

# 苹果 *MdKS*、*MdKOA1* 基因克隆与表达分析

姜志昂, 彭建营, 孙建设

(河北农业大学园艺学院, 保定 071000)

**摘要:** 内根-贝壳杉烯合成酶基因 (*KS*)、内根-贝壳杉烯酸氧化酶基因 (*KOA*) 是赤霉素合成途径的关键基因。通过 touchdown PCR 从短枝富士茎尖组织中克隆得到 *KS* 和 *KOA* 基因的开放阅读框 (ORF), 分别命名为 *MdKS* (GenBank 登录号 KF437681) 和 *MdKOA1* (GenBank 登录号为 KF437682)。 *MdKS* 和 *MdKOA1* 基因的 ORF 分别为 2211 bp、1509 bp。氨基酸同源性分析表明, *MdKS* 与其他物种的氨基酸序列具有 45.2% ~ 98.8% 的同源性; 而 *MdKOA1* 与其他物种的氨基酸序列同源性为 42.8% ~ 99.4%。亚细胞定位显示, *MdKS* 蛋白定位于细胞核、细胞质和细胞质膜; 而 *MdKOA1* 蛋白定位于细胞质和细胞质膜。荧光定量表明, *MdKS* 与 *MdKOA1* 基因在 SH40、SH28 嫁接品种短枝富士不同组织中的表达模式基本一致。 *MdKS* 和 *MdKOA1* 在半矮化类型 SH28 嫁接短枝富士的茎尖、幼果与枝条中的表达量高于矮化类型 SH40 的嫁接品种。

**关键词:** *MdKS*; *MdKOA1*; 克隆; 亚细胞定位; 表达

## Isolation and Expression of *MdKS* and *MdKOA1* Gene in Apple

JIANG Zhi-ang, PENG Jian-ying, SUN Jian-she

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

**Abstract:** *Ent*-kaurene synthase (*KS*) and *ent*-kaurenoic acid oxidase genes (*KOA*) are critical genes in the pathway of gibberellins biosynthesis. In this research, *KS* and *KOA* genes in apple, designated as *MdKS* (GenBank accession number: KF437681) and *MdKOA1* (GenBank accession number: KF437682), were isolated from the apical tissues of 'spur-type Fuji' apple by touchdown PCR. The ORF length of *MdKS* gene was 2211bp, while *MdKOA1* gene was 1509bp. Amino acid sequence analysis revealed that the *MdKS* sequence had 45.2% -98.8% similarity with those of other plants and the *MdKOA1* sequence had 42.8% -99.4% similarity with other plants. Subcellular localization assays showed that the *MdKS* protein was located in the nucleus, the plasma, and the plasma membrane, while the *MdKOA1* protein located in the plasma and plasma membrane. Relative expression showed that the trend of expression of *MdKS* and *MdKOA1* genes were the same in SH40 and SH28 grafted cultivar 'spur-type Fuji'. The expression of *MdKS* and *MdKOA1* gene in the apical tissues, young fruits, and branch barks of semi-dwarf type SH28 grafted cultivar 'spur-type Fuji' were higher than dwarf type SH40 grafted cultivar.

**Key words:** *MdKS*; *MdKOA1*; cloning; subcellular location; expression

赤霉素 (GA, gibberellin acid) 是一种广泛存在于高等植物体内的四环二萜羧酸, 是调节植物生长发育的五大激素之一。主要功能是促进种子发芽、叶片扩展、嫩芽和茎的伸长、毛状体发育等过程。其中, 对果树树体大小调控, 是目前国内外的研究热

点<sup>[1-2]</sup>。因此, 开展苹果中 GAs 合成相关基因的分离、定位及表达分析, 有助于探讨苹果 GAs 合成的分子机理、认识相关基因在苹果生长发育过程中的作用以及为后续研究奠定基础。

目前, GAs 的生物合成途径已经比较清楚, 该过

收稿日期: 2013-07-25 修回日期: 2013-09-04 网络出版日期: 2014-01-24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.13430/j.cnki.jpgr.2014.02.020.html>

基金项目: 国家现代苹果产业技术体系 (CARS-28)

