



## 云南松GA20氧化酶基因的克隆与表达分析

李瑞连 王玉倩 母德锦 徐骏飞 蔡年辉 许玉兰 陈林

### Cloning and Expression Analysis of GA20 Oxidase Gene in *Pinus yunnanensis*

Li Ruilian, Wang Yuqian, Mu Dejin, Xu Junfei, Cai Nianhui, Xu Yulan, Chen Lin

#### 引用本文:

李瑞连, 王玉倩, 母德锦, 徐骏飞, 蔡年辉, 许玉兰, 陈林. 云南松GA20氧化酶基因的克隆与表达分析[J]. 西南林业大学学报, 2025, 45(1):55–67. doi: 10.11929/j.swfu.202402027

Li Ruilian, Wang Yuqian, Mu Dejin, Xu Junfei, Cai Nianhui, Xu Yulan, Chen Lin. Cloning and Expression Analysis of GA20 Oxidase Gene in *Pinus yunnanensis*[J]. *Journal of Southwest Forestry University(Natural Science)*, 2025, 45(1):55–67. doi: 10.11929/j.swfu.202402027

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202402027>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

#### 复羽叶栎树叶绿体基因组密码子偏好性分析

Analysis of Codon Usage Bias in the Chloroplast Genome of *Koelreuteria bipinnata*

西南林业大学学报. 2023, 43(3): 56–63 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202111031>

#### 2种玉兰属植物叶绿体基因组密码子偏好性分析

Analysis of Codon Usage Bias(CUB) in the Chloroplast Genomes of 2 *Yulania* species

西南林业大学学报. 2023, 43(2): 44–53 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202111038>

#### 黄药大头茶叶绿体基因组密码子偏好性分析

Analysis of Codon Usage Bias in Chloroplast Genome of *Polyspora chrysandra*

西南林业大学学报. 2023, 43(5): 66–76 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202203018>

#### 星毛唐草叶绿体基因组的测序及其密码子偏好性分析

Characteristics of *Thalictrum cirrhosum* Chloroplast Genome and Its Analysis on Codon Usage Bias

西南林业大学学报. 2023, 43(5): 47–56 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202205026>

#### 基于转录组序列的非洲菊密码子偏好性分析

Codon Usage Bias Analysis of *Gerbera jamesonii* Based on Transcriptome Sequences

西南林业大学学报. 2023, 43(5): 77–86 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202206053>

#### 蒜头果叶绿体基因组密码子偏好性分析

Analysis of Codon Usage Bias in Chloroplast Genome of *Malania oleifera*

西南林业大学学报. 2021, 41(3): 15–22 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202001047>

# 云南松 GA20 氧化酶基因的克隆与表达分析

李瑞连<sup>1,2</sup> 王玉倩<sup>1,2</sup> 母德锦<sup>1,2</sup> 徐骏飞<sup>1,2</sup> 蔡年辉<sup>1,2</sup> 许玉兰<sup>1,2</sup> 陈林<sup>1,2</sup>

(1. 西南林业大学西南山地森林资源保育与利用教育部重点实验室, 云南昆明 650233; 2. 西南林业大学西南地区生物多样性保育国家林业和草原局重点实验室, 云南昆明 650233)

**摘要:** 为探讨外源赤霉素对云南松生长发育的影响, 及关键合成酶基因 *GA20ox* 的表达分析, 选用云南松幼苗为材料, 分别以 100、200、300 mg/L 浓度梯度赤霉素及赤霉素抑制剂多效唑进行外源喷施处理, 观察其苗高、地径变化; 同时通过对云南松转录组数据的筛选、比对, 获得 1 条 *GA20ox* 基因的同源序列, 利用 RT-PCR 技术进行基因克隆, 并进行生物信息学分析、密码子偏好性分析和基因表达分析。结果表明: 不同浓度梯度下, 外源 200 mg/L 赤霉素显著促进云南松苗高生长, 而 100 mg/L 赤霉素则显著促进其地径生长。通过克隆所得的云南松 *GA20ox(PyGA20ox)* 基因 GenBank 登录号为 OR651279, 其编码区长度为 1 107 bp, 编码 368 个氨基酸, 理论相对分子质量为 41.7 kDa。密码子偏好性分析表明, 该基因偏好使用以 A/U 结尾的密码子, 酵母适合作为该基因微生物异源表达受体, 烟草和拟南芥均适合作为该基因遗传转化及功能研究的受体材料。荧光定量 PCR 结果显示, *PyGA20ox* 在根、茎、叶以及茎尖均有表达, 且相对在茎中显著表达, 而不同植物生长调节剂处理下该基因表达模式不同。综上所述, 通过外源植物生长调节剂处理确定了赤霉素对云南松生长的显著促进作用, 适宜喷施浓度为 200 mg/L, 并对赤霉素生物合成途径中的关键酶 *PyGA20ox* 进行了克隆与表达分析。

**关键词:** 云南松; 植物生长调节剂处理; 基因克隆; 密码子偏好性; 表达分析

中图分类号: S791.257

文献标志码: A

文章编号: 2095-1914(2025)01-0055-13

引文格式: 李瑞连, 王玉倩, 母德锦, 等. 云南松 GA20 氧化酶基因的克隆与表达分析 [J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2025, 45(1): 55-67. Li R L, Wang Y Q, Mu D J, et al. Cloning and Expression Analysis of GA20 Oxidase Gene in *Pinus yunnanensis*[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2025, 45(1): 55-67. DOI: [10.11929/j.swfu.202402027](https://doi.org/10.11929/j.swfu.202402027)



## Cloning and Expression Analysis of GA20 Oxidase Gene in *Pinus yunnanensis*

Li Ruilian<sup>1,2</sup>, Wang Yuqian<sup>1,2</sup>, Mu Dejin<sup>1,2</sup>, Xu Junfei<sup>1,2</sup>, Cai Nianhui<sup>1,2</sup>, Xu Yulan<sup>1,2</sup>, Chen Lin<sup>1,2</sup>

(1. The Key Laboratory of Ministry of Education on Forest Resources Conservation and Utilization in the Southwest Mountains of China, Southwest Forestry University, Kunming Yunnan 650233, China; 2. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Biodiversity Conservation in Southwest China, Kunming Yunnan 650233, China)

**Abstract:** To explore the effects of exogenous gibberellins on the growth and development of *Pinus yunnanensis*, and to analyze the expression of the key synthase gene *GA20ox*, *P. yunnanensis* seedlings were selected as materials and treated with exogenous spraying of gibberellin and the gibberellin inhibitor Paclobutrazol at concentrations of 100, 200, and 300 mg/L, respectively, to observe the changes in seedling height and ground diameter.

收稿日期: 2024-02-26; 修回日期: 2024-06-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(32360381)资助; 云南省高层次人才支持计划青年拔尖人才项目(YNWR-QNBJ-2019-075)资助; 云南省农业联合专项重点项目(202301BD070001-152)资助; 云南省农业联合专项面上项目(202301BD070001-035)资助; 云南省研究生导师团队建设项目(2022-97)资助。

第1作者: 李瑞连(2000—), 女, 硕士研究生。研究方向: 林木遗传育种。Email: [L2502666160@163.com](mailto:L2502666160@163.com)。

通信作者: 陈林(1985—), 男, 副研究员。研究方向: 森林培育。Email: [linchen@swfu.edu.cn](mailto:linchen@swfu.edu.cn)。

At the same time, by screening and comparing the transcriptome data of *P. yunnanensis*, a homologous sequence of *GA20ox* gene was obtained. RT-PCR technology was used for gene cloning, and bioinformatics analysis, codon preference analysis, and gene expression analysis were performed. The results showed that under different concentration gradients, exogenous 200 mg/L gibberellin significantly promoted the height growth of *P. yunnanensis* seedlings, while 100 mg/L gibberellin significantly promoted their ground diameter growth. The GenBank login number of *P. yunnanensis GA20ox(PyGA20ox)* obtained through cloning is OR651279, with a coding region length of 1 107 bp, encoding 368 amino acids, with a theoretical relative molecular weight of 41.7 kDa. Codon preference analysis showed that the gene prefers to use codons ending in A/U, *Saccharomyces cerevisiae* was suitable as a microbial heterologous expression receptor for this gene, and both *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* were suitable as receptor materials for genetic transformation and functional studies of this gene. The results of fluorescence quantitative PCR showed that *PyGA20ox* was expressed in roots, stems, leaves, and stem tips, and was significantly expressed in stems. However, the expression pattern of this gene varied under different hormone treatments. This experiment determined the significant promoting effect of gibberellin on the growth of *P. yunnanensis* through exogenous hormone treatment, with a suitable spraying concentration of 200 mg/L. The key enzyme *PyGA20ox* in the gibberellin biosynthesis pathway was cloned and expressed.

