

袁 苗, 刘 鑫, 党仕卓, 等. 红地球葡萄生长素响应因子 *VvARF7* 基因克隆及其光响应分析[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(4): 1052-1061.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2023.04.015

红地球葡萄生长素响应因子 *VvARF7* 基因克隆及其光响应分析

袁 苗, 刘 鑫, 党仕卓, 黄嘉俊, 高迎东, 周 娟, 张亚红
(宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 生长素是一类重要的植物内源激素, 在植物的生长发育过程中具有重要作用, 而生长素响应因子 (ARF) 是一类受生长素调节的转录因子, 在生长素信号调控途径中起重要作用。因此, 本研究以设施栽培的红地球葡萄 *VvARF7* 基因为对象, 对其进行生物信息学及在红蓝光处理下的表达响应分析, 为进一步研究其作用机制提供参考。结果显示, *VvARF7* 基因全长 3 468 bp, 编码 1 155 个氨基酸, 相对分子质量为 12 958, 蛋白质等电点为 6.66。VvARF7 与河岸葡萄 VrARF7-like 亲缘关系最近, 为亲水蛋白质; 二级结构中 β -转角占 8.14%, 延伸链占 14.63%, α -螺旋占 27.27%, 无规则卷曲占 49.96%, 属于核定位蛋白质。启动子序列分析结果表明, *VvARF7* 主要包括激素应答和光调控顺式作用元件。qRT-PCR 结果表明, 在花芽分化过程中处理组 *VvARF7* 相对表达量在 5 月 30 日-8 月 15 日低于对照组, 花芽分化后期 (6 月 30 日-7 月 30 日) 在处理组中的相对表达量显著低于对照组。由此推测 *VvARF7* 响应红蓝光 (4:1) 参与葡萄花芽分化过程的调控。

关键词: 红地球葡萄; 生长素响应因子 (ARF); 基因克隆; 瞬时表达; 基因表达

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)04-1052-10

Cloning of Red Earth grape auxin response factor *VvARF7* and its light response analysis

YUAN Miao, LIU Xin, DANG Shi-zhuo, HUANG Jia-jun, GAO Ying-dong, ZHOU Juan, ZHANG Ya-hong
(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Auxin is a kind of important plant endogenous hormones which plays important roles in the growth and development of plants. Auxin reaction factor (ARF) is a kind of transcription factors regulated by auxin and plays an important role in the auxin signaling pathway. Therefore, *VvARF7* gene in facility cultivated Red Earth grape was used as the object in this study, bioinformatics analysis and expression response analysis under red and blue light treatment were made to provide reference for further study of the action mechanism. The results showed that, the *VvARF7* gene was 3 468 bp in full-length, encoded 1 155 amino acids, the relative molecular mass was 12 958, the protein isoelectric point was 6.66. VvARF7 showed the closest relationship with VrARF7-like of riparian grape, both of them were hydrophilic proteins. In the secondary structure, the β -angle accounted for 8.14%, the extension chain accounted for 14.63%, the α -spiral accounted for 27.27% and the irregular curl accounted for 49.96%, which indicated that the VvARF7 was nuclear located protein. The analysis results of promoter sequence showed that, *VvARF7* mainly included hormone response and cis-acting elements of light regulation. The qRT-PCR results showed that, during the stage of grape bud differentiation, the relative expression amount of *VvARF7* gene in the treatment group was lower

收稿日期: 2022-08-23

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目 (2021BEF02016)

作者简介: 袁 苗 (1997-), 女, 宁夏固原人, 硕士研究生, 主要从事园艺学研究。 (E-mail) yuanmiao970915@163.com

通讯作者: 张亚红, (E-mail) zhyhcau@sina.com

than that in the control group between May 30th and August 15th. Between June 30th and July 30th, which was the end stage of grape bud differentiation, the relative expression amount of *VvARF7* gene in the treatment group was significantly lower than that in the control group. It is speculated that

VvARF7 responded to the participation of red and blue light (4 : 1) into the regulation of grape bud differentiation.

