

葡萄 *SCARECROW Like 14-Like* 基因的表达特征及胁迫响应研究

陈立勇¹ 柴丽娟¹ 陈尚武² 马会勤^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193; 2. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要 为探索外源赤霉素(GA₃)介导的无核葡萄果实膨大过程中的信号途径的调控基因,寻找验证主要调控元件,本研究以欧亚种无核葡萄品种‘无核白鸡心’(*Vitis vinifera* L. cv. Centennial Seedless)为材料,通过半定量 RT-PCR 技术分析属于 GRAS 基因家族的 *SCARECROW Like 14-Like* (*VvSCL14-Like*) 基因在葡萄不同组织器官和果实发育期的表达。通过启动子克隆、生物信息学分析、*promoter::GUS* 融合基因和 GUS 组织染色法对该基因的表达特征进行了研究。半定量 RT-PCR 结果表明,*VvSCL14-Like* 基因主要在休眠芽中表达,在果实发育过程中无表达。利用 GA₃ 对葡萄幼果进行膨大处理,处理后 1、3 和 7 d 的果实转录组结果表明 *VvSCL14-Like* 的转录水平无差异。对 *VvSCL14-Like* 启动子进行生物信息学分析,发现多个响应外源激素和逆境胁迫的作用元件。*VvSCL14-Like* 启动子驱动的 GUS 基因,只在拟南芥萌发初期下胚轴处表达。以 GA₃ 和 NaCl 分别处理阳性拟南芥幼苗,48 h 后 GUS 基因均在叶柄和叶脉表达。干旱胁迫处理阳性拟南芥幼苗,15 d 后 GUS 基因只发现在根部表达。研究结果表明,*VvSCL14-Like* 基因的表达具有组织特异性,参与外源赤霉素(GA₃)和非生物胁迫响应过程,但不是外源赤霉素(GA₃)介导的无核葡萄果实膨大过程的主要调控元件。

关键词 葡萄;*VvSCL14-Like* 基因;GA₃ 处理;盐胁迫;干旱胁迫

中图分类号 S 663.2

文章编号 1007-4333(2014)03-0080-08

文献标志码 A

Expression pattern and stress response of grape *SCARECROW Like 14-Like* gene

CHEN Li-yong¹, CHAI Li-juan¹, CHEN Shang-wu², MA Hui-qin^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract This paper was concerned on exploring the signal pathway mediated by exogenous gibberellins (GA₃) in berry enlargement of seedless grape, and verifying the main regulatory elements. Centennial Seedless (*Vitis vinifera* L.) was used to detect the expression character of GRAS family gene *SCARECROW Like 14-Like* (*VvSCL14-Like*) in different tissues, organs and berry developmental stages by semi-quantitative RT-PCR and grape berry transcriptomic data analysis. The expression pattern of *VvSCL14-Like* was further studied by promoter cloning, bioinformatic analysis, *promoter::GUS fusion* gene and GUS staining. The semi-quantitative RT-PCR detected *VvSCL14-Like* expression in dormant buds. No expression in berries was found in three main developmental stages. Berry transcriptomic data revealed that exogenous GA₃ application did not lead to significant difference expression on 1, 3 and 7 day after treatment. Bioinformatics analysis showed that *VvSCL14-Like* promoter has multi-acting elements involving in responses to exogenous hormones and stress resistance. The GUS staining displayed GUS expressions in hypocotyls at the early stage of Arabidopsis seedling development. The GUS expression was found in petioles and leaf veins of transformed young Arabidopsis after 48 h GA₃ or NaCl treatments. The GUS expression was found in the root of transformed Arabidopsis after 15 days stop irrigation. These results indicate that *VvSCL14-Like* gene is of tissue-specific expression pattern. It might be involved in response to exogenous gibberellins (GA₃) and abiotic stress, but not act as a main

收稿日期: 2013-09-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171939)

第一作者: 陈立勇, 硕士研究生, E-mail: chenliyong88@126.com

通讯作者: 马会勤, 教授, 主要从事葡萄研究, E-mail: hqma@cau.edu.cn

regulatory element in berry enlargement process of seedless grape mediated by exogenous gibberellins (GA₃).

Key words grape; *VvSCL 14-Like* gene; GA₃ treatment; salt stress; drought stress

GRAS(*GAI*、*RGA* 和 *SCR*) 基因家族编码的蛋白质是一类植物特有的重要转录因子, 参与植物的生长发育、GA 信号传导^[1]、光信号转导^[2] 和根的辐射生长^[3] 和腋芽分生组织的形成。1996 年, *SCARECROW*(*SCR*) 基因在拟南芥中被克隆和证明, 作为 *GRAS* 基因家族中重要的成员, 该基因在拟南芥侧根形成上起关键作用^[4]。随后, 发现一些拟南芥表达序列标签 (ESTs) 编码的基因产物与 *SCR* 基因产物在羧基端具有高度的相似性, 这些表达序列被归类为 *SCARECROW-LIKE* (*SCL*) 基因^[5], 参与植物逆境胁迫和 GA 信号调控。2010 年, 胡杨 *PeSCL7* 被克隆, 并在拟南芥上进行了超表达基因功能验证, 发现其参与 NaCl 和干旱胁迫响应过程^[6]。2011 年, 发现 *AtSCL3* 位于 *RGA* 基因的下游, 是参与拟南芥 GA 调控的一个正向调控因子, 在拟南芥根伸长中起重要作用^[1]。已有的研究表明, 葡萄 *GRAS* 基因家族中的 *VvSCL9* 和 *VvSCL14* 基因在无核白鸡心葡萄果实 GA₃ 处理后有上调表达^[7], 可能参与了 GA₃ 处理无核葡萄介导果实膨大的生理过程。与 *SCL* 基因序列上相似的一类基因被称为 *SCL-LIKE* 基因, *SCL-LIKE* 基因也是 *GRAS* 基因家族的成员。

