

苹果砧木 SH40 *MdNCED1* 基因克隆与表达分析

姜志昂, 孙建设, 彭建营, 邵建柱

(河北农业大学园艺学院, 保定 071000)

摘要: 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶基因是脱落酸合成途径的关键基因。本试验通过 RT-PCR 结合 RACE 技术从苹果 SH40 (*Malus domestica* × *Malus Honanensis*) 茎尖组织中克隆了 1 条 *NCED* 基因, 命名为 *MdNCED1* (GenBank 登录号为 KC816734)。该 cDNA 序列全长 2179 bp, 包含 1 个编码 606 个氨基酸的开放阅读框。氨基酸同源性分析表明, *MdNCED1* 与已报道的其他植物物种的氨基酸序列具有 63.7% ~ 93.0% 的相似性。构建 *MdNCED1* 基因的原核表达载体 pDEST15-*MdNCED1*, 转入大肠杆菌 (DE3), 用 IPTG 诱导。SDS-PAGE 分析表明, *MdNCED1* 基因在大肠杆菌中被诱导表达的蛋白质分子量与预期结果一致。荧光定量结果表明, *MdNCED1* 基因在 SH28、M26、SH40 及其嫁接品种嘎啦的表达趋势均呈先上升后下降的趋势, 同时与其矮生程度呈正相关。

关键词: 苹果砧木; *MdNCED1*; 克隆; 表达; 原核表达

Isolation and Expression of *MdNCED1* Gene from Apple Rootstock SH40

JIANG Zhi-ang, SUN Jian-she, PENG Jian-ying, SHAO Jian-zhu

(College of Horticulture Agricultural University of Hebei, Baoding 071000)

Abstract: 9-cis-epoxycarotenoid (*NCED*) gene is a critical gene in the pathway of abscisic acid biosynthesis. In this research, *NCED* gene in apple, designated as *MdNCED1* (GenBank accession number: KC816734), was isolated from the apical tissue of apple rootstock SH40 (*M. domestica* × *M. Honanensis*) by RT-PCR and RACE technology. The full-length cDNA was 2179 bp, containing a complete open reading frame that encodes 606 amino acids. Amino acid sequence analysis revealed that the sequence had 63.7% -93.0% similarity with those of other reported plants. Construction of *MdNCED1* gene prokaryotic expression vector pDEST15-*MdNCED1*, the recombinated plasmid was transformed in to *E. coli*. (DE3) and induced by IPTG. The result of SDS-PAGE demonstrated that the size of expected protein in the prokaryotic expression system. Fluorescent quantitative PCR analysis showed that the trend of expression of SH28, M26, SH40, and the grafted varieties Gala were increased and then decreased. The expression of this gene was positively associated to the dwarfing degree.

Key words: apple rootstocks; *MdNCED1*; cloning; expression; prokaryotic expression

矮化密植栽培因产量高、早果早产、低耗高效以及方便生产管理, 已成为现代苹果生产的发展趋势。矮化砧木的选育和利用, 是实现矮化密植栽培的重要途径。对果树机理进行深入研究, 有助于推动苹果矮化栽培的进一步发展。

脱落酸 (ABA, abscisic acid) 是一种非常重要的天然植物生长激素, 是最早得到确认的五大类植物激素之一。脱落酸参与了许多植物生长和发育过程, 如种子萌发、幼苗生长、叶片气孔开闭和果实成熟等。其中脱落酸作为生长抑制剂, 是历来果树矮

收稿日期: 2013-04-26 修回日期: 2013-06-24 网络出版日期: 2013-12-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131219.1114.008.html>

基金项目: 国家现代苹果产业技术体系 (CARS-28)

