

· 专题论坛 ·

生长素合成途径的研究进展

王家利^{1, 3†}, 刘冬成^{3†}, 郭小丽², 张爱民^{3*}

¹莱芜职业技术学院信息工程系, 莱芜 271100; ²中国农业大学生物学院, 北京 100193

³中国科学院遗传与发育生物学研究所, 植物细胞与染色体工程国家重点实验室, 北京 100101

摘要 生长素是一类含有一个不饱和芳香族环和一个乙酸侧链的内源激素, 参与植物生长发育的许多过程。植物和一些侵染植物的病原微生物都可以通过改变生长素的合成来调节植株的生长。吲哚-3-乙酸(IAA)是天然植物生长素的主要活性成分。近年来, 随着IAA生物合成过程中一些关键调控基因的克隆和功能分析, 人们对IAA的生物合成途径有了更加深入的认识。IAA的生物合成有依赖色氨酸和非依赖色氨酸两条途径。依据IAA合成的中间产物不同, 依赖色氨酸的生物合成过程通常又划分为4条支路: 吲哚乙醛肟途径、吲哚丙酮酸途径、色胺途径和吲哚乙酰胺途径。该文综述了近几年在IAA生物合成方面取得的新进展。

关键词 合成途径, 酶, 基因, 生长素

王家利, 刘冬成, 郭小丽, 张爱民 (2012). 生长素合成途径的研究进展. *植物学报* 47, 292–301.

生长素(auxin)是一类含有一个不饱和芳香族环和一个乙酸侧链的内源激素, 在植物的生长发育过程中发挥重要作用。生长素影响植物细胞的伸长和分裂、植株向地性和向光性的形成、主侧根和下胚轴的生长、维管组织的发育及根毛和花器官的形成, 它对植物的早期发育和形态建成均具有重要意义(Bandurski et al., 1995)。1928年, Went证实了胚芽的尖端确实产生了某种能够控制胚芽生长的物质。之后, Kogl等从一些植物中分离出了该物质并将其命名为吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)。IAA是天然植物生长素的主要活性成分, 是最早发现的促进植物生长的激素, 其英文名称来源于希腊文auxein。此外, 在植物体内还存在其它生长素, 如吲哚丁酸(indole-3-butyric acid, IBA)和4-氯吲哚-3-乙酸(4-chloroindole-3-acetic acid, 4-Cl-IAA)等(Bandurski et al., 1995)。阐明生长素合成的分子基础和生化机制, 对界定生长素在植物发育中的功能、深入了解生长素的运输方式及在调节植物发育等方面的作用都有深远的影响。尽管IAA的研究已开展了近80年并取得了丰硕成果, 但对IAA合成途径的探究至今仍是科学界面临的艰巨挑战之一。目前, 研究人员普遍认为植物体内的IAA有

多条合成途径, 但每条途径中具体的生物反应机制尚有许多研究空白, 不同种类的生物个体所依赖的主要合成途径也有待明确(Quittenden et al., 2009)。

植物体内生长素的合成是一个非常复杂的过程。当植物体内IAA浓度降低时, IAA-amino acids、IAA-sugar和IAA-methyl ester等可被蛋白水解酶水解成有活性的IAA(Zhao et al., 2001; Woodward and Bartel, 2005)。尽管各类植物中都存在相对保守的生长素合成途径, 但在长期的进化过程中, 每一类植物的生长素合成方式又发生了很大变异, 有些种类的植物还演化出了自己特有的生长素合成途径(Zhao, 2010)。功能基因组学研究、酶学分析、代谢特征观察及同位素标记稀释实验表明, IAA的生物合成主要分为依赖色氨酸(Trp-dependent pathway)和非依赖色氨酸(Trp-independent pathway)两条途径(Cohen et al., 2003)。近年来发现的与生长素合成相关的重要催化酶系和克隆的关键调控基因多数属于依赖色氨酸合成途径, 非依赖色氨酸途径因尚未克隆到参与合成的重要基因而知之甚少。依据IAA合成过程中的主要中间产物, 依赖色氨酸的生物合成过程通常又划分为4条支路: 吲哚乙醛肟(indole-3-acetaldoxime,

收稿日期: 2011-12-28; 接受日期: 2012-03-26

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(No.2011CB100300)

† 共同第一作者。

* 通讯作者。E-mail: amzhang@genetics.ac.cn

IAOx)途径、色胺(tryptamine)途径、吲哚乙酰胺(indole-3-acetamide, IAM)途径和吲哚丙酮酸(indole-3-pyruvic acid, IPA)途径(Woodward and Bartel, 2005; Wang et al., 2006; Lehmann et al., 2010; Zhao, 2010)。随着生长素合成途径中重要催化酶功能的明确, 也有研究将依赖色氨酸的生长素合成过程分为CYP79B途径、YUCCA(YUC)途径、吲哚乙酰胺途径和吲哚丙酮酸途径(Strader and Bartel, 2008)。本文将系统阐述生物体内IAA合成过程的研究概况, 重点综述植物体内依赖色氨酸的生长素合成途径。此外, 鉴于微生物中生长素合成途径的研究工作对开展植物体内IAA合成的研究有重要启示作用, 本文也将对相关内容做简单描述。

