

唐菖蒲 *GhAOS* 基因的克隆与表达

连青龙¹ 韩昊君¹ 辛海波¹ 陈莉¹ 胡小燕¹ 何秀丽² 义鸣放¹

(1 中国农业大学观赏园艺与园林系 2 山东省乳山市农业局)

摘要: 丙二烯氧合酶(AOS)是茉莉酸(JA)生物合成途径中的关键酶,为深入研究AOS基因在唐菖蒲茉莉酸生物合成途径中的作用及唐菖蒲球茎膨大的分子机制,以唐菖蒲品种‘Rose Supreme’的球茎为试材,采用RT-PCR和RACE技术,克隆到了一个*GhAOS*的cDNA序列,序列内部含有一个1 533 bp的开放阅读框(ORF),编码510个氨基酸,推导的蛋白质分子质量为56.53 kD。组织特异性RT-PCR表达分析表明:*GhAOS*基因在唐菖蒲叶、花、根、匍匐茎、新球茎和籽球上都表达,而在叶和匍匐茎中表达量较高;经过不同浓度梯度的水杨酸(SA)0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L处理后,在唐菖蒲球茎中*GhAOS*基因的表达水平随着浓度的升高而降低。结果表明,*GhAOS*是一个新的AOS基因,SA抑制了该基因的表达,初步验证了SA与JA在信号途径中相互拮抗的作用。

关键词: 唐菖蒲;茉莉酸;丙二烯氧合酶;克隆;表达

中图分类号: S682.2⁴ 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2011)02-0077-07

LIAN Qing-long¹; HAN Hao-jun¹; XIN Hai-bo¹; CHEN Li¹; HU Xiao-yan¹; HE Xiu-li²; YI Ming-fang¹.

Cloning and expression of *GhAOS* gene from *Gladiolus hybridus*. *Journal of Beijing Forestry University* (2011)33(2)77-83 [Ch, 23 ref.]

1 Department of Ornamental Horticulture and Landscape Architecture, China Agricultural University, Beijing, 100193, P. R. China;

2 Agriculture Bureau of Rushan, Shandong Province, 264500, P. R. China.

As a key enzyme, allene oxide synthase (AOS) plays an important role in the biosynthesis of jasmonic acid (JA). In order to study its function in the process and molecular mechanism of corm expansion for *Gladiolus hybridus*, a full-length cDNA of *GhAOS*, containing a 1 533 bp open reading frame (ORF) encoding 510 putative amino acids with a calculated protein molecular weight of 56.53 kD, was cloned from the corms of *G. hybridus* ‘Rose Supreme’ through RT-PCR and RACE technologies. The tissue-specific expression analysis using RT-PCR showed that the *GhAOS* was expressed in leaves, stolons, flowers, roots, corms and cormels. Moreover, its RNA level was higher in leaves and stolons. In corms, the expression level of *GhAOS* decreased with the increasing concentrations of salicylic acid (SA) from 0, 0.1, 0.5, 1.0 to 2.0 mmol/L. In summary, results indicate that *GhAOS* is a novel AOS gene and repressed by SA in mRNA level, which primarily verifies the antagonistic interaction between SA and JA in signaling pathways.

Key words *Gladiolus hybridus*; jasmonic acid; allene oxide synthase; cloning; expression

茉莉酸(jasmonic acid, JA)及其茉莉酸类化合物(jasmonates JAs),最早是作为生长抑制剂分离得到的,现在已经发现它们参与植物生长的多种生理过程,如抑制植物生长、抑制花粉粒萌发、促进叶片衰老、促进果实成熟和衰老、诱导块茎形成、诱导卷

须卷曲、促进气孔关闭等^[1]。

JAs是由脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)途径,经过LOX和丙二烯氧合酶(allene oxide synthase, AOS)等一系列酶促反应形成的。植物细胞膜中的脂类物质(如磷脂等)在脂酶作用下,经水解释放游

收稿日期:2010-04-24

基金项目:农业部行业科技项目(200903020)。

第一作者:连青龙,博士生。主要研究方向:花卉栽培生理与分子生物学。电话:010-62733817 Email: qinglong_lian@163.com 地址:100193 北京市海淀区圆明园西路2号中国农业大学观赏园艺与园林系。

责任作者:义鸣放,教授。主要研究方向:花卉栽培生理与分子生物学。电话:010-62733817 Email: ymfang@cau.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://www.bjfujournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