**Key words:** *Pinus yunnanensis*; hormone treatment; gene clone; codon usage bias; expression analysis

云南松 (*Pinus yunnanensis*), 又称为“青松”“飞松”和“长毛松”, 主要分布在我国云南、贵州、四川以及西藏、广西等西南地区, 具有喜光, 适应性强等特点, 是植树造林的先锋树种<sup>[1]</sup>。近些年来, 由于云南松的经营管理措施较为粗放和遗传效应的叠加<sup>[2]</sup>, 云南现存林分中, 树干矮小扭曲、质量低劣等现象普遍<sup>[3-4]</sup>, 严重影响了林木的生长和木材的利用价值<sup>[5]</sup>; 有研究也表明, 其在苗期就存在生长十分缓慢等问题<sup>[6-7]</sup>, 严重制约了良种繁育效率, 经济价值和生态价值显著降低, 这都是云南松在人工林栽培中亟须解决的问题。随着林业的不断发展, 利用植物生长调节剂对苗木进行调控, 已经成为促进林木生长发育的一种重要途径<sup>[8]</sup>。

赤霉素作为一类四环二萜羧酸类化合物<sup>[9]</sup>, 广泛参与植物的多种生命活动, 尤其在促进植物生长和高度调控方面具有显著作用<sup>[10-12]</sup>。已有多项研究表明, 外源赤霉素施用能够显著促进植物的生长。江雪等<sup>[13]</sup>发现对毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 实生苗叶面喷施不同浓度赤霉素后, 能极大增加新分蘖竹株的秆高、节间长、叶片数量和竹材纤维质量。Li 等<sup>[14]</sup>发现外源赤霉素通过促进细胞伸长, 有效促进了黄粱木 (*Neolamarckia cadamba*) 的节间的生长, 从而显著提升其生物量和株高。另外田佳星<sup>[15]</sup>的研究显示, 赤霉素显著影响毛白杨 (*Populus tomentosa*) 的生理、光

合、生长与木材品质性状。在 Li 等<sup>[16]</sup>的研究中, 外源赤霉素在低红光诱导下促进油松 (*P. tabulaeformis*) 幼苗茎的伸长, 对促进油松幼苗生长具有重要作用。赤霉素的合成涉及多种酶的参与, 其中 GA20-氧化酶作为催化活性赤霉素产生的关键酶和限速酶<sup>[17]</sup>, 通过催化多步氧化反应将生物活性低的赤霉素转化生成生物活性高的赤霉素, 从而影响植物的生长<sup>[18]</sup>。*GA20ox* 基因在植物生长和调控中发挥着重要作用。在水稻 (*Oryza sativa*) 中, 沉默 *GA20ox* 表达会导致水稻的茎秆长度减短, 出现矮化表型<sup>[19]</sup>。在油茶 (*Camellia oleifera*)<sup>[20]</sup>、杂交白杨 (*Populus tremula* × *P. tremuloides*)<sup>[21]</sup>、楝树 (*Melia azedarach*)<sup>[22]</sup> 和赤松 (*P. densiflora*)<sup>[23]</sup> 等物种中, 过表达 *GA20ox* 均能促进植株生长, 增加生物量, 加速茎生长和木质部分化。

尽管在植物生长和调控方面对赤霉素和 *GA20ox* 基因的研究已相对充分, 但在云南松中相关研究尚未见报道。因此, 本研究旨在通过外源植物生长调节剂喷施, 同时采用 RT-PCR 技术克隆云南松 *PyGA20ox* 基因, 利用生物信息学方法和密码子偏好性分析法对其进行分析, 并初步研究了该基因在不同组织中的表达特异性及其对外源植物生长调节剂的响应, 以期为进一步探究赤霉素对云南松生长发育的影响以及对该基因的深入研究提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料及处理

本试验采用云南省弥渡县云南松无性系种子园的种子, 2023年1月在西南林业大学格林温室大棚进行育苗。先用0.5%高锰酸钾溶液对种子浸泡消毒1h, 取出用清水冲洗, 再放于50℃的温水中浸泡24h后, 进行播种, 每个穴1~2粒种子, 播种完成后铺上松针, 并用高锰酸钾溶液对土壤 [ $V$ (腐殖土):  $V$ (红土)=3:1] 和播苗盘进行消毒, 用拱架搭成棚子, 搭上遮阳网进行遮阴, 定期浇水以及管理。在2023年7月选择长势良好, 生长一致的苗木, 配置如表1所示不同浓度植物生长调节剂赤霉素 A3 ( $GA_3$ ), 及赤霉素抑制剂多效唑 (PAC) 进行处理, 以清水作为对照 (CK), 使用喷壶外源喷施至叶片和茎表面充分湿润而基本无液滴落下, 每5d喷施一次, 共喷施4次, 每个处理3次重复, 5个处理共计150株。处理组间分别用步道隔开, 避免植物生长调节剂喷施影响。

表1 试验处理

Table 1 Experimental treatment

处理编号	植物生长调节剂种类	浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )
T1	CK	0
T2	$GA_3$	100
T3	$GA_3$	200
T4	$GA_3$	300
T5	PAC	15

### 1.2 生长指标测定

从2023年7月开始, 每月初使用直尺和数显游标卡尺进行测量, 共测定6个月不同植物生长调节剂喷施处理下的云南松苗高、地径指标。采用Excel 2019对试验数据进行整理, 利用SPSS 24软件通过邓肯多重比较法分析不同处理下生长量的差异显著性。

### 1.3 总RNA的提取及反转录cDNA合成

按照多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(天根

生化科技有限公司, 中国)说明书, 提取云南松总RNA, 使用美国Nanodrop One 2000超微量紫外分光光度仪检测RNA的浓度和质量, 并结合1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。根据反转录试剂盒HiScript® III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) (诺唯赞生物科技股份有限公司, 中国)说明书, 将检测合格的RNA反转录合成第一链cDNA, 再将cDNA稀释至10 ng/ $\mu$ L, 作为克隆模板。

### 1.4 目的基因的克隆

根据课题组前期云南松转录组数据 (PRJNA 1057769), 筛选、比对获得  $GA20ox$  基因序列, 使用Snapgene软件设计特异性引物, 引物见表2, 以上述制备cDNA为模板进行PCR扩增, 使用DNA聚合酶Green Taq Mix (诺唯赞生物科技股份有限公司, 中国) 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物各0.75  $\mu$ L, 10倍稀释模板cDNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L, 总体系为25  $\mu$ L。PCR反应程序为预变性95℃, 3 min; 变性95℃, 15 s; 退火56℃, 15 s; 延伸72℃, 90 s, 共35个循环; 再延伸72℃, 5 min, 4℃保存。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳分析后, 再使用高保真酶2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus) (诺唯赞生物科技股份有限公司, 中国) 进行50  $\mu$ L体系PCR扩增。同时将pET30a+质粒用BamH I进行酶切, 分别回收纯化PCR产物和酶切产物, 使用非连接酶依赖型的单片段一步法克隆试剂盒ClonExpress® II One Step Cloning Kit (诺唯赞生物科技股份有限公司, 中国) 进行同源重组连接至pET30a+载体上, 并转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 涂板, 37℃倒置培养12h, 挑取单克隆阳性菌斑, 进行菌液PCR鉴定, 将含有目的片段的阳性菌液送至上海生工生物有限公司进行测序。

表2 引物序列

Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')	用途
PyGA20ox-F	ATGGGTACTTCGAGTGTGAATG	扩增
PyGA20ox-R	CTATGGCTGGTTTCTTGAGGTG	
pET GA20ox-F	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGGGTACTTCGAGTGTGAA	扩增
pET GA20ox-R	ACGGAGCTCGAATTCGGATCCCTATGGCTGGTTTCTTGAGG	
q-PyGA20ox-F	AAGGCAACCAAAGAAGCGTCAG	定量
q-PyGA20ox-R	ATGAGCAGCAGTGAGGAGGTC	
TUBA1-F	AGTCTTTTCTCGATTGACCAC	内参
TUBA1-R	GAGCCTCAGAGAATTCACCCT	

