

柱型苹果 *MdGAI* 基因的克隆及表达分析

梁美霞, 祝 军, 戴洪义*

(青岛农业大学园林园艺学院, 山东青岛 266109)

摘 要: 以柱型苹果‘鲁加 5 号’茎尖为试材, 克隆编码 DELLA 蛋白的 *MdGAI* 基因, 并研究该基因的表达特点。结果表明, 柱型苹果 *MdGAI* 的 cDNA 序列长度为 2 491 bp, 编码 635 个氨基酸。核酸序列与其它苹果属植物具有很高的同源性, 在 N 端具有保守氨基酸结构域 DELLA 和 VHYNP, 在 C 端存在保守的氨基酸结构域 VHVID 和 SAW。实时荧光定量 PCR 分析表明, 在春、夏和秋季, *MdGAI* 基因在柱型和普通型苹果新梢茎尖均能表达, 同一生长时期, 柱型苹果新梢茎尖的表达量明显高, 说明柱型苹果的生长分枝特性可能与 *MdGAI* 基因的高表达量有关。*MdGAI* 基因在种子、叶芽、茎尖、节间、花芽、花和幼果中均能表达, 不同器官中的表达量存在显著差异, 幼果中相对表达量最高, 说明该基因可能主要调控苹果果实的发育。

关键词: 苹果; DELLA 蛋白; *MdGAI* 基因; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S 661.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 10-1969-07

Cloning and Expression Analyzing of *MdGAI* Gene of Columnar Apples

LIANG Mei-xia, ZHU Jun, and DAI Hong-yi*

(College of Landscape and Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: The shoot tips of columnar apple ‘Lujia 5’ were used as experimental materials for cloning *MdGAI* gene encoding DELLA protein and researching its expression characterization via rapid amplification of cDNA ends (RACE) and real time PCR methods. The full length sequence of *MdGAI* was 2 491 bp, encoding 635 amino acids. The nucleic acid sequence was highly homologous with those of other *Malus* plants. Sequence analysis of the product of the *MdGAI* indicated that they shared a highly conserved N terminus that contained two recognizable domains DELLA and VHYNP, and a highly conserved C terminus that contained two recognizable domains VHVID and SAW. The real-time quantitative PCR analysis showed that *MdGAI* gene were always expressed in shoot apices of columnar and standard apple trees during the spring, summer and autumn growing season. In the same season, the *MdGAI* of columnar apples were expressed at higher level than that of standard apples. It is perhaps that the growing habit of columnar apple is related to *MdGAI* gene with high levels expression. The *MdGAI* gene were expressed in seeds, leaf buds, shoot tips, internodes, floral buds, flowers and young fruits of columnar apple ‘Lujia 5’. However, the amounts of the expression were obviously different. In the early development of young fruit, the relative expression level of *MdGAI* gene was up to the maximum value.

收稿日期: 2011 - 04 - 11; **修回日期:** 2011 - 09 - 02

基金项目: 国家苹果产业技术体系项目 (CAR-28-01-07); 山东省良种产业化工程项目; 山东省教育厅项目 (J10LC12); 青岛市科技局项目 (10-3-4-5-2-jch)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hydai@qau.edu.cn)

This means that *GAI* gene may play a crucial role during the fruit developing of columnar apple.

Key words: apple; DELLA protein; *MdGAI* gene; Real-time PCR

柱型苹果是一种特殊的矮生突变类型,节间短,分枝少,萌芽率高,是实行矮化密植栽培的重要资源(Kesley & Brown, 1992)。柱型基因 *Co* 是迄今为止研究最深入的,目前已筛选出与该基因连锁的 RAPD、AFLP、ISSR、SCAR 等分子标记(祝军等, 2000; 王彩虹等, 2002; 朱元娣等, 2003; Kim et al., 2003; Tian et al., 2005),但与 *Co* 基因的遗传连锁距离较远,目前仍未克隆到 *Co* 基因,也未能从分子水平上阐述该基因对树形发育的调控模式。

