

油菜素内酯信号转导的研究进展

王凤茹^{1,2}, 王志勇²

(1. 河北农业大学, 河北 保定 071001; 2. 中国科学院 植物研究所, 北京 100093)

摘要: 油菜素内酯(Brassinosteroids) 是植物生长发育所必需的一类植物激素, 在植物的生长、发育过程中起着非常重要的调节作用。在拟南芥中, 广泛的分子遗传和生化研究使得 BR 信号转导途径从细胞表面受体的识别到核内基因的表达基本清晰, 很多信号转导组分也已被鉴定, 但已知的 BR 信号转导组分还不能组成一个完整的信号转导途径, 还有一些问题尚待阐明。

关键词: 油菜素内酯; 信号转导; 拟南芥; 水稻

中图分类号: S634.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008) 增刊- 0029- 11

The Research of Brassinosteroids Signal Transduction

WANG Feng-ru^{1,2}, WANG Zhi-yong²

(1. Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Institute of Botany,
The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Brassinosteroids (BRs) are essential hormones that play important roles in the growth and development of plant. Extensive molecular genetic and biochemical studies of BR signaling in *Arabidopsis thaliana* have illustrated a BR signal transduction pathway from ligand perception on the cell surface to gene expression in the nucleus. But there are still gaps in the pathway and many signaling steps remain unclear.

Key words: Brassinosteroids; Signaling transduction; *Arabidopsis thaliana*; Rice

1970 年, 美国农业科学家 Mitchell 等^[1]首次从油菜(*Brassica napus* L) 花粉中分离提取出一种生物活性极高的物质, 将其涂于菜豆, 4 d 后观察到菜豆的生长率提高了 10 倍, 该提取物被称为油菜素(Brassin)。1979 年, Grove 等^[2]经 X 光衍射和超微量分析确定了其分子结构, 认为是一种甾醇类化合物, 正式定名为油菜素内酯(Brassinolide, BL)。近年来, 有关油菜素内酯的研究有了较大的进展, 科学家们已从不同的植物中分离出 60 多种与 BR 类似的化合物, 统称为油菜素甾醇类化合物(Brassinosteroids, BRs)^[3]。BL 是 BRs 中活性最强的一种^[4]。目前发现 BRs 存在于 50 多种植物中, 这些植物包括被子植物、裸子植物、蕨类植物、苔藓类植物及绿藻^[5]。植物的不同器官如根、茎、叶、花粉、雌蕊、果实和种子等均含有 BRs^[6]。

1 BR 生物合成途径

BRs 生物合成突变体的发现为进一步证实 BR

是植物生长发育的必需物质提供了证据。已知 BR 在植物体内浓度极低, Takatsuto 等^[7]发展了 BR 的 GG-MS 和 GG-MS-SIM 技术, 可监测 10^{-12} g 水平的 BR, 从而极大地促进了对 BR 生物合成途径的研究及 BR 生物合成突变体中所影响合成步骤的确定。

BR 是 28C 的类固醇, 以固醇为底物合成。以油菜甾醇(Campesterol, CR) 为原料能大规模人工合成 BR 类似物 24-表油菜素内酯(eBL) 和高油菜素内酯^[8]。Fujioka 等^[9]利用悬浮培养的长春花(*Catharanthus roseus*) 细胞系统, 以 CR 作为 BR 生物合成的起始物, 用放射性标记前体, 以 GG-MS 分析 BR 及其各前体的含量, 提出植物中至少存在 2 条 BR 生物合成途径: 早期 G-6 氧化途径和晚期 G-6 氧化途径。已证实拟南芥、烟草、水稻中同时存在这 2 条途径^[10,11]。而且光照下, 晚期 G-6 氧化途径的合成活性高, 黑暗中, 早期 G-6 氧化途径的合成活性高^[12]。

1.1 由甲瓦龙酸合成 24-亚甲基胆固醇

BRs 和动物甾醇激素是类异戊二烯生物合成途

收稿日期: 2008-09-23

作者简介: 王凤茹(1972-), 女, 河北景县人, 副教授, 博士, 主要从事植物抗旱性研究。

径的产物。一般认为:从甲瓦龙酸(甲羟戊酸)到鲨烯 2,3-环氧化物的合成步骤在植物和动物之间是相同的,而从鲨烯 2,3-环氧化物到固醇的前体的转变是不同的。在动物体中,鲨烯 2,3-环氧化物转变为羊毛甾醇(胆固醇和甾醇激素的前体);而在植物体中,鲨烯 2,3-环氧化物转变为 24 亚甲基胆固醇(所有植物甾醇的前体,包括豆甾醇和谷甾醇)^[13,14]。

1.2 由 24 亚甲基胆固醇合成油菜甾醇

油菜甾醇(CR)由 24 亚甲基胆固醇合成。24 亚甲基胆固醇经过 G-24 还原生成油菜甾醇。对 *duf1* 突变体的生化分析表明,DWF1 不能催化 24 亚甲基胆固醇与 CR 间的 G-24 还原作用^[15]。对豌豆 *lkb* 突变体的内源甾醇分析后发现,*lkb* 积累 24 亚甲基胆固醇,而它的氢化产物 CR 极少。饲喂^[25,26,27-²H₇] 24 亚甲基胆固醇,在 *lkb* 中检测不到^[26,27-²H₆] CR。表明 *lkb* 不能将 24 亚甲基胆固醇转化成 CR^[16]。

1.3 由油菜甾醇合成油菜烷醇

CR 并不是直接形成 CN(油菜烷醇)^[17],对参与 CR 合成 CN 的类固醇进行代谢和数量分析表明,它们之间有 4 步转换,即 CR 先由异构酶重排双键形成(24R)-24 甲基胆固醇 4 烯-3 β 羟基,(24R)-24 甲基胆固醇 4 烯-3 β 羟基氧化形成(24R)-24 甲基 cholest-4 烯-3 酮,(24R)-24 甲基 cholest-4 烯-3 酮再经 5 α 还原作用形成(24R)-24 甲基-5 α 胆甾烷-3 酮,最后生成 CN。用悬浮培养的长春花细胞为材料得到了相同的结果,显示上述合成过程在植物中可能是广泛存在的。而哺乳动物中是先氧化再异构化,即动植物中存在不同的转化顺序^[18]。*sax1* 突变体不能进行上述的异构化和氧化作用^[19]。而 *det2* 的 BR 合成阻断在(24R)-24 甲基 cholest-4 烯-3 酮到(24R)-24 甲基-5 α 胆甾烷-3 酮的 5 α -还原过程^[9,20]。拟南芥的 *duf6* 和西红柿 *lk* 突变体也不能将(24R)-24 甲基 cholest-4 烯-3 酮还原为(24R)-24 甲基-5 α 胆甾烷-3 酮^[21,22]。

1.4 由油菜烷醇合成油菜素内酯

从油菜烷醇开始,由于 G-6 氧化的时间不同,BR(油菜素内酯)的合成出现了分支,即形成了早期 G-6 氧化途径和晚期 G-6 氧化途径。

1.4.1 早期 G-6 氧化途径 在早期 G-6 氧化途径中,CN 的 G-6 立即氧化形成 6-氧油菜烷醇^[23],羟化成长春花甾酮(Cathasterone, CA)^[12],进一步再羟化成茶甾酮(Teasterone, TE)^[24],经脱氢、再氢化为香蒲甾酮(Typhasterol, TY)^[25],接着转化为栗甾酮(Casterone, CS)和 BR^[26]。

1.4.2 晚期 G-6 氧化途径 通过饲喂试验,长春花培养细胞的 CN 除了立即氧化,经早期 G-6 氧化途径合成 BR 外,还可能依次羟基化形成 6-脱氧长春花甾酮,6-脱氧茶甾酮,然后脱氢,再氢化成 6-脱氧香蒲甾醇,其转化形成的 6-脱氧栗甾酮氧化为栗甾酮,再形成 BR,形成晚期 G-6 氧化途径^[21,27]。然后相继在拟南芥、西红柿中进一步证实了晚期 G-6 氧化途径在植物中的存在。