1 生长素合成途径

1.1 吲哚乙醛肟途径

吲哚乙醛肟途径又称为CYP79B途径(Strader and Bartel, 2008)。其原因是细胞色素P450单加氧酶(cytochrome P450 mono-oxygenase)CYP79B2和CYP79B3是该条途径中重要的催化酶。过量表达CYP79B2基因会导致拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植株体内生长素的含量显著提高, 而双突变体*cyp79b2cyp79b3*(CYP79B2和CYP79B3基因均被沉默)表现为幼苗下胚轴变短, 植株矮小, 体内生长素的含量显著降低(Zhao et al., 2002)。体外实验表明, 这2个P450单加氧酶能够将色氨酸氧化为吲哚-3-乙醛肟(Hull et al., 2000)。在以拟南芥突变体为材料开展基因功能研究的过程中, 曾一度认为CYP79B途径和有YUC基因参与的途径均能产生吲哚-3-乙醛肟, 吲哚-3-乙醛肟和吲哚-3-乙腈(indole-3-acetonitrile)可能是N-羟基色氨酸(N-hydroxyl-tryptamine)转变为IAA的中间产物(Zhao et al., 2002; Strader and Bartel, 2008)。随着检测装备的不断升级及分析水平的不断提高, 尤其是LC-ESI-MS/MS检测手段在实验中的应用, 显著提高了检测植物体内吲哚-3-乙醛肟含量的灵敏度和准确性。近年来的研究结果表明, 拟南芥体内的吲哚-3-乙醛肟主要在CYP79B途径而不是在有YUC基因参与的生长素合成途径中合成(Sugawara et al., 2009)。吲哚-3-乙醛肟是IAA合成途径中一个非常重要的中间产物, 因此该条途径也被称作吲哚乙醛

肟途径(Sugawara et al., 2009)。

CYP79B家族基因编码蛋白可将色氨酸转化为吲哚-3-乙醛肟(图1), 但是吲哚-3-乙醛肟如何转化到IAA目前尚不清楚。理论上, 吲哚-3-乙醛肟可以转变为吲哚-3-乙腈和吲哚乙醛(indole-3-acetaldehyde), 并可分别在腈水解酶(nitrilase)和醛氧化酶(aldehyde oxidase)催化下生成IAA。在缺少腈水解酶且pH<4时, 吲哚-3-乙醛肟可自发生成吲哚-3-乙醛; 当pH>4时, 吲哚-3-乙醛肟也可生成吲哚-3-乙醛, 但转变机制目前还不十分清楚(Zazimalova and Napier, 2003)。现在认识该过程更多的是通过对*sur1*、*sur2*及CYP79B2过表达植株的研究。*sur1*是拟南芥中第1个被鉴定出来的、体内生长素含量增加的突变体, 该突变体表现出严重的生长发育缺陷。光照下生长的*sur1*幼苗具有长的下胚轴和偏上生长的子叶, 而黑暗下生长时*sur1*幼苗有短的下胚轴。另外, *sur1*能从下胚轴产生出很多不定根。*SUR1*编码C-S裂解酶(C-S lyase), 该酶可催化吲哚-3-乙酰氧肟(S-indolyl-acetohydroximoyl)转变成吲哚-3-硫代葡萄糖甙(indolyl-3-thiohydroximate), 这是吲哚族硫代葡萄糖甙(indolyl glucosinolate, IG)合成中的关键步骤(Mikkelsen et al., 2004)。与*sur1*相同, *sur2*也可从下胚轴产生出很多的不定根。*SUR2*编码一个细胞色素P450家族成员CYP83B1, 它可将吲哚-3-乙醛肟转变为吲哚族硫代葡萄糖甙。在*sur2cyp83B1*突变体中, 吲哚-3-乙醛肟转变成硫代葡萄糖甙的途径被阻断, 导致吲哚-3-乙醛肟含量增加, 增加的一部分吲哚-3-乙醛肟又转变为生长素。有研究发现, 在一些具有硫代葡萄糖甙代谢的植物中, 吲哚-3-乙醛肟是吲哚-3-乙腈、吲哚族硫代葡萄糖甙以及植保素亚麻芥素(camalexin, CL)等几条次生代谢途径的重要交会节点。当组织受到病原微生物侵染时, 吲哚-3-乙醛肟主要经CYP83B1等酶催化形成吲哚族硫代葡萄糖甙(Zhao et al., 2002; Grubb and Abel, 2006)。值得注意的是, 在正常环境下生长的野生型拟南芥植株体内, 吲哚-3-乙腈、吲哚族硫代葡萄糖甙以及植保素亚麻芥素的合成是相互独立的过程(Sugawara et al., 2009)。另外, *SUR1*基因的失活破坏了吲哚族硫代葡萄糖甙的合成, 可能会导致上游中间产物吲哚-3-乙醛肟的积累。*sur1*是一个隐性的功能缺失突变体, *sur1*高生长素的表型可能是由于过量的吲哚-3-乙醛肟转变成了IAA, 这暗示着在拟南芥体内可能