DELLA 蛋白是 GA 信号传导途径的抑制因子,在高等植物中,其 N 端具有高度保守的结构域 DELLA(Dill et al., 2004)。模式植物拟南芥中 DELLA 蛋白是多基因家族,有 *GAI*、*RGA*、*RGL1*、*RGL2*、*RGL3*,其中 *GAI* 和 *RGA* 是茎伸长的主要负调控因子(Dill et al., 2001; Dill & Sun, 2001; King et al., 2001)。拟南芥、葡萄、水稻等植物中编码 DELLA 结构域的 *GAI* 基因发生缺失、突变或超量表达均能导致植物表型发生改变,表现为矮化特征(Ogawa et al., 2000; Fu et al., 2001; Boss & Thomas, 2002; Olszewski et al., 2002)。Hartweck 和 Olszewski (2006)报道,DELLA 蛋白可能参与多种激素的信号途径,同时 DELLA 蛋白的量又受到赤霉素、生长素、乙烯和脱落酸等多种激素的共同调节(Fu & Harberd, 2003; Achard et al., 2003, 2006; Ma et al., 2003; Alabadi et al., 2004)。

柱型苹果内源激素特别是低浓度的赤霉素和高浓度的细胞分裂素是导致其树体柱型生长特性的主要原因(Looney et al., 1988; Watanabe et al., 2006)。在柱型苹果中,赤霉素合成途径中贝壳杉烯氧化酶基因的表达量低于普通型苹果(田义轲, 2004);苹果异戊烯基转移酶基因过表达可诱导转基因烟草侧枝分生及细胞分裂素水平增加(朱元娣, 2008)。

由于柱型苹果的生长特性与赤霉素等内源激素密切相关,而赤霉素的合成及传导与 DELLA 蛋白的编码基因结构和表达量有关,因此,本研究中利用 RACE 方法,克隆柱型苹果中编码 DELLA 蛋白的 *MdGAI* 基因的全长 cDNA,并对其基因和编码蛋白序列进行分析,利用 Real-time PCR 技术检测该基因在柱型和普通型苹果中的相对表达量,试图从分子水平上揭示苹果柱型生长的机理;同时,在柱型苹果的不同发育时期,分析该基因在不同组织和器官的相对表达量,试图揭示 *MdGAI* 基因在苹果生长发育过程中的时空表达模式,为进一步研究该基因的功能提供基础理论依据。

1 材料与方法

供试柱型苹果为‘Telamon’、‘鲁加 5 号’和‘鲁加 6 号’;普通型苹果为‘富士’、‘鲁加 2 号’和‘鲁加 3 号’,树龄均为 5 年,取自于青岛农业大学园林园艺学院果树实验站。分别于春、夏和秋季取上述 6 种苹果的新梢茎尖。2008 年,分别取‘鲁加 5 号’春梢茎尖(4 月 24 号)、节间(4 月 24 号)、花(4 月 24 号)、幼果(5 月 10 号)、夏梢茎尖(6 月 24 号)、秋梢茎尖(8 月 30 号)、种子(11 月 8 号)、发芽后种子(12 月 20 号)、花芽(12 月 20 号)和叶芽(12 月 20 号),液氮速冻后 -80 °C 冰箱保存,用于 RNA 的提取。

RNA 提取参照 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒说明书(北京原平皓公司)。以提取的总 RNA 为模板,按 3'- Full RACE Core Set Ver. 2.0 (TaKaRa) 反转录成 cDNA。

根据 GenBank 上发表的相关同源基因的氨基酸保守序列和核苷酸序列设计引物。设计 3'端引物为 5'-CGTTGACGACCCCTTTTTCAGC-3', 5'-GTCCACGTCATCGATTTCTCC-3'和 5'-GCAAATCTGC AACGTGGTGG-3',扩增 *MdGAI* 基因的 3'端序列。设计 5'端引物为 5'-CGGGTTATAGTGAACGGTG

TC-3', 5'-GTCTTCCCACATCTTGGCCTTGC-3'和 5'-CGGGGATGGATTGGAAGTCGTAGTA-3', 扩增 *MdGAI* 基因的 5'端序列。利用 RACE-PCR 技术, 按照 TaKaRa 公司的 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 和 5'-Full Race Kit 试剂盒说明书对目的基因进行扩增。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 次循环。

