

异源表达拟南芥赤霉素 2-氧化酶基因对矮牵牛形态发育的影响

余 勇, 葛文东, 邹世慧, 杨 子, 韩 珪, 秦小婷, 杨 霞, 郭余龙*, 李名扬

(西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆市花卉工程技术研究中心, 重庆 400716)

摘 要: 拟南芥赤霉素 2-氧化酶基因 *AtGA2ox1* 在矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 中过量表达导致转基因植株开花延迟, 株形明显矮化, 花冠变小, 花冠表皮细胞变小, 但花色变化不明显。施用多效唑对矮牵牛花冠的影响与过量表达 *AtGA2ox1* 一致。用拟南芥茎特异性表达基因 *At3g56700* 的启动子驱动 *AtGA2ox1* 在矮牵牛中表达时, 转基因植株的表型变化在株系间存在明显的差异, 但外源基因在茎中的表达量都明显高于叶和花中的, 果实和种子的发育未受影响, 通过对转基因后代的筛选可以获得株形矮化, 其它性状的发育受影响较小的转基因株系。

关键词: 矮牵牛; 赤霉素 2-氧化酶基因; 矮化植株; 茎特异启动子

中图分类号: S 681.6

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 10-2065-10

Impact of Heterologous Expression of a Gibberellin 2-oxidase Gene from *Arabidopsis* on Morphology Development in Transgenic *Petunia*

YU Yong, GE Wen-dong, ZOU Shi-hui, YANG Zi, HAN Yao, QIN Xiao-ting, YANG Xia, GUO Yu-long*, and LI Ming-yang

(Chongqing Engineering Research Center for Floriculture, Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Overexpression of *Arabidopsis* gibberellin 2-oxidase gene *AtGA2ox1* led to the delay of flowering in petunia. The transgenic plants were obviously dwarfed and the size of transgenic flower and the adaxial petal epidermal cells were reduced. However, the flower color of transgenic plants was not altered. The usage of paclobutrazol on flower buds had similar effects on petunia flowers as the overexpression of *AtGA2ox1* in petunia plants. For the purpose of bypassing the unwanted effects raised by overexpression of *AtGA2ox1*, a 2.1 kb 5' upstream promoter sequence of the stem specific gene *At3g56700* from *Arabidopsis* was used to drive the expression of *AtGA2ox1* in petunia. The transgenic plants showed dwarf phenotype and other morphologic changes in various degrees. However *AtGA2ox1* gene accumulated at higher levels in stems than in leaves and flowers and the expression of heterologous

收稿日期: 2014-05-13; 修回日期: 2014-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272199)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yulong@swu.edu.cn)

AtGA2ox1 did not hazard the development of fruits and seeds in these transgenic plants. Compact transgenic plants without obviously detrimental alternations could be found from the offspring of transgenic plants expressing *AtGA2ox1* driven by the promoter of *At3g56700*.

Key words: petunia; gibberellin 2-oxidase gene; compact plant; stem-specific promoter

赤霉素调控植物生长发育最为显著的作用是促进茎的伸长。经过多年的深入研究,赤霉素代谢和作用机理已渐被阐明,在模式植物中与此相关的大多数基因已被克隆(Hedden & Phillips, 2000; Sakamoto et al., 2004),研究者得以利用转基因技术调控赤霉素的代谢和信号传导来培育株形理想的新材料,同时进一步分析赤霉素在不同物种中对各种性状的影响(Bhattacharya et al., 2010)。高等植物赤霉素合成过程中,GA2ox, GA3ox 和 GA20ox 这 3 个小基因家族在决定体内活性赤霉素的水平中发挥关键的作用,其中 GA3ox 和 GA20ox 家族基因催化合成有生物活性的赤霉素,而 GA2ox 家族基因是将活性赤霉素转化成无活性的状态(Yamaguchi, 2008; Han & Zhu, 2011)。在降低内源赤霉素水平的生理效应和创造矮化植物新材料的研究中,GA2ox 家族基因最常被使用(Dijkstra et al., 2008; Singh et al., 2010; Zhou et al., 2011; Studzinska et al., 2012)。

研究表明,超量表达 GA2ox 家族基因虽然可以获得矮化的植株,但同时也会导致花变小、花色变浅、开花延迟和不能结实等不利性状(Sakamoto et al., 2003; Ubeda-Tomas et al., 2006)。因此,在基因工程中应用该类基因时有必要对其表达的时空进行限制。本研究中通过超量表达拟南芥赤霉素 2-氧化酶基因 *AtGA2ox1*, 分析内源赤霉素水平降低对矮牵牛花的颜色和大小等观赏性状的影响;利用茎特异表达基因 *At3g56700* 的上游启动子驱动拟南芥赤霉素 2-氧化酶基因 *AtGA2ox1* 在矮牵牛中表达,分析该启动子在观赏植物的矮化基因工程应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株与质粒

