

刚毛柽柳 *ThGAI* 基因的克隆和序列分析

张悦, 张玉, 张春蕊, 王超

(东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘要: 通过对刚毛柽柳转录组的分析, 克隆获得了一条柽柳 DELLA 家族蛋白基因, 命名为 *ThGAI*。序列分析结果表明, *ThGAI* 基因全长 cDNA 为 2 901 bp, 包括 1 980 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 推测 *ThGAI* 基因编码 659 个氨基酸, 编码蛋白相对分子质量为 71.99 ku, 等电点为 5.58。通过生物信息学分析发现, *ThGAI* 基因编码蛋白具有 DELLA 蛋白特有的结构域; 氨基酸多序列比对和系统进化树分析发现, *ThGAI* 基因编码氨基酸序列与其他已知植物 DELLA 蛋白有较高的同源性, 属于 DELLA 亚家族成员, 并具有 TVHYNP 结构域、POLY S/T/V 结构域、核定位 NLS、VHVID 结构域、亮氨酸结构域及 GRAS 结构域, 且与玉米 *ZmGAI* 亲缘性最近。实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 分析表明, *ThGAI* 表达受 NaCl 和聚乙二醇 (PEG) 诱导, 暗示赤霉素 (gibberellins, GA) 可能参与了刚毛柽柳的非生物胁迫响应过程。

关键词: 分子生物学; 刚毛柽柳; *ThGAI* 基因; DELLA 蛋白; 表达分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2017)15-1679-09

Gene cloning and expression analysis of *ThGAI* from *Tamarix hispida*

ZHANG Yue, ZHANG Yu, ZHANG Chunrui, WANG Chao

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: A protein gene of DELLA family named *ThGAI* gene was successfully cloned from the transcrip cDNA library of *Tamarix hispida*. Sequence analysis indicated that *ThGAI* gene is 2 901 bp in length, containing an open reading frame (ORF) of 1 980 bp and encoding 659 amino acids. The estimated molecular weight and isoelectric point of the protein encoded were 71.99 ku and 5.58, respectively. Bioinformatics analysis indicated that the typical domains of DELLA protein were found in the protein encoded by *ThGAI* gene. Amino acid sequence alignment with other species and phylogenetic tree analysis indicated that the deduced amino acid sequence of *ThGAI* gene was highly homologous with those of DELLA protein from other plants and was belonged to the DELLA family. They had the DELLA protein typical domains such as TVHYNP, POLY S/T/V, NLS, VHVID, leucine and the conserved GRAS. They had the highest homology with *ZmGAI* from *Zea mays* Linn. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) assay revealed that the mRNA levels of *ThGAI* was significantly up-regulated under NaCl and PEG treatments, suggesting that gibberellins (GA) may be involved in abiotic stress response of *T. hispida*.

Key words: molecular biology; *Tamarix hispida*; *ThGAI* gene; DELLA protein; expression analysis

0 引言

GA 是植物体中一类重要的生长激素, 能够调节种子萌发、花器官分化及茎伸长等, 在植物整个生命

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金 (20130062120012)

作者简介: 张悦 (1993—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 林木遗传育种

通信联系人: 王超, 副教授, 主要研究方向: 林木遗传育种. E-mail: wzyrgm@163.com

周期中发挥着重要作用^[1]。GA对植物生长发育的调控功能主要表现在启动 DELLA 蛋白泛素蛋白酶的降解途径,实现 DELLA 去阻遏,从而促进植物生长发育^[1~2]。DELLA 蛋白是 GA 信号通路重要的负调控因子,DELLA 家族蛋白的 N 端同源性总体不高,但存在两个非常保守的酸性结构域——DELLA 和 TVHYNP;中部有一个核定位信号结构域——NLS (RKVATYFGLARR);其后有一个保守氨基酸结构域 (VHIID)和亮氨酸重复序列(LZ);在 C 端有类似 SH2 结构域(R₁₅GTFLDRTESLYY₃FDSLEGG)、REVR 和 SAW 结构域。当 DELLA 蛋白的 N 端发生突变时,植株会表现矮化,对 GA 不敏感^[3~4]。此外,DELLA 蛋白还受生长素(auxin)、茉莉酸(jasmonate)、乙烯(ethylene)和脱落酸(abscisic acid, ABA)等多种信号转导途径调控^[5~7]。目前,已从多种植物中得到 DELLA 蛋白,包括拟南芥的 GAI、RGA 和 RGL,大麦的 SLN1,玉米的 d8,水稻的 SLR1 和 GAI,小麦的 Rht 和葡萄的 L1 等^[8~13]。

