DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20200115

山核桃赤霉素氧化酶基因 CcGA3ox 的克隆和功能分析

魏广利,梁 璧,张佳琦,胡恒康,黄有军,娄和强*,张启香*

(浙江农林大学林业与生物技术学院•省部共建亚热带森林培育国家重点实验室,浙江临安 311300)

摘 要:【目的】赤霉素 3-氧化酶(gibberellin 3-oxidases,GA3ox)是赤霉素(GAs)生物合成途径中关键酶之一,对山核桃(Carya cathayensis)中 CcGA3ox基因进行克隆,并进行序列分析和功能验证。【方法】以山核桃体细胞胚为材料,提取RNA,采用PCR扩增技术,克隆山核桃CcGA3ox基因编码区全长;对序列进行生物信息学分析。为验证基因功能,通过同源重组技术构建具有强启动子的35S::CcGA3ox::GFP过表达载体,以核桃体细胞胚为转化材料,利用农杆菌介导法进行遗传转化;利用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析山核桃CcGA3ox基因在转基因阳性核桃植株中的相对表达量。采用紫外分光光度计检测植株中叶绿素含量,并分析其差异。【结果】山核桃CcGA3ox基因开放阅读框(ORF)全长为1116 bp,编码371 个氨基酸。对CcGA3ox氨基酸序列分析发现,其含有2OG-FeII-Oxy结构域。系统进化树显示,CcGA3ox与薄壳山核桃CiGA3ox亲缘关系最近,与核桃JrGA3ox亲缘关系较近。对核桃体细胞胚进行遗传转化、荧光检测及PCR验证表明,35S::CcGA3ox::GFP过表达载体被成功转入核桃体胚中。核桃阳性再生植株与对照植株相比,株高明显增高;qRT-PCR结果表明,CcGA3ox基因相对表达量显著增加。同时,过表达CcGA3ox基因可以降低核桃阳性再生植株中叶绿素含量。【结论】山核桃CcGA3ox基因在核桃生长过程中对株高调控起关键作用。 关键词:山核桃;赤霉素 3-氧化酶基因(GA3ox);遗传转化;功能分析

中图分类号:S664.1 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2021)01-0013-16

Cloning and functional analysis of *CcGA3ox* gene from hickory (*Carya ca-thayensis*)

WEI Guangli, LIANG Bi, ZHANG Jiaqi, HU Hengkang, HUANG Youjun, LOU Heqiang^{*}, ZHANG Qixiang^{*}

(School of Forestry & Biotechnology, Zhejiang A & F University/State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Lin' an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective**]**Gibberellin (GAs) is an essential natural plant hormone in plants and plays an indispensable role in seed germination, stem elongation, floral organ induction and development, fruit formation, chlorophyll expression. Therefore, the process of anabolism of GAs is very important for the growth of plants. Gibberellin 3-oxidases (GA3ox) are key enzymes in the biosynthetic pathway of GAs which directly catalyze inactive GAs (GA9/GA20) to bioactive GAs (GA1/GA4) to regulate the dynamic balance of GAs in plants and regulate plant growth and development process, especially in regulating plant height. *Carya cathayensis* is an important economic tree species in China and has extremely high value in nutrition, industry and medicine. In recent years, the demand for hickory has gradually increased, but most hickory trees are high and grow on hillside ditches, resulting in difficulty of harvest and management. Therefore, the creation of dwarf or semi-dwarf new germplasms is very important for

收稿日期:2020-04-13 接受日期:2020-10-19

基金项目:国家自然科学基金(31670682、31800563、31600547、31971672);浙江省自然科学基金(LY18C150002);浙江省农业(果品)新品 种选育重大科技专项(2016C02052-13)

作者简介:魏广利,在读硕士研究生,主要从事果树发育分子生物学研究。Tel:18358136311,E-mail:782849474@qq.com

^{*}通信作者 Author for correspondence. E-mail:qxzhang@zafu.edu.cn

the sustainable development of the hickory industry. At present, there are on a few studies on the GA3ox gene in fruit trees. In this study, through the cloning and bioinformatics analysis of the CcGA3ox gene and the construction of genetic vector in hickory, we further explored the role of the CcGA3ox gene in regulating the growth and development of fruit trees, especially in regulating plant height, so as to help dig and utilize more high-quality genes in hickory. [Methods] Firstly, according to the full-length CDS sequence of the GA3ox gene of hickory and the Clon Express II One Step Cloning Kit of Vazyme, the full-length cloning primers were designed using the software Primer 5.0 based on In-Fusion cloning technology, and then the target gene was amplified by PCR amplification system. Based on the cloning results, the bioinformatics analysis of the CcGA3ox was carried out, the gene structure characteristics were analyzed by ORF Finder open reading, the conserved regions of genes were analyzed by NCBI, the physicochemical properties of amino acids were analyzed by ExPASy, and the subcellular localization was predicted by PSORT online analysis software. TMHMM ServerV.2.0 software was used for protein sequence transmembrane region analysis, MEGA7.0 software was used for multi-sequence alignment analysis of amino acid sequences, and a multi-species phylogenetic tree was established. At the same time, pC1300 plasmids were double-digested by BamH I and Sal I, then the PCR products and double-digested products were recovered respectively. The 35S::CcGA3ox::GFP fusion expression vector was used to transform the competent cells of Escherichia coli $DH5\alpha$ by using One step cloning kit of Vazyme .The positive clones were screened by primer PCR at full length of the amplified gene, and the positive clones were selected for sequencing validation. The constructed vector 35S::CcGA3ox::GFP was transfected into Agrobacterium GV3101 competent cells. The correct strains were identified by PCR and enriched after extended culture with rifampicin and kanamycin of LB liquid medium, and then suspended in liquid DKW medium containing acetylsvringone. The well-grown walnut somatic embryos were selected, and were immersed in suspension for 10-15 min, then were cultured in DKW solid medium containing acetylsyringone for 3 days, and then were placed in DKW solid medium containing 80 mg \cdot L⁻¹ hygromycin and 300 mg \cdot L⁻¹ carboxybenzylpenicillin to screen positive somatic embryos. The effect of 35S::CcGA3ox::GFP expression on the fluorescence excitation of somatic embryos was observed under white light and blue excitation light (OD=488 nm) by stereofluorescence microscopy, and the somatic embryos and regenerated plants were positively identified by PCR. Phenotypic changes were observed on days 0 and 15, and plant height and internode length were determined. Fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to determine the changes of gene expression of the CcGA3ox in regenerated plants. The chlorophyll content of regenerated plants was determined by ultraviolet spectrophotometer using ethanol to extract chlorophyll. Results The open reading frame of the CcGA3ox was 1 116 bp in length and encoded 371 amino acids with a molecular weight of 40.69 kDa. Bioinformatics analysis showed that the CcGA3ox was an acidic hydrophilic protein with conserved domains typical of 20G-Fe II - Oxy. Subcellular localization prediction indicated that it was located in 56.5% of the cytoplasm, 21.7% in the nucleus and 13% in the mitochondria. Analysis of the transmembrane region of the protein showed that the transmembrane region of the protein was zero. The results of amino acid phylogenetic tree comparison showed that the gene had the closest genetic relationship with pecan 98.6% homology, and 97.84%, 84.64%, 83.56% homology with walnut, Chinese chestnut and broad leaved oak respectively. The results of somatic fluorescence microscopy showed that 35S::CcGA3ox::GFP overexpression vector was successfully introduced into walnut somatic embryos, and underwent four complete growth and development life cycles: spherical embryo, heart embryo, torpedo embryo and cotyledon embryo. Phenotypic observation showed that the height and internode length of the transformed plants were

significantly increased compared with those of the control plants. The results of qRT-PCR showed that the height of the positive regenerated plants was significantly different from that of the control plants, and the expression level was higher, indicating that its expression abundance was positively correlated with the plant height. At the same time, the *CcGA3ox* gene affected the expression of chlorophyll, resulting in the reduction of the content of chlorophyll in the regenerated plants of 35S::CcGA3ox::GFP. Compared with the control plants, the average content of chlorophyll a decreased by 41.5%, the average content of chlorophyll b decreased by 29.3%, and the total chlorophyll decreased by 34.4%. [Conclusion] The amino acid sequence of the *CcGA3ox* gene had the highest homology with that of the *CcGA3ox* of pecan (98.6%). The expression of the *CcGA3ox* CDNA in transformed walnut significantly increased, and the regenerated plants showed obvious elongation characteristics, and the chlorophyll content obviously declined. The *GA3ox* gene would play a key role in the growth of plant height in walnut. **Key words:** Hickory; Gibberellin 3-oxidases gene (*GA3ox*); Transformation; Functional analysis

