

‘藤稔’葡萄 *VvGAI* 基因的克隆、亚细胞定位及时空表达分析

杨光^{1,2}, 曹雪¹, 房经贵^{1,*}, 宋长年¹, 王晨¹, 王西成¹

(¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²黑龙江省农业科学院浆果研究所, 黑龙江绥化 152204)

摘要: 以‘藤稔’葡萄 (*Vitis vinifera* × *V. labrusca* ‘Fujiminori’) 的茎、叶、花和果为试材, 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆获得 1 个推测为葡萄赤霉素响应因子 *VvGAI* 基因的 cDNA 序列, 全长 2 295 bp, 其编码 590 个氨基酸。该基因在 GenBank 基因数据库的登录号为 HQ834311。序列分析表明: *VvGAI* 与杨树、拟南芥、水稻的同源基因的氨基酸序列相似性分别为 68.56%、62.79% 和 54.16%。半定量与定量 PCR 结果都表明, *VvGAI* 在葡萄茎尖、叶、花和果等营养与生殖器官中均有表达, 但在茎尖中的表达最高, 是一个与快速生长和分裂关系密切的基因。50 mg · L⁻¹ 赤霉素处理后, 各阶段果实中 *VvGAI* 表达量趋势与对照基本一致, 但水平低于对照, 其中幼果中表达量最高。洋葱表皮细胞的瞬时表达显示, *VvGAI* 蛋白定位于细胞核。

关键词: 葡萄; *VvGAI*; 克隆; 表达; 亚细胞定位

中图分类号: S 663.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 10-1883-10

Cloning, Subcellular Localization and Spatiotemporal Expression of a *VvGAI* Gene from Grapevine ‘Fujiminori’

YANG Guang^{1,2}, CAO Xue¹, FANG Jing-gui^{1,*}, SONG Chang-nian¹, WANG Chen¹, and WANG Xi-cheng¹

(¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Berries Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Suiling, Heilongjiang 152204, China)

Abstract: Full length cDNA sequence of potential GA response factor gene (*VvGAI*) was cloned from grapevine ‘Fujiminori’ (*Vitis vinifera* × *V. labrusca*) using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). The sequence has been deposited in GenBank database with the accession number of HQ834311. Sequence analysis showed that the nucleotide sequence of this gene is 2 295 bp, containing a complete open reading frame that encodes 590 amino acids. Amino acid sequence analysis revealed that this potential *VvGAI* shared relatively high identity with the orthologs from *Populus trichocarpa* (68.56%), *Arabidopsis thaliana* (62.79%), *Oryza sativa* Indica Group (54.16%). Semi-quantitative RT-PCR and fluorescent quantitative PCR analysis showed that *VvGAI* was expressed ubiquitously in vegetative and reproductive organs, such as shoot, leaf, flower and fruit. However, it was expressed the

收稿日期: 2011-05-25; 修回日期: 2011-09-14

基金项目: 江苏省农业科技支撑项目 (BE2010326)

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

highest in shoot, which suggested that *VvGAI* could be a gene related to the rapid growth and division. Its expression in the developing fruits from treated inflorescence with GA solution was lower than that of the control, about which the highest expression level was shown in young fruits. Subcellular localization assays showed that the *VvGAI* protein appeared in the nucleus.

Key words: grapevine; *VvGAI*; cloning; expression; subcellular localization

赤霉素 (GA) 是调节植物生长发育的五大激素之一, 其主要功能是促进细胞分裂、伸长, 诱导开花, 打破休眠, 促进雄花分化等 (王忠, 2000; 徐增达, 2006)。有关 GA 对植物生长发育的作用机理一直是人们研究的重要内容。

对于 GA 信号传递过程中作为植物生长负调控因子的 DELLA 蛋白家族的研究也相继在拟南芥、水稻等重要植物中开展。在拟南芥基因组中, 共有 5 个高度同源的 DELLA 蛋白抑制子, 包括: GA Insensitive (*GAI*)、Repressor of *gal-3* (*RGA*)、*RGL1* (*RGA-like 1*)、*RGL2* 和 *RGL3*。*GAI* 和 *RGA* 在抑制植物延伸生长时具有功能重叠的现象 (Willige et al., 2007), *RGL1* (*RGA-like 1*) 和 *RGL2* 分别在控制植物发芽和花发育中起着重要作用 (Peng et al., 1997)。所有的 DELLA 蛋白可以通过泛素降解系统被降解而不能对 GA 反应进行抑制 (Silverstone et al., 2001)。根据蛋白结构特点, *GAI*、*RGA* 蛋白家族属于植物特有的 GRAS (指 *GAI*, *RGA*, *SCARECROW*) 蛋白家族中的一个亚族 (Pysh et al., 1999)。它们有 GRAS 家族成员都具有的高度保守的中心区 VHID、C 末端的 RVER 结构和 N 端的 DELLA 区域, GA 信号转导途径是通过 DELLA 蛋白来抑制的。所有的 DELLA 蛋白具有以下特征: 在 N 端有高度保守的 DELLA 结构域和 TVHYNP 结构域, 中部有一个核定位信号结构域 (NLS), 在 C 端有类似 SH2 结构域、RVER 和 SAW 结构域。相关研究表明 DELLA 与 TVHYNP 结构可能是 GA 信号感知结构域, C 端的 VHID、SH2 和 SAW 等结构可能是阻遏结构域 (Itoh et al., 2002)。

