

唐菖蒲丙二烯氧化物环化酶基因 *GhAOC* 的克隆与表达分析

连青龙^{1,2} 李晓昕² 钟雄辉² 尹义蕾¹ 义鸣放²*

(1. 农业部 规划设计研究院设施农业研究所, 北京 100125;

2. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要 克隆唐菖蒲 *AOC* 基因的全长 cDNA 序列, 并分析该基因的表达模式及其对茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 生物合成的影响。以唐菖蒲栽培品种 'Rose Supreme' 的球茎为试材, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆 *AOC* 基因的全长 cDNA 序列; 利用基因枪方法进行 *GhAOC* 基因的亚细胞定位分析; 运用实时荧光定量 PCR 技术分析 *GhAOC* 基因的表达模式。克隆了 1 个全长为 898 bp 的茉莉酸生物合成关键酶丙二烯氧化物环化酶 (allene oxide cyclase, *AOC*) 基因的 cDNA 序列, 命名为 *GhAOC*。该序列含有 1 个 735 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 244 个氨基酸, 推导的蛋白质分子量为 26.52 ku。亚细胞定位分析表明 *GhAOC* 是叶绿体蛋白。实时荧光定量 RT-PCR 表达分析显示, 该基因在唐菖蒲叶、花、根、匍匐茎、新球茎和籽球上都表达, 其中在新球茎和籽球中表达量最高; 经过 0.1~0.5 mmol/L 的 MJ (methyl jasmonate, 茉莉酸甲酯) 处理后, 逐渐提高了 *GhAOC* 基因在球茎中的表达量和内源 MJ 含量。*GhAOC* 基因的表达促进了唐菖蒲茉莉酸的生物合成。

关键词 唐菖蒲; *AOC* 基因; JA; 克隆; 表达

中图分类号 S 682.2

文章编号 1007-4333(2012)05-0046-08

文献标志码 A

Cloning and expression analysis of allene oxide cyclase gene *GhAOC* from *Gladiolus hybridus*

LIAN Qing-long^{1,2}, LI Xiao-xin², ZHONG Xiong-hui², YIN Yi-lei¹, YI Ming-fang²*

(1. Institute of Facility Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Engineering,

Ministry of Agriculture of People's Republic of China, Beijing 100125, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract To clone the full-length cDNA of *GhAOC* and analyze the expression patterns of *GhAOC* and the effect on the biosynthesis of jasmonic acid. The full length cDNA of *GhAOC* was cloned in *Gladiolus hybridus* 'Rose Supreme' corms by RT-PCR and RACE. The technology of gene gun bombardment was used to analyze the sub-cellular localization of *GhAOC*. The real time RT-PCR was used to analyze the expression pattern of *GhAOC*. A full-length cDNA named *GhAOC* encoding a key enzyme of the biosynthesis of jasmonic acid was cloned in *Gladiolus*. The open reading frame encompassed 735 bp encoding a polypeptide of 244 amino acids with calculated protein molecular mass of 26.52 ku. The sub-cellular localization analysis indicated that *GhAOC* was a chloroplast protein. Real time RT-PCR analysis showed that *GhAOC* gene was expressed in leaf, flower, root, stolon, corm and cormel, and the relatively high expression level of *GhAOC* was observed in corm and cormel. Meanwhile, the expression level and the endogenous MJ content in corms steadily increased under MJ treatment with a raising concentration gradients from 0.1 mmol/L to 0.5 mmol/L. Based on the results of our pilot study, the expression of *GhAOC* promoted the the biosynthesis of jasmonic acid in *Gladiolus hybridus*.

Key words *Gladiolus hybridus*; allene oxide cyclase; jasmonic acid; cloning; expression

收稿日期: 2012-04-09

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903020, 200903009)

