

## 葡萄 *VvSCL9* 基因和启动子的克隆及初步研究

陈立勇<sup>1</sup> 陈丽华<sup>1</sup> 柴丽娟<sup>1</sup> 陈尚武<sup>2</sup> 马会勤<sup>1\*</sup>

(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 100193)

**摘要** 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 比较了 *VvSCL9* 基因在葡萄不同组织器官中的表达, 利用转录组分析探索了葡萄果实中 *VvSCL9* 对外源赤霉素(GA<sub>3</sub>)处理的响应。通过全基因组序列和启动子克隆、启动子生物信息学分析及转基因验证进一步研究了 *VvSCL9* 的表达特征及对不同胁迫的响应。结果表明, *VvSCL9* 在葡萄梢尖、幼叶、成叶、老叶和花序等组织器官中均有表达, 参与葡萄果实第一快速生长期的发育, 但对外源 GA<sub>3</sub> 处理无显著响应。对克隆得到的 *VvSCL9* 启动子进行生物信息学分析, 发现多个激素和逆境胁迫响应的作用元件。以 GA<sub>3</sub> 处理超表达 *VvSCL9* 的转基因烟草种子, 转基因烟草种子的萌发率在前期低于对照。转基因烟草组培苗对 100 mmol/L NaCl 的耐受性高于对照。研究表明, *VvSCL9* 基因参与葡萄的营养生长和生殖生长, 能够提高植物耐盐性, 在一定程度上影响植物外源 GA<sub>3</sub> 的敏感性, 但可能不是外源赤霉素(GA<sub>3</sub>)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; *VvSCL9* 基因; 启动子; GA<sub>3</sub> 处理; 盐胁迫

中图分类号 S 663.1

文章编号 1007-4333(2015)02-0101-07

文献标志码 A

## Isolation and primary function study of *VvSCL9* gene and its promoter

CHEN Li-yong<sup>1</sup>, CHEN Li-hua<sup>1</sup>, CHAI Li-juan<sup>1</sup>, CHEN Shang-wu<sup>2</sup>, MA Hui-qin<sup>1\*</sup>

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

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

**Abstract** *SCARECROW-Like (SCL)* genes are the members of *GRAS* gene family. They involve in many processes including plant development, hormone and stress response. In the present study, ‘Centennial Seedless’ (*Vitis vinifera* L.) variety was used to detect the expression of *VvSCL9* in different tissues and organs by a semi-quantitative RT-PCR. The precise transcription abundance in berries after exogenous GA<sub>3</sub> treatment was revealed by transcriptomic data analysis. The expression character and function of *VvSCL9* were further studied by full sequence and promoter cloning, bioinformatic analysis and heterogeneous expression. The semi-quantitative RT-PCR detected *VvSCL9* expression in shoot tips, young leaves, full-expanded leaves, old leaves and inflorescence. Berry transcriptomic data revealed that *VvSCL9* was expressed in stage I berry. But no differential expression was found on 1, 3 and 7 d after exogenous GA<sub>3</sub> application. Bioinformatics analysis found that *VvSCL9* promoter had multi-acting elements involved in response to plant hormones and stress resistance. Transgenic tobacco seeds over-expressing *VvSCL9* demonstrated lower germination rate than the controls in the early days under GA<sub>3</sub> treatment. Transgenic tobacco plants over-expressing *VvSCL9* improved the plant tolerance to 100 mmol/L NaCl. Our results indicated that *VvSCL9* participated in vegetative and reproductive growth of grapevine, it involved in plant salt tolerance and the sensitivity to GA<sub>3</sub>. However, *VvSCL9* might not serve as a main regulatory element in exogenous gibberellins (GA<sub>3</sub>) induced seedless grape berry enlargement.