Key words: Red Earth grape; auxin response factor (ARF); gene cloning; transient expression; gene expression

花芽分化受内部因素(碳水化合物和激素等)和环境因素(光和温度等)相互作用的影响^[1-3]。而光照作为植株生长发育的关键环境因素之一,对植株形态建成、物质组成和新陈代谢及生长发育相关基因的表达都有着巨大的调节作用^[4]。有研究结果表明,植物对红光、蓝光有非常高的生物需求量^[5],红光处理会提高樱桃番茄的单株产量,增加维生素 C、可溶性糖以及番茄红素含量,蓝光处理则会缩短番茄果实转色时间,降低硝酸盐含量^[6]。红/蓝(3 : 1)或红/蓝(1 : 1)组合光处理下番茄幼苗生长健壮,植株的干物质积累量大,果实品质较高,叶片厚度增大且光合作用、荧光特性较强^[7]。红蓝复合光能够促进葡萄的光合作用,且可以增强抗氧化酶活性^[8]。相较于自然光,比例为1 : 4 的蓝红光处理可促进火龙果花芽分化进程,提高花芽成花率与坐果率,从而提高了产量^[9]。红光处理显著增加了铁皮石斛组培苗的根数和鲜质量,而红蓝绿复合光处理既提前了铁皮石斛的花期又提高了开花率^[10]。此外,有研究结果表明,红蓝6 : 1 的组合光可提高不结球白菜和番茄内源激素脱落酸(ABA)、玉米素核苷(ZR)以及生长素(IAA)的含量^[11]。

花芽分化是植物开花的前提,植物激素在这个过程中起调节作用,并在体内具有一定的动态平衡,且通过平衡互作调控参与植物花芽的分化过程,共同调节糖类的积累、运输及分配的各个过程,调控核酸、碳、氮等物质代谢^[12]。生长素作为内源生长调节物质之一,在植物生长发育、阶段转变、成花诱导及花器官发育中扮演重要角色^[13-15]。研究结果表明,IAA 对于花芽生长发育的调控可能涉及参与细胞分裂和增殖的精确调控,而这一调控过程可能诱导更多的花芽形成^[16]。

生长素响应因子(Auxin response factor, ARF)不仅是 IAA 信号调控途径中的重要调控因子,也是调节 IAA 参与植物响应生长素信号及外界环境信号的关键因子^[17]。在大多数植物体内发现了 ARF 家族基因,比如拟南芥^[18]、葡萄^[19]、甜橙^[20]、水稻^[21]、番茄^[22]等植物。ARF 作为 IAA 信号途径的重要调控子,可以同下游生长素响应基因的启动子区域 TGTCTC 或 TGTC-CCAT 结合,从而激活或抑制下游基因的表达,在生长

素信号转导途径中具有关键作用^[23-24]。研究结果表明,ARF 转录因子基因表达量在花芽形成过程中有显著变化,对顶端分生组织的形成有显著作用^[25]。在模式植物拟南芥中的研究发现,*AtARF17* 促进花药发育和花粉管壁形成^[26],*AtARF1* 和 *AtARF2* 参与花器官的发育和凋谢过程等^[17],拟南芥中 *AtARF6* 和 *AtARF8* 能够参与未成熟花雌蕊和雄蕊的发育过程^[27]。桂花发育过程中,*OfARF11*、*OfARF12*、*OfARF13* 和 *OfARF14* 可能对桂花的花期延长起到调控作用,该结果为 ARF 基因调控桂花花期的分子机制奠定基础^[28]。梅花 *PmARF17* 能够促进雌蕊的正常发育^[29]。此外,王景超等^[30]发现,ARF 在玉米雌花序发育的不同时期具有重要调控作用。