近年来,研究发现 GA 还参与了植物非生物胁迫响应过程。在非生物胁迫下,植物可通过 GA 减少的方式使生长减缓从而适应外界环境。GA 合成与信号转导途径中的相关基因与植物的抗逆性有密切关联。植物通过对 *DELLAs*、*GA20oxs*、*GA3oxs* 和 *GA2oxs* 等 GA 代谢相关基因的表达调控来适应外界的不利环境^[14~19]。另外,DELLAs 会与 ABA 信号通路中的相关蛋白共同参与调控植物非生物胁迫应答调控过程^[20~22]。为探究 GA 信号途径与柽柳非生物胁迫响应过程之间的关系,研究克隆了一条编码刚毛柽柳(*Tamarix hispida*) DELLA 蛋白的基因 *ThGAI* 全长 cDNA 序列,对该序列进行生物信息学分析,利用 qRT-PCR 技术分析其在 NaCl 和 PEG 胁迫下的表达模式,为进一步研究 GA 参与刚毛柽柳非生物胁迫响应调控的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与处理

将采自中国科学院吐鲁番沙漠植物园的刚毛柽柳种子播种于泥炭土:沙为 1:3 (体积比)的混合土中,放置于温室培养,温室培养条件为:平均温度 24℃,相对湿度 70%~75%,光照强度 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期 16 h/8 h。选取生长状态良好和长势相同的 2 月龄刚毛柽柳幼苗,分别用 20%(质量/体积)PEG6000 和 0.4 mol/L NaCl 胁迫处理不同时间,同时用正常浇水幼苗作为对照,每个处理重复 3 次,每个样品至少 20 棵幼苗,使其充分混合后用液氮速冻,置于-80℃冰箱用于提取 RNA。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

对在不同时间 NaCl 处理下刚毛柽柳的地上组织和地下组织取样,用溴化十六烷基三甲铵(CTAB)法提取总 RNA,参照 PrimeScript™ RT Reagent Kit (TaKaRa)进行反转录,合成 cDNA 第一条链。

1.3 *ThGAI* 全长 cDNA 序列克隆

根据对刚毛柽柳转录组测序数据的分析,用 Unigenes 功能注释结果获得 *ThGAI* 序列。以柽柳 cDNA 为模板对该基因进行 PCR 扩增,得到的目的条带进行胶回收纯化后,连接到 pMD18-T 载体上进行测序。

1.4 *ThGAI* 基因序列分析

利用在线工具 ORF Finder 分析 *ThGAI* 基因的 ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>);利用 ExPASy 在线软件预测 *ThGAI* 编码的氨基酸序列的分子量及理论等电点 (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>);用 Bioedit 进行同源蛋白序列的多序列比对;用 MEGA 5.0 软件 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树;用二级结构预测软件预测 *ThGAI* 基因编码蛋白质的二级结构 (<https://www.predictprotein.org/>);用 ProtScale 在线分析 *ThGAI* 蛋白质的疏水性 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/>)

protscale.pl); 用 Psort 软件进行亚细胞定位预测 (<http://wolfsort.seq.cbrc.jp/>)。

1.5 qRT-PCR 分析

根据 *ThGAI* 全长 cDNA 序列设计定量引物, 以刚毛柞柳 β -actin (FJ618517)、 α -tubulin (FJ618518) 和 β -tubulin (FJ618519) 基因作为内参基因, 引物序列如表 1 所示。qRT-PCR 使用全式金的 TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂盒, 反应体系为: 2×TransStart Top Green qPCR SuperMix 10 μ L, 稀释后的模板 cDNA 2 μ L, 上游引物和下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 加灭菌去离子水补足体积至 20 μ L。反应程序为: 94℃ 预变性 30 s; 94℃ 变性 12 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 79℃ 读板 1 s, 45 个循环。待 PCR 反应结束后, 将反应温度以 0.5℃/s 的速度从 55℃ 升至 99℃。每个样品重复 3 次, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行基因的相对定量分析^[23-24]。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences used for qRT-PCR analysis

基因	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')
<i>ThGAI</i>	CTTCGTGCTATTCCTGGAATCG	GACAGCCCTGGCGCAGGCCATG
α -tubulin	CACCCACCGTTGTCCAG	ACCGTCGTCATCTCACC
β -actin	AAACAATGGCTGATGCTG	ACAATACCGTGCTCAATAGG
β -tubulin	GGAAGCCATAGAAAGACC	CAACAAATGTGGGATGCT

2 结果与分析

2.1 *ThGAI* 基因全长 cDNA 的获得

对刚毛柞柳根部进行转录组数据分析, 获得一条 *GRAS* 基因的编码序列。对该序列进行 PCR 扩增并连接至 pMD18-T 上, 基因测序结果与转录组碱基序列完全相同, 将此基因命名为 *ThGAI*。