**Key words** grape; *VvSCL9* gene; promoter; GA<sub>3</sub> treatment; salt stress

收稿日期: 2014-05-05

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

GRAS(GAI、RGA 和 SCR)基因家族编码的蛋白质是一类重要的转录因子,参与植物的生长发育、赤霉素(GA)信号传导<sup>[1]</sup>、光信号转导<sup>[2]</sup>、根的辐射生长<sup>[3]</sup>和腋芽分生组织的形成等重要生理过程。首个 SCARECROW(SCR)基因于1996年在拟南芥中被克隆和证明,该基因作为 GRAS 基因家族中重要的成员,在拟南芥侧根形成中起关键作用<sup>[4]</sup>。随后,又发现一些拟南芥表达序列标签(ESTs)所编码的基因产物与 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<sup>[5]</sup>。研究表明,与 SCR 类似,SCL 基因参与植物逆境胁迫和 GA 信号调控。对拟南芥 SCL14 的研究表明,超表达 *AtSCL14* 的植株对有毒化学品异烟酸和 2,4,6-三碘酸的耐受性显著增加<sup>[6]</sup>。将胡杨 *PeSCL7* 在拟南芥中进行超表达,发现其参与 NaCl 和干旱胁迫响应过程<sup>[7]</sup>。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。*AtSCL3* 与 DELLA 起拮抗作用,并进一步通过这种拮抗作用控制下游 GA 的响应<sup>[1]</sup>。

葡萄是世界栽培面积最大的果树树种之一,鲜食葡萄品种中无核葡萄是重要的类型,也是育种和栽培的发展方向。无核葡萄由于天然果粒较小,通常都需要在果实生长期进行 1 到多次的 GA<sub>3</sub> 处理,用于膨大果实,提高葡萄的商品价值。尽管 GA<sub>3</sub> 在葡萄产业中的应用已经有数十年的历史,但对 GA<sub>3</sub> 介导的无核葡萄膨大的深层机理并不清楚,影响了 GA 敏感型无核葡萄的选育,以及对现有品种的 GA<sub>3</sub> 处理窗口期与使用浓度的优化。目前,对 SCL 基因是否参与外源 GA<sub>3</sub> 介导的葡萄果实膨大的信号传导途径还不清楚。此外,基于已知的 SCL 基因参与植物抗逆反应,研究 SCL 基因在葡萄抗逆中的作用也具有重要意义。

本研究通过半定量 RT-PCR,比较 *VvSCL19* 基因在葡萄植株不同组织部位和果实发育期的表达水平,利用前期研究构建的葡萄果实转录组数据,分析 *VvSCL9* 基因在转录水平对外源 GA<sub>3</sub> 处理的响应。通过克隆 *VvSCL9* 基因,转化烟草,进一步研究验证 *VvSCL9* 基因对于 GA<sub>3</sub> 处理和盐胁迫的响应。通过克隆 *VvSCL9* 启动子,对启动子序列进行生物信息学分析,以预测 *VvSCL9* 的基因表达特性。

## 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),用于基因克隆的材料为花后 13 d 的果实,取自北京市通州区的实验基地。转基因用烟草为普通烟草(*Nicotiana tabacum*)。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  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 连接酶及 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 小量法提取葡萄植株不同组织部位材料的总 RNA<sup>[8]</sup>。RNA 纯化及 cDNA 一链的合成,按照本实验室在相同材料上使用的方法<sup>[8]</sup>。根据葡萄全基因组序列设计 *VvSCL9* 基因的特异性半定量 RT-PCR 引物:*VvSCL9*-F: 5-GATGG-GAATCAAAGACTGGC-3, *VvSCL9*-R: 5'-AGA-GGCGTTGGATAAAGGTG-3'。

以 *Vv18S* 作为内参基因。以葡萄不同组织材料和不同时期果实的 cDNA 一链为模板,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 葡萄果实 *VvSCL9* 的转录组分析

在无核白鸡心葡萄盛花后 12 d 对果穗进行 30 mg/L GA<sub>3</sub> 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 *VvSCL9* 的转录信息,并进行分析。

