

侯宇奇,李贞景,翟雨佳,等. 蓖麻 GA20-氧化酶基因表达分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):59-62.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.013

# 蓖麻 GA20-氧化酶基因表达分析

侯宇奇<sup>1,2</sup>, 李贞景<sup>1,2</sup>, 翟雨佳<sup>1</sup>, 谢彩梅<sup>1</sup>, 武淑芬<sup>1,2</sup>, 王昌禄<sup>1,2</sup>

(1. 天津科技大学新农村发展研究院,天津 300457;

2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院/食品营养与安全教育部重点实验室,天津 300457)

**摘要:**为研究 GA20 氧化酶基因在蓖麻中的表达情况,以具有典型代表的 4 种高秆和 4 种矮秆蓖麻品种为材料,采用实时定量 PCR 和荧光定量 PCR 技术,对 GA20 氧化酶基因在蓖麻的不同器官及器官发育的不同阶段的表达特异性进行分析。结果表明,蓖麻的矮化不是由 GA20 氧化酶基因的突变所引起;GA20 氧化酶基因在种子和嫩叶中的表达量最高,在成熟叶中可大量表达,在茎中可微量表达,在根中可痕量进行表达;同一生长时期,高秆品种的 GA20 氧化酶基因表达量明显高于矮秆品种,不同生长时期高秆品种 GA20 氧化酶基因的表达量呈现由高到低再升高的变化趋势,而矮秆蓖麻 GA20 氧化酶基因的表达量始终处于相对较低水平。该研究结果为进一步阐明蓖麻 GA20 氧化酶基因的功能特征及揭示其参与调控植物生长的分子机制提供了参考。

**关键词:**GA20 氧化酶;RT-PCR;荧光定量 PCR;表达量

**中图分类号:**S565.601 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)10-0059-04

蓖麻(*Ricinus communis* L.)是一种经济潜力十分巨大的工业油料作物,是世界十大油料作物之一,具有极高的应用价值和巨大的经济前景<sup>[1]</sup>。以蓖麻籽为原料生产的蓖麻油具有性能稳定、不易变性等特点,在极端温度环境下仍能保持原

有的燃烧特性。此外,蓖麻油是目前羟基脂肪酸的唯一来源<sup>[2]</sup>,以蓖麻油为基础原料的深加工产品多达 3 000 多种,广泛用于航空、纺织、环保、医药等领域<sup>[3]</sup>。然而,我国主推种植的蓖麻品种绝大多数属高秆品种,因植株高大,单位面积单株数过少且抗倒伏性较差,使我国蓖麻种植面临的机械化收割困难和种植效益低下等问题日益突出,影响了农民种植蓖麻的积极性,使我国蓖麻原料的供应不足,成为严重制约我国蓖麻产业健康发展的瓶颈<sup>[4]</sup>。

实践证明,矮化育种是解决蓖麻种植业发展瓶颈的有效途径之一。通过植株适当矮化,改善株型,增大群体结构,能够提高植物光合效率等能力<sup>[5]</sup>。赤霉素(gibberellins,简称 GAs)是一类普遍存在于高等植物体内的类四环二萜羧酸,在

收稿日期:2017-10-28

基金项目:天津科技大学新农村发展研究院项目(编号:xnc201505);

天津市引智项目(编号:Y2012063)。

作者简介:侯宇奇(1993—),男,天津人,硕士研究生,研究方向为转基因蓖麻的培育及蛋白分析研究。E-mail:monkeygaara@163.com。

通信作者:王昌禄,教授,主要从事生物技术研究。Tel:(022)60601154;E-mail:clw123@tust.edu.cn。

[11] Hebert P N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Royal Soc London B; Biol Sci, 2003, 270(1512):313-321.

[12] 杜启艳,常重杰. DNA 条形码在鉴定物种中的应用[J]. 生物学教学,2010,35(12):60-61.

[13] 单云晶,鲁翠云,李超,等. 基于线粒体 COI 基因序列的 5 种鲤养殖品种遗传多样性研究[J]. 中国水产科学,2013,20(5):931-938.

[14] 曹艳,章群,宫亚运,等. 基于线粒体 COI 序列的中国沿海蓝点马鲛遗传多样性[J]. 海洋渔业,2015,37(6):485-493.

[15] 李海. 基于线粒体 COI 基因序列的雀科鸟类分子系统发育[D]. 西安:陕西师范大学,2008.

