

‘辽宁 2 号’DELLA 蛋白编码基因的克隆及表达分析

宋晓波^{1,2}, 王红霞², 张志华²

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 2. 河北农业大学 山区研究所, 河北 保定 071000)

摘要: 以‘辽宁 2 号’核桃的叶片为试材, 通过同源克隆和 RACE 技术克隆 DELLA 家族蛋白的编码基因, 并进行了同源性分析和氨基酸序列的多重比对; 通过实时荧光定量 PCR 分析了该基因在‘辽宁 2 号’核桃中的组织特异性表达情况。主要研究结果如下: 获得了 DELLA 蛋白编码基因的 cDNA 全长, 命名为 *JrGAI* (Genebank: JF766606), cDNA 全长为 2 361 bp, 包含 1 842 bp 编码区序列, 推测其编码的蛋白包含 613 个氨基酸, 分子量为 66.78 kDa。同源性分析及氨基酸序列的多重比对结果表明该蛋白与其他物种的 DELLA 蛋白高度相似, 并且具有完整的 DELLA、TVHYN、VHIID、RVER 和 SAW 等结构域; 实时荧光定量 PCR 结果显示 *JrGAI* 基因在‘辽宁 2 号’核桃的叶芽、混合花芽、叶片、雄花、茎段和果实中普遍表达, 并且在休眠期组织中具有较高的表达量, 其中以休眠期的混合花芽中的表达量最高。

关键词: 核桃; 矮化; DELLA 蛋白; *JrGAI*; 表达分析

中图分类号: S664.1

文献标志码: A

Cloning and expression analysis of *JrGAI* gene in DELLA protein from ‘Liaoning 2’

SONG Xiao-bo^{1,2}, WANG Hong-xia², ZHANG Zhi-hua²

(1. College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;
2. Mountain Area research Institute of Hebei Province, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China.)

Abstract: The leaves of the dwarf walnut cultivar ‘Liaoning 2’ were used for cloning the gene encoding DELLA protein by in this research homologous cloning and RACE techniques. Homology analysis and multiple sequences alignment analysis of the amino acid sequences were carried out with bioinformatics technology. The expression pattern of *JrGAI* gene in different tissues of dwarf walnuts was analyzed with real-time quantitative PCR detection. The main results are as follows: The full-length cDNA was isolated from the ‘Liaoning 2’ cultivar and was named as *JrGAI* (Genebank: JF766606). It was 2 361 bp long including 1 842 bp of ORF. The protein it encoded is deduced as 66.78 kDa and contains 613 amino acid residues. According to the results of homology analysis and multiple alignment analysis of the amino acid sequences, the protein that the gene encoded is highly similar to the DELLA protein in other species, having complete domains like DELLA, TVHYN, VHIID, RVER and SAW. The real-time quanti-

收稿日期: 2015-10-20

作者简介: 宋晓波(1986-), 男, 河北省石家庄人, 博士研究生, 研究方向为经济林树种遗传改良。

E-mail: songxiaobao@126.com

通讯作者: 张志华(1957-), 男, 河北省玉田人, 研究员, 博士生导师, 主要从事核桃栽培育种方面的研究。

E-mail: zzh@hebau.edu.cn

tative PCR analysis showed the *JrGAI* gene was always expressed in leaves, leaf buds, shoot tips, internodes, mixed floral buds, male flowers and fruits of 'Liaoning 2' cultivars. Meanwhile, *JrGAI* gene was highly expressed in tissues of dormancy period, and it had the highest expression in mixed floral buds in dormancy.

Keywords: walnut; dwarf; DELLA protein; *JrGAI*; expression analysis

矮化是植物育种工作中重要的农艺性状之一。矮化密植型栽培模式因具有结果早、品质好、管理方便、品种更新快等优点,已成为现代果树业发展的趋势^[1]。'辽宁 2 号'为短枝型早实核桃品种,树冠紧凑,树体矮化。侧芽形成混合芽的能力超过 95%,丰产性强^[2, 3],是施行矮化密植栽培和研究果树矮化机理的重要资源。

