

## 蓝莓花芽休眠相关MADS-box基因*VcDAM1*的克隆与表达分析

刘思, 夏秀英\*, 李波

大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连116024

**摘要:** 休眠相关MADS-box (DAM)基因在植物芽休眠及解除过程中发挥重要作用。本研究以‘蓝丰’蓝莓(*Vaccinium corymbosum*)休眠花芽为材料, 利用RT-PCR及RACE技术, 克隆获得*VcDAM1*基因(GenBank登录号为KF871069)。该基因全长1 376 bp, 包含一个750 bp的开放阅读框, 编码249个氨基酸。序列比对发现, 该基因编码的蛋白质具有典型的MIKC<sup>C</sup>型MADS-box结构域和K-box结构域, 其氨基酸序列与砂梨DAM同源性较高。实时定量PCR结果表明, 该基因在蓝莓花芽中表达量最高, 且随花芽休眠进程呈现规律变化, 在内休眠期间表达量持续上升, 内休眠解除后表达量迅速下降; 外源脱落酸能使该基因表达上调, 外源赤霉素和单氰胺使该基因表达下调。推测该基因调控蓝莓花芽的休眠。

**关键词:** 蓝莓; 休眠相关MADS-box基因; 休眠; 克隆; 表达分析

休眠是植物经过长期演化而获得的一种对环境条件及季节性气候变化的生物学适应(Anderson等2001; Campoy等2011)。芽休眠是植物休眠的典型类型。在冬季严寒到来之前, 包括蓝莓(*Vaccinium corymbosum*)在内的多年生落叶果树的芽分生组织进入休眠状态。一般来说, 休眠的诱导是由光周期和温度变化引起的(Rinne等2011), 休眠花芽必须积累足够低温或经过化学药剂的处理才能解除休眠。如果低温积累不足, 植株不能完成自然休眠过程, 花芽萌发、开花和果实的发育及产量都会受到影响(Zhuang等2013; Ito等2015)。芽休眠是落叶果树栽培和设施果树生产的主要限制因素之一(李宪利等2001; 白松龄等2016), 目前对芽休眠及解除的分子机理还缺乏完整的认识。

活跃的生长到休眠的转换涉及一系列复杂的生理生化反应、信号转导过程及大量基因表达的变化。越来越多的研究揭示, 一些休眠相关MADS-box (dormancy-associated MADS-box, DAM)基因可能在这个过程中发挥了重要作用。*DAM*是MIKC<sup>C</sup>型MADS-box基因, 最早在桃(*Prunus persica*)中被发现, *DAM*位点突变后, 桃顶芽不能进入休眠(Yamane等2011)。目前, 已在不同物种中鉴定出多个在休眠诱导及解除过程中差异表达的*DAM*基因(Jiménez等2010; Sasaki等2011; Leida等2012; 刘国琴等2013; 李亮等2016)。Hoenicka等(2008)研究发现, 过量表达*DAM*基因*BpMADS4*的杨树不能正常进入休眠。这些结果表明*DAM*基因可能是调控芽休眠的关键基因。发掘更多物种的*DAM*基因, 明确其表达特性及功能, 对于从分子层面深入了解芽休眠的机制及其调控具有重要的价值。

蓝莓(*Vaccinium* spp.)属于杜鹃花科越橘属小浆果果树, 其果实中含有大量的类黄酮及抗菌物质, 具有防止脑神经老化、保护视力、抗癌、软化血管及增强机体免疫等功效(Prior等2001; Jaakola等2010), 因其特有的营养及保健价值而深受消费者喜爱, 近年来鲜果市场需求不断增加。但因为对蓝莓休眠生理及分子机制缺乏了解, 在蓝莓生产中经常出现因花芽休眠解除不彻底而导致的成熟期不集中、产量低、品质差等问题, 阻碍了蓝莓产业的发展及推广。

为了解蓝莓中参与花芽休眠的*DAM*基因情况, 本研究以蓝莓休眠花芽为材料, 利用RT-PCR及cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术克隆了*VcDAM1*基因, 并分析该基因在不同休眠期及休眠相关化学物质处理后的表达特性, 明确其与蓝莓花芽休眠的关系, 为阐明蓝莓芽休眠的分子机制、开发蓝莓芽休眠调控措施奠定基础。

### 材料与amp;方法

#### 1 实验材料

蓝莓(*Vaccinium corymbosum* L.)品种为‘蓝丰’(‘Bluecrop’), 种植于大连城子坦地区大连蓝风农业科技有限公司的蓝莓园。用于cDNA克隆的总RNA样品提取自蓝莓园十年生树体的休眠花芽; 用于检测基因组织表达特性的材料取自生长季树

