

# 桃 *GRF* 基因家族的序列及其组织特异性表达分析

曹珂<sup>1</sup>, 薛灵姿<sup>1,2</sup>, 王蛟<sup>1</sup>, 方伟超<sup>1</sup>, 朱更瑞<sup>1</sup>, 陈昌文<sup>1</sup>, 王新卫<sup>1</sup>, 王力荣<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009; <sup>2</sup> 河南农业大学园艺学院, 郑州 450002)

**摘要:** 转录因子家族基因 *GRF* (growth-regulating factor) 是植物中特有的一类生长调控因子基因, 在水稻和拟南芥中, *GRF* 家族基因编码的蛋白质具有正向调控茎和叶生长发育的功能。为了探究在桃中 *GRF* 基因是否参与了狭叶桃“金蜜狭叶”的叶片发育, 本试验首先分析桃基因组中鉴定出的 *GRF* 基因的序列信息; 然后, 以正常叶片的“上海水蜜桃”为对照, 通过荧光定量 *PCR* 检测了这些 *GRF* 基因在“金蜜狭叶”桃的组织特异性表达情况; 最后, 利用 126 对简单序列重复标记对 1 个  $F_2$  杂交群体进行连锁分析, 定位狭叶性状, 辅助筛选狭叶性状的候选基因。结果表明: 桃基因组 *GRF* 基因包括 10 个成员, 分布在除 4 和 8 外的其他染色体上, 编码蛋白的氨基酸长度在 191~612 之间。蛋白序列分析表明, 除 *ppa011917m* 的 QLQ 结构域中的 Leu 残基被 Phe 代替外, 这 10 个 *GRF* 的 N 端均含保守的 QLQ 和 WRC 结构域。系统进化树将桃上的 10 个 *GRF* 基因分为 3 组。从 10 个 *GRF* 基因的表达结果可以看出, 6 个基因在茎尖的表达量高于幼叶, 也高于其他成熟组织和器官; 其中 2 个基因在狭叶桃中的表达显著高于正常叶对照。通过连锁分析将“金蜜狭叶”桃的狭叶性状定位在第 6 染色体的 15.7~21.1 Mb 之间, 该区间仅含有 1 个 *GRF* 基因 *ppa003017m*, 是狭叶性状的候选基因。本研究将为“金蜜狭叶”桃狭叶性状基因的鉴定和高光效种质筛选奠定研究基础。

**关键词:** 桃; 反转录; *GRF* 基因; 狭叶; 荧光定量

## The Sequence Character of *GRF* Gene and Its Tissue-specific Expression Pattern in Peach (*Prunus persica*)

CAO Ke<sup>1</sup>, XUE Ling-zi<sup>1,2</sup>, WANG Jiao<sup>1</sup>, FANG Wei-chao<sup>1</sup>, ZHU Geng-rui<sup>1</sup>,  
CHEN Chang-wen<sup>1</sup>, WANG Xin-wei<sup>1</sup>, WANG Li-rong<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009;

<sup>2</sup> College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** The growth-regulating factor (*GRF*) transcription factor is a plant-specific gene family that regulates plant growth. In *Arabidopsis* and rice, the *GRF* gene family-encoding proteins have a positive function in regulating stem and leaf growth and development. In the present study, we speculated that the *GRF* genes might be more important and responsible for the formation of narrow leaves. To ask if the *GRF* genes are the causal mechanism in the development of a narrow-leaf peach variety (*Prunus persica* (L.) Batsch ‘Jin Mi Xia Ye’), *GRF* genes in the peach genome were identified by BLAST search according to the sequence homology. The expression pattern of these *GRF* genes was determined in the shoot apical meristem, young leaves, mature leaves, seeds, flesh of fruit, and phloem in ‘Jin Mi Xia Ye’ and the normal-leaf variety ‘Chinese Cling’. Meanwhile, the genetic mapping of narrow-leave was conducted in an  $F_2$  population by using 126 simple sequence repeats (SSR) markers. Ten members of the *GRF* genes were found in the peach genome. The deduced proteins of *GRFs* arranged from 191 and 612 amino acids. Sequence analysis showed that the N terminal of these proteins maintained two conserved motifs QLQ (Gln-Leu-Gln) and WRC (Trp-Arg-Cys), except that the Leu residue of QLQ in *ppa011917m* was replaced by Phe. While the C terminal of those sequences varied, for instance, a TQL and a GGPL motifs. A phylogenetic tree using a neighbor-joining method

收稿日期: 2017-09-28 修回日期: 2017-12-02 网络出版日期: 2017-04-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180417.1436.048.html>

基金项目: 中央级科研院所基本科研业务费专项 (160192016201); 中国农业科学院科技创新工程项目 [CAAS-ASTIP-2017-ZFRI-(01)]

第一作者研究方向为桃种质资源与遗传育种研究。E-mail: wyandck@126.com

placed the *GRF* genes into three groups. According the expression result of 10 *GRF* genes in peach, six of them exhibited higher expression levels in the shoot apical meristem than in young leaves and other mature tissues and organs. Only a few genes showed slight expression levels in the flesh of fruit, mature leaves, and phloem, such as *ppa022199m* in flesh and *ppa019752m* in phloem. Only two genes, *ppa019623m* and *ppa003017m*, expressed higher levels in peach varieties with narrow leaves than in those with normal leaves. Meanwhile, we located the narrow-leaf trait in the region between two markers (UDP98-407 and BPPCT025 of linkage group 6) using linkage analysis based on SSR markers. Based on the linkage analysis, we then chose the *ppa003017m* as one of the key candidates in regulating leaf development in the 'Jin Mi Xia Ye' variety. However, the sequence amplification found that, among 30 seedlings with different leaf phenotypes, no variation existed in the promoter of the key candidate gene, *ppa003017m*. The results indicate that there is no relationship between the expression of *ppa003017m* and sequence variation in its promoter regions. This study highlights the importance of identifying genes that regulate the narrow-leaf trait in peach, as well as the importance of selecting the excellent peach germplasm resources with high photosynthesis efficiency using molecular marker assisted selection in the future.

