

## 板栗野生和芽变雄花序赤霉素合成关键酶基因比较分析

郭献平<sup>1,2</sup> 李兴亮<sup>2</sup> 段续伟<sup>2</sup> 邓舒<sup>2</sup> 曹庆芹<sup>2</sup> 秦岭<sup>2\*</sup>

(1. 新疆农业大学 林学与园艺学院, 乌鲁木齐 830052;

2. 北京农学院 植物科学技术学院/农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

**摘要** 为探明芽变雄花序赤霉素含量降低的分子机制,对板栗野生和芽变雄花序赤霉素合成关键酶基因古巴焦磷酸合成酶(CPS)、贝壳杉烯合成酶(KS)、贝壳杉烯氧化酶(KO)、贝壳杉烯酸氧化酶(KAO)、赤霉素 20-氧化酶 1(GA20ox1)和赤霉素 3-氧化酶 1(GA3ox1)的 cDNA 序列,以及 KO 基因 DNA 序列进行了比对,结果表明:两类花序中 KO 基因在开放阅读框的 872、1 115 和 1 150 bp 存在 3 处碱基差异,分别造成了氨基酸由 Glu、Tyr 和 Tyr 突变为 Gly、Phe 和 His,最终导致了跨膜区的改变,且发现 cDNA 上碱基突变是由 DNA 的碱基差异造成的。推测 KO 基因的这种突变导致板栗短雄花序性状。

**关键词** 板栗; 雄花序; 贝壳杉烯氧化酶; 碱基突变

中图分类号 S 664.2

文章编号 1007-4333(2012)04-0091-05

文献标志码 A

## Comparison of key enzymes of gibberellin biosynthesis between normal catkin and short catkin in *Castanea mollissima* Bl.

GUO Xian-ping<sup>1,2</sup>, LI Xing-liang<sup>2</sup>, DUAN Xu-wei<sup>2</sup>, DENG Shu<sup>2</sup>,  
CAO Qing-qin<sup>2</sup>, QIN Ling<sup>2\*</sup>

(1. College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Key Laboratory of New Technology in Agriculture Application of Beijing/College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

**Abstract** This paper is concerned on the molecular mechanisms of gibberellin decrease in mutant catkins. We used cDNA sequence alignment of the gibberellin biosynthesis key enzymes *ent-copalyl diphosphate synthase* (CPS), *ent-kaurene synthase* (KS), *ent-kaurene oxidase* (KO), *ent-kaurenoic acid oxidase* (KAO), *GA 20-oxidase 1* (GA20ox1) and *GA 3-oxidase 1* (GA3ox1), and KO DNA sequence alignment between wild type and mutant catkins. The result revealed that there were three different bases in 872, 1 115 and 1 150 bp in KO open reading frame, which converted Glu, Tyr, Tyr to Gly, Phe, His, leading to the change of the transmembrane region. The cDNA point mutations were caused by sequence differences of DNA. It is speculated that the short catkin may be caused by the mutation of the KO gene.

**Key words** *Castanea mollissima* Bl.; catkin; *Ent-kaurene oxidase*; point mutations

板栗生产中一直存在着的低产问题主要是由于雄花多、雌花少造成的<sup>[1-2]</sup>,目前人们采取了多种方法试图解决,如:采用配方施肥、施用微量元素和生长调节剂、人工疏雄等措施促进雌花分化,以增加雌

雄花的比率,但是这些方法可操作性差,人力物力消耗大,生产上较难推广<sup>[3-6]</sup>。因此,选育雌花多,雄花少、雄花序退化或早期脱落的丰产优质品种,是解决板栗低产的有效途径。‘无花栗’、‘半无花栗’<sup>[7]</sup>、

收稿日期: 2012-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30872039)

第一作者: 郭献平,博士研究生,E-mail: xianping2005@163.com

通讯作者: 秦岭,教授,博士,主要从事果树种质资源研究与利用,E-mail: qinling@bac.edu.cn

‘浮来无花’<sup>[8]</sup>,它们的特性突出表现在雄花序抽生后,随着发育不断地进行而发生不同程度的自然退化和脱落,是优良的育种材料。

本研究的前期研究中在北京市密云县板栗产区发现一株自然实生变异的板栗芽变母株,在同一株树上,除一枝上的雄花序短小外,其余枝上的雄花序正常。芽变雄花序在生长过程中,顶端发生细胞程序性死亡(PCD),雄花序的平均长度 2.2 cm,只有普通板栗雄花序长度的 1/6~1/8<sup>[9-11]</sup>。此新品种通过国家林业局审定命名为‘短花云丰’(新品种保护权:20090015)<sup>[12]</sup>。前期研究还发现,该短雄花序是一种赤霉素敏感性芽变,雄花序的短化与 GA<sub>3</sub> 密切相关<sup>[13-14]</sup>。

