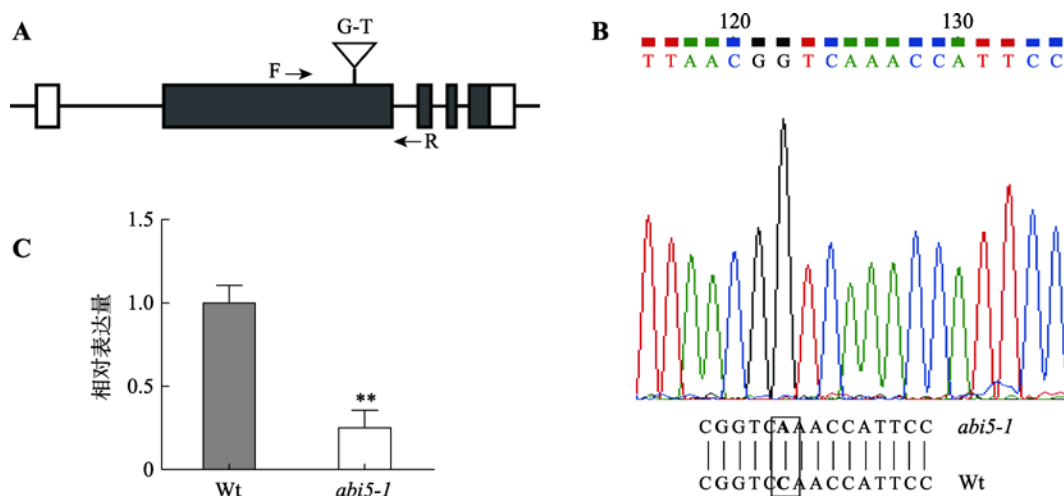
提取生长 3 周 *abi5-1* 突变体叶片基因组 DNA, 通过 DNA 测序和 Blast 序列比对, 结果表明 *abi5-1* 的编码序列中发生了单碱基变化: G→T (图 3: A, B), 可用于后续功能分析。同时提取正常生长 7 d 的 *abi5-1* 幼苗总 RNA, 使用 *ABI5* 特异性引物, 对突变体中 *ABI5* 表达量进行了 qRT-PCR 分析, 结果表明 *abi5-1* 突变体中 *ABI5* 表达水平显著降低(图 3C)。

### 2.4 BR 胁迫条件下 *ABI5* 缺失对拟南芥幼苗下胚轴生长的影响

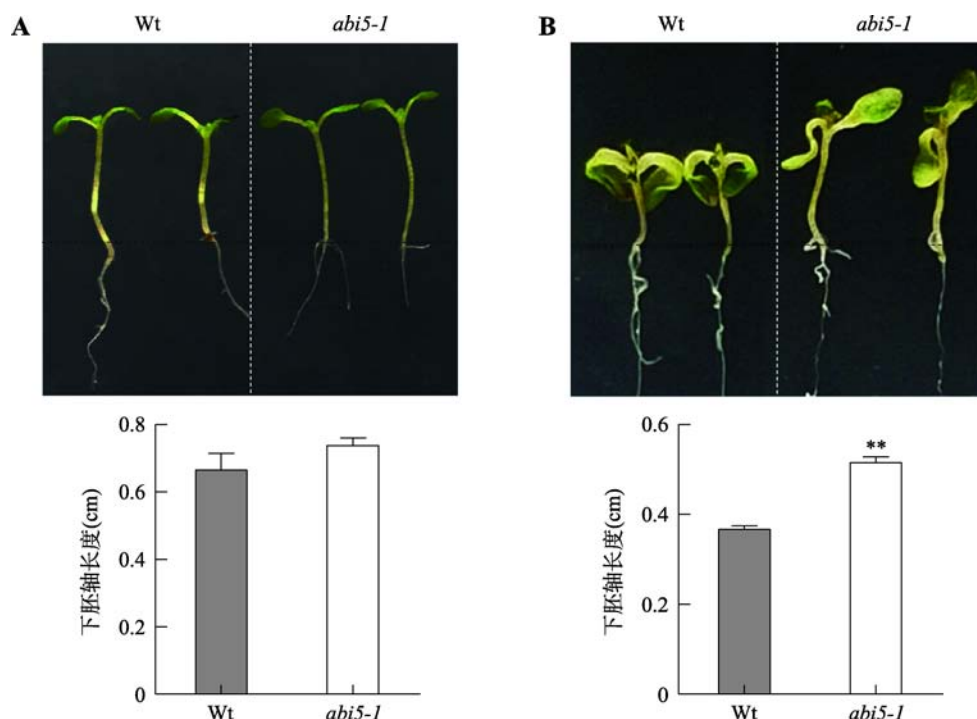
为了探究 BR 胁迫下 *ABI5* 功能, 将野生型拟南芥(Wt)和 *abi5-1* 种子播种在含有 0  $\mu\text{mol/L}$  和 5  $\mu\text{mol/L}$  BR 的 1/2MS 培养基上, 4℃吸胀处理 3 d 后, 于 22℃ (16 h 明/8 h 暗)培养箱中培养 7 d, 进行表型观察。结果发现, 正常条件下, 野生型拟南芥和 *abi5-1* 幼苗生长状态无明显差异(图 4A); 但 5  $\mu\text{mol/L}$  BR 条件下, *abi5-1* 幼苗下胚轴长度明显大于野生型拟南芥(图 4B), 这表明 *ABI5* 缺失促进了 BR 胁迫条件下拟南芥下胚轴的生长。