无核葡萄是鲜食葡萄中应用非常广泛的品种类型, 由于自然条件下无核葡萄果粒较小, 为了提高商品价值, 国内外在生产上均常规使用赤霉素 (GA₃) 和以 GA 为主要成分的商业膨大剂处理增大果实^[8]。尽管作为一种通用的生产方法, 外源 GA 使用已有几十年的历史, 但对 GA 介导无核葡萄膨大的分子机制还不清楚。哪些基因和蛋白质是 GA 介导无核葡萄果实膨大信号传导途径中的关键基因和调控因子? 其调控机理又是什么? 随着对 GA 信号转导途径的逐步解析, 对关键作用元件的研究也从结构基因向调控基因深入。同时, 我国葡萄主产区逐步迁入西北内陆地区, 虽然具有昼夜温差大、劳动力成本低的优势, 但存在着土壤干旱和高盐的情况。环境胁迫已经成为限制我国葡萄产业发展的一个重要因素。研究和了解有哪些基因和蛋白质参与和调控葡萄环境胁迫, 对提高葡萄抗逆性的研究具有深远意义。*SCL14-LIKE* 基因与 *SCL14*、*SCL7* 基因结构类似, 同属于 *GRAS* 基因家族。研究 *SCL14-*

LIKE 基因在葡萄上的基因表达和功能, 对深入解析 GA₃ 介导的果实膨大机制和葡萄对环境胁迫的响应过程具有重要的意义。

本研究通过半定量 RT-PCR, 研究 *VvSCL14-Like* 基因在葡萄不同组织部位的表达情况, 利用本研究构建的葡萄果实转录组, 分析 *VvSCL14-Like* 基因在 GA₃ 处理后的转录水平变化。通过克隆 *VvSCL14-Like* 基因启动子, 遗传转化拟南芥后, 进行 GUS 染色检测 *GUS* 的时空表达, 评价该基因启动子对各种处理后的生理响应, 旨在解析 *VvSCL14-Like* 基因对 GA 和环境胁迫处理的响应。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为欧亚种无核葡萄品种‘无核白鸡心’ (*Vitis vinifera* L. cv. Centennial Seedless), 设施栽培于中国农业大学上庄试验站, 常规管理。野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 品种‘哥伦比亚’, 栽培于实验室光照培养箱, 常规管理。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株购自北京博迈德科技发展有限公司, 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 菌株和植物表达载体 pCAMBIA1301 由本实验室保存。pMD19-T 载体、DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 连接酶和 M-MLV 逆转录酶等均购自 TAKARA 公司 (大连), 多功能 DNA 纯化回收试剂盒购自博迈德科技发展有限公司, 引物合成及测序由上海英俊生物技术有限公司完成。

1.2 方 法

1.2.1 半定量 RT-PCR

采用 CTAB 小量法提取葡萄不同组织部位总 RNA^[9]。RNA 纯化及 first-strand cDNA 链的合成, 按照本葛辉等^[10] 在相同材料上使用的方法。根据葡萄全基因组序列得到 *VvSCL14-Like* 基因的序列, 设计 *VvSCL14-Like* 基因的特异性半定量 RT-PCR 引物 *VvSCL14-Like-F*: 5'- TGGATGAGACCGTAGTGGAA-3', *VvSCL14-Like-R*: 5'- AAAGAAGCTGCCTGAAACCC-3'。以 *Vv18S* 作为内参基因。以葡萄不同材料的 first-strand cDNA 链为模板, 循环条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s; 53 °C 40 s; 72 °C 延伸 40 s; 32 个循环。其中

*Vv18s*的循环条件为 94 °C 5 min; 94 °C 40 s; 48 °C 40 s; 72 °C 延伸 40 s; 27 个循环。

1.2.2 启动子基因克隆与表达载体构建

根据葡萄基因组序列在 *VvSCL14-Like* 基因上游查询其启动子序列,并设计特异性引物 *VvSCL14-Like* promoter-PF: 5'-ATTCTGAGC-TTTGAAAGGCAGGGCT-3', *VvSCL14-Like* promoter-PR: 5'-CCATGGACAGGCACTGAGG-TTCAGGAAGAG-3'(下划线为 *Nco* I 酶切位点)。以 CTAB 小量法提取的葡萄成叶总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。循环条件为 94 °C 5 min; 94 °C 50 s; 53 °C 50 s; 72 °C 3.5 min; 34 个循环。