#### 1.2.3 基因和启动子的克隆与基因的表达载体构建

根据葡萄基因组序列查询 *VvSCL9* 基因序列和上游启动子序列,分别以 CTAB 小量法提取的葡

萄花后 13 d 的  $GA_3$  处理组葡萄果实 RNA 克隆  
*VvSCL9* 基因全长,以果实 DNA 为模板克隆

*VvSCL9* 启动子。*VvSCL9* 基因全长和启动子克隆  
引物如下:

*VvSCL9* F *Pst* I 5'- CCACTGCAGATAGCGGTAATTGCGGAGTAGAT-3'

*VvSCL9* R *Xba* I 5'- GATCTCTAGACAGACCAGGGTACTGATGAGCATA -3'

*VvSCL9* promoterF5'-AACTGCAGGAAGAGCAGCATACTGACAGAATCA-3'

*VvSCL9* promoter R5'- GAAGATCTCTACTCCGCAATTACCGCTATCA-3'

克隆 *VvSCL9* 基因的 PCR 条件为 94 °C 5 min;  
94 °C 50 s;57 °C 50 s;72 °C 3.5 min;35 个循环。  
克隆 *VvSCL9* 启动子 PCR 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  
物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,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 *Pst* I 和 *Xba* I 双酶切质粒 pMD19-T-  
*VvSCL9* 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 pCAMBIA1301-*VvSCL9* 用冻融法转入农  
杆菌菌株 EHA105。以普通烟草为外植体,用农杆  
菌介导的叶圆片法进行转化。通过筛选再生和验证  
获得转基因烟草,组培和炼苗后,在温室中自花授  
粉,收获充分成熟的种子。

#### 1.2.4 转基因烟草种子萌发率测定

将收获的 *VvSCL9* 超表达烟草的种子,随机挑  
选 100 粒进行萌发处理。将萌发的种子进行 GUS  
染色,超过 90% 的种子均能被染成蓝色,证明收  
获的种子为 *VvSCL9* 超表达烟草种子,可以用于萌  
发率测定。将 *VvSCL9* 超表达烟草种子 4 °C 春化  
24 h 后,随机选取 150 粒,分为 3 组,将种子均匀分  
布在铺有滤纸的培养皿中,分别进行 1 和 10  $\mu$ mol/L  
 $GA_3$  和蒸馏水处理,保证种子随时被处理溶液浸  
润,每个处理重复 3 次,以 pCAMBIA1301 空载转  
基因烟草种子为对照组。培养皿均放置在 23 °C、  
16 h 光照恒温培养箱内,处理 48 h 后,开始进行种  
子萌发率的统计。

#### 1.2.5 转基因烟草组培苗的胁迫处理

分别用含 100 和 200 mmol/L NaCl 的 MS 培  
养基处理 *VvSCL9* 超表达烟草,以 pCAMBIA1301  
空载转基因烟草为对照植株。1 个月后,观察植株  
生长情况。