水稻中 BR 生物合成途径与拟南芥中的相似,但水稻中没有检测到 BL,CS 是水稻中活性最高的 BR^[28]。

综上所述,可将目前对 BR 生物合成的认识概括如图 1 所示^[28]。

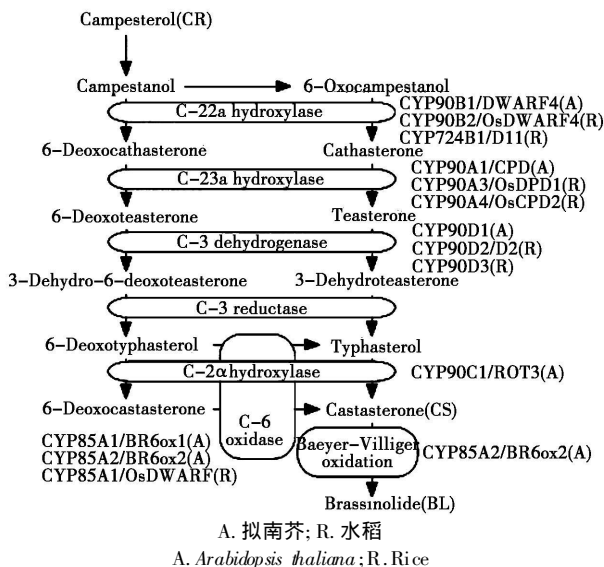


图 1 拟南芥和水稻的 BR 的生物合成途径和相关的酶
Fig. 1 *Arabidopsis thaliana* and rice BR biosynthesis pathways and related enzymes

2 BR 的分布和运输

所有的植物器官如茎、叶、花粉、种子中等都含有 BRs,但其含量差别较大。一般来讲正在生长的幼嫩组织比成熟组织中 BRs 的含量相对较高^[29,30]。那 BR 在植物体内是否同生长素一样存在运输呢? Symons and Reid 等^[31]用 H^[3] 标记 BR 发现在豌豆中 BR 不能进行长距离运输。

3 BR 在植物体内的生理功能

BR 在植物的生长、发育和繁殖过程中都起着非常重要的作用。在 BR 合成或信号接收方面存在缺陷的突变体 *det2* 和 *bril* 均表现为矮化、叶色暗绿、叶片上卷、育性降低、发育延迟等性状^[32]。外源 BR 可以部分或者完全恢复 BR 合成缺陷型突变体的表型,而 BR 合成抑制剂 brassinazole 或 brz2001 可以模

拟 BR 合成突变体的表型^[33, 34]。对 BR 突变体的分析对 BR 在植物体生长、发育过程中的功能提供了强有力的证据。到目前为止, 已知的拟南芥 BR 突变体如表 1。

表 1 拟南芥 BR 相关突变体

Tab. 1 BR-related mutant of *Arabidopsis thaliana*

Mutant	Identification method	Protein	Cellular location	Physiological role
<i>duf4</i>	T-DNA insertion ^[12]	Cytochrome P450 steroid hydroxylase		BR synthesis
<i>duf1</i>	T-DNA insertion ^[35]	24 Methylenecholesterol reductase		BR synthesis
<i>bul1 / duf7</i>	T-DNA insertion ^[36]	Sterol C5-desaturase		BR synthesis
<i>duf5</i>	T-DNA insertion ^[37]	Sterol reductases		BR synthesis
<i>cpd</i>	T-DNA insertion ^[38]	Cytochrome P450		BR synthesis
<i>det2</i>	Genics screen ^[39]	Steroid 5 α -reductase		BR synthesis
<i>bri1</i>	EMS mutagenesis screen ^[40, 41]	Leucine rich repeat receptor-like kinase(LRR-RLK)	Plasma membrane	Perceive extracellular brassinolide
<i>bri1</i>	Activation tagging ^[42, 43]	BRI1-like receptor kinase	Plasma membrane	Perceive extracellular BR; Promote vascular differentiation
<i>bri3</i>	Activation tagging ^[42, 43]	BRI1-like receptor kinase	Plasma membrane	Perceive extracellular BR; Promote vascular differentiation
<i>bri2</i>	<i>Arabidopsis</i> genome/ Isolated from T-DNA insertion ^[43]	BRI1-like receptor kinase	Plasma membrane	Provascular differentiation
<i>vh1</i>	<i>Arabidopsis</i> genome/ Isolated from T-DNA insertion ^[44]	VH1: Vascular highway 1, also a receptor kinase	Plasma membrane	Provascular differentiation
<i>bak1</i>	Yeast two-hybrid Activation tagging ^[45]	BRI1-associated kinase	Plasma membrane	Heterodimerize with BRI1
<i>bin2</i>	EMS mutagenesis screen ^[46]	SK-3 Glycogen synthase GINase-3/Shaggy-like kinase)	Plasma membrane and nucleus	Negative regulator of BR signal involved in cell expansion; Phosphorylates and down regulated levels of BES1, BZR1
<i>uci2</i>	EMS mutagenesis screen ^[47]			
<i>AtSK1</i>	EMS mutagenesis screen ^[48]			
<i>duf12</i>	EMS mutagenesis screen ^[49]			
<i>bsul</i>	Activation tagging ^[50]	Serine/ threonine phosphatase with ketch-repeat domains	Nucleus	Antagonize BIN2; Up regulated levels of BES1
<i>lxr1</i>	Resistance to brassinazole, a BR biosynthesis inhibitor ^[51]	Plant-specific transcription-factors	Cytosol and nucleus	Accumulate in nucleus in response to BL to regulate gene expression; Targeted for breakdown <i>via</i> action of BIN2
<i>bes1 / lxr2</i>	EMS suppressor of <i>bri1</i> ^[52]			
<i>bin3</i>	EMS mutagenesis and T-DNA insertion screens ^[53]	Putative homolog of archaeobacteria topoisomerase VIB	Nucleus	Modulate BR-regulated gene expression <i>via</i> chromatin remodelling?
<i>bin5</i>				
<i>bri1</i>	Activation tagged suppressor of <i>bri1</i> ^[54]	Serine carboxypeptidase		Signaling role unknown, does partially suppress a weak <i>bri</i> allele
<i>bee1, bee2, bee3</i>	Fluorescent differential display with <i>det2</i> and <i>bri1</i> RNA ^[55]	BR-enhanced expression; bHLH transcription factors		Positive regulators of BR signalling, induced by BL and repressed by ABA
<i>ttl</i>	Yeast two-hybrid with kinase domain of BRI1 ^[56]	Transthyretin-like protein	Plasma membrane	Potential BRI1 kinase substrate negative regulator of BR-mediated plant growth
<i>det3</i>	De-etiolation of dark-grown seedlings ^[57]	Vacuolar H-ATPase, subunit C		Control of cell elongation, Regulation of meristem activity
<i>bim1</i>	Yeast two-hybrid with BES1	Basic helix-loop-helix protein		Interacts with BES1 to regulate BR-induced genes

一系列 BR 合成突变体的发现对我们了解 BR 在植物体内的合成机理起了关键作用。拟南芥 BR 缺失突变体(*det2*、*cpd*、*duf1*、*duf4* 等) 在正常光条件下生长表现为矮化、叶深绿、顶端优势丧失以及育性

