

doi:10.7668/hbxb.2014.06.005

苹果 *MdCPS* 基因的克隆、定位及其在柱型/普通型间的表达差异分析

田义轲,白牡丹,王彩虹,刘云龙,陈宝印

(青岛农业大学 园艺学院,山东 青岛 266109)

摘要:为研究赤霉素合成途径关键酶基因,了解果树的矮化机理。以苹果品种富士当年生新梢的茎尖为试材,以苹果基因组数据库为依据,克隆了编码苹果 CPS 的基因 *MdCPS*(GenBank 登录号:KC433942.1)。该基因 gDNA 序列含有 15 个外显子和 14 个内含子,其编码序列(Coding sequence,CDS)长度为 2 400 bp,共编码 799 个氨基酸。在已发表的金冠苹果基因组中,与该基因相对应的转录本是 MDP0000147908,它的定位区间为 chr11:32433834 ~ 32439214。同源性分析表明,*MdCPS* 与其他植物的 CPS 间有较高的相似性(49% ~ 67%)。以杂交组合富士(普通型)×舞姿(柱型)的亲本品种及 F₁ 后代当年生新梢的茎尖组织为试材,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析表明,尽管该基因在柱型亲本中的表达水平显著低于普通型亲本,但在其后代的柱型与普通型群体间差异并不明显。同时,在柱型杂种及其普通型突变体间的分析结果也表明,*MdCPS* 的表达水平与柱型性状没有明显的相关性。可见,柱型苹果茎尖组织中活性赤霉素含量偏低受其合成早期步骤关键酶基因 *MdCPS* 的影响不大。

关键词:苹果;赤霉素;柯巴焦磷酸合酶基因(CPS);柱型性状

中图分类号:Q78;S661.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2014)06-0021-07

Cloning and Location of *MdCPS* and Analysis Its Expression Difference Between Columnar and Standard Tree Architecture in Apple

TIAN Yi-ke, BAI Mu-dan, WANG Cai-hong, LIU Yun-long, CHEN Bao-yin
(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Gibberellins are the most important phytohormones influencing the plant height of fruit trees. Researches of the genes encoding the critical enzymes in gibberellin biosynthesis are significant to understanding the mechanism of dwarf tree architectures. This study reported the isolation of the *MdCPS* (GenBank accession number: KC433942.1), encoding CPS in apple, from primary apical shoots of the variety Fuji based on the apple genome database. The gDNA sequence of *MdCPS* contained 15 exons and 14 introns, and the coding sequence(CDS) of it was 2 400 bp, which encoded a polypeptide of 799 amino acids. The transcript MDP0000147908 that spanned chromosome 11 from location 32433834 to 32439214 in the published Golden delicious apple genome corresponds to this gene. Homology analysis indicated that the deduced *MdCPS* shared a higher level of similarity(49% - 67%) with CPS protein from other plant species. Using the primary apical shoots of the parents and F₁ progenies of Fuji(standard) × Telamon(columnar) as plant materials, quantitative real-time PCR(qRT-PCR) analyses showed that even though the transcription level of this gene in the columnar parent was lower than that in the standard parent, there was no significant difference was observed between the two populations of columnar and standard progenies. At the same time, qRT-PCR analysis in the columnar hybrids and their correspondent standard mutants indicated that the expression level of *MdCPS* was not relevant to the columnar growth habit. These results suggested that the lower content of active gibberellins in columnar apple apical shoots was not distinctively influenced by *MdCPS* in the early stage of gibberellins synthesis.

Key words: Apple; Gibberellins; *Ent-copalyl diphosphate synthase*(CPS); Columnar trait

收稿日期:2014-07-05

基金项目:青岛市科技发展计划项目(11-2-4-5(4)-jch);山东省良种工程项目(2011-2014)

作者简介:田义轲(1967-),男,山东平度人,教授,博士,主要从事果树生物技术与育种研究。

通讯作者:王彩虹(1968-),女,陕西礼泉人,教授,博士,主要从事果树种质资源与遗传育种研究。

赤霉素 (Gibberellins) 是高等植物体内非常重要的一种植物激素, 调控着茎的伸长、花的分化、种子和果实的发育以及休眠等多个生理过程^[1-2]。高等植物中赤霉素生物合成途径已基本确定^[3-4]。其中, 柯巴焦磷酸合酶 (Ent-copalyl diphosphate synthase, CPS) 是赤霉素合成途径第一阶段所需要的第一个关键酶, 属于萜类合成酶 (Terpene synthases, TPS) 中的二萜合成酶, 它可以催化从牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (Geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP) 到柯巴焦磷酸 (Copalyl pyrophosphate, CPP) 的形成。

几乎所有赤霉素合成的关键酶基因已经从草本植物 (如拟南芥、水稻、豌豆、小麦等) 中得到克隆^[4-5]。然而, 在木本植物上的相关研究依然较少。众所周知, 苹果是落叶果树的重要树种, 在世界果树生产上占据十分重要的位置, 因此, 与其赤霉素相关的基础研究也具有非常重要的意义。目前, 已克隆了一些苹果赤霉素合成的关键酶基因, 如 *MdKO*、*MdKAO*、*MdGA20ox*、*MdGA3ox* 和 *MdGA2ox*^[6-9], 但处于赤霉素合成途径上游的第一个关键酶基因还未有报道。本研究欲以已测序的金冠苹果基因组为依据, 利用同源克隆的方法, 从苹果茎尖组织中分离鉴定编码 CPS 蛋白 (即 *MdCPS*) 的基因 *MdCPS*, 并分析其结构特征, 目的是为进一步了解该基因的功能提供依据。