试验于 2011 年 9 月至 2013 年 9 月于西南大学花卉研究所进行。矮牵牛自交系 ‘V26’ (紫色花) 由华中农业大学包满珠教授惠赠, ‘Mitchel Diploid’ (MD, 白色花) 系新西兰 David Lewis 博士赠送,栽培品种 ‘地毯紫青’ 和 ‘梦幻粉红’ 购自农友种苗(中国)有限公司。拟南芥(Col)由本实验室保存。植物材料种植于西南大学试验农场大棚,供试的植株同时种植,相邻放置,保证其生长条件一致。大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101、植物表达载体 pCAMBIA2301 和 pGreen II 0229 由本实验室保存。pMD19-T 购自宝生生物(大连)有限公司。

1.2 表达载体构建及矮牵牛的遗传转化

用 CTAB 法提取拟南芥幼苗基因组 DNA 为模板,PCR 扩增带内含子的 *AtGA2ox1* 基因。扩增引物根据 *At1G78440* 序列(Biemelt et al., 2004)设计为:CTGCAGATCAATGGCGGTATTGTCTAAAC (*Pst* I) 和 GGATCCTCAATTTAGGAGATTTTTTATAGTC (*Bam* H I)。扩增产物连接到 pMD19-T 上,测序验证后用 *Pst* I 和 *Bam* H I 酶切。回收目的片段,连接到辅助载体 pMF500 (王会平等, 2013) 上,置于 2 \times 35S 启动子和 35S 终止子之间,酶切和测序验证后命名为 pMF501。用 *Eco* R I 和 *Sal* I 酶切 pMF501 回收表达盒,连接到 pCAMBIA2301 的多克隆位点,验证后命名 pCMF501 (图 1)。

构建茎特异表达 *AtGA2ox1* 基因的载体时,首先将 pMF500 的表达框用 *Sac* I 和 *Hind* III 切下连

接到 pGreen II 0229, 得到载体 pGMF500。根据拟南芥转录组的研究结果 (Schmid et al., 2005), 以拟南芥基因组 DNA 为模板, PCR 扩增克隆茎特异表达基因 *At3g56700* 的 5'端非编码区约 2.1 kb 的序列, 用作 *AtGA2ox1* 的启动子。扩增使用的引物为: GGTACCTTCCTAGAACAGTCTGAGC (*Kpn* I) 和 CTGCAGGCCATGGTAGTTACCAACG (*Pst* I)。扩增产物连接到 pMD19-T 并测序验证后, 以 *Kpn* I 和 *Pst* I 酶切回收目的片段, 连接到 *Kpn* I 和 *Pst* I 酶切 pMF501 回收的载体片段上, 验证后为 pMF712。*Sac* I 和 *Bam*H I 酶切 pMF712 和 pGMF500, 分别回收表达框和载体, 连接, 验证后命名为 pGMF712 (图 1)。

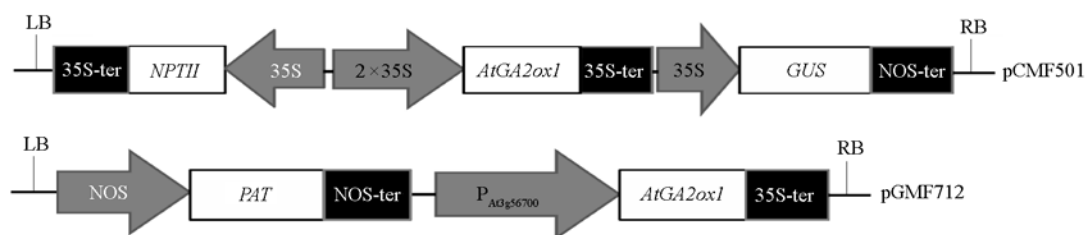


图 1 pCMF501 和 pGMF712 的载体结构简图

Fig. 1 Schematic representation of the pCMF501 and pGMF712 constructs

pCMF501 和 pGMF712 质粒 DNA 用电击法转化导入农杆菌 GV3101。矮牵牛遗传转化使用叶盘法, 具体程序见参考文献 (郭余龙 等, 2014; Guo et al., 2014)。

1.3 抗性植株中外源基因的表达分析

pCMF501 转化 ‘V26’ 和 ‘MD’ 后, 取其抗性植株和对照植株的叶片浸于 GUS 染色液中, 37 °C 保温 3 ~ 12 h, 乙醇脱色, 观察染色情况。取 T_0 或 T_1 代抗性植株的茎、叶和花蕾, 用 RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒 (北京天根) 提取总 RNA, cDNA 第 1 链用 PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒 (TaKaRa) 合成, 每次反应使用 1 μ g 总 RNA。