### 1.5 生物信息学分析

通过表 3 所示软件对 *PyGA20ox* 基因及其编码蛋白进行生物信息学分析；为进一步分析 *PyGA20ox* 蛋白的进化关系，利用 DNAMAN 9.0 对 *PyGA20ox* 蛋白进行多重序列比对。同时运用 MEGA 11 的邻接法构建不同物种的系统进化树。其中油松 (*P. tabuliformis*, AHW42465.1)、赤松 (*P. densiflora*, AGI99537.1)、红松 (*P. koraiensis*, AYA73795.1)、日本柳杉 (*Cryptomeria japonica*, XP\_057867848.1)、向日葵 (*Helianthus*

*annuus*, XP\_022034303.1)、沉水樟 (*Cinnamomum micranthum*, RWR81380.1)、蓝星睡莲 (*Nymphaea colorata*, XP\_031493539.1)、鳄梨 (*Persea americana*, KAJ8650985.1)、长刺矢车菊 (*Centaura solstitialis*, KAJ9545772.1)、烟草 (*Nicotiana tabacum*, BAA32156.1)、小叶杨 (*Populus simonii*, FJ422146.1)、大桉 (*Eucalyptus grandis*, XP\_010035059.1) 以及橡树 (*Quercus robur*, XP\_050253557.1) 等物种的氨基酸序列从 NCBI 数据库中获取。

表 3 生物信息学分析在线软件及网址

Table 3 Online software and websites of bioinformatics prediction

在线软件	网址	用途
ExPasy ProtParam	<a href="https://web.expasy.org/protparam">https://web.expasy.org/protparam</a>	理化特性分析
STRING	<a href="https://string-db.org/">https://string-db.org/</a>	蛋白互作分析
NCBI Conserved Domain Search	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi</a>	保守结构域分析
ProtScale	<a href="https://web.expasy.org/protscale/">https://web.expasy.org/protscale/</a>	亲疏水性分析
TMHMM2.0	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0</a>	跨膜结构分析
SignalP 6.0	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/</a>	信号肽分析
Cell-PLoc2.0	<a href="http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2">http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2</a>	亚细胞定位预测
PSORT	<a href="https://www.genscript.com/psort.html">https://www.genscript.com/psort.html</a>	亚细胞定位预测
NetPhos 3.1	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/</a>	磷酸化位点分析
NetNGlyc 1.0	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/">https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/</a>	糖基化位点分析
SOPMA	<a href="https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html">https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html</a>	蛋白二级结构预测
SWISS-MODEL	<a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a>	蛋白三级结构预测

### 1.6 密码子偏好性分析

使用 Codon W 1.4.2 软件计算云南松 *PyGA20ox* 基因序列同义密码子相对使用度 (RSCU)，其反映了特定密码子在编码相应氨基酸时同义密码子使用的相对概率，当 RSCU>1 时，其在同义密码子中使用相对较多；RSCU=1 时，其使用无偏好性；RSCU<1 时，其使用相对较少<sup>[24]</sup>；有效密码子数 (ENC)，是密码子实际值与随机值间的偏离程度，其反映基因对密码子选择性的强弱，其值的范围是 20~61，越趋近于 20 偏好性越强，与偏好性呈负相关<sup>[25]</sup>；密码子适应指数 (CAI)，常用于基因表达水平的评估，其值介于 0~1，该值与偏好性呈正相关<sup>[26]</sup>。

通过 EMBOSS explorer 计算密码子第 1、2、3 位碱基的 GC 含量 (GC<sub>1</sub>、GC<sub>2</sub>、GC<sub>3</sub>) 和总 GC 含量 (GC)。使用 CUSP 分析该基因密码子的使用频率，并通过 Codon Usage Database 密码子数据库获取大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基

因组密码子使用频率。

### 1.7 基因表达分析

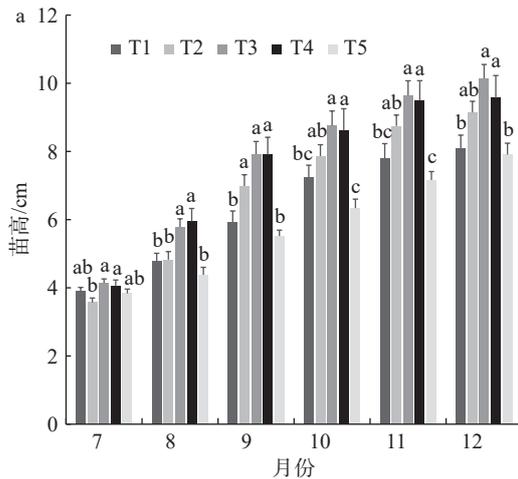
使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒，提取未喷施处理的云南松根、茎、叶、茎尖各部位总 RNA 及第 4 次喷施处理结束后 T1、T2 和 T5 组的云南松茎段总 RNA，使用反转录试剂盒 Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (gDNA digester plus) (翌圣生物科技股份有限公司，中国)，合成作为实时荧光定量 PCR 模板的 cDNA，10 倍稀释后放于 -20 °C 冷藏备用。表达分析引物根据克隆所得的基因序列，使用 Primer 5.0 软件设计得到 *q-PyGA20ox-F* 和 *q-PyGA20ox-R*，以 *TUBA1* 基因为内参对照，使用 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix (诺唯赞生物科技股份有限公司，中国) 进行实时荧光定量表达分析。反应体系共 20 μL，包括 cDNA 模板 1 μL，F、R 引物各 0.4 μL，SYBR Mix 10 μL，无菌水 8.2 μL。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算基因的相对表达量。通过 SPSS 24 软件进行方差分析，使用 Graphpad Pism 9.5 软件进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同植物生长调节剂处理对云南松苗高、地径生长的影响

为了解植物生长调节剂处理对云南松苗高、地径生长的影响，喷施植物生长调节剂后，连续 6 个月测定云南松幼苗的生长情况，结果见图 1。

从图 1a 可以看出 100 mg/L GA<sub>3</sub> 处理对苗高



有促进作用，但效果不明显，与对照相比仅在 9 月差异显著，其他几个月未达显著水平；200、300 mg/L GA<sub>3</sub> 处理的云南松苗高均显著高于对照，在 12 月时，其苗高分别为 (10.15 ± 0.41)、(9.57 ± 0.66) cm，相比于对照分别提高 25.46% 和 18.29%，200 mg/L GA<sub>3</sub> 处理的效果较好；而 15 mg/L PAC 处理与对照相比则表现出抑制作用。

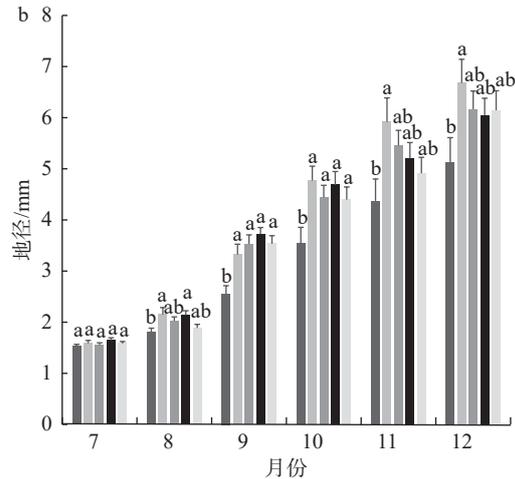


图 1 不同浓度植物生长调节剂处理下的苗高 (a) 和地径 (b)

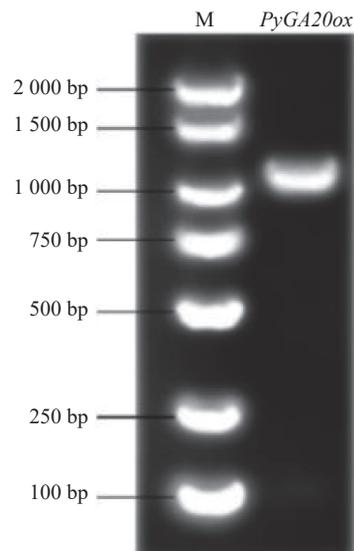
Fig. 1 Seedling height(a) and ground diameter(b) under different concentrations of exogenous hormones treatment