第一作者研究方向为果树结实生理与分子生物学。E-mail: jiangzhiang2007@163.com

通信作者: 彭建营, 研究方向为果树分子生物学。E-mail: pjy@hebau.edu.cn

孙建设, 研究方向为苹果砧木评价与利用。E-mail: jiansheapple@163.com

程需要多种酶的参与,包括柯巴焦磷酸合酶(CPS, copalyl pyrophosphate synthase)、内根-贝壳杉烯合成酶(KS, *ent*-kaurene synthase)、内根-贝壳杉烯氧化酶(KO, *ent*-kaurene oxidase)、内根-贝壳杉烯酸氧化酶(KAO, *ent*-kaurene acid oxidase)、GA20-氧化酶(GA20ox, GA20-oxidases)和 GA3 $\beta$ -羟化酶(GA3ox, GA3-oxidases)等。H. Aach 等<sup>[3]</sup>研究发现 KS 位于快速分裂的植物组织的质体基质中,并在小麦(*Triticum aestivum*)的整个营养生长期均表现出非常高的活性,尤其在节间伸长的时候,KS 酶活性迅速增加。KS 基因最早是从南瓜(*Cucurbita maxima*)未成熟的种子中分离得到的,其突变严重影响植株的发育<sup>[4]</sup>。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的研究中发现, *ga2* 矮化突变体是由 KS 基因的功能缺失造成的,对该突变体序列分析发现,正是 cDNA 中单碱基发生突变导致终止密码子提前出现,从而导致 KS 基因编码的 KS 蛋白失活<sup>[5]</sup>。M. Margis-Pinheiro 等<sup>[6]</sup>研究水稻(*Oryza sativa*) *OsKS1* 缺失突变体发现该突变体相比野生型可以正常发芽,且根生长无异常;但苗期茎伸长受抑制、叶色深绿,后期表现为严重矮小不开花,喷施 GA 后可以迅速恢复。KOA 隶属于 CYP450 蛋白家族中的 CYP88A 亚家族,催化贝壳杉烯酸形成 GA12。前人通过玉米(*Zea mays*) *dwarf3* 矮化突变体<sup>[7-8]</sup>、大麦(*Hordeum vulgare*) *grd5* 矮化突变体<sup>[9]</sup>、豌豆(*Pisum sativum*) *na* 突变体<sup>[10]</sup>,发现 KAO 基因突变也会造成植株矮化。

苹果矮化密植栽培是利用矮化砧和矮化技术使树木矮小紧凑,合理密植,达到早果、丰产、优质、低耗、高效的目的。随着苹果生产的发展,苹果栽培制度由乔化砧稀植向矮化密植改变,已成为当前国内外发展的趋势。对果树矮化机理进行深入研究,有助于推动苹果矮化栽培的进一步发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以 5 年生苹果矮化砧木 SH40(*Malus domestica* × *M. Honanensis*)、SH28(*M. domestica* × *M. Honanensis*)嫁接品种短枝富士(*M. domestica* Borkh. 'Spur-type Fuji')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 日取嫁接短枝富士的茎尖、幼叶、成熟叶片、花蕾、枝皮及在 5 月 12 日取短枝富士幼果,置于盛有液氮的冰壶带回实验室,放入超低温冰箱保存备用。

感受态细胞 DH5 $\alpha$  购自北京全式金公司,真核表达载体 pCamE-GFP 由河北农业大学农学院棉花育种课题组惠赠。LA *Taq* 酶、平末端克隆载体 PMD19-T、限制性内切酶 *Sal* I、*Kpn* I 购自于大连宝生物公司(Takara)。T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 New England Biolabs(NEB)公司。

### 1.2 *MdKS* 与 *MdKAOI* 基因开放阅读框的克隆

按照天根植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取苹果总 RNA。cDNA 第一链合成参照全式金 Easy-Script 反转录试剂盒说明进行操作。根据 GenBank 已登录的苹果 KS 基因(登录号:JQ281521.1)去除终止密码子后设计引物 KS1 和 KS2;根据电子克隆的方法,去除终止密码子后设计 KOA 基因引物 KOA1 和 KOA2(表 1)。*MdKS* 基因的克隆采用 touchdown PCR 程序扩增:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 40 s,54 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 2.5 min,共 4 个循环;94 °C 变性 40 s,68 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 2.5 min,共 4 个循环;然后每进行 4 个循环,退火降低 2 °C,直至退火温度降低至 60 °C;再每 4 个循环,退火降低 1 °C,直至退火温度为 56 °C,进行 25 个循环,72 °C 延伸 10 min。*MdKAOI* 基因克隆的反应程序:退火自 73 °C 始,每 4 个循环降低 2 °C 直至 65 °C;然后每 4 个循环,退火降低 1 °C,直至退火为 60 °C,进行 25 个循环。

PCR 反应体系:cDNA 1  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L,10 × PCR buffer 5  $\mu$ L,dNTP 8  $\mu$ L,*Taq* 酶 0.5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 33.5  $\mu$ L,总体积 50  $\mu$ L。