第一作者: 连青龙, 博士, 主要从事设施园艺栽培生理与生物技术研究, E-mail: qinglong_lian@163.com

通讯作者: 义鸣放, 教授, 主要从事观赏植物栽培生理与生物技术研究, E-mail: ymfang@cau.edu.cn

唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 是鸢尾科唐菖蒲属植物, 花色丰富和花型美观, 是著名的世界四大切花之一, 在我国有广泛栽培。在实际生产中由于病毒等外界逆境的伤害导致唐菖蒲种性退化问题突出, 严重影响了生产切花的品质。丙二烯氧化物环化酶 (allene oxide cyclase, AOC) 是茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 生物合成途径中的一个特征酶和关键酶, 在 JA 生物合成过程中起着重要作用。茉莉酸类化合物 (jasmonic acids, JAs) 不但参与调节植物的生理发育过程, 而且参与调节植物的防御系统, 包括抵抗病原菌侵袭、干旱胁迫、渗透胁迫、机械损伤以及伤害应答等^[1-2]。如在外界机械创伤、病虫害防御和不利的环境因子胁迫等信号转导中起信使作用, 可诱导一系列植物防御基因的表达和防御反应化学物质的合成等, 并调节植物的“免疫”和应激反应^[2-6]。同时, JAs 还调控与植物发育相关基因的表达^[7], 这些基因功能的深入分析将详尽地揭示植物中 JAs 的作用。唐菖蒲 AOC 基因的研究, 旨在为探索该基因调控唐菖蒲茉莉酸类化合物的生物合成, 进而探讨 AOC 基因为唐菖蒲伤害防御、抗病性功能提供依据, 并为进一步深入研究 AOS 基因的功能及其调控机制奠定基础。丙二烯氧化物环化酶是植物茉莉酸生物合成途径中的关键酶, 其催化作用对于代谢流通向最后的茉莉酸产物至关重要。1990 年, 玉米 AOC 蛋白作为一个可溶性蛋白被分离纯化出来^[8]。到 2000 年, 从番茄中首次克隆得到 AOC 基因, 并分析了这个基因对应的酶的底物特异性, 发现它是通过 N 端的叶绿体转运肽定位到叶绿体上的^[9]。并且, AOC 基因在番茄的伤诱导信号途径中起着关键作用^[10]。在受到伤诱导的番茄叶片中, AOC 基因转录水平迅速上升, 并主要是在叶脉组织中表达^[11], 这可能与系统素从维管组织中的释放有关^[12]。目前已得到拟南芥 AOC2 蛋白的晶体结构^[13]。此外, 还有试验发现红树和喜树中的 AOC 在原核细菌中显示出耐盐作用^[14-15], 这预示着 AOC 基因在酶的作用和进化上值得深入研究, 对通过基因工程来提高植物的抗逆性可能具有潜在的应用价值。AOC 是植物茉莉酸生物合成途径中的限速酶, 对茉莉酸类化合物的生物合成具有重要作用。但在唐菖蒲中 *GhAOC* 基因对 JAs 生物合成的作用, 该基因在唐菖蒲中的表达模式以及对唐菖蒲生长发育及防御性作用等研究尚未有报道。本研究克隆唐菖蒲 AOC

基因的全长 cDNA 序列, 并分析该基因的表达模式, 旨在为研究该基因在唐菖蒲茉莉酸生物合成途径中的调控作用, 以及在唐菖蒲生长发育和防御系统相关的分子机理提供依据, 并为进一步深入研究 AOC 基因的功能及其调控作用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

所用材料为唐菖蒲品种‘Rose Supreme’, 种球购自辽宁省金城园艺试验场, 种球周径为 10~12 cm; 于 2009 年 4 月初种植在中国农业大学科学园中。组培球茎是以 2008 年大田收获的籽球 (在 4 °C 冰箱中贮存)。为外植体培养而成, AOC 基因的分离是以组培球茎为材料, 实时荧光定量 RT-PCR 表达分析用的叶、花、根、匍匐茎、新球和籽球为 2009 年 8 月中旬在大田中采得。

1.2 RNA 的提取及逆转录反应

唐菖蒲 RNA 的分离采用 MyLab 通用型 RNA 快速提取试剂盒。DEPC 水溶解 RNA, 用分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值。根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值判断 RNA 的质量, 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。RNA 提取具体步骤为:

1) 称取 50 mg 唐菖蒲材料放置研钵中, 加入适量液氮并立即研磨至粉状。向其中加入 750 μL 溶液 I, 继续研磨成均一相液体。移入无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管并向其中加入 250 μL 溶液 II, 上下轻柔颠倒混匀 10 次, 冰水浴 5 min;

2) 室温 14 000 r/min 离心 3~5 min。小心移取上清液 600~650 μL 移入另一无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管; 向离心管中加入 750 μL 异丙醇, 上下轻柔颠倒 50 次, 室温 14 000 r/min 离心 3~5 min, 去上清; 加入 750 μL 的 75% 乙醇, 震荡 30 s。室温 14 000 r/min 离心 1 min, 去上清;

3) 在超净工作台晾至约 15 min, 加入 40 μL 的 RNA 酶的水溶解。

cDNA 反转录按照 Promega 的 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行。具体步骤为:

1) 在 200 μL 离心管中加入 0.5 μL 100 μmol 接头引物 AP, 14.5 μL 的总 RNA, 70 °C 热激 5 min, 迅速转移止冰上 2 min。

2) 依次加入下列成份, 轻柔混匀。M-MLV 5 × Reaction buffer 5 μL, dNTP (10 mmol), Recombinant Rnasin Ribonuclease inhibitor 25 U,