2.2 *ThGAI* 基因的生物信息学分析

2.2.1 *ThGAI* 氨基酸组成、理化性质分析

运用 OFR Finder 和 ExPASy 进行分析 (如图 1 所示), 得知 *ThGAI* 基因 cDNA 全长为 2 901 bp, 包含 1 980 bp 完整 ORF, 编码 659 个氨基酸序列。*ThGAI* 基因编码蛋白的相对分子质量为 71.99 ku, 理论等电点 PI 为 5.58; 带负电荷氨基酸残基数 Arg+Glu 为 75, 带负电荷氨基酸残基数 Arg+Lys 为 54; 蛋白质不稳定系数估算值为 53.85, 为不稳定性蛋白质。理论推导出半衰期约为 30 h; 亲水性平均数为 -0.373, 预测该蛋白为亲水性蛋白, 与 Protscale 在线分析 *ThGAI* 蛋白质的疏水性结果一致 (如图 2 所示)。利用 NCBI CD-Search service 工具对 *ThGAI* 编码蛋白的结构域进行分析, 结果表明, *ThGAI* 基因序列 N 端氨基酸区域含有 DELLA 家族核心序列, C 端氨基酸区域含有 *GRAS* 家族核心序列 (如图 3 所示)。

2.2.2 *ThGAI* 二级结构预测

根据蛋白质二级结构预测, 发现 *ThGAI* 二级结构由无规则卷曲、 α -螺旋和 β -折叠组成。其中以无规则卷曲为主, 占 63.58% (约 419 个氨基酸); 其次是 α -螺旋, 占 29.59% (约 195 个氨基酸); β -折叠占 6.83% (约 45 个氨基酸) (如图 4 所示)。利用 Protscale 分析发现 (如图 1 所示), 亲水氨基酸均匀分布在整个 *ThGAI* 肽链上, N 端表现为疏水性, C 端表现为亲水性, 整个多肽链表现为亲水性。利用 SignalP4.1Server 进行氨基酸序列信号肽分析, 发现 *ThGAI* 基因编码的蛋白没有信号肽存在 (如图 5 所示)。

```
1 M K R D H Q E M S H H H S I S P S A A  
1 ATGAAGAGAGATCATCAAGAAATGCCATCATCACCCTCTATCTCACCCCTCAGCCGCC  
21 G S G E A S S S K G K I W E D G D G G G  
61 GGTTCCGGCGAGCGAGTTCTTCAAGGGCAAGATTGGGAAGACGGGGATGGAGGTGA  
41 G M D D E L L A V L G Y K V K A L D M A  
121 GGCATGGATGATGAGCTACTTGCTGTCTTGGTTATAAGGTCAAAGCCTTAGACATGGCC  
61 D V A Q K I E Q L E M A M G T V Q E D G  
181 GACGTTGCTCAGAAAATCGAACAACTTGAGATGGCAATGGGTACTGTTCAGGAAGATGGT  
81 I S H L S C D T V H Y N P S D I S G W L  
241 ATTTCTCATCTCTCTTGTGATACTGTTCACTATAATCCTTCTGACATCTCTGGTTGGCTT  
101 E N M L S E I N P L R P P P P S P P L L  
301 GAGAATATGCTCTCTGAGATTAATCCTTTACGACCACCACCACCATCACCCCTCTTCTT  
121 H R Q Q P C L E S G A A N P L S S V H N  
361 CATCGTCAACAGCCTTGTGGAGTCGGAGCTGCTAATCCCTGTCCTCTGTCCATAAC  
141 H P G M D S L F V Q P Q P H S Q Y Q H H  
421 CATCTGGTATGGATTCTTCTTTCGTCAGCCACAACCCATAGCCAATATCAGCATCAT  
161 P Q L Q S N A S I L S P S S S R H Q P P  
481 CCCAGTTACAATCCAATGCTTCCATCTCTCCCTCATCTCCAGACACCAACCA  
181 P I I Y E D N S E Y D L R A I P G I A A  
541 CCGATAATCTACGAAGACAACCTCGGAGTACGATCTTCGTGCTATTCCTGGAAATCGCCGC  