### 1.3 亚细胞定位载体的构建

以 *MdKS* 和 *MdKAOI* 基因扩增产物的阳性克隆提取质粒,经限制性内切酶 *Sal* I 和 *Kpn* I 37 °C 酶切 3 h,用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接到 pCamE-GFP 载体上,获得 GFP/目的基因的融合表达载体。然后再转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞、菌液 PCR 筛选、酶切鉴定阳性克隆,并对阳性克隆进行测序验证。

### 1.4 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 的使用说明并加以改进,基因枪轰击受体材料参照孔佑宾<sup>[11]</sup>的方法操作。

### 1.5 荧光定量表达

分别提取 SH40 与 SH28 嫁接短枝富士的茎尖、幼叶、成熟叶片、花蕾、枝皮及幼果的总 RNA,采用全式金 EasyScript 反转录试剂盒反转录合成 cDNA,作为模板。

表 1 引物序列及用途

Table 1 Sequence and application of primers

编号 Serial no.	序列(5'-3') Primer sequence	用途 Use
KS1	<u>GTCGAC</u> ATGTTCCACAAGGTTGATCTCT	<i>MdKS</i> 基因 ORF 扩增
KS2	<u>GGTACC</u> CAGTTCGCTGAGAAGGATAGGT	Complete ORF amplification of <i>MdKS</i> gene
KOA1	<u>GTCGAC</u> ATGCTGCTGGGTTTGGTGGTGG	<i>MdKAO1</i> 基因 ORF 扩增
KOA2	<u>GGTACC</u> AGCCCCTGCAGATCCACATTC	Complete ORF amplification of <i>MdKAO1</i> gene
KS-F	ACCGTGAAGAACTCAACCATCT	荧光定量 RT-PCR
KS-R	CAGCAGCAGAGAAGTAACACTATG	Fluorescent quantitative RT-PCR
KOA-F	AACATTCTCACTCACCGTCTTTTC	荧光定量 RT-PCR
KOA-R	GCTCCTGAACCAAACCAATACT	Fluorescent quantitative RT-PCR
ACTIN-F	CTGAACCCAAAGGCTAATCG	荧光定量 RT-PCR
ACTIN-R	ACTGGCGTAGAGGAAAGAA	Fluorescent quantitative RT-PCR

下划线部分 'GTCGAC' 和 'GGTACC' 分别为添加的 *Sal* I 和 *Kpn* I 酶切位点

Underlined positions 'GTCGAC' and 'GGTACC' in primers represent restriction enzyme sites of *Sal* I and *Kpn* I, respectively

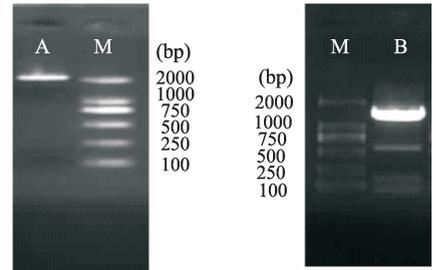
根据已获得的 *MdKS* 及 *MdKAO1* 基因 ORF, 设计荧光定量特异性引物 KS-F、KS-R 及 KOA-F、KOA-R(表 1)。以苹果的  $\beta$ -ACTIN 基因为内参, 设计内参基因特异性引物 ACTIN-F 与 ACTIN-R(表 1), 采用荧光定量 PCR 对 *MdKS* 和 *MdKAO1* 基因进行表达分析。反应体系包括 cDNA 2  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, 25  $\mu$ L 反应 Mix, 21  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 总体系 50  $\mu$ L。反应程序为 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环。反应结束后, 确认 Real Time PCR 的扩增曲线和溶解曲线, 试验 3 次重复, 记录数值, 结果采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果 *MdKS* 与 *MdKAO1* 基因 ORF 的获得

以短枝富士苹果茎尖组织总 RNA 反转录产物为

模板进行 touchdown PCR 扩增, 以 KS1 与 KS2 为引物, 扩增 *MdKS* 基因 ORF, 经测序后得到 2211 bp 长的序列; 以 KOA1 与 KOA2 为引物, 扩增 *MdKAO1* 基因 ORF, 经测序后得到 1509 bp 长的序列(图 1)。

图 1 *MdKS* 基因 ORF (A)、*MdKAO1* 基因 ORF (B) 扩增结果Fig. 1 Amplification results of *MdKS* gene ORF (A) and *MdKAO1* gene ORF (B)