M-MLV RT 200 U, 无 RNA 酶 H₂O 补足 25 μ L。

反应, 或于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

3) 42 $^{\circ}$ C 60 min, 72 $^{\circ}$ C 15 min, 用于下步 PCR

cDNA 合成及 PCR 反应所用引物见表 1。

表 1 反转录和 PCR 扩增引物

Table 1 Primers applied in the reverse transcription and PCR amplification

引物	序列
AOCF ₁	CT(A/T/C)GTCCCCTT(C/T)A(C/G)CAACAA
AOCF ₂	GC(A/T/C)(A/G)T(C/T)TACAGCTTCTACTTCCG
AOCF ₃	GGAGTCTACGGCCAAGTCAA
AOCF ₄	CATTCGAACTCAAGGGCATT
AOCF ₅	<u>CGCGTCGACATGGCGGCTACTTTCGACCAC</u>
AOCR ₁	TT(A/G)GC(A/T/G)(T/G)C(A/T/G)GG(A/T/C)G(A/T/C)TGGCTC
AOCR ₂	GGCAG(A,G)(T,C)C(A,C,G)GG(A,G)AT(ACG)CCCTT
AOCR ₃	GCACAAGCAAATGTGCTGAA
AOCR ₄	GGCAGATCCTGAATGCCCTT
AOCR ₅	GAAGCTTGACTTGGCCGTAG
AOCR ₆	<u>AACTGCAGTTACTTTGTGTAATTCTTGAGGGC</u>
AP ₁	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGC(T)17
AP ₂	CCAGTGAGCAGAGTGACG
AP ₃	GAGGACTCGAGCTCAAGC
5'RACE Outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5'RACE Inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
GSPAOC-F	GCGACTTGGTTCGGTTCAGT
GSPAOC-R	GCCGTAGTCGCCGAAATAGA
Actin-F	TCGAGGTTGCTGTTGGGTACT
Actin-R	AACAAAACATGCGACCAAGC

注: 下划线为酶切位点与保护碱基序列。

1.3 唐菖蒲 AOC 基因保守片段的克隆

根据 GenBank 核酸数据库中报道的烟草 (AJ308487. 1)、玉米 (AY488136. 1)、水稻 (EU090802. 1)、番茄 (AF384374. 1)、大麦 (AJ308488. 1)、豌豆 (AB095986. 1) 等 AOC 基因的 mRNA 序列, 通过 DNAMAN 软件进行同源比对并设计保守区兼并上游引物 AOCF₁ 和 AOCF₂ 以及下游引物 AOCR₁ 和 AOCR₂, 然后进行巢式 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 反应以 AOCF₁ 和 AOCR₁ 为引物, 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 45 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 50 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。以第 1 轮 PCR 产物为模板进行第 2 轮扩增, 以 AOCF₂ 和 AOCR₂ 为上

下游引物, 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 50 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 唐菖蒲 AOC 基因 3' 端与 5' 端的克隆

根据已克隆的唐菖蒲 AOC 基因保守片段设计 2 条 3' RACE 上游引物 AOCF₃ 和 AOCF₄, 以 AP₁ 为反转录引物进行反转录, 然后以反转录的 cDNA 为模板进行巢式 PCR 扩增。第一轮 PCR 反应引物用 AOCF₃ 和接头引物 AP₂, 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s; 50 $^{\circ}$ C 45 s; 72 $^{\circ}$ C 40 s; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取第一轮 PCR 产物 1 μ L 进行第 2 轮反应, 引物为 AOCF₄ 和接头引物 AP₃。94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s; 54 $^{\circ}$ C 45 s; 72 $^{\circ}$ C 40 s; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

对于基因 5' 序列信息的获取 (具体按照

TaKaRa 公司的 5'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行), 采用引物 AOCR₃ 进行反转录, 第一轮 PCR 反应引物用 5' RACE Outer primer 和特异引物 AOCR₄。94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 10 min。取第 1 轮产物 1 μL 进行第二轮反应, 引物为 5' RACE Inner primer 和特异引物 AOCR₅。94 °C 3 min, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 72 °C 10 min。

1.5 唐菖蒲 AOC 基因全长的克隆与序列测定

应用 DNAMAN 对 AOC 基因的 3' 端和 5' 端序列进行拼接, 并在 NCBI 网站上预测其 ORF。根据 ORF 2 端序列设计特异引物 AOCF₅ 和 AOCR₆ 扩增该基因的编码区序列 (CDS), 并在上游引物 5' 端和下游引物 3' 端分别设计 *Sal* I 和 *Pst* I 限制性内切酶酶切位点。PCR 反应程序为: 94 °C 4 min, 94 °C 45 s, 52 °C 45 s, 72 °C 50 s, 35 个循环, 72 °C 10 min。

