

蚬壳花椒 *GID1* 同源基因克隆及其在种子萌发过程中的表达分析

周韬¹, 王平^{2,*}, 孙吉康^{1,*}, 李猛²

中南林业科技大学¹生命科学与技术学院,²环境科学与工程学院, 长沙410004

摘要: *GID1* 是赤霉素信号通路关键调控基因, 其通路主要影响种子萌发和植物生长。本文以高通量测序构建的蚬壳花椒 (*Zanthoxylum dissitum*) cDNA文库为参考, 克隆了蚬壳花椒3个 *GID1* 同源基因 *ZaGID1a*、*ZaGID1b*、*ZaGID1c*。利用生物信息学对蚬壳花椒 *GID1* 同源基因的核酸序列及氨基酸序列进行分析, 表明3个同源 *GID1* 序列编码的蛋白功能区域、理化性质、系统发育、亲疏水性、亚细胞信号肽定位、三级结构预测等各项生物信息学信息均指向赤霉素受体蛋白功能。同源 *GID1* 序列在蚬壳花椒种子人工萌发过程中的实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 表达量分析研究表明, *ZaGID1a*、*ZaGID1c* 可能对蚬壳花椒种子萌发起关键调控作用, *ZaGID1b* 与种子萌发过程的关系不明显。

关键词: 蚬壳花椒; 克隆; 表达分析; 生物信息学

蚬壳花椒 (*Zanthoxylum dissitum*) 是我国南方重要的珍稀林药资源。资源调查研究表明: 该植物结实率高, 但种子自然繁殖率低。虽然蚬壳花椒并未纳入濒危保护植物名录, 但由于较大的市场需求造成主产地对资源的掠夺性采伐, 加之其生境特征, 使野生蚬壳花椒资源已处于严重匮乏状态, 面临濒危 (马英姿等2007; 杨辉等2015)。课题组前期研究发现其自然萌发率低是由于种子的休眠机制所致 (程鹏等2013), 而种子的休眠与萌发涉及一系列基因的表达作用。

转录组测序技术被广泛用于真核生物、原核生物以及病毒的基因组研究中, 近几年来转录组高通量测序技术极大促进了植物基因表达研究 (周茜等2016)。国内外学者利用转录组测序技术对以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为代表的模式植物种子休眠与萌发机制的研究报道逐渐增多, 克隆了一批与休眠和萌发相关的基因, 并采用组学 (omics) 方法开展相关功能研究, 通过模式植物的研究初步揭示了一些萌发关键基因对促进萌发与抑制萌发的调控功能。但到目前为止, 属于深度休眠型的木本植物与属于浅休眠型的模式植物种子休眠特征存在较大差异, 其种子休眠与萌发的分子机制也理应存在一定差异 (李晓玲等2016)。早期的激素研究揭示了赤霉素 (gibberellin, GA) 对种子的促萌发机理, 在种子萌发过程中, GA 能促进种子萌发和拮抗脱落酸 (abscisic acid, ABA) 的抑制作用 (于敏等2016), 其信号通路由一种可溶性受体蛋白 *GID1* (GA-INSENSITIVE DWARF 1) 感受, 且感受GA的机制是保守的, 在拟南芥和水稻 (*Oryza sativa*) 中是一致的。运用图位克隆 (map-based cloning) 技术

(闫其涛等2005), 已经在水稻GA不敏感的突变体中鉴定了 *GID1* 基因 (Ayan等2014), 在大麦 (*Hordeum vulgare*) 中鉴定了 *GID1* 的同系物 *GSE1* (Chandler等2008), 以及在拟南芥中鉴定了同系物 *GID1a*、*GID1b* 和 *GID1c* (Penfield和Hall 2009)。在此之前, Inukai等 (2005) 和 Iuchi等 (2007) 也已在水稻和拟南芥中验证了 *GID1* 基因编码的GA受体蛋白在赤霉素信号通路中所起的解休眠促萌发功能。

为了解蚬壳花椒人工萌发的分子机理, 本文将蚬壳花椒赤霉素信号通路为切入点, 克隆得到蚬壳花椒 *GID1* 基因, 研究种子萌发过程中的表达差异, 为直观发现蚬壳花椒种子的萌发分子机制, 揭示赤霉素信号通路对蚬壳花椒种子解休眠的作用机制, 了解木本植物种子萌发分子机理提供参考。

材料与方法

1 材料

在湖南省张家界采集自然环境状态下生长的蚬壳花椒 (*Zanthoxylum dissitum* Hemsl.) 冬季的种子, 破壳处理, 并用定量外源激素浸泡一定时间, 以大幅提高萌发率, 对种子起到解休眠的作用, 相关科研成果已发表 (费明亮等2014)。以此为依据将1 000粒人工萌发解休眠后的蚬壳花椒种子设为一个实验组, 分别设定取样实验组与萌发率统计