201 Y R S T I Y S D P D S L P Q T T N N A Y K  
601 TATAGATCCACATATTCAGATCCGATTCGCTACCGCAACGACTAACCAAGCCTATAAG  
221 R V K P E P A S D M G S V S C H R S P P  
661 AGAGTGAAGCCTGAACCGCGTCCGACATGGGATCCGTGCTGTCATCGTTCGCGCGC  
241 S S A P V E L A K P A I V V D S Q E T G  
721 TCTCAGCTCCCGTGAACCTAGCTAAACCTGCAATCGTGTGACTCACAGGAGACGGGG  
261 V R L V H A L M A C A R A V Q N E D L K  
781 GTCGCTAGTCCACGCGCTCATGGCTGCGCCAGGGCTGTCCAACGAGGACCTCAAG  
281 L A D A L V K Q I G Q L A V S Q T G A M  
841 TTGGCCGATGCGCTGCAAAACAAATCGGACAACGCGGTGCTCAAAACGGGGCTATG  
301 R K V A T Y F A E A L A R R I Y N V P P  
901 CGTAAAGTCGCTACGTACTTCGCGAGGCACTCGCTCGTCAATCTACAATGTTCCTCT  
321 Q Q S S M D S A C A D V L Q M H F Y E T  
961 CAACAATCTTCATGAGACTCCGCGTGGCGGAGCTCCTCAGATGCACTTCTACGAAAC  
341 C P Y L K F A H I T A N E A I L E A F A  
1021 TGTCCTTACCTCAAATTCGCTCATATCACAGCTAATGAAGCCATCCTGGAGCATTCCGG  
361 T S S R V H V I D F S M K Q G M Q W P M  
1081 ACTTCTTAGGGTTTCATGATAGACTTTAGCATGAAACAAAGTATGAGTGGCCGATG  
381 L I Q R L A L R P G G P P S L R L S G I  
1141 CTCATACAACGCTCTGCTCTCCGCCCGGGGTCCTCCGCTCTAAGACTGAGCGCATC  
501 G P E F L E R F N E A L H Y Y S T L F D  
1501 GGACCTGAATTCTTGGAAAGTTCAACGAGGCGCTGCATTACTCGACGCTGTTCCGAC  
521 S L E G R G G G T G G N G G V E E Q Q N  
1561 TCGTTGAAGGCGCGCGCGGTACGGAGGAAATGGTGGGTTGGAGGAGCAGCAGAAC  
541 N Q Q D V V M T E M Y L G I Q I C N V V  
1621 AACCCAGCAGGATGTGGTATGACGGAGATGACTTGGGACGAGATATGTAACGTTGGT  
561 A C E G A E R V E R H E T L M Q W R G R  
1681 GCTTGTGAAGGTGCGGAGAGGGTGGAGACACGAGACGTTGATGAGTGGAGAGGAGG  
581 M E S A G F D S V P L G S N A F K Q V S  
1741 ATGGAATCGGCCGGTTTGACTCGGTTCCCTTGGGTTCAATGCATTAAACAAGTGAGT  
601 M L S G L F P Q G D G Y R V E E R N G C  
1801 ATGTTGCGGTTTGTTCCTCCAGGGTATGGGTATAGGGTGGAGGAGGAATGGGTGT  
621 L T L N W H T R P L I A T S A W R V A Y  
1861 CTGACGCTTAATGGCATACTCGGCCGTTGATTGCGACATCGGCCGTTGGCGTAT  
641 G G G G V G G T S G R V D G V F V V R *  
1921 GGTGGCGCGCGTAGGAGGACTAGCGGCCGAGTTGACGGTGTATTGTGGTGGCTGA
```