**Key words:** Peach (*Prunus persica* (L.) Batsch); reverse transcription; *GRF* genes; narrow leaf; realtime-qPCR

桃起源于中国,经过长期的进化和选择,种质资源极其丰富。其中,根据叶片宽度可将桃分为普通型和狭叶型。早在 1957 年,狭叶类型就有报道<sup>[1]</sup>,其叶宽通常为普通型的一半,狭长的叶片可以增加树冠的透光率、改善叶色、有利于果实均匀成熟<sup>[2-3]</sup>,因此狭叶种质被认为是优异资源。“金蜜狭叶”桃是中国农业科学院郑州果树研究所于 1999 年育成的狭叶型品种,其树体高度正常,叶型指数和叶片开张度显著大于 2 个对照品种“中农金辉”和“红珊瑚”,果实数量少但味道香甜、可溶性固形物含量极高(最高可达到 25.9%)。“金蜜狭叶”桃树冠内光照强度不仅在上、中、下三层均匀分布,且内部光照强度及相应位置叶片的光合速率均显著大于 2 个对照品种<sup>[4]</sup>。

遗传机制研究是发掘狭叶桃优异基因的基础。W. R. Okie 等<sup>[5]</sup>对桃狭叶突变体与野生型进行杂交,发现狭叶性状在一些  $F_1$  群体中呈部分显性。由于实际的分离比不符合孟德尔定律,因此不能准确地判断其遗传机制。T. Yamamoto 等<sup>[6]</sup>利用“Akame” $\times$ “Juseitou”的 133 株桃  $F_2$  群体,将狭叶性状定位在第 8 连锁群的顶端。

对于狭叶基因的发掘,目前的研究多集中在模式作物上。首先是一类 *GRF* (growth-regulation factor) 基因被认为与叶片的发育有关,在水稻上, *OsGRF1* 基因在植株的居间分生组织快速表达<sup>[7]</sup>。在拟南芥上, *AtGRF* 基因家族包含 9 个成员,大部分成员在拟南芥的快速生长和发育的组织中表达较高,例如茎尖、花芽和根。在拟南芥中过量表达 *AtGRF1*、*AtGRF2* 和 *AtGRF3* 可促进叶

片和子叶的生长,而单独沉默 *AtGRF1*、*AtGRF2* 和 *AtGRF3* 基因时,拟南芥的表型并没有明显变化,只有同时沉默这 3 个基因,拟南芥的叶片和子叶才明显变小<sup>[8]</sup>。同时, *AtGRF* 的伴侣蛋白 GIF (*GRF*-interacting factor) 也在拟南芥叶片的发育上发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>。在其他物种如玉米<sup>[11]</sup>和油菜<sup>[12]</sup>上,均有 *GRF* 基因参与叶片细胞发育的报道。其次,在水稻上,研究者发现存在另外一类控制狭叶性状的基因,位点包括 *nal* (narrow leaf) 1、*nal2*、*nal3*、*nal4*、*nal5*、*nal6*、*nal7*<sup>[13]</sup>。目前对 *nal1* 和 *nal7* 这 2 个基因研究比较深入,其中, *nal1* 编码一种特定的未知生物学功能的蛋白<sup>[14]</sup>,它通过降低生长素在植物体内的极性运输,最终形成了窄叶的表型。K. Fujino 等<sup>[15]</sup>则以突变体 *nal7* 为研究材料,发现突变体的生长素含量发生改变,功能分析表明, *nal7* 编码 1 个控制生长素合成的核黄素单加氧酶 *YUCCA* 基因。此外,研究发现其他一些 *nal* 基因的功能同样与生长素含量异常相关<sup>[16]</sup>。在棉花上,生长素也是导致叶片变小的重要原因<sup>[17]</sup>。

鉴于水稻上 *nal* 基因突变的窄叶突变体不仅叶片较窄且同时具有植株矮小、叶片卷曲的形态学特征<sup>[12]</sup>,而“金蜜狭叶”桃则仅表现为叶片较窄,因此,本研究根据桃基因组注释结果 (<https://www.rosaceae.org/>),着重分析桃基因组上的 *GRF* 基因家族的序列特征和组织特异性表达信息,探讨其与“金蜜狭叶”桃狭叶性状形成的关系,为狭叶桃育种奠定研究基础。

# 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

本研究用于 *GRF* 基因组织特异性表达分析的 2 份试材品种为“金蜜狭叶”(狭叶)和“上海水蜜”(普通叶),定植在中国农业科学院郑州果树研究所桃种质资源圃,树龄 12 年,正常栽培管理。2016 年分别采集幼叶(新梢顶端开始 2~3 片叶)、成龄叶(新梢顶端开始 6~10 片叶)、茎尖(新梢顶端 0.3 cm)、果实(去除表皮后的中果皮果肉)、韧皮部(新梢 6~10 片叶间)和果实成熟时的种子,迅速置于液氮中,−80 °C 保存,备用。

此外,选择“99-7-15”(普通叶)×“金蜜狭叶”(狭叶)的 1 株  $F_1$ (普通叶)实生得到 72 株  $F_2$  单株群体,宽叶与狭叶单株比为 48:14,取幼叶,提取 DNA,用于狭叶性状的混合群体分离分析(BSA, bulked segregant analysis)和初选标记的验证等研究。