[16] 郑兰平,陈小勇,杨君兴. 澜沧江中下游鱼类现状及保护[J]. 动物学研究,2013,34(6):680-686.

[17] Du M, Niu B Z, Jia M Y, et al. The complete mitochondrial genome of the bagarius yarrelli from honghe river[J]. Earth and Environmental Science, 2016, 41:12-31.

[18] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics (Oxford, England),

2009, 25(11):1451-1452.

[19] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24:1596-1599.

[20] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980(16):111-120.

[21] Fedorov A, Saxonov S, Gilbert W. Regularities of context-dependent codon bias in eukaryotic genes[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(5):1192-1197.

[22] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. Nature, 2002, 418(6897):479.

[23] 彭居刚,王绪楨,何舜平. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. 水生生物学报,2008,32(6):916-919.

[24] 黄原. 分子系统学——原理、方法和应用[M]. 北京:中国农业出版社,1998:70-76.

[25] 董新培,武小斌,万海付,等. 河北 3 个日本沼虾野生群体线粒体 DNA D-Loop 基因序列变异及种群遗传结构分析[J]. 水产学报,2017,41(2):182-188.

促进植物生长发育过程中起重要作用<sup>[6]</sup>。GA20 氧化酶是赤霉素生物合成中最重要的限速酶之一<sup>[7]</sup>,其在植物徒长型和矮化型突变体内的表达量存在很大的差异。因此,GA20 氧化酶家族基因常被用于植物矮化基因工程育种和降低植物内源 GAs 水平的生理效应研究中<sup>[8]</sup>。

国外水稻 GA20 氧化酶基因研究表明,正义转化表现出植株增高,反义转化表达植株明显“矮化”<sup>[9-12]</sup>。国内也有报道指出,GA20 氧化酶功能缺失的突变体具半矮生的表型,而过量表达 GA20 氧化酶能导致赤霉素的过量合成和明显加快植株生长。通过 RNAi 抑制水稻中 OsGA20 氧化酶基因表达,能导致水稻内源 GA1 含量减少并使植株矮化<sup>[13]</sup>。上述赤霉素及 GA20 氧化酶的研究,为矮化型转基因蓖麻植株的培育奠定了基础,但针对蓖麻种的 GA-20 氧化酶基因的研究还处于初级阶段,相关报道较少。

本研究以蓖麻为材料,采用实时定量 PCR 和荧光定量 PCR 技术对 GA20 氧化酶基因在不同高矮蓖麻植株中的不同器官及器官发育不同阶段的表达特异性进行了初步研究,为最终利用转基因技术实现蓖麻矮化育种提供参考。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

试验于 2014 年 3 月至 2015 年 11 月在天津科技大学食品工程与生物技术学院进行。选取 8 个蓖麻品种,其中高秆品种 4 个:淄蓖麻 5 号(市场购买)、蓖绿 2 号(南开大学蓖麻工程研究中心惠赠)、CSR24.181(购于通辽市农业科学研究院)、浙蓖 17 号(浙江省农业科学院惠赠);矮秆品种 4 个:中北 4 号、中北 5 号(购于山西经作蓖麻科技有限公司)、天蓖 26 号、浙蓖 36 号(浙江省农业科学院惠赠)。

试验用大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  菌株,购自 Takara (宝生物工程大连有限公司);根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 菌株,由中国农业科学院油料作物研究所惠赠;克隆载体 (pUC-T Vector) 购自康维世纪生物科技有限公司;Plant RNA Kit 试剂盒购自 OMEGA 公司;pBI-121 双元表达载体、pHANNIBAL 载体由笔者所在实验室保存。

### 1.2 试验方法

1.2.1 GA20 氧化酶基因组织特异性表达分析 提取淄蓖麻 5 号蓖麻品种的种子、根、茎、嫩叶、成熟叶等器官的总 RNA,反转录合成 cDNA,以各器官的 cDNA 为模板,以蓖麻 *Actin* 基因作为内参基因,以表 1 中的引物进行半定量 RT-PCR 分析。构建反应体系,扩增程序为 95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,55~60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 60 s,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,分析 GA20 氧化酶基因在不同器官表达模式。

表 1 半定量 RT-PCR 引物

引物名称	引物序列	产物大小 (bp)
GA20-ox	F:5'-GTCCATCGTCAGTCCATCA-3'	570
	R:5'-AAGACTGCTCATAGCCTCGC-3'	
Actin	F:5'-TGATGATGCTCCACGGCAG-3'	486
	R:5'-AGATCACGTCAGCAAGGTC-3'	

