

## 研究报告 Original Papers

## 番荔枝GA20氧化酶基因的克隆与表达分析

刘锴栋<sup>1</sup>, 袁长春<sup>1\*</sup>, 黎海利<sup>1</sup>, 刘金祥<sup>1</sup>, 陈燕<sup>1</sup>, 莫亿伟<sup>2</sup>, 李华富<sup>1</sup><sup>1</sup>岭南师范学院生命科学与技术学院, 广东湛江524048; <sup>2</sup>绍兴文理学院生命科学学院, 浙江绍兴312000

**摘要:** 本研究利用同源克隆和RACE-PCR的方法获得番荔枝GA20ox基因的全长cDNA序列, 命名为*AsGA20ox*, GenBank登录号为KR676623。序列分析表明, 克隆获得的番荔枝*AsGA20ox*基因编码区长为1 257 bp, 编码418个氨基酸。序列比对显示与油棕和海枣等GA20ox的相似度分别为71%和70%。构建类似蛋白系统进化树显示, 番荔枝*AsGA20ox*与簇毛麦、香蕉等分子进化距离较近。预测*AsGA20ox*蛋白定位在细胞外基质和过氧化物酶体中, 不具备信号肽。蛋白质分子量为47.2 kDa, 等电点为6.21。实时定量RT-PCR结果表明, 在不同的组织、不同的器官中, *AsGA20ox*的表达量存在差异, 其中在花蕾期I、未成熟的种子、结果枝的幼嫩茎段和雌蕊中的表达量相对较高。

**关键词:** 番荔枝; *GA20ox*; 基因克隆; 表达模式

## Cloning and Expression Analysis of GA20-Oxidase Gene from Sugar Apple (*Annona squamosa*)

LIU Kai-Dong<sup>1</sup>, YUAN Chang-Chun<sup>1\*</sup>, LI Hai-Li<sup>1</sup>, LIU Jin-Xiang<sup>1</sup>, CHEN Yan<sup>1</sup>, MO Yi-Wei<sup>2</sup>, LI Hua-Fu<sup>1</sup><sup>1</sup>Life Science and Technology School, Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China; <sup>2</sup>College of Life Science, Shaoxing University, Shaoxing, Zhejiang 312000, China

**Abstract:** A full-length cDNA sequence of homologous *GA20ox* gene was cloned by employing homology gene cloning and RACE-PCR from sugar apple (*Annona squamosa* L.), which was named as *AsGA20ox* (GenBank accession KR676623). Sequence analysis showed that the *AsGA20ox* gene has a 1 257 bp open reading frame (ORF) encoding 418 amino acids. Sequence alignment displayed that it was a similarity of 71% and 70% with *GA20ox* of *Elaeis guineensis* and *Phoenix dactylifera*, respectively. The phylogenetic tree showed that sugar apple *AsGA20ox* and *Dasypyrum villosum* *GA20ox* are closest in molecular evolution distance, followed by *Musa acuminata* subsp. *Malaccensis* *GA20ox*. It was speculated that *AsGA20ox* protein is located in the extracellular matrix and peroxisomal. It do not have a signal peptide. The putative protein molecular weight was 47.2 kDa and its theoretical isoelectric point was 6.21. The real-time PCR results suggested that *AsGA20ox* gene showed a high transcription level in flower buds I, immature seeds, young stems of fruiting branches and pistils. The results laid a solid foundation for further research on *AsGA20ox* protein structure and the relationship between the gene and plant flower development.

**Key words:** sugar apple (*Annona squamosa*); *GA20ox*; gene cloning; expression pattern

赤霉素(gibberellins, GA)作为一种重要的植物激素, 参与控制多种植物发育和生理过程。这些过程包括种子萌发、茎的伸长、叶片伸展、表皮毛发育、根的生长, 以及花和果实发育等(Olszewski等2002; 岳川等2012)。GA是在成花调控中研究得较多和深入的一种植物内源激素。GA并不是独立调控植物成花诱导, 其他激素也能够与GA相互渗透, 共同调控植物成花(Yamaguchi等2013)。GA对不同植物成花具有明显不同的影响。外施GA时, 促使一些长日照植物在短日照条件下成花,

阻断内源GA生物合成则延迟开花。GA20氧化酶(GA20-oxidase, GA20ox)是GA生物合成过程中的

收稿 2015-06-10 修定 2015-09-06

资助 广东省科技计划项目(2013B020304008)、国家自然科学基金项目(31201586)、广东省教育厅科技创新项目(2013KJCX0124)、湛江市热带特色资源植物技术开发重点实验室项目(2014A06008)和湛江师范学院科研创新团队资助项目(2013CXTD05)。

