

# 东方百合‘索邦’*GA20ox*的克隆及表达分析

张旭红<sup>1,2</sup>, 孙美玉<sup>1</sup>, 李靖锐<sup>1</sup>, 王 頔<sup>1</sup>, 张金政<sup>1</sup>, 石 雷<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院植物研究所北方资源植物重点实验室/北京植物园, 北京 100093; <sup>2</sup>西北农林科技大学风景园林艺术学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 以东方百合‘索邦’为材料, 利用 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE) 获得编码活性 GAs 合成过程中双加氧酶的基因 *GA20ox*, 对其进行生物信息学分析和表达分析。结果表明, *GA20ox* 全长 1 502 bp, 包括 1 个 1 167 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 388 个氨基酸。*GA20ox* 编码的蛋白存在多个糖基化位点、磷酸化位点和酰化位点。‘索邦’*GA20ox* 和其他物种的 *GA20ox* 蛋白有很高的相似性, 均含有保守的 PLN02276 结构域。‘索邦’*GA20ox* 与姬蝴蝶兰、铁皮石斛、海枣、油棕和椰子等单子叶植物的 *GA20ox* 蛋白具有较高的同源性。实时荧光定量 PCR 分析表明, *GA20ox* 具有时空表达特异性, 在萌芽期之后的茎生根、现蕾期的茎、萌芽期和展叶期的叶片、萌芽期的顶芽等快速发育的组织中有较高的表达。在萌芽期对植株进行高浓度 (200 和 400 mg · L<sup>-1</sup>) GA<sub>3</sub> 处理对其生长的影响最大, 其中 200 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理最有利于株高的增加, 400 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理最有利于地下部分干质量的增加。对萌芽期‘索邦’百合进行 200 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理, 显著抑制其 *GA20ox* 在除鳞片外其他部位的表达, 表达量均在处理后 12 h 降至最低, 其中在茎和基生根中降幅最大, 分别下降了 96.79% 和 94.65%。推测 *GA20ox* 的表达受活性 GAs 的反馈调节, 在调控体内活性 GAs 稳态中发挥重要的作用。

**关键词:** 百合; *GA20ox*; 基因克隆; 基因表达; 株高

**中图分类号:** S 682.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2019) 01-0074-13

## Cloning and Expression Analysis of *GA20ox* Gene in *Lilium* Oriental Hybrids ‘Sorbonne’

ZHANG Xuhong<sup>1,2</sup>, SUN Meiyu<sup>1</sup>, LI Jingrui<sup>1</sup>, WANG Di<sup>1</sup>, ZHANG Jinzheng<sup>1</sup>, and SHI Lei<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Plant Resources and Beijing Botanical Garden, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; <sup>2</sup>College of Landscape Architecture and Arts, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** We cloned a cDNA encoding *GA20ox* from *Lilium* Oriental Hybrids ‘Sorbonne’ using rapid amplification of cDNA ends (RACE). The bioinformatics and expression patterns of *GA20ox* were analyzed in our study. Sequences analysis showed that the cloned *GA20ox* was 1 502 bp in length with an open reading frame (1 167 bp), which encoded 388 amino acids. The putative protein had many glycosylation, phosphorylation and N-myristoylation sites. Alignment of amino acid sequence showed that *GA20ox* of ‘Sorbonne’ shared a PLN02276 binding domain like the *GA20ox* in other species. Phylogenetic analysis revealed that *GA20ox* of ‘Sorbonne’ was highly homologous to *GA20ox* of other monocots,

**收稿日期:** 2018-06-16; **修回日期:** 2019-01-11

**基金项目:** 中国科学院重点部署项目 (KFZD-SW-313); 国家重要野生植物种质资源共享平台开放共享后补助经费项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: shilei\_67@126.com)

including *Phalaenopsis equestris*, *Dendrobium catenatum*, *Phoenix dactylifera*, *Elaeis guineensis* and *Cocos nucifera*. Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) analysis showed that *GA20ox* was highly expressed in stem root after germination, stem of squaring stage, leaf of germination stage and leaf expansion stage, and terminal bud of germination stage, implying the temporal and special regulation of *GA20ox*. The application of high GA<sub>3</sub> concentration in germination stage had great influence on plant growth as plant height and biomass of underground were promoted by 200 mg · L<sup>-1</sup> and 400 mg · L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> treatment, respectively. After treatment of GA<sub>3</sub> at 200 mg · L<sup>-1</sup>, the expression of *GA20ox* was significantly suppressed in all tissues(except for bulb scale)and fell to their lowest level at 12 h, especially in the stem and root with decreasing by 96.79% and 94.65% respectively. These results suggest that the expression of *GA20ox* may be regulated by active gibberellins with a potential feedback mechanism, thus the *GA20ox* may play a key role for the maintenance of endogenous active gibberellins homeostasis in lily.

**Keywords:** *Lilium*; *GA20ox*; gene cloning; gene expression; plant height

在百合生产中, 株高是一个十分重要的性状, 高秆对切花来说是个显著的优点, 矮秆对于盆栽来说又十分有利。生产中常用化学试剂如 GA<sub>3</sub> 等调控百合的株高, 但受到植物种类、施用时间、施用浓度以及外界环境等因素的影响。基因工程技术进行株高育种将可能成为替代化学诱变的一种有效方法, 而实现该目标的前提是分离验证与百合株高相关的基因。

赤霉素(gibberellins, GAs)是一类双萜植物激素, 参与控制多种植物发育和生理过程, 特别是在茎的伸长中起着重要的作用(Yamaguchi, 2008; Mutasa-Göttgens & Hedden, 2009; Seymour et al., 2013; 李艳冰 等, 2018)。GA20 加氧酶(GA20ox)作为 GAs 生物合成过程中的关键限速酶, 在 GAs 合成的最后阶段行使催化调控功能, 促进活性 GA<sub>1</sub> 和 GA<sub>4</sub> 的前体 GA<sub>20</sub> 和 GA<sub>9</sub> 的生成(Xu et al., 1995; Desgagné-Penix & Sponsel, 2008), 从而调控活性 GAs 的含量。目前, 编码 GA20ox 的基因已从多种植物中相继克隆, 如玉米、水稻、苹果、马铃薯、西瓜和拟南芥等(Phillips et al., 1995; Toyomasu et al., 1997; Kang et al., 1999; Carrera et al., 2000; Du et al., 2009; 姜志昂 等, 2013)。前人研究表明 *GA20ox* 基因可发挥对株形的调控功能(乔枫 等, 2013; 王江英 等, 2015; Do et al., 2016), 在烟草中过表达 *CrGA20ox1* 后, 植株株高约为野生型的 3.6 倍, 而沉默表达 *CrGA20ox1*, 烟草株高约为野生型的一半(王江英 等, 2015), 这为百合株形调控候选基因的确定提供了借鉴。

