

苹果 *MdGA20ox1* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析

姜志昂, 孙建设*, 彭建营*, 邵建柱

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071000)

摘要: 以苹果砧木 SH40 [*Malus × domestica*) × *M. honanensis*] 为试材, 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术从 SH40 茎尖中克隆得到一个赤霉素合成关键酶基因 (GA20-氧化酶基因), 命名为 *MdGA20ox1*, 其 cDNA 全长 1 579 bp, 编码 392 个氨基酸。该基因在 GenBank 登录号为 KC493633。氨基酸序列同源性分析表明: *MdGA20ox1* 与玉米、拟南芥、梨等植物 GA20ox 具有 55.9% ~ 96.7% 的相似性。洋葱表皮细胞瞬时表达显示, *MdGA20ox1* 蛋白定位于细胞核与细胞质膜。植株生长量测定和相对定量表达结果表明, *MdGA20ox1* 基因在砧木 SH28、SH40 和 M26 自根苗的表达呈先下降再上升然后下降的趋势, 这与其生长动态基本一致。嘎啦/SH28 的植株生长量和 *MdGA20ox1* 表达量最高, 嘎啦/M26 次之, 嘎啦/SH40 最低, 初步表明该基因的表达有与苹果植株矮化程度呈负相关的趋势。*MdGA20ox1* 在嘎啦/SH40 和嘎啦/SH28 不同组织中的表达模式一致, 且半矮化类型砧木 SH28 嫁接 ‘嘎啦’, 其茎尖、幼叶、成熟叶和枝皮中的表达量均高于矮化类型 SH40 嫁接 ‘嘎啦’。

关键词: 苹果; 砧木; *MdGA20ox1*; 克隆; 表达; 亚细胞定位

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 12-2373-09

Isolation, Subcellular Location and Expression of *MdGA20ox1* Gene from Apple

JIANG Zhi-ang, SUN Jian-she*, PENG Jian-ying*, and SHAO Jian-zhu

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: GA20-oxidase is a critical enzyme in the pathway of gibberellins biosynthesis. In this research, a *GA20-oxidase* gene in *Malus*, designated as *MdGA20ox1* (GenBank accession number: KC493633), was isolated from the apical tissue of apple rootstock SH40 [*Malus × domestica*) × *M. honanensis*] by RT-PCR and RACE method. The length of full cDNA was 1 579 bp, containing a complete open reading frame that encoding 392 amino acids. Amino acid sequence analysis revealed that the sequence of *MdGA20ox1* had 55.9% – 96.7% identities with the sequence of GA20ox from plants such as *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Pyrus communis* and so on. Subcellular localization showed that the *MdGA20ox1* protein was located in the nucleus and the plasma membrane. The expression of *MdGA20ox1* in SH28, SH40 and M26 showed a trend of decline-rise-decline, which were corresponded with the

收稿日期: 2013-08-06; 修回日期: 2013-11-26

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-28)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jiansheapple@163.com; pjy@hebau.edu.cn)

growing periods of their own-rooted seedlings. The expression of *MdGA20ox1* and growth increment of SH28 grafted cultivar ‘Gala’ were the highest of them, M26 grafted cultivar ‘Gala’ were higher than the SH40 grafted cultivar ‘Gala’. And the expression intensity of the *MdGA20ox1* gene was negatively associated to the dwarfing degree of the different rootstocks. The trend of expression of *MdGA20ox1* gene was the same in SH40 and SH28 grafted cultivar ‘Gala’. The expression of *MdGA20ox1* gene in the apical tissue, young leaf, leaf and branch bark of semi-dwarf type SH28 grafted cultivar ‘Gala’ were higher than dwarf type SH40 grafted cultivar ‘Gala’.

Key words: apple; rootstock; *MdGA20ox1*; cloning; expression; subcellular location

赤霉素 (GAs) 影响植物整个生命周期中的生长和发育过程, 主要包括促进种子发芽、叶片扩展、嫩芽和茎的伸长、毛状体发育等过程 (李节法 等, 2010; 田伟 等, 2011)。其中对果树树体大小调控是目前国内外的研究热点。

在植物中, GAs 生物合成过程中的关键酶主要包括柯巴焦磷酸合酶 (CPS)、内根—贝壳杉烯合成酶 (KS)、内根—贝壳杉烯氧化酶 (KO)、GA20-氧化酶 (GA20ox)、GA-3 β -羟基化酶 (GA-3 β -hydroxylase) 等。其中 GA20ox 是重要的活性 GAs 生物合成调控酶, 属于可溶性的双加氧酶, 它能在 GAs 生物合成的最后阶段催化从 GA12 到 GA9 及 GA53 到 GA20 一系列的氧化反应, 经连续氧化失去 CO₂ 的过程, 最后形成具有生物活性的 GA4 和 GA1。GA20ox 功能缺失的突变体具半矮生的表型 (Wolfgang & Ross, 2001; Wolfgang et al., 2004); 而过量表达的 GA20ox 能导致赤霉素的过量合成和明显加快植株生长 (Huang et al., 1998; Coles et al., 1999)。