\* 通讯作者(E-mail: yuanchangchun@163.com; Tel: 0759-3183271)。

关键酶,它催化转化GA<sub>12</sub>/GA<sub>53</sub>生成GA<sub>9</sub>/GA<sub>20</sub>,而后者是具有生物活性的GA<sub>4</sub>和GA<sub>1</sub>的前体(Xu等1995; Desgagné-Penix和Sponsel 2008)。因此,深入研究GA20ox的生物合成过程,克隆调控这一过程的关键基因,并对其表达产物进行分析就显得尤为必要。目前拟南芥(Phillips等1995)、水稻(Lisa等2002)、荔波连蕊茶(肖政等2014)、小叶杨(卫尊征等2009)、簇毛麦(刘英华等2009)、棉花(邓伟等2008)和梨(宣利利等2011)等多种植物的GA20ox基因都已经被克隆。

番荔枝又称林檎、释迦果,为番荔枝科(Annonaceae)落叶小乔木,是热带、亚热带优稀水果。番荔枝在我国南方均有种植,尤以广东、广西、海南、福建等省份有较大面积栽培(刘锴栋等2013; Liu等2015)。番荔枝的芽为复芽,其腋芽被叶柄抱嵌,若叶片不脱落,腋芽一般不会萌发。在生产实践中,主要于3月至8月将老熟枝条中任一节位的叶片摘除,并结合剪顶或摘心就可以抽发新梢,同时,先发新梢80%以上能成花(赵金凤等2014; Soler和Cuevas 2009)。番荔枝的茎的生长发育、成花诱导等分子机制还未有深入研究,在番荔枝上有关GA20ox基因的研究也未见报道。

因此,本研究以番荔枝为材料,采用RT-PCR和RACE技术克隆出GA20ox基因全长(命名为*AsGA20ox*),利用生物信息学方法对其序列进行分析,并对该基因在植株中的不同器官及组织中的表达特异性进行了初步研究,为下一步研究该基因在番荔枝发育中的功能奠定基础。

## 材料与amp;方法

### 1 植物材料及试剂

番荔枝(*Annona squamosa* L.)栽培于岭南师范学院热带果树创新团队试验地,常规栽培管理。于2014年7~8月分别采集花蕾期I(1 mm<花蕾<2 mm)、花蕾期II(3 mm<花蕾<4 mm)、开花前期(花瓣轻微张开)及开花期(花瓣张开)的花。同时采集结果枝和营养枝的幼嫩叶片、顶芽、茎段、去叶后的腋芽、雄蕊、雌蕊、萼片、花瓣、未成熟的种子、成熟的种子。不同的花期和不同的组织均重复3次。取样后立即用液氮速冻后保存于-80℃冰箱中备用。

RACE试剂盒(SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit, Clontech), pMD18-T vector, RNA反转录试剂盒(PrimeScript™ RT Reagent Kit和PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser), LA Taq, dNTPs, DL 2000 DNA Marker, SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。RNAprep pure植物总RNA提取试剂盒和聚合酶链式反应(PCR)产物胶回收试剂盒购自天根生物公司。本研究所用引物均由上海生工有限公司合成。其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 2 RNA的提取和cDNA合成

取适量番荔枝相应组织部位的材料在液氮中研磨,参照RNAprep pure植物总RNA提取试剂盒中的方法,提取番荔枝相应部位的总RNA。采用PrimeScript™ RT Reagent Kit(用于基因克隆)和PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser(用于定量PCR)反转录试剂盒将番荔枝相应部位的RNA反转录为第一链互补链DNA(cDNA)。反转录的反应条件及程序均按照试剂盒说明书进行。

### 3 *AsGA20ox*基因全长的克隆

本实验利用DNAMAN生物软件对已知物种GA20ox同源基因进行同源比对分析,找到GA20ox基因共有的保守序列区域,并在其上设计一对基因特异引物3GSP1和5GSP1(表1)。

以番荔枝叶片样本的反转录产物为模板,通过PCR扩增番荔枝GA20ox基因特异片段。反应体系如下: cDNA 1.0 μL, 10×LA Taq Buffer 2 μL, 1 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs 1 μL, LA Taq Polymerase 0.5 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup>上下游引物各1.0 μL, 终体积为20 μL。反应程序: 94℃预变性5 min, 然后进行30个循环: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 循环结束后72℃延伸反应10 min, 4℃保温。1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,对扩增所得目的片段进行切胶回收。将回收的PCR产物与测序载体pMD19-T连接后,转化DH5α感受态细胞,在氨苄青霉素抗性平板上进行蓝白斑筛选,再经PstI酶切检测后选择阳性克隆进行测序。

### 4 *AsGA20ox*基因编码蛋白的生物信息学分析

利用ExPASy Proteomics Server上的在线工具ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)对*AsGA20ox*基因编码蛋白的理化性质进行分析预测。采用SOMPA (<http://www.expasy.ch/tools/>)对