山核桃属(Carya Nutt.)隶属于胡桃科(Juglandaceae),大约有18个种,主要分布在北美东部及亚 洲东南部^[1]。在我国,山核桃属植物主要有5个种, 分别为山核桃(Carya cathayensis)、云南山核桃 (Carya tonkinensis)、贵州山核桃(Carya kweichowensis)、湖南山核桃(Carya hunanensis)和大别山山 核桃(Carva dabieshanesis)。其中,山核桃主产于浙 江临安、淳安、桐庐和安吉等地区四。山核桃坚果风 味醇厚,含有各种维生素,具有极高的营养价值,是 国内外著名的坚果之一^[3],此外,山核桃还具有重要 的工业及医药价值44。近年来,随着生活水平的提 高,人们对山核桃的需求呈逐年上升的趋势。然 而,山核桃多生长于山坡沟坎,且树体高大,采摘难 度极大,因管理和采摘山核桃而造成的伤亡事故时 有发生。因此,开展山核桃矮化和半矮化的种质 资源创新与培育,对我国山核桃产业的可持续发展 具有重要的现实意义。

赤霉素(gibberellins,GAs)作为调控植物生长 发育的五大激素之一,在植物^[7]、细菌^[8]、真菌^[9]中广 泛存在。研究表明,GAs影响高等植物生物生活的 各个阶段,如种子的萌发^[10-11]、茎的伸长^[12-13]、花器官 的诱导及发育^[14-15]、果实的形成^[16-17]、木质素的积 累^[18]、叶绿素的表达^[19-20]等。GAs属于双萜类化合 物,由4个异戊二烯单位组成^[21]。随着植物功能基 因组学和蛋白质组学的发展,GAs研究取得重大进 展,GAs的生物合成代谢途径及其关键酶在模式植 物拟南芥中已比较清楚^[22]。GAs生物合成过程中的 关键酶主要包括古巴焦磷酸合酶(*ent*-copalyl diphosphate synthase,CPS)、内根-贝壳杉烯合酶(*ent*kaurene synthase,KS)、内根-贝壳杉烯氧化酶(*ent*-

kaurene oxidase,KO)、内根-贝壳杉烯酸氧化酶(entkaurenoic acid oxidase, KAO)、GA20 氧化酶(GA20oxydase, GA20ox)、GA3β-羟化酶(GA3β-hydroxidase, GA3ox) 及 GA2 氧 化 酶 (GA2- oxydase, GA2ox)^[23]。在GAs的合成代谢过程中,这些关键酶 主要通过三个阶段发挥作用,第一阶段发生在质体 中,CPS和KS将GAs合成前体牻牛儿基牻牛儿基焦 磷酸(geranylgeranyl diphosphate, GGDP)转化为内 根-贝壳杉烯(ent-kaurene);第二阶段主要发生在内 质网,内根-贝壳杉烯被细胞色素P450单加氧酶KO 和KAO氧化,形成GA12-醛,它是GA的最初产物, 进一步转化成GA12,GA12作为GAs生物合成中重 要的中间物质,在GA13氧化酶(GA13-oxydase, GA13ox)的作用下还可转变为GA53;第三阶段发生 在细胞质, GA12/GA53被GA20ox氧化酶催化为 GA9/GA10,该产物又进一步被GA3ox氧化酶转化 为有生物活性的GA1/GA4,而GA2ox氧化酶则将有 生物活性的GA1和GA4转化为无生物活性的GA8/ GA34^[24](图1)。

GA3ox(GA3oxidase)是重要的GAs生物合成调 控酶之一,属于2-酮戊二酸依赖性双加氧酶(2-oxoglutarate-dependent dioxygenase,2-ODDs)。该家族 由多个基因家族编码,是植物基因组中第二大类酶 家族,参与各种氧合/羟化反应,在植物发育、转录调 节、核酸修饰及修复、次级代谢合成途径中发挥重要 作用^[25]。GA3ox调控植物的生长发育是一个复杂的 过程,涉及到信号转导、合成代谢、内源激素水平以 及周围的环境信号^[26-27],如水分^[28]、光照^[29]、温度^[30]、时 空表达^[31]等因素。目前,GA3ox基因已经在拟南芥 (Arabidopsis thaliana)^[32]、烟 草 (Nicotiana taba-



A. 山核桃体细胞胚; B. 核桃体细胞胚。标尺=100 mm。
 A. Somatic embryos of hickory; B. Somatic embryos of walnut. Bars=100 mm.
 图 1 山核桃和核桃体细胞胚
 Fig. 1 Somatic embryos of hickory and walnut

cum)^[33]、南瓜(*Cucurbita moschata*)^[34]、小麦(*Triti*cum aestivum)^[35]、杨树(Populus)^[36]、苹果(Malus domestica)^[37]和葡萄(Vitis vinifera)^[38]等多种植物中得 到分离克隆。同时随着突变体和转基因技术等相关 研究的不断深入,人们对GA3ox的生物学功能有了 一定的了解。资料显示,GA3ox的表达量可以影响 植物的株高[39]。从矮杆小麦'宁98-210'(含有矮杆 基因 Rht12) 扩增得到 GA3ox1, 通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析,结果显示,与正常株高的'中 国春'相比,TaGA3ox1基因主要在矮杆小麦材料的 倒一节结中的表达量较高,说明 TaGA3ox1 在缩短矮 化品种小麦的节结部位起着关键调控作用[40];水稻 矮化小穗突变体 d18 的新等位基因 3β-羟化酶 (GA3ox2),在突变体中表达量显著降低,茎部细胞 长度显著变短,植株表现出矮化表型[4];玉米中典型 的GAs缺陷型突变体dl编码GA3ox氧化酶,阻断催 化GAs合成的最后一步,突变体植株矮小^[42];土豆 StGA3ox2基因突变,可造成节间变短、植株变矮[43]。 此外,有研究表明,GA3ox还可在一定程度影响植物 体内叶绿体的合成^[44],如水稻 GA3ox 缺陷型突变体 植株中,叶片颜色变深,叶绿素增加,说明GA3ox参 与调控叶绿素的表达[45];GA3ox还能通过调节纤维 发育影响茎秆生长情况,从而调节植物的株高[46-47]。

目前,关于GA3ox基因在果树中的研究较少,笔 者以山核桃为材料,首次克隆山核桃CcGA3ox基 因,利用生物信息学的方法对其进行分析,进一步开 展遗传转化并验证其生物学功能,为培育半矮化的 山核桃创新种质奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

植物材料均来自于省部共建亚热带森林培育国家重点实验室,包括山核桃体细胞胚和核桃(Juglans regia L.)体细胞胚(简称"体胚")。体胚培养在 (25±2)℃的暗箱中,再生植株培养在(25±2)℃、光 照周期为16 h/8 h(光/暗)、光照强度为40~50 µmol·m⁻²·s⁻¹的培养室中^[48]。总RNA的提取选用山 核桃体胚,遗传转化材料选用生长良好的核桃体细 胞胚。GFP荧光验证和PCR验证选用转化后生长 至E3代的稳定遗传的核桃体胚和核桃再生植株。

1.2 方法

1.2.1 山核桃 CcGA3ox 基因克隆与载体构建 过 表达载体由 TaKaRa 公司的 pCAMBIA1300(简称 pC1300)改造而来,即在多克隆位点前后分别连接 花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S强启动子和绿色荧 光蛋白基因 GFP;大肠杆菌 E. coli DH5α感受态细 胞购自于杭州有康生物技术有限公司;农杆菌 GV3101感受态细胞购自于上海唯地生物科技有限 公司。

选用北京天根生化科技有限公司的多糖多酚植物总RNA提取试剂盒提取山核桃体胚的RNA,采用杭州昊枫生物科技有限公司Plant DNAzol植物基因组DNA快速提取试剂提取DNA,基因克隆及后续的验证过程采用TaKaRa公司的cDNA反转录试

剂盒、Primer STAR 高保真酶、DNA Marker、rTaqD-NA聚合酶、连接酶和各种限制性内切酶进行操作, 凝胶回收及质粒提取采用上海生物工程有限公司的 SanPrep柱式取试剂盒。

