

短枝型苹果赤霉素受体基因 *MdGID1a* 及其启动子克隆和表达分析

宋 杨^{1,2}, 张艳敏², 吴树敬², 冯守千², 王传增³, 陈学森^{2,*}

(¹中国农业科学院果树研究所, 农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁兴城 125100; ²山东农业大学园艺科学与工程学院/作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; ³山东省果树研究所, 山东泰安 271000)

摘 要: 以短枝型富士苹果‘龙富短枝’(*Malus × domestica* Borkh. ‘Longfu Duanzhi’) 枝条为试材, 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆获得苹果赤霉素受体基因 *MdGID1a*, GenBank 基因数据库的登录号为 JF516247。该基因编码区共 1 035 bp, 推测其编码 345 个氨基酸。氨基酸序列分析显示, 其具有 HSL 基因家族的保守氨基酸结构域 HGG 和 GX SXG, 与其它植物赤霉素受体基因具有较高的同源性。其启动子序列包含植物激素和光等响应元件。实时定量 qRT-PCR 分析表明, *MdGID1a* 在短枝型‘龙富短枝’和普通型‘长富 2 号’枝条不同生长阶段、在叶片、枝条、果实、花和叶芽中的表达水平存在明显差异。苹果赤霉素受体基因 *MdGID1a* 在短枝型苹果枝条伸长过程中具有一定的调控作用。

关键词: 苹果; 赤霉素受体基因; 基因表达分析; 启动子

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 11-2237-08

Cloning, Expression Analysis of *MdGID1a* Gene and Promoter from Spur-type Apple

SONG Yang^{1,2}, ZHANG Yan-min², WU Shu-jing², FENG Shou-qian², WANG Chuan-zeng³, and CHEN Xue-sen^{2,*}

(¹Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (Germplasm Resources Utilization), Ministry of Agriculture, P. R. China, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100, China; ²College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University/State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China; ³Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000, China)

Abstract: *MdGID1a* gene was amplified from spur-type apple (*Malus × domestica* Borkh. ‘Longfu Duanzhi’) shoots by using RT-PCR and RACE method. The sequence has been deposited in GenBank database with the accession number of JF516247. The gene was named *MdGID1a*, containing an open reading frame (1 035 bp) and encoding a protein of 345 amino acid. Sequence analysis indicated that *MdGID1a* shared highly homology with HGG and GX SXG domain of HSL family gene. The promoter of *MdGID1a* contained phytohormone and light regulatory elements. The real-time quantitative PCR analysis showed that the expression levels of *MdGID1a* gene changed in different tissues, standard shoots and

收稿日期: 2013 - 08 - 16; 修回日期: 2013 - 11 - 05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171932); 国家重点基础研究发展计划项目 (2011CB100606); 山东省农业良种工程项目[鲁农良种字 (2011) 7 号]

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

shoots of different growth stages. The GA receptor gene *MdGID1a* may play an important role during the shoots development apple.

Key words: apple; GA receptor gene; gene expression analysis; promoter

芽变选种是果树品种改良的重要途径之一, 能够有效地改良果树的树形、果实颜色等农艺性状和品质性状, 特别适合对目前优良品种的个别不良性状进行改良。20 世纪 50 年代, 随着‘新红星’等一些具有矮化紧凑株形的短枝芽变品种の利用, 使集约化栽培成为可能, 推动了苹果栽培模式的变革。研究苹果短枝型芽变形成机理, 对品种改良和产业发展具有重要意义。