收稿 2017-03-06 修定 2017-07-05

资助 国家自然科学基金(31370612)和湖南省高校科技成果产业化繁育项目(15CY011)。

* 共同通讯作者(E-mail: wangping@csuft.edu.cn; 1825856598@qq.com)。

实验组, 统一在人工气候箱内培养。参考费明亮等(2014)设定最优萌发外因, 包括温度、湿度、光照以及昼夜温差。

2 取样点的设定

利用石蜡切片技术, 通过种子胚的形态学动态变化观察蚬壳花椒种子的萌发情况, 记录萌发周期。种子胚的形态学变化表明: 人工气候箱培养条件下的种子自培养起始2 d后开始有萌发迹象, 直至6 d后种子下胚轴生长突出即种子萌发。因此, 通过研究胚的形态学变化, 设定用于*GIDI*表达量分析实验的取样时间分别为: 培养起始0、6、12、24、48、96 h。与此同时, 萌发率统计组表明: 此批次培养的蚬壳花椒种子萌发率约为70%, 用于后续试验的样品因种子完全不萌发或坏死导致的误差, 可通过取样量尽可能减小。

3 蚬壳花椒种子萌发期RNA提取及cDNA第一链合成

将已确定取样的不同萌发期的种子均用RNA-prep Pure Plant Kit (TIANGEN)提取总RNA, 测定 $OD_{260/280}$ 值, 且每次提取1 μ L进行1%琼脂糖凝胶电泳分析提取的总RNA纯度和完整性。以提取的总RNA为模板, 按照TaKaRa PrimeScript RT Master Mix使用说明合成每一取样期后续用于相对荧光定量实验的荧光定量cDNA模板并于 -80°C 保存。按照TaKaRa PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明合成用于目的基因克隆的cDNA模板。

4 蚬壳花椒*GIDI*基因编码序列的获得

基于本课题组前期的研究成果, 对蚬壳花椒种子转录组进行了第二代高通量测序, 由华大基因有限公司完成转录组测序、数据组装拼接、蚬壳花椒cDNA文库建立, 其cDNA文库信息已发布于网上(<http://bioinformation.csuft.edu.cn/>)。通过转录组高通量测序获得3个蚬壳花椒*GIDI*同源序列, 以此设计3对引物 F_1 (5'-CTTTGTGGCCACTTAG-CCTGATCTT-3')、 R_1 (5'-GCAAACAACCATTA-ATTACTCCAGG-3'), F_2 (5'-ACTAATATCACCGC-CACCACGAATG-3')、 R_2 (5'-CAGAAACAGGAA-CGAGGAATCAATC-3'), F_3 (5'-ACTACATTTCTGTCCCTGATAACC-3')、 R_3 (5'-ATGGCTGCAAGTGATGAAGTGAACC-3'), 以反转录的cDNA为模板克隆其全长编码序列(coding sequence, CDS)。

取6 μ L PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 按照TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 4.0试剂使用说明回收纯化目的片段, 连接使用生物生工提供的pUCm-T载体转入BMDH5 α 感受态细胞中, 筛选阳性克隆并送至生工生物有限公司进行测序。

5 蚬壳花椒3个*GIDI*同源基因核苷酸序列及编码氨基酸序列的生物信息学分析

利用NCBI数据库Nucleotide BLAST和Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)程序进行核苷酸和氨基酸序列的同源比对, 用Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)数据库分析氨基酸序列的保守区域, 用ScanProsite tool (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>)预测编码蛋白的功能位点, 用SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>)预测蛋白的信号肽, 用TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)进行氨基酸序列导肽预测分析, 用ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质理化性质, 用ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)以默认算法进行蛋白质亲疏水性预测, 使用MEGA 5软件、采用最大似然法构建NCBI全基因系统进化树, 通过SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)进行蛋白的三级结构预测和建模。

6 蚬壳花椒种子萌发过程中3个*GIDI*同源基因的表达量差异分析

根据已获得的3个*GIDI*同源基因序列设计3对荧光定量引物 $ZaGID1a$: F (5'-TGAAAATCGC-TATCCCTGTGC-3')、R (5'-ATCCCCAATAC-TTCAACTTCTG-3'); $ZaGID1b$: F (5'-CAATTATC-GCCGATCACCTG-3')、R (5'-GAATCCTTCC-ACTTTGTAGCC-3'); $ZaGID1c$: F (5'-GGTGGG-CAGGAGCGAACT-3')、R (5'-AAGCCGGAT-GATCCCTATCT-3'), 参照木本植物不同组织样品与不同处理方法下的最优内参基因筛选(袁伟等2012)。以多聚泛素酶基因(*UBQ50*)和肌动蛋白基因(*ACT*)为内参基因, 按照TaKaRa PrimeScript RT Master Mix所提供的两步法, 以前期 -80°C 保存的用于荧光定量cDNA为模板, 按照实验说明操作进行模板和引物稀释, 在ABI7500实时荧光定量仪上