葡萄是世界性的重要水果, 当前, 其总产量和总面积仅次于柑橘, 居第二位。赤霉素不仅是影响果树生长发育的重要内源激素, 而且也是果树生产中用于无核化生产、促进果实发育、疏花疏果等的重要外源生长调节剂。

葡萄无核化生产一直是葡萄生产的重要内容, 生产上获得无核葡萄的途径, 一是选用无核品种, 二是利用植物生长调节剂对有核品种进行无核化处理, 促进形成无核果实。在利用植物生长调节剂诱导有核品种进行葡萄无核生产实践中, 赤霉素是目前应用最广泛与最成功的生长调节剂之一。认识赤霉素在葡萄单性结实中作用的分子机理对于更科学地调控葡萄果实的发育提供理论依据。鉴于 *GAI* 在 GA 信号转导、植物生长发育以及在激素相互关系中的作用, 本研究中以 ‘藤稔’ 葡萄为试材对葡萄 *GAI* 基因 (*VvGAI*) 的序列特征以及时空表达情况进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验于 2010 年 6 月在南京农业大学江浦试验基地进行。品种为 6 年生 ‘藤稔’ 葡萄。

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。PowerScript IITM 反转录酶购自 Clontech 公司, DNase 酶 I、Ex-Taq 酶、pMD18-T simple 载体、dNTP、DNA Marker、*Bam*H I、*Sal* I 购自 TaKaRa 公司, 荧光定量染料 SYBR Green I 购自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司, *T*₄ DNA 连接酶购自 Promega

公司, DNA 回收试剂盒、DL 2000 Plus DNA Marker 为北京全式金生物技术有限公司生产。各种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 方法

1.2.1 赤霉素处理花穗与果穗

选择长势相近的植株的花穗作为材料。参照已有研究报道 (刘捷 等, 2008), 采用 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA_3 处理, 清水为对照。分两次处理, 每次处理 10 个花穗或果穗。第 1 次处理在盛花期将花序在赤霉素溶液中浸 5 s, 花后第 2 天分别采取处理和对照的幼果。第 2 次处理在盛花后两周将果穗在药液中浸 5 s, 处理后第 2 天采取中果, 在果实不再膨大时 (谢花后 1 个月) 采取大果。

1.2.2 RNA 提取纯化与 cDNA 合成

‘藤稔’葡萄各组织总 RNA 的提取采用 CTAB 法 (Chang et al., 1993; 张彦苹 等, 2010), 用 DNase I 酶 (RNase free) 消化和氯仿抽提, mRNA 的纯化采用 Promega 公司生产的 PloyA Ttract[®] mRNA Isolation System IV 试剂盒进行。

以 mRNA 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°C 保温 1 h, 75°C 保温 10 min, 冰上冷却 2 min 后, -20°C 保存备用。

1.2.3 基因 ORF 区与基因 3'和 5'末端 PCR 扩增

以 cDNA 为模板, 用引物 P07/P08 进行 PCR 扩增, 反应体系为 $50 \mu\text{L}$: 引物 P07/P08 各 $2 \mu\text{L}$, Ex-*Taq* 酶 $0.50 \mu\text{L}$, $10 \times \text{PCR buffer (Mg}^{2+}\text{plus)}$ $5 \mu\text{L}$, dNTP Mixture $4 \mu\text{L}$, cDNA $2 \mu\text{L}$, 反应参数: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 40 s, 65°C 退火 40 s, 72°C 延伸 2 min, 35 个循环后 72°C 继续延伸 10 min, 4°C 下保存。琼脂糖凝胶电泳检测后用 DNA 回收试剂盒回收目标片段进行 T/A 克隆, DNA 测序由上海美季生物技术有限公司完成 (下同)。

以 cDNA 为模板, 用引物 P03/P04 进行 PCR 扩增获得基因的 3'末端 (3'UTR 区)。反应体系为 $50 \mu\text{L}$: Ex-*Taq* 酶 $0.50 \mu\text{L}$, $10 \times \text{PCR buffer (Mg}^{2+}\text{plus)}$ $5 \mu\text{L}$, dNTP Mixture $4 \mu\text{L}$, cDNA $2 \mu\text{L}$, 引物 P03/P04 各 $2 \mu\text{L}$, 反应参数为 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 40 s, 68°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环后 72°C 继续延伸 10 min, 4°C 下保存。

