

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

王 满, 金 灿, 许 雪, 宗 成 文, 曹 后 男

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133000)

摘 要:以梨极矮化突变体和苹果梨为试材,应用 RT-PCR 技术对 *GA20ox* 基因进行克隆及序列分析。结果表明:克隆得到梨极矮化突变体和苹果梨 *GA20*-氧化酶基因,依次命名为 *Pu-GA20ox* 和 *PbGA20ox*,其全长均为 1 179 bp,分别包含 1 个完整编码 392 个氨基酸的开放阅读框(ORF);对其进行序列分析,并成功构建了植物表达载体,为进一步研究梨矮化突变体和 *GA20*-氧化酶基因功能奠定了基础。

关键词:梨极矮化突变体;*GA20*-氧化酶基因;克隆;序列分析;植物表达载体

中图分类号:S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0089-06

赤霉素(Gibberellic acid, GA)是一类广泛存在于植物整个生命周期的内源激素之一,在高等生物不同的生长和发育阶段都起着十分重要的调控作用,如种子的萌发,茎的伸长和花的发育等^[1]。张超等^[2]研究表明植物矮化突变与植物赤霉素和油菜素类固醇有关,少数植物矮化与生长素有关。GA 的生物合成受到许多酶的调控作用,研究结果已经证实 *GA20*-氧化酶是高等植物体内最重要的 GAs 代谢调控中心之一。该酶能够催化 $GA_{12} \rightarrow GA_9$ 及 $GA_{53} \rightarrow GA_{20}$ 过程中的多步氧化反应,能够将生物活性低的 GAs 转化生成生物活性高的 GAs,也是赤霉素合成关键酶中研究最多的一种生物合成限速酶^[3]。相关试验证明 *GA20*-氧化酶基因过量表达能使植物体内赤霉素合成加速,植物生长发育加快^[4]。

梨属矮化砧木及矮化品种具有促进嫁接树矮化、早果、早期丰产、果实品质优等特点^[5],因此,矮化栽培对砧木选育及育种具有非常重要的意义。该研究所用梨极矮化突变体是从砧木园中发现的秋子梨系统的实生后代矮化紧凑的突变体,其抗寒、抗病性较一般砧木强、是矮化砧木育种非常珍贵的种质资源^[6]。该试验从梨极矮化突变体中分离 *GA20*-氧化酶基因,构建其植物表达载体,为研究其基因功能、揭示梨极矮化突变体的致矮

机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为梨极矮化突变体和苹果梨幼嫩叶片,以液氮速冻, -70℃ 低温保存备用。

载体 pMD18-T vector、普通 *Taq* 酶、EX *Taq* 酶、dNTPs、反转录酶(M-MLV)、各种限制性内切酶、*T₄* DNA 连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara),引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Genscript 公司,植物表达载体 pCambia-S1300⁺、农杆菌 LBA4404、大肠杆菌 DH5 α 为该实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片总 RNA 的提取 采用改良 CTAB 法^[7]提取叶片总 RNA。

1.2.2 极矮化突变体、苹果梨 cDNA 第 1 链合成及引物设计 使用 M-MLV(RNase H⁻)反转录酶合成 cDNA 第 1 链。根据 Genbank 上查询到的梨矮化砧木中矮 1 号 *PcGA20ox1* 基因的序列(登录号:HQ833589.1)设计引物,扩增编码区全长,引物序列为:上游引物-5' ATG-GCTGTTGAGTGCATGATC 3';下游引物-5' TCA-CAGTTTCTGGTTGGTTTTC 3'。

1.2.3 梨极矮化突变体、苹果梨 *GA20*-氧化酶基因的扩增 PCR 扩增反应体系:含模板第 1 链 cDNA 1 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μ L, 5 U/L Ex *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L, 10 \times Ex Buffer 2.5 μ L, ddH₂O 17.8 μ L, 共计 25 μ L; PCR 反应条

第一作者简介:王满(1987-),女,硕士研究生,现主要从事果树遗传育种等研究工作。E-mail:wm_2011@sina.com.