柱型苹果的树形高度紧凑, 非常适合高密度栽植, 因而受到人们的广泛关注。已有研究表明, 柱型苹果茎尖组织中的活性赤霉素含量明显低于普通型苹果^[10], 但这种现象的产生是否与赤霉素合成途径上游关键酶基因 *MdCPS* 的调控相关, 目前还不清楚。本研究欲通过该基因在柱型/普通型苹果间的转录特征分析, 试对这一问题进行探讨。

1 材料和方法

1.1 植物材料

普通型苹果品种富士、柱型苹果品种舞姿以及从其 F_1 群体中随机抽取的柱型及普通型杂种 (各 3 株); 青岛农业大学果树育种课题组在源自相同亲本组合的柱型杂种后代中发现的 2 个普通型突变体。

5 月中旬, 从苹果快速生长的新梢上, 切去长度约为 0.5 cm 长的茎端组织, 快速投入液氮, 带回室内后置于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取与反转录 茎尖总 RNA 的提取用北京原平皓公司的 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒, 反转录应用 Fermentas 公司的 RevertAid

First-strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒, 具体步骤参考试剂盒说明书进行。

1.2.2 *MdCPS* 基因 cDNA 的克隆 从 NCBI 数据库中搜索来自其他植物 (包括葡萄、拟南芥、板栗、毛果杨、西红柿) 的 CPS 蛋白序列, 然后以其为种子序列在苹果数据库 Apple Gene Set (amino acid) (<http://genomics.research.iasma.it/blast/blast.html>) 中进行 Blast 搜索比对, 选择 E-value 为 0.0 的蛋白序列 (序列号: MDP0000147908), 对金冠苹果基因组 (<http://genomics.research.iasma.it/gb2/gbrowse/apple/>) 相应的转录本进行搜索, 并下载其 CDS 序列, 同时, 确定对应的基因在染色体上的定位区间。

根据下载的 CDS 序列信息设计 2 对 PCR 引物, 并由上海生工公司合成。引物序列分别为:

MdCPS-F1: 5'-ATGCAAGCAACTGCCACATA-3'

MdCPS-R1: 5'-GGCAAGTCCTTCGTGATGAT-3'

MdCPS-F2: 5'-CAGCCATGGCATTACAGACTA-3'

MdCPS-R2: 5'-TCAGAATACTCTCTCGAACA-3'

以富士苹果茎尖 RNA 的反转录产物为模板, 分别用以上 2 对引物进行套式 PCR 扩增, 将扩增片段进行测序、拼接, 以获取 *MdCPS* 基因的 cDNA 编码序列。

1.2.3 DNA 的提取与纯化 用 CTAB 法从苹果茎尖组织中提取基因组 DNA, 具体步骤参考田义轲等^[11]的方法。用紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 波长下的 OD 值, 检测 DNA 的质量并计算其浓度。

1.2.4 *MdCPS* 基因 gDNA 的克隆 以富士苹果基因组 DNA 为模板, 用以上 2 对引物进行套式 PCR 扩增, 将扩增片段的测序结果进行拼接, 以获取 *MdCPS* 基因的 gDNA 序列。

1.2.5 PCR 产物的克隆与测序 用试剂盒 Agrose Gel DNA Recovery Kit Ver. 2.0 (TaKaRa) 从 1.2% 的琼脂糖凝胶上回收 PCR 产物。将回收产物连接于 pMD[®] 18-T Simple Vector, 并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 蓝白斑筛选挑取阳性克隆, 菌液 PCR 鉴定后送上海生工公司测序。

1.2.6 生物信息学分析 利用 Spidey 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/>) 分析外显子和内含子; 用 DNAMAN 软件分析氨基酸基本成分; 运用 MEGA (Version 2.1) 软件构建氨基酸序列系统进化树。采用 Pfam 26.0 软件 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) 预测蛋白质的功能结构域; 用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 进行蛋白质信号肽序列分析; 用 PSORT Prediction (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 对蛋白质进行亚细胞定位预测; 用 TMHMM Server V. 2.0 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/>)

services/TMHMM/)进行跨膜结构域预测。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 分析 (qRT-PCR) 取 1.0 μg 总 RNA, 用 PrimeScript[®] RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 进行反转录。将反转录产物稀释 20 倍用于 qRT-PCR。

根据 1.2.2 中获得的 *MdCPS* 基因的 cDNA 编码序列设计 qRT-PCR 引物, 以苹果的 β -actin gene (GQ339778.1) 作为内参基因。引物序列见表 1。

qRT-PCR 在 LightCycler[®] 480 II (Roche) 实时荧光定量 PCR 分析系统中完成。在 20 μL 的反应体系中含有 1 \times LightCycler 480 Green I Master