## 1.2 DNA 的提取

采用北京艾德莱生物技术有限公司的 DNA 提取试剂盒(Aidlab,北京)提取幼嫩叶片的基因组 DNA。

## 1.3 总 RNA 的提取、纯化和反转录

采用常规 CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bro-

mide)法提取不同组织中总 RNA,主要步骤如下:取 500 mg 样品,加入 800  $\mu$ L CTAB,65 °C 水浴 15 min;之后加入等体积的氯仿/异戊醇,震荡,4 °C 12000 r/min 离心 10 min,取上清液,再次加入等体积氯仿/异戊醇,震荡摇匀后取上清液,加入 1/3~1/4 体积的 8 mol/L LiCl,−20 °C 沉淀 8~16 h;10000 r/min 离心,加入 500  $\mu$ L 75% 的乙醇洗涤沉淀 2 次,晾干,加入适量(70~100  $\mu$ L)DEPC 水溶解约 5 min。

参照 TAKARA(大连,中国)公司 DNaseI 操作说明消化总 RNA 中的 DNA,加入 540  $\mu$ L DEPC 水和 600  $\mu$ L 氯仿/异戊醇,震荡,10000 r/min 离心,取上清液,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,−80 °C 沉淀 30~45 min。离心,重新用 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次,晾干,加入 50~80  $\mu$ L DEPC 水溶解,琼脂糖电泳检测完整性,同时检测浓度;−80 °C 保存备用。

cDNA 第 1 链的合成参考东洋纺(上海,中国)的 ReverTra Ace qPCR RT Kit 说明书完成。

## 1.4 *GRF* 基因的荧光定量 PCR (qRT-PCR)

根据桃基因组的注释结果,鉴定出与 *AtGRF* 同源的桃 *GRF* 家族基因,利用 NCBI 中的 Primer-blast 软件设计荧光定量 PCR 引物,如表 1 所示。

表 1 桃 *GRF* 基因在染色体的位置及其定量 PCR 引物

Table 1 The physical position of *GRF* genes in peach genome and its primers used for qRT-PCR

基因名称 Gene name	染色体 Chromosome	起始 位置 Start site	终止 位置 Stop site	基因长度(bp) Transcript length	正向引物 Forward primer	反向 引物 Reverse primer	产物长度 (bp) Product length
<i>ppa019623m</i>	scaffold_1	35330027	35333123	3097	ACTCCCTCCTCAACCCATCA	GCGAAGGGAATGCTGTGTGTG	119
<i>ppa021277m</i>	scaffold_2	16827306	16829645	2340	CACCAGGATTGGGCTTCTCC	GCCCTCTGTGGATATGCTG	193
<i>ppa024293m</i>	scaffold_2	26124208	26126583	2376	TGTGCCTCGTGATCTCCTCT	GCGCCACATCTCTTGAACAC	149
<i>ppa022199m</i>	scaffold_2	26637336	26641459	4124	GCCTCCTGATCTCGTGCTTC	GCACCTCCACTTCTTTCCGT	157
<i>ppa017593m</i>	scaffold_3	2116412	2117741	1330	GGAACGAAGGGAAGTGTTGA	GCCAGGTGTCTGTGCTCTTT	328
<i>ppa011917m</i>	scaffold_5	2337318	2338341	1024	AGGTGCTCCAAAGATGCACA	CCAAAGCATAGACCCCACT	215
<i>ppa019752m</i>	scaffold_5	12677592	12679579	1988	GATGCTCTGCTCCTGTCC	CACAGGCTTCTTGAACGGG	253
<i>ppa003017m</i>	scaffold_6	20543630	20546680	3051	TAAATGAAGGGTGGGACGGC	GGTGCTCCCTGAACTACTG	105
<i>ppa006912m</i>	scaffold_7	14478504	14480990	2487	CGGGAGTGCTAAATCCGACA	CCAGCATTGGTTCGTGCATT	96
<i>ppa015791m</i>	scaffold_7	19152923	19154439	1517	TATGGGCTGAAGGAGGAGGT	TGTCAGTGGTGTGAACTGCC	117

定量 PCR 体系为 20  $\mu$ L,其中包含 DNA 2  $\mu$ L, Biotake(北京,中国)的 SYBR Real-time PCR Premixture 荧光染料 10  $\mu$ L,上游和下游引物各 0.5  $\mu$ L, DEPC 水 7  $\mu$ L,3 次重复。使用 Roche LightCycler<sup>®</sup> 480II 型 PCR 仪进行扩增,反应程序为:98 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 10 s,58 °C 退火 10 s,72 °C 延伸

20 s,34 个循环;72 °C 延伸 5 min,4 °C 保存。荧光定量结果计算使用为  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法<sup>[18]</sup>,内参采用 *Elongation factor 1-alpha* 基因<sup>[19]</sup>。

## 1.5 狭叶性状的基因定位

根据 BSA 法原理,将 8 株宽叶和 8 株窄叶 DNA 分别等量混合,组成宽叶性状基因池和窄叶性状基

因池。利用 126 对 SSR (Simple Sequence Repeats) 引物,引物序列参照郭瑞<sup>[20]</sup>,对两个混合基因池进行 PCR 扩增,产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,PCR 和电泳方法参照曹珂等<sup>[21]</sup>。

选取在混合池间有差异的引物,对 72 株“99-7-15”×“金蜜狭叶”的 F<sub>2</sub> 单株进行扩增,统计扩增条带,利用 MAPMAKER 3.0 软件计算标记与性状的连锁关系,统计方法参照曹珂等<sup>[21]</sup>的方法。

### 1.6 *GRF* 基因的序列特征分析

使用 DNAMAN (Lynnon Corporation, Canada) 软件进行桃基因组中不同 *GRF* 蛋白序列相似性比对,使用 NCBI 的 COBALT 软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>) 进行系统发育树的构建,方法采用邻接法。其中拟南芥 AtGRF1 至 AtGRF9 蛋白序列在 NCBI 数据库中的编号分别为 O81001、Q8L8A8、

