

芍药*PIGA20ox*基因的克隆及其在芽内休眠解除进程中的表达分析

韩璐璐*, 李俊杰*, 马燕, 国静, 郭先锋**

山东农业大学林学院, 山东泰安271018

摘要: 以芍药‘大富贵’芽为试材, 采用RT-PCR结合cDNA末端快速扩增(RACE)技术, 克隆得到*GA20ox*基因的cDNA全长, 命名为*PIGA20ox* (GenBank登录号为KU886552)。该基因全长1351 bp, 开放阅读框1146 bp, 共编码381个氨基酸, 含有高度保守的20G-Fe(II)-Oxy蛋白结构域、Fe²⁺结合位点(His-247、Asp-249和His-303)和2-酮戊二酸结合位点(Arg-313和Ser-315)。*PIGA20ox*蛋白分子量为43 209.1 Da, 为稳定蛋白, 无跨膜结构域, 无信号肽, 属于C19-GAoxs。氨基酸序列同源性及系统进化树分析表明: *PIGA20ox*与牡丹*PsGA20ox*同源性高达96%, 亲缘关系最近。采用农杆菌介导法将*PIGA20ox*基因于本生烟叶片中瞬时表达, 观察显示: *PIGA20ox*蛋白定位于细胞质中。该基因在芍药各器官中均有表达, 其中, 在芽中表达最高, 其次花瓣, 在根、萼片、叶片和茎中表达微弱。实时荧光定量PCR和高效液相色谱(HPLC)结果显示: 在低温解除芍药芽内休眠进程中, *PIGA20ox*表达水平呈先上升后总体下降趋势, 且与内源GA₃含量呈显著正相关($r=0.901^*$); 外施赤霉素会明显增加内源GA₃含量, 但同时抑制*PIGA20ox*的表达, 说明*PIGA20ox*调控GA₃的合成, 同时受植物体内活性GA₃含量的负反馈调节。
关键词: 芍药; *PIGA20ox*; 克隆; 亚细胞定位; 表达; 芽

赤霉素(gibberellins, GAs)作为一种重要的植物激素, 参与控制种子和芽的萌发、茎的伸长、叶片伸展、根的生长以及花和果实的发育等多种植物发育和生理过程(Olszewski等2002; 岳川等2012)。GA20-氧化酶(GA20ox)是GAs生物合成过程中的关键限速酶, 在GAs合成第三阶段的早期13-羟基化和非13-羟基化途径中行使催化调控功能, 从而生成具有生物活性的GAs (Xu等1995; Desgagné-Penix和Sponsel 2008), 调控具有活性GAs的含量。因此, *GA20ox*基因的分离、表达特性及功能研究近年来逐渐上升为GAs合成代谢及相关研究领域的热点。

目前, 该基因已相继从多种植物中被克隆, 如拟南芥(Phillips等1995)、水稻(Lisa等2002)、葡萄(王西成等2012)、苹果(姜志昂等2013)和番荔枝(刘锴栋等2015)等, 这些不同物种来源的*GA20ox*基因序列差异明显(李伟等2003)。前人研究表明*GA20ox*基因可行使多种调控功能, 例如, 番茄中*GA20ox1*、*GA20ox2*和*GA20ox3*基因可调控种子休眠与萌发(Xiao等2006), 水稻*OsGA20ox2*基因可调节株高(乔枫等2013), 白杨*GA20ox1*基因可调控纤维细胞次生壁的生长(Jeon等2016)。综上所述, 该基因的功能研究主要涉及萌发与休眠、株高和植物纤维素等。

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)隶属于芍药科, 是重要宿根花卉(秦魁杰2004)。在长期演化过程中, 芍药形成了芽冬季休眠的特性, 需达到一定的

低温积累, 芽休眠解除后才可萌芽、生长、开花(成仿云等2005)。本课题组前期及其他课题组研究都表明, 5周的0~4°C低温处理可解除芍药‘大富贵’芽内休眠, 而辅以200 mg·L⁻¹的外源GA₃处理可有效降低开花所需积温(黄雪2010; 王厉慧2011)。张玉喜等(2014)研究表明: *GA20ox*基因在牡丹芽休眠解除过程中发挥重要作用, 低温累积能够促进牡丹芽中*GA20ox*基因的表达和GA₃含量的提高, 从而促进芽休眠解除。那么, 作为GAs生物合成过程中的关键调控基因, *GA20ox*基因在芍药芽经低温解除休眠过程中如何表达, 其与芍药内源GA₃含量的关系如何, 外施GA₃又如何影响其表达等等, 这些科学问题均亟待解答。

迄今为止, 芍药中尚未分离到*GA20ox*基因。为此, 本研究拟基于前期的芍药芽转录组数据, 克隆芍药*GA20ox*基因的cDNA全长序列, 在此基础上, 着重研究其在芍药芽休眠解除进程中的表达特性, 以期为进一步揭示其生物学功能并阐明芍药芽内休眠解除的分子机理奠定基础。

材料与方法

1 材料

以三年生盆栽芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)

收稿 2017-02-10 修定 2017-03-31
资助 山东省自然科学基金(ZR2014CM028).
* 共同第一作者。
** 通讯作者(E-mail: guoxf@sdau.edu.cn)。

‘大富贵’为试验材料。基因克隆试材为芍药芽,于2015年11月采取;组织差异表达试验所用叶片、茎、萼片、花瓣及根于2016年4月下旬采集。休眠解除进程中*PIGA20ox*基因表达分析和内源GA₃含量的测定均采用芽,分别经2种处理后0、7、14、21、28和35 d采取。所有样品均重复3次,取样后经液氮速冻于-80°C保存备用。

本生烟(*Nicotiana benthamiana*)为本实验室保存,亚细胞定位载体为pROKII-GFP,克隆载体为pMD19-T Vector,大肠杆菌感受态细胞为DH5 α ,农杆菌感受态细胞为GV3101。

2 外源GA₃和低温处理

2015年11月15日,当日均气温降至10°C时,将144盆‘大富贵’平均分为2组:一组以200 mg·L⁻¹的外源GA₃进行灌根处理,每棵250 mL;另一组以水代替GA₃做相同处理。处理后全部移入0~4°C冷库进行低温解除内休眠处理。