由图 1b 可以看出，不同浓度植物生长调节剂处理对云南松地径生长有一定的促进作用，其中 100 mg/L GA<sub>3</sub> 处理的促进效果较显著；200、300 mg/L GA<sub>3</sub> 和 15 mg/L PAC 效果次之，在 12 月时，其地径分别为 (6.17 ± 0.36)、(6.05 ± 0.33) mm 和 (6.14 ± 0.38) mm，相比于对照分别提高 20.27%、17.93% 和 19.69%；综上，对云南松幼苗外源喷施赤霉素，可以显著促进植株的苗高、地径生长，且 T3 处理相比于其他处理综合效果更好，说明外源喷施 200 mg/L 赤霉素浓度是促进云南松幼苗高生长的较适浓度。

### 2.2 云南松 GA20ox 基因的克隆与理化性质分析

利用引物 PyGA20ox-F 和 PyGA20ox-R，以云南松 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，得到目的基因，通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示 1000 bp 左右有特异性条带 (图 2)，与转录组测序所获得的 ORF 序列大小基本一致。测序结果表明 PyGA20ox 的长度为 1107 bp，共编码 368 个氨基酸。对 PyGA20ox 蛋白理化性质进行分析，结果显示其分子式为 C<sub>1877</sub>H<sub>2878</sub>N<sub>506</sub>O<sub>542</sub>S<sub>15</sub>，分子质量为 41.7 kDa，理论等电点为 6.46，原子总数为 5818 个，脂肪指数为 76.03，带负电残基的总数

(Asp + Glu) 为 44 个，带正电残基的总数 (Arg + Lys) 为 41 个，半衰期为 30 h，不稳定性指数为 37.10，说明 PyGA20ox 蛋白较为稳定。



M 是 Marker 2000。

图 2 云南松 PyGA20ox 基因电泳检测图

Fig. 2 Electrophoresis detection map of PyGA20ox gene in *P. yunnanensis*

### 2.3 生物信息学分析

保守结构域分析结果显示(图3a):其含有2OG-Fe(II)加氧酶超家族[2OG-Fe(II)]的特征结构域,属于GA20ox基因家族成员。基于ExPASy-Protscale在线软件的亲疏水性分析结果显示,PyGA20ox蛋白在第67位和118位氨基酸处

出现最小值-2.733,此处亲水性最强;在第160位氨基酸处出现最大值2.122,此处疏水性最强(图3b);分布于0以下的氨基酸残基数230个,分布于0以上的氨基酸残基数130个,总平均疏水指数(Grand average of hydropathicity)为-0.365(<0),综合说明该蛋白是亲水性蛋白。

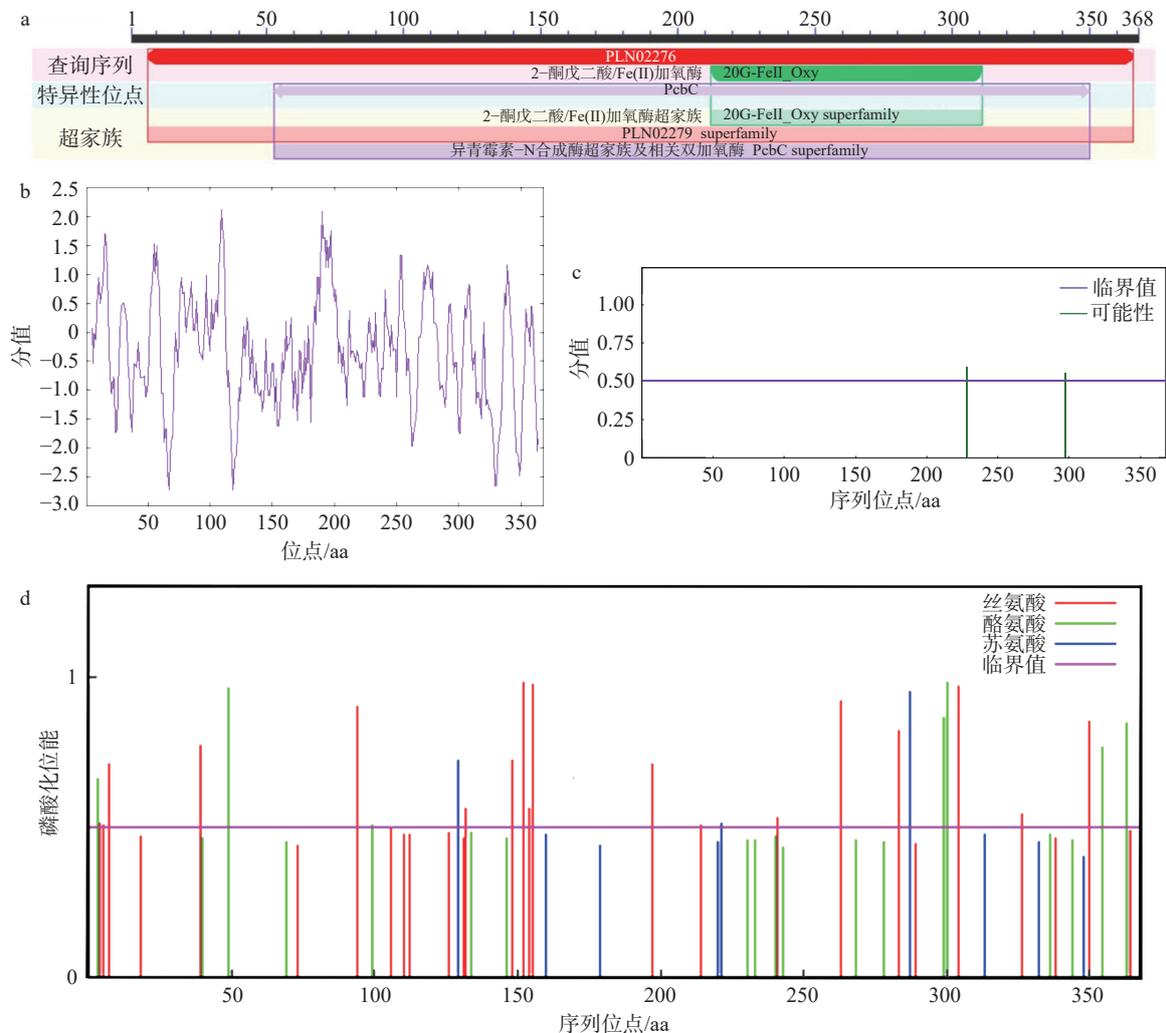


图3 PyGA20ox 蛋白保守结构域(a)、蛋白亲水性/疏水性(b)、蛋白糖基化位点(c)及蛋白磷酸化位点(d)

Fig. 3 PyGA20ox protein conserved domain(a), protein hydrophilicity/hydrophobicity(b), protein glycosylation site(c) and protein phosphorylation site(d)

对PyGA20ox编码蛋白质的跨膜结构域、跨膜方向和信号肽的预测结果显示,该蛋白不具备跨膜结构域和信号肽,为非分泌蛋白。通过Cell-PLoc2.0亚细胞定位预测于细胞质,PSORT软件预测其定位60.9%在细胞质、26.1%在细胞核,8.7%在线粒体,4.3%在高尔基体,说明PyGA20ox蛋白位于细胞质中的可靠性较高。基于NetNGlyc1.0及Netphos 3.1预测结果显示,PyGA20ox蛋白含有2个潜在的糖基化位点,分

别在第228位(NLTL),概率为58.52%;第297位(NKTT),概率为54.43%(图3c);存在28个磷酸化位点(分数>0.5),其中丝氨酸位点18个,苏氨酸位点7个,酪氨酸位点3个,该蛋白丝氨酸磷酸化位点最多,而丝氨酸磷酸化的主要作用是变构蛋白质以激活蛋白质的活力,主要是指酶活力(图3d)。

### 2.4 多序列比对和系统进化分析

将云南松PyGA20ox与其他物种氨基酸序列

通过 DNAMAN 进行多重比对分析，结果如图 4a 所示，其编码产物均有与赤霉素底物结合的高度保守基序“LPWKET”，以及与 2-酮戊二酸结合相关的保守基序“NYYPCCQK”<sup>[27]</sup>。为进一步分析 GA20ox 蛋白在不同物种之间的进化关系，通过 MEGA 11 软件，采用 NJ 法构建了不同物种间 GA20ox 蛋白的系统进化树，如图 4b 所示，云

