

梨贝壳杉烯酸氧化酶基因 *PcKAO1* 的克隆与表达分析

欧春青, 姜淑苓*, 王 斐, 王志刚, 马 力, 李连文

(中国农业科学院果树研究所, 农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁兴城 125100)

摘 要: 以梨矮化砧木‘中矮 1 号’新梢叶片为试材, 根据苹果基因组中相关序列信息设计特异引物, 通过 RT-PCR 的方法克隆了梨赤霉素合成过程中关键酶——贝壳杉烯酸氧化酶 (KAO) 基因的编码框全长序列。该序列全长 1 568 bp, 开放阅读框 (ORF) 编码 503 个氨基酸, 相对分子量为 57.59 kD, 等电点为 9.47, 氨基酸序列与其它物种已知的 KAO 序列具有 53.14% ~ 98.61% 的相似性, 且具有细胞色素 P450 家族蛋白典型的功能结构域和跨膜结构域, 将该基因命名为 *PcKAO1*, GenBank 登录号为 KC153027.1。用同样的方法克隆了对照梨品种‘早酥’ (乔化) 和‘锦香’ (半矮化) 的 *PcKAO1* 基因, 通过比对分析发现 3 个品种的 *PcKAO1* 基因间仅有个别碱基差异, 其编码的蛋白序列完全一致。RT-PCR 半定量分析表明: *PcKAO1* 基因在‘中矮 1 号’各个检测的器官组织中均有表达, 其中以种子和子房中的表达量最高; 在 3 个品种的新梢叶片中, 除新梢生长初期 (5 月 10 日) 之外, 其他时期矮化砧木‘中矮 1 号’均低于乔化和半矮化的对照品种‘早酥’和‘锦香’, 而在这些时期‘中矮 1 号’新梢生长逐渐减缓乃至停长。

关键词: 梨; 贝壳杉烯酸氧化酶基因 (*KAO*); 基因表达; 矮化

中图分类号: S 661.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 05-0849-10

Cloning and Expression Analysis of *ent*-Kaurenoic Acid Oxidase Gene (*PcKAO1*) in Pear

OU Chun-qing, JIANG Shu-ling*, WANG Fei, WANG Zhi-gang, MA Li, and LI Lian-wen

(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Horticultural Crops Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

Abstract: *Ent*-kaurenoic acid oxidase (KAO) is a critical enzyme in the pathway of gibberellins biosynthesis. In this research, specific primers were designed based on sequence information of apple genome and a coding sequence of *ent*-kaurenoic acid oxidase gene was isolated from new shoot leaves of pear dwarfing inter-stock ‘Zhongai 1’ by RT-PCR method. The sequence was 1 568 bp in length with an open reading frame (ORF) encoding a protein of 503 amino acids. Molecular weight and isoelectric point of the protein was 57.59 kD and 9.47, respectively. Amino acids homology analysis indicated that the sequence shared 53.14% - 98.61% similarity with other reported KAOs, and it had the typical functional

收稿日期: 2013-01-27; **修回日期:** 2013-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101516); 农业公益性行业科研专项 (201203075-05); 中国农业科学院作物科学研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610032012006)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jshling@163.com)

regions of cytochrome P450 superfamily proteins, so named the gene as *PcKAO1*, GenBank accession number was KC153027.1. The other two *PcKAO1* genes from control pear varieties ‘Zaosu’ (tall) and ‘Jinxiang’ (semi-dwarf) also were isolated by the same method. Multiple sequence alignment showed that the *PcKAO1* sequence only had few nucleotide bases difference among three varieties, but their encoding amino acids sequences were completely consistent. Half quantitative RT-PCR results showed that *PcKAO1* gene expressed in every tested organs of ‘Zhongai 1’, and in the seeds and ovary it had the highest expression. In all the growth periods except the initial growth period (10th May) the *PcKAO1* gene expression of new shoot leaves in ‘Zhongai 1’ was lower than in control varieties tall ‘Zaosu’ and semi-dwarf ‘Jinxiang’. In these periods the new shoot growth speed of ‘Zhongai 1’ was gradually slowed and stopped growing.

Key words: pear; *ent*-kaurenoic acid oxidase gene (*KAO*); gene expression; dwarf

赤霉素 (Gibberellins, GA) 的生物合成需要多种酶的参与 (Hedden & Proebsting, 1999; 武涛等, 2005; 石琰璟 等, 2006; 谈心和马欣荣, 2008; 胡宏敏 等, 2012)。贝壳杉烯酸氧化酶 (*ent*-kaurenoic acid oxidase) 是其中一个关键酶, 它属于细胞色素 P450 (CYP450) 蛋白家族中的 CYP88A 亚家族。玉米 *dwarf3* 基因是该亚家族第一个被克隆的基因 (Winkler & Helentjaris, 1995)。Helliwell 等 (2001) 通过酵母表达等方式证明了拟南芥的 *CYP88A3*、*CYP88A4* 基因和大麦的 *grd5* 基因催化赤霉素合成途径中从贝壳杉烯酸到 GA₁₂ 的三步反应, 并将其命名为贝壳杉烯酸氧化酶 (KAO) 基因。豌豆的 *na* 基因 (Davidson et al., 2003) 也编码 CYP88A 蛋白, 也属于贝壳杉烯酸氧化酶。此外, 通过数据库检索, 在板栗、毛果杨、南瓜、豌豆、向日葵、水稻、小麦等作物上也有贝壳杉烯酸氧化酶基因序列全长的获得。但在梨上还没有该基因的报道。