东方百合品种以花大, 花色丰富, 具有浓郁芳香, 成为现在切花百合中最重要的种类, 其中‘索邦’百合(*Lilium Oriental Hybrids ‘Sorbonne’*)是最主要的品种, 通过基因工程技术改变‘索邦’百合株高, 进而加强对其切花品质的改善和应用形式的丰富具有重要意义。本研究以东方百合‘索邦’为材料, 克隆得到其 *GA20ox* 基因, 并进行了生物信息学分析, 在此基础上对目的基因在百合不同发育时期及 GA<sub>3</sub> 处理后的表达模式进行分析, 以期了解 *GA20ox* 的有关特性及其在 GAs 稳态维持中的作用, 为进一步开展百合株形的遗传改良奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料与处理

试验于 2016 年 10 月至 2017 年 3 月在中国科学院植物研究所进行。东方百合‘索邦’的种球购自北京盛斯通生态科技有限责任公司。选取直径约 5 cm 的独头鳞茎, 种植于泥炭土和沙子(2:1)

混合的基质中, 置于温室内, 相对湿度 60%, 昼夜温度 20~25 °C/15~18 °C。

于萌芽期(芽萌发至 10~15 cm, I 期)和展叶期(茎秆长 40~45 cm, II 期)采集植株顶芽、茎、叶片、茎生根、鳞片、鳞茎盘和基生根, 于现蕾期(花蕾形成 1 cm 左右, III 期)采集茎、叶片、茎生根、鳞片、鳞茎盘、基生根和花器官, 于子鳞茎增长期(花谢后约两周, IV 期)采集茎、叶片、茎生根、鳞片、鳞茎盘、基生根和小鳞茎, 生物学重复 3 次, 于液氮中冷冻后, -80 °C 保存备用用于实时荧光定量 PCR 分析测定 *GA20ox* 基因表达。

分别于萌芽期和展叶期, 选取长势一致的植株, 喷施 20、200 和 400 mg·L<sup>-1</sup> 的 GA<sub>3</sub> 溶液, 对照用添加与处理液等量乙醇和 0.1%吐温 20 的混合液喷施。将处理后的植株分为两组, 其中一组分别在喷施后 0、6、12 和 24 h 随机采集顶芽、茎、叶片、茎生根、鳞片、鳞茎盘和基生根(重复 3 次), 于液氮中冷冻后 -80 °C 保存备用用于实时荧光定量 PCR 测定 *GA20ox* 基因表达。另一组于温室内继续培养, 每 3 d 按各自浓度喷施 1 次 GA<sub>3</sub> 溶液, 共喷施 3 次。待植株生长至花蕾变色后, 每种处理随机选取 10 株, 测定其地上株高和茎粗(距土壤表面 20 cm 处), 统计每株的开花时间, 待植株地上部位枯萎时, 测定地下部分的干质量。

## 1.2 *GA20ox* 的克隆

按照 HiPure Plant RNA Mini Kit 说明书对冻存样品进行总 RNA 的提取, 并检验其纯度和完整性。以 RNA 为模板反转录成 cDNA。

以正常生长植株展叶期的叶片提取的 RNA 为模板, 根据 SMARTer<sup>®</sup> RACE 5'/3'试剂盒提供的方法和试剂, 分别反转录合成 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready cDNA, 用于基因全长 5'和 3'片段的扩增模板。RACE-Ready cDNA 的特点是在其所有 cDNA 两端都被加上已知序列接头, 并根据这段序列设计后续扩增所需的通用引物 UPM (Universal Primer Mix): 5'-CTAATACGACTCACTA TAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAG-3'。基于实验室前期转录组测序结果, 挑选注释结果为 *GA20ox* 基因的序列, 设计 5'端片段扩增引物 UPM 和 R1: 5'-TGTCAGGGAAGTTGGGTCCGGTGTG-3'; 3'端片段扩增引物 F1: 5'-CGAGAGGCGTTTGCCTGT TTGGAT-3'和 UPM, 由于 3'端片段在首次 PCR 扩增后均未检测到目的条带, 因此, 以稀释 10 倍的一轮 PCR 产物为模板, 并在第 1 个引物内侧再设计新引物 F2: 5'-GAAACGCTCTCCTTCGGCTTCGATGACG-3', 进行二轮 PCR, 即巢式 PCR。引物由美吉生物公司合成。

利用 PCR 技术分别扩增 5'和 3'端片段, 5'端片段反应体系含 Buffer 25 μL, UPM 引物 5 μL, 下游引物 R1 1 μL, 5'-RACE-Ready cDNA 模板 2.5 μL, DNA 聚合酶 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 15.5 μL; 3'端片段反应体系含 Buffer 25 μL, 上游引物 F1/F2 1 μL, UPM 引物 5 μL, 3'-RACE-Ready cDNA 模板/一轮 PCR 产物 2.5 μL, DNA 聚合酶 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 15.5 μL。一轮 PCR 反应程序采用 touchdown 方法: 94 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 2 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min, 25 个循环。二轮 PCR 反应程序为: 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环。将 PCR 产物用胶回收试剂盒回收后, 送北京擎科新业生物技术有限公司测序。

根据 RACE 获得的序列在末端设计引物 F: 5'-CATGGGGAACACACCTCAAACACAC-3'和 R: 5'-TGGCTCCACACGAGTTGGGACGAAT-3', 验证 cDNA 序列拼接的正确性。

## 1.3 *GA20ox* 的生物信息学分析

采用 ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 进行 *GA20ox* 基因序列的开放阅读框预测。利用 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam>) 预测蛋白质的理化性质。用 TMHMM

(<http://www.cbs.Dtu.dk/services/TMHMM/>)对GA20ox蛋白的跨膜情况进行分析。根据SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析蛋白质的信号肽。采用SOMPA (<http://www.expasy.ch/tools>)和Phyre2在线软件对GA20ox基因编码蛋白进行二级结构分析与3D结构建模。根据Motif Scan (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN/>)研究蛋白 motifs。用NCBI的protein blast进行蛋白序列保守结构域分析。通过NCBI网站上的BLAST进行序列同源性比较。通过DNAMAN软件进行氨基酸序列同源性分析,并构建系统发育树。

