

苹果内根-贝壳杉烯合成酶基因的克隆及表达分析

邓晓云 戴洪义 梁美霞

(青岛农业大学 园林园艺学院 山东 青岛 266109)

摘要:以柱型苹果茎尖为试材,采用同源克隆的方法克隆得到赤霉素合成代谢关键酶内根-贝壳杉烯合成酶的 cDNA 全长序列,命名为 *MdKS*。*MdKS* 的开放阅读框(ORF)全长 2 214 bp,编码 737 个氨基酸。*KS* 属于萜类合成酶亚家族,具有 DDXD 保守结构域。氨基酸聚类分析表明,*MdKS* 与梨同源性最高,为 98%,其次是板栗,为 73%;实时荧光定量 PCR 分析表明,在苹果的生长季节,*MdKS* 基因在柱型和普通型苹果中均能表达。在苹果的生长初期,普通型苹果 *MdKS* 基因的表达量均明显高于柱型苹果,而在 6 月初,其表达量却略低于柱型苹果。

关键词:苹果;内根-贝壳杉烯合成酶;矮化;实时荧光定量 PCR

中图分类号:S661.1;Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2013)02-0046-06

Cloning and Expression Analysis of *Ent*-Kaurene Synthase Gene *MdKS* in Apple(*Malus domestica* Borkh)

DENG Xiao-yun, DAI Hong-yi, LIANG Mei-xia

(College of Landscape and Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: *Ent*-kaurene synthase(*KS*) is a critical enzyme in the pathway of gibberellins biosynthesis. In this research *ent*-kaurene synthase gene in columnar apple, designated as *MdKS*, was isolated from apple(*Malus domestica* Borkh) stem apical tissue by homologous cloning technology. The full-length cDNA consisted of 2 214 nucleotides encoding a putative protein of 737 amino acids. *MdKS* contained a core functional domain DDXD of plant class terpene synthase. Amino acids cluster analysis showed that *KS* from apple was highly homologous with Pp*KS* firstly had 98% similarity and followed by that from *Castanea sativa*, had 73% similarity. The Real-time quantitative PCR analysis showed that *MdKS* gene were always expressed in columnar and standard apple trees during the growing season. In the early growing season, the *MdKS* of standard apples were expressed at higher level than that of columnar apples, but on early June, it was opposite.

Key words: Apple; *Ent*-kaurene synthase; Dwarf; Real-time PCR

赤霉素调控植物生长发育的各个方面,如:种子萌发,下胚轴的伸长,叶片的生长和植物开花时间等^[1]。果树树型的改变是以赤霉素(GAs)为中心的激素代谢不平衡造成的^[2],GAs 是控制树体大小的最重要的激素^[3]。Ibrahim 等从高度矮化的苹果砧木中分离得到低活性的 GA 类物质,而在矮化性状不明显的砧木中 GA 类物质活性高^[4],王丽琴等^[5]发现,紧凑型苹果春梢旺长期茎尖和叶片中 GA₁ 和 GA₃ 的总含量明显低于普通型苹果。前人的研究表明,赤霉素与果树的矮化性状或短枝生长习性紧密

相关,在控制树体高矮方面发挥着重要作用。柱型苹果(*Malus domestica* Borkh)是一种特殊的矮生突变类型,其表现为节间非常短、侧生延长新梢很少,呈现直立单干形。柱型苹果独特生长特性的形成是否与 GA 合成途径的关键酶基因的突变有关值得深入研究。

内根-贝壳杉烯合成酶(*Ent*-kaurene synthase, *KS*)又称为内根-贝壳杉烯合成酶 B,是赤霉素合成途径中的第 2 个关键酶,与古巴焦磷酸合酶(Copalyl pyrophosphate synthase, CPS)催化 GGPP 形成内根-

收稿日期:2012-12-02

基金项目:国家现代农业(苹果)产业技术体系项目(CARS-28-01-07);山东良种产业化工程项目;山东省教育厅项目(J10LC12);青岛市科技局项目(10-3-4-5-2-jch)

作者简介:邓晓云(1986 -),女,山东潍坊人,在读硕士,主要从事果树遗传育种。

通讯作者:梁美霞(1970 -),女,山东莱阳人,副教授,硕士生导师,主要从事果树生物技术研究。

贝壳杉烯(*Ent-kaurene*) ,它与 CPS 都位于前质体具有引导序列。目前,编码 KS 的基因在南瓜、拟南芥、甜叶菊、黄瓜、莴苣、蓖麻等草本植物上相继得到克隆^[6-9] ,在多年生木本植物上,也报道了咖啡、毛果杨、板栗、梨的 cDNA 全长或部分片段,但在苹果上尚未见报道。本研究以国光×特拉蒙同一遗传背景杂交后代中柱型和普通型苹果的茎尖为试材,克隆 KS 基因(*MdKS*) ,并对所获得的基因进行生物信息学分析,以期探讨苹果生长发育赤霉素合成途径上游的调控机制,为研究苹果的矮化机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

