

外施赤霉素对薄壳山核桃幼苗生长及相关代谢基因表达的影响

严泽埔, 张佳琦, 梁 璧, 魏广利, 张启香, 王正加

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】研究赤霉素(gibberellin)对植物株高的影响,探讨了 *GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 在赤霉素合成过程中的反馈调节机制。【方法】以薄壳山核桃 *Carya illinoensis* 幼苗为材料,进行 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 赤霉素叶面喷施处理。对外施赤霉素后薄壳山核桃的株高、节间长度和主根长以及薄壳山核桃 *GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 的时空变化进行了研究。【结果】外施赤霉素 28 d 后,薄壳山核桃节间长度和主根长的伸长量与对照相比都存在显著差异 ($P<0.05$),节间数量没有发生变化;植株平均生长量达 2.9 cm,为对照的 1.93 倍,差异极显著 ($P<0.01$)。实时荧光定量 PCR 结果表明:*GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 在薄壳山核桃生长期存在时空表达差异。外施赤霉素能够使 *CiGA20ox* 的表达量持续下降,28 d 后的表达量仅为初始值的 38.6%;而 *CiGA3ox* 表达量则是在 7 d 时跌落低谷,下降至初始值的 55.4%,28 d 后回升,表达量为初始值的 350%;*CiGA2ox* 表达量总体呈波浪形变化,在 7 d 后达到顶峰,之后有所回落,至 21 d 时恢复到了初始水平,28 d 后上升为初始值的 220%。*CiGA3ox* 在薄壳山核桃植株茎杆内发生了累积,相较于 *CiGA20ox* 和 *CiGA2ox* 在转录水平上发生了较大的变化。【结论】外施赤霉素促进了薄壳山核桃茎杆伸长,同时引起了薄壳山核桃体内赤霉素代谢关键基因表达模式的时空变化。图 6 表 1 参 29

关键词: 林木育科学;薄壳山核桃;赤霉素;赤霉素氧化酶基因;时空变化

中图分类号: S722.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2020)05-0922-08

Effects of exogenous gibberellin on growth of *Carya illinoensis* and its metabolic gene expression

YAN Zepu, ZHANG Jiaqi, LIANG Bi, WEI Guangli, ZHANG Qixiang, WANG Zhengjia

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study attempts to explore the effect of gibberellin(GA_3) on plant height and discuss the feedback regulation mechanism of *GA20ox*, *GA3ox* and *GA2ox* in the process of GA_3 synthesis. [Method] The leaves of *Carya illinoensis* seedlings were sprayed with $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GA_3 . The plant height, internode length and main root length of *C. illinoensis* and the spatiotemporal variation of *CiGA20ox*, *CiGA3ox* and *CiGA2ox* were studied. [Result] After 28 days of GA_3 application, the internode length and the elongation of the main root length of *C. illinoensis* seedlings were significantly different from those of the control ($P<0.05$), but the number of internodes did not change. The average plant growth was 2.9 cm, which was 1.93 times that of the control, and the difference was extremely significant ($P<0.01$). The results of real-time PCR showed that there were spatial-temporal differences in the expression of *GA20ox*, *GA3ox* and *GA2ox* during the growth period of *C. illinoensis*. Exogenous GA_3 could continuously reduce the expression of *CiGA20ox*. After 28 days,

收稿日期: 2019-09-25; 修回日期: 2020-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31670682); 浙江省科技厅重大研发专项 (2018C02004); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2016C02052-13); 中央财政林业科技推广项目 ([2018] TS 08 号)

作者简介: 严泽埔, 从事薄壳山核桃遗传育种研究。E-mail: 2801086565@qq.com。通信作者: 王正加, 教授, 博士, 从事经济林育种研究。E-mail: wzlj21@163.com

the expression level of *CiGA20ox* was only 38.6% of the initial value. The expression level of *CiGA3ox* dropped to a low point of 55.4% of the initial value on day 7 and rose to 350% of the initial value on day 28. The expression level of *CiGA2ox* in general showed a wavy change, reaching the peak after 7 days, then falling back to the initial level after 21 days, and rising to 220% of the initial value after 28 days. However, *CiGA3ox* accumulated in the stem of *C. illinoensis* seedlings, which changed in transcription level compared with *CiGA20ox* and *CiGA2ox*. [Conclusion] The exogenous GA_3 could promote the stem elongation of *C. illinoensis* and cause the temporal and spatial variation of the key gene expression patterns of GA_3 metabolism in *C. illinoensis*. [Ch, 6 fig. 1 tab. 29 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Carya illinoensis*; gibberellins(GA_3); gibberellin oxidase gene; temporal and spatial variation