#### 1.4 GA20ox 的表达分析

以上述反转录的cDNA为模板,利用实时荧光定量PCR技术分析‘索邦’GA20ox在不同生长时期的表达模式,以展叶期茎的表达量作为1;分析GA20ox在外源GA<sub>3</sub>处理后对株高影响显著的处理组中的表达模式,以未经GA<sub>3</sub>处理的对照组百合为参照因子,设其各组织器官中GA20ox的表达量为1,观测对照和GA<sub>3</sub>处理后不同时间点GA20ox的表达量。以其基因序列设计荧光定量引物,上游引物F:5'-CGACCCA ACTTCCCTGACAA-3',下游引物R:5'-TTCACGGTGGCTGTTTAC GA-3'。选择百合 Actin 为内参基因,上游引物 Actin-F:5'-CCATCCCA ACCATGACACCA-3',下游引物 Actin-R:5'-TAAGCAATGGCTGATGCCGA-3'。反应体系:SYBR green 5 μL, ROX Reference Dye 0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 2 μL, cDNA 1 μL, 上、下游引物各 1 μL。反应程序:95 °C预变性 3 min; 95 °C变性 15 s, 60 °C退火 15 s, 72 °C延伸 20 s, 40个循环。设置3个生物学重复,3个技术性重复,用2<sup>-ΔΔCt</sup>法对样本基因进行表达差异相对定量分析。使用Excel和SPSS(20.0)软件对数据进行统计分析,采用Tukey's法进行差异显著性检验。分别对GA<sub>3</sub>处理时期及浓度与处理后植株形态指标进行皮尔逊相关性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 GA20ox 的克隆

采用RACE技术克隆‘索邦’GA20ox 5'端和3'端序列,拼接后得cDNA全长序列1502 bp。在所得基因序列近末端设计引物进行扩增验证,获得了1个长度为1258 bp的目的片段(图1),胶回收测序结果与拼接所得序列一致。利用NCBI在线工具ORF Finder搜索发现,其中包括一个完整的ORF,全长为1167 bp, GenBank登录号为MG780361,编码388个氨基酸。

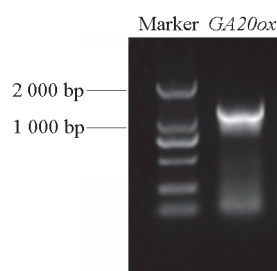


图1 GA20ox 基因 PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR amplified product of GA20ox gene

### 2.2 GA20ox 基因的生物信息学分析

#### 2.2.1 蛋白基本性质预测

在线软件预测GA20ox蛋白分子式为C<sub>1937</sub>H<sub>2998</sub>N<sub>536</sub>O<sub>571</sub>S<sub>23</sub>,相对分子质量为43667.74 D,理论等电点为6.13,由388个氨基酸组成,其中带正电残基(Arg+Lys)为38个,带负电残基(Asp+Glu)为43个,半衰期30 h,不稳定系数为43.14,脂溶指数为78.20,总平均亲水性(GRAVY)为-0.255,

由此推测该蛋白为亲水性蛋白。TMHMM 预测 *GA20ox* 为细胞外的非跨膜蛋白，可能是在游离核糖体上合成蛋白多肽。利用 SignalP 4.1 Server 分析可知，该序列无信号肽，为非分泌蛋白。

SOPMA 软件分析 *GA20ox* 蛋白的二级结构（图 2）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 39.69% 和 32.47%， $\beta$  转角最少仅为 9.54%。

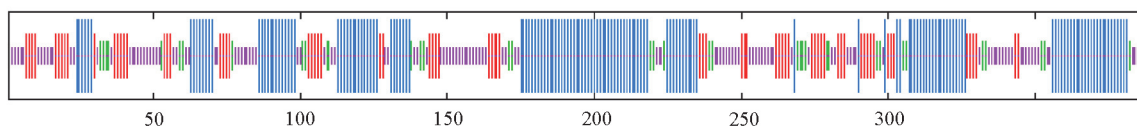


图 2 *GA20ox* 蛋白的二级结构

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。

Fig. 2 The secondary structure of *GA20ox* protein

Blue indicates alpha helix; Yellow indicates random curls; Green indicates beta turn; Red indicates extended strand.

利用 Phyre2 在线软件进行蛋白三级结构建模（图 3），建模结果显示，*GA20ox* 与拟南芥花青素合成酶匹配度最高（30%），该酶与 *GA20ox* 同属 2ODDs 酶类，这表明‘索邦’*GA20ox* 蛋白具有比较大的物种特异性。

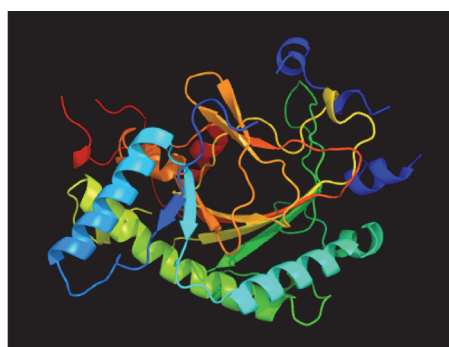


图 3 *GA20ox* 蛋白三维结构预测

Fig. 3 Three-dimensional structure of deduced *GA20ox* protein

Motif Scan 分析表明，*GA20ox* 蛋白含有 1 个 N-糖基化位点（第 354~357 位氨基酸），1 个依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点（第 206~209 位氨基酸），4 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点（第 65~68、87~90、245~248、320~323 位氨基酸），4 个 N-豆蔻酰化位点（第 111~116、143~148、221~226、

307~312 位氨基酸），4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点（第 153~155、320~322、335~337、348~350 位氨基酸），这说明该蛋白可能存在多种翻译后水平的调控作用，以此来调控自身的表达情况。

#### 2.2.2 同源性比对和分子系统进化树分析

将 *GA20ox* 的氨基酸序列进行 BLASTp 比对，结合其它植物同源 *GA20ox* 分析结果（图 4），发现编码的蛋白都存在 PLN02276 结构域，该结构域属于异青霉素 N 合成酶及其相关的双加氧酶超家族。

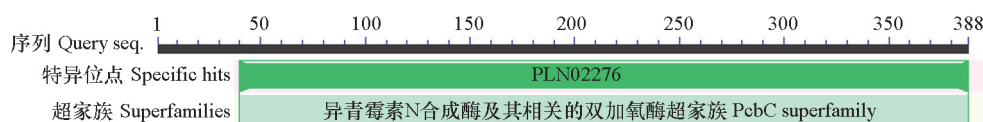


图 4 *GA20ox* 蛋白的保守结构域分析

Fig. 4 Conserved domain analysis of *GA20ox* protein

经 BLAST 比对发现, ‘索邦’ GA20ox 的氨基酸序列与油棕 (*Elaeis guineensis*, XP\_010911046.1)、海枣 (*Phoenix dactylifera*, XP\_008805890.1) 和椰子 (*Cocos nucifera*, AMP82003.1) 等相似性最高, 均为 67%。将它与这 3 个物种 GA20ox 氨基酸序列进行多重序列比对, 结果 (图 5) 表明, GA20ox 氨基酸序列相对保守。