半定量分析抗性植株中外源基因 *AtGA2ox1* 的表达时, 扩增 *ACTIN* 内参的引物为: AGATCTGG CATCATACCTTCTACA 和 CCMGCAGCTTCCATRCCAATCA。扩增目的基因 *AtGA2ox1* 的正向引物为 GCATTCTACTTCTATTGCAGC (TL-2), 反向引物为 TCGTCCTCATTGTCTATC (501R), 扩增条件为 94 °C 变性 5 min 后, 进行 25 个循环的 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 扩增, 最后 1 个循环后 72 °C 延伸 10 min。

荧光定量分析外源基因 *AtGA2ox1* 的表达量时, 扩增内参基因 *SAND* 的引物为: CTTACGACGA GTTCAGATGCC 和 GGTAAGTCCTCAACACGCATG (Mallona et al., 2010); 目标基因 *AtGA2ox1* 的引物为 501-qF2: CACACTTCCTTCTTCTTCAACG 和 501-qR2: CGTACAACCTCTCGTCCTCAT。分析在 CFX96 PCR 仪上进行, 每个 qRT-PCR 总体积为 10 μ L, 包含 0.5 μ L cDNA, 正反向引物各 0.5 μ L (10 μ mol \cdot L⁻¹), 5 μ L 2 \times SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad)。扩增条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火并延伸 5 s, 39 个循环。每个样品设 3 次生物学重复。试验数据通过 Bio-Rad Manager™ (Version 1.1) 软件进行采集和分析, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法获得目标基因的相对表达量。

1.4 转基因植株的形态分析

花冠面积的测量: 在花开放后花冠达最大直径时 (气温低于 28 °C 时 4 d, 高于 28 °C 时 3 d) 将花剪下, 放到架子上, 花冠自然展平, 从垂直于花冠平面的角度拍照, 拍照时在花冠旁边放一刻度尺。拍照后用 ImageJ 软件计算花冠所占的面积, 记为花冠面积。

花瓣上表皮细胞观察：将花冠中部切成 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 见方的小块，用导电胶粘在样品支架上，放到 HITACHI S-3000N 扫描电镜样品室的冷冻台上，在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， 15 kV 的条件下进行冷冻扫描观察、拍照。每个材料观察 5 朵花。用 ImageJ 软件进行细胞计数，计算每个细胞所占面积。

测量第 1 个花蕾的高度在植株主茎至少有 5 朵花开放后进行，将植株拔出后，测量子叶节到第 1 朵花（蕾）着生处的长度。测量花序的节间长度时，先测量每花序枝上所有充分伸长的节间的总长度，再除以节间数记为该花序枝的节间长度，每个株系随机选取约 30 个花序枝进行测量。

1.5 花色素苷测定

取材的前 1 d 将所有已开放的花去除，第 2 天取完全展开的花冠，用 1% 的盐酸甲醇溶液提取花色素苷。提取时先将花冠称质量，然后按每 100 mg 样品 10 mL 提取液的比例加入提取液。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下慢速振荡提取 48 h 后，提取液用分光光度计（TU-1901，北京普析通用）测定 530 nm 和 657 nm 的吸光度，计算 $A_{530} - 0.25 \times A_{657}$ 值以表示提取液中花色素苷的相对含量，同时校正叶绿素及其降解产物存在对测定结果的影响（Weiss & Halevy, 1989）。每个株系测定 15 朵花。

1.6 赤霉素和多效唑处理

参考 Nishijima 等（2006）用细胞分裂素处理矮牵牛花蕾时的方法。将赤霉素和多效唑（购自 Sigma 公司）溶解于 50% 丙酮水溶液中配成浓度为 $100\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。花蕾长度 2 mm 时开始处理，每两天处理 1 次，每次将 5 μL 溶液滴到花蕾顶部，直到花朵开放。对照用 50% 丙酮水溶液处理。每处理至少 15 朵花。

2 结果与分析

2.1 过量表达 *AtGA2ox1* 的矮牵牛植株花冠及花色变化

通过表达赤霉素 2-氧化酶基因来降低植物内源赤霉素水平的研究中，目前有多个物种的基因可供选用。因为 *AtGA2ox1* 在单子叶植物百喜草（Agharkar et al., 2007）和双子叶植物烟草（Biemelt et al., 2004）中异源表达都有较好的效果，故本研究选用该基因。经卡那霉素筛选和 GUS 染色，将 17 个 GUS 染色阳性的 ‘V26’ 矮牵牛抗性株系移栽后提取 DNA 进行 PCR 验证，都检测到外源 *AtGA2ox1* 基因。这些植株呈现程度不同的矮化，开花时间较对照有不同程度的延后，有一个株系（VL25）在移栽后 8 个月尚未开花，与前人报道的超量表达赤霉素 2-氧化酶基因转基因植株的表型一致（Schomburg et al., 2003; Biemelt et al., 2004）。转基因植株的花冠（图 2）出现不同程度的变小，与预期结果一致；但花色未出现明显变化，与预期结果不同。对照和抗性植株的花序提取 RNA，进行 RT-PCR 分析表明，所检测的抗性植株中 *AtGA2ox1* 均有表达（图 3）。为了进一步了解花冠变化的情况，取 4 个株系对花冠面积和花色素苷的含量进行测定，结果（表 1）显示转