表1 引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
3GSP1	GAGAAAATGAGAGCACAGA	<i>GA20ox</i> 基因片段分离
3NGSP1	GGAGAGAGCTGCGGCTACG	巢式引物
5GSP1	CAACGAAGGCATCTCGCC	<i>GA20ox</i> 基因片段分离
5NGSP1	TCGTCAACGAACACCTGCA	巢式引物
3'-CDS Primier	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)30VN	3'-RACE引物
5'-CDS Primier	(T)25VN	5'-RACE引物
BD SMART IITM	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	试剂盒自带通用引物
ORF Up	ATGGCCATCAAAGACTGCAT	<i>GA20ox</i> 开放阅读框的扩增
ORF Dn	TCACTTGCTCTCTCCAGTC	同上
<i>AsGA20ox</i> RT Up	GGAGATGAACAAGGTGGTGAA	<i>GA20ox</i> 荧光定量引物
<i>AsGA20ox</i> RT Dn	GGGTGAAGTTGAGGAAAGATGA	同上
<i>AsActin</i> -F	GACACCATCCCCAGAATCC	荧光定量内参引物
<i>AsActin</i> -R	CCCCAGAAGAACACCCTGT	同上

AsGA20ox和Phyre2在线软件(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>)基因编码蛋白进行二级结构分析与3D结构建模。使用 SignalP4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行分泌蛋白预测。利用在线软件ProtComp v. 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)进行蛋白定位信号预测。GA20ox蛋白氨基酸序列比对利用 NCBI 的蛋白质序列数据库进行搜索, 并通过ClustalW软件进行作图。通过MEGA 5.1构建neighbor-joining系统进化树, bootstrap重复次数为1 000次, 其他采用默认设置。

根据基因特异引物PCR扩增的达到的同源保守序列, 我们依据RACE操作手册分别设计了3'-RACE, 3'巢式引物(3NGSP1), 5'-RACE, 5'巢式引物(5NGSP1) (表1), 并按要求逆转录生成cDNA第一链。第一轮反应程序为: 94 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 73 °C 3 min, 25个循环。取5 μL产物进行电泳检测, 所有PCR扩增条带均回收测序。利用第一轮PCR得到的产物, 再进行第二次巢式扩增, 扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min, 35个循环, 72 °C 7 min。再次对所有PCR扩增条带均回收测序。依据测序结果, 我们设计一对全长引物, 扩增*AsGA20ox*基因的ORF读码框, 引物分别为: ORF Up和ORF Dn (表1)。

## 5 实时荧光定量PCR (real-time PCR)

提取各样品总RNA, 以Oligo-d(T)为引物, 用AMV反转录酶进行反转录, 参照 PrimeScript 1 Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)方法进行。用反转录后的cDNA作模板。为了提高荧光信号的特异性, 设计实时定量PCR特异引物(*AsGA20ox* RT Up 和*AsGA20ox* RT Dn) (表 1)。根据前期克隆到的番荔枝看家基因*AsActin*设计一对定量内参引物qActin-F和qActin-R, 扩增片段大小为189 bp (表 1)。按照SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>操作说明, 以*AsActin*为内参, 在Bio-Rad iQ5荧光定量PCR仪上进行PCR扩增, 检测基因的相对表达量。荧光定量PCR反应体系为 20 μL: 2×SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 10 μL, 引物各1 μL, cDNA模板1 μL, 超纯水7 μL, 混合加样。PCR反应程序为96 °C 预变性1 min; 95 °C 变性15 s, 60 °C 退火15 s, 72 °C 延伸45 s, 40次循环。每个试验设置3次重复。

## 实验结果

### 1 番荔枝*AsGA20ox*基因全长序列的克隆

通过TRIZOL法提取番荔枝总RNA并用琼脂糖凝胶电泳检测其质量, 结果显示28S和18S条带清楚, 基本无DNA污染, 质量可靠无降解, 可用于后续工作的实验需要。

通过比对已知物种中克隆得到的*GA20ox*同源基因序列的保守区域, 并以此为基础, 设计了一对

基因特异引物,以番荔枝花蕾的cDNA为模板进行PCR扩增,得到一条长约500 bp的特异条带(图1-A)。测序结果表明,该片段与拟南芥、葡萄、簇毛麦和香蕉的*GA20ox*同源基因具有较高的同源性,表明该片段是*GA20ox*在番荔枝中的同源基因片段。

基于前期实验得到的番荔枝*GA20ox*同源基因片段,我们利用Full RACE Kit的使用说明,设计了两条巢式引物及一条3'-CDS引物、一条5'-CDS引物,成功进行了RACE克隆。扩增产物连接pMDT-19载体,转化大肠杆菌感受态,蓝白斑筛选阳性克隆,经菌落PCR、酶切鉴定后送样测序。综合分析测序得到的序列片段,拼接测序结果,用于进一步全长基因的克隆。在此基础上,设计了两条全长序列克隆引物ORF Up和ORF Dn,通过LA Taq DNA聚合酶扩增全长后测序(图1)。通过对测序结果的分析,我们得到了1 257 bp的全长cDNA序列。其中A、T、G、C四种碱基含量分别为23.55% (A)、26.73% (G)、19.97% (T)和29.75% (C)。该cDNA序列被命名为*AsGA20ox*,已经登录GenBank,登录号为KR676623。