南松 PyGA20ox 蛋白与日本柳杉 (*Cryptomeria japonica*, XP\_057867848.1)、赤松 (*P. densiflora*, AGI99537.1)、油松 (*P. tabuliformis*, AHW42465.1) 和红松 (*P. koraiensis*, AYA73795.1) 的 GA20ox 蛋白同源性较高，共同聚到裸子植物一支上，其余被子植物聚为一支，说明该蛋白在裸子、被子植物中存在明显的遗传分化。

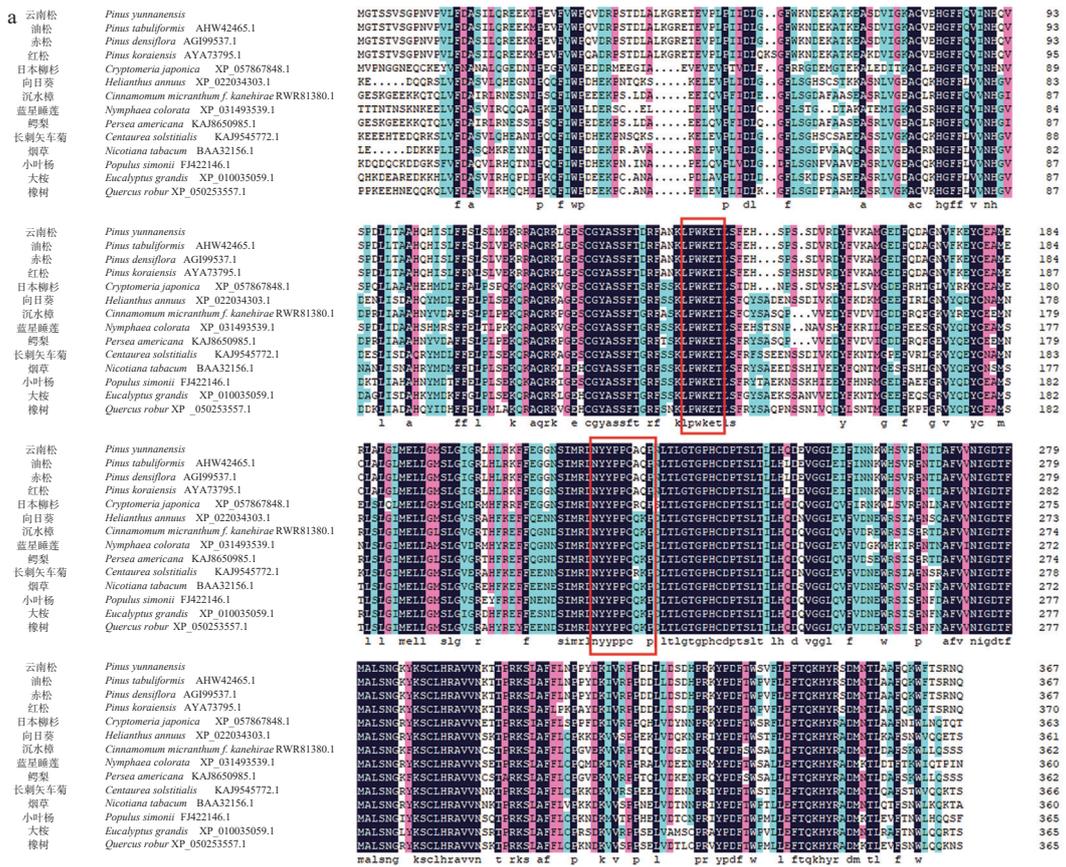


图 4 PyGA20ox 氨基酸序列同源性分析 (a) 及系统发育树分析 (b)

Fig. 4 Homology analysis of PyGA20ox amino acid sequence(a) and phylogenetic tree analysis(b)

## 2.5 *PyGA20ox* 密码子偏好性分析

使用 Codon W1.4.2 软件和 EMBOSS explorer 对目的基因进行分析, 结果见图 5。从图 5 可以看出: 该基因 ENC 值为 56.96, 趋近于 61, 说明其密码子偏好性较弱。其 CAI 值为 0.202, 其值更趋近于 0, 说明该基因表达水平不高。对不同位置的 GC 含量进行分析, 结果显示,  $GC1 > GC3 > GC2$ , 其含量分别为 52.03%、44.99%、39.57%, 总 GC 含量为 45.53%。其 RSCU 值在 0.16 (CUA) ~ 3 (UAG) 之间, 其中 5 个密码子

的使用没有偏好性 (RSCU=1), 分别为 AUG、CCU、CAA、CAG、UGG, 25 个密码子为高频密码子 (RSCU > 1), 分别为 UUG、GUG、AGU、CGA、CCA、GGA、GCU、GCA、ACU、ACA、UAU、CAU、UGU、CUU、CUG、UCU、UCA、AAA、AGG、GAU、GGU、AUA、GAG、AAC、UUU, 除编码谷氨酰胺的密码子 AAC 以 C 结尾外, 其他密码子以 G 结尾的 5 个, 以 A 结尾的有 8 个, 以 U 结尾的有 11 个, 说明 *PyGA20ox* 基因的密码子偏好以 A/U 结尾。

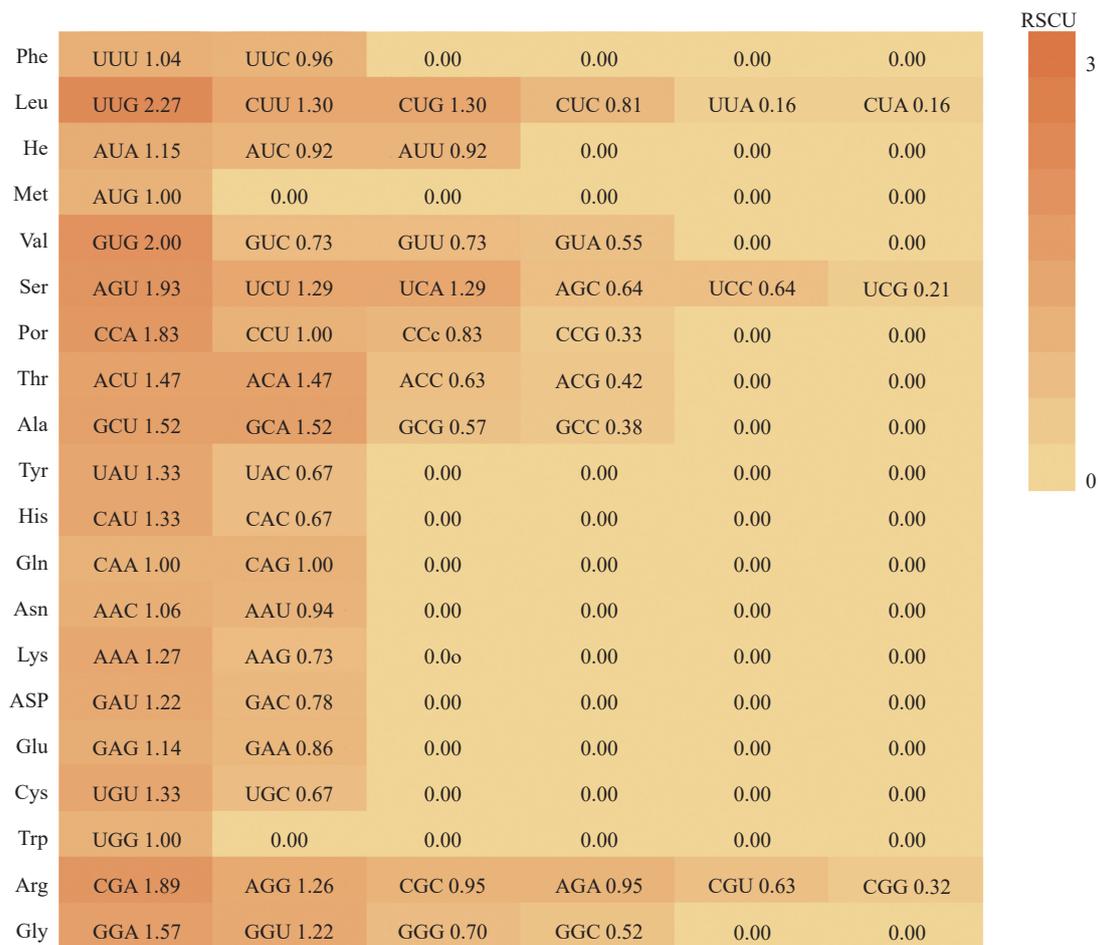


图 5 *PyGA20ox* 基因的同义密码子相对使用频率分析

Fig. 5 Analysis of the relative frequency of synonymous codon usage in *PyGA20ox* gene