3 芍药*PIGA20ox*基因cDNA全长的克隆

RNA的提取参照艾德莱的EASYSpin植物RNA快速提取试剂盒说明书操作。利用琼脂糖凝胶电泳及分光光度计检测RNA的质量及浓度。

参考芍药‘大富贵’转录组测序结果中*GA20ox*相关基因片段,利用软件DNAMAN 5.2.2设计引物(表1)。以cDNA为模板进行PCR扩增,反应体系含cDNA 1 μ L、上下游引物各1 μ L (10 μ mol·L⁻¹)、PCR Mix 12.5 μ L,用ddH₂O补足至25 μ L。用特异

引物F₁和R₁(表1)进行中间片段的特异扩增。PCR反应条件为:94°C 5 min预变性;94°C 1 min,52°C 30 s,72°C 45 s,共35个循环;72°C延伸10 min。将PCR产物用胶回收试剂盒回收后,与pMD19-T载体连接,然后转化大肠杆菌DH5 α ,挑选阳性克隆,送华大基因公司测序。

以B₂₆反转录获得的cDNA第一条链为模板,在获得中间片段碱基序列的基础上设计引物F₂和F₃(表1),并与B₂₆进行巢式PCR。PCR反应程序:94°C 5 min预变性;94°C 1 min,58°C 30 s (Outer)、60°C 30 s (Inner),72°C 45 s,共35个循环;72°C延伸10 min。将PCR产物测序,具体方法同上。最后经过拼接和比对,设计引物GA20-F和GA20-R(表1)得到*PIGA20ox*编码区序列全长。

4 生物信息学分析及同源性、系统进化分析

用ORFfinder程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)进行开放阅读框(open reading frame, ORF)预测,用ExPASy (<http://www.expasy.org/>)、CBS Prediction Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/Services/>)、SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)等在线软件对推测蛋白的基本性质、保守结构域及高级结构进行分析。

BLAST程序在NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行序列同源性的比较;MEGA 5.0软件进行氨基酸序列同源性分析及系统发育分析,

表1 芍药*PIGA20ox*基因克隆和表达分析及GFP载体构建所用的引物及其序列

Table1 Primers used to clone and analyze the expression of *PIGA20ox* and the vector construction of GFP

引物名称	核苷酸序列(5'→3')	用途
F ₁	ACAAAATGTCTCTCCTACTGG	中间片段PCR扩增
R ₁	TCAAACAAATCCGACCATGTG	
F ₂	ATTAGCTTGGGAGTCGATCGT	3'-RACE PCR扩增
F ₃	TGAGATGCAACTACTATCCAGCCTG	
B ₂₆	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTT	
GA20-F	ACAAAATGTCTCTCCTACTGG	全长cDNA扩增
GA20-R	AAGTGACTAGAATTTTGATGG	
Actin-F	ACTGCTGAACGGGAAATT	<i>Actin</i> 内参引物
Actin-R	ATGGCTGGAACAGGACTT	
qPCR-F	AAATGGCAAGGCGTTCG	荧光定量PCR引物
qPCR-R	TTCCCTATTCCTACTGCTCTA	
GFP-B-F	CGGGATCCATGTCTCTCCTACTGGACTCAAG	GFP载体构建
GFP-K-R	GGGGTACCGAATTTTGATGGTTAGATGATAG	

下划线部分‘GGATCC’和‘GGTACC’分别为添加的*Bam*HI和*Kpn*I酶切位点。

构建Neighbor-Joining进化树, 采用自举法(bootstrap)对系统发育树进行检验, 共1 000次重复, 其他均为默认设置。

5 表达载体的构建及亚细胞定位

根据*PIGA20ox*的ORF设计引物GFP-B-F与GFP-K-R(表1), 以其正确的克隆产物提取质粒, 经*Bam*HI和*Kpn*I进行双酶切, 用T₄ DNA连接酶连接到pROKII-GFP载体上, 获得pROKII-*PIGA20ox*-GFP的融合表达载体。然后转入DH5 α 感受态细胞, 经PCR扩增和酶切筛选阳性克隆, 并对阳性克隆进行测序验证。以正确融合表达载体pROKII-*PIGA20ox*-GFP的克隆产物提取质粒, 并转入农杆菌GV3101, 通过PCR鉴定阳性转化。

挑取新鲜培养的转化了pROKII-*PIGA20ox*-GFP的农杆菌单菌落, 接种于5 mL含卡那霉素(50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和利福平(25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的YEP培养基中, 于28 $^{\circ}\text{C}$ 下200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养16~24 h。然后加入1%体积的菌液到含有乙酰丁香酮(200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)的YEP培养基中, 同条件下培养至菌液OD₆₀₀=0.8~1.2。3 000 \times g离心10 min, 去上清, 用10 mL MMA (10 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ MES-KOH, 10 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ MgCl₂, 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 乙酰丁香酮)重新悬浮菌体, 于室温下静置3 h, 将含有目的载体和空载体的菌液与P19菌液1:1混合, 用注射器注射培养4周的烟草叶片。取感染2 d后的烟草叶片, 在激光共聚焦显微镜488 nm检测波长下激发观察。

6 *PIGA20ox*在不同器官中表达分析

检测器官包括芍药‘大富贵’的芽、叶片、茎、萼片、花瓣及根, 采用半定量PCR法。利用软件Primer 5.0设计qPCR-F和qPCR-R特异引物, 内参引物为芍药*Actin*基因(表1)。半定量PCR反应体系与反应条件参考基因克隆, 采用琼脂糖凝胶电泳进行分析。

7 芽内休眠解除进程中*PIGA20ox*基因的表达分析与内源GA₃含量测定

7.1 *PIGA20ox*基因的表达分析

采用软件Primer 5.0设计实时定量引物qPCR-F和qPCR-R, 内参引物为芍药*Actin*基因(表1)。在Bio-Rad CFX96TM系统进行荧光采集, 检测低温和低温+GA₃处理后, *PIGA20ox*在芽休眠解除进程中的表达情况。20 μL 反应体系含10 μL SYBR Green

