

矮生山茶‘恨天高’*GA20ox1* 的克隆及其对转基因烟草株形的影响

王江英, 吴 斌, 刘伟鑫, 范正琪*, 李纪元*

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江省林木育种技术研究重点实验室, 浙江富阳 311400)

摘 要: 根据山茶 (*Camellia japonica*) 同源序列设计特异性引物, 利用同源克隆和 3',5'-RACE 技术, 从云南山茶 (*C. reticulata*) 矮生品种‘恨天高’茎尖组织中克隆出 GA20 - 氧化酶 (GA20-oxidase, GA20ox) 基因, 命名为 *CrGA20ox1* (GenBank 登录号: KP635268), 基因全长 1 178 bp, 开放阅读框 1 146 bp, 编码 381 个氨基酸。实时荧光定量 PCR 分析发现, *GA20ox1* 在 4 种不同的山茶中均得到表达, 其中乔木类的浙江红山茶 (*C. chekiangoleosa*) *GA20ox1* 表达量最高, 其次是岳麓连蕊茶 (*C. handelii*) 及金花茶 (*C. nitidissima*), 表达量最低的为矮生品种‘恨天高’。结果表明该基因的表达量高低与测试物种的株高有关。*GA20ox1* 在 4 个物种不同组织中的表达模式基本一致, 且在茎尖组织中的表达量均高于叶片。*CrGA20ox1* 转基因烟草分析结果表明, 过表达 *CrGA20ox1* 烟草株高约为野生型的 3.6 倍, 而沉默表达 *CrGA20ox1* 烟草株高约为野生型的一半。

关键词: 山茶; 云南山茶; 矮生; 基因克隆; 表达分析; 转基因烟草

中图分类号: S 685.14

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 08-1523-10

Overexpression and Silence Expression of *CrGA20ox1* from *Camellia reticulata* ‘Hentiangao’ and Its Effect on Plant Forms in Transgenic Tobacco

WANG Jiang-ying, WU Bin, LIU Wei-xin, FAN Zheng-qi*, and LI Ji-yuan*

(Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Tree Breeding, Fuyang, Zhejiang 311400, China)

Abstract: On the basis of homologous sequences of *Camellia japonica*, a GA20-oxidase (GA20ox) gene was isolated from the stem tip of *C. reticulata* ‘Hentiangao’ by the 3',5'-RACE technology named *CrGA20ox1* (GenBank Accession ID: KP635268). The full-length cDNA of *CrGA20ox1* is 1 178 bp, containing an 1 146 bp ORF which encodes 381 amino acids. Expressions of *GA20ox1* in four different plant phenotypes of camellias were analyzed by fluorescent quantitative real-time PCR. The results showed that *GA20ox1* gene was expressed in the four camellias differently, where the expression level of *GA20ox1* in *C. chekiangoleosa* was the highest, medium in *C. handelii* and *C. nitidissima*, and the lowest in *C. reticulata* ‘Hentiangao’, which indicated that the expression intensity of the *GA20ox1* gene was

收稿日期: 2015-01-15; **修回日期:** 2015-07-17

基金项目: 国家‘十二五’科技计划课题 (2012BA01B0703); 浙江省花卉新品种选育重大科技专项 (2012C12909-6); 浙江省与中国林业科学研究院省院合作林业科技项目 (2012SY02); 国家农业成果转化资金项目 (GB2013GB24320606); 引进国际先进林业科学技术项目 (948 项目) (2014-4-16)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fzq_76@126.com; jiyuan_li@126.com)

positively associated with height in the different camellias. The trends of expressions of *GA20ox1* gene were almost the same in various organs of the four camellias, and furthermore, the expressions of the gene was higher in the shoot tips than in tender leaves. Phenotypic results of transgenic tobacco showed that the transgenic plant with sense *CrGA20ox1* gene was nearly 3.6 times height than wild type tobacco; Meanwhile, the transgenic plant with anti-sense *CrGA20ox1* gene was about only half height of the wild type tobacco.

Key words: *Camellia japonica*; *Camellia reticulata*; dwarfing variety; gene clone; expression analysis; transgenic tobacco

‘恨天高’山茶是云南最珍贵的品种之一，其株形矮小，生长缓慢，花瓣平展，完全重瓣，形姿优美，叶浓花艳，具有极高的观赏价值（管开云 等，2014）。矮生和盆栽木本花卉在园林绿化、居室美化等工程中的发展潜力很大，但矮生变异种质十分稀少。通过分子生物学技术将具有矮生功能的外源基因导入山茶中，是加速培育微型山茶新品种发展趋势之一。

赤霉素（Gibberellins, GAs）主要促进植株的营养生长，包括节间的延长、根的伸长和叶的扩展（Richards et al., 2001）。GA20 氧化酶（GA20ox）是活性 GAs 合成途径中重要的调控酶之一，属于可溶性的双加氧酶，能在 GA 合成的最后阶段催化非羟化 GAs 前体（GA₁₂）和羟基化 GAs 前体（GA₅₃）到 GA₉ 和 GA₂₀，经连续失去 CO₂ 的过程，最后形成具有生物活性的 GA₄ 和 GA₁（Hedden, 1997）；GA20ox 在植物矮生型和徒长型突变体中表达丰度差别很大（Appleford & Lenton, 1991; Lange et al., 1994）。目前已从多种植物（如拟南芥、南瓜、茶树及荔波连蕊茶等）中克隆出 GA20ox，其过量表达能加快植物生长，节间伸长（Coles et al., 1999; Carrera et al., 2000），沉默表达则抑制内源生物活性 GA 的合成，植株表现出矮生特性（Eriksson et al., 2000; Wolfgang et al., 2004）。