离脂肪酸,其中亚麻酸和亚油酸可作为 LOX 的底物,氧化产生脂肪酸氢过氧化物,然后在 AOS 催化下生成 12,13-环氧亚麻酸,然后再经过一系列的最终形成 JAs。AOS 与 LOX 一样,在膜脂过氧化系统、植物的生长发育进程中起着很重要的调节作用。AOS 的作用产物正好是 LOX 的反应底物,即 AOS 在 JA 合成途径中位于 LOX 的上游区域,并且, AOS 活性与其他一些成熟衰老或生长发育的相关因子如 LOX、自由基等的变化是一致的。因此,除 LOX 外, AOS 也是植物 LOX 途径中的一个特征酶和关键酶,在 JA 生物合成过程中起着重要作用^[2-4]。

从功能上讲, AOS 基因的启动子可以被一些信号激活,包括 JA、OPDA 和创伤等,这预示 AOS 蛋白的表达对 JA 信号可能起着主要的调控作用,并与防御基因的激活密切相关^[4-5]。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中,伤诱导 2 h 后就可以在花组织中检测到 AOS 的转录^[6],而 AOS 在拟南芥中的过量表达并没有改变 JA 的基础含量。但当转基因植株受到伤诱导后,JA 的含量比对照大幅提高^[7],这表明伤诱导产生的 JA 更多地受到 AOS 底物供应的调控,而不是受到 AOS 蛋白量的调控,亚麻酸从叶绿体脂质上的释放可能比 AOS 的作用更重要。相反, AOS 基因在马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 中的表达则增加了内源 JA 的含量。Harms 等^[8]发现在马铃薯中转入亚麻 (*Linum usitatissimum*) 的 AOS cDNA,其内源 JA 含量比未转基因的植株高 8~12 倍,正常植株中 JA 的含量也取决于 AOS 酶的活性,并认为 AOS 是 JA 生物合成中主要的限速酶,表明马铃薯中 AOS 作用的底物浓度并没有限制 JA 的合成。同时,JA 及其 OPDA 以剂量效应方式刺激 AOS 基因的表达^[9],而乙酰水杨酸 (acetylsalicylic acid) 等则可以通过抑制 AOS 的作用阻断 JAs 的合成^[10-11]。

许多研究中发现,水杨酸 (salicylic acid, SA) 途径信号干扰 JA 和乙烯 (ethylene, ET) 信号在防御反应中的作用,表现在抑制 JA 和乙烯响应基因。此外,通过 *NIMI/NPRI* 突变阻遏 SA 信号转导或水杨酸酯水解酶表达受抑制,都导致对 JA 反应超敏^[12-13]。反之,JA 途径的活性能抑制 SA 反应的诱导,包括 *PR* 基因表达和 SAR (systemic acquired resistance)。尽管许多 SA 和 JA 反应表现相互拮抗,但有些基因也被这 2 种化合物共同诱导,说明了防御反应路径网络的复杂性。并且,JA 在植物发育中的作用高度依赖于与其他生长调节物质的交互,这一点越来越清楚。尽管这些相互作用有复杂性,但是一个有意思的特点是 JAs 可以作为发育和防御

中的双重调控因子^[14-15]。

研究表明, JAs 对植物地下变态器官的形成具有重要的作用。JAs 对离体马铃薯、薯蓣 (*Dioscorea opposita*)、菊芋 (*Helianthus tuberosus*) 的块茎形成和甘薯 (*Ipomoea batatas*) 的块根以及大蒜 (*Allium sativum*)、洋葱 (*Allium cepa*) 的鳞茎形成具有显著的促进效应,并且已从这些材料中分离出 JA^[16]。JA 及茉莉酸甲酯 (methyl jasmonate, MJ) 均可诱导离体条件下马铃薯块茎的形成和马铃薯髓部细胞的膨大,其在微管重排、细胞扩大、块茎膨大中发挥着重要作用^[17]。

唐菖蒲 (*Gladiolus hybridus*) 为鸢尾科 (Iridaceae) 唐菖蒲属植物,是世界著名的“四大切花”之一,在我国广泛栽培。但实际生产中种性退化问题突出,严重制约了生产切花的品质。唐菖蒲大部分种类都可以形成或大或小的籽球,自然条件下匍匐茎顶端产生的小籽球种性退化程度低,是目前唐菖蒲种球的唯一商品化繁殖材料。因此探明唐菖蒲球茎形态发生机制,以提高形成种球生产可用的籽球数量和质量,对我国唐菖蒲良种繁育和种球商品化生产有着重要的理论和实践指导意义。