表 1 表达 *AtGA2ox1* 的矮牵牛 ‘V26’ 转基因植株
花冠面积和花色素苷含量

Table 1 Limb area and anthocyanin content of flowers from the
transgenic petunia ‘V26’ plants expressed *AtGA2ox1*

转基因植株 Transgenic plants	花冠面积/ cm^2 Limb area	花色素苷含量 Anthocyanin content
VL26	7.6 ± 1.3	1.92 ± 0.01
VL19	8.8 ± 1.6	1.94 ± 0.01
VL27	11.4 ± 1.5	1.95 ± 0.01
VL5	12.2 ± 1.8	1.95 ± 0.01
野生型 Wild type	16.9 ± 1.3	1.93 ± 0.01

注：花色素苷含量为每 100 mg 花冠（鲜样质量）的 10 mL 1% 盐酸甲醇提取液 530 nm 处吸光度值，计算 $A_{530} - 0.25 \times A_{657}$ 。

Note: Anthocyanins were extracted from fresh petunia limbs (100 mg) using 10 mL of 1% HCl in methanol. The concentration of anthocyanins were reported as $A_{530} - 0.25 \times A_{657}$ (Weiss & Halevy, 1989).

基因植株花冠面积明显变小、但花色素苷的含量与对照植株差别不大, 与肉眼观察结果一致。转基因株系间花冠面积的差异与外源基因表达量差异的变化趋势一致 (表 1, 图 3)。



图 2 超量表达 *AtGA2ox1* 的矮牵牛 ‘V26’ 花变小

VL26、VL27: 转基因株系; WT: 野生型。

Fig. 2 Reduction of flower size in the *Petunia* ‘V26’ transgenic plants transformed with pCMF501

VL26, VL27: Independent transgenic lines; WT: Wild type.

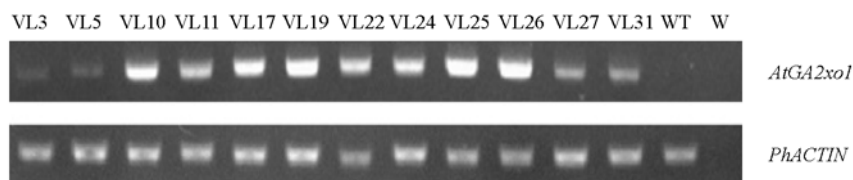


图 3 ‘V26’ 转基因植株中 *AtGA2ox1* 的半定量分析

VL3 ~ VL31: 转基因株系; WT: 野生型; W: 水。

Fig. 3 RT-PCR analysis of *AtGA2ox1* mRNA accumulation in the *Petunia* ‘V26’ transgenic plants transformed with pCMF501

VL3 - VL31: Independent transgenic lines; WT: Wild type; W: Water.

矮牵牛研究中, ‘MD’ 自交系是一个较 ‘V26’ 更为常用的材料, 并且其花瓣发育进程中的细胞分裂和膨大的模式已有详细的分析 (Reale et al., 2002)。pCMF501 转化 ‘MD’ 后, 获得 10 个花冠有不同程度地变小的转基因株系, 半定量分析显示这些植株的花蕾中均有外源 *AtGA2ox1* 的表达。对其中的 ML9 株系进行的分析表明, 其花冠面积明显变小, ML9 为 $(11.7 \pm 1.5) \text{ cm}^2$, 而 ‘MD’ 对照为 $(17.5 \pm 1.9) \text{ cm}^2$ (图 4); 外源基因在其茎、叶和花中的表达量相似 (图 5)。用赤霉素对 ML9 的花蕾进行处理后, 花冠的面积能够恢复甚至超过野生型 MD 花冠的面积 (图 4), 说明外源赤霉素可以补偿 *AtGA2ox1* 对矮牵牛花冠发育的影响。



图 4 GA_3 处理对表达 *AtGA2ox1* 的矮牵牛 ‘MD’ 花冠的影响

Fig. 4 Effects of GA_3 on the flower corolla of *AtGA2ox1* transgenic ‘MD’ petunia plants

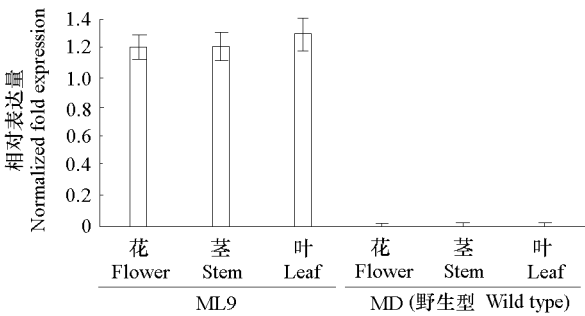


图 5 *AtGA2ox1* 在转基因植株 ML9 不同器官的表达水平
Fig. 5 Expression levels of *AtGA2ox1* in flower, stem and leaf of ML9 transgenic plants