Master Mix、1 μL cDNA、引物各0.6 μL 、ddH₂O 7.8 μL 。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共39次循环; 每次循环第3步进行荧光采集, 最后退火至65 $^{\circ}\text{C}$, 每隔5 s上升0.5 $^{\circ}\text{C}$, 至95 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min。cDNA标样和待测样均设置3次重复, 数据分析采用2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法。

7.2 内源GA₃含量的测定

内源激素提取和纯化参考刘清等(2007)的方法。高效液相色谱仪为Agilent 1100型, 色谱柱为安捷伦SB (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)。色谱条件: 流动相为甲醇:0.8%冰醋酸溶液=55:45, 柱温为30 $^{\circ}\text{C}$, 灵敏度为0.08 AUFS, 流速为0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长为254 nm, 进样量为15 μL 。每个样品重复测3次, 取平均值。

数据采用Microsoft Office Excel 2003和SPSS 21.0进行统计分析。

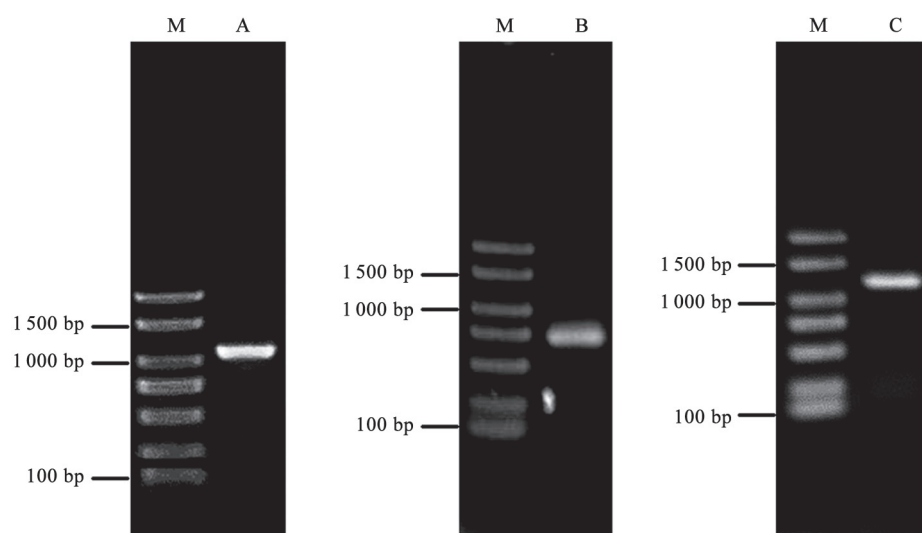
实验结果

1 *PIGA20ox*基因cDNA全长的克隆

经过中间片段和3'-RACE两次扩增, 分别获得了长度为1 063和685 bp的片段(图1-A和B)。拼接后得到一条长1 351 bp (含polyA尾巴)的cDNA序列。利用ORF Finder预测该序列编码区(coding sequence, CDS)并进行特异扩增, 经PCR验证获得了1 146 bp单一扩增条带(图1-C)。NCBI BLAST同源序列比对显示, 该序列与同属植物牡丹*PsGA20ox*同源性高达96%。故将其命名为*PIGA20ox*, GenBank登录号为KU886552。

2 *PIGA20ox*基因编码蛋白的生物信息学分析

利用ExpASy预测*PIGA20ox*蛋白的分子式为C₁₉₅₂H₂₉₇₆N₅₂₄O₅₅₉S₁₅, 相对分子量为43 209.1 Da, 理论等电点为6.89。构成该基因蛋白肽链的381个氨基酸中, 负电荷残基(Asp+Glu)共有43个, 正电荷残基(Arg+Lys)共有42个。该基因蛋白的不稳定指数为32.81, 属于稳定蛋白; 无跨膜结构域, 无信号肽, 总平均疏水指数为-0.335, 属偏亲水性蛋白。同时, *PIGA20ox*蛋白与牡丹、莲、川桑等同源性较高的13种植物的蛋白序列差别较小, 氨基酸数均在378~388之间, 等电点5.67~7.67, 不稳定系数为31.90~39.46, 都属于稳定性蛋白; 总平均疏水指数在-0.502~-0.246, 均为亲水蛋白。

图1 *PIGA20ox*基因 cDNA的PCR扩增Fig.1 PCR amplification of *PIGA20ox* cDNA

M: 分子量标准DL2000; A: 中间片段产物; B: 3'-RACE产物; C: ORF扩增。

SOPMA预测分析表明, *PIGA20ox*蛋白二级结构中, β -转角较少, 而其他3种类型结构较多。其中, α -螺旋(α -helix) 117个(30.71%), β -转角(β -turn) 33个(8.66%), β -折叠(β -sheet) 82个(21.52%), 无规则卷曲(random coil) 149个(39.11%)。

3 *PIGA20ox*基因编码蛋白的同源性、保守结构域和系统进化分析

通过DNAMAN软件对*PIGA20ox*编码的氨基酸序列与GenBank数据库中其他物种进行同源性比较, 结果表明: *PIGA20ox*蛋白有着GA20-氧化酶蛋白家族共同的结构特点, 即N端序列相对变异较大, C端序列则较保守, 在氨基酸序列C端225~322含有保守的2OG-Fe(II)-Oxy蛋白结构域, 其中包含高度保守的Fe²⁺结合位点(His-247、Asp-249、His-303)和2-酮戊二酸结合位点(Arg-313、Ser-315), 此外, 还有与GA底物相结合的保守序列LPWKET(图2)。

为进一步分析*PIGA20ox*蛋白的遗传进化关系, 经NCBI数据库比对, 选取15个与*PIGA20ox*蛋白同源性较高的序列, 运用DNAMAN和MEGA 5.0软件进行多重序列比对、构建系统进化树。结果显示, 同属于豆科的野大豆(*Glycine soja*)、木豆(*Cajanus cajan*)、赤豆(*Vigna angularis*), 同属于锦葵科的陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、树棉(*G. arboreum*)以及同属于杨柳科的毛果杨(*Populus trichocarpa*)、胡杨(*P. euphratica*)等均都在同一分支中,