根据作者所在课题组前期研究发现,在离体条件下,经过 MJ 处理后唐菖蒲的结球率、球茎质量和直径明显升高,促进了唐菖蒲球茎的形成和膨大,并且显著提高了 JA 生物合成关键酶 LOX 的活性^[18-20]。这一发现对唐菖蒲的球茎形成机理研究有着重要意义。作为唐菖蒲茉莉酸生物合成的另一关键酶——AOS 是否对茉莉酸及其化合物的合成起着限速步骤的作用,它的表达对调控唐菖蒲茉莉酸的生物合成是否有重要作用? SA 与 JA 信号途径间具有相互拮抗的作用,作为 JA 生物合成途径中的关键酶基因 AOS 是否受 SA 的影响? 相关研究还未见报道。为此,本研究克隆了唐菖蒲茉莉酸生物合成关键酶基因 AOS 的 cDNA 全长序列,并初步对其表达进行了分析,旨在为该基因调控唐菖蒲茉莉酸及其化合物的生物合成,进而探讨 AOS 在唐菖蒲球茎形成过程中的生理功能提供依据,并为进一步深入研究 AOS 基因的功能及其调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

所用材料为唐菖蒲品种 ‘Rose Supreme’,种球购自辽宁省金城园艺试验场,种球周径为 10~12 cm;于 2009 年 4 月初种植在中国农业大学科学园中。组培球茎是由 2008 年大田收获的籽球为外植

体培养而成,收获的籽球在 4 °C 冰箱中贮存。*AOS* 基因的分离是以组培球茎为材料,RT-PCR 表达分析用的叶、根、新球为组培苗,花为 2009 年 7 月中旬在大田中采得,匍匐茎和籽球为 2009 年 8 月中旬在大田中采得。

1.2 RNA 的提取及反转录反应

唐菖蒲新球和籽球 RNA 的分离采用 MyLab 通用型 RNA 快速提取试剂盒;叶、花和根采用百泰克 RNAPure 高纯总 RNA 快速提取试剂盒;匍匐茎采用北京强欣博瑞生物技术有限公司生产的 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒。DEPC 水溶解 RNA,用分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 数值,根据 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值判断 RNA 的质量,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

cDNA 反转录按照 Promega 的 M-MLV Reverse Transcriptase 说明书进行。*AOS* 5'端 cDNA 的合成按照 TaKaRa 公司的 5'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行。

cDNA 合成及 PCR 反应所用引物见表 1。

表 1 反转录和 PCR 扩增引物

Tab. 1 Primers applied in the reverse transcription and PCR amplification

引物	序列
PF1	TTCACCGGHACYTWCATGCC
PF2	GCGGTCCACAACATCCTCTTC
PF3	AGGTGACGATGAAATCGATGGAG
PF4	CGCGTCGACATGGCATCCTTCTCTCCGT
PF5	CTTCTCTCCGTCTCTCTCT
PR1	GGYTGGTAVCCGAAHAGCAT
PR2	CTCGAGCGAGTCGAAGAGTT
PR3	GATGGAGTGGAGGGTGAGGTCTTCT
PR4	GTGACTATAGGAGCCAGCTG
PR5	AACTGCAGTCAAAAAGCTCGCCGGCTT
PR6	CTTCACGATATTCGGTCCCT
AP1	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAG CTCAAGC(T)17
AP2	CCAGTGAGCAGACTGACC
AP3	GAGGACTCGAGCTCAAGC
<i>ACTIN</i> For	GCTATTCTTCTGATCGACCTTG
<i>ACTIN</i> Rev	AACATTGTGCTCAGCGGTGG
5'RACE Outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5'RACE Inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATC AGTCGATG

1.3 唐菖蒲 *AOS* 基因保守片段的克隆

根据 GenBank 核酸数据库中报道的拟南芥 (NM_123629)、烟草 (*Nicotiana tabacum*, AJ295274)、水稻 (*Oryza sativa*, EU090801)、马铃薯 (AY135640)、玉米 (*Zea mays*, AY488135)、大麦 (*Hordeum vulgare*, AJ250864) 等 *AOS* 基因的 mRNA 序列,通过 DNAMAN 软件进行同源比对并设计保守区兼并引物 PF1 和

PR1。PCR 反应程序为:94 °C 变性 4 min,94 °C 变性 45 s,52 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 90 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。

1.4 唐菖蒲 *AOS* 基因 3'端与 5'端的克隆

对于基因 3'端序列克隆,根据已克隆的唐菖蒲 *AOS* 基因保守区片段设计 2 条 3' RACE 上游引物 PF2 和 PF3,以 AP1 为反转录引物进行反转录,进行巢式 PCR 扩增。第一轮 PCR 反应引物用 PF2 和接头引物 AP2,94 °C 变性 4 min,94 °C 变性 45 s,56 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。取第一轮产物 1 μL 进行第二轮反应,引物为 PF3 和接头引物 AP3,94 °C 变性 4 min,94 °C 变性 45 s,58 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 50 s,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。