目前, 编码 GA20ox 的基因在拟南芥、马铃薯、水稻、南瓜、向日葵、玉米、棉花、香石竹、板栗、小叶杨中相继被克隆, Kusaba 等 (2001) 从苹果基因组中克隆了一个苹果 GA20ox 基因, 研究了该基因在不同组织中的表达情况, 并指出该基因属于一个多基因家族。

SH 系苹果砧木是中国选育的使接穗品种开花结果早、抗逆性强、具有优良矮化特性的砧木系列, 也是当前中国生产推广的重要类型。本试验中以该砧木系列中 SH40 [*Malus × domestica*) × *M. honanensis*] 为试材, 通过 RT-PCR 及 RACE 的方法克隆得到了一个 GA20ox 基因 cDNA 全长, 并且研究了其序列特征、亚细胞定位以及不同砧木在不同生长时期和组织上该基因的表达情况, 以期利用转基因技术调控树形奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2 年生 SH40、SH28 和 M26 自根苗定植于河北农业大学何家营果树实验站, 于 2012 年 4 月 20 日部分自根苗嫁接 ‘嘎啦’。2012 年 6 月 1 日至 9 月 7 日每隔 10 d 取 SH40、SH28 和 M26 自根苗及 ‘嘎啦’ 快速生长的茎尖组织。

以 5 年生苹果矮化砧木 SH40、SH28 嫁接 ‘嘎啦’ 为试验材料, 样品取自河北农业大学标本园, 分别于 2013 年 4 月 20 日取 ‘嘎啦’ 的茎尖、幼叶、成熟叶、花蕾、花、枝皮, 在 5 月 12 日取 ‘嘎啦’ 幼果。

上述样品取后均立即放入盛有液氮的冰壶中带回实验室, 置入超低温冰箱保存备用。

1.2 *MdGA20ox1* 基因 cDNA 全长序列克隆

采用 Trizol 试剂 (购自 TaKaRa 公司) 提取苹果砧木 SH40 总 RNA。3' RACE cDNA 第一链合

成参照 TaKaRa RNA Kit (AMV3.0) 使用说明进行操作; 5' RACE cDNA 第一链合成参照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 使用说明进行操作。根据 GenBank 已注册的其它植物 *GA20ox* 基因序列设计简并引物, 并由上海生工生物工程有限公司合成。以提取的总 RNA 反转录获得的 cDNA 第一条链为模板, 用简并引物 A1 与 A2 (表 1) 进行中间片段的扩增。PCR 程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。以 3' RACE 反转录获得的 cDNA 第一条链为模板, 在获得中间片段的基础上设计引物 B1 和 B2 (表 1), 并与试剂盒通用引物 C1 和 C2 (表 1) 配对进行 3' cDNA 末端扩增。PCR 程序为 Outer PCR: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 20 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。Inner PCR: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。根据 *MdGA20ox1* 中间片段设计特异性引物 D1 和 D2 (表 1), 分别与试剂盒通用引物 UPM、NUP (表 1) 配对进行巢式 PCR。以 5'-RACE-Ready 反应液为模板, 以 D1 与 UPM 为引物进行反应: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 72 °C 反应 1 min, 共 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 70 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 5 个循环; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 进行 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。二次反应是将一次反应产物稀释 50× 作为模板, D2 与 NUP 为引物进行反应: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 20 个循环; 72 °C 延伸 10 min。从 2.0% 的琼脂糖凝胶中切胶回收扩增特异性片段, 经转化回收酶切后, 送样测序。

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 6.0 软件对 *MdGA20ox1* 基因的中间片段、3'末端、5'末端序列进行拼接分析; 该基因翻译的氨基酸序列利用 NCBI 的 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 与相应序列进行相似性分析。使用 Clustal 1.83 与 Mega 4.0 构建苹果砧木 SH40 与西洋梨、'富士' 苹果、辣椒、陆地棉、毛白杨、菜豆、草莓、板栗、马占相思、葡萄、香石竹、烟草、拟南芥、玉米 *GA20ox* 氨基酸序列同源进化树。用在线软件 WOLF PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) 进行亚细胞定位分析。

1.4 亚细胞定位载体的构建

根据 *MdGA20ox1* 的 ORF 设计引物 E1 与 E2 (表 1), 以 *MdGA20ox1* 基因 ORF 正确的克隆产物提取质粒, 经 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接到 pRGWF7.0-GFP 载体上, 获得 GFP/目的基因的融合表达载体。然后再转入 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 扩增和酶切筛选阳性克隆, 并对阳性克隆进行测序验证。