收稿 2017-04-17 修定 2017-09-18

资助 教育部留学归国人员启动金项目(第48批)。

\* 通讯作者(E-mail: xx47@dlut.edu.cn)。

体不同器官; 用于检测化学试剂对基因表达影响的材料取自休眠期枝条。

柱式植物总RNA抽提纯化试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司; *LA Taq*聚合酶、dNTP Mixture、PCR产物纯化试剂盒、DNA连接酶、反转录试剂盒、3'-Full RACE及5'-Full RACE试剂盒、pMD18-T载体均购于宝生物工程(大连)有限公司。

## 2 *VcDAMI*基因全长cDNA的克隆

使用植物总RNA抽提纯化试剂盒提取蓝莓花芽总RNA, 1%琼脂糖凝胶电泳及NanoDrop 2000C分光光度计检测RNA纯度及浓度。根据MADS-box基因保守序列设计并合成简并引物F1和R1 (表1), 使用TaKaRa 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase试剂盒合成cDNA; 以cDNA为模板, 以F1和R1为引物进行PCR扩增; 扩增产物回收后连接T载体并测序。根据测序结果, 选取其中一个含有MADS-box结构域的序列, 利用Primer Premier 5.0软件设计3'端特异引物F2和F3 (表1), 进行3' RACE PCR扩增该基因3'端序列; 再根据获得的3'-RACE产物序列设计5'端特异引物R2和R3 (表1), 扩增其5'端序列。RACE采用TaKaRa 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase和TaKaRa 5'-Full RACE Kit with TAP, 具体的操作过程按照试剂盒说明书进行。将RACE获得的序列用DNAMAN进行拼接。根据拼接结果, 设计特异引物F4和R4 (表1), 扩增该基因全长cDNA。将扩增获得片段回收并

连接至pMD18-T载体, 转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 蓝白斑筛选阳性克隆, 送至生工生物工程(上海)有限公司测序。

## 3 序列比对及系统进化树的构建

NCBI上对获得的蓝莓花芽MADS-box基因cDNA序列进行BLAST分析, 将其推导的氨基酸序列与已知的DAM蛋白采用DNAMAN进行同源性比对, 系统进化树构建采用Clustal X和MEGA 5.0软件。

## 4 蓝莓花芽休眠进程确定

从2016年10月15日至2017年1月12日, 每隔2周采集带有饱满、健康花芽的蓝莓枝条, 置于装有清水的玻璃瓶中, 放入培养室中培养。培养条件为: 光周期12 h, 光照强度320  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 温度(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ ; 空气相对湿度75%。每隔2 d换一次水, 同时剪去基部少许, 露出新茬。每日喷2次蒸馏水, 保持枝条湿润。培养2周后统计萌芽率, 以花芽顶端露绿为萌芽标准。萌芽率<50%, 可判定采样期该枝条已进入休眠; 萌芽率 $\geq$ 50%, 表明该枝条休眠已解除, 此采样期为休眠解除期(Viti等2010; Yamane等2011)。

## 5 *VcDAMI*基因表达分析

利用荧光实时定量PCR技术检测基因表达量。内参基因选用金属硫蛋白基因*Metallothionein* (GenBank登录号为CF811253)。利用Primer Premier 5.0软件, 根据目标基因及内参基因序列分别设计实时定量PCR引物MADSF和MADSR及MetF和MetR (表1), 由生工生物工程(上海)有限公司合成。荧光实时定量PCR反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40个循环。反应体系参考SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, 中国大连)说明书。每个样品设置3个生物学重复。

为检测化学药剂对基因表达的影响, 于休眠期采集带有饱满、健康花芽的蓝莓枝条, 置于装有清水的玻璃瓶中, 用喷雾器分别喷施0.65% (V/V) 单氰胺(hydrogen cyanamide, HC)、500  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  赤霉素(gibberellin, GA<sub>4</sub>)、150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  脱落酸(abscisic acid, ABA)及蒸馏水, 处理后置于培养室培养。一部分枝条培养2周后统计萌芽率; 另一部分枝条于0、6、12、24、36和72 h后取中上段饱满的花芽, 液氮速冻后置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 用于提取RNA。