责任作者:曹后男(1962-),女,博士,教授,硕士生导师,现主要从事园艺植物遗传育种等研究工作。E-mail:hncan@ybu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960231)。

收稿日期:2013-10-24

件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,50℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,35 个循环,72℃延伸 5 min,4℃保存;PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 μg/mL),120 V 恒压电泳 15 min,观察特异扩增片段并拍照。

1.2.4 目的基因的克隆与鉴定 参照 Genscript 公司凝胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物,回收目的片段,连接 PMD18-T 载体(Takara),转化大肠杆菌 DH5α。经菌液 PCR 筛选,随机挑选 3~6 个带有目的片段长度的阳性克隆送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。

1.2.5 生物信息学分析 获得序列在 NCBI 数据库中运行 BlastP,查找典型的 GA20-氧化酶基因家族的同源序列;将推导的氨基酸序列与 GenBank 数据库登录的 GA20-氧化酶蛋白序列进行多序列比对,使用 ClustalX 1.83 及其默认参数生成多重序列比对,使用 Genedoc 生成比对结果;使用 MEGA4.0 构建系统发育树。

1.2.6 *PuGA20ox* 和 *PbGA20ox* 基因双元表达载体的构建及鉴定 分别以含有 *PuGA20ox*、*PbGA20ox* 的质粒为模板,根据序列中的酶切位点,设计引物,在 *PuGA20ox* 和 *PbGA20ox* 基因的上游、下游均引入 *SpeI* 和 *XbaI* 酶切位点,进行 PCR 扩增。具体引物为:*PbGA20a1F*:5'-GCTCTAGAATGGCTGTTGAGTGCATGAT-3'; *PbGA20a1R*: 5'-GGAC-TAGTTCACAGTTTCTGGTTGGTTT-3'。回收产物(基因片段)的酶切体系:10×M Buffer 3.0 μL, *PuGA20ox*/*PbGA20ox* PCR 产物回收 3.0 μL, *SpeI* 1.0 μL, *XbaI* 1.0 μL, ddH₂O 22.0 μL, 共计 30.0 μL, 37℃ 12 h。pCAMBIA-S1300⁺ 中间载体酶切体系:10×M Buffer 3.0 μL, pCAMBIA-S1300⁺ 4.0 μL, *SpeI* 1.0 μL, *XbaI* 1.0 μL, ddH₂O 21.0 μL, 共计 30.0 μL, 37℃ 12 h。将酶切 pCAMBIA-S1300⁺ 质粒片段与目的基因片段用 T4 DNA 连接酶连接,反应体系为:pCAMBIA-S1300⁺ 质粒酶切产物 2.0 μL, *PuGA20ox*/*PbGA20ox* 基因酶切片段 6.0 μL, 10×T4 DNA ligase Buffer 2.0 μL, T4DNA ligase 1.0 μL, ddH₂O 9.0 μL, 共计 20.0 μL, 16℃连接 12 h。连接产物转化大肠杆菌。菌液 PCR 鉴定阳性克隆。提取质粒,-20℃保存。重组植物表达载体采用冻融法转化农杆菌 LBA4404 感受态细胞,待转化子菌落长出后,挑取单菌落进行 PCR 鉴定。

2 结果与分析

2.1 梨极矮化突变体、苹果梨 GA20-氧化酶基因的克隆

2.1.1 RT-PCR 扩增结果电泳检测 由梨极矮化突变体、苹果梨叶片总 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-PCR 反应,图 1 为梨极矮化突变体与苹果梨扩增产物电泳结果,分别扩增出 1 200 bp 左右的片段,与预测目片段的大小一致。