本研究中以云南山茶矮生品种‘恨天高’为材料，将 *GA20ox1* 分离出来，通过实时荧光定量 PCR 技术分析其在不同株形山茶物种间的特异性表达，以及在模式植物烟草中过量和沉默表达的差异性及其形态变异，为山茶株形分子育种提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2013 年 3 月至 2014 年 3 月于本课题组苗圃采集立地条件相同且生长年龄相近的‘恨天高’山茶（*Camellia reticulata* ‘Hentiangao’）、岳麓连蕊茶（*C. handelii*）、金花茶（*C. nitidissima*）及浙江红山茶（*C. chekiangoleosa*）的幼嫩叶片和茎尖组织，液氮速冻。‘恨天高’为云南山茶矮生品种，植株矮小，株高约 0.57 m；岳麓连蕊茶为矮生灌木，株高约 1.53 m；金花茶为灌木或小乔木，株高约 2.60 m；浙江红山茶为乔木类植物，株高达 3.80 m。野生型烟草为本实验室培育。

1.2 *CrGA20ox1* 的克隆

按照 EASY Spin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒说明书提取样品总 RNA。根据 GenBank 公布的 *GA20ox1* 同源基因序列进行保守区片段扩增，再按照 TaKaRa 5'-Full RACE Kit、3'-Full RACE Kit 说明书进行目的片段 5'和 3'末端的扩增，所用引物见表 1。

1.3 生物信息学分析

DNAMAN 软件序列拼接后在 NCBI 上进行 Blast 同源性比对, 选择同源性较高的 12 种植物, 运用 DNAMAN 和 MEGA5.05 软件进行氨基酸多序列比对和系统进化树分析。利用 Prot Param 软件 (<http://cn.expasy.org>) 分析蛋白质的理化特性, HNN 软件 (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) 进行蛋白质二级结构分析; 采用 Swidd-model 同源建模方法预测蛋白质相应的三级结构。

1.4 *GA20ox1* 在不同山茶组织中的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 方法, 检测 *GA20ox1* 在‘恨天高’山茶、金花茶、岳麓连蕊茶及浙江红山茶嫩叶及茎尖中的表达情况, 以山茶 18S RNA 为内标 (所用引物见表 1), 生物学试验重复 3 次。运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法求得 4 种山茶嫩叶及茎尖中 *GA20ox1* 表达量, 此后再运用 Sigma Plot 11.0 对数据进行统计分析并绘图。

1.5 植物表达载体的构建

对含有正义、反义 *CrGA20ox1* 的 pGEM-T₄ 重组质粒以及植物表达载体 pBI121 质粒用 *Xba* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶进行双酶切, 将酶切回收纯化后的正义、反义 *CrGA20ox1* 片段分别和载体用 T₄ 连接酶 16 °C 过夜连接, 转化大肠杆菌感受态 DH5 α 。

1.6 农杆菌介导转化烟草及 RT-PCR 检测

采用农杆菌介导的“叶盘法”进行烟草转化。提取待测转基因烟草总 RNA, 反转录获得 cDNA 进行 PCR 检测 (所用引物见表 1)。

1.7 转基因植株不同株系间实时荧光定量 PCR 分析

分别选择正义、反义 *CrGA20ox1* 转化烟草 T₀ 代阳性增高株系 L1 ~ L3 以及阳性矮生株系 DL1 ~ DL3, 提取茎尖组织总 RNA。实时荧光定量 PCR 检测 *CrGA20ox1* 在正义 *CrGA20ox1* 转化烟草中的表达情况, 以及烟草同源 *GA20ox1* 基因在反义 *CrGA20ox1* 转化烟草中的表达情况, 以烟草 *EF1a* 基因作为内标基因 (所用引物见表 1)。野生型烟草作对照, 生物学试验重复 3 次。具体试验步骤同 1.4。

