

高世敏,董 阳,王 武,等. 葡萄赤霉素合成关键基因 *VvGA20ox2* 的克隆、亚细胞定位和表达分析[J].江苏农业学报,2018,34( 6 ):1331-1338.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.019

## 葡萄赤霉素合成关键基因 *VvGA20ox2* 的克隆、亚细胞定位和表达分析

高世敏, 董 阳, 王 武, 陶建敏

(南京农业大学园艺学院,江苏 南京 210095)

**摘要:** 本研究建立在对金手指葡萄果形转录组分析的基础上,通过分析样品间表达差异发现,与对照相比,*GA20ox2* 基因的转录水平在  $GA_3$  处理后有显著差异。为了进一步从分子水平阐述 *GA20ox2* 在赤霉素合成途径中的作用机理,本研究以金手指葡萄幼果为材料,克隆了 *GA20ox2* 基因,分析了此基因碱基序列特征,并通过构建融合表达载体对其进行亚细胞定位分析。研究表明,克隆了葡萄赤霉素合成途径中的 *VvGA20ox2* 基因,测序得 CDS 全长为 1 134 bp,编码 377 个氨基酸。*VvGA20ox2* 编码的氨基酸序列与 NCBI 上其他物种 *GA20ox* 序列相似性在 51%~67%,其中该基因与可可(EOX92603.1)和杨树(PNT28192.1)的亲缘关系较近。该基因定位在细胞核和细胞膜中。外源  $GA_3$  处理后的成熟葡萄果实与对照相比纵径显著伸长,且在幼果中该基因表达量在一段时间内明显上升,推测 *VvGA20ox2* 基因可能参与葡萄果形拉长的调控。

**关键词:** 葡萄; 赤霉素; *VvGA20ox2*; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: S663.103.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2018)06-1331-08

## Cloning, subcellular localization and expression analysis of the key gene *VvGA20ox2* in gibberellin synthesis of grapevine

GAO Shi-min, DONG Yang, WANG Wu, TAO Jian-min

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

**Abstract:** In this study, based on the transcriptome analysis of grape berry shape change, it was found that there was a significant expression difference among samples in the transcriptional level of the *GA20ox2* gene after gibberellin ( $GA_3$ ) treatment compared with the control. In order to study molecular mechanism of *GA20ox2* in GA biosynthesis pathway, *VvGA20ox2* gene was cloned from Golden Finger grape. The base sequence characteristics of *GA20ox2* gene were analyzed, and subcellular localization analysis was performed by constructing a fusion expression vector. The results showed that the *VvGA20ox2* gene related to gibberellin synthesis pathway was successfully cloned, and the total length of CDS was 1 134 bp, and 377 amino acids were encoded. The sequence similarity of *VvGA20ox2* to other nine species *GA20ox* protein sequences in NCBI was 51%~67%, it had closer relationship with cacao (EOX92603.1) and poplar (PNT28192.1). The *VvGA20ox2* gene was located in both the plasma membrane and nucleus. The longitudinal diameter of mature grape berries treated with  $GA_3$  was significantly longer than that of the control, and the expression level of *VvGA20ox2* gene in young fruit increased significantly.

It is speculated that the *VvGA20ox2* gene may be involved in the regulation of grape shape.

**Key words:** *Vitis vinifera*; gibberellin ( $GA_3$ ); *VvGA20ox2*; subcellular localization; expression analysis

收稿日期: 2018-03-18

基金项目: 国家现代农业葡萄产业技术体系项目(CARS-29); 国家“948”重点项目(2016-X19); 江苏省农业重大新品种创制项目(PZCZ201723)

作者简介: 高世敏, (1992-) 男, 山西临汾人, 硕士研究生, 主要从事果树生理与分子技术研究。(E-mail) 547579531@qq.com

通讯作者: 陶建敏, (E-mail) tjm266@sina.com

赤霉素作为一种植物内源激素, 在种子的萌发, 茎和根的伸长, 叶片伸展, 花和果实的发育等植物生

长的整个生命周期起着重要的调控作用<sup>[1-7]</sup>。目前关于赤霉素生物合成路径的研究已趋于完善<sup>[8-11]</sup>,此过程需要多种酶参与完成,包括参与GA合成早期步骤的一些酶,如古巴焦磷酸合成酶(CPS)、内根-贝壳杉烯合成酶(KS)、内根-贝壳杉烯氧化酶(KO)和内根-贝壳杉烯酸氧化酶(KAO)及参与后期步骤的一些酶,如GA20-氧化酶(GA20ox)、GA3 $\beta$ 羟甲基化酶(GA3ox)和GA2-氧化酶(GA2ox),其中,CPS、GA20ox和GA3ox被认为是整个赤霉素的生物合成过程中起关键作用的酶,GA20ox的主要作用是通过多步反应将GA<sub>12</sub>和GA<sub>53</sub>催化合成GA<sub>9</sub>和GA<sub>20</sub>,从而形成有生物活性的GAs<sup>[12-13]</sup>。