‘中矮 1 号’梨是中国农业科学院果树研究所选育的优良梨矮化砧木, 其本身树体紧凑矮化, 16 年生树高仅 190 cm (姜淑苓 等, 2000), 其矮化机理尚不十分清楚。前期研究表明, ‘中矮 1 号’新梢叶片中赤霉素含量显著低于乔化品种 (陈长兰, 1996)。对大麦 *grd5* (Winkler & Helentjaris, 1995)、玉米 *dwarf3* (Helliwell et al., 2001)、豌豆 *na* (Davidson et al., 2003)、向日葵 *dw2* (Fambrini et al., 2011) 等赤霉素反应型矮化突变体的研究表明, 突变体植株矮化的主要原因是由于贝壳杉烯酸氧化酶基因不同程度突变造成赤霉素合成量减少而引起的。因此, 获取矮化梨 ‘中矮 1 号’赤霉素合成途径关键酶——贝壳杉烯酸氧化酶基因的序列及其表达信息对研究其自身的矮化机理具有重要意义, 并为梨矮化育种奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

梨矮化砧木 ‘中矮 1 号’ (*Pyrus communis* L.) 及其对照品种 ‘锦香’ (*Pyrus communis* L., ‘中矮 1 号’的母本, 半矮化) 和 ‘早酥’ (*Pyrus bretschneideri* Rehd., 乔化) 均定植于中国农业科学院果树研究所梨试验园, 树龄 20 年以上, 基础均为杜梨 (*Pyrus betulifolia* Bge.)。

2011 年, 分别于萌芽期 (4 月 25 日)、新梢生长初期 (5 月 10 日)、中期 (5 月 27 日和 6 月 13 日) 和后期 (7 月 8 日) 摘取上述 3 个品种树体不同方位新梢顶端未展开嫩叶, 于各采样时期观察各品种新梢生长状态并拍照记录; 于花期 (5 月 3 日) 采集 ‘中矮 1 号’ 刚刚开放的花朵及新梢生长点, 并将花瓣、花药、萼片和子房分离; 于新梢生长中期 (6 月 13 日) 取 ‘中矮 1 号’ 1 年生枝

条, 剥取其韧皮部, 剪碎; 于果实接近成熟期(8月7日)取‘中矮1号’果实, 剥取其种子, 去种皮。上述材料取样处理后均包于锡箔纸中, 经液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱中待用。

Plantol 高效总 RNA 提取试剂盒为深圳莱伯克生物科技有限公司生产, DNase I、Prime ScriptTM RT reagent Kit、*Ex Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker、克隆载体 pMD19-T 等为大连宝生物科技有限公司生产, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DH5 α 感受态细胞购于天根生化科技有限公司, 其它试剂均为分析纯, 引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及逆转录反应

各供试材料总 RNA 均用 Plantol 高效总 RNA 提取试剂盒提取, 如有 DNA 污染, 使用 DNase I 去除, RNA 反转录使用 Prime ScriptTM RT reagent Kit 进行, 操作均按各试剂的使用说明书进行。

1.2.2 ‘中矮1号’ KAO 基因编码序列全长扩增

以 GenBank 核酸数据库中板栗 KAO 基因序列(HQ658173.1)为基序到苹果基因组中 BLAST (<http://genomics.research.iasma.it/blast/blast.html>), 检索获取与其匹配性最好的苹果基因组中预测的苹果 KAO 基因的 ORF 序列(MDP0000326359), 并根据基因编号检索其在苹果基因组上的位置, 获取其对应的 DNA 序列信息(MDC012762.455), 在 ORF 外侧贴近起始和终止密码子处设计一对特异引物 KAOF 5'-AGTGAATAGTGAGTCATCACAAAGC-3'和 KAOR 5'-CTCTTGTTCTCTCAATGCTCTCAT-3', 采用 RT-PCR 方法, 扩增‘中矮1号’ KAO 基因编码序列全长。反应体系为 25 μL , 含有 *Ex Taq* DNA 聚合酶 1.25 U, Mg^{2+} (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 dNTP (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 2 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , 反转录产物 1 μL , 用水补足体系至 25 μL 。PCR 扩增程序: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶检测后, 切胶回收目的片段, 与 pMD19-T 克隆载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选挑取阳性克隆, PCR 鉴定后测序, 测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.2.3 生物信息学分析

将验证正确的梨 KAO 基因的核苷酸序列用 DNAMAN (Version 5.2.2) 软件预测其蛋白的分子量、等电点, 并对氨基酸序列进行比对分析; 运用 MEGA (version 5.0) 软件构建氨基酸序列系统进化树; 采用 InterPro(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)在线软件预测蛋白质的功能结构域; 用 TMHMM Server v.2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜结构域预测; 用 YLoc (<http://www.abi.informatik.uni-tuebingen.de/Services/YLoc>) 软件进行亚细胞定位预测, 用 SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行蛋白质信号肽序列分析。

1.2.4 不同梨品种 KAO 基因的克隆及比较分析

采用同样的引物和试验方法克隆另两个品种‘锦香’和‘早酥’的 KAO 基因序列, 用 DNAMAN 软件比对 3 个品种 KAO 基因在核酸和蛋白水平的差异。

1.2.5 梨 KAO 基因的表达分析

根据所得的全长 cDNA 序列设计一对 RT-PCR 半定量引物 F: 5'-GTTTGGTTCAGGAGCATTC ACTA-3'和 R: 5'-CGGATTAGTGCGTTCCATCTTAT-3'进行表达分析, 扩增片段长度为 216 bp。以 β -actin 基因为内参, 扩增引物为 F: 5'-AAAGACCTATATGGAAACATCGTGC-3'和 R: 5'-TGACTCG TCATACTCACCCCTTGG-3', 扩增片段长度为 225 bp。经优化后的反应体系为 25 μL , 含有 *Ex Taq* DNA 聚合酶 1.25 U, Mg^{2+} (25 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 dNTP (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 2 μL , 上、下游引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 1 μL , *PcKAOI* 基因和 β -actin 基因 cDNA 用量相等, 且尽可能使各材料 β -actin 基因扩增条带的亮度保持一致, 最后用水补足体系至 25 μL 。反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, (*PcKAOI* 56°C ;