1.2.2 不同品种蓖麻 GA20 氧化酶基因编码区比较 提取 4 个典型蓖麻矮秆品种中北 4 号、中北 5 号、天蓖 26 号、浙蓖 36 号,以及 4 个典型蓖麻高秆品种蓖绿 2 号、淄蓖麻 5 号、CSR24.181、浙蓖 17 号叶片的总 RNA,反转录合成 cDNA。根据目的基因设计特异性引物 (F:5'-ATGGCAATAGAGTGCATCAA-3'和 R:5'-CTACTTCTCTGTGAACCC-3')。分别以 8 个不同品种的 cDNA 为模板,对其 GA20 氧化酶基因的编码区进行 PCR 扩增,反应体系及扩增程序同“1.2.1”节,PCR 扩增产物经 1% 凝胶琼脂糖电泳检测分析。对 8 个品种扩增得到的 PCR 产物进行纯化回收,将回收的 PCR 产物送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序,测序结果使用 DNAMAN 软件进行比对分析。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR) 对 8 个蓖麻品种进行播种,以第 30 天、第 60 天、第 75 天、第 90 天及第 105 天 5 个生长时期的新生幼嫩叶片的 cDNA 为模板,以“中北 4 号”在第 30 天的嫩叶 cDNA 为对照,以蓖麻 *Actin* 为内参基因,对 8 个蓖麻品种在不同时期的 GA20 氧化酶基因进行相对定量分析。

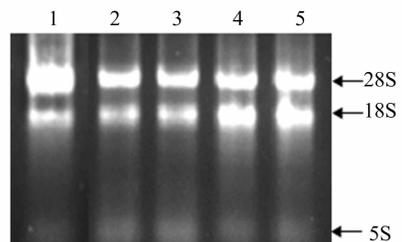
以蓖麻 GA20 氧化酶基因的 mRNA 序列 (XM\_002510827.1) 为模板,依据荧光定量引物的设计原则,通过 NCBI 的 Primer-BLAST 设计 1 对最优的特异性引物 GA20-ox B (F:5'-TACTGCGAGGCTATGAGCAC-3'和 R:5'-GGATCGCAATGAGGTCCAGT-3'),以蓖麻 *Actin* 基因为内参基因,设计内参基因引物 *Actin* B (F:5'-CGAGCAAGAACTTGAGACTGC-3'和 R:5'-CTCGTGGATTCTCCTGCAGCTT-3')。使用 TAKARA 公司的 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 进行实时荧光定量 PCR 试验。

依据试剂盒说明,构建 RT-qPCR 反应体系,扩增程序为 95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 60 s,72  $^{\circ}$ C 60 s,45 个循环;95  $^{\circ}$ C 30 s,55  $^{\circ}$ C 60 s,95  $^{\circ}$ C 30 s。每个反应 3 个平行,重复 1 次。反应完成后,记录试验数据,通过 MxPro 软件,采用相对定量分析方法中的  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法,对 GA20 氧化酶基因的表达量进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 GA20 氧化酶基因组织特异性表达分析

分别提取淄蓖麻 5 号蓖麻的种子、根、茎、嫩叶、成熟叶等不同器官的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳,其结果如图 1 所示。从图 1 中可以看出,蓖麻不同器官总 RNA 提取 28S、18S 条带较完整,经酶标仪检测其  $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$  值均在 1.8~2.0 之间,质量符合下一步试验要求。



1—种子;2—根;3—茎;4—嫩叶;5—成熟叶。图 2 同  
图 1 蓖麻不同器官总 RNA 电泳

将从不同器官提取的总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 作为模板,进行实时定量 PCR 分析,结果如图 2 所示。