## 2.6 与模式物种密码子使用频率比较分析

云南松 *PyGA20ox* 基因与大肠杆菌、酿酒酵母、本氏烟、拟南芥各基因组密码子使用频率的比值分别用  $Py/Ec$ 、 $Py/Sc$ 、 $Py/Nb$ 、 $Py/At$  表示 (表 4)。若 2 个物种间的密码子使用偏好性差异较小, 该比值常在 0.5 ~ 2 之间<sup>[28]</sup>, 超出此范围则差异较大, 若差异较大的密码子个数越少则说明 2 个物种的密码子偏好性越相似, 越有利于基

因的异源表达。云南松 *PyGA20ox* 基因与大肠杆菌和酿酒酵母偏好性差异较大的密码子分别为 30、15 个, 说明酿酒酵母相比于大肠杆菌更适合作为该基因微生物内异源表达试验的受体。与模式植物本氏烟和拟南芥的基因组相比, 偏好性差异较大的密码子数分别为 9、10 个, 说明在进行遗传转化试验时, 烟草和拟南芥均适合该基因的异源表达。

表 4 *PyGA20ox* 基因与大肠杆菌、酿酒酵母、本氏烟、拟南芥基因组密码子使用频率比较

Table 4 Comparison of codon usage frequencies of *PyGA20ox* gene with *E. coli*, *S. cerevisiae*, *N. benthamiana*, and *A. thaliana*

氨基酸	密码子	密码子偏好的比值				氨基酸	密码子	密码子偏好的比值			
		Py/Ec	Py/Sc	Py/Nb	Py/At			Py/Ec	Py/Sc	Py/Nb	Py/At
Phe	UUU	1.59	1.35	1.49	1.62	His	CAU	1.69	1.59	1.68	1.57
	UUC	2.05	1.77	1.85	1.57		CAC	1.15	1.39	1.32	1.25
Leu	UUA	0.20	0.10	0.21	0.21	Gln	CAA	1.11	0.60	0.90	0.84
	UUG	2.92	1.39	1.56	1.82		CAG	0.55	1.34	0.96	1.07
	CUU	1.90	1.76	0.87	0.90	Asn	AAU	1.13	0.61	0.75	0.97
	CUC	1.29	2.51	1.08	0.84		AAC	1.12	0.98	1.44	1.17
Ile	CUA	0.69	0.20	0.29	0.27	Lys	AAA	1.12	0.91	1.31	1.23
	CUG	0.42	2.06	1.82	2.21		AAG	1.97	0.70	0.57	0.66
	AUU	0.36	0.36	0.41	0.50	Asp	GAU	1.16	1.01	0.99	1.04
	AUC	0.45	0.63	0.78	0.59		GAC	1.27	1.21	1.49	1.42
Met	AUA	2.46	0.76	1.12	1.08	Glu	GAA	0.62	0.53	0.69	0.71
	AUG	0.90	1.17	1.02	1.00		GAG	1.74	1.69	1.05	1.01
Val	GUU	0.60	0.49	0.42	0.40	Cys	UGU	2.08	1.34	1.18	1.03
	GUC	0.73	0.92	1.02	0.85		UGC	0.85	1.13	0.75	0.75
	GUA	0.75	0.69	0.82	0.82	Trp	UGG	1.06	1.56	1.31	1.30
	GUG	1.14	2.76	1.91	1.71		Arg	CGU	0.27	0.85	0.70
Pro	CCU	4.14	2.21	1.58	1.59	CGC		0.39	3.13	1.94	2.14
	CCC	2.42	1.99	2.12	2.56	Ser	AGU	2.59	1.72	1.66	1.74
	CCA	3.55	1.63	1.77	1.85		AGC	0.51	0.83	0.76	0.72
	CCG	0.24	1.02	0.83	0.63	UCU	1.87	0.69	0.73	0.65	
Thr	ACU	2.08	0.93	1.09	1.08	UCC	0.91	0.57	0.78	0.73	
	ACC	0.36	0.64	0.80	0.79	UCA	2.01	0.87	0.95	0.89	
	ACA	2.34	1.07	1.25	1.21	UCG	0.31	0.32	0.48	0.29	
	ACG	0.36	0.68	1.00	0.70	Tyr	UAU	0.99	0.86	1.03	1.11
Ala	GCU	1.41	1.02	0.65	0.77		UAC	0.66	0.55	0.64	0.59
	GCC	0.22	0.43	0.43	0.53	TER	UAA	0.00	0.00	0.00	0.00
	GCA	1.05	1.34	0.92	1.24		UAG	9.03	5.42	3.87	5.42
	GCG	0.25	1.31	1.25	0.90	UGA	0.00	0.00	0.00	0.00	
Gly	GGU	0.78	0.79	0.78	0.85	AGA	2.80	0.38	0.51	0.43	
	GGC	0.29	0.83	0.71	0.88	AGG	6.02	1.18	0.83	0.99	
	GGA	2.74	2.24	1.08	1.01	CGA	4.28	5.42	2.80	2.58	
	GGG	0.92	1.81	0.98	1.06	CGG	0.44	1.59	0.51	0.55	

2.7 蛋白质二级、三级结构分析和蛋白互作分析

蛋白的二级结构分析结果显示 (图 6a), *PyGA20ox* 蛋白由 148 个无规则卷曲, 135 个  $\alpha$  螺旋以及 60 个伸展链和 25 个  $\beta$  折叠构成。各结构所占比率为无规则卷曲 (40.22%) >  $\alpha$  螺旋 (36.68%) > 伸展链 (16.30%) >  $\beta$  折叠 (6.79%)。

利用 SWISS-MODEL 同源建模法进行 *PyGA20ox* 编码蛋白的三级结构预测 (图 6b), 结果显示与油松 (X5CYA0.1.A) *GA20ox1* 的序列同源性 98.37%, 相似度为 62%, 置信度为 100%, 模型质量估测 91%, 表明 *PyGA20ox* 蛋白为 *GA20ox* 蛋白家族, 建立的三维结构结果可靠。

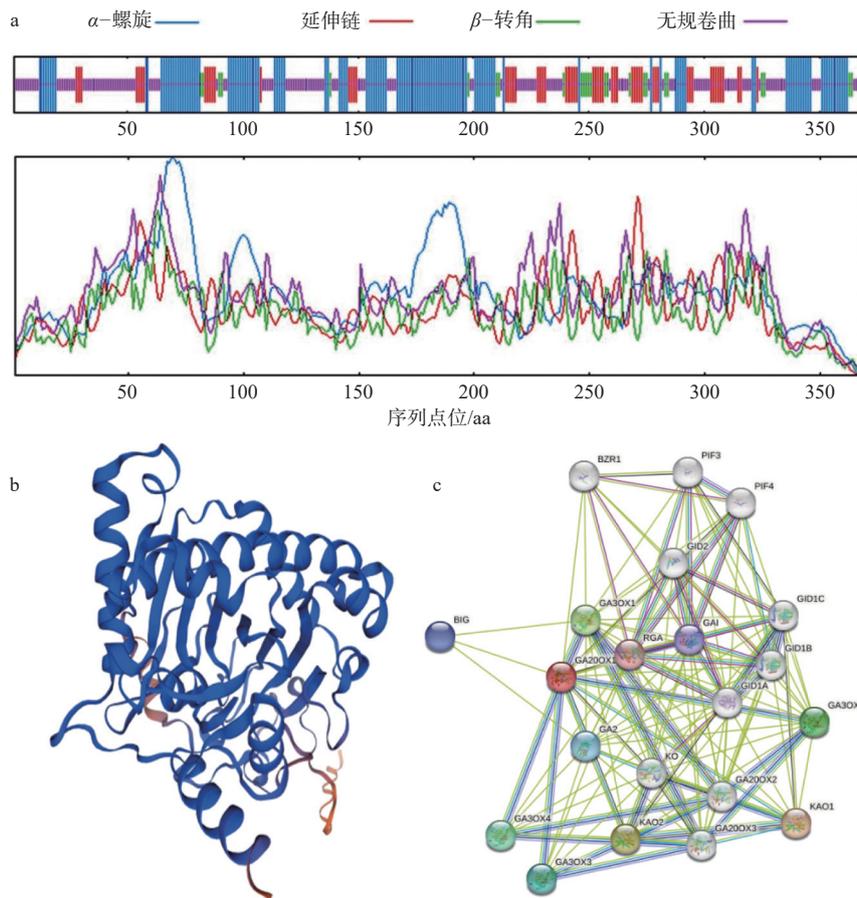


图 6 PyGA20ox 氨基酸二级 (a)、三级 (b) 结构预测与蛋白互作分析 (c)