进行实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)相对荧光定量实验, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法分析结果, 同时利用geNorm、BestKeeper、Norm Finder分析验证内参基因选用的可行性。

实验结果

1 蚬壳花椒种子萌发不同时期胚的形态学变化

图1所示分别为培养0、6、12、24、48、96 h的蚬壳花椒种子石蜡切片。蚬壳花椒种子萌发培养过程中, 6 h时种子开始吸胀增大, 胚开始发育; 12 h时胚与胚乳间形成间隔, 随着种子吸水量迅速增加, 胚开始生长, 种子内贮存的营养物质开始大量消耗, 此为种子细胞分裂和增大阶段; 96 h时, 胚生长后体积增大, 突破种皮而外露, 胚根初步形成种子萌发。形态变化包含了蚬壳花椒种子萌发的全过程, 这一系列萌发过程必然伴随着萌发调控

基因的表达, 其表达量的趋势将揭示对种子萌发的调控作用影响。

2 蚬壳花椒种子3个*GID1*同源基因的获得

如图2所示, 克隆所得的蚬壳花椒3个*GID1*同源基因凝胶电泳图, 同源性比对后分别命名为*ZaGID1a*、*ZaGID1b*、*ZaGID1c*。克隆所得序列包括了起始密码子ACT和终止密码子TGA, 全长分别为1 021、989、982 bp。其测序结果与已获得的蚬壳花椒cDNA文库中的3个*GID1*同源基因开放阅读框序列进行比对, 同源性均大于98%, 只有少数AT碱基突变造成克隆结果不能100%比对, 说明转录组高通量测序结果真实可靠, 此cDNA文库可为后续蚬壳花椒不同目的基因的克隆提供可靠参照。其核苷酸序列全长以及推导出的氨基酸序列可登陆蚬壳花椒cDNA文库(<http://bioinformation.csuft.edu.cn/>)查看。

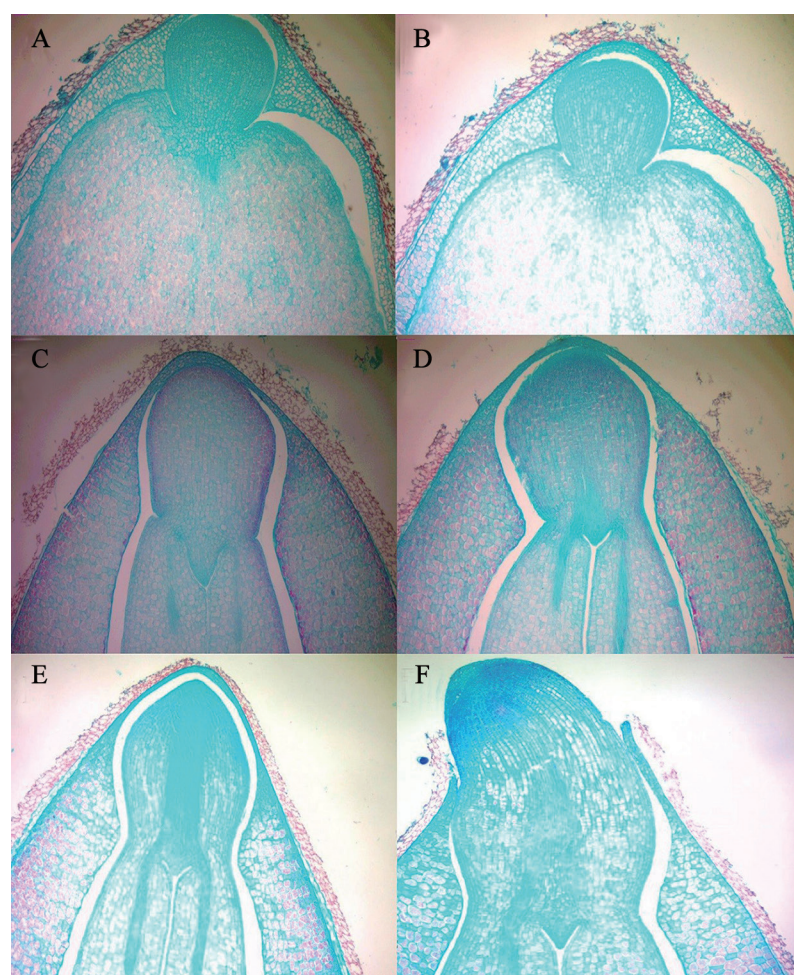


图1 蚬壳花椒种子人工萌发过程中胚的形态学变化

Fig.1 Morphological change of *Z. dissitum* seed embryo during artificial germination
A~F分别为GA浸泡后培养0、6、12、24、48、96 h的蚬壳花椒种子石蜡切片。