赤霉素 (GA) 是植物体内一种重要的生长调节物质, 能够参与调控茎的伸长、种子萌发、叶片展开和果实发育等多个生长发育过程 (Richards et al., 2001; Olszewski et al., 2002; Schwechheimer, 2008; Aya et al., 2009; Plackett et al., 2011)。目前已经发现了许多 GA 不敏感型矮化突变体, 这种矮化现象是由于植物不能够对 GA 进行有效感应造成的。在拟南芥中, 编码赤霉素受体 GID1 (Gibberellin insensitive dwarf, GID1) 的基因功能缺失型矮化突变体都表现出不能感应 GA (Griffiths et al., 2006; Willige et al., 2007; Li et al., 2011, 2013)。Nakajima 等 (2006) 发现, 在拟南芥基因组中有 3 个水稻 GID1 的同源基因, 每个基因分别转化水稻 *gid1* 突变体, 都能恢复由于对 GA 不敏感导致水稻矮化的表型, 但拟南芥中每个基因的单突变没有产生明显的矮化表型。水稻 GID1 能够与水稻的 DELLA 蛋白 SLR1 (slender rice 1) 的保守功能域 I 和 II 特异地结合, 提高了 SLR1 与 SCF 的 E3 泛素连接酶的亲和性, 促进了 SLR1 的泛素化和降解, 最终促进了植株的伸长 (Peng et al., 1999; Feng et al., 2008)。在蛋白质晶体结构方面的研究表明, GID1 蛋白中央能够容纳具有活性的 GA, 与 GA 的结合促使 GID1 的 N 端发生变化, 这种变化使 DELLA 蛋白的功能域 I 和 II 特异结合。GA-GID1-DELLA 复合体的形成促进 DELLA 蛋白的 C 端发生变化, 激发了 DELLA 与 SCF 的 E3 泛素连接酶的结合, 从而促进了 DELLA 的降解, 促进了植株的伸长。经 GA 处理后, *VvGID1A* 在葡萄果实的幼果期、中果期和大果期表达水平平均低于未经过 GA 处理的果实 (王西成 等, 2013)。板栗短雄花序中 *CmGID1* 表达量显著高于野生型, 经 GA 处理后其表达水平下降, 初步认为该短雄花序为一个 GA 合成缺陷型突变体 (李兴亮 等, 2011)。

目前多从生理和分子标记角度来阐述苹果短枝型芽变的机理 (Looney & Lane, 1984; 张玉萍 等, 1994; 牛自勉 等, 1996; 杨佩芳 等, 2000; 张今今 等, 2000; 祝军 等, 2000), 而从分子层面对短枝型芽变形成机理的研究甚少。因此, 开展苹果短枝型芽变相关基因的研究, 有助于揭示短枝型芽变形成的分子机理。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验于 2010—2012 年在山东农业大学作物生物学国家重点实验室进行。供试材料为‘长富 2 号’ (*Malus × domestica* Borkh.) 及其短枝型芽变品种‘龙富短枝’。‘龙富短枝’为 11 年生嫁接苗, 砧木为八棱海棠。在 5—8 月份分别于‘龙富短枝’花后 20、50、80 和 110 d 采集其当年生枝条从顶部数第一节间和新梢部分, 液氮速冻, -70 °C 冰箱保存备用。

工程菌 *Escherichia coli* DH5α 购自北京天根公司, 克隆载体 pJET1.2/blunt 购自 Fermentas 公司, Phusion DNA Polymerase 高保真聚合酶购于 New England Biolabs (NEB) 公司, 反转录试剂盒购自 Invitrogen 和 Fermentas 公司, 植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根 (北京) 公司。

1.2 基因克隆与序列分析

参照 Cheng 等（1993）方法提取 1 年生枝条新梢部分的总 RNA，参照天根植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。

参照 Zhang 等(2008)的方法进行反转录和 RACE 扩增。利用 Invitrogen 公司 Superscript II reverse transcriptase 反转录酶合成 cDNA，- 20 ℃ 保存备用。以水稻的 GID1 的 cDNA 序列为信息，比对苹果 EST 数据库，设计特异性引物 *pMdGID1a*-F 和 *pMdGID1a*-R 进行 PCR，PCR 反应条件为：98 ℃ 预变性 3 min；98 ℃ 10 s，57 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。参照 TaKaRa 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物，回收产物连接到 pJET1.2/blunt 载体上，转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞，筛选阳性克隆，送上海生工生物技术有限公司测序。根据所得 cDNA 片段，设计特异性引物 GSP1、GSP2、GSP3 和 GSP4，锚定引物 Smart P1、Smart P2 和 BRL-A2 进行巢式 PCR 扩增，回收、克隆并测序，序列拼接。再在两端设计特异引物 *MdGID1a*-F 和 *MdGID1a*-R 扩增基因全长序列。利用 NCBI 网站上的 BLASTx 程序进行同源序列比对，DNASTAR 软件分析基因的 ORF 和氨基酸序列；MEGA5 软件进行系统进化树构建。扩增引物序列见表 1。

1.3 上游调控序列的克隆

根据获得的 *MdGID1* 基因组序列设计 3 条巢式引物，参考 Liu 和 Chen（2007）的方法，利用 Hightail-PCR 技术，使用 3 轮 PCR 扩增 *MdGID1* 基因组上游调控序列，克隆、测序，鉴定测序正确的序列，利用软件 PLANTCARE 分析作用元件。扩增引物序列见表 1。