葡萄是世界上广泛种植的果树之一,中国的鲜食葡萄产量占全球葡萄产量的14%<sup>[14]</sup>,金手指葡萄(Golden Finger, *V. vinifera* L.  $\times$  *V. labrusca* L.)为鲜食葡萄的一种,甘甜爽口,有浓郁的冰糖味和牛奶味,且果粒形状奇特美观,深受广大消费者喜爱。由于自然环境及自身生长因素的影响,在成熟时葡萄果粒往往形态大小不一致,造成商品质量下降。为了更加有效地提高生产质量,开展葡萄果实形状的研究变得尤为重要。传统的改良果实形状的育种方法主要是杂交实生选种,这需要较长的时间和较大的种植规模<sup>[15]</sup>。目前生产上多使用植物生长调节剂调节果实发育,改善果实品质,外源赤霉素(GA<sub>3</sub>)作为一种重要的生长调节剂,在果实的发育及膨大方面起着重要作用,可调节果实形状<sup>[16-18]</sup>。有研究结果表明外源GA<sub>3</sub>处理对葡萄的果形指数影响较大,郑焕等<sup>[17]</sup>发现钟山红葡萄果形指数随着盛花期使用GA<sub>3</sub>浓度的增加而增大,当浓度达到一定值后,果形指数并无显著提高。但赤霉素调节葡萄果实形状的分子机制仍不清楚,GA20ox作为赤霉素合成过程中的关键酶,可能调节果实发育,影响葡萄果形变化。染色质免疫共沉淀表明*AtGA20ox1*基因作为*AtOFPI*的靶基因调控着果实的发育,*AtOFPI*转录因子通过抑制*AtGA20ox1*的表达,从而抑制下胚轴细胞的生长,产生矮小的植株表型,过量表达*AtOFPI*的拟南芥角果纵径变短<sup>[19]</sup>。目前在葡萄中关于GA20ox2基因的研究主要集中在GA20ox在赤霉素合成过程中的调控,因此探讨GA20ox2基因在葡萄果实形状上的作用具有重要的实际意义和参考价值。

针对金手指葡萄果形的特异性,掌握合适的GA<sub>3</sub>处理时间及浓度对果实的生长及形状的一致性尤为关键,本试验以金手指葡萄盛花后7d的幼果为材料,克

隆出*VvGA20ox2*基因,对其进行序列特征及表达分析,以期从分子水平上初步了解赤霉素调控葡萄果实发育机理,为葡萄果形方面的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于2017年5月在南京农业大学汤山葡萄试验基地进行。供试品种为5年生金手指葡萄,采用平棚架避雨栽培,株行距为3.0 m $\times$ 6.0 m, T型架,常规田间管理。

### 1.2 试验方法

1.2.1 田间处理 选取3株长势一致的金手指葡萄树,为了增强试验的可靠性,在处理前统一修剪花序,序尖留约4 cm,试验进行3次生物学重复,在每株树的两臂分别为处理组和对照组。以每个花序一半以上的小花开放时期作为盛花期,在盛花后7 d,用质量浓度为25 mg/L的赤霉素溶液对幼果进行浸泡处理,处理时间大约为10 s,以清水处理作为对照(CK)。

1.2.2 样品采集 分别采集处理后1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 5个时期的对照组及处理组葡萄果实样品,从3次生物学重复的植株上随机采集,取样时兼顾阴阳两面,用液氮速冻,带回实验室,保存于-80℃冰箱中待用。果实成熟时,在处理组和对照组中各选取30粒果粒用冰盒带回实验室,测量其纵横径。

1.2.3 RNA的提取及cDNA第一条链的合成 采用多糖多酚植物组织总RNA提取试剂盒(成都福际公司产品)提取上述各时期样品的总RNA,利用反转录试剂盒PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa公司产品)反转录合成cDNA第一条链,稀释后的cDNA用于实时荧光定量PCR。