薄壳山核桃 *Carya illinoensis* 又称长山核桃、美国山核桃, 为世界著名的高档干果、油料树种和材果兼用优良树种, 其果实营养丰富, 保健价值高^[1]。研究发现: 长期食用薄壳山核桃有明显的抗衰老、健肠胃、防治心血管疾病等作用^[2]。然而, 薄壳山核桃树体高大, 不利于人工采摘果实及日常的养护管理, 培育矮化砧木可为薄壳山核桃育种工作及果品的推广提供便利。魏灵珠等^[3]提出: 赤霉素(gibberellins, GA_3)是调控植物株高的重要激素, 相关株高基因的克隆与分子机制研究对于合理调控植物生长发育和农业生产具有极其重要的利用价值。赤霉素作为一类二萜类植物激素, 调节种子萌发^[4-5]、茎秆伸长^[6]、花粉管生长^[7]、花和种子发育^[8]等多种生理活动, 也能在环境胁迫下调控植物的生长和发育^[9]。其中, 值得关注的是赤霉素通过促进节间伸长来调控植株的营养生长^[10]。目前, 已经克隆到赤霉素生物合成大多数步骤催化酶的基因, 构建了从前体分子到活性赤霉素的整体合成框架^[11]。研究发现: 赤霉素后期的代谢酶($GA20ox$ 、 $GA3ox$ 、 $GA2ox$)对活性赤霉素的精确调控具有关键作用^[12]。 $GA20$ 氧化酶($GA20$ -oxidase, $GA20ox$)是赤霉素合成过程中关键的限速酶, 在棉花 *Gossypium* spp.^[13]、毛白杨 *Populus tomentosa*^[14]和山茶 *Camellia reticulata*^[15]中过表达会使得植株增高, 抑制该基因在烟草 *Nicotiana tabacum*^[16]、苹果 *Malus domestica*^[17]等植株中表达则会使植株矮化。邓伟等^[14]通过农杆菌介导法在毛白杨中过量表达棉花 $GA20ox$ 使得杨树的茎伸长, 但减少了叶片和根的生长。赵恺^[17]通过农杆菌介导法将 $GA20ox$ 的干扰信号转入苹果中, 获得了苹果的矮化砧木。 $GA3$ 氧化酶($GA3$ -oxidase, $GA3ox$)则是赤霉素合成过程中的一个关键酶。研究发现: 抑制小麦 *Triticum aestivum*^[18]和水稻 *Oryza sativa*^[19]中的 $GA3ox$ 基因表达, 植株会呈现矮化的性状。刘颖等^[18]发现: 在矮秆小麦‘宁 98-2105’中, $GA3ox1$ 和 $GA3ox2$ 在茎的倒一节结节中的转录水平显著高于对照, 推测是赤霉素传导通路受到影响导致植株突变。而过量表达赤霉素合成过程中的另一个关键酶赤霉素氧化酶($GA2$ -oxidase, $GA2ox$), 也会使麻疯树 *Jatropha curcas*^[20]、荔波连蕊茶 *Camellia lipoensis*^[21]和矮牵牛 *Petunia hybrida*^[22]等植株矮化。HU 等^[20]运用农杆菌介导法在麻疯树中过表达 *JcGA2ox* 发现: 植株呈现矮化, 更小更深的叶片, 花序果实都变小的性状。本研究以薄壳山核桃幼苗为实验材料, 于生长期喷施 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的赤霉素, 研究其对薄壳山核桃幼苗生长的影响和赤霉素合成代谢关键基因的时空变化, 初步了解薄壳山核桃 $GA20ox$ 、 $GA3ox$ 和 $GA2ox$ 基因的时空表达特征及在赤霉素合成中的调控作用, 为薄壳山核桃矮化新种质育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与处理

实验薄壳山核桃种子是半同胞家系, 2018 年 10 月采摘于浙江农林大学同一株树, 挑选大小一致的种子作为实验材料。晾晒后置于塑封袋内, 置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。2019 年 4 月, 将薄壳山核桃种子种在基质土 [$m(\text{泥炭}):m(\text{珍珠岩}):m(\text{蛭石})=1:1:1$] 内, 在亚热带森林培育国家重点实验室的驯化室 [$(25\pm 2)\text{ }^{\circ}\text{C}$, 湿度为 75%] 进行萌发培养。2019 年 5 月, 选取生长势、株高、节间长度和主根长度等形态指标基本一致的幼苗 54 株, 叶面喷施 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的赤霉素(CAS: 77-06-5, BC, 上海生工)进行处理(24 h 内不浇水), 以去离子水为对照, 3 次重复。