根据山核桃 CcGA3ox 基因的全长 CDS 序列,按 照喏唯赞 CloneExpress II One Step Cloning Kit 试剂 盒的操作要求,基于 In-Fusion 的载体构建技术^[49]进 行构建载体,利用 Premier 5.0 软件设计克隆引物,其 序列见表1。根据 Saito 等^[50]的 PCR 扩增体系进行扩 增,并调整 PCR 反应程序为:94 ℃预变性2 min; 98 ℃变性10 s;55 ℃退火30 s;68 ℃延伸2 min;共 32个循环;68℃延伸7min。将PCR反应产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳,同时,将pC1300质粒进行 Bam H I和 Sal I 双酶切,分别胶回收目的条带和双 酶切电泳产物,将目的条带和酶切后的质粒载体进 行连接,将连接产物35S::CcGA3ox::GFP转入DH5a 大肠杆菌感受态细胞^[51],取阳性单克隆菌株进行 PCR鉴定并送至杭州有康生物技术有限公司测序鉴 定,测序结果比对正确的质粒转化农杆菌^[52],PCR验 证正确的菌株用于保菌及后续实验。将克隆获得的 序列拟命名为CcGA3ox,并将构建的过表达载体拟 命名为35S::CcGA3ox::GFP。

表 1 引物序列 Table 1 Primers sequence

7116 6 16	۔ جب جب	
引物名称	予列	用途
Primer name	Sequence(5'-3')	Purpose
GA3ox-1300-F	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGCCTTCAAGACTATCAGA	扩增Amplification
GA3ox1300-R	TCGCCCTTGCTCACCATGTCGACATAACAGAGTACAAGTTGGC	扩增 Amplification
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	鉴定Testing
GFP-R	TTACTTGTACAGCTCGTCCA	鉴定Testing
Actin-F	GCCGAACGGGAAATTGTC	内参 Internal reference
Actin-R	AGAGATGGCTGGAAGAGG	内参 Internal reference
CcGA3ox-F	CGTTGTTAACCGCACCCGTTAT	定量 qRT-PCR
CcGA3ox -R	GACTGGGTCCTAGCAGCTTTGA	定量 qRT-PCR

注:GGATCC、GTCGAC 分别为 Bam H I、Sal I 的酶切位点。

Note: GGATCC and GTCGAC are Bam H I and Sal I restriction sites, respectively.

1.2.2 山核桃 CcGA3ox 基因的生物信息学分析 利用美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站中的 BLAST对氨基酸序列进行序列相似性分析(https:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/);利用软件PROSITE Scan对 基因进行保守区域预测分析;利用 ORF Finder (https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/tag/orffinder/) 分析开放阅读框;利用 ExPASy (https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam) 对氨基酸的 理化性质进行分析;利用 PSORT(https://www.genscript.com/tools/psort)在线分析软件进行亚细胞定 位预测,利用TMHMM Server v.2.0软件进行蛋白 序列跨膜区分析:使用MEGA 7.0软件对氨基酸序 列进行多序列比对分析,建立多物种系统发育树。 1.2.3 山核桃 CcGA3ox 基因在核桃中的遗传转 化 将构建好的载体 35S::CcGA3ox::GFP 转入农 杆菌 GV3101 感受态细胞中并在含有利福平(50 mg·mL⁻¹)和卡那霉素(50 mg·mL⁻¹)的LB液体培养 基悬浮培养至 OD600 值为 0.8~1.0,5 000 r·min⁻¹离心 5 min 富集菌株, 倒掉上清液, 再加入含有乙酰丁香

酮(40 mg·L⁻¹)的液体DKW培养基进行悬浮^[53]。选取生长良好的核桃体胚,在悬浮液中浸染10~15 min后,放置于加有乙酰丁香酮(40 mg·L⁻¹)的DKW固体培养基中共培养3d,再转入含有潮霉素(80 mg·L⁻¹)和羧苄青霉素(300 mg·L⁻¹)抗生素的DKW固体培养基中进行阳性体胚筛选,培养3~4 周后进行鉴定。具体步骤参照Zhang等^[54]的方法。

利用体式荧光显微镜(Carl Zeiss Stereo D13covery V12, Axio Cam MRc system)在蓝色激发光(488 nm)下,观察山核桃 35S::CcGA3ox::GFP转化体胚的荧光激发情况^[55],并对具有绿色荧光激发体细胞胚进行 PCR 鉴定(引物序列见表1)。经 PCR 鉴定的阳性体胚长至子叶胚阶段后,将体胚脱水干化3d后,置于萌发培养基中进行植株再生,之后对再生植株进行 PCR 阳性鉴定。

1.2.4 山核桃 CcGA3ox 基因功能的初步验证 从鉴定的阳性植株顶芽开始向下截取1.5 cm,培养15 d观察植株表型,并选取植株顶芽、叶片、茎段混样提取 RNA,使用 The iQ5 Real-Time PCR Detection Sys-

tem 仪器进行 qRT-PCR,测定转基因植株中 *Cc-GA3ox*的相对表达量。反应程序为^[56]:95 ℃ 10 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 31 s,40 个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 15 s。采用2^{-ΔΔCT[57]}方法计算定量结果。植物组织叶绿素的提取采用乙醇提取法^[58],采用紫外分光光度计测定波长665 nm和649 nm的吸光度值,采用公式^[59]计算结果,数据处理及显著性差异分析使用 Excle 和 SPSS 2.0 软件。

2 结果与分析

2.1 山核桃 CcGA3ox 基因的克隆和序列分析

根据设计的引物,采用PCR技术克隆扩增获得 山核桃 CcGA3ox 基因编码区全长,琼脂糖凝胶电 泳显示约1000 bp大小条带(图2-A),与目的基 因(1116 bp)大小一致。为了进一步构建山核桃 CcGA3ox 基因过量表达载体,将目的条带胶回收后 的产物与双酶切后的pC1300质粒连接,转化DH5a 大肠杆菌感受态细胞,挑选单克隆进行筛选培养,对 得到的菌液进行PCR鉴定,电泳显示条带在1000 bp 左右(图2-B),测序比对正确的序列命名为Cc-GA3ox。构建的CcGA3ox 基因过表达载体命名为 35S::CcGA3ox::GFP。



A. 山核桃 *CcGA3ox* 基因扩增电泳图。M. Maker DL2000, 泳道 1~4 为目的条带; B. 山核桃 *CcGA3ox* 基因大肠杆菌菌检电泳图。M. Maker DL5000, 泳道 1~5 为目的条带。

A. Amplification electrophoresis map of *CcGA3ox* gene. M. Maker DL2000, Lane 1-4 is the target; B. Electrophoretogram of *CcGA3ox Escherichia coli*. M. Maker is DL 5000. Lane 1-5 is the target.

图 2 山核桃 CcGA3ox 基因克隆及载体构建电泳分析

Fig. 2 Electrophoretogram of GA3ox gene cloning and vector construction in hickory

2.2 山核桃 CcGA3ox 基因的生物信息学分析

ORF Finder 软件分析结果表明,山核桃 Cc-GA3ox开放阅读框的长度为1116 bp,编码371个氨 基酸;用 ExPASy在线软件预测该基因所编码蛋白 的相对分子质量为40.69 kDa,等电点(pI)为6.67,小 于7.0,为酸性蛋白质,分子式为C1824H2836N498O537S11, 总疏水性系数为-0.209,为亲水性蛋白;用 PSORT 在线软件分析预测 CcGA3ox 蛋白质在细胞内的分 布,其中有56.5%位于细胞质中,21.7%位于细胞核, 13%位于线粒体,极少量分布在细胞膜和溶酶体中; 应用TMHMM Server v.2.0对CcGA3ox蛋白的跨膜 区域进行分析,结果显示,该蛋白的跨膜区域值为 零,在跨膜区域中氨基酸序列的期望值为0.02833, 当该结果大于18时才有跨膜区域,因此该蛋白没有 跨膜区域(图3);利用PROSITE Scan软件分析预测 蛋白结构域和功能位点,发现该蛋白含有保守的



2OG-Fe II-Oxy(288-297)结构域和3个Fe²⁺结合位 点(230,232,287),以及数目不等的基元,包括6个 酪蛋白激酶II磷酸化位点(25~28、43~46、45~48、 145~148、190~193、331~334)、5个N-糖基化位点 (85~88、242~245、243~246、279~282、292 295)、2个 蛋白激酶C磷酸化位点(97~99、349~351)、2个酰基 化位点(205~210、280~285),这些保守基元在信号 识别以及遗传转录中具有重要作用(图4)。

运用 NCBI 在线软件中的 BLAST 将 CcGA3ox 氨基酸序列与 NCBI 中 Nr (RefSeq non-redundant





proteins)数据库中选取的39个物种的GA3ox氨基 酸序列进行比对,经过ClustalW比对并利用MEGA 7.0中的NJ(Neighbor joining)法构建进化树,利用 iTOL在线软件对进化树进行修饰,最后得到不同物 种的GA3ox氨基酸序列进化树。图5显示,山核桃 CcGA3ox氨基酸序列进化树。图5显示,山核桃 CcGA3ox氨基酸序列与薄壳山核桃GA3ox (L1184S0079)的相似度最高,达到98.6%,同属一个 小分支,亲缘关系最近;其次是与核桃JrGA3ox达到 97.84%的同源率,亲缘关系较近;与板栗CmGA3ox 的同源率为84.64%,与阔叶栎QlGA3ox的同源率为 83.56%,与巴西橡胶树HbGA3ox同源率为80.7%, 与麻风树JcGA3ox同源率为79.23%。发现在同一 支内,各物种之间的差异较小,但随着分支的不断扩 大,亲缘关系值逐渐减小。