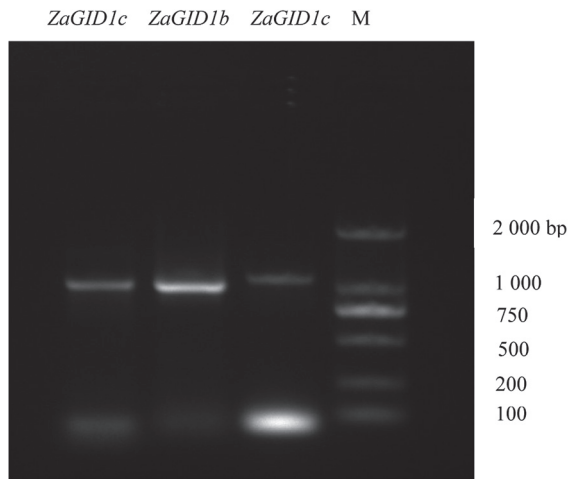


图2 *GID1*基因电泳图

Fig.2 Electrophoresis results of *GID1* cloning
M: 分子质量对照物。

3 蚬壳花椒3个*GID1*同源基因的生物信息学分析

3.1 蚬壳花椒3个*GID1*同源基因核苷酸序列及推导的氨基酸序列分析

蚬壳花椒3个*GID1*同源基因核苷酸序列与其他物种的*GID1*同源序列相似性为79%~90%，其中*ZaGID1c*、*ZaGID1a*与柑橘(*Citrus reticulata*) *GID1c*和毛果杨(*Populus trichocarpa*) *GID1*比对相似性均大于80%，而*ZaGID1b*与拟南芥*GID1a*的相似性为

80%，与葡萄(*Vitis vinifera*) *GID1a*相似性为82%。将蚬壳花椒3种*GID1*同源基因编码的氨基酸序列与拟南芥等已获得功能验证的*GID1*编码氨基酸序列进行多重比对(图3)，发现3种蚬壳花椒*GID1*蛋白中都含有GDSSG、HGG等HSL家族特有保守域。在HSL家族蛋白中组成催化三联体的3个重要氨基酸里，Asp、Ser在3种蚬壳花椒*GID1*序列中是保守的，而His被Val或Ile取代，这是它们失去催化能力的主要原因(Murase等2008)，这点与拟南芥等其他植物*GID1*的氨基酸序列一致。

利用最大似然法将NCBI上已报道的*GID1*编码氨基酸序列绘制系统进化树如图4所示，3种蚬壳花椒*GID1*中，*ZaGID1c*、*ZaGID1a*与甜橙(*C. sinensis*) *GID1* (XM006433171)、柑橘(*C. reticulata*) *GID1a* (XM006433172)、*GID1c* (XM006471873)聚为一类，*ZaGID1b*与甜橙*GID1* (XM006444124)、柑橘*GID1b* (XM006479765)聚为一类，它们都属于芸香科植物，进化树表明其进化距离最近。

3.2 蚬壳花椒*GID1*蛋白理化性质、结构、蛋白功能域预测

以ProtParam tool预测*ZaGID1a*、*ZaGID1b*、*ZaGID1c*编码的3种蛋白的分子质量分别为37.89、37.68、37.87 kDa，理论等电点分别为6.20、6.21、6.20。信号肽预测显示并无叶绿体、线粒体等信

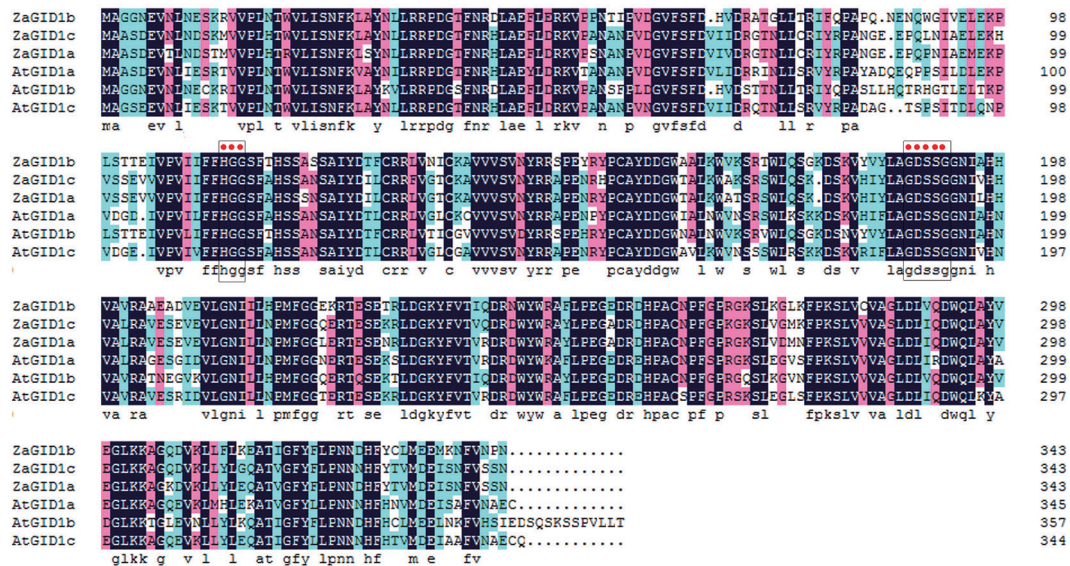


图3 蚬壳花椒与拟南芥*GID1*编码氨基酸序列比对结果

Fig.3 Putative amino acid sequence alignment of *Z. dissitum* and *A. thaliana* *GID1*s