β -actin 58 °C) 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 4% 琼脂糖凝胶电泳检测。用 Gel-Pro Analyzer 软件对电泳结果进行相对定量分析, 相对表达量以 KAO 基因条带的 OD 值与 β -actin 基因条带的 OD 值的比值表示。2 次重复, 用 DPS 7.05 软件对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 ‘中矮 1 号’ KAO 基因 cDNA 全长序列获得

以‘中矮 1 号’幼嫩叶片 cDNA 为模板, 用设计的特异引物经 PCR 扩增后, 获得了一条 1 600 bp 左右的片段。片段经回收测序, 确定其全长为 1 568 bp。经比对分析, 该序列与苹果预测的 KAO 基因序列 (MDP0000326359) 对应的同等长度序列的相似性达 98.72%, 与板栗 (HQ658173.1) 对应的同长度序列的相似性为 74.38%。

2.2 ‘中矮 1 号’ KAO 基因推导的氨基酸序列同源性及系统进化分析

分析所获得的 cDNA 全长序列, 其编码区位于 37 ~ 1 548 bp 之间, 长 1 512 bp, 推导获得一个由 503 个氨基酸组成的蛋白序列。用 DNAMAN 软件预测其蛋白质分子量为 57.59 kD, 等电点为 9.47。序列比对分析结果表明, 该基因编码的氨基酸序列与苹果、板栗等其它物种 KAO 基因编码的氨基酸序列的相似性在 53.14% ~ 98.61% 之间。以 14 个物种的 17 条氨基酸序列用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树 (图 1), 结果表明: KAO 在单、双子叶植物中的进化分离明显, 梨 KAO 与共属蔷薇科的苹果的亲缘关系最近, 板栗次之, 与小麦等单子叶植物亲缘关系最远, 与植物学分类相符。由此将克隆出的 cDNA 序列命名为 *PcKAO1*, GenBank 登录号为 KC153027.1。

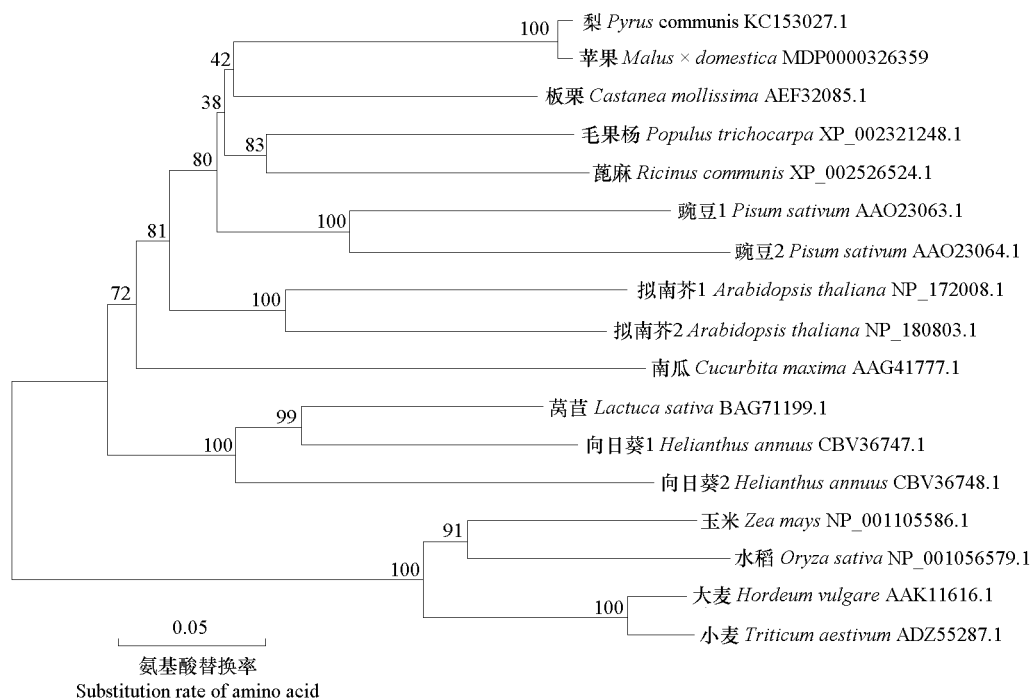


图 1 ‘中矮 1 号’梨 KAO 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列的系统进化树

节点上的数字表示 bootstrap 检验后置信度值 (%); 拉丁学名后面的代码为 GenBank 登录号。

Fig. 1 Phylogenetic tree of KAO from various species including ‘Zhongai 1’ pear

Numbers at nodes represent the bootstrap support values (%); The codes followed Latin name represent accession numbers of GenBank.