目前,有关矮化分子机理的研究大多集中在模式植物当中,并已获得了许多与矮化性状相关的基因。这些基因大多与赤霉素的合成途径或赤霉素信号转导途径相关。赤霉素(GA)是植物体内一类具有广泛生理功能的植物激素,其功能涉及植物生长发育的各个关键时期^[4, 5]。而 DELLA 蛋白是赤霉素信号转导通路中重要的负调控因子,因 N 端存在保守的 DELLA 结构域而得名^[6-8]。在拟南芥中的 DELLA 蛋白家族中有 GAI、RGA、RGL1、RGL2、RGL3 等成员,其中 GAI/RGA 是茎伸长的主要负调控因子^[9]。正常情况下 GAI/RGA 蛋白在 GA 信号的作用下,通过泛素-蛋白酶体途径降解,从而解除对下游基因的抑制作用,植株表现出正常的 GA 响应表型。当 GAI/RGA 蛋白的 DELLA 结构域发生变异时,会导致植株赤霉素不敏感的矮化表型^[10]。拟南芥中的 *gai*^[11]、玉米中的 *d8*^[12]、大麦中的 *sln1*^[13] 以及葡萄中的 *Vvgai*^[14] 等突变体均是由于 DELLA 结构域发生氨基酸序列的缺失或突变导致赤霉素不敏感的矮化表型,外施赤霉素并不能使其恢复野生表型;另一方面,DELLA 蛋白编码基因的高表达,同样也会引起植株的矮化表型^[15]。

本研究以'辽宁 2 号'核桃叶片为试材克隆 DELLA 蛋白的编码基因,并通过实时荧光定量 PCR 技术分析该基因在'辽宁 2 号'不同组织中的组织特异性表达模式,试图探索'辽宁 2 号'短枝、矮化性状与 DELLA 蛋白的关系,从而为生物技术途径的矮化育种提供理论依据和资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验取材于河北省定州市德胜农林公司核桃种质资源圃。试验材料为核桃品种'辽宁 2 号',树龄 9 年,本砧,株行距 5m×6m,有灌溉条件,管理水平良好。分别于 2011 年春季萌芽前(3 月下旬)采集该品种的叶芽和一年生枝顶端混合芽;于新梢生长期(4 月下旬)采集幼嫩叶片、新梢茎段和未开放的雄花;于果实膨大期(5 月中旬)采集幼果。样品采集后立即放入液氮中速冻,并于 -80 °C 保存,用于 RNA 提取。

1.2 试验方法

1.2.1 *JrGAI* 基因 cDNA 全长的克隆 总 RNA 的提取方法参照北京百泰克生物技术有限公司的通用植物总 RNA 提取试剂盒中的方法进行;以琼脂糖凝胶电泳法检测 RNA 的完整性,NanoDrop 8 000 分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度;参照北京全式金生物技术有限公司的反转录试剂盒中的方法进行 cDNA 的合成,-20 °C 保存备用。

根据 GenBank 中的已公布的 *GAI* 基因的保守区序列,设计一对简并引物 F1/R1,RT-PCR 技术扩增 *JrGAI* 基因的中间片段。根据中间片段的测序结果分别设计 5'端和 3'端基因特异性引物(GSP 1-4),巢式 PCR 进行 5'和 3'末端的扩增。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后,回收目的片段,连接至 pGM-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,菌落 PCR 鉴定后委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。应用 VectorNTI 8.0 软件的 Contig Express 程序,将 5'和 3' RACE 末端序列与中间片段进行拼接,得到核桃 *JrGAI* 基因的 cDNA 序列全长(引物序列见表 1)。

1.2.3 核桃 *JrGAI* 基因的生物信息学分析 所得序列在 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)上使用 Blast 进行分析,验证克隆片段的正确性;基因及蛋白质基本性质,ORF 查找和 ORF 翻译等借助 DNAMAN 软件完成;利用 CLUSTALX 1.81 进行

序列多重比对;通过 MEGA version 5.0 软件构建进化树。

表 1 引物列表

Table 1 Primer Sequence

引物用途 Purpose of Primer	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
中间片段克隆	F1	CCAATCAAGCCATC-CTCG
	R1	GTTGTGGTTCGCCTC-CTG
	GSP1	TAGGGACAGGTCTCG-TAGAAATGC
	GSP2	GGAAACAGTGAAC-CACCGCCTACA
	GSP3	CACCCGCTTTTCGCTT-GACTGGT
	GSP4	GAGACGAT-TCACGTCGAGTTTG
	5'RACE Outer Primer	CATGGCTACATGCTGA-CAGCCTA
RACE 扩增引物	5'RACE Inner Primer	CGCGGATCCACAGC-CTACTGATGAT-CAGTCGATG
	3'RACE Outer Primer	TACCGTCGTTCCAC-TAGTGATTT
	3'RACE Inner Primer	CGCGGATCCTCCAC-TAGTGATTTCACTAT-AGG
	qJrGAI F	AGCGAACCACAACG-GACCAGT
qRT-PCR 引物	qJrGAI R	ACCTTGTCCTGATT-GCTCACGGAT
	18SrRNA F	AGAGGCCTACAATG-GTGGTG
内参基因引物	18SrRNA R	CTCCAATGGATC-CTCGTTA