降低^[38, 58-60]。这些突变体表型大都是 BRs 合成的关键酶失活所导致的, 可被外源施加 BRs 所恢复。如: *DWF1* (*LKB*, *BRD2*) 编码一个氧化酶催化 24 亚甲基胆固醇 (24-methylene-cholesterol) 到芸苔甾醇 (Campesterol) 的转变; *DET2* (*LK*) 编码一个 5 α -还原酶催化芸苔甾醇 (Campesterol) 到芸苔甾烷醇 (Campestanol) 的转变; *AtDWF4* (*OsDWF4*), *CPD*, *AtDWF* (*BRD1*, *DWARF*) 属于细胞色素 P450 单加氧酶家族, 能分别催化 BR 合成过程中 G-22, G-23 的羟基化和 G-6 的氧化。这些突变体的发现对研究拟南芥中 BR 生物合成及其生理作用提供了可靠的基础。

水稻 BR 相关突变体的研究使得 BR 在水稻生长发育过程中的作用日益明确。如水稻的 BR 合成突变体 (*d2*, *dl1*, *brd1* 和 *brd2*) 表现为矮小, 去黄化, 卷叶和叶直立等表型^[61-64]。

对以上这些突变体的研究表明, BR 在植物生长发育过程中具有重要的作用, 包括细胞伸长和分裂、光形态建成、维管束发育、种子萌发、花器官发育、器官衰老和植物抗逆性等。

3.1 BR 影响细胞的伸长, 分裂及维管束发育

BR 促进细胞的伸长: 试验表明, BRs 处理可以增加大豆上胚轴和玉米根系的 ATPase 活性, 导致 H⁺-ATPase 释放 H⁺ 酸化非质体进而增加细胞壁的可塑性^[65, 66]。BR 促进大豆、拟南芥、西红柿、水稻中木质素内转糖基酶 (XTHs) 的表达, XTHs 参与细胞壁的合成和修饰^[67-70]。

BR 影响细胞的形状: BR 通过调节微管的动态分布影响细胞的形状和扩大。BL 可以诱导豌豆上胚轴皮层微管方向发生改变^[71]。拟南芥 BR 缺失突变体 *bul1* 表现为细胞小、微管排列紊乱, 外源 BR 可以恢复微管的排列和细胞的伸长^[71]。水稻 BR 不敏感突变体 *d61* (*Osbril*) 和 BR 合成缺失突变体 *brd1* 都表现为微管排列紊乱^[63, 72]。

关于 BR 是否促进细胞的分裂还存在分歧。因为细胞培养的试验系统比较复杂, 培养液的浓度、加入的各种激素以及 BR 和各种激素之间的交互作用都会影响试验结果的判断。Miyazawa 等^[73] 发现在烟草 BY-2 细胞体系中, BL 促进细胞的分裂只发生在悬浮系早期阶段和不存在外源生长素的情况下。但在用显微镜观察拟南芥叶片时却存在相反的结论: 通过对 BR 缺失突变体 *cbbl*, *cbbl3* 和 BR 不敏感突变体 *cbbl2* 的观察, Kauschmann 等^[74] 得到的结论为植株矮小的表型是由于细胞变小而不是细胞数目的降低造成的; 但是, Nakaya^[75] 观察 BR 合成突变体 *det2* 和 *dwl1* 的叶片后发现细胞数目确实减少了, 而

且叶片停止扩展也比野生型的要早。由此可见, BR 是否促进细胞的分裂还需进一步的试验证明。

3.2 BR 对种子萌发的影响

BR 同其他植物激素一样也参与到种子萌发的过程中。试验已经证实 GA 可以促进种子萌发和打破休眠, 而 ABA 具有相反的作用。几个 GA 合成和信号转导突变体的萌发可以被 BR 部分恢复, BR 合成突变体 *det2* 和不敏感突变体 *bril* 与野生型相比对 ABA 更敏感^[76]。G 蛋白的 α 亚基 (GPA1) 在种子萌发过程中可能起着非常重要的作用, 有试验证明用 GA 合成抑制剂 PAC 处理 *gpa1*、*bril*、*det2* 后各个突变体均呈现 GA 缺失的表型, *det2* 可以用 BL 完全恢复, 而 *gpa1* 只能被 BL 部分恢复, *bril* 对 BL 处理无反应^[77]。这说明 BL 和 GPA1 都是 GA 促进种子萌发所必需的。

3.3 BR 影响气孔的开张和关闭

BR 可能调节气孔的开张和关闭, 因为 2 个 BR 相关突变体 (*sax1*, *det3*) 在气孔的开张和关闭方面与野生型相比发生了明显的改变。*sax1* 是 BR 合成缺陷突变体, 此突变体加强了 ABA 促进气孔关闭的效应^[78]。氧化胁迫和 Ca²⁺ 能促进野生型气孔的关闭, 但不能诱发 *det3* 气孔的关闭, 而 ABA 和冷处理却能诱发 *det3* 气孔关闭^[78]。BR 合成突变体 *bul1* / *dwl7* 的单位叶片的气孔比野生型多 5~6 倍^[19]。这些都说明 BR 参与了调节气孔的开张和关闭及气孔的发生过程, 但其作用机制还需进一步的试验来证实。

3.4 BR 可以提高植物对逆境的抵抗能力

已有试验结果表明, BR 可以提高水稻^[80]、西红柿^[80]、玉米^[81]、黄瓜^[82]、雀麦草^[83] 对低温的抵抗能力, 还可以提高小麦^[84] 和雀麦草^[83] 对高温的忍耐力, 提高甜菜^[85] 对干旱和小麦对潮湿的抵抗力, 也可以缓解盐害对桉树^[86] 和水稻^[87] 的毒害。这些试验表明 BR 可以提高植物对各种逆境的适应。BR 之所以具有这些功能可能是因为可以激活植物中的抗氧化酶保护系统, 从而尽快消除植物体内由于逆境而产生的过多有害自由基, 提高植物抵抗逆境的能力^[88]。

3.5 BR 可以调节植物的育性

BR 和植物的育性有很大的关系, 比如拟南芥中 BR 信号转导缺陷型的突变体很多是不育或育性下降, 如 *bin2*, *bril-116* 等。水稻中 *d61*, *Osbrd1* 等 BR 信号转导缺陷型的突变体也是育性极低甚至不育^[89]。

3.6 BR 参与光形态建成

光对生物的作用不只是提供光合作用的能量, 对植物和微生物来说还是一个重要的光形态建成信号。 *det2*, *cpd*, *duf4* 等 BR 合成突变体暗生长表现为下胚轴短、子叶张开、脱黄化等光形态建成^[58, 59]。同时, 用 BR 合成抑制剂处理暗中生长的拟南芥幼苗可以诱导光形态建成^[90]。马力耕等的基因芯片结果表明, 有 4 个 BR 合成基因被光下调。这些结果说明 BR 在调控植物的光形态建成方面起着重要的作用。高水平的 BR 是暗形态建成所必需的, 而光又抑制 BR 的合成^[91]。

4 BR 信号转导在拟南芥中的研究进展

4.1 细胞表面 BR 信号的感知

BR 在细胞表面被其受体 BRI1 接受, 对拟南芥 *BRI1* 基因的序列分析表明, 它编码一个富含亮氨酸重复序列(Leucine-rich repeat, LRR)的跨膜受体蛋白激酶(Receptor-like kinase, RLK)^[17, 92, 93]。BRI1 的胞外部分包括 N-端的信号多肽、亮氨酸拉链基序、25 个串联的 LRR 以及位于其头部的 2 个半胱氨酸残基, 在第 21 和 22 个 LRR 之间还有一个 70 个氨基酸的岛屿(70aa 岛屿)。BRI1 的胞内部分具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性^[17]。因为 LRR 是已知的蛋白质与蛋白质相互作用的保守域, 因此, BRI1 可能需要一个蛋白配体同 BR 相互作用^[17]。这个假设被 BRI1-SUPPRESSOR 1 (BRS1) 的发现所证实, BRS1 是一个分泌的丝氨酸羧肽酶, 过表达 BRS1 可以恢复 *bri1* 胞外域突变体表型而对 *bri1* 胞内域突变体没有影响^[54, 94]。但后来的研究表明, 在拟南芥中, BRs 可直接结合在 BRI1 上^[95], BRI1 胞外域能结合 BRs 的最小的 Motif 包括 70 个氨基酸和第 22 个 LRR, 现在已知发生在第 22 个 LRR 的 *bri1* 突变体有 *bri1-6* (Gly644Asp), *bri1-7* (Gly613Ser), *bri1-9* (Ser662Phe) 和 *bri1-113* (Gly611Glu)^[96]。有趣的是, *bri1-6* (Gly644Asp) 的突变中, BRI1 仍能与 BRs 结合, 这说明 Gly644Asp 对与 BRs 结合作用不大, 很可能在 BR 诱导 BRI1 构象从而激活胞内激酶的过程中起关键作用^[97]。