用电子克隆获得基因的 5'末端 (5'UTR 区), 再根据电子克隆的序列, 设计特异引物 P05/P06, 以 cDNA 为模板进行 5'末端扩增, 反应体系为 $50 \mu\text{L}$: Ex-*Taq* 酶 $0.50 \mu\text{L}$, $10 \times \text{PCR buffer (Mg}^{2+}\text{plus)}$ $5 \mu\text{L}$, dNTP Mixture $4 \mu\text{L}$, cDNA $2 \mu\text{L}$, 引物 P05/P06 各 $2 \mu\text{L}$, 反应参数为 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 68°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 35 个循环后 72°C 继续延伸 10 min, 4°C 下保存。

1.2.4 生物信息学分析

利用 DNAMAN5.22 软件对 *VvGAI* 的 ORF、3'末端、5'末端序列进行拼接分析; 该基因的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>) 与葡萄、水稻、玉米、杨树、蓖麻、苹果、拟南芥、大豆、棉花的相应序列进行相似性分析。

1.2.5 *VvGAI* 亚细胞定位载体的构建

以 *VvGAI* 基因的 ORF 正确的克隆提取质粒, 经 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切, 同时 pJIT166-GFP 质粒也用 *Sal* I 和 *Bam* H I 双酶切, 分别回收小片段和大片段, 用 T_4 DNA 连接酶连接, 从而得到 pJIT166-GFP/*VvGAI* 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。

1.2.6 基因枪轰击洋葱表皮

微粒子子弹的制备: DNA 的钨粉包埋按照 Biolistic PDS-1000/ He Particle Delivery System 的方法 (Xu & Wei, 1998), 取钨粉悬液 $50 \mu\text{L}$ ($50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加入 $50 \mu\text{L}$ 的 CaCl_2 ($2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $20 \mu\text{L}$

亚精胺 ($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)， $5 \mu\text{g}$ 的 35S-GFP/VvGAI 载体质粒充分混匀， $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 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 $50 \mu\text{L}$ 无水乙醇中。

轰击受体材料：将幼嫩的洋葱表皮摆放在 MS 高渗培养基上， $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预培养 4 h ，选用 $1\,100 \text{ psi}$ 的压力膜，将 $20 \mu\text{L}$ 钨粉 DNA 混合物点在轰击膜中央，洋葱表皮（约 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的小块）放在 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 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 $25 \text{ in} \cdot \text{Hg}$ 。轰击后的洋葱表皮细胞经 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。

1.2.7 葡萄 VvGAI 基因的表达分析

荧光定量 PCR（real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR）参照已有研究报道（王晨 等，2010），为确保定量 PCR 的特异性，根据得到的 VvGAI 基因序列，考虑其同源性和保守性在基因的 3'非翻译区（3'UTR）设计下游引物，在 ORF 内靠近 3'端设计上游引物；葡萄看家基因 *UBQ* 为内参进行定量 PCR。应用 Bio-Rad iCycler i Q 实时定量 PCR 仪，使用 SYBR Green I（Toyobo）试剂以茎尖、幼果、中果、大果、幼叶、老叶的 cDNA 作为模板，应用设计的引物进行 PCR 扩增，以葡萄中的 *UBQ* 基因为内参，采用荧光定量 PCR 与半定量 RT-PCR 法对 VvGAI 基因进行器官特异性表达分析。扩增体系含 $1 \mu\text{L}$ cDNA，上下游引物 P11/P12 各 $0.8 \mu\text{L}$ ， $10 \mu\text{L}$ 反应 MIX， $7.4 \mu\text{L}$ ddH₂O，总体积 $20 \mu\text{L}$ 。反应程序为 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min ， $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s ， $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s ， $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s ，40 个循环；反应结束后分析荧光值变化曲线以及融解曲线。试验 3 次重复，试验数据用 LinRegPCR（Ramakers et al., 2003）和 Excel 软件分析。

表 1 引物序列及用途
Table 1 Sequence of primers and application

编号 Code	序列 (5'-3') Sequence	用途 Use
P01	GCAGGACTGCAGCTGACTGACTACT ₃₀ VN	cDNA 合成
P02	GACCACTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG	cDNA synthesis
P03	AGGAGAACAATGGGTGTCTGATGCT	扩增 VvGAI 基因 3'端
P04	GCAGGACTGCAGCTGACTGACTAC	3'-end amplification
P05	AGACCCCTTTGGGTTCGAGACCC	扩增 VvGAI 基因 5'端
P06	CGGCATCCACATCTTACCCT	5'-end amplification
P07	<u>GTCGAC</u> ATGAAGAGGGAGTATCATCATCCTCATCAC	VvGAI 基因 ORF 扩增
P08	<u>GGATCC</u> TCAGTTGGAGGCAGGTGTGGAGGAG	Complete ORF amplification
P09	CAGCCTTCTGGTAAACATAGGTGAG	扩增 UBQ
P10	AGGAGTGTCCGAATGCTGAGTG	UBQ amplification
P11	AGGAGAACAATGGGTGTCTGATGCT	定量 RT-PCR
P12	TGGTCACAAGGCACGGTCATACAAG	Quantitative RT-PCR

注：下划线为添加的酶切位点：GTCGAC（*Sal* I），GGATCC（*Bam* H I）。

Note: GTCGAC and GGATCC underlined in primers indicate restriction enzyme sites of *Sal* I and *Bam* H I.