2.1.2 阳性克隆序列测定及结构分析 利用特异性引物,分别克隆得到梨极矮化突变体和苹果梨 GA20-氧化酶基因,依次命名为 *PuGA20ox* 和 *PbGA20ox*,其全长均为 1 179 bp,分别包含 1 个完整编码 392 个氨基酸的 ORF。将 2 个序列在 NCBI 中运行 Blastn 比对,比较其核苷酸序列的同源性,结果表明 2 个序列与 GenBank 中已登录的梨矮化砧木“中矮 1 号”(*Pyrus communis*) *PcGA20ox1* 基因 mRNA 编码序列(HQ833589.1)同源性最高达 99%;和苹果(*Malus × domestica*)的 *MdGA20-ox* 基因(AB037114.1)的同源性高达 94%,说明该极矮化突变体和梨矮化砧木“中矮 1 号”的相似性很高。

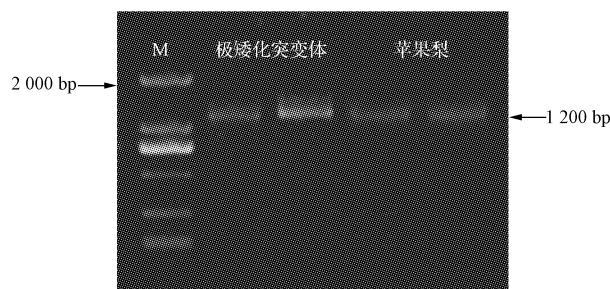


图 1 梨极矮化突变体与苹果梨 GA20-氧化酶基因全长扩增产物

Fig.1 The products of cDNA full length of pear dwarfing Mutant and 'Pingguoli' pear of GA20ox gene

2.2 *PuGA20ox*、*PbGA20ox* 基因的多序列比对与系统发育树

将获得的 *PuGA20ox* 与 *PbGA20ox* 基因推导的氨基酸序列在 NCBI 上运行 Blastp,搜索与其同源性高的不同物种中的氨基酸序列,挑选典型物种序列用 ClustalX 1.83 及 Gendoc 软件进行多序列比对。如图 4 所示, *PuGA20ox* 以及 *PbGA20ox* 编码的氨基酸序列具有典型的 GA20-氧化酶特征,具有共同的保守氨基酸结构域:结合 2-酮戊二酸的双加氧酶特性有关的保守一致序列 NYYPQCQKP;与 Fe²⁺ 元结合有关的保守的 H 和 D 残基;与 GA 底物结合的保守序列 Leu-Pro-Trp-Lys-Glu-Thr(LPWKET)基元。通过运行 NCBI 中的氨基酸 blast 得出,其中 *PuGA20ox* 与 *PcGA20-ox*、*MdGA20-ox*、*FsGA20-ox*、*CiGA20-ox* 的氨基酸同源性分别为 98%、92%、81%、74%; *PbGA20ox* 与 *PcGA20-ox*、*MdGA20-ox*、*FsGA20-ox*、*CiGA20-ox* 的同源性分别为 99%、92%、82%、75%。

应用 MEGA4.0 软件,构建系统进化树(图 2)分析结果表明,亲缘关系较近的梨和苹果聚为同一大类,即 *PuGA20ox*、*PbGA20ox* 与同属于蔷薇科的苹果在同一分支上,该分类支持率为 100,说明具有较近的亲缘关系,

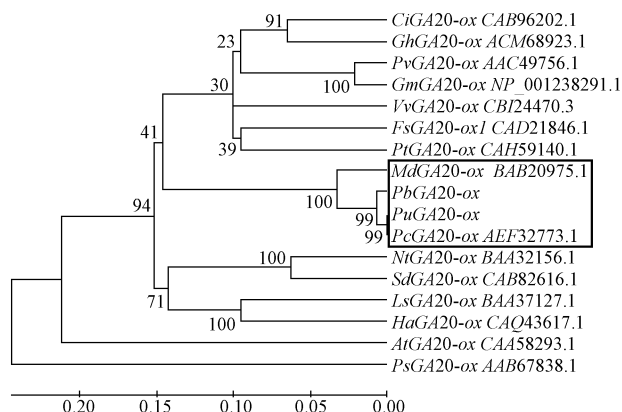
图2 *PuGA20ox*, *PbGA20ox* 与 *GA20ox* 基因的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *PuGA20ox*, *PbGA20ox* comprising the known genes from *GA20ox*