## 2 番荔枝*AsGA20ox*基因编码蛋白特性分析

### 2.1 *AsGA20ox*基因全长cDNA序列及氨基酸序列结构分析

通过DNASTar软件分析并结合RACE技术得到的全长基因序列,我们发现*AsGA20ox*基因具有一个完整的开放阅读框,共有1 257个碱基,编码一个含有418个氨基酸的蛋白质。

### 2.2 *AsGA20ox*基因编码蛋白理化性质分析

本研究通过ExPASy的在线软件ProtParam对*AsGA20ox*基因编码蛋白的理化性质进行分析。分析结果显示,该蛋白的分子式为 $C_{2094}H_{3197}N_{579}O_{629}S_{21}$ ,分子量为47.2 kDa,蛋白等电点pI为6.21,带正电残基(Arg+Lys)为45个,带负电残基(Asp+Glu)为51个。进一步分析得到,该蛋白的不稳定系数为46.83,脂肪系数为64.57,平均亲水性系数为-0.502。

### 2.3 蛋白结构域分析

利用在线SignalP4.1Server软件分析发现,*AsGA20ox*蛋白不含信号肽。通过ProtComp v. 9.0软件预测*AsGA20ox*蛋白的亚细胞定位主要在细胞外基质和过氧化物酶体。

该基因编码的氨基酸序列含有*GA20ox*基因家

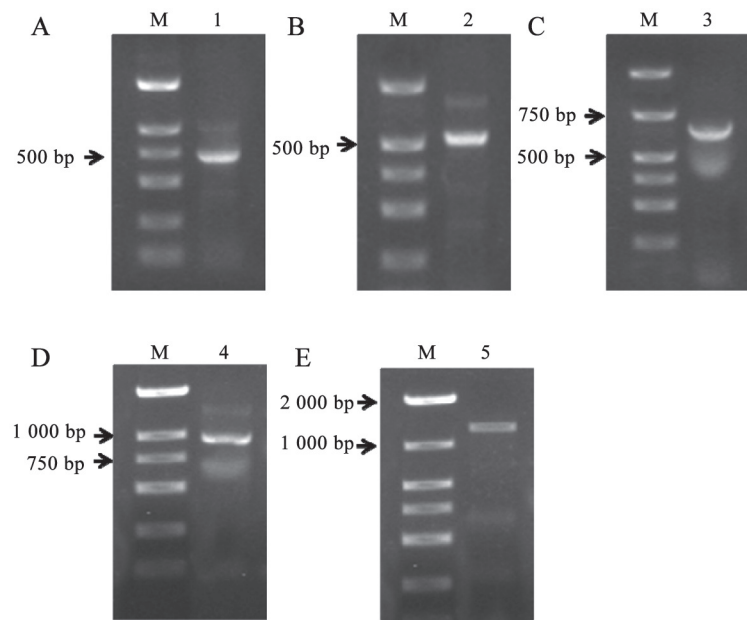


图1 *AsGA20ox*全长基因克隆

Fig.1 Cloning of full length of *AsGA20ox* gene

A: *AsGA20ox* 特异片段扩增产物; B: 3'-RACE第一轮扩增产物; C: 5'-RACE 第一轮扩增产物; D: 5'-RACE 第二轮扩增产物; E: *AsGA20ox*全长基因ORF扩增产物。1~5为PCR产物, M为DL2000 maker。

族的保守域20G-FeII\_Oxy superfamily (图2)。

SOPMA软件分析AsGA20ox蛋白的二级结构显示, 此蛋白有 $\alpha$ 螺旋、 $\beta$ 转角、不规则卷曲和延伸链结构, 其中,  $\alpha$ 螺旋和不规则卷曲所占比例最大, 分别为31.58%和41.39%,  $\beta$ 转角最少仅为8.61% (图3)。

利用Phyre2在线软件进行蛋白3D结构建模, AsGA20ox蛋白的保守结构域三维结构模型如图4所示。结构模型以拟南芥GA20ox为模板, 三维结构预测的相似度不高, 表明番荔枝的AsGA20ox蛋白具有比较大的物种特异性。

### 3 不同植物GA20ox蛋白序列比对与聚类分析

将AsGA20ox的蛋白序列提交至美国国立生物技术信息中心(NCBI)的蛋白序列数据库(<http://>

[blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi))进行BLASTP相似性搜索。从NCBI的非冗余蛋白数据库(Nr)中下载与AsGA20ox蛋白高度同源的15条蛋白序列进行同源比对。所选取的序列包括蓖麻(*Ricinus communis*)、番茄(*Solanum lycopersicum*, NP\_001234070.1)、可可(*Theobroma cacao*, XP\_007038527.1)、莲(*Nelumbo nucifera*, XP\_010255609.1)、毛白杨(*Populus tomentosa*, AFS33148.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP\_1942721)、欧白英(*Solanum dulcamara*, CAB82616.1)、欧洲山杨(*Populus tremula*, CAH59102.1)、葡萄(*Vitis vinifera*, XP\_002272415)、莴苣(*Lactuca sativa*, BAA37127.1)、香蕉(*Musa acuminata* subsp. *Malaccensis*, XP\_009413747.1)、油棕(*Elaeis guineensis*, XP\_010918994.1)、簇毛麦