2 结果与分析

2.1 葡萄 VvGAI 基因 cDNA 全长的获得

根据 GenBank 数据库中登录的 VvGAI 基因序列（序列号 AF378125）设计特异引物，以‘藤稔’葡萄各组织混合 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，获得该基因的 ORF。在获得的 ORF 内设计上游引物 P03 与下游引物 P04 扩增获得 VvGAI 的 3'末端，包含 3'UTR 区和 Poly A 结构。根据电子克隆的序列设计特异引物 P05/P06，并用特异 PCR 扩增，经克隆测序获得该基因的 5'末端，对 3'端、5'端以及 ORF 全长拼接获得 VvGAI 的 cDNA 全长为 $2\,295 \text{ bp}$ （图 1）。VvGAI 的全长序列包括长度为 $1\,773 \text{ bp}$

2.2 葡萄 *VvGAI* 的 ORF 区及其氨基酸序列与分析

由 *VvGAI* 基因 cDNA 的 ORF 区推导共编码 590 个氨基酸。利用 GenBank 数据库提供的保守结构域数据库对其氨基酸序列进行比对分析发现, 该基因属于 GRAS 家族基因 (图 2), 具有保守的 GRAS 结构域。

VvGAI 编码的氨基酸序列与其它植物的 *GAI* 氨基酸序列均有高度保守的序列, 即 DELLA 结构域与 VHYNP 结构域, 它们对感知 GA 信号是必需的 (Dill & Sum, 2001)。用 DNAMAN5.22 软件对葡萄 *VvGAI* 氨基酸序列与 GenBank 数据库中葡萄 *VvGAI*、水稻 *GAI*、玉米 *D8*、杨树 *GAI/RGA1*、蓖麻 *GAI-P-B*、苹果 *L1a*、拟南芥 *RGAI*、大豆 *GAI1*、棉花 *GAI* 的相应序列进行同源性比较, 结果表明: ‘藤稔’葡萄 *VvGAI* 氨基酸序列与 GenBank 数据库中 ‘Pinot Meunier’ 葡萄 *VvGAI*、蓖麻、棉花、杨树的 *GAI* 的同源性较高, 分别为 99%、68.98%、68.64%和 68.56%, 与苹果、拟南芥、大豆的同源性为 63.97%、62.79%、63.41%, 与水稻、玉米的同源性为 54.16%、48.12%。这些 *GAI* 同源基因氨基酸序列同源性的不同表明它们在功能上可能存在着一一定的差异。

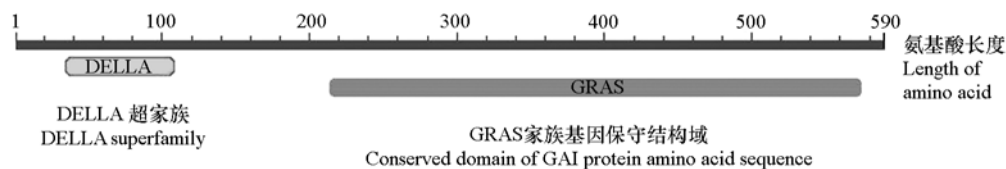


图 2 NCBI 上葡萄 *GAI* 蛋白氨基酸序列的保守结构域检索

Fig. 2 Search for conserved domain of *GAI* protein amino acid sequence of *Vitis vinifera* by NCBI

上述植物的 *GAI* 氨基酸序列的系统树 (图 3) 分析也显示了相似的结果: 葡萄 *VvGAI* 氨基酸序列与蓖麻、杨树的 *GAI* 的进化关系较近, 与水稻、玉米等的亲缘关系较远。