1.5 基因枪法转化洋葱表皮细胞

质粒 DNA 的包埋: DNA 金粉包埋按照 Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System 的方法并加以改进, 取 50 μ L (3 mg) 金粉悬液至 1.5 mL 离心管中, 边振荡边依次加入 5 μ L DNA、25 μ L CaCl_2 悬液 ($2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、20 μ L 亚精胺 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续振荡 2~3 min, 室温放置 1 min, 瞬时离心 2 s, 弃上清液。加入 140 μ L 70%乙醇洗 1 次, 再用 140 μ L 无水乙醇洗 1 次, 以 48 μ L 无水乙醇重悬金粉。

基因枪轰击受体材料: 将幼嫩的洋葱表皮摆放在 MS 高渗培养基上, 25 °C 预培养 4 h, 选用 1 100 psi 的压力膜, 将 8 μ L 金粉 DNA 悬浮液点在载物膜中央, 洋葱表皮放在轰击培养基上, 采用 PDS-1000/He 型基因枪 (Bio-Rad) 进行轰击, 轰击距离 6 cm, 真空度为 28 in · Hg。轰击后的洋葱表皮经 25 °C 暗培养 40 h 后制片, 荧光显微镜 (Olympus, BX51) 下蓝光 (480 nm) 激发观察。

1.6 荧光定量表达

分别提取 2 年生砧木 SH28、M26 和 SH40 自根苗及其嫁接品种‘嘎啦’不同时期茎尖组织以及 5 年生 SH28、SH40 嫁接品种‘嘎啦’不同组织的总 RNA，用 DNase I 酶纯化后，采用 Fermentas 试剂盒逆转录 cDNA 作为模板。根据获得的 *MdGA20ox1* 基因序列，设计引物 F1 与 F2（表 1）。以苹果中的 β -actin 基因为内参，设计内参基因特异性引物 G1 与 G2（表 1），采用荧光定量 PCR 对 *MdGA20ox1* 基因进行不同生长时期及组织的表达分析。

表 1 引物序列及用途
Table 1 Sequence of primers and application

编号 Code	序列 (5' - 3') Primer sequence	用途 Use
A1	CATGGMTTYTTYCTCRTC	中间片段扩增
A2	CATCGRCCATGTGAAATCYGG	Middle fragment amplification
B1	GGAGGCCTTGAAGTCTTTG	3' RACE
B2	CTCTTGCAITCTTCTTGTC	3' RACE
C1	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTCTACTATAGG	3' RACE
C2	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT	3' RACE
D1	CCCAGAAGTTCCATGATCCC	5' RACE
D2	CCTTTTTCGGCGGAGTAGC	5' RACE
UPM	CTAATACGACTCACTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAA	5' RACE
	CGCAGAGT	
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	5' RACE
E1	<u>AAGCTT</u> ATGGCTGTTGAGTGCATGATCAAACCCAGC	<i>MdGA20ox1</i> 基因 ORF 扩增
E2	<u>TCTAGAC</u> AGTTTTTGGTTGCTTTTCTGTTGTC	Complete ORF amplification of <i>MdGA20ox1</i> gene
F1	TTGGTAGATACTTCGAGTCCG	荧光定量 RT-PCR
F2	CAGTTTTTGGTTGCTTTTCTG	Fluorescent quantitative RT-PCR
G1	CTGAACCCAAAGGCTAATCG	荧光定量 PCR
G2	ACTGGCGTAGAGGGAAAGAA	Fluorescent quantitative RT-PCR

注：下划线部分‘AAGCTT’和‘TCTAGA’分别为添加的 *Hind* III、*Xba* I 酶切位点。
Note: Underlined position ‘AAGCTT’ and ‘TCTAGA’ in primers represent restriction enzyme sites of *Hind* III and *Xba* I , respectively.

2 结果与分析

2.1 *MdGA20ox1* 全长序列的获得

以苹果砧木 SH40 茎尖组织 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增，以 A1 与 A2 为引物，扩增产物经测序后得到 783 bp 的中间片段；以 B1/C1、B2/C2 为引物，通过 3'RACE 获得长度 571 bp 的片段；以 D1/UPM、D2/NUP 为引物，通过 5'RACE 扩增获得 5'端的 533 bp 的片段。将获得的 3 个片段通过 DNAMAN 6.0 软件进行序列拼接，获得 *MdGA20ox1* 的 cDNA 全长为 1 579 bp。*MdGA20ox1* 的全长序列包括长度为 1 179 bp 的 ORF，50 bp 的 5'非翻译区（5'UTR），339 bp 的 3'非翻译区（3'UTR）以及 11 bp 的 Poly（A）结构，终止子 TGA 后具有非常保守的 AATAAA 序列，该序列为转录终止提供信号。该基因在 GenBank 基因数据库的登录号为 KC493633。

2.2 *MdGA20ox1* 编码的氨基酸序列生物信息学分析

通过 DNAMAN 6.0 软件对 *MdGA20ox1* 编码的氨基酸序列与 GenBank 数据库中的其他物种的 *GA20ox* 编码氨基酸序列进行同源性比较，结果表明：*GA20ox* 蛋白的 N 端序列保守性较低，C 端序列相对保守。*MdGA20ox1* 与西洋梨 *GA20ox* 的同源性最高，为 96.7%；与‘富士’苹果 *GA20ox* 同