表 1 引物用途及序列
Table 1 Application of primers and sequence

用途 Use	引物名称 Primer name	序列（5′ - 3′）Sequence
扩增 <i>MdGID1a</i> 基因中间片段 Middle fragment amplification	<i>pMdGID1a</i> -F <i>pMdGID1a</i> -R	GTGGTCTCTGTGAATTATCGTAGGG GATGTTTTTGCCAGCACTCTCG
扩增 <i>MdGID1a</i> 基因 5′端 5′-end amplification	GSP1 GSP2 Smart P1 Smart P2	GGTCCCTATCTTCACCATCAGGGAG GCTCTCCAGTACCAGTCCCGGTC AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT ATCAACGCAGAGTGGCCATTATG
扩增 <i>MdGID1a</i> 基因 3′端 3′-end amplification	GSP3 GSP4 BRL-A2	GATGGATGGACAGCCCTGAGGTG CTCAAACGTTCATATCTATCTAGCTGG GGCCACGCGTCGACTAGTAC
<i>MdGID1a</i> 基因 ORF 扩增 Complete ORF amplification	<i>MdGID1a</i> -F <i>MdGID1a</i> -R	ATGTCTGGGGCAATGAAGTCAAC TCAATTATCGGAGAGCACGAATTTAC
<i>MdGID1a</i> 基因启动子的分离 Isolation of <i>MdGID1a</i> promoter	P1 P2 P3	CTGCCAAGTGGCGGTTGAAGGTCCCG GGGCGGCGCAGAAGATTGTATGAC CTTAAATGGAGATGAGGACCCATG
荧光定量 PCR Fluorescent quantitative PCR	qPCR- <i>MdGID1a</i> -F qPCR- <i>MdGID1a</i> -R <i>MdActin</i> -F <i>MdActin</i> -R	ATGTAACCCATTTGGTCCCCGT GATGTTTTTGCCAGCACTCTCG TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC

1.4 实时定量 qRT-PCR 分析

分别提取‘龙富短枝’的叶片、枝条、果实、花和叶芽以及花后 20、50、80 和 110 d 的‘龙富短枝’和‘长富 2 号’当年生枝条新梢的总 RNA，反转录合成 cDNA。依据 *MdGID1a* 的 ORF 序列设计荧光定量引物 qPCR-*MdGID1a*-F 和 qPCR-*MdGID1a*-R（表 1），选取 *MdActin*（GenBank accession number CN938024）为内参基因，采用两步法进行荧光定量 PCR，使用的仪器为 IQ5，PCR 反应重

复 3 次。PCR 反应体系为: SYBR Green I Master 10 μL , 上、下游引物浓度为 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 模板 1 μL , 加去离子水至 20 μL 。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 4 min, 94°C 10 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 40 个循环; 每次循环第 3 步进行荧光采集, 最后退火至 65°C , 每隔 30 s 上升 0.5°C 至 95°C 变性 1 min。试验结果用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法对数据进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 苹果 *MdGID1a* 基因克隆与序列分析

以水稻的 GID1 蛋白 (GenBank accession number AB211399) 氨基酸序列为信息探针, BLAST 搜索 GenBank 的苹果 EST 数据库, 对 EST 序列进行反复比对和拼接, 获得一条苹果的同源片段 *pMdGID1a*。经 RT-PCR 验证, 其长度为 504 bp。以 *pMdGID1a* 为核心片段, 利用特异性引物 GSP1、GSP2 和锚定引物 Smart P1、Smart P2 进行巢式 PCR 扩增, 获得一条特异性片段, 经测序验证后表明, 其精确长度为 746 bp, 包含起始密码子部分; 利用特异性引物 GSP3、GSP4 和锚定引物 BRL-A2 进行 PCR 扩增, 测序后精确长度为 499 bp, 包含终止密码子部分。最后利用特异性引物 *MdGID1a*-F 和 *MdGID1a*-R 扩增其开放读码框 (ORF) 全长, 测序后其精确长度为 1 035 bp (图 1)。

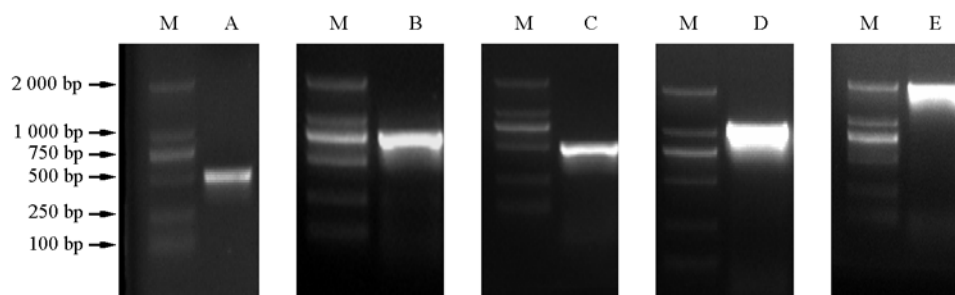


图 1 从短枝型苹果中分离的 *MdGID1a* 电泳图

M: Marker; A: *MdGID1a* 片段扩增产物; B: 5'RACE 扩增产物; C: 3'RACE 扩增产物;
D: *MdGID1a* ORF 全长扩增产物; E: *MdGID1a* 启动子扩增产物。