### 2.2 *MdKS* 及 *MdKAO1* 基因推导的氨基酸序列的同源性分析

通过 DNAMAN 6.0 软件对 *MdKS*、*MdKAO1* 基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中其他物种的 KS、KAO 编码的氨基酸序列进行同源性比较。结果表明: KS 蛋白 N 端保守性较低, C 端相对保守。对短枝富士与富士、西洋梨、板栗、苜蓿等 11 个物种的 *MdKS* 蛋白进行同源性比较(图 2)。其与富士同源性为 98.8%, 与西洋梨同源性为 97.8%, 与节节麦最低为 45.2%。软件分析表明 KOA 蛋白 N 端保守性同样较低, C 端相对保守。将短枝富士的 *MdKAO1* 蛋白与其他 11 个物种的 KOA 蛋白同源性比较表明(图 3), *MdKAO1* 蛋白与富士同源性最高为 99.4%, 与西洋梨同源性次之为 98.8%, 与苜蓿同源性最低为 42.8%。

### 2.3 基因表达载体的构建及亚细胞定位

将扩增得到的 *MdKS* 与 *MdKAO1* 基因 ORF 与 PMD19-T 载体进行连接, 转入大肠杆菌后, 挑取阳性克隆送样测序。采用限制性内切酶 *Sal* I 与 *Kpn* I 双酶切测序正确的质粒, 并与双酶切的 pCamE-GFP 载体连接转化, 再进行酶切鉴定。

将空载体 pCamE-GFP、pCamE-*MdKS*-GFP 与 pCamE-*MdKAO1*-GFP 分别转化到幼嫩的洋葱表皮细胞中。借助于绿色荧光蛋白信号, 结果显示(图 4): 不含外源基因的载体 pCamE-GFP 分布在细胞核和细胞质膜, 也分布于液泡、内质网等结构上且呈絮状荧光; 而 pCamE-*MdKS*-GFP 载体的洋葱表皮细胞内绿色荧光仅分布在细胞核、细胞质和细胞质膜中; pCamE-*MdKAO1*-GFP 载体的洋葱表皮内绿色荧光只分布于细胞质和细胞质膜中。

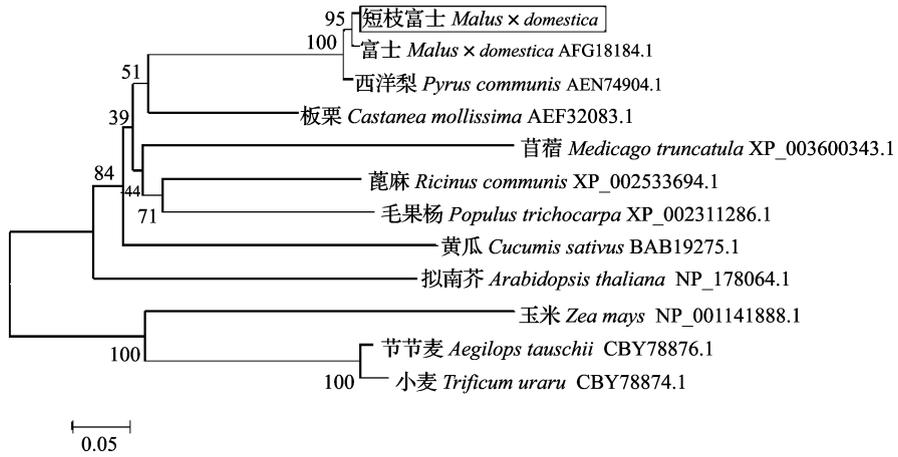


图 2 短枝富士与其他物种 KS 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of KS amino acid sequence of 'spur-type Fuji' and other various species

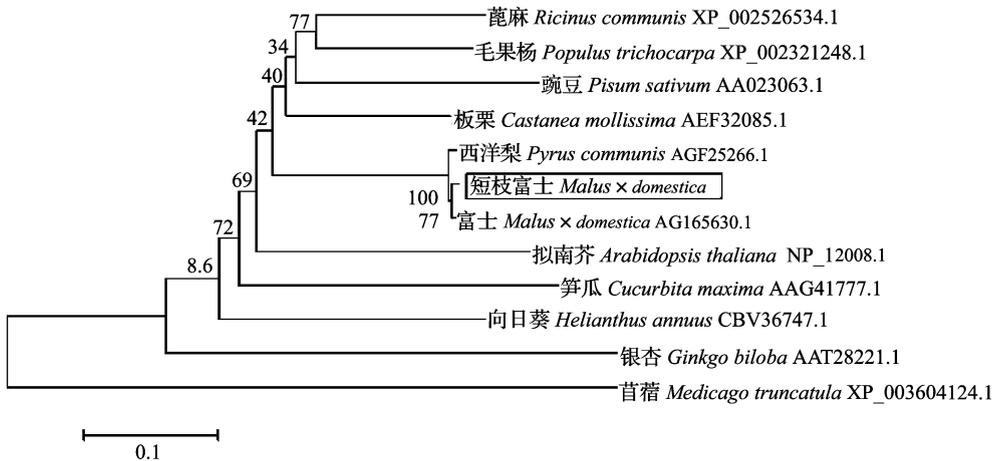
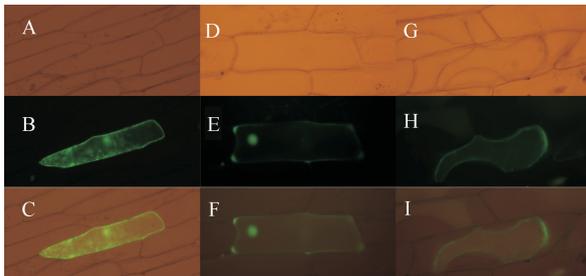