对于基因 5'序列信息的获取(具体按照 TaKaRa 公司的 5'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行),采用引物 PR2 进行反转录,第一轮 PCR 反应引物用 5' RACE Outer primer 和特异引物 PR3。94 °C 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 延伸 10 min。取第一轮产物 1 μL 进行第二轮反应,引物为 5' RACE Inner primer 和特异引物 PR4。94 °C 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 延伸 10 min。

1.5 唐菖蒲 *AOS* 基因全长的克隆

应用 DNAMAN 对 *AOS* 基因的 3'端和 5'端序列进行拼接,并在 NCBI 网站上预测其 ORF。根据 ORF 两端序列设计特异引物 PF4 和 PR5 扩增该基因的编码区序列(CDS),并在上游引物 5'端和下游引物 3'端分别设计 *Sal* I 和 *Pst* I 限制性内切酶酶切位点。PCR 反应程序为:94 °C 变性 4 min,94 °C 变性 45 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 2 min,35 个循环,72 °C 延伸 10 min。

1.6 序列测定

将所有 PCR 产物凝胶电泳后回收目的片段,与 PMD18-T 载体连接并转化 DH5α,重组质粒鉴定后送北京华大基因公司进行测序。

1.7 RT-PCR 的表达分析

采用半定量 RT-PCR 方法研究 *GhAOS* 在叶、花、根、匍匐茎、新球茎和籽球不同组织器官的表达模式,以及组培新球茎在 0、0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L SA 溶液处理后的表达情况。以 *ACTIN* 基因作为内参,调整不同处理的模板用量,使模板用量尽可能一致。用基因特异引物 PF5 和 PR6,在固定模板量的情况下进行 PCR 反应,检测基因的相对表达量。*ACTIN* 退火温度 55 °C,25 个循环,*GhAOS* 退火温度 55 °C,30 个循环。每组处理重复 3 次,用凝胶成像

软件量化图片中 PCR 产物,文中显示具有代表性的一组电泳图片。

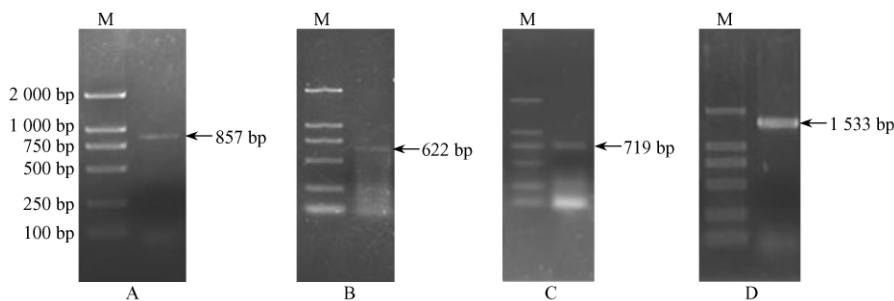
2 结果与分析

2.1 唐菖蒲 AOS 基因 cDNA 片段的克隆

以唐菖蒲组培球茎提取 RNA 反转录的 cDNA 为模板,以兼并引物 PF1 和 PR1 为引物,进行保守区的 PCR 扩增(图 1A),经测序其核苷酸序列大小为 857 bp。根据该保守区片段,利用 2 条 3'RACE 上游引物 PF2 和 PF3,进行 2 轮 PCR 扩增,测序结

果表明该 3'RACE 产物大小为 622 bp(图 1B)。结合保守区片段设计 2 条下游引物,用基因特异引物 PR2 进行逆转录,PR3 和 PR4 分别进行 5'端第一轮和第二轮 PCR 扩增,经测序该 5'端核苷酸序列大小为 719 bp(图 1C)。

使用 DNAMAN 把中间片段序列、3'端以及 5'端序列进行拼接,得到全长 1 699 bp 的全长 AOS 基因序列,预测其 ORF,并设计上下游引物 PF4 和 PR5 PCR 扩增该基因的编码区序列(CDS),得到 AOS 基因的 CDS 1 533 bp(图 1D)。