1.2.4 *VvGA20ox2*基因ORF的克隆及生物信息学分析 根据已知RNA-seq测序结果,在NCBI中查找到GA20ox2在葡萄中的预测序列(XP\_002266536.1),其CDS区在GenBank的登录号为KC898186,利用DNAMAN 8.0设计特异性引物M1(表1),以盛花后7d果实cDNA为模版,进行PCR扩增,反应体系(25.0  $\mu$ l)为:稀释后的cDNA 1.0  $\mu$ l, 5 $\times$ PrimeSTAR GXL buffer 5.0  $\mu$ l, dNTP mixture 2.0  $\mu$ l, PrimeSTAR GXL DNA polymerase 0.5  $\mu$ l, 上、下游引物各0.5  $\mu$ l, 灭菌后ddH<sub>2</sub>O 15.5  $\mu$ l; 反应程序:98℃预变性5 min;98℃变性10 s,55℃退火15 s,68℃延伸80 s,35个循环;68℃延伸10 min,4℃

保存。琼脂糖凝胶电泳检测后用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目标片段,并连接到 *pEASY-Blunt* 载体(全式金),转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,阳性克隆鉴定后由擎科公司进行测序。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
M1	ATGGACTCGACTGCCTCAAC	TTATTTGGTTTGAGATGAGAGAGACC
M2	GCTTATGTCTCAGAGAAGG	CTGGAGAGTATCATTATTTGG
M3	CTGCCCTTTCGAAAGATCCC	ATAACGTCATGCATTACATG
actin	TACAATFCCATCATGAAGTGTGATG	TTAGAAGCACTTCCTGTGAACAATG

1.2.5 *VvGA20ox2* 基因的亚细胞定位 通过 Gateway 系统,构建 PMDC43-GFP/*VvGA20ox2* 表达载体。首先将已鉴定测序正确的 *VvGA20ox2* 基因连接到入门级载体 pDONR221,然后使用 BsrGI 将其单酶切线性化,通过同源重组与 PMDC43 载体进行连接,从而完成 PMDC43-GFP/*VvGA20ox2* 瞬时表达载体的构建,最后将获得的连接产物转化到 EHA105 农杆菌感受态细胞中,经 PCR 扩增(引物 M3 见表 1)筛选阳性克隆,并对阳性克隆进行测序验证正确后,进行烟草瞬时侵染试验。

农杆菌介导重组载体的烟草瞬时转化及激光共聚焦扫描显微镜观察亚细胞定位的方法参考已有报道<sup>[20]</sup>进行。

1.2.6 *VvGA20ox2* 基因的表达分析 根据 *VvGA20ox2* 基因碱基序列设计实时荧光定量 PCR 特异引物 M2(表 1),以葡萄 *Actin*(XM\_002265440)作为内参基因。PCR 反应体系(20.0  $\mu$ l)为: cDNA 1.2  $\mu$ l, 2 $\times$ SYBR Premix *Ex Taq* TM (TaKaRa 公司)10.0  $\mu$ l,上、下游引物各 0.4  $\mu$ l,灭菌后 ddH<sub>2</sub>O 补足至 20.0  $\mu$ l。反应程序为:95  $^{\circ}$ C 4 min;95  $^{\circ}$ C 20 s,60  $^{\circ}$ C 20 s,72  $^{\circ}$ C 40 s,40 个循环。每个样品设 3 次重复,采用 ABI7300system 软件和  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ <sup>[21]</sup> 方法分析数据。

1.2.7 果实纵、横径的测量及果形指数的计算 果实成熟后,每个处理各取 30 个有代表性的果粒,用电子游标卡尺测量其纵、横径,计算果形指数。数据采用 SAS 9.1 软件进行方差分析。

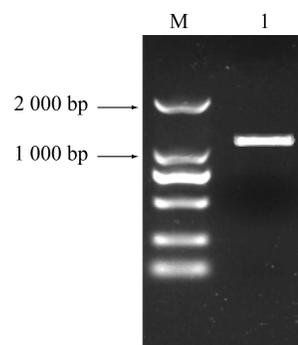
## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄 *VvGA20ox2* 基因的克隆

根据先前 RNA-seq 研究结果中选择差异表达基

因 *VvGA20ox2* 基因编码的氨基酸序列、蛋白质分子量和等电点等理化性质及结构进行预测分析,利用 MEGA5.0 软件进行同源性分析和系统进化树构建。

因 *GA20ox2*,在 NCBI 中获得此基因的预测序列。以盛花后 14 d 金手指葡萄幼果为材料,扩增出一条 1 000 bp 左右的片段(图 1)。测序并通过 DNAMAN 软件将得到的序列与预测序列(XP\_002266536.1)进行比对发现,CDS 序列长度一致,长度为 1 134 bp。第 547 位核苷酸发生突变,由 TGG 变成 AGG,其编码氨基酸由色氨酸变成精氨酸(图 2)。