在设施栽培葡萄生产中,棚膜的老化,导致膜通透性降低,树木叶片遮光等环境因素会导致栽培设施内出现受光不足、受光不均匀等现象,最终导致葡萄花芽分化不良,影响产量和经济效益^[31-32]。因此,设施增设发光二极管(LED)补光措施有助于葡萄花芽分化,然而具体的分子机制仍有待进一步研究。前期筛选出有利于花芽分化的最佳补光比例为:红光 : 蓝光 = 4 : 1^[31],采取不同时期葡萄花芽进行转录组测序分析发现,*VvARF7* 参与调节花芽分化的激素通路。本研究通过探索 *VvARF7* 基因在花芽分化中的功能,通过对其进行同源克隆、生物信息学和基因表达分析来挖掘该基因的光响应潜力,为后续深入开展葡萄花芽分化的分子机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2021 年 5 月-2021 年 9 月在宁夏银川市贺兰县园艺产业园(106°16'E, 38°20'N)内进行。试验材料为 10 年生设施栽培红地球葡萄,株行距为 0.8 m×1.5 m,每行 6 个生物学重复,行间利用反光膜进行分区。利用课题组前期试验筛选获得的最佳复合光补光比例,红光 : 蓝光 = 4 : 1 (R4B1)处理葡萄,不补光作为空白对照(CK),光周期为 16 h/8 h,补光时间由揭苫升温前至葡萄成熟。花芽采样时期参考路瑶等^[33]对红地球花芽分化时间的划分,于 5 月中旬到 9 月初进行采样,每 15 d 采样 1 次,采取

基部5~7个生长一致的芽,6个生物学重复。采集的葡萄花芽经液氮速冻后立即带回实验室,冻存于超低温冰箱用于后续试验。

RNA的提取、反转录和同源重组试剂盒、限制性内切酶 *Xba* I 和 *Xho* I 均购自诺唯赞生物科技股份有限公司(南京),质粒小提试剂盒、纯化回收试剂盒及大肠杆菌感受态 DH5 α 均购自天根生化科技有限公司(北京)。瞬时表达载体 PBI221-GFP 和根癌农杆菌菌株 EH105 均由宁夏大学贺兰山校区葡萄抗逆分子育种实验室提供。引物合成及测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 基因克隆

葡萄花芽总 RNA 提取参照植物总 RNA 快速分离试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)说明书进行,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,通过 NanoDrop 测定浓度和纯度。参照反转录试剂盒说明书将葡萄花芽总 RNA 反转录为 cDNA,

首先去除基因组 DNA,体系为 5 \times gDNA wiper Mix 2 μ l, RNA 1 000 ng, RNase-free ddH₂O 补齐至 10 μ l; 反应条件:42 $^{\circ}$ C 2 min; cNDA 合成:上一步的混合液 10 μ l, HiScript III Enzyme Mix 2 μ l, Random hexamers 1 μ l, 10 \times RT Mix 2 μ l, Oligo (dT) 20VN 1 μ l, RNase-free ddH₂O 补齐至 20 μ l, 反应条件:37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 15 s, 4 $^{\circ}$ C 5 min。

参考 *VvARF7* 基因编码区序列(CDS)并使用 Primer 8.0 软件设计特异性全长扩增引物 *VvARF7*-F/R (表 1),以红地球葡萄花芽的 cDNA 为模板,使用高保真酶(南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品)进行特异性扩增,扩增体系为:cDNA 2.0 μ l, 上下游引物各 1.0 μ l, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 12.5 μ l, ddH₂O 3.5 μ l。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 上述程序循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 彻底延伸 10 min; 扩增完成后于 4 $^{\circ}$ C 保存用于后续试验。

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Sequence of primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
<i>VvARF7</i> -F	ATGGATCCCATGAAGGAG	编码序列(CDS)扩增
<i>VvARF7</i> -R	GGGTGTGCTGCCGAATCGGC	
Q- <i>VvARF7</i> -F	GCTCTAGAATGAAAGCTCCACCAAATGGGTTTC	实时荧光定量分析
Q- <i>VvARF7</i> -R	GACGTCGACTCGATTAAATGAGGCAGCTGAGGT	
pBI221-GFP- <i>VvARF7</i> -F	GAGAGAACACGGGGGACTCTAGAATGGATCCCATGAAGGAG	亚细胞定位
pBI221-GFP- <i>VvARF7</i> -R	TTACCCATGGTACCCCGCTCGAGGGGTGTTGCTGCCGAATCGGC	
CaMV35S-F	GCTCCTACAAATGCCATCA	农杆菌检测
CaMV35S-R	GATAGTGGGATTGTGCGTCA	
<i>VvActin</i> -F	TCCTTGCCCTTGCGTCATCTAT	内参基因
<i>VvActin</i> -R	CACCAATCACTCTCCTGCTACAA	