2011 年在青岛农业大学莱阳果树实验站采集国光×特拉蒙杂交后代柱型和普通型苹果快速生长的新梢茎尖组织,采样日期分别为 4 月 12 日、4 月 25 日、5 月 10 日、5 月 24 日和 6 月 7 日,液氮速冻后-70℃冰箱保存待用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 第一链的合成 总 RNA 的提取采用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒, DNase I, RNase-free 去除基因组 DNA, cDNA 第一链的合成参照 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明进行操作。

1.2.2 苹果 KS 基因 cDNA 全长序列的克隆 根据 GenBank 中已登录的其他植物 KS 氨基酸序列,与苹果基因组序列进行比对,设计特异引物 MdKS-F: 5'-ATGTTTCGACAAGATTGATCTC-3', MdKS-R: 5'-TTACAGTTCGCTGAGAAGGAT-3',以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 扩增程序: 95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 54℃退火 30 s, 72℃延伸 3 min, 40 个循环; 72℃终延伸 10 min。将扩增得到的片段进行切胶回收,连接于 pGM-T 载体,并转化到 *E. coli* DH5 α 细胞,蓝白斑筛选挑取阳性克隆,菌液 PCR 检测后送上海生工测序。

1.2.3 *MdKS* 基因及其氨基酸序列的生物信息学分析 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析开放阅读框; DNAMAN 6.0 软件初步分析氨基酸序列的蛋白质分子量、等电点、保守结构域,比较不同品种间核酸序列和氨基酸序列的差异; ProtParam tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 分析氨基酸基本成分; PBIL LYON-GERLAND(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html) 进

行二级结构预测。DNAMAN 6.0 软件进行同源性比对并绘制系统进化树 相关物种有: 南瓜、拟南芥、甜叶菊、黄瓜、莴苣、蓖麻、咖啡、毛果杨、板栗、梨; 结合 DNAMAN 比对分析结果, NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中的 BLASTP、Motif Scan (http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 及 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 工具对 *MdKS* 的推导的氨基酸序列进行功能位点和底物结合位点分析; 通过 YLoc(<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>)、PSORT(<http://psort.hgc.jp/form.html>) 进行亚细胞定位预测,用 DNAMAN、TMHMM Server v. 2.0(<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 及 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行跨膜预测分析。

1.2.4 *MdKS* 基因的表达分析 提取柱型苹果和普通型苹果不同发育时期新梢嫩叶的总 RNA,经检测其 $A_{260/280}$ 值在 1.8~2.0 之间,以其反转录的 cDNA 为模板,根据所得序列设计 RT-PCR 半定量引物 Md-KS-F: 5'-CAGGTGGCAGCATCTGATAAT-3', Md-KS-R: 5'-AAATATGCCCGCCTTTCTATG-3',以 actin 基因为内参,扩增引物为: actin-F: 5'-CCAAAGGCTAATCGGGAGAAA-3', actin-R: 5'-ACTGGCGTAGAGGGAAAGAACA-3' 进行表达分析,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 苹果 KS 基因全长 cDNA 序列的获得

分别以国光×特拉蒙杂交后代普通型和柱型苹果新梢茎尖总 RNA 的反转录产物为模板,进行 PCR 扩增,均得到了长度为 2 214 bp 的 cDNA 序列。片段回收测序后,利用 ORF Finder 软件分析知,该基因阅读框长度为 2 214 bp,编码 737 个氨基酸残基。预测柱型苹果 KS 基因蛋白质分子量为 83.569 2 kDa,等电点 pI 为 5.34; 普通型苹果 KS 基因蛋白质分子量为 83.724 4 kDa,等电点 pI 为 5.47。该氨基酸序列与其他植物 KS 基因具有相同的保守结构域 YDTAWVAWVP 和 DDXXD(图 1)。

2.2 柱型和普通型苹果 *MdKS* 基因及其蛋白序列分析

序列比对分析结果表明,柱型和普通型苹果 KS 基因的 cDNA 序列有 5 个碱基的差异,而与这 5 个碱基相对应编码的氨基酸也均有差异,但差异均不在保守结构域。(图 2,3)