本研究通过比对分析板栗野生和芽变雄花序古巴焦磷酸合成酶(CPS)、贝壳杉烯合成酶(KS)、贝壳杉烯氧化酶(KO)、贝壳杉烯酸氧化酶(KAO)、赤霉素 20-氧化酶 1(GA20ox1)和赤霉素 3-氧化酶 1(GA3ox1)基因(NCBI 登录号分别为 HQ658170、HQ658171、HQ658172、HQ658173、JN542465 和 JN542466)的 cDNA 序列,旨在找到芽变雄花序赤霉素(GA<sub>3</sub>)含量降低的分子机制,为板栗产量的调控机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

板栗正常雄花序及芽变品种‘短花云丰’短雄花序来源于北京市密云板栗产区。从 2010 年 5 月 11 日花序萌发开始,到 5 月 23 日为止,共采样 7 次,液氮速冻后于 -80 °C 冰箱保存。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒(北京博迈德科技发展有限公司)提取正常和芽变雄花序的总 RNA,用 RNA 纯化试剂盒(北京天根生化科技有限公司)进行纯化,最后用 Reverse transcriptase M-MLV(RNase H-)试剂盒(大连宝生物工程有限公司)进行 cDNA 第一链的合成。

#### 1.2.2 DNA 提取

利用 Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver 3.0(大连宝生物工程有限公司)提取正常和芽

变雄花序 DNA。

### 1.2.3 KO cDNA 与 DNA PCR 扩增

以 KO-C 为引物扩增 KO cDNA,以 KO-D 为引物扩增 KO DNA 突变区。KO-C: F, 5'-CAATCTTTTCTCTAGAACTGC-3'; R, 5'-AA-TATGTAATGGCCGATACGA-3'。KO-D: F, 5'-GTGCGATTGAGGTTGATTGGAG-3'; R, 5'-TA-AACAACGAGGCACAGGGCTT-3'。

### 1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析

使用 Primer5.0 软件设计 KO 基因荧光定量引物为 KO-RT,扩增产物长度为 269 bp。以 *Actin* (GQ339776)为内参基因设计引物 KO-ACT,产物长度 178 bp。按照 SYBR Premix Ex *Taq* 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)操作指导,对反转录所得的 cDNA 分别进行 5 倍梯度稀释(1、1/10、1/100、1/1 000、1/10 000),实施荧光定量反应,绘制相对标准曲线。KO 基因 RT-qPCR 反应体系为 10  $\mu$ L,包括:5  $\mu$ L SYBR premix Ex *Taq* 混合液、1  $\mu$ L cDNA、KO-RT 上下游引物各 0.25  $\mu$ L、3.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应程序为:95 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 20 s,54 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,40 次循环;每次循环第 3 步进行荧光采集,最后退火至 65 °C,每隔 30 s 上升 0.5 °C,至 95 °C 变性 1 min。检测其荧光值,绘制溶解曲线。内参基因 *Actin* PCR 扩增反应体系及反应程序与 KO 基因相同。PCR 反应于 Bio-RAD C1000™ Thermal Cycler 上进行,使用 CFX96™ 系统进行荧光采集。cDNA 标样和待测样均设置 3 次重复。KO-RT: F, 5'-AAAGGGTGCATTGAGGT-3'; R, 5'-CAGTAG-TATCCG CCGTCT-3'。KO-ACT: F, 5'-TTGAC-TATGAGCAGGAACCTT-3', R, 5'-TTGTAGGT-GGTC TCGTGAAT-3'。