Fig. 1 Amplification of *MdGID1a* from spur-type bud sport apple

M: Marker; A: Amplification product of *MdGID1a* fragment; B: Amplification product of 5'RACE;
C: Amplification product of 3'RACE; D: Full-length amplification product of *MdGID1a* ORF;
E: The promoter product of *MdGID1a*.

生物信息学分析表明, 由苹果 *GID1a* 的 ORF 区推导其编码的氨基酸序列上包含 HGG、GX SXG 保守区以及 GA 和 DELLA 蛋白的结合位点, 推测该基因是 HSL 家族的赤霉素受体基因 (图 2)。

利用预测的氨基酸序列与 GenBank 上已登录物种的赤霉素受体相应序列进行同源性比对分析, 应用软件 MEGA5 构建系统树 (图 3)。BLAST 比对结果表明, 获得的 *MdGID1a* 与其它植物赤霉素受体基因的同源性很高, 如与葡萄的同源性为 80%, 与拟南芥的同源性为 76%。分析表明, 苹果 *GID1a* 与葡萄和拟南芥的 GID1 基因亲缘关系较近, 因此命名为 *MdGID1a*, GenBank 登录号为 JF516247。

根据获得的 *MdGID1a* 的 cDNA 全长, 利用基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到 1 条约 1 500 bp 的特异条带。经克隆、测序和序列比对分析, 结果表明, *MdGID1a* 基因组序列精确长度为 1 521 bp, 含有两个外显子和一个内含子, 内含子长度为 486 bp, 两个外显子长度分别为 38 bp 和 997 bp。

MdGID1a	MSGGNEVNVSSRMVPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....A.N.LS	89
VvGID1	MAGSNEVNLSESRVPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....G.E.EA	89
SoGID1	MAGSDEVNRNECKGPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....L.N.EA	98
GhGID1	MAGSDEVNRNECKGPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....L.N.EA	88
AtGID1L1	MAASDEVNLDESRTVPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....L.N.EA	90
MtGID1b	MTGTNEVNLDESRTVPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....SEN.ES	89
OsGID1	MAGSDEVNRNECKGPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....AEEGAAA.VT	97
TaGID1	MAGSDEVNRNECKGPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....AEEGAAA.LT	99
ZmGID1b	MAGSDEVNRNECKGPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....GGG.G.AT	94
PgGID1	MASSDDYGFDAEMVPHNTNVLISNFKLANNLRDGTFRRLDAGFLDRKVFANSEVDGVVSDVVIDRETSLSRIMHFDL.....A.T.SD	89
Consensus	m e v p t l i s n f k y r r d g t f r l e r v s d l r y	
MdGID1a	PLNIVDPERAV.SQE.VLPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...WLKSTIRDSNVHI	184
VvGID1	LPSIMELEKPV.TGD.IVPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...WLKSEEDSKVHI	184
SoGID1	LPILDFLAGAP.SFD.PPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...FLRSGADARFRV	193
GhGID1	QWGMVDLEKPLSTTE.IVPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...WLQSGKSNVHV	184
AtGID1L1	PFSLIDLEKPV.DGD.IVPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...WLKSKKSKVHI	185
MtGID1b	QWGMVDLEKPLSTTE.IVPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...WLQSGREKKVYV	185
OsGID1	RPILEFTIDAP.AAE.PPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...FMRSGGDAQARV	192
TaGID1	LPILDFLAGAP.SFD.PPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...FLRSGDARLRV	194
ZmGID1b	LPILDFLAGAP.SFD.PPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...SLGSGSGGARV	190
PgGID1	STANVAG.....LPEVILFFHGGSEAHSSNSNCIYDILCRRLVIGICKAVVSVNYRRAPENRYFCAMDGDWALRWVNSR...FMRSGGDAQARV	179
Consensus	p v i f f h g g s e a h s s n s n c i y d i l c r r l v i g i c k a v v s v n y r r a p e n r y f c a m d g d w a l r w v n s r	
MdGID1a	YLAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LEAVKFEFS	280
VvGID1	YVAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LVGMKFEFS	280
SoGID1	YLAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LVGMKFEFS	289
GhGID1	YLAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LVGMKFEFS	280
AtGID1L1	YLAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LVGMKFEFS	281
MtGID1b	YVAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LVGMKFEFS	285
OsGID1	YLAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LVGMKFEFS	288
TaGID1	YLAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LVGMKFEFS	290
ZmGID1b	YLAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LVGMKFEFS	286
PgGID1	YLAGSSGGNINVEVVAEAGSGL...NVLGNILLNFMFGGERTSEKRLDGKYFVILQDRWYWEANLHEGEDRTHACNPFEGFRGKS...LVGMKFEFS	275
Consensus	g d a s s g g n i n v e v v a e a g s g l n v l g n i l l n f m f g g e r t s e k r l d g k y f v i l q d r w y w e a n l h e g e d r t h a c n p f e g f r g k s	
MdGID1a	LVV.VAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	344
VvGID1	LVV.VAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	344
SoGID1	LII.VAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	353
GhGID1	LVV.VAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	344
AtGID1L1	LVV.VAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	345
MtGID1b	SLVQVAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	350
OsGID1	LII.VAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	354
TaGID1	LII.VAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	355
ZmGID1b	LII.VAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	350
PgGID1	LVV.VAGLDTTCRQLANAEGLREDEHDKVLMFLDCAVGFYILENNHFFYVMDEISKEVLSN.....	351
Consensus	v g l d l d q y l g a t g f y l n e i f	

