

葡萄 *SPL9* 和 *SPL10* 基因全长 cDNA 克隆、亚细胞定位和表达分析

曹 雪, 王 晨, 房经贵*, 杨 光, 于华平, 宋长年

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘 要: 从‘夏黑’葡萄(*Vitis vinifera* × *V. labrusca* ‘Summer Black’)中克隆了 SBP(Squamosa promoter binding protein) 类重要转录因子基因 *SPL9* 和 *SPL10* 全长 cDNA 序列, 在 GenBank 的登录号分别是 HM018600 和 HM018601, 序列分析表明二者均具备完全保守的核定位信号序列(KKSR)、SBP 结构域以及葡萄 microRNA156a (Vv-miR156a) 的靶序列。进一步构建 Vv-*SPL9* 和 Vv-*SPL10* 亚细胞定位表达载体, 对其是否具有核定位功能进行了研究, 并利用半定量、荧光定量 RT-PCR 研究了这两个基因与 Vv-miR156a 在葡萄不同组织的表达情况。结果表明: 转录因子 *SPL9* 和 *SPL10* 均定位于细胞核中, 而且两个基因在葡萄各个组织中均有表达, 但表达量存在差异, 两者均在小果中的表达量最高。Vv-miR156a 的积累水平与这两个基因在各个组织中的表达呈现一定的消长关系, 并且在小果中最为明显。

关键词: 葡萄; *SPL9*; *SPL10*; 亚细胞定位; 荧光定量 RT-PCR

中图分类号: S 663.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 02-0240-11

Cloning, Subcellular Localization and Expression Analysis of *SPL9* and *SPL10* Genes from Grapevine

CAO Xue, WANG Chen, FANG Jing-gui*, YANG Guang, YU Hua-ping, and SONG Chang-nian

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Firstly cloned two full length cDNAs of *SPL9* and *SPL10* SBPs (Squamosa promoter binding proteins) transcription factors from Summer Black (*Vitis vinifera* × *V. labrusca*) with accession No. of HM018600 and HM018601 deposited in GenBank database. The amino acid sequences of both genes had a putative nuclear localization signal sequence (KKSR), highly conserved SBP domains and the grapevine microRNA156a (Vv-miR156a) recognition sites. The sub-cellular location analysis using expression vectors of *SPL9* and *SPL10* constructed showed that they were both located in nucleus. The semi-quantitative and fluorescent quantitative RT-PCR were used to detect expression levels of Vv-*SPL9*, Vv-*SPL10* and miR156a in different tissues of grapevine. The result showed that the two genes were expressed ubiquitously, but at different levels in different tissues. Their expression levels were the highest in small fruit, where miR156a was accumulated at a lowest level. The expression levels of the two genes showed some trade-off correlation with those of Vv-miRNA156a in various grapevine tissues, especially in

收稿日期: 2010-11-06; 修回日期: 2011-01-11

基金项目: 国家博士后基金项目 (20080440161); 第 36 批国家留学基金项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: fanggg@njau.edu.cn; Tel: 025-84399069)

the small fruit.

Key words: grapevine; *SPL9*; *SPL0*; sub-cellular localization; fluorescent quantitative RT-PCR

植物体内存在大量的转录因子, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 27 000 个基因中就有 5.9% 是编码转录因子的 (Riechmann et al., 2000)。根据其 DNA 结合域的特点可以把转录因子分成若干个家族, 如 WRKY, AP2/EREBP, MYB, HB, MADS, SBP 等 (Birkenbihl et al., 2005), 其中 SBP 家族至今只在植物中发现, 具有植物特异性。迄今已在拟南芥中发现该家族有 17 个成员, 其中有 11 个 (*SPL2*、*SPL3*、*SPL4*、*SPL5*、*SPL6*、*SPL9*、*SPL10*、*SPL11*、*SPL13* 和 *SPL15a/b*) 具有 microRNA156 (miR156) 的识别位点 (Rhoades et al., 2002; Schwab et al., 2005; Wu & Poethig, 2006; Gandikota et al., 2007)。近年来, 有关该基因家族在其他植物上的研究也得到了重视 (Moreno et al., 1997; Eriksson et al., 2004)。

SBP 虽是较晚发现的转录因子家族, 但其功能的研究一直备受关注 (Cardon et al., 1997; Unte et al., 2003; Stone et al., 2005; Wang et al., 2005; Manning et al., 2006; Schwarz et al., 2008)。自从金鱼草中分离出两个 SBP 蛋白 *SPL1* 和 *SPL2* 后, 陆续发现 *SPL* 基因参与花和果实发育 (Unte et al., 2003; 林志萍 等, 2006)、孢子发育以及赤霉素介导的发育过程局部调控 (Debouck, 1995; Unte et al., 2003; Zhang et al., 2007) 等。而关于葡萄 SBP 转录因子家族的研究才刚起步 (曹雪 等, 2010)。

葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 的基因组较小 (约为 500 Mbp), 大约是拟南芥基因组大小的 3 到 4 倍, 同时也是继拟南芥、水稻、杨树之后完成全基因组测序的第 4 种开花植物 (Jaillon et al., 2007; 房经贵 等, 2008), 因此葡萄分子生物学成为研究的热点 (Schellenbaum et al., 2008; Muruganantham et al., 2009; 程和禾 等, 2009; 周军 等, 2009; 王晨 等, 2010; 王延书 等, 2010; 杨光 等, 2010)。本研究中利用 RACE 技术获得了葡萄 SBP 类两个重要转录因子 *SPL9* 和 *SPL10* 的 cDNA 全长, 采用半定量及荧光定量 RT-PCR 方法分析了 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 基因在葡萄不同组织中的表达情况, 并对其与葡萄 miRNA156 (*Vv-miRNA156*) 在不同组织中的表达水平进行了比较, 对两个葡萄 SBP 类转录因子功能有了初步认识, 这对于生产中更有效地利用该基因或有目的地进行基因调控具有重要的理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘夏黑’ (Summer Black) 葡萄成熟叶、幼叶、花蕾、花、小果 (直径约 0.5 cm)、中果 (直径约 1.0 cm)、大果 (直径约 1.3 cm) 于 2009 年 4 月中旬到 6 月中旬采自南京农业大学汤山葡萄园。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 由本实验室保存。亚细胞定位载体 pJIT166-GFP 由南京农业大学作物遗传与育种国家重点实验室惠赠。引物由上海英骏生物技术有限公司 (Invitrogen) 合成, 其编号及序列见表 1。