将所有 PCR 产物凝胶电泳后回收目的片段, 与 PMD18-T 载体连接并转化 DH5 α , 重组质粒鉴定后送北京华大基因公司进行测序。

1.6 亚细胞定位

构建 pSAT-GFP-*GhAOC* 瞬时表达载体, 重组质粒测序无误后, 制备金粉-DNA 复合体, 用基因枪轰击洋葱表皮, 将轰击后的洋葱表皮在 28 °C 培养 20~24 h, 在共聚焦激光显微镜下观察 GFP 融合蛋白定位情况。用 Confocal Laser Scanning Microscope (LSM 510 META) 观察目的基因在细胞内的表达情况 (最适激发光波长 490 nm, 发射光波长 515 nm)。用 25-mw 氩/氩激发器产生的 488 nm 激光激发荧光。同时, 利用 ChloroP version 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>) 和 the TargetP program version 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) 软件进行亚细胞定位的在线预测, 与其在共聚焦激光显微镜下观察到的 GFP 融合蛋白定位情况进行对比。

1.7 唐菖蒲试管球茎的诱导以及不同浓度 MJ 的处理

籽球外植体处理: 70% 乙醇消毒 1 min, 无菌蒸馏水冲洗 3 次, 3% Ca(ClO)₂ 消毒 15 min, 无菌水冲洗 5 次。唐菖蒲试管球茎诱导的方法参考何秀丽

的方法^[16], 初代培养基为: MS+6.0 mg/L 6-BA+40 g/L 蔗糖。在初代培养基中每瓶接 2 个籽球, 在恒温组培室中培养 4 周。4 周后进行继代培养, 在 MS 继代培养基上进行壮苗培养。4 周后进行结球诱导, 从继代培养的组培苗中挑选长势比较一致的组培苗进行结球诱导。基本培养基均为 MS+60 g/L 蔗糖。在培养基中分别加入 0.1、0.2 和 0.5 mmol/L 的 MJ (methyl jasmonate, 茉莉酸甲酯), MJ 采用过滤灭菌法添加到培养基中。以基本培养基 MS 为对照。GhAOC 基因对不同浓度的 MJ 处理后的表达分析共 4 个处理, 每个处理 3 次重复, 每个重复 9 瓶。培养基 pH 为 5.8, 培养温度 (25±2) °C, 光照强度 3 000 lx, 光照时间 12 h/d。

1.8 实时荧光定量 RT-PCR 分析

提取唐菖蒲不同器官 (叶、花、根、匍匐茎、新球和籽球) 以及不同浓度的 MJ 处理后试管球茎的总 RNA, 并将反转录的 cDNA 模板稀释 10 倍, 进行 Real time RT-PCR 反应, 分析 GhAOC 基因的表达模式, 反应在 ABI 7 500 实时定量 PCR 仪上进行, 方法参照《美国应用生物系统公司 7 300/7 500 实时定量 PCR 仪相对定量实验入门指南》和荧光定量试剂盒 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa) 说明书。荧光定量 PCR 扩增的反应体系为: cDNA 模板 2 μL, 2×SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL, 特异引物 (GSPAOC-F 和 GSPAOC-R) 和内参 Actin 引物 (引物序列见表 1) 分别为 0.4 μL (10 μmol/L), 50×ROX Reference Dye II 0.4 μL, 用水补足 20 μL。采用两步法标准程序: 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 共 45 个循环。每个试验设 4 次重复, 利用 ABI 7 500 PCR 仪 Sequence Detection software 软件 (2^{-ΔΔC_t} 法) 进行数据分析。

1.9 内源 MJ 含量的测定

测定唐菖蒲不同组织和经过不同浓度的 MJ 处理后试管球茎的内源 MJ 含量, MJ 含量的测定采用间接 ELISA 法^[18]。样品中激素提取在本实验室进行, 将待测样品放入预冷的研钵中, 按照 1:3~4 的质量 (kg) 与体积 (L) 比加入 4 °C 条件下预冷的 80% 甲醇提取液 (含 BHT (二丁基羟基甲苯) 22 mg/100 mL 80% 甲醇)、少量石英砂和 0.1 g PVP, 冰浴条件下研磨, 充分转移出匀浆, 4 °C 浸提过夜, 离心 (4 °C, 10 000 r/min, 10 min), 取上清液备测, 测定在中国

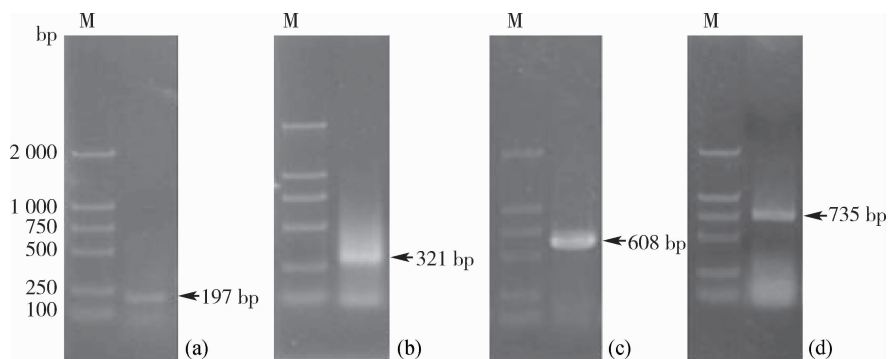
农业大学农学与生物技术学院化控室完成。

2 结果与分析

2.1 唐菖蒲丙二烯氧化物环化酶 AOC 基因全长 cDNA 序列的克隆

以唐菖蒲组培球茎提取 RNA 反转录的 cDNA 为模板,以兼并引物 AOCF₁、AOCR₁ 以及 AOCF₂、AOCR₂ 进行巢式 PCR 扩增 AOC 基因的保守区