4.2 BR 激活 BRI1 活性

虽然已有试验证明外源 BR 可以激活 BRI1 的活性^[93, 98, 99], 但激活 BRI1 活性的生物化学机制还不清楚。一种理论认为: BRI1 的激活包括 BR 诱导 BRI1 和 BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 (BAK1) 形成异二聚体, 然后在 BRI1 和 BAK1 之间发生相互磷酸化^[100]。BAK1 是用酵母双杂交技术筛选同 BRI1 相互作用的蛋白时鉴定到的, 与 BRI1 有

类似的结构构成和亚细胞定位, 二者在体内和体外都可以相互作用, 但 BAK1 只有 5 个亮氨酸, 也无 70 个氨基酸的岛屿^[99, 101-103]。另一种理论认为: BRI1 和 BAK1 之间的相互作用更类似于动物细胞中转化生长因子 β (TGF- β) 的信号转导途径, 即 BR 与 BRI1 的同型二聚体结合, 诱导二聚体构象发生变化激活它的活性, 然后磷酸化 BAK1, 使之活化, 被活化的 BAK1 进而使下游元件磷酸化^[104]。Karlova 等^[103]用蛋白组学的方法发现在一个蛋白质复合体中包括 BRI1 和 BAK1 和 SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 (SERK1), SERK1 是 BAK1 非常同源的蛋白。但 BAK1 和 SERK1 的确切功能还不十分清楚。

4.3 BRI1 信号的传出

BR 信号如何从 BRI1 传到细胞内呢? 在这个过程中可能起作用的蛋白有 BAK1, BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR1), TTL (TRANSTHYRETIN-LIKE protein), TRIP1 (TGF β -RECEPTOR-INTERACTING PROTEIN 1)。

BR 可以诱导 BRI1 和 BAK1 相互作用^[45]。Etgenia Russinova 等的研究表明, 在原生质体系统中过表达 BAK1 可以诱导 BRI1 的内吞现象, 这暗示着 BAK1 可能在 BR 信号转导过程中把 BRI1 从细胞表面带到细胞质内, 然后, BRI1 在细胞质内直接同它的靶蛋白相互作用^[102, 105]。另一个可能调节 BR 信号由 BRI1 输出的蛋白是 BKI1^[106, 107]。过表达 *BKI1* 导致植株矮小, BR 敏感性降低, RNAi 造成的 *BKI1* 沉默导致下胚轴伸长。这些说明 BKI1 是 BR 信号转导过程中的负调节因子。BR 处理可以迅速使 BKI1 从细胞膜分离下来。所以, BKI1 的作用是同 BRI1 相互作用阻止了 BRI1 同 BAK1 结合, 从而阻止了信号从 BRI1 传出^[97]。另外 2 个可能在信号由 BRI1 输出过程中起作用的蛋白是 TTL 和 TRIP1, 它们在体外能被 BRI1 磷酸化, 这两个蛋白如何在 BR 信号转导过程中起作用还不是十分清楚^[108]。

4.4 细胞内 BR 信号转导

BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 (BIN2) 调节细胞内 BR 信号转导^[47-49]。BIN2 基因编码一种胞质丝氨酸/苏氨酸激酶, 其催化功能域与果蝇的 SHAGGY 和哺乳动物的糖元合成酶激酶 3 (Glycogen synthase kinase-3, GSK3) 有 70% 的同源性。在动物细胞中, GSK3/SHAGGY 激酶参与多个信号转导途径 (如将 Wingless/Wnt 的信号传至核内), 并且它一般通过磷酸化来负调节底物以阻遏信号转导。bin2-1 突变体分析表明, BIN2 在 BR 信号转导中的作用与动物中途径类似, 通过磷酸化作用使 BR 信号转导

中的正向作用因子失活,从而阻遏 BR 的信号转导;推测,当 BR 信号被感知时,BIN2 的激酶活性受到抑制,使 BR 信号转导的抑制也得以解除。对 BIN2 激酶活性的抑制是 BR 信号转导中的关键性步骤,Peng peng 等^[109]的研究发现 BIN2 激酶活性受抑制是因为蛋白酶体介导的 BIN2 的降解造成的,外源施加 BR 合成抑制剂会增加 BIN2 的积累,而外源施加有活性的 BR 会减少 BIN2 的积累。研究表明在拟南芥中至少存在另外 2 个 GSK3 激酶,即 ASK22 和 ASK23,它们与 BIN2 功能相同,也是 BR 信号转导过程中的负调节因子^[110]。

遗传和生物化学研究表明 BIN2 通过磷酸化几个核内的蛋白来调节 BR 信号转导过程,BZR1 (BRASSINAZOLE-RESISTANT1) 和 BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR1) 是通过 2 个独立的遗传筛选发现的 2 个 BIN2 的底物,二者的序列同源性为 88%^[111-113]。外源 BR 不但抑制 BES1 和 BZR1 的磷酸化,而且可以提高蛋白的稳定性和在核内的积累^[114]。

BSU1 编码核定位的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,此酶在正在伸长的细胞中优先表达。BSU1 能对抗 BIN2 的作用而调控 BES1 的磷酸化状态,从而提高去磷酸化 BES1 的水平,进而在核中活化 BR 诱导基因的表达式^[50]。

然而 Vert G 等^[110]研究表明 BR 处理不影响 BES1 的稳定性和在核内的积累,但是影响了 BES1 的 DNA 结合能力。这和一些研究相矛盾^[52,114]。原因可能是他们所用的是不同发育时期的材料或不同的转基因株系,因此,BIN2 可能通过不同机制磷酸化这些核内的蛋白,包括蛋白降解、亚细胞定位和 DNA 结合活性^[97]。Srinivas S Gampala 等^[115]的研究表明,BIN2 磷酸化 BZR1 和 BES1 不仅抑制了 BZR1 和 BES1 和 DNA 的结合,还促进了它们同 14-3-3 蛋白的结合导致 BZR1 在细胞质积累。而去除 BZR1 上 14-3-3 结合位点的突变体不仅导致 BZR1 在细胞核积累还增强转基因植株的 BR 应答反应。

根据上述研究,可以总结出以下 BR 信号转导模式(图 2):在 BRs 不存在或浓度低时,BRI1 的激酶活性被自身 C 末端的磷酸化和与 BKI1 的结合所抑制,而 BIN2 处于活性状态时,可磷酸化转录因子 BZR1 和 BZR2/BES1,使它们被泛素化后被蛋白酶体降解,BIN2 磷酸化 BZR1 不但促进它同 14-3-3 蛋白的结合导致 BZR1 在细胞质积累在细胞核中积累减少,而且还抑制 BZR1 和 BZR2/BES1 的 DNA 结合活性。当 BRs 浓度高时,BRs 结合到 BRI1 的膜外区诱导 BRI1 激酶区蛋白构象发生改变,导致 BRI1 C 端

和 BKI1 的磷酸化改变,使得 BKI1 从质膜上脱离下来失去对 BRI1 的抑制作用。激活的 BRI1 可与 BAK1 结合,BIN2 被蛋白酶体降解积累降低,BSU1 的激酶活性被激活,导致 BZR1 和 BZR2/BES1 的去磷酸,结合在 BRs 响应基因的启动子上,调控这些基因的表达,从而参与了对植物生长发育的调控。