1.2 *SPL9* 和 *SPL10* 基因 cDNA 全长的克隆

葡萄各个组织总 RNA 的提取参照改进 SDS/酚法提取, 再分离 LMW RNA (张彦苹 等, 2010)。总 RNA 的纯化参照 TaKaRa 公司的 DNase I (RNase Free) 说明书进行。以总 RNA 为模板, 引物 P01 反转录合成 cDNA 第一条链, 引物 P02 延伸加帽子, 空气加热条件下 42 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 75 $^{\circ}\text{C}$ 保温 10 min, 冰上冷却 2 min 后, -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。LMW RNA 参照 Shi 和 Chiang (2005) PAP 加尾法

加尾, 再加 5'接头 (序列见 P03), 将获得的连有 3'端和 5'端接头的小 RNA 为底物, 利用引物 P04, 参照 SuperScript II 逆转录酶试剂盒说明书进行反转录 (Fu et al., 2005)。

根据拟南芥 *SPL9* 和 *SPL10* 基因序列, 参照宋长年等 (2009) 电子克隆方法克隆葡萄 *SPL9* 和 *SPL10* 基因。以 cDNA 为模板分别用引物 P05/P06 和引物 P09/P10 进行 PCR 扩增获得基因 *SPL9* 和 *SPL10* 的 3'末端。反应体系: Ex-*Taq* 酶 0.50 μL , $10 \times$ PCR buffer (Mg^{2+} plus) 5 μL , dNTP Mixture 4 μL , cDNA 2 μL , 引物各 1 μL , 用灭菌纯水补足到 50 μL 。反应参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 25 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测后用 DNA 回收试剂盒回收目标片段, 再连接到 pMD-18T simple 载体进行 T/A 克隆。DNA 测序由南京金斯瑞科技有限公司 (<http://www.genscript.com.cn>) 完成。

表 1 引物序列及 PCR 扩增片段大小
Table 1 Sequence of primers and PCR amplified products

编号 Code	序列 Sequence (5' - 3')	预期片段大小/bp Predicted size of amplified product	用途 Use
P01	GCAGGACTGCAGCTGACTGACTACT ₃₀ VN		cDNA 合成
P02	GACCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG		cDNA synthesis
P03	GAGGACTGCAGCTGACTGACTACT ₃₀ VN		LMWRNA 5'接头 LMWRNA 5' joints
P04	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATGT ₃₀ VN		cDNA 合成 cDNA synthesis
P05	CAATCACTTCCCAAGCACCT	$\pm 1\ 486$	扩增 Vv- <i>SPL9</i> 基因 3'端
P06	GCAGGACTGCAGCTGACTGACTAC		3'-end amplification
P07	CTTGCTTTGTTGCCTTCACA	± 502	扩增 Vv- <i>SPL9</i> 基因 5'端
P08	AATGACCGTTGGAGACTTCG		5' -end amplification
P09	ATGGAGTGGAATTTAAGAACTCCCTCA	$\pm 1\ 656$	扩增 Vv- <i>SPL10</i> 基因 3'端
P10	GCAGGACTGCAGCTGACTGACTAC		3'-end amplification
P11	GCCTACAGACGGAAGATGCT	± 374	扩增 Vv- <i>SPL10</i> 基因 5'端
P12	CCGCCACTCTTATCAACTC		5'-end amplification
P13	<u>GTCGAC</u> ATGGAAGGGGTTTCGAGCTCTTTGACCG	1 137	Vv- <i>SPL9</i> 基因 ORF 扩增
P14	<u>TCTAGACT</u> AAAGTGACCAGTGATCTGCTGAGTGGA		Complete ORF amplification
P15	<u>AAGCTT</u> ATGGAGTGGAATTTAAGAACTCCCTCA	1 398	Vv- <i>SPL10</i> 基因 ORF 扩增
P16	<u>TCTAGAT</u> CAGTTAATTTGATTGGGATAAAACAGCC		Complete ORF amplification
P17	CAGCAGATGCACTGGTCACT	113	Vv- <i>SPL9</i> 半定量 RT-PCR
P18	GGAGGTATCCCCCTGAAAGA		Vv- <i>SPL9</i> semi-quantitative PCR.
P19	TGTGATGCATTGGAGAAAGC	138	Vv- <i>SPL10</i> 半定量 RT-PCR
P20	CCATGAAACAAACGGATTCA		Vv- <i>SPL10</i> semi-quantitative PCR
P21	GCTCGCTGTTTTCAGTTCTAC	151	扩增 <i>UBI</i>
P22	AACATAGGTGAGGCCGCACTT		<i>UBI</i> amplification
P23	CTCGGCAACGGATATCTCGGCTCT	110	扩增 5S rRNA
P24	CTAATGGCTTGGGGCGCAACTTG		5S rRNA amplification
P25	TGACAGAAGAGAGGGAGCAA	78	扩增 miR156
P26	ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG		miR156 amplification

注: 下划线为添加的酶切位点, AAGCTT 为 *Hind*III, TCTAGA 为 *Xba* I, GTCGAC 为 *Sal* I。

Note: AAGCTT, TCTAGA, GTCGAC underlined in primers indicates restriction enzyme sites of *Hind*III, *Xba* I and *Sal* I.

用引物 P07/P08 和 P11/P12 进行 PCR 扩增分别获得基因 *SPL9* 和 *SPL10* 的 5'末端, 反应参数和反应体系同 3'末端扩增。以来源葡萄幼叶的 cDNA 为模板, 利用引物 P13/P14 和 P15/P16 进行 PCR 扩增分别获得 *SPL9* 和 *SPL10* 的 ORF。反应体系、反应参数、回收、克隆与测序同上。

利用 DNAMAN 5.22 软件对 ORF、3'末端和 5'末端等 3 个序列进行拼接分析; 核苷酸和氨基酸序列分别利用 NCBI 的 BLASTn 和 BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行相似性分析; 用 DNAMAN 5.22 软件通过氨基酸序列分析葡萄 *SPL9* 和 *SPL10* 与其他植物的关系。

1.3 亚细胞定位载体构建及 35S-GW-GFP-HM018600/ HM018601-GFP 转化洋葱表皮细胞

分别从上面测序正确的 *SPL9* 和 *SPL10* 的 ORF 菌液中提取质粒, 分别再用 *Sal* I 和 *Xba* I、*Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切, 用 *T*₄ DNA 连接酶连接到 pJIT166-GFP 载体从而得到 35S-GW-GFP-HM018600/HM018601-GFP 融合表达载体, 转入 DH5 α , PCR、酶切筛选阳性克隆, 并对阳性克隆进行测序验证。