1.3 生物信息学分析

用 DNASTAR 软件和美国生物技术信息中心(NCBI)数据库 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 网络服务工具对核苷酸序列进行查询和比对;利用 NCBI 在线软件工具 Conserved Domains Search 预测保守结构域(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>);采用 MEGA 12.0 邻接法(*Bootstrap* 为 1 000)构建系统进化树;在 Ensembl 数据库(<https://asia.ensembl.org/index.html>) 中搜索并下载 *VvARF7* 基因的起始密码子上游 2 000 bp 的启动子

序列,使用在线软件 plantCARE 进行启动子序列分析;采用在线软件 ExPASy Proteomics server (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *VvARF7* 基因编码蛋白质的理化性质;使用 DNAMAN 进行氨基酸序列相似性比对。

1.4 基因表达模式分析

根据葡萄 *VvARF7* 基因 CDS 设计实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)特异扩增引物(表 1)。荧光定量仪为 qTOWER 2.2(德国 Analytik Jena 公司产品),反应总体积为 20 μ l; 2 \times ChamQ universal SYBR qPCR Mas-

ter Mix 10 μ l, cDNA 1 μ l, 上下游引物各 1 μ l, ddH₂O 7 μ l。运行程序为:95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 循环 40 次; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s。

1.5 植物瞬时表达载体构建及亚细胞定位

设计植物过表达载体的特异性引物 pBI221-GFP-*VvARF7*-F/pBI221-GFP-*VvARF7*-R (表 1)。以葡萄花芽的 cDNA 为模板, 利用纯化回收试剂盒回收 *VvARF7* 基因扩增产物和经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切后的线性载体 pBI221-35S-GFP, 通过同源重组法将回收的 PCR 产物与酶切后的线性载体连接, 产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后, 涂布于加有氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养箱内倒置培养 12 h, 挑取单克隆进行菌落 PCR 检测, 检测后, 将正确的单克隆进行扩大培养, 提取质粒, 进行酶切检测, 检测正确的送公司测序。构建好的融合载体 pBI221-GFP-*VvARF7* 通过电激转化法导入到农杆菌 EH105 中, 检测正确的单克隆接种于 50 ml 含有利福平和卡那霉素的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养 16 h, 将菌液收集至 50 ml 离心管中, 3 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入重悬液 [10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 2-吗啉乙磺酸 (MES)], 使用移液枪吹散沉淀, 再次离心 10 min, 弃去上清液, 该步骤重复 1 次。上述步骤结束后, 加入适量重悬液, 使用移液枪吹散沉淀后, 继续加入乙酰丁香酮 (AS, 200 μ mol/L) 静置活化 4~5 h 后注射至烟草叶片中 (6~8 周), 将黑暗环境培养 24 h 后的烟草转到正常生长环境培养 2 d, 剪取一小块本氏烟草叶片, 用 DAPI (4', 6-二脒基-2-苯基吡啶, 核染料) 染色 (可利用 10 ml 注射器抽真空, 使 DAPI 进入烟草内部, 有利于染色), 使用 LeicaTC-SSP8X (德国 Leica 公司产品) 共聚焦荧光显微镜观察本氏烟草叶片中融合蛋白的分布情况。

1.6 数据分析

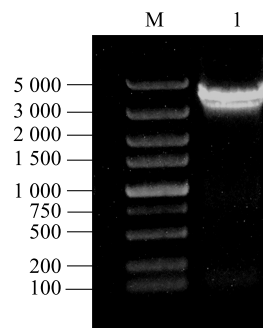
用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量, 3 次重复。用 Microsoft Excel 2010 软件对数据进行处理, 并采用 IBM SPSS 26.0 软件进行 *t* 检验比较差异显著性, 然后使用 Origin Pro 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 基因的克隆