途径生成吲哚乙腈。在芸薹属(*Brassica*)植物中, 吲哚-3-乙腈由黑芥子酶(myrosinase)催化吲哚族硫代葡萄糖甙水解得到, 硫代葡萄糖甙代谢途径被认为是产生吲哚-3-乙腈的一个重要来源(Grubb and Abel, 2006; Strader and Bartel, 2008)。一般认为, 硫代葡萄糖甙合成后贮存于液泡中, 在空间上与黑芥子酶相互隔离, 结构比较稳定。但当组织和细胞受到损伤时, 硫代葡萄糖甙会与黑芥子酶接触后发生不可逆的水解反应并进一步生成吲哚-3-乙腈。在正常条件下生长的玉米、水稻(*Oryza sativa*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)及拟南芥 *cyp79b2cyp79b3* 双突变体中均未检测到吲哚-3-乙腈(Sugawara et al., 2009)。因此, 近年来有研究人员认为吲哚-3-乙腈主要来源于吲哚乙醛脱氢途径。不过, 目前尚未有足够的证据可以排除吲哚-3-乙腈是植物体内生长素合成的中间产物, 在某些植物体内也许存在以吲哚-3-乙腈为主要中间产物的合成途径(Sugawara et al., 2009)。

现在研究人员普遍认为, 植物界中由吲哚-3-乙醛脱氢转变为 IAA 并不是一个主要的生长素合成途径(Zhao, 2010; Lehmann et al., 2010)。支持该观点的证据概括起来主要有以下几点。(1) 在水稻和玉米等作物中没有 *CYP79B* 的同源基因, 理论上在这些植物体内不会存在内源的吲哚-3-乙醛脱氢, 实验的结果也证明在水稻和玉米中检测不到内源的吲哚-3-乙醛脱氢(Sugawara et al., 2009)。(2) 在正常条件下生长的野生型拟南芥体内可以检测到内源的吲哚-3-乙醛脱氢, 而将 *CYP79B* 基因家族成员功能失活后, 在 *cy79b2cyp79b3* 双突变体中检测不到内源的吲哚-3-乙醛脱氢。(3) 与其它生长素信号转导突变体相比, *cy79b2cyp79b3* 双突变体生长素缺陷的表型并不显著。自然界中存在一些植物, 它们与拟南芥一样具有硫代葡萄糖甙代谢途径, 吲哚乙醛脱氢途径可能是这类植物的一个特有合成途径(Sugawara et al., 2009)。值得注意的是, *cy79b2cyp79b3* 双突变体生活在特定的温度(26°C)条件下时, IAA 的活性显著下降, 突变体植株表现出明显的生长素缺陷表型(Zhao et al., 2002; Sugawara et al., 2009)。当实验温度升高到 29°C 时, 在剥离的胚轴中 IAA 的合成速率显著提高(Gray et al., 1998)。可见在拟南芥中, 吲哚乙醛脱氢途径可能受温度诱导。

1.2 吲哚丙酮酸途径

吲哚丙酮酸途径是微生物中生长素合成的一条重要途径(Koga, 1995)。代谢研究结果表明, 存在于黄瓜(*Cucumis sativus*)根际可以促进多种农作物生长的微生物 *Enterobacter cloacae* 中, 合成 IAA 的主要途径为吲哚丙酮酸途径。在 *E. cloacae*、*Azospirillum brasilense* Sp245 和 Sp7 中克隆到了编码吲哚丙酮酸途径的关键酶——吲哚丙酮酸脱羧酶(indolepyruvate decarboxylase, IPD)的 *ipdC* 基因。到目前为止, 在微生物中尚未克隆到由色氨酸到吲哚丙酮酸阶段起关键作用的基因, 催化吲哚乙醛转变为 IAA 的酶也不十分清楚(Zhao, 2010)。

在番茄(*Solanum lycopersicum*)和拟南芥中也检测到了内源的吲哚丙酮酸, 由此推测吲哚丙酮酸可能是植物体内 IAA 合成途径中的一个中间产物。然而直到最近, 才明确了吲哚丙酮酸在植物体内生长素合成途径中的贡献及其对植株生长发育的作用。已有 3 个实验室分别克隆了参与吲哚丙酮酸途径第 1 步反应的基因。Tao 等(2008)在筛选避荫反应缺陷突变体时, 发现生长在模拟遮阴条件下的 *shade avoidance (sav3)* 突变体植株叶柄和茎都不能伸长。SAV3 编码一个氨基转移酶的同源蛋白, 这个转氨酶具有催化色氨酸转变为吲哚丙酮酸的活性, 因此被命名为 TAA1 (Tryptophan Amino Transferase of Arabidopsis)。2008 年, Alonso 研究小组筛选到一个对乙烯弱敏感的植株, 其突变体 *taal/wei8* 在 ACC(乙烯合成的直接前体)存在时具有较长的根, 而在相同的条件下野生型的根却被明显抑制, 进而克隆到了 TAA1 基因(Stepanova et al., 2008)。此外, 在分析 *tir2* 突变体的过程中, 也克隆了 TAA1 基因(Yamada et al., 2009)。*tir2* 突变体对生长素运输的抑制剂 N-1-萘甲酰苯甲酸萘酯(N-1-naphthylphthalamic acid, NPA)不敏感。*tir2* 突变体具有短的下胚轴(这一表型可以被吲哚丙酮酸和 IAA 所互补), 表明 TIR2 基因可能参与了吲哚丙酮酸生长素合成途径。此外, 在拟南芥中, TIR2 基因对温度依赖性的下胚轴伸长是必需的。TAA1 缺失突变体具有多种表型: (1) 因抵抗遮荫胁迫的反应机能被破坏, 它们在阴暗条件下生长时具有短的胚轴; (2) 由于突变体比野生型体内生长素含量减少了 40%, 导致突变体植株雌蕊和胚发育存在缺陷。但是 TAA1 基