DNA 的钨粉包埋按照 Biolistic PDS-1000/ He Particle Delivery System 的方法(徐淑平和卫志明, 1998)。取钨粉悬液 50 μ L (50 mg \cdot mL⁻¹), 加入 50 μ L 的 CaCl₂ (2.5 mol \cdot L⁻¹), 20 μ L 亚精胺 (0.1 mol \cdot L⁻¹), 5 μ g 的载体质粒充分混匀, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 1 min, 冰上静置 15 min, 分别用 70% 乙醇和无水乙醇洗涤沉淀 1 次, 重新悬浮沉淀于 50 μ L 无水乙醇中。

将幼嫩的洋葱表皮摆放在 MS 高渗培养基上, 25 $^{\circ}$ C 预培养 4 h。选用 1 100 psi 的压力膜, 将 20 μ L 钨粉 DNA 混合物点在轰击膜中央, 洋葱表皮 (约 1 cm \times 1 cm 的小块) 放在 10 g \cdot L⁻¹ 琼脂培养基上, 采用 PDS1000/He 型基因枪 (Bio-Rad) 进行轰击, 轰击距离 6 cm, 真空度为 25 in.Hg。轰击后的洋葱表皮 25 $^{\circ}$ C 暗培养 24 h 后制片, 于激光共聚焦显微镜 (Leica TCS SP2) 下观察细胞中的荧光。将转化后的洋葱表皮用 20%蔗糖进行质壁分离处理后, 再分别用蓝光 (395 nm) 和紫外光激发成像, 选用 B (IF2490) 激发滤光器, 用 PM230 全自动显微照相装置拍照。

1.4 葡萄 *Vv-SPL9*、*Vv-SPL10* 基因及 miR156 的表达分析

分别提取葡萄成熟叶、幼叶、花蕾、花、小果、中果及大果等组织的总 RNA, 并分离 LMW RNA (张彦苹 等, 2010)。以反转录后的 cDNA 为模板, 用 Primer 3 Input (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 设计引物 P17/P18 和 P19/P20, 分别研究 *SPL9* 和 *SPL10* 在不同组织中的表达情况。内标基因利用葡萄 *UBI* (GenBank accession number: XM_002266714) 的特异性引物 P21/P22 进行测定。另以 5S (特异性引物 P23/P24) 为内标基因, 利用 P25/P26 检测 miR156 在相应组织中的积累情况。

2 结果与分析

2.1 葡萄 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 基因 cDNA 全长的电子克隆

根据拟南芥的 *SPL9* 基因序列 AT2G42200 和 *SPL10* 基因序列 AT1G27370, 经 BLAST 检索, 分别得到葡萄高相似的 EST 序列 EC934615 和 CB970427, 然后以此序列作为种子序列在葡萄 EST 数据库中再进行 BLAST 检索, 将检出的与种子序列同源性较高的或有部分重叠的 EST 序列 (EV239750、EC934615、EV241638、GR905745、EC989040、CF413649、DT039919 和 EC940210、EC926087、EE068129、EE067765、EE093085、DT022393、EE085683) 拼接组装为重叠群 (Contig), 再以此重叠群序列重复以上 BLAST 检索过程, 反复进行 EST 重叠群序列的拼接和比对, 尽可能获得葡萄 *SPL9* 和 *SPL10* 的 cDNA 全长。

2.2 葡萄 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 基因 cDNA 全长的获得

以葡萄幼叶 cDNA 为模板进行克隆与测序, 分别得到 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 基因的 3'末端(1 486 bp 和 1 656 bp) 和 5'末端 (502 bp 和 374 bp)。利用加入 *Sal* I 和 *Xba* I, *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点引物 P13/P14 和 P15/P16, 以葡萄幼叶 cDNA 为模板, 克隆得到长度为 1 137 bp 和 1 398 bp 的全长 ORF。对 3'端、5'端以及 ORF 全长拼接分别获得葡萄 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* cDNA 全长为 1 649 bp 和 1 709 bp, 分别有一个 1 134 bp 和 1 500 bp 完整的开放阅读框 (ORF), 163 bp 和 53 bp 的 5'非翻译区 (5' UTR), 352 bp 和 156 bp 的 3'非翻译区 (3' UTR) 以及 32 bp 和 28 bp 的 poly⁺ (A) 尾, 二者还均有相同的 *Vv-miR156a*(5'-UGACAGAAGAGAGGGAGCAC-3') 的识别靶序列位点(5'-GUGCU CUCUCUCUUCUGUCA-3'), 且两者之间仅存在 1 个碱基的错配, 符合 microRNA 与其靶位点序列互补错配少于 3 个碱基的原则, 进一步说明成功地从葡萄中分离得到了 *SPL9* 和 *SPL10* 的同源基因。

2.3 葡萄 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 氨基酸序列分析

由 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 的 ORF 区推导出它们分别编码 378 和 500 个氨基酸 (图 1), 将其氨基酸在 NCBI 的 BLASTp 进行相似性比较, 发现它们具有高度保守 SBP 结构域序列, 即含有 79 个保守的氨基酸, 内含两个锌指蛋白域和一个高度保守的双向核定位信号 KRXXXRRRK (Klein et al., 1996; Birkenbihl et al., 2005)。