属于同一起源。*PuGA20ox*, *PbGA20ox*, 中矮一号 *PcGA20ox* 聚集在同一个分支上, 说明 *PuGA20ox*, *PbGA20ox* 与 *PcGA20ox* 有很近的亲缘关系, 属于 *GA20*-氧化酶基因家族。

2.3 *PuGA20ox*, *PbGA20ox*, *PcGA20ox* 基因的碱基、氨基酸序列比对

将试验获得的 *PuGA20ox* 和 *PbGA20ox* 基因与梨矮化砧木“中矮1号”(*Pyrus communis*) 的 *PcGA20ox* 基因的碱基序列、氨基酸序列分别进行比对, 3个基因的碱基序列比对结果如图3所示, 三者同源性很高, 高度保守。极矮化突变体 *PuGA20ox* 与苹果梨 *PbGA20ox* 碱基序列有3处不同, 分别为277、944、1022处; 而 *PuGA20ox* 与中矮一号 *PcGA20ox* 碱基序列在266、273、324、334、492、498、834、924、944、996、1022、1096处位点的碱基都不相同。

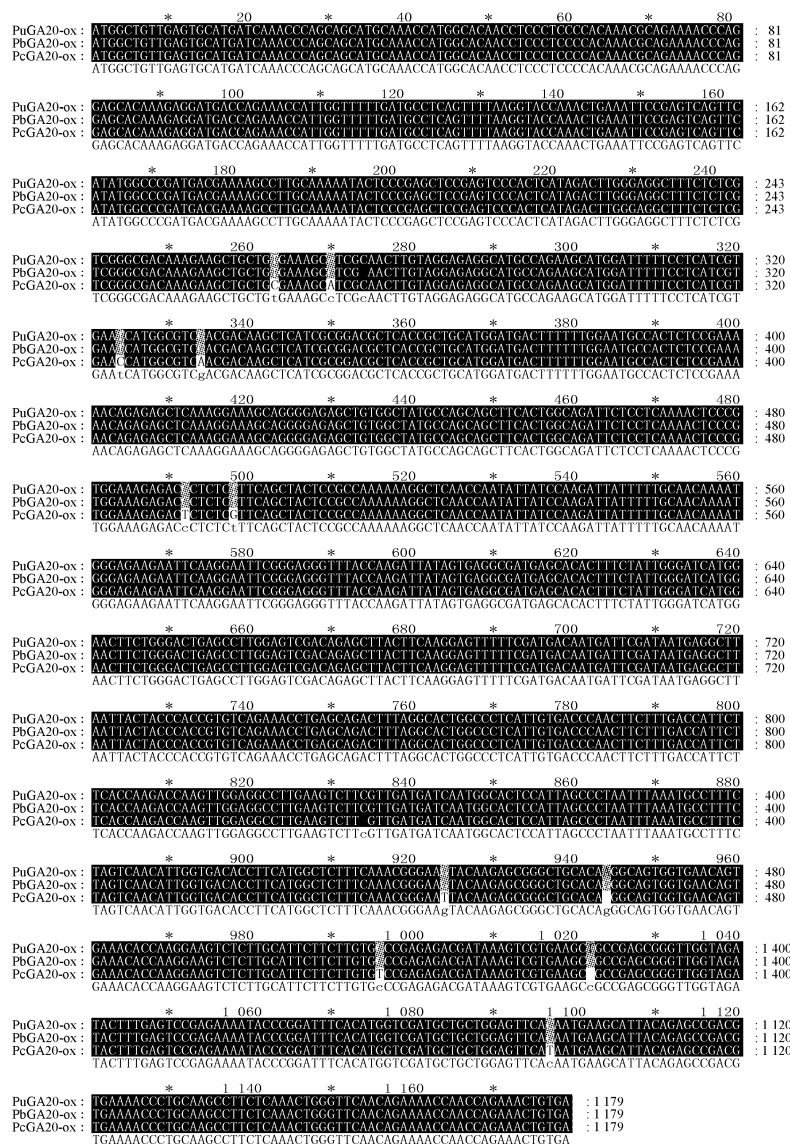
图3 *PuGA20ox*, *PbGA20ox*, *PcGA20ox* 碱基序列比对