源性次之, 为 93.6%; 与草莓、葡萄、毛白杨、板栗、菜豆、陆地棉、马占相思、烟草、辣椒、香石竹、拟南芥的 GA20ox 同源性分别为 76.5%、72.7%、72.7%、70.7%、69.4%、70.5%、68.9%、68.4%、67.9%、64.2%、62.2%, 与玉米 GA20ox 同源性最低为 55.9%。

使用 MEGA 4.0 对包括苹果砧木 SH40 在内的 15 个 GA20ox 蛋白的氨基酸序列构建系统进化树 (图 1)。分析表明: *MdGA20ox1* 的进化符合植物分类学的进化规律, 并具有非常明显的种属特征, 苹果砧木 SH40 首先与西洋梨、苹果 (序列号分别为 AEF32773.1、BAB20975.1) 组成一个分支, 然后与同为蔷薇科的草莓 (序列号为 ABB00359.1) 聚在一起。板栗 (AEW67997.1)、陆地棉 (ACM68923.1)、葡萄 (ABF61825.1)、毛白杨 (AFS33171.1) 聚在一个大的分支上。拟南芥 (NP194272.1) 与菜豆 (AAC49756.1) 聚在一起, 辣椒 (ADZ96940.1) 和烟草 (BAA32156.1) 聚在一个分支上。最终与亲缘关系较远的香石竹 (ACD93464.1)、马占相思 (ABX45092.1)、玉米 (NP_001105923.1) 聚在一起。

在线软件 WOLF PSORT 分析表明: *MdGA20ox1* 蛋白位于细胞核与细胞质中。

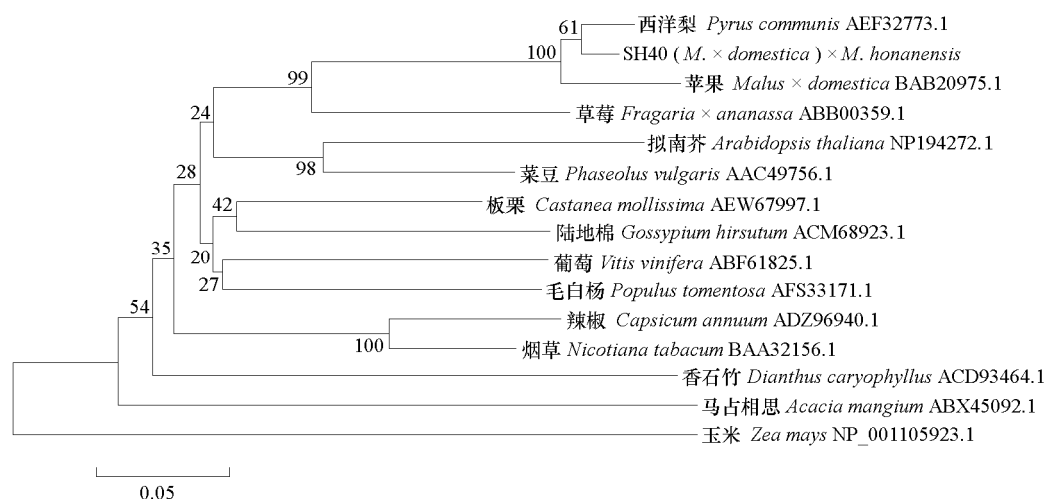


图 1 SH40 与其他物种 GA20ox 氨基酸序列的系统进化树分析

标尺代表分支长度相当于每个氨基酸残基有 0.05 个发生变化。

节点上的数值表示自展值验证中基于 1 000 次重复该节点可信度的百分比 (%)。

Fig. 1 Phylogenetic tree of GA20ox from various species including SH40

The bar represents the branch length equivalent to 0.05 amino acid changes per residue.

The number at the nodes represents the reliability percent (%) of bootstraps values based on 1 000 replications.

2.3 基因表达载体的构建及亚细胞定位

将构建的 *MdGA20ox1* 基因的瞬时表达载体 35S-*MdGA20ox1*-GFP 转化到幼嫩的洋葱表皮细胞中。借助于绿色荧光蛋白信号观察, 结果 (图 2) 显示, 不含外源基因的载体 pRGWF7.0-GFP 分布在整个细胞核和细胞质膜、也分布于液泡、内质网等结构上呈絮状荧光, 且核定位不清晰; 而转 35S-*MdGA20ox1*-GFP 载体的洋葱表皮细胞内绿色荧光仅分布在细胞核与细胞质膜上。

2.4 SH40、SH28 和 M26 自根苗及嫁接品种‘嘎啦’植株生长量、茎尖组织 *MdGA20ox1* 表达结果

从图 3, A 中可以看出, SH40、SH28 和 M26 自根苗生长量呈先下降再上升然后再下降的趋势, 且 SH28 与 SH40 生长势基本一致, M26 最弱。图 3, B 可以看到, *MdGA20ox1* 基因在 3 种自根苗不同生长期的表达也是先下降再上升然后再下降的趋势, 该基因在 7 月 15 日表达量最高, 之后维持在一个较低的水平。