A

```

1   CTTGCTTTGTTGCTTCACAACTGCTTTTGAACCCCCACTCTTCTATCGGTATCTGTTGCTTTTGTCACTCTTACACAAGTGTTC
91  CTTTCCCCTCTTTTCTATATCTTCGTGACCCACAAGAAAAATACCCATGAATGGACTCTAGGAGCGCCACAC
164 ATGGAAGGGGTTTCGAGCTCTTTGACCGTTTCCAGCTCTTCGGCCAACTCGTCTGAGTCGCTCAACGGGTGAAATTTGGGCAGAGATA
    M E R G S S S L T V S S S S A N S S E S L N G L K F G Q K I
254 TATTTGAAGATTGGGTGTTGAGCTCCGGCCAAATCGGGAACCGGTCTCTCTCTCTGCGCGGCTCCGGTGGTCCGCCACCT
    Y F E D L G V G A P A K S G T G S S S S A A G S G G R P P
344 CCGGCGCCACCAAGAAGGTAAAGAGGTAGTGGGTGTTTCAGGGAGGCCAACCCAGGTGTCAAGTTGAAGGTGTAAAGTAGATCTG
    P A P P K K V R G S G V V Q G G Q P P R C Q V E G C K V D L
434 AGTGATGCCAAAGCTTACTATTCAAGGCATAAAGTGTGTGATGCATTGCAAGTCTCCAACGGTCATTGTTGCGGGCCTTGAGCAGAGG
    S D A K A Y Y S R H K V C G M H S K S P T V I V A G L E Q R
524 TTTTGCCAGCAGTGTAGCAGATTTTCATCAGCTTGCCTGAAATTTGACCAAGGAAACGAAGTTGTCGTAGGCGCCTGGCTGGTCATAATGAG
    F C Q Q C S R F H Q L A E F D Q G K R S C R R R L A G H N E
614 CGTCGCAGGAAGCCACCACCTGGATCTTTATTGCTCTACGCTATGGCGGACTTTCTTCATCCATTTTGAACACAGCAGCAGGGTGGGA
    R R R K P P P G S L L S S R Y G R L S S S I F E N S S R V G
704 GGAGGCTTTCTGATGGACTTTGCTGCATACCAAGGCATCCCGAGAGGGATACTTGCCAACTACAAGAGCATCTGATCGGGTACCTGGA
    G G F L M D F A A Y P R H P E R D T W P T T R A S D R V P G
794 AATCAACCACTGCGATGGGAAGGTTTCTTCACATCCATGGCAGAGCAACTCTGAGAATCCTCTCTTTCTGCAAGGTTACAGAGCGGG
    N Q T T A M G R F L P H P W Q S N S E N P L F L Q G S A G G
884 ACCAGCTTTTCATGGTCTGGAATTCCTTCAGGAGAATGTTTCACAGGGGCTCCGACTCAAGCTGTGCTCTCTCTCTCTGTCAAATCAG
    T S F H G P G I P S G E C F T G A S D S S C A L S L L S N Q
974 CCATGGAGCTCCAGGAATCGAGCATCTGGTCTTGGAGCAAACAGCTTCATGAATCCTGAAGGGGCATCCATGGCGCAACCCACAGCTCCT
    P W S S R N R A S G L G A N S F M N P E G A S M A Q P T A P
1064 CATAGTCAGCTATCAATCACTTCCAAGCACCTCGTGGGATTTCAAGGGCAATGAAGGTAGTAGCAGTTCGAGGAGATGCCACCTGAT
    H S A A I N H F P S T S W D F K G N E G S S S S Q E M P P D
1154 CTTGGTCTTGGTCAAATTTACAGCCTATTAATAGCCAGTTCTCAGGTGGGGCGAGTTGCCCAACAGAGTGAAGGCAATACATGGAA
    L G L G Q I S Q P I N S Q F S G G G E L P Q Q S G R Q Y M E
1244 CTCGAGCACTCCAGGGCTTATGACTCTTCACTCAGCAGATGCACTGGTCACTTTAGGTGCCAATTTCCCATTTGGTTTGTATGAACACC
    L E H S R A Y D S S T Q Q M H W S L *
1334 TTAAACAGCTTTGGTTCAAAAAAGTACTTACGAATATCTTTCAGGGGGATACCTCCTGATCCCAATTTTGTAGGAGAAAAACCAATGG
1424 TTCATGATCATGTTTGTGCTGGGAAAAACCTAAATGGTCTTGATCTTTGTTTGTGAGACTTAAATGGGGGGTGATTTTGTGTTTGTCTGG
1514 GAGACCTTAATGGCTGTTATCTGTGCTTGGTTTGAGTTTCTCAATATTGAGAAGCAAAAAAAGCTTGTTAAATGTCTCTTAATAAGAT
1604 CATAAGACCTTTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

B

```

1      GCCTACAGACGGAAGATGCTGTTGAATTCTTTTCATGAGGTTTCTTCTGTG
54     ATGGAGTGGAATTTAAGAACTCCCTCAGAATGGGACTGGGAGACCCTAACAGCGTTTAATACTAGGGCTTTCGAATTTCTGGGCGGGTA
      M E W N L R T P S E W D W E T L T A F N T R A F E F P G R V
144    CAACTGTCAAACCATGATATTGAAGTAGATGGAGGGTGGATAATGGATCTGTATACTCATCTGGAGGTGGTGGCTTCTGCTTCTGAT
      Q L S N H D I E V D G G V D N G S V Y S S G G G G F S G S D
234    TTGGGTCATGGCTCTTCTCCAGGAGCTCCATCTCTGTTTCAGGTGATTCTTCGTTGAAAGAGGAATAAGAAATTTAGGAATGTTGAA
      L G H G S S S R S S I S V S G D S S L K E G I K K F R N V E
324    GATATTCATAAGATTTTAGTGAGAACAAAGAGTTGATAAGAGTGGGCGGTAGTGGAATTTGTCGACTGTAGGGACTTCTGATGGCTCT
      D I H K D F S E N K E L I R V G G S G N C P T V G T S D G S
414    GGTGAAGCAATGATTGGTTTAAACTGGGAAGCGGCTTACTTTGAAGATGTTTGTGCCGCTAGCACCCTAAACTACAACCTTCTTCT
      G E A M I G L K L G K R P Y F E D V C A A S T A K T T T S S
504    GTCAATCCTGCATCATCTGTTTCTGCAACAAAGCGATTAGAACATCTTATCAGAGTTCGCAACCCCTCGTTGCCAAGTTGAAGGATGC
      V N P A S S V S A T K R F R T S Y Q S S Q T P R C Q V E G Q
594    AACCTTGACCTCAAGTCAGCTAAGGATTACCATCGCAGGCATAGAATCTGTGAAAACCATTCAAAAGCCCAAGGTCATTGTAGCTGGT
      N L D L K S A K D Y H R R R H R I C E N H S K S P K V I V A G
684    TTGGAGCGCGGTTTTGTCAACAGTCAGCAGGTTCCATGAGTTGACAGAGTTTGATGACAAGAAGCGAAGTCGTCGTAGGCGCCTCAAT
      L E R R F C Q Q C S R F H E L T E F D D K K R S R R R R L N
774    GACCACAATGCACGGCGCCGAGGCCACATCCAGAGTCAATCCAATTTAGCTCTGGAAGGCTGCCTTCATCACTATATGATGGCAGACAG
      D H N A R R R R P H P E S I Q F S S G R L P S S L Y D G R Q
864    CAGATTAATCTTGCATGCAACAGGTTACCAATCCCTGTTGCAACTCCTATGTGGCAAAATCCATGCAGCTTAAAGACACCCAGACTGGA
      Q I N L A C N R L P I P V A T P M W Q N P C S F K D T Q T G
954    GGTCTTTGATTAGGCTGTAAAAGCAGTAGGCATTGATAAGCAGCTGCATTGCCCAGTATGAGATGCCGGATGCTATTCTATGCTA
      G S L I R P V K A V G I D K Q L H L P T D E M P D A I S M L
1044   CATGTTAACTCAGAGAGGATGTTGTCTTTTGATGGCAGTACCTCGGGTCCTTAACCAAGGTTAGAGGCATCTGCAATTGCTTCTAAT
      H V N S E R M L S F D G S T P R V L N Q G L E A S A I A S N
1134   TCAATGTAGCACCAGATTTCCGGCGTCTCTCTCTCTGCTCACTAATTTCTGGGTTTGAATGATCCTGGACCTACTTCTTTGGAC
      S N V A P D F R R A L S L L S T N S W G L N D P G P T S L D
1224   CAGCTCATGCATGTAAACCAATCCAGCATGGCCAGCCACGATGCATGTTGAACACACAATTGGGCTCTTGCTTCATCAGAAAAATATG
      Q L M H V N Q S S M A Q P T M H V E P H N W A L A S S E N M
1314   CACGTTCAACAAACACCTTCAGAGATTCGGGGACATTTCATTGGATTGCATAATAATGAAGCAGCATGTTCAAGAGTTCAATTATTTA
      H V Q Q T P S E I R G H S L D L H N N E A A C F K S F N Y L
1404   AAGCCCCTTATGAGTCTGGCTGTTTATCCCAATCAAATTAAGTGAACCAAGTTGCTTCCAGTGTCAAAAAGAACTGCAAAATAAG
      K P L M S L A V F I P I K L T E N Q V C F Q C Q K E L Q I K
1494   TGATGTCGTGTGATGCATTGGAGAAAGCAATAATGGGATTAGGATGCCTTTTGTCCATTGATCCAAAATATTTTCAATGTATAAT
      C S P C D A L E K A I M G I R M P F V H *
1584   GTGTGTTAGAAACAAGACAATGCACCTGCATTATGGTTGAATCCGTTTGTTCATGAAAAGTGAGTTTTTTCATGGCTTCTGCCGTCA
1674   TCTGTCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 1 *Vv-SPL9* (A) 和 *Vv-SPL10* (B) cDNA 全长与推导的氨基酸序列