M:DL2000 market;1: *VvGA20ox2* 基因片段扩增产物。图 1 *VvGA20ox2* 基因扩增结果Fig.1 Amplification of *VvGA20ox2* gene

### 2.2 葡萄 *VvGA20ox2* 蛋白生物信息学分析

2.2.1 *VvGA20ox2* 蛋白的理化性质分析 *VvGA20ox2* 基因编码 377 个氨基酸,包含 51 个酸性氨基酸(Asp+Glu),49 个碱性氨基酸(Arg+Lys),编码产物相对分子量为 42 788.605,等电点为 6.93,蛋白质的不稳定性系数是 32.8,平均亲水系数为 -0.649,属于亲水蛋白质。

2.2.2 *VvGA20ox2* 蛋白的疏水性、信号肽和跨膜结构分析 疏水性分析结果表明,*VvGA20ox2* 蛋白没有明显的疏水性区域,属于亲水蛋白。TMHMM Servcecr v.2.0 分析结果表明,*VvGA20ox2* 蛋白没有

```

1   ATGGACTCGAGTGCCTCAACTATTCTCATGCCTCCTCCACTGGAGCTTAAGGATGAGAGG
   M D S S A S T I L M P P P L E L K D E R
61  AAAAAAGGAAGTGGTGGTTTTGACTCATCTAAGATGCAAAAACAAGAGAAGTTGCCAACA
   K K G S V V F D S S K M Q K Q E K L P T
121 GAATTCATTGGCCTGATGCGGATTTAGTTCGGGCCCAACAAGAGCTTAACGAACCTTG
   E F I W P D A D L V R A Q Q E L N E P L
181 ATAGACTTGGATGGATTCTCAAAGGTGATGAGGCTGCAACTGCCCATGCCGTGAGCTT
   I D L D G F F K G D E A A T A H A A E L
241 ATCAGGATGGCTTGTGAACCATGGCTTC TTCCAAGTTACCAACCATGGCGTCGACCTA
   I R M A C L N H G F F Q V T N H G V D L
301 GATCTTATCCGTGCTGCACAGGAAGACATGGCGCTTCTTCAAGCTGCCATTGAGCAGG
   D L I R A A Q E D M G A F F K L P L S R
361 AAGCTCAGTGTCAAGAAGAAGCCTGGCGAATTGTCAGGTTATTCGGGTGCCCATGCGGAT
   K L S V K K K P G E L S G Y S G A H A D
421 CGGTACACTTCTAAGCTGCCGTGGAAGGAGACACTTTCTTTGTCTATTGTTATGATAGT
   R Y T S K L P W K E T L S F V Y C Y D S
481 GGTCCAAGCCCATGGTAGCTGATTATTTCAAACTGCCTTAGGTGAAGACTTTGAACAG
   G S K P M V A D Y F K T A L G E D F E Q
541 ATAGGCAAGGATTATCAGAAATACTGTGACGCATTGAAGGAGCTGTCTTAGGGATTATG
   I G I Y Q K Y C D A L K E L S L G I M
601 CAACTCTTGGCAATTAGCTTGGATGGATAGTCTACTACAGGAAATATTTGAAGAT
   Q L L A I S L D V D S S Y Y R K L F E D
661 GGTACTCAATTATAGGTGCAACTCTATCCACTTGCAAAGAAGCTG GCCTTGTGATG
   G Y S I M R C N S Y P P C K E A G L V M
721 GGCACCGCCCTCACTGCGACCCAGTGGCTCTAACAATTCTCATCAAGACCAAGTAAA
   G T G P H C D P V A L T I L H Q D Q V K
781 GGCCTAGAAGTTTTGTGGATAACAAATGGCAATCTGTCAAACCTCGACCCGGTCCCTG
   G L E V F V D N K W Q S V K P R P G A L
841 GTGGTTAACATTGGTGACACTTTCATGGCACTATCCAATGGAAAATACAAGAGCTGTATA
   V V N I G D T F M A L S N G K Y K S C I
901 CATAGGGCTGTGGTGAACATGGACAAAGAGAAGATCATTGACCTTCTTATGAGCCCG
   H R A V V N M D K E R R S L T F F M S P
961 AAAGACGACAAGTGGTGGAGTCCGCCACAGGAGCTTATTGTCAGAGAAGGGCCAAGGAAG
   K D D K V V S P P Q E L I V R E G P R K
1 021 TACCGGACTTCAAATGGTCAGAATTGTTGGAGTCACTCAGAGCACTATAGACCCAAT
   Y P D F K W S E L L E F T Q K H Y R P N
1 081 AATGATACTCCAGAGCTTTGTGGAATGGCGTCTCTCATCTCAAACCAATA A
   N D T L Q S F V E W R L S S Q T K *