(图 1(a))经测序其核苷酸序列大小为 197 bp。根据该保守区片段,利用 2 条 3' RACE 上游引物 AOCF₃ 和 AOCF₄,进行 2 轮 PCR 扩增,测序结果表明该 3' RACE 产物大小为 321 bp(图 1(b))。结合保守区片段设计 2 条下游引物,用基因特异引物 AOCR₃ 进行逆转录,AOCR₄ 和 AOCR₅ 分别进行 5'端第 1 轮和第 2 轮 PCR 扩增,经测序该 5'端核苷酸序列大小为 508 bp(图 1(c))。



(a)为中间片段产物;(b)为 3' RACE 产物;(c)为 5' RACE 产物;(d)为 CDS 产物;M 为 DL2 000 marker。

图 1 PCR 产物检测

Fig. 1 Detection of PCR products

使用 DNAMAN 把中间片段序列、3'端以及 5'端序列进行拼接,得到全长 898 bp 的全长 AOC 基因序列,预测其 ORF,并设计上下游引物 AOCF₅ 和 AOCR₆ PCR 扩增该基因的编码区序列,得到 AOC 基因的 CDS 735 bp(图 1(d))。

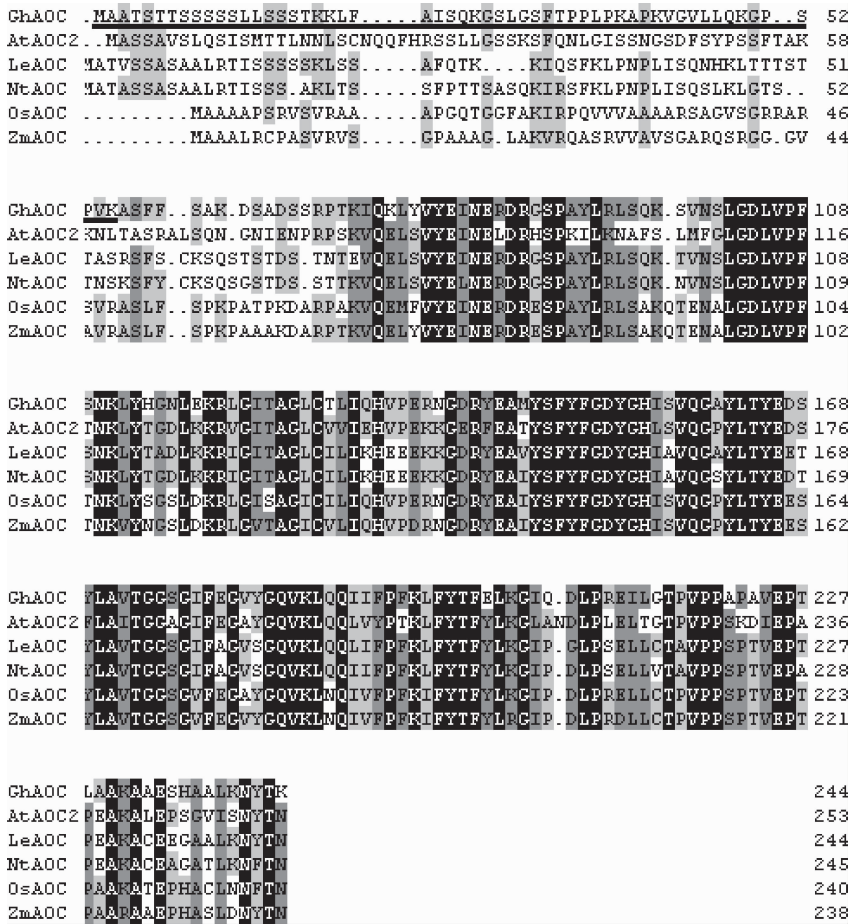
2.2 唐菖蒲 AOC 基因序列的分析

对唐菖蒲 AOC 基因的全长序列进行分析得知,该基因全长 898 bp,包含一个编码 244 个氨基酸的开放阅读框 735 bp,3' UTR 和 5' UTR 分别为 120 和 43 bp。将该基因命名为 *GhAOC*,提交至 NCBI 数据库,登录号为 JF831196。利用 ExPASyD 分析唐菖蒲 *GhAOC* 基因,推导的蛋白质分子质量为 26.52 ku,等电点 9.37。同时将其氨基酸序列提交 NCBI 在线比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),将同源性较高和研究相对较多的候选序列下载,使用 DNAMAN 软件将唐菖蒲 AOC 氨基酸序列与这些序列进行比对。结果表明,唐菖蒲 AOC 氨基酸序列与玉米(AJ488136.1)的同源性最高为 64.8%;其次为水稻(EU090802.1)63.4%,烟草(AJ308487.1)63.0%,番茄(AF384374.1)