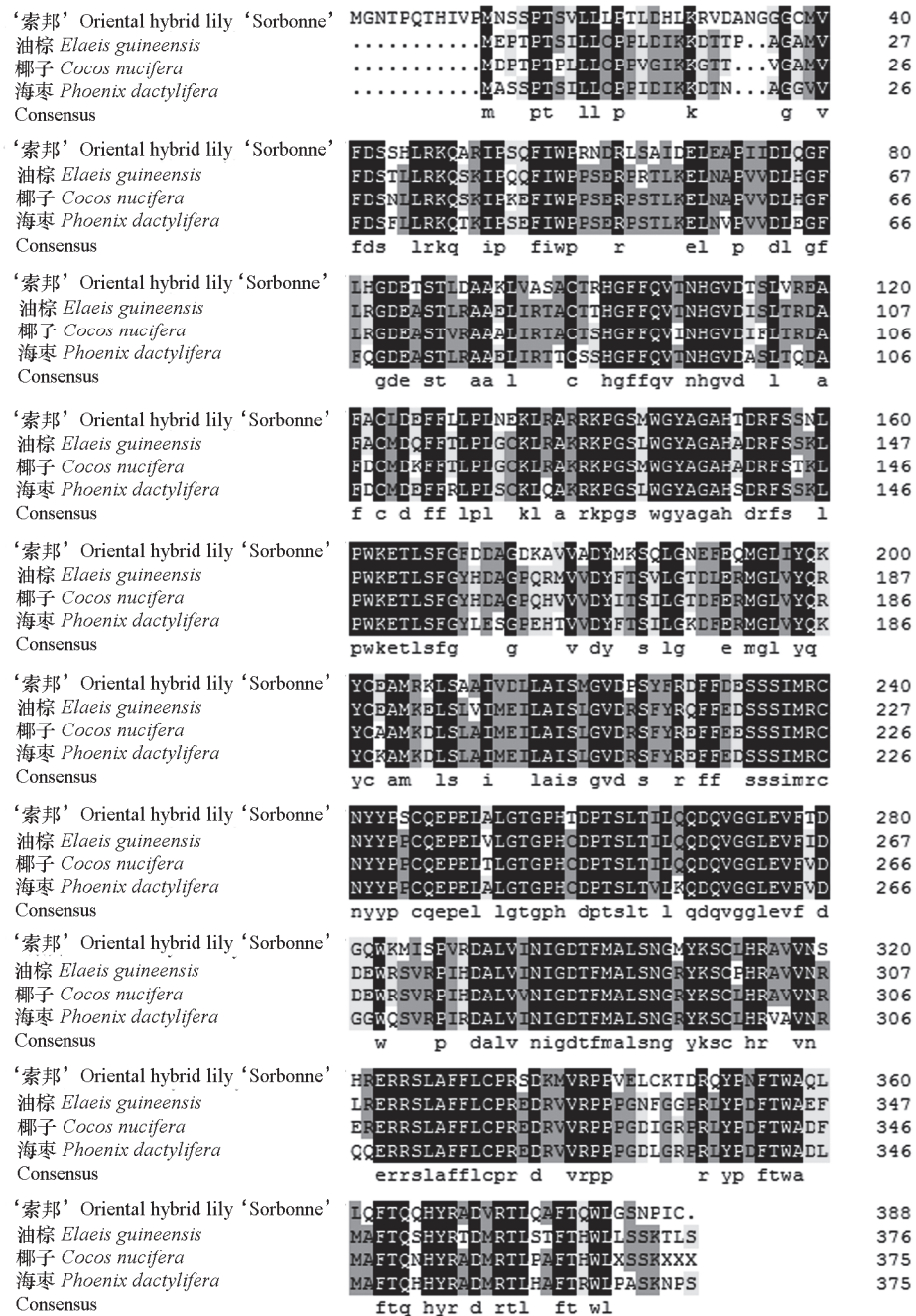


图 5 ‘索邦’ 与其他植物 GA20ox 氨基酸序列比对

Fig. 5 Alignment of amino acid of GA20ox from ‘Sorbonne’ and other plants

利用 DNAMAN 软件, 将‘索邦’氨基酸序列与来自 17 个科 31 个物种的 31 条 GA20ox 氨基酸序列构建进化树。结果(图 6)显示‘索邦’GA20ox 与兰科的铁皮石斛和姬蝴蝶兰亲缘关系最近, 首先聚类, 然后与椰子、油棕、海枣、菠萝、水稻和谷子等单子叶植物聚类, 随后再与其他双子叶植物进行聚类。