A. 中间片段产物; B. 3'RACE 产物; C. 5'RACE 产物; D. CDS 产物; M. DL 2 000 marker

图 1 PCR 产物检测

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of PCR products

2.2 唐菖蒲 AOS 序列分析

对唐菖蒲 AOS 基因的全长序列进行分析得知,该基因全长 1 699 bp,包含一个编码 510 个氨基酸的开放阅读框 1 533 bp,3'UTR 和 5'UTR 分别为 149 和 17 bp。将其核酸序列提交 NCBI 在线比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),将同源性较高和研究相对较多的候选序列下载,使用 DNAMAN 将唐菖蒲 AOS 核酸序列与这些序列进行比对。结果表明,唐菖蒲 AOS 与单子叶植物水稻 AOS(EU090801.1)的同源性最高,达到 64.8%,与甜橙(*Citrus sinensis*) AOS (AY243478.1)次之,同源性为 63.9%,与研究相对较多的拟南芥、马铃薯以及番茄(*Lycopersicon esculentum*) AOS (NM_123629.3,

AY135640.1,AF230371.1)的同源性分别为 59.8%、59.7% 和 59.1%。

从氨基酸序列系统进化树(图 2)可以看出:推定的唐菖蒲与水稻的同源性最高为 61.1%,其次为大豆(*Glycine max*) (ABB91777 60.7%,见图 3);与研究相对较多的番茄、拟南芥以及马铃薯的同源性分别为 56.7%、56.5% 和 58.1%。系统进化树分析也表明该基因与水稻等单子叶植物的亲缘关系最近,而与其他双子叶植物的亲缘关系相对较远(图 2)。结合核酸序列比对结果,本试验中克隆到的基因序列确定为唐菖蒲 AOS 基因序列,将其命名为 GhAOS。利用 ExPASyD 分析唐菖蒲 GhAOS 基因,推导的蛋白质分子质量为 56.53 kD,等电点 6.62。图

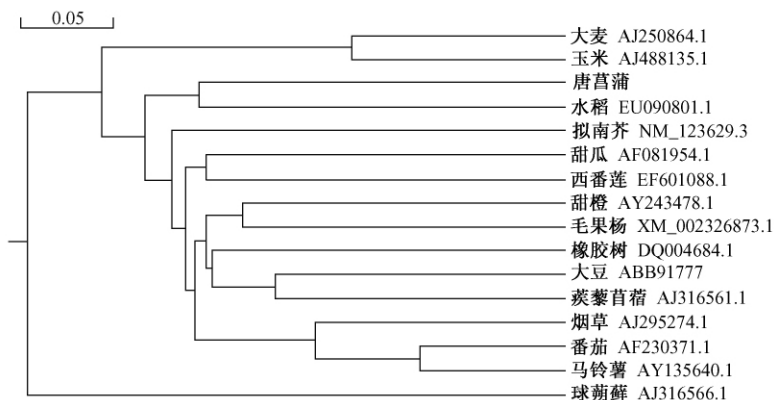
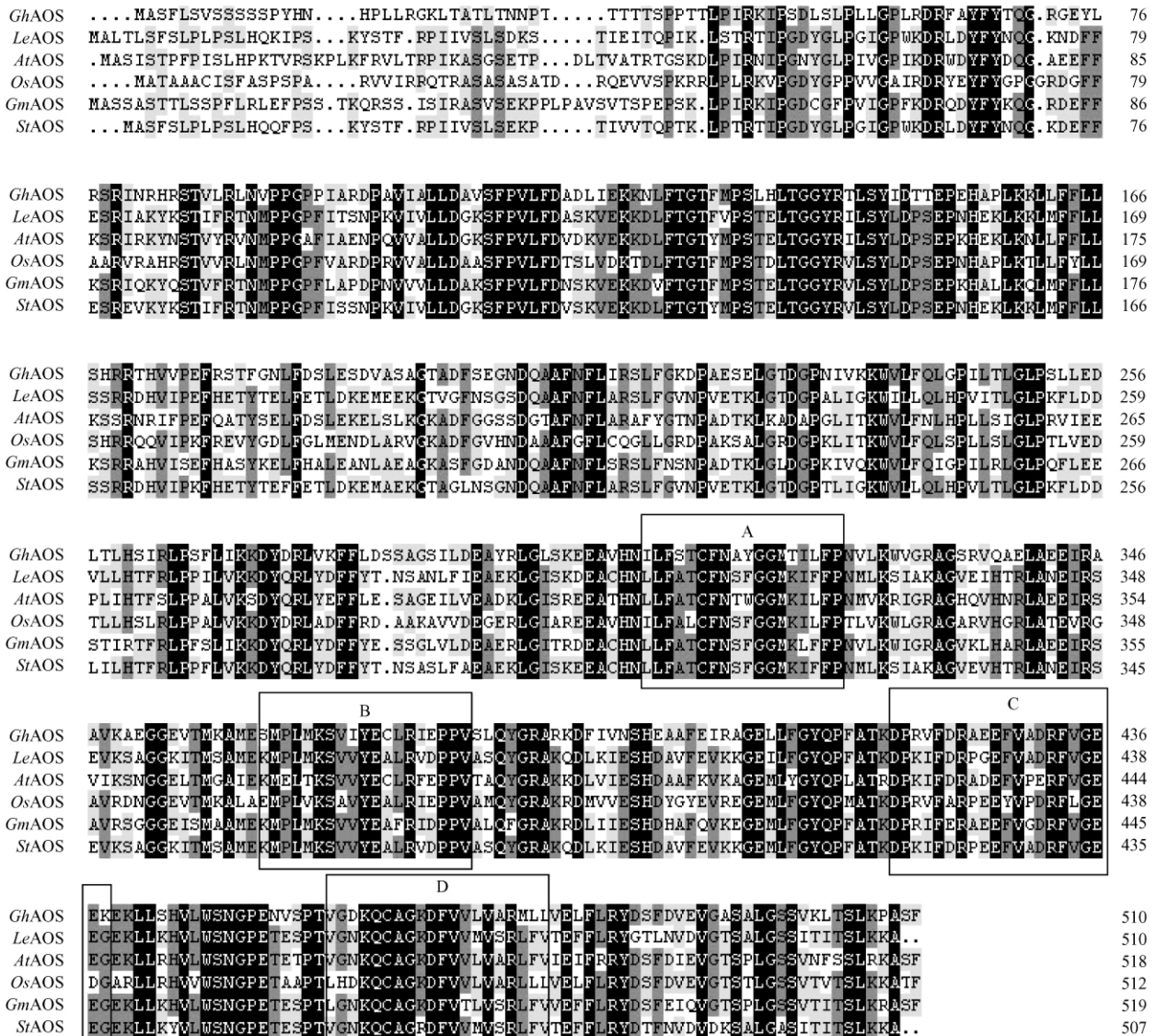