实时荧光定量 PCR 检测以苹果 *Actin* 基因(序列号 GQ339778)作为内参, 其引物对设计为 *Act-F*: 5'-CCAAAGGCTAATCGGGAGAAA-3'和 *Act-R*: 5'-ACTGGCGTAGAGGGAAAGAACA-3', 扩增目的基因 *MdGAI* 引物对设计为 *GAI-F*: 5'-GAGACCTGCCCCTACCTGAA-3'和 *GAI-R*: 5'-GATGACGTG GACTCTGGTTTTG-3'。对反转录获得的 cDNA 用 EASY Dilution 按 5 倍梯度 (5^0 、 5^1 、 5^2 、 5^3 、 5^4 倍) 稀释, 进行荧光定量反应, 绘制相对标准曲线。反应体系为 25 μ L, 含有 12.5 μ L SYBR Premix Ex *Taq* II (TaKaRa), 2.0 μ L cDNA, 9.5 μ L ddH₂O, 上下游引物各 0.5 μ L (引物浓度为 10 μ mol \cdot L⁻¹)。反应程序为: 94 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 次循环。每个样品重复 3 次。

序列相似性使用 BLAST 软件分析, 多重序列比对用 ClustalW 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 和多重序列显示程序 (<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>)。进化树构建用 MEGA 4.0 程序和邻位相连法 (Neighbor-joining)。

2 结果与分析

2.1 柱型苹果 *MdGAI* 基因的生物信息学分析

利用 RACE-PCR 技术从柱型苹果‘鲁加 5 号’茎尖中克隆得到 *MdGAI* 基因(登录号: HQ834196)的 cDNA 全长序列。其全长为 2 491 bp, 其中编码区序列长度为 1 908 bp, 编码 635 个氨基酸, 起始密码子是 ATG, 终止密码子是 TAG, 5'UTR 为 199 bp, 3'UTR 有 384 bp, 在 3'UTR 中还包含加尾信号 AATAA 和 poly (A) 尾巴。推测的蛋白质等电点为 5.30, 分子量为 69 734.67。

所获得的目的片段经 GenBank 数据库中的 BLAST, 柱型苹果‘鲁加 5 号’*MdGAI* 基因与小金海棠 *GAI2* (登录号: GQ384426) 和 *GAI* 基因 (登录号: FJ535244) 的氨基酸序列相似性分别为 99% 和 92%, 与湖北海棠 *GAI* 基因 (登录号: EF026101) 的氨基酸序列相似性为 97%, 与‘富士’苹果和苹果砧木‘M26’及‘Mark’的 *GAI1* 基因 (登录号分别是: FJ535245, GQ384424 和 GQ384425) 氨基酸序列相似性均为 93%。

利用 MEGA4.0 软件, 分析柱型苹果的 *MdGAI* 基因与已知其他植物的 *GAI* 进化树 (图 1), 编码柱型苹果 DELLA 蛋白的 *MdGAI* 基因与所有苹果属植物聚类在同一分支上, 其与小金海棠的 *GAI2* 基因在进化上亲缘关系最近; 其次与湖北海棠的 *GAI* 基因在进化上亲缘关系较近, 而最后与拟南芥和番茄的 *GAI* 基因聚类, 说明它们的基因在进化上亲缘关系最远。

2.2 柱型和普通型苹果新梢 *MdGAI* 基因的相对表达量分析

在春、夏和秋季, 分别提取 3 个柱型和 3 个普通型苹果新梢茎尖的 RNA 进行转录, 以获得的 cDNA 进行实时荧光定量表达分析。

分析结果 (图 2) 表明: 3 个季节中, 柱型和普通型苹果中 *MdGAI* 基因均有一定量的表达。3 个柱型苹果中 *MdGAI* 基因相对表达量平均值分别为 0.88、0.99、1.00; 而 3 个普通型苹果中 *MdGAI* 基因相对表达量平均值分别为 0.68、0.68、0.52。