图 3 短枝富士与其他物种 KOA 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of KOA amino acid sequence of 'spur-type Fuji' and other various species



A, D, G: 洋葱表皮细胞外观图; B, E, H: 荧光显微镜下 GFP 蛋白、MdKS 蛋白、MdKAO1 蛋白的绿色荧光信号; C: A 和 B 的重叠; F: D 和 E 的重叠; I: G 和 H 的重叠

A, D, G: Outlook of onion epidermal cells, B, E, H: Images of green fluorescence of GFP protein, MdKS-GFP, and MdKAO1-GFP in onion cells under the fluorescence microscope, C: Overlaid of A and B, F: Overlaid of D and E, I: Overlaid of H and I

图 4 GFP, MdKS, MdKAO1 在洋葱表皮细胞中的瞬时表达 Fig. 4 The transient expression of GFP, MdKS, and MdKAO1 proteins in onion cells

### 2.4 SH40 与 SH28 嫁接短枝富士不同组织上的 *MdKS* 与 *MdKAO1* 基因的相对定量表达情况

为确定 2 个基因在嫁接短枝富士不同组织的表达情况, 利用来自各个组织的 cDNA 为模板, 以苹果 *ACTIN* 基因作为内参, 进行荧光定量 PCR, 结果如图 5 和图 6 所示。 *MdKS* 基因在 SH28 及 SH40 嫁接短枝富士均为枝皮的表达量最高、幼果次之; 茎尖、幼叶、成熟叶片表达量较高; 花蕾和花的表达量最低。且半矮化类型的 SH28 嫁接短枝富士 *MdKS* 基因在茎尖、花蕾、幼果及枝皮的表达量均高于矮化类型的 SH40 嫁接品种; 该基因在幼叶、成熟叶及花的表达量 SH40 嫁接品种高于 SH28 嫁接品种 (图 5)。 *MdKAO1* 基因在 2 个不同砧木嫁接品种的表达模式也为在枝皮的表达量最高, 幼果次之; 茎尖、幼叶及成熟叶较高; 花蕾和花