2.2 多效唑处理后矮牵牛花冠及花色的变化

由于 *AtGA2ox1* 在 ‘V26’ 中的过量表达没有改变花的颜色，与预期的结果存在差异。进一步利用赤霉素合成抑制剂多效唑对 ‘V26’、‘地毯紫青’ 和 ‘梦幻粉红’ 的花蕾进行处理，以调节花蕾中内源 GA 水平，对赤霉素影响花冠大小和颜色的结果进行进一步验证。观察表明，经多效唑处理的花蕾开花后花冠明显变小，但花的颜色没有明显的变化（图 6），与表达 *AtGA2ox1* 降低内源 GA 含量对花的大小和颜色的影响是一致的。



图 6 多效唑处理对矮牵牛花冠发育的影响
左：对照；右：多效唑处理。
Fig. 6 Effects of paclobutrazol on the petunia corolla
Left: Control; Right: Paclobutrazol treatment.

2.3 过量表达 *AtGA2ox1* 抑制矮牵牛花冠细胞膨大

通常认为赤霉素主要影响植物细胞的膨大。为了观察 *AtGA2ox1* 表达对花瓣细胞发育的影响，对 ‘V26’ 及其转基因植株 VL27 和 ‘MD’ 及其转基因植株 ML9 的花瓣上表皮细胞进行了扫描电镜观察，结果（图 7）显示，矮牵牛花瓣上表皮细胞呈乳突状，细胞的膨大并不均匀一致，而是大小相间排列的。转 *AtGA2ox1* 的植株花瓣上表皮细胞的形状没有明显变化，但明显变小，与预期的结果一致。

每个材料取 5 朵花进行观察统计，花瓣中部上表皮每个细胞所占面积为：V26 $(4.3 \pm 0.2) \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ，VL27 $(3.6 \pm 0.3) \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ，MD $(4.4 \pm 0.5) \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ，ML9 $(2.9 \pm 0.4) \times 10^3 \mu\text{m}^2$ 。

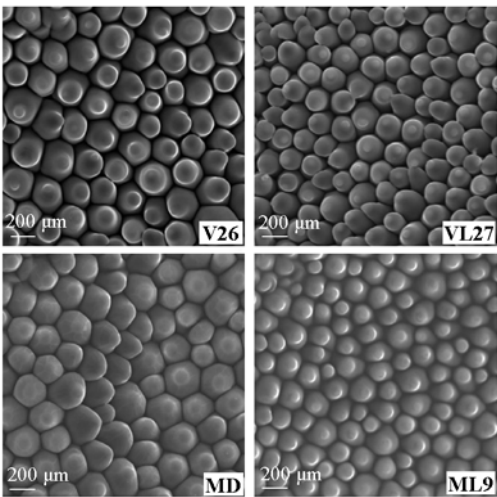


图 7 过量表达 *AtGA2ox1* 抑制矮牵牛花冠细胞的膨大

V26、MD: 野生型; VL27、ML9: V26 和 MD 的转基因株系。

Fig. 7 Overexpression of *AtGA2ox1* represses the expansion of petal cells in petunia

V26, MD: Wild type; VL27, ML9: Transgenic plants of V26 and MD.

2.4 启动子 *P_{At3g56700}* 驱动 *AtGA2ox1* 在茎中优势表达

35S 启动子驱动 *AtGA2ox1* 表达的转基因植株虽然实现了矮化, 但花明显变小, 同时开花时间延迟, 这对观花植物是不利的。因此, 克隆了拟南芥茎特异表达基因 *At3g56700* 的启动子, 构建载体 pGMF712 (图 1), 以使 *AtGA2ox1* 在茎中特异表达。经过 BASTA 筛选, 获得田间抗除草剂的独立转化系 33 个。观察发现, 抗性植株中有 7 个株系与对照差异不明显; 6 个株系矮化非常明显, 开花明显延迟, 花冠变小; 其余 20 个株系不同程度地矮化, 开花时间和花冠大小也受一定程度的影响。说明转基因矮牵牛植株中 *AtGA2ox1* 的表达受插入位点的影响。

随机选取了 9 个 *T₀* 代抗性株系, 进行外源 *AtGA2ox1* 的表达分析, 结果表明均有表达。所有观察的转基因植株均能正常结实, 果实和种子发育未受影响。为了分析转基因植株后代的表型, 利用未转基因的 MD 材料作父本与转基因株系进行杂交, 收获种子, 播种发芽后, 在三叶期喷施 BASTA 进行鉴定。根据 *T₀* 代植株和 *T₁* 幼苗的表型, 以及 *T₁* 代抗性植株的分离情况, 选择 6 个抗性呈 1:1 分离的株系对株型进行进一步的分析。结果 (表 2) 显示, 转基因株系 ‘712-31’ 和 ‘712-33’ 表型