PCR 产物回收后与 pMD19-T 连接,连接产物转化 *E. coli* 感受态细胞,提取质粒测序。用 *Xba* I 和 *Nco* I 双酶切质粒 pMD19-T-*VvSCL14-Like* promoter 和 pCAMBIA1301,重组载体转化 *E. coli* 感受态细胞。提取质粒进行双酶切鉴定。将构建好的质粒 pCAM-*VvSCL14-Like* promoter 用冻融法转入农杆菌菌株 EHA105。以野生型拟南芥品种哥伦比亚为外植体,用农杆菌介导法进行浸染^[11]。收获成熟种子后,在 MS 抗性培养基(10 mg/L Hyg, 50 mg/L TMT)上进行筛选。

1.2.3 生物信息学分析

在无核白鸡心葡萄 (*Vitis vinifera* L. cv. Centennial Seedless) 盛花后 12 d 对其果穗进行 30 mg/L GA₃ 蘸穗处理,分别于处理后 1、3 和 7 d 随机采集对照与处理的葡萄果实至少 100 粒,迅速用液氮冷冻后,放入 -80 °C 储存备用。采用 CTAB 法提取各样品的总 RNA, Nanodrop 2000 检测 RNA 质量后,采用 Illumina HiSeq™ 2000 平台进行 RNA

测序,提取 *VvSCL14-Like* 的转录信息,并进行分析。应用在线数据库 PLACE 对克隆测序的 *VvSCL14-Like* 启动子序列进行分析^[12-13]。根据得到的作用元件,对 *VvSCL14-Like* 启动子的转录调控和 *VvSCL14-Like* 的生物学功能进行预测。

1.2.4 启动子表达特性的研究

用 T₃ 代阳性拟南芥进行组织 GUS 染色观察^[14]及逆境胁迫、激素处理试验。拟南芥种植于培养钵中。以萌发后 20 d 的阳性拟南芥为试验材料。采用以下方法处理后进行 GUS 染色。GA₃ 处理:幼苗浸泡在 150 μmol/L 的 GA₃ 溶液中,23 °C,16 h 光照恒温培养箱内分别处理 24 和 48 h 后,进行 GUS 染色观察。NaCl 处理:幼苗浸泡在 100 mmol/L 的 NaCl 溶液中,23 °C,16 h 光照恒温培养箱内分别处理 24 和 48 h 后,进行 GUS 染色观察,以上处理均以清水浸泡为对照。干旱胁迫:幼苗在 23 °C,16 h 光照恒温培养箱培养条件下,停止浇水 7 和 15 d 后,分别进行 GUS 染色观察,以上处理以正常生长为对照。

2 结果与分析

2.1 *VvSCL14-Like* 基因及其在葡萄不同组织部位中的表达

利用已公布的葡萄基因组信息,获得相关序列,将 *VvSCL14-Like* 基因所编码的氨基酸序列与葡萄基因组中部分 SCL 基因成员和拟南芥 SCR 基因所编码的氨基酸序列进行比对,结果显示 *VvSCL14-Like* 基因所编码的氨基酸序列具有 GRAS 家族特有的碳端保守结构域 VHIID(图 1),说明 *VvSCL14-Like* 基因是葡萄 GRAS 基因家族中的一个成员。

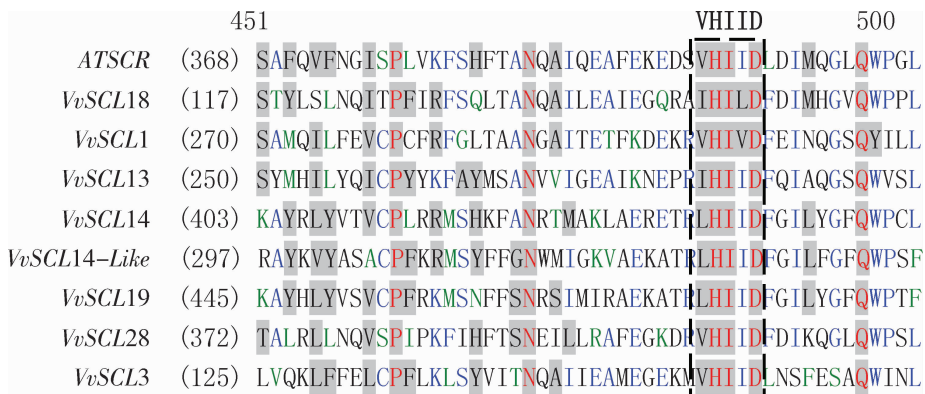
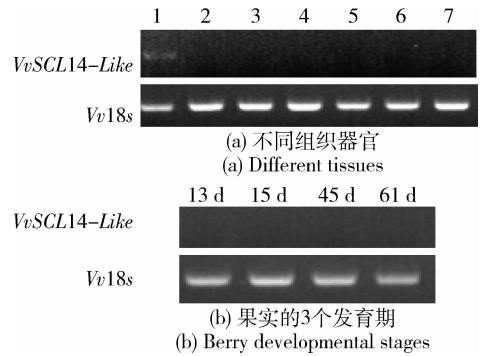