中最低(图6)。SH28 嫁接品种在茎尖、幼果及枝皮的表达量均高于 SH40 嫁接品种;在幼叶、成熟

叶、花中的表达量 SH40 嫁接品种高于 SH28;在花蕾中的表达量二者相当。

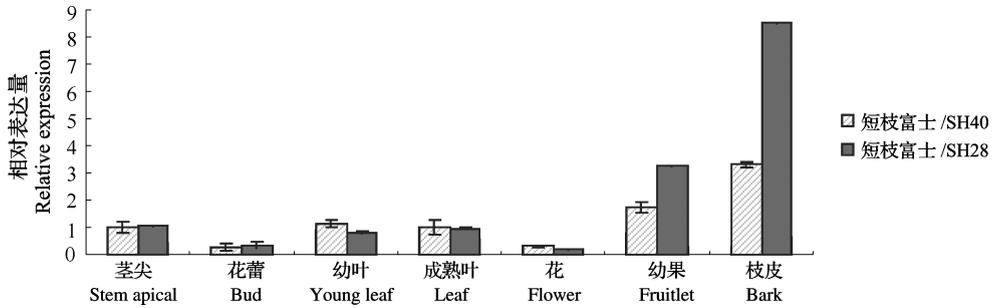


图5 *MdKS* 基因在苹果不同组织中的表达水平

Fig. 5 Expression of *MdKS* gene in different tissues of apple

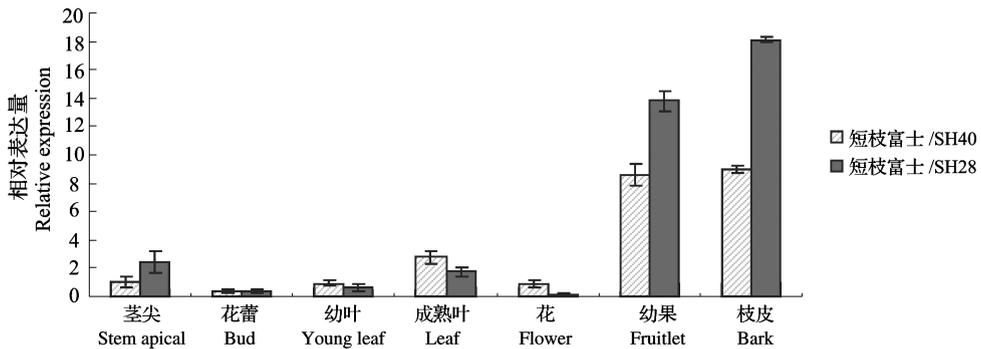


图6 *MdKOA1* 基因在苹果不同组织中的表达水平

Fig. 6 Expression of *MdKOA1* gene in different tissues of apple

### 3 讨论

赤霉素是较大的萜类化合物家族,在植物整个生命循环过程中起着重要的调控作用。高等植物的 GAs 合成前体是牻牛儿基焦磷酸(GGPP, geranylpyrophosphate)<sup>[12]</sup>,合成主要包括3个阶段。第1阶段是在柯巴焦磷酸合酶(CPS)及内根-贝壳杉烯合成酶(KS)催化下完成内根-贝壳杉烯的合成,主要在质体中完成。第2阶段是在内根-内根贝壳杉烯氧化酶(KO)和内根-贝壳杉烯酸氧化酶的作用下生成GA12-醛,主要在内质网膜上完成。第3阶段从GA12-醛到其他各种类赤霉素的合成,主要在细胞质中完成<sup>[13-14]</sup>。赤霉素的调控作用主要是通过自身的合成和代谢,且参与其他信号途径的协同作用,控制植物的生长和发育<sup>[15]</sup>。目前,尽管GA的合成途径已经基本确定,并且已经在苹果中克隆得到多个赤霉素合成途径基因,但是多数研究只是进行了生物信息学分析,并未做更进一步的研究<sup>[1-2]</sup>。本研究根据GenBank已登录的基因以及电子克隆技术,获得了苹果KS和KAO基因的ORF。其中MdKS

蛋白与富士苹果的氨基酸同源性为98.8%,与西洋梨的氨基酸同源性则为97.8%;MdKOA1氨基酸序列与富士苹果的氨基酸同源性更高为99.4%,与西洋梨的同源性为98.8%,这可能与同属蔷薇科有关。MdKS及MdKOA1与部分物种同源性较低说明其基因在物种进化过程中发生了较大的变异,但2个氨基酸序列与其他物种具有相同的保守结构域,也证实了克隆得到的基因序列的准确性。

人类进入功能基因组时代后,大量植物基因相继被克隆。为了研究得到的基因功能,经常将该外源基因转入模式植物如烟草、拟南芥等植物中进行功能的验证及进行亚细胞定位研究<sup>[16]</sup>。目前,较多的亚细胞定位方法是将质粒与金粉或钨粉包埋后,采用基因枪轰击洋葱内表皮<sup>[16-21]</sup>。杨光等<sup>[18]</sup>研究与葡萄花发育相关的7个基因发现其中VvSOC1、VvFT、VvFLC和VvAP2定位于细胞核上,认为该蛋白发挥了转录因子的作用;VvFUL、VvAP3与GFP融合蛋白定位于细胞质膜和细胞核上,认为这两种蛋白既有转录因子的功能又有维持细胞膜稳定的作用。王西成等<sup>[14]</sup>对葡萄赤霉素部分基因及赵晓鑫

等<sup>[21]</sup>对沙冬青 *AmLEA5* 基因的亚细胞定位研究也支持上述观点。本试验通过亚细胞定位研究表明,苹果 *MdKS* 蛋白定位于细胞核、细胞质和细胞质膜,而 *MdKAOI* 蛋白主要定位于细胞质与细胞质膜。这表明 *MdKS* 蛋白可能既在细胞质体中参与了赤霉素的合成也具有一定的转录因子的作用,且具有保护细胞膜的作用;而 *MdKAOI* 蛋白可能既发挥了合成的作用也具有维持细胞膜稳定性的作用。