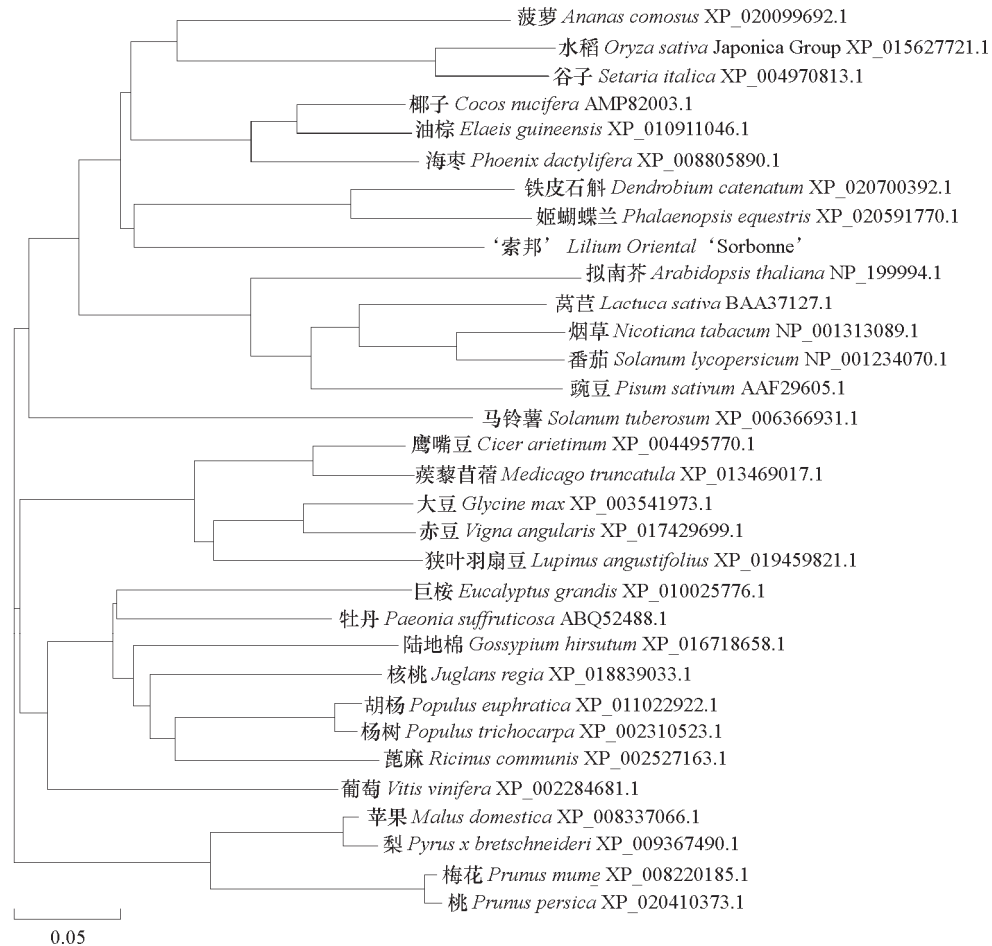


图 6 ‘索邦’百合 GA20ox 与其他植物 GA20ox 的进化树分析  
Fig. 6 A phylogenetic tree of GA20ox from ‘Sorbonne’ and other plants

### 2.3 外源 GA<sub>3</sub> 处理对‘索邦’百合生长的影响

用不同浓度的 GA<sub>3</sub> 处理‘索邦’百合萌芽期植株, 结果(表 1)显示, 200 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理后的植株株高显著高于其他处理, 为 104.60 cm, 地下部分干样质量显著高于对照, 为 11.26 g; 400 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理后的植株茎粗和地下部分干样质量显著高于其他处理, 分别为 7.54 mm 和 13.44 g, 并且始花期较对照显著提前, 为 88 d。用不同浓度 GA<sub>3</sub> 处理展叶期植株, 除 400 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理后的植株始花期显著提前外, 其他各浓度 GA<sub>3</sub> 处理均未引起植株性状的显著改变。20 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 对萌芽期植株处理后的株高显著高于展叶期的, 用 200 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 对萌芽期植株处理后的株高和地下部分干样质量显著高于展叶期的处理, 用 400 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 对萌芽期植株处理后的茎粗和地下部分干样质量显著高于对展叶期植株的处理。这表明, GA<sub>3</sub> 处理萌芽期‘索邦’对植株产生的影响较大。

表 1 外源 GA<sub>3</sub> 处理对‘索邦’生长的影响  
 Table 1 Effects of exogenous GA<sub>3</sub> on growth of ‘Sorbonne’

处理时期 Stage of treatment	GA <sub>3</sub> / (mg · L <sup>-1</sup> )	株高/cm Plant height	茎粗/mm Stem diameter	始花期/d The first flowering time	地下部分干样质量/g Biomass of underground
萌芽期 Germination stage	0	94.00 ± 3.35 b	7.02 ± 0.22 b	90.50 ± 1.96 a	9.22 ± 1.33 c
	20	96.90 ± 5.41 b*	7.06 ± 0.24 b	90.30 ± 0.48 a	9.53 ± 0.55 bc
	200	104.60 ± 2.89 a*	7.07 ± 0.40 b	88.50 ± 2.07 ab	11.26 ± 0.83 b*
	400	98.55 ± 3.44 b	7.54 ± 0.40 a*	88.00 ± 1.83 b	13.44 ± 1.00 a*
展叶期 Leaf expansion stage	0	94.35 ± 3.92 a	6.93 ± 0.42 a	90.10 ± 2.23 a	9.69 ± 1.02 a
	20	92.00 ± 3.08 a	7.08 ± 0.55 a	90.90 ± 2.51 a	10.05 ± 1.00 a
	200	92.15 ± 4.99 a	7.07 ± 0.34 a	90.10 ± 1.85 a	8.81 ± 1.36 a
	400	96.75 ± 5.29 a	6.73 ± 0.24 a	87.40 ± 2.01 b	9.45 ± 0.87 a

注: 同一处理时期同列数值间不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。\* 表示不同处理时期同一处理浓度的数值间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Values with different lowercase letters in each column of the same treatment stage mean significant difference at  $P < 0.05$ . \* Means significant difference at  $P < 0.05$  between values in the same treatment concentration at different treatment stages.

对 GA<sub>3</sub> 处理时期 (萌芽期和展叶期) 及浓度与处理后‘索邦’的形态指标进行相关性分析结果 (表 2) 显示, GA<sub>3</sub> 处理时期与株高和地下部分干样质量极显著负相关, 与茎粗显著负相关; GA<sub>3</sub> 处理浓度与地下部分干样质量极显著正相关, 与株高显著正相关, 与始花期极显著负相关。

综上, 在萌芽期对植株进行高浓度 (200 或 400 mg · L<sup>-1</sup>) GA<sub>3</sub> 处理对‘索邦’生长的影响较大, 其中, 200 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理最有利于株高的增加, 400 mg · L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> 处理最有利于地下部分干样质量的增加。

表 2 GA<sub>3</sub> 处理时期、处理浓度与‘索邦’百合生长指标的皮尔逊相关性  
 Table 2 Pearson’s correlation coefficient between growth indicators of ‘Sorbonne’ and treatment stage as well as treatment concentration of GA<sub>3</sub>

处理参数 Treatment parameter	株高 Plant height	茎粗 Stem diameter	始花期 The first flowering time	地下部分干样质量 Biomass of underground
处理时期 Treatment stage	- 0.426**	- 0.245*	- 0.068	- 0.408**
处理浓度 Treatment concentration	0.281*	0.114	- 0.504**	0.434**

注: \*\*在 0.01 水平上显著相关, \*在 0.05 水平上显著相关。

Note: \*\* Significant association at the level 0.01. \* Significant association at the 0.05 level.