说明同科植物的GA20ox具有较近的同源关系。同时, 这些氨基酸序列聚合成两大类, 分别为原始花被亚纲和合瓣花亚纲。第一大类中, 芍药与同科同属的牡丹(*P. suffruticosa*)最先聚合, 与同目的莲(*Nelumbo nucifera*)后聚合, 表明其在进化上与牡丹亲缘关系最近; 其次, 与豆科、桑科、梧桐科、锦葵科亲缘关系较近, 而与杨柳科、大戟科亲缘关系相对较远。第二类只包括葫芦科的甜瓜(*Cucumis melo*)和黄瓜(*C. sativus*), 表明与这两种植物的亲缘关系远(图3)。综上所述, *PIGA20ox*基因在遗传进化方面较为保守且符合遗传进化规律。

4 *PIGA20ox*基因表达载体的构建及亚细胞定位

为明确*PIGA20ox*蛋白在植物细胞内的分布, 成功构建了农杆菌介导的亚细胞定位载体pROKII-*PIGA20ox*-GFP。将*PIGA20ox*基因侵染八叶期本生烟植株的叶片, 48 h后在激光共聚焦显微镜下观察, 结果显示: 转入pROKII-GFP空载体的细胞中, 绿色荧光信号呈弥散状态分布, 且定位不清晰, 而转入pROKII-*PIGA20ox*-GFP融合表达载体的细胞内, 绿色荧光信号呈颗粒状分布于细胞质中, 为非胞浆酶(图4), 因而推断该基因定位于细胞质中。

5 *PIGA20ox*基因在不同器官组织中的表达分析

通过半定量RT-PCR分析*PIGA20ox*基因的组织特异性(因‘大富贵’雌雄蕊退化严重, 故无雄蕊和种子的表达分析), 结果显示: 该基因在不同组织

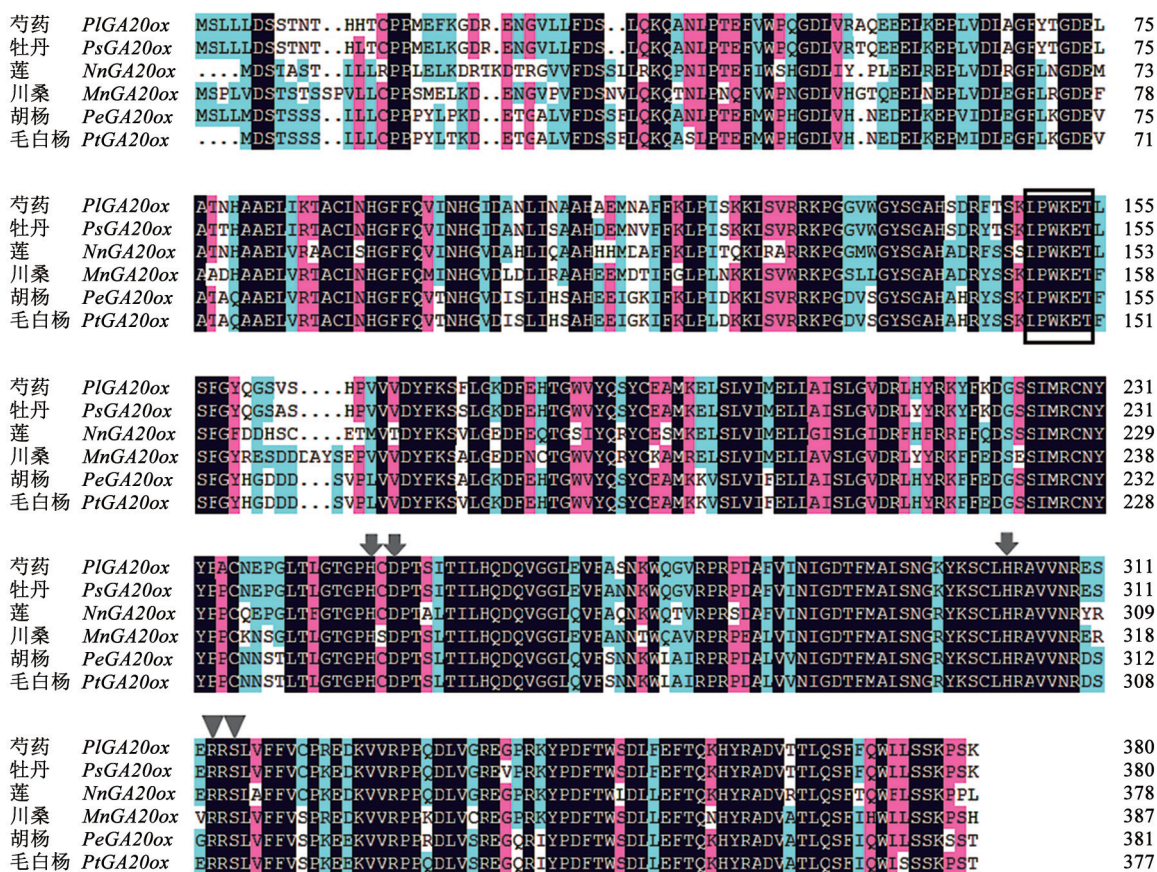


图2 预测的PIGA20ox与其他植物GA20ox的同源性比对

Fig.2 Alignment of the deduced PIGA20ox protein and GA20ox from other plants
箭头和三角分别表示Fe²⁺和2-酮戊二酸结合位点; 方框表示与GA底物相结合的保守序列。