因过量表达的植株并没有表现出明显的因生长素含量改变而引起的表型,其体内游离态的生长素含量也没有显著升高(Tao et al., 2008)。因此推测TAA1并不是该合成过程中的限速因子。

TAA基因家族编码蛋白催化的色氨酸转变为吲哚丙酮酸是吲哚丙酮酸途径的第1步(图1)。在微生物中,吲哚丙酮酸经吲哚乙醛生成IAA,这个过程由吲哚丙酮酸脱羧酶催化(Woodward and Bartel, 2005),但该酶基因在植物中至今未找到。有研究报道,在植物中Arabidopsis Aldehyde Oxidase 1(AAO1)能够催化吲哚乙醛转变为IAA(Seo et al., 1998),但AAO基因家族成员需要ABA3(ABA Deficient 3)编码的钼辅因子硫化酶(molybdenum cofactor sulfurase, MC-SU)激活其活性(Bittner et al., 2001)。最近的研究发现,在aba3突变体中,尽管AAO基因家族的成员功能失活,吲哚乙醛的含量却没有明显改变;在TAA1过表达植株中吲哚丙酮酸的含量显著改变,吲哚乙醛的含量却没有明显变化,表明在拟南芥中吲哚乙醛可能不是吲哚丙酮酸到IAA的中间产物(Mashiguchi et al., 2011)。基因功能分析以及体外实验和同位素示踪观察的结果表明,YUC基因家族可催化吲哚丙酮酸直接转变成IAA(Mashiguchi et al., 2011)。在拟南芥中,YUC基因家族目前已发现了11个成员,它们编码类黄素单加氧酶(flavin monooxygenase-like enzyme, FMO)。该基因最早是利用激活标签法从拟南芥中筛选到的一个突变体,表现出光信号缺陷并具有下胚轴伸长的表型,然后将其命名为yucca(重命名为yuc1D)(Zhao et al., 2001)。但随后发现yuc1D很可能影响了激素的平衡而不是光信号,因为在各种波长下yuc1D都有很长的下胚轴。yuc1D的表型与生长素含量增加的突变体表型相似,其它的证据也进一步证实yuc1D是生长素含量增加的突变体,在此基础上克隆了YUC基因。yuc1D突变体是第1个发现的、少量生长素改变就能引起严重发育障碍的拟南芥突变体。与许多生长素信号转导途径突变体的表型相似,yuc1D突变体表现出顶端优势丧失、株高下降、叶片扭曲、育性下降、花器官和维管束发育异常。在yucyuc4-yuc10yuc11四重突变体中还观察到体细胞胚胎发生时不能正常形成胚的基座(Cheng et al., 2007)。失活YUC基因会降低生长素报告基因的表达,表明植物体内生长素合成减少。以YUC1基因的启动子在

yuc1yuc4突变体中特异过表达iaaM基因,获得的过表达植株恢复了yuc1yuc4突变体的表型(Cheng et al., 2006)。

在很长的一段时间里,人们一直认为YUC基因家族可催化色胺转变为N-羟基色氨,故被定位于色胺途径中。但最近的研究结果表明,YUC参与了吲哚丙酮酸途径(Won et al., 2011; Mashiguchi et al., 2011)。将TAA1基因在yuc1D突变体中过表达,与yuc1D突变体相比,过表达植株中IAA和IAA-Glu的含量分别提高了1.5倍和2.3倍。IAA含量的这种变化显示,TAA1基因与YUC基因可能在生长素合成过程中起协同作用。以 $^{15}\text{N}_2$ -TAM为内标测量植物体内源的TAM含量,在yuc1yuc2yuc4yuc6四重突变体中TAM的含量并没有显著改变,在植物体内YUC基因家族可能并不催化色胺转变为N-羟基色氨。由此推测,YUC基因家族并不参与色胺途径。值得注意的是,吲哚丙酮酸的含量在yuc1yuc2yuc4yuc6四重突变体中提高了1.5倍,而在过表达YUC6基因的植株中下降了33%。这表明YUC基因参与了吲哚丙酮酸转变过程。进一步的实验表明,纯化的GST-YUC2蛋白能够催化吲哚丙酮酸转变为IAA,但TAM并不是GST-YUC2蛋白催化的底物(Mashiguchi et al., 2011)。在遮阴胁迫下,yuc1yuc4与taa有相似的表型,且所有taa突变体都能找到与其表型类似的yuc突变体,YUC过表达的表型在taa突变体背景中被抑制,TAA基因家族与YUC基因家族协同参与生长素的合成(Won et al., 2011)。植物体内以吲哚丙酮酸为中间产物的IAA合成过程是:色氨酸在TAA蛋白的催化下生成吲哚丙酮酸,再经YUC蛋白催化生成IAA。