第一作者研究方向为果树结实生理与分子生物学。E-mail: jiangzhiang2007@163.com

通信作者: 孙建设, 研究方向为苹果砧木评价与利用。E-mail: jiansheapple@163.com

彭建营, 研究方向为果树分子生物学。E-mail: pjy@hebau.edu.cn

化机理研究的热点问题。邵开基等^[1]研究发现 ABA 含量与树体矮化呈显著负相关, 树体愈矮化, 叶片 ABA 含量越高。牛自勉等^[2]通过对 M 系、S 系和 SH 系苹果砧木的相关分析也表明叶片 ABA 含量水平与树体高度、树干周长及新梢长度均呈显著负相关。赵大中等^[3]对柑橘的研究也证明, 随着株高的增加, ABA 水平下降。张志华等^[4]在试验中发现, 核桃实生苗的 ABA 含量与树体生长势呈显著负相关。曹敏格等^[5]研究表明苹果砧木叶片的 ABA 含量可以有效地反映砧木的生长势强弱, 可用于苹果砧木的矮化预选。

矮化密植栽培是目前研究的关注点, 但在苹果砧木选育过程中存在砧木嫁接品种后, 矮化类型与砧木本身生长势并不一致, 即矮生砧木并不一定在嫁接品种后导致其矮化。因此观察砧木的矮化效果需要树体生长到一定年份才能得到初步结论, 并且在传统的研究方法中要定期测量新梢的生长量, 测定内源激素含量等, 这一矛盾也导致目前育种工作的繁琐。并且果树矮生机理研究主要集中在生理方面, 以分子生物学为手段的研究基础较为薄弱。生化与遗传研究已经证明, 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶 (NCED) 是高等植物 ABA 生物合成途径的关键酶^[6]。研究同时表明, 在植物体中 NCED 以基因家族的形式存在, 并且其表达量的变化与 ABA 含量的变化有直接关系^[7-9]。编码 NCED 的基因首先在玉米中通过 *viviparous4* (*vpl4*) 突变体得到验证^[10]。在番茄的一个 ABA 缺乏的突变体 *notabilis* 中分离到了与 *vpl4* 相关的基因 *LeNCED*^[11]。目前许多植物 NCED 基因已经克隆和鉴定, 包括豌豆 (*Phaseolus vulgaris*)^[12]、豇豆 (*Vigna unguiculata*)^[13]、鳄梨 (*Persea americana*)^[14]、柑橘 (*Citrus sinensis*)^[15]、柿子 (*Diospyros kaki*)^[16]、牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.)^[17] 和枸杞 (*Lycium barbarum*)^[18] 等。

本研究以苹果砧木为试材, 克隆 NCED 基因以及研究该基因在苹果砧木及其嫁接品种生长发育期的表达情况, 不仅是为研究苹果矮生机理及为砧木初选提供一个快速的分子检测方法, 也是为以后利用基因调控技术改良树型与抗性提供分子依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

基因克隆试验以 2 年生苹果矮生砧木 SH40 (*Malus domestica* × *M. Honanensis*) 茎尖为试验材料; 荧光定量试验材料为 2 年生苹果矮生砧木 SH40、

SH28 (*M. domestica* × *M. Honanensis*)、M26 (*M. domestica* Mill. M26) 及其嫁接品种嘎啦 (*M. domestica* Mill. Gala) 距茎尖 3~4 片完全展开的叶片, 于 2012 年 6 月 1 日至 9 月 7 日每隔 10 d 取样。样品均取自河北农业大学何家营果树试验站。

1.2 NCED 基因 cDNA 全长序列克隆

采用 Trizol 试剂 (Takara 公司) 提取苹果总 RNA。3'RACE cDNA 第 1 链合成参照 TaKaRa RNA Kit (AMV3.0) 使用说明进行操作; 5'RACE cDNA 第 1 链合成参照 SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit 使用说明进行操作。根据已报道或登录 GenBank 的其他植物 NCED 基因序列设计简并引物 (表 1), 由上海生工工程技术有限公司合成。

以提取的总 RNA 反转录获得的 cDNA 第 1 条链为模板, 用简并引物 A1 与 A2 进行中间片段的扩增。PCR 程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。

以 3'RACE 反转录获得的 cDNA 第 1 条链为模板, 在获得中间片段的基础上设计引物 B1 和 B2, 并与试剂盒通用引物 C1 和 C2 配对进行 3'cDNA 末端扩增。PCR 程序为: Outer PCR: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 20 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。Inner PCR: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。