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

编号 Code	序列 Primer sequence (5' - 3')	引物用途 Primer use
F1	CTCATATCCGATGCTCATAGC	保守区片段扩增
R1	AGAGCCATGAAGGTGTCACC	Conservative district fragment
F2	CAAGACTACTGCAATGCCATGAG	3'RACE
F3	GTGTCCTTGATGAAGGATAGT	3'RACE
R2	AGAGCCATGAAGGTGTCACC	5'RACE
R3	GTGTCCTTGATGAAGGATAGT	5'RACE
F4	ATGGCGATCAATTGCGTCAC	ORF 序列扩增; 正义转化植株 PCR 验证
R4	TCAGCTGTTTTCTGTTGAACC	Complete ORF amplification; Sense transgene PCR
F5	TAGGAACAGGACCTCATTGCG	实时荧光定量 PCR
R5	AAGGTGTCGCCTATGTTGACGAC	Quantitative Real-time PCR
18S RNA-F	GACTCAACACGGGGAAACTTACC	山茶内参基因扩增
18S RNA-R	CAGACAAATCGCTCCACCAAC	Camellia reference gene amplication
<i>GusA</i> -F	ATGTTACGTCCTGTAGAAACC	反义转化植株 PCR 验证
<i>GusA</i> -R	TCATTGTTTGCTCCCTGCTG	Anti-sense transgene PCR
<i>EF1a</i> -F	CGGTTAAGGATCTCAAGCGT	烟草内参基因扩增
<i>EF1a</i> -R	GAAGTGGAGCATATCCATTGCC	Tobacco reference gene amplication

1.8 转基因植株形态指标测定

挑选表型变异明显的正义 *CrGA20ox1* 转化植株的 3 个阳性株系 L1 ~ L3 以及反义 *CrGA20ox1* 转化植株的 3 个阳性株系 DL1 ~ DL3 为材料, T_0 代定植 30 d, T_1 代定植 20 d 后测量株高、第 3 与第 4 功能叶片的间距。以野生型烟草作对照。每个株系重复测 3 株。

2 结果与分析

2.1 *CrGA20ox1* 全长 cDNA 序列的克隆

以‘恨天高’茎尖 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 保守区片段扩增, 经测序获得长为 569 bp 的序列 (图 1, A), NCBI Blast 同源序列比对显示, 与荔波连蕊茶同源性达 99.30%, 与茶树同源性达 98.95%, 确认此序列为‘恨天高’*CrGA20ox1* 的一段序列。利用 5'-RACE 和 3'-RACE 技术, 从‘恨天高’茎尖总 RNA 中分别获得 *GA20ox1* cDNA 的 5'和 3'端的序列。测序结果表明 5'-RACE 产物长度为 791 bp (图 1, B), 3'-RACE 产物长度为 440 bp (图 1, C)。利用 ORF Finder 分析 *CrGA20ox1* 的 CDS 区为 1 146 bp (图 1, D), 编码一条含 381 个氨基酸, 分子量为 42.747 kD, 等电点为 6.11 的蛋白质, 然后在 GenBank 上进行登录, 登录号为 KP635268。

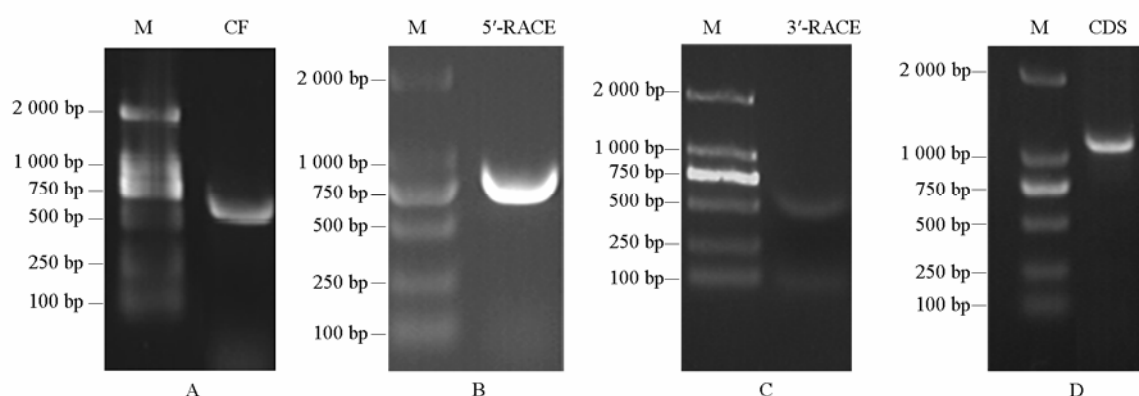


图 1 矮生山茶‘恨天高’*CrGA20ox1* 的克隆

M: 分子量标准 DL2000; CF: 保守片段。

Fig. 1 Cloning of *CrGA20ox1* from *C. reticulata* 'Hentiangao'

M: DL2000 DNA marker; CF: Conservative fragment.

2.2 *CrGA20ox1* 的生物信息学分析

利用 DNAMAN 软件对‘恨天高’及同源性较高的多个物种 (如荔波连蕊茶、茶树、烟草等) 的 *GA20ox* 氨基酸序列进行多序列比对, 结果表明, N 末端有较大差异外, 其他区域都比较保守, 与荔波连蕊茶及茶树的同源性高达 99%, 与其他物种的同源性也都超过 80%。系统发育树分析也表明‘恨天高’*CrGA20ox1* 所编码的蛋白序列与荔波连蕊茶及茶树亲缘关系十分紧密 (图 2)。

利用 Prot Param 在线分析蛋白质理化特性, 发现‘恨天高’*CrGA20ox1* 编码的蛋白与同源性较高的其他植物的差别不大, 13 种植物的氨基酸数均在 376 ~ 392 之间, 等电点在 5.79 ~ 7.59 之间, 不稳定系数为 30.08 ~ 38.88, 都属于稳定性蛋白。