2.3 PcKAO1 结构域及亚细胞定位的生物信息学分析

用 InterPro 对 PcKAO1 序列进行在线分析, 表明其属于 CYP450 蛋白家族, 其氨基端序列的保守性较差, 在靠近羧基端的第 309~326 位、366~377 位、438~458 位氨基酸处存在 3 个保守结构域。

如图 2 所示, 这 3 个结构域与 Kalb 和 Loper (1988) 所定义的 CYP450 蛋白所共有的 A、B 和 D 结构域相对应。PcKAO1 的 A 结构域存在 AGHESSGH 序列, 在供试的 14 个物种中完全保守。研究表明其可能与底物和氧分子结合有关 (Poulos et al., 1985; Choe et al., 1998)。PcKAO1 的 B 结

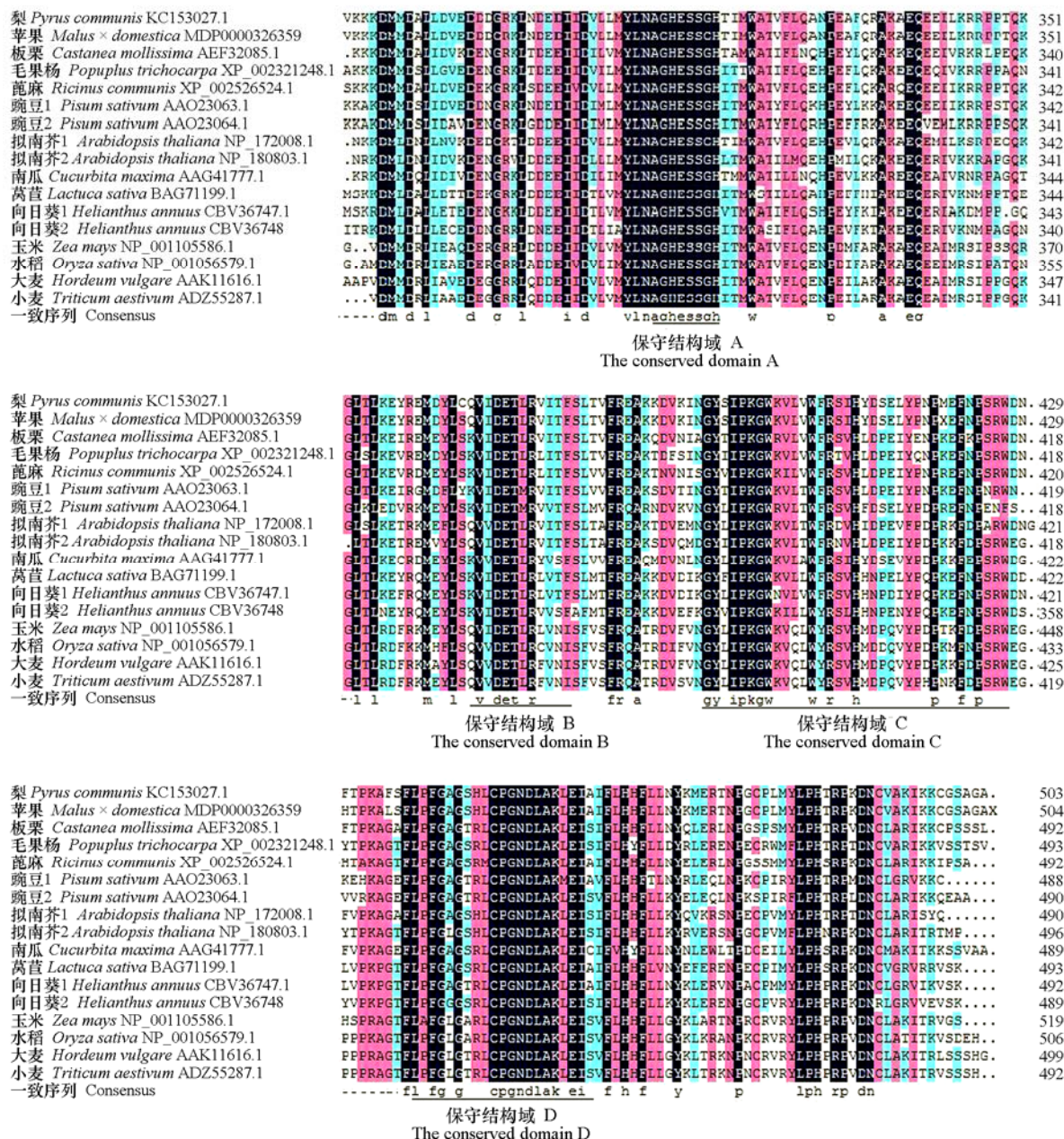


图 2 不同物种 KAO 羧基端序列的多重比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of the carboxyl-terminal protein of various KAOs

构域中存在高保守的 ETxR 序列, 为 ERR 三联体中的 ExxR 部分。研究表明 ERR 三联体具有定位血红素口袋的作用 (Hasemann et al., 1995)。PcKAO1 的 D 结构域含有高度保守的 FGxGxxxCPG 序列。其是 CYP450 蛋白的典型结构域, 为血红素结合区, 由半胱氨酸 (C) 将硫化轴配体提供给血红素铁 (Fambrini et al., 2011)。PcKAO1 的第 393 ~ 427 位氨基酸序列则与 Kalb 和 Loper (1988) 所定义的 C 结构域相对应。其含有高度保守的 GYxIPKG 基序 (Winkler & Helentjaris, 1995) 和 PxR 基序, 其中 PxR 中含有 ERR 三联体中的第 3 个 R (Hasemann et al., 1995)。

研究表明多数植物 CYP450 是内质网结合蛋白, 氨基端有一疏水性螺旋将其锚定在内质网膜上并将其余大部分蛋白定位于内质网膜外胞质中 (李节法 等, 2010), 用 YLoc 在线软件对 PcKAO1 进行亚细胞定位预测, 发现其有 94.69% 的几率定位于叶绿体, 而非内质网; 用 TMHMM 程序对 PcKAO1 进行跨膜结构域预测, 发现其距氨基端 1 ~ 11 位氨基酸位于膜内, 12 ~ 34 位氨基酸位于跨膜螺旋区, 35 ~ 503 位氨基酸位于膜外, 推测其可能是通过将氨基端锚定在叶绿体上, 将羧基端功能区域释放到细胞质中而起作用的。用 SignalP 在线软件进行信号肽分析, 结果表明 PcKAO1 不含信号肽。