(Roche)、1.0 μL 稀释的反转录产物、0.25 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物、2.0 mmol/L MgCl_2 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min, 然后按照 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s 的程序进行 30 个循环。熔解曲线分析程序: PCR 反应结束后, 将温度升至 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 然后降至 65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 再升至 97 $^{\circ}\text{C}$ 。从 65 ~ 97 $^{\circ}\text{C}$ 的升温过程中收集荧光 (每升高 0.2 $^{\circ}\text{C}$ 收集荧光 1 次)。最后一步将温度冷却至 40 $^{\circ}\text{C}$ 即可。每样品设 3 次重复。

用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法^[12] 计算目标基因的相对表达量。用 SAS 软件进行显著性分析。

表 1 用于 qRT-PCR 分析的目标基因以及内参基因的引物

Tab. 1 Primers used for qRT-PCR analysis of the target gene and the internal reference gene

基因 Gene	正向引物 (5' - 3') Forward primer sequence	反向引物 (5' - 3') Reverse primer sequence	产物大小/ Product size
<i>MdCPS</i>	AGAAAGGGCAGGGACTCATT	CAGAAGCCACTTTTCCCAAG	125
β -actin (GenBank Accession No. GQ339778.1)	CTGAACCCAAAGGCTAATCG	ACTGGCGTAGAGGGAAAGAA	108

2 结果与分析

2.1 *MdCPS* 基因 cDNA 序列

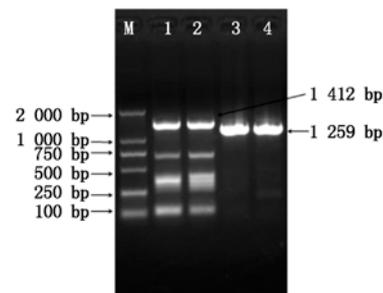
以富士苹果茎尖 RNA 的反转录产物为模板, 用 *MdCPS*-F1 和 *MdCPS*-R1、*MdCPS*-F2 和 *MdCPS*-R2 这 2 对引物分别扩增, 获取长度分别为 1 412, 1 259 bp 的 2 个片段 (图 1)。用 DNAMAN 软件对这 2 段序列的测序结果进行拼接, 获得 2 400 bp 的开放阅读框, 即 *MdCPS* 基因的编码序列。

2.2 *MdCPS* 基因的结构特征及染色体定位

对基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 产物经测序和拼接后, 获得 *MdCPS* 的全长 gDNA 序列, 为 5 393 bp。

利用 Spidey 程序对 cDNA 和 gDNA 的分析表

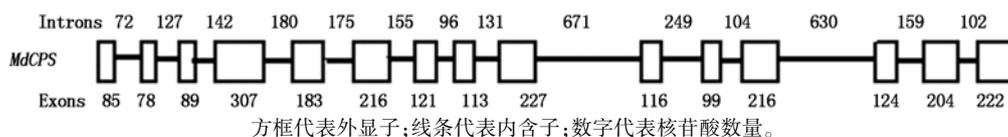
明, 该基因含有 15 个外显子和 14 个内含子 (图 2)。



M. DL2000 Marker; 1, 2. 引物对 *MdCPS*-F1 和 *MdCPS*-R1 的扩增结果; 3, 4. 引物对 *MdCPS*-F2 和 *MdCPS*-R2 的扩增结果。
M. DL2000 Marker; 1, 2. Amplification of primer pair *MdCPS*-F1/*MdCPS*-R1; 3, 4. Amplification of primer pair *MdCPS*-F2/*MdCPS*-R2.

图 1 *MdCPS* 基因 cDNA 序列扩增

Fig. 1 Amplification of the cDNA for gene *MdCPS*



方框代表外显子; 线条代表内含子; 数字代表核苷酸数量。

Boxes, lines and numbers represent exons, introns and nucleotide numbers, respectively.

图 2 *MdCPS* 基因的结构

Fig. 2 Gene structure of *MdCPS*

依据转录本 MDP0000147908 在染色体上的覆盖区间 (图 3), 可以确定 *MdCPS* 基因在苹果基因组

中的位置, 即 chr11:32433834 ~ 32439214。

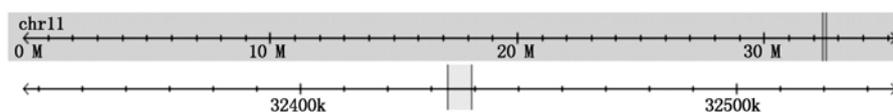


图 3 *MdCPS* 在苹果基因组中的定位区间

Fig. 3 The region of *MdCPS* located in the apple genome

2.3 *MdCPS* 的蛋白特征

用 Pfam 对 *MdCPS* 氨基酸序列进行在线分析, 表明它属于 TPS 蛋白家族, 且含有 Terpene synthase

和 Terpene synthase C 功能域 (图 4), 以上功能域含有萜类环化酶家族蛋白重要的功能位点, 说明 *MdCPS* 为萜类环化酶 (TPS) 蛋白家族中的 TPSc 亚家族。

用 PSORT Prediction 软件对 MdCPS 进行亚细胞定位预测,发现 MdCPS 定位于叶绿体上。用 SignalP 在线软件进行信号肽分析,结果表明 MdCPS 不含信号肽。利用 TMHMM 进行跨膜结构分析,发现氨基酸序列不存在跨膜区。综合预测结果说明, MdCPS 编码的蛋白质在细胞质中合成后,不进行跨膜转运,而是直接在细胞质基质中的特定部位行使催化功能。