Q9SJR5、Q8L8A7、Q8L8A6、Q9ZQ12、Q9FJB8、Q9SU44 和 Q8S9M3,水稻 OsGRF1 至 OsGRF12 蛋白序列的编号分别为 Q6AWY8、Q6AWY7、Q6AWY6、Q6ZIK5、Q6AWY4、Q6AWY3、Q6AWY2、Q6AWY1、Q9FRG8、Q6EPP9、Q6AWX8 和 Q6AWX7,玉米 ZmGRF1、ZmGRF2 和 ZmGRF10 蛋白序列的编号分别为 NP\_001152607、NP\_001334126 和 NP\_001106028。

### 1.7 基因 *ppa003017m* 的启动子及编码区序列扩增

对于狭叶性状关键候选基因 *ppa003017m*,本研究以杂交群体中 5 株普通叶和 5 株狭叶单株的 DNA 作为模板,采用 Sanger 测序法测定其启动子区 2000 bp 及编码区 CDS 序列,引物如表 2 所示,扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序后拼接。

表 2 *ppa003017m* 基因启动子 2000 bp 及编码区序列的扩增引物

Table 2 The primers for amplifying the target promoter and coding sequence of *ppa003017m*

		上游(5'-3') Forward	下游(5'-3') Reverse
启动子 Promoter	前段 up	GACCCAAACATGAAACCCGC	GAATCGGCCCTCGTACTTCA
	中段 middle	ACCAATGCTCTCAAACCTCCACA	ACGGATGTCTTGCTAACTTCGT
	末段 down	CGACATAAAATTACGGAACGC	GGACACTCCACCAATCTCCA
编码区 Coding sequence	前段 up	TGGCATGGCACTCAAGTTCA	AACTGCCTCATCAAATGTACAAAA
	末段 down	CAATGGGGAAAGGTGGGA	CTAGCCAAAGTGGCCAACATC

## 2 结果与分析

### 2.1 桃 *GRF* 基因的序列分析

前人研究中,最早鉴定出来的 *GRF* 基因为水稻的 *OsGRF1*<sup>[7]</sup>,该蛋白含有几个保守的结构域,第 1 个为 QLQ 区域,特征氨基酸为 Gln、Leu 和 Gln,此外含有大量的芳香族的/疏水性的氨基酸如 Phe、Trp、Tyr、Leu 和 Glu 等<sup>[7-8,11]</sup>,该区域在蛋白互作过程中起到关键作用<sup>[7]</sup>。第 2 个保守区域是 WRC,特征氨基酸为 Trp、Arg 和 Cys 以及 3 个保守的 Cys 和 1 个 His,即 C3H 区域,该部分可能与 DNA 的细胞核定位信号有关<sup>[7-8,11]</sup>。在拟南芥中,所有的 9 个 *GRF* 蛋白在 N 末端都存在保守的 QLQ 和 WRC 结构域<sup>[8]</sup>,而 C 末端为高变区,相似度最高的成员是 AtGRF3 和 AtGRF4, C 末端的相似度达到 54%,而 AtGRF5 和 AtGRF6 相似度仅为 16%。除了 QLQ 和 WRC,在 AtGRF 的 C 末端存在着另外两个小的结构域,即 TQL 和 GGPL。TQL 出现在 AtGRF1-AtGRF4 和 OsGRF1-OsGRF5 中,而 GGPL 仅存在于 AtGRF1-

AtGRF4 和 AtGRF7、AtGRF8 中。这 2 个小的结构域在其他一些物种中也有发现,但功能未知<sup>[7-8,11]</sup>。根据 OsGRF1 和 AtGRF1 的氨基酸保守结构域对桃基因组进行 blast,共鉴定到 10 个 *GRF* 基因家族序列,其中第 1、3、6 染色体各 1 个,第 5 和 7 染色体各 2 个,第 2 染色体 3 个,在第 4 和 8 染色体无 *GRF* 基因(表 1)。10 个 *GRF* 基因的长度从 1024 bp 到 4124 bp 不等,编码蛋白的氨基酸长度在 191 ~ 612 aa 之间。

如图 1b 所示,以桃 *GRF* 基因 *ppa019623m* 为例,其蛋白序列含有 *GRF* 特异的 4 个保守结构域,显示这 10 个基因为真正的 *GRF* 家族基因。分析该类基因蛋白序列的第 1 个保守结构域 QLQ(图 1c),除了 *ppa011917m* 的保守结构域 Gln-Leu-Gln 中 Leu 残基被 Phe 代替外,其余蛋白均含有 QLQ 的特征残基。在桃基因组的 10 个 *GRFs* 蛋白中,第 2 个结构域保守性最高,C3H 氨基酸残基完全一致(图 1d)。分析不同结构域在 10 个蛋白上的分布(图 1e)可以看出,10 个蛋白序列在 N 端都含有 QLQ 和 WRC 结