## 2.4 GA20ox 的表达分析

### 2.4.1 GA20ox 的时空特异性表达分析

通过 qRT-PCR 技术测定‘索邦’百合 GA20ox 在不同生长时期的不同组织器官中的表达, 结果 (图 7, 图 8) 显示, 在萌芽期叶片中表达量最高, 其次是顶芽, 其他部位表达较少; 在展叶期, 伴随有大量的茎生根产生, GA20ox 在茎生根和叶片中的表达量迅速升高, 并且在茎生根表达量最高, 在鳞茎盘、基生根和茎中的表达量也有所增加, 而顶芽表达量明显降低; 至现蕾期时, 该基因在茎和基生根中表达水平明显升高, 尤其在茎生根中表达量进一步增加, 而在叶片和鳞茎盘中表达降低。这一时期该基因开始在花蕾中表达, 以花药和花柱中表达量最高, 花瓣和花丝中表达微弱, 柱头中没有表达。随着花的盛开, 除柱头外, 花器官各部位的表达量均有所增加, 其中花药中增加显著, 为现蕾期的 7.41 倍; 在子鳞茎增重时期, 该基因在茎生根、茎和基生根中的表达急剧降低, 鳞茎盘和鳞片表达量增加, 同时也在新长出小鳞茎表达。在‘索邦’的整个发育过程中, GA20ox 在各部位的表达模式与‘索邦’的生长发育密切联系, 具有一定的时空特异性。



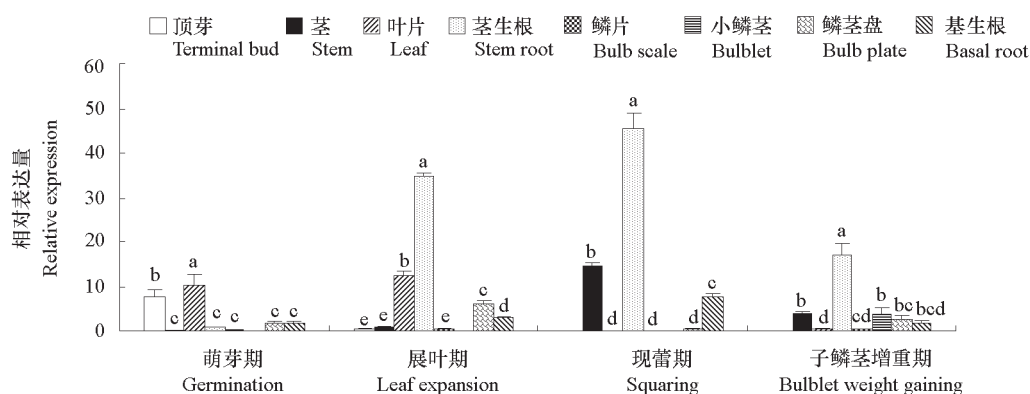


图7 ‘索邦’不同生长发育时期各组织中 *GA20ox* 的相对表达量

同一生长时期不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 7 Relative expression levels of *GA20ox* in different tissues of 'Sorbonne' during different growth and development stages

Bars with different lowercase letters in each growth stage mean significant difference at  $P < 0.05$ .

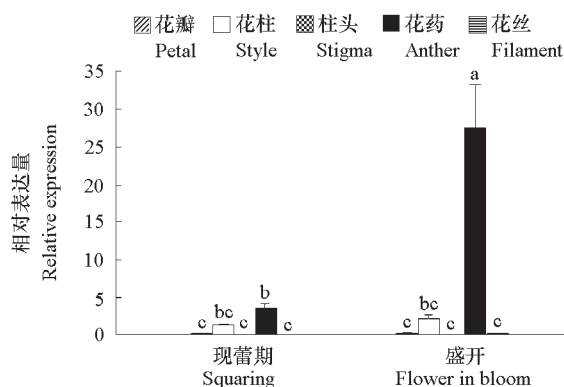


图8 ‘索邦’花器官中 *GA20ox* 的相对表达量

不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 8 Relative expression levels of *GA20ox* in flower of 'Sorbonne'

Different lowercase letters mean significant difference at  $P < 0.05$ .

#### 2.4.2 $GA_3$ 处理后 *GA20ox* 的表达分析

用  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} GA_3$  处理萌芽期‘索邦’百合植株, 结果(图9)显示, 24 h 内除鳞片外, 在其他组织器官(顶芽、茎、叶片、茎生根、鳞茎盘和基生根)中 *GA20ox* 的表达量均显著低于对照, 在处理12 h 降至最低, 分别为对照的 37.20%、3.21%、36.64%、13.98%、20.57%和 5.35%, 其中茎和基生根的降低幅度最大, 分别下降了 96.79%和 94.65%, 24 h 时茎、叶片和茎生根中表达量显著回升, 但仍低于对照。

而鳞片中 *GA20ox* 的表达量呈先升高后降低的趋势, 在 6 h 时达到最高, 为对照的 2.87 倍, 24 h 时表达量骤然降低, 维持在近于对照的水平。可见, 外源  $GA_3$  处理促进了 *GA20ox* 在‘索邦’鳞片中的表达, 而在不同程度上抑制了 *GA20ox* 在其他组织器官中的表达。