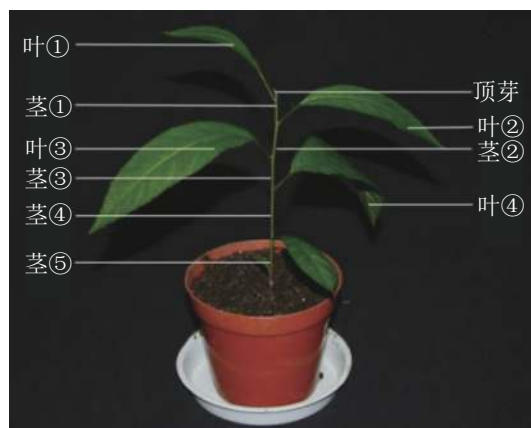
1.2 方法

1.2.1 处理后薄壳山核桃幼苗形态指标测定 处理 28 d 后测量植株高度、顶芽至第 1 叶节间长度和主根长度, 均用直尺测量, 保留 1 位小数。采用 SPSS 17.0 中的单因素方差分析对所有指标进行统计处理, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

1.2.2 赤霉素代谢关键基因的生物信息学分析 薄壳山核桃、山核桃 *Carya cathayensis* 和核桃 *Juglans regia* 的 *GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 均由浙江农林大学省部共建亚热带森林培育国家重点实验室张启香课题组克隆。从美国国家生物信息中心 (NCBI)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上分别搜索已报道的植物 *GA20ox*、*GA3ox*、*GA2ox* 同源基因的氨基酸序列, 通过软件 DNAMAN 进行氨基酸序列比对。利用 ITOL (<https://itol.embl.de/>) 和 MEGA 制作系统进化树。

1.2.3 赤霉素相关基因的时空表达分析 对处理 0、7、14、21 和 28 d 后植株的叶片进行采样, 用于基因不同时间表达变化; 基因不同空间表达变化采用处理 0 和 28 d 后植株的顶芽、叶①、茎①、叶②、茎②、叶③、茎③、叶④、茎④和根 (图 1)。样品采集后立即放入液氮, 总 RNA 的提取方法按照 RNAprep pure Plant Kit(北京天根) 及其说明书提供的方法进行。用 Prime Script™ RT Master Mix (TaKaRa 公司) 反转录合成 cDNA。

根据基因序列, 利用 Primer3Input(<http://primer3.ut.ee/>) 设计定量引物, 以山核桃 *Actin* 基因为内参, 引物序列见表 1。荧光定量 PCR 反应体系为 10.0 μL , 包含 cDNA 0.4 μL , TBGREEN (TaKaRa 公司) 5.0 μL , 正向引物 0.2 μL , 反向引物 0.2 μL , 双蒸水 4.2 μL 。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 31 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。数据分析采用 7300system 软件和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法, $\Delta\Delta C_t = (C_{t\text{靶基因}} - C_{t\text{内参}})_{\text{处理组}} - (C_{t\text{靶基因}} - C_{t\text{内参}})_{\text{对照组}}$ [23-24]。图表由 Excel 2007 软件制作。



顶芽至第 1 叶间为茎①, 第 2 叶至第 3 叶为茎②, 第 3 叶至第 4 叶为茎③, 第 4 至第 5 叶为茎④, 第 5 至根部为茎⑤

图 1 薄壳山核桃不同组织部位示意图

Figure 1 Schematic diagram of different tissues in *C. illinoensis*

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
RTCiGA20ox	GCACACCGACCCACAAATCATT	TGAGTTCGTGATCAGGTGGGACT
RTCiGA3ox	CACTCGAACAATTCCGCCAACT	TGCCCAAGGAGCCTAGCATTAG
RTCiGA2ox	CAGGTAGGTGGGCTTCAAGTGT	CCCGATGCAAGCAACTTTTGTA
CcActin	TGCGGGTGCTCGCTTCGGCAGC	GGGCAGCCAAGGATGACT

2 结果与分析

2.1 外源赤霉素处理对薄壳山核桃幼苗生长指标的影响

由图 2A 可知: 处理 28 d 后, 薄壳山核桃植株平均生长量达 2.9 cm, 对照组平均生长量仅为 1.5 cm, 处理后为对照的 1.93 倍, 差异极显著 ($P < 0.01$)。外源赤霉素可以有效刺激薄壳山核桃的营养生长, 显著促进了茎的生长。经过赤霉素处理后, 薄壳山核桃从顶芽至第 1 叶茎节间长度伸长量为对照的 1.14 倍, 差异显著 ($P < 0.05$), 但节的数量没有发生变化 (图 2B)。此外, 赤霉素对根系生长也有良好的促进作用。赤霉素处理 28 d 后薄壳山核桃主根伸长量是对照组的 1.09 倍, 差异显著 ($P < 0.05$) (图 2C)。