### 1.3 数据分析

SPSS13.0 进行方差分析,Excel 2007 作图。

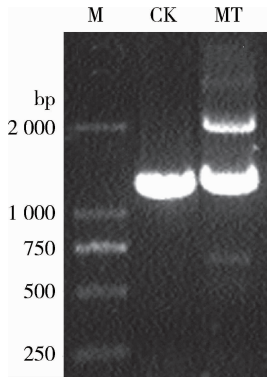
## 2 结果与分析

### 2.1 野生和芽变雄花序在 KO 基因 DNA 水平上碱基差异造成 cDNA 上碱基差别

KO 基因注册序列共 1 790 bp 碱基,其开放阅读框为 48~1 592 bp(1 545 bp)。以 KO-C 为引物

对野生和芽变雄花序 cDNA 进行 PCR 扩增,进行测序后发现,板栗野生和芽变雄花序 *KO* 基因在 cDNA 序列上有 3 处碱基存在差异。差异分别为开放阅读框的 872、1 115 和 1 150 bp 处。

为探讨野生和芽变雄花序 *KO* 基因 cDNA 上碱基差异的原因,以野生和芽变雄花序 DNA 为模板,在突变区域设计引物 *KO-D*,进行 PCR 扩增后电泳图如图 1。



M 为 Maker;CK 为野生雄花序;MT 为芽变雄花序。

图 1 野生与芽变雄花序 DNA PCR 扩增图

Fig.1 DNA PCR amplification of wild and mutant catkins

从图 1 可知,以芽变雄花序 DNA 为模板扩增产物比野生型多一 DNA 条带,经测序分析得知,野生板栗雄花序在 *KO* 基因开放阅读框 872、1 115 和 1 150 bp 3 个差异位点处的碱基组合仅有 2 种,G、A、T 和 A、A、T,将其对应的 *KO* 基因分别命名为 *KO1* 和 *KO2*,二者之间只有一个碱基的差异。而在芽变雄花序中也有 2 种组合,分别为 G、A、T 和 G、T、C,其对应的基因为 *KO1* 和 *KO3*。经过 5 次重复,测序结果为:*KO3* DNA 序列比 *KO1* 和 *KO2* 多出 2 段内含子,长度分别为 328 和 9 bp。芽变雄花序中 *KO3* 在 cDNA 序列上由 A、A、T 3 种碱基突变为 G、T 和 C。因此得知 cDNA 中碱基差异是由 DNA 上的差异造成的。

2.2 芽变雄花序中 *KO* 蛋白与野生型之间的比较

*KO2* 中 A、A、T 3 种碱基突变 *KO3* 的 G、T、C,也造成了 *KO* 蛋白 3 处氨基酸的变化,*KO* 蛋白共 514 个氨基酸,其中在 291、372 和 384 氨

基酸位点发生变异, *KO2* 为 Glu(谷氨酸,E)、Tyr(酪氨酸,Y)和 Tyr(Y), *KO3* 为 Gly(甘氨酸,G)、Phe(苯丙氨酸,F)和 His(组氨酸,H), *KO1* 在这 3 处所对应的氨基酸序列为 Gly(G)、Tyr(Y)和 Tyr(Y)。

将 *KO* 蛋白在 NCBI 中进行 Blast,选取与 *KO* 蛋白相近的 10 个品种,分别是梨 (*Pyrus communis*, AEK01241.1),苹果 (*Malus domestica*, AAS68017.2),草莓 (*Fragaria grandiflora*, AAR18407.2),葡萄 (*Vitis vinifera*, XP002282197.1),蓖麻 (*Ricinus communis*, XP002510288.1),苦瓜 (*Momordica charantia*, ADE06669.1),大豆 (*Glycine max*, XP003543711.1),豌豆 (*Pisum sativum*, AAP69988.1),蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*, XP003637273.1),拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NP197962.1),利用 DNAMAN 进行氨基酸保守序列比对,比对结果如图 2 所示,在 291 氨基酸位点 G/E 为 10 : 1,372 处均为 Y,384 处 Y : H 为 5 : 6。推测 *KO3* 在 372 氨基酸位点的突变应为重要突变位点,*KO3* 在此处由 Tyr(Y)突变为 Phe(F)。