Fig. 3 Nucleotide alignment of *PuGA20ox*, *PbGA20ox*, *PcGA20ox*

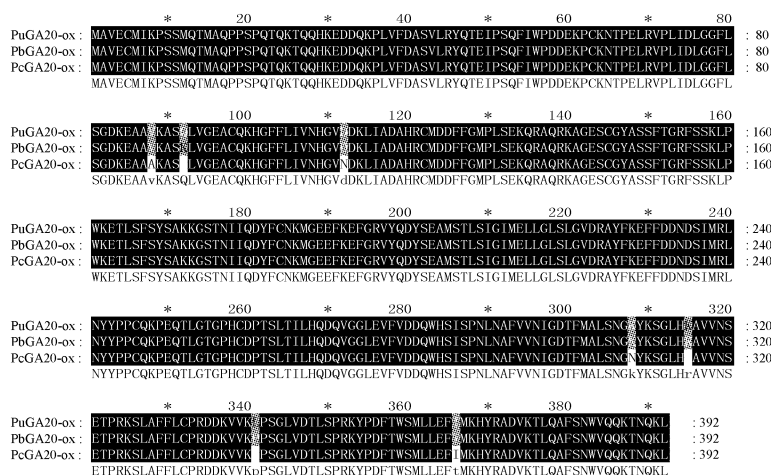


图4 *PuGA20ox*、*PbGA20ox*、*PcGA20ox* 氨基酸序列比对

Fig. 4 Amino acid alignment of *PuGA20ox*, *PbGA20ox*, *PcGA20ox*

3个基因的氨基酸序列比对结果见图4所示,氨基酸序列同源性也很高,都具有GA20ox基因家族蛋白的典型结构域,*PuGA20ox*与*PbGA20ox*氨基酸序列有3处不同,分别在92、315、341;*PuGA20ox*与*PcGA20ox*在88、112、308、315、341、366处氨基酸序列不相同,梨极矮化突变体与苹果梨和中矮一号的315、341处均不相同,可能会导致蛋白质结构的不同。梨极矮化突变体的矮化是否因为位点突变导致的需要进一步的研究。

2.4 植物表达载体的构建

以含*PuGA20ox*、*PbGA20ox*的质粒为模板,用引物*PbGA20a1F*、*PbGA20a1R*进行PCR扩增,结果如图5所示,1、2为梨极矮化突变体扩增产物,3、4为苹果梨扩增产物,表明扩增出的DNA片段与克隆得到的片段大小一致。

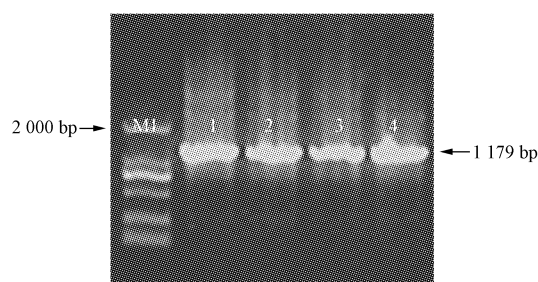


图5 引入酶切位点后*PuGA20ox*和*PbGA20ox*的PCR扩增

注:左边maker标注条带大小,右边标注样品的大小。下同。

Fig. 5 The PCR product of *PuGA20ox* and *PbGA20ox*

full length after introduced restriction site

由图6可知,pCambia-S1300⁺中间载体与回收引入酶切位点的PCR产物,分别用*SpeI*、*XbaI*双酶切,酶切产物检测结果:1为载体双酶切;2、3为回收引入酶切位点的*PuGA20ox*与*PbGA20ox*产物的双酶切,分别与预期目的