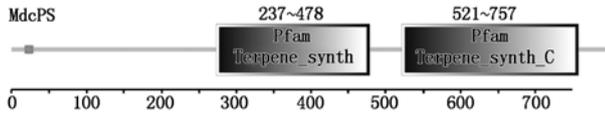


图 4 MdCPS 功能域的预测

Fig. 4 Prediction of the function domains for MdCPS

2.4 不同物种 CPS 的序列比对与进化分析

NCBI 上的 Blastp 比对分析表明,由 MdCPS 基因推导的氨基酸序列与板栗、毛果杨和葡萄等多种植物的 CPS 具有较高的相似性(为 49%~67%)。通过 DNAMAN 比对,结果发现不同植物 CPS 的 N 端序列相对保守,而 C 端序列的保守性较差,并含有一个 DxDD 基元(图 5),符合 TPS II 类蛋白的结构特征^[13]。二萜合成酶大多含有天冬氨酸富集基序(DDxxD 或 DxDD)^[14],这个基序被认为起到结合金属离子的作用^[15],它定位在活性位点的入口处,在引导金属底物(Mg²⁺、Mn²⁺等)催化时发挥重要的作用,如果基序发生突变则会导致酶催化活性的下降或产生特异的产物^[16]。

南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>MKALSLS..RPFCCSDATKLSRPPFFPP..FGSCSFVKVESIRSSRI..IKNAISKPPAQEYSDVLQS...GVFVIKMQQF.VED	76
苹果 <i>Malus domestica</i>MQATATYSLRPFCLIRPFLSLSLDRDLR...HSVWLFGANDRDRF...SKCSAVSKSRTQEVAVLQGN...GLFVIKWHET.VED	75
板栗 <i>Castanea mollissima</i>MSSQSNEFLPLSFTLPLSFLPLSLKVS.....WSFGVKDKRVNDFDLGCGNAISKPRTEQVINIFGN...GLSVVWHEI.VED	76
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>MASHFSTHCHLPSFSSSNHFFSSSSSLSLHFSKSSSLGAVLSEINDKQEIIRCRAISKPRTEQVSDIFGG...SLATLKEIENVED	84
大豆 <i>Glycine max</i>MASHFSTHCHLPSFSSSNHFFSSSSSLSLHFSKSSSLGAVLSEINDKQEIIRCRAISKPRTEQVSDIFGG...SLATLKEIENVED	89
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	MASATAAATLLGLCNTIRREVSFPNPGPSESTL...NSGIWSPGKSLHNNFRLRCSTVSPPIKELDEGSQN...GKFEVTKWQILEEG	85
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>MSISASFLRFS.LTAHYQPSPSSSPPFNQP....FKFLKSNREHVEFNRILQCHAVSRRTKDYKEVQSG...SLFVIKWDIDAEIV	78
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>MKTGTGVSIPATTFHHHSFLAATSHRCLP.....PSTTRSVLKNNNFCKAVSKSHTQEVSDILHK.NGGELINNDNDNVGD	75
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>MKTM.ISSPIPAHFPRFSPAAGSRRLSPFI.....LPSGSGVVLGSKTCKAVSKSFTQEVFVQK.NGLEFINNQNDVVED	76
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>MSLQYHVLNSIPSTFTLSSTKTTLSSSFLT.....TSGSPINVARCKSRSGSIHCSKLRTEQVINSQEVGHDLLEIHEWQQLCGE	80
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>MSSQSTILFRALSFKGLPSPSSSTPYKA...AGTGNWAKCKRAHFENLRRCQKALFKPCIQEVVDFVQS...GLFVIKWHET.VED	80
玉米 <i>Zea mays</i>MVLSSSCTTVFHLSLAVVQLGPGWS.....SRIKKKIDTVAVFAGRWRRRALARAQHTSESAAVAGKSSLTPIIRT	72
Consensus		

南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	IT/S.ETTAHVLSKETEERINRISMSLSSNDG...ISHSAYDTAWVALIPRVLDGKVI...FSSLEWVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	165
苹果 <i>Malus domestica</i>	P/EGDEAPADFGQINKIKQVETITSMVESMDGG...ITHSAYDTAWVALVEIVE.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	164
板栗 <i>Castanea mollissima</i>	IKTEENALKVSTFNNIKERNSIKMSLSDMG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	165
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	ITTEE...DAARVSVAKEIDEHVKTIKRAMLEMHEGG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	146
大豆 <i>Glycine max</i>	ITTEE...DAARVSVAKEIDEHVKTIKRAMLEMHEGG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	146
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	ITTEE...DAARVSVAKEIDEHVKTIKRAMLEMHEGG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	173
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	ITTEE...DAARVSVAKEIDEHVKTIKRAMLEMHEGG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	172
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	ITTEE...DAARVSVAKEIDEHVKTIKRAMLEMHEGG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	165
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	ITTEE...DAARVSVAKEIDEHVKTIKRAMLEMHEGG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	161
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	ITTEE...DAARVSVAKEIDEHVKTIKRAMLEMHEGG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	163
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	ITTEE...DAARVSVAKEIDEHVKTIKRAMLEMHEGG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	164
玉米 <i>Zea mays</i>	ITTEE...DAARVSVAKEIDEHVKTIKRAMLEMHEGG...SSSAYDTAWVALVEIEH.GSGLFCFSSSLQVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	167
Consensus	DAES.RRTRWPTDDDDAEPLVDEIRAMITSM...G...ISHSAYDTAWVALIPRVLDGKVI...FSSLEWVANNCLDGSWGDSEIFSAEDRI	160