红点表示HSL家族保守序列。

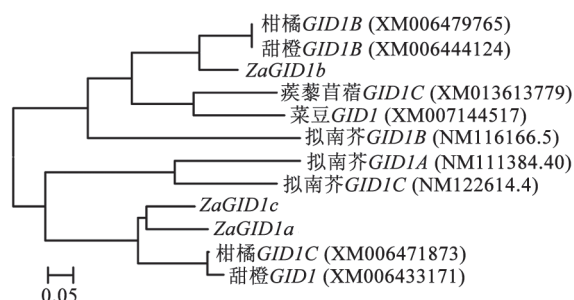


图4 GID1s系统进化树

Fig.4 Phylogenetic analysis of putative amino acid sequences of GID1s
标尺表示平均遗传距离。

号肽位点,属于非分泌性蛋白质,Tmap v6.0.1预测此3种氨基酸序列均有一个跨膜区域,因此3种蛋白都为跨膜蛋白。NetNES 1.1预测蛋白质的亚细胞定位,显示均位于细胞核内。ProtScale的亲、疏水性分析表明ZaGID1a、ZaGID1b、ZaGID1c蛋白均在200~250 aa处有很强的疏水性,在100~150 aa处有很强的亲水性,此外负峰值个数均多于正峰值个数,为亲水性可溶蛋白。

GID1蛋白结合GA与DELLA蛋白作用的功能域一共有13个(Murase等2008),如图3所示,在蚬壳花椒ZaGID1b基因编码的GA受体蛋白与拟南芥LDR功能域中的D(Asp)被E(Glu)取代,其他区域的序列都是保守的,Asp、Glu属于酸性基团且为相同性质的氨基酸,因此推测该突变对氨基酸三级结构影响不大,是物种进化过程中为适应各自需要形成的。

SWISS-MODEL预测的蛋白质三级结构中,

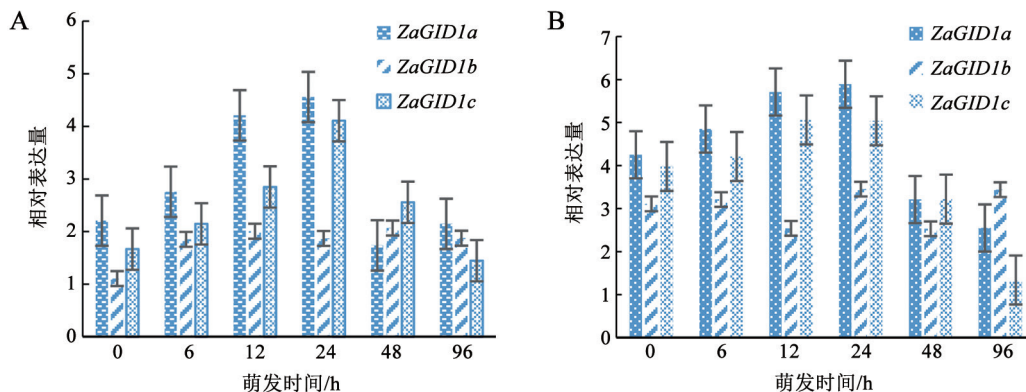


图6 GID1基因在蚬壳花椒人工萌发过程中的相对表达量

Fig.6 Relative expression levels of *Z. dissitum* GID1s during artificial germination

A和B分别表示以ACT和UBQ5为内参基因。

同其他植物的GID1蛋白一样,都具有水解酶超家族中的羧酸脂酶类的相似结构,如图5所示。以上生物信息学信息初步确定本实验所获得3种GID1同源基因表达的蛋白质均为蚬壳花椒GA受体蛋白。

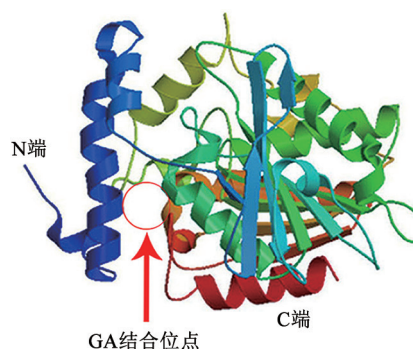


图5 蚬壳花椒GID1的三级结构

Fig.5 Tertiary structure of *Z. dissitum* GID1

蚬壳花椒GID1蛋白N端由3个 α 螺旋和一个额外环构成,核心结构由C端8条 β 折叠和7个 α 螺旋构成。GA与受体在核心结构内结合后,GID1能够与DELLA蛋白结合,形成GID1-GA-DELLA三聚体,SCF^{S^{LY1}GID2}复合体诱导DELLA蛋白发生聚泛素化降解,在植物体内产生赤霉素效应。