```

方框内为突变位点。

图2 *VvGA20ox2* 基因 ORF 及其推导的氨基酸序列

Fig.2 The open reading frame of *VvGA20ox2* and the sequence of deduced amino acid

跨膜区域。利用 SignalP4.0 软件预测信号肽,结果表明 *VvGA20ox2* 蛋白没有信号肽。

2.2.3 *VvGA20ox2* 蛋白的二级结构和卷曲螺旋预测 *VvGA20ox2* 蛋白包含 32.10%的 $\alpha$ -螺旋(Alpha helix),21.49%的 $\beta$ -折叠(Extended strand),10.61% $\beta$ -转角(Beta turn)和 35.81%的无规则卷曲(Random coil),利用在线网站 Net NES1.1 预测 *VvGA20ox2* 蛋白的 NES,结果表明 *VvGA20ox2* 蛋白仅有 4 个 NES 保守位点,分别是亮氨酸(197,202),异亮氨酸(199,205)。

2.2.4 *VvGA20ox2* 蛋白的系统进化树 在 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 中查找葡萄 *VvGA20ox2* 蛋白的结构域,发现第59~171 氨基酸

位点为 DIOX\_N 结构域,第221~320 位点是 2OG-Fell\_Oxy 结构域。

将 *VvGA20ox2* 蛋白氨基酸序列与其他物种的同源氨基酸序列进行比对(图3),试验结果表明,所有氨基酸序列均含有上述两个结构域,说明 *GA20ox* 蛋白在各个物种中是相对保守的,通过同源性比对分析,发现 *VvGA20ox2* 基因编码的氨基酸序列与多种植物 *GA20ox* 氨基酸序列相似性在51%~67%,其中,与可可(EOX92603.1)和杨树(PNT28192.1)的同源性较高,分别达到 65%和 67%,与草莓(ABB00359.1)、番茄(NP\_001234070.1)、拟南芥(AGW24332.1)、水稻(AER45797.1)、玉米(AQK99102.1)、烟草(XP\_016471245.1)的同源性分别为 53%、55%、53%、55%、



54%、56%，而与小麦 (CFV04355.1) 的同源性为 51%。系统进化树分析结果表明 (图 4)，葡萄 VvGA20ox2 蛋白与可可和杨树亲缘关系较近，与模

式植物拟南芥、番茄等植物亲缘关系较远，系统进化树与物种进化关系一致。

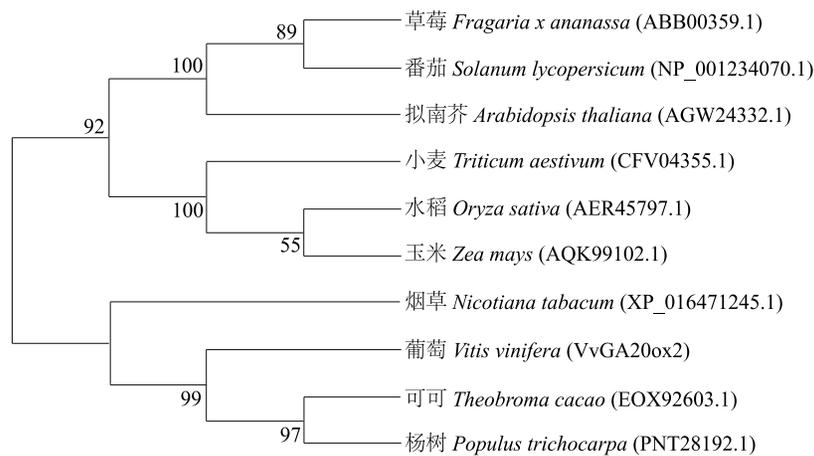


图 4 葡萄 VvGA20ox2 与其他物种 GA20ox 蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of VvGA20ox2 in grapevine and the GA20ox protein amino acid sequence in other species

### 2.3 VvGA20ox2 蛋白亚细胞定位

为探索 VvGA20ox2 基因所编码蛋白在植物亚细胞结构中的分布情况，进一步构建了 VvGA20ox2 的瞬时表达载体 35S-VvGA20ox2-GFP，并将其转化到烟草细胞内，借助绿色荧光蛋白来确定目标蛋白在细胞内的分布情况。利用农杆菌介导法转化烟草细胞，在感染后将烟草暗培养 3 d 后，制作临时切片，用激光共聚焦扫描显微镜观察绿色荧光蛋白信号。结果显示，PMDC43-GFP 空载体在整个细胞范围内都显示出绿色荧光信号 (图 5)，而瞬时表达载体 35S-VvGA20ox2-GFP 表达的融合蛋白不仅在细胞核上有荧光信号，在细胞膜上也可观察到绿色荧光 (图 5)。