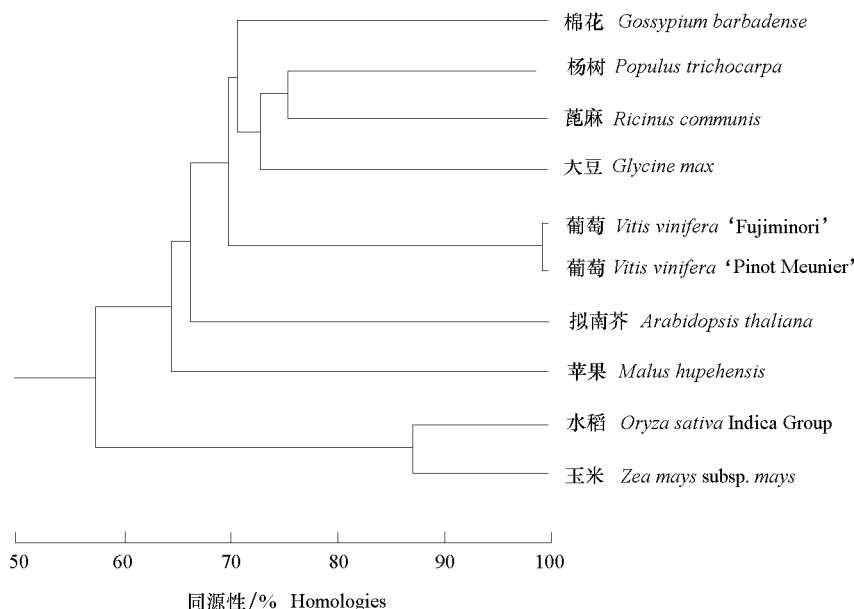


图 3 *VvGAI* 氨基酸序列与多种植物的 *GAI* 氨基酸系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the amino acid sequence of *VvGAI* and its homologues in other plants

2.3 *VvGAI* 蛋白亚细胞定位

将构建的 *VvGAI* 基因的瞬时表达载体 35S-*VvGAI*-GFP 转化到洋葱表皮细胞,借助于绿色荧光蛋白信号确定目标蛋白在细胞内的分布。基因枪轰击洋葱表皮细胞 24 h 后,通过共聚焦激光扫描显微镜观察绿色荧光蛋白的信号。结果(图 4)显示,转 pJIT166-GFP 载体的洋葱细胞内绿色荧光分布在整个细胞膜、细胞核和细胞质中,转 35S-*VvGAI*-GFP 载体的洋葱细胞内绿色荧光分布在细胞核中,说明 *VvGAI* 主要发挥了转录因子的功能。这与 *VvGAI* 基因序列上含有一个核定位信号(NLS)区域的特征是相符的。

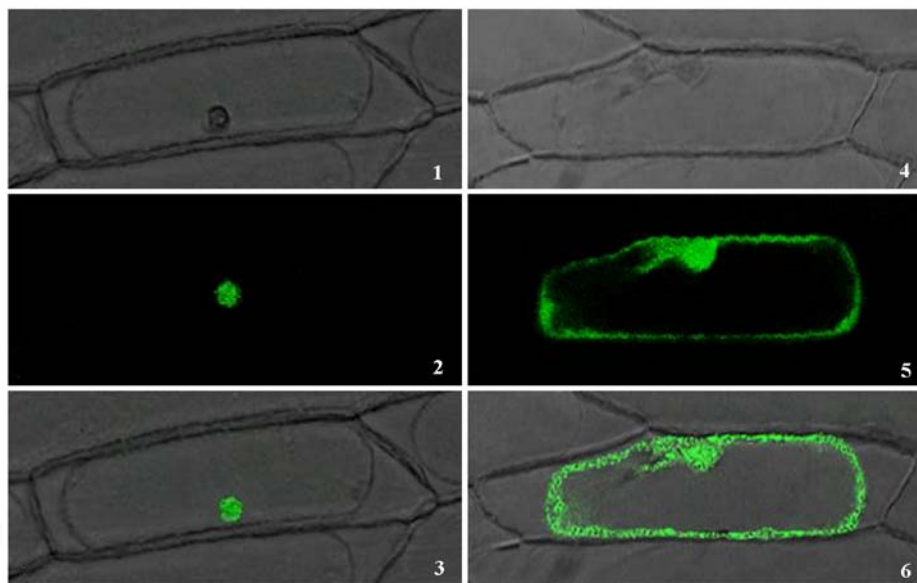


图 4 *VvGAI* 和 GFP 在洋葱表皮细胞中的瞬时表达

1、4: 洋葱表皮细胞外观图; 2、5: 共聚焦显微镜下 *VvGAI*-GFP 蛋白, GFP 蛋白的绿色荧光信号; 3: 1 与 2 的重叠; 6: 4 与 5 的重叠。

Fig. 4 The transient expression of *VvGAI* and GFP gene in onion cells

1, 4: Out-look of onion epidermal cells; 2, 5: Images of green fluorescence of *VvGAI*-GFP, GFP protein in onion cells under the confocal microscope; 3: Overlaid of 1 and 2; 6: Overlaid of 4 and 5.