2.4 不同梨品种 *PcKAO1* 基因的克隆及比较分析

利用上述同样的方法克隆到了‘锦香’和‘早酥’两个品种的 *PcKAO1* 基因序列, 并推导出其各自编码的蛋白质序列。经比对分析发现, 3 个品种 *PcKAO1* 基因的 cDNA 序列长度相等, 品种间仅个别碱基存在差异, 但其氨基酸序列完全一致, 表明在蛋白质水平上基因的功能没有任何差异。

2.5 *PcKAO1* 基因的 RT-PCR 半定量分析

提取‘中矮 1 号’、‘锦香’和‘早酥’3 个品种新梢不同生长期新梢嫩叶以及‘中矮 1 号’花器官、新梢生长点、韧皮部和种子等组织的总 RNA, 经检测其 A_{260}/A_{280} 值在 1.8 ~ 2.0 之间, 符合下一步试验要求。

RT-PCR 半定量分析结果表明: 从‘中矮 1 号’的各个器官组织中 (图 3, A) 和 3 个品种不同时期的叶片中 (图 4) 都能扩增到与引物设计预期大小相同的 *PcKAO1* 和 β -actin 基因片段, 表明 *PcKAO1* 基因均有表达。

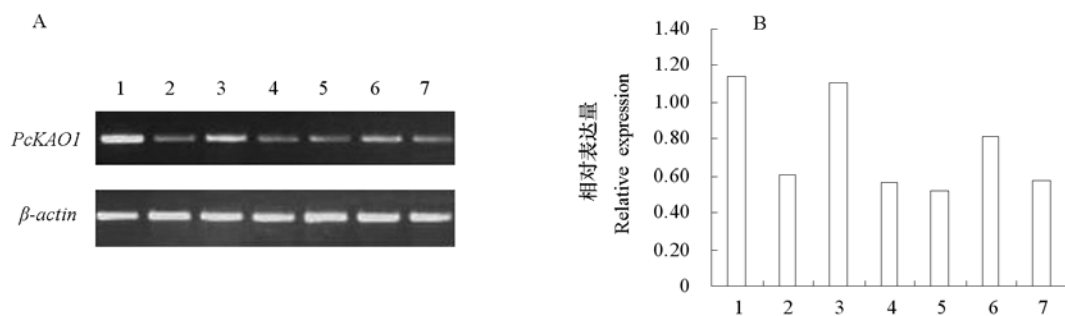


图 3 ‘中矮 1 号’不同器官组织中 *PcKAO1* 基因的相对表达

1. 种子; 2. 韧皮部; 3. 子房; 4. 新梢生长点; 5. 花瓣; 6. 萼片; 7. 花药。

Fig. 3 Relative expression of *PcKAO1* gene in different organic tissues from ‘Zhongai 1’ pear

1. Seeds; 2. Phloem; 3. Ovary; 4. Shoot tips; 5. Petals; 6. Sepals; 7. Anthers.

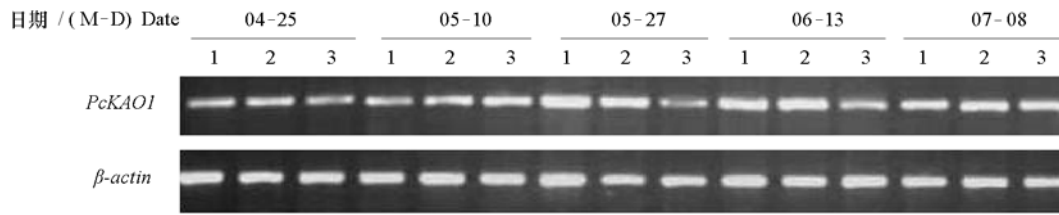


图 4 3 个梨品种不同时期新梢叶片中 *PcKAOI* 基因的 RT-PCR

1. 早酥; 2. 锦香; 3. 中矮 1 号。

Fig. 4 RT-PCR of *PcKAOI* gene in new shoot leaves from three pear varieties in different periods

1. Zaosu; 2. Jinxiang; 3. Zhongai 1.

用 Gel-Pro Analyzer 软件对 RT-PCR 电泳条带进行数值转换, 为减小误差, 以 *PcKAOI* 与 β -actin 条带 OD 的比值来表示 *PcKAOI* 基因的相对表达量。结果表明: *PcKAOI* 基因在‘中矮 1 号’种子和子房中的表达量最高, 接近表达量最低的花瓣的 2 倍, 这可能与赤霉素在种子及胚珠中合成比较旺盛有关 (图 3, B); *PcKAOI* 基因在‘早酥’和‘锦香’新梢叶片中的表达各时期变化不大, 在 β -actin 基因表达量的 0.68~1.02 倍之间, 在‘中矮 1 号’新梢叶片中的表达除在新梢生长初期 (5 月 10 日) 略高于‘锦香’显著高于‘早酥’外, 其他时期均低于‘早酥’和‘锦香’, 且在 5 月 27 日均达显著水平 (图 5)。