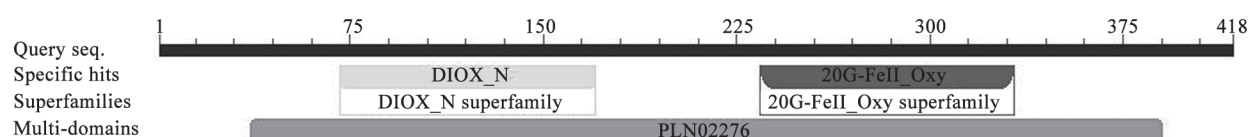


图2 AsGA20ox基因的保守功能结构域分析

Fig.2 Conserved functional domain of AsGA20ox

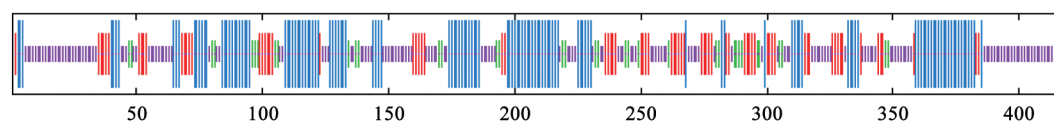


图3 AsGA20ox蛋白的二级结构

Fig.3 The secondary structure of AsGA20ox protein

蓝色表示 $\alpha$ 螺旋, 黄色表示不规则卷曲, 绿色表示 $\beta$ 转角, 红色表示延伸链。

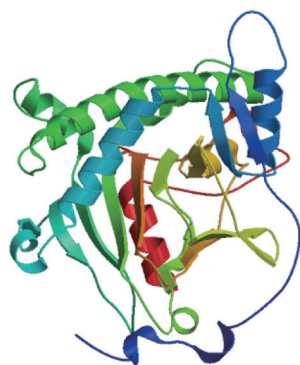


图4 AsGA20ox蛋白三维结构预测

Fig.4 Three-dimensional structure of deduced AsGA20ox protein

(*Dasypyrum villosum*, ACU40931.1)、向日葵(*Helianthus annuus*, CAQ43616)。利用ClustalW软件, 将AsGA20ox蛋白序列与下载得到的15条蛋白序列进行氨基酸同源比对, 发现上述蛋白序列具有极高的序列相似度(图5)。

为了进一步分析GA20ox蛋白在不同物种之间的进化关系, 利用MEGA 5.1软件, 采用neighbor-joining方法构建了不同植物物种间GA20ox蛋白的系统进化树。本研究克隆得到的AsGA20ox蛋白及19个下载得到的同源蛋白经聚类后, 分成两个主要亚家族: 聚类I和聚类II。经过聚类分析, 本研究涉及到的蛋白序列被分成两个大的亚家族:

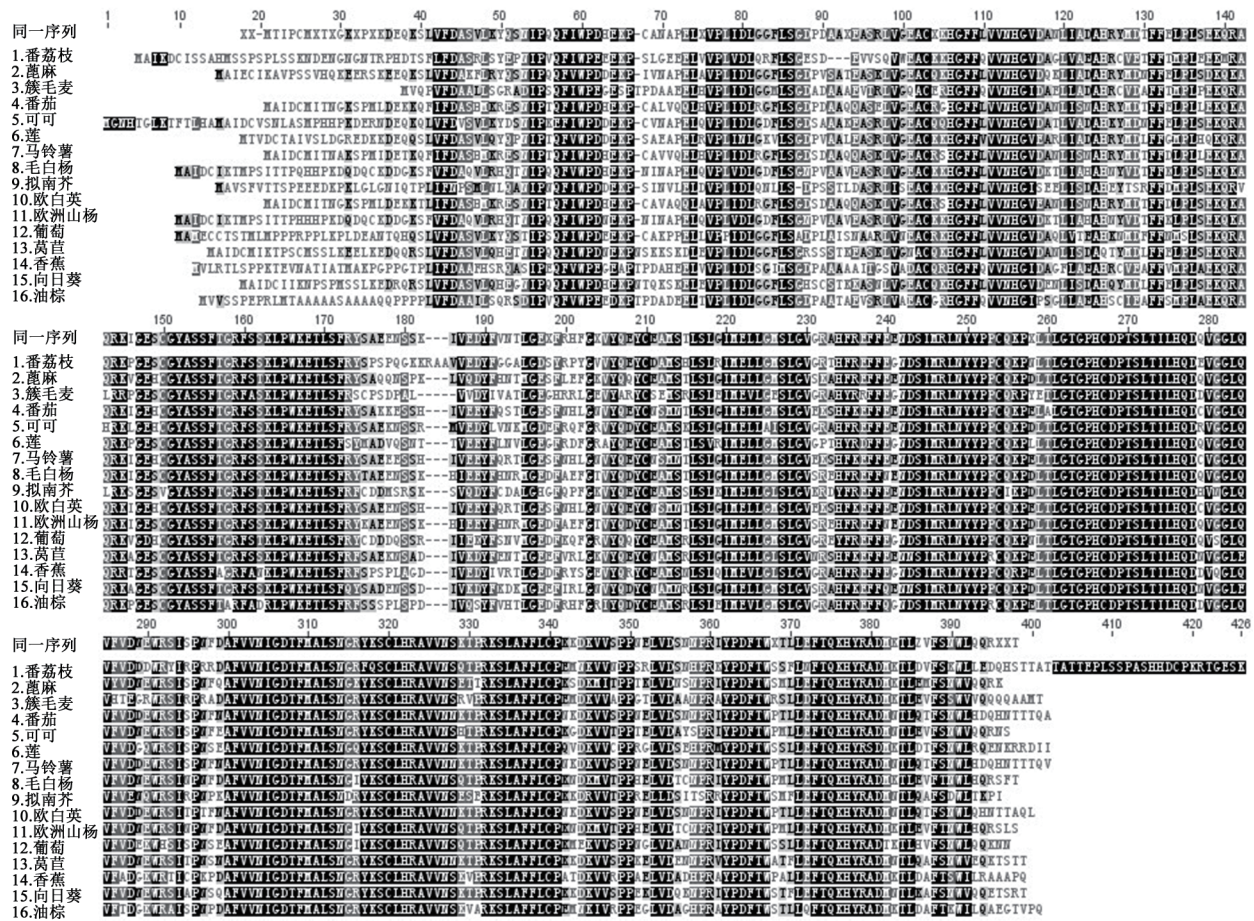


图5 植物GA20ox类蛋白氨基酸序列同源比对

Fig.5 Multiple alignment profile of GA20ox proteins form different plant species

亚家族I和亚家族II。AsGA20ox蛋白属于亚家族II，与簇毛麦、香蕉、海枣和油棕的GA20ox蛋白同源性较高(图6)。

4 AsGA20ox基因组织特异性表达分析

实时定量RT-PCR检测结果表明: AsGA20ox基因在番荔枝的不同组织器官中表达差异较大, 其表达量的大小依次为: 未成熟的种子>结果枝的幼嫩茎段>雌蕊>营养枝的幼嫩茎段>结果枝去叶后的腋芽>营养枝去叶后的腋芽>雄蕊>成熟的种子>结果枝的顶芽>营养枝的顶芽。在营养枝的幼嫩叶片、结果枝的幼嫩叶片、萼片及花瓣中的该基因的表达量较低(图7)。以上结果表明番荔枝中AsGA20ox基因的表达具有组织特异性。

5 AsGA20ox基因花发育不同时期的表达分析

实时定量RT-PCR检测结果表明: 在番荔枝花发育的不同时期, AsGA20ox基因的表达量也不同,

在花蕾期I中表达量最高, 其次是花蕾期II, 表达量最低的是开花前期和开花期(图8)。这说明AsGA20ox基因有可能在花发育初期起到一定的作用。

讨论

赤霉素参与调节植物生长发育的许多过程, 其中调控开花是其重要的功能之一, 阻断内源GA生物合成则延迟开花(张艺能等2014)。GA20ox是最重要的也是目前研究最多的赤霉素生物合成限速酶(李伟和陈晓阳2003)。本试验中AsGA20ox序列是采用同源克隆方法首次从番荔枝中克隆到GA20ox基因, 并对其进行了初步分析。AsGA20ox编码区为1 257 bp, 编码418个氨基酸。通过序列分析, 其具有GA20ox基因共同的保守基元: 与底物结合的高度保守序列LPWKET, 以及与结合2-酮戊二