1.2.4 *JrGAI* 基因在‘辽宁 2 号’中的组织特异性表达分析 分叶取叶芽、混合芽、叶片、茎段、雄花和果实为材料提取总 RNA,反转录合成 cDNA。根据已得到的 *JrGAI* 基因全长设计实时荧光定量 PCR 引物(*qJrGAI F/R*),以核桃的 18SrRNA 为内参基

因设计引物(见表 1)。实时荧光定量分析按照 SYBR Premix ExTaq™ (TAKARA) 试剂中的说明,在 Light Cycler Real Time PCR 扩增仪(Roche)上完成。20 μ L 完成反应体系为:SYBR Premix (2X)10.0 μ L,上游引物(10 μ M)0.4 μ L,下游引物(10 μ M)0.4 μ L,cDNA 2.0 μ L,ddH₂O 7.2 μ L,每样本 3 次技术重复。采用两步法 PCR 标准扩增程序,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行定量数据分析。

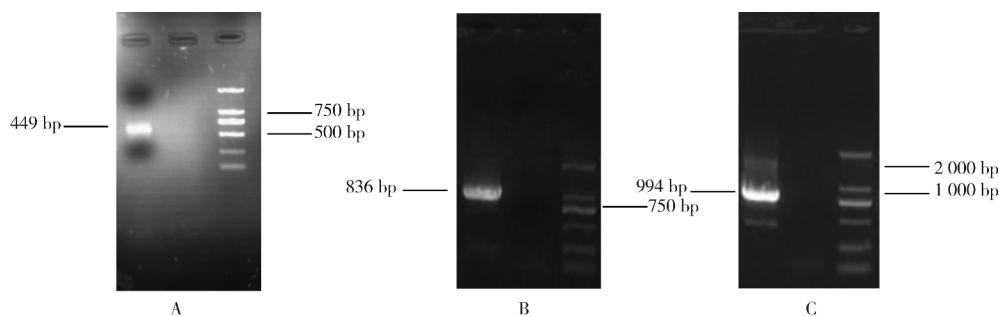
2 结果与分析

2.1 ‘辽宁 2 号’核桃 *JrGAI* 基因 cDNA 全长的克隆

根据 NCBI 数据库中公布的 *GAI* 基因序列设计兼并引物,以‘辽宁 2 号’核桃的叶片 cDNA 为模板,通过 RT-PCR 克隆得到约 450 bp 的中间片段(图 1A),经 Blast 比对后,显示其编码的氨基酸序列与小金海棠和苹果的 DELLA 蛋白同源性最高,分别为 92%和 91%。证明克隆到的序列为 DELLA 蛋白编码基因的一部分。

利用 5'RACE 基因特异性引物 GSP1/GSP2 进行巢式 PCR 扩增,得到一条长度为 836 bp 的片段(图 1B),序列比对发现与中间片段有 49 bp 的重叠区域。3'RACE 基因特异性引物 GSP3/GSP4,进行巢式 PCR 扩增,得到一条长度在 994 bp 的片段(图 1C),序列比对发现与中间片段有 234 bp 的重叠区域,且在 3'端有 12 bp 的 poly A 结构,具备一般 cDNA 序列 3'端的典型特征,可以确定为核桃 DELLA 蛋白编码基因完整的 3'端 cDNA 序列。

将上述 3 个片段的序列根据重叠区进行拼接得到 *JrGAI* 基因的全长。核桃 *JrGAI* 基因的 cDNA 全长为 2 361 bp,包含 158 bp 的 5'UTR 区,349 bp 3'UTR 区及 12 bp 的 poly A。