图 2 GhAOS 与其他已克隆的 AOS 类蛋白序列的系统进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of GhAOS and other AOS-type protein sequences

3 和图 4 A ~ D 显示的是 4 个具有构成细胞色素 P450 特征的结构域。唐菖蒲与番茄、拟南芥、水稻、大豆以及马铃薯的 AOS 细胞色素 P450 结构域序列

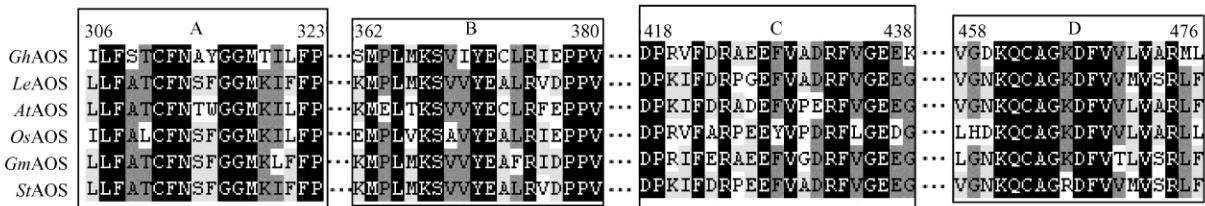
同源性分别为 71.8%、74.4%、74.4%、70.5% 和 71.8% (图 4)。



Gh. 唐菖蒲; *Le.* 番茄; *At.* 拟南芥; *Os.* 水稻; *Gm.* 大豆; *St.* 马铃薯

图 3 唐菖蒲与几种植物 AOS 序列蛋白氨基酸序列同源性比较

Fig. 3 Homology comparison of amino acid sequence of *G. hybridus* AOS with other plants



Gh. 唐菖蒲; *Le.* 番茄; *At.* 拟南芥; *Os.* 水稻; *Gm.* 大豆; *St.* 马铃薯

图 4 6 个植物中构成 CytP450 特征结构域的 AOS 蛋白质序列同源比对

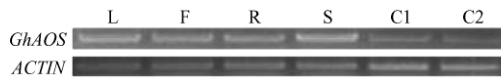
Fig. 4 Homology comparison of AOS protein sequences constituting the CytP450 domains in six plants

2.3 唐菖蒲 *GhAOS* 在不同组织的 RT-PCR 表达分析

采用 RT-PCR 法,对唐菖蒲的叶、花、根、匍匐

茎、新球茎、籽球进行相对定量表达分析。从图 5 可以看出,在内参 *ACTIN* 扩增产物比较一致的情况下,*GhAOS* 在叶、花、根、匍匐茎、新球、籽球组织里