表 2 *T₁* 代 *P_{At3g56700}::AtGA2ox1* 转基因植株的株型比较
Table 2 Plant stature of *T₁* transgenic plants with *P_{At3g56700}::AtGA2ox1*

转基因植株 Transgenic plants	第一花蕾高度/cm Height of the first flower buds	花序节间长度/cm Internode length of the inflorescence rachis	花冠投影面积/cm ² Projected area of the corolla
MD (野生型 Wild type)	32.6 ± 3.3	5.3 ± 1.2	12.8 ± 1.6
712-10	13.4 ± 4.0**	1.7 ± 0.4**	9.9 ± 2.8**
712-15	24.8 ± 3.7*	3.7 ± 0.6**	11.7 ± 1.3**
712-26	14.9 ± 3.8**	2.1 ± 0.5**	6.4 ± 1.6**
712-27	14.3 ± 3.6**	3.7 ± 0.9**	10.1 ± 2.0**
712-31	30.9 ± 4.1	4.9 ± 0.8	12.5 ± 1.9
712-33	29.6 ± 3.4	5.3 ± 1.4	12.5 ± 1.3

注: *t* 检验。*: 与未转基因 MD 对照差异显著 (*P* < 0.05), **: 与对照差异极显著 (*P* < 0.01)。

Note: *t*-test. * Significant at *P* < 0.05 or ** *P* < 0.01 versus the wild type.

变化轻微, 株形与未转基因对照差异不明显; 转基因株系 ‘712-10’ 和 ‘712-26’ 植株明显矮化, 开花时间明显延迟 (长日照, 重庆 5—9 月), 花冠变小 (表 2, 图 8); 转基因株系 ‘712-15’ 和 ‘712-27’ 介于前两者之间, 植株矮化明显, 花冠略为变小 (表 2, 图 8)。对表型不同的 3 个株系的茎、叶和花中外源基因的表达情况进行了分析, 结果 (图 9) 显示, 3 个株系茎中的表达量均高于叶和花, 说明 *At3g56700* 基因的上游启动子在矮牵牛中仍具有驱动外源基因在茎中优势表达的特性。

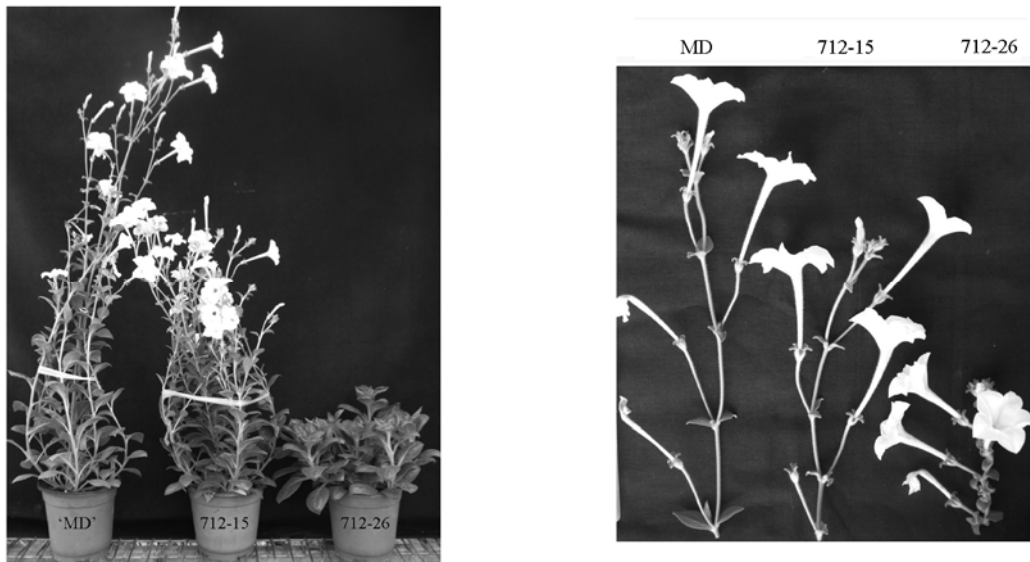


图 8 $P_{At3g56700}::AtGA2ox1$ 转基因矮牵牛 ‘MD’ 植株矮化

Fig. 8 Dwarfed transgenic petunia ‘MD’ plants with $P_{At3g56700}::AtGA2ox1$

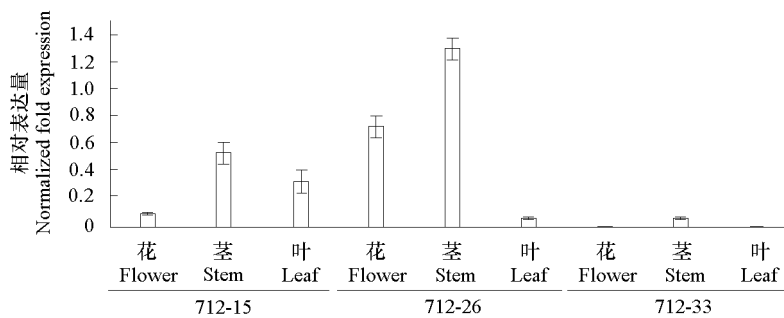


图 9 *AtGA2ox1* 在 $P_{At3g56700}::AtGA2ox1$ 转基因植株不同器官的表达水平

Fig. 9 Expression levels of *AtGA2ox1* in flowers, internodes and leaves of $P_{At3g56700}::AtGA2ox1$ transgenic plants