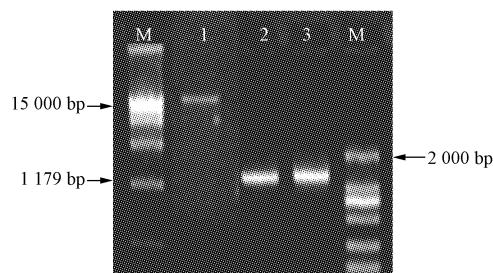


图6 pCambia-S1300⁺和回收引入酶切位点的PCR产物的双酶切

Fig. 6 pCambia-S1300⁺ and PCR production digested with *XbaI* and *SpeI*

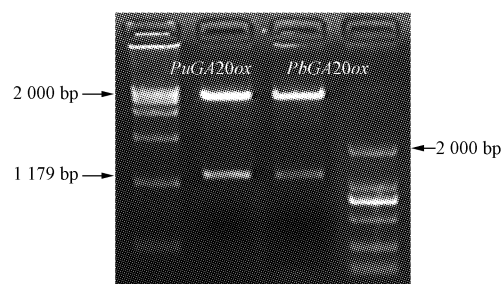


图7 已构建的pCambia-S1300⁺-*PuGA20ox*与pCambia-S1300⁺-*PbGA20ox*质粒酶切后的鉴定

Fig. 7 pCambia-S1300⁺-*PuGA20ox* and pCambia-S1300⁺-*PbGA20ox* plasmid digested with *XbaI* and *SpeI*

片段一致。分别回收酶切的片段,用T4 DNA连接酶连接,转化大肠杆菌,经菌液PCR鉴定后,提取质粒进行双酶切鉴定,结果见图7所示,从分离的条带大小与目的基因相一致,表明成功构建了*PuGA20ox*和*PbGA20ox*2个基因的植物表达载体。

利用冻融法将携带 *PuGA20ox*、*PbGA20ox* 基因的重组植物表达载体分别导入到农杆菌 LBA4404 中,获得了大量转化子,菌液 PCR 检测结果见图 8,扩增出 1 179 bp 特异条带,说明构建的 pCambia-S1300⁺-*PuGA20ox*、pCambia-S1300⁺-*PbGA20ox* 质粒成功导入农杆菌中。

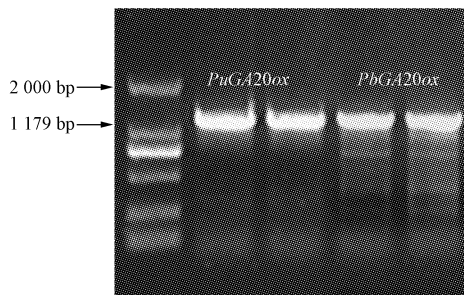


图 8 含 pCambia-S1300⁺-*PuGA20ox* 与 pCambia-S1300⁺-*PbGA20ox* 质粒的农杆菌菌液 PCR 鉴定
Fig. 8 PCR analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* strains bacterial liquid with pCambia-S1300⁺-*PuGA20ox* and pCambia-S1300⁺-*PbGA20ox*

3 讨论与结论

GA20-氧化酶在植物体内 GA 生物合成中催化起到很重要的限速作用^[3]。研究表明,GA20-氧化酶是由小基因家族编码的。南瓜克隆出 2 个^[8],拟南芥、豌豆及水稻中克隆 1~3 不等。而在果树中研究较少,该研究克隆出了 2 个与编码 GA20-氧化酶家族高度同源的基因,其中 1 个是从极矮化突变体中获得 *PuGA20ox*,另外 1 个是从乔化的苹果梨中获得 *PbGA20ox*。为探讨梨极矮化突变体出现矮化表型的原因,将 *PuGA20ox*、*PbGA20ox* 与梨矮化砧木中矮一号 *PcGA20ox1* 基因的碱基及氨基酸序列进行了比对。三者相比,碱基及氨基酸序列存在多处位点差异,梨极矮化突变体矮化是否因为位点突变导致还需研究探讨。