荧光定量 PCR 技术是目前比较流行采用的定量技术,结果灵敏可靠,是目前检测基因表达水平的重要技术手段。P. Hedden<sup>[22]</sup>认为 GAs 具有促进茎的伸长、种子和果实发育的功能。本试验采用荧光定量 PCR 技术对分别嫁接于 SH28 和 SH40 的短枝富士的茎尖、花蕾、花、幼叶、成熟叶、枝皮及幼果等不同组织 GAs 合成途径的 *MdKS* 和 *MdKAOI* 基因进行了分析研究。结果表明,2 个基因在不同组织中的表达显示了显著的差异性。*MdKS* 和 *MdKAOI* 基因在 SH28 和 SH40 嫁接品种枝皮的表达量最高,这可能与枝皮包含分生组织,需维持茎的加粗生长有关。W. Li 等<sup>[23]</sup>研究发现 *OsKSI* 基因只能在水稻野生型植株的叶片和茎中检测出。本试验嫁接品种的幼果中 2 个基因的表达量仅次于枝皮中基因的表达量,可能与果实的膨大生长有关。王西成等<sup>[14]</sup>研究葡萄 *KO* 基因发现其在花的表达量最低,本试验研究发现 *MdKS* 和 *MdKAOI* 基因在 2 个砧木嫁接品种的花和花蕾中的表达均较低,说明 GAs 合成前期的基因主要与植株的生长有关。本研究还发现 2 个基因在茎尖、幼叶和成熟叶中均高度表达,与维持 GAs 的稳定合成有关<sup>[23-25]</sup>。

邓晓云等<sup>[26]</sup>研究发现 *MdKS* 基因在柱形苹果生长的初期,普通型苹果新梢的 *MdKS* 基因的表达量均显著高于柱形苹果。程飞飞等<sup>[27]</sup>通过比较 *PcKS* 基因在中矮 1 号、锦香中的表达表明,*PcKS* 基因的表达量与植株矮化程度呈负相关。欧春青等<sup>[28]</sup>通过检测中矮 1 号、锦香、早酥矮化品种 *PcKAOI* 基因的表达量,也得出了上述结果。本试验利用荧光定量 PCR 研究了 SH40 与 SH28 两种苹果砧木嫁接短枝富士不同组织的表达情况。试验结果表明,半矮化类型的 SH28 嫁接短枝富士在茎尖、幼果、以及枝皮等组织上 *MdKS* 基因与 *MdKAOI* 基因均显著高于矮化类型 SH40 嫁接短枝富士。茎尖是植物体快速生长的组织,其伸长生长决定了株高。可能由于嫁接不同砧木后,*MdKS* 基因和 *MdKAOI* 基因在茎尖表达量减少,因此出现不同

矮化程度的短枝富士。本研究结果与前人的研究基本一致,间接证明了赤霉素是影响树体矮化的重要因素。

目前的研究认为与 GAs 早期合成相关的酶 CPS、KS 及 KO 是被单基因编码的<sup>[29-32]</sup>。*KOA* 在前期研究中也认为是单基因编码的酶蛋白<sup>[31-32]</sup>。而在拟南芥<sup>[10]</sup>、豌豆<sup>[9]</sup>、向日葵<sup>[33]</sup>中至少发现了 2 个 *KAO* 基因,在本试验及欧春青等<sup>[26]</sup>对梨 *KOA* 基因的克隆均只发现 1 个 *KAO* 基因。因此,在蔷薇科物种中,*KAO* 基因是否是多拷贝还需要进一步的研究。

引起果树矮化的机理较为复杂,完全阐明矮化机理,需要在信号转导、赤霉素合成及多激素协同等多方面进行系统的研究。本试验克隆得到了苹果 *MdKS* 和 *MdKAOI* 基因的 ORF,并且对 2 个基因的亚细胞定位和不同组织上的表达情况进行了研究,为进行砧木早期筛选以及通过基因干涉和转基因工程验证其功能奠定了一定的基础。