图 1 葡萄 *VvSCL14-Like* 与部分葡萄 SCL 及拟南芥 SCR 碳端 VHIID 结构域氨基酸序列的比对

Fig. 1 Comparison of amino acid sequences of *VvSCL14-Like* protein with some SCL proteins of *V. vinifera* L. and *Arabidopsis thaliana* SCR protein VHIID domain

葡萄 *VvSCL14-Like* (GI:359478625) 位于葡萄第 6 条染色体上 *VvSCL14* (GI:225434901) 基因的下流, 聚类分析表明, *VvSCL14-Like* 与 *VvSCL14* 和 *VvSCL9* (GI:225434907) 分为一个亚族 (图 2)。 *VvSCL14-Like* 与 *VvSCL14* 基因序列相似度为 49.38%, 与 *VvSCL9* 基因序列相似度为 44.26%, 在氨基酸序列上相似度上分别为 62% 和 52%, 预测 *VvSCL14-Like* 在蛋白高级结构和功能上可能和 *VvSCL14* 和 *VvSCL9* 较为相似。

达 (图 3(b))。



1 为休眠芽; 2 为根; 3 为稍尖; 4 为幼叶; 5 为成叶; 6 为老叶; 7 为花序。
1: Dormant bud; 2: Root; 3: Stem apex; 4: Young leaves; 5: Leaves; 6: Old leaves; 7: Inflorescence.

图 3 葡萄 *VvSCL14-Like* 基因在不同组织器官和果实发育过程中的表达

Fig. 3 Expression level of *VvSCL14-Like* gene in different tissues, organs and berry developmental stages of 'Centennial Seedless'

为了更好地检测葡萄果实中 *VvSCL14-Like* 的转录水平是否受外源 GA 的调控, 利用本实验室完成的无核白鸡心果实对 GA₃ 处理响应的转录组数据库, 对处理与对照果实中 *VvSCL14-Like* 在果实第一快速生长期的表达水平进行了比较。结果表明与 *VvSCL14-Like* 基因同一亚族的 *VvSCL9*、*VvSCL14* 在果实第一次快速生长期内均有表达, 且在 GA₃ 处理后 3 d 的果实中出现上调表达, 与本实验室前人利用半定量 RT-PCR 获得的结果相一致^[8]。 *VvSCL14-Like* 基因在果实第一快速生长期只在 15 d 有极微弱的表达, 与葡萄花后果实发育半定量 RT-PCR 结果一致, GA₃ 处理后 *VvSCL14-Like* 基因也未出现上调表达 (表 1)。

表 1 外源 GA₃ 处理和对照葡萄果实中 *VvSCL14-Like* 基因表达水平 (RPKM) 的转录组分析

Table 1 Transcription analysis of *VvSCL14-Like* gene expression level in stage I of grape berry development

基因名称 Gene name	1DAT 对照 Control for 1DAT	1DAT 处理 GA ₃ Treatment for 1DAT	3DAT 对照 Control for 3DAT	3DAT 处理 GA ₃ Treatment for 3DAT	7DAT 对照 Control for 7DAT	7DAT 处理 GA ₃ Treatment for 7DAT
<i>VvSCL-9</i>	27.137 1	26.522 7	20.558 5	22.118	24.723	19.563 5
<i>VvSCL-14</i>	14.676 8	13.305 2	15.181 4	15.367 2	15.640 2	12.075 1
<i>VvSCL14-Like</i>	—	—	0.035 7	—	—	—

注: 1DAT 处理后; RPKM 基因表达水平。

Note: 1Day after treatment; Reads per kilobase of exon model per million mapped reads.

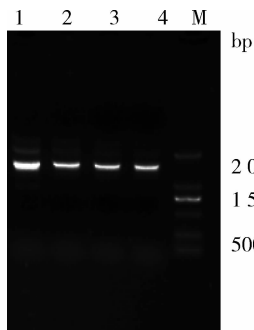
图 2 葡萄中部分 *VvSCL* 基因的氨基酸序列聚类对比

Fig. 2 Comparison and clustering of sequences of SCL of *V. vinifera* L. A tree diagram of some members of *VvSCL* was generated by AlignX from Vector NTI (Invitrogen)

对葡萄进行不同组织部位半定量 RT-PCR, 结果表明 *VvSCL14-Like* 基因只在休眠芽有表达, 在其余试验材料中均无明显表达 (图 3(a))。葡萄花后果实发育半定量 RT-PCR 结果表明, *VvSCL14-Like* 基因在第一次快速生长期 (19 d), 果实缓慢生长期 (45 d) 和第二次快速生长期 (61 d) 均无明显表

2.2 *VvSCL14-Like* 启动子的克隆与生物信息学分析

为了研究 *VvSCL14-Like* 的表达特征,探索其可能的生理功能,以葡萄总 DNA 为模板,经 PCR 扩增,得到约 1 600 bp 的 *VvSCL14-Like* 启动子序列,即包括 ATG 上游的 1 600 bp 的序列(图 4 和 5)。PCR 产物经纯化回收后,连接到 pMD19-T 克隆载体中得到新的质粒,命名为 pMD19-T-*VvSCL14-Like* promoter。测序结果表明,序列长度为 1 655 bp,与葡萄基因组公布的序列相似度为 94%。