62.2%;与拟南芥 AOC2(NM_113476.3)的氨基酸序列最低为 52.0%。通过 ChloroP version 1.1 和 TargetP program version 1.1 预测 *GhAOC* 氨基酸有一个典型的 N 端转移信号肽(图 2)。

2.3 唐菖蒲 GhAOC 的亚细胞定位

将构建好的瞬时表达载体制备成金粉混合液,基因枪轰击洋葱表皮,暗培养 12~16 h 后,共聚焦显微观察,以空载体 35S-GFP 为对照,GFP 在洋葱的细胞膜、细胞质和细胞核中均有表达(图 3(a)、(b)和(c))。单独的 GFP 在细胞中定位不具特殊性,在细胞质、细胞核和细胞膜中均有表达,而某一特定蛋白与 GFP 融合蛋白的定位则由该蛋白决定。35S-GFP-*GhAOC* 的绿色荧光信号主要分布在叶绿体上(图 3(d)、(e)和(f))。经 Psort I (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)预测,*GhAOC* 的氨基酸序列的 N-端均含有一个定位于叶绿体的运转信号肽,并且经 ChloroP version 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>)和 the TargetP program version 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>)的预测结果得出 *GhAOC* 定位在



Gh 为唐菖蒲；At 为拟南芥；Le 为番茄；Nt 为烟草；Os 为水稻；Zm 为玉米。

图 2 唐菖蒲与几种植物 AOC 序列蛋白氨基酸序列同源性比较

Fig. 2 Homology comparison of amino acid sequence of *Gladiolus hybridus* AOC with other plants