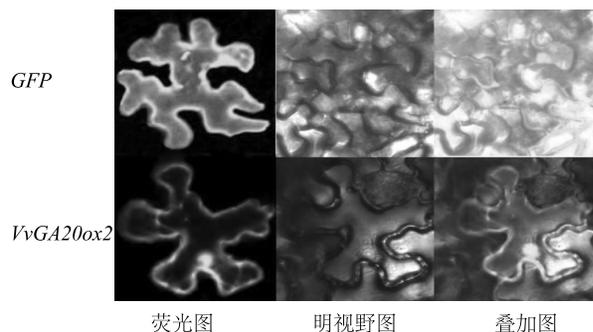


图 5 VvGA20ox2 在烟草表皮细胞中的亚细胞定位

Fig.5 Subcellular localization of VvGA20ox2 in tobacco epidermal cells

### 2.4 VvGA20ox2 基因在 GA<sub>3</sub> 处理后表达分析

GA<sub>3</sub> 处理后不同时期金手指葡萄果实 VvGA20ox2 基因表达实时荧光定量分析结果显示 (图 6)，在 GA<sub>3</sub> 处理后第 1 d，VvGA20ox2 基因处理组的 VvGA20ox2 基因表达量显著低于对照，呈现显著下降趋势。随后在 GA<sub>3</sub> 处理后第 2 d，处理组 VvGA20ox2 基因表达急速上升，在第 3 d 时相对表达量达到最高。在 GA<sub>3</sub> 处理后第 7 d，此基因表达水平与对照相比差异较小，在 GA<sub>3</sub> 处理后第 14 d 几乎检测不到该基因的表达。

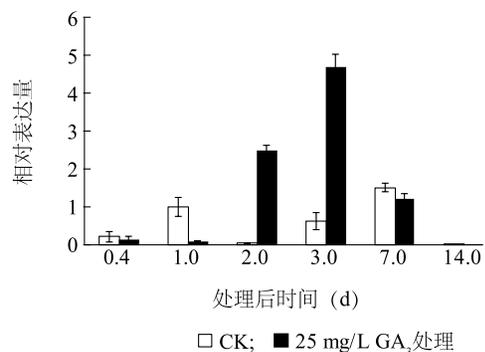


图 6 VvGA20ox2 基因在赤霉素处理的金手指葡萄果实中不同时期的表达水平

Fig.6 Expression level of VvGA20ox2 gene of Gold Finger grape treated by gibberellin at different development stages

## 2.5 果粒纵、横径及果形指数

葡萄果粒纵径在赤霉素处理下相比对照均有增长,且差异极显著(表2)。GA<sub>3</sub>处理下葡萄果粒横径增大,相比对照差异不显著,25 mg/L赤霉素处理后果形指数与对照差异极显著,说明葡萄果形发生显著变化。

表2 赤霉素处理对果粒形状的影响

Table 2 Effect of gibberellin treatment on fruit shape

处理	果粒横径 (mm)	果粒纵径 (mm)	果形指数
CK	16.31Aa	32.22Aa	1.97Aa
25 mg/L GA <sub>3</sub> 处理	16.41Aa	42.87Bb	2.61Bb

同列数据不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

在赤霉素生物合成途径中,参与GA合成早期步骤的一些酶由单基因编码,而参与后期步骤的一些酶则由多基因家族编码。目前,许多赤霉素合成代谢中的关键基因在葡萄上已经被克隆并进行了研究<sup>[22-24]</sup>,GA20ox家族基因是植物体内合成活性赤霉素的关键基因,在活性赤霉素的合成过程起着极其重要的作用。在葡萄中关于GA20ox2基因的研究多集中于对赤霉素合成的调控,主要研究赤霉素处理葡萄在不同花期 *VvGA20ox3* 表达的变化<sup>[25]</sup>。改变基质浓度研究GA20ox2对其基因调控产物GA<sub>12</sub>合成的影响<sup>[26]</sup>,及在不同品种中的GA20ox家族的组织特异性表达差异<sup>[27]</sup>,并未深入探讨GA20ox2基因在赤霉素调控合成中的作用对果实形状的影响。本试验通过对金手指葡萄果形转录组的分析,找到差异表达基因 *VvGA20ox2*,并在金手指葡萄中克隆出 *VvGA20ox2* 基因,与NCBI中预测基因相比,该基因发生点突变,但突变位点不在功能结构域内,这可能是由于测序品种和试验品种不同造成的。多序列比对和系统发育树分析结果显示,在葡萄、杨树、番茄、拟南芥、水稻、烟草、可可、小麦、草莓和玉米等10种植物中, *VvGA20ox2* 基因与杨树同源基因亲缘关系最近,并且在10种植物中具有相似的保守结构域,说明GA20ox2基因功能是相对保守的。