2.2 薄壳山核桃赤霉素代谢关键基因 *CiGA20ox*、*CiGA3ox* 和 *CiGA2ox* 的生物信息学分析

将 *CiGA20ox*、*CiGA3ox* 和 *CiGA2ox* 基因编码的氨基酸序列与 NCBI 数据库的 *GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 蛋白氨基酸序列进行比对分析 (图 3)。发现 *CiGA20ox* (图 3A)、*CiGA3ox* (图 3B) 和 *CiGA2ox*

Figure 3 Amino acid alignment of CiGA20ox, CiGA2ox, CiGA3ox and its closest homologues

(图 3C) 都有着相应的保守 20G-Fe II-Oxy 蛋白结构域, 以及 2-酮戊二酸结合位点和亚铁离子 (Fe^{2+}) 结合位点。说明 CiGA20ox、CiGA3ox 和 CiGA2ox 属于相应的赤霉素氧化酶家族。

在进化关系图 (图 4) 中, CiGA20ox、CiGA20ox 和 CiGA3ox 与山核桃和核桃的亲缘关系较近, 且与山核桃的亲缘关系最近。可见同科植物的 GA20ox、GA2ox 和 GA3ox 蛋白同源关系较近, 这与该蛋白的序列相似性分析结果相一致, 表明薄壳山核桃 GA20ox、GA2ox 和 GA3ox 蛋白在进化方面较为保守。

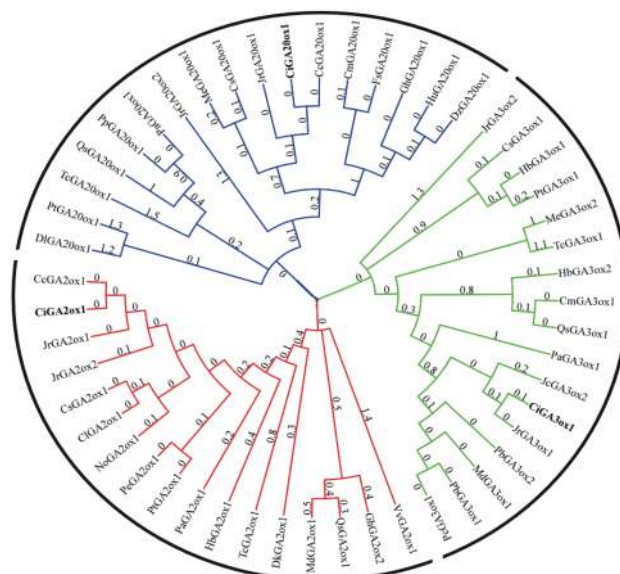
2.3 薄壳山核桃赤霉素代谢关键基因 CiGA20ox、CiGA3ox 和 CiGA2ox 表达的时间变化

对薄壳山核桃幼苗喷施 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素, 通过 qRT-PCR 检测并分析其在处理后不同时期 (0、7、14、21、28 d) CiGA20ox、CiGA3ox 和 CiGA2ox 的相对表达量特征。

定量结果显示: 喷施 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素可在短期内抑制 CiGA20ox 的转录。在前期, CiGA20ox 表达量相对平稳, 在处理 14 d 后, CiGA20ox 的表达量快速下降, 处理 21 d 后, 表达量为初始值的 59.1%, 之后持续缓慢下降, 28 d 后的表达量仅为初始值的 38.6% (图 5A)。

在赤霉素处理后 CiGA3ox 表达量呈先下降后上升的趋势。处理 7 d 后表达量到达最低点, 为对照的 48.6%, 之后缓慢升高, 于处理 21 d 后回升至处理前水平。后快速上升, 于处理 28 d 后到达顶点, 表达量为初始值的 350%。与 GA20ox 基因表达情况不同的是在赤霉素处理 21 d 后, GA3ox 表达量迅速提高到较高的水平, 可能是 GA3ox 在赤霉素质量浓度下降时起更重要的反调节作用, 以保持植物体内的赤霉素水平, 具体调控机制尚不明确 (图 5B)。

赤霉素代谢过程中的另一个关键酶 CiGA2ox 表达量总体则呈波浪形变化, 在 7 d 后达到顶峰, 之后缓慢下降, 14 d 后快速下降至 21 d 时恢复到了对照水平, 28 d 后再次上升为初始值的 220% (图 5C)。



Ci. *Carya illinoensis*; Jr. *Juglans regia*; Cc. *Carya cathayensis*; Tc. *Theobroma cacao*; Pt. *Populus trichocarpa*; Cs. *Camellia sinensis*; Cm. *Castanea mollissima*; Qs. *Quercus suber*; Pp. *Prunus persica*; Pa. *Prunus avium*; No. *Nerium oleander*; Md. *Malus domestica*; Hb. *Heveabrsilensis*; Me. *Manihot esculenta*; Vv. *Vitis vinifera*; Pe. *Populus euphratica*; Dk. *Diospyros kaki*; Pb. *Pyrus bretschneideri*