2.4 *VvGAI* 基因在葡萄各组织中的表达

荧光定量与半定量 RT-PCR 检测结果如图 5 所示, *VvGAI* 基因在茎尖中表达量最高, 在幼果和幼叶中表达量次之, 在果实发育过程中表达呈降低趋势, 在幼叶中的表达量高于老叶。表明 *VvGAI* 基因在快速生长组织和细胞分裂活跃组织中表达量高, 这与赤霉素作用特点的相关报道是相符的(姜仕豪 等, 2008)。 *VvGAI* 在葡萄不同器官组织的不同发育阶段均能表达的特点说明该基因编码的蛋白是一种普遍存在的转录因子, 而其在不同时期中表达水平的不同则又说明了该转录因子在不同器官组织发育过程中所起作用的大小存在差异。

本研究中首先利用赤霉素处理藤稔葡萄果穗, 无核果实诱导率 90% 以上, 果穗外围果粒的无籽率达到 100%。在果实横径达到 1 cm 左右时果形逐渐长成椭圆形, 清水对照的有核果为圆形。

进一步利用经赤霉素和清水蘸穗处理的不同大小的果实 cDNA 作为模板, 利用荧光定量与半定量 RT-PCR 法对 *VvGAI* 基因进行表达分析, 方法与措施如前面所述。检测结果显示 *VvGAI* 基因在赤霉素处理后果实不同发育阶段的表达水平明显低于相应对照样品(图 6), 说明外源 GA 降低了 *VvGAI* 的表达, 这种低水平的表达可能与 GA 作用的改变以及种子不能正常发育有关。但是, *VvGAI* 在处理果实中的表达趋势与对照一致, 即在幼果中表达量最高, 随着果实发育其表达量降低。

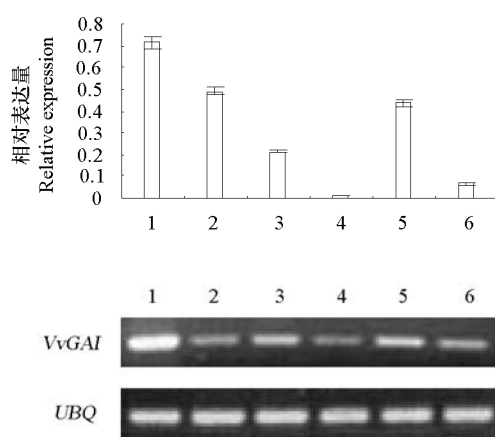


图 5 荧光定量（上）与半定量 RT-PCR（下）检测 *VvGAI* 基因的表达

1: 茎尖; 2: 幼果; 3: 中果; 4: 大果; 5: 幼叶; 6: 老叶。

Fig. 5 Expression of *VvGAI* gene in different tissues from grapevine by fluorescent quantitative (up) and semi-quantitative RT-PCR (down)

1: Stem tip; 2: Young fruit; 3: Middle fruit; 4: Big fruit; 5: Young leaf; 6: Old leaf.

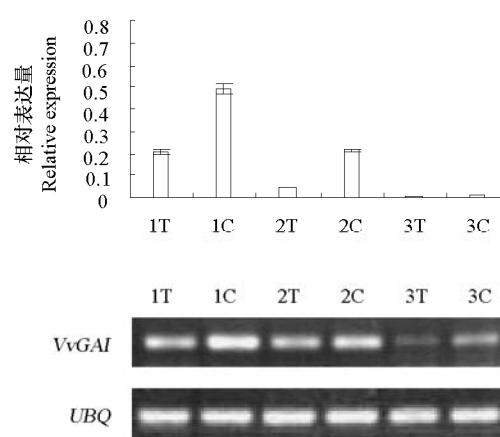


图 6 荧光定量（上）与半定量 RT-PCR（下）检测赤霉素处理果实后 *VvGAI* 基因的表达

1: 幼果; 2: 中果; 3: 大果; T. GA 处理; C. 对照。

Fig. 6 Expression of *VvGAI* gene in fruits in response to GA by fluorescent quantitative (up) and semi-quantitative RT-PCR (down)

1: Young fruit; 2: Middle fruit; 3: Big fruit. T. GA treatment; C. Control.

3 讨论

赤霉素在植物生命循环过程中起着重要的调控作用 (Fleet & Sun, 2005; Hartweek & Olszewski, 2006)。近年来, 随着植物功能基因组学的发展, 在有关赤霉素生物合成及调控, 信号转导途径, 以及赤霉素与其他激素和环境因子的互作等领域的研究取得了较大进展。用赤霉素处理可诱导葡萄、草莓、杏、梨、番茄等单性结实, 产生无籽果实 (Lopez-Galarza & Pascual, 1989; 林勇 等, 1999)。本试验中通过赤霉素处理葡萄花穗与果穗同样获得了无核果实, 且果实形状变为长圆形。葡萄的无核不仅是受基因调控的重要性状, 而且可以通过喷施赤霉素等进行无籽葡萄的生产 (房经贵 等, 1999)。DELLA 蛋白在赤霉素信号转导过程中发挥的重要作用也得以阐明 (黄先忠 等, 2006)。有关葡萄中 DELLA 的研究以及其在外源 GA 的外施条件下的作用特点尚未见报道。本研究通过 RT-PCR 技术从‘藤稔’葡萄中克隆得到 *VvGAI* 基因 ORF 全长, 通过对其氨基酸序列进行保守结构分析得知该基因属于 GRAS 家族基因, 具有保守的 GRAS 结构域, 包括核定位信号域 NLS, DELLA 蛋白 N 端保守结构域 DELLA 和 TVHYNP 区域, 它们对感知 GA 信号是必需的 (Dill & Sum, 2001), C 端保守结构 VHIID、RVER 和 SAW, 以及在 GA 信号转导过程中起重要调节作用的 LZ 区域和 polyS/T/V 区域, 由此推测 *VvGAI* 编码蛋白属于植物特有的 GRAS 转录因子的 DELLA 亚族, 并有可能参与 GA 信号通路调节。*VvGAI* 编码的氨基酸序列与其它植物的 *GAI* 氨基酸序列均有高度保守的序列即 DELLA 结构域与 VHYNP 结构域。水稻 *OsGAI* 基因的产物是一种 DELLA 类似蛋白。王文奎和戴思兰 (2000) 在 GAL4-*OsGAI* 融合蛋白的反式激活试验中发现 *OsGAI* 蛋白是一种转录激活因子或辅激活因子。在拟南芥中, GA 处理对 *GAI* 和 RGL 蛋白的稳定性影响较小。由此可见, 不同的 DELLA 蛋白在 GA 信号转导中的功能不同, 其作用机制也可能不一样。同源性分析和 BLAST 搜索表明得到的葡萄 *VvGAI* 与其他物种的 *GAI* 基因高度相似。对葡萄 *VvGAI* 氨基酸序列与水稻 *GAI*、玉米 D8、