图1 刚毛怪柳 *ThGAI* 基因 cDNA 序列及其推测的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA sequences of *ThGAI* gene and deduced amino acid sequence in *T. hispida*

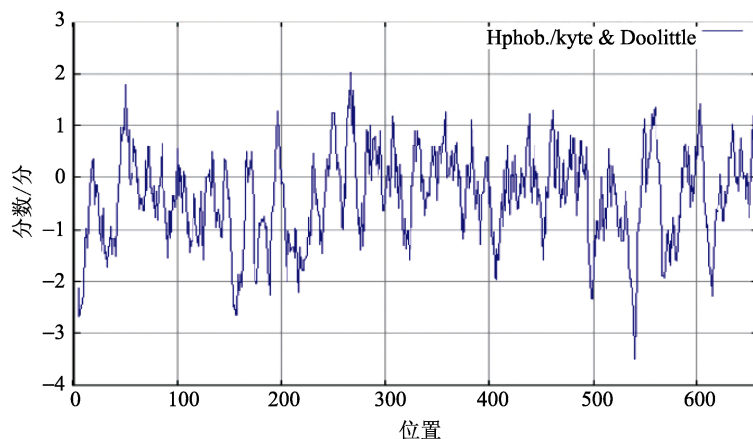


图2 *ThGAI* 基因疏水性分析

Fig. 2 Hydrophobicity analysis of *ThGAI* gene

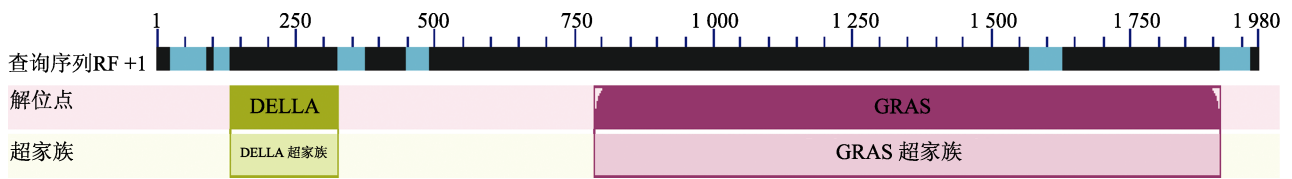


图3 *ThGAI* 保守区结构预测

Fig. 3 Putative conserved domains of *ThGAI*

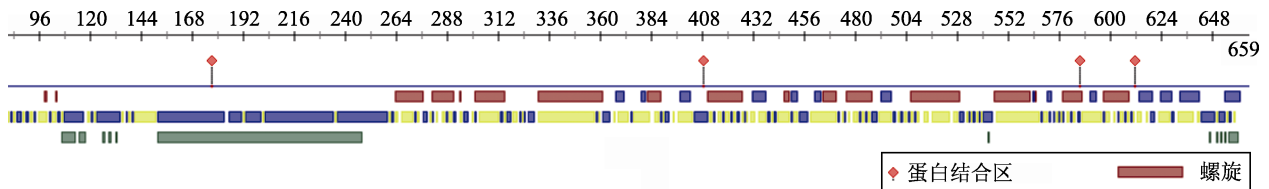


图4 *ThGAI* 二级结构预测

Fig. 4 Secondary structure prediction of *ThGAI*

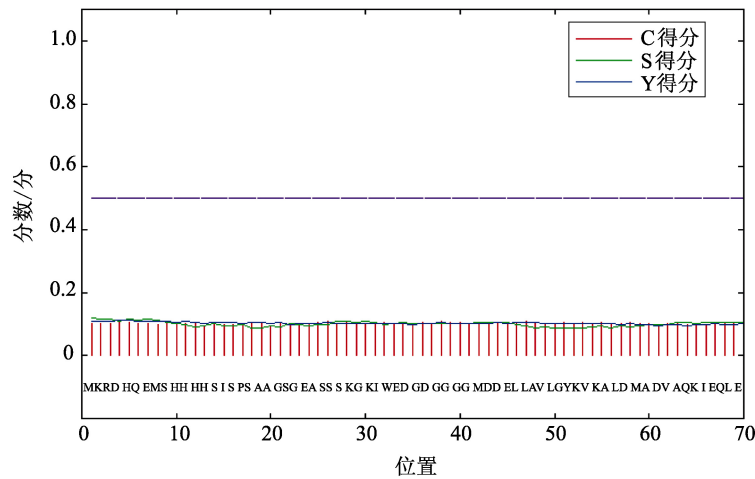


图5 *ThGAI* 蛋白信号肽预测

Fig. 5 Signal P-NN prediction for *ThGAI* protein

2.2.3 *ThGAI* 蛋白的亚细胞定位分析

利用 Psort 对 *ThGAI* 蛋白的亚细胞进行定位预测，发现其可能定位在细胞核、内质网、液泡和细胞质中（如表 2 所示），定位在细胞核的概率最大，为 69.23%，其他定位概率较小，表明 *ThGAI* 可能是一个核蛋白。

表 2 *ThGAI* 蛋白亚细胞定位

Tab. 2 Subcellular localization of *ThGAI* protein

亚细胞定位	概率/%
细胞核	69.23
内质网	15.38
液泡	7.69
细胞质	7.69

2.2.4 *ThGAI* 基因编码的氨基酸序列同源性分析与系统发育树构建

利用 NCBI 的 Smart BLAST 数据库进行序列同源性分析，发现 *ThGAI* 蛋白与其他植物 DELLA 蛋白家族成员的氨基酸序列具有较高的相似性，利用 Bioedit 对 *ThGAI* 蛋白与已知 7 种植物（葡萄 *VvGAI*: AAM19210；水稻 *OsGAI*: BAA90749；玉米 *ZmGAI*: CAB51557；小麦 *TaGAI*: CAB51555；番茄 *LeGAI*: AAP22369；拟南芥 *AtGAI*: CAA72177；核桃 *JrGAI*: ADH10265）的 DELLA 家族蛋白进行同源性序列比较（如图 6 所示）。结果表明，*ThGAI* 蛋白具有 GRAS 家族所有典型结构域，其中包括 NLS（核定位信号域）、N 端的 DELLA 和 TVHYNP（保守结构域）、C 端的 VHIID、PFYRE 和 SAW（保守结构域）、LZ 区域和 POLY S/T/V（传导 GA 信号），推测 *ThGAI* 蛋白属于 GRAS