都有表达,而在叶和匍匐茎中的表达量较高。进一步证明了 AOS 在植物组织中普遍存在,但主要存在于植物的叶中。而作为唐菖蒲籽球最初形成部位的匍匐茎其 AOS 基因也大量表达,这可能是由于在籽球形成初期,AOS 大量聚集在匍匐茎中,以利于茉莉酸的生物合成,促进唐菖蒲籽球的形成与膨大。



L. 叶; F. 花; R. 根; S. 匍匐茎; C1. 新球; C2. 籽球

图5 唐菖蒲 *GhAOS* 在不同组织中表达情况

Fig.5 *GhAOS* expression in various tissues of *G. hybridus*

2.4 不同浓度水杨酸处理的唐菖蒲组培球茎中 *GhAOS* 的 RT-PCR 表达分析

从图6可以看出:在不同浓度的 SA 处理后,随着 SA 浓度的增加,*GhAOS* 在唐菖蒲组培球茎的表达量随之减少;在 0.1~0.5 mmol/L 浓度下 *GhAOS* 表达量较对照没有明显变化,但当 SA 浓度达到 1.0 mmol/L 以上时,*GhAOS* 表达量明显减少。结果表明,SA 抑制了 JA 响应基因 AOS 的表达,这可能和 SA 与 JA 的信号途径相互抑制有关,SA 干扰了 JA 生物合成关键酶 AOS mRNA 的积累,降低了 AOS 的转录水平。

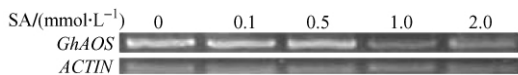


图6 唐菖蒲球茎在不同浓度 SA 处理下 *GhAOS* 的表达情况

Fig.6 *GhAOS* expression in the corms of

G. hybridus with different concentrations of SA

3 结论与讨论

在过去的十几年里,许多研究已经鉴定出几乎所有编码 JA 生物合成相关酶的基因。多数工作利用传统生化方法纯化酶,接着利用适当的分子技术鉴定相应的 cDNAs。异源表达系统,通常用大肠杆菌,也已用来验证 cDNA 产物的酶活性,并且确定这些酶的底物特异性和动力学参数。这些方法分别成功用于亚麻、番茄、拟南芥中,并首次鉴定 AOS、AOC 和 OPR 等的 cDNAs^[21-22]。

本研究得到了一个唐菖蒲 AOS cDNA 的全长序列,编码一个分子质量为 56.53 kD 的 510 个氨基酸的多肽。AOS 属于细胞色素 P450 酶类,命名为 CYP74。图3和图4A~D显示的是6个植物典型的 CytP450 特征性结构域,且都位于 *GhAOS* 的 C-端。由于 CytP450 的区域是 AOS 的密码区,所以唐菖蒲、番茄、拟南芥、水稻、大豆和马铃薯等在这一区域具有更大的相似性。经过几种植物 AOS 蛋白质序

列的 CytP450 特征性结构域同源比对发现,其同源性可达 70% 以上(图4)。而且,CytP450 酶类中 3/4 的氨基酸残基保留下来,正好是 AOS 的密码区^[23]。

AOS 在植物组织中普遍存在,在成熟的拟南芥不同器官中,AOS 主要存在于叶和花器中,以叶中为主,且老叶比新叶的含量高,而根、茎、种子中含量很少^[4]。Harms 等^[9]测得在亚麻种子、根茎、老叶、嫩叶和花芽中都存在 AOS mRNA,且以种子中含量高。在本研究中,唐菖蒲 AOS 基因在叶、花、根、匍匐茎、新球和籽球中皆有表达,在叶和匍匐茎中表达量较高,而在新球和籽球中表达量相对较低。由于 *GhAOS* 表达的时空局限性,所以可能导致 AOS 在不同植物、同一植物的不同组织、同一组织不同的时期以及不同的实验方法所得结果不尽相同。但对于唐菖蒲 AOS 在各个组织上的活性还不是很清楚,需要进一步探讨。

本研究经过 SA 处理后的唐菖蒲球茎中 AOS 基因的表达量明显降低,且随着浓度的增加其表达量显著降低,结果与 Pan 等^[10]的研究相一致,Pan 等认为 SA 是 AOS 的竞争性抑制剂,阻碍 12-oxo-PDA 和 JA 的形成。Sivasankar 等^[5]在番茄幼苗中研究 SA 对 AOS 表达的影响,结果表明,即使在诱导条件下(系统素、OPDA 或 MeJA),SA 也能降低 AOS 的转录水平,并抑制其诱导期的出现。Harms 等^[9]在受机械伤害的亚麻酸叶片中发现,用 SA 或 Asp 预处理不影响伤诱导的 AOS 活性和 12-oxo-PDA 的形成,而是抑制 AOS mRNA 的积累,降低 AOS 的转录水平。在过去的几十年中,对 AOS 的认识已取得重大的进展,但仍有许多问题需要继续研究探讨。例如:虽然 AOS 在 JA 生物合成中的作用已经初步确立,但 AOS 与其他物质及其相关因子,尤其是与植物地下变态器官形成的关系仍需要在更广的范围内进行深入研究。本研究将继续深入研究 *GhAOS* 的基因功能,并通过转基因技术进一步探讨 *GhAOS* 在调控唐菖蒲茉莉酸及其化合物的生物合成中的作用,进而探讨 AOS 在唐菖蒲球茎形成过程中的生理功能。