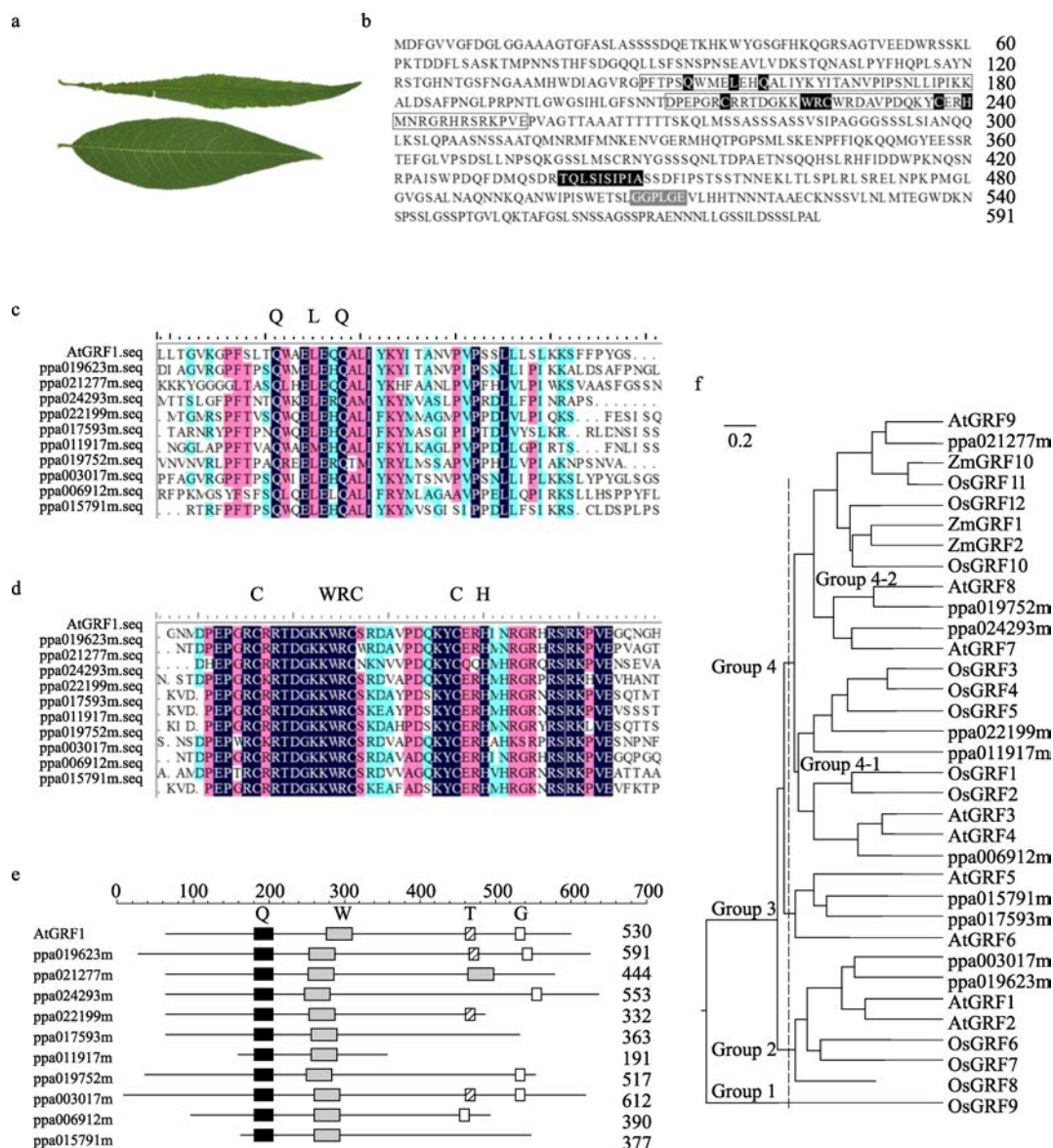


图1 AtGRF1 与桃 GRFs 蛋白的氨基酸序列比较

Fig. 1 Analysis of the amino acid sequences of AtGRF1 and GRFs in peach

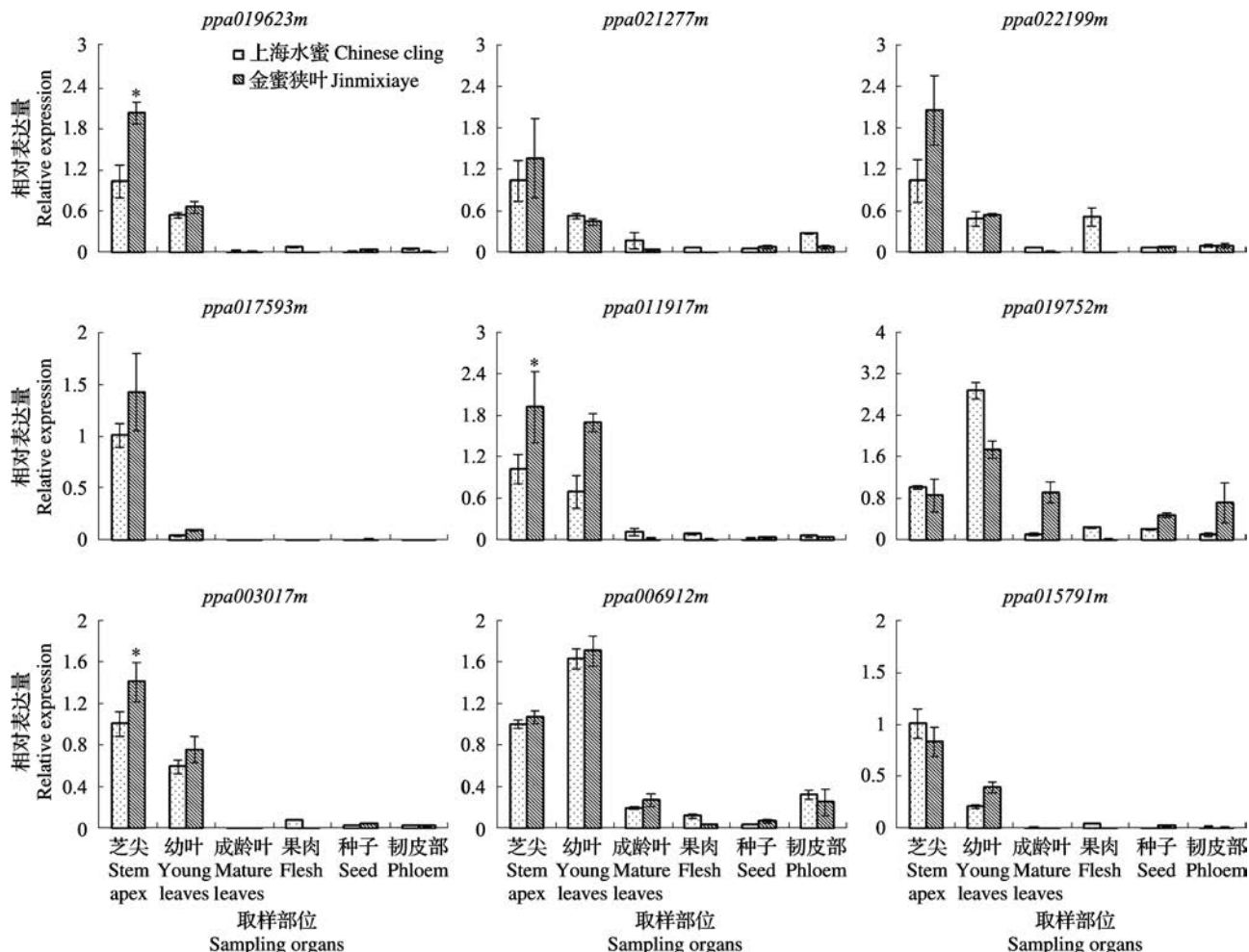
构域,但 C 端为高变区。在 C 端,*ppa019623m* 和 *ppa003017m* 编码蛋白与 *AtGRF1* 类似,分别含有 1 个 TQL 和 GGPL 区;*ppa021277m* 含有另外 1 个 WRC 结构域,与 *AtGRF9* 类似<sup>[8]</sup>; *ppa024293m*、*ppa019752m* 和 *ppa006912m* 编码蛋白仅含有 1 个 GGPL 结构域,*ppa022199m* 编码蛋白仅含有 1 个 TQL 区,*ppa017593m*、*ppa011917m* 和 *ppa015791m* 编码蛋白则不含有上述任何一个结构域。