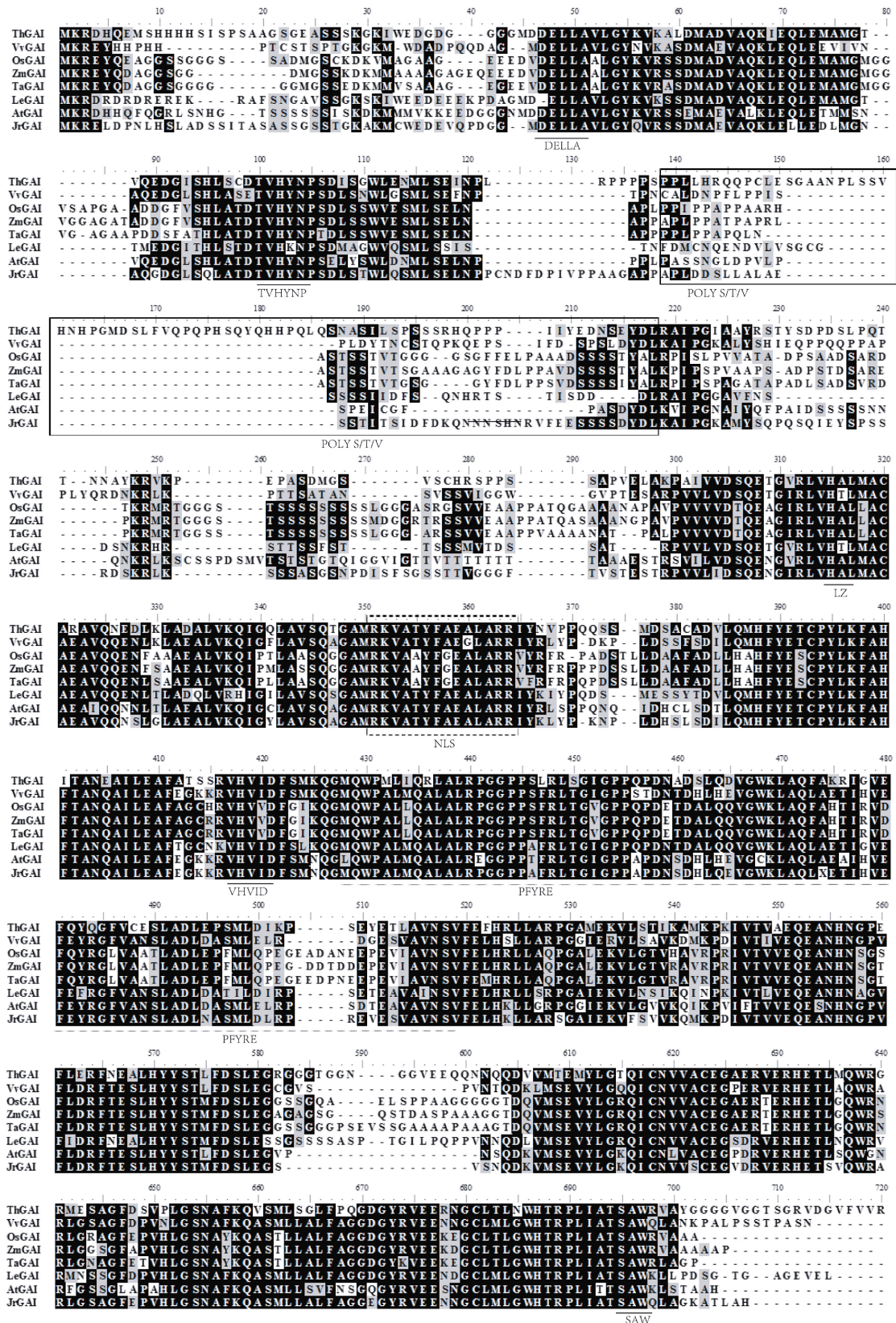


图 6 刚毛柃柳 ThGAI 蛋白与其他植物 DELLA 家族蛋白的同源序列比较

Fig. 6 Homologous sequence comparison of ThGAI protein in *T. hispida* with other plant DELLA family proteins

转录因子 DELLA 亚家族, 可能参与 GA 信号通路调节。其中, 拟南芥、葡萄、番茄属于双子叶植物; 水稻、小麦、玉米属于单子叶植物。ThGAI 与双子叶植物中 DELLA 蛋白的相似度高于单子叶植物, 也进一步从分子水平为物种分类提供了依据。

利用 MEGA 5.0 软件构建几种植物 DELLA 蛋白同源序列的系统进化树 (如图 7 所示), 其中包括拟南芥 3 种 DELLA 蛋白 (AtRGL1: Q9C8Y3; AtRGL2: Q8GXW1; AtRGL3: Q9LF53) 和陆地棉 2 种 DELLA 蛋白 (GhSLR1a: DQ006269; GhSLR1b: AY208992)。进化树结果显示, ThGAI 与 ZmGAI 亲缘关系最近, 二者可能有相似的功能。

2.3 非生物胁迫下 *ThGAI* 基因的表达

为进一步研究 *ThGAI* 基因对逆境胁迫的响应情况, 采用 qRT-PCR 方法分析其在 NaCl 和 PEG 胁迫下的表达模式。*ThGAI* 在高盐及干旱胁迫下均呈现为表达上调, 但在各胁迫时间点的表达模式有所差异 (如图 8 所示)。在 NaCl 胁迫下, *ThGAI* 在刚毛怪柳中表达量迅速上升, 胁迫 12 h 时表达量达到最高, 表达上调 4.5 倍, 随着胁迫时间的延长, *ThGAI* 表达量有不同程度的降低; 在 PEG6000 模拟干旱胁迫下, *ThGAI* 表达量在胁迫 2 h 时达到最高, 表达上调 6 倍, 随着胁迫时间的延长, *ThGAI* 表达量逐渐降低, 在 12 h 后表达水平趋于平稳, 表达量保持在对照的 1.6 倍。综上所述, *ThGAI* 对高盐和干旱胁迫具有明显的响应, 表明 *ThGAI* 可能参与刚毛怪柳抗旱耐盐的生理过程。