3 讨论

花的颜色和大小是重要的观赏性状。研究表明, 赤霉素在矮牵牛花冠生长和着色过程中发挥促进作用。矮牵牛的花去除雄蕊后, 花冠的生长和着色都受到影响, 但补充赤霉素能部分替代雄蕊在花冠发育中的作用 (Weiss & Halevy, 1989); 在离体培养条件下, 赤霉素能促进矮牵牛花瓣着色和生长 (Weiss & Halevy, 1989), 促进查尔酮合成酶基因 (*CHS*) 的转录 (Weiss et al., 1992), 对查尔酮异构酶基因 (*CHI*)、二氢叶酸还原酶基因 (*DFR*) 和鼠李糖基转移酶基因 (*RT*) 也有相似的促进作用 (Weiss et al., 1995)。根据这些研究结果, 最初推测表达外源 GA2 - 氧化酶的转基因植株花

的颜色会因活性赤霉素的浓度降低而变浅。但试验结果显示, 所有开花的‘V26’转基因植株中花的颜色都没有明显的变化(表 1, 图 2), 同时, 使用赤霉素合成抑制剂多效唑处理花蕾导致花冠明显变小, 但颜色没有明显的变化(图 6)。这可能是由于矮牵牛花瓣着色所需的赤霉素浓度较低, 花芽正常分化和花朵正常开放所需的赤霉素浓度已足以保证花瓣正常着色, 当赤霉素浓度降低到足以影响着色时, 花不能形成和开放。

利用转基因技术调节内源赤霉素水平实现植物矮化, 已不是一件非常困难的事情。但是, GA 影响高等植物生活史的各个阶段, 包括种子萌发、茎的伸长、花的诱导和发育、种子和果实的发育等, 使用组成型启动子调控赤霉素代谢酶基因的表达时, 外源基因的表达虽然降低了植株的高度, 但转基因植株也出现开花、结实异常等问题, 产生对植物不利的影响, 因此, 使用合适的启动子是植物矮化基因工程的发展方向(Bhattacharya et al., 2010)。Sakamoto 等(2003)在研究中采用源于水稻的茎叶特异表达启动子, 将赤霉素含量的变化限制在特定的器官, 从而减少对其其它器官造成影响, 取得较好的效果, 但是没有将该研究中使用的启动子成功用于双子叶植物中的报道。本研究根据拟南芥转录组分析的结果(Schmid et al., 2005), 克隆了一个拟南芥茎特异表达基因 *At3g56700* 编码区上游 2.1 kb 长的序列用作表达 *AtGA2ox1* 的启动子, 观察其用于矮牵牛矮化研究的效果。对转基因植株中外源基因的表达分析表明, 与 35S 启动子的特性不同(图 5), $P_{At3g56700}$ 启动子能驱动外源基因在矮牵牛茎中优势表达(图 9), 不过, 启动活性和特异性在不同转基因株系中存在差异, 可能与该启动子的活性受插入位点附近序列的影响有关。通过对转基因后代的筛选可以获得株型矮化, 其它性状受较小影响的转基因株系。 $P_{At3g56700}$ 启动子的使用可以在一定程度上实现外源基因在双子叶植物茎中特异表达的目的。