根据与山核桃的亲缘关系的远近,可将GA3ox 分为5个簇族。其中山核桃、薄壳山核桃、核桃、板 栗、阔叶栎、巴西橡胶树、麻风树、葡萄、橙子、柚子、 杨梅、白梨、山荆子、罂粟、巨桉、大叶早樱为第一簇 族,与山核桃遗传距离关系较近,亲缘关系值为 61.29%~98.60%;海枣、油棕、大葱、橄榄树、芝麻、大 麻、鹰嘴豆、油菜、榴莲、木薯、月季花为第二簇族,与 山核桃遗传距离关系相对较近,亲缘关系值为 43.12%~76.20%;案头菊、水稻、刺棘蓟、藜麦、蓝猪 耳、苦瓜、草莓、大叶藻、马铃薯、卷心菜为第三簇族, 亲缘关系值为43.39%~63.90%;番茄单独为一簇 族。

2.3 山核桃 CcGA3ox 基因在核桃中的遗传转化及 阳性检测

目前,由于山核桃体细胞胚溃传转化体系还不 够成熟,笔者选取同属于胡桃科生长健壮的核桃体 细胞胚作为遗传转化的初始材料(图6-A~B),用制 备好的35S::CcGA3ox::GFP过表达载体的农杆菌工 程菌进行侵染,将农杆菌侵染的体胚记为EO代,所 选用的E0代体胚均由一个体细胞胚分化而来,再将 E0代其表面增殖的胚状体记为E1,以此类推。培养 至E3代,体式荧光显微镜下观察发现,转化体细胞 胚生长健壮,可正常发育和增殖,与对照体胚相似, 其发育过程经历了4个时期,分别为球形胚、心形 胚、鱼雷形胚以及子叶形胚阶段。在白光视野下,对 照体胚和转化体胚形态相似,均为白色透明状;在蓝 色激发光(488 nm)条件下,35S::CcGA3ox::GFP 阳 性转化核桃体胚呈现明亮的绿色荧光(该类体胚定 为GFP阳性体胚),而对照体胚呈现较弱的绿色荧 光(图6)。数据统计结果表明,E1代体胚GFP阳性 率为32%;E2代体胚GFP阳性率为56%;E3代体胚 GFP 阳性率为77%,说明转化的体细胞胚能够稳定 遗传(表2)。

为进一步验证体胚的阳性,将GFP阳性体胚培养至E3代提取DNA,进行PCR检测,为排除假阳性的可能性,用外源GFP基因(729 bp)进行验证,发现凝胶电泳显示条带大小为750 bp左右,与GFP基因



山核桃 Carya cathayensis. CcGA3ox (CCA0475S0001); 薄壳山核桃 Carya illinoinensis. CiGA3ox (L1184S0079); 核桃 Juglans regia. Jr-GA3ox (XP_018827425.1); 板栗 Castanea mollissima. CmGA3ox (AEW67998.1); 阔叶栎 Quercus lobata. QIGA3ox (XP_030968798.1); 巴西橡 胶树 Hevea brasiliensis. HbGA3ox (XP_021660459.1); 麻风树 Jatropha curcas. JcGA3ox (XP_012073283.1); 葡萄 Vitis vinifera. VvGA3ox (XP_ 002284981.1); 橙子 Citrus sinensis. CsGA3ox (XP_006465424.1); 柚子 Citrus clementina. CcGA3ox (XP_006427125.2); 杨梅 Morella rubra. MrGA3ox (KAB1218614.1); 白梨 Pyrus bretschneideri. PbGA3ox (XP_009339604.1); 山荆子 Malus baccata. MbGA3ox (TQE04418.1); 罂粟 Papaver somniferum. PsGA3ox (XP_026404546.1); 巨桉 Eucalyptus grandis. EgGA3ox (XP_010061961.1); 大叶早樱 Cerasus subhirtella. CsGA3ox (BAD91162.1); 海枣 .Phoenix dactylifera. PdGA3ox (XP_008785607.1); 油棕 Elaeis guineensi. EgGA3ox (XP_010925284.1); 大葱 Allium fistulosum. AfGA3ox (BAG32267.1); 橄榄树 Olea europaea. OeGA3ox (XP 022884986.1); 芝麻 Sesamum indicum. SiGA3ox (XP 011072274.1); 大麻 Cannabis sativa. CsGA3ox (XP 030488464.1); 鹰嘴豆 Cicer arietinum. CaGA3ox (XP 004498636.1); 油菜 Brassica napus. BnGA3ox (XP 013710717.1); 榴莲 Durio zibethinus. DzGA3ox (XP 022777151.1); 木薯 Manihot esculenta. MeGA3ox (XP 021611256.1); 月季花 Rosa chinensis. RcGA3ox (XP_024168805.1); 案头菊 Chrysanthemum morifolium. CmGA3ox (BAG48320.1); 水稻 Oryza sativa. OsGA3ox (XP_ 015634638.1); 刺棘蓟 Cynara cardunculus. CcGA3ox (XP_024980281.1); 藜麦 Chenopodium quinoa. CqGA3ox (XP_021731922.1); 蓝猪耳 Torenia fournieri. TfGA3ox (BAJ65442.1); 苦瓜 Momordica charantia. McGA3ox (XP_022145559.1); 草莓 Fragaria vescasubsp. Fv GA3ox (XP_ 004292966.1); 大叶藻 Zostera marina. ZmGA3ox (KMZ69735.1); 马铃薯 Solanum tuberosum. StGA3ox (XP_006341659.1); 卷心菜 Brassica oleracea. BoGA3ox (XP_013619987.1); 绿豆 Vigna radiata. VrGA3ox (XP_014516137.1); 拟南芥 Arabidopsis thaliana. AtGA3ox (NP_193900.1); 番茄 Solanum lycopersicum. SIGA3ox(XP 004253252.1).

> 图 5 不同物种的 GA3ox 氨基酸序列的系统进化树 Fig. 5 Phylogenetic tree of GA3ox amino acid sequences in different species



A~D. 白光下的转化核桃体胚;A1~D1. 蓝光激发下的转化核桃体胚;E~H. 白光下的对照核桃体胚;E1~H1. 蓝光激发下的对照核桃体胚; A、E 为球形胚;B、F 为心形胚;C、G 为鱼雷形胚;D、H 为子叶形胚。标尺=100 μm。

A-D. Transgenic somatic embryo of walnut under natural light; A1-D1. Transgenic somatic embryo of walnut stimulated by blue light; E-H. Control somatic embryo of walnut under natural light; E1-H1. Control somatic embryo of walnut stimulated by blue light; A and E: spherical embryos; B and F :heart-shaped embryos; C and G: torpedo embryos; D and H :cotyledon embryos. Bar=100 µm.

图 6 核桃 35S::CcGA3ox::GFP 转化体胚荧光表达

Fig. 6 Fluorescent expression of walnut 35S::CcGA3ox::GFP transformed somatic embryos

表 2 核桃体胚培养代数对阳性率的影响

Table 2	The effect of	f generation on t	the rate of	f positive :	somatic em	bryos in wal	lnut
---------	---------------	-------------------	-------------	--------------	------------	--------------	------

E0		E1		E2		E3		
侵染数 Infections number	成活数 Survival number	萌发数 Germination number	阳性率 Positive rate/%	萌发数 Germination number	阳性率 Positive rate/%	萌发数 Germination number	阳性率 Positive rate/%	PCR 阳性率 PCR positive rate/%
20	13	50	32	105	56	150	77	63

大小相符合;同时用目的基因 CcGA3ox(1116 bp)进行再次验证,目的基因条带的 PCR 检验结果显示(图7),得到大小为1000 bp 左右的电泳条带,与目的基因大小相符(图7-A、C)。因此说明获得阳性验证体胚,且体胚 PCR 验证阳性率为63%。将 PCR 验证的阳性体胚进行脱水干化处理 3~5 d,置于添加 BA和IBA的改良 DKW 固体培养基中促其萌发,生长成 3~5 cm 再生植株,提取 DNA,进行 GFP 和目的基因的双重 PCR 验证,检测到大小约为 750 bp 和 1000 bp 的电泳条带,说明得到阳性转化 35S::Cc-GA3ox::GFP 核桃再生植株(图7-B、D)。