M. Maker; A. *JrGAI* 基因片段扩增产物; B. 5'RACE 扩增产物; C. 3'RACE 扩增产物

图 1 核桃 *JrGAI* 基因扩增电泳图

Fig. 1 Amplification of *JrGAI* from walnut

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

Juglans regia 核桃	LACHTAIH....	644
Malus domestica 苹果	ESXNSVIAH....	666
Populus tomentosa 杨树	YNNHFPVGGAN..	694
Vitis vinifera 葡萄	LNNHFAISSTPAS	620
Gossypium barbadense 海岛棉	LTNHTAISQ....	647
Arabidopsis thaliana 拟南芥	SS.....	618
Nicotiana sylvestris 烟草	SS.....	618
Eucalyptus grandis 巨桉	EAATQ.....	659
Pyrus betulifolia 杜梨	EPNSVIAH.....	665
Consensus		

图 2 核桃 DELLA 蛋白与其他 DELLA 蛋白多重序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of JrDELLA with other DELLA proteins

利用 MEGA5.0 软件,选取核桃的 DELLA 蛋白与数据库中已登录的 8 种高等植物的 DELLA 蛋白进行系统进化树的构建(图 3)。系统进化关系分析结果显示:核桃的 DELLA 蛋白单独聚为一支,并且与蔷薇科的苹果、杜梨以及杨柳科的杨树亲缘关系较近。

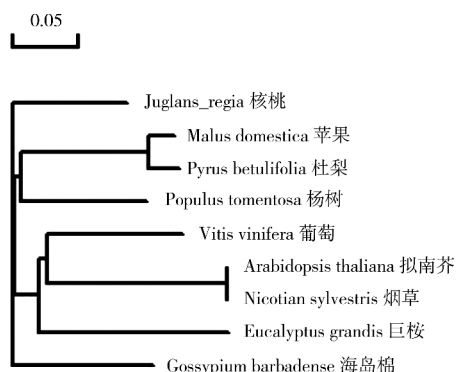
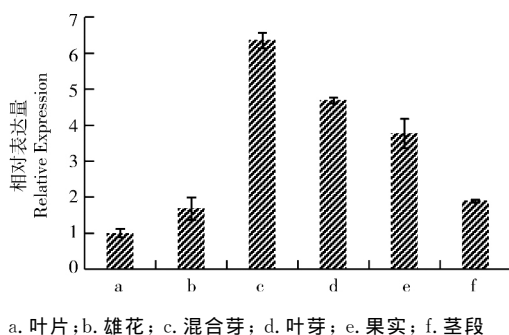


图 3 DELLA 蛋白的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of JrDELLA proteins with known DELLA proteins

2.3 *JrGAI* 基因在‘辽宁 2 号’中的组织特异性表达分析

实时荧光定量 PCR 结果显示,*JrGAI* 基因在‘辽宁 2 号’核桃的叶芽、混合芽、叶片、雄花、茎段和果实中均有表达,相对于生长活跃的组织来说,*JrGAI* 基因在休眠期的组织中具有更高的表达量,其中以休眠期的混合芽中的表达量最高(图 4)。

图 4 *JrGAI* 基因在‘辽宁 2 号’核桃不同组织中的表达分析Fig. 4 Expression analysis of *JrGAI* in different tissues of ‘Liaoning 2’ by qRT-PCR with 18S rRNA as control

3 讨论

核桃在植物学和树木分类学中被定义为高大乔木,自然生长情况下,成年树体高度可达 25~30 m^[2],即使经过高强度栽培措施也只能控制在 6 m 左右。导致栽培管理困难,树冠郁闭,影响通风透光,果实品质差,经济效益低。因此核桃矮化品种和核桃矮化砧木的选育工作就显得尤为重要。但是由于复杂的遗传背景和较长的童期,矮化育种工作进展缓慢。对于果树矮化机理的研究也大多集中在生理生化指标和解剖结构与树体生长势的关系上^[16, 17]。本研究以矮化型核桃品种‘辽宁 2 号’为材料克隆了 *JrGAI* 基因的 cDNA 全长。氨基酸序列通过分析发现‘辽宁 2 号’*JrGAI* 基因编码的 DELLA 蛋白与拟南芥^[12]、水稻^[18]、葡萄^[14]和苹果^[19]等多个物种的 DELLA 蛋白具有较高的同源性,且具有 DELLA 家族蛋白完整的功能结构域。因此推测,‘辽宁 2 号’并不是 DELLA 蛋白突变导致的赤霉素不敏感型矮化突变体,但 *JrGAI* 基因的获得能够为核桃矮化分子机理的研究提供良好的基因资源。