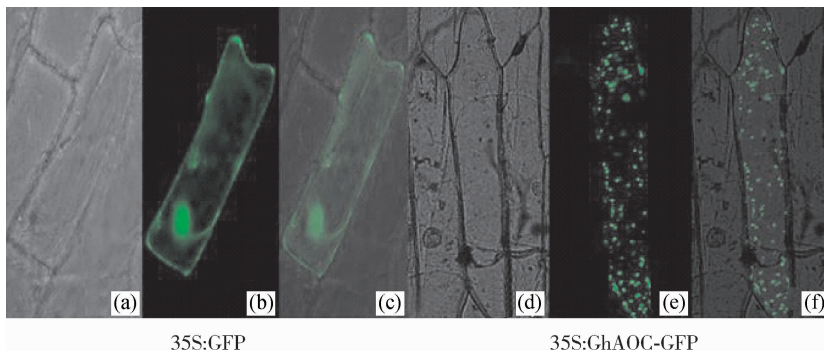


图 3 *GhAOC* 在洋葱表皮的亚细胞定位

Fig. 3 Sub-cellular localizations of *GhAOC* in onion

叶绿体上。

2.4 *GhAOC* 基因在唐菖蒲不同器官的表达以及 MJ 含量的分析

实时荧光定量 RT-PCR 分析表明, *GhAOC* 基因在检测的唐菖蒲叶、花、根、匍匐茎、新球茎和籽球

均有表达,而在新球茎中的相对表达量最高,其次是籽球和匍匐茎。在根中的表达水平最低(图 4)。

此外,测定的内源 MJ 含量在匍匐茎中最高,其次是籽球和新球茎,而在叶片、花和根中的含量相对较小。并且,内源 MJ 含量除了在匍匐茎中明显较

高外,在籽球、新球、叶片、花和根之间的含量相差较小(图5)。

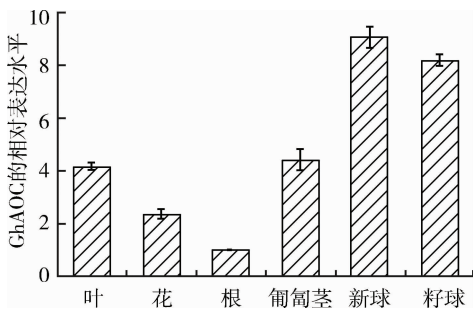


图4 唐菖蒲不同器官的 *GhAOC* 基因表达水平

Fig. 4 Transcriptional levels of *GhAOC* in different organs of *Gladiolus*

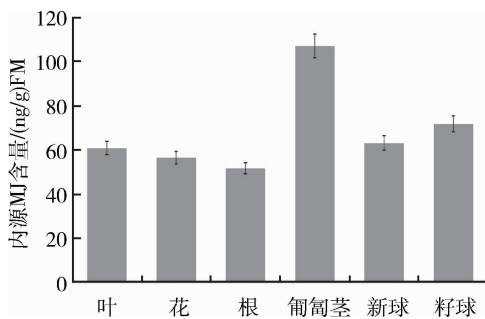


图5 唐菖蒲不同器官的内源 MJ 含量

Fig. 5 Endogenous MJ content in different organs of *Gladiolus*

2.5 不同浓度的 MJ 处理对 *GhAOC* 基因表达水平以及内源 MJ 含量变化的影响

在经过 0.1~0.5 mmol/L 的 MJ 处理后,随着 MJ 浓度的增加, *GhAOC* 基因在球茎中的表达水平都呈现不同程度的升高,在 0.5 mmol/L 的 MJ 处理后达到最大。并且 *GhAOC* 基因的最大表达水平是对照的 4.4 倍(图6)。

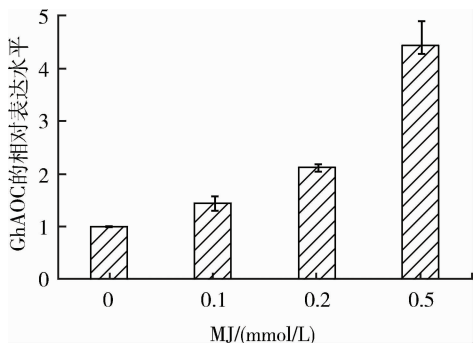


图6 MJ 处理对唐菖蒲球茎中 *GhAOC* 基因表达的影响

Fig. 6 Effect of MJ treatment on *GhAOC* transcript in *Gladiolus* corm

唐菖蒲球茎内源 MJ 含量在 0.1~0.5 mmol/L MJ 处理的浓度的范围内随着浓度的升高而升高,并且在 0.5 mmol/L 的 MJ 处理时的球茎的内源 MJ 含量达到了最大,比对照提高了 39.6%(图7)。

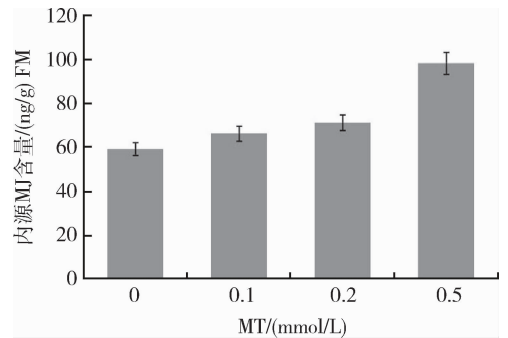


图7 MJ 处理对唐菖蒲球茎中内源 MJ 含量的影响

Fig. 7 Effect of MJ treatment on MJ endogenous content in *Gladiolus* corm

3 讨论

在过去的十几年里,许多研究已经鉴定出几乎所有编码 JA 生物合成相关酶的基因。多数工作利用传统生化方法纯化酶,接着利用适当的分子技术鉴定相应的 cDNAs。异源表达系统,通常用大肠杆菌,也已用来验证 cDNA 产物的酶活性,并且确定这些酶的底物特异性和动力学参数。这些方法分别成功用于从亚麻、番茄、拟南芥中,并首次鉴定 AOS、AOC、和 OPR 等的 cDNAs^[19-20]。AOC 基因作为 JA 合成途径中最为关键的酶基因,已经在玉米、拟南芥、番茄、海莲、水稻和大麦等物种中展开研究,并发现了它对 JA 生物合成以及在植物的生长发育和抗逆系统中的重要作用^[9,14,21-25]。

本研究中,从唐菖蒲球茎克隆了 1 个 13-LOX 途径的茉莉酸生物合成关键酶基因 *GhAOC*。经过氨基酸序列分析得知和 *GhAOC* 的氨基酸序列含有一个 N 端转运信号肽,这是定位于叶绿体中的一个典型特征,经过亚细胞定位的研究后证实了这个推论,并且与番茄 AOC 基因的研究结果一致^[9]。Real time RT-PCR 分析表明, *GhAOC* 基因在唐菖蒲的匍匐茎、籽球和新球茎中表达量较高,其中在新球茎中表达量最高,而在叶子、花和根中相对表达量较低。同时测定的内源 MJ 含量结果显示,同样是在匍匐茎、籽球和新球茎中含量较高,但在匍匐茎中含量最高,而在叶、花和根中含量相对较低。 *GhAOS* 基因的表达水平和内源 MJ 含量的最大值分别发生在唐

菖蒲的新球和匍匐茎中,这可能与唐菖蒲的发育过程有关。在唐菖蒲球茎的发育过程中,匍匐茎发生在新球的基部并依附其上,而且匍匐茎较短小,所以匍匐茎和新球的连接部位较难分离的特别清楚,这或许对试验的结果造成了一定的影响,但其更深入的原因需要进一步的研究。