杨树 *GAI/RGA1*、蓖麻 *GAIP-B*、苹果 *L1a*、拟南芥 *RGA1*、大豆 *GAI1*、棉花 *GAI* 的相应序列进行同源性比较, 结果表明: 葡萄 *VvGAI* 氨基酸序列与蓖麻、棉花、杨树的 *GAI* 的同源性最高, 与苹果、拟南芥、大豆的同源性次之, 与水稻、玉米的同源性最低。尽管 *VvGAI* 在葡萄各组织均有表达, 但存在着一定的表达差异, 这些 *GAI* 同源基因氨基酸序列同源性的不同表明它们在功能上可能存在着一定的差异。上述植物的 *GAI* 氨基酸序列的系统树分析也显示了相似的结果: 葡萄 *VvGAI* 氨基酸序列与蓖麻、杨树的 *GAI* 的进化关系较近, 与水稻、玉米等的亲缘关系较远; 总体上是双子叶植物的氨基酸序列的相似性高于单子叶植物。洋葱表皮细胞的瞬时表达显示, *VvGAI* 定位于细胞核, 与拟南芥的 *GAI*、*RGA*、*RGL1*、*RGL2* 蛋白定位在细胞核 (Wen & Chang, 2002; Fu & Harberd, 2003) 的结果一致。蛋白序列结构特征分析和蛋白的核定位表明 *DELLA* 蛋白是一类潜在的转录因子。

采用半定量 RT-PCR 法和荧光定量 PCR 方法检测 *VvGAI* 基因在葡萄各组织的表达, 结果表明, *VvGAI* 基因在茎尖中表达量最高, 在果实发育过程中表达呈降低趋势。在幼叶中的表达量高于老叶, *VvGAI* 基因在各组织均有表达, 在分生能力强的幼嫩组织表达量明显高于其他组织。经赤霉素处理后的葡萄果实 *VvGAI* 基因在幼果中的表达水平最高, 在大果中表达量最低, 表明 *VvGAI* 基因在快速生长的幼果期表达量明显高于其他时期, *VvGAI* 基因在快速生长组织和细胞分裂活跃组织中表达量高, 且在每个时期的对照组表达量均高于处理组, 说明葡萄 *VvGAI* 基因的表达可能受赤霉素的反馈抑制调节。Boss 和 Thomas (2002) 对葡萄栽培品种 Pinot Meunier 的一个 GA 不敏感矮化突变体的研究证明 *DELLA* 蛋白与生殖器官的发育有关。突变的基因解除了 GA 对花器官发育的抑制作用, 以致葡萄蔓藤上本应生长蔓须的部位变成了花序。植物单性结实形成无籽果实的过程受各种植物激素的调控, 如生长素与赤霉素, 所以它们的响应基因都可能参与调控单性结实过程。本试验克隆获得的葡萄 GA 信号响应因子 *VvGAI* 基因也可能在葡萄单性结实过程中扮演重要角色。本研究结果为进一步通过基因干涉和超表达转基因工程来验证其基因功能, 从分子水平上揭示葡萄的单性结实机理奠定了一定的研究基础。