利用 HNN 软件对‘恨天高’CrGA20ox1 编码的蛋白质二级结构分析发现, α -螺旋占 33.07%、无规则卷曲占 51.18%、延伸连占 15.75%, 无 β -转角, 与荔波连蕊茶、茶树等同源性较高的植物相比发现, 蛋白二级结构都以无规则卷曲为主, 其次为 α -螺旋和延伸链, 均没有 β -转角等区域。

Swidd-model 同源建模预测‘恨天高’CrGA20ox1 编码的蛋白三级结构以无规则卷曲作为主要骨架, 其次为 α -螺旋, 与其他植物一样, 并与预测的二级结构分析结果基本一致。利用 NCBI Conserved Domain Search 进行保守域在线分析, 结合其他植物的同源 GA20ox1 分析结果, 发现编码的蛋白都存在 DIOX_N 和 20G-FeII_Oxy 两个结构域, 包含相同的保守基元, 如与 2-酮戊二酸有关的保守序列 NYYPXCQKP 和保守的 H 和 D 残基, 还有与 GA 底物结合有关的 LPWKET 基元。

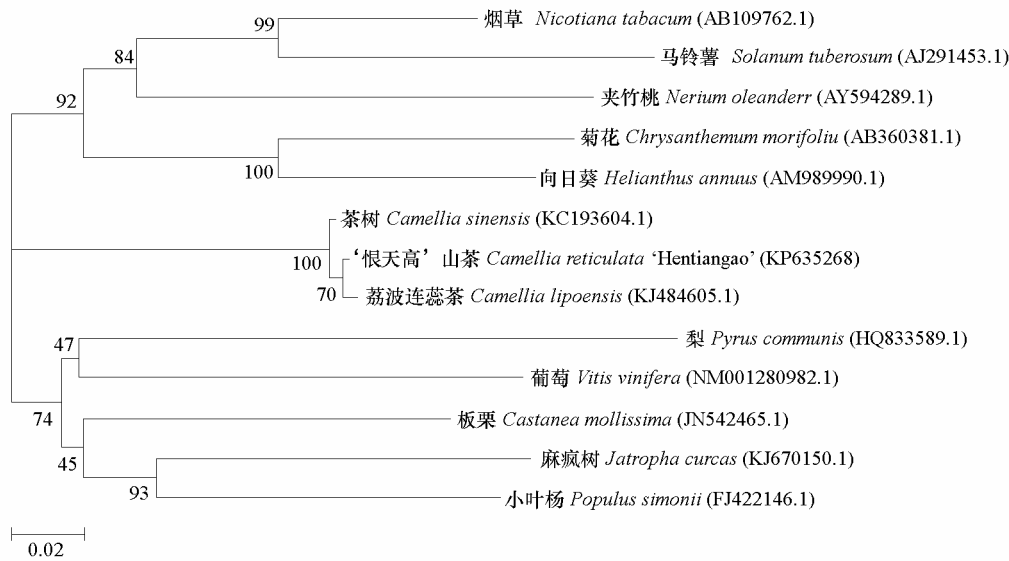


图 2 矮生山茶‘恨天高’GA20ox 与其他植物 GA20ox 系统发育树分析

Fig. 2 The phylogenetic tree analysis of GA20ox from *C. reticulata* 'Hentiangao' and GA20oxs from other species

2.3 GA20ox1 在不同山茶中的表达分析

4 种山茶嫩叶中的 GA20ox1 表达量差异明显 ($P < 0.05$) (图 3, A), 其中‘恨天高’中表达量最低, 岳麓连蕊茶和金花茶分别是‘恨天高’的 2.01 倍和 3.22 倍, 浙江红山茶为 6.44 倍; GA20ox1

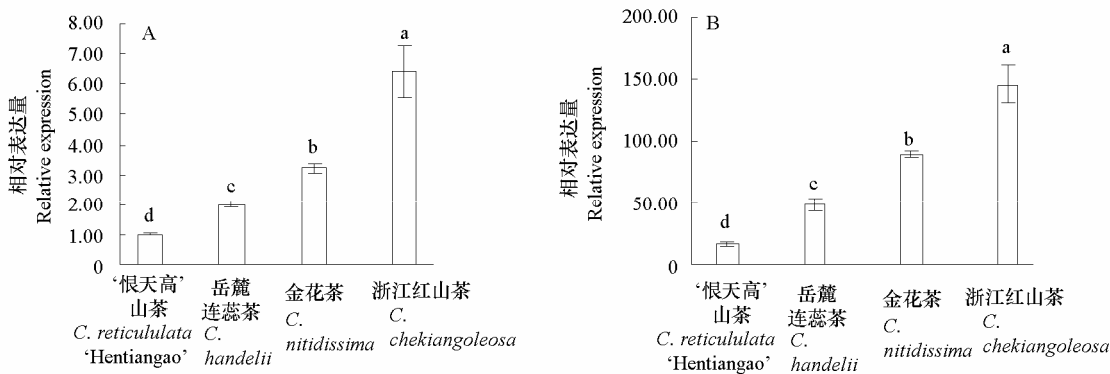


图 3 GA20ox1 在不同山茶嫩叶 (A) 和茎尖 (B) 中的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of GA20ox1 in tender leaves (A) and shoot tips (B) of different camellia species