2.4 山核桃 CcGA3ox 基因的功能验证

2.4.1 核桃 35S::CcGA3ox::GFP 再生植株的表型分析 为了研究山核桃 CcGA3ox 基因过量表达与株高的相关性,笔者选取了3组阳性再生植株进行培养观察,3个株系分别命名为35S::CcGA3ox::GFP-1、35S::CcGA3ox::GFP-2、35S::CcGA3ox::GFP-3,所选植株截取的长度为从顶尖开始向下1.5 cm,带有2~4枚复叶。结果显示,在生长15 d后,核桃 35S::Cc-GA3ox::GFP 阳性核桃植株与对照植株相比,再生植株生长旺盛,株高较高,节间长度和叶片长度更长(图8-A~C)。株高和节间长度统计结果显示,对照



A. 阳性体胚 GFP 基因 PCR 鉴定。M. Maker DL2000, 泳道 1~6 为阳性体胚。B. 阳性再生植株 GFP 基因 PCR 鉴定, M. Maker DL2000, 泳道 1~7 为阳性再生植株。C. 阳性体胚目的基因 PCR 鉴定。M. Maker DL5000, 泳道 1~8 为阳性体胚。D. 阳性再生植株目的基因 PCR 鉴定。M. Maker DL5000, 泳道 1~7 为阳性植株。

A. Identification of GFP gene from positive somatic embryos by PCR. M. Maker DL2000, lane 1-6 as positive somatic embryos. B. Identification of GFP gene in positive regenerated plants by PCR. M. Maker DL2000, lane 1-7 as positive regenerated plants. C. Identification of target gene from positive somatic embryos by PCR. M. Maker DL5000, lane 1-8 as positive somatic embryos. D. Identification of target gene in positive regenerated plants by PCR. M. Maker DL5000, lane 1-7 as positive somatic embryos. D. Identification of target gene in positive regenerated plants by PCR. M. Maker DL5000, lane 1-7 as positive regenerated plants.

图 7 35S::CcGA3ox::GFP 转核桃体胚及再生植株 PCR 鉴定 Fig. 7 PCR identification of transformed somatic embryos and regenerated plants of 35S::CcGA3ox::GFP in walnut

植株平均高度为 20.3 mm,节间平均长度为 3.8 mm。再生植株株系 35S::CcGA3ox::GFP-1 平均株高为 25.2 mm,比对照增加了 24%,节间平均长为 4.8 mm,比对照增加了 26%; 35S::CcGA3ox::GFP-2 平均株高为 25.1 mm,比对照增加了 24%; 35S::Cc-GA3ox::GFP-3 平均株高为 25.8 mm,比对照增加了

27%,节间平均长度为4.3 mm,比对照增加了27% (图9)。

为探究山核桃 CcGA3ox 基因在阳性转化植株和未转化植株中表达量的差异性,提取 35S::Cc-GA3ox::GFP 再生植株的 RNA,通过 qRT-PCR 检测 CcGA3ox 基因在核桃再生植株中的相对表达量。结果显示, 35S::CcGA3ox::GFP 株系阳性植株 Cc-



A. 对照植株和阳性再生植株在 0 d 的表型; B. 对照植株和再生阳性植株在 15 d 的表型; C. 对照植株及阳性再生植株株茎及叶片表型对比。标尺=10 mm。

A. The phenotypes of a control and regenerated positive plants at 0 day; B. The phenotypes of a control and regenerated positive plants at 15 days; C. The phenotypes of a control and regenerated positive plants at stem and leaves; Bar=10 mm.

图 8 核桃 35S::CcGA3ox::GFP 阳性再生植株的表型分析

Fig. 8 Phenotypic analysis of regenerated plants of walnut 35S::CcGA3ox::GFP



单因素方差分析显著性,不同小写字母表示差异显著(p < 0.05)。下同。 Significance of one-way ANOVA, different small letters indicated significant difference (p < 0.05). The same below. 图 9 核桃 35S::CcGA3ox::GFP 再生植株株高及节间长度分析 Fig. 9 Analysis of plant height and internode length of walnut 35S::CcGA3ox::GFP regenerated plants

GA3ox 基因的表达量均显著高于对照植株,平均相对表达量是对照植株的137倍。其中,35S::Cc-GA3ox::GFP-1株系的相对表达量是对照植株的130倍;35S::CcGA3ox::GF-2株系的相对表达量是对照植株的141倍;35S::CcGA3ox::GF-3株系的相对表达量是对照植株的140倍(图10)。

2.4.2 山核桃 CcGA3ox 植株中叶绿素含量分析 通过表型观察,山核桃 35S::CcGA3ox::GFP 再生植 株阳性株系呈现肉眼所见的叶色变浅。选取3个株 系的阳性再生植株,进行叶绿素含量的测定,结果显 示,与对照植株相比,阳性再生植株的叶绿素含量显 著降低。35S::CcGA3ox::GFP-1、35S::CcGA3ox:: GFP-2和35S::CcGA3ox::GFP-3阳性再生植株的叶绿素 a 含量(w,后同)分别为0.272 5、0.385 0和 0.255 7 mg·g⁻¹,显著低于对照(0.520 5 mg·g⁻¹);3个 阳性再生植株的叶绿素b含量分别为0.363 8、0.403 6 和0.346 7 mg·g⁻¹,显著低于对照(0.508 7 mg·g⁻¹);同 样,3个阳性再生植株总叶绿素含量分别为0.636 3、 0.788 7、0.602 4 mg·g⁻¹,显著低于对照(1.029 1 mg·g⁻¹)。 与对照植株相比,阳性再生植株平均叶绿素 a 含量 减少41.5%,平均叶绿素b含量减少29.3%,总叶绿 素含量下降34.4%(图11)。



图 10 核桃 35S::CcGA3ox::GFP 再生植株相对表达量分析 Fig. 10 Relative expression analysis of regenerated plants of walnut 35S:: CcGA3ox:: GFP



Fig. 11 Analysis of chlorophyll content of regenerated plants in walnut 35S::CcGA3ox::GFP

3 讨 论

GAs参与植物生长发育的整个过程,是植物的 重要调控激素之一,GAs的缺乏会导致植物生长缓 慢,出现矮化表型、雄性不育等现象^[60]。GA3ox作为 GAs 合成过程中关键限速酶之一,参与调控GAs 最 后合成代谢阶段^[61]。目前,有关GA3ox基因的研究 大多集中在模式植物和农作物方面,如水稻、拟南 芥、小麦、玉米等[31]。在果树中,有关GA3ox基因生 物学功能验证方面报道较少。本研究中,笔者基于 Huang 等^[62]山核桃的转录组数据,通过基因克隆获 得编码山核桃 GA3ox 基因的完整开放阅读框序列, 通过对该基因的生物信息学分析,发现山核桃 Cc-GA3ox 基因序列长度为1 116 bp,编码 371 个氨基 酸,相对分子质量为40.69 kDa,等电点为6.67,分子 式为C1824H2836N498O537S11。不同物种的同源序列比对 结果表明,山核桃 CcGA3ox 基因属于2-酮戊二酸依 赖性双加氧酶(2-ODDs)^[63],这与葡萄、小麦 GA3ox 中的比对结果一致^[38,40]。PSORT在线软件分析表 明,山核桃CcGA3ox蛋白主要定位于细胞质,不存 在信号肽和跨膜结构域,这与铁皮石斛GA3ox 蛋 白[64]类似。进一步将山核桃 CcGA3ox 基因编码的氨 基酸序列与其他物种的氨基酸序列在NCBI中进行 比对,发现其与薄壳山核桃亲缘 CiGA3ox 关系最 近,同源率高达98.6%;此外,其与核桃、板栗、阔叶 栎 GA3ox 亲缘关系较近,同源率分别为97.84%、 84.64%、83.56%,与小麦、油菜、拟南芥、水稻的同源 率分别为61.03%、59.7%、44.33%、38.46%,说明在进 化过程中,亲缘关系越近,同源率越高。