图2 苹果 MdGID1a 与其它 GID1 蛋白的多序列比较

横线表示 HSL 家族的 HGG 和 GXSSXG 结构域; 星号表示 GA 或 DELLA 蛋白与 GID1 的结合位点。

Fig. 2 Multiple sequence alignment of MdGID1a and GID1 proteins from other plants

The lines indicate the HGG and GXSSXG domain of HSL family; The binding sites of GA and DELLA proteins are marked by asterisks.

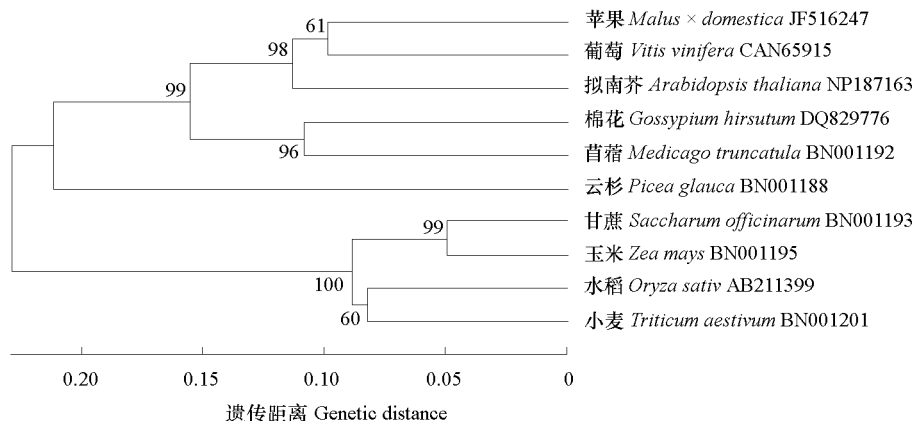


图3 苹果 MdGID1a 蛋白与其它植物 GID1 蛋白的系统发生分析

线上数字表示基因的相似性。

Fig. 3 Phylogenetic relationship of GID1 proteins in apple and other plants

The numbers indicate the gene similarity.

2.2 *MdGID1a* 启动子分离与序列分析

根据 *MdGID1a* 序列设计 3 条巢式引物和锚定引物进行 PCR 扩增, 得到 1 条长度约为 2 000 bp 的片段, 经克隆、测序、序列比对和软件分析, 发现序列中含有植物激素响应元件、光响应元件和高温响应元件 (表 2), 分析结果说明 *MdGID1a* 基因的转录表达可能受到这些因子的调控。

表 2 *MdGID1a* 上游调控序列顺式元件分析
Table 2 Cis-acting elements potentially associated with *MdGID1a*