根据 *MdGA20ox1* 中间片段设计特异性引物 D1、D2, 分别与试剂盒通用引物 UPM、NUP 配对进行巢式 PCR。以 5'-RACE-Ready 反应液为模板, 以 D1 与 UPM 为引物进行反应: 94 °C 变性 4 min; 94 °C 反应 30 s, 72 °C 反应 1 min, 进行 5 次循环; 94 °C 反应 30 s, 70 °C 反应 30 s, 72 °C 反应 1 min, 进行 5 次循环; 94 °C 反应 30 s, 68 °C 反应 30 s, 72 °C 反应 1 min, 进行 25 次循环; 然后 72 °C 延伸 10 min。2 次反应将 1 次反应产物稀释 50 倍为模板, D2 与 NUP 为引物, 进行反应: 94 °C 变性 4 min; 94 °C 反应 30 s, 68 °C 反应 30 s, 72 °C 反应 1 min, 进行 20 次循环; 然后 72 °C 延伸 10 min。

利用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳并回收扩增特异性片段, 经转化酶切回收后, 送样测序。

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 6.0 软件对 *MdNCED1* 基因的中间片段、3'末端、5'末端序列进行拼接分析; 该基因的核苷酸和翻译的氨基酸序列分别利用 NCBI 的

BLASTn 和 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 与相应序列进行相似性分析;利用 Clustal 1.83 与 Mega 4.0 构建苹果砧木 SH40 与平邑甜茶、克莱门柚、蓖麻、番茄、烟草、草莓、萝卜、葡萄、拧条锦鸡儿、花生、菊花、中粒咖啡、马铃薯、豌豆和拟南芥 *NCED* 氨基酸序列同源进化树;利用 ExPASy 在线软件分析 (<http://www.expasy.ch/prosite/>) *MdNCED1* 氨基酸的功能结构域;利用在线软件 PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) 进行亚细胞定位分析;利用 TMHMM Server v. 2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白跨膜序列跨膜区分析;利用 PBIL LYON-GERLAND 对 *GA20ox1* 进行二级结构预测 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_hnn.pl);蛋白质三级结构预测采用 SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/workspce/index.php?func=modelling_simple)。

1.4 通过 Gateway 技术构建原核表达载体

设计引物 E1 与 E2(表 1),在正向引物 E1 的 5' 端加上 CACC 4 个碱基。扩增 *MdNCED1* 基因的开放阅读框,通过 TOPO 反应将该基因克隆到 TOPO 载体上,然后与目的载体 pDEST15 进行 LR 重组,经转化大肠杆菌,氨苄青霉素抗性筛选后,获得 pD-EST15-*MdNCED1* 质粒的菌落。经菌液 PCR、测序验证后进行后续试验。

1.5 融合蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 电泳分析

将重组质粒、空质粒均转入大肠杆菌 Rosseta (DE3)感受态细胞中,挑取单菌落接种于 10 mL 液体 LB 培养基中(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMP⁺)中,在灭菌的三角瓶中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜培养。将菌液按 1:50 稀释,并加入 2% 的葡萄糖,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续培养 2~3 h,使之 OD₆₀₀ 达到 0.5~0.7。收集诱导前 1 mL 菌液后,加入终浓度为 0.5 mmol/L ITPG,28 $^{\circ}\text{C}$ 分别振荡培养 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h 诱导 *MdNCED1* 表达。诱导完成后,6000 r/min 离心,收集上清液加入 2 \times 上样缓冲液,沸水浴 5 min,冰上冷却后,取 25 μL 进行 SDS-PAGE 电泳分析(浓缩胶 4%,分离胶 12%)。

1.6 荧光定量表达

分别提取不同时期 2 年生矮化砧木 SH28、M26、SH40 及其嫁接品种嘎啦的总 RNA,用 DNase I 酶纯化后,采用 Fermentas 试剂盒逆转录 cDNA,作为模板。