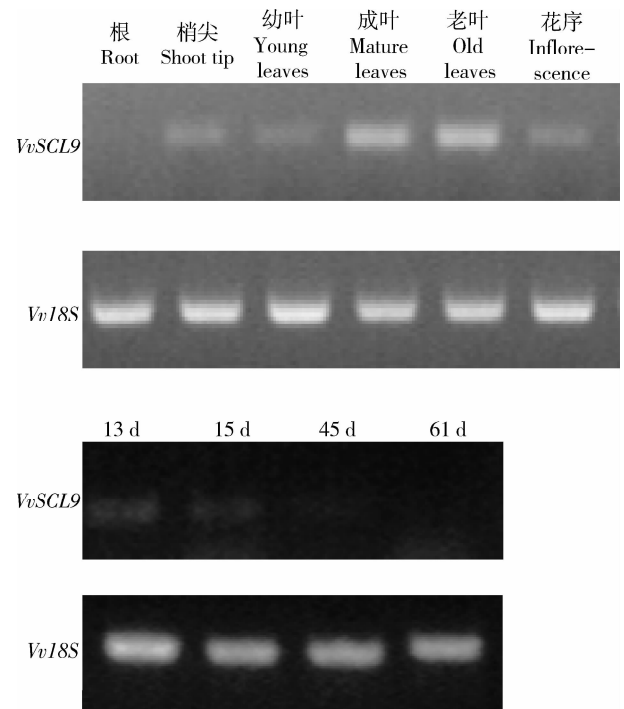
#### 1.2.6 启动子生物信息学分析

应用在线数据库 PLACE 对克隆测序的  
*VvSCL9* 启动子序列进行分析<sup>[9-10]</sup>。根据得到的作  
用元件,对 *VvSCL9* 启动子的转录调控和 *VvSCL9*  
的生物学功能进行预测。

## 2 结果与分析

### 2.1 *VvSCL9* 基因在葡萄组织器官及果实不同发育期中的表达

对葡萄植株不同组织部位的材料进行半定量  
RT-PCR,结果表明 *VvSCL9* 基因在葡萄梢尖、幼  
叶、成叶、老叶和花序等器官均有表达,在根部中  
无明显表达(图 1(a))。其中在成叶和老叶中表达量  
较高。葡萄花后果实发育半定量 RT-PCR 结果表  
明,*VvSCL9* 基因在第一次快速生长期(13 和 15 d)  
有表达,在果实缓慢生长期(45 d)和第二次快速生  
长期(61 d)无明显表达(图 1(b))。



(a)不同组织器官(b)果实的3个发育期  
(a)Different tissues(b)Berry developmental stages

图1 葡萄 *VvSCL9* 基因在不同组织器官和  
果实发育过程中的表达

Fig. 1 Expression level of *VvSCL9* gene in different  
tissues,organs and berry developmental  
stages of 'Centennial Seedless'

转录组数据分析结果显示, *VvSCL9* 基因在无核葡萄果实第一次快速生长期内的 3 个采样时间(花后 13、15 和 19 d)均有表达。这个结果与葡萄花后果实发育半定量 RT-PCR 结果一致。在 30 mg/L 外源  $GA_3$  处理后, 对 *VvSCL9* 基因表达量的显著性测验表明 *VvSCL9* 基因的表达没有出现明显变化(表 1), 表明 *VvSCL9* 基因虽然参与了无核葡萄果实在第一次快速生长期的发育, 但不响应外源  $GA_3$  处理。

表 1 处理后无核白鸡心葡萄果实中 *VvSCL9* 基因的表达水平

Table 1 Transcription response of *VvSCL9* to  $GA_3$  treatment in centennial seedless berries

$GA_3$ 质量浓度/ (mg/L) Concentration of $GA_3$	处理后不同时间 Different time		
	1 d	3 d	7 d
0	27.14	20.56	24.72
30	26.52	22.12	19.56

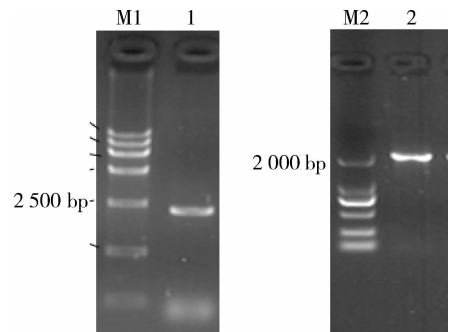
注: RPKM 基因表达水平。

Note: Reads per kilobase of exon model per million mapped reads.