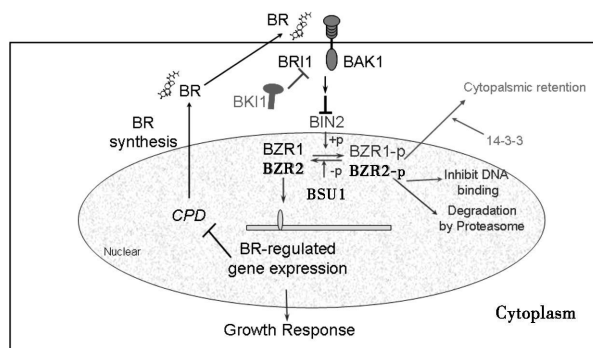


图 2 拟南芥中 BR 信号转导模式图。

Fig. 2 BR signal transduction model of *Arabidopsis thaliana*

4.5 BIN2 的调节机制

细胞表面活化的 BRI1 和 BAK1 如何抑制 BIN2 的活性目前还不清楚,它们之间没有被发现有任何物理作用和磷酸化现象^[48]。因此推测在受体和 BIN2 之间可能存在另外的信号转导蛋白。关于在植物体内 BIN2 磷酸化活性的调节机制有下面的假说: BRI1 和 BAK1 活化 BIN2 的结合蛋白,而活化的 BIN2 结合蛋白钝化 BIN2 的底物结合域进而抑制 BIN2 的磷酸化活性,激素信号也可能调节 BIN2 的亚细胞定位或其稳定性来调节其磷酸化活性。Vert 等^[110]用 BIN2-GFP 观察 BIN2 的亚细胞定位,发现在野生型植株中 BIN2 几乎均等的分布于细胞膜、细胞质和细胞核中;而功能获得性突变的 *bin2-1* 主要分布在细胞核内。Peng peng 等^[109]的研究发现 BIN2 激酶活性受抑制是因为蛋白酶体介导的 BIN2 的降解造成的。

4.6 细胞核内基因的表达

试验已经证实 BR 可以诱导很多基因表达的改变^[116],基因组芯片的结果表明有几百个 BR 调控的基因,包括参与细胞壁的合成,细胞骨架的构成,其他植物激素的合成,信号转导和运输的基因,而且有很多的基因是转录因子^[111,117-119]。这说明植物激素用很复杂的机制来调节基因的表达。但这些转录因子如何调节基因的表达产生 BR 诱导的各种生理现象还不清楚。

研究较多的转录因子是 BZR1 和 BES1。研究表明 BZR1 的结合域是 CGTG(T/C)G,CGTG(T/C)G 是已知的 BR 反应元件,存在于 CPD 和 DWF4 的启动子区,与 BZR1 结合后抑制这 2 个 BR 合成基因的表

达^[120]。BES1的结合域是E boxes(CANNTG), CANNTG存在于SAUR-AC1的启动子区,与BES1结合后激活SAUR-AC1基因的表达^[111]。与此一致的试验是,光下生长的*bzr1-1D*表现为弱的BR缺失或不敏感突变体的半矮化表型;而光下生长的*bes1-D*表现为过表达的DWF4表型。而在暗下*bzr1-1D*和*bes1-D*均表现为对BR合成抑制剂brassinazole的抗性^[51]。可能是二者通过调控各自不同的靶基因和相重叠的靶基因而产生的上述现象,试验表明30个BES1靶基因中有10个在*bzr1-1D*上调而几个BR反馈抑制的BR合成基因在*bes1-D*中下调^[116]。Yu Xiaofei等^[121]利用酵母单杂交技术鉴定到ELF6(Early flowering 6)和REF6(Relative of early flowering 6)可以与BES1相互作用,ELF6和REF6发生突变的转基因拟南芥表现出BR相关表型,如细胞伸长、BR靶基因表达下降等。BES1可以激活ELF6和REF6来调控植物的开花时间等过程。

在BRs不存在或浓度低时,BRI1的激酶活性被自身C末端的磷酸化和与BKI1的结合所抑制,而BIN2处于活性状态时,可磷酸化转录因子BZR1和BZR2/BES1,使它们被泛素化后被蛋白酶体降解,BIN2磷酸化BZR1不但促进它同14-3-3蛋白的结合导致BZR1在细胞质积累在细胞核中积累减少,而且还抑制BZR1和BZR2/BES1的DNA结合活性。当BRs浓度高时,BRs结合到BRI1的膜外区诱导BRI1激酶区蛋白构象发生改变,导致BRI1C端和BKI1的磷酸化改变,使得BKI1从质膜上脱离下来失去对BRI1的抑制作用。激活的BRI1可与BAK1结合,BIN2被蛋白酶体降解积累降低,BSU1的激酶活性被激活,导致BZR1和BZR2/BES1的去磷酸,结合在BRs响应基因的启动子上,调控这些基因的表达,从而参与了对植物生长发育的调控。

5 BR信号转导在水稻中的研究进展

水稻既是我国三大粮食作物之一,又是单子叶植物基因组学研究的模式材料,在生产实践和科学研究中都占有极其重要的地位。BR信号转导途径在拟南芥中已经取得了很大的进展,但在水稻中的报道还不是很多。近几年来水稻中几个BR相关突变体的相继鉴定为水稻中BR信号转导的研究打开了突破口。

第一个被克隆的BR信号转导相关基因是OsBRI1,OsBRI1与BRI1无论在结构上还是序列上都有高度的相似性,突变体*d61*与野生型相比较具有矮小、叶片直立、种子小、第二节间缩短、对外源施加

BR不敏感等表型,将OsBRI1转回到*d61*可以使*d61*恢复到野生型的表型^[72]。相继被鉴定的几个突变体是BR合成缺失突变体*brd1*、*d2*、*dl1*、*brd2*^[61,62,89]。这些BR合成缺失突变体表现为生长受抑制,株型矮小、叶片直立、叶色暗绿等。

Wang Lei等^[122]在水稻中过表达拟南芥BAK1基因,转基因水稻的生长发育受到明显的影响,表现为半矮化、主根变短,几个BR诱导基因在转基因株系中被明显上调,这些说明BAK1确实影响了水稻中的BR信号转导。水稻中是否存在与拟南芥相同的BRI1与BAK1的作用机制尚需进一步的试验来验证。

Bai Mingyi等^[123]利用反向遗传学研究了OsBZR1的功能并鉴定了一些与OsBZR1有相互作用的蛋白,利用RNAi干扰降低植物体内OsBZR1的表达可导致植株矮小,叶片直立,BR敏感性降低并改变一些BR响应基因的表达水平,此外利用酵母双杂交发现14-3-3蛋白可与OsBZR1发生相互作用,而去除14-3-3结合位点的OsBZR1则不能与14-3-3蛋白在酵母和植物体内发生相互作用。去除14-3-3结合位点的OsBZR1转入拟南芥*brl-5*突变体中可部分恢复*brl-5*的表型而转野生的OsBZR1则对*brl-5*的表型没有明显的影响。同时还发现去除OsBZR1的14-3-3结合位点可影响OsBZR1在细胞内的分布,能增加OsBZR1在细胞核内的分布,这表明14-3-3蛋白至少可通过降低OsBZR1核内的分布来抑制OsBZR1的功能。这些结果有力证明了OsBZR1和14-3-3蛋白在水稻BR信号转导中的重要功能。

OsGSK1是拟南芥BIN2的同源基因,过表达全长OsGSK1的转基因植株表现为株型矮小,推测OsGSK1可能是水稻BR信号转导途径中的负调节因子。敲除OsGSK1后的转基因植株对冷、热、盐、干旱的忍耐能力增强,说明OsGSK1在逆境响应中起着非常重要的作用^[124]。