元件 Motif	与起始密码子的距离/bp Distance from ATG	序列 Sequence	功能 Function
ABRE	1866	ACGTG	脱落酸响应元件 Cis-acting element involved in ABA responsiveness
ARR1AT	1433	NGATT	细胞分裂素响应元件 Cis-acting element involved in CTK responsiveness
ASF1MOTIFCAMV	460	TGACG	生长素和光响应元件 Cis-acting element involved in AUXIN and light responsiveness
CAREOSREP1	33	CAACTC	赤霉素响应元件 Cis-acting element involved in GA responsiveness
CCAATBOX1	1756	CCAAT	光和高温响应元件 Cis-acting element involved in light and high-temperature responsiveness
GATABOX	127	GATA	光响应元件 Cis-acting element involved in light
W-box	459	TTGAC	病害和赤霉素响应元件
	734	TGACT	Cis-acting element involved in disease, GA responsiveness
	905	CTGACY	
	636	TGACY	
WRKY71OS	216	TGAC	赤霉素响应元件 Cis-acting element involved in GA responsiveness

2.3 *MdGID1a* 表达模式分析

利用实时定量 qRT-PCR 方法, 在同一生长季节和相同立地条件下, 检测了 *MdGID1a* 在 ‘龙富短枝’ 5 个组织器官以及 ‘龙富短枝’ 和 ‘长富 2 号’ 枝条不同生长阶段中的转录水平。结果发现, *MdGID1a* 在所检测的组织器官中均表达, 在花和枝条中表达量较大, 在果实、叶片和叶芽中表达较弱 (图 4)。*MdGID1a* 在 ‘龙富短枝’ 和 ‘长富 2 号’ 枝条整个生长阶段均有表达, 在 20 和 80 d, 在短枝型中的相对表达量显著低于普通型 ($P < 0.05$, 图 5)。

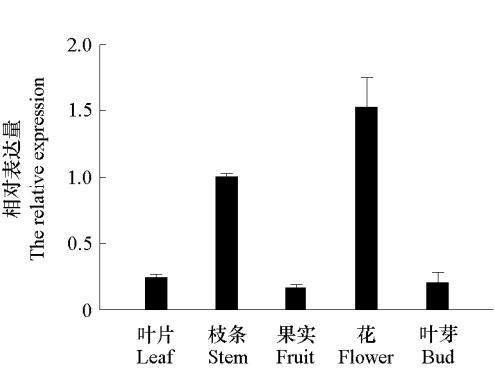


图 4 短枝型苹果 ‘龙富短枝’ 不同组织中 *MdGID1a* 转录水平的表达分析
Fig. 4 Expression analyzing of *MdGID1a* in different tissues of spur-type apple ‘Longfu Duanzhi’ at transcript levels

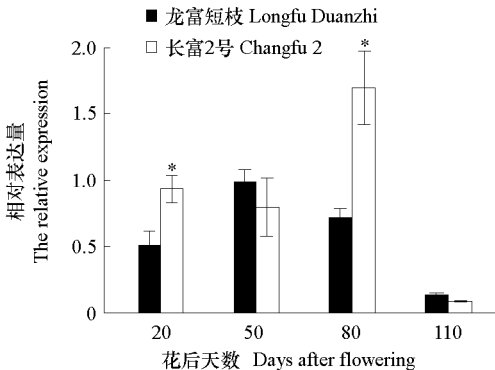


图 5 短枝型苹果 ‘龙富短枝’ 和普通型 ‘长富 2 号’ 枝条中 *MdGID1a* 基因转录水平上的表达分析
Fig. 5 Expression analyzing of *MdGID1a* in the shoots of spur-type apple ‘Longfu Duanzhi’ and normal apple ‘Changfu 2’ at transcript levels
 $P < 0.05$.

3 讨论

目前,在拟南芥、水稻等植物中,响应赤霉素的受体 GID1 蛋白已经被克隆鉴定(Ueguchi-Tanaka et al., 2005)。植物既可以通过 F-box 蛋白的泛素—蛋白酶体途径降解 DELLA 蛋白外,也可以通过 GID1 蛋白、GA 和 DELLA 蛋白形成的 GA-GID1-DELLA 复合体来降低植物体内游离的 DELLA 蛋白含量,从而解除 DELLA 蛋白对植物生长的抑制作用(Harberd et al., 2009)。水稻中的 GID1 蛋白能够与 DELLA (SLR1) 互作,响应 GA 信号,共同调控植株的生长(Itoh et al., 2008)。拟南芥中有多个 GID1 同源基因,功能上存在一定的冗余(Nakajima et al., 2006; Iuchi et al., 2007)。棉花中有 6 个 GID1 同源基因,它们的功能及冗余又互补,并且在棉花不同器官和组织中表达水平存在差异(董静等, 2009)。本研究分离克隆得到 *MdGID1a* 基因,属于典型的 HSL 基因家族成员,含有保守的 HGG 和 GX SXG 结构域及与 GA 和 DELLA 蛋白相结合的作用位点。*MdGID1a* 基因与拟南芥和水稻的 GID1 基因具有非常高的同源性,可能与赤霉素受体的功能相似。拟南芥中有 3 个 *GID1* 基因,单个 *GID1* 突变后植株表型无变化,但双突变或三突变后植株茎的伸长受到抑制,植株表现为严重的矮化。本研究 *MdGID1a* 在枝条和花中表达量较高,在叶片、果实和芽中表达量较低,而且在枝条的整个生长阶段持续表达,并且在花后 20 d 和 80 d,在短枝型枝条中的表达量显著低于正常型枝条,说明 *MdGID1a* 对枝条的生长可能有重要调控作用。推测苹果短枝型芽变的 *MdGID1a* 下调表达,降低了植株对 GA 的敏感度,影响了植株的伸长,从而产生了短枝型枝条。