M: DNA marker(DL 2000); 1, 2, 3 和 4: 4 个重复 *VvSCL14-Like* 基因启动子 PCR 产物
M: DNA marker(DL 2000); 1, 2, 3 and 4: The PCR product of *VvSCL14-Like* promoter

图 4 葡萄 *VvSCL14-Like* 基因启动子 PCR 结果

Fig. 4 PCR amplification of *VvSCL14-Like* gene Promoter

经过在线数据库 PLACE 分析,克隆的 *VvSCL14-Like* 启动子序列具有启动子的基本功能元件 TATA-BOX、CAAT-BOX,还具有多个与植物逆境胁迫相关和响应植物激素的作用元件(表 2)。*VvSCL14-Like* 基因表达产物可能是葡萄抗逆表达与激素响应过程中的一个转录因子。

在多个增强子 CAAT-BOX 后面含有与干旱胁迫、脱水胁迫、盐胁迫、光调控和响应 GA 的作用元件(图 5)。说明 *VvSCL14-Like* 启动子可能能够响应以上胁迫,并能够受到 GA 的调控。

```

CTAGAGATTATTCTGAGCTTGAAAGGCAGGGCTTCTTCAAGGCAGGGCTT -1513
CTTCAAGGCAGAAAGGTGGATCAGACTCCTCTACTAGATTATTTTTTTTGG -1463
ATCTGTGAGAGAACCCAGCAAGATAGTAATCTTTTACCATGACGGT -1413
CCCTTCAAGACACTCGGTGCTTTTACATAGTGCTGAATATGTGAGCTC -1363
TATGTTTTGCTTGCCCCAGATCATCAATCTATGGTGGGTTCCAGGAACT -1313
TTCGTGACAGCTGTTCATTCTTGTAGTACTTCTTACTATGTAATG -1263
GAGTTAGCCCTAGAAATCTTTGTGTAAGAGATTTGAAGAAAATATAAGAT -1213
ATAGTCAGATTCTGTGAACCTCIGGTTTAGTCTGTATTTTTTTTTTATTT -1163
GTAATTTTACCAATTTCTTTGTGATACTACTTAGCTGTGAGTGTAGTAGT -1113
TGGGGCACCCTGGTTCAGTTTGAATTAACAATTTAGAGATGGGAATGTG -1063
GAAATTATGAAGCAGAAGGATCAAAGGTAAGAAGAATGTAGAACTGGT -1013
TCTGGGTTGTTCCAAAATCTATGAAATGATAATAGCTTCTCAGTTGTT -963
                                IBOXCORE MYBCORE
CATCAATTCTGACAAAGACCTGGGTTTTGCACCCTAGAGCACCGCCGC -913
CTTGCTTTTTGTTGAATTTGTCATCGGTTGAGACTAAATGCATAGCCACC -863
                                MYBCORE
TCCTTTTCTTCTCGAAAAACAGAAGGAAGACAGAAATATGAGAAAGAT -813
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A
                                GT1GMSCAM4
TATTTATATTTGACGGGATTCAGAGTATGTCACCTGGGCAGAGCCGCTCT -763
TTTGAACCCAACTCTACTATCCCGATCAAACATTAGCCAGATTGCTA -713
GGGAATTGAAAATTCAGTAGTGAATAACATTCAATCACTAAAGAGTAAAGA -663
                                IBOXCORE
CACAGAGATGATCAATTTTCTATTTTTTTAAAGTAATGTCAGATTTTTTC -613
TTCAAATTTATTTTCAAATCTTTTTCTTTTATATAATTTATTTAAATTTTT -563
AAAAACAATATAAATTTGAATTTTTTTCTTTTCATATTTTCTTGAGGGT -513
                                PYRIMIDINEBOXHVEPB1
CCATTTAGAATGGCATTCGGTACCCACTTTGGACTCGGGTAGGCTGCGGT -463
GCGGTACCGTAGTATTTTTCTTTGATGATAATCATTTTTTTTAACAATT -413
                                IBOXCORE
TTTTATTTGGTGCTTACCTAATTAACCTCTATGAACCGTTAGTAAGTTA -363
                                ACGTATERD1 MYBCORE
TGTTGAAGCTCCACAGTGCATCTCTCCCATACAGTATTTTTGGAAATCC -313
CTTCTTATACAGTTCTAGTTCTCCGATCAGCAGGAGATTTCTCCGCTGAT -263
TTTTCCCTCTCGTCAGTGTGACTTTCAATGTTCTGTCTATTCTCTCAGC -213
TACTCTGAATTTATAGTATTTATGTTATCTGTCTATTCTCTCAGCTTCT -163
TTTGATCTTCGCTGCCCTTTTCTGAAGAATTTAAGTCATATTGTATAGC -113
                                PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A
ACAAACTCAATATTTTCTTTTCTTCCCTCAGTTTTCTCAGAAACCAA -63
                                MYBIAT
CTTAGGATGCAGTTAACTTCTTGCCCTTTTGTATCTTCTCTGAACCTC -13
                                MYBCORE PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A
AGTGCCTGTCTCATG +1