本研究利用邻接法构建了包括桃在内 4 个物种的 GRFs 的系统发育树(图 1f),不同种的 GRFs 分为 4 组,第 1 组仅有 1 个成员,为 *OsGRF9*,显示其与其他 GRFs 亲缘关系较远。第 2 组包括 2 个 *AtGRFs* 蛋白、3 个 *OsGRFs* 和 2 个桃 GRFs(*ppa003017m* 和 *ppa019623m* 编码蛋白),该组中拟南芥的 2 个蛋白主要参与调控细胞体积和雌蕊发育<sup>[8]</sup>。第 3 组包

括 2 个 *AtGRFs* 和 2 个桃 GRFs 蛋白,其中拟南芥的 2 个蛋白主要作用为调控细胞增殖、叶绿体增殖、光合作用以及叶片衰老<sup>[8]</sup>。第 4 组中的蛋白序列较多,又可以分为 2 个亚组,亚组 4-1 包含 2 个 *AtGRFs*、5 个 *OsGRFs* 和 3 个桃 GRFs 蛋白,其中拟南芥的 2 个蛋白也具有调控细胞增殖的功能<sup>[8]</sup>;亚组 4-2 分别包含 3 个 *AtGRFs*、*OsGRFs*、*ZmGRFs* 和桃 GRFs 蛋白,其中拟南芥的 3 个蛋白主要参与雌蕊发育<sup>[8]</sup>。桃 GRFs 蛋白在除第 1 组之外的每个组和亚组中均有分布,暗示其多样性较高。

## 2.2 桃 *GRF* 基因的组织特性表达分析

在桃的 10 个 *GRF* 基因中,*ppa024293m* 表达量非常低,在后续的分析中舍弃,其余 9 个基因的表达如图 2 所示。



\* 表示在 0.05 水平基因在 2 个品种茎尖的表达差异

\* indicate the expression difference in stem apex of two accessions at 0.05 level

图 2 *GRF* 基因在两种叶片类型的桃树体不同组织的表达

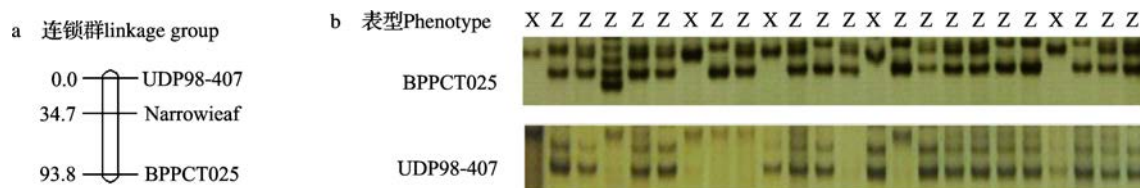
Fig. 2 The transcriptional levels of *GRF* genes in different tissue of peach varieties

9 个桃的 *GRF* 基因全部在茎尖和幼叶中表达较高,而在成龄叶片、果肉、种子和韧皮部表达较低,部分基因如 *ppa022199m* 在果肉中、*ppa019752m* 在成龄叶片和韧皮部有一定的表达。比较基因在茎尖和幼叶中的表达发现,除了 *ppa011917m* 在 2 个组织间表达差异较小、*ppa019752m* 和 *ppa006912m* 在茎尖表达低于幼叶外,其余 6 个基因如 *ppa019623m*、*ppa021277m*、*ppa022199m*、*ppa017593m*、*ppa003017m* 和 *ppa015791m* 均在茎尖中的表达高于幼叶。

比较这 6 个基因在普通叶“上海水蜜”和“狭叶金蜜”狭叶桃中的表达,可以发现,2 个基因 *ppa019623m* 和 *ppa003017m* 在茎尖中的表达在“上海水蜜”低于“金蜜狭叶”,差异有统计学意义。