本研究中利用 Hightail-PCR 方法分离得到 *MdGID1a* 基因的上游调控序列,并通过 Plantcare 软件分析了其调控元件,发现存在多个植物激素响应元件、光响应元件和温度响应元件与相应 GA 及枝条生长密切相关。可见 *MdGID1a* 的表达可能受到赤霉素和光等信号的调节。综上, *MdGID1a* 可能具有与拟南芥和水稻的 GID1 基因相类似的功能,能够作为赤霉素受体而响应赤霉素信号并调控短枝型芽变枝条的形成。但是 *MdGID1a* 究竟如何调控短枝型枝条的形成目前尚不清晰,需要进一步研究。

References

- Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Kondo M, Hamada K, Yano K, Nishimura M, Matsuoka M. 2009. Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of GAMYB. *The Plant Cell*, 21: 1453 - 1472.
- Cheng S, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11: 113 - 116.
- Dong Jing, Yin Meng-hui, Yang Fan, Zhao Juan, Qin Shan, Hou Lei, Luo Ming, Pei Yan, Xiao Yue-hua. 2009. Cloning and expression profiling of gibberellins insensitive dwarf *GID1* homologous genes from cotton. *Acta Agronomica Sinica*, 35 (10): 1822 - 1830. (in Chinese)
- 董 静, 尹梦回, 杨 帆, 赵 娟, 覃 珊, 侯 磊, 罗 明, 裴 炎, 肖月华. 2009. 棉花赤霉素不敏感矮化 *GID1* 同源基因的克隆和表达分析. *作物学报*, 35 (10): 1822 - 1830.
- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J L, Wang F, Chen L Y, Yu L, Iglesias-Pedraz J M, Kircher S, Schafer E, Fu X D, Fan L M, Deng X W. 2008. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, 451: 475 - 479.
- Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang Z L, Powers S J, Gong F, Phillips A L, Hedden P, Sun T P, Thomas S G. 2006. Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18: 3399 - 3414.
- Harberd N P, Belfield E, Yasumura Y. 2009. The angiosperm Gibberellins-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: How an “inhibitor of an inhibitor” enables flexible response to fluctuating environments. *American Society of Plant Biologists*, 21: 1328 - 1339.
- Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Matsuoka M. 2008. Molecular biology of gibberellins signaling in higher plants. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 268: 191 - 221.
- Iuchi S, Suzuke H, Kim Y C, Iuchi A, Kuromori T, Ueguchi-Tanaka M, Asami T, Yamaguchi I, Matsuoka M, Kobayashi M, Nakajima M. 2007. Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellins receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellins signal. *The Plant Journal*, 50: 958 - 966.
- Li A X, Yang W L, Li S J, Liu D C, Guo X L, Sun J Z, Zhang A M. 2013. Molecular characterization of three gibberellin-insensitive dwarf1