## 2.2 *VvSCL9* 基因和启动子的克隆

分别以葡萄花后 13 d 的  $GA_3$  处理组葡萄果实 RNA 和果实 DNA 为模板, 以 *VvSCL9* 和 *VvSCL9*-*promoter* 引物对为引物, 经 PCR 扩增, 分别获得 2 280 bp 的 *VvSCL9* 基因片段及 2 170 bp 的 *VvSCL9* 启动子片段(图 2)。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, 分

别命名为 pMD19-T-*VvSCL9* 和 pMD19-T-*VvSCL9* promoter。测序结果表明, 克隆的 *VvSCL9* 基因片段与葡萄基因组公布的序列相似度为 99%, 克隆的 *VvSCL9* 启动子片段与葡萄基因组公布的序列相似度为 99%, 证明 2 个片段均为目的片段, 可以进行下一步试验。



M1: 15 000 bp DNA marker; M2: 2 000 bp DNA marker

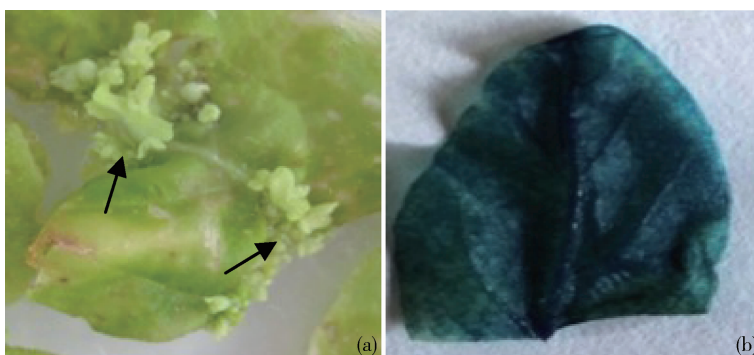
(a) *VvSCL9* 基因 PCR 产物 (b) *VvSCL9* 启动子 PCR 产物。

(a) PCR product of *VvSCL9* gene (b) PCR product of *VvSCL9* promoter.

图 2 无核白鸡心葡萄 *VvSCL9* 基因和启动子的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of *VvSCL9* gene and its promoter from centennial seedless grape

采用农杆菌介导法侵染烟草叶片, 侵染过的烟草叶片经过 3 d 暗培养, 转入含有潮霉素的抗性培养基进行初步筛选, 获得抗性芽点(图 3(a))。将抗性芽点切下, 转入组培瓶中进行继代培养, 待成苗后, 进行 GUS 检测, 证明获得 *VvSCL9* 超表达烟草(图 3(b))。



(a) *VvSCL9* 超表达烟草的筛选 (b) GUS 检测。

(a) Selection of *VvSCL9* over-expression tobacco (b) GUS detection.

图 3 *VvSCL9* 超表达烟草的筛选和 GUS 检测

Fig. 3 Selection and GUS staining results of *VvSCL9* over-expression tobacco

### 2.3 $GA_3$ 处理对 *VvSCL9* 超表达烟草种子萌发的影响

在蒸馏水处理中,对照组烟草种子萌发高峰期在 2~3 d, *VvSCL9* 超表达烟草种子萌发高峰期在 3~4 d。经  $1 \mu\text{mol/L}$   $GA_3$  处理 2 d 后, *VvSCL9* 超表达烟草种子的萌发率较蒸馏水处理稍有上升,但低于对照组烟草种子经  $1 \mu\text{mol/L}$   $GA_3$  处理后的萌发率。 $1 \mu\text{mol/L}$   $GA_3$  处理 3 d 后, *VvSCL9* 超表达烟草种子萌发率与蒸馏水处理相比没有显著差异。 $10 \mu\text{mol/L}$   $GA_3$  处理 2 d 后, *VvSCL9* 超表达烟草

种子萌发率与  $1 \mu\text{mol/L}$   $GA_3$  处理的相比,没有明显变化。 $10 \mu\text{mol/L}$   $GA_3$  处理 3 d 后, *VvSCL9* 超表达烟草种子萌发率与蒸馏水处理相比没有显著差异。以上说明,超表达烟草种子对于外源  $GA_3$  处理的敏感性低于对照(表 2)。较高浓度( $10 \mu\text{mol/L}$ )外源  $GA_3$  对 *VvSCL9* 超表达烟草种子的萌发促进作用与较低浓度( $1 \mu\text{mol/L}$ )差异不大,也说明超表达 *VvSCL9* 基因能够降低烟草种子对外源  $GA_3$  的响应。