植物体内赤霉素的生物合成不仅受自身严格的控制具有组织特异性,而且也受光周期、温度等因素影响。GA20-氧化酶功能缺失的突变体具有半矮生的表型^[9]。在 *ga5* 突变体中,核苷酸序列中 G 取代 A 使终止提前出现产生半矮化现象^[10],而 GA20-氧化酶过量表达能导致赤霉素的过量合成和明显加快植株生长^[4]。由于抑制光受体 *phyB* 基因在土豆中的表达,StGA-20 氧化酶转录水平明显下降^[11]。豌豆幼苗在黑暗条件下生长含 GA20-氧化酶的量是强光下的 25%^[12],此外,GA 也通过降解 DELLA 蛋白来调节植物生长发育,Peng 等^[13]提出的 GA-可去抑制的抑制子模型并支持了这一观点。综上,赤霉素生物合成影响因子及基因功能代谢调控以及是否和 DELLA 蛋

白共同作用导致的梨极矮化突变的矮化有待研究。

随着分子生物学的飞跃发展,反义技术、基因敲除、定向突变等手段为研究 GA20-氧化酶的作用和功能提供了技术支持。利用反义 RNA 技术控制植物体内有生物活性的 Gas 含量,为培育矮化具有抗性的农作物及园艺植物新品种打下基础^[14]。Tan 等^[15]利用 RNA 干扰技术,构建烟草 GA20-氧化酶基因 RNAi 植物表达载体,有效地干扰了烟草 GA20-氧化酶基因的表达,获得了表型矮化的、新材料、新品种的转基因烟草。并且该试验成功构建了 2 个基因的植物表达载体,为其基因功能的鉴定提供必要的基础。

参考文献

- [1] Carrera E, Bou J, Garcia-Martinez J L, et al. Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants[J]. Plant, 2000(22):247-256.
- [2] 张超,孙君灵,贾银华,等. 外源激素对一个新的棉花极端矮化突变体 AS98 植株生长和酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2010(7):1370-1378.
- [3] Lange T. Molecular biology of gibberellin synthesis[J]. Planta, 1998, 204:409-419.
- [4] Huang S, Raman A S, Ream J E, et al. Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 1998, 118:773-781.
- [5] 贾敬贤. 梨树矮化密植栽培[M]. 北京:金盾出版社, 2005.
- [6] 朴永虎. 延边小香水梨 (*Pyrus ussuriensis* Maxim) 偶然实生矮化突变体的评价研究[D]. 延吉:延边大学, 2010.
- [7] 金灿. 生长调节物质对梨极矮化突变体生长的影响及 GA20-氧化酶基因克隆的方法[D]. 延吉:延边大学, 2012.
- [8] Lange T, Hedden P, Graebe J E. Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:8552-8556.
- [9] Wolbang C M, Chandler P M, Smith J J, et al. Auxin from the developing inflorescence is required for the biosynthesis of active gibberellins in barley stems[J]. Plant Physiol, 2004, 134:769-776.
- [10] Hedden P, William M. Proebsting. Genetic Analysis of Gibberellin Biosynthesis[J]. Plant Physiol, 1999, 119:365-370.
- [11] Stephen D. Jackson P E, James, E C. Regulation of Transcript Levels of a Potato Gibberellin 20-Oxidase Gene by Light and Phytochrome B[J]. Plant Physiol, 2000, 124:423-430.
- [12] Gawronska H, Yang Y Y, Furukawa K, et al. Effects of Low Irradiance Stress on Gibberellin Levels in Pea Seedlings[J]. Plant Cell Physiol, 1995, 85:87-90.
- [13] Peng J, Carol P, Richards D, et al. Arabidopsis GAI gene defines a signaling path-way that negatively regulates gibberellin responses[J]. Genes Dev, 1997(11):3194-3205.
- [14] 李伟,陈晓阳,丁霞. 高等植物 GA20-氧化酶研究进展[J]. 生命科学, 2003, 15(1):42-46.
- [15] Tan X, Yang H, Qiao D J, et al. Construction of si RNA plant expression vector interfered with GA 20-oxidase and production of dwarf tobacco[J]. Chin J Environ Biol, 2008, 14(1):48-52.