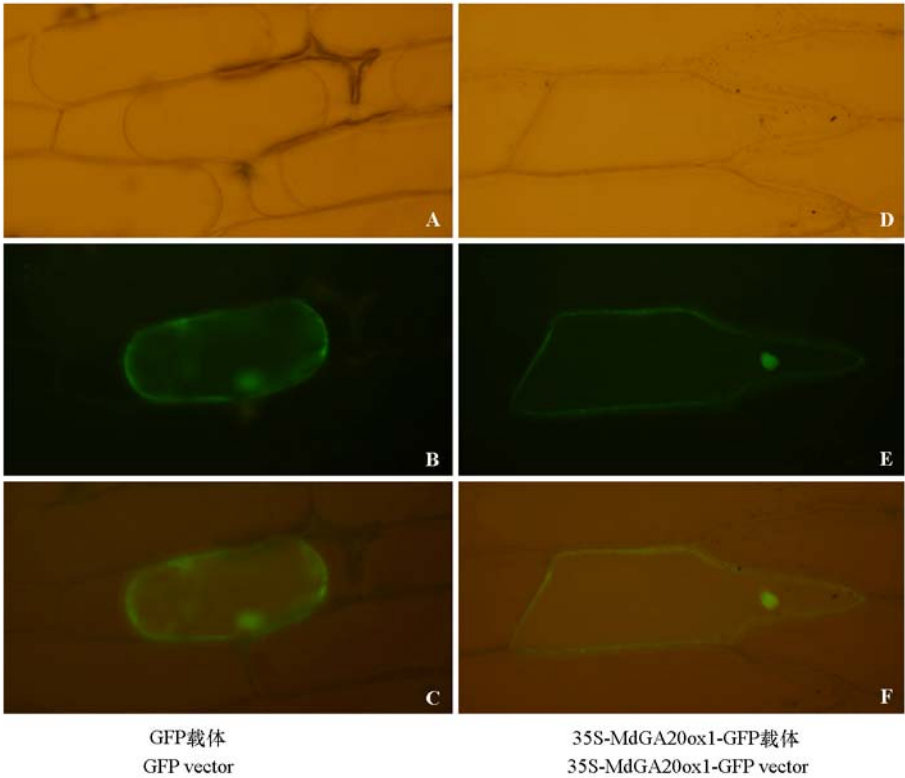


图 2 *MdGA20ox1* 和 *GFP* 在洋葱表皮细胞中的瞬时表达

A、D：洋葱表皮细胞外观图；B、E：荧光显微镜下 GFP 蛋白，
MdGA20ox1-GFP 蛋白的绿色荧光信号；C：A 和 B 的重叠；F：D 与 E 的重叠。

Fig. 2 The transient expression of *MdGA20ox1* and *GFP* gene in onion cells

A, D: Outlook of onion epidermal cells; B, E: Images of green fluorescence of GFP protein,
MdGA20ox1-GFP in onion cells under the fluorescence microscope; C: Overlaid of A and B; F: Overlaid of D and E.

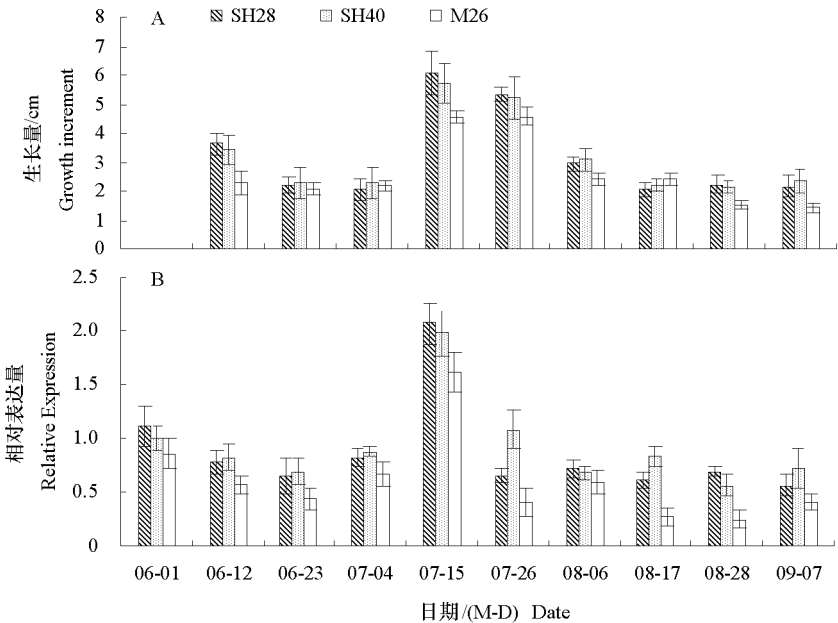


图 3 苹果砧木生长量及茎尖组织 *MdGA20ox1* 基因的相对表达量

Fig. 3 Growth increment and relative expression of *MdGA20ox1* gene in apical tissue of different rootstocks