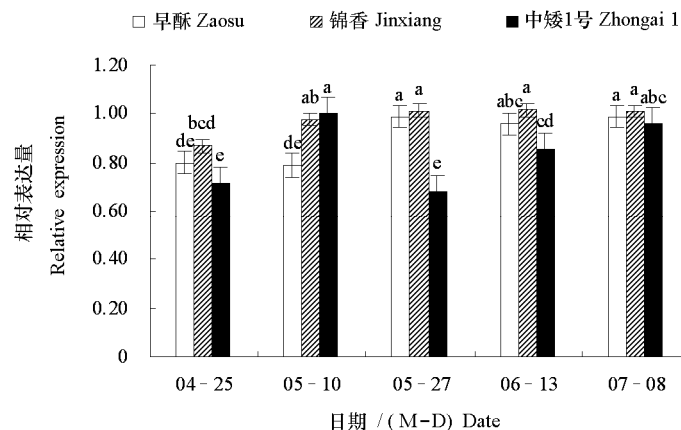


图 5 3 个梨品种不同时期新梢叶片中 *PcKAOI* 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *PcKAOI* gene in shoot leaves from three pear varieties in different periods

2.6 梨新梢生长情况与 *PCKAOI* 基因表达关系分析

通过观察 3 个品种新梢在各时期的生长状态, 发现 3 个品种新梢生长初期长度接近, 而自 5 月下旬开始矮化品种‘中矮 1 号’的新梢生长逐渐减缓并在 6 月中下旬左右停止生长, 另 2 个品种依然继续生长 (图 6)。相对应的在‘中矮 1 号’新梢生长减缓直至停长的时期内其 *PcKAOI* 基因表达量均低于乔化和半矮化的对照品种‘早酥’和‘锦香’, 推测其可能限制了新梢叶片中赤霉素的合成进而致使新梢生长量减少并导致了植株矮化。

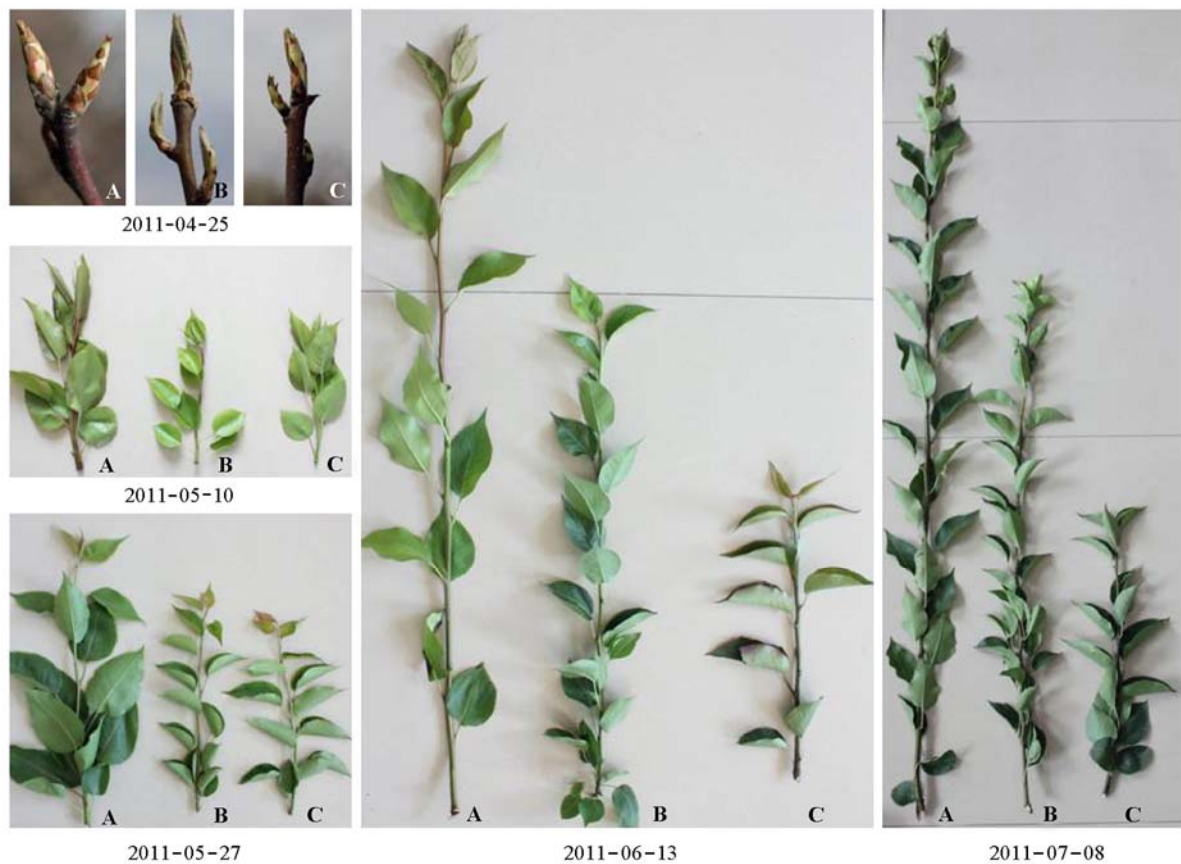


图 6 3 个梨品种不同时期新梢生长状态比较

A: 早酥; B: 锦香; C: 中矮 1 号。

Fig. 6 Comparison of new shoot growth status from three varieties in different periods

A: Zaosu; B: Jinxiang; C: Zhongai 1.