References

- Agharkar M, Lomba P, Altpeter F, Zhang H, Kenworthy K, Lange T. 2007. Stable expression of *AtGA2ox1* in a low-input turfgrass (*Paspalum notatum* Flugge) reduces bioactive gibberellin levels and improves turf quality under field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 5 (6): 791 – 801.
- Bhattacharya A, Kourmpetli S, Davey M R. 2010. Practical applications of manipulating plant architecture by regulating gibberellin metabolism. *Journal of Plant Growth Regulation*, 29 (2): 249 – 256.
- Biemelt S, Tschiersch H, Sonnewald U. 2004. Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol*, 135 (1): 254 – 265.
- Dijkstra C, Adams E, Bhattacharya A, Page A F, Anthony P, Kourmpetli S, Power J B, Lowe K C, Thomas S G, Hedden P, Phillips A L, Davey M R. 2008. Over-expression of a gibberellin 2-oxidase gene from *Phaseolus coccineus* L. enhances gibberellin inactivation and induces dwarfism in *Solanum* species. *Plant Cell Rep*, 27 (3): 463 – 470.
- Guo Y L, Han Y, Ma J, Wang H P, Sang X C, Li M Y. 2014. Undesired small RNAs originate from an artificial microRNA precursor in transgenic petunia (*Petunia hybrida*). *PLoS One*, 9 (6): e98783.
- Guo Yu-long, Yu Yong, Yang Zi, Qin Xiao-ting, Ma Jing, Han Yao, Yang Xia, Li Ming-yang. 2014. Over-expressing PMADS20-SRDX repressor leads to the formation of ectopic trichome and stoma on petals and pistils in petunia. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (3): 509 – 520. (in Chinese)
- 郭余龙, 余 勇, 杨 子, 秦小婷, 马 婧, 韩 珏, 杨 霞, 李名扬. 2014. 超量表达 PMADS20-SRDX 抑制因子导致矮牵牛花瓣和雌蕊出现异位表皮毛和气孔. *园艺学报*, 41 (3): 509 – 520.
- Han F, Zhu B. 2011. Evolutionary analysis of three gibberellin oxidase genes in rice, *Arabidopsis*, and soybean. *Gene*, 473 (1): 23 – 35.
- Hedden P, Phillips A L. 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*, 5 (12): 523 – 530.
- Mallona I, Lischewski S, Weiss J, Hause B, Egea-Cortines M. 2010. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during leaf and flower development in *Petunia hybrida*. *BMC Plant Biology*, 10: 4.

- Nishijima T, Miyaki H, Sasaki K, Okazawa T. 2006. Cultivar and anatomical analysis of corolla enlargement of petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) by cytokinin application. *Scientia Horticulturae*, 111 (1): 49 – 55.
- Reale L, Porceddu A, Lanfaloni L, Moretti C, Zenoni S, Pezzotti M, Romano B, Ferranti F. 2002. Patterns of cell division and expansion in developing petals of *Petunia hybrida*. *Sexual Plant Reproduction*, 15 (3): 123 – 132.
- 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 (4): 1642 – 1653.
- Sakamoto T, Morinaka Y, Ishiyama K, Kobayashi M, Itoh H, Kayano T, Iwahori S, Matsuoka M, Tanaka H. 2003. Genetic manipulation of gibberellin metabolism in transgenic rice. *Nature Biotechnology*, 21 (8): 909 – 913.
- Schmid M, Davison T S, Henz S R, Pape U J, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann J U. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics*, 37 (5): 501 – 506.
- Schomburg F M, Bizzell C M, Lee D J, Zeevaert J A D, Amasino R M. 2003. Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants. *Plant Cell*, 15 (1): 151 – 163.
- Singh D P, Filardo F F, Storey R, Jermakow A M, Yamaguchi S, Swain S M. 2010. Overexpression of a gibberellin inactivation gene alters seed development, KNOX gene expression, and plant development in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 138 (1): 74 – 90.
- Studzinska A K, Gardner D S, Metzger J D, Shetlar D, Harriman R, Danneberger T K. 2012. The effect of *PcGA2ox* overexpression on creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.): Performance under various light environments. *HortScience*, 47 (2): 280 – 284.
- Ubeda-Tomas S, Garcia-Martinez J L, Lopez-Diaz O. 2006. Molecular, biochemical and physiological characterization of gibberellin biosynthesis and catabolism genes from *Nerium oleander*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25 (1): 52 – 68.
- Wang Hui-ping, Yu Ling, Zou Shi-hui, Chen Jing, Guo Yu-long, Li Ming-yang. 2013. Silencing of chalcone synthase genes by artificial microRNA in petunia. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (12): 2491 – 2498. (in Chinese)
- 王会平, 遇玲, 邹世慧, 陈璟, 郭余龙, 李名扬. 2013. 利用 amiRNA 技术沉默矮牵牛查尔酮合成酶基因. *园艺学报*, 39 (12): 2491 – 2498.
- Weiss D, Halevy A H. 1989. Stamens and gibberellin in the regulation of corolla pigmentation and growth in *Petunia hybrida*. *Planta*, 179 (1): 89 – 96.
- Weiss D, van Blokland R, Kooter J M, Mol J N M, van Tunen A J. 1992. Gibberellic acid regulates chalcone synthase gene transcription in the corolla of *Petunia hybrida*. *Plant Physiology*, 98 (1): 191 – 197.
- Weiss D, van der Luit A, Knecht E, Vermeer E, Mol J N M, Kooter J M. 1995. Identification of endogenous gibberellins in petunia flowers (induction of anthocyanin biosynthetic gene expression and the antagonistic effect of abscisic acid). *Plant Physiology*, 107 (3): 695 – 702.
- Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 59: 225 – 251.
- Zhou B, Peng D, Lin J, Huang X, Peng W, He R, Guo M, Tang D, Zhao X, Liu X. 2011. Heterologous expression of a gibberellin 2-oxidase gene from *Arabidopsis thaliana* enhanced the photosynthesis capacity in *Brassica napus* L. *Journal of Plant Biology*, 54 (1): 23 – 32.