目前,已在许多种植物中克隆到了YUC同源基因,如矮牵牛(Petunia hybrida)、番茄、牵牛花(Ipomoea nil)和水稻等(Lehmann et al., 2010),说明YUC基因在不同种类植物的生长发育过程中发挥着类似作用,因此吲哚丙酮酸途径是植物体内最基本的也是最主要的一条生长素合成途径(Zhao, 2011)。

1.3 色胺途径

根据色胺在燕麦属生长素类物质中的活性及其对胚轴的促进作用,色胺很早就被认为是植物中IAA合成的前体。后来,在烟草顶端分生组织、烟草愈伤组织、马铃薯(Solanum tuberosum)和大麦(Hordeum vul-

gare)的地上部分,都观察到被同位素标记的 ^{14}C 色胺转变为IAA。因此,早在1967年,Phelps和Sequenian就发现烟草中存在色胺生长素合成途径。色胺途径的第1步是TDC(TRP decarboxylase)催化色氨酸形成色胺。目前,催化这一步反应的酶基因在长春花(*Catharanthus roseus*)、喜树(*Camptotheca acuminata*)、短小蛇根草(*Ophiorrhiza pumila*)和水稻中被克隆(Zhao, 2010)。在拟南芥中,利用生物信息学方法进行模拟分析得到2个具有芳香左旋氨基酸脱羧酶活性的蛋白,但实验证明这2个蛋白作用的底物都不是色氨酸。迄今为止,研究者还不十分清楚在拟南芥中究竟是何种蛋白在色氨酸转变为色胺的过程中起重要作用。

TDC催化色氨酸形成色胺(图1),色胺又将如何转化为IAA?早期的研究认为,色胺途径中各中间产物出现的先后顺序是色氨酸、色胺、*N*-羟基色氨、吲哚-3-乙醛肟、吲哚乙醛(Zhao et al., 2001, 2002)。YUC基因家族能催化色胺转化为*N*-羟基色胺,因此在最初的研究中YUC被认为是色胺途径中的限速酶(Woodward and Bartel, 2005; Lehmann et al., 2010; Zhao, 2010)。但最近的研究发现,YUC基因家族催化吲哚丙酮酸生成IAA,并不参与色胺途径的IAA合成(Mashiguchi et al., 2011)。功能基因组学的分析也表明,吲哚-3-乙醛肟来自吲哚乙醛肟途径(Sugawara et al., 2009)。因此,需要重新审视植物中存在的以色胺为中间产物的IAA合成过程。豌豆(*Pisum sativum*)是目前少数可以明确色胺途径中各产物的植物之一。利用气相色谱质谱联用(GC-MS)技术分析表明,将色胺做同位素标记后,在豌豆根中检测到了被标记的吲哚乙醛,因而在豌豆体内IAA合成过程中各中间产物出现的先后顺序是色氨酸、色胺、吲哚乙醛、IAA。吲哚乙醛是豌豆体内色胺途径中的一个重要中间产物,然而豌豆中色胺转变成吲哚乙醛的生化机制并不十分清楚(Quittenden et al., 2009)。

目前,人们对植物体内色胺途径的了解还非常有限,对于一些植物体内色胺途径的中间产物尚存在争议,甚至尚未确定某些植物是否存在色胺途径(Mashiguchi et al., 2011)。例如,在拟南芥体内也检测到了内源的色胺和吲哚乙醛(Sugawara et al., 2009),但色胺是否转变为吲哚乙醛还值得商榷。在拟南芥中乙醛氧化酶(aldehyde oxidases, AAO)催化吲哚乙醛

转变为IAA,并在其体内发现了4个AAO基因家族成员。不过正如前文所述,这些酶是否在植物体内涉及IAA的合成仍然需要进一步的深入研究,因为AAO基因的时空表达与生长素物质的含量改变并不相符(Seo et al., 2000)。另外,在*aba3*突变体中,虽然AAO基因家族的成员功能失活,吲哚乙醛的含量却没有明显改变。因此推断AAO基因家族可能不参与拟南芥体内IAA的合成(Mashiguchi et al., 2011)。色胺途径在植物中确切的生化反应机制以及其在植物体内IAA合成中的贡献尚需要更深入的研究。

1.4 吲哚乙酰胺途径

吲哚乙酰胺途径是迄今为止在微生物中研究最清楚的一条途径。该途径是在根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)和假单胞菌(*Pseudomonas savastanoi*)中发现的。在这条途径中,IAA合成前体色氨酸首先被色氨酸单加氧酶(tryptophan monooxygenase, *iaaM*)催化转变为吲哚-3-乙酰胺,而后吲哚乙酰胺水解酶水解吲哚-3-乙酰胺转变为IAA(图1)。在根癌农杆菌的T-DNA上共含有*tms*、*tmr*和*tmt*三套基因,其中*tms*和*tmr*两套基因分别控制植物生长素与分裂素的合成,通过过量合成激素促使植物创伤组织无限地生长与分裂,形成冠瘿瘤。*tms*基因组由*iaaH*和*iaaM*两个基因组成,控制由色氨酸产生IAA的生物合成途径。Kuo和Kosuge(1970)用Salkowski比色、薄层层析(thin layer chromatography, TLC)和色氨酸单加氧酶酶活测定等方法获得了吲哚-3-乙酰胺的克隆,Comai和Kosuge(1982)从此克隆中分离到了色氨酸单加氧酶基因。研究结果表明,根癌农杆菌与假单胞菌的*iaaM*基因产物色氨酸单加氧酶具有明显的同源性,且色氨酸单加氧酶的黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)结合域的25个氨基酸序列高度一致,这表明2个菌系中的生长素合成途径具有共同的起源。DNA分析发现,*iaaM*和编码吲哚-3-乙酰胺水解酶的*iaaH*为共转录基因,启动子位于*iaaM*的上游。