为确保荧光定量 PCR 的特异性,在该基因保守区设计引物 F1 与 F2(表 1)。以苹果中的 β -actin 基

因为内参,设计内参基因特异性引物 G1 与 G2,采用荧光定量 PCR 对 *MdGA20ox1* 基因进行生长发育期表达分析。反应体系上下游引物各 0.4 μL ,10.4 μL 反应 Mixture,3.8 μL ddH₂O,总体积 15 μL 。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,40 个循环;反应结束后,确认 Real Time PCR 的扩增曲线和溶解曲线,试验 3 次重复,记录数值。

表 1 引物序列及用途

Table 1 Sequence and application of primers

编号 Code	序列(5'-3') Primer sequence	用途 Application
A1	GCCCACCATGATKCAYGAYT	中间片段扩增
A2	CTTCTCGTCGTGMACRAAHG	Middle fragment amplification
B1	CTGGTTGCTTACCTCGC	3'RACE
B2	ACGGTGGTGAGCCGTTTTTCG	3'RACE
C1	CGCGGATCCTCCACTAGT- GATTTCACTATAGG	3'RACE
C2	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT	3'RACE
D1	GCAGAACCTGTCCGGAGACTC	5'RACE
D2	GATCATCTCTCCGAGCTGAACAC	5'RACE
UPM	CTAATACGACTACTAAT- ACGACTCACTATAGGGCAAG- CAGTGGTATCAACGCAGAGT	5'RACE
NUP	AAGCAGTGGTATCAACG- CAGAGT	5' RACE
E1	<u>CACC</u> ATGTCAACTCTTC- CAAAAGCACC	<i>MdNCED1</i> 基因 ORF 扩增
E2	TGCCTGATTTACCAAGTCCTTCG	Complete ORF amplification of <i>MdNCED1</i> gene
F1	TCGGAGGACGACGGTTATATTC	荧光定量 RT-PCR
F2	CCATGAAACCCGTAGGGCAC	Fluorescent quantitative RT-PCR
G1	CTGAACCCAAAGGCTAATCG	荧光定量 PCR
G2	ACTGGCGTAGAGGGAAAGAA	Fluorescent quantitative RT-PCR

下划线为保护性碱基 Underlines in primer sequence is protective bases

2 结果与分析

2.1 苹果 *MdNCED1* cDNA 全长的获得及序列分析

以苹果砧木 SH40 新梢总 RNA 的反转录产物为模板进行 RT-PCR 扩增,以 A1 与 A2 为引物,扩增产物经测序后得到 643 bp,以 B1/C1、B2/C2 引物,通过 3'RACE 获得长度 244 bp 的片段;以 D1/UPM、D2/NUP 为引物,通过 5' RACE 扩增获得 5' 端的 1478 bp 的片段(图 1)。

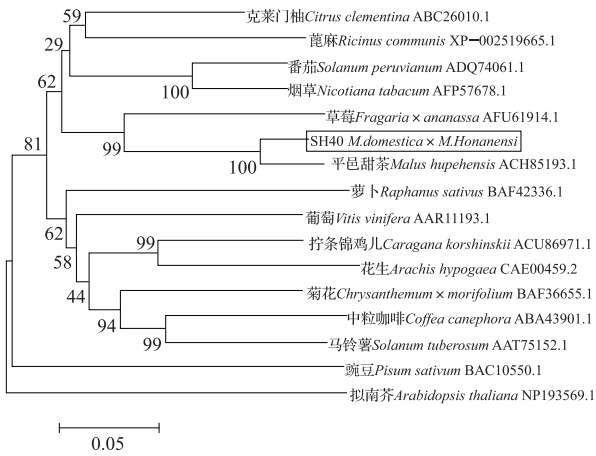


图3 苹果砧木 SH40 与其他物种 NCED 氨基酸序列的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis between *MdNCED1* and NCED proteins from other species

通过在线软件 Wolf PSORT 进行亚细胞定位表明 *MdNCED1* 定位于叶绿体上。通过 TMHMM Server 2.0 进行跨膜分析与 SignalP-3.1 进行信号肽分析表明 *MdNCED1* 无跨膜(图4)和信号肽结构。