#### 参考文献

- [1] 田伟,田义轲,王彩虹,等. 苹果内根-贝壳杉烯氧化酶基因的克隆及序列分析[J]. 果树学报, 2011, 28(1): 1-7
- [2] 李节法,田义轲,王彩虹,等. 梨贝壳杉烯氧化酶基因 *PpKO* 的克隆及生物信息学分析[J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1575-1582
- [3] Aach H, Bode H, Robinson D G, et al. *ent*-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissues [J]. *Planta*, 1997, 202(2):211-219
- [4] Yamaguchi S, Saito T, Abe H, et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme *ent*-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) [J]. *Plant J*, 1996, 10: 203-213
- [5] Gil J, García-Martínez J L. Light regulation of gibberellin A<sub>1</sub> content and expression of genes coding for GA20-oxidase and GA3β-hydroxylase in etiolated pea seedlings [J]. *Physiol Plantarum*, 2000, 108:223-229
- [6] Margis-Pinheiro M, Zhou X R, Zhou Q H, et al. Isolation and characterization of a *Ds*-tagged rice (*Oryza sativa* L.) GA-responsive dwarf mutant defective in an early step of the gibberellin biosynthesis pathway [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23:819-833
- [7] Phinney B O. *Plant Growth Substances* [M]. New York: Academic, 1982:101-110
- [8] Winker R G, Helentjaris T. The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis [J]. *Plant cell*, 1995, 7(8):1307-1317
- [9] Helliwell C A, Chandler P M, Pool A, et al. The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellins biosynthesis pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4):2065-2070
- [10] Davidson S E, Elliott R C, Helliwell C A, et al. The pea gene *NA* encodes *ent*-kaurenoic acid oxidase [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131(1):335-344
- [11] 孔佑宾. 大豆紫色酸性磷酸酶 *GmPAP4* 和 *GmPAP14* 克隆与功能研究[D]. 保定:河北农业大学,2012
- [12] Hedden P, Phillips A L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(12):523-530

- [13] 黄先忠,蒋才富,傅向东,等. 赤霉素作用机理的分子基础与调控模式研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(5):499-510
- [14] 王西成,任国慧,房经贵,等. 葡萄赤霉素合成相关基因克隆、亚细胞定位和表达分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(11):2224-2231
- [15] 罗霞,康宗利,樊金娟. 赤霉素的信号转导途径[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(1):191-194
- [16] 邢浩然,刘丽娟,刘振国. 植物蛋白质的亚细胞定位研究进展[J]. 华北农学报, 2006(21):1-6
- [17] 张松,黄波,夏学峰,等. 蛋白质亚细胞定位的生物信息学研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34(6):573-579
- [18] 杨光,曹雪,房经贵,等. 葡萄花发育基因的亚细胞定位和表达分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(3):641-650
- [19] Zhou S Y, Zhao W Y, Li H, et al. Characterization of a novel ring finger gene *OsRFPI*, which is induced by ethylene, salicylic acid and blast fungus infection in rice [J]. *Phytopathology*, 2008, 156:396-402
- [20] Lin R M, Zhao W S, Meng X B, et al. Rice gene *OsNAC19* encodes a novel NAC domain transcription factor and responds to infection of *Magnaporthe grisea* [J]. *Plant Sci*, 2007, 172:120-130
- [21] 赵晓鑫,刘美芹,卢存福,等. 沙冬青 *AmLEA5* 基因的生物信息学分析及非生物胁迫下的表达模式[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3):492-500
- [22] Hedden P. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48:431-460
- [23] Li W, Wu J, Weng S, et al. Identification and characterization of *dwarf2*, a loss-function mutation in *DLT/O<sub>5</sub>GRAS-32* affecting gibberethin metabolism in rice [T]. *Planta*, 2010, 232(6):1383-1396
- [24] Yamaguchi S, Saito T, Abe H, et al. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme *ent-kaurene synthase B* from pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) [J]. *Plant J*, 1996, 10(2):203-213
- [25] Davison S E, Smith J J, Helliwell C A. The pea gene *LH* encodes *ent-kaurene oxidase* [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(3):1123-1134
- [26] 邓晓云,戴洪义,梁美霞. 苹果内根-贝壳杉烯合成酶基因的克隆及表达分析[J]. 华北农学报, 2013(2):46-51
- [27] 程飞飞,欧春青,姜淑苓,等. 梨内根-贝壳杉烯合酶基因克隆及表达分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(6):677-682
- [28] 欧春青,姜淑苓,王斐,等. 梨贝壳杉烯酸氧化酶基因 *PcKOA1* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(5):849-858
- [29] Mau C J D, Weat C A. Cloning of casbene synthase cDNA: evidence for conserved structural features among terpenoid cyclases in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:8497-8501
- [30] Richman A S, Gijzen M, Starratt A N, et al. Diterpene synthesis in stevia recruitment: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway [J]. *Plant J*, 1999, 19:411-421
- [31] 魏灵珠,程建徽,李琳. 赤霉素生物合成与信号传递对植物株高的调控[J]. 生物工程学报, 2012, 28(2):144-153
- [32] 武涛,曹家树,虞慧芳. 赤霉素合成基因的克隆以及其相关矮化突变体[J]. 细胞生物学杂志, 2005(27):175-164
- [33] Fambrini M, Mariotti L, Parlanti S, et al. 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 [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 75:431-450