表1 PCR的引物序列

Table 1 The primer sequences used for PCR

名称	序列(5'→3')
F1	GGRAAGCTCTTYGAGTACTCCAC
R1	TGAGRGCAGTRTCAATCTGTTGC
F2	AGGGAGCTTATTGCCACTGATC
F3	TACAAAGAARCCAAAGGCACTA
R2	AGGTATCGAGGTCTTCTCCCAT
R3	AACCTGGCCTTGAGCTTAGAAT
F4	AATGGGGAGGGGAAGAGTGCAG
R4	CAACTACTCATAAAATCCCAGA
MetF	ACCCTGACATGAGCTTCTCG
MetR	ACCCAAATCTCTGCTTGCTG
MADSF	CCATCTCGTACGTACATGCTTAT
MADSR	CCCATTCTGCTACTTCTCTCT

## 实验结果

### 1 蓝莓休眠花芽MADS-box基因的克隆

由简并引物扩增得到约200 bp (图1-A)中间片段,回收片段并连接至T载体,对获得的阳性克隆进行测序,根据其中一个测序结果,设计3'及5'

RACE引物,进行末端扩增,分别得到800 bp (图1-B)及500 bp (图1-C)片段。将中间片段序列与RACE序列拼接,得到长度为1 376 bp序列。根据拼接结果,在序列两端设计引物进行RT-PCR扩增,得到一条特异条带(图1-D)。对该条带进行测序,结果与拼接的序列完全相同。

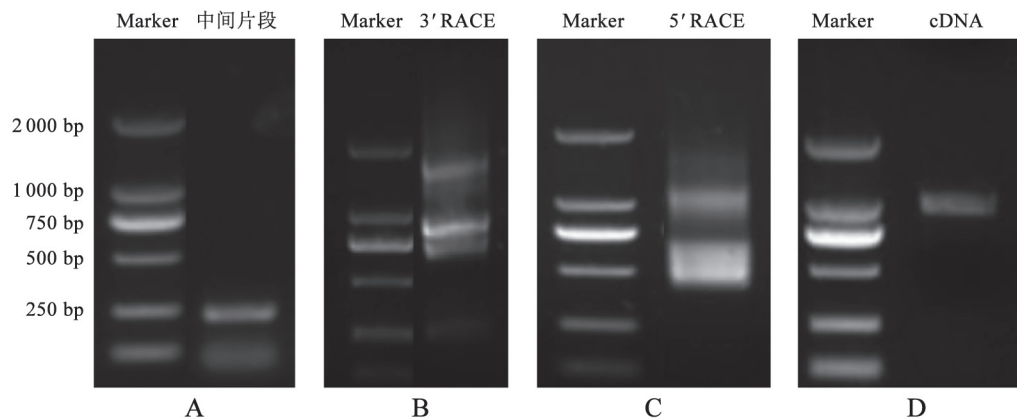


图1 蓝莓MADS-box基因的克隆

Fig.1 Cloning of MADS-box gene from blueberry

A: 简并引物扩增获得约200 bp的中间片段; B: 3' RACE扩增获得约800 bp的片段; C: 5' RACE扩增获得约500 bp的片段; D: MADS-box基因编码区全长cDNA的扩增。M: DNA Marker DL2000。

### 2 蓝莓MADS-box基因序列分析

克隆获得的cDNA序列开放阅读框(open reading frame, ORF)长度为750 bp,编码249个氨基酸,5'非翻译区(untranslated region, UTR)长度为247 bp,3' UTR长度为379 bp (图2)。将推导的氨基酸序列在NCBI上进行蛋白结构域分析,结果显示该蛋白具有典型的MIKC<sup>C</sup>型MADS-box保守结构域和K-box结构域(图2),表明该序列是植物特有的MADS-box基因。利用BLAST工具对该基因氨基酸序列进行同源性比对,结果表明该序列与其他植物AGL8蛋白具有较高的同源性。

因该基因分离自休眠花芽,将该基因编码的氨基酸序列与GenBank中部分植物DAM蛋白以邻近法构建系统进化树(图3)。结果表明,该序列与砂梨(*Pyrus pyrifolia*)冬季休眠期相关SEP4-like MADS-box基因(GenBank登录号为AJW29039.1)(Niu等2016)的同源性较高,系统进化树中聚在一起。初步推断该基因可能与蓝莓芽休眠相关,将其命名为VcDAMI (GenBank登录号为KF871069),推导的氨基酸序列GenBank登录号为AHI42988.1。

### 3 VcDAMI基因的组织表达特性

由图4可见,VcDAMI基因在蓝莓叶、花芽、幼茎、花瓣和果实中均有表达,但表达量存在差异,在花芽中的表达量最高,在果实及叶片中的表达量居中,在茎和花瓣中的表达量较低。