Fig. 6 Prediction of secondary(a) and tertiary(b) structure of PyGA20ox amino acids and analysis of protein interaction(c)

通过 STRING 数据库, 构建云南松 GA20ox 蛋白与其他蛋白的互作 (图 6c), 以拟南芥蛋白数据库作为参考分析该蛋白与其他蛋白的相互作用, 发现 PyGA20ox 和细胞色素 P450 家族的 KAO1 互作分数最高, 为 0.978, 其可能相互作用促进植物茎伸长, 在植物发育中发挥着核心作用, 与 GA3ox、GA2、GAI、RGA 等互作分数较高, 其可能通过赤霉素合成或信号通路共同调节植物生长, 其次还与生长素转运蛋白 BIG 相互作用, 说明 PyGA20ox 蛋白可能影响生长素介导的发育反应 (如细胞伸长、顶端优势、侧根产生、花序结构和一般生长和发育) 与极性生长素转运等。

## 2.8 云南松 GA20ox 基因的表达分析

为了解 PyGA20ox 基因在云南松不同组织中的表达情况, 通过 RT-qPCR 方法对喷施处理前的云南松进行定量分析, 结果如图 7a 所示, 其在不同组织中的表达差异较大, 表达量的大小依次为: 茎 > 叶 > 茎尖 > 根, 以上结果表明 PyGA20ox 基因的表达具有组织特异性, 其在茎段中的相对表达量显著高于其他组织, 为进一步研究该基

因在不同处理下的表达变化, 以不同处理下云南松茎段 cDNA 为模板进行分析, 结果如图 7b 所示, 该基因在赤霉素处理下, 相对表达量显著低于对照, 符合其限速酶特性, 而在多效唑处理下该基因相对表达量升高, 验证了前人所提出的植物内部赤霉素稳态系统, 通过负反馈调节机制来维持最佳 GA 水平, 继续植物的自然生长发育<sup>[29-31]</sup>。

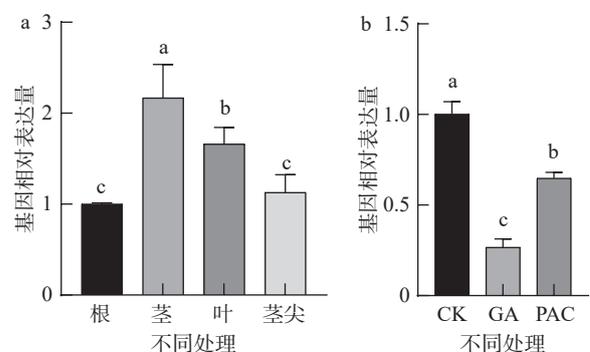


图 7 PyGA20ox 基因在不同组织 (a) 与不同处理 (b) 中的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of PyGA20ox gene in different tissues(a) and treatments(b)

### 3 结论与讨论

苗木作为造林的物质基础,其质量的优劣直接影响着造林的成败<sup>[32]</sup>,已有的研究表明,植物生长调节剂应用是促进苗木生长的主要措施之一<sup>[33]</sup>。赤霉素作为促进生长的关键调节剂,在调控林木的生长发育中发挥了重要作用。本试验结果表明,外源喷施赤霉素使得云南松苗高、地径显著增长,且不同浓度梯度下 200 mg/L GA 处理综合效果更佳。GA20 氧化酶是赤霉素生物合成过程中的关键酶,其催化活性赤霉素产生,目前已在许多物种中被报道,表明 GA20 氧化酶基因对植物的生长发育存在重要影响。因此,本试验通过 RT-PCR 技术,从云南松中成功克隆到 *PyGA20ox* 基因,该基因 ORF 为 1107 bp,编码 368 个氨基酸,属于 2OG-Fe(II) 双加氧酶超家族,亚细胞定位预测于细胞质中。通过与油松等序列比较分析,发现其编码产物均具有与赤霉素底物结合的“LPWKET”高度保守基序,以及与 2-酮戊二酸结合相关的“NYPPCQKP”保守基序<sup>[27]</sup>, 综上证实了本试验所克隆到的云南松 *PyGA20ox* 为 GA20ox 家族的同源基因。

在植物生长和发育过程中,赤霉素会通过负反馈机制来维持生物活性赤霉素的水平,并控制每个组织对赤霉素的响应<sup>[34]</sup>。GA20 氧化酶则是赤霉素合成途径中发挥负反馈调节功能的关键限速酶<sup>[35]</sup>,通过对不同环境条件的响应和各个步骤的严格调控,从而使得植物体内的赤霉素含量达到动态平衡<sup>[36]</sup>。*GA20ox* 基因在不同组织器官中表现出不同的表达模式<sup>[37]</sup>,其在不同环境条件下的表达也存在差异。肖政等<sup>[38]</sup>对荔波连蕊茶中 *CIGA20ox2* 基因实时定量 PCR 分析结果表明,该基因在 2 年生茎段中的表达丰度最高,在顶端分生组织中表达丰度最低,在嫩叶和根中表达丰度较高,成熟叶片和种子表达丰度较低。周慧文等<sup>[39]</sup>对甘蔗中 *ScGA20ox1* 基因进行实时荧光定量 PCR 分析结果表明,该基因在甘蔗幼苗茎秆中的表达量最高,叶片次之,根的表达量最低,对甘蔗幼苗施用赤霉素后 *ScGA20ox1* 表达量下调。He 等<sup>[40]</sup>对葡萄中 *VvGA20ox1* 基因进行实时荧光定量 PCR 分析结果表明,在不同浓度赤霉素处理下,该基因表达水平平均下调,而在赤霉素抑制剂烯效唑处理下该基因表达上调。本试验结果显示, *PyGA20ox* 基因在云南松不同组织中的表达量差异显著,其在茎中相对显著高表达,说明该基因可能主要在茎中

发挥功能。对云南松幼苗施用赤霉素后 *PyGA20ox* 相对表达下调,施用赤霉素抑制剂多效唑后该基因相对表达上调,与前人在其他物种的研究结果一致,说明该基因在响应环境变化的表达模式上比较相似。

植物的正常生长发育依赖于蛋白质之间的相互作用<sup>[28]</sup>。本试验通过分析 *PyGA20ox* 编码蛋白与其他蛋白之间的相互作用,发现其与 KAO1、GA3ox 等与赤霉素合成、信号转导相关的蛋白以及生长素转运蛋白 BIG 存在相互作用,说明 *PyGA20ox* 可能通过蛋白的相互作用,影响细胞伸长、一般生长发育和极性生长素转运等,从而调节植物生长。由于云南松的同源转化十分困难,目前的基因功能分析只能借助于异源转化。密码子的使用偏好性能够反映物种或基因的起源、进化规律和突变方式,将有助于为基因功能验证、异源表达宿主选择、蛋白质表达和蛋白质结构研究等提供参考<sup>[41]</sup>。本试验发现云南松 *PyGA20ox* 偏好于以 A/U 结尾的密码子,通过分析其与 4 种模式物种的密码子使用频率,发现云南松 *PyGA20ox* 相比于大肠杆菌,其与酵母菌偏好性差异较大的密码子个数较少,说明该基因更适合酵母真核表达系统;而在遗传转化功能验证中,该基因与烟草和拟南芥偏好性差异较大的密码子个数都较少,说明烟草和拟南芥均可作为其遗传转化植物。

外施赤霉素显著促进云南松的生长,而外施多效唑则表现出抑制高生长的现象,表明赤霉素在调控云南松株高方面可能发挥着重要作用。对关键酶基因 *PyGA20ox* 进行表达分析显示,该基因主要在茎中相对显著表达,推测其参与云南松茎部的生长发育,影响株高调控。蛋白互作分析揭示了其与赤霉素合成、信号转导以及生长素转运等蛋白之间存在相互作用,表明植物内部存在着复杂的调控机制来调节植物的生长。此外,密码子使用频率分析显示该基因适宜的异源表达受体和遗传转化材料,为今后的功能研究提供参考。综上所述,这些都为进一步研究 *PyGA20ox* 作用机制和赤霉素对云南松高生长调控研究提供理论依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] 陈诗,陈林,唐军荣,等. 云南松不同等级苗木的生物