1 ATGTTTCGACAAGATTGATCTCTCGGTTTCCTCATATGACACTGCTTGGGTGGCAATGGTCCCTTCTCCAAATTCC
1 M F D K I D L S V S S Y D T A W V A M V P S P N S
76 CCAAAGGACCCCTTTTTTCCCGAATGCGTAACTGGTTATTGTGTAATCAACTCCATGATGGCTCATGGGGTCCT
26 P K D P F F P E C V N W L L C N Q L H D G S W G P
151 CCTAATTGCAACCCTTGTTTCACGAAAGATGCTCTTATCTACCTTAGCTTGCATCCTTGCACCTGAAGCAGTGG
51 P N L Q P L F T K D A L L S T L A C I L A L K Q W
226 AATGTTGGCGAAGAACAATAACAAGGGGCTACATTTTATTGAATCAAATGTAGCTTCAGCTACTGATGAAGAA
76 N V G E E Q I N K G L H F I E S N V A S A T D E E
301 CAACAATCTCCTGTTGGATTTAATATATTGTTTCCTGCGATGATTGAGTCTGCAATGAATTTGAAGATGAACCTT
101 Q Q S P V G F N I L F P A M I E S A M N L K M N L
376 CCCTTGGGTGCACCAACCCTAGACGCCTTATTTACAGAAGAGACTTTGAGCTGAAAAGAGGCTATGCAAGCAAC
126 P L G A P T L D A L F H R R D F E L K R G Y A S N
451 TCAGAGGGGTGGAGAAGCTTGTAGCATATATTTTCAAGAGGATTGGAAAAGTCGAGGATTGGGACCTGGTCATG
151 S E G W R T L L A Y I S E G F G K S Q D W D L V M
526 AAGTATCAAAGGAAGATGGGTCCTTGTTAATTCACCAGCAACCACGCTCTGCTTTTGCTACCTTAAGAAT
176 K Y Q R K N G S L F N S P A T T A S A F A H L K N
601 GCTGATTGCCTTAAGTACCTACGCTCACTCTTAGAGAAGTTTGGGAATGCAGTTCCAACGGTCTATCCTCTAGAT
201 A D C L K Y L R S L L E K F G N A V P T V Y P L D
676 AAATATGCCCCCTTTCTATGGCTGCCAGTCTTGAATAATTTGGGTATTGATCGACATTTTCAGGGAGGAAATTAGA
226 K Y A R L S M A A S L E N L G I D R H F R E E I R
751 AGTGTACTGGATGAACATACAGAAGCTGGCTGCAGGTGATGAAGATATATTATCAGATGCTGCCACCTGTGCA
251 S V L D E T Y R S W L Q G D E D I L S D A T C A
826 ATGGCGTTTCGACTCTTACGTGTTAATGGATATGATGTTTCTGCAGATCCATTAACTCAATATTCAGAAGATCGT
276 M A F R L L R V N G Y D V S A D P L T Q Y S E D R
901 TTGTTCAATTCCTTGGAGGTATATGAAGGACATCGATGATGCCTTAGAGTTGTTAGAGCTTCAGAAACCATC
301 L F N S L G G Y M K D I D D A L E L F R A S E T I
976 ATACATCCAGATGAATCCGTTCTAGAGAAACAACATCACTGGACAAGTCATTTTCTGAAGCAGGAGTTATCCAAT
326 I H P D E S V L E K Q H H W T S H F L K Q E L S N
1051 ACTTTAATTCGGGGTCATAATCTGAATAAGCATCTCGGCCTAGAGGTGGATGATGCTCTTAAACTTCTCGCTAT
351 T L I R G H N L N K H I G L E V D D A L K L P R Y
1126 GCAATTCGGGCGGATTGTCAACCAGAACAGCTATAAAATATTACAACACAGATAGTACAAGGATTTTAAATCG
376 A I L G R L S T R T A I K Y Y N T D S T R I L K S
1201 TATTATCGTTGTTTGAATATTGGAATGAAGATTTCTAAAGCTGGCTGTGGATGACTTCAATAATGCCAATCT
401 Y Y R C L N I G N E D F L K L A V D D F N N C Q S
1276 ATACACCGTGAAGAAGTCAACCATCTTACTAGGTGGGTTGAGGAGTACAGATTAGACAAGCTAAACTTTGCTAGA
426 I H R E E L N H L T R W V E E Y R L D K L N F A R
1351 CAGAAGCAGGCATACTGTTACTTCTCTGCTGTCGAACCCCTTTTCTCCGAACTATCAGATGCACGCATATCA
451 Q K Q A Y C Y F S A A A T L F P P E L S D A R I S
1426 TGGGCCAAAAATGGAGTCCTTACGACTGTGGTCGATGATTTCTTTGACGTTGGAGGTTCCGAAGAGGAAGTATA
476 W A K N G V L T T V V D D F F F D V G G S E E E L I
1501 AACCTCATACAATTGGTTGAGAAGTGGATGTGAATGTGAGTGTGATTGTTGTTCCGAGAATGTTGAATTTATA
501 N L I Q L V E K W D V N V S V D C C S E N V E I I
1576 TTTTCAGCACTCAAGAACAATCAACGAGATTGGAGCCAGTGCATTACGCGGCAAGGACGAGTGTGACAAGT
526 F S A L K N T I N E I G A S A F T R Q G R S V T S
1651 CATGTTATAGAGATTGTTGGTGGATTGATCAAGTCTATGTTCAAGGAAGCCAGTGGTTGAAAAACAAGTCGGTT
551 H V I E I W L D L I K S M F K E A Q W L K N K S V
1726 CCAACAATGGAGGATATATGGAATAATGCATATGATCATTTGCTTGGGACCGATTGCTCTCCAGCTCTCTAT
576 P T M E E Y M E N A Y V S F A L G P I V L P A L Y
1801 TTGGTTGGGCCATAAGCTTTAGAGGAGGCTGTAGGAAGTCCGAATTTGATCATCTGTATCGACTCATGAGCACT
601 L V G P K L S E E A V G S S E F D H L Y R L M S T
1876 GCTGGGCGCCTTCTCAATGATATCCAAGGGTTTAAAGAGGAATCTGCAGAAGGGAGCTAAATGCTGTGTCCTTG
626 A G R L L N D I Q G F K R E S A E G K L N A V S L
1951 GCCATGATTCATGGCAACGGTGTACCGAGGAAGGCCATTGACGAGATGAAGAATGTAATAGTCAGCAAGAGG
651 A M I H G N G V T E E E A I D E M K N V I V S K R
2026 AGAGAATTGCTAAGATTAGTTTGTCTCGAGAAGGGTAGCGTAGTTCCGAGAGCTTGCAAGATTGTTTGTGAAC
676 R E L L R L V L L E K G S V V P R A C K D L F W N
2101 ATGAGCAAAAGTCTGCACCTGTTTATGCTAAGCATGATGGATTACAGCACATGATATGATGAAGACGGTAAAT
701 M S K V L H L F Y A K H D G F T A H D M M K T V N
2176 GCAGTAATGGAAGAACCTATCCTTCTCAGCGAACTGTAA
726 A V M E E P I L S E L *