- homologous genes in hexaploid wheat. *Journal of Plant Physiology*, 170: 432 – 443.
- Li H P, Wang Y, Li X C, Gao Y, Wang Z J, Zhao Y, Wang M L. 2011. A GA-insensitive dwarf mutant of *Brassica napus* L. correlated with mutation in pyrimidine box in the promoter of *GIDI*. *Molecular Biology Reports*, 38: 191 – 197.
- Liu Y G, Chen Y L. 2007. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification. *Short Technical Reports*, 43: 649 – 656.
- Li Xing-liang, Guo Xian-ping, Shen Yuan-yue, Cao Qing-qin, Feng Yong-qing, Qin Ling. 2011. Preliminary identification of Gas-deficient short male catkin mutant and expression analysis of *CmGIDI* in *Castanea mollissima*. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (7): 1251 – 1258. (in Chinese)
- 李兴亮, 郭献平, 沈元月, 曹庆芹, 冯永庆, 秦 岭. 2011. 板栗赤霉素缺陷型短雄花序芽变的初步鉴定及 *CmGIDI* 基因的表达分析. *园艺学报*, 38 (7): 1251 – 1258.
- Looney N E, Lane W D. 1984. Spur-type growth mutants of McIntosh apple: A review of their genetics, physiology and field performance. *Acta Horticulturae*, 146: 31 – 46.
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim Y C, Park S H, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kabayashi M, Maeda T, Matsuoka M, Yamaguchi I. 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *The Plant Journal*, 46: 880 – 889.
- Niu Zi-mian, Wang Xian-ping, Li Quan, Chen Hong. 1996. A study on bearing habit in various spur-type strains of Red Fuji apple. *Scientia Agricultura Sinica*, 29 (2): 45 – 51. (in Chinese)
- 牛自勉, 王贤萍, 李 全, 陈 宏. 1996. 短枝红富士苹果结果特性的研究. *中国农业科学*, 29 (2): 45 – 51.
- Olszewski N, Sun T P, Gubler F. 2002. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell*, 14: S61 – S80.
- Peng J, Richards D E, Hartlye N M, Murphy G P, Devos K M, Flintham J E, Beales J, Fish L J, Worland A J, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape J W, Gale M D, Harber N P. 1999. ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 400: 256 – 261.
- Plackett A R G, Thomas S G, Wilson Z A, Hedden P. 2011. Gibberellin control of stamen development: A fertile field. *Trends in Plant Science*, 16: 568 – 578.
- Richards D E, King K E, Ait-ali T, Harber N P. 2001. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 67 – 68.
- Schwechheimer C. 2008. Understanding gibberellin acid signaling—Are we there yet? *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 9 – 15.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow T Y, Hsing Y I, Kitano H, Yamaguchi I, Matsuoka M. 2005. *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437: 693 – 698.
- Wang Xi-cheng, Wu Wei-min, Fang Jing-gui, Qian Ya-ming, Wang Chen, Song Chang-nian, Zhao Mi-zhen. 2013. Isolation, subcellular localization and expression analysis of gibberellins receptor gene *VvGID1A* from grapevine. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (5): 839 – 848. (in Chinese)
- 王西成, 吴伟民, 房经贵, 钱亚明, 王 晨, 宋长年, 赵密珍. 2013. 葡萄赤霉素受体基因 *VvGID1A* 的分离、亚细胞定位及表达分析. *园艺学报*, 40 (5): 839 – 848.
- Willige B C, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann E M N, Maier A, Schwechheimer C. 2007. The DELLA domain of *GA INSENSITIVE DWARF1A* gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19: 1209 – 1220.
- Yang Pei-fang, Hao Yan-yan, Tian Cai-fang. 2000. Studies on the anatomy the vessel member of spur-type apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (1): 52 – 54. (in Chinese)
- 杨佩芳, 郝燕燕, 田彩芳. 2000. 苹果短枝型品种导管分子的解剖学研究. *园艺学报*, 27 (1): 52 – 54.
- Zhang L H, Tello J A, Zhang W M, Tsai P S. 2008. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aphysia californica*. *General and Comparative Endocrinology*, 156 (2): 201 – 209.
- Zhang Jin-jin, Wang Yue-jin, Li Rong-qi. 2000. Study on apple spur type sports using RAPD. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 8 (3): 285 – 288. (in Chinese)
- 张今今, 王跃进, 李荣旗. 2000. 苹果短枝型性状的 RAPD 研究. *农业生物技术学报*, 8 (3): 285 – 288.
- Zhang Yu-ping, Niu Zi-mian, Li Quan. 1994. A study on the correlation between ABA content and growth and development of spur-type variety of apple. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 14 (2): 138 – 140. (in Chinese)
- 张玉萍, 牛自勉, 李 全. 1994. 苹果短枝型品种脱落酸含量与树体生长的研究. *山西农业大学学报*, 14 (2): 138 – 140.
- Zhu Jun, Wang Tao, Zhao Yu-jun, Zhang Wen, Li Chen-guang, Zhou Ai-qin. 2000. Identification of apple varieties with AFLP molecular marker. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (2): 102 – 106. (in Chinese)
- 祝 军, 王 涛, 赵玉军, 张 文, 李晨光, 周爱琴. 2000. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种. *园艺学报*, 27 (2): 102 – 106.