```

图 5 *VvSCL14-Like* 基因启动子序列及作用元件序列

Fig. 5 Promoter and elements sequence of *VvSCL14-Like*

表 2 *VvSCL14-Like* 启动子调控元件的生物信息学分析

Table 2 Bioinformatics analysis of *VvSCL14-Like* promoter

作用元件名称 Name of regulatory sequence	核心序列 Core sequence	功能 Function	位点 Position
TATA-BOX2	TATAAAT	转录起始-30 核心启动子序列 ^[15]	-554
TATA-BOX4	TATATAA	转录起始-30 核心启动子序列 ^[15]	-582
CAAT-BOX	CAAT	增强子, 基本功能元件 ^[16]	-105、-236 等 9 个位点

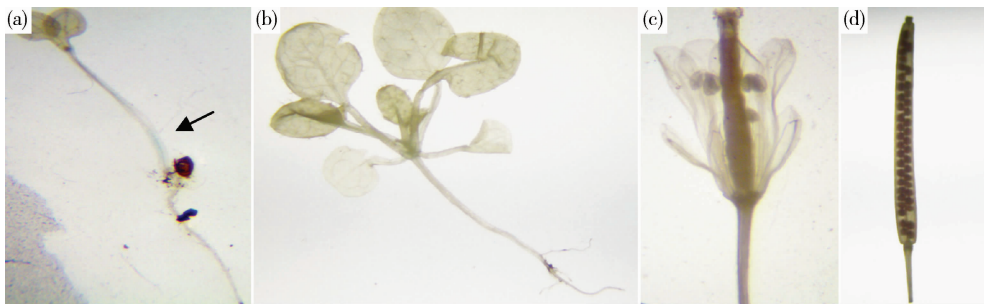
表 2(续)

作用元件名称 Name of regulatory sequence	核心序列 Core sequence	功能 Function	位点 Position
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	GA 响应元件 ^[17]	-37、-147、-861
PYRIMIDINEBOXHVEPBI	TTTTTTCC	GA 响应元件 ^[18]	-541
GT1GMSCAM4	GAAAAA	盐胁迫响应元件 ^[19]	-848
ACGTATERD1	ACGT	干旱胁迫响应元件 ^[20]	-387
MYBIAT	WAACCA	MYB 识别位点, 干旱响应元件 ^[21]	-70
MYBCORE	CNGTTR	脱水反应元件 ^[22]	-53、-376 等 5 个位点
IBOXCORE	GATAA	光调控元件 ^[23]	-435、-691、-984

2.3 启动子活性分析

利用植物组织 GUS 染色的方法, 检测了 pVvSCL14-Like::GUS 在 T₃ 代阳性拟南芥中的启动子表达。结果表明, 拟南芥种子萌发长出子叶后, 在下胚轴处有 GUS 基因表达(图 6(a))。拟南芥长出真叶后, 植株无 GUS 基因表达(图 6(b))。拟南芥进入生殖生长后, 花器官无明显的 GUS 基因表达(图 6(c)), 形成的角果也无明显的 GUS 基因表达

(图 6(d))。这说明, VvSCL14-Like 启动子序列具有启动子表达活性, 为组织特异性启动子。VvSCL14-Like 启动子在植株生长初期有活性, 在花器官的分化与生长和种子的形成与成熟 2 个过程中, VvSCL14-Like 启动子没有明显的活性。这一结果与 VvSCL14-Like 基因在葡萄不同组织部位和果实发育过程中的半定量 RT-PCR 结果相一致。



(a) 萌发后 7 d 的幼苗; (b) 萌发后 20 d 的拟南芥; (c) 成熟的花; (d) 角果
(a) A 7 d-old seedling; (b) A 20 d-old seedling; (c) Mature flower. (D) Silique