* 代表终止密码子。

* Stands for the termination codon.

图1 柱型苹果 *MdKS* 的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列Fig. 1 Sequence of *MdKS* and its deduced amino acid sequence in columnar apple

2.3 *MdKS* 推导的氨基酸序列的同源性及其系统进化分析

将从柱型苹果茎尖中克隆到的 *MdKS* 推导的氨基酸序列与 GenBank 中已登录的其他物种 *KS* 氨基酸序列进行同源性比对, 结果表明: *KS* 的 N 端序列相对保守, 但 C 端序列保守性相对较低, *KS* 保守底

物结合位点位于 N 端。*MdKS* 与这 12 种植物的氨基酸序列的同源性在 52% ~ 98% , 其中与梨 (JF441169.1) 的相似性最高, 为 98% , 其次为板栗 (HQ658171.1) , 相似性为 73% 。氨基酸序列的聚

类分析表明,苹果与梨处于同一进化支,与板栗属于同一分支,其他物种中,亲缘关系较近的毛果杨、蓖麻属于同一进化支,并与葡萄聚为一类,南瓜和黄瓜聚为一类,甜叶菊和莠苣聚为一类(图4)。

普通型, seq 柱型, seq	ATGTTGCGACAGGATTGATCTCTCGGTTTCTCATATGACACTGCTTGGGTGGCAATGGTCCCTTCTCCAAATTCGCCAAGGACCCCTTTTTCCCGGAATGCGTAAACTGGTATTGTGTAATCA ATGTTGCGACAGGATTGATCTCTCGGTTTCTCATATGACACTGCTTGGGTGGCAATGGTCCCTTCTCCAAATTCGCCAAGGACCCCTTTTTCCCGGAATGCGTAAACTGGTATTGTGTAATCA
普通型, seq 柱型, seq	ACTCCATGATGGCTCATGGGGTCTCTCTAAATTTGCAACCCCTTGTTACAGGAAGATGCTCTCTTATCTACCTTAGCTTGCATCCTTGCATGGAAGAGTGGAAATGTTGGCGAAGAACAAATTAACN ACTCCATGATGGCTCATGGGGTCTCTCTAAATTTGCAACCCCTTGTTACAGGAAGATGCTCTCTTATCTACCTTAGCTTGCATCCTTGCATGGAAGAGTGGAAATGTTGGCGAAGAACAAATTAACN
普通型, seq 柱型, seq	AGGGGCTACATTTTATTGAATCAAAATGAGCTTCAGCTACTGATGAAGAACAACTCTCGTTGGATTAAATATATTGTTTCTGCGATGATTGAGTGTGCAATGAATTTGAAGATGAACCTT AGGGGCTACATTTTATTGAATCAAAATGAGCTTCAGCTACTGATGAAGAACAACTCTCGTTGGATTAAATATATTGTTTCTGCGATGATTGAGTGTGCAATGAATTTGAAGATGAACCTT
普通型, seq 柱型, seq	CCCTTGGGTGCAACCAACCTGAGACGCTTATTTCACAGAGAGAGCTTTGAGCTGAAAAGAGGCTATGCAAGCAACTCAGAGGGGTGGGAACGTTGTTAGCATATATTTCAGAGGATTGGAA CCCTTGGGTGCAACCAACCTGAGACGCTTATTTCACAGAGAGAGCTTTGAGCTGAAAAGAGGCTATGCAAGCAACTCAGAGGGGTGGGAACGTTGTTAGCATATATTTCAGAGGATTGGAA
普通型, seq 柱型, seq	GTGCGAGGATTGGGACCTGGTCATGAAGTATCAAAGGAAGAAATGGGTCTTGTTTAAATCACCAGCAACACCGCCTCTGCTTTTGCTCACCTTAAAGAAATGCTGATTGCCTTAAGTACCTACGCT GTGCGAGGATTGGGACCTGGTCATGAAGTATCAAAGGAAGAAATGGGTCTTGTTTAAATCACCAGCAACACCGCCTCTGCTTTTGCTCACCTTAAAGAAATGCTGATTGCCTTAAGTACCTACGCT
普通型, seq 柱型, seq	CACCTCTTAGAGAAGTTTGGGAATGCAGTTCACACGGTCTATCCTCTAGATAAATATGCCCGCTTTCTATGGCTGCCAGTCTTGAAAATTTGGGTATTGATGCACATTCAGGGAGGAAAATTAGA CACCTCTTAGAGAAGTTTGGGAATGCAGTTCACACGGTCTATCCTCTAGATAAATATGCCCGCTTTCTATGGCTGCCAGTCTTGAAAATTTGGGTATTGATGCACATTCAGGGAGGAAAATTAGA
普通型, seq 柱型, seq	AGTGTACTGGATGAACATACAGAAGCTGGCTGCAGGGTGATGAAGATATATTATCAGATGCTGCCACCTGCAATGGCGTTTCGACTCTTACGTTTAAATGGATATGATGTTTCTGCAGATCC AGTGTACTGGATGAACATACAGAAGCTGGCTGCAGGGTGATGAAGATATATTATCAGATGCTGCCACCTGCAATGGCGTTTCGACTCTTACGTTTAAATGGATATGATGTTTCTGCAGATCC
普通型, seq 柱型, seq	ATTAACTCAATATTCACAAGATCCTTTCTCAATTCCTCTCCACGGTATATCAACACATCCATCATCCTTTACACTTCTTTACACCTTCACAAACCATCATATCCCATCAATCCGTTCTAC ATTAACTCAATATTCAGAAGATCGTTTGTCTCAATTCCTCTGGAGGGTATATGAAGGATCATCGATGATGCTCTTAGAGTTGTTTAGAGCTTCAGAAACCATCATATCCAGATCAATCCGTTCTAC