表 2  $GA_3$  处理对 *VvSCL9* 超表达烟草种子萌发率的影响

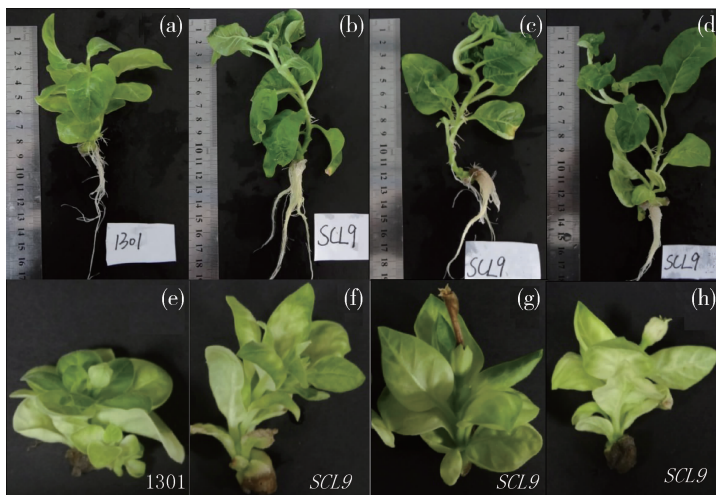
Table 2 Effect of  $GA_3$  on the germination of *VvSCL9* over-expression tobacco seeds

$GA_3$ 浓度/ ( $\mu\text{mol/L}$ ) Concentration of $GA_3$	处理后 2 d		处理后 3 d		处理后 4 d		%
	Germination rate of treatment for 2 d		Germination rate of treatment for 3 d		Germination rate of treatment for 4 d		
	CK	<i>VvSCL9</i>	CK	<i>VvSCL9</i>	CK	<i>VvSCL9</i>	
0	9±1	12.67±3	86±8	44±2	100	96±1	
1	26±2	17.5±3	89±1	45±5	100	94±2	
10	34.5±11	15.3±3	84±2	47±3	100	100	

### 2.4 *VvSCL9* 超表达烟草组培苗对 NaCl 处理的响应

在 MS 培养基中加入  $100 \text{ mmol/L}$  NaCl, 生长一个月后 *VvSCL9* 超表达烟草植株高度明显高于对照(图 4(a)、(b)、(c)和(d))。 *VvSCL9* 超表达烟草根系生长正常, 叶片颜色正常。对照组烟草根系生长较弱, 叶片颜色偏黄, 表现了更大的胁迫反应。

在  $200 \text{ mmol/L}$  NaCl 的培养基处理转基因烟草和对照组烟草 1 个月之后, *VvSCL9* 超表达烟草与对照组烟草均出现叶片黄化、节间缩短、叶形变小、植株矮化、花期提前、根系发育迟缓等性状(图 4(e)、(f)、(d)和(h)), 二者之间没有显著的性状差异。以上结果说明, *VvSCL9* 超表达烟草对  $100 \text{ mmol/L}$  NaCl 胁迫表现出增强的耐受能力。



(a)  $100 \text{ mmol/L}$  NaCl 处理的对照烟草 (b, c 和 d)  $100 \text{ mmol/L}$  NaCl 处理的 *VvSCL9* 超表达烟草 (e)  $200 \text{ mmol/L}$  NaCl 处理的对照烟草 (f, g 和 h)  $200 \text{ mmol/L}$  NaCl 处理的 *VvSCL9* 超表达烟草。

(a) Control under  $100 \text{ mmol/L}$  NaCl treatment (b, c, d) *VvSCL9* over-expression tobacco under  $100 \text{ mmol/L}$  NaCl treatment

(e) Control under  $200 \text{ mmol/L}$  NaCl treatment (f, g, h) *VvSCL9* over-expression tobacco under  $200 \text{ mmol/L}$  NaCl treatment.