4 蚬壳花椒种子萌发过程中3个GID1同源基因的表达量差异分析

蚬壳花椒种子人工萌发阶段分别以ACT和UBQ5为内参基因,相对荧光定量分析ZaGID1a、ZaGID1b、ZaGID1c表达变化如图6所示。ZaGID1a与ZaGID1c表达量在人工萌发过程0~24 h内有上升趋势,而ZaGID1b表达量无明显趋势,正如Nakajima等(2006)在拟南芥中获得的3种GID1同源基因一样,它们在功能上具有相似性却存在着组织表达

差异性。结合蚬壳花椒种子萌发过程的形态学变化,其在24 h萌发阶段*GIDI*表达量达到最高,胚与胚乳分离子叶初步形成,下胚轴胀大有分化趋势,48 h后表达量明显降低,子叶成形,下胚轴伸长。

ZaGID1a、*ZaGID1c*在蚬壳花椒种子人工萌发中都有着相对高的表达量,说明在其萌发过程中*ZaGID1a*、*ZaGID1c*很有可能是调控蚬壳花椒种子萌发的关键基因,表达量上升,种子解除休眠趋于萌发状态。萌发期结束时,表达量降低且趋于相对平稳。*ZaGID1b*的无规律表达趋势证明相较于其他两个蚬壳花椒*GIDI*同源基因,其对种子萌发的调控影响性相对较弱。

geNorm是根据平均表达稳定指数*M*判断内参基因的稳定性,*M*值越大表示内参基因越不稳定,反之越稳定;*M*=1.5为判定上线,只有*M*<1.5才认为内参基因表达稳定。BestKeeper分析可以直接运用*C_T*值计算标准偏差来分析内参基因表达的稳定性,标准偏差越小表达越稳定,反之越不稳定;Norm Finder程序是运用Excel进行计算得到*M*值,*M*值为平均表达稳定指数,*M*值越大表示内参基因越不稳定,反之越稳定(Gutierrez 2008)。在蚬壳花椒qRT-PCR反应中利用上述三个软件进行稳定性验证,其各项数值均小于1,表明*ACT*与*UBQ5*都适用于在蚬壳花椒萌发过程的相对荧光定量实验中作为内参基因。

讨 论

1 蚬壳花椒*GIDI*同源基因的克隆及氨基酸序列分析

自*GIDI*基因从水稻中被分离鉴定以来,已有不少学者对赤霉素信号通路中*GIDI*的重要性做出了验证,随后相继在不同植物中克隆出*GIDI*基因,例如拟南芥中获得的*AtGID1a*、*AtGID1b*、*AtGID1c*,它们在植物的种子萌发、生长发育等阶段都有着重要调控作用,且已被证实其功能都有相似性和组织表达差异性特征(Nakajima等2006)。本研究以高通量转录组测序技术建立的蚬壳花椒cDNA文库为参照,克隆了蚬壳花椒3种*GIDI*同源基因*ZaGID1a*、*ZaGID1b*、*ZaGID1c*,其克隆所得序列全长包含整个开放阅读框序列部分,分别为1 021、989、982 bp,其所编码的蛋白质氨基酸全长、理化性质、亚细胞定位等都与其他物种的*GIDI*相近,与Mura等(2008)所报道的研究成果相一致;氨基酸序

列与甜橙、柑橘所报道的*GIDI*氨基酸序列有高度的相似性,进化关系最近,且都属于芸香科物种。氨基酸序列比对分析也与其他物种的*GIDI*氨基酸序列特征一致:含有HGG、GDSSG保守域,且导致HSL蛋白失去催化功能的机理都为H的突变,被V取代;三级结构预测表明其核心部分形似“袋子”结构,由8个β折叠和7个α螺旋构成,一个环加3个螺旋的保守性N端构成了盖子(Shimada等2008),其三级结构与杨树(*Populus* sp.)的*GID1L*最为相近,保守的N端延伸结构对行使GA受体功能至关重要(Hauvermale等2012)。上述特征表明蚬壳花椒的*GIDI*蛋白与其他物种的*GIDI*蛋白一样都是由HSL家族蛋白进化而来,其蛋白质功能理应为GA受体。