在茎尖中的表达情况与嫩叶相似（图 3，B）。4 种山茶嫩叶及茎尖 *GA20ox1* 表达量均随着株高的递增而增加（ $P < 0.05$ ）。比较发现，‘恨天高’茎尖表达量约为嫩叶的 15.93 倍，浙江红山茶约为 22.69 倍，岳麓连蕊茶约为 24.37 倍，金花茶约为 27.76 倍，表明 *GA20ox1* 在茎尖表达量远高于嫩叶，茎尖中 *GA20ox1* 的表达情况是决定植株高矮的主要因素之一。

2.4 正义、反义表达载体构建

pGEM-T-*CrGA20ox1* 正、反向重组载体中的正义和反义 *CrGA20ox1* 与 pBI121 重组后，重组质粒用 *Xba* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定，切下的小片段与 *CrGA20ox1* 片段大小一致（图 4），表明成功构建了植物正义表达载体 pBI121-*CrGA20ox1*₊ 和植物反义表达载体 pBI121-*CrGA20ox1*₋。

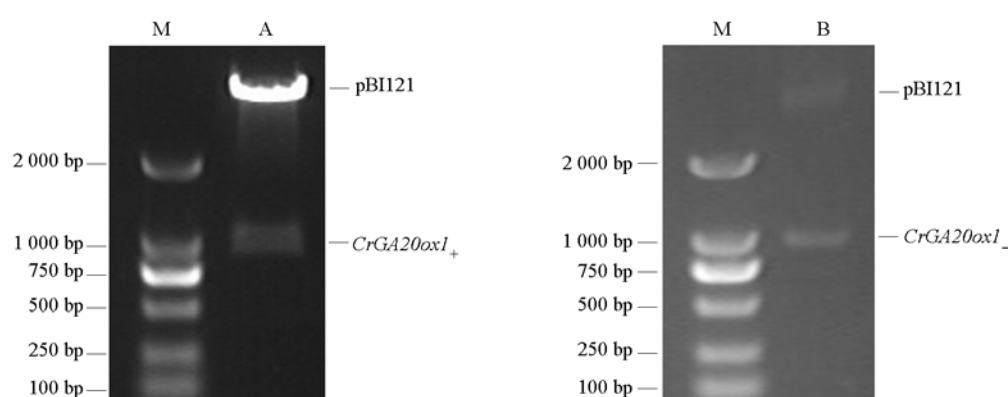


图 4 正义、反义表达载体 pBI121-*CrGA20ox1*₊ (A) 和 pBI121-*CrGA20ox1*₋ (B) 双酶切验证

Fig. 4 Enzyme-digestion of pBI121-*CrGA20ox1*₊ (A) and pBI121-*CrGA20ox1*₋ (B) recombinant expression vectors

2.5 转基因烟草阳性株系的鉴定

正义、反义 *CrGA20ox1* 转化烟草 RT-PCR 检测结果显示，转化阳性植株能够分别扩增出与 *CrGA20ox1* 及 *CusA* 基因大小一致的条带，对照则没有此条带（图 5，A、B），由此可以确定正义、反义目的基因成功整合到烟草基因组中。

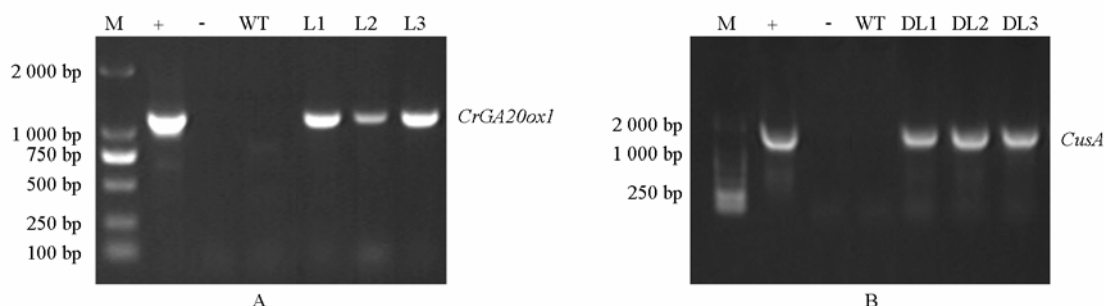


图 5 转正义 *CrGA20ox1* 烟草植株 (L1 ~ L3) 和反义 *CrGA20ox1* 烟草植株 (DL1 ~ DL3) RT-PCR 检测

A: 正义 *CrGA20ox1* 转化烟草 PCR 扩增产物; B: 反义 *CrGA20ox1* 转化烟草 PCR 扩增产物;

M: 分子量标准 DL 2000; +: pBI121 质粒; -: 双蒸水; WT: 野生型。

Fig. 5 Detection of sense *CrGA20ox1* transgenic tobacco plants (L1 - L3) and anti-sense *CrGA20ox1* transgenic plants (DL1 - DL3) by RT-PCR

A: PCR identification of sense *CrGA20ox1* transgenic tobacco; B: PCR identification of anti-sense *CrGA20ox1* transgenic tobacco;

M: DL2000 DNA marker; +: pBI121-*CrGA20ox1*₊ positive; -: ddH₂O; WT: Wild type.