3 讨论

贝壳杉烯酸氧化酶隶属于 CYP450 蛋白家族中的 CYP88A 亚家族, 研究证明其能催化赤霉素合成途径中从贝壳杉烯酸到 GA_{12} 的三步反应, 虽然在玉米、豌豆、拟南芥等植物上已有该基因的研究 (Winkler & Helentjaris, 1995; Helliwell et al., 2001; Davidson et al., 2003), 但果树上仅在板栗上有该基因序列的报道。本试验中所克隆的 *PcKAOI* 基因是梨树上获得的第 1 个 KAO 基因, 其是通过同源查找苹果基因组中预测的苹果的 KAO 基因序列, 并根据该序列编码框前后的序列设计特异引物而克隆到的, 其 mRNA 序列及推导的氨基酸序列与苹果预测序列的相似性均在 98% 以上, 可见梨与苹果基因序列的相似性之高, 这也说明了在未获得梨基因组数据之前利用苹果基因组中的同源序列信息克隆梨树中的同源基因在某种程度上是可行的, 较之 RACE 方法要经济、快速得多。本试验中克隆到的基因除了与苹果预测基因相似性较高外, 其氨基酸序列与板栗的相似性也高达 73.96%, 与其他物种的 KAO 序列的相似性也都在 50% 以上, 且与之具有相同的保守结构域, 证实了该基因准确性。

本研究中所用试材‘中矮 1 号’是中国农业科学院果树研究所选育的梨优良矮化砧木, 其本身树体紧凑矮化。为研究其矮化机理, 本实验室多年来从生理、生化和解剖学等方面开展了大量工作

(陈长兰, 1996; 姜淑苓 等, 2010), 发现其新梢叶片中赤霉素含量显著低于乔化品种, 并从赤霉素的合成角度对其矮化机理进行了研究(程飞飞 等, 2011)。本试验中通过对‘中矮 1 号’赤霉素合成过程中的关键酶 KAO 基因的克隆和表达分析, 发现 KAO 基因在‘中矮 1 号’的新梢生长减缓至停止生长的时期内新梢叶片中的表达量低于其母本‘锦香’和乔化对照品种‘早酥’, 推测其可能会限制新梢叶片中赤霉素的合成使新梢生长量减少而使植株矮化。在拟南芥(Davidson et al., 2003)、豌豆(Helliwell et al., 2001)等其他物种上都有关于 KAO 基因突变造成植株矮化现象的报道, 但没有关于 KAO 基因表达量对株形影响的研究, 而在赤霉素合成过程中的另一个关键酶基因 GA20-氧化酶上有过关于基因沉默而导致植株矮化的报道(谈心 等, 2008)。本试验中克隆的 KAO 基因虽然在核酸水平上具有品种间差异, 但在蛋白水平上完全一致, 可见‘中矮 1 号’的矮化并非由基因结构变异引起。本实验室前期也克隆了赤霉素合成过程中的其他几个关键酶基因, 如 KO, KS, GA20-氧化酶等, 发现 GA20-氧化酶基因在‘中矮 1 号’不同发育阶段新梢叶片中的表达均低于对照品种, 也可能与植株高矮相关, 但同样也不是由于基因结构变异引起的(宣利利 等, 2011), 这与 KAO 有类似之处, 这可能是受一些未知因素的调控。由于赤霉素的合成过程比较复杂, 且受很多因素的影响, 因此, KAO 和 GA20-氧化酶基因的低表达是否是造成‘中矮 1 号’新梢叶片中赤霉素含量低和植株矮化的主要原因, 二者之间存在什么关系, 其基因的表达受哪些因素的调控, 是如何调控的, 还有待于进一步研究。

有研究认为 KAO 基因是由单基因编码的(Sakamoto et al., 2004), 但在拟南芥(Davidson et al., 2003)、豌豆(Helliwell et al., 2001)和向日葵(Fambrini et al., 2011)中都至少发现了 2 个 KAO 基因, 且同源性较高, 多数都能在不同组织中检测到其表达, 但组织表达强度不尽相同。本试验在梨中仅克隆到 1 个 KAO 基因, 基因的组织表达强度与前人研究有相似之处, 即在含有种子和含有胚珠等赤霉素合成较为旺盛的组织中表达量较高, 间接证明了其在赤霉素合成中起着重要作用。由于梨树是多年生木本植物, 基因组较拟南芥等草本植物复杂得多, 因此, 在梨中可能还有其他同源性较高的 KAO 基因的存在, 这还需要进一步的研究。

References

- Chen Chang-lan. 1996. Study on the biological characteristics and dwarfing mechanism of dwarf types of pears [Ph. D. Dissertation]. Shenyang: Shenyang Agricultural University. (in Chinese)
- 陈长兰. 1996. 梨树矮型的生物学特性及其致矮机理的研究[博士论文]. 沈阳: 沈阳农业大学.
- Cheng Fei-fei, Ou Chun-qing, Jiang Shu-ling, Wang Fei, Ma Li, Li Lian-wen. 2011. Cloning and expression analysis of ent-kaurene synthase gene in pear. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 42 (6): 677 - 682. (in Chinese)
- 程飞飞, 欧春青, 姜淑苓, 王 斐, 马 力, 李连文. 2011. 梨内根一贝壳杉烯合酶基因克隆及表达分析. *沈阳农业大学学报*, 42 (6): 677 - 682.
- Choe S, Dilkes B P, Fujioka S, Takatsuto S, Sakurai A, Feldmanna K A. 1998. The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 a-hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell*, 10: 231 - 243.
- Davidson S E, Elliott R C, Helliwell C A, Poole A T, Reid J B. 2003. The pea gene NA encodes ent-kaurenoic acid oxidase. *Plant Physiology*, 131: 335 - 344.
- Fambrini M, Mariotti L, Parlanti S, Picciarelli P, Salvini M, Ceccarelli N, Pugliesi C. 2011. The extreme dwarf phenotype of the GA-sensitive mutant of sunflower, dwarf2, is generated by a deletion in the *ent-kaurenoic acid oxidase1* (*HaKAO1*) gene sequence. *Plant Mol Biol*, 75: 431 - 450.
- Hasemann C A, Kurumbail R G, Boddupalli S S, Peterson J A, Deisenhofer J. 1995. Structure and function of cytochrome-P450: A comparative analysis of 3 crystal structures. *Structure*, 3: 41 - 62.
- Hedden P, Proebsting W M. 1999. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol*, 119: 365 - 370.