### 2.5 BR 胁迫条件下 *abi5-1* 中 BR 信号通路相关基因表达变化

为深入了解 BR 胁迫条件下 *ABI5* 缺失和拟南芥

图 3 *ABI5* 缺失突变体鉴定**Fig. 3 Identification of *ABI5* homozygous mutant**

A: *ABI5* 基因结构和突变位点。白框表示 UTR 区域, 黑框表示外显子, 线条表示内含子。B: *ABI5* 基因 DNA 测序和 Blast 鉴定结果。突变位点加粗并用黑框标记。C: *abi5-1* 突变体中 *ABI5* 表达量分析。分析数值为 3 次独立实验的平均值, 误差为标准误差; \*\* $P < 0.01$ ; Wt: 野生型。

图 4 BR 胁迫条件下 *ABI5* 调控拟南芥幼苗下胚轴生长分析**Fig. 4 Analysis of *ABI5* regulation on hypocotyl growth of *Arabidopsis* seedlings under BR stress**

A: Wt 和 *abi5-1* 种子在 1/2 MS 培养基上生长 7 d 后下胚轴长度统计分析; B: Wt 和 *abi5-1* 种子在含有 5  $\mu\text{mol/L}$  BR 的 1/2 MS 培养基上生长 7 d 后下胚轴长度统计分析。数值为 3 次独立实验的平均值, 误差为标准误差; \*\* $P < 0.01$ ; Wt: 野生型。

下胚轴伸长相关性, 本研究对 3 个 BR 信号通路基因(*BZR1*<sup>[17]</sup>、*BES1*<sup>[17]</sup>和 *BIN2*<sup>[18]</sup>), 1 个下胚轴向光性弯曲相关基因 *PIN7*<sup>[19]</sup>和 1 个细胞扩增相关基因

*EXP3*<sup>[20]</sup>在 BR 胁迫条件下的表达响应进行了研究。将 1/2MS 培养基上萌发 4 d 的野生型和 *abi5-1* 幼苗移入 1/2MS 培养基和含有 5  $\mu\text{mol/L}$  BR 的 1/2MS 培



培养基中分别培养 24 h 后, 提取总 RNA, 使用特异性引物进行 qRT-PCR 分析。结果表明, 在正常和 5  $\mu\text{mol/L}$  BR 胁迫处理下 *ABI5* 缺失都抑制了 *EXP3* 表达, 同时 5  $\mu\text{mol/L}$  BR 胁迫处理下 *ABI5* 缺失明显抑制了 *BIN2*、*BES1* 表达(图 5)。这些结果证明 *EXP3*、*BIN2* 和 *BES1* 响应 BR 胁迫条件下 *ABI5* 缺失导致的拟南芥下胚轴伸长。

### 3 讨论

下胚轴是连接子叶和根的胚性部分, 由成熟胚中位于顶端和基部分生组织之间的细胞发育而成。种子萌发过程中, 下胚轴伸长有利于将胚根推出种皮, 吸收环境中的水分及营养物质, 加快种子萌发<sup>[21]</sup>。种子萌发后下胚轴伸长是幼苗早期光形态建成过程中一个重要过程。温度、光及水分作为植物赖以生存的环境条件调控了下胚轴伸长, 但作用机制不尽相同<sup>[22]</sup>。高温促进下胚轴伸长, 而光和低温抑制下胚轴伸长<sup>[23]</sup>。下胚轴伸长也受外界环境和多种植物激素(CTK、BR 和 GA 等)的协同调控。CTK 能抑制黑暗诱导的下胚轴伸长但在光下不影响下胚轴伸长<sup>[24]</sup>。BR 与可溶性碳水化合物协同上调 *BZR1* 与