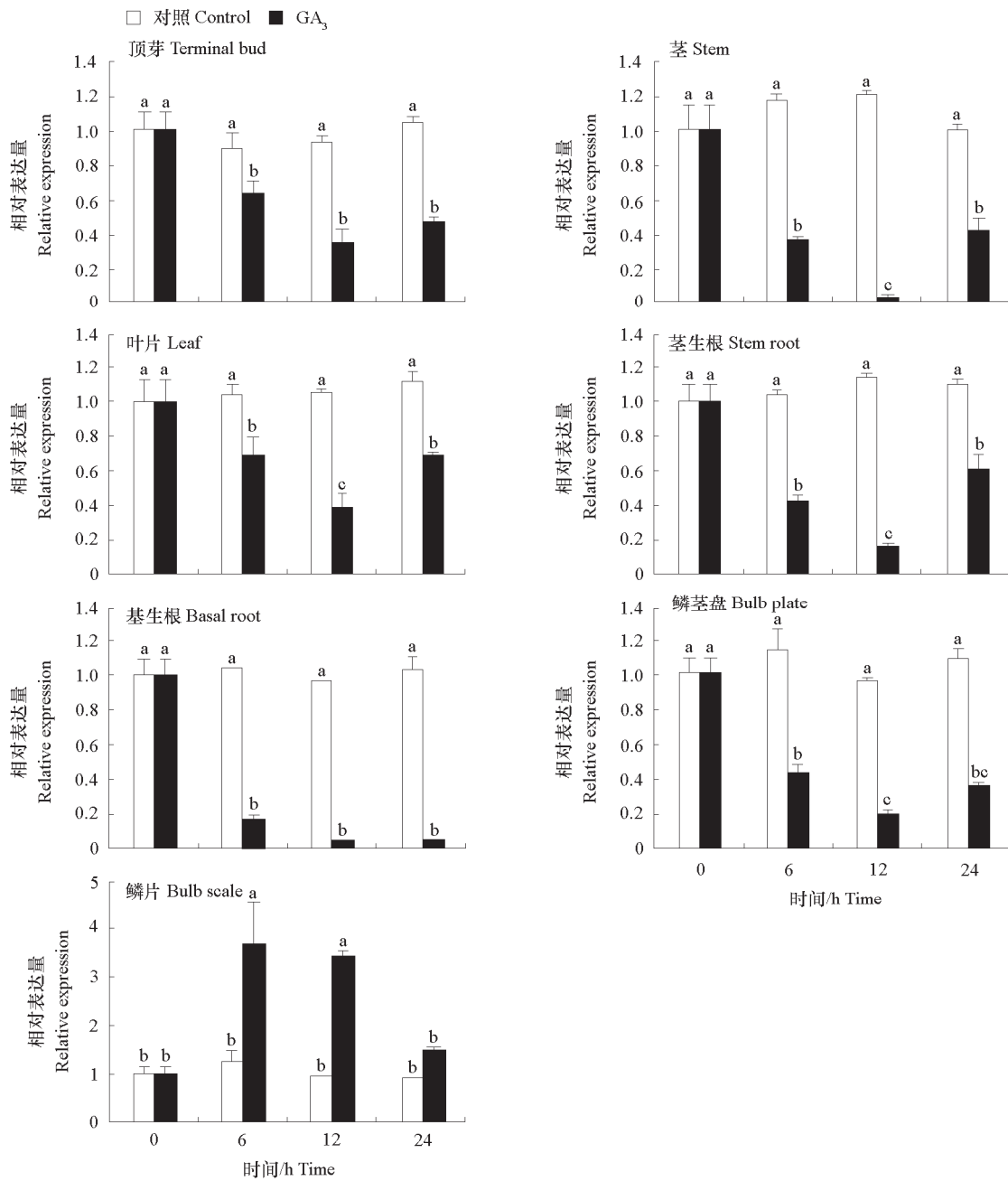


图9  $GA_3$ 处理后‘索邦’不同组织中 *GA20ox* 的相对表达量

同一组织中不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Fig. 9 Relative expression levels of *GA20ox* in different tissues of ‘Sorbonne’ in response to  $GA_3$

Bars with different lowercase letters in each tissue mean significant difference at  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

*GA20ox* 是 GAs 合成过程中最后阶段的关键限速酶 (Hedden & Kamiya, 1997; Desgagné-Penix & Sponsel, 2008), 由一个小的基因家族编码, 目前已从至少 30 种植物中分离出 *GA20ox*。已有研

究认为,不同植物来源的 *GA20ox* 编码的氨基酸序列同源性较低,多集中在 50%~60% (李伟等, 2003),但在玉米、高粱等禾本科植物之间的同源性为 75%~89% (吴建明等, 2009)。本研究,首次分离出‘索邦’ *GA20ox* 基因,该基因编码的氨基酸与其他物种具有较高的相似度,其中与油棕、海枣、椰子等的相似度最高,均为 67%。同时, *GA20ox* 编码的氨基酸序列包含 *GA20ox* 保守结构域。结合其它生物信息学分析表明,所克隆的‘索邦’ *GA20ox* 为 *GA20ox* 的同源基因,这为更加全面地研究赤霉素与百合的生长发育提供了参考。

*GA20ox* 基因在植物中的表达具有特异性 (Hedden & Phillips, 2000; Huerta et al., 2009; 刘文超等, 2012),并且有研究表明 *GA20ox* 的表达与提高活性 GA 含量具有直接的关系 (Kamiya & García-Martínez, 1999; Vidal et al., 2003),因此, *GA20ox* 的表达模式可能与活性 GAs 在植物生长发育过程中的作用密切相关。前人研究表明,活性 GAs 主要合成于快速发育的组织中,比如伸长的茎端和根部器官、伸展的叶片、芽尖、发育的种子和果实等组织 (Choi et al., 1995; 黄桃鹏等, 2015),对应于其主要合成位点,活性 GAs 参与控制茎和根的伸长、叶片伸展、种子和芽的萌发、坐果及果实发育等多种植物发育和生理过程 (Richards et al., 2001; Yamaguchi, 2008; Mutasa-Göttgens & Hedden, 2009; Seymour et al., 2013)。本研究结果显示, *GA20ox* 基因在萌芽期之后的茎生根、现蕾期的茎、萌芽期和展叶期的叶片、萌芽期的顶芽等快速发育的组织中有较高的表达,这说明该基因可能参与了‘索邦’根和茎的伸长、叶片的伸展和鳞茎的萌芽等发育过程。另外,有研究表明,花药中合成的 GAs 可能有利于促进其他花器官的发育 (Olszewski et al., 2002)。本研究花器官中 *GA20ox* 在花药中表达量最高,并且随着花的盛开,其表达量进一步显著增加,有利于花药中 GAs 的合成,并可能促进其他花器官的发育,与前人报道一致。

活性 GAs 在植物生长和发育的各个阶段,特别是茎的伸长中起重要的作用 (季兰和杨仁崔, 2002; Pimenta & Lange, 2006)。已有研究表明,赤霉素处理显著提高了甘蔗幼茎内源赤霉素的含量,并引起了植株高度的增加 (吴建明等, 2009)。另外,由于 *GA20ox* 的表达受体内活性 GAs 的反馈调节,当用赤霉素对植物进行处理时,该基因表达水平下调,从而控制体内活性 GAs 的含量 (Hedden & Phillips, 2000; Yamaguchi & Kamiya, 2000)。本研究中,  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{GA}_3$  处理显著促进了‘索邦’株高的增加,并抑制了 *GA20ox* 在大部分组织中的表达,与前人研究结果一致;而鳞片中 *GA20ox* 的表达量呈先上升后下降的趋势,这可能与不同组织对活性 GAs 的响应程度差异及植物生长发育对 GAs 的调节和运输有关,  $\text{GA}_3$  处理后地下部分干样质量的显著增加可能也与这一过程相关,具体机制有待于进一步研究。上述表明‘索邦’ *GA20ox* 作为编码活性 GAs 合成过程中关键酶的基因,同时受活性 GAs 的反馈调节,在调控 GAs 生物合成和维持植物体内赤霉素稳态中发挥重要作用,可作为百合株高遗传改良的候选基因。前人的研究中,过量表达 *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),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; Wolbang et al., 2004)。因此,通过基因工程手段操纵 *GA20ox* 的表达,进而调控体内活性 GAs 的含量,将有助于百合株高育种的发展。

目前对百合株高基因工程育种的研究较少。本研究中克隆出‘索邦’ *GA20ox* 基因,并探究了其时空表达特异性及在  $\text{GA}_3$  处理后的表达模式,但 *GA20ox* 反馈调节机理和相关功能方面的试验还需利用过表达和抑制表达等手段进一步验证,以期实现百合株高的遗传改良。