为阐明BR调控植物生长发育的机理,借助基因芯片结果,受BR调节的基因OsBLE1和OsMPD1相继被克隆和分析^[125,126]。BL处理后,OsBLE1的表达量明显增加,把反义OsBLE1转入水稻中会抑制水稻的生长,表明OsBLE1参与到了BR调控的植物生长发育过程中^[125]。OsMPD1的表达量被BR处理所抑制,缺失OsMPD1的转基因植株对外源BR超敏感,OsMPD1在BR信号传递中起负调节作用^[126]。OsMADS22和OsMADS55是OsMPD1的同源基因,被证明也在BR信号传递中起负调节作用^[127]。

可见,目前水稻中BR的信号转导途径的研究

大都仅限于拟南芥信号转导途径组分的同源基因的克隆及相应突变体的分析上,水稻中 BR 信号转导机制是否同拟南芥的完全相似? 是否存在不同的信号转导组分? 这些都还没有明确的结论。而且已知的 BR 信号转导组分还很难组成一个完整的信号转导途径,从 BR 信号的感知到信号在胞质的传递,再到在核内引起特异基因的表达和酶活性等各个层次上都还有一些问题尚待阐明。

参考文献:

- [1] Mitchell J W, Mandava N B, Worley J F. Brassins— a new family of plant hormones from rape pollen[J]. Nature, 1970, 225: 1065– 1066.
- [2] Grove M D, Spencer G F, Rohwedder W K. Brassinolide, a plant growth promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen[J]. Nature, 1979, 281: 216– 217.
- [3] Abdelaty Saleh, Victoria Lumbreras, Cristina Lopez, *et al.* Maize DBF1-interactor protein 1 containing an R3H domain is a potential regulator of DBF1 activity in stress responses [J]. Plant Journal, 2006: 747– 757.
- [4] Altmann T. Recent advances in brassinosteroid molecular genetics [J]. Current Opinion Plant Biology, 1998, 1: 378– 383.
- [5] Fujioka S. Natural occurrence of brassinosteroids in the plant kingdom [M]. Brassinosteroids: Steroidal Plant Homones, 1999: 21– 46.
- [6] Bajguz A, Tretyn A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants [J]. Phytochemistry, 2003, 62: 1027– 1046.
- [7] Takatsuto S. Brassinosteroids. Distribution in plants, bioassays and microanalysis by gas chromatography mass spectrometry [J]. J Chromatography, 1994, 658: 3– 15.
- [8] Ikekawa N, Zhao Y J. Synthesis of brassinolide analogues [C]. Washington DC: American Chemical Society, 1991.
- [9] Fujioka S, Li J M, Choi Y H, *et al.* The *Arabidopsis deetiolated2* mutant is blocked early in Brassinosteroid biosynthesis [J]. Plant Cell 1997, 9: 1951– 1962.
- [10] Choi Y H, Fujioka S, Nomura T, *et al.* An alternative brassinolide biosynthetic pathway via late G-6 oxidation [J]. Phytochemistry, 1997, 44: 609– 613.
- [11] Noguchi T, Fujioka S, Choe S, *et al.* Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology 2000, 124: 201– 209.
- [12] Choe S W, 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]. Plant Cell, 1998, 10: 231– 243.
- [13] Steven D, Clouse S. Brassinosteroid signal transduction: Clarifying the pathway from ligand perception to gene expression [J]. Molecular Cell, 2002, 10: 973– 982.
- [14] Benveniste P. Sterol biosynthesis [J]. Annu Rev Plant Physiol, 1986, 37: 275– 308.
- [15] Nakai K, Kanehisam S. A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells [J]. Genomics, 1992, 14: 897– 911.
- [16] Nomura T, Kitasaka Y, Takatsuto S, *et al.* Brassinosteroid/sterol synthesis and plant growth as affected by *lka* and *lkb* mutations of pea [J]. Plant Physiology, 1999, 119: 1517– 1526.
- [17] Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction [J]. Cell, 1997, 90: 929– 938.
- [18] Lachance Y, Luurthev D, Labrie C. Characterization of human 3β -hydroxysteroid dehydrogenase P52 isomerase gene and its expression in mammalian cells [J]. J Biology Chemistry, 1990, 265: 20469– 20475.
- [19] Ephritikhine G, Pagant S, Fujioka S, *et al.* The *sax1* mutation defines a new locus involved in the brassinosteroid biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal 1999, 18: 315– 320.
- [20] Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, *et al.* *Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24R)-24-methylcholesterol-4-en-3-one to (24R)-24-methyl-5 α -cholesterol-3-one in brassinosteroid biosynthesis [J]. Plant Physiology, 1999, 120: 833– 839.
- [21] Yokota T, Nomura T, Kitasaka Y. Biosynthetic lesions in brassinosteroids deficient *pea* mutants [C] // The 24th proceedings of America. Edited by America: the plant growth regulation society of America; 1997: 94.
- [22] Li J M, Biswas M G, Chao A, *et al.* Conservation of function between mammalian and plant steroid 5 α -reductases [C] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94: 3554– 3559.
- [23] Suzuki H, Inoue T, Fujioka S, *et al.* Conversion of 24-methylcholesterol to 6-Ox-24-methylcholesterol, a putative intermediate of the biosynthesis of Brassinosteroids, in cultured cells of *Catharanthus roseus* [J]. Phytochemistry, 1995, 40: 1391– 1397.
- [24] Fujioka S, Inoue T, Takatsuto S, *et al.* Identification of a new brassinosteroid, cathasterone, in cultured cells of *Catharanthus-roseus* as a biosynthetic precursor of teasterone [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1995, 59: 1543– 1547.
- [25] Suzuki H, Fujioka S, Takatsuto S. Biosynthesis of brassinolide from teasterone via typhasterol and castasterone in cultured cells of *Catharanthus roseus* [J]. J Plant Growth Regulation, 1994, 13: 21– 26.
- [26] Suzuki H, Fujioka S, Takatsuto S. Possible involvement of 3-dehydroteasterone in the conversion of teasterone to typhasterol in cultured cells of *Catharanthus roseus* [J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 1994b, 58: 1186– 1188.
- [27] Yokota T, Nakayama M, Wakisaka T, *et al.* 3-Dehydroteasterone, a 3, 6-diketobrassinosteroid as a possible biosynthetic intermediate of brassinolide from wheat grain [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1994, 58: 1183– 1185.
- [28] Tomoaki, Sakamoto, Makoto, *et al.* Characterization of constitutive photomorphogenesis and dwarfism homologs in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. J Plant Growth Regulation, 2006, 25: 245– 251.
- [29] Clouse S D, Sasse J M. BRASSINOSTEROIDS: Essential regulators of plant growth and development [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 427– 451.
- [30] Shimada Y, Goda H, Nakamura A, *et al.* Organ-specific expression of brassinosteroid-biosynthetic genes and distribution of endogenous brassinosteroids in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2003, 131: 287– 297.
- [31] Symons G M, Reid J B. Brassinosteroids do not undergo long-distance transport in pea. Implications for the regulation of endogenous brassinosteroid levels [J]. Plant Physiology, 2004, 135: 2196– 2206.