普通型, seq 柱型, seq	AGAAACAACTCACTGGACAACTGATTTTCTGAAGCAGGAGTTATCCAACTACTTTAAATCGGGGTCATAATCTGAATAAGCATATCGGCTAGAGGTGGATGATGCTCTTAAACTTCTCTCGCTAT AGAAACAACTCACTGGACAACTGATTTTCTGAAGCAGGAGTTATCCAACTACTTTAAATCGGGGTCATAATCTGAATAAGCATATCGGCTAGAGGTGGATGATGCTCTTAAACTTCTCTCGCTAT
普通型, seq 柱型, seq	CCAATTTCTGGGCCCCATTCTCAACCACAACCTATAAAAATATTACAACACATAGTACAAGGATTTAAAAATCCTTATATCCTTGTTTCAATATTGCAAAATCAACATTTCTTAAACCTCGCTCT GCAATTTCTGGGCCCCATTCTCAACCACAACCTATAAAAATATTACAACACATAGTACAAGGATTTAAAAATCCTTATATCCTTGTTTGAATATTGAAATGAGGATTTCTTAAAGCTGGCTCT
普通型, seq 柱型, seq	CGATGACTTCAATTAATCCCAATCTATACACCGTCAACAACTCAACCATCTTACTAGCTGGCTTACCAGTACACATTACACAAGCTAAACCTTCTACACACAACCGCCATCTCTTACTCTT GGATGACTTCAATTAATGCAATCTATACACCGTGAAGAACTCAACCATCTTACTAGCTGGGTGAGGAGTACAGATTAGACAAGCTAAACCTTCTAGACAGAGCAGGCATCTCTTACTCTT
普通型, seq 柱型, seq	CTGCTGCTGCAACCCCTTTTCTCCGGAATATCAGATGCAAGCATATCATGGGCAAAAATGGAGTCTTACGACTGTGGTGCATGATTTCTTGACGTTGGAAGTCCGAAGGAGAACTGATA CTGCTGCTGCAACCCCTTTTCTCCGGAATATCAGATGCAAGCATATCATGGGCAAAAATGGAGTCTTACGACTGTGGTGCATGATTTCTTGACGTTGGAAGTCCGAAGGAGAACTGATA
普通型, seq 柱型, seq	AACCTCATACAATTTGGTTGAGAAGTGGGATGTGAATGTGAGTGTTGATTGTTGTTCCGGAATGTTGAAATTTATATTTTCAGCACTCAAGAACCAATCAACGAGATTGGAGCCAGTGCAATTAC AACCTCATACAATTTGGTTGAGAAGTGGGATGTGAATGTGAGTGTTGATTGTTGTTCCGGAATGTTGAAATTTATATTTTCAGCACTCAAGAACCAATCAACGAGATTGGAGCCAGTGCAATTAC
普通型, seq 柱型, seq	GCGGCAAGGACGAGTGTGCAAGTCAATGTTATAGAGATTGGTTGGATTGATCAAGTCTATGTTCAAGGAAGCCAGTGTTGAAAAACAAGTCGGTTCCCAATGAGGAGATATATGGA GCGGCAAGGACGAGTGTGCAAGTCAATGTTATAGAGATTGGTTGGATTGATCAAGTCTATGTTCAAGGAAGCCAGTGTTGAAAAACAAGTCGGTTCCCAATGAGGAGATATATGGA
普通型, seq 柱型, seq	ATGCATATGTATCATTGCTTGGGACCGATTGCTCTTCCAGCTCTCTATTGGTTGGGCTTAAGCTTTACAGGAGGCTGTAGGAAGTTCCGAATTTGATCATCTGTATGACTCATGAGCACT ATGCATATGTATCATTGCTTGGGACCGATTGCTCTTCCAGCTCTCTATTGGTTGGGCTTAAGCTTTACAGGAGGCTGTAGGAAGTTCCGAATTTGATCATCTGTATGACTCATGAGCACT
普通型, seq 柱型, seq	GCTGGGCGCCTTCTCAATGATATCCAAGGTTTAAAGAGGAATCTGCAGAGGGAACCTAAATGCTGTGCTCTTGCCCATGATTCAATGGCAACCGGTGTTACCGAGGAAGAGGCCATTACAGGAT GCTGGGCGCCTTCTCAATGATATCCAAGGTTTAAAGAGGAATCTGCAGAGGGAACCTAAATGCTGTGCTCTTGCCCATGATTCAATGGCAACCGGTGTTACCGAGGAAGAGGCCATTACAGGAT
普通型, seq 柱型, seq	GAGAATGTAAATAGTCAGCAAGAGGAGAGAATTGCTAAGATTAGTTTGTCTGAGAAGGGTAGCGTAGTCCGAGAGCTTGCAAAAGTTTGTGTTGGAACATGAGCAAGTGTCTGCACCTGTTTT GAGAATGTAAATAGTCAGCAAGAGGAGAGAATTGCTAAGATTAGTTTGTCTGAGAAGGGTAGCGTAGTCCGAGAGCTTGCAAAAGTTTGTGTTGGAACATGAGCAAGTGTCTGCACCTGTTTT
普通型, seq 柱型, seq	ATGCTAAGCATGATGGATTACAGCAGCATGATATGATGAAGACGGTAAATGCAGTAAATGGAAGAACCTATCCTTCTCAGCGAACTGTA ATGCTAAGCATGATGGATTACAGCAGCATGATATGATGAAGACGGTAAATGCAGTAAATGGAAGAACCTATCCTTCTCAGCGAACTGTA