同一生长季节中, 3 个柱型苹果 *MdGAI* 基因相对表达量均高于 3 个普通型苹果。

上述结果说明柱型苹果的生长分枝特性可能与 *MdGAI* 基因的高表达量有关。

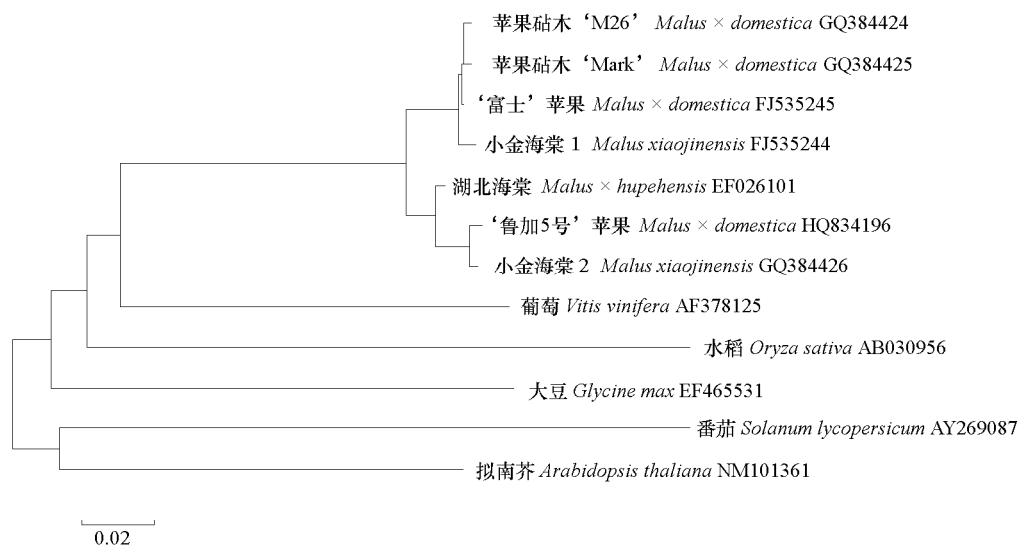


图 1 基于柱型苹果 *MdGAI* 基因氨基酸序列与同源氨基酸序列建立的进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of amino acid sequences of columnar apple *MdGAI* gene with homologous amino acid sequences from other plants

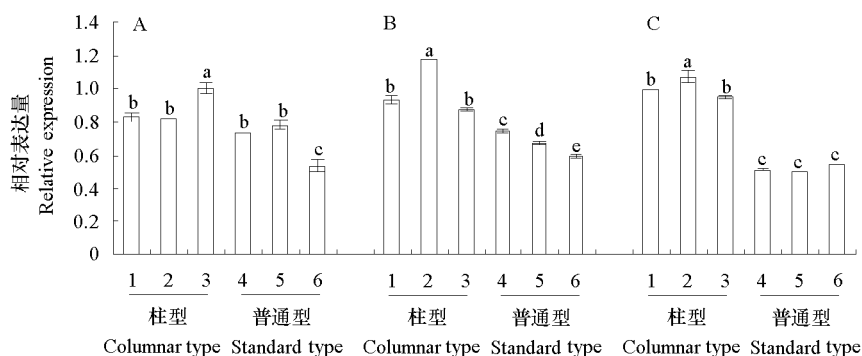


图 2 柱型和普通型苹果新梢中 *MdGAI* 基因转录水平上的表达分析

A: 春梢; B: 夏梢; C: 秋梢。1. Telamon; 2. 鲁加 5 号; 3. 鲁加 6 号; 4. 富士; 5. 鲁加 2 号; 6. 鲁加 3 号。

Fig. 2 Expression analyzing of *MdGAI* in the apices of growing shoots of columnar and standard apples at transcript levels

A: Spring shoots; B: Summer shoots; C: Autumn shoots. 1. Telamon; 2. Lujia 5; 3. Lujia 6; 4. Fuji; 5. Lujia 2; 6. Lujia 3.