南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	ISTIRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	254
苹果 <i>Malus domestica</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	253
板栗 <i>Castanea mollissima</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	255
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	235
大豆 <i>Glycine max</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	262
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	261
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	254
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	250
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	252
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	253
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	256
玉米 <i>Zea mays</i>	INTLRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	250
Consensus	ISTIRCVLANSKRLHFDKSEKGMVLEKNSIKRLEDNABEM...IGFEVA...FSLMEFARRINLQV...TDSFVLQENHNRSSIKLTRTRKEI	

南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	NHKVPTILLHSLEGMGMEGLDGMKLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	344
苹果 <i>Malus domestica</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	340
板栗 <i>Castanea mollissima</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	342
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	322
大豆 <i>Glycine max</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	349
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	348
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	341
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	337
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	339
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	340
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	343
玉米 <i>Zea mays</i>	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	337
Consensus	NHKVPTILLHSLEGMG...DDEWKRLLKLCQDGSFLSPSSTAFALMCTKDNOLNRYNKAHRRNGGVENVVFDLFEHFWVDRDLR	

南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	434
苹果 <i>Malus domestica</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	430
板栗 <i>Castanea mollissima</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	432
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	412
大豆 <i>Glycine max</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	439
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	438
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	431
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	427
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	429
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	430
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	433
玉米 <i>Zea mays</i>	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	427
Consensus	LGSRYFHFEEIVESVLYRRHWDGICWARNSEVHDDDTAMGFRLLRLGHEVSAQVFRNEFRDGGFVCIAGCSTAVIGMNLIRAS	

DXDD

南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	DQVMFPGKTEEDAKGESYKFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNN	524
苹果 <i>Malus domestica</i>	.QVMFPGTLLHEAKDSSYKFRERKQASNEIDLKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNN	519
板栗 <i>Castanea mollissima</i>	.QVLFPGKTEEDAKGESYKFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNN	521
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	.QVLFPGKTEEDAKGESYKFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNN	501
大豆 <i>Glycine max</i>	.QVMFPGKTEEDAKGESYKFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNN	528
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	.QVMFPGTEEDAKGESYKFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNN	527
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	.HVMFSGKTEEDAKHFTSNYRFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNS	520
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	.QVLFPGKTEEDAKGESYKFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNS	516
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	.QVLFPGKTEEDAKGESYKFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNS	518
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	.QVLFPGKTEEDAKGESYKFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNS	519
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	.QVLFPGTLLHEAKDSSYKFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNN	522
玉米 <i>Zea mays</i>	.QISEFGEDVYHRRGASVEYFRERKQAQEDLDKWIIRDLPGGVGYADVFYASLPFRLEFRYIQCYYGGRDWDWIGKTLYRMPVWNS	516
Consensus	e l f l k l d w i k l e l p w l p r e r y g g d w i g k t l y r m v n	

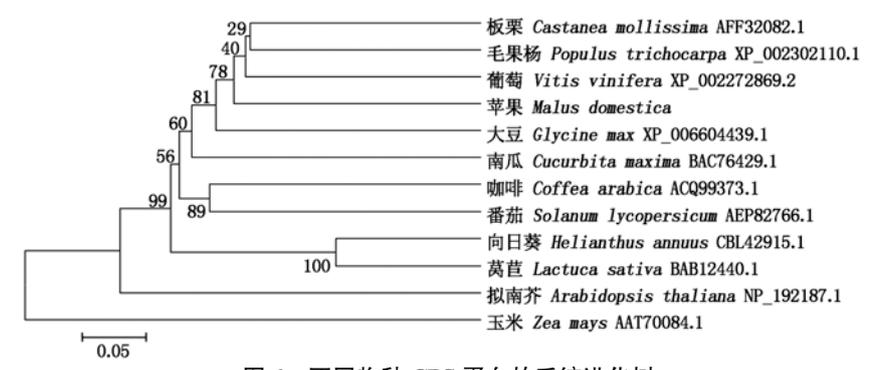
南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	610
苹果 <i>Malus domestica</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	605
板栗 <i>Castanea mollissima</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	605
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	590
大豆 <i>Glycine max</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	612
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	615
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	606
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	605
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	607
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	604
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	609
玉米 <i>Zea mays</i>	.TYELAKLDYNNCQAHLHEEDSICQVWSEKLENVGLS.IRSLDMAYFVAASSIPEPERANERLPAKTTIETIGSHREGT...SE	601
Consensus	y l d n c h e w w y g l y e r w l	