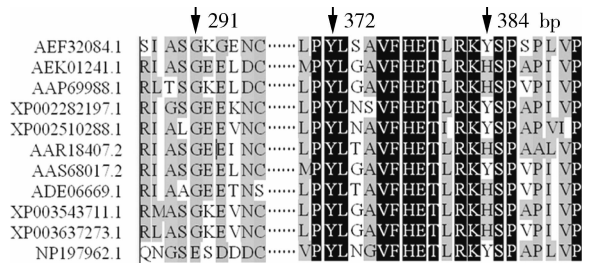


图 2 保守序列比对

Fig.2 Conserved sequence comparison

在 NCBI 中查看 *KO* 蛋白氨基酸结构域发现, *KO* 属于细胞色素 P450 家族,而 *KO3* 的 3 处突变位点均位于结构域内。

为了进一步验证基因突变造成的影响,在 <http://minnou.cchmc.org/> 中对 *KO2* 和 *KO3* 进行了二级结构和跨膜区的生物信息学分析(图 3)。经生物信息学分析,*KO2* 和 *KO3* 在 291、372 和 384 位点有 3 处氨基酸的差异造成其在二级结构上 6 处差异。另外,*KO1* 和 *KO2* 均有 2 处跨膜区,而 *KO3* 多了 1 处跨膜区。

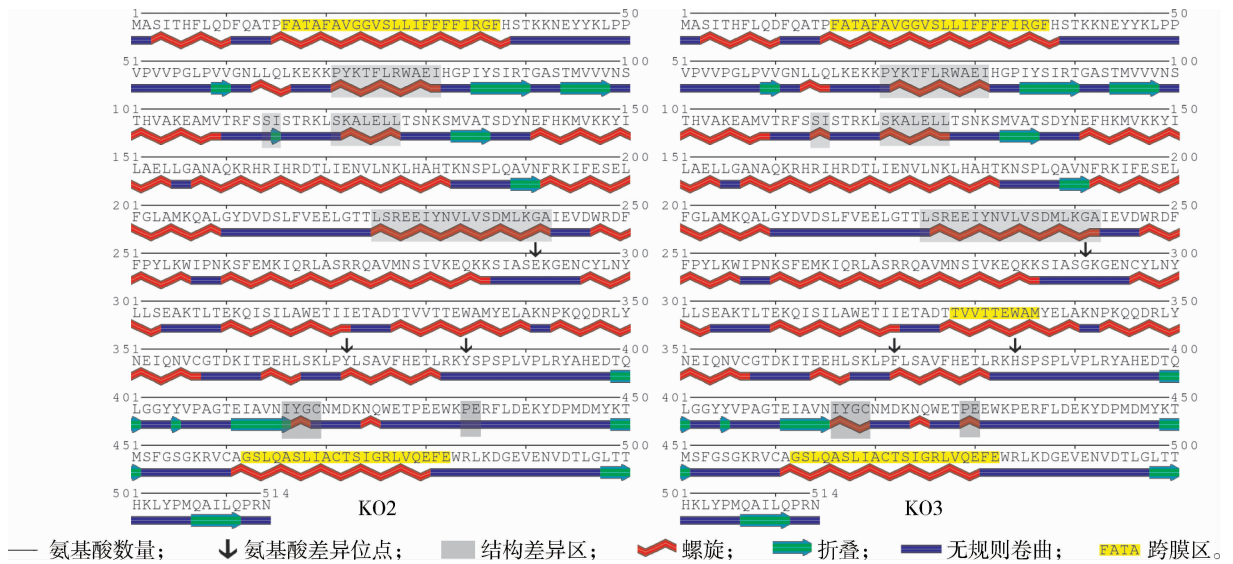


图3 KO2与KO3氨基酸二级结构和跨膜区对比

Fig. 3 Comparison of the secondary structure and transmembrane region between KO2 and KO3

### 2.3 野生与芽变雄花序 KO 基因荧光定量分析

对板栗正常和芽变雄花序 KO 基因进行荧光定量分析(图4),正常雄花序 KO 基因表达量高于芽变,且野生和芽变雄花序的相对表达量除 5.15 显著差异外其余均为极显著差异。

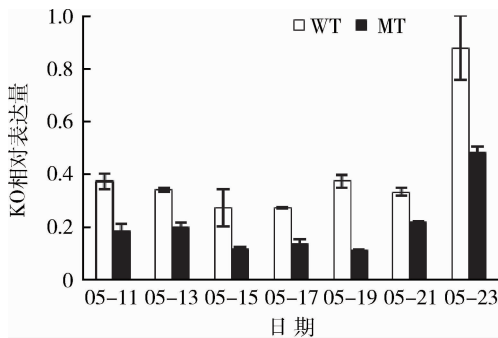


图4 野生和芽变雄花序 KO 基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of KO gene in wild and mutant catkin