2.3 柱型苹果不同组织器官中 *MdGAI* 基因的相对表达量分析

提取柱型苹果‘鲁加 5 号’不同组织器官中的 RNA 进行反转录合成 cDNA 链，然后以得到的第一链 cDNA 为模板，用特异引物进行 Real-time PCR 扩增。

结果如图 3 所示，*MdGAI* 基因在种子、叶芽、茎尖、节间、花芽、花和幼果中均能表达，但表达量存在明显差异。

种子萌发后，*MdGAI* 基因的表达量明显下降，在春梢、夏梢和秋梢中，表达量相对稳定。花开放后，表达量也随之下落；而在幼果中，表达量急剧增加，达到最高值 1.55，说明该基因可能主要调控苹果果实的发育。

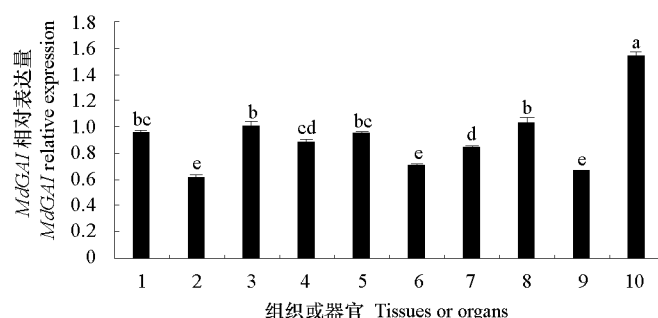


图3 柱型苹果‘鲁加5号’不同组织器官中 *MdGAI* 基因转录水平上的表达分析

1. 种子; 2. 发芽后种子; 3. 春梢茎尖; 4. 夏梢茎尖; 5. 秋梢茎尖; 6. 叶芽; 7. 节间; 8. 花芽; 9. 花; 10. 幼果。

Fig. 3 Expression analyzing of *MdGAI* in different tissues or organs of columnar apples ‘Lujia 5’ at transcript levels

1. Seeds; 2. Seeds after germination; 3. Shoot tips in spring; 4. Shoot tips in summer; 5. Shoot tips in autumn; 6. Vegetative buds; 7. Internodes; 8. Floral buds; 9. Flowers; 10. Young fruits.

3 讨论

沙海峰(2007)分别从‘威赛克’和‘旭’苹果中克隆得到编码 DELLA 蛋白家族的 *MdRGLla* 和 *MdRGL2a* 基因,发现 *RGLla* 和 *RGL2a* 基因在柱型和普通型苹果中的核苷酸序列同源性均为 100%,初步表明柱型苹果‘威赛克’的柱型突变与 *RGL* 基因无关。本研究得到的编码柱型苹果‘鲁加 5 号’ DELLA 蛋白的 *GAI* 基因与 GenBank 上‘富士’苹果的 *GAI* 基因氨基酸序列相似性为 93%,二者在 N 端均具有保守氨基酸结构域 DELLA 和 VHYNP。这说明柱型苹果的 DELLA 结构域没有发生碱基突变、缺失,因此,柱型苹果的节间短并非由 *MdGAI* 基因主要功能区的变化引起。另外,柱型苹果‘鲁加 5 号’的 *GAI* 基因与 GenBank 上苹果属植物的 *GAI* 基因序列相似性均在 92%以上,最高的达 99%,说明是同一基因或等位基因。本研究中发现,在同一生长季节,3 个柱型苹果茎尖中的 *MdGAI* 相对表达量均高于 3 个普通型苹果。植物体内的 DELLA 蛋白含量越多,对逆境的适应性越强,高盐环境下,植物通过增加 DELLA 蛋白的含量,进而增强 DELLA 蛋白对植物生长的抑制作用(Achard et al., 2006)。柱型苹果 *GAI* 基因的表达量高可能抑制了植株的生长,也可能是对外界环境更加适应的表现。