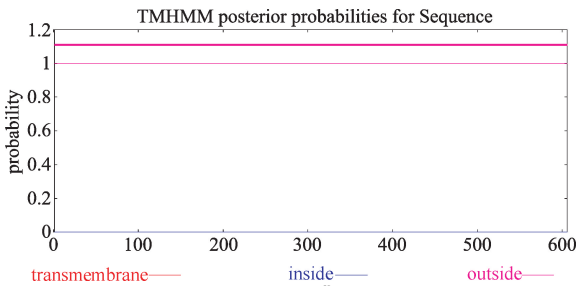


图4 *MdNCED1* 跨膜区域预测结果

Fig. 4 The predicted result of *MdNCED1* transmembrane region

利用软件 ExPASy 软件分析 *MdNCED1*, 结果显示:28-31、151-154、269-272、439-442、475-478、548-551 和 595-598 为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点;36-38、41-43、44-46、47-49、203-205、468-470、469-471 和 581-583 为蛋白激酶 C 磷酸化位点;109-114、182-187、250-255、252-257、312-317 和 542-547 为 N-肉豆蔻酰位点甘氨酸;50-53 为 N-糖基化位点;48-51 为 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点;492-495 为酰胺化位点。同时该软件还显示,10-52 这段氨基酸序列为一段富含丝氨酸(Ser)的低复杂度区域。

用 Hopfield 神经网络(HNN)预测 *MdNCED1* 的氨基酸序列,结果表明,*MdNCED1* 的二级结构是由 α -螺旋、无规则卷曲和延展链构成,其中 α -螺旋有 135 个占 22.28%,无规则卷曲有 343 个占 56.6%,延展链有 128 个占 21.21%。

建立一个蛋白质的三级结构图,必须有一个经

过试验验证的 3D 模型,并且该模型与目标序列有较高的相似性。本试验通过 SWISS-MODEL 软件,以单体蛋白(PDB Code:3npea)为模板,对 *MdNCED1* 三级结构进行同源建模,结果如图 5 所示。

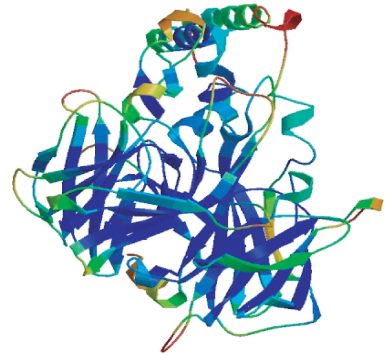
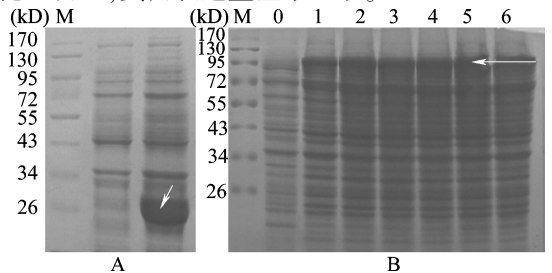


图5 SWISS-MODEL 预测 *MdNCED1*-3D 结构图

Fig. 5 The tertiary structure of *MdNCED1* predicted with SWISS-MODEL

2.4 SDS-PAGE 分析

以大肠杆菌 Rosseta (DE3) 作为宿主菌, pDEST15 作为空质粒对照,利用 SDS-PAGE 分析 *MdNCED1* 在大肠杆菌中的表达情况。DNAMAN 6.0 软件分析 *MdNCED1* 基因表达产物大约 66.9 kD,表达系统 N 端有 GST·Tag 序列表达约 26.7 kD 大小的蛋白以及重组后 linker 也会被诱导表达,因此融合蛋白预期表达量在 95 kD 左右。SDS-PAGE 电泳分析显示,分子量在 95 kD 的位置存在 1 条融合蛋白诱导表达的条带。并且在诱导 1~6 h 均出现了目的条带,而在空质粒和未诱导的转化重组质粒均未出现目的蛋白带。表明重组质粒 pGEST15-*MdNCED1* 在大肠杆菌中诱导表达了 SH40 苹果砧木 *MdNCED1* 蛋白(图6)。试验调整诱导时间 1~6 h,目的条带的深度变化不明显,蛋白表达量基本一致。