2.6 转基因植株 *CrGA20ox1* 的表达分析

实时荧光定量 PCR 分析 (图 6) 发现, 野生型中没有检测到 *CrGA20ox1* 表达, 表达量为 0, 而正义 *CrGA20ox1* 转化烟草 T_0 代植株 L1 ~ L3 的表达量均显著提高 ($P < 0.05$), 表达量高达 58.94 ~ 194.07, 平均 108.02; 反义 *CrGA20ox1* 转化烟草 T_0 代植株 DL1 ~ DL3 的烟草同源 *GA20ox1* 表达量差异显著 ($P < 0.05$), 平均为野生型的 44%。因此, 通过超表达或沉默表达 *CrGA20ox1* 能改变烟草植株的高矮且变化明显。

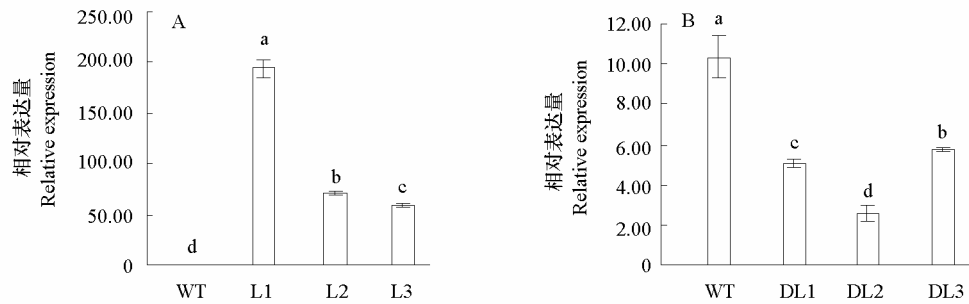


图 6 *CrGA20ox1* 在正义转化烟草 (A) 和烟草同源 *GA20ox1* 在反义转化烟草 (B) 中的表达
Fig. 6 Relative expression of *CrGA20ox1* gene in sense transgenic tobaccos (A) and *GA20ox1* homologous gene in anti-sense transgenic tobaccos (B)

2.7 转基因烟草植株形态变化

在株高形态上, 正义 *CrGA20ox1* 转化 T_0 代株系 L1 ~ L3 定植 30 d 后株高明显高于野生型, 平均高 3.59 倍 (图 7, 图 8); 反义 *CrGA20ox1* 转化 T_0 代株系 DL1 ~ DL3 表现出矮生特性, 株高平均



图 7 转基因烟草 T_0 代及 T_1 代植株
Fig. 7 T_0 and T_1 generation of transgenic tobacco plants

为野生型的 51%; T_1 代定植 20 d 后, L1 ~ L3 的株高也显著高于野生型 ($P < 0.05$), 平均高 3.90 倍; DL1 ~ DL3 株高低于野生型, 平均为野生型的 53% (图 7, 图 8)。

在叶间距形态性状上, 正义 *CrGA20ox1* 转化 T_0 代株系 L1 ~ L3 定植 30 d 后第 3 与第 4 功能叶间距明显大于野生型 ($P < 0.05$), 平均为野生型的 2.14 倍; 反义 *CrGA20ox1* 转化 T_0 代株系 DL1 ~ DL3 第 3 与第 4 功能叶间距只有野生型的 26% ~ 36%, 平均为 30%; T_1 代定植 20 d 后, L1 ~ L3 第 3 与第 4 功能叶间距也显著高于野生型 ($P < 0.05$), 平均高 3.96 倍; DL1 ~ DL3 第 3 与第 4 功能叶间距则显著小于野生型, 平均为野生型的 50% (图 7, 图 8)。

根据以上形态指标分析发现, 转正义 *CrGA20ox1* 可以显著促进烟草植株增高, 节间伸长, 而转反义 *CrGA20ox1* 则明显抑制烟草植株生长, 表现出株形矮化, 节间缩短, 且植株增高及矮生表型在两代间稳定遗传。