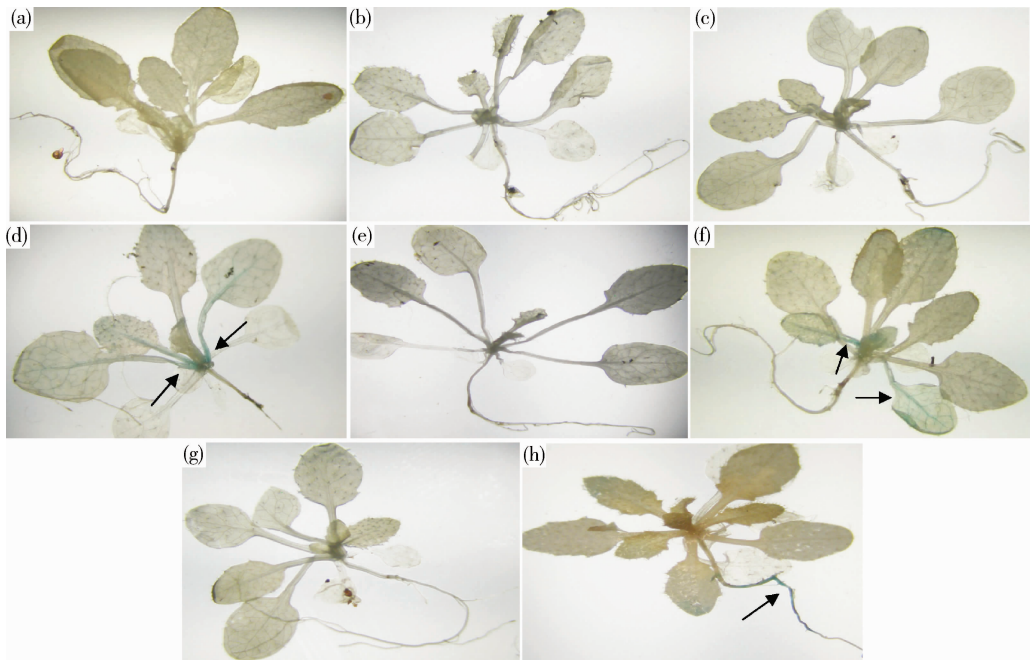
图 6 VvSCL14-Like 启动子区段::GUS 的阳性转基因株系的 GUS 染色结果

Fig. 6 GUS staining of pVvSCL14-Like::GUS transformed *Arabidopsis thaliana*

2.5 VvSCL14-Like 启动子对不同生理处理的响应

经 150 μ mol 的 GA₃ 溶液和 100 mmol 的 NaCl 溶液处理 24 h 的拟南芥幼苗, 与对照相同, 在各个组织部位均没有观察到 GUS 基因的明显表达, GA₃ 和 NaCl 处理 48 h 后, GUS 基因在叶柄和叶脉处均出现表达(图 7(a)~(f))。干旱胁迫处理后的拟南芥幼苗, 处理 7 d 后在各个组织部位都没有观察到 GUS 的表达(图 7(g)), 处理 15 d 后 GUS 在根部出现表达

(图 7(h))。这说明, VvSCL14-Like 启动子能够响应 GA₃ 处理、盐胁迫和干旱胁迫, 与生物信息学分析结果一致。干旱胁迫与 GA₃、NaCl 处理中的 GUS 基因表达位置的不一样, 证明了 VvSCL14-Like 启动子具有组织特异性相应特征。VvSCL14-Like 启动子未在短时间内响应 GA 处理、盐胁迫和干旱胁迫, 可能是一个较为下游的响应因子, 这与 VvSCL14 在葡萄果实中对 GA₃ 处理的响应具有相似的特征。



(a) 24 h 对照; (b) 48 h 对照; (c) 150 $\mu\text{mol/L}$ GA_3 处理 24 h; (d) 150 $\mu\text{mol/L}$ GA_3 处理 48 h; (e) 100 mmol NaCl 处理 24 h; (f) 100 mmol NaCl 处理 48 h; (g) 7 d 干旱处理; (h) 15 d 干旱处理。
 (a) Control for 24 h; (b) Control for 48 h; (c) 150 μmol GA_3 Treatment for 24 h; (d) 150 μmol GA_3 Treatment for 48 h; (e) 100 mmol NaCl Treatment for 24 h; (f) 100 mmol NaCl Treatment for 48 h; (g) Drought treatment for 7 d; (h) Drought treatment for 15 d.

图 7 *VvSCL14-Like* 启动子区段::*GUS* 的阳性转基因株系 GA_3 、NaCl 和干旱处理后的 *GUS* 染色结果

Fig. 7 GUS staining of p*VvSCL14-Like*::*GUS* transformed *Arabidopsis thaliana* after GA_3 , NaCl and drought treatment

3 讨论

目前对 *SCL-LIKE* 基因在植物组织部位的表达特征和生理功能还缺乏深入研究。本研究对葡萄不同组织部位的 *VvSCL14-Like* 基因的表达情况进行了检测,发现 *VvSCL14-Like* 基因在葡萄休眠芽中的表达量最高,这与前人^[8]研究的 *VvSCL-14* 基因在葡萄不同组织部位的表达情况相一致。休眠芽中存在处于静止态的干细胞区,这个结果也与 *SCR* 基因参与植物干细胞胚性维持的功能相符合^[3]。*VvSCL-14* 基因在葡萄幼叶、成叶和果实第一快速生长期中也有表达,而 *VvSCL14-Like* 基因在这些组织部位中均没有发现明显表达,表明 *SCL14* 和 *SCL14-LIKE* 在生理功能上可能存在差异。

AtSCL3 在 *RGA* 基因的下游,是拟南芥体内参与 GA 调控的一个正向调控因子^[6]。*VvSCL-14* 基因在无核葡萄果实 GA_3 处理后呈现上调表达^[8],可以推测为葡萄果实中参与 GA 响应的正向调控因子。试验结果表明,*VvSCL14-Like* 启动子响应外