南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	QRRAFVQEQINFDAIDQ.AYDINAWRAGNVQKQK..GGQGVGILLRITLISLDLILVSGGFD...IHHHQVWERLFWKQDGD..	691
苹果 <i>Malus domestica</i>	.QRRAFVQEQINFDAIDQ.AYDINAWRAGNVQKQK..GGQGVGILLRITLISLDLILVSGGFD...IHHHQVWERLFWKQDGD..	671
板栗 <i>Castanea mollissima</i>	.MRRLDFQRERNH...TRDCTNRRGSNTNET...CGGIELTLLTILHCLSDAMVAHQD...ISHPHRQWERLFWKQDGD..	681
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	.QRRTFVHSESTGIS...INGRRSGTKTTR...KEIVKMLGLTNLQSLFGALEVHGRD...ISHSRHRHWRERLWLEEGV..	662
大豆 <i>Glycine max</i>	.MRDLFMKKSVCIN...RRDYSVMRNRNRNI...GHGLAEALVATIDQISDILVSGGHE...IGYHMRHRWERLWLEEGV..	688
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	.HIEAFLRDQRSS...NLDHTSGGRYG..PTQGLRVLTLINQLSLDAVLVHGRD...IHCYRHRHWRERLWLEEGV..	688
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	.AAAFVHCEAHYSS...TALNS...RYN..TEDRIVGVILGINHLSLALLTHGRD...IHHYRHRHWRERLWLEEGV..	675
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	.DRTAFVNEERNRS...FKQHFKN.E..PWYEMVALQKNIYELADALDMHQD...IHPCHHWRERLWLEEGV..	675
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	.HRRDFVVEERNISM...SIHHAKYGR..FWHGMLVALKGTIHEALDVLMTERRD...IHPCHHWRERLWLEEGV..	678
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	.SRRFSDQHEYIANARRSDHHFNDRNMRDLRPGSVQASRLAGVLIGTLNQMSEDFLMSFGRD...VNNLILVSGGDMRERLWLEEGV..	688
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	.QRRAFLLKGYSPGSD.YMKKINGRFVGFLLK..SGEELVGLLGLTNQLSLDVLVHGRD...IRHLRQHEWRERLWLEEGV..	690
玉米 <i>Zea mays</i>	.FRERLEHSCRFRS...EETDGSWFSNSSGSDAVVKAVLRRLTDSLAREAQPTFGRG.PEDIHKLRSWRERLWLEEGV..	682
Consensus	h w	

南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	...VHKEEAEVLVGTIILNSGCSTLEDLNS.FQYKLSYLTNKVGHGHPFKK..HRVINGGIYKRETKEN..MFP..	760
苹果 <i>Malus domestica</i>	...VHKEEAEVLVGTIILNSGCSTLEDLNS.FQYKLSYLTNKVGHGHPFKK..HRVINGGIYKRETKEN..MFP..	738
板栗 <i>Castanea mollissima</i>	...RQCGEAEVLVHILNLTAGLRFSEELMSH.FQYKPSDLINKIYCCYKSYK..RKVNVNKGYSNTISCSDN..ITP..	751
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	...RRRGEAEVLVQIHLTAGYKVESEELLVYRHPQEQLADLNRCYQLGHYK..NKVDNMGSTIITGSDRTITP..	735
大豆 <i>Glycine max</i>	...KCEGQAEVLAQIINLCGHWISEDQVDF.FQYKSLQLNLTINLQRHRCHQK..DKELESGNCGTVNNSM..ITQ..	757
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	...MGQEEAEVLVRTINLNCAGGYPSEELLSHPRVQQLMRLISRVEHQIRHFENK..KVGHGSDNNGSANAGGITSVS..	761
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	...EGEGEAEVLVIRTINLNCVHWISEEILLSPHYQKLEIITNRVSHRLYK..HNRKQVGMILTFS..	739
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	...VTG.EAEMVQNTIMNTAGRWVSKELLTH.FQYKRLSSINNMCLSKHKENR...ITCDNNGTIS...P..	738
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	...ATEGEAEVLVQTIINMTAGRWVSNELLEAH.FQYRLSSVINNICEHAY..HNRTC...MEVNSTIIS...T..	739
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	...EGE..GEMVWKMIILMNNDLN...FFTHHEVRLAEIINRICALPRQYLKAR...RNDEKEK...TIK..	746
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	...GYRGEAEVLVIRTINLNCAGRSISELLA.HFQYRLRSQNLNRCINDLGFLL..HKGH.NGTYNFENGSP...MSH..	758
玉米 <i>Zea mays</i>	CNGSSAVEQEGSRMVHDKQTCLLARMIEISAGRAAGEAASED..GDRRIQLGSGICDSRQKMLVSG...DPEKNEEMMSH...VDD..	763
Consensus	l	