实时荧光定量 PCR 分析表明,*JrGAI* 基因在‘辽宁 2 号’的叶芽、混合芽、叶片、雄花、茎尖和果实中普遍表达,其中混合芽中的表达量最高。这一结果同甜樱桃^[20]和苹果^[19, 21]中的表达结果一致。赤霉素在植物的生长发育过程中具有相反的双重作用:一方面赤霉素能够促进植物从营养生长向生殖生长的转变,同时又具有抑制花芽分化的作用^[22]。因此推测‘辽宁 2 号’混合花芽中 *JrGAI* 基因的高表达可能与该品种较短的童期以及高侧花芽比率相关,较早的进入结果期,同时较大果实负载量对营养生长的抑制也是导致该品种矮化性状的一个重要原因。

本研究以短枝、矮化型核桃品种‘辽宁 2 号’为试材,分离出 DELLA 蛋白的编码基因。下一步将继续研究该基因在不同类型核桃品种和树体,不同

发育时期的表达模式,以及赤霉素信号转导通路中其他关键因子克隆,以期更深入的探索‘辽宁2号’矮化性状的分子机理,进一步为核桃矮化品种和矮化砧木的选育奠定基础。

参考文献:

- [1] 贾敬贤, 陈长兰, 李树玲, 等. 梨树矮化密植栽培[M]. 北京: 金盾出版社, 2000.
- [2] 郝荣庭, 张毅萍. 中国果树志: 核桃卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1996.
- [3] 裴东, 鲁新政. 中国核桃种质资源[M]. 北京: 中国林业出版社, 2011.
- [4] Fleet C M, Sun T. A DELLA cate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis[J]. Current opinion in plant biology, 2005, 8(1): 77-85.
- [5] Swain S M, Singh D P. Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development[J]. Trends in plant science, 2005, 10(3): 123-129.
- [6] Sun T. The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants[J]. Current Biology, 2011, 21(9): R338-R345.
- [7] Davière J M, Achard P. Gibberellin signaling in plants[J]. Development, 2013, 140(6): 1147-1151.
- [8] Locascio A, Blázquez M A, Alabadi D. Genomic analysis of DELLA protein activity[J]. Plant and cell physiology, 2013, 54(8): 1229-1237.
- [9] Alvey L, Harberd N P. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs[J]. Physiologia Plantarum, 2005, 123(2): 153-160.
- [10] 黄先忠, 马正强. DELLA 家族蛋白与植物生长发育的关系[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(5): 529-532.
- [11] Peng J, Carol P, Richards D E, et al. The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses[J]. Genes & Development, 1997, 11(23): 3194-3205.
- [12] Peng J, Richards D E, Hartley N M, et al. ‘Green revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators[J]. Nature, 1999, 400(6741): 256-261.
- [13] Chandler P M, Marion-Poll A, Ellis M, et al. Mutants at the Slender1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization[J]. Plant physiology, 2002, 129(1): 181-190.
- [14] Boss P K, Thomas M R. Association of dwarfism and floral induction with a grape ‘green revolution’ mutation[J]. Nature, 2002, 416(6883): 847-850.
- [15] Etherington E, Gandhi H, Busov V, et al. Dwarfism genes for modifying the stature of woody plants: a case study in poplar[J]. Landscape, 2007, 18:3-16.
- [16] 张志华, 刘新彩, 刘彦红, 等. 核桃幼树内源激素与生长势的关系[J]. 林业科学, 2006, 42(9): 131-133.
- [17] 张志华, 刘新彩, 刘彦红, 等. 核桃枝条解剖结构与生长势的关系[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1303-1308.
- [18] Ikeda A, Ueguchi-Tanaka M, Sonoda Y, et al. 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[J]. The Plant Cell Online, 2001, 13(5): 999-1010.
- [19] Foster T, Kirk C, Jones W T, et al. Characterisation of the DELLA subfamily in apple (Malus x domestica Borkh.)[J]. Tree Genetics & Genomes, 2007, 3(3): 187-197.
- [20] 钟翡, 沈欣杰, 刘芳, 等. 甜樱桃 DELLA 蛋白基因 PaGAI 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2012, 39(1): 143-150.
- [21] Willige B C, Ghosh S, Nill C, et al. The DELLA domain of GA INSENSITIVE mediates the interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A gibberellin receptor of Arabidopsis[J]. The Plant Cell Online, 2007, 19(4): 1209-1220.
- [22] Yamaguchi N, Winter C M, Wu M F, et al. Gibberellin acts positively then negatively to control onset of flower formation in Arabidopsis[J]. Science, 2014, 344(6184): 638-641.

(编辑:王雅娇)