油茶异常落花落果现象的生殖特性

陈世明¹, 王 猛¹, 赵志珩¹, 尹加笔², 石卓功¹

(1. 西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224; 2. 德宏州林业局 中心苗圃, 云南 德宏 678400)

摘 要:以往年正常开花结果和异常落花落果的油茶样株为试材, 采用碘-碘化钾溶液测定其花粉活力, 苯胺蓝染色法观察花粉管生长情况, 石蜡切片观察胚囊和雌配子体的发育, 同时通过自然授粉和异花授粉试验观察各样株的坐果率及其动态变化规律。结果表明: 正常开花结果的油茶树花粉活力、花粉管在花柱中的生长比例都明显比异常落花落果的油茶树高。方差分析表明, 油茶坐果率与不同开花结果性状的样株显著相关, 与授粉方式不相关。异常落花落果样株与正常开花结果样株相比, 雌配子体发育更易出现异常和退化, 致使胚珠畸形, 导致花后落花落果严重, 坐果率极低。

关键词:油茶; 落花落果; 生殖特性; 德宏州

中图分类号:S 794.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0094-05

油茶(*Camellia oleifera*)是我国重要木本油料树种, 与油棕(*Elaeis guineensis*)、油橄榄(*Olea europaea*)、椰子(*Cocos nucifera*)并称为世界四大木本油料树种。油茶主要分布于北纬 18°21'~34°34', 东经 98°40'~121°41', 其北界自秦岭南坡经桐柏山、大别山白山麓至江苏云台山, 南达海南崖县, 东达浙江省镇海, 福建省福安, 西至云南省怒江流域等 18 个省(自治区、直辖市)^[1]。

茶油清香味美, 营养价值高, 茶油中不饱和脂肪酸含量高达 90% 以上, 是一种高级食用油。茶油具有很好的保健功能, 可以降血压、降血脂、降胆固醇、治疗心脑血管疾病^[2]。其茶籽粕和果壳含有茶皂素、糖类、粗蛋白、粗纤维等, 可制成皂素、活性炭、糠醛、烤胶、饲料、肥料等多种化工产品^[3-5], 是很好的化工、医药等原料, 具有很高的利用价值。因此, 油茶被誉为“东方橄榄油”。

目前, 云南省部分油茶栽培区落花落果现象极为严重, 出现开花不整齐、花没有完全开放时就脱落, 且枝上花芽成串而无坐果的现象。开花与坐果对油茶栽培具有十分重要的意义^[6]。该试验采用生殖生物学方法对云南省德宏州油茶成龄林开花结实特性等开展研究, 旨在揭示油茶落花落果的原因。

第一作者简介:陈世明(1986-), 男, 硕士, 研究方向为经济林生殖生物学。E-mail: chenshming@sina.cn.

责任作者:石卓功(1957-), 男, 博士, 教授, 现主要从事经济林和果树生殖生物学及其栽培技术等研究工作。E-mail: zgongshi@sina.com.

基金项目:云南省重点新产品开发计划资助项目(2009BB004)。

收稿日期:2013-09-16

Cloning and Plant Expression Vector Construction of GA20-oxidase Gene from Pear Dwarfing Mutants and Pingguo Pear

WANG Man, JIN Can, XU Xue, ZONG Cheng-wen, CAO Hou-nan
(College of Agricultural, Yanbian University, Yanji, Jinlin 133000)

Abstract: Taking pear dwarf mutant and ‘Pingguo’ pear as test material, by RT-PCR technique, cloning and sequencing of GA20ox gene was studied. The results showed that two GA20-oxidase genes which full-length cDNA consist 1 179 nucleotides and contain complete open reading frame (ORF) which encoding a protein of 392 amino acids residue were isolated from pear dwarfing mutant and ‘Pingguo’ pear. Moreover named that *PuGA20ox* and *PbGA20ox*. Cloning and plant expression vector construction of GA20-oxidase gene from pear dwarfing mutants and ‘Pingguo’ pear basis for studying the genetic transformation and function of GA20-oxidase gene.

Key words: pear dwarf mutant; GA20-oxidase gene; cloning; sequence analysis; plant expression vect