灰色突出显示为 SBP 结构域; 方框为两个锌指蛋白域 Zn-1 和 Zn-2, 分别含有保守的半胱氨酸和组氨酸用波浪线表示;

粗线表示双向核定位信号 KRXXRRRK; 下划线是 microRNA156a 的识别位点。

Fig. 1 Nucleotide sequence of complete *Vv-SPL9* (A) and *Vv-SPL10* (B) cDNA and their deduced amino acids

SBP domain is Highlighted in gray; The two boxes stand for the two zinc finger protein domain Zn-1 and Zn-2 respectively, which containing conserved cysteine and histidine underlined; Wave line is bi-directional nuclear localization signal KRXXRRRK;

Underlined regions are the complementary sequences of *Vv-miR156a* recognition sites.

BLAST 结果显示葡萄 *Vv-SPL9* 与杨树 (XP_002322678) 的同源性较高, 达到了 66%, 与拟南芥 (AAK76681) 和玉米 (NP_001136945) 的同源性分别为 47%和 44%, 而葡萄 *Vv-SPL10* 与杨树 (XP_002304686) 的同源性较高, 为 50%, 与拟南芥 (CAB56577) 和玉米 (NP_001145727) 的同源性分别为 37%和 41%。用 DNAMAN 5.22 软件对葡萄 *Vv-SPL9* 氨基酸序列与杨树 (XP_002322678)、金鱼草 (CAB56570)、拟南芥 (AAK76681)、柑橘 (ACL51015)、苜蓿 (ABN08632)、蓖麻 (XP_002532343)、高粱 (XP_002444771)、玉米 (NP_001136945), 以及对葡萄 *Vv-SPL10* 氨基酸

序列与蓖麻 (XP_002514905)、玉米 (NP_001145727)、拟南芥 (CAB56577)、大豆 (ACU18328)、桉树 (BAH80551)、杨树 (XP_002304686)、水稻 (EAY84676)、小立碗藓 (ABM67305) 氨基酸序列进行分析 (图 2) 获得了类似结果: 葡萄 *Vv-SPL9* 与杨树同源基因关系较近, *Vv-SPL10* 则与玉米、水稻等的同源基因关系较近。以上结果表明不同植物中 *SPL9* 和 *SPL10* 的同源基因所编码氨基酸序列存在差异, 致使其功能也可能不同。

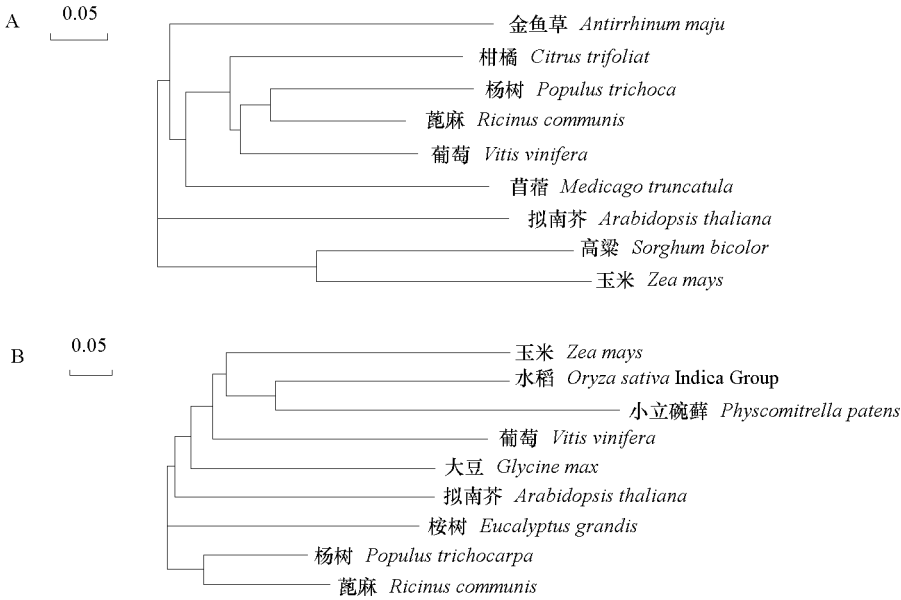


图 2 *Vv-SPL9* (A) 与 *Vv-SPL10* (B) 推导的序列与多种植物氨基酸系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the amino acid sequence of *Vv-SPL9* (A), *Vv-SPL10* (B) and their homologues in other plants

2.4 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* GFP 表达载体的构建与亚细胞定位

在融合基因表达载体构建完成后, 对载体目标区域进行测序验证, 插入片段与预期序列完全一致, 表明载体构建成功。为了确定相关基因表达的蛋白在细胞中发挥功能的具体部位, 构建了绿色荧光蛋白与基因的融合表达载体, 利用基因枪法将这两个基因 ORF 分别插入到 35S 启动子和绿色荧光蛋白基因之间形成融合蛋白 (GFP) 基因, 转化到洋葱表皮细胞中, 获得高效瞬时表达, 绿色荧光蛋白在 475 nm 蓝光激发下产生 509 nm 的绿色荧光。由图 3 可以看出两者都仅在核内产生绿色荧光, 即表明 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 均具有核定位功能。