虽然在柑橘(*Citrus reticulata*)、日本山樱(*Prunus jamasakura*)和笋瓜(*Cucurbita maxima*)等植物体内也检测到了内源的吲哚-3-乙酰胺。但是很长一段时间以来,研究人员普遍认为吲哚乙酰胺途径并不存在于植物界中。尽管很早以前就从小麦(*Triticum ae-*

stivum)、豌豆、水稻和枳(*Poncirus trifoliata*)等植物提取的粗蛋白中检测到具活性的吲哚-3-乙酰胺水解酶,但往往被认为是来源于污染的微生物(Kawaguchi et al., 1993)。随着分析水平的提高和检测仪器的不断改进,内源吲哚-3-乙酰胺在拟南芥、玉米、水稻和烟草中均被精确检测到(Sugawara et al., 2009)。人们开始相信在植物体内同样也存在以吲哚-3-乙酰胺为中间产物的生长素合成途径。不过,目前尚未发现催化色氨酸直接转化成吲哚-3-乙酰胺的调控基因(图1)。

在植物体内,吲哚-3-乙酰胺水解酶将吲哚-3-乙酰胺水解成IAA(图1)。吲哚-3-乙酰胺水解酶编码基因的克隆是最近几年IAA合成研究中取得的又一重大进展。Nemoto等(2009a)发现在烟草Bright Yellow-2 (BY-2)细胞中仅过量表达*AUX1*基因, BY-2细胞可以在没有外源生长素的环境中快速生长,这表明烟草BY-2细胞中可能存在一个类似*AUX2*功能的基因。进一步的实验显示,烟草BY-2细胞可以在含有吲哚-3-乙酰胺的培养基中生存,最终在烟草中克隆了*NtAMI1*,其作用相当于*AUX2*基因(图1)(Nemoto et al., 2009b)。在拟南芥中也克隆到了编码吲哚-3-乙酰胺水解酶的*AtAMI1*,并被定位于细胞质(Pollmann et al., 2006)。体外实验结果表明,吲哚-3-乙酰胺显著地影响拟南芥提取蛋白催化色氨酸转变为IAA的效率,但是其它物质(如色胺、吲哚-3-乙腈和吲哚乙醛等)对此过程没有明显影响(Nemoto et al., 2009b)。Pollmann等(2009)证实植物体内存在吲哚-3-乙酰胺水解酶,它在色氨酸转变为IAA的过程中发挥作用。目前,在烟草和拟南芥中分别克隆了吲哚-3-乙酰胺水解酶并对其进行了功能分析。拟南芥和烟草是不同种属的植物,因此上述结果揭示吲哚乙酰胺途径可能广泛存在于植物界中。

此外,吲哚-3-乙酰胺也是吲哚-3-乙醛肟到IAA这一合成途径中的一个重要中间产物(Sugawara et al., 2009)。利用生物化学方法对*cyp79b2cyp79b3*双突变体进行分析发现,其体内吲哚-3-乙酰胺的含量显著降低,而在突变体*sur1*植株中吲哚-3-乙酰胺的含量比野生型增长了34倍。经¹³C₆-IAOx处理后,在*cyp79b2cyp79b3*双突变体植株中检测到被标记的吲哚-3-乙酰胺。但这项研究结果还不足以证明在植物体内不存在其它生成吲哚乙酰胺的合成途径,因为在水

稻、玉米和烟草中也检测到内源吲哚-3-乙酰胺。以上这些植物体内并不存在*CYP79B*基因家族的同源基因,暗示植物界中可能还存在一条不依赖于吲哚-3-乙醛肟产生吲哚-3-乙酰胺的途径(Sugawara et al., 2009),尽管人们对这条途径知之甚少。

2 各条途径之间的联系

依据生长素合成过程中的不同中间产物(或者在合成过程中起关键作用的催化酶),生长素合成过程被划分成了几条支路,而实际上在植物体内这几条支路是紧密联系并交织在一起的。随着研究的不断深入,植物体内各个途径之间的联系不断被重新认识。例如,吲哚-3-乙醛肟曾一度被认为可能是*CYP79B*途径、吲哚丙酮酸途径及硫代葡萄糖甙代谢途径中共同的中间产物(Zhao et al., 2002)。近年来的生化分析却表明,在拟南芥中大部分吲哚-3-乙醛肟是在*CYP79B*途径中产生的(Sugawara et al., 2009)。因此推测吲哚-3-乙醛肟的合成与吲哚-3-乙醛肟转变为生长素的过程是耦合在一起的,而与吲哚-3-乙醛肟转变为硫代葡萄糖甙的过程不是耦合在一起的(Zhao, 2010)。各条生长素合成途径在植物体内产生IAA的量不尽相同。功能基因组学的研究表明,*YUC*和*TAA*基因家族是生长素合成和植物发育过程中最重要的催化酶系;吲哚丙酮酸途径是植物体内最基本的一条生长素合成途径(Won et al., 2011; Mashiguchi et al., 2011)。*CYP79B*、腈水解酶和吲哚-3-乙醛氧化酶等所在合成途径对生长素合成的贡献较小(Zhao, 2011)。此外,每条途径在植物体内合生长素的时空方式也有差异。例如,*YUC*基因的表达主要涉及植株局部的生长素合成,而吲哚乙醛肟生长素合成过程似乎不具组织特异性(Sugawara et al., 2009)。