参 考 文 献

- [1] CASTRO G, KRAUS T, ABDALA G. Endogenous jasmonic acid and radial cell expansion in buds of potato tubers [J]. *J Plant Physiol*, 1999, 155: 706-710.
- [2] HAMBERG M, GARDNER H W. Oxylin pathway to jasmonates: Biochemistry and biological significance [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1165(1): 1-18.
- [3] LAUDERT D, PFANNSCHMIDT U, LOTTSPEICH F, et al. Cloning molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31(2): 323-335.

- [4] LAUDERT D , WEILER E W. Allene oxide synthase: A major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling [J]. *Plant J* ,1998 ,15 (5) :675-684.
- [5] SIVASANKAR S ,SHELDRIK B ,ROTHSTEIN S J. Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato [J]. *Plant Physiol* 2000 ,122 (4) :1335-1342.
- [6] KUBIGSTELTIG I ,LAUDERT D ,WEILER E W. Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene [J]. *Planta* ,1999 ,208 : 463-471.
- [7] LAUDERT D , SCHALLER F , WEILER E W. Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase [J]. *Planta* 2000 ,211:163-165.
- [8] HARMS K , ATZORN R ,BRASH A , *et al.* Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation JA-respondin gene [J]. *Plant Cell* , 1995 ,7: 1645-1654.
- [9] HARMS K ,RAMIREZ I , PENA-CÓRTEZ H. Inhibition of wound-induced accumulation of allene oxide synthase transcripts in flax leaves by aspirin and salicylic acid [J]. *Plant Physiol* , 1998 ,118:1057-1065.
- [10] PAN Z ,CAMARA B ,GARDNER H W , *et al.* Aspirin inhibition and acetylation of the plant cytochrome P450 , allene oxide synthase , resembles that of animal prostaglandin endoperoxide H synthase [J]. *J Biol Chem* ,1998 ,273 (29) :18139-18145.
- [11] PENA-CORTES H , ALBRECHT T , PRAT S , *et al.* Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis [J]. *Planta* , 1993 ,191: 123-128.
- [12] FEYS B J ,PARK J E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance [J]. *Trends in Genetics* ,2000 ,16 (10) : 449-455.
- [13] KUKEL B N ,BROOKS D M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense [J]. *Curr Opin Plant Biol* ,2002 ,5 (4) :325-331.
- [14] CREELMAN R A ,MULLET J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* ,1997 ,48:355-381.
- [15] LI L ,LI C ,HOWE G A. Genetic analysis of wound signaling in tomato. Evidence for a dual role of jasmonic acid in defense and female fertility [J]. *Plant Physiol* 2001 ,127 (4) :1414-1417.
- [16] 甘立军 ,曾晓春 ,周燮. 茉莉酸类与植物地下贮藏器官的形成 [J]. *植物学通报* ,2001 ,18 (5) : 546-553.
- [17] KODA Y. Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events [J]. *Physiol Plant* ,1997 , 100 (3) : 639-646.
- [18] 何秀丽 ,苑智华 ,义鸣放 ,等. 脂氧合酶对唐菖蒲籽球形成和膨大的影响 [J]. *园艺学报* ,2008 ,35 (1) : 87-93.
- [19] 何秀丽 ,张智乾 ,义鸣放 ,等. SHAM 和 MJ 对唐菖蒲试管结球的影响 [J]. *园艺学报* ,2008 ,35 (5) : 707-714.
- [20] HE X L ,SHI L W ,YI M F , *et al.* Effects of lipoxygenase on the corm formation and enlargement in *Gladiolus hybridus* [J]. *Scientia Horticulturae* 2008 ,118:60-69.
- [21] SCHALLER F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules [J]. *J Exp Bot* ,2001 ,52 (354) : 11-23.
- [22] WASTERNAK C ,HAUSE B. Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2002 ,72:165-221.
- [23] MUELLER M J. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis [J]. *Physiol Plant* ,1997 ,100 (3) :653-663.

(责任编辑 董晓燕)