图2 柱型和普通型苹果 *MdKS* 基因 cDNA 序列相似性比较

Fig. 2 Comparison of cDNA sequences of *MdKS* gene between columnar and standard apples

普通型Aa. seq 柱型Aa. seq	MFKRIDLSVSSYDTAWVAMVSPNSPKDFPFPECVNWLLCNGLHDSGWPNNLPFLFTKCALLSTLACILALKQWNVGEECKNGKLHFIESNVASATDEECCSPVGFNILFPAMIEAENLKMNI MFKRIDLSVSSYDTAWVAMVSPNSPKDFPFPECVNWLLCNGLHDSGWPNNLPFLFTKCALLSTLACILALKQWNVGEECKNGKLHFIESNVASATDEECCSPVGFNILFPAMIEAENLKMNI
普通型Aa. seq 柱型Aa. seq	PLGAPTLLDALFHRRDFELKRGYASNSEGWRTILLAYISEGFGKSCDWIDVMKYCRKNGSLFNSPATTASAF AHLKNADCLKYRLSLEKFGNAVPTVYPLDKYARLSMAASLENLIGDRHFREIR PLGAPTLLDALFHRRDFELKRGYASNSEGWRTILLAYISEGFGKSCDWIDVMKYCRKNGSLFNSPATTASAF AHLKNADCLKYRLSLEKFGNAVPTVYPLDKYARLSMAASLENLIGDRHFREIR
普通型Aa. seq 柱型Aa. seq	SVLDETYRSMLCGDEIILSDAATCAMAFLRLRVNGYDVSADPLTCYSZDLFNSLGGYMKDIDDAELFRASETIITHPDESVLKCKHHHTSHFLKCELSNTLIRGHNNLNKHIGLEVDDALKLPY SVLDETYRSMLCGDEIILSDAATCAMAFLRLRVNGYDVSADPLTCYSZDLFNSLGGYMKDIDDAELFRASETIITHPDESVLKCKHHHTSHFLKCELSNTLIRGHNNLNKHIGLEVDDALKLPY
普通型Aa. seq 柱型Aa. seq	AILGRLSTRTAIKYYNTDSTRILKSYRCLNIGNEDEFLKLAVDENFNNCCSIHREELNHLTRWVEEYRLDKLNFARQCKAYCYFSAATLFPPELSPARISWAKNGVLITTVDDFFDVGSGSEELI AILGRLSTRTAIKYYNTDSTRILKSYRCLNIGNEDEFLKLAVDENFNNCCSIHREELNHLTRWVEEYRLDKLNFARQCKAYCYFSAATLFPPELSPARISWAKNGVLITTVDDFFDVGSGSEELI
普通型Aa. seq 柱型Aa. seq	NLIQLVEKNDDVNSVDDCCSENVEIIFSALKNTINEIGAFATRCGRSVTSHVIEIWLIDIKSMFKEACWLKKNKSVPTMEEYMENAYVSFALGEIPLPALYIVGPKLSEEAAGSGSEFDFHLYRLMT NLIQLVEKNDDVNSVDDCCSENVEIIFSALKNTINEIGAFATRCGRSVTSHVIEIWLIDIKSMFKEACWLKKNKSVPTMEEYMENAYVSFALGEIPLPALYIVGPKLSEEAAGSGSEFDFHLYRLMT
普通型Aa. seq 柱型Aa. seq	AGRLNIDICGKFRESAEGKLNVAWSLMIHNGNVEETEEAENEMKNVIVSKRRELLRVLLEKSGVVPACKDILFNNMSKVLHLYFAKHBDGFTACDMKMTVNAVMEEPILLSE AGRLNIDICGKFRESAEGKLNVAWSLMIHNGNVEETEEAENEMKNVIVSKRRELLRVLLEKSGVVPACKDILFNNMSKVLHLYFAKHBDGFTACDMKMTVNAVMEEPILLSE