图 4 GA20ox、GA3ox 和 GA2ox 的系统进化树

Figure 4 An unrooted phylogenetic tree representing relationships of GA20ox, GA3ox and GA2ox

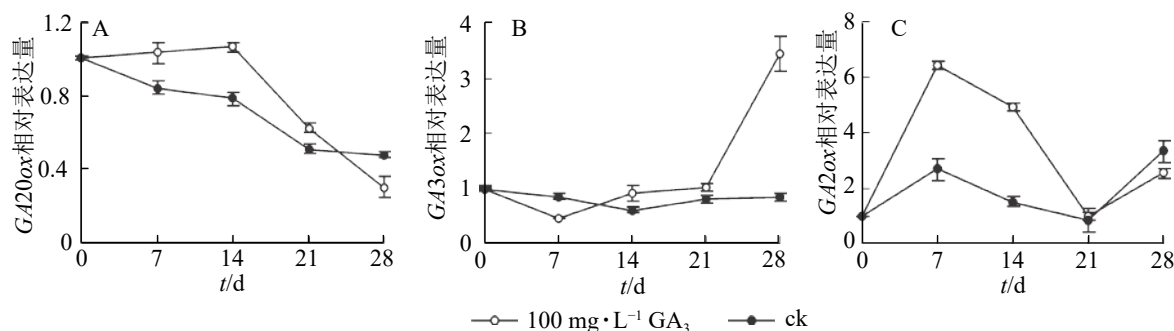


图 5 赤霉素处理后 CiGA20ox、CiGA3ox、CiGA2ox 基因转录水平的变化

Figure 5 Transcript levels of CiGA20ox, CiGA3ox, CiGA2ox after GA_3 treatments

2.4 薄壳山核桃赤霉素代谢关键基因 CiGA20ox、CiGA3ox 和 CiGA2ox 的空间变化

本研究通过 qRT-PCR 对薄壳山核桃幼苗不同部位赤霉素代谢关键基因 GA20ox、GA3ox 和 GA2ox 的相对表达量开展了研究。由植株上端至下端命名不同部位 (图 1)。

结果显示：薄壳山核桃 *GA20ox* 在不同部位均有表达，但是不同部位分布不均，主要分布在植株的顶芽、叶片和根内，分布规律大致为在叶片中是由顶芽向叶④逐渐递减，在茎中是由茎①至茎⑤逐渐递增（图 6A）。赤霉素处理过后，各个部位的 *GA20ox* 基因表达量均下降，说明在赤霉素处理 28 d 后，*CiGA20ox* 的各部位表达均受到了抑制，但是表达模式没有发生变化，顶芽中最多，其次是叶片内表达量大于茎秆中的表达量。

薄壳山核桃 *GA3ox* 基因表达量相对较少，存在组织特异性，主要集中在植株顶芽和茎中，在叶片中表达量较少（图 6B）。但是在外施赤霉素后可以发现：除了根部，*GA3ox* 在其他部位均有上升，而在茎中的增加量大于在叶片中的增加量。

薄壳山核桃 *GA2ox* 在各个部位均有分布，主要分布在薄壳山核桃的顶芽和叶片内，在茎秆部位几乎不表达（图 6C）。经过赤霉素处理后，*CiGA2ox* 在靠近植株顶端的茎中，相对含量发生了累积，而叶片中的 *GA2ox* 转录受到了抑制。

3 讨论

在本研究中，外施赤霉素使得薄壳山核桃茎秆伸长，植株增高，并且在一定程度上促进了主根系的生长。李俊南等^[25]用不同浓度的赤霉素浸泡薄壳山核桃种子后，增加了薄壳山核桃的发芽率，并且对薄壳山核桃幼苗的根茎影响较大。此外，刘芳等^[26]对甜樱桃 *Prunus avium* 外施赤霉素后，新梢生长量显著高于对照，但是调节新梢长度的影响主要体现在调节其节数，对平均节间长度的作用并不显著。这可能是植株新梢生长程度与植株整体并不一致造成的。

外施赤霉素使得薄壳山核桃幼苗内的赤霉素生物合成基因 *CiGA20ox* 和 *CiGA3ox* 表达量显著下调，而 *CiGA3ox* 的表达量在处理后期出现了升高的现象，可能是因为 *GA3ox* 作为赤霉素生物合成的最后一步，在赤霉素质量浓度骤然升高或降低时，*GA3ox* 起着更重要的反调节作用，从而维持植物体内赤霉素的平衡。该结果类似于赤霉素合成过程中的负反馈调节现象。而 *CiGA2ox* 则是呈现先上升后下降的波浪形趋势，说明在外源赤霉素的作用下，随着活性赤霉素物质的增加，*GA2ox* 表达量也在增加。郝鹏博^[27]在对桃树 *Prunus persica* 外施赤霉素后，桃树的 *GA20ox*、*GA3ox* 呈下降趋势，并于后期增加，*GA2ox* 则是呈先上调后下降的趋势，与本研究基本一致。这些结果均表现出赤霉素合成代谢酶 *GA20ox* 和 *GA3ox* 参与赤霉素负反馈调节，而 *GA2ox* 则是参与了正反馈调节。