## 3 结果与讨论

芽变是体细胞突变(somatic mutation)的一种。目前对芽变分子机理了解还有限,现有研究主要集中在反转录转座子插入<sup>[15-16]</sup>、DNA 甲基化<sup>[17]</sup>、基因结构和表达差异<sup>[18-19]</sup>等方面。

有许多赤霉素合成关键酶基因结构和表达差异导致植物矮化。Helliwell 等<sup>[20]</sup>的研究表明,拟南芥 *ga3-1* 突变体 KO 的 2 个等位基因都含有一个碱基

的替代,分别在阅读框内引入一个终止子导致 KO 活性减弱,进而导致植株的矮化。向日葵 *dwarf2* 突变体具有叶片、叶柄和花器官比对照变小特点,且茎的生长速度减慢。这种结果是由于突变体中 *HaKAOI* 的 DNA 有一段碱基序列缺失使得基因转录提前终止造成的<sup>[21]</sup>。Sasaki 等<sup>[22]</sup>报道认为水稻中 *GA20ox2* 与 *sd1* 紧密连锁。比较了 4 个矮秆品种与野生型在 *sd1* 位点上的序列差异,发现野生型水稻 *sd1* 等位基因的 3 个外显子大小分别为 557、321 和 291 bp,2 个内含子分别为 103 和 1 472 bp;矮秆品种 *Deo-geo-woo-gen* 及其衍生种在该位点缺失 383 bp 碱基,包含 103 bp 的内含子;矮秆品种 *Jikkoku* 中编码第 94 氨基酸的 GGG 变为 GTG,导致 Gly 变为 Val(缬氨酸);矮秆品种 *Calrose76* 中编码第 266 氨基酸的 CTC 突变为 TTC,导致 Leu(亮氨酸)突变为 Phe;矮秆品种 *Remei* 中编码第 349 氨基酸的 GAC 变为 CAC,导致 Asn(天冬氨酸)变为 His。

而因赤霉素原因导致果树芽变的报道比较少,如 Boss 和 Thomas<sup>[23]</sup>发现葡萄栽培品种 Pinot Meunier 的 GA 不敏感矮化突变体。其典型表型为节间变短,对其喷施外源赤霉素不能使其恢复野生表型,但是却积累了 4 倍于野生型的  $GA_1$  和 12 倍于野生型的  $GA_4$ 。经证明由于基因的突变导致其编码产物的 DELLA 结构域序列变成了 DELHA。这一突变解除了 DELLA 蛋白的抑制作用,植株表

现为矮化,同时 GA 对花器官发育的抑制作用也被解除,以致葡萄蔓藤上本应生长蔓须的部位变成了花序。此芽变为赤霉素不敏感型,这种情况类似于拟南芥中的 *GAI*<sup>[24]</sup>。

本试验中,板栗短雄花序 *KO* 基因中一个等位基因 *KO2* 突变为 *KO3*。在进行跨膜区和二级结构的生物信息学分析预测后得知,*KO3* 比 *KO2* 多一个跨膜区,且二者的二级结构出现了 6 处差异。这种结构的差异可能导致了赤霉素合成途径的部分阻断,*KO* 基因在芽变雄花序发育过程中相对表达量远低于野生雄花序也证明了这一点,进而影响了活性赤霉素的含量。*PP<sub>333</sub>* 是赤霉素的拮抗物,通过抑制内根-贝壳杉烯到内根-贝壳杉烯酸的氧化,阻碍植物体内赤霉素前体物的形成,从而减少赤霉素的生物合成<sup>[25]</sup>。在 5 月 28 日对照水处理的雄花序长度是 *PP<sub>333</sub>* (1 500 mg/L) 处理的 1.9 倍,*PP<sub>333</sub>* 的处理起到了显著抑制雄花序伸长生长的作用<sup>[14]</sup>。而贝壳杉烯氧化酶(*KO*)正是催化这 3 步反应的酶,说明内根-贝壳杉烯到内根-贝壳杉烯酸的氧化的阻断,能够使板栗雄花序形成短化性状。综合以上结果,推测 *KO* 基因的突变导致板栗短雄花序性状。为了更进一步对这种突变进行验证,还需要对野生型雄花序 *KO2* 基因进行 RNA 干扰试验,从而证明以上的推断。