M:蛋白 marker;A:pDEST15 空载体诱导表达产物,箭头所指为标签蛋白,0、3 为诱导表达时间;B:pDEST15-*MdNCED1* 诱导表达产物,箭头所指为目标蛋白,0~6 为诱导表达时间

M:protein marker, A:The expression products of pDEST15, arrow shows tagged protein, induction for 0 and 3 h, B:The expression products of pDEST15-*MdNCED1*, arrow shows target protein, induction for 0 to 6 h

图6 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 Analysis of induced expression products by SDS-PAGE

2.5 *MdNCED1* 基因荧光定量表达结果

采用荧光定量 PCR 研究了 *MdNCED1* 基因在 SH40、M26、SH28 及其嫁接品种嘎啦生长发育阶段的表达情况,试验结果表明,在 6 月 1-12 日这一时期,3 种砧木类型及其嫁接品种嘎啦的 *MdNCED1* 基因表达量均呈上升趋势,随后迅速下降至 6 月 23 日的最低值。在以后的时期中,表达量维持在一个较

低的水平。SH28 与 SH40 生长势基本一致,SH40 稍强于 SH28。从图 7 中可以看到 *MdNCED1* 基因表达量基本与 3 种不同砧木类型的生长势呈正相关。而嫁接品种嘎啦后,SH28 是半矮化类型,M26、SH40 均是矮化类型;矮化类型 M26 稍强于 SH40。从图 8 中可以发现 *MdNCED1* 基因表达量与嫁接品种后的 3 个砧木类型的矮化程度均呈正相关。

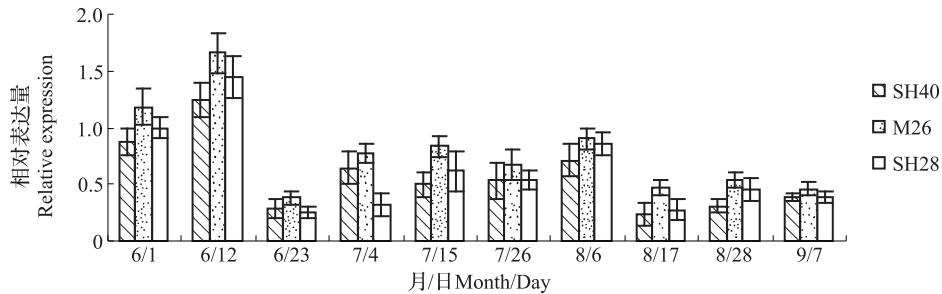


图 7 SH28、M26、SH40 在生长发育期 *MdNCED1* 基因荧光定量 PCR 检测结果

Fig. 7 qPCR expression analysis of *MdNCED1* gene for the SH28, M26, and SH40 at the growing time

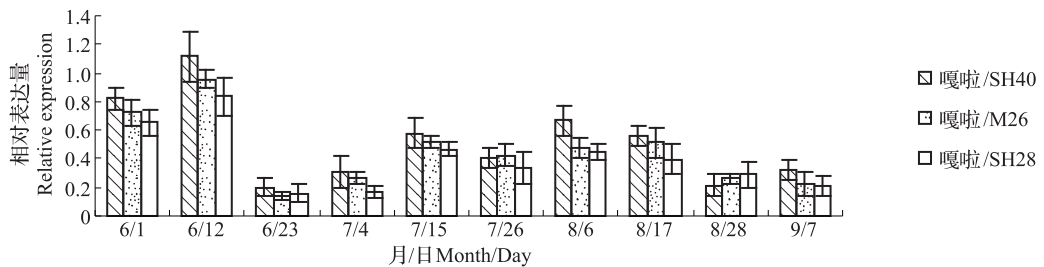


图 8 SH28、M26、SH40 嫁接品种嘎啦后在生长发育期 *MdNCED1* 基因荧光定量 PCR 检测结果

Fig. 8 qPCR expression analysis of *MdNCED1* gene for the SH28, M26, and SH40 grafted varieties Gala at the growing time