本研究选取了薄壳山核桃的不同部位进行 qRT-PCR 分析，通过组织特异性分析发现：赤霉素合成相关基因 *CiGA20ox* 和 *CiGA3ox* 均在顶端大量表达，参与合成活性赤霉素；而调控赤霉素代谢的基因家族 *CiGA2ox* 在中部和顶部也高表达，表明薄壳山核桃顶部的生命活动最旺盛。外施赤霉素后，薄壳山核桃顶端维持的赤霉素稳定程度被打破，*CiGA20ox* 被抑制转录，*CiGA3ox* 大量生成调控了植株生长，而 *CiGA2ox* 在茎中表达量上升以降解体内过多的赤霉素，以达到稳定的状态保证植株稳定生长^[28]。而这些基因相对含量的变化都与植株生长有着一定的联系。

本研究通过对薄壳山核桃喷施 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 赤霉素，对薄壳山核桃赤霉素代谢关键基因 *GA20ox*、

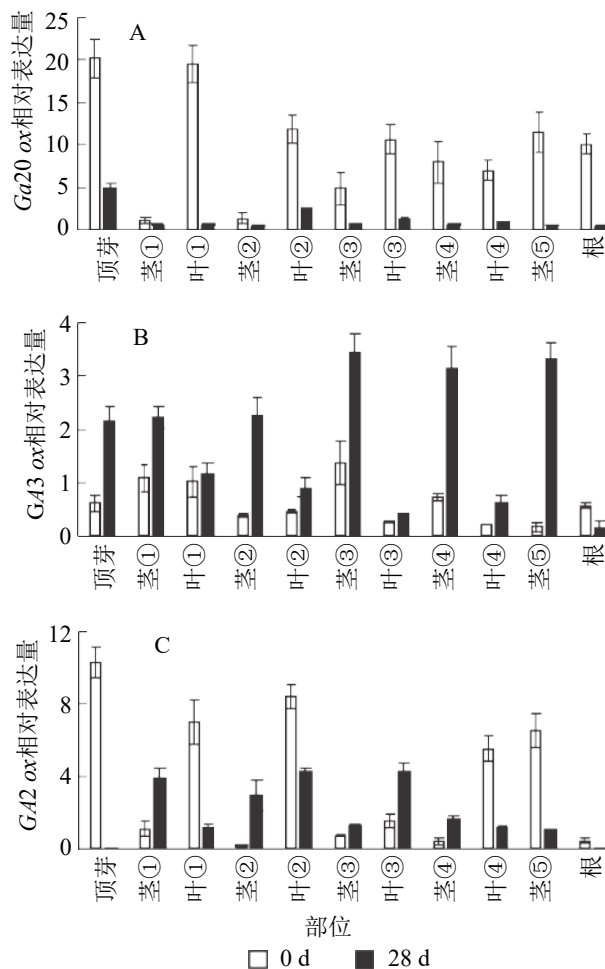


图 6 薄壳山核桃 *GA20ox*、*GA3ox* 和 *GA2ox* 在不同组织部位的表达量

Figure 6 Expression of *GA20ox*, *GA3ox* and *GA2ox* in different tissues in *C. illinoensis*

GA3ox 和 *GA2ox* 进行了系统深入研究, 为薄壳山核桃矮化分子育种提供了理论基础。目前, 张佳琦等^[29]通过农杆菌介导法构建核桃的 *GA2ox* 同源转化体系, 已经得到了核桃的矮化再生植株。薄壳山核桃和核桃亲缘关系较近, 可以通过转化矮化目的基因到植物体胚内, 以期得到薄壳山核桃良种矮化砧木。