在单子叶植物水稻和大麦中编码 DELLA 蛋白的基因仅为 *SLR1* (Ikeda et al., 2001) 和 *SLN1* (Chandler et al., 2002)。在双子叶植物拟南芥的生长发育时期,编码 DELLA 蛋白的 *GAI*、*RGA*、*RGL1*、*RGL2* 和 *RGL3* 发挥不同的作用。*RGA* 和 *RGL2* 是花形成和生殖生长的主要负调控因子,*RGA* 和 *GAI* 是茎伸长的主要负调控因子(Peng et al., 1999; Dill et al., 2001; Dill & Sun, 2001)。拟南芥种子萌发过程中,5 种 DELLA 蛋白基因均参与调控种子萌发,但是 *RGA* 基因发挥主要作用,在所有营养组织中,其表达量均高于其它 DELLA 蛋白基因。拟南芥的 *GAI* 基因位于细胞核中,主要抑制营养生长,阻遏植物生长发育。拟南芥中的 *RGL1*、*RGL2*、*RGA* 和 *GAI* 在花和角果的表达量均很高,说明这 4 种基因参与调控拟南芥花和角果的发育(Tyler et al., 2004)。Muangprom 等(2005)用半定量 PCR 法检测油菜 *RGA* 基因在其野生型和矮化突变体中的表达情况,在所检测的所有组织中,两种类型的油菜中 *RGA* 基因的表达量相似,而该基因主要从蛋白水平上进行调控。

苹果属植物的 DELLA 蛋白基因也是多基因家族(Foster et al., 2007),在苹果 DELLA 蛋白的多基因家族中,柱型苹果枝条分枝特性具体由哪个基因发挥主要作用,该基因是在转录水平还是蛋白水平进行调控需要进一步研究。

另外,柱型苹果幼果中 *GAI* 基因的表达量急剧增加,这说明该基因可能调控苹果果实的发育。编码柱型苹果 DELLA 蛋白的 *GAI* 基因的克隆和时空表达分析为后续通过转基因技术手段或 RNAi 干扰技术研究基因的功能奠定了一定的基础。

References

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van D, Straeten D, Peng J, Harberd N P. 2006. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311: 91 – 94.
- Achard P, Vriezen W H, Van D, Straeten D, Harberd N P. 2003. Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell*, 15: 2816 – 2825.
- Alabadi D, Gil J, Blazquez M, Garcia-Martinez J. 2004. Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant Physiol*, 134: 1050 – 1057.
- Boss P K, Thomas M R. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape ‘Green Revolution’ mutation. *Nature*, 416: 847 – 850.
- Chandler P M, Marion-poll A, Ellis M, Gubler F. 2002. Mutants at the slender locus of barley cv. Himalaya: Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol*, 129: 181 – 190.
- Dill A, Jung H S, Sun T P. 2001. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of *RGA*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 14162 – 14167.
- Dill A, Sun T P. 2001. Synergistic de-repression of gibberellin signaling by removing *RGA* and *GAI* function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 159: 777 – 785.
- Dill A, Thomas S G, Hu J H, Steber C M, Sun T P. 2004. The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell*, 16: 1392 – 1405.
- Foster T, Kirk C, Jones W T, Allan A C, Espley R, Karunairetnam S, Rakonjac J. 2007. Characterization of the DELLA subfamily in apple (*Malus × domestica* Borkh.) . *Tree Genet Genomes*, 3: 187 – 197.
- Fu X D, Harberd N P. 2003. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421: 740 – 743.
- Fu X D, Sudhakar D, Peng J R, Richards D E, Christou P, Harberd N P. 2001. Expression of *Arabidopsis GAI* in transgenic rice represses multiple gibberellin responses. *The Plant Cell*, 13: 1791 – 1802.
- Hartweck L M, Olszewski N E. 2006. Rice GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. *Plant Cell*, 18 (2): 278 – 282.
- Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, Kitano H, Koshioka M, Futsuhara Y, Matsuoka M, Yamaguchi J. 2001. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell*, 13: 999 – 1010.
- Kesley D F, Brown S K. 1992. ‘McIntosh Wijcik’ a columnar mutation of ‘McIntosh’ apple proving useful in physiology and breeding research. *Fruit Varieties Journal*, 46 (2): 83 – 87.
- Kim M Y, Song K J, Wang J H, Shin Y U, Lee H J. 2003. Development of RAPD and SCAR markers linked to the *Co* gene conferring columnar growth habit in apple (*Malus pumila* Mill.) . *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 78 (4): 512 – 517.
- King K, Moritz T, Harberd N. 2001. Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of *GAI* and *RGA*. *Genetics*, 159: 767 – 776.
- Looney N E, Taylor J S, Pharis R P. 1988. Relationship of endogenous gibberellin and cytokinin levels in shoot tips to apical form in four strains of McIntosh apple. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 113: 395 – 398.
- Ma L, Zhao H, Deng X W. 2003. Analysis of the mutational effects of the COP/DET/FUS loci on genome expression profiles reveals their overlapping yet not identical roles in regulating *Arabidopsis* seedling development. *Development*, 130: 969 – 981.