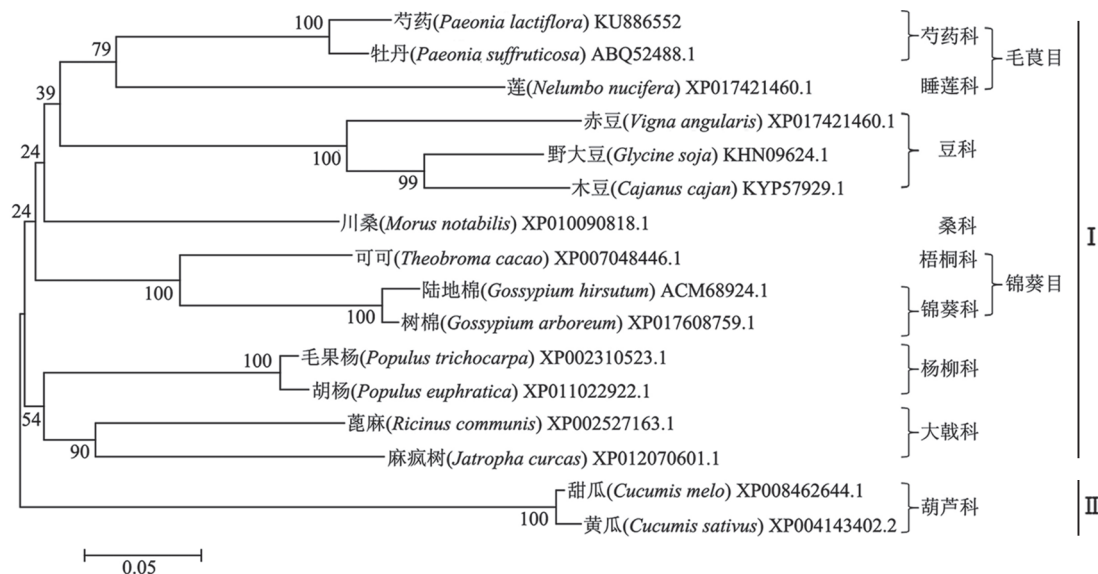


图3 PIGA20ox与其他物种GA20ox蛋白系统进化树分析

Fig.3 The phylogenetic tree derived from the alignment of amino acid sequences of PIGA20ox and other GA20oxs

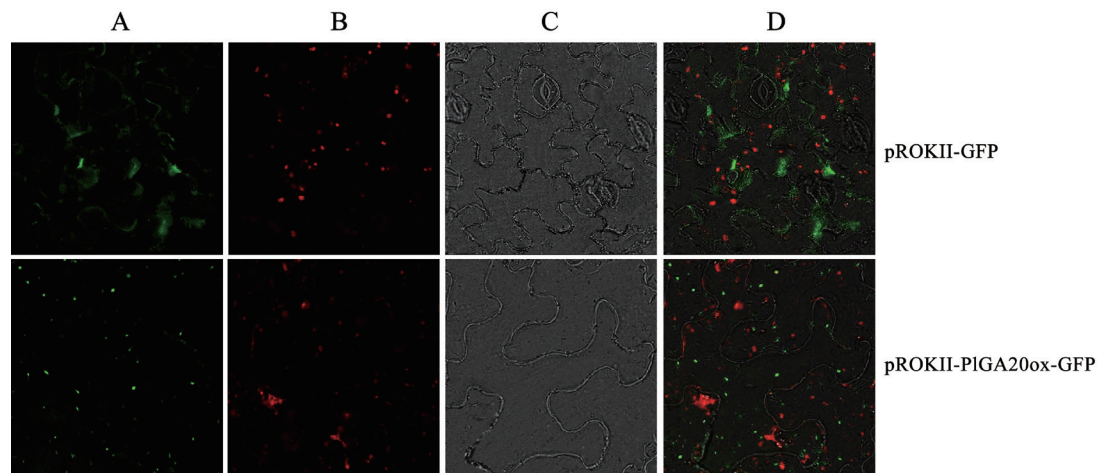


图4 *PIGA20ox*在本生烟叶片细胞中的定位

Fig.4 Subcellular localization of *PIGA20ox* in leaves of *N. benthamiana*

A: 荧光信号图; B: 叶绿体自发荧光图; C: 明图视野图; D: A、B、C的叠加图

器官中均表达, 但表达水平存在较明显差异, 其中, 芽中表达丰度最高, 其次是花瓣, 而在根、萼片、叶片及茎中表达微弱(图5)。

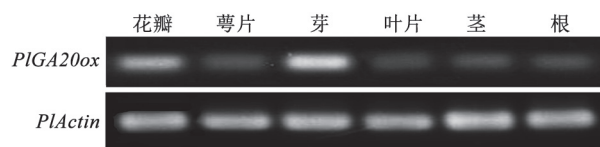


图5 芍药‘大富贵’不同器官中*PIGA20ox*基因的表达

Fig.5 Expression characteristics of *PIGA20ox* gene in *P. lactiflora* ‘Da fugui’ organs

6 *PIGA20ox*在芽内休眠解除进程中的表达量及内源GA₃含量的变化

两种处理下*PIGA20ox*在芽内休眠解除进程中的相对表达量变化如图6所示。低温处理时, *PIGA20ox*表达量随低温积累量的增加而增加, 在低温处理7 d后出现最大值, 之后随低温时间的延长呈总体下降的变化趋势, 即7 d后迅速下降, 21 d时微弱上升, 之后平缓下降。而低温+GA₃复合处理后, *PIGA20ox*表达量则呈持续急速下降的变化趋势, 28 d时降到最低, 35 d时小幅回升, 与低温处理组相比, 表达量下降剧烈, 说明*PIGA20ox*表达量明显受外源GA₃影响。

两种处理下芽中内源GA₃含量的测定结果见图7。低温处理时, GA₃含量呈先上升后下降的变

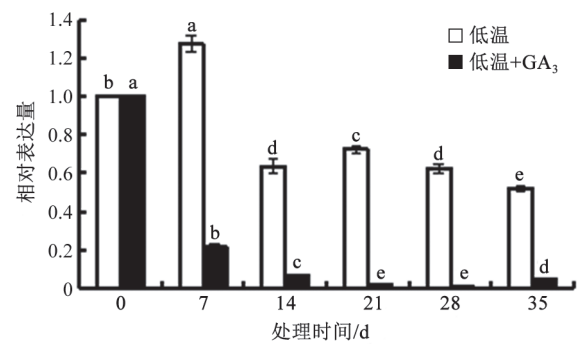


图6 *PIGA20ox*在芍药芽休眠解除进程中的表达特性
Fig.6 Expression characteristics of *PIGA20ox* during peony bud dormancy release