*BES1* 的表达促进下胚轴伸长<sup>[25]</sup>。光照条件下乙烯通过促进 EIN3/EIL1 介导的 PIF3 转录活性促进下胚轴伸长<sup>[26]</sup>。光通过下调 GA 含量促进了 DELLA 积累, 从而抑制 PIF3/4/5 转录活性并促进下胚轴伸长<sup>[27]</sup>。此外, 光照条件下 HY5 通过增强 BR 信号转导的关键阻遏物 GSK3 激酶 BIN2 活性, 从而促进 BIN2 介导的磷酸化和 *BZR1* 的降解以抑制下胚轴伸长<sup>[28]</sup>。目前, 植物激素和外界环境因素调控下胚轴伸长的详细机制尚不清楚。

ABA 和 BR 信号通路之间存在复杂的拮抗交互作用。然而, ABA 是否或如何与植物中 BR 协同相互作用仍有待阐明。本研究发现, ABA 信号核心成员 *ABI5* 响应 BR 胁迫, 并在拟南芥幼苗体内大量积累。正常培养条件下, 野生型拟南芥和 *abi5-1* 下胚轴生长状态无明显差异; BR 胁迫下, *abi5-1* 幼苗下胚轴明显长于野生型, 这表明, BR 胁迫下 *ABI5* 基因通过调控拟南芥下胚轴伸长影响了幼苗早期构建。该发现为进一步研究植物如何调控自身生长发育的过程提供了一个全新的视角。BR 胁迫处理下 *ABI5* 缺失明显抑制了 BR 信号通路中 *BIN2*、*BES1* 表达, 进一步揭示了该作用可能依赖 *ABI5* 与 BR 信号通路的分子机制, 为阐明 ABA 与 BR 间复杂交互作用提

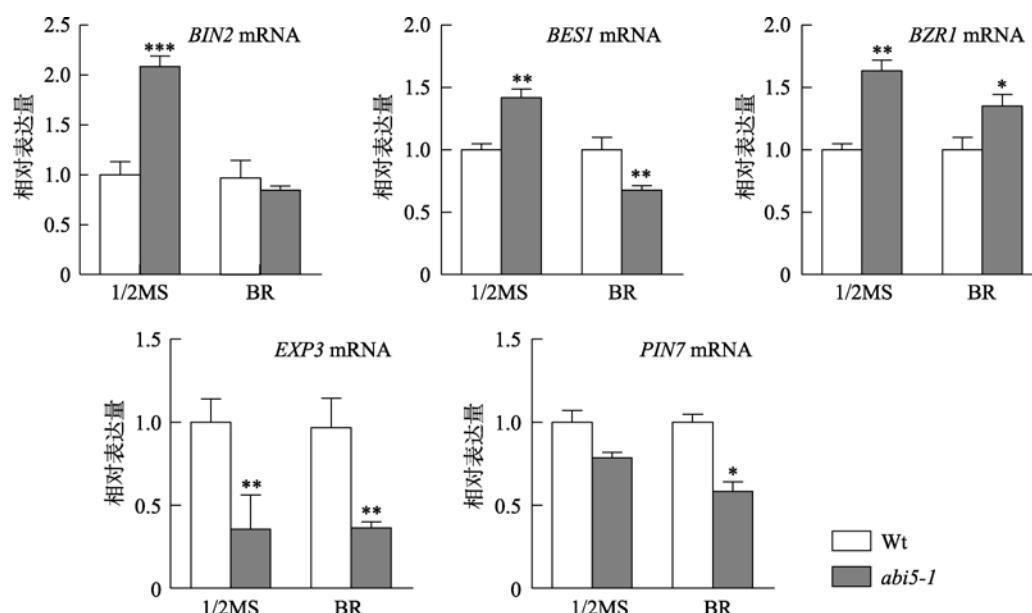


图 5 1/2MS 和 BR 胁迫条件下 BR 信号通路相关基因表达分析

Fig. 5 Expression analysis of genes related to the BR signaling pathway under 1/2MS and BR stress