## 参 考 文 献

- [1] 王永宏,孙益知,李方向. 板栗花芽分化特点与调控技术研究进展[J]. 西北农业学报,2001,10(2):115-118
- [2] Liu K,Zhao Z,Li C. Effect of thinning catkins on nutrition in Chinese chestnut tree[J]. ISHS Acta Hort,1999,494:191-194
- [3] 陈建华,何钢,李志辉,等. 促进板栗雌花芽分化的研究[J]. 中南林学院学报,2002,22(1):27-30
- [4] 尹颖,石雪晖. 板栗雌花芽分化与促成技术[J]. 中国果菜,2005,4:11-12
- [5] 杨国顺,刘昆玉,倪建军,等. 植物生长调节剂对板栗花芽性别分化及结果枝生长的影响[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2001,27(6):467-468
- [6] 封志强,焦志耕,张东生. 板栗疏雄增产原因的研究[J]. 中国果树,1995(1):14-15,23
- [7] 张毅,杨兴华. 山东板栗种质资源中的珍稀类型[J]. 落叶果树,1996,增刊:43-44
- [8] 王云尊,马元考,陈维峰. 珍稀板栗新品种浮来无花的性状及栽培技术[J]. 林业科技开发,2001,15(5):31-32
- [9] 张婧,董清华,杨凯,等. 板栗短雄花序异常死亡的超微结构观察[J]. 园艺学报,2007,34(3):605-608
- [10] Feng YQ,Shen YY,Qin L,et al. Short catkin1, a novel mutant of *Castanea mollissima*, is associated with programmed cell death during chestnut staminate flower differentiation[J]. Sci Hort- Amsterdam,2011,130:434-435
- [11] 冯永庆,杨东生,沈元月,等. 板栗短雄花序芽变花粉特性研究[J]. 北京农学院学报,2008,23(2):2-4
- [12] 秦岭,杨东生,高天放,等. 板栗新品种‘短花云丰’[J]. 林业科学,2011,47(4):194,197
- [13] 丁宁. 板栗贝壳杉烯氧化酶基因的克隆及半定量 RT-PCR 的初步研究[D]. 北京:北京农学院,2008
- [14] 韩宝. 板栗短雄花序芽变花序发育期内源激素变化研究[D]. 北京:北京农学院,2009
- [15] Yao J L,Dong Y H,Morris B A M. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor[J]. P Natl Acad Sci USA,2001,98:1306-1311
- [16] Kobayashi S,Yamamoto N G,Hirochika H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color[J]. Science,2004,304:982
- [17] De Schepper S, Van Bockstaele E, Debergh P, et al. Molecular analysis of sports induction in azalea (*Rhododendron simsii* hybrids)[J]. Acta Hort,2001a,552:143-149
- [18] Han X Y, Wang L S, Liu Z A, et al. Characterization of sequence-related amplified polymorphism markers analysis of tree peony bud sports[J]. Sci Hort- Amsterdam,2008,115:261-267
- [19] Liu Y Z, Tang P, Tao N G, et al. Fruit coloration difference between Fengwan, a late-maturing mutant and its original cultivar Fengjie72-1 of navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck)[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology,2006,32(1):31-36
- [20] Helliwell C A, Sheldon C C, Olive M R, et al. Cloning of the *Arabidopsis ent*-kaurene oxidase gene GA3[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998,95(15):9019-9024
- [21] Fambrini M, Mariotti L, Parlanti S, et al. The extreme dwarf phenotype of the GA-sensitive mutant of sunflower, *dwarf2*, is generated by a deletion in the *ent-kaurenoic acid oxidase 1 (HaKAO1)* gene sequence[J]. Plant Mol Biol,2011,75:431-450
- [22] Sasaki A, Ashikari M, Tanaka M U, et al. A mutant gibberellin-synthesis gene in rice[J]. Nature,2002,416:701-702
- [23] Boss P K, Thomas M R. Association of dwarfism and floral induction with a grape ‘green revolution’ mutation [J]. Nature,2002,416:847-850
- [24] Peng J, Carol P, Richards D E, et al. The *Arabidopsis GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses[J]. Gene Dev,1997,11:3194-3205
- [25] Hedden P, Graebe J E. Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol in cell-free homogenates of *Cucurbita maxima* endosperm and *Malus pumila* embryos [J]. J Plant Growth Regul,1985,4:1-4