- 量分配及其异速生长 [J]. 四川农业大学学报, 2023, 41(2): 209–216, 256.
- [2] 太廷惠, 杨兴, 申腾朝, 等. 云南松近年来研究进展 [J]. 林业调查规划, 2023, 48(2): 61–64.
- [3] 郑元, 黄新会, 王大玮, 等. 云南松研究进展及展望 [J]. 现代农业科技, 2013(13): 169–171.
- [4] 许玉兰, 蔡年辉, 康向阳, 等. 云南松种质资源遗传多样性研究概况 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(6): 982–985.
- [5] 常恩福, 李思广, 李娅, 等. 云南松与思茅松不同杂交组合球果和种子形态变异 [J]. 西部林业科学, 2017, 46(6): 8–14.
- [6] 王文俊, 张薇, 李莲芳, 等. 云南松天然更新幼苗和幼树期的生长动态分析 [J]. 福建林业科技, 2017, 44(3): 75–81.
- [7] 杨历雨, 李莲芳, 杨文君, 等. 云南松蹲苗的特征分析 [J]. 种子, 2020, 39(8): 149–153, 163.
- [8] 卢志锋, 马松亚, 唐鑫, 等. 不同浓度 NAA、IBA 和 GA<sub>3</sub> 对细叶云南松幼苗生长的影响 [J]. 广东农业科学, 2016, 43(9): 56–61.
- [9] Wang S S, Wang Y J. Harnessing hormone gibberellin knowledge for plant height regulation [J]. *Plant Cell Reports*, 2022, 41(10): 1945–1953.
- [10] Wu C Y, Bai Y C, Cao Z H, et al. Plasticity in the morphology of growing bamboo: a Bayesian analysis of exogenous treatment effects on plant height, internode length, and internode numbers [J]. *Plants*, 2023, 12(8): 1713.
- [11] Wang Y J, Zhao J, Lu W J, et al. Gibberellin in plant height control: old player, new story [J]. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(3): 391–398.
- [12] Liao Z G, Yu H, Duan J B, et al. SLR1 inhibits MOC1 degradation to coordinate tiller number and plant height in rice [J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2738.
- [13] 江雪, 楼崇, 袁娜, 等. 外源 GA<sub>3</sub> 对毛竹实生苗新分蘖竹株秆形与竹材纤维质量的影响 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2016, 40(2): 121–126.
- [14] Li L, Wang J Q, Chen J J, et al. Physiological and transcriptomic responses of growth in *Neolamarckia cadamba* stimulated by exogenous gibberellins [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11842.
- [15] 田佳星. 毛白杨响应赤霉素的转录调控与等位变异解析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2016.
- [16] Li W, Liu S W, Ma J J, et al. Gibberellin signaling is required for far-red light-induced shoot elongation in *Pinus tabulaeformis* seedlings [J]. *Plant Physiology*, 2020, 182(1): 658–668.
- [17] 杨艳华, 张亚东, 朱镇, 等. 赤霉素 (GA<sub>3</sub>) 和脱落酸 (ABA) 对不同水稻品种生长和生理特性及 *GA20ox2*、*GA3ox2* 基因表达的影响 [J]. 中国水稻科学, 2010, 24(4): 433–437.
- [18] 王满, 金灿, 许雪, 等. 梨极矮化突变体与苹果梨 *GA20ox* 基因的克隆及植物表达载体的构建 [J]. 北方园艺, 2014(2): 89–94.
- [19] Qin X, Liu J H, Zhao W S, et al. Gibberellin 20-oxidase gene *OsGA20ox3* regulates plant stature and disease development in rice [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 2013, 26(2): 227–239.
- [20] Wang Y, Li J A, Guo P R, et al. Ectopic expression of *Camellia oleifera* Abel. gibberellin 20-oxidase gene increased plant height and promoted secondary cell walls deposition in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2023, 258(3): 65.
- [21] Israelsson M, Mellerowicz E, Chono M, et al. Cloning and overproduction of gibberellin 3-oxidase in hybrid aspen trees. effects on gibberellin homeostasis and development [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(1): 221–230.
- [22] Ly L K, Bui T P, Van Thi Le A, et al. Enhancing plant growth and biomass production by overexpression of *GA20ox* gene under control of a root preferential promoter [J]. *Transgenic Research*, 2022, 31(1): 73–85.
- [23] Jeon H W, Cho J S, Park E J, et al. Developing xylem-preferential expression of *PdGA20ox1*, a gibberellin 20-oxidase 1 from *Pinus densiflora*, improves woody biomass production in a hybrid poplar [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14(4): 1161–1170.
- [24] 郑钢, 顾翠花, 林琳, 等. 20 种千屈菜科植物 *rbcl* 基因密码子使用偏好性分析 [J]. 浙江农林大学学报, 2021, 38(3): 476–484.
- [25] 朱沛煌, 陈好, 朱灵芝, 等. 马尾松转录组密码子使用偏好性及其影响因素 [J]. 林业科学, 2020, 56(4): 74–81.
- [26] 吴妙丽, 陈世品, 陈辉. 竹亚科叶绿体基因组的密码子使用偏性分析 [J]. 森林与环境学报, 2019, 39(1): 9–14.
- [27] 杨炳磊, 许好标, 李黎贝, 等. 陆地棉株高相关基因 *GhGA20ox6* 的克隆及功能初探 [J]. 棉花学报, 2022, 34(4): 275–285.
- [28] 周佩娜, 李阳, 蒲天珍, 等. 霍山石斛  $\beta$ -1,4-木糖基转移酶 (*IRX9*) 基因克隆及生物信息学分析 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1212–1219.
- [29] Gallego-Giraldo L, Ubeda-Tomás S, Gisbert C, et al. Gibberellin homeostasis in tobacco is regulated by

- gibberellin metabolism genes with different gibberellin sensitivity [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(5): 679–690.
- [30] Thomas S G, Rieu I, Steber C M. Gibberellin metabolism and signaling [J]. *Vitamins and Hormones*, 2005, 72: 289–338.
- [31] Fukazawa J, Miyamoto C, Ando H, et al. DELLA-GAF1 complex is involved in tissue-specific expression and gibberellin feedback regulation of *GA20ox1* in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2021, 107(3): 147–158.
- [32] 汪啟波, 颜廷雨, 王瑜, 等. 不同种源一年生云南松苗木分级及其异速生长 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2022, 42(10): 102–110.
- [33] 杨永洁, 张青青, 李莲芳, 等. 激素和基质及缓释肥对云南松苗木生长的影响 [J]. *东北林业大学学报*, 2020, 48(8): 6–10.
- [34] Honi U, Amin M R, Kabir S M T, et al. Genome-wide identification, characterization and expression profiling of gibberellin metabolism genes in jute [J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20(1): 306.
- [35] Fukazawa J, Mori M, Watanabe S, et al. DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of GA20 oxidase 2 [J]. *Plant Physiology*, 2017, 175(3): 1395–1406.
- [36] Hedden P. The genes of the Green Revolution [J]. *Trends in Genetics: TIG*, 2003, 19(1): 5–9.
- [37] Mitchum M G, Yamaguchi S, Hanada A, et al. Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in *Arabidopsis* development [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2006, 45(5): 804–818.
- [38] 肖政, 李纪元, 范正琪, 等. 荔波连蕊茶 GA20 氧化酶基因的克隆及表达分析 [J]. *植物研究*, 2014, 34(5): 678–686.
- [39] 周慧文, 丘立杭, 黄杏, 等. 甘蔗赤霉素氧化酶基因 *ScGA20ox1* 的克隆及功能分析 [J]. *作物学报*, 2022, 48(4): 1017–1026.
- [40] He H H, Liang G P, Lu S X, et al. Genome-wide identification and expression analysis of GA2ox, GA3ox, and GA20ox are related to gibberellin oxidase genes in grape (*Vitis Vinifera* L.) [J]. *Genes*, 2019, 10(9): 680.
- [41] 赵春丽, 彭丽云, 王晓, 等. 莧菜 *AtGAI* 基因密码子偏好性与进化分析 [J]. *中国农业大学学报*, 2019, 24(12): 10–22.

(责任编辑 张 坤)