1/2MS 和 BR 胁迫条件下, *BIN2*、*BES1*、*BZR1*、*EXP3* 和 *PIN7* mRNA 在 Wt 和 *abi5-1* 突变体中相对表达量分析。数值为 3 次独立实验的平均值, 误差为标准误差; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Wt: 野生型。

供了新的切入点。此外,本研究也有其他发现,正常和BR胁迫处理下 *ABI5* 缺失都抑制了 *EXP3* 表达, *EXP3* 作为一种扩展蛋白在细胞伸长生长中起促进作用,但也有研究表明,多种扩展蛋白基因表现出差异表达和受激素调节的重叠表达,扩展蛋白的过度表达可能会导致生长发育的有害缺陷<sup>[29]</sup>。因此,本研究推测单一的 *EXP3* 可能执行不同于其他扩增蛋白基因的细胞功能,导致 *abi5-1* 对环境刺激的不同敏感性。

接下来,我们将制备 *ABI5* 过表达植株,深入挖掘BR胁迫下 *ABI5* 作用的靶基因,阐明 *ABI5* 调控下胚轴伸长的分子机制,为深化理解拟南芥 *ABI5* 的调控机制和BR信号传导途径提供依据,更有助于了解植物激素BR和ABA之间复杂的网络串联。同时也在作物逆境耐受性的改良中有必要考虑对不同胁迫的差异化适应机制,以确保获得适度逆境耐受性的同时兼顾有利于生产的作物生长发育。

## 参考文献(References):

- [1] Finkelstein RR, Lynch TJ. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 2000, 12(4): 599–609. [DOI]
- [2] Skubacz A, Daszkowska-Golec A, Szarejko I. The role and regulation of *ABI5* (ABA-Insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1884. [DOI]
- [3] Yu FF, Wu YR, Xie Q. Precise protein post-translational modifications modulate *ABI5* activity. *Trends Plant Sci*, 2015, 20(9): 569–575. [DOI]
- [4] Kim JH, Hyun WY, Nguyen HN, Jeong CY, Xiong LM, Hong SW, Lee H. AtMyb7, a subgroup 4 R2R3 Myb, negatively regulates ABA-induced inhibition of seed germination by blocking the expression of the bZIP transcription factor *ABI5*. *Plant Cell Environ*, 2015, 38(3): 559–571. [DOI]
- [5] Wang TJ, Huang SZ, Zhang A, Guo P, Liu YT, Xu CM, Cong WX, Liu B, Xu ZY. JM17-WRKY40 and HY5-*ABI5* modules regulate the expression of ABA-responsive genes in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2021, 230(2): 567–584. [DOI]
- [6] Bi C, Ma Y, Wang XF, Zhang DP. Overexpression of the transcription factor NF-YC9 confers abscisic acid hypersensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2017, 95(4–5): 425–439. [DOI]
- [7] Yuan TT, Xu HH, Zhang KX, Guo TT, Lu YT. Glucose inhibits root meristem growth via ABA INSENSITIVE 5, which represses PIN1 accumulation and auxin activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 2014, 37(6): 1338–1350. [DOI]
- [8] Guan CM, Wang XC, Feng J, Hong SL, Liang Y, Ren B, Zuo JR. Cytokinin antagonizes abscisic acid-mediated inhibition of cotyledon greening by promoting the degradation of abscisic acid insensitive5 protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2014, 164(3): 1515–1526. [DOI]
- [9] Zhu JY, Sae-Seaw J, Wang ZY. Brassinosteroid signalling. *Development*, 2013, 140(8): 1615–1620. [DOI]
- [10] Nolan TM, Vukašinović N, Liu DR, Russinova E, Yin YH. Brassinosteroids: Multidimensional regulators of plant growth, development, and stress responses. *Plant Cell*, 2020, 32(2): 295–318. [DOI]
- [11] Li ZY, Xu ZS, He GY, Yang GX, Chen M, Li LC, Ma YZ. A mutation in *Arabidopsis* BSK5 encoding a brassinosteroid-signaling kinase protein affects responses to salinity and abscisic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 426(4): 522–527. [DOI]
- [12] Ruan JX, Chen HH, Zhu T, Yu YG, Lei YW, Yuan LB, Liu J, Wang ZY, Kuang JF, Lu WJ, Huang SZ, Li CL. Brassinosteroids repress the seed maturation program during the seed-to-seedling transition. *Plant Physiol*, 2021, 186(1): 534–548. [DOI]
- [13] Zhang DW, Tan WR, Yang F, Han Q, Deng XG, Guo HQ, Liu BH, Yin YH, Lin HH. A BIN2-GLK1 signaling module integrates brassinosteroid and light signaling to repress chloroplast development in the dark. *Dev Cell*, 2021, 56(3): 310–324.e7. [DOI]
- [14] Zhong CM, Patra B, Tang Y, Li XK, Yuan L, Wang XJ. A transcriptional hub integrating gibberellin-brassinosteroid signals to promote seed germination in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 2021, 72(13): 4708–4720. [DOI]
- [15] Hu YR, Yu DQ. BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26(11): 4394–4408. [DOI]
- [16] Zhao X, Dou LR, Gong ZZ, Wang XF, Mao TL. BES1 hinders ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 and promotes seed germination in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 2019, 221(2): 908–918. [DOI]
- [17] Guo HQ, Li L, Aluru M, Aluru S, Yin YH. Mechanisms and networks for brassinosteroid regulated gene expression