2 种子的人工萌发与*GIDI*表达量变化的关系

在人工萌发处理中使用了GA浸泡的方式处理蚬壳花椒破壳后的种子,再进行培养达到解休眠的目的。这种方式相对自然状态下的蚬壳花椒种子而言,不仅大为提高了种子的萌发率,也同样缩短了萌发周期,推测该过程中GA短时间内调控了内部基因发生表达变化。因此,种子形态学变化标示萌发周期被大为缩短,与此同时,蚬壳花椒*GIDI*同源基因所表达的*GIDI*蛋白在人工萌发过程中形成*GID1-GA-DELLA*复合体结构被SCF^{SLY1/GID2}复合体标记、聚泛素化降解,促进了胚的发育和下胚轴的延长(Hauvermale等2012),即解除了DELLA抑制种子细胞分化的功能(Liu等2015),因而大为缩短了其萌发周期;而后两者的相对表达量都呈下降趋势,可能是*GID1-GA-DELLA*复合体具有自我调控机制所致(Yamamoto等2010)。当植物种子趋于萌发期结束时,更多的能量物质将被用于促进根的伸长与幼叶发育,为使萌发结束后对GA的敏感性相对萌发期有所降低,从而逐渐降低*GIDI*的表达量,使其成为正常幼苗生长时对GA的刺激量(Jiang 2017);如受营养物质不足、萌发环境不利等影响,萌发周期被延迟,则*GIDI*表达上调。

*ZaGID1b*功能预测与序列分析都与*ZaGID1a*、*ZaGID1c*一致,但在人工萌发阶段并无类似的表达趋势,表达量相对稳定,这可能与拟南芥中3个同源基因所表现的组织表达差异性类似。*ZaGID1b*并不是种子萌发阶段较关键的调控基因,其在植物其他组织部分生长发育阶段的调控作用还有待研究。

3 小结

蚬壳花椒中得到的3个同源GA受体基因*ZaGID1a*、*ZaGID1b*、*ZaGID1c*都具有已被验证的*GID1*基因特征。人工萌发过程中*ZaGID1a*、*ZaGID1c*可能起主要调控作用,且在萌发前期表达量升高,萌发后期表达量降低;通过GA对种子的快速调控机理提高种子萌发率、缩短萌发周期,可能起到关键调控作用。*GID1*同源基因的获得将为后续蚬壳花椒的研究提供参考。

参考文献

- Ayano M, Kani T, Kojima M, Sakakibara H, Kitaoka T, Kuroha T, Angeles-Shim RB, Kitano H, Nagai K, Ashikari M (2014). Gibberellin biosynthesis and signal transduction is essential for internode elongation in deepwater rice. *Plant Cell Environ*, 37 (10): 2313–2324
- Chandler PM, Harding CA, Ashton AR, Mulcair MD, Dixon NE, Mander LN (2008). Characterization of gibberellin receptor mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Plant*, 1 (2): 285–294
- Cheng P, Wang P, Sun JK, Fei ML, Yang H (2013). Research progress on refulation mechanisms of plant seeds dormancy and germination. *J Cent South Univ For Technol*, 33 (5): 52–58 (in Chinese with English abstract) [程鹏, 王平, 孙吉康, 费明亮, 杨辉 (2013). 植物种子休眠与萌发调控机制研究进展. 中南林业科技大学学报, 33 (5): 52–58]
- Fei ML, Wang P, Zhou T, Cheng P (2014). Study on Characteristics *Zanthoxylum dissitum* Hemsl. seeds germination. *Mod Agr Sci Technol*, (10): 71–74 (in Chinese with English abstract) [费明亮, 王平, 周韬, 程鹏(2014). 蚬壳花椒种子萌发特性研究. 现代农业科技, (10): 71–74]
- Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, et al (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnol J*, 6: 609–618
- Hauvermale AL, Ariizumi T, Steber CM (2012). Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiol*, 160: 83–92
- Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Shibata Y, Gomi K, Umemura I, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M (2005). *Crown rootless1*, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell*, 17 (5): 1387
- Iuchi S, Suzuki H, Kim YC, Iuchi A, Kuromori T, Ueguchi-Tanaka M, Asami T, Yamaguchi I, Matsuoka M, Kobayashi M, et al (2007). Multiple loss-of-function of *Arabidopsis* gibberellin receptor *AtGID1s* completely shuts down a gibberellin signal. *Plant J*, 50 (6): 958–966
- Jiang K, Otani M, Shimotakahara H, Yoon JM, Park SH, Miyaji T, Nakano T, Nakamura H, Nakajima M, Asami T (2017). Substituted phthalimide AC94377 is a selective agonist of the gibberellin receptor *GID1*. *Plant Physiol*, 173: 825–835
- Li XL, Cheng SH, Luan CY, Yang J, Weng HR, Huang YP, Huang CM (2016). Seed dormancy mechanism and ecological adaptability of riparian plant *Distylium chinense*. *Plant Physiol J*, 52 (8): 1231–1242 (in Chinese with English abstract) [李晓玲, 程岁寒, 栾春艳, 杨进, 温浩然, 黄应平, 黄成名. 河岸带植物中华蚊母树种子休眠机制及生态适应性. 植物生理学报, 52 (8): 1231–1242]
- Liu B, Liu X, Yang S, Chen C, Xue S, Cai Y, Wang D, Yin S, Gai X, Ren H (2015). Silencing of the gibberellin receptor homolog, *CsGID1a*, affects locule formation in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit. *New Phytol*, 210 (2): 551–563
- Ma YZ, Wang P, Liang WB (2007). Investigation on habitat and biological characteristics of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl. *Nonwood For Res*, 25 (1): 25–30 (in Chinese with English abstract) [马英姿, 王平, 梁文斌(2007). 药用植物蚬壳花椒的生境及生物学调查. 经济林研究, 25 (1): 25–30]
- Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor *GID1*. *Nature*, 456 (7221): 459–463
- Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, Suzuki H, Katoh E, Iuchi S, Kobayashi M, et al (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellins Receptors. *Plant J*, 46 (5): 880–889
- Penfield S, Hall A (2009). A role for multiple circadian clock genes in the response to signals that break seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21 (6): 1722–1732
- Shimada A, Ueguchitanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, Kato H, Matsuoka M (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor *GID1*. *Nature*, 456 (7221): 520–523
- Yamamoto Y, Hirai T, Yamamoto E, Kawamura M, Sato T, Kitano H, Matsuoka M, Ueguchi-Tanaka M (2010). A rice *gid1* suppressor mutant reveals that gibberellin is not always required for interaction between its receptor, *GID1*, and *DELLA* proteins. *Plant Cell*, 22 (11): 3589–3602
- Yan Q, Lu H, Mao W, Li J (2005). Map-based cloning for plants gene isolation. *Mol Plant Breed*, 3 (4): 585–590 (in Chinese with English abstract) [闫其涛, 逯慧, 毛万霞, 李建粤(2005). 植物基因分离的图位克隆技术. 分子植物育种, 3 (4): 585–590]
- Yang H, Li M, Wang P, Sun J, Dai M (2015). Research progress on medicinal plant of *Zanthoxylum dissitum* Hemsl. *Chin Agr Sci Bull*, 31 (10): 153–157 (in Chinese with English abstract) [杨辉, 李猛, 王平, 孙吉康, 代明龙(2015). 蚬壳花椒资源繁育与有效成分研究进展. 中国农学通报, 31 (10): 153–157]
- Yu M, Xu H, Zhang H, Zhu Y (2016). Regulation of plant hormones on seed dormancy and germination. *Plant Physiol J*, 52 (5): 599–606 (in Chinese with English abstract) [于敏, 徐恒, 张华, 朱英(2016). 植物激素在种子休眠与萌发中的调控机制. 植物生理学报, 52 (5): 599–606]
- Yuan W, Wan HJ, Yang YJ (2012). Characterization and selection of reference genes for real-time quantitative RT-PCR of plants. *Chin Bull Bot*, 47 (4): 427–436 (in Chinese with English ab-