南瓜 <i>Cucurbita maxima</i>	EIEEDWKRMQMVIQNSSDGNDIDSPIRNTFETVARSSYRPFYDFPMTINVEIAKVLFERV..	822
苹果 <i>Malus domestica</i>	EIEFEMQQLVQVQLQKFLDG.AIESSIKQTEFVAVRSYRSPCSDFGTINGELTKVLFERV..	799
板栗 <i>Castanea mollissima</i>	EIESDMQELVQVQLQKSSND..IDSDIRQTEFVAVRSYRSPYRDFHEITFNCSSTI...S..	807
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	QIESDMQELVQVQLQKTSQD..IDFKIKQTEFVAVRSYRSPYRDFGTINGELTKVLFERV..	795
大豆 <i>Glycine max</i>	EIEESKQELVQVQLVQKSPGT..IDFNKNTEFVAVRSYRSPYRDFGTSRTVNEIEAKVLFDKVV..	817
咖啡 <i>Coffea arabica</i>	SIEADMQELAKLVITSS.FS.DLDAVQKTEFVAVRSYRSPYRPHGNGPTVNEIEAKVLFERV..	821
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	EIEGDMQQLAEVLVSHSDAS.ELDANIKQTEFVAVRSYRSPYQDRTINVEIAKVLFERV..	800
向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	MIIESEMQLVRLVLRSDPDG..LDQDLRQTEFVAVRYSRPFYDFPMTINVEISKVLFIDV..	798
莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	SIEESKQELVQVQLVLSLDD..LDQDLRQTEFVAVRYSRPFYDFPMTINVEISKVLFETI..	799
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	MIIESEMGMVELAISESDTF...RDVSIETVAVRSYRPFYDFG.DHLQTEISKVLFQK..	802
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	RVEISDMQELTKIVLNYPDG..INFEIKTEEMVGRKSPYRPFYDFGPAIISVEIAKVLFERAA..	818
玉米 <i>Zea mays</i>	ELKLRIRRETVQVLLRLGEEK.TGSSSETQTEFVAVRSYRPFYDFPMTINVEIAKVLFERV..SAA..	826
Consensus	tf y y a h	

图5 不同物种 CPS 的氨基酸序列比对
 Fig.5 Multiple alignment of amino acid sequences of CPS from different plant species



运用 MEGA 软件分析不同植物 CPS 氨基酸序列的进化关系,结果表明,苹果与葡萄、板栗、毛果杨这些木本植物的进化距离较近(图 6)。

2.5 *MdCPS* 在柱型/普通型苹果茎组织中的转录差异分析

通过 qRT-PCR 对同一时期舞姿、富士及它们杂交 F_1 的茎尖组织中 *CPS* 基因的表达量进行了检测,结果表明:尽管柱型亲本舞姿中的表达量低于普通型亲本富士,而在 F_1 的柱型群体与普通型群体间,*CPS* 表达量上的差异并无明显的规律可循(图 7)。

另外,通过 qRT-PCR 也对同一时期亲本品种、柱型杂种及其突变体茎尖中的 *CPS* 基因的表达量进行了检测。结果表明:柱型杂种 Z95-121 中基因的表达量低于它的普通型突变体 P95-121,这与亲本间的表现一致;但柱型杂种 Z95-177 中的表达量却略高于其普通型突变体 P95-177(图 8)。

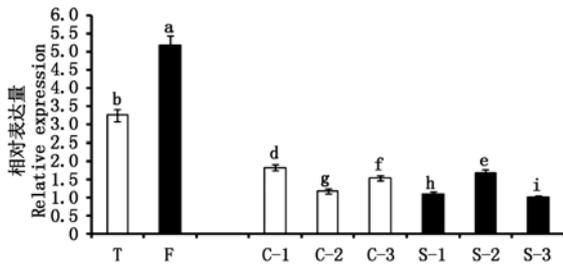


图 7 *MdCPS* 基因在亲本品种及其 F_1 后代群体上的转录水平分析

T. Columnar parent Telamon; F. Standard parent Fuji; C-1, C-2 and C-3. 3 different columnar hybrids, respectively; S-1, S-2 and S-3. 3 different standard hybrids, respectively. Different lower-case letters mean significant difference at $P \leq 0.05$. The same as Fig. 8.

图 7 *MdCPS* 基因在亲本品种及其 F_1 后代群体上的转录水平分析
Fig. 7 Analyses of *MdCPS* transcript levels in the parent cultivars and their F_1 progenies

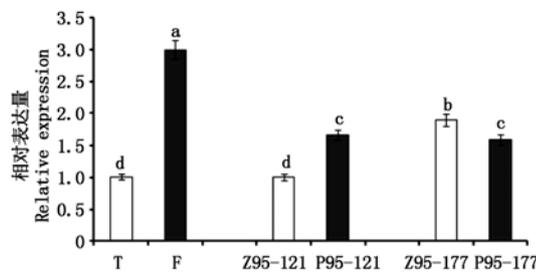


图 8 *MdCPS* 基因在亲本品种及其 F_1 后代野生型/突变型上的转录水平分析

Z95-121/P95-121, Z95-177/P95-177 分别代表 2 个不同的柱型杂种及其相应的普通型突变体。Z95-121/P95-121 and Z95-177/P95-177 represent the columnar wild type and the corresponding standard mutant of the two different hybrids, respectively.

图 8 *MdCPS* 基因在亲本品种及其 F_1 后代野生型/突变型上的转录水平分析
Fig. 8 Analyses of *MdCPS* transcript levels in parent cultivars and the F_1 progenies with the wild types and mutants

可见,在苹果柱型性状与 *MdCPS* 基因的转录水

平间无明显的相关性。

3 讨论

CPS 是影响高等植物赤霉素合成途径上游的第一个关键酶,其编码基因在拟南芥、水稻、番茄等草本植物上已相继得到克隆^[17-19],但在木本果树上的研究很少,苹果上至今未见报道。