- [32] Bishop G J, Konz C. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(Suppl): S97– 110.
- [33] Asami T, Min Y K, Nagata N, *et al.* Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor[J]. *Plant Physiology*, 2000, 123: 93– 99.
- [34] Sekimata K, Kimura T, Kaneko I, *et al.* A specific brassinosteroid biosynthesis inhibitor, Brz2001: evaluation of its effects on *Arabidopsis*, cress, tobacco, and rice[J]. *Planta*, 2001, 213: 716– 721.
- [35] Feldmann K A, Marks M D, Christianson M L, *et al.* A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis[J]. *Science*, 1989, 243: 1351– 1354.
- [36] Choe S W, Noguchi T, Fujioka S, *et al.* The *Arabidopsis* *dwf7/stel1* mutant is defective in the Delta(7) sterol G-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 207– 221.
- [37] Choe S W, Tanaka A, Noguchi T, *et al.* Lesions in the sterol Delta(7) reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis[J]. *Plant Journal*, 2000, 21: 431– 443.
- [38] Szekeres M, Nemeth K, Konz Kálmán Z, *et al.* Brassinosteroids rescue the deficiency of *CYP90*, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1996, 85: 171– 182.
- [39] Chory J, Nagpal P, Peto C A. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1991, 3: 445– 459.
- [40] Clouse S D, Langford M, McMorris T C. A Brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development [J]. *Plant Physiology*, 1996, 111: 671– 678.
- [41] Li J M, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction[J]. *Cell*, 1997, 90: 929– 938.
- [42] Zhou A, Wang H C, Walker J C, *et al.* BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* Brassinosteroid signaling[J]. *Plant Journal*, 2004, 40: 399– 409.
- [43] Cano-Delgado A, Yin Y H, Yu C, *et al.* *BRL1* and *BRL3* are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2004, 131: 5341– 5351.
- [44] Clay N K, Nelson T. VH1, a provascular cell-specific receptor kinase that influences leaf cell patterns in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 2707– 2722.
- [45] Li J, Wen J, Lease K A, *et al.* BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling[J]. *Cell*, 2002, 110: 213– 222.
- [46] Li J M, Nam K H, Vafeados D, *et al.* *BIN2*, a new brassinosteroid-insensitive locus in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 14– 22.
- [47] Perez-Perez J M, Ponce M R, Micol J L. The *UCUI* *Arabidopsis* gene encodes a *SHAGGY/GSK3*-like kinase required for cell expansion along the proximodistal axis[J]. *Developmental Biology*, 2002, 242: 161– 173.
- [48] Li J M, Nam K H. Regulation of brassinosteroid signaling by a *GSK3/SHAGGY*-like kinase[J]. *Science*, 2002, 295: 1299– 1301.
- [49] Choe S W, Schmitz R J, Fujioka S, *et al.* *Arabidopsis* brassinosteroid-insensitive *dwarf12* mutants are semidominant and defective in a glycogen synthase kinase 3 beta-like kinase [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130: 1506– 1515.
- [50] Mora-Garcia S, Vert G, Yin Y, *et al.* Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to Brassinosteroids in *Arabidopsis* [J]. *Genes Development*, 2004, 18: 448– 460.
- [51] Wang Z Y, Nakano T, Gendron J, *et al.* Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis[J]. *Developmental Cell*, 2002, 2: 505– 513.
- [52] 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: 181– 191.
- [53] Yin Y H, Cheong H, Friedrichsen D, *et al.* A crucial role for the putative *Arabidopsis* topoisomerase VI in plant growth and development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 10191– 10196.
- [54] Li J, Lease K A, Tax F E, *et al.* BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates *BRI1* signaling in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 5916– 5921.
- [55] Friedrichsen D M, Nemhauser J, Muramitsu T, *et al.* Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth [J]. *Genetics*, 2002, 162: 1445– 1456.
- [56] Nam K H, Li J M. The *Arabidopsis* Transhyretin-Like protein is a potential substrate of *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 2406– 2417.
- [57] Cabreray Poch H L, Peto C A, Chory J. A mutation in the *Arabidopsis* *DET3* gene uncouples photoregulated leaf development from gene expression and chloroplast biogenesis[J]. *Plant Journal*, 1993, 4: 671– 682.
- [58] Li J, Nagpal P, Vitart V, *et al.* A role for Brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1996, 272: 398– 401.
- [59] Klahre U, Noguchi T, Fujioka S, *et al.* The *Arabidopsis* *DIMINUTO/DWARF1* gene encodes a protein involved in steroid synthesis[J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1677– 1690.
- [60] Neff M M, Nguyen S M, Malancharvil E J, *et al.* *BAS1*: A gene regulating Brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 15316– 15323.
- [61] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Umemura K, *et al.* A rice Brassinosteroid-deficient mutant, *ebisu dwarf (d2)*, is caused by a loss of function of a new member of cytochrome P450 [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 2900– 2910.
- [62] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Fujioka S, *et al.* The rice Brassinosteroid-deficient *dwarf2* mutant, defective in the rice homolog of *Arabidopsis* *DIMINUTO/DWARF1*, is rescued by the endogenously accumulated alternative bioactive Brassinosteroid, dolichosterone [J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 2243– 2254.
- [63] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Shimizu-Sato S, *et al.* Loss-of-function of a rice brassinosteroid biosynthetic enzyme, G-6 oxidase, prevents the organized arrangement and polar elongation of cells in the leaves and stem [J]. *Plant Journal*, 2002, 32: 495– 508.
- [64] 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 re-

- duced seed length[J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 776– 790.
- [65] Cerana R, Bonetti A, Marre M T, *et al.* Effects of a brassinosteroid on growth and electrogenic proton extrusion in Azuki bean epicotyls[J]. *Physiologia Plantarum*, 1983, 59: 23– 27.
- [66] Cerana R, Lado P, Anastasia M, *et al.* Regulating effects of brassinosteroids and of sterols on growth and H^+ secretion in maize roots[J]. *Journal of Plant Physiology*, 1984, 114: 221– 225.
- [67] Zurek D M, Clouse S D. Molecular cloning and characterization of a brassinosteroid-regulated gene from elongating soybean (*Glycine max* L.) epicotyls[J]. *Plant Physiology*, 1994, 104: 161– 170.
- [68] Xu W, Punnganan M M, Polisensky D H, *et al.* *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase[J]. *Plant Cell*, 1995, 7: 1555– 1567.
- [69] Koka C V, Cemy 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: 85– 98.
- [70] Uozu S, Tanaka-Ueguchi M, Kitano H, *et al.* Characterization of *XET*-related genes of rice[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 853– 859.
- [71] Catterou M, Dubois F, Schaller H, *et al.* Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. I. Molecular, cellular and physiological characterization of the *Arabidopsis* bull mutant, defective in the Delta(7)-sterol C5-desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis[J]. *Planta*, 2001, 212: 659– 672.
- [72] Yamamuro C, Ihara Y, Wu X, *et al.* Loss of function of a rice *Brassinosteroid insensitive* homolog prevents internode elongation and bending of the lamina joint[J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 1591– 1605.
- [73] Miyazawa Y, Nakajima N, Abe T, *et al.* Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression, and organellar DNA contents[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54: 2669– 2678.
- [74] Kauschmann A, Jessop A, Koncz C, *et al.* Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development[J]. *Plant Journal*, 1996, 9: 701– 713.
- [75] Nakaya M, Tsukaya H, Murakami N, *et al.* Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43: 239– 244.
- [76] Steber C M, McCourt P. A role for brassinosteroids in germination in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2001, 125: 763– 769.
- [77] Ullah H, Chen J G, Wang S, *et al.* Role of a heterotrimeric G protein in regulation of *Arabidopsis* seed germination[J]. *Plant Physiology*, 2002, 129: 897– 907.
- [78] Ephrussi G, Fellner M, Vannini C, *et al.* The *sax1* dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid[J]. *Plant Journal*, 1999, 18: 303– 314.
- [79] Allen G J, Chu S P, Schumacher K. Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant[J]. *Science*, 2000, 289: 2338– 2342.
- [80] Kamuro Y, Takatsuto S. Capability for and problems of practical uses of Brassinosteroids[J]. *Acs Symposium Series* 1991, 474: 292– 297.
- [81] He R Y, Wang G J, Wang X S. Effect of brassinolide on growth and chilling resistance of maize seedlings[M]. Washington, DC: American Chemical Society; 1991.
- [82] Katsumi M. Physiological modes of brassinolide action[M]. Washington, DC: American Chemical Society; 1991.
- [83] Wilen R W, Sacco M, Gusta L V, *et al.* Effects of 24-Epi-brassinolide on freezing and thermotolerance of bromegrass (*Bromus-Inermis*) cell cultures[J]. *Physiologia Plantarum*, 1995, 95: 195– 202.
- [84] Kulaeva O N, Burkhanova E A, Fedina A B, *et al.* Effect of brassinosteroids on protein synthesis and plant cell ultrastructure under stress conditions[J]. *Acs Symposium Series* 1991, 474: 141– 155.
- [85] Schilling G, Schiller C, Otto S. Influence of brassinosteroids on organ relation and enzyme activities of sugar beet plants[M]. Washington, DC: American Chemical Society, 1991.
- [86] Sairam R K. Effect of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisture stress condition of two wheat varieties[J]. *Plant Growth Regulation*, 1994, 14: 173– 181.
- [87] Sasse J M, Smith R, Hudson I. Effect of 24-epibrassinolide on germination of seeds of *Eucalyptus camuldulensis* in saline conditions[J]. *Proc Plant Growth Regulation*, 1995, 22: 136– 141.
- [88] Anuradha S, Rao S. Effect of brassinosteroids on the salinity stress induced inhibition of germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa*) [J]. *Plant Growth Regulation*, 2001, 33: 151– 153.
- [89] Hong Z, Ueguchi-Tanaka M, Uozu S, *et al.* Isolation and characterization of a rice brassinosteroid mutant, *Osdwarf* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2002, 43: 184– 184.
- [90] Nagata N, Min Y K, Nakano T, *et al.* Treatment of dark-grown *Arabidopsis thaliana* with a brassinosteroid-biosynthesis inhibitor, brassinazole, induces some characteristics of light-grown plants[J]. *Planta*, 2000, 211: 781– 790.
- [91] Ma L G, Li J, Qu L, *et al.* Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways[J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 2389– 2607.
- [92] He Z H, Wang Z Y, Li J, *et al.* Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1[J]. *Science*, 2000, 288: 2360– 2363.
- [93] Wang Z Y, Seto H, Fujioka S, *et al.* BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids[J]. *Nature*, 2001, 410: 380– 383.
- [94] Zhou A F, Li J. *Arabidopsis* BRS1 is a secreted and active serine carboxypeptidase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280: 35554– 35561.
- [95] Kinoshita T, Cano-Delgado A, Seto H, *et al.* Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1[J]. *Nature*, 2005, 433: 167– 171.
- [96] Noguchi T, Fujioka S, Choe S, *et al.* *Brassinosteroid-insensitive* dwarf mutants of *Arabidopsis* accumulate brassinosteroids[J]. *Plant Physiology*, 1999, 121: 743– 752.
- [97] Li J M, Jin H. Regulation of brassinosteroid signaling[J]. *Trends in Plant Science*, 2007, 12: 37– 41.
- [98] Wang X, Goshe M B, Soderblom E J, *et al.* Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the

- Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase[J]. Plant Cell, 2005, 17: 1685– 1703.
- [99] Wang X F, Goshe M B, Soderblom E J, *et al.* Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase[J]. Plant Cell, 2005, 17: 1685– 1703.
- [100] Nam K H, Li J M. *BRI1/BAK1*, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling[J]. Cell, 2002, 110: 203– 212.
- [101] Whipps C W, Hangarter R P. A brassinosteroid-hypersensitive mutant of *BAK1* indicates that a convergence of photomorphogenic and hormonal signaling modulates phototropism[J]. Plant Physiology, 2005, 139: 448– 457.
- [102] Russinova E, Borst J W, Kwaaitaal M, *et al.* Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* Brassinosteroid receptors *BRI1* and *AtSERK3* (*BAK1*) [J]. Plant Cell, 2004, 16: 3216– 3229.
- [103] Karlova R, de Vries S C. Advances in understanding brassinosteroid signaling[J]. Science Signaling, 2006, 354: 36– 44.
- [104] Wang X, Li X, Meisenhelder J, *et al.* Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor *BRI1* [J]. Development Cell 2005, 8: 855– 865.
- [105] Geldner N, Hyman D L, Wang X, *et al.* Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase *BRI1* [J]. Genes Development, 2007, 21: 1598– 1602.
- [106] Wang X, Chory J. Brassinosteroids regulate dissociation of *BK1*, a negative regulator of *BRI1* signaling, from the plasma membrane[J]. Science, 2006, 313: 1118– 1122.
- [107] Hirabayashi S, Matsushita Y, Sato M, *et al.* Two proton pump interactors identified from a direct phosphorylation screening of a rice cDNA library by using a recombinant *BRI1* receptor kinase[J]. Plant Biotechnology, 2004, 21: 35– 45.
- [108] Ehsan H, Ray W K, Phinney B, *et al.* Interaction of *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 receptor kinase with a homolog of mammalian TGF-beta receptor interacting protein[J]. Plant Journal, 2005, 43: 251– 261.
- [109] Peng Peng, Yan Zhenyan, Zhu Yongyou, *et al.* Regulation of the *Arabidopsis* GSK3-like kinase BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 through proteasome-mediated protein degradation[J]. Molecular Plant, 2008, 1: 338– 346.
- [110] Vert G, Chory J. Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling[J]. Nature, 2006, 441: 96– 100.
- [111] Yin Y H, Vafeados D, Tao Y, *et al.* A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2005, 120: 249– 259.
- [112] Wang Z Y, Nakano T, Gendron J, *et al.* Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis[J]. Dev Cell, 2002, 2: 505– 513.
- [113] Zhao J, Peng P, Schmitz R J, *et al.* Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling [J]. Plant Physiology, 2002, 130: 1221– 1229.
- [114] He J X, Gendron J M, Yang Y L, *et al.* The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99: 10185– 10190.
- [115] Srinivas S, Gampala, Tae-Wuk Kim, Jun Xian He, *et al.* An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*[J]. Developmental Cell, 2007, 13: 177– 189.
- [116] Vert G, Nemhauser J L, Geldner N, *et al.* Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005, 21: 177– 201.
- [117] Goda H, Shimada Y, Asami T, *et al.* Microarray analysis of Brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2002, 130: 1319– 1334.
- [118] Mussig C, Fischer S, Altmann T. Brassinosteroid-regulated gene expression[J]. Plant Physiology, 2002, 129: 1241– 1251.
- [119] He J X, Gendron J M, Sun Y, *et al.* BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses[J]. Science, 2005, 307: 1634– 1638.
- [120] He J X. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses [J]. Science, 2005, 308: 1743– 1743.
- [121] Yu Xiaofei, Li Li, Li Lei, *et al.* Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008.
- [122] Wang Lei, Xu Yuyuan, Li J, *et al.* Transgenic rice plants ectopically expressing *AtBAK1* are semi-dwarfed and hypersensitive to 24 epibrassinolide[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164: 655– 664.
- [123] Bai M Y, Zhang L Y, Gampala S, *et al.* Functions of OsBZR1 and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104: 13839– 13844.
- [124] Serry Koh, Sang Choon L, Min Kyung K, *et al.* T-DNA tagged knockout mutation of rice *OsGSK1*, an orthologue of *Arabidopsis* BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stresses[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 65: 453– 466.
- [125] Yang G X, Setsuko Komatsu. Molecular cloning and characterization of a novel brassinolide enhanced gene *OsBLE1* in *Oryza sativa* seedlings[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42: 1– 6.
- [126] Duan K, Li L, Hu P, *et al.* A brassinolide-suppressed rice MADS-box transcription factor, OsMDP1, has a negative regulatory role in BR signaling[J]. Plant Journal, 2006, 47: 519– 531.
- [127] Shinyoung Lee, Sang Chul Choi, Gynheung An. Rice SVP-group MADS-box proteins, OsMADS22 and OsMADS55, are negative regulators of brassinosteroid responses[J]. Plant Journal, 2008, 54: 93– 105.