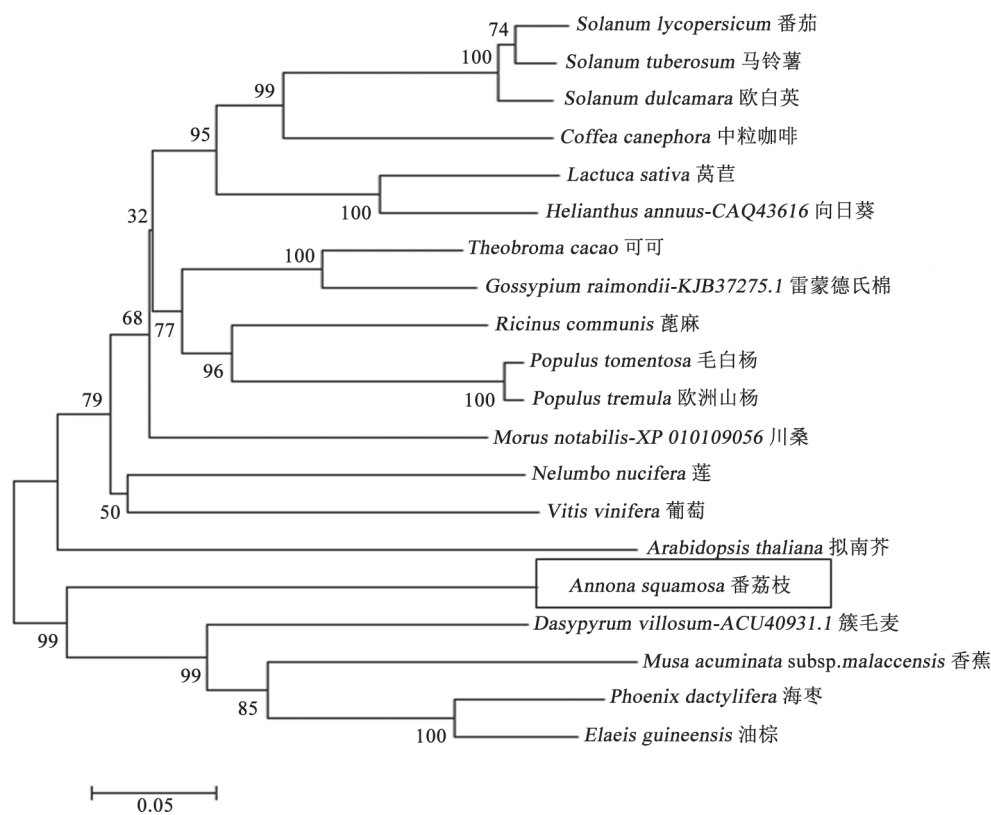
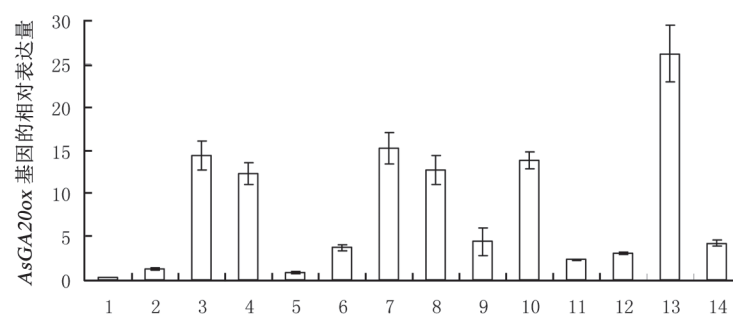


图6 番荔枝AsGA20ox与其他物种GA20ox蛋白的系统进化分析

Fig.6 Phylogenetic evolutionary analyses of GA20ox proteins from different plant species

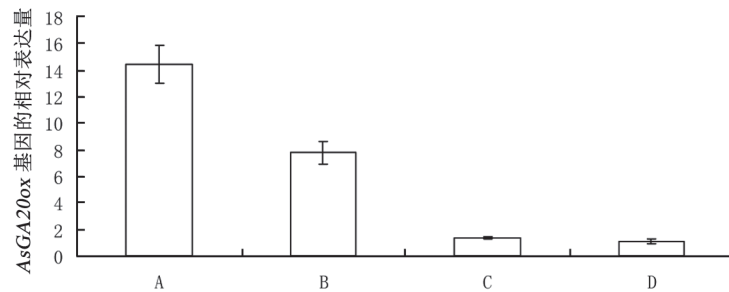
图7 *AsGA20ox*基因在不同组织和器官中的表达Fig.7 Expression pattern of *AsGA20ox* gene in different tissues and organs

1: 营养枝的幼嫩叶片; 2: 营养枝的顶芽; 3: 营养枝的幼嫩茎段; 4: 营养枝去叶后的腋芽; 5: 结果枝的幼嫩叶片; 6: 结果枝的顶芽; 7: 结果枝的幼嫩茎段; 8: 结果枝去叶后的腋芽; 9: 雄蕊; 10: 雌蕊; 11: 萼片; 12: 花瓣; 13: 未成熟的种子; 14: 成熟的种子。

酸有关的保守一致序列NYYPXCQKP。NCBI序列比对结果显示, *AsGA20ox*与其他物种的GA20ox有较高的相似度, 其中与油棕、海枣等的GA20ox的相似度依次为71%、70%。同时, 其他生物信息学分析还表明, *AsGA20ox*蛋白不含有信号肽。而亚细胞定位预测将蛋白定位于细胞外基质和过氧

化物酶体中。由此可见, 所克隆的*AsGA20ox*为GA20ox的同源基因, 这为更加全面地研究赤霉素与番荔枝的生长发育提供了参考。

GA20ox基因的表达在不同植物的组织和器官上存在差异。卫尊征等(2009)通过RT-PCR对小叶杨*PsGA20ox*基因的组织特异性分析时, 发现*Ps-*

图8 *AsGA20ox*基因在不同花发育阶段的表达Fig.8 Expression pattern of *AsGA20ox* in different growth stages of flowers