图 4 表明, SH40, SH28 和 M26 嫁接‘嘎啦’*MdGA20ox1* 表达量与其生长量趋势基本相同, 呈先下降再上升然后再下降的过程。*MdGA20ox1* 的表达量在 7 月 15 日最高, 之后迅速下降至较低的水平。生长量最高的 SH28 嫁接‘嘎啦’, 其 *MdGA20ox1* 表达量最高; M26 嫁接‘嘎啦’次之; 生长量最低的 SH40 嫁接‘嘎啦’, 该基因的表达量也最低。

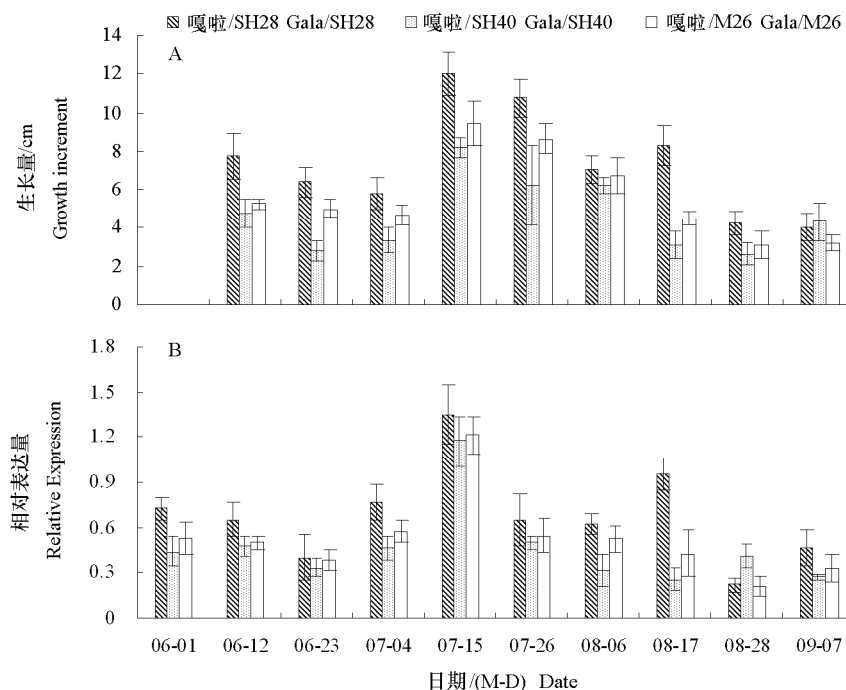


图 4 苹果砧木嫁接‘嘎啦’生长量及茎尖组织 *MdGA20ox1* 基因的相对表达量
Fig. 4 Growth increment and relative expression of *MdGA20ox1* gene in apical tissue of ‘Gala’ cultivar grafted on different rootstocks

2.5 *MdGA20ox1* 在苹果砧木 SH40 与 SH28 嫁接‘嘎啦’不同组织中的相对表达

从图 5 中可以看出, SH40 与 SH28 嫁接‘嘎啦’, 在不同组织中 *MdGA20ox1* 的表达模式是相同的, 均是成熟叶片中表达量最高, 枝皮次之, 在茎尖、幼叶、幼果中表达量较高, 而在花蕾和花中基本不表达, 并且半矮化类型的 SH28 嫁接‘嘎啦’在与生长相关的组织茎尖、幼叶、成熟叶、枝皮中的表达量均高于矮化类型 SH40 嫁接‘嘎啦’。

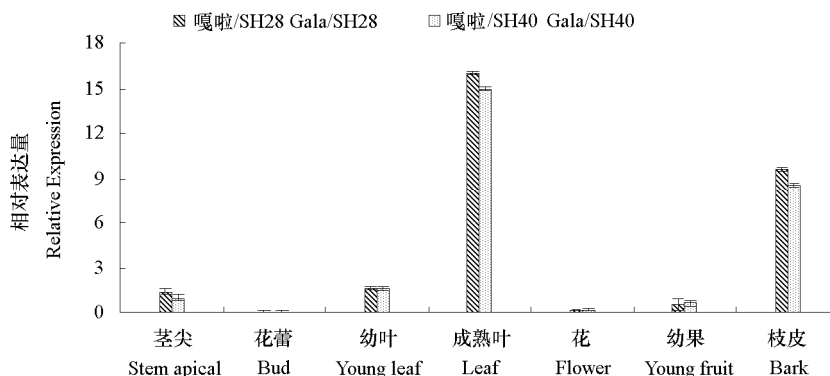


图 5 *MdGA20ox1* 基因在 2 个苹果砧木嫁接‘嘎啦’不同组织中的相对表达量
Fig. 5 Relative expression of *MdGA20ox1* gene in difference tissues of 2 apple rootstocks grafted cultivar ‘Gala’