References

- Boss P K, Thomas M R. 2002. Association of dwarfism and floral induction with a grape ‘Green Revolution’ mutation. *Nature*, 416: 847 – 850.
- Chang S, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11: 113 – 116.
- Dill A, Sum T P. 2001. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing *RGA* and *GAI* function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 159: 777 – 785.
- Fang Jing-gui, Zhang Zhen, Cai Bin-hua. 1999. The advances of research and breeding technique of genetic mechanism of seedless grape. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 3: 34 – 35, 82. (in Chinese)
- 房经贵, 章 镇, 蔡斌华. 1999. 葡萄无核遗传机理研究进展及育种技术. *中国农学通报*, 3: 34 – 35, 82.
- Fleet C M, Sun T P. 2005. A *DELLA* cate balance: The role of gibberellin in plant morphogenesis. *Current Opinion in Plant Biol*, 8: 77 – 85.
- Fu X, Harberd N P. 2003. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature*, 421: 740 – 743.
- Hartweck L M, Olszewski N E. 2006. Rice *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1* is a gibberellin receptor that illuminates and raises questions about GA signaling. *Plant Cell*, 18 (2): 278 – 282.
- Huang Xian-zhong, Jiang Cai-fu, Liao Li-li, Fu Xiang-dong. 2006. Progress on molecular foundation of GA biosynthesis pathway and signaling. *Chinese Bulletin of Botany*, 23 (5): 499 – 510. (in Chinese)
- 黄先忠, 蒋才富, 廖立力, 傅向东. 2006. 赤霉素作用机理的分子基础与调控模式研究进展. *植物学通报*, 23 (5): 499 – 510.
- Itoh H, Uegechi-Tamh M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M. 2002. The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of *SLENDER RICE 1* in nuclei. *Plant Cell*, 14: 57 – 70.

- Jiang Shi-hao, Pang Ji-liang, Wang Li-lin, Liang Hai-man. 2008. Molecular mechanism of gibberellin promotion on floral development. *Plant Physiology Communications*, 44 (5): 835 - 843. (in Chinese)
- 姜仕豪, 庞基良, 王利琳, 梁海曼. 2008. 赤霉素促进花发育的分子机制. *植物生理学通讯*, 44 (5): 835 - 843.
- Lin Yong, Lu Xue-hua, Guo Wen-jie. 1999. Preliminary discussion on the application of GA on the crop. *Fujian Science & Technology of Tropical Crops*, 1: 46 - 48. (in Chinese)
- 林 勇, 鲁雪华, 郭文杰. 1999. 浅谈赤霉素在一些农作物上的应用. *福建热作科技*, 1: 46 - 48.
- Liu Jie, Yang Li-na, Tao Jian-min, Xu Kuan-yong, Cheng Qun-kang, Liu Yan-hong. 2008. Effect of GA₃ and CPPU on new manicure finger grape seedless. *South China Fruits*, 37 (1): 61 - 62. (in Chinese)
- 刘 捷, 杨丽娜, 陶建敏, 许宽勇, 程群康, 刘艳红. 2008. GA₃ 与 CPPU 对新美人指葡萄果实无核化发育的影响. *中国南方果树*, 37 (1): 61 - 62.
- Lopez-Galarza S, Pascual B. 1989. The influence of winter gibberellic acid applications on earliness, productivity and other parameters of quality in strawberry cultivation on the Spanish Mediterranean coast. *Acta Hort*, 265: 217 - 222.
- Peng J, Carol P, Richards D E, King K E, Cowling R J, Murphy G P, Harberd N P. 1997. The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Devel*, 11: 3194 - 3205.
- Pysh L D, Wysocka-Diller J W, Camilleri C, Bouchez D, Benfey P N. 1999. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: Sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *Plant J*, 18: 111 - 119.
- Ramakers C, Ruijter J M, Lekane Depreza R H, Moorman A F M. 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339: 62 - 66.
- Silverstone A L, Jung H S, Dill A, Kawaide H, Kamiya Y, Sun T P. 2001. Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13: 1555 - 1566.
- 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*, 27 (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*, 27 (2): 207 - 212.
- Wang Wen-kui, Dai Si-lan. 2000. The applications of in situ hybridization in plant relationship researches. *Journal of Beijing Forestry University*, 22 (6): 100 - 104. (in Chinese)
- 王文奎, 戴思兰. 2000. 染色体原位杂交技术在植物亲缘关系研究中的应用. *北京林业大学学报*, 22 (6): 100 - 104.
- Wang Zhong. 2000. *Plant physiology*. Beijing: China Agriculture Press: 278 - 279. (in Chinese)
- 王 忠. 2000. *植物生理学*. 北京: 中国农业出版社: 278 - 279.
- Wen C K, Chang C. 2002. *Arabidopsis* RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*, 14: 87 - 100.
- Willige B C, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann E M N, Maier A, Schwechheimer C. 2007. The DELLA domain of GA insensitive mediates the interaction with the GA insensitive dwarf1A gibberellin receptor of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19: 1209 - 1220.
- Xu S P, Wei Z M. 1998. Introduction to method of microprojectile bombardment and its application. *Plant Physiology Communications*, 34 (1): 41 - 43.
- Xu Zeng-da. 2006. Application of plant growth regulator on flower. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 18 (3): 94 - 96. (in Chinese)
- 徐增达. 2006. 植物生长调节剂在花卉上的应用. *江西农业学报*, 18 (3): 94 - 96.
- 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)
- 张彦萍, 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.