3 讨论

本试验以 SH40 苹果砧木快速生长茎尖为试材,通过 RACE 技术从中克隆得到 1 个 2179 bp 的完整 cDNA 序列,通过对其氨基酸序列进行保守结构域分析,表明该基因属于超家族 RPE65 系,该家族包含了植物的新黄质裂解酶的序列,并且该氨基酸序列含有多个磷酸化、酰基化和糖基化位点。丝氨酸、苏氨酸的磷酸化位点通过磷酸化和脱磷酸化以及甘氨酸的酰基化位点通过酰基化调节细胞内已存在酶的“活性酶量”,使细胞对外界刺激做出的迅速反应更为有效,糖基化是蛋白质重要的翻译后修饰,可以进一步增加蛋白质的稳定性,均表明其催化功能的复杂性^[19]。

迄今为止,虽然在鳄梨^[14]、柑橘^[15]、柿子^[16]、牡丹^[17]和枸杞^[18]等植物中克隆分析了多个 *NCED* 基因,但研究主要集中在 *NCED* 基因在逆境胁迫、花朵的开放衰老以及果实成熟时的表达情况,对

NCED 蛋白的体外表达研究很少。了解其植物体内的生化功能,必须从蛋白水平上进行研究。原核表达系统为研究 *NCED* 蛋白的表达和功能提供了一个有效的途径^[20]。本研究将 SH40 苹果砧木类型的 *NCED* 基因与原核表达载体 pDEST15 通过 Gateway 技术重组^[21],转入大肠杆菌 Rosseta (DE3) 诱导表达,通过 SDS-PAGE 电泳分析表明,SH40 苹果砧木类型的 *NCED* 基因能够与 GST 标签蛋白形成融合蛋白,并在原核表达体系中正确表达。

ABA 广泛参与植物生长发育的调控和对多种环境胁迫的适应反应。目前的研究认为,ABA 除了参与逆境生理反应,也在调控植物矮化中具有重要作用。本试验以利用实时荧光定量 PCR 研究相同立地条件下,SH40、SH28 和 M26 3 种不同苹果砧木及其嫁接品种嘎啦在生长发育阶段 ABA 合成关键基因 *MdNCED1* 基因的表达情况。试验结果表明 *MdNCED1* 基因在 3 个砧木类型及其嫁接品种中的

表达趋势基本一致,均是从6月初的高水平的峰值迅速下降。同时该基因的表达情况与苹果幼树的生长动态基本一致,6月初是苹果幼树的生长停止期,此时 *MdNCED1* 基因的表达量最高。随着苹果秋梢的加速生长,该基因的表达量降低,维持在较低的水平。付蕾等^[22]和毕桂红等^[23]的研究均发现苹果幼树内源激素 ABA 含量的周年发生动态与新梢的生长趋势相反,在新梢旺盛生长期 ABA 含量降低,在新梢停长期 ABA 含量升高。

本试验还发现 *MdNCED1* 基因的表达量与3个砧木类型的生长势及其嫁接品种嘎啦的矮化程度呈显著正相关,生长势最弱的 M26 其 *MdNCED1* 基因在生长发育阶段表达水平较高;而生长势较强的 SH40,其 *MdNCED1* 基因表达量基本维持在一个较低的水平;在7月4日 SH40 *MdNCED1* 基因表达量显著高于 SH28,可能是不同砧木类型在生长节奏上有差异造成的,在整个发育阶段 SH40 *MdNCED1* 基因表达量均低于 SH28。嫁接品种后半矮化类型 SH28 *MdNCED1* 基因的表达量显著低于矮化类型 SH40 与 M26。均表明 ABA 是调控树体矮化程度的重要因素之一。