3 讨论

20 世纪 50 年代的“绿色革命”中,水稻因 GA20ox 功能的缺陷产生半矮秆植株,提高了水稻的抗倒伏能力且显著提高了水稻的产量,引发了人们对植株高度和赤霉素生物合成酶类的广泛关注 (Spielmeyer et al., 2002)。GA20ox 是重要的 GAs 生物合成和调控酶,是由小的多基因家族编码的可溶性双加氧酶 (Hedden & Phillips, 2000)。本试验首次从苹果砧木 SH40 幼嫩的茎尖组织中,克隆得到 GA20ox 基因的 cDNA 全长,氨基酸同源性比对表明 *MdGA20ox1* 编码氨基酸序列与西洋梨的氨基酸序列同源性最高,达到 96.7%;但与 Kusaba 等 (2001) 从‘富士’克隆得到的 *MdGA20ox* 编码氨基酸序列同源性为 93.6%,这可能与 GA20ox 家族的组织特异表达有关。Phillips 等 (1995) 在拟南芥中克隆得到 3 个不同的 GA20ox 基因分别在花、果实、茎中特异性表达。本试验试材为幼嫩茎尖,与西洋梨 (宣利利, 2011) 一致,而 Kusaba 等 (2001) 用的是富士种子,这可能是导致本试验得到的 *MdGA20ox1* 与 Kusaba 等 (2001) 的苹果基因差异较大,而与西洋梨差异较小的原因。

生命活动真正起作用的是基因表达的产物——蛋白质,蛋白质是生物功能的直接体现者,有序分布和动态调控的蛋白质是保证生命个体正常生长、发育的前提,因此对于蛋白质进行亚细胞定位也是对其功能进行分析研究必不可少的环节之一 (邢浩然 等, 2006; 张付云 等, 2009; 杨光 等, 2011)。本研究发现 *MdGA20ox1* 蛋白在细胞核与细胞质膜中产生绿色荧光,表明 *MdGA20ox1* 翻译的蛋白主要位于细胞核与细胞质膜中,说明该基因可能发挥了转录因子的功能,并且对细胞质膜的稳定或控制蛋白转运可能也具有一定的作用 (林茂, 2008; 杨光 等, 2011)。

GA 具有促进茎叶延长的作用, Faust 等 (1992) 曾把 GA 作为调控树体大小最重要的激素,果树树体的大小与 GA 的含量以及 GA 的信号传导密切相关。张志华等 (2006) 的试验结果表明,核桃实生苗的 GA₃ 含量与树体生长势呈正相关。GA20ox 是重要的 GAs 生物合成酶,它能经过 3 个连续的氧化反应,催化产生 GA9 和 GA20 (Zhao et al., 2010)。Carrera 等 (2000) 通过遗传修饰 GA20ox 基因水平来改变马铃薯体内的赤霉素含量证实,与对照相比,GA20ox 正义转化使马铃薯植株高度增加、节间增长;反义转化则抑制了植株的生长和发育。本试验利用实时荧光定量 PCR 研究了相同立地条件下,SH40、SH28、M26 自根苗及其嫁接品种‘嘎啦’在不同生长时期 *MdGA20ox1* 基因茎尖组织的表达情况,结果表明在 6 月 1 日至 9 月 7 日期间,*MdGA20ox1* 基因在 3 种自根苗及其嫁接品种‘嘎啦’的横向表达量变化趋势基本一致,均为先下降再上升然后再下降的趋势。同时该基因的表达情况与其自根苗的生长动态基本相同,6 月初是苹果幼树的停止生长时期,此时 *MdGA20ox1* 基因的表达量逐渐降低,至 6 月 23 日表达量最低。随着苹果茎尖的加速生长,该基因的表达量开始上升并在 7 月 15 日表达量达到最高。5 年生 SH28、SH40 嫁接‘嘎啦’不同组织相对表达量结果表明 *MdGA20ox1* 基因主要在茎尖、幼叶、成熟叶、枝皮等组织中高度表达,在花中几乎不表达,表明该基因作为 GAs 合成途径的关键基因,主要参与了苹果株高生长过程。

矮化密植栽培是苹果生产的发展趋势,要弄清其矮化机理,还需要在赤霉素合成及信号转导以及多种激素的协同作用等方面做大量工作 (程飞飞 等, 2011)。本试验克隆得到一个完整 GA20ox 基因,并对该基因的亚细胞定位和表达情况做了一定的研究,为以后转基因工作奠定了一定的基础。