## References

- Carrera E, Bou J, García-Martínez J L, Prat S. 2000. Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *The Plant Journal*, 22 (3): 247 - 256.
- Choi Y H, Yoshizawa K, Kobayashi M, Sakurai A. 1995. Distribution of endogenous gibberellins in vegetative shoots of rice. *Plant and Cell Physiology*, 36: 997 - 1001.
- Coles J P, Phillips A L, Croker S J, Garcia-Lepe R, 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 (5): 547 - 556.
- Desgagné-Penix I, Sponsel V M. 2008. Expression of *gibberellin 20-oxidase1* (*AtGA20ox1*) in *Arabidopsis* seedlings with altered auxin status is regulated at multiple levels. *Journal of Experimental Botany*, 59 (8): 2057 - 2070.
- Do P T, De Tar J R, Lee H, Folta M K, Zhang Z J. 2016. Expression of *ZmGA20ox* cDNA alters plant morphology and increases biomass production of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 14: 1532 - 1540.
- Du J K, Yao Y Y, Ni Z F, Sun Q X. 2009. Cloning and characterization of an up-regulated GA 20-oxidase gene in hybrid maize. *Progress in Natural Science*, 19: 161 - 166.
- 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 - 788.
- Hedden P, Kamiya Y. 1997. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 431 - 460.
- Hedden P, Phillips A L. 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science*, 5 (12): 523 - 530.
- Huang Tao-peng, Li Mei-juan, Wang Rui, Li Ling. 2015. Progress in study of gibberellins biosynthesis and signaling transduction pathway. *Plant Physiology Journal*, 51 (8): 1241 - 1247. (in Chinese)
- 黄桃鹏, 李媚娟, 王 睿, 李 玲. 2015. 赤霉素生物合成及信号转导途径研究进展. *植物生理学报*, 51 (8): 1241 - 1247.
- Huang S, Raman A S, Ream J E, Fujiwara H, Cerny R E, Brown S M. 1998. Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 118: 773 - 781.
- Huerta L, Garcia-Lor A, Garcia-Martínez J L. 2009. Characterization of gibberellin 20-oxidases in the citrus hybrid Carrizocit range. *Tree Physiology*, 29: 569 - 577.
- Ji Lan, Yang Ren-cui. 2002. Rice stem elongation and plant hormones. *Chinese Bulletin of Botany*, 19 (1): 109 - 115. (in Chinese)
- 季 兰, 杨仁崔. 2002. 水稻茎伸长生长与植物激素. *植物学通报*, 19 (1): 109 - 115.
- 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-Martínez J L. 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 398 - 403.
- Kang H G, Jun S H, Kim J, Kawaide H, Kamiya Y, An G. 1999. Cloning and molecular analyses of a gibberellin 20-oxidase gene expressed specifically in developing seeds of watermelon. *Plant Physiology*, 121: 373 - 382.
- Li Wei, Chen Xiao-yang, Ding Xia. 2003. Studies on the GA20-oxidase of higher plants. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 15 (1): 42 - 45. (in Chinese)
- 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 - 45.
- Li Yan-bing, Zhu Mei-yu, Yang Xiao-ru, Li Yue, He Yi, Qi Ming-fang, Li Tian-lai. 2018. Advances on Gibberellin 2-oxidases gene in higher plants. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (9): 1844 - 1856. (in Chinese)
- 李艳冰, 朱美玉, 杨晓茹, 李 悦, 赫 易, 齐明芳, 李天来. 2018. 植物中 Gibberellin 2-oxidases 基因研究进展. *园艺学报*, 45 (9): 1844 - 1856.
- Liu Wen-chao, Wang Dong-hao, Wang Zhe-zhi, Li Cui-qin. 2012. Cloning and expression analysis of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 32 (7): 1289 - 1294. (in Chinese)

- 刘文超, 王东浩, 王喆之, 李翠芹. 2012. 丹参 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶基因克隆及表达分析. *西北植物学报*, 32 (7): 1289 - 1294.
- Mutasa-Göttgens E, Hedden P. 2009. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 60 (7): 1979 - 1989.
- Olszewski N, Sun T P, Gubler F. 2002. Gibberellin Signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell*, 14: S61 - S80.
- Phillips A L, Ward D A, Uknes S, Appleford N E, Lange T, Huttly A K, Gaskin P, Craebe J E, Hedden P. 1995. Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 108: 1049 - 1057.
- Pimenta Lange M J, Lange T. 2006. Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development. *Plant Biology*, (8): 281 - 290.
- Qiao Feng, Wang Chun-lian, Chen Zhi, Geng Gui-gong. 2013. Influence on plant architecture through the over expression of *OsGA20ox2* in rice. *Journal of China Agricultural University*, 18 (1): 25 - 31. (in Chinese)
- 乔枫, 王春连, 陈志, 耿贵工. 2013. *OsGA20ox2* 基因过量表达对水稻性状的影响. *中国农业大学学报*, 18 (1): 25 - 31.
- 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 Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 67 - 88.
- Seymour G B, Østergaard L, Chapman N H, Knapp S, Martin C. 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 64: 219 - 241.
- Toyomasu T, Kawaide H, Sekimoto H, Numers C V, Phillips A L, Hedden P, Kamiya Y. 1997. Cloning and characterization of a cDNA encoding gibberellin 20-oxidase from rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 99: 111 - 118.
- Vidal A M, Ben-Cheikh W, Talon M, García-Martínez 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 Jiang-ying, Wu Bin, Liu Wei-xin, Fan Zheng-qi, Li Ji-yuan. 2015. Overexpression and silence expression of *CrGA20ox1* from *Camellia reticulata* 'Hentiangao' and its effect on plant forms in transgenic tobacco. *Acta Horticulturae Sinica*, 42 (8): 1523 - 1532. (in Chinese)
- 王江英, 吴斌, 刘伟鑫, 范正琪, 李纪元. 2015. 矮生山茶 '恨天高' *GA20ox1* 的克隆及其对转基因烟草株形的影响. *园艺学报*, 42 (8): 1523 - 1532.
- 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.
- Wu Jian-ming, Li Yang-rui, Yang Liu, Wang Ai-qin, Yang Li-tao. 2009. Relationship between gibberellin-induced internode elongation and endogenous hormone changes in sugarcane. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 30 (10): 1452 - 1457. (in Chinese)
- 吴建明, 李杨瑞, 杨柳, 王爱勤, 杨丽涛. 2009. 赤霉素诱导甘蔗节间伸长与内源激素变化的关系. *热带作物学报*, 30 (10): 1452 - 1457.
- Xu Y L, Li L, Wu K, Peeters A J, Gage D A, Zeevaert J A. 1995. The *GA5* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 6640 - 6644.
- Yamaguchi S, Kamiya Y. 2000. Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant and Cell Physiology*, 41: 251 - 257.
- Yamaguchi S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59: 225 - 251.