图3 柱型和普通型苹果 *MdKS* 基因氨基酸序列相似性比较

Fig.3 Comparison of amino acid sequences of *MdKS* gene between columnar and standard apples

2.4 *MdKS* 的生物信息学分析

分析结果表明,苹果 *MdKS* 属于 TPS 家族中的 TPSe 亚家族。萜类合成酶(Terpene synthase, TPS)是萜类合成的关键酶,可分为单萜合成酶、倍半萜合成酶和二萜合成酶等,分别以 GPP 或 NPP、FPP 和 GGPP 为直接前体底物合成相应的单萜、倍半萜、二萜^[10-12]。几乎所有的萜类合成酶都含有一个天冬氨酸富集基序(DDxxD)。分析发现, *MdKS* 同样具有 DDALD 结构,这个基序可能起到结合二价金属离子(Mg^{2+} 、 Mn^{2+})与焦磷酸基所形成的复合体相结合,介导焦磷酸基的解离的作用^[13-14]。此外,还发现一个保守结构域 YDTAWVAMVP,该结构域在维持植物双萜环化酶的环化酶活性中起到必要作用^[14-15],推测其为牻牛儿焦磷酸(GGPP)到内根-贝壳杉烯的合成途径中 CPS 与 KS 共同的保守底物结合位点^[16]。亚细胞定位预测发现, *MdKS* 有 15.3% 的可能定位于细胞核, 4.3% 的可能定位于质膜,还可能定位于线粒体和内质网。*MdKS* 为膜外蛋白,不含信号肽,表明 KS 蛋白不是分泌型蛋白。

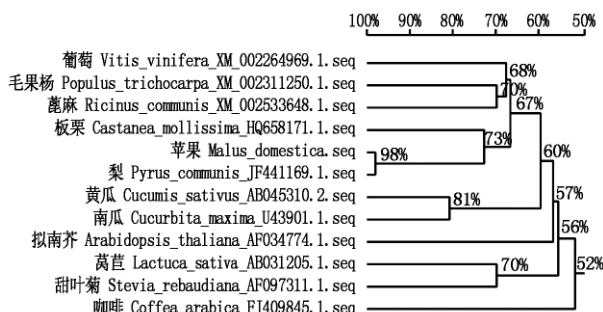


图 4 12 个来自不同物种的 KS 氨基酸序列的聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of ent-kaurene synthase sequences derived from twelve different species

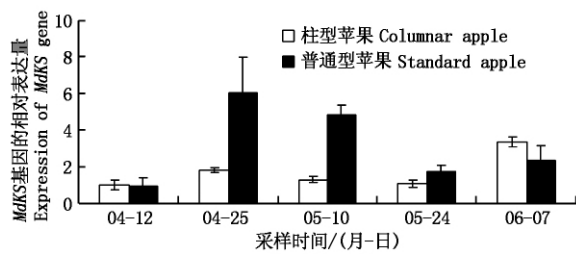


图 5 *MdKS* 在普通型和柱型苹果中不同时期的表达分析

Fig. 5 Quantitative analysis of *MdKS* of different developmental stages in columnar apple and standard apple

2.5 *MdKS* 基因在苹果中的表达分析

从苹果茎尖提取 RNA 进行转录,以获得的 cDNA 进行实时荧光定量表达分析。结构表明(图 5):在普通型和柱型苹果的不同生长时期, *MdKS* 均能表达,但表达量有差异。4 月上中旬生长初期, *MdKS* 基因在普通型和柱型苹果中的表达量均较低。在 4 月 25 日-5 月 24 日苹果生长季节的同一