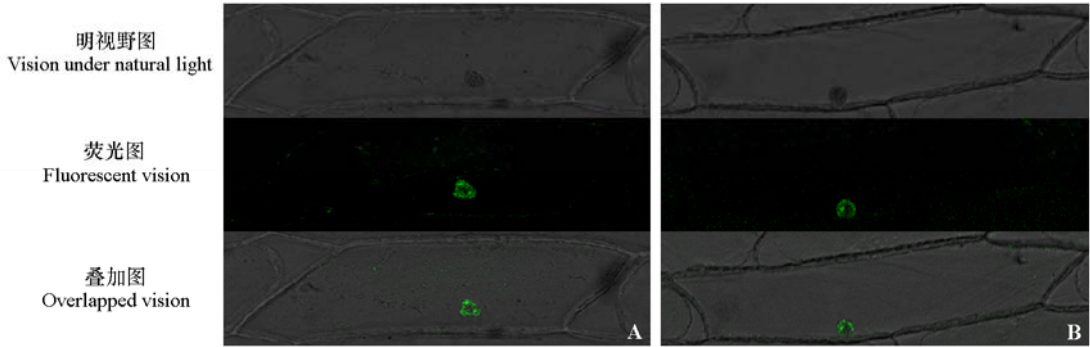


图 3 *Vv-SPL9* (A) 与 *Vv-SPL10* (B) 融合蛋白在洋葱表皮细胞中的定位

Fig. 3 Subcellular localization of *Vv-SPL9* (A) and *Vv-SPL10* (B) proteins in onion epidermal cells

2.5 *Vv-SPL9*、*Vv-SPL10* 及 *miR156* 在葡萄不同组织中的表达分析

半定量和荧光定量 RT-PCR 检测结果 (图 4) 基本一致, *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 在不同组织间均有表达, 但表达水平存在较大差异。两者均在小果中的表达量较高, 在中果及大果中表达量渐弱。*Vv-SPL9* 除在果中表达量高外, 在幼叶中也有较高表达, 在花蕾中的表达较低。*Vv-SPL10* 在幼叶与花蕾中的表达量差异不大, 而在成熟叶中表达很低, 这就说明 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 可能参与葡萄营养器官与生殖器官的发育, 其中与葡萄果实的生长发育关系尤为密切。

鉴于二者均含有 *Vv-miR156a* 的识别靶序列位点的特点, 为探讨 *miR156* 是否参与了这两个基因表达, 本研究应用荧光定量 PCR 方法检测了 *miR156* 在各个组织中的积累水平。研究结果发现, *Vv-miR156* 在小果中的积累水平最低, 花蕾及花次之, 在幼叶中的积累量较多, 且 *Vv-miR156* 与这两个候选靶基因的表达存在一定的消长关系, 而以小果中的情况最为明显。由此可以推测 *miR156* 可能调控这两个基因的表达, 并且其调控作用的发生可能具有一定的时空性。

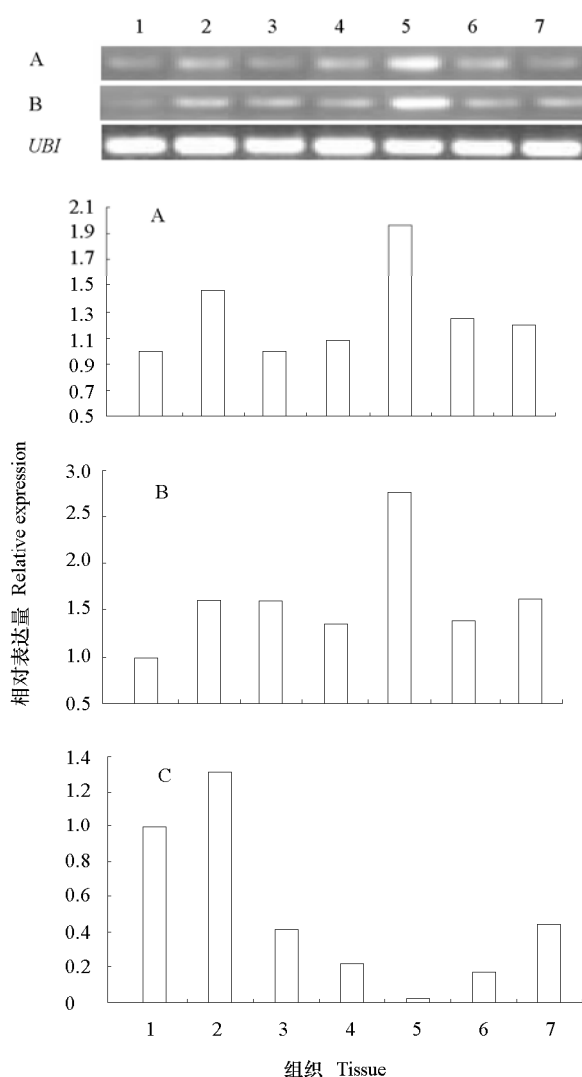


图 4 *Vv-SPL9* (A)、*Vv-SPL10* (B) 和 *miR156* (C) 在不同组织中的表达

1~7 分别是成熟叶、幼叶、花蕾、花、小果、中果、大果样品。

Fig. 4 Expression of *Vv-SPL9* (A), *Vv-SPL10* (B) and *miR156* (C) in different tissues of grapevine

1. Mature leaf; 2. Young leaf; 3. Flower bud; 4. Flower; 5. Small fruit; 6. Middle size fruit; 7. Large size fruit.

3 讨论

拟南芥转录因子数据库 DATF 中部分为植物特异转录因子家族, 至今只在植物中发现。SBP 基因家族就是一个植物特异转录因子家族, 首先是在金鱼草中发现的, 之后在拟南芥和苔藓上发现多个 SBP 转录因子基因拷贝 (Cardon et al., 1999; Riese et al., 2007), 它们都具有 DNA 结合结构域的保守核苷酸序列, 即 SBP 结构域 (SBP-domain), 含 79 个氨基酸残基。Yamasaki 等 (2004) 发现该类基因均含两个锌指结构 (Zinc finger), 可能为双向核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) (Birkenbihl et al., 2005)。本研究从葡萄幼叶的 cDNA 中成功分离出 *SPL9* 和 *SPL10* 的同源基因 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10*, 由测序结果看出两个基因编码的蛋白质均具有 SBP 转录因子的典型特征, 即含有保守性很高的两个识别并结合 DNA 顺式作用元件的花分生组织启动子 SBP 结构域、两个锌指蛋白域 Zn-1 和 Zn-2, 分别含有保守的半胱氨酸和组氨酸和一段双向核定位序列 KRXXXRRRK (Klein et al., 1996; Birkenbihl et al., 2005), 并且具有 Vv-miR156a 识别位点, 这与拟南芥上相关研究相一致, 其表达在一定程度上受 microRNA 调控。本研究通过构建 35S-GW-GFP-HM018600/HM018601-GFP 的融合表达载体, 利用基因枪转化法将重组载体转入洋葱内表皮进行亚细胞定位, 结果表明其表达的蛋白定位于细胞核中, 说明 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 的编码产物亦为转录因子, 具有核定位功能。