- Muangprom A, Thomas S G, Sun T P, Osborn T C. 2005. A novel dwarfing mutation in a green revolution gene from *Brassica rapa*. *Plant Physiology*, 137: 931 – 938.
- Ogawa M, Kusano T, Katsumi M, Sano H. 2000. Rice gibberellin-insensitive gene homolog, *OsGAI*, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene*, 245 (1): 21 – 29.
- Olszewski N, Sun T P, Gubler F. 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism and response pathways. *Plant Cell*, 14: 61 – 80.
- Peng J, Richards D E, Hartley N M, Murphy G P, Devos K M, Flintham J E, Beales J. 1999. Green revolution genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 400: 256 – 261.
- Sha Hai-feng. 2007. Cloning and function analysis of related gene encoded DELLA protein from columnar apple [M. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 沙海峰. 2007. 苹果 DELLA 相关基因的克隆及功能初步鉴定 [硕士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Tian Yi-ke. 2004. Molecular genetic mapping for columnar gene and cloning cDNA fragment of Ent-kaurene oxidase gene in apple [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 田义珂. 2004. 苹果柱型基因作图及贝壳杉烯氧化酶基因 cDNA 片段克隆 [博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Tian Yi-ke, Wang Cai-hong, Zhang Ji-shu, James Celia, Dai Hong-yi. 2005. Mapping *Co*, a gene controlling columnar phenotype of apple tree, with molecular markers. *Euphytica*, 145: 181 – 188.
- Tyler L, Thomas S G, Hu J H, Dill A, Alonso J M, Echer J R, Sun T P. 2004. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 135: 1008 – 1019.
- Wang Cai-hong, Wang Qian, Dai Hong-yi, Tian Yi-ke, Jia Jian-hang, Shu Huai-rui, Wang Bin. 2002. Development of a SCAR marker linked to *Co* gene of apple from an AFLP marker. *Acta Horticulturae Sinica*, 29 (2): 100 – 104. (in Chinese)
- 王彩虹, 王 倩, 戴洪义, 田义珂, 贾建航, 束怀瑞, 王 斌. 2002. 苹果柱型基因 *Co* 的一个 AFLP 标记的 SCAR 转换. *园艺学报*, 29 (2): 100 – 104.
- Watanabe M, Suzuki A, Komori S, Bessho H. 2006. Effects of heading back pruning on shoot growth and IAA and cytokinins concentrations at bud burst of columnar-type apple trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 75: 224 – 230.
- Zhu Jun, Li Guang-chen, Wang Tao, Zhang Wen, Zhao Yu-jun. 2000. AFLP polymorphism between McIntosh and Wujick columnar apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (6): 447 – 448. (in Chinese)
- 祝 军, 李光晨, 王 涛, 张 文, 赵玉军. 2000. 威赛克柱型苹果与旭的 AFLP 多态性研究. *园艺学报*, 27 (6): 447 – 448.
- Zhu Yuan-di. 2008. Cloning and function analysis of Isopentenyl-transferases (*ipt*) gene from columnar apple [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 朱元娣. 2008. 柱型苹果异戊烯基转移酶 *ipt* 基因克隆与功能分析 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- ZhuYuan-di, Li Guang-chen, Li Chun-yu, Dong Li-min, Wang Tao. 2003. Studies on the ISSR marker analyses of the columnar gene in apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (5): 505 – 510. (in Chinese)
- 朱元娣, 李光晨, 李春雨, 董利民, 王 涛. 2003. 苹果柱型基因的 ISSR 分子标记研究. *园艺学报*, 30 (5): 505 – 510.