农杆菌介导法转化烟草细胞瞬时表达结果显示, *VvGA20ox2* 蛋白同时定位在细胞核和细胞膜中,说明此基因编码的产物不仅在细胞核上有功能,而

且在细胞膜上起作用。由于膜上的蛋白质主要有载体蛋白、与细胞活动相关的离子泵、通道蛋白和蛋白受体等,因此 *VvGA20ox2* 的编码产物对细胞质膜的稳定或控制蛋白转运具有一定的作用<sup>[28]</sup>。与 *VvGA20ox1* 蛋白定位结果一致<sup>[22]</sup>,推测可能发挥相似的功能。

利用外源GA对花序和幼果处理可有效地提高果实品质,促进果实发育及膨大,在许多果树生产中应用广泛。本试验采用外施GA<sub>3</sub>处理葡萄幼果,在果实成熟时,处理后的果实纵径显著增长,与对照相比,果形发生明显变化。为了进一步了解 *VvGA20ox2* 基因在调节葡萄果形方面的功能,试验利用实时荧光定量PCR技术对该基因在处理与对照样品间的表达特性进行了分析,试验结果表明,在GA<sub>3</sub>处理后1d内, *VvGA20ox2* 的表达受到抑制,其原因可能在于GA20ox2基因的转录水平受到GAs初期的反馈调节影响。由于施用了外源GA使得果实内GA含量增高,进而抑制了该基因的表达,这与GA应答系统与活性GA含量之间存在着前馈和反馈调节的关系相一致,在GA<sub>3</sub>处理1d后表达量迅速升高,并在第3d达到峰值。在拟南芥中, *AtGA20ox1* 和 *AtGA20ox2* 基因可以促进下胚轴生长及角果的伸长<sup>[29]</sup>,推测 *AtGA20ox* 同源基因 *VvGA20ox2* 可能参与了葡萄果形拉长的调控,从而促进果实的生长,产生长形果实。在GA<sub>3</sub>处理后第7d,基因的表达逐渐下降,在第14d几乎没有表达,可能与赤霉素的作用减弱有关。有研究结果表明,外源GA<sub>3</sub>的作用效果可以持续7~15d<sup>[30]</sup>。

关于GA<sub>3</sub>对葡萄果实形状的调控作用,研究仍未深入,从拟南芥果形相关的研究中可知, *AtGA20ox1* 基因作为 *AtOFPI* 的靶基因调控着果实的发育,影响植株大小。本试验从葡萄活性赤霉素合成中关键活性基因的序列功能及表达进行了分析,通过GA<sub>3</sub>处理后GA20ox2基因在幼果中的表达变化,调节内源赤霉素含量,从而影响果实发育,控制果形变化。同时,推测GA20ox2基因可能作为控制果形 *OVATE* 基因的靶基因调控果实发育,影响果实形状,但具体的调控机制仍不清楚,需要后续试验验证两者的关系,关于GA20ox2基因的在果形上的功能需要通过基因沉默和超表达进一步研究。