不同处理的数据标不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 图7同。

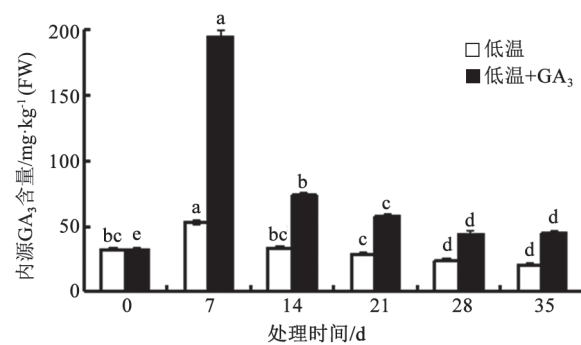


图7 在芍药芽内休眠解除进程中GA₃含量的变化
Fig.7 Dynamics of GA₃ content during peony bud dormancy release

化趋势, 低温处理7 d后出现峰值; 而低温+GA₃复合处理后, GA₃含量变化剧烈, 7 d后含量急剧上升, 之后迅速下降, 28 d后趋于较平稳状态, 且外源GA₃处理后, 内源GA₃含量明显高于对照组。

比较相应时期*PIGA20ox*相对表达情况, 发现在低温处理时, 内源GA₃含量变化趋势与*PIGA20ox*表达量变化趋势基本一致, 利用SPSS软件进行数据分析, 两者之间呈显著正相关($r=0.901^*$)。外施赤霉素后, 内源GA₃含量明显升高, 而*PIGA20ox*相对表达量明显下降, 两者之间呈负相关, 但无明确的线性关系($r=-0.157$)。

讨 论

GA20-氧化酶是GAs合成过程中最后阶段的关键限速酶(Hedden和Kamiya 1997; Desgagné-Penix和Sponsel 2008), 目前已从至少30种植物中被分离。本研究以芍药‘大富贵’为研究对象, 克隆得到cDNA全长序列为1 351 bp的*PIGA20ox*基因, 并挖掘了其生物学信息, 定位了其蛋白表达位置, 同时开展了表达模式的研究。这是首篇有关芍药*PIGA20ox*的报道。

研究认为, 不同植物来源的*GA20ox*基因编码的氨基酸序列同源性较低, 大部分集中在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)。本研究中, *PIGA20ox*所编码氨基酸序列与上述15种植物的同源性均在69%以上, 与同属植物牡丹*Ps-GA20ox* (张玉喜等2014)同源性则高达96%。这一方面可能是基于二者非常亲密的系统演化关系; 另一方面, 也暗示*PIGA20ox*基因在芍药属植物中非常保守, 预示其在芍药属植物芽发育中可能具有非常重要的作用。蛋白的有序分布是保证生命个体生长发育的基础, 因此对其进行亚细胞定位是对其功能进行分析研究必不可少的环节(Emanuelsson和Heijne 2001; 杨光等2011)。依据赤霉素合成途径中酶的亚细胞定位, 其合成途径依次在质体、内质网膜和细胞质3个亚细胞结构中进行(黄桃鹏等2015), 其中GA20ox蛋白主要定位于细胞质中(Oikawa等2004; Appleford等2006), 某些植物如葡萄(王西成等2012)和苹果(姜志昂等2013)中GA20ox蛋白也定位于细胞核和细胞质膜上, 本研究发现芍药

*PIGA20ox*蛋白定位在细胞质中。GA20ox蛋白是一种2-酮戊二酸依赖性酶, 并且其催化时需要Fe²⁺辅助(Aphrodite等2012; 高聪聪等2015), 推测*PIGA20ox*蛋白正是在细胞质中结合游离的2-酮戊二酸底物及辅因子Fe²⁺, 以进一步发挥其催化功能。

郑国生等(2009)将低温解除牡丹芽休眠划分为低温积累期、解除启动期、基本解除期和彻底解除期。本研究中当低温积累达到一定值时(7 d), *PIGA20ox*表达量和内源GA₃含量均出现最大值, 说明低温的积累促进了两者的增加, 达到一定阈值后, 诱导内休眠解除启动期的开始, 休眠解除阶段呈整体下降趋势, 内休眠解除后降至较低水平; 这与袁燕波等(2014)在芍药休眠芽发育进程和张玉喜等(2014)牡丹内休眠解除进程中GA₃含量随休眠的解除呈下降趋势的研究结果基本一致。另外, *PIGA20ox*基因的表达量和GA₃含量的相关性分析表明, 两者之间呈显著正相关, 说明*PIGA20ox*是调控GA₃合成的关键基因, 且发挥一定的正调控作用。同时, 内源GA₃含量变化在一定程度上可以反映芍药芽的休眠进程, 但其休眠解除可能并不是受内源GA₃的单一调控, 而是可能同时受到其他活性GAs的影响, 也可能更多地受生长类和抑制类激素的平衡来调节和制约, 形成一个复杂的应答网络, 致使激素间的交叉反应, 而其内部具体的相互作用调控网络包括活性GAs之间的相互转化关系等还需进一步探究。

在采用低温+外源GA₃复合处理以解除芍药芽内休眠进程中, *PIGA20ox*基因的表达水平持续剧烈下降。已有报道表明, 采用外源GA₄处理可降低拟南芥*GA20ox*的表达水平(Xu等1995); 4℃低温结合赤霉素或乙烯处理在解除山毛榉种子休眠进程中, 其*GA20ox*转录水平下降(Calvo等2004)。本研究结果支持了前人关于外源赤霉素下调*GA20ox*基因表达水平的结论。复合处理过程中, 内源GA₃含量急剧上升、之后缓慢下降, 但在处理后的任何一个时期, 其含量均明显高于处理前水平。相比之下, *PIGA20ox*基因表达水平的变化趋势刚好相反。诸多研究认为, *GA20ox*基因是控制植物GAs合成的关键基因, 但同时也受到外源激素的影响和内源GAs含量的负反馈调节(Yamaguchi和Kamiya 2000; Ana等2003)。

Plackett等(2011)曾指出,植物中GA20ox是以小基因家族的形式存在,一般为3~5个基因家族成员,如拟南芥有5个,水稻有4个。本研究基于芍药芽转录组数据得到了1条芍药GA20ox基因序列,但芍药植株中是否还有更多的GA20ox基因,尚待后续深入研究。此外,在草本植物中,除休眠外,GA20ox的功能还被更多地与株高相联系(Lange等1994; Qiao和Chen 2013),那么PGA20ox基因与芍药株高之间有着怎样的关联,也有待进一步研究。