### 4 VcDAMI基因在蓝莓花芽休眠进程中的表达变化

如图5所示,10月15日采集的枝条,培养2周后萌芽率为100%,表明花芽尚未进入休眠,此时VcDAMI基因表达量较低;11月1日采集的枝条培养2周后未见芽萌发,表明花芽在采样期已进入休眠,此时VcDAMI基因表达量开始升高,随后一直呈上升趋势,并于12月28日达到峰值;次年1月12日采集的枝条萌芽率为70.5%,表明采样期花芽休眠已完全解除,此时VcDAMI基因表达量急剧下降。可见,VcDAMI基因表达量的变化与‘蓝丰’花芽休眠状态的转变有关,在休眠期间高量表达,休眠解除后表达量下降,说明VcDAMI基因可能参与了蓝莓花芽休眠进程。

### 5 休眠相关化学物质对蓝莓VcDAMI基因表达的影响

处于休眠期的蓝莓枝条喷施GA和HC,2周后



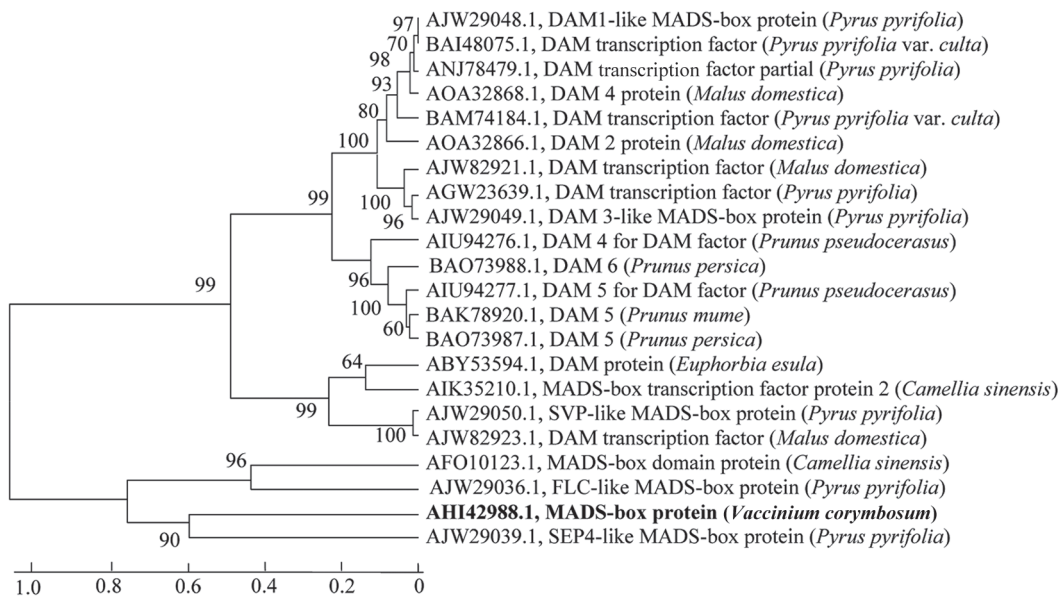
```

1   ATCTTCTCATTAGATGCCGCAGAGGTAACGCCTCCTCAATATTCTCAAAACACAAACACAAACGCAAACGC
74  AAACCCACTACTTCCCATCTCGTACGTACATGCTTATCATTAAACCAGACAGACAAGACTTTCYCCACTCCCTAC
148 ACACACAAAAGACTCTCCTCTCTCTCTCCTCTTTGTATTCCCATGAGATAGAGATAGAGATAGAGATAG
222 AGATAGAGAGAGAAAAGTAGCAGAA
1   ATGGGGAGGGGAAGAGTGCAGTTGAAGAGGATAGAGAAACAAAATCAACAGGCAAGTAACGTTCTCGAAG
1   M G R G R V Q L K R I E N K I N R Q V T F S K
70  CGTCGTTGCGGGTTGCTGAAGAAAGCTCATGAGATCTCGGTCTTTGCGATGCCGAGGTGGCGCTTATC
24  R R S G L L K K A H E I S V L C D A E V A L I
139 TTCTCTCACAAAGGAAAGCTTTTCGAGTACGCCACCGATTCTTCCATGGAAGGATTCTTGAAGATAT
47  V F S H K G K L F E Y A T D S C M E R I L E R
177 GAGAGATACTCTTATGCAGAAAGGGAGCTTATTGCCACTGATCTCGACCCAGGGAAGCTGGAGTCTG
70  Y E R Y S Y A E R E L I A T D L D T Q G S W S
277 GAGCATTCTAAGCTCAAGGCCAGGTTGGAATCTTACAAAGAAAACAAAGGCATATATGGGAGAAGAC
93  L E H S K L K A R L E L L Q R N Q R H Y M G E
346 CTCGATACCTTGACTCTGAGAGAGCTTCAAGATTTGGAGCACCAGCTTGACACTGCTCTCAAACATGTA
116 D L D T L T L R E L Q N L E H Q L D T A L K H
415 AGGACCAAAAAGAACCAACTTATGCATGAATCCATTTCTGAGCTTCAGAAAAAGGATAAAGGCATTGATC
139 V R T K K N Q L M H E S I S E L Q K K D K A L
484 GATCAAAATAACTTGCTTGCGAAGAAGATTAAGGAAAAGGAAAAGGAACAGGCCAAAGAGGCTCAATTG
162 I D Q N N L L A K K I K E K E K E Q A K E A Q
553 GAGCAGCAGAACAGTGACCTGATGATTTCTTCTGTTGGTGTATGCCATTGCCACACCTAACGGACCCT
185 L E Q Q N S D L M I S S V G A M P L P H L T D
622 TTCAACAATATTGGCGGAGCTAATTACCAGGAAGATGGCGGCATTGGAGGCGTCCAAGGAAATCCAATC
208 P F N N I G G A N Y Q E D G G I G G V Q G N P
691 CAAAATCTAAACTCCAATGATGCCACCCTGGATGTTTCGGCGCTTGACGGCTAG
231 I Q N L N T P M M P P W M F R R L S G *
1   AACGAGGCGCGGTATCTCCAGCTGCTATGTTTGAATTGTGATGTCTATATAAGCATATATACATGGGGACAT
75  GTATTTTAGTTACCGTCAATAGACCTAGCTTGATTTTCATGCAAATATGTATCTGCAGGGAACAATCTTAATTG
149 TCTGGTTTGAATCAAGGGGATGTTGTGAAATTAATTGTGTTGGTGTCTGGGATTTATGAGTAGTTGATTT
222 TGTGTGGTTGTTTCATTTTCATTTCTTTAAATCTGTAAGTGTGTGTAATGCATCAGTGTGTGTGAGAAGTG
296 AGATGTGTGTATAGAAAGTGTGTGAAACTGTATGGGTGTTTGTATGGATTTATCAATAAAAATTTGTGAGT
369 GTGTTGAGTGT