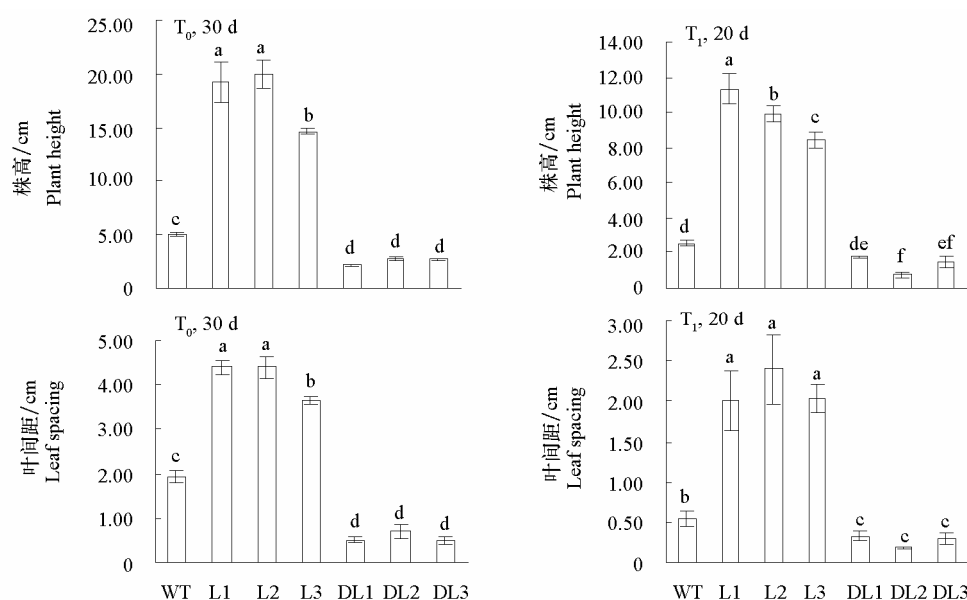


图 8 转基因烟草各项形态指标
Fig. 8 Morphological indexes of transgenic tobacco plants

3 讨论

立地条件相同且生长年龄相近的 4 种山茶 *GA20ox1* 表达量差异较大, 由低到高依次是‘恨天高’、岳麓连蕊茶、金花茶、浙江红山茶, 表现出与其株高呈明显正相关的趋势。从 4 种山茶的株形比较发现, ‘恨天高’树形较紧凑, 生长缓慢, 植株较矮, 而浙江红山茶树形开张, 株形高大。研究显示 *GA20ox1* 的表达与提高活性 GA 含量具有直接的关系 (Kamiya & Garcia-Martinez, 1999; Vidal et al., 2003); 当拟南芥体内活性 GA 水平低时, *GA20ox1* 表达量则显著提高 (Rieu et al., 2008)。由此可见, 植株低矮的‘恨天高’*GA20ox1* 表达量较低, 而株形高大的浙江红山茶 *GA20ox1* 表达量则较高, 株高处于中间的岳麓连蕊茶和金花茶 *GA20ox1* 表达量也处于中等水平。姜志昂等 (2013) 在苹果中也发现 *MdGA20ox1* 的表达量与苹果株高呈正相关趋势。

植物 GA 代谢突变引起的矮生突变体分两类, GA 缺陷型和 GA 不敏感型。大多数突变体由于

编码 GA 合生相关酶的基因缺失, 导致 GA 合成水平降低, 表现为植物矮生, 叶色加深 (Ait-Ali et al., 1999; Carrera et al., 1999)。GA 不敏感型突变体由于信号传导过程中基因突变, 导致信号传递中断或受阻, 体内活性 GA 水平变化得不到响应, 从而诱导植物矮生, 叶色深绿, 花期延迟 (Hedden & Proebsting, 1999)。从基因结构来看, 生物信息学分析发现‘恨天高’*CrGA20ox1* 与其他植物同源性较高, 编码的蛋白相似性也较高; 从基因功能研究发现, 正义 *CrGA20ox1* 转化烟草植株增高, 而反义 *CrGA20ox1* 转化烟草植株低矮, 说明 *CrGA20ox1* 功能正常。因此‘恨天高’*CrGA20ox1* 表达量较低, 可能是由 GA 合成途径中 *GA20ox1* 上游基因突变所引起。另外, ‘恨天高’信号传导通路的相关研究目前还没有类似报道, 因此‘恨天高’是否属于 GA 不敏感型突变体有待进一步研究。

正义、反义 *CrGA20ox1* 转化烟草不同株系表达分析结果显示, 同一基因在不同株系中的表达量亦不相同, 随着 *CrGA20ox1* 表达量的提高, 正义 *CrGA20ox1* 转化烟草株高增加和节间伸长的表型性状更加明显; 而随着烟草同源 *GA20ox1* 表达量的降低, 反义 *CrGA20ox1* 转化烟草植株矮生程度也随之加剧。同一基因在不同转基因株系中的表达量差异可能与植物表达载体中含有的 CaMV35S 启动子表达非特异有关 (Wang & Oard, 2003), 而且转化烟草植株中目的基因的插入位点存在随机性以及旁侧序列对外源基因活性产生的位置效应也有影响关系 (Chandler & Vaucheret, 2001; Kim et al., 2007)。

转基因烟草形态指标测定显示, 株高及叶间距在正义、反义 *CrGA20ox1* 转化植株中均显著变化, 与野生型比较发现, 正义 *CrGA20ox1* 转化植株表现出株高增加、叶间距伸长; 而反义 *CrGA20ox1* 转化植株则表现出矮生、叶间距缩短的表型。这些现象表明 *CrGA20ox1* 具有调控植株高矮、节间长短的重要功能。将正义 *CrGA20ox1* 整合到烟草基因组中, 在 CaMV35S 启动子的作用下能够高效表达 (Battraw & Hall, 1990)。因此, 过表达后 *GA20ox* 酶活性提高, 植物体内 GA 含量也随之增加; 棉花 *GhGA20ox1* 在烟草中过量表达后, *GA20ox* 酶活性增强, 转基因植株中 GA 含量也随之明显增加, 其植株高度显著增加 (Xiao et al., 2006); Eriksson 等 (2000) 将拟南芥 *GA20ox* 正义转化到杨树中发现转基因杨树体内 GA 含量水平提高了 20 倍, 而且植株主干明显伸长。反义表达 *CrGA20ox1*, 可以使植物细胞合成特异性的反义 RNA, 从而抑制烟草同源 *GA20ox1* 的生物功能, 使其酶活性下降, 从而降低体内 GA 含量; 水稻 *sd1* 突变体由于 *GA20ox* 编码框序列缺失, 致使 *GA20ox* 失活, GA 合成受阻, 内源活性 GA 降低, 植株矮生 (Sasaki et al., 2002); Jia 等 (2009) 发现, *GA20ox* 的 *sdw1* 的内含子中出现 SNP 位点, 从而导致大麦秆缩短。