4 参考文献

- [1] 王曼, 李贤忠, 宁德鲁, 等. 薄壳山核桃研究概况及发展趋势[J]. *林业调查规划*, 2009, **34**(6): 93 – 95.
WANG Man, LI Xianzhong, NING Delu, *et al.* The research summary and developmental trend of *Carya illinoensis* [J]. *For Inventory Plann*, 2009, **34**(6): 93 – 95.
- [2] 胡芳名, 谭晓风, 刘惠民. 中国主要经济树种栽培与利用[M]. 北京: 中国林业出版社, 2006.
- [3] 魏灵珠, 程建徽, 李琳, 等. 赤霉素生物合成与信号传递对植物株高的调控[J]. *生物工程学报*, 2012, **28**(2): 144 – 153.
WEI Lingzhu, CHENG Jianhui, LI Lin, *et al.* Regulation of plant height by gibberellins biosynthesis and signal transduction [J]. *Chin J Biotechnol*, 2012, **28**(2): 144 – 153.
- [4] GROOT S P C, KARSSSEN C M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants [J]. *Planta*, 1987, **171**(4): 525 – 531.
- [5] SUN Jikang, WANG Ping, ZHOU Tao, *et al.* Transcriptome analysis of the effects of shell removal and exogenous gibberellin on germination of zanthoxylum seeds[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 8521. doi: 10.1038/s41598-017-07424-0.
- [6] PENG Jianfeng, RICHARDS D E, HARTLEY N M, *et al.* ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators [J]. *Nature*, 1999, **400**(6741): 256 – 261.
- [7] SAKATA T, ODA S, TSUNAGA Y, *et al.* Reduction of gibberellin by low temperature disrupts pollen development in rice [J]. *Plant Physiol*, 2014, **164**(4): 2011 – 2019.
- [8] MUTASA-GOTTGENS E S, HEDDEN P. Gibberellin as a factor in floral regulatory networks [J]. *J Exp Bot*, 2009, **60**(7): 1979 – 1989.
- [9] RICHARDS D E, KING K E, AITALI T, *et al.* How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling [J]. *Ann Rev Plant Biol*, 2001, **52**: 67 – 88.
- [10] LANGE M J P, LANGE T. Gibberellin biosynthesis and the regulation of plant development [J]. *Plant Biol*, 2006, **8**(3): 281 – 290.
- [11] 陈晶晶, 胡玉林, 胡会刚, 等. 植物矮化相关基因的研究进展[J]. *广东农业科学*, 2014(15): 126 – 132.
CHEN Jingjing, HU Yulin, HU Huigang, *et al.* Research advances on dwarfing genes in plants [J]. *Guangdong Sci*, 2014(15): 126 – 132.
- [12] 高聪聪, 倪军, 陈茂盛, 等. 能源植物小桐子赤霉素合成代谢及信号转导相关基因的鉴定及序列分析[J]. *植物分类与资源学报*, 2015, **37**(2): 157 – 167.
GAO Congcong, NI Jun, CHEN Maosheng, *et al.* Characterization of genes involved in gibberellin metabolism and signaling pathway in the biofuel plant *Jatropha curcas* [J]. *Plant Diversity Resour*, 2015, **37**(2): 157 – 167.
- [13] 冯怡. 棉花 GA20-氧化酶基因 *GhGA20ox1* 超量表达及其对番茄果实发育的影响[D]. 重庆: 西南农业大学, 2005.
FENG Yi. *Overexpression of A Cotton GA 20-oxidase Gene(GhGA20ox1) and Its Effects on Tomato Fruit Development* [D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2005.
- [14] 邓伟, 吕立堂, 罗克明, 等. 棉花 GA20-氧化酶基因转毛白杨的研究[J]. *西北植物学报*, 2008, **28**(6): 1095 – 1100.
DENG Wei, LÜ Litang, LUO Keming, *et al.* Transformation of gibberellin 20-oxidase gene of cotton into Chinese white poplar [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2008, **28**(6): 1095 – 1100.
- [15] 王江英, 吴斌, 刘伟鑫, 等. 矮生山茶 ‘恨天高’ *GA20ox1* 的克隆及其对转基因烟草株形的影响[J]. *园艺学报*, 2015, **42**(8): 1523 – 1532.
WANG Jiangying, WU Bin, LIU Weixin, *et al.* Overexpression and silence expression of *CrGA20ox1* from *Camellia reticulata* ‘Hentiangao’ and its effect on plant forms in transgenic tobacco [J]. *Acta Horti Sin*, 2015, **42**(8): 1523 – 1532.
- [16] TAN Xin, YANG Hong, QIAO Dingjun, *et al.* Construction of siRNA plant expression vector interfered with GA20-oxidase and production of dwarf tobacco [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2008, **14**(1): 48 – 52.
- [17] 赵恺. 通过沉默 GA20-ox 基因获矮化苹果植株的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.