```

图2 蓝莓*VcDAM1*基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *VcDAM1* gene from blueberry

画实线部分为MADS-box区, 虚线部分为K-box区。

图3 蓝莓*VcDAM1* (AHI42988.1)蛋白系统发育树Fig.3 Phylogenetic tree of *VcDAM1* (AHI42988.1) of blueberry

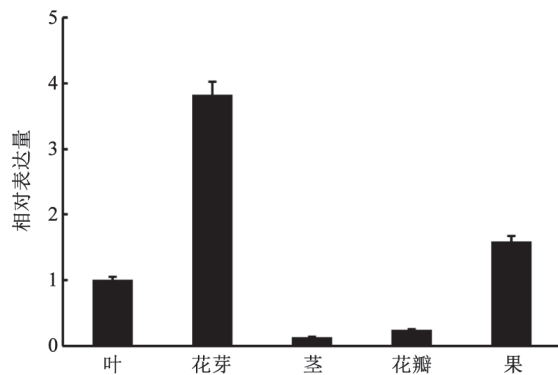


图4 蓝莓*VcDAMI*基因的组织表达特性分析  
Fig.4 Characterization of *VcDAMI* expression in tissues of blueberry

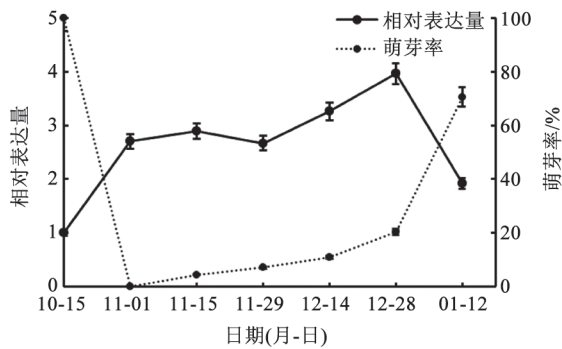


图5 蓝莓花芽休眠进程及*VcDAMI*基因表达变化  
Fig.5 The process of flower bud dormancy and changes of *VcDAMI* gene expression in blueberry