参考文献

- Ana MV, Waddi BC, Manuel T, Jose LG (2003). Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellins content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta*, 217: 442–448
- Aphrodite T, Konstantinos P, Athanasios ST (2012). The role of a gibberellin 20-oxidase gene in fruit development in pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Mol Biol Rep*, 30: 556–565
- Appleford NE, Evans DJ, Lenton JR, Gaskin P, Croker SJ, Devos KM, Phillips AL, Hedden P (2006). Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta*, 223: 568–582
- Calvo AP, Nicolas C, Nicolas G, Rodriguez D (2004). Evidence of a cross-talk regulation of a GA20-oxidase (*FsGA20ox1*) by gibberellins and ethylene during the breaking of dormancy in *Fagus sylvatica* seeds. *Physiol Plantarum*, 120 (4): 623–630
- Cheng FY, Zhang WJ, Yu XN, Chai XL, Yu RQ (2005). Effects of gibberellin and rooting powder on the forcing culture of *Paeonia lactiflora* ‘Da fugui’. *Acta Hort Sin*, 32 (6): 1129–1132 (in Chinese with English abstract) [成仿云, 张文娟, 于晓南, 柴新利, 余瑞卿(2005). 赤霉素及生根粉对芍药促成栽培的影响. *园艺学报*, 32 (6): 1129–1132]
- Desgagné-Penix I, Sponsel VM (2008). Expression of gibberellin 20-oxidase1 (*AtGA20ox1*) in *Arabidopsis* seedlings with altered auxin status is regulated at multiple levels. *J Exp Bot*, 59 (8): 2057–2070
- Emanuelsson O, von Heijne G (2001). Prediction of organellar targeting signals. *Biochim Biophys Acta*, 1541 (1-2): 114–119
- Gao CC, Ni J, Chen MS, Xu ZF (2015). Characterization of gene involved in gibberellin metabolism and signaling pathway in the biofuel plant *Jatropha curcas*. *Plant Diver Resour*, 37 (2): 157–167 (in Chinese with English abstract) [高聪聪, 倪军, 陈茂盛, 徐增富(2015). 能源植物小桐子赤霉素合成代谢及信号转导相关基因的鉴定及序列分析. *植物分类与资源学报*, 37 (2): 157–167]
- Hedden P, Kamiya Y (1997). Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu Rev Plant Biol*, 48: 431–460
- Huang TP, Li MJ, Wang R, Li L (2015). Progress in study of gibberellins biosynthesis and signaling transduction pathway. *Plant Physiol J*, 51 (8): 1241–1247 (in Chinese with English abstract) [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 X (2010). The researches on the selection of herbaceous peony cultivars in greenhouse and the matched techniques (Master's thesis). Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [黄雪(2010). 芍药温室栽培品种的筛选及配套技术的研究(硕士论文). 泰安: 山东农业大学]
- Jeon HW, Cho JS, Park EJ, Han KH, Choi YI, Ko JH (2016). Developing xylem-preferential expression of *PdGA20ox1*, a gibberellin 20-oxidase 1 from *Pinus densiflora*, improves woody biomass production in a hybrid poplar. *Plant Biotechnol J*, 14: 1161–1170
- Jiang ZA, Suo JS, Peng JY, Shao JZ (2013). Isolation, subcellular location and expression of *MdGA20ox1* gene from apple. *Acta Hort Sin*, 40 (12): 2373–2381 (in Chinese with English abstract) [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]
- Lange T, Hedden P, Graebe JE (1994). Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 (18): 8552–8556
- Li W, Chen XY, Ding X (2003). Studies on the GA20-oxidase of higher plants. *Chin Bull Life Sci*, 15 (1): 42–45, 35 (in Chinese with English abstract) [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, 35]
- Liu KD, Yuan CC, Li HL, Liu JX, Chen Y, Mo YW, Li HF (2015). Cloning and expression analysis of GA20-oxidase gene from sugar apple (*Annona squamosa*). *Plant Physiol J*, 51 (10): 1697–1705 (in Chinese with English abstract) [刘锴栋, 袁长春, 黎海利, 刘金祥, 陈燕, 莫亿伟, 李华富(2015). 番荔枝GA20氧化酶基因的克隆与表达分析. *植物生理学报*, 51 (10): 1697–1705]
- Liu Q, Zhu YH, Wu S, Shen GZ, Xiao LT (2007). Studies on the content changes of endogenous phytohormones in rice calli for genetic transformation. *Sci Agric Sin*, 40 (10): 2361–2367 (in Chinese with English abstract) [刘清, 朱允华, 吴顺, 沈革志, 萧浪涛(2007). 遗传转化过程中水稻愈伤组织的内源植物激素变化动态研究. *中国农业科学*, 40 (10): 2361–2367]
- Lisa M, Noriyuki K, Rika Y, Junko S, Haruka M, Yumiko M, Masao T, Mizuho S, Shinobu N, Yuzo M (2002). Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice “green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res*, 9 (1): 11–17
- Oikawa T, Koshioka M, Kojima K, Yoshida H, Kawata M (2004). A role of *OsGA20ox1*, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice. *Plant Mol Biol*, 55: 687–700
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 14: S61–S80
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NE, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 108 (3): 1049–1057
- Plackett AR, Thomas SG, Wilson ZA, Hedden P (2011). Gibberellin control of stamen development: a fertile field. *Trends Plant Sci*, 16 (10): 568–578