对拟南芥的研究证明, 所有的 *SPL* 基因在生长发育和形态建成过程中起调控作用 (Yang et al., 2008; Wang et al., 2008, 2009; Wu et al., 2009)。除拟南芥外, SBP 转录因子促进花和果实发育在白桦、西红柿上也有报道 (Länneppää et al., 2004; Manning et al., 2006)。本试验半定量及荧光定量研究结果证明 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 在葡萄花器官形成、果实发育等生长发育阶段都具有一定表达, 其中在小果表达量最高, 说明其与小果的发育联系最为密切。Vv-miR156a 积累水平的研究表明其在葡萄各个组织中也存在着一定差异, 在小果中积累水平最低。结合 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 的表达情况, 发现其与这两个基因在葡萄不同组织的表达存在一定的消长关系, 可以推测 miR156 可能调控这两个基因的表达, 并且是以调控靶基因降解或抑制靶基因翻译的方式起作用, 该调控具有一定的时空性。

为了更好地认识 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 的功能, 将利用已经构建的 *Vv-SPL9* 和 *Vv-SPL10* 正义和反义表达载体转化葡萄开展进一步的功能研究。

References

- Birkenbihl R P, Jach G, Saedler H, Huijser P. 2005. Functional dissection of the plant SBP-domain: Overlap of the DNA binding and nuclear localization domains. *Mol Biol*, 352: 585 - 596.
- Cao Xue, Shanguan Ling-fei, Yu Hua-ping, Yang Guang, Wang Chen, Tan Hong-hua, Fang Jing-gui. 2010. Bioinformatics analysis of the SBP gene family in grapevine. *Genomics and Applied Biology*, 29 (4): 791 - 798. (in Chinese)
- 曹 雪, 上官凌飞, 于华平, 杨 光, 王 晨, 谭洪花, 房经贵. 2010. 葡萄SBP基因家族生物信息学分析. *基因组学与应用生物学*, 29 (4): 791 - 798.
- Cardon G H, Hohmann S, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P. 1997. Functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* SBP-box gene *SPL3*: A novel gene involved in the floral transition. *Plant J*, 12: 367 - 377.
- Cardon G H, Hohmann S, Klein J, Nettesheim K, Saedler H, Huijser P. 1999. Molecular characterisation of the *Arabidopsis* SBP-box genes. *Gene*, 237 (1): 91 - 104.
- Cheng He-he, Wu Ya-qin, Zhao Yan-hua. 2009. Research advance on seedless genes of grape. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 13 (10): 61 - 63, 66. (in Chinese)

- 程和禾, 吴雅琴, 赵艳华. 2009. 葡萄无核基因的研究进展. 河北农业科学, 13 (10): 61 - 63, 66.
- Debouck C. 1995. Differential display or differential dismay? Current Opinion Biotechnology, 6: 97 - 99.
- Eriksson M, Moseley J L, Tottey S, Del Campo J A, Quinn J, Kim Y, Merchant S. 2004. Genetic dissection of nutritional copper signaling in *chlamydomonas* distinguishes regulatory and target genes. Genetics, 168: 795 - 807.
- Fang Jing-gui, Liu Hong, Yang Guang. 2008. The star grape wine cultivar in genomic sequencing era — Pinot Noir. Sino-overseas Grapevine & Wine, 3: 57 - 59. (in Chinese)
- 房经贵, 刘 洪, 杨 光. 2008. 基因组学研究时代的葡萄酿造明星——黑比诺. 中外葡萄与葡萄酒, 3: 57 - 59.
- Fu H, Tie Y, Xu C, Zhang Z, Zhu J, Shi Y, Jiang H, Sun Z, Zheng X. 2005. Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. FEBS Letters, 579: 3849 - 3854.
- Gandikota M, Birkenbihl R P, Hohmann S, Cardon G H, Saedler H, Huijser P. 2007. The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the *Arabidopsis* SBP box gene *SPL3* prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. Plant J, 49: 683 - 693.
- Jaillon O, Aury J M, Noel B. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature, 449: 463 - 467.
- Klein J, Saedler H, Huijser P. 1996. A new family of DNA binding proteins includes putative transcriptional regulators of the *Antirrhinum majus* floral meristem identity gene *SQUAMOSA*. Mol Gen Genet, 250: 7 - 16.
- Lännenpää M, Jänönen I, Hölttä-Vuori M, Gardemeister M, Porali I, Sopanen T. 2004. A new SBP-box gene *BpSPL1* in silver birch (*Betula pendula*). Physiol Plant, 120: 491 - 500.
- Lin Zhi-ping, An Li-jia, Hou He-sheng. 2006. The structure and function of AP2/EREBP transcription factors. Chinese Agricultural Science Bulletin, 22 (2): 33 - 38. (in Chinese)
- 林志萍, 安利佳, 侯和胜. 2006. AP2/EREBP转录因子的结构与功能. 中国农学通报, 22 (2): 33 - 38.
- Manning K, Tor M, Poole M, Hong Y, Thompson, A J, King, G J, Giovannoni J J, Seymour G B. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. Nat Genet, 38: 948 - 952.
- Muruganantham M, Moskovitz Y, Haviv S, Horesh T, Fenigstein A, Preez J D, Stephan D, Burger J T, Mawassi M. 2009. Grapevine virus, a-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera*. Journal of Virological Methods, 155: 167 - 174.
- Moreno M A, Harper L C, Krueger R W, Dellaporta S L, Freeling M. 1997. *liguleless1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis. Genes Dev, 11: 616 - 628.
- Rhoades M W, Reinhart B J, Lim L P, Burge C B, Bartel B, Bartel D P. 2002. Prediction of plant microRNA targets. Cell, 110: 513 - 520.
- Riechmann J L, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe O J, Samaha R R, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang J Z, Ghandehari D, Sherman B K, Yu G. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science, 290 (5499): 2105 - 2110.
- Riese M, Hohmann S, Saedler H, Munster T, Huijser P. 2007. Comparative analysis of the SBP-box gene families in P-patens and seed plants. Gene, 401 (1-2): 28 - 37.
- Schellenbaum P, Jacques A, Maillot P, Bertsch C, Mazet F, Farine S, Walter B. 2008. Characterization of *VvSERK1*, *VvSERK2*, *VvSERK3* and *VvLIL* genes and their expression during somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell Rep, 27: 1799 - 1809.
- Schwab R, Palatnik J F, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D. 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. Dev Cell, 8: 517 - 527.
- Schwarz S, Grande A V, Bujdoso N, Saedler H, Huijser P. 2008. The microRNA regulated SBP-box genes *SPL9* and *SPL15* control shoot maturation in *Arabidopsis*. Plant Mol Biol, 67: 183 - 195.
- Shi R, Chiang V L. 2005. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. Biotechniques, 39: 519 - 525.
- Song Chang-nian, Fang Jing-gui, Wang Chen, Shangguan Ling-fei, Zhang Zhen. 2009. Cloning and expression analysis of *APETALA2* gene from *Poncirus trifoliata* based on EST database. Acta Horticulturae Sinica, 36 (6): 799 - 806. (in Chinese)
- 宋长年, 房经贵, 王 晨, 上官凌飞, 章 镇. 2009. 基于 EST 库的枳 *APETALA2* 基因 cDNA 克隆及其表达分析. 园艺学报, 36 (6): 799 - 806.
- Stone J M, Liang X, Neel E R, Stiers J J. 2005. *Arabidopsis* at *SPL14*, a plant-specific SBP-domain transcription factor, participates in plant