研究表明,果树树体的矮化机制与以赤霉素为 中心的激素代谢密切相关^[6]。GAs 相关合成代谢酶 的基因表达量可改变植株高度⁶⁶¹。GA20ox 作为 GAs 合成途径中的关键酶,在GAs 合成最后步骤中 起到限速酶的作用从而调控 GAs 含量。果树中 GA20ox 基因的遗传转化研究表明, GA20ox 表达量 的变化明显改变转化植株体内的GAs含量,从而影 响植物株高[61]。在柑橘中过表达GA20ox基因,过表 达植株中的GA1含量是对照植株的1.8~2.8倍,过表 达植株的高度与对照相比明显增高,节间增长,而 GA20ox 基因沉默表达植株的 GA1 含量仅为对照植 株的46%~62%,表现出矮化表型167。在梨中,同样 发现 GA20ox 基因在不同品种的表达量与植株高度 呈正相关,不同发育阶段新梢叶片中GA20ox基因的 表达强度为'中矮1号'<'锦香'<'早酥',与植株 高矮表现一致[68]。与GA20ox相似,GA3ox基因表达 量的改变也可影响植株高度。杂交获得的短枝型苹 果'苏帅'与其亲本相比,枝条粗壮节间较短,植株较 矮,通过对'苏帅'和其亲本的内源激素测定分析,发 现'苏帅'中GA3ox4 同源基因表达量显著低于亲 本^[69]。紫花苜蓿 MsDWF1 基因编码 GA3ox,该基因 自然突变体植株呈现矮化表型,且这种矮化表型可 被GA3恢复,但不能被野生型砧木恢复^[70]。以上研 究结果表明,GA3ox 基因正向调控植株高度的变 化。笔者在本研究中通过过量表达山核桃 GA3ox 基 因,发现核桃再生植株高度显著高于对照,表明过量 表达该基因可促进植株长高,该结论与前人研究结 果一致。

研究显示,GAs调控植株高度主要通过节间伸

长或缩短实现,一般来说,节的数量不变^[67]。Dennis 等^[71]构建了转*PsGA3ox*基因的过表达豌豆株系,发 现转化植株平均节间长度比对照植株增加22%,节 间明显伸长,但节的数量不变,进一步检测结果表 明,转化植株*PsGA3ox*在节间组织中的相对表达量 为对照植株的5倍。土豆*StGA3ox2*基因受到RNA 干扰后,再生植株呈现矮化性状,与对照相比,节间 变短^[43]。在本研究中,在*CcGA3ox*的过表达核桃植 株中,茎秆的伸长主要是通过节间伸长实现的,而非 节间数目的增多。

此外,GAs还在植物的生长过程中间接调控植 物体内叶绿素的合成[45]。研究表明,GAs主要通过 DELLA蛋白介导调控叶绿素的合成¹⁰,同时,GAs 通过影响叶绿素合成代谢关键酶的作用,维持叶绿 素含量,减缓植物衰老^[20],CND41作为一个负调控 叶绿体转录水平的结合蛋白,CND41反义突变转基 因烟草植株矮化,叶片深绿,开花延迟,GAs含量降 低,并推测GA20ox氧化酶转录水平降低[72]。与野生 型水稻相比,水稻GAs生物合成基因3b-羟基化酶 (GA3ox)功能丧失的突变体叶片面积减少,每单位 叶面积中叶绿素含量增加,具有更强的光合作用,叶 片颜色更深^[45]。玉米GAs缺乏矮化突变体d1,编码 GA3ox氧化酶并阻断GAs形成,出现节间缩短表 型,叶片宽且呈深绿色^[42]。在麻风树中过量表达Jc-GA2ox6基因,通过调控植株内源GA1和GA4水平, 从而产生具有更高叶绿素含量的深绿色叶片及矮 小的表型[73]。本研究中过量表达CcGA3ox可使核 桃转化株系的叶绿素含量显著降低,与前人研究结 果一致。

GA3ox 基因在调控植物生长发育^[31]、遗传代谢^[26]、非生物胁迫^[30]等方面起着重要作用,随着研究的进一步深入,GA3ox 基因在调控果树生长发育中的机制将会被逐渐揭示,本研究也为分子水平利用 基因敲除、定向突变等手段深入研究GA3ox 的生物 学功能奠定了基础。

4 结 论

从山核桃中分离获得 CcGA3ox 基因,并对该基因序列进行生物信息学分析。功能鉴定结果初步表明,山核桃 CcGA3ox 基因过表达可促进核桃植株高度增加,降低叶绿素含量,为进一步明确该基因的功能特征及其参与调控植株生长的分子机制提供了良

好的理论依据。

参考文献 References:

- 郑万钧.中国树木志[M].北京:中国林业出版社,1985:23-76.
 ZHENG Wanjun. Chinese tree chronicles[M]. Beijing: China Forestry Press,1985:23-76.
- [2] 吕芳德,黄菁.山核桃属植物研究进展[J]. 经济林研究,2005, 23(2):72-75.

LÜ Fangde, HUANG Jing. Advances of *Carya* Nutt[J]. Non-wood Forest Research, 2005, 23(2): 72-75.

[3] 杨颖.临安市山核桃生态化经营模式的研究[D].临安:浙江农 林大学,2017.

YANG Ying. Research on ecology management model of *Carya cathayensis* in Lin' an county[D]. Lin' an: Zhejiang Agricultural and Forestry University, 2017.

- [4] 陈咪佳.山核桃主要营养成分比较及其加工影响的研究[D]. 临安:浙江农林大学,2017.
 CHEN Mijia. The research on comparison of main nutritional components of hickory and influence of processing effect[D].
 Lin'an: Zhejiang Agricultural and Forestry University,2017.
- [5] 郑燕. 安徽省山核桃产业发展现状及对策研究[D]. 合肥:安徽 农业大学,2016.
 ZHENG Yan. Research on the present situation and development of *Carya cathayensiss* Sarg. industry in Anhui province
- [D]. Hefei: Anhui Agricultural University,2016.
 [6] 许小峰,张蔚,徐九华,杨林,邓世维.便携式山核桃动力采摘 设备的研究[J]. 木材加工机械,2012,23(5): 51-54.
 XU Xiaofeng,ZHANG Wei,XU Jiuhua,YANG Lin,DENG Shiwei. Research on picking equipment of portable hickory[J].
 Wood Processing Machinery,2012,23(5): 51-54.
- [7] WAILER E W. The biochemistry and physiology of gibberellins, vols I and II [J]. Plant, Cell and Environment, 2010, 7(8): 631-632.
- [8] HEDDEN P, PHILLIPS A L. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes[J]. Trends in Plant Science, 2001, 5 (12): 523-530.
- [9] HEDDEN P. Gibberellin metabolism and its regulation[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2002, 20(4): 317-318.
- [10] JONES R L, JACOBSEN J V. Regulation of synthesis and transport of secreted proteins in cereal aleurone[J]. International Review of Cytology, 1991, 126: 49-88.
- [11] BIEMELT S, TSCHIERSCH H, SONNEWALD U. Impact of altered gibberellin metabolism on biomass accumulation, lignin biosynthesis, and photosynthesis in transgenic tobacco plants[J]. Plant Physiology, 2004, 135(1): 254-265.
- [12] ACHARD P, GENSCHIK P. Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(4):1085-1092.
- [13] KING K E, MORITZ T, HARBERD N P. Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA[J]. Genetics, 2001, 159(2):767-776.
- [14] DONG B, DENG Y, WANG H B, GAO R, STEPHEN G K,

CHEN S M, CHEN F D, JIANG J F. Gibberellic acid signaling is required to induce flowering of chrysanthemums grown under both short and long days[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(6):1259