图 4 *VvSCL9* 超表达烟草对 NaCl 胁迫的耐受

Fig. 4 Tolerance of *VvSCL9* over-expression tobacco to NaCl stress

## 2.5 *VvSCL9* 启动子的生物信息学分析

经过在线数据库 PLACE 分析,克隆得到的无核白鸡心 *VvSCL9* 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、响应植物激素的作用元件,包括盐胁迫响应元件(表 3),支持了在烟草中进行 *VvSCL9* 基因超表达的试验结果。

表 3 *VvSCL9* 启动子调控元件的生物信息学分析涂黄处加英文

Table 3 Bioinformatics analysis of *VvSCL9* promoter

作用元件名称 Name of regulatory sequence	核心序列 Core sequence	功能 Function	数目 Number
TATA-BOX4	TATATAA	转录起始-30 核心启动子序列 <sup>[11]</sup>	1
CAAT-BOX	CAAT	增强子,基本功能元件 <sup>[12]</sup>	15
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	CCTTTT	GA 响应元件 <sup>[13]</sup>	2
GT1GMSCAM4	GAAAAA	盐胁迫响应元件 <sup>[14]</sup>	3
ACGTATERD1	ACGT	干旱胁迫响应元件 <sup>[15]</sup>	3
MYB1AT	WAACCA	MYB 识别位点,ABA 响应元件 <sup>[16]</sup>	3
MYBCORE	CNGTTR	脱水反应元件 <sup>[17]</sup>	3
IBOXCORE	GATAA	光调控元件 <sup>[18]</sup>	5
ABRELATERD1	ACGTG	ABA 响应元件 <sup>[19]</sup>	3
DREDR1ATRD29AB	TACCGACAT	盐、干旱、低温胁迫响应元件 <sup>[20]</sup>	1
CRTDREHVCBF2	GTCGAC	盐、干旱、低温胁迫响应元件 <sup>[21]</sup>	2
W-BOX	TGAC	抗病响应元件 <sup>[22]</sup>	15

## 3 讨论

目前对 *SCL* 基因的表达特征已经在模式植物拟南芥上进行了研究,其中 *AtSCL9* 基因在拟南芥的根、叶、花和幼苗部位均有表达<sup>[23]</sup>。葡萄是多年生藤本植物,试验结果发现 *VvSCL9* 基因在葡萄梢尖、幼叶、成叶、老叶和花序等器官均有表达,而在根部中无明显表达。*VvSCL9* 基因在无核葡萄果实第一次快速生长期有表达,在其余时期无明显表达。*VvSCL9* 基因与 *AtSCL9* 基因的表达特征存在差异,说明 *SCL9* 基因在不同植物之间的表达具有一定的特异性。

*AtSCL3* 在 *RGA* 基因的下游,是拟南芥体内参与 GA 响应的一个正向调控因子,能够增加拟南芥对于 GA 的敏感性<sup>[1]</sup>。本研究前期对另一个葡萄 *SCL* 基因的研究结果表明,*VvSCL14* 基因在无核白鸡心葡萄果实经 GA<sub>3</sub> 处理后呈现上调表达<sup>[24]</sup>,可以推测为葡萄果实中参与 GA 响应的正向调控因子。对于 *SCL* 基因其他成员在 GA 信号转导中的作用还缺乏深入研究。GA<sub>3</sub> 处理无核葡萄果实后的转录组分析显示,*VvSCL9* 基因不响应外源 GA<sub>3</sub> 的处理。GA<sub>3</sub> 处理 *VvSCL9* 超表达烟草种子后的萌发率结果表明,*VvSCL9* 超表达烟草种子萌发时

对 GA<sub>3</sub> 不敏感。*VvSCL9* 基因对于 GA 的响应情况与 *AtSCL3* 和 *VvSCL14* 基因不同,说明 *SCL* 基因的功能具有差异性。