References

- Carrera E, Bou J, Garcia-Martinez J L, Prat S. 2000. Changes in GA20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tube induction and tuber yield of potato plants. *The Plant J*, 22 (3): 247 - 256.
- 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 Agriculture 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—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.
- Coles J P, Phillips A J, Croker S J, Garcialepe R, Lewis M J, Hedden P. 1999. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and anti-sense expression of gibberellin 20-oxidase genes. Plant J, 17 (5): 547 - 556.
- Faust M. 1992. 决定树体大小的理论机制. 吴邦良, 译. 国外农学: 果树, 45 (1): 34 - 38.
- Hedden P, Phillips A L. 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. Trends in Plant Science, 5 (12): 523 - 530.
- Huang S S, Raman A S, Ream J E, Fujiwara H, Cerny R E, Brown S M. 1998. Over-expression of 20-oxidase confers a gibberellin overproduction phenotype in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 118 (3): 773 - 781.
- Kusaba S, Honda C, Kano-Murakami Y. 2001. Isolation and expression analysis of gibberellin 20-oxidase homologous gene in apple. J Exp Bot, 52 (335): 375 - 376.
- Li Jie-fa, Tian Yi-ke, Wang Cai-hong, Tian Wei, Song Wei, Yin Hao. 2010. Cloning and bioinformatics analysis of *ent*-kaurene oxidase gene *PpKO* in pear. 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.
- Lin Mao. 2008. Stress tolerance analysis and subcellular localization of *Cpcor413pm1* gene [M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 林 茂. 2008. 腊梅 *Cpcor413pm1* 基因的抗逆性分析与亚细胞定位 [硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Phillips A L, Ward D A, Uknes S, Appleford N E J, Lange T, Huttly A K, Gaskin P, Graebe J E, Hedden P. 1995. Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. Plant Physiology, 108 (3): 1049 - 1057.
- Spielmeier W, Ellis M H, Chandler P M. 2002. Semidwarf (*sd-1*), 'Green Revolution' rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. Proc Natl Acad Sci USA, 99 (13): 9043 - 9048.
- Tian Wei, Tian Yi-ke, Wang Cai-hong, Song Wei, Li Jie-fa, Yin Hao. 2011. Cloning and sequence analysis of *ent*-kaurene oxidase gene in apple. Journal of Fruit Science, 28 (1): 1 - 7. (in Chinese)
- 田 伟, 田义轲, 王彩虹, 宋 伟, 李节法, 殷 豪. 2011. 苹果内根—贝壳杉烯氧化酶基因的克隆及序列分析. 果树学报, 28 (1): 1 - 7.
- Wolbang C M, Ross J J. 2001. Auxin promotes gibberellin biosynthesis in decapitated tobacco plants. Planta, 214 (1): 153 - 157.
- Wolbang C M, Chandler P M, Smith J J, Ross J J. 2004. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems. Plant Physiology, 134 (2): 769 - 776.
- Xing Hao-ran, Liu Li-juan, Liu Guo-zhen. 2006. Advancement of protein sub-cellular location in plants. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, (S2): 1 - 6. (in Chinese)
- 邢浩然, 刘丽娟, 刘国振. 2006. 植物蛋白质的亚细胞定位研究进展. 华北农学报, (S2): 1 - 6.
- Xuan Li-li. 2011. Cloning and expression analysis of GA20-oxidase and *ent*-kaurene oxidase genes in pear [M. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)
- 宣利利. 2011. 梨 GA20 - 氧化酶和贝壳杉烯氧化酶基因克隆及表达分析 [硕士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Yang Guang, Cao Xue, Fang Jing-gui, Song Chang-nian, Wang Chen, Wang Xi-cheng. 2011. Cloning sub-cellular localization and spatiotemporal expression of a *VvGAI* gene from grapevine 'Fujiminori'. Acta Horticulturae Sinica, 38 (10): 1883 - 1892. (in Chinese)
- 杨 光, 曹 雪, 房经贵, 宋长年, 王 晨, 王西成. 2011. '藤稔' 葡萄 *VvGAI* 基因的克隆、亚细胞定位及时空表达分析. 园艺学报, 38 (10): 1883 - 1892.
- Zhang Fu-yun, Chen Shi-yun, Zhao Xiao-ming, Bai Xue-fang, Du Xian-guang. 2009. Construction of NtSKP1-GFP plant expression vector and sub-cellular location. Acta Agriculture Boreali-occidentalis Sinica, 18 (4): 144 - 148. (in Chinese)
- 张付云, 陈士云, 赵小明, 白雪芳, 杜显光. 2009. NtSKP1-GFP 植物表达载体的构建及亚细胞定位. 西北农业学报, 18 (4): 144 - 148.
- Zhang Zhi-hua, Liu Xin-cai, Liu Yan-hong, Gao Yi, Wang Hong-xia. 2006. Study on relationship between hormone and growth vigor of young *Juglans regia*. Scientia Silvae Sinicae, 42 (9): 131 - 133. (in Chinese)
- 张志华, 刘新彩, 刘彦红, 高 仪, 王红霞. 2006. 核桃幼树内源激素与生长势的关系. 林业科学, 42 (9): 131 - 133.
- Zhao H J, Dong J L, Wang T. 2010. Function and expression analysis of gibberellin oxidases in apple. Plant Mol Biol Rep, 28: 231 - 238.