References

- Ait-Ali T, Frances S, Weller J L, Reid J B, Kendrick R E, Kamiya Y. 1999. Regulation of gibberellin 20-oxidase and gibberellin 3 β -hydroxylase transcript accumulation during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiology*, 121 (3): 783 - 791.
- Appleford N E J, Lenton J R. 1991. Gibberellins and leaf expansion in near-isogenic wheat lines containing *Rht 1* and *Rht 3* dwarfing alleles. *Planta*, 183: 229 - 236.
- Battraw M J, Hall T C. 1990. Histochemical analysis of CaMV35S promoter β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Molecular Biology*, 15 (4): 527 - 538.
- Carrera E, Bou J, Garcia-Martinez J L, Part S. 2000. Changes in *GA20*-oxidase gene expression strongly affect stem length, tube induction and tuber yield of potato plants. *The Plant Journal*, 22 (3): 247 - 256.
- Carrera E, Jackson S D, Prat S. 1999. Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato. *Plant Physiology*, 119 (2): 765 - 774.
- Chandler V L, Vaucheret H. 2001. Gene activation and gene silencing. *Plant Physiology*, 125 (1): 145 - 148.

- Coles J P, Phillips A L, Croker S J, Lepe R G, Lewis M J, Hedden P. 1999. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *The Plant Journal*, 17: 547 – 563.
- Eriksson M E, Israelsson M, Olsson O, Moritz T. 2000. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nature Biotechnology*, 18: 784 – 789.
- Guan Kai-yun, Li Ji-yuan, Wang Zhong-lang. 2014. *Camellias of China*. Hangzhou: Zhengjiang Science and Techology Publishing House: 260. (in Chinese)
- 管开云, 李纪元, 王仲朗. 2014. 中国茶花图鉴. 杭州: 浙江科学技术出版社: 260.
- Hedden P. 1997. Gibberellin biosynthesis: Enzyme genes and their regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 431 – 460.
- Hedden P, Proebsting W M. 1999. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*, 119: 364 – 370.
- Jia Q J, Zhang J J, Westcott S, Zhang X Q, Bellgard M, Lance R, Li C D. 2009. GA-20 oxidase as a candidate for the semidwarf gene *sdw1/denso* in barley. *Functional and Integrative Genomics*, 9: 255 – 262.
- Jiang Zhi-ang, Sun Jian-she, Peng Jian-ying, Shao Jian-zhu. 2013. Isolation, subcellular location and expression of *MdGA20ox1* gene from apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (12): 2373 – 2381. (in Chinese)
- 姜志昂, 孙建设, 彭建营, 邵建柱. 2013. 苹果 *MdGA20ox1* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析. *园艺学报*, 40 (12): 2373 – 2381.
- Kamiya Y, Garcia-Martinez J L. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Current Opinion in Plant Biology*, 2 (5): 398 – 403.
- Kim S I, Veena, Gelvin S B. 2007. Genome-wide analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration sites in the *Arabidopsis* genome generated under non-selective conditions. *The Plant Journal*, 51 (5): 779 – 791.
- Lange T, Hedden P, Graebe J E. 1994. Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 8522 – 8566.
- Richards D E, King K E, Ait-Ali T, Hardberd N P. 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 52: 67 – 88.
- Rieu I, Eriksson S, Powers S J, Gong F, Griffiths J, Woolly L, Benlloch R, Nilsson O, Thomas S G, Hedden P, Phillips A L. 2008. Genetic analysis reveals that C19-GA 2-oxidation is a major gibberellin inactivation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20 (9): 2420 – 2436.
- Sasaki A, Ashikari M, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Swapan D, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush G S, Kitano H, Matsuoka M. 2002. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature*, 416: 701 – 702.
- Vidal A M, Ben-Cheikh W, Talon M, Garcia-Martinez J L. 2003. Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta*, 217 (3): 442 – 448.
- Wang J, Oard J H. 2003. Rice ubiquitin promoters: Deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. *Plant Cell Reports*, 22: 721 – 714.
- 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.
- Xiao Y H, Ye Y F, Feng Y, Li X B, Luo M, Hou L, Luo X Y, Li D M, Pei Y. 2006. Functional expression of the cotton gibberellic acid oxidase homologous gene *GhGA20ox1* in tobacco. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32 (5): 563 – 569.