胡杨 *PeSCL7* 基因在 NaCl 和干旱胁迫处理后出现上调表达,*PeSCL7* 超表达拟南芥在 100 mmol/L NaCl 处理条件下表现出较强的耐盐性<sup>[7]</sup>。盐胁迫处理 *VvSCL9* 超表达烟草的结果表明,在 100 mmol/L NaCl 处理条件下,*VvSCL9* 超表达烟草对盐胁迫表现出了更高的耐受性。这个结果显示,*VvSCL9* 基因与胡杨 *PeSCL7* 基因类似,能够提高转基因植物的耐盐性。*VvSCL9* 基因对于其他环境胁迫的响应情况还有待进一步研究验证。

通过对葡萄 *VvSCL14-LIKE* 基因启动子的研究发现,该启动子能够响应 GA<sub>3</sub>、干旱和盐胁迫处理<sup>[25]</sup>。本试验克隆的 *VvSCL9* 启动子序列具有多个启动子的增强子作用元件和与植物逆境胁迫相关、响应植物激素的作用元件。在 *VvSCL9* 启动子作用元件中发现了多个盐胁迫响应元件,与 *VvSCL9* 转基因烟草对盐胁迫处理的响应结果成同向性。*VvSCL9* 基因和 *VvSCL14-LIKE* 基因具有类似的功能,显示这 2 个基因在功能上可能具有一定的重叠性。

综上,本研究对 *VvSCL9* 基因在葡萄不同组织

部位的表达情况和 *VvSCL9* 启动子的生物信息学进行了分析,对 *VvSCL9* 基因对环境胁迫和 GA<sub>3</sub> 处理的响应进行了探索。*VvSCL9* 基因在葡萄植株和果实的发育过程中存在差异表达,超表达 *VvSCL9* 能够降低转基因烟草种子对于 GA 的敏感性,提高转基因烟草对盐胁迫的敏感性,但在葡萄幼果中 *VvSCL9* 的转录水平不响应外源 GA<sub>3</sub> 处理。本研究结果为进一步探索葡萄 *SCL* 基因家族在果实生长发育、GA 信号转导和植株响应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] Fode B, Siemsen T, Thurow C, et al. The *Arabidopsis* GRAS protein *SCL14* interacts with class IITGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters [J]. The Plant Cell, 2008, 20: 3122-3135
- [7] 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
- [8] 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
- [9] 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
- [10] Prestridge D S. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements [J]. CABIOS, 1991, 7: 203-206
- [11] 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
- [12] Vicente-Carbajosa J, Moose S P, Parsons R L, et al. A maize zinc-finger protein binds the prolamins box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2 [J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94: 7685-7690
- [13] 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
- [14] Park H C, Kim M L, Kang Y H, et al. Pathogen and NaCl-induced expression of the *SCaM-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
- [15] 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
- [16] Abe H, Urao T, Ito T, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in signaling [J]. Plant Cell, 2003, 15: 63-78
- [17] 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
- [18] Terzaghi W B, Cashmore A R. Light-regulated transcription [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1995, 46: 445-474
- [19] 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
- [20] Benedict C, Skinner J S, Meng R, et al. The CBF1-dependent low temperature signalling pathway, regulation and increase in freeze tolerance are conserved in *Populus* spp [J]. Plant, Cell and Environment, 2006, 29: 1259-1272
- [21] Xue G P. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature [J]. Plant J, 2003, 33: 373-383
- [22] Eulgem T, Rushton P J, Schmelzer E, et al. Early nuclear events in plant defence signalling: Rapid gene activation by WRKY transcription factors [J]. EMBO J, 1999, 18: 4689-4699
- [23] Mi-Hyun Lee, Bohye Kim, Sang-Kee Song, et al. Large-scale analysis of the GRAS gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 2008, 67: 659-670
- [24] 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
- [25] 陈立勇, 柴丽娟, 陈尚武, 等. 葡萄 *SCARECROW Like 14-Like* 基因的表达特征及胁迫响应研究 [J]. 中国农业大学学报, 2014, 19(3): 80-87