- [15] YAMGUCHI N, WINTER C M, WU M F, KANNO Y, YAMA-GUCHI A, SEO M, WAGNER D. Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in *Arabidopsis*[J]. Science, 2014, 344(6184): 638-641.
- [16] CHORY J, LI J. Gibberellins, brassinosteroids and light regulated development[J]. Plant Cell and Environment, 1997, 20(6): 801-806.
- [17] GHOSH A, CHIKARA J, CHAUDHARY D R, PRAKASH A R, BORICHA G, ZALA A. Paclobutrazol arrests vegetative growth and unveils unexpressed yield potential of *Jatropha curcas*[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2010, 29(3): 307-315.
- [18] 李哲馨,钮世辉,高琼,李伟.赤霉素调控木质部发育的细胞 学研究[J].北京林业大学学报,2014,36(2):68-73.
 LI Zhexin, NIU Shihui, GAO Qiong, LI Wei. Cytological study of gibberellin regulated xylem development[J]. Journal of Beijing Forestry University,2014,36(2):68-73.
- [19] MA Z X, HU X P, CAI W J, HUANG W H, ZHOU X, LUO Q, YANG H Q, WANG J W, HUANG J R. *Arabidopsis* miR171targeted scarecrow-like proteins bind to GT *cis*- elements and mediate gibberellin- regulated chlorophyll biosynthesis under light conditions[J]. Plos Genetics, 2014, 10(8): e1004519.
- [20] LI J R, YU K, WEI J R, MA Q, WANG B Q, YU D. Gibberellin retards chlorophyll degradation during senescence of *Paris polyphylla*[J]. Biologia Plantarum, 2010, 54(2): 395-399.
- [21] 谈心,马欣荣.赤霉素生物合成途径及其相关研究进展[J].应用与环境生物学报,2008,14(4):571-577.
 TAN Xin, MA Xinrong. Advance in research of gibberellin biosynthesis pathway and related progress[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology,2008,14(4): 571-577
- [22] OLSZEWSKI N, SUN T P, GUBLER F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways[J]. The Plant Cell,2002,14(Suppl.): 61-80.
- [23] 周明兵,汤定钦.高等植物赤霉素生物合成及其关键酶的研究进展[J].浙江林学院学报,2004,21(3): 344-348. ZHOU Mingbing, TANG Dingqin. Research progress of gibberellin biosynthesis and its key enzymes in higher plants[J]. Journal of Zhejiang Forestry College,2004,21(3): 112-116.
- [24] 王金祥,李玲,潘瑞炽.高等植物中赤霉素的生物合成及其调控[J].植物生理学通讯,2002,38(1):1-8.
 WANG Jinxiang,LI Ling,PAN Ruizhi. Gibberellin biosynthesis and its regulation in higher plants[J]. Plant Physiology Communications,2002,38(1):1-8.
- [25] HAN F M, ZHU B G. Evolutionary analysis of three gibberellin oxidase genesin rice, *Arabidopsis*, and soybean[J]. Gene, 2011, 473(1): 23-35.
- [26] ACHARD P, GONG F, CHEMINANT S, ALIOUA M, HED-DEN P, GENSCHIK P. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the

growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism[J]. The Plant Cell, 2008, 20(8): 2117-2129.

- [27] OZGA J A, YU J, REINECKE D M. Pollination-, development-, and auxin- specific regulation of gibberellin 3β - hydroxylase gene expression in pea fruit and seeds[J]. Plant Physiology, 2003,131(3): 1137-1146.
- [28] TOYOMASU T, KAWAIDE H, MITSUHASHI W, INOIE Y. KAMIYA Y. Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds[J]. Plant Physiology, 1998, 118(4): 1517-1523.
- [29] 牛亚利,赵芊,张肖晗,艾秋实,宋水山.霉素信号在非生物胁 迫中的作用及其调控机制研究进展[J].生物技术通报,2015, 31(10): 31-37.

NIU Yali, ZHAO Qian, ZHANG Xiaohan, AI Qiushi, SONG Shuishan. Research progress on the role and regulation mechanism of gibberellin signal in response to abiotic stress[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(10): 31-37.

- [30] YANG L J, YANG D B, YAN X J, CUI L, WANG Z Y, YUAN H Z. The role of gibberellins in improving the resistance of tebuconazole-coated maize seeds to chilling stress by microencapsulation[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 35447.
- [31] 杨意宏,徐浩,陈段芬,高志民.高等植物赤霉素 3-β-双氧化酶 基因研究进展[J]. 生物技术通报,2018,34(3):18-22.
 YANG Yihong, XU Hao, CHEN Duanfen, GAO Zhimin. Research advance on the gene for gibberellin 3-β-dioxygenase gene in higher plants[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(3): 18-22.
- [32] CHIANG H H, HWANG I, GOODMAN H M. Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus[J]. Plant Cell, 1995, 7(2): 195-201.
- [33] ITOH H, TANAKA-UEGUCHI M, KAWAIDE H, CHEN X B, KAMIYA Y, MATSUOKA M. The gene encoding tobacco gibberellin 3β-ydroxylase is expressed at the site of GA action during stem elongation and flower organ development[J]. The Plant Journal, 1999, 20(1): 15-24.
- [34] LANGE T, KAPPLER J, FISCHER A, FRISSE A, PADEFFKE T, SCHMIDKE S, LANGE M J P. Gibberellin biosynthesis in developing pumpkin seedlings[J]. Plant Physiology, 2005, 139 (1): 213-223.
- [35] APPLEFORD N E J, EVANS D J, LENTON J R, GASKIN P, CROKER S J, DEVOS K M, PHILLIPS A L. HEDDEN P. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat[J]. Planta, 2006, 223(3): 568-582.
- [36] ISRAEISSON M, MELLEROWICZ E, CHONO M, GULL-BERG J, MORITZ T. Cloning and overproduction of gibberellin 3-oxidase in hybrid aspen trees effects on gibberellin homeostasis and development[J]. Plant Physiology, 2004, 135(1): 221-230.
- [37] 赵慧君,余海忠,王海燕,朱文权.苹果赤霉素 3-氧化酶 1(*Md-GA3ox1*)在烟草中的表达研究[J]. 湖北文理学院学报,2015, 36(2):17-20.

ZHAO Huijun, YU Haizhong, WANG Haiyan, ZHU Wenquan. Research on apple GA3-oxidase 1 (*MdGA3ox1*) expression in tobacco[J]. Journal of Hubei University of Arts and Science, 2015, 36(2): 17-20.

[38] 刘炳臣,王茜,王跃进,张朝红.葡萄活性赤霉素合成关键基因 VvGA3ox 家族的克隆和表达分析[J]. 园艺学报,2016,43 (12): 2293-2303.

LIU Bingchen, WANG Qian, WANG Yuejin, ZHANG Chaohong. Cloning and expression analysis of the key gene family *Vvga3ox* in active gibberellin synthesis in grapevine[J]. Acta Horticulturae Scinica, 2016, 43(12): 2293-2303.

- [39] 乔枫,赵开军.植物中赤霉素代谢酶与株高的关系[J].生物技术通报,2011,27(3):1-6.
 QIAO Feng, ZHAO Kaijun. Relationship between plant height and gibberellin metabolic enzymes[J]. Biotechnology Bulletin, 2011,27(3): 1-6.
- [40] 刘颖,阳文龙,郭小丽,翟晓,刘冬成,孙家柱,夏石头,张爱 民. Rht12 矮秆小麦 GA3ox 基因的克隆与表达分析[J]. 分子 植物育种,2015,13(2):241-253.

LIU Ying, YANG Wenlong, GUO Xiaoli, ZHAI Xiao, LIU Dongcheng, SUN Jiazhu, XIA Shitou, ZHANG Aimin, Cloning and expression analysis of *GA3ox* gene from *Rht12* dwarf wheat [J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(2): 241-253.

[41] 徐江民,方云霞,曾龙军,徐娜,焦然,胡娟,马路,肖飒清,黄 玲,胡江,饶玉春,王跃星.水稻矮化小穗突变 *d18* 新等位基 因的发现及生理功能分析[J].中国科学:生命科学,2018,48 (6): 692-704.

XU Jiangmin, FANG Yunxia, ZENG Longjun, XU Na, JIAO Ran, HU Juan, MA Lu, XIAO Saqing, HUANG Ling, HU Jiang, RAO Yuchun, WANG Yuexing. Identification and physiological function analysis of a new dwarf spikelet *Dwarf18*-allele mutant in rice[J]. Scientia Sinica Vitae, 2018, 48(6): 692-704.

- [42] CHEN Y, HOU M M, LIU L J, WU S, SHEN Y, ISHIYAMA K, KOBAYASHI M, MCCARTY D R, TAN B C. The maize *DWARF1* encodes a gibberellin 3-oxidase and is dual localized to the nucleus and cytosol[J]. Plant Physiology, 2014, 166(4): 2028-2039.
- [43] ROUMELIOTIS E, KLOOSTERMAN B, OORTWIJN M, LANGE T, VISSER R G F, BACHEM C W B. Down regulation of *StGA3ox* genes in potato results in altered GA content and affect plant and tuber growth characteristics[J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(14):1228-1234.
- [44] WOLF F T, HABER A H. Chlorophyll content of gibberellintreated wheat seedlings[J]. Nature, 1960, 186(4720): 217-218.
- [45] JIANG X S, LI H Y, WANG T, PENG C L, WANG H Y, WU H, WANG X J. Gibberellin indirectly promotes chloroplast biogenesis as a means to maintain the chloroplast population of expanded cells[J]. Plant Journal, 2012, 72(5):768-780.
- [46] 王富廷,杨炜茹,张启翔.垂枝梅花赤霉素 GA20ox、GA3ox、 GID1 基因克隆与表达分析[C]//张启翔.中国观赏园艺研究 进展,北京:中国林业出版社,2014.

WANG Futing, YANG Weiru, ZHANG Qixiang. Molecular cloning and expression analysis of *GA200x*, *GA30x* and *GID1* of *Prunus mume*[C]// ZHANG Qixiang. Advances in Omamental Horticulture of China, Beijing: China Forestry Press, 2014.