以往,赤霉素合成关键酶基因大多是从相应的突变体上分离鉴定出来的。如拟南芥 *AtCPS* 基因的克隆就是通过赤霉素缺陷型矮化突变体 *gal* 的研究实现的^[17]。豌豆、水稻中贝壳杉烯氧化酶基因 (*KO*)也是分别依据其赤霉素缺陷型矮化突变体 *lh* 和 *d³⁵*而克隆的^[20]。然而,在果树上,相关突变体的获得十分困难,使得利用这一策略进行基因分离鉴定的可能性非常小。

近年来,随着基因组测序数据的剧增,在各种数据库中沉积了大量的序列信息,这给基因的克隆和功能分析带来了极大的方便。本研究中,我们以已发表的金冠苹果基因组^[21]为依据,从富士苹果茎尖组织中成功地克隆了赤霉素合成途径中的第一个关键酶基因 *MdCPS*,并揭示了其结构特征,同时也确定了其在苹果基因组中的位置。这一研究结果,对进一步深入了解其在高等植物上的进化特征以及功能特点具有重要意义。

20 世纪 50 年代的“绿色革命”中,水稻因赤霉素合成关键酶功能的缺陷产生半矮秆植株,提高了其抗倒伏能力且显著提高了产量,由此引发了人们对植株高度和赤霉素生物合成酶类的广泛关注。在植物上已有众多研究发现植株的高矮与赤霉素合成途径密切相关。苹果的柱型性状是一种矮生紧凑型性状。国内外均有研究发现,柱型苹果茎尖组织中的活性赤霉素含量偏低^[10,22],因此,该性状的形成极可能与赤霉素合成途径关键酶基因调控有关。目前,已研究表明,赤霉素合成中下游的关键酶基因除了 *MdKAO* 外,其转录水平均与柱型性状无明显的相关性^[6,8]。本研究中,我们证实了苹果的柱型性状与赤霉素合成途径上游关键酶基因 *MdCPS* 的转录水平相关性也不大。因此,综合已有的报道,可以推测,柱型苹果茎尖中赤霉素含量可能受中间步骤的关键酶基因 *MdKAO* 的调控影响最大。关于这一点,还需要有更多的研究数据去支持。

参考文献:

[1] Blazquez M A, Soowal L N, Lee I, et al. LEAFY expression and flower initiation in arabidopsis [J]. Develop-

- ment, 1997, 124(19): 3835 – 3844.
- [2] Carzoli F G, Michelotti V, Fambrini M A, *et al.* Molecular cloning and Organ-specific expression of two gibberellin 20-oxidase genes of *helianthus annuus* [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2009, 27(2): 144 – 152.
- [3] Hedden P, Phillips A L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5: 523 – 530.
- [4] Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59, 225 – 251.
- [5] Huang Y Y, Yang W L, Pei Z, *et al.* The genes for gibberellin biosynthesis in wheat [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2012, 12(1): 199 – 206.
- [6] Wang C H, Bai M D, Tian Y K, *et al.* Characterisation of two genes encoding cytochrome P450 mono-oxygenases involved in gibberellin biosynthesis in Apple (*malus × domestica* borkh.) [J]. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 2014, 89(3): 329 – 337.
- [7] Kusaba S, Honda C, Kano-Murakami Y. Isolation and expression analysis of gibberellin 20-oxidase homologous gene in apple [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52(355): 375 – 376.
- [8] Zhao H J, Dong J L, Wang T. Function and expression analysis of gibberellin oxidases in apple [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2010, 28(2): 231 – 238.
- [9] Bulley S M, Wilson F M, Hedden P, *et al.* Modification of gibberellin biosynthesis in the grafted apple scion allows control of tree height independent of the rootstock [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2005, 3: 215 – 223.
- [10] Looney N E, Lane W D. Spur-type growth mutants of McIntosh apple: A review of their genetics, physiology and field performance [J]. *Acta Horticulturae*, 1984, 164: 31 – 41.
- [11] 田义轲, 王彩虹, 张继澍, 等. 一个与苹果柱型基因 (*Co*) 连锁的 RAPD 标记 [J]. *西北植物学报*, 2003, 23(12): 2176 – 2179.
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods (San Diego, Calif.)*, 2001, 25(4): 402 – 408.
- [13] Chen F, Tholl D, Bohlmann J, *et al.* The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom [J]. *Plant Journal*, 2011, 66(1): 212 – 229.
- [14] Christianson D W. Structural biology and chemistry of the Terpenoid cyclases [J]. *Chem Rev*, 2006, 106: 3412 – 3442.
- [15] Sacchettini J C, Poulter C D. Biochemistry-creating isoprenoid diversity [J]. *Science*, 1997, 277(5333): 1788 – 1789.
- [16] 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]. *园艺学报*, 2011, 38(2): 379 – 388.
- [17] Sun T P, Kamiya Y. The arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase a of gibberellin biosynthesis [J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(10): 1509 – 1518.
- [18] Prisco S, Xu M M, Wilderman P R, *et al.* Rice contains two disparate *ent*-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(4): 4228 – 4236.
- [19] Falara V, Akhtar T A, Nguyen T T, *et al.* The tomato terpene synthase gene family [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157(2): 770 – 789.
- [20] Davidson S E, Reid J B, Helliwell C A. Cytochromes P450 in gibberellin biosynthesis [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2006, 5: 405 – 419.
- [21] Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, *et al.* The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.) [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(10): 833 – 839.
- [22] 王丽琴, 唐芳, 赵飞, 等. 苹果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.