- Qiao F, Chen Z (2013). Alteration of rice growth and development via antisense expression of *OsGA20ox2* gene. *Afr J Biotechnol*, 12 (25): 3898–3904
- Qiao F, Wang CL, Chen Z, Geng GG (2013). Influence on plant architecture through the over expression of *OsGA20ox2* in rice. *J Chin Agric Univ*, 18 (1): 25–31 (in Chinese with English abstract) [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]
- Qin KJ (2004). Peony. Beijing: China Forestry Publishing House, 18–42 (in Chinese) [秦魁杰(2004). 芍药. 北京: 中国林业出版社, 18–42]
- Wang LH (2011). Studies on forcing cultivation of herbaceous peony for cutting and its dynamic changing of hormones inside dormant buds (Master's thesis). Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese with English abstract) [王历慧(2011). 芍药切花促成栽培与休眠芽激素变化规律研究(硕士论文). 北京: 北京林业大学]
- Wang XC, Ren GH, Fang JG, Li AY, Liu H, Wu WM, Zhao MZ (2012). Cloning, subcellular localization and expression analysis of genes related to the synthesis of gibberellin from grapevine. *Sci Agric Sin*, 45 (11): 2224–2231 (in Chinese with English abstract) [王西成, 任国慧, 房经贵, 李阿英, 刘洪, 吴伟民, 赵密珍(2012). 葡萄赤霉素合成相关基因克隆、亚细胞定位和表达分析. 中国农业科学, 45 (11): 2224–2231]
- Wu JM, Li YR, Wang AQ, Yang LT, Yang L (2009). Cloning and sequence analysis of sugarcane GA20-oxidase gene. *Chin J Tropic Agric*, 30 (6): 817–821 (in Chinese with English abstract) [吴建明, 李杨瑞, 王爱勤, 杨丽涛, 杨柳(2009). 甘蔗GA20氧化酶基因片段克隆及序列分析. 热带作物学报, 30 (6): 817–821]
- Xiao J, Li H, Zhang J, Chen R, Zhang Y, Ouyang B, Wang T, Ye Z (2006). Dissection of GA20-oxidase members affecting tomato morphology by RNAi-mediated silencing. *Plant Growth Regul*, 50: 179–189
- Xu YL, Li L, Wu K, Peeters AJM, Gage DA, Zeevaart AD (1995). The *GA5* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (14): 6640–6644
- Yamaguchi S, Kamiya Y (2000). Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol*, 41: 251–257
- Yang G, Cao X, Fang JG, Song CN, Wang C, Wang XC (2011). Cloning, subcellular localization and spatiotemporal expression of a *VvGAI* gene from grapevine 'Fujiminori'. *Acta Horti Sin*, 38 (10): 1883–1892 (in Chinese with English abstract) [杨光, 曹雪, 房经贵, 宋长年, 王晨, 王西成(2011). '藤稔'葡萄*VvGAI*基因的克隆、亚细胞定位及时空表达分析. 园艺学报, 38 (10): 1883–1892]
- Yuan YB, Wang LH, Yu XN (2014). Comparative analysis of endogenous hormones during dormant bud development of Chinese herbaceous peony. *Acta Agric Zhejiangensis*, 26 (1): 54–60 (in Chinese with English abstract) [袁燕波, 王历慧, 于晓南(2014). 芍药休眠芽发育进程内源激素变化研究. 浙江农业学报, 26 (1): 54–60]
- Yue C, Zeng JM, Cao HL, Wang XC, Zhang ZF (2012). Gibberellins metabolism and signalling pathway in higher plant. *Plant Physiol J*, 48 (2): 118–128 (in Chinese with English abstract) [岳川, 曾建明, 曹红利, 王新超, 章志芳(2012). 高等植物赤霉素代谢及其信号转导通路. 植物生理学报, 48 (2): 118–128]
- Zhang YX, Zhang WC, Li YE, Liu CY, Zheng GS, Gai SP (2014). The study of *PsGA20ox* gene participating in endo-dormancy release of flower buds by chilling treatment in tree peony. *Acta Agric Boreali Sin*, 29 (3): 22–26 (in Chinese with English abstract) [张玉喜, 张文超, 李玉娥, 刘春英, 郑国生, 盖树鹏(2014). 赤霉素氧化酶*PsGA20ox*基因参与低温诱导的牡丹内休眠解除. 华北农学报, 29 (3): 22–26]
- Zheng GS, Gai SP, Gai WL (2009). Changes of endogenous hormones during dormancy release by chilling in tree peony. *Sci Silva Sin*, 45 (2): 48–52 (in Chinese with English abstract) [郑国生, 盖树鹏, 盖伟玲(2009). 低温解除牡丹芽休眠进程中内源激素的变化. 林业科学, 45 (2): 48–52]

Cloning and expression analysis of *PIGA20ox* gene in peony (*Paeonia lactiflora*) buds during endodormancy release

HAN Lu-Lu*, LI Jun-Jie*, MA Yan, GUO Jing, GUO Xian-Feng**

Colloge of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: The full-length cDNA of *PIGA20ox* gene (GenBank accession number: KU886552) was cloned from *Paeonia lactiflora* 'Da fugui' buds by RT-PCR and rapid-amplification of cDNA ends (RACE) methods. Cloned *PIGA20ox* gene is 1 351 bp in length, containing 1 146 bp open reading frame (ORF) encoding 381 amino acids. Amino acid sequence analysis indicated that *PIGA20ox* possesses conserved 20G-Fe(II)-Oxy protein domain, highly conserved Fe²⁺ and 2-oxoglutaric acid binding sites. *PIGA20ox* is a kind of stable protein with a predicted molecular weight of 43 209.1 Da and belongs to C19-GAoxs without transmembrane domain or signal peptide. The homology between *PIGA20ox* and *GA20ox* from *P. suffruticosa* is as high as 96%, indicating the closest genetic relationship. Subcellular localization showed that the *PIGA20ox* protein was localized in the cytoplasm. Semi-quantitative PCR showed that *PIGA20ox* was expressed in each organ of *P. lactiflora* but differentially. It was extremely high in buds, followed by petals, and weakly present in the leaves, stems, sepals and roots. The expression level of *PIGA20ox* showed an overall downward trend with an initial rise, which is positively correlated to endogenous GA₃ content during bud endodormancy release induced by chilling. The exogenous GA₃ could increase the endogenous GA₃ content and inhibit the expression of *PIGA20ox* significantly, indicating that *PIGA20ox* can regulate the synthesis of GA₃ meanwhile receive negative feedback regulation from active GA₃ in plants.

Key words: *Paeonia lactiflora*; *PIGA20ox*; cloning; subcellular location; expression; buds

Received 2017-02-10 Accepted 2017-03-31

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No. ZR2014CM028).

*Co-first authors.

**Corresponding author (E-mail: guoxf@sdau.edu.cn).