- development and sensitivity to fumonisin B1. *Plant J*, 41: 744 – 754.
- Unte U S, Sorensen A M, Pesaresi P, Gandikota M, Leister D, Saedler H, Huijser P. 2003. *SPL8*, an SBP-box gene that affects pollen sac development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 1009 – 1019.
- Wang Chen, Liu Hong, Fang Jing-gui, Song Chang-nian, Cao Xue, Yang Guang, Zhang Zhen. 2010. Cloning and expression analysis of *APETALA2* gene from grapevine (*Vitis vinifera*) based on EST database. *Journal of Fruit Science*, (2): 207 – 212. (in Chinese)
- 王 晨, 刘 洪, 房经贵, 宋长年, 曹 雪, 杨 光, 章 镇. 2010. 基于EST数据库的葡萄(*Vitis vinifera*)*APETALA2*基因cDNA克隆及其表达分析. *果树学报*, (2): 207 – 212.
- Wang H, Nussbaum-Wagler T, Li B, Zhao Q, Vigouroux Y, Faller M, Bomblies K, Lukens L, Doebley J F. 2005. The origin of the naked grains of maize. *Nature*, 436: 714 – 719.
- Wang J W, Czech B, Weigel D. 2009. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138: 738 – 749.
- Wang J W, Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D. 2008. Dual effects of miR156-targeted *SPL* genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 20: 1231 – 1243.
- Wang Yan-shu, Li Chun-li, Jia Hai-feng, Qin Ling, Gao Dong-sheng, Shen Yuan-yue. 2010. Studies on transcriptional level of *VvNCED1* and *VvBG1*, two key genes related to ABA accumulation around the veraison of grape berry ripening. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (5): 801 – 804. (in Chinese)
- 王延书, 李春丽, 贾海峰, 秦 岭, 高东升, 沈元月. 2010. 葡萄果实始熟前后 ABA 积累关键酶基因 *VvNCED1* 和 *VvBG1* 转录水平的研究. *园艺学报*, 37 (5): 801 – 804.
- Wu G, Park M Y, Conway S R, Wang J W, Weigel D, Poethig R S. 2009. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138: 625 – 627.
- Wu G, Poethig R S. 2006. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target *SPL3*. *Development*, 133: 3539 – 3547.
- Xu Shu-ping, Wei Zhi-ming. 1998. Introduction to method of microprojectile bombardment and its application. *Plant Physiology Communications*, 34 (1): 41 – 43. (in Chinese)
- 徐淑平, 卫志明. 1998. 基因枪的使用方法介绍. *植物生理学通讯*, 34 (1): 41 – 43.
- Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Matsuda T, Nunokawa E, Ishizuka Y, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, Yokoyama S. 2004. A novel zinc-binding motif revealed by solution structures of DNA-binding domains of *Arabidopsis* SBP-family transcription factors. *J Mol. Biol.*, 337: 49 – 63.
- Yang Guang, Cao Xue, Fang Jing-gui, Song Chang-nian, Tao Jian-min, Wang Chen, Chu Jian-qing. 2010. Characterization of seven important genes involved in grapevine flower development. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 22 (2): 49 – 52. (in Chinese)
- 杨 光, 曹 雪, 房经贵, 宋长年, 陶建敏, 王 晨, 初建青. 2010. 葡萄七个重要花发育相关基因序列特征的分析. *江西农业学报*, 22 (2): 49 – 52.
- Yang J H, Fang Z M, Yu J Q. 2008. Relationship between cytoplasmic male sterility and *SPL-like* gene expression in stem mustard. *Physiologia Plantarum*, 133: 426 – 434.
- Zhang Yan-ping, Wang Chen, Yu Hua-ping, Cai Bin-hua, Fang Jing-gui. 2010. Screening of RNA extraction methods for various grapevine organs and tissues. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 19 (11): 135 – 140. (in Chinese)
- 张彦苹, 王 晨, 于华平, 蔡斌华, 房经贵. 2010. 适于葡萄不同组织RNA提取方法的筛选. *西北农业学报*, 19 (11): 135 – 140.
- Zhang Y, Schwarz S, Saedler H, Huijser P. 2007. *SPL8*, a local regulator in a subset of gibberellin-mediated developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 63: 429 – 439.
- Zhou Jun, Yao Quan-hong, Peng Ri-he, Xiong Ai-sheng, Cai Bin, XU Jin-tao, Jin Xiao-fen, Tao Jian-min, Zhang Zhen. 2009. Cloning and expression analysis of CHI of Kyoho grape by semi-quantity RT-PCR. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 29 (9): 1723 – 1729. (in Chinese)
- 周 军, 姚泉洪, 彭日荷, 熊爱生, 蔡 斌, 徐锦涛, 金晓芬, 陶建敏, 章 镇. 2009. 巨峰葡萄查尔酮异构酶基因克隆及表达分析. *西北植物学报*, 29 (9): 1723 – 1729.