- Helliwell C A, Chandler P M, Poole A, Dennis E S, Peacock W J. 2001. The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellins biosynthesis pathway. *PNAS*, 98 (4): 2065 – 2070.
- Hu Hong-min, Jiang Fang-ling, Cao Xue, Wu Zhen, Wang Guang-long. 2012. Cloning and expression analysis of ent-kaurene oxidase gene *CKO* in cucumber. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (6): 1131 – 1140. (in Chinese)
- 胡宏敏, 蒋芳玲, 曹 雪, 吴 震, 王广龙. 2012. 黄瓜贝壳杉烯氧化酶基因 *CKO* 的克隆及其表达分析. 园艺学报, 39 (6): 1131 – 1140.
- Jiang Shu-ling, Chen Chang-lan, Wang Fei, Ou Chun-qing, Wang Xi-cheng, Jia Jing-xian, Ma Li. 2010. Study on the changes of anatomical structure and endogenous hormones in the pear of compact types. *Journal of Fruit Science*, 27 (2): 203 – 206. (in Chinese)
- 姜淑苓, 陈长兰, 王 斐, 欧春青, 王西成, 贾敬贤, 马 力. 2010. 紧凑型梨解剖结构及内源激素变化. 果树学报, 27 (2): 203 – 206.
- Jiang Shu-ling, Jia Jing-xian, Ji Bao-sheng, Ma Li. 2000. A dwarf rootstock of pear ‘Zhongai 1’. *China Fruits*, (3): 1 – 3. (in Chinese)
- 姜淑苓, 贾敬贤, 纪宝生, 马 力. 2000. 梨矮化砧木——‘中矮 1 号’. 中国果树, (3): 1 – 3.
- Kalb V F, Loper J C. 1988. Proteins from eight eukaryotic cytochrome P-450 families share a segmented region of sequence similarity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 7221 – 7225.
- Li Jie-fa, Tian Yi-ke, Wang Cai-hong, Tian Wei, Song Wei, Yin Hao. 2010. Bioinformatics analysis of *ent*-kaurene oxidase gene *PpKO* in pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (10): 1575 – 1582. (in Chinese)
- 李节法, 田义轲, 王彩虹, 田 伟, 宋 伟, 殷 豪. 2010. 梨贝壳杉烯氧化酶基因 *PpKO* 的克隆及生物信息学分析. 园艺学报, 37 (10): 1575 – 1582.
- Poulos T L, Finzel B C, Gunzalus I C, Wagner G C, Kraut J. 1985. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *J Biol Chem*, 260: 16122 – 16130.
- Sakamoto T, Miura K, Itoh H, Tatsumi T, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Agrawal G K, Takeda S, Abe K, Miyao A, Hirochika H, Kitano H, Ashikari M, Matsuoka M. 2004. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiol*, 134: 1642 – 1653.
- Shi Yan-jing, Sun Zhong-xu, Shu Huai-rui. 2006. Cloning of two different ent-kaurene oxidase (STGA3) sequence in strawberry. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (1): 128 – 129. (in Chinese)
- 石琰璟, 孙仲序, 束怀瑞. 2006. 草莓中贝壳杉烯氧化酶基因 (STGA3) 中两个不同编码序列的克隆. 园艺学报, 33 (1): 128 – 129.
- Tan Xin, Ma Xin-rong. 2008. Advance in research of gibberellin biosynthesis pathway. *Chin J Appl Environ Bio*, 14 (4): 571 – 577. (in Chinese)
- 谈 心, 马欣荣. 2008. 赤霉素生物合成途径及其相关研究进展. 应用与环境生物学报, 14 (4): 571 – 577.
- Tan Xin, Yang Hong, Qiao Ding-jun, Ma Xin-rong. 2008. Construction of siRNA plant expression vector interfered with GA 20-oxidase and production of dwarf tobacco. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 14 (1): 48 – 52. (in Chinese)
- 谈 心, 杨 宏, 乔定君, 马欣荣. 2008. 干扰烟草 GA20 – 氧化酶 siRNA 植物表达载体的构建及矮化烟草的产生. 应用与环境生物学报, 14 (1): 48 – 52.
- Winkler R G, Helentjaris T. 1995. The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7: 1307 – 1317.
- Wu Tao, Cao Jia-Shu, Yu Hui-Fang. 2005. The cloning of gibberellin metabolism enzyme genes and their related dwarf mutants. *Chinese Journal of Cell Biology*, 27: 157 – 164. (in Chinese)
- 武 涛, 曹家树, 虞慧芳. 2005. 赤霉素合成基因的克隆以及其相关矮化突变体. 细胞生物学杂志, 27: 157 – 164.
- Xuan Li-li, Ou Chun-qing, Wang fei, Wang Zhi-gang, Cheng Fei-fei, Li Zhen-ru, Jiang Shu-ling. 2011. Isolation and expression analysis of gibberellin 20-oxidase gene from pear dwarfing ‘Zhongai 1’. *Journal of Fruit Science*, 28 (5): 883 – 887. (in Chinese)
- 宣利利, 欧春青, 王 斐, 王志刚, 程飞飞, 李振茹, 姜淑苓. 2011. 梨矮化砧木 ‘中矮 1 号’ GA20 – 氧化酶基因克隆与表达分析. 果树学报, 28 (5): 883 – 887.