时期,普通型苹果 *MdKS* 基因的表达量均明显高于柱型苹果,而 6 月初普通型苹果 *MdKS* 基因的表达量却略低于柱型苹果。

3 讨论

赤霉素合成途径中关键酶基因发生突变均可导致植物株型发生改变。水稻因 GA20-氧化酶功能的缺失产生半矮秆植株,引发了一场“绿色革命”,从而使人们对矮化性状与赤霉素合成途径关键酶基因之间的研究更加关注^[17-21]。拟南芥 *ga2* 突变体是赤霉素缺陷型突变体,是由 KS 的催化功能缺失引起。将南瓜 KS 基因转到 *ga2* 突变体中过量表达能矮化性状恢复至野生型^[7]。在水稻中沉默 *OsKS1* 基因,会导致半矮化植株的出现^[14-22]。KS 基因的突变可能引起植株矮化。本研究克隆得到了国光×特拉蒙杂交后代中柱型苹果和普通型苹果 KS 基因的全长 cDNA,通过比对发现,同一遗传背景下的柱型苹果和普通型苹果 *MdKS* 的 cDNA 序列和氨基酸序列虽有差异,但差异均不在其功能位点区域,因此说明苹果的柱型性状可能与该基因的关键位点碱基发生突变无关。Real-time PCR 检测表明,在苹果的生长前期即 5 月中旬以前,普通型苹果 *MdKS* 基因的表达量均明显高于柱型苹果,而 6 月初却正好相反。在南瓜及多数植物中, KS 基因在快速生长的茎尖和幼叶中大量表达^[6],但在甜叶菊中, KS 基因却在成熟的叶片中高表达,与赤霉素合成途径的一般模式相反^[8]。本研究在苹果生长早期普通型植株中表达量明显高于柱型植株,也验证了早期树型的形成与赤霉素合成途径密切相关,可能与普通型植株合成途径基因在这一时期大量表达从而引起树体内源激素含量与柱型植株不同有关。而 6 月初柱型苹果的 *MdKS* 基因的表达量略高于普通型苹果,这可能与该时期柱型苹果的生长势较强有关。

另外,利用生物信息学对 *MdKS* 基因的功能域和结构进行了分析和预测,发现 *MdKS* 属于萜类合成酶(Terpene synthase, TPS)家族中的 TPSe 亚家族,是萜类合成的关键酶,为开展该基因的表达研究,进一步确定其功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hedden P, Kamiya Y. Gibberellin biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1997, 48: 431 - 460.
- [2] Faust M. The theoretical mechanism of tree size [J]. Wu Bangliang, Trans Fruits Japan, 1990, 45(7): 34 - 38.

- [3] 马焕普, 刘志民. 赤霉素与果树的生长发育[J]. 植物学通报, 1998, 15(1): 27-36.
- [4] Looney N E, Taylor T S, Pairs R P. Relationship of endogenous gibberellin and cytokinin levels in shoot tips to apical form in four strains of "McIntosh" apple[J]. American Society for Horticultural Science, 1998, 113: 395-398.
- [5] 王丽琴, 唐芳, 赵飞. 梨紧凑型品种和矮化砧木内源激素的变化[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 5-8.
- [6] Yamaguchi S, Saito T, Abe H *et al.* Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the gibberellin biosynthetic enzyme *ent*-kaurene synthase B from pumpkin (*Cucurbita maxima*) [J]. The Plant Journal, 1996, 10(2): 203-213.
- [7] Yamaguchi S, Sun T, Kawaide H *et al.* The GA2 Locus of Arabidopsis thaliana Encodes *ent*-Kaurene Synthase of Gibberellin Biosynthesis [J]. Plant physiology, 1999: 765-773.
- [8] Richman A S, Gijzen M, Starratt A N *et al.* Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from gibberellin biosynthetic pathway [J]. The Plant Journal, 1999, 19(4): 411-421.
- [9] Sawada Y, Katsumata T, Kitamura J *et al.* Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content rather than of gibberellin responsiveness [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(12): 3383-3393.
- [10] Sacchettini J C, Poulter C D. Biochemistry: Creating isoprenoid diversity [J]. Science, 1997, 277(5333): 1788-1789.
- [11] Schilmiller A L, Schauvinhold I, Larson M *et al.* Monoterpenes in the glandular trichomes of tomato are synthesized from a neryl diphosphate precursor rather than geranyl diphosphate [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(26): 10865-10870.
- [12] 岳跃冲, 范燕萍. 植物萜类合成酶及其代谢调控的研究进展[J]. 2011, 38(2): 379-388.
- [13] 段续伟. 板栗赤霉素合成关键酶基因的克隆及表达分析[D]. 北京: 北京农学院, 2010.
- [14] 程飞飞, 欧春青, 姜淑苓, 等. 梨内根-贝壳杉烯合酶基因克隆及表达分析[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(6): 677-682.
- [15] Kawaide H, Sassa T, Kamiya Y. Functional analysis of the two interacting cyclase domains in *ent*-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* spL487 and a comparison with cyclases from higher plants [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275: 2276-2280.
- [16] 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.
- [17] Spielmeier W, Ellis M H, Chandler P M. Semidwarf (sd-1) 'green revolution' rice contains a defective gibberellin 20-oxidase gene [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(13): 9043-9048.
- [18] 高奋明, 姜勇, 孔德伟, 等. 水稻株高的遗传控制及其在育种上的应用[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 87-93.
- [19] Kusaba S, Honda C, Kano Murakami Y. Isolation and expression analysis of gibberellin 20-oxidase homologous genes in apple [J]. Society for Experimental Biology, 2001, 52(335): 375-376.
- [20] Zhao Huijun, Dong Jiangli, Wang Tao. Function and Expression Analysis of Gibberellin Oxidases in Apple [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2010, 28: 231-238.
- [21] 李节法, 田义轲, 王彩虹, 等. 梨贝壳杉烯氧化酶基因 *PpKO* 的克隆及生物信息学分析 [J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1575-1582.
- [22] MargisPinheiro M, Zhou X R, Zhu Q H *et al.* Isolation and characterization of a Ds-tagged rice (*Oryza sativa* L.) GA-responsive dwarf mutant defective in an early step of the gibberellin biosynthesis pathway [J]. Plant Cell Reports, 2005, 23: 819-833.