有研究表明,色胺可对吲哚-3-乙醛肟产生竞争抑制,阻止*CYP83B1*酶与吲哚-3-乙醛肟结合(Bak and Feyereisen, 2001)。临近于*CYP83B1*酶催化中心的亚铁血红素离子(heme iron)的氨基上存在孤对电子,色胺的伯胺可与之紧密结合,因而*CYP83B1*酶丧失了与吲哚-3-乙醛肟结合的能力(Bak and Feyereisen, 2001)。与色胺相比,*N*-羟基色胺因被羟基化,在结构上与含有肟基的吲哚-3-乙醛肟更为相似,因而更易与*CYP83B1*酶结合。色胺途径产生的色胺以

及植物体内形成的N-羟基色胺可抑制CYP83B1酶的活性,降低吲哚族芥子油苷的生成,于是吲哚-3-乙醛肟进入到生长素的合成过程中(Grubb and Abel, 2006)。事实上,由于生长素合成途径间存在明显的功能冗余,生长素合成中某些基因功能缺失的突变体往往并不具生长素缺陷表型,这在很大程度上限制了研究者探明生长素各合成途径之间的联系。近年来,不断有新的研究结果颠覆传统的结论,间接证明了合成途径之间错综复杂的关系(Mashiguchi et al., 2011)。在尽可能多的突变体背景下,分析IAA合成过程中一些中间产物(如色胺、吲哚-3-乙醛肟、吲哚丙酮酸和吲哚-3-乙酰胺等)的含量变化,探究编码基因在生长素合成缺陷突变体中的相互作用,对明确植物体内各条生长素合成路径及其相互联系显得尤为重要(Zhao, 2010)。

3 研究展望

随着分子生物学和功能基因组学的发展,研究人员从细胞和分子水平上对生长素合成过程开展了深入研究。尤其是最近几年,对植物体内生长素合成过程的研究取得了巨大进展。借助模式植物拟南芥突变体的筛选和鉴定,一些生长素合成过程中的调控基因以及关键催化酶的功能相继被明确。现在普遍认为植物体内存在多条生长素合成途径,但是各个合成过程中的编码基因、催化酶类以及编码基因之间的相互作用还不明晰。生长素的合成过程及其在植物发育过程中的作用仍然需要更深入的研究,在转录组及蛋白组水平上调节生长素合成的研究几乎还是一片空白。只有将生长素合成的研究与生长素在体内的运输、信号转导以及生长素结合蛋白的分离与纯化研究结合起来,才能更加明确生长素合成在植物体发育过程中的作用。而生物化学和功能基因组学的发展、遗传转化技术和内源生长素检测水平的提高,无疑为人们深入探究生长素的合成过程提供了强大的动力。此外,人们对非依赖于色氨酸IAA合成途径的组成、调控及其生物学意义的认识尚不够深入,克隆并分析其中的关键基因将对阐明生长素合成途径具有重要意义。

参考文献

王冰,李家洋,王永红 (2006). 生长素调控植物株型形成的

研究进展. 植物学通报 23, 443–458.

- Bak S, Feyereisen R (2001). The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. *Plant Physiol* 127, 108–118.
- Bandurski RS, Cohen JD, Reinecke DM, Slovin JP (1995). Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones, Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 39–65.
- Barlier I, Kowalczyk M, Marchant A, Ljung K, Bhalerao R, Bennett M, Sandberg G, Bellini C (2000). The *SUR2* gene of *Arabidopsis thaliana* encodes the cytochrome P450 CYP83B1, a modulator of auxin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 14819–14824.
- Bartling D, Seedorf M, Schmidt RC, Weiler EW (1994). Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 6021–6025.
- Bittner F, Oreb M, Mendel RR (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 276, 40381–40384.
- Cheng YF, Dai XH, Zhao YD (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 20, 1790–1799.
- Cheng YF, Dai XH, Zhao YD (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 2430–2439.
- Cohen JD, Slovin JP, Hendrickson AM (2003). Two genetically discrete pathways convert tryptophan to auxin: more redundancy in auxin biosynthesis. *Trends Plant Sci* 8, 197–199.
- Comai L, Kosuge T (1982). Cloning characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *J Bacteriol* 149, 40–46.
- Gray WM, Östin A, Sandberg G, Romano CP, Estelle M (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7197–7202.
- Grubb CD, Abel S (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci* 11, 89–100.
- Hull AK, Vij R, Celenza JL (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent

- indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2379–2384.
- Kawaguchi M, Fujioka S, Sakurai A, Yamaki YT, Syöno K** (1993). Presence of a pathway for the biosynthesis of auxin via indole-3-acetamide in trifoliata orange. *Plant Cell Physiol* **34**, 121–128.
- Kobayashi M, Suzuki T, Fujita T, Masuda M, Shimizu S** (1995). Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 714–718.
- Koga J** (1995). Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1249**, 1–13.
- Kuo TT, Kosuge T** (1970). Role of aminotransferase and indole-3-pyruvic acid in the synthesis of indole-3-acetic acid in *Pseudomonas savastanoi*. *J Gen Appl Microbiol* **16**, 191–204.
- Lehmann T, Hoffmann M, Hentrich M, Pollmann S** (2010). Indole-3-acetamide-dependent auxin biosynthesis: a widely distributed way of indole-3-acetic acid production? *Eur J Cell Biol* **89**, 895–905.
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, McSteen P, Zhao YD, Hayashi K, Kamiya Y, Kasahara H** (2011). The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 18512–18517.
- Mikkelsen MD, Naur P, Halkier BA** (2004). Arabidopsis mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J* **37**, 770–777.
- Nemoto K, Hara M, Goto S, Kasai K, Seki H, Suzuki M, Oka A, Muranaka T, Mano Y** (2009a). The *aux1* gene of the Ri plasmid is sufficient to confer auxin autotrophy in tobacco BY-2 cells. *J Plant Physiol* **166**, 729–738.
- Nemoto K, Hara M, Suzuki M, Seki H, Muranaka T, Mano Y** (2009b). The *NtAMI1* gene functions in cell division of tobacco BY-2 cells in the presence of indole-3-acetamide. *FEBS Lett* **583**, 487–492.
- Park WJ, Kriechbaumer V, Möller A, Piotrowski M, Meeley RB, Gierl A, Glawischnig E** (2003). The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiol* **133**, 794–802.
- Pollmann S, Dückting P, Weiler EW** (2009). Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry* **70**, 523–531.
- Pollmann S, Neu D, Lehmann T, Berkowitz O, Schäfer T, Weiler EW** (2006). Subcellular localization and tissue specific expression of amidase 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**, 1241–1253.
- Quittenden LJ, Davies NW, Smith JA, Molesworth PP, Tivendale ND, Ross JJ** (2009). Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiol* **151**, 1130–1138.
- Seo M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T** (1998). Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **116**, 687–693.
- Seo M, Koiwai H, Akaba S, Komano T, Oritani T, Kamiya Y, Koshiba T** (2000). Abscisic aldehyde oxidase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **23**, 481–488.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Doležal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM** (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* **133**, 177–191.
- Strader LC, Bartel B** (2008). A new path to auxin. *Nat Chem Biol* **4**, 337–339.
- Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao YD, Kamiya Y, Kasahara H** (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 5430–5435.
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong FX, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng YF, Lim J, Zhao YD, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J** (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* **133**, 164–176.
- Won C, Shen XL, Mashiguchi K, Zheng ZY, Dai XH, Cheng YF, Kasahara H, Kamiya Y, Chory J, Zhao YD** (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 18518–18523.
- Woodward AW, Bartel B** (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* **95**, 707–735.
- Yamada M, Greenham K, Prigge MJ, Jensen PJ, Estelle M** (2009). The *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2* (*TIR2*) gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol* **151**, 168–179.
- Zazimalova E, Napier RM** (2003). Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Rep* **21**, 625–634.

Zhao YD (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 49–64.

Zhao YD (2011). Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Mol Plant* **5**, 334–338.

Zhao YD, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D, Chory J (2001). A role for flavin

monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* **291**, 306–309.

Zhao YD, Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev* **16**, 3100–3112.

Research Advances in Auxin Biosynthesis

Jiali Wang^{1,3†}, Dongcheng Liu^{3†}, Xiaoli Guo², Aimin Zhang^{3*}

¹Department of Information Engineering, Laiwu Vocational and Technology College, Laiwu 271100, China; ²College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ³State Key Laboratory of Plant Cell and Chromosome Engineering, Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract This review focuses on recent advances in the study of auxin biosynthesis. Auxins are compounds with an aromatic ring and a carboxylic acid group that play an important role in many aspects of plant growth and development. Both plants and some pathogens can produce indole-3-acetic acid (IAA), the most abundant naturally occurring auxin, to modulate plant growth. Recently, several key genes involved in IAA biosynthesis have been identified and characterized. Advances in auxin biology provide novel insights into auxin biosynthesis. Genetic and biochemical studies have revealed two major pathways: Trp-dependent and independent pathways. Intermediates produced during IAA synthesis have led to the proposal of four pathways for biosynthesis of IAA from Trp in plants: indole-3-acetaldoxime, indole-3-pyruvic acid, tryptamine, and indole-3-acetamide pathways.

Key words biosynthesis, enzyme, gene, indole-3-acetic acid

Wang JL, Liu DC, Guo XL, Zhang AM (2012). Research advances in auxin biosynthesis. *Chin Bull Bot* **47**, 292–301.

† These authors contributed equally in this paper.

* Author for correspondence. E-mail: amzhang@genetics.ac.cn