A: 花蕾期I; B: 花蕾期II; C: 开花前期; D: 开花期。

*GA20ox*基因在成熟木质部中表达最高,在顶端分生组织中有少量表达,在未成熟木质部和嫩叶中表达丰度较高。肖政等(2014)通过荧光定量PCR对*CIGA20ox2*基因在荔波连蕊茶中的组织特异性分析,结果显示:*CIGA20ox2*在茎、叶、根和种子中均有表达,其中在二年生茎段中表达丰度最高,在顶端分生组织中表达最低,在嫩叶中表达丰度较高。本研究结果显示,*AsGA20ox*基因在未成熟的种子、结果枝的幼嫩茎段、雌蕊、营养枝的幼嫩茎段、结果枝去叶后的腋芽、营养枝去叶后的腋芽等有较高的表达,这说明该基因可能参与了番荔枝种子萌发和茎的伸长发育过程。此外,Calderon-Urrea和Dellaporta (1999)研究发现发育中的雌蕊能够产生大量的赤霉素,而高水平的赤霉素能够抑制雄蕊。本研究中*AsGA20ox*基因在雌蕊中表达较高,说明番荔枝雌蕊发育中*AsGA20ox*基因大量表达,有可能促进了赤霉素的合成。本研究结果还显示,*AsGA20ox*主要在成花初期的花蕾中表达量最高,说明其在促进花形成过程中发挥作用;随着花器官的形成,表达量不断降低。这与*GA20ox*基因在其它果树中的表达模式上比较相似。

以上结果表明,*AsGA20ox*基因的表达与番荔枝花发育、茎的伸长发育等阶段有较大的关联。因此,本研究对番荔枝*AsGA20ox*基因的克隆及研究,将为在分子水平上利用反义技术、RNAi干扰技术、定向突变、转基因等手段实现番荔枝株型分子调控和花期调控提供一定的理论基础。

### 参考文献

邓伟,吕立堂,罗克明,李义(2008).棉花GA20-氧化酶基因转毛白杨的研究.西北植物学报,28(6):1095~1100

李伟,陈晓阳,丁霞(2003).高等植物GA20-氧化酶研究进展.生命科学,15(1):42~47

刘锴栋,袁长春,敬国兴,黎海利,刘金祥(2013).外源草酸对采后番荔枝后熟及耐藏性的影响.食品科学,34(14):329~334

刘英华,赵桃,龙海,邓光兵,潘志芬,余懋群(2009).簇毛麦(*Dasy-pyrum villosum*) *GA20ox*基因的分离和鉴定.应用与环境生物学报,15(4):479~482

卫尊征,郭琦,李百炼,张金凤,张德强(2009).小叶杨GA20氧化酶基因的克隆、表达及单核苷酸多态性分析.林业科学,45(4):19~27

肖政,李纪元,范正琪,殷恒福(2014).荔波连蕊茶GA20氧化酶基因的克隆及表达分析.植物研究,34(5):678~686

宣利利,欧春青,王斐,王志刚,程飞飞,李振茹,姜淑琴(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,(5):883~887

岳川,曾建明,曹红利,王新超,章志芳(2012).高等植物赤霉素代谢及其信号转导通路.植物生理学报,48(2):118~128

张艺能,周玉萍,陈琼华,黄小玲,田长恩(2014).拟南芥开花时间调控的分子基础.植物学报,49(4):469~482

赵金凤,刘锴栋,袁长春,黎海利,刘静婷(2014).2种人工催花方法对AP番荔枝新梢生长和成花的影响.西北农林科技大学学报(自然科学版),42(12):133~138

Calderon-Urrea A, Dellaporta SL (1999). Cell death and cell protection genes determine the fate of pistils in maize. Development, 126(3):435~441

Desgagné-Penix I, Sponsel VM (2008). Expression of gibberellin 20-oxidase1 (*AtGA20ox1*) in *Arabidopsis* seedlings with altered auxin status is regulated at multiple levels. J Exp Bot, 59(8):2057~2070

Lisa M, Noriyuki K, Rika Y, Junko S, Haruka M, Yumiko M, Masao T, Mizuho S, Shinobu N, Yuzo M (2002). Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice “green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. DNA Res, 9(1):11~17

Liu KD, Li HL, Yuan CC, Huang YL, Chan Y, Liu JX (2015). Identification of phenological growth stages of sugar apple (*Annona squamosa* L.) using the extended BBCH-scale. Sci Hortic, 181:76~80



- Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 14: S61~S80
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NE, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 108 (3): 1049~1057
- Soler L, Cuevas J (2009). Early flower initiation allows ample manipulation of flowering time in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Sci Hortic*, 121: 327~332
- Xu Y L, Li L, Wu K, Peeters AJM, Gage DA, Zeevaart AD (1995). The *GA5* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (14): 6640~6644
- Yamaguchi N, Wu MF, Winter CM, Berns M, Nole-Wilson S, Yamaguchi A, Coupland G, Krizek B, Wagner D (2013). A molecular framework for auxin-mediated initiation of flower primordia. *Curr Biol*, 24: 271~282