[47] 王增光,柴国华,王芝瑶,唐贤丰,孙长江,周功克,马三梅.拟 南芥 AtGA3ox1 和 AtGA3ox2 基因影响茎秆次生细胞壁增厚 的分子机理[J].遗传,2013,35(5):655-665.

WANG Zengguang, CHAI Guohua, WANG Zhiyao, TANG Xianfeng, SUN Changjiang, ZHOU Gongke, MA Sanmei. Molecular mechanism of *AtGA3ox1* and *Atga3ox2* genes affecting secondary wall thickening in stems in *Arabidopsis*[J]. Hereditas, 2013, 35(5): 655-665.

[48] 胡恒康,江香梅,张启香,陈贝,黄坚软.碳源对山核桃体细胞
 胚发生和植株再生的影响[J].浙江农林大学学报,2011,28
 (6):911-917.

HU Hengkang, JIANG Xiangmei, ZHANG Qixiang, CHEN Bei, HUANG Jianqin. Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carya cathayensis* embryos using different carbon source[J]. Journal of Zhejiang Agricultural and Forestry University, 2011, 28(6): 911-917.

- [49] TUO D C, SHEN W T, YAN P, LI X Y, ZHOU P. Rapid construction of stable infectious full-length cDNA clone of papaya leaf distortion mosaic virus using in-fusion cloning[J]. Viruses, 2015,7(12): 6241-6250.
- [50] SAITO T, BAI S L, ITO A, SAKAMOTO D, SAITO T, UBI B E, TMAI T, MARIGUCHI T. Expression and genomic structure of the dormancy-associated MADS box genes *MADS13* in Japanese pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai) that differ in their chilling requirement for endodormancy release[J]. Tree Physiology, 2013, 33(6): 654-667.
- [51] SAMBROOK J, FRITSCH F J, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[J]. Biochemical Education, 1983, 11 (2): 182-183.
- [52] HOOD E E, GELVIN S B, MELCHERS L S, HOEKEMA A. New Agrobacterium helper plasmids for gene transfer to plants[J]. Transgenic Research, 1993, 2(4): 208-218.
- [53] 刘会君. 核桃 JrAMT 基因的克隆与功能分析[D]. 杭州:浙江 农林大学,2019.
 LIU Huijun. Cloning and functional analysis of walnut JrAMT gene[D]. Hangzhou: Zhejiang Agricultural and Forestry Univer-
- sity, 2019.
 [54] ZHANG Q X, WALAWAGE S L, TRICOLI D M, DANDEKAR A M, LESLIE C A. A red fluorescent protein (DsRED) from *Discosoma* sp. as a reporter for gene expression in walnut somatic embryos[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(5): 861-869.
- [55] LESLIE C A, HACKETT W P, MCGRANAHAN G H. Improved rooting methods for walnut (*Juglans*) microshoots[J]. Acta Horticulturae, 2010, 861: 365-372.
- [56] GUO Y P, LI W, SUN H Y, WANG N, YU H S. CHEN H G. Detection and quantification of *Rhizoctonia cerealis* in soil using real-time PCR[J]. Journal of General Plant Pathology, 2012, 78(4): 247-254.
- [57] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔ Ct} method[J]. Methods, 2011, 25: 402-408.

ZHANG Zhiliang, ZHAI Weijing, LI Xiaofang. Experimental guidance of plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 2009.

[59] 邱振鲁,李筱涵,朱蕾,张稳轩,刘文薪,于洪泉.赤霉素、6-糠 氨基嘌呤与萘乙酸对风信子花期及叶绿素含量的影响[J].绿 色科技,2018(16):253-255.

QIU Zhenlu, LI Xiaohan, ZHU Lei, ZHANG Wenxuan, LIU Wenxin, YU Hongquan. Effects of gibberellin, 6-furylaminopurine and NAA on flowering period and chlorophyll content of hyacinth[J]. Journal of Green Science and Technology, 2018 (16): 253-255.

[60] 陈晶晶,胡玉林,胡会刚,段雅婕,庞振才,谢江辉.植物矮化 相关基因的研究进展[J]. 广东农业科学,2014,41(15):126-132.

CHEN Jingjing, HU Yulin, HU Huigang, DUAN Yajie, PANG Zhencai, XIE Jianghui. Research advances on dwarfing gene in plants[J]. Guangdong Agricultural Science, 2014, 41(15): 126-132.

- [61] 岳川,曾建明,曹红利,王新超,章志芳.高等植物赤霉素代谢及其信号转导通路[J].植物生理学报,2012,48(2):118-128.
 YUE Chuan, ZENG Jianming, CAO Hongli, WANG Xinchao, ZHANG Zhifang. Gibberellin metabolism and signal pathway in higher plants[J]. Plant Physiology Journal, 2012, 48(2): 118-128.
- [62] HUANG Y J, XIAO L H, ZHANG Z R,, HUANG J Q. The genomes of pecan and Chinese hickory provide insights into *Carya* evolution and nut nutrition[J] Gigaence, 2019, 8(5): 1-17.
- [63] YAMAGUCHI S, KAMIYA Y. Gibberellin biosynthesis: Its regulation by endogenous and environmental signals[J]. Plant and Cell Physiology, 2000, 41(3): 251-257.
- [64] 刘思思,张岗,陈晓梅,李淑超,陈娟,郭顺星.铁皮石斛赤霉素 3-氧化酶基因的克隆及表达分析[J].中草药,2016,47(6): 990-996.

LIU Sisi, ZHANG Gang, CHEN Xiaomei, LI Shuchao, CHEN Juan, GUO Shunxing. Cloning and expression analysis of gibberellin 3- oxidase gene of *Dendrobium candidum*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(6): 990-996.

[65] FAUST M. 决定树体大小的理论机制[J]. 吴帮良译国外农学 (果树),1992(1): 13-14.

FAUST M. The theoretical mechanism of determining tree size [J]. WU Bangliang Trans Foreign Agriculture (fruit trees), 1992 (1): 13-14.

- [66] 王弋,董晨,魏永赞,郑雪文,李伟才.GA 信号途径及其调控 果树生长发育的研究进展[J]. 果树学报,2018,35(4): 110-121.
 WANG Yi, DONG Chen, WEI Yongzan, ZHENG Xuewen, LI Weicai. Research progress on GA signaling pathway and its function in regulating fruit tree growth and development[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(4): 110-121.
- [67] FAGOAGA C, TADEO F R, IGLESIAS D J, HUERTA L, LISO I. VIDAL A M, TALON M T, NAVARRO L, CARCÍA-MATÍNEZ J L, PEÑA L. Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA20-oxidase gene modifies plant architecture[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(6): 1407-1420.
- [68] 宣利利,欧春青,王斐,王志刚,程飞飞,李振茹,姜淑苓.梨矮 化砧木中矮1号GA20-氧化酶基因克隆与表达分析[J].果树 学报,2011,28(5):883-887.

XUAN Lili, OU Chunqing, WANG Fei, WANG Zhigang, CHENG Feifei, LI Zhenru, JIANG Shuling. Isolation and expression analysis of gibberellin 20- oxidase gene from pear dwarfing Zhongai 1[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(5): 883-887.

- [69] 辛璐. 短枝型苹果'苏帅'赤霉素相关差异基因的筛选与表达 分析[D]. 南京:南京农业大学,2015.
 XIN Lu. Screening and expression of the difference for gibberellin related genes of spur-type apple 'Sushuai' [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University,2015.
- [70] DALMADI Á, KALÓ P, JAKAB J, SASKŐI A, PETROVICS T, DEÁK G, KISS G B. Dwarf plants of diploid *Medicago sati-va* carry a mutation in the gibberellin 3-β-hydroxylase gene[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(8): 1271-1279.
- [71] REINECKE D M, WICKRAMARATHNA A D, OZGA J A, KUREPIN L V, JIN A L, GOOD A G, PHARIS R P. Gibberellin 3-oxidase gene expression patterns influence gibberellin biosynthesis, growth, and development in pea[J]. Plant Physiology, 2013,163(2): 929-945.
- [72] NAKANO T, NAGATA N, KIMURA T, SEKIMOTO M, KAWAIDE H, MURAKAMI S, KANEKO Y, MATSUSHIMA H, KAMIYA Y, SATO F, YOSHIDA S. CND41, a chloroplast nucleoid protein that regulates plastid development, causes reduced gibberellin content and dwarfism in tobacco[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 117(1): 130-136.
- [73] HU Y X, TAO Y B, XU Z F. Overexpression of *Jatropha* Gibberellin 2- oxidase 6 (*JcGA2ox6*) induces dwarfism and smaller leaves, flowers and fruits in *Arabidopsis* and *Jatropha*[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 2103.