stract) [袁伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量PCR内参基因的特点及选择. 植物学报, 47 (4): 427–436]
Zhou Q, Zhao H, Li P, Zeng W, Li Y, Ge F, Zhao J, Zhao H (2016).
De novo characterization of the seed transcriptome of *Lepidium*

apetalum Willd. Chin J Biol Eng, 36: 38–46 (in Chinese) [周茜, 赵惠新, 李萍萍, 曾卫军, 李艳红, 葛凤伟, 赵君洁, 赵和平 (2016). 独行菜种子转录组的高通量测序及分析. 中国生物工程杂志, 36: 38–46]

Cloning of *GID1*-homologous genes and expression analysis during seed germination in *Zanthoxylum dissitum* Hemsl.

ZHOU Tao¹, WANG Ping^{2*}, SUN Ji-Kang^{1*}, LI Meng²

¹College of Life Science, ²College of Environmental Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

Abstract: *GID1* is the key regulatory gene in gibberellin signaling pathway, which mainly affects seed germination and plant growth. In this study, we cloned three homologous genes of *GID1* in *Zanthoxylum dissitum*, namely *ZaGID1a*, *ZaGID1b* and *ZaGID1c*, by referring to its DNA library established by high throughput sequencing. Bioinformatics was applied to analyze nucleotide and putative amino acid sequences of homologous genes of *GID1* in *Z. dissitum*, and the results indicate the encoded protein functional region, physiochemical property, phylogeny, hydrophobicity-hydrophilicity, subcellular signal peptide location and tertiary structure prediction in three homologous *GID1* sequences point to the receptor protein function of gibberellin. Quantitative real time PCR expression analysis of homologous *GID1* sequences via *Z. dissitum* artificial germination indicates *ZaGID1a* and *ZaGID1c* played a critical role in the regulation of *Z. dissitum* seed germination, while the relation between *ZaGID1b* and seed germination was not evident.

Key words: *Zanthoxylum dissitum*; cloning; expression analysis; bioinformatics

Received 2017-03-06 Accepted 2017-07-05

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (Grant No. 31370612), and Industrialization Breeding Project of Scientific and Technological Achievements in Universities in Hunan Province (Grant No. 15CY011).

*Co-corresponding authors (Email: wangping@csuft.edu.cn; 1825856598@qq.com).