- ZHAO Kai. *Development of Dwarf Apple Plants via RNAi Suppression of GA20-ox Gene Expression*[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.
- [18] 刘颖, 阳文龙, 郭小丽, 等. Rht12 矮秆小麦 *GA3ox* 基因的克隆与表达分析[J]. 分子植物育种, 2015, **13**(2): 241 – 253.
- LIU Ying, YANG Wenlong, GUO Xiaoli, *et al.* Cloning and expression analysis of *GA3ox* genes from Rht12 dwarfing wheat [J]. *Mol Plant Breed*, 2015, **13**(2): 241 – 253.
- [19] ITO H, UEGUCHI-TANAKA M, SENTOKU N, *et al.* Cloning and functional analysis of two gibberellin 3 β -hydroxylase genes that are differently expressed during the growth of rice [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, **98**(15): 8909 – 8914.
- [20] HU Yingxiong, TAO Yanbin, XU Zengfu. Overexpression of *Jatropha* gibberellin 2-oxidase 6(*JcGA2ox6*) induces dwarfism and smaller leaves, flowers and fruits in *Arabidopsis* and *Jatropha* [J]. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 1 – 12.
- [21] 肖政, 李纪元, 范正琪, 等. 荔波连蕊茶 *GA2ox1* 基因的克隆及表达分析[J]. 林业科学研究, 2016, **29**(1): 41 – 47.
- XIAO Zheng, LI Jiyuan, FAN Zhengqi, *et al.* Cloning and expression analysis of *GA2ox1* gene from *Camellia lipoensis* [J]. *For Res*, 2016, **29**(1): 41 – 47.
- [22] 郭余龙, 邹世慧, 王会平, 等. 矮牵牛 3 个赤霉素 2-氧化酶基因的克隆及初步功能分析[J]. 农业生物技术学报, 2013, **21**(8): 940 – 948.
- GUO Yulong, ZOU Shihui, WANG Huiping, *et al.* Cloning and preliminary functional analysis of three gibberellin 2-oxidase genes in *Petunia hybrida* [J]. *J Agric Biotechnol*, 2013, **21**(8): 940 – 948.
- [23] 张计育, 佟兆国, 高志红, 等. SA、MeJA、ACC 和苹果轮纹病菌病原菌诱导湖北海棠 *MhWRKY1* 基因的表达[J]. 中国农业科学, 2011, **44**(5): 990 – 999.
- ZHANG Jiyu, TONG Zhaoguo, GAO Zhihong, *et al.* Expression of *MhWRKY1* gene induced by the elicitors SA, MeJA, ACC and the apple ring spot pathogen [J]. *Sci Agric Sin*, 2011, **44**(5): 990 – 999.
- [24] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method [J]. *Methods*, 2011, **25**(4): 402 – 408.
- [25] 李俊南, 熊新武, 习学良, 等. 植物激素对薄壳山核桃种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 经济林研究, 2013, **31**(1): 81 – 86.
- LI Junnan, XIONG Xinwu, XI Xueliang, *et al.* Effects of different hormones on seed germination and seedling growth in *Carya illinoensis* [J]. *Nonwood For Res*, 2013, **31**(1): 81 – 86.
- [26] 刘芳, 袁华招, 沈欣杰, 等. 外源 GA₃ 和 PP₃₃₃ 对甜樱桃新梢生长及赤霉素代谢关键基因表达的影响[J]. 核农学报, 2013, **27**(3): 272 – 278.
- LIU Fang, YUAN Huazhao, SHEN Xinjie, *et al.* Effects of GA₃ and PP₃₃₃ on shoot growth and gene expression of gibberellins metabolism in *Prunus avium* [J]. *J Nucl Agric Sci*, 2013, **27**(3): 272 – 278.
- [27] 郝鹏博. 外源赤霉素和多效唑对桃节间长度及赤霉素代谢基因表达影响[D]. 郑州: 河南农业大学, 2017.
- HAO Pengbo. *Effects of GA₃ and PBZ on Internode Length and Gene Expression of Gibberellins Metabolism in Peach(Prunus persica L.)*[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2017.
- [28] 叶家其, 张毓婷, 傅鹰, 等. 毛竹茎秆伸长过程中赤霉素生物合成、降解和信号转导关键基因的鉴定及表达分析[J]. 生物工程学报, 2019, **35**(4): 647 – 666.
- YE Jiaqi, ZHANG Yuting, FU Ying, *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of gibberellin biosynthesis, metabolism and signaling family genes in *Phyllostachys edulis* [J]. *Chin J Biotechnol*, 2019, **35**(4): 647 – 666.
- [29] 张佳琦, 胡恒康, 张启香, 等. 核桃 *JrGA2ox* 基因的克隆、亚细胞定位及功能验证[J]. 林业科学, 2019, **55**(2): 50 – 60.
- ZHANG Jiaqi, HU Hengkang, ZHANG Qixiang, *et al.* Cloning, subcellular localization and function verification of gibberellin 2-oxidase gene in walnut (*Juglans regia*) [J]. *Sci Silv Sin*, 2019, **55**(2): 50 – 60.