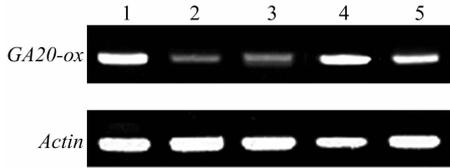


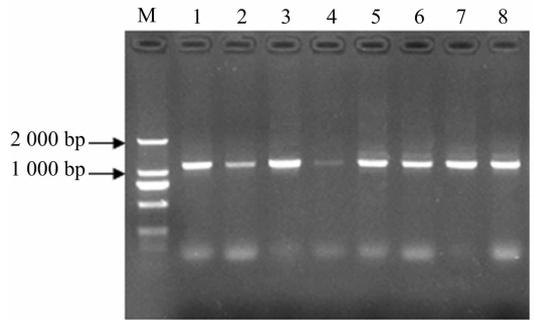
图2 GA20 氧化酶基因在不同器官中的表达

从图 2 中可以看出,在蓖麻的种子、根、茎、嫩叶、成熟叶中 GA20 氧化酶基因都有表达,但表达水平存在明显差异。GA20 氧化酶基因在种子和嫩叶中表达量最高,其次是在成熟叶中可进行大量表达,在茎中可微量表达,在根中有痕量表达。表明 GA20 氧化酶基因在蓖麻不同器官中具有不同的表达模式。

### 2.2 不同品种蓖麻的 GA20 氧化酶基因编码区比较

分别以 8 个高矮蓖麻品种的 cDNA 为模板,对蓖麻 GA20 氧化酶基因的编码区进行 PCR 扩增,用 1% 凝胶电泳进行检测,结果如图 3 所示。

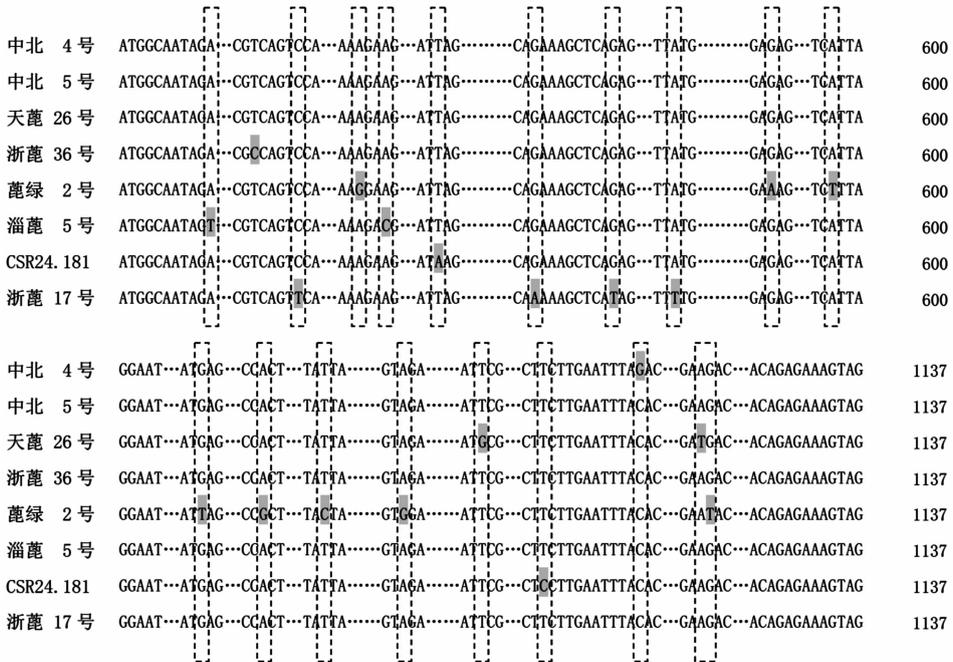
从图 3 可以看出,8 个品种的 GA20 氧化酶基因扩增效果良好,切胶回收目标条带,可直接进行测序,得到的序列片段长度均为 1 137 bp。



M—DL2000 DNA Marker; 1—中北 5 号; 2—天萼 26 号; 3—浙蓖 36 号; 4—中北 4 号; 5—蓖绿 2 号; 6—淄蓖麻 5 号; 7—CSR24.181; 8—浙蓖 17 号

图3 GA20 氧化酶基因在 8 个不同蓖麻品种 PCR 扩增结果

将 8 个蓖麻品种的 *RcGA20* 氧化酶基因进行序列比对,其结果如图 4 所示。从图 4 可以看出,8 个高矮不同蓖麻品种的 *RcGA20* 氧化酶基因核苷酸序列中存在少数碱基差异,但所对应氨基酸序列并不存在差异,由此说明,试验使用的中北 4 号、中北 5 号、天萼 26 号、浙蓖 36 号这 4 种典型矮秆蓖麻品种在生长中表现出的矮化现象,不是由于 *RcGA20* 氧化酶基因突变所引起的。