## 参考文献:

- [1] HEDDEN P, KAMIYA Y. Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes

- and their regulation[J]. Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 1997, 48: 431-460.
- [2] 葛长军, 闫良, 徐丽荣. 赤霉素处理对黄瓜雌性系的诱雄效果[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(5): 111-114.
- [3] ERIKSSON S, BÖHLENIUS H, MORITZ T, et al. GA<sub>4</sub> is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation[J]. Plant Cell, 2006, 18(9): 2172-2181.
- [4] 林玲, 白先进, 张瑛, 等. 赤霉素对巨峰葡萄冬果花序拉长效果及果实品质的影响[J]. 南方农业学报, 2017, 48(6): 1031-1035.
- [5] HARTWECK L M, OLSZWSKI N E. Rice GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 is a gibberellins receptor that illuminates and raises questions about GA signaling[J]. The Plant Cell, 2006, 18(2): 278-282.
- [6] 黄桃鹏, 李媚娟, 王睿, 等. 赤霉素生物合成及信号转导途径研究进展[J]. 植物生理学报, 2005, 51(8): 1241-1247.
- [7] 陈峰源, 王先俱, 陈亚君, 等. 赤霉素对杂交粳稻组合孕穗期生育进程的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 92-94.
- [8] 张晓莹, 宋长年, 房经贵, 等. 赤霉素的生物合成及其在葡萄栽培上的应用[J]. 浙江农业科学, 2011(5): 1015-1018.
- [9] 熊书. 赤霉素的生物合成和信号转导研究进展[J]. 教育教学论坛, 2015(16): 95-96.
- [10] 虞慧芳, 曹家树, 王永勤. 植物矮化突变体的激素调控[J]. 生命科学, 2002, 14(2): 85-88.
- [11] HEDDEN P. Recent advances in gibberellin biosynthesis[J]. Journal of Experimental Botany, 1999, 50(334): 553-563.
- [12] 黄先忠, 蒋才富, 廖立力, 等. 赤霉素作用机理的分子基础与调控模式研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(5): 499-510.
- [13] 石琰璟, 沙广利, 束怀瑞. 赤霉素生物合成及其分子机理研究进展[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1482-1489.
- [14] KHALILURREHMAN M, SUN L, LI C X, et al. Comparative RNA-seq based transcriptomic analysis of bud dormancy in grape[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 18.
- [15] 柴丹丹. 黄瓜果实圆形性状的 SRAP 分子标记[D]. 西北农林科技大学, 2008.
- [16] WANG Z, ZHAO F, ZHAO X, et al. Proteomic analysis of berry-sizing effect of GA<sub>3</sub> on seedless *Vitis vinifera* L. [J]. Proteomics, 2012, 12(1): 86-94.
- [17] 郑焕, 季晨飞, 陶建敏. GA<sub>3</sub> 和 CPPU 对钟山红葡萄果实品质的影响[J]. 中国南方果树, 2013, 42(1): 22-24.
- [18] WANG S, CHANG Y, GUO J, et al. Arabidopsis ovate family protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation[J]. Plant Journal, 2007, 50(5): 858-872.
- [19] TOYOOKA K, GOTO Y, ASATSUMA S, et al. A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to plant cell exterior[J]. Plant Cell, 2009, 21(4): 1212-1229.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta delta C(T)</sup> method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] 王西成, 任国慧, 房经贵, 等. 葡萄赤霉素合成相关基因克隆、亚细胞定位和表达分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(11): 2224-2231.
- [22] 王西成, 吴伟民, 房经贵, 等. 葡萄赤霉素受体基因 *VvGID1A* 的分离、亚细胞定位及表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(5): 839-848.
- [23] 刘炳臣, 王茜, 王跃进, 等. 葡萄活性赤霉素合成关键基因 *VvGA3ox* 家族的克隆和表达分析[J]. 园艺学报, 2016, 43(12): 2293-2303.
- [24] JUNG C J, HUR Y Y, JUNG S M, et al. Transcriptional changes of gibberellin oxidase genes in grapevines with or without gibberellin application during inflorescence development[J]. Plant Res, 2014, 127(2): 359-371.
- [25] GIACIMELLI L, ROTA-STABELLI O, MASUERO D, et al. Gibberellin metabolism in *Vitis vinifera* L. during bloom and fruit-set: functional characterization and evolution of grapevine gibberellin oxidase[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(14): 4403-4419.
- [26] ATIAGO K, ACHEAMPONG, CHUANLIN ZHENG, et al. Abnormal endogenous repression of GA signaling in a seedless table grape cultivar with high berry growth response to GA application[J]. Frontier in Plant Science, 2017, 8: 850.
- [27] 邢浩然, 刘丽娟, 刘国振. 植物蛋白质的亚细胞定位研究进展[J]. 华北农学报, 2006, 21(增刊): 1-6.
- [28] KING K E, MORITZ T, HARBERD N P. Gibberellins are not required for normal stem growth in Arabidopsis thaliana in the absence of GAI and RGA[J]. Genetics, 2001, 159(2): 767-776.
- [29] RIEU I, RUIZ-RIVERO O, FERNANDEZ-GARCIA N, et al. The gibberellin biosynthetic genes *AtGA20ox1* and *AtGA20ox2* act, partially redundantly, to promote growth and development throughout the Arabidopsis life cycle[J]. The plant journal, 2008, 53(3): 488-504.
- [30] 陶建敏, 韩传光, 章镇, 等. GA<sub>3</sub> 在葡萄生产上的应用[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2003(6): 33-35.

(责任编辑: 姜华珏)