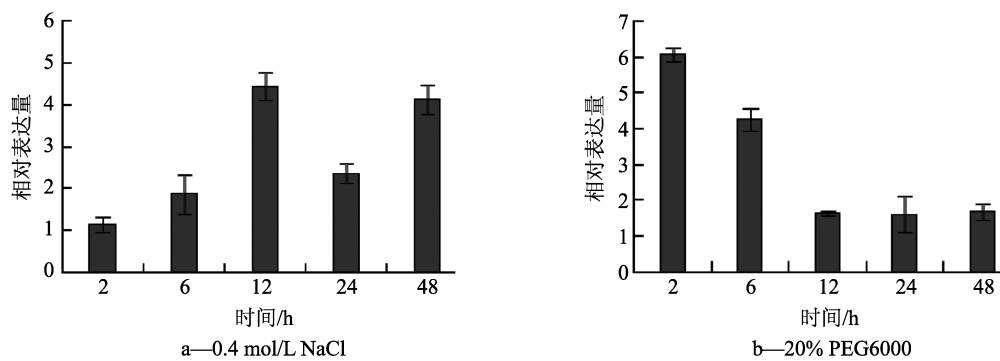


图 8 *ThGAI* 基因在不同胁迫下的表达模式分析
Fig. 8 Expression analysis of *ThGAI* gene under several abiotic stresses

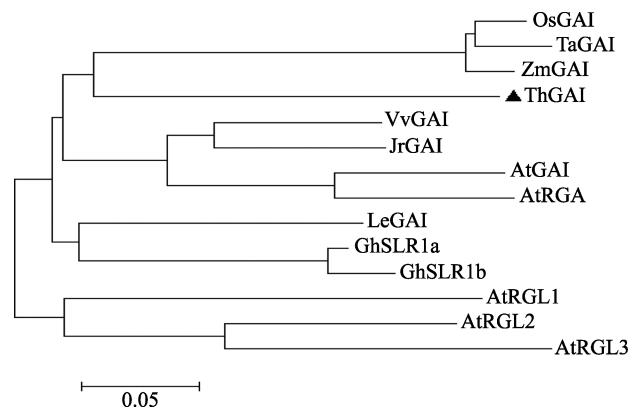


图 7 几种植物 DELLA 蛋白同源序列的系统进化树分析
Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of DELLA proteins homologous sequence from various plant species

3 讨论与结论

GA 在植物生长发育过程中起着重要的调控作用^[25]。作为 GA 合成的负调控因子, DELLA 蛋白是 GA 信号通路中的重要元件。本研究克隆了一条刚毛怪柳 DELLA 蛋白基因, 命名为 *ThGAI*。*ThGAI* 的 cDNA ORF 长 1 980 bp, 编码 659 个氨基酸。ThGAI 蛋白与其他植物的 DELLA 蛋白具有较高的同源性, 并具有 GRAS 家族所有典型结构域, 包括 TVHYNP 结构域、POLY S/T/V 结构域、核定位 NLS、VHVID 结构域、亮氨酸结构域及 GRAS 结构域。虽然 DELLA 蛋白编码基因是 GRAS 家族中的一员^[5], 但与其他家族成员相比, 在 N 端同源性较差, 在 C 端表现出较高的同源性。

GA 作为重要的植物激素, 在植物种子萌发、叶片伸展、开花和果实形成等方面的调控作用已被深入研究^[13, 26~31]。但近年来, 越来越多的研究证实 GA 信号相关 DELLA 蛋白家族成员参与了植物的非生物胁迫响应过程。盐胁迫下, 拟南芥植株体内 GA 含量下降, DELLA 蛋白累积并可以提高植株的耐盐能力^[16]。拟南芥 DELLA 蛋白基因 *AtGAI* 的过量表达可减少盐胁迫诱导的活性氧(reactive oxygen species, ROS) 产生的伤害^[17]; 而拟南芥 DELLA 突变体植株则对盐胁迫更敏感^[32]。遭遇低温胁迫时, 拟南芥会诱导 *CBFI* 基因的表达, 从而激活 GA 降解酶基因, 使 GA 含量下降而提高 DELLA 蛋白累积, 在抑制生长的同时提高抗逆性^[18]。另有研究显示, DELLA 蛋白能够调控下游抗逆基因的表达, 从而提高植物的抗逆能力^[20~22]。这些研究均表明, GA 的信号传导途径也参与了植物的非生物胁迫响应过程, 并且在植物非生物胁迫应答中起到了关键的作用。然而, 目前 GA 参与植物非生物胁迫的应答机制仍不清楚, GA 信号途径与植物胁迫应答调控网络间的关系尚待深入研究。为进一步探究 GA 信号途径与柃柳非生物胁迫响应过程之间的关系, 本研究利用 qRT-PCR 技术分析了 *ThGAI* 在 NaCl 和 PEG 胁迫下的表达模式, 结果显示, *ThGAI* 的表达受到高盐和干旱胁迫的诱导。推测盐和干旱胁迫下, *ThGAI* 表达量上升, 柃柳体内 DELLA 蛋白迅速累积, GA 含量下降, 致使柃柳生长发育减缓, 从而适应高盐与干旱环境。