黑色虚线框内为单碱基差异位点(SNP); 灰色阴影区为突变碱基; ... 表示省略完全重合的碱基序列

图4 8 个不同蓖麻品种 *RcGA20-ox* 基因核苷酸序列比对

### 2.3 GA20 氧化酶基因的实时荧光定量表达分析

选取的 5 个生长时期的扩增曲线均达到平台期,且扩增效果良好;熔解曲线显示,各扩增条带均只有 1 个尖锐的峰,没有杂峰出现,说明扩增产物稳定准确,扩增产物单一,没有非特异性扩增,各生长时期的电泳结果良好,得到清晰单一的条带,同样也验证了无非特异性扩增,荧光定量 PCR 结果可信。从各个时期的电泳图还可以看出,8 个不同品种在同一个时期的 PCR 产物电泳条带亮度不一,表明 GA20 氧化酶基因的表达均存在差别。

采用相对定量分析方法对 8 个蓖麻品种在不同时期 GA20 氧化酶基因相对表达分析汇总如图 5 所示。在蓖麻播种后的第 30 天、第 60 天、第 75 天、第 90 天及第 105 天 5 个时期,4 个高秆蓖麻品种的 GA20 氧化酶基因表达量明显高于 4 个矮秆蓖麻品种的基因表达量,且与植株高矮表现一致。播种后第 30 天(生长初期)与播种后第 90 天(生长旺盛期),高秆蓖麻与矮秆蓖麻品种之间 GA20 氧化酶基因表达量变化的差异更为明显。在这 5 个生长时期中,高秆蓖麻品种 GA20 氧化酶基因的表达量是由高到低再升高的变化趋势,而矮秆蓖麻品种

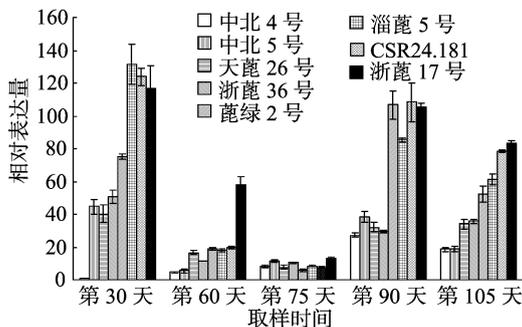


图5 8个蓖麻品种在不同时期 RcGA20 氧化酶基因相对表达分析

GA20 氧化酶基因的表达式都始终处于相对较低的水平。

### 3 讨论与结论

近年来,随着基因工程技术的不断发展,已经有 20 ~ 30 种高等植物的 GA20 氧化酶基因被克隆分离鉴定出来,有的已被转化到其他植物体内,相关结果已经对其生物功能及作用机制进行了深入研究和分析<sup>[14-15]</sup>。

Kang 等从正在发育的西瓜种子中克隆得到了 GA20 氧化酶基因,进一步研究发现,GA20 氧化酶基因在西瓜胚株中强烈表达,但在成熟种子中却几乎检测不到 GA20 氧化酶基因的表达<sup>[16]</sup>。Vidal 等从柑橘中克隆得到 GA20 氧化酶基因,在顶端和叶片中强烈表达,但在节间、节点和根部只是微量表达<sup>[17]</sup>。由此可以看出,GA20 氧化酶基因在植物体内表达分布上存在着较大差异。

本研究中,在蓖麻的种子、根、茎、嫩叶、成熟叶中 GA20 氧化酶基因都有表达,但表达水平存在明显差异。GA20 氧化酶基因在种子和嫩叶中表达量最高,其次是在成熟叶中大量表达,在茎中微量表达,在根中痕量表达。表明 GA20 氧化酶基因在蓖麻不同器官中具有不同的表达模式。

Eriksson 等将克隆得到的拟南芥 GA20 氧化酶基因转入杂交杨中使其超量表达,结果显示,转基因植株体内赤霉素含量增多,叶片变大,树体的主干和直径变长<sup>[18]</sup>。Dayan 等将拟南芥 GA20 氧化酶基因转化烟草使其过表达,发现转基因烟草在早期营养生长期,茎的高度有很明显提高,并且纤维产量也有很大程度增多<sup>[19]</sup>。