的萌芽率高于对照及喷施ABA的处理, 萌芽率分别为89.5%和74.5% (图6-A), 表明GA和HC可以解除蓝莓花芽休眠。外源ABA、GA及HC处理后, *VcDAMI*基因表达量发生明显变化。ABA处理后,

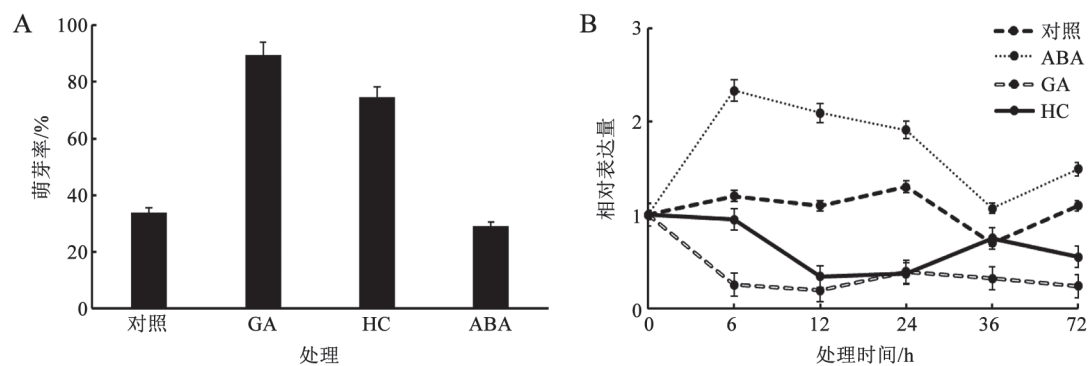


图6 ABA、GA和HC对蓝莓休眠芽萌发(A)及*VcDAMI*基因表达(B)的影响  
Fig.6 Effects of ABA, GA and HC on germination of dormant shoots (A) and expression of *VcDAMI* gene (B) in blueberry

*VcDAMI*基因上调表达, 处理6 h后表达量最高, 是对照的2.3倍, 随后略有下降但始终高于对照; HC和GA处理后, *VcDAMI*基因下调表达, GA处理6 h后表达量降至最低, 是对照的20.8%, HC处理12 h后表达量降至最低, 是对照的30.8% (图6-B)。

## 讨论

MADS-box是植物体内重要的一类转录因子, 参与了植物的多种生理活动及发育过程。*DAM*基因是芽响应休眠诱导的MIKC<sup>C</sup>型MADS-box基因的成员。Li等(2009)测定了*DAM*基因在桃树年生长周期中表达量的变化, 发现*DAM1*、*DAM2*和*DAM4*的表达与桃树的顶端停长和顶芽形成的时间基本一致, 是最有可能调控休眠的基因。Jiménez等(2010)在桃芽休眠研究中发现, *DAM3*、*DAM5*和*DAM6*表达量随冬季低温持续而下调, 并且在不同需冷量品种中变化趋势一致。刘国琴等(2013)的研究表明, *PpMADS1*和*PpMADS2*在酥梨内休眠解除之前的表达量最高, 随着休眠解除表达量下降。Yamane等(2011)的研究表明, *DAM5*和*DAM6*在桃树内休眠期间表达量上调, 休眠解除期间表达下调。李亮等(2016)的研究发现, 砂梨*PpMADS13-1*和*PpMADS13-3*的表达量随休眠解除下调表达。本研究用RACE技术从蓝莓休眠花芽中成功获得*VcDAMI*基因。生物信息学分析发现该基因具有MIKC<sup>C</sup>型MADS-box基因的典型结构特征, 系统进化分析表明其与砂梨休眠相关*SEP4-like MADS-box*基因(Niu等2016)聚在一个分支。*VcDAMI*基因在蓝莓花芽中的表达量最高, 且随休

眠进程呈现规律性变化。随着温度降低, 蓝莓花芽进入内休眠, *VcDAMI*基因表达量也随之升高, 并在内休眠解除前达到最大, 需冷量满足后, 花芽解除休眠, *VcDAMI*基因表达量也显著降低。这与上述植物的*DAM*基因表达模式一致, 可见, *VcDAMI*基因可能参与了蓝莓花芽休眠与解除。