此外,在经过 0.1~0.5 mmol/L 的 MJ 处理后,随着 MJ 含量的增加,*GhAOC* 基因在球茎中的表达水平以及内源 MJ 含量都呈现不同程度的升高,且呈正相关的关系。可以很明显的看出, MJ 对 *GhAOC* 基因诱导表达的作用较为显著,由于 MJ 是茉莉酸生物合成途径中的终产物,普遍认为是正反馈作用机制在植物茉莉酸反应系统中起到了关键作用。这些结果表明, *GhAOC* 基因的表达促进了茉莉酸类化合物的生物合成。本研究将深入研究 *GhAOC* 的基因功能,并通过转基因技术进一步探讨 *GhAOC* 基因在调控唐菖蒲茉莉酸及其化合物的生物合成中的作用,进而探讨 AOC 在唐菖蒲生长发育过程以及防御系统中的生理功能。

参 考 文 献

- [1] 蒋科技,皮妍,候嵘,等. 植物内源茉莉酸类物质的生物合成途径及其生物学意义[J]. 植物学报,2010,45(2):137-148
- [2] Li L, Li C, Lee G, et al. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato[J]. *Plant Biology*, 2002, 99(9): 6416-6421
- [3] 吴劲松, 种康. 茉莉酸作用的分子生物学研究[J]. 植物学通报, 2002, 19(2): 164-170
- [4] 孙清鹏, 王小菁. 植物伤反应中的茉莉酸类信号[J]. 植物学通报 2003, 20: 481-488
- [5] Howe G A. Jasmonates as signals in the wound response[J]. *Plant Growth Regul*, 2004, 23: 223-237
- [6] Wasternack C. Oxilipins; biosynthesis, signal transduction and action [C] // Hedden P, Thomas S, eds. *Plant Hormone Signaling*. Annual Plant Reviews, Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006: 185-228
- [7] Vom Endt D, Soares E, Silva M, et al. Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-hook DNA-binding proteins[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144: 1680-1689
- [8] Hamberg M, Fahlstadius P. Allene oxide cyclase: A new enzyme in plant lipid-metabolism[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 276: 518-526
- [9] Ziegler J, Stenzel I, Hause B, et al. Molecular cloning of allene oxide cyclase: The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 19132-19138
- [10] Stenzel I, Hause B, Maucher H, et al. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle specific generation of jasmonates in tomato-amplification in wound-signalling[J]. *The Plant Journal*, 2003, 33: 577-589
- [11] Hause B, Stenzel I, Miersch O, et al. Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers; Allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles[J]. *Plant J*, 2000, 24: 113-126
- [12] Jacinto T, McGurl B, Ryan C A. Wound-regulation and tissue specificity of the tomato prosystemin promoter in transgenic tobacco plants[J]. *Plant Sci*, 1999, 140: 155-159
- [13] Hofmann E, Zerbe P, Schaller F. The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* allene oxide cyclase; insights into the oxylipin cyclization reaction[J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 3201-3217
- [14] Yamada A, Saitoh T, Mimura T, et al. Expression of mangrove allene oxide cyclase enhances salt tolerance in *Escherichia coli*, yeast, and tobacco cells[J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 903-910
- [15] Pi Y, Jiang K, Cao Y, et al. Allene oxide cyclase from *Camptotheca acuminata* improves tolerance against low temperature and salt stress in tobacco and bacteria[J]. *Mol Biotechnol*, 2009, 41: 115-122
- [16] He Xiu-li, Yi Ming-fang, Yi Ming-fang, et al. Effects of lipoxygenase on the corm formation and enlargement in *Gladiolus hybridus* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2008, 118: 60-69
- [17] Lian Qing-long, Xin Hai-bo, Yi Ming-fang, et al. Cloning, characterization and expression analysis of a 9-lipoxygenase gene in *Gladiolus hybridus* [J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 130: 468-475
- [18] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993: 60-68
- [19] Schaller F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules[J]. *J Exp Bot*, 2001, 52: 11-23
- [20] Wasternack C, Hause B. Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development [J]. *Progress in Nucleic Acid Res. Mol Biol*, 2002, 72: 165-221
- [21] Ziegler J, Hamberg M, Miersch O. Purification and characterization of allene oxide cyclase from corn kernels[J]. *Plant Physiology*, 1996, 111: 450-450
- [22] Ziegler J, Hamberg M, Miersch O, et al. Purification and characterization of Allene oxide cyclase from dry corm seeds [J]. *Plant Physiology*, 1997, 114: 565-573
- [23] Hause B, Stenzel I, Miersch O, et al. Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 971-980
- [24] Agrawal G K, Jwa N S, Shibato J, et al. Diverse environmental cues transiently regulate *OxOPRI* of the "Octadecanoid pathway" revealing its importance in rice defense/stress and development[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310: 1073-1082
- [25] Maucher H, Stenzel I, Miersch O, et al. The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.)-cloning and organ-specific expression[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 801-811