### 2.3 “金蜜狭叶”桃狭叶性状的基因定位

利用“99-7-15”×“金蜜狭叶” $F_2$  群体的 8 株狭叶和 8 株宽叶单株构建混合基因池,利用 126 对 SSR 标记进行扩增,其中 3 对(BPPCT025、UDP98-407 及 CPSC006)在混合池间表现出多态性。继而在 72 株后代中扩增验证(图 3),CPSC006 和宽叶/狭叶性状无连锁关系,利用 MAPMAKER3.0 进行连锁分析,可将宽叶/狭叶性状定位于第 6 连锁群的两个标记 UDP98-407 和 BPPCT025 之间,距离二者的遗传距离分别为 34.7 cM 和 59.1 cM。这两个标记在基因组上对应的物理位置为第 6 染色体的 15.7 Mb 和 21.1 Mb,而在该区间仅含有上述 2 个 *GRF* 基因中的 1 个(*ppa003017m*),因此推测该基因可能是参与控制桃狭叶性状的 *GRF* 候选基因。



a: 狭叶性状定位的第 6 连锁群,左边为连锁距离(cM),右边为标记名称;

b: 两个 SSR 标记在群体 24 个单株中的扩增结果,其中从左至右第 1、7、10、14、21 为狭叶单株,表型用 X 表示;其余为普通叶单株,表型用 Z 表示

a: The linkage group of narrow leaf trait. The linkage distance was showed in the left column and marker names in the right,

b: The amplification of two SSRs in 24 seedlings, the first, seventh, tenth, fourteenth, and twenty-first lanes (the phenotypes were showed as a letter 'X') from left to right were PCR product using narrow leaf seedlings, and the rest were normal leaves (the phenotypes were showed as a letter 'Z')

图 3 狭叶性状的定位

Fig. 3 The preliminary genetic mapping of the narrow leaf trait

### 2.4 关键候选基因 *ppa003017m* 的启动子和编码区序列差异分析

为了分析 *ppa003017m* 在狭叶和普通叶种质叶片差异表达的原因,本研究设计了该基因启动子区域 2000 bp 和编码区的 PCR 扩增引物,分别在“99-7-15”×“金蜜狭叶” $F_2$  群体中的 5 份狭叶和 5 份普通叶单株中进行 PCR 扩增、测序和拼接。

在启动子区发现 4 个单核苷酸多态性位点 (SNPs),其中位于起始密码子上游 1930 bp 的位点在 4 个普通叶和 3 个狭叶单株中分型为 A,在另外 1 个普通叶和 2 个狭叶分型为 C;位于起始密码子上游 1916 bp 的位点在 4 个普通叶和 5 个狭叶单株中分型为 A,在另外 1 个普通叶分型为 T;位于起始密码子上游 1906 bp 的位点在 4 个普通叶和 5 个狭叶单株中分型为 A,在另外 1 个普通叶分型为 G;位于起始密码子 1193 bp 的位点在 1 个普通叶单株有 1 个 A 碱基插入,其余 9 个单株与参考基因组序列一致(表 3)。

表 3 *ppa003017m* 基因启动子在 10 份杂交单株上的分型

Table 3 The promoter genotype of *ppa003017m* in 10 seedlings with different leaf phenotype

在起始密码子 ATG 上游的位置 (bp) before the start codon (ATG)	变异 类型 Variation	5 份普通 叶单株分型 The genotype in five seedlings with normal leaves	5 份狭叶单 株分型 The genotype in five seedlings with narrow leaves
1930	A/C	4A:1C	3A:2C
1916	A/T	4A:1T	5A
1906	A/G	4A:1G	5A
1193	A/-	1A	—



而在基因编码区,10 个不同叶型的单株均与参考基因组序列一致,即在两种叶片类型种质间不存在差异。综上所述,在启动子和编码区不存在与叶型分离规律一致的 SNP。

### 3 讨论

对于狭叶基因的遗传规律,不同研究之间存在差异。如在大豆上,W. E. Domigo<sup>[22]</sup>发现大豆狭叶与宽叶植株杂交的  $F_2$  和  $F_3$  中,宽叶和狭叶的性状分离比均表现为 3:1,即狭叶性状是由 1 对隐性基因控制。在绿豆<sup>[23]</sup>和棉花<sup>[24]</sup>上,均有相同报道。而在桃上,前期研究表明“金蜜狭叶”桃的狭叶性状受到至少 2 对隐性基因控制<sup>[4]</sup>。本研究对 *GRF* 基因在不同叶型植株上进行表达分析,发现 9 个 *GRF* 基因全部在茎尖和幼叶表达较高,即 *GRF* 基因确实与桃叶片的形成存在关联,与 G. Horiguchi 等<sup>[10]</sup>和 R. E. Rodriguez 等<sup>[25]</sup>的研究结果一致。6 个基因在叶片形成的早期即茎尖中表达高于幼叶,也高于成龄叶。其中,2 个基因 *ppa019623m* 和 *ppa003017m* 在狭叶中的表达高于正常叶。经过连锁分析,推测 *ppa003017m* 为狭叶性状的候选基因。然而,由于连锁分析定位的区间较大,是否在该区间存在其他的非 *GRF* 候选基因,需要进一步研究。同时,本研究与 T. Yamamoto 等<sup>[6]</sup>将桃狭叶性状定位在第 8 连锁群不同,暗示控制桃狭叶性状的基因确实可能有多个<sup>[4]</sup>。

在拟南芥上,GIF 蛋白与 AtGRF 相互作用,形成蛋白复合体调控叶片和子叶的生长<sup>[9]</sup>。在本研究中,通过表达分析发现 *ppa003017m* 可能是调控“金蜜狭叶”桃狭叶性状形成的关键基因,然而通过扩增其启动子区域却未发现有规律的遗传变异。因此,在桃上,可能存在与 *GRF* 相互作用的 GIF 蛋白,从而导致 *GRF* 基因的差异表达。通过检索桃基因组注释数据库,却没有发现 *GIF* 基因。在 NCBI 中下载拟南芥的 *GIF1* 基因的蛋白序列,与桃基因组进行相似性比对得到 2 个同源蛋白,其基因编号为 *ppa011329m* 和 *ppa011344m*,分别位于第 6 染色体的 27.8 Mb 和第 2 染色体的 19.7 Mb 附近,均编码与钙响应有关的反式作用因子。其中,*ppa011329m* 与本研究通过连锁分析定位的狭叶位点距离较近,对于其是否与 *GRF* 基因互作调控“金蜜狭叶”桃的狭叶表型形成是下一步研究的重点。