- ssion. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16(5): 545–553. [DOI]
- [18] Wang HJ, Tang J, Liu J, Hu J, Liu JJ, Chen YX, Cai ZY, Wang XL. Absciscic acid signaling inhibits brassinosteroid signaling through dampening the dephosphorylation of BIN2 by ABI1 and ABI2. *Mol Plant*, 2018, 11(2): 315–325. [DOI]
- [19] Cary AJ, Liu W, Howell SH. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol*, 1995, 107(4): 1075–1082. [DOI]
- [20] Stamm P, Topham AT, Mukhtar NK, Jackson MDB, Tomé DFA, Beynon JL, Bassel GW. The transcription factor ATHB5 affects GA-mediated plasticity in hypocotyl cell growth during seed germination. *Plant Physiol*, 2017: 173(1): 907–917. [DOI]
- [21] Wang HF, Shang QM. Molecular mechanisms of cell elongation in angiosperm hypocotyl. *Bull Bot*, 2018, 53(2): 276–287.  
王红飞, 尚庆茂. 被子植物下胚轴细胞伸长的分子机理. *植物学报*, 2018, 53(2): 276–287. [DOI]
- [22] Jiang N, Wang C, Pan JW. Molecular regulatory mechanisms of hypocotyl elongation and phototropism in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 2014, 50(10): 1435–1444.  
姜楠, 王超, 潘建伟. 拟南芥下胚轴伸长与向光性的分子调控机理. *植物生理学报*, 2014, 50(10): 1435–1444. [DOI]
- [23] Oh E, Zhu JY, Wang ZY. Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(8): 802–809. [DOI]
- [24] Zhang YQ, Liu ZJ, Wang JF, Chen YD, Bi YR, He JX. Brassinosteroid is required for sugar promotion of hypocotyl elongation in *Arabidopsis* in darkness. *Planta*, 2015, 242(4): 881–893. [DOI]
- [25] Zhong SW, Shi H, Xue C, Wei N, Guo HW, Deng XW. Ethylene-orchestrated circuitry coordinates a seedling's response to soil cover and etiolated growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(11): 3913–3920. [DOI]
- [26] Kunihiro A, Yamashino T, Mizuno T. PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS PIF4 and PIF5 are implicated in the regulation of hypocotyl elongation in response to blue light in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(12): 2538–2541. [DOI]
- [27] Li J, Terzaghi W, Gong YY, Li CR, Ling JJ, Fan YY, Qin NX, Gong XQ, Zhu DM, Deng XW. Modulation of BIN2 kinase activity by HY5 controls hypocotyl elongation in the light. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1592. [DOI]
- [28] Li TT, Kang XK, Lei W, Yao XH, Zou LJ, Zhang DW, Lin HH. SHY2 as a node in the regulation of root meristem development by auxin, brassinosteroids, and cytokinin. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62(10): 1500–1517. [DOI]
- [29] Kwon YR, Lee HJ, Kim KH, Hong SW, Lee SJ, Lee H. Ectopic expression of Expansin3 or Expansinbeta1 causes enhanced hormone and salt stress sensitivity in *Arabidopsis*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(7): 1281–1288. [DOI]

(责任编辑: 储成才)