ABA在调控植物芽休眠中起着关键的作用。ABA建立和维持植物休眠, 被称为休眠素, 在休眠或即将休眠的芽中含量较高, 休眠解除后其含量逐渐减少并消失(Düring和Bachmann 1975)。Zheng等(2015)研究表明, HC解除植物休眠是通过降低ABA含量而实现。而有关ABA与*DAM*基因表达的关系鲜有报导。本文检测了ABA处理对*VcDAMI*基因表达的影响, 发现外源ABA可诱导*VcDAMI*基因上调表达, 可见ABA可能通过促进*DAM*基因表达而维持蓝莓花芽的休眠状态。

GA、HC、6-苄基腺嘌呤、硝酸钾、石灰氮等都具有弥补有效低温积累量不足、打破落叶果树自然休眠和促进萌芽的作用(Perez等2009; Rinne等2011; Maia等2013)。其中GA和HC是生产中常用破眠剂的主要成分。Yamane等(2011)研究发现, 在侧芽上施用HC可提前打破桃树芽休眠, 同时会造成*DAM5*和*DAM6*基因表达的下调。本研究发现, 外源GA及HC可以解除蓝莓花芽休眠, 蓝莓*VcDAMI*基因也能响应外源GA及HC处理而下调表达, 我们推测GA和HC可能通过抑制*DAM*基因的表达使花芽休眠解除。

### 参考文献

- Anderson JV, Chao WS, Horvath DP (2001). A current review on the regulation of dormancy in vegetative buds. *Weed Sci*, 49: 581–589
- Bai SL, Niu QF, Teng YW (2016). Advances in the research of the regulatory mechanism of endodormancy in pear. *J Fruit Sci*, 33: 1–9 (in Chinese with English abstract) [白松龄, 牛庆丰, 滕元文(2016). 梨芽内休眠分子调控机制研究进展. *果树学报*, 33: 1–9]
- Campoy JA, Ruiz D, Egea J (2011). Dormancy in temperate fruit trees in a global warming context: a review. *Sci Hort*, 130 (2): 357–372
- Düring H, Bachmann O (1975). Abscisic acid analysis in *Vitis vinifera* in the period of endogenous bud dormancy by high pressure liquid chromatography. *Physiol Plantarum*, 34: 201–203
- Hoenicka H, Nowitzki O, Hanelt D, Fladung M (2008). Heterologous overexpression of the birch *FRUITFULL*-like MADS-box gene *BpMADS4* prevents normal senescence and winter dormancy in *Populus tremula* L. *Planta*, 227: 1001–1011
- Ito A, Saito T, Sakamoto D, Sugiura T, Bai SL, Moriguchi T (2015). Physiological differences between bud breaking and flowering after dormancy completion revealed by *DAM* and *FT/TFL1* expression in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Tree Physiol*, 36: 109–120
- Jaakola L, Poole M, Jones MO, Karppinen TK, Koskimäki JJ, Hohtola A, Häggman H, Fraser PD, Manning K, King GJ, et al (2010). A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits. *Plant Physiol*, 153: 1619–1629
- Jiménez S, Reighard GL, Bielenberg DG (2010). Gene expression of *DAM5* and *DAM6* is suppressed by chilling temperatures and inversely correlated with bud break rate. *Plant Mol Biol*, 73: 157–167
- Leida C, Conesa A, Llacer G, Badenes ML, Rios G (2012). Histone modifications and expression of *DAM6* gene in peach are modulated during bud dormancy release in a cultivar dependent manner. *New Phytol*, 193: 67–80
- Li L, Liu H, Zhang GC, Wu SH, Li YY (2016). Characteristics and expression of dormancy-associated MADS-box *PpMADS13* in different chilling requirement pear cultivars. *Subtropical Plant Sci*, 45 (1): 42–47 (in Chinese with English abstract) [李亮, 刘杭, 张桂池, 吴少华, 李永裕(2016). 不同低温需求量砂梨休眠相关基因*PpMADS13*的特征及表达模式. *亚热带植物科学*, 45 (1): 42–47]
- Li ZG, Reighard GL, Abbott AG, Bielenberg DG (2009). Dormancy-associated MADS genes from the *EVG* locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. *J Exp Bot*, 60: 3521–3530
- Liu GQ, Zheng PH, Hussain S, Teng YW (2013). Characteristics of two dormancy-associated MADS-box genes in pear and their expression analysis during the dormancy. *Acta Hort*, 40 (4): 724–732 (in Chinese with English abstract) [刘国琴, 郑鹏华, Sayed Hussain, 滕元文(2013). 梨两个休眠相关MADS-box基因特征及其在休眠过程中的表达分析. *园艺学报*, 40 (4): 724–732]
- Maia AJ, Schwan-Estrada KRF, Botelho RV, Jardimetti VDA, Faria CMDR, Batista AF, Costa WFD (2013). Bud break and enzymatic activity in buds of grapevines cv. Ives treated with *Galliesia integrifolia* hydrolate. *Acta Physiol Plant*, 35: 2727–2735
- Niu QF, Li JZ, Cai DY, Qian MJ, Jia HM, Bai SL, Hussain S, Liu GQ, Teng YW, Zheng XY (2016). Dormancy-associated MADS-box genes and microRNAs jointly control dormancy transition in pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) flower bud. *J Exp Bot*, 10: 1–19
- Perez FJ, Vergara R, Or E (2009). On the mechanism of dormancy release in grapevine buds: a comparative study between hydrogen cyanamide and sodium azide. *Plant Growth Regul*, 59 (2): 145–152
- Prior RL, Lazarus SA, Cao G, Muccitelli H, Hammerstone JF (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid

- chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 49 (3): 1270–1276
- Rinne PLH, Welling A, Vahala J, Ripel L, Ruonala R, Kangasjarvi J, Schoot CVD (2011). Chilling of dormant buds hyperinduces *FLOWERING LOCUS T* and recruits GA-inducible 1,3-b-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *Plant Cell*, 23: 130–146
- Sasaki R, Yamane H, Ooka T, Jotatsu H, Kitamura Y, Akagi T, Tao R (2011). Functional and expression analyses of *PmDAM* genes associated with endodormancy in Japanese apricot (*Prunus mume*). *Plant Physiol*, 157 (1): 485–497
- Viti R, Andreini L, Ruiz D, Egea J, Bartolini S, Iacona C, Campoy JA (2010). Effect of climatic conditions on the overcoming of dormancy in apricot flower buds in two Mediterranean areas: Murcia (Spain) and Tuscany (Italy). *Sci Hortic*, 124: 217–224
- Yamane H, Ooka T, Jotatsu H, Hosaka Y, Sasaki R, Tao R (2011). Expressional regulation of *PpDAM5* and *PpDAM6*, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. *J Exp Bot*, 62: 3481–3488
- Zheng CL, Halaly T, Acheampong AK, Takebayashi Y, Jikumaru Y, Or E (2015). Abscisic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism. *J Exp Bot*, 66 (5): 1527–1542
- Zhuang WB, Gao ZH, Wang LG, Zhong WJ, Ni ZJ, Zhang Z (2013). Comparative proteomic and transcriptomic approaches to address the active role of GA<sub>4</sub> in Japanese apricot flower bud dormancy release. *J Exp Bot*, 64 (16): 4953–4966

## Cloning and expression analysis of dormancy-associated MADS-box gene *VcDAM1* from blueberry (*Vaccinium corymbosum*)

LIU Si, XIA Xiu-Ying\*, LI Bo

*School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024, China*

**Abstract:** Dormancy-associated MADS-box (DAM) genes play important roles in regulating bud dormancy induction and release in plants. In this study, a MADS-box gene, named as *VcDAM1* (GenBank accession number KF871069) was isolated from the dormant floral buds of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. The gene consists of 1 376 bp which has a 750-bp open reading frame (ORF) coding a protein of 249 amino acids. Multiple sequence comparison revealed that *VcDAM1* encodes a protein, which is the typical MIKCC-type MADS-box protein with the MADS-box domain and K-box region. Phylogenetic analysis indicated that the amino acid sequence of *VcDAM1* had high homology with dormancy-associated MADS-box from *Pyrus pyrifolia*. qRT-PCR analysis indicated that the gene expression level in flower buds was the highest among all the organs, and with the process of flower bud dormancy, the gene expression level changed regularly. The gene expression level was increased during dormancy, and decreased rapidly after the dormancy was released. Exogenous abscisic acid (ABA) up-regulated the expression of *VcDAM1*, while exogenous gibberellin (GA) and hydrogen cyanamide (HC) down-regulated the expression of *VcDAM1*. The results imply that *VcDAM1* gene might play an important role in regulating bud dormancy in blueberry.

**Key words:** *Vaccinium corymbosum*; dormancy-associated MADS-box gene; dormancy; clone; expression analysis

Received 2017-04-17 Accepted 2017-09-18

This work was supported by the Ministry of Education to Study Abroad Returnees Launch of the Project.

\*Corresponding author (E-mail: xx47@dlut.edu.cn).