植物的生长发育是由基因调控的,因此转基因育种也是目前和未来的重要研究方向之一。本研究为从分子水平上进行砧木早期筛选以及通过基因干涉和超表达转基因工程验证其基因功能奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] 邵开基,牛自勉,张忠仁,等. 苹果砧木矮化程度与 ABA 含量的关系[J]. 园艺学报,1987,14(1):7-11
- [2] 牛自勉,梁德声,房耀仁. 苹果砧木脱落酸与树体生长规律的研究[J]. 北京林业大学学报,1991,13(3):50-55
- [3] 赵大中,陈民,罗先实. 不同种类柑橘幼苗生长势与叶片过氧化物酶活性 GA_3 和 ABA 含量的关系[J]. 果树科学,1998,15(3):267-269
- [4] 张志华,刘新彩,刘彦红,等. 核桃幼树内源激素与生长势的关系[J]. 林业科学,2006,42(9):131-133
- [5] 曹敏格,杨海玲,张文,等. 苹果砧木矮化性评价指标的研究[J]. 中国农业大学学报,2008,13(5):11-18
- [6] Ren H B,Geo Z H,Chen L. Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissue under water deficit[J]. J Exp Bot,2007,58(2):211-219
- [7] Yang J F,Guo Z F. Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygen-

- ase gene (*SgNCED1*) from *Stylosanthes guianensis* and its expression in response to abiotic stresses [J]. Plant Cell Rep, 2007,26:1383-1390
- [8] Zhang M,Leng P,Zhang G L,et al. Cloning and function analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits [J]. J Plant Physiol,2009,166(12):124-152
- [9] Hu B,Liu X,Hong L,et al. Expression and localization of arachis hypogaea 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1 (*AhNCED1*) of peanut under water stress [J]. Agric Environ Biotech,2010,24(1):1562-1568
- [10] Tan B C,Schwartz S H,Zeevaart J A D,et al. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in acid biosynthesis in maize[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94:12235-12240
- [11] Burbidge A,Grieve T M,Jackson A,et al. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14[J]. Plant J,1999,17:427-431
- [12] Qin X,Zeevaart J A. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulated step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 15354-15361
- [13] Iuchi S,Kobayashi M,Yamaguchi-Shinozaki K,et al. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cow pea [J]. Plant Physiol,2000,123:553-562
- [14] Chernys J T,Zeevaart J A. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado [J]. Plant Physiol, 2000, 124: 345-353
- [15] Rodrigo M J,Alquezar B,Zacaras L. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes,differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange(*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. J Exp Bot,2006,57(3):633-643
- [16] Leng P,Zhang G L,Li X X,et al. Cloning of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) gene encoding a key enzyme during abscisic acid (ABA) biosynthesis and ABA-regulated ethylene production in detached young persimmon calyx[J]. Chinese Sci Bull,2009,54:2830-2838
- [17] 王晓庆,张超,董丽,等. 牡丹 *NCED* 基因的克隆和表达分析[J]. 园艺学报,2012,39(10):2033-2044
- [18] 陆平,田悦胜,王名雪,等. 枸杞脱落酸生物合成关键酶基因 *NCED* 的克隆及表达分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(2):303-310
- [19] 吴娟娟,吴倩,喻德跃. 大豆丙二烯氧化物合酶基因(*GmAOS*)及其启动子的克隆与分析[J]. 作物学报,2011,37(2):216-223
- [20] 宋杨,张艳敏,陈学森,等. 短枝型苹果 *MdRGL* 基因的克隆及原核表达分析[J]. 中国农业科学,2012,45(7):1347-1354
- [21] 毕慧慧,王根平,王成社,等. 单子叶植物 RNA 干扰和过表达 Gateway 载体的构建[J]. 植物资源遗传学报,2013,14(1):113-121
- [22] 付蕾,王明林,高吉刚,等. 苹果幼树4种内源激素周年发生动态研究[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2000,31(2):180-182
- [23] 毕桂红,吴耕西,张国珍. 苹果幼树内源生长素、脱落酸的周年变化[J]. 山东农业大学学报,1995,26(1):98-102