此外,在拟南芥中,*AtGRF1* 和 *AtGRF2* 的过量

表达会导致叶片变大<sup>[8]</sup>,即 *GRF* 基因正向调控叶片的扩张。而在玉米上,过表达 *ZmGRF10* 则会导致叶片长度变小和植株高度降低,即 *GRF* 基因也能抑制细胞的增殖<sup>[26]</sup>。在本研究中,6 个基因在狭叶和普通叶间差异表达,仅有 *ppa019752m* 在正常叶中的表达高于狭叶,可能与拟南芥中的 *GRF* 基因作用类似;而位于狭叶性状位点附近的基因 *ppa003017m* 则在狭叶中的表达高于正常叶,即在桃中 *GRF* 调控叶片形态建成的作用机制与玉米类似。

综上所述,本研究分析了 *GRF* 基因在桃基因组上的分布以及序列特征。通过荧光定量 PCR 检测了 9 个 *GRF* 基因在 1 份狭叶和 1 份普通叶桃不同组织的表达信息,发现 9 个基因在茎尖和幼叶的表达量高于其他成熟组织和器官,可能与茎尖和叶片等新生组织的发育有关;其中,6 个基因在茎尖中的表达高于幼叶,2 个基因在狭叶中的表达显著高于正常叶植株。在前期连锁分析定位的基础上,鉴定了关键候选基因 *ppa003017m* 的启动子区序列差异,但没有在 DNA 水平发现导致叶型变化的关键变异。随着高通量测序的应用,通过简化基因组测序或重测序技术有望开发出更多的分子标记,用于狭叶性状定位区段的加密,从而为候选基因和关键的基因组变异筛选提供准确的位置信息。

### 参考文献

- [1] Lesley J W. A genetic study of inbreeding and of crossing inbred lines in peaches [J]. J Am Soc Hortic SCI, 1957, 70: 93-103
- [2] Glenn D M, Scorza R, Okie W R. Genetic and environmental effects on water use efficiency in peach [J]. J Am Soc Hortic SCI, 2006, 131 (2): 290-294
- [3] 张斌斌, 马瑞娟, 沈志军, 等. 窄叶桃叶片秋季光合特性研究 [J]. 果树学报, 2011, 28 (5): 763-769
- [4] 王蛟. 狭叶桃光合及遗传特性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013
- [5] Okie W R, Scorza R. Breeding peach for narrow leaf width [J]. Acta Hortic, 2001, 592
- [6] Yamamoto T, Shimada T, Imai T, et al. Characterization of morphological traits based on a genetic linkage map in peach [J]. Breed Sci, 2001, 51: 271-278
- [7] Van Der Knaap E, Kim J H, Kende H. A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth [J]. Plant Physiol, 2000, 122: 695-704
- [8] 刘倩, 王凤德, 张一卉, 等. 植物生长调控因子研究进展 [J]. 植物生理学报, 2015, 51 (11): 1775-1779
- [9] Kim J H, Kende H. A transcriptional coactivator, *AtGIF1*, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci, 2004, 101: 13374-13379
- [10] Horiguchi G, Kim G T, Tsukaya H. The transcription factor *AtGRF5* and the transcription coactivator *AN3* regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2005, 43: 68-78



- [11] Zhang D F, Li B, Jia G Q, et al. Isolation and characterization of genes encoding GRF transcription factors and GIF transcriptional coactivators in Maize[J]. Plant Sci, 2008, 175(6): 809-817
- [12] Liu J, Hua W, Yang H L, et al. The *BnGRF2* gene (GRF2-like gene from *Brassica napus*) enhances seed oil production through regulating cell number and plant photosynthesis[J]. J Exp Bot, 2012, 63(10): 3727-3740
- [13] 陈代波, 程式华, 曹立勇. 水稻窄叶性状的研究进展[J]. 中国稻米, 2010, 16(3): 1-4
- [14] Jing Q, Qian Q, Bu Q Y, et al. Mutation of the rice *narrow leaf 1* gene, which encodes a novel protein, affects vein patterning and polar auxin transport[J]. Plant Physiol, 2008, 147: 1947-1955
- [15] Fujino K, Matsuda Y, Ozawa K, et al. NARROW LEAF 7 controls leaf shape mediated by auxin in rice[J]. Mol Genet Genomics, 2008, 279: 499-507
- [16] 方云霞, 朱丽, 潘江杰, 等. 水稻窄叶突变体 *nal10* 的鉴定与基因精细定位[J]. 中国水稻科学, 2015, 29(6): 587-594
- [17] 孙冉, 刘国栋, 宫永超, 等. 棉花叶皱小突变体的遗传分析及激素含量研究[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2): 278-282
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. Methods, 2001: 25402-25408
- [19] Tong Z, Gao Z, Wang F, et al. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR[J]. BMC Mol Biol, 2009, 10: 71
- [20] 郭瑞. 甘肃桃抗南方根结线虫基因的分子标记研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009
- [21] 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 等. 桃遗传图谱的构建及两个花性状的分子标记[J]. 园艺学报, 2009, 36(2): 179-186
- [22] Domiogo W E. Inheritance of number of seeds per pod and leaflet shape in the soybean[J]. J Agric Res, 1945, 70: 251-268
- [23] Soehendi R, Chanprame S, Toojinde T, et al. Genetics, agronomic, and molecular study of leaflet mutants in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) [J]. J Crop Sci Biotechnol, 2007, 10(3): 193-200
- [24] Sujata B, Basavaraja G T, Salimath P M. Evaluation of narrow leaflet genotypes and genetic variability in segregating generation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) [J]. EJPB, 2011, 2(1): 124-131
- [25] Rodrigue R E, Mecchia M A, Debemardi J M, et al. Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396[J]. Development, 2010, 137(1): 103-112
- [26] Wu L, Zhang D, Xue M, et al. Overexpression of the maize *GRF10*, an endogenous truncated growth-regulating factor protein, leads to reduction in leaf size and plant height[J]. J Integr Plant Biol, 2014, 56: 1053-1063