源 GA_3 处理,在转基因拟南芥的叶柄和叶脉处出现上调的 *GUS* 表达。因此,*VvSCL14-Like* 很可能与部分 *SCL* 基因一样,是葡萄体内参与 GA 调控的一个正向调控因子,由于其表达的组织特异性,不参与 GA_3 介导的无核葡萄果实膨大过程。此外,由于转基因拟南芥在 GA_3 处理 24 h 后,并未发现 *GUS* 染色增强,说明 *VvSCL14-Like* 基因应该不是快速响应 GA_3 处理的途径因子,*VvSCL14-Like* 是如何响应 GA_3 处理的还有待于进一步研究。

胡杨 *PeSCL7* 基因在 NaCl 和干旱胁迫处理后表现上调表达,转基因拟南芥具有抗盐和抗旱性^[5]。对 *VvSCL14-Like* 启动子的研究结果表明,*VvSCL14-Like* 可能是葡萄体内参与干旱和盐胁迫的一个转录因子。由于 *VvSCL14-Like* 启动子在 NaCl 处理 24 h 和干旱处理 7 d 后,在转基因拟南芥上均没有发现 *GUS* 基因表达,说明 *VvSCL14-Like* 基因无法快速响应盐胁迫和干旱胁迫。*VvSCL14-Like* 基因对于其他环境胁迫的响应情况还有待验证。

综上,本试验对 *VvSCL14-Like* 在葡萄不同组织部位的表达情况和 *VvSCL14-Like* 启动子的表达特性进行了分析,对 *VvSCL14-Like* 启动子对环境胁迫和激素处理的响应进行了探索,表明 *VvSCL14-Like* 基因虽然不参与外源 GA₃ 介导的果实膨大过程,但是一个响应外源 GA₃ 处理和干旱、盐胁迫的正向调控因子,对研究葡萄 GA 信号调控和逆境胁迫的机制具有重要意义,为后续的 *VvSCL14-Like* 基因的功能验证、GA 信号转导和环境胁迫过程中的具体作用和详细机制提供了初步线索。

参 考 文 献

- [1] Zhang Z L, Ogawa M, Fleet C, et al. SCARECROW-LIKE 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci, 2011, 108: 2160-2165
- [2] Bolle B. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development [J]. Planta, 2004, 218: 683-6922
- [3] Wysocka-Diller J W, Helariutta Y, Fukaki H, et al. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot [J]. Development, 2000, 127(3): 595-603
- [4] Laurenzio D, Wysocka-Diller J W, Malamy J, et al. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root [J]. Cell, 1996, 3(86): 423-433
- [5] Pysh L D, Wysocka-Diller J W, Camilleri C, et al. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes [J]. The Plant Journal, 1999, 18(1): 111-119
- [6] Ma H S, Liang D, Shuai P, et al. The salt- and drought-inducible poplar GRAS protein SCL7 confers salt and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(14): 4011-4019
- [7] 陈丽华, 葛晖, 柴丽娟, 等. 葡萄 SCARECROW 基因家族的分析与表达 [J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(1): 80-87
- [8] Olszewski N, Sun T, Gubler F, et al. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways [J]. Plant Cell, 2002, 14: 61-80
- [9] Fulton T M, Chunwongse J, Tanksley S D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants [J]. Plant Molecular Biology Reports, 1995, 13: 207-209
- [10] 葛晖, 赵晓, 王增, 等. 葡萄 GA 受体基因 GID1 初探及其在果实 GA 处理条件下的差异表达 [J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(2): 58-63
- [11] Zhang X, Henriques R, Lin S S, et al. Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 1: 641-646
- [12] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1): 297-300
- [13] Prestridge D S. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements [J]. CABIOS, 1991, 7: 203-206
- [14] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The gus gene fusion system [J]. Plant Molecular Biology Reports, 1987, 5(4): 387-405
- [15] Grace M L, Chandrasekharan M B, Hall T C, et al. Sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation from the beta-phaseolin promoter [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 8102-8110
- [16] Vicente-Carbajosa J, Moose S P, Parsons R L, et al. A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zeingenepromoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2 [J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94: 7685-7690
- [17] Mena M, Cejudo F J, Isabel-Lamonedaa I, et al. A role for the DOF transcription factor BPBF in the regulation of gibberellin-responsive genes in barley aleurone [J]. Plant Physiol, 2002, 130: 111-119
- [18] Cercos M, Gomez-Cadenas A, Ho T H D, et al. Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, EPB-1, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid [J]. Plant J, 1999, 19: 107-118
- [19] Park H C, Kim M L, Kang Y H, et al. Pathogen- and NaCl-induced expression of the S_{CaM}-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor [J]. Plant Physiol, 2004, 135: 2150-2161
- [20] Simpson S D, Nakashima K, Narusaka Y, et al. Two different novel cis-acting elements of erd1, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence [J]. Plant J, 2003, 33: 259-270
- [21] Abe H, Urao T, Ito T, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. Plant Cell, 2003, 15: 63-78
- [22] Solano R, Nieto C, Avila J, et al. Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB. Ph3) from *Petunia* hybrid [J]. EMBO J, 1995, 14: 1773-1784
- [23] Terzaghi W B, Cashmore A R. Light-regulated transcription [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1995, 46: 445-474