[参考文献] (References)

- [1] SUN T P. Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development[J]. *Plant Physiol.*, 2010, 154(2): 567-570.
- [2] FLEET C M, SUN T P. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis[J]. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2005, 8(1): 77-85.
- [3] HIRANO K, UEGUCHI-TANAKA M, MATSUOKA M. GID1-mediated gibberellin signaling in plants[J]. *Trends Plant Sci.*, 2008, 13(4): 192-199.
- [4] JIANG C, FU X. GA action: turning on de-DELLA repressing signaling[J]. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2007, 10(5): 461-465.
- [5] LAWIT S J, WYCH H M, XU D, et al. Maize DELLA proteins dwarf plant8 and dwarf plant9 as modulators of plant development[J]. *Plant Cell Physiol.*, 2010, 51(11): 1854-1868.
- [6] ACHARD P, VRIEZEN W H, van der STRAETEN D, et al. Ethylene regulates arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(12): 2816-2825.
- [7] HOU X, LEE L Y, XIA K, et al. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs[J]. *Dev. Cell*, 2010, 19(6): 884-894.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] CHANDLER P M, GUBLER F. Mutants at the *Slender1* locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization[J]. *Plant Physiol.*, 2002, 129(1): 181-190.
- [11] 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.
- [12] IKEDA A, UEGUCHI-TANAKA M, SONODA Y, et al. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the *SLRI* gene, an ortholog of the height-regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(5): 999-1010.
- [13] LEE S, CHENG H, KING K E, et al. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(5): 646-658.

- [14] SAKAMOTO T, MIURA K, ITOH H, et al. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice[J]. *Plant Physiol.*, 2004, 134(4): 1642-1653.
- [15] JAVID M G, SOROOSHAEH A, MORADI F, et al. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants[J]. *AJCS*, 2011, 5(6): 726-734.
- [16] ACHARD P, CHENG H, de GRAUWE L, et al. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals[J]. *Science*, 2006, 311(5757): 91-94.
- [17] ACHARD P, RENOU J P, BERTHOMÉ R, et al. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species[J]. *Curr. Biol.*, 2008, 18(9): 656-660.
- [18] ACHARD P, GONG F, CHEMINANT S, et al. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(8): 2117-2129.
- [19] MAGOME H, YAMAGUCHI S, HANADA A, et al. The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, *GA2ox7*, under high-salinity stress in *Arabidopsis*[J]. *Plant J.*, 2008, 56(4): 613-626.
- [20] HEDDEN P, THOMAS S G. Gibberellin biosynthesis and its regulation[J]. *Biochem. J.*, 2012, 444(1): 11-25.
- [21] ZENTELLA R, ZHANG Z L, PARK M, et al. Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2007, 19(10): 3037-3057.
- [22] KO J H, YANG S H, HAN K H. Upregulation of an *Arabidopsis RING-H2* gene, *XERICO*, confers drought tolerance through increased abscisic acid biosynthesis[J]. *Plant J.*, 2006, 47(3): 343-355.
- [23] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [24] VANDESOMPELE J, de PRETER K, PATTYN F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes[J]. *Genome Biol.*, 2002, 3(7): RESEARCH0034.1-RESEARCH0034.11.
- [25] TYLER L, THOMAS S G, HU J, et al. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol.*, 2004, 135(2): 1008-1019.
- [26] GUBLER F, KALLA R, ROBERTS J K, et al. Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(11): 1879-1891.
- [27] GUBLER F, RAVENTOS D, KEYS M, et al. Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone[J]. *Plant J.*, 1999, 17(1): 1-9.
- [28] GALE M D, LAW C N, WORLAND A J. The chromosomal location of a major dwarfing gene from Norin 10 in new British semi-dwarfing wheat[J]. *Heredity*, 1975, 35(3): 417-421.
- [29] 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.
- [30] POETHIG R S. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants[J]. *Science*, 1990, 250(4983): 923-930.
- [31] WEN C K, CHANG C. *Arabidopsis RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(1): 87-100.
- [32] COLEBROOK E H, THOMAS S G, PHILLIPS A L, et al. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress[J]. *J. Exp. Biol.*, 2014, 217(Pt 1): 67-75.