本研究对 8 个不同高矮蓖麻品种的 GA20 氧化酶基因的编码区进行比对分析,证明选取的 4 种典型矮秆蓖麻品种的矮化不是由于 GA20 氧化酶基因突变所引起的,采用荧光定量 PCR 对 8 个不同高矮品种的不同生长时期 GA20 氧化酶基因的相对表达量分析表明,高秆蓖麻品种的 GA20 氧化酶基因表达量明显高于矮秆蓖麻品种的基因表达量,且与植株高矮表现一致。在这 5 个生长时期,高秆蓖麻品种 GA20 氧化酶基因的表达量是由高到低再升高的变化趋势,而矮秆蓖麻品种 GA20 氧化酶基因的表达量都始终处于相对较低的水平。

本研究结果表明,蓖麻的 GA20 氧化酶基因与其他大多数植物的 GA20 氧化酶基因功能相似,在赤霉素合成过程中可以催化形成具有生物活性的 GAs。这也说明,蓖麻 GA20 氧化酶基因的表达差异会影响赤霉素的合成,是影响植株表现高矮的重要原因之一。该结果为进一步明确 GA20 氧化酶基因的功能特征及揭示其参与调控植物生长的分子机制奠定

了基础,为利用转基因技术进行矮化蓖麻育种提供了参考。

### 参考文献:

- [1] 包红霞,张春华,李金琴,等. 国外蓖麻研究及产销概况[J]. 内蒙古农业科技,2003(4):6-8.
- [2] 郑鹭,祁建民,陈绍军,等. 蓖麻遗传育种进展及其在生物能源与医药综合利用潜势[J]. 中国农学通报,2006(9):109-113.
- [3] 贾媚霞. 种植密度对矮化蓖麻品种产量及其群体光合性能影响的研究[D]. 通辽:内蒙古民族大学,2008.
- [4] 吕相义,李军,毕万新. 国内外蓖麻生产的现状,问题及对策[J]. 中国农技推广,2003(6):22-23.
- [5] 陈永胜,李国瑞,黄凤兰,等. cDNA-AFLP 技术分析蓖麻矮秆茎秆差异表达基因[J]. 华北农学报,2013,28(6):126-129.
- [6] 李保珠,赵翔,安国勇. 赤霉素的研究进展[J]. 中国农学通报,2011,27(1):1-5.
- [7] 王凌飞. 蓖麻油深加工及其应用[J]. 西部粮油科技,2002,27(5):25-26.
- [8] 肖政,李纪元,范正琪,等. 荔枝连蕊茶 GA20ox1 基因的克隆及表达分析[J]. 林业科学研究,2016(1):41-47.
- [9] Qiao F, Chen Z F, Chen Z. Alteration of rice growth and development via antisense expression of *OsGA20ox2* gene[J]. African Journal of Biotechnology, 2013, 12(25):3898-3904.
- [10] Wang J, Zhao K J, Qiao F, et al. Genetic effects of different RNA interference fragments from *OsGA20ox2* on plant height and other agronomic traits in rice[J]. Acta Agronomica Sinica, 2012, 38(4):632-638.
- [11] Qiao F, Yang Q, Wang C L, et al. Modification of plant height via RNAi suppression of *OsGA20ox2* gene in rice[J]. Euphytica, 2007, 158(1/2):35-45.
- [12] 严远鑫,安成才,栗力,等. 水稻赤霉素 20-氧化酶基因(*rga5*)的正、反义转化对水稻生物学性状的影响[J]. 科学通报,2003,48(4):358-363.
- [13] 代小梅. GA20 氧化酶基因研究进展[C]//全国植物分子育种研讨会摘要集. 北京:科技部 863 计划现代农业技术领域办公室,2009:34.
- [14] 鲍晓兰,杨凯,冯永庆,等. 板栗 GA20-氧化酶基因的克隆及序列分析[J]. 北京农学院学报,2009,24(2):5-8.
- [15] 肖景华. 番茄 GA20-氧化酶和 GA2-氧化酶基因的克隆与功能分析[D]. 武汉:华中农业大学,2006.
- [16] Kang H G, Jun S H, Kim J, et al. Cloning and molecular analyses of a gibberellin 20-oxidase gene expressed specifically in developing seeds of watermelon[J]. Plant Physiology, 1999, 121(2):373-382.
- [17] Vidal A M, Ben-Cheikh W, Talon M, et al. Regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression and gibberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid[J]. Planta, 2003, 217(3):442-448.
- [18] Eriksson M E, Israelsson M, Olsson O, et al. Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(7):784-788.
- [19] Dayan J, Schwarzkopf M, Avni A, et al. Enhancing plant growth and fiber production by silencing GA 2-oxidase[J]. Plant Biotechnology Journal, 2010, 8(4):425-435.