根据目的基因的 CDS 设计同源克隆引物 (表 1), 将提取的葡萄花芽总 RNA 反转录为 cDNA 后作

为模板扩增, 扩增结果如图 1 所示, 将扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收后送上海生工生物工程股份有限公司测序, 测序结果正确, *VvARF7* 的 CDS 长度为 3 468 bp, 编码 1 155 个氨基酸 (GenBank 登录号: XP010656094.1)。



M: DL5 000 marker; 1: *VvARF7* 基因。

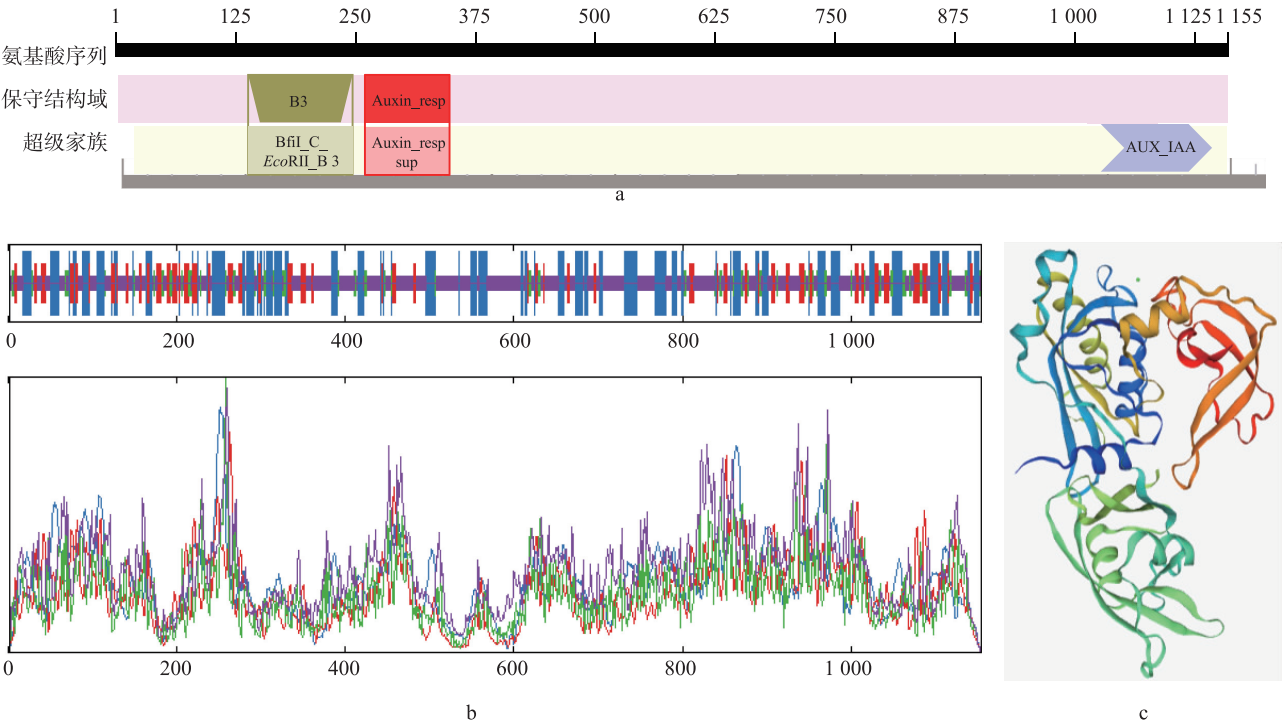
图 1 葡萄 *VvARF7* 基因扩增产物

Fig.1 Amplification product of *VvARF7* gene of grape

2.2 *VvARF7* 转录因子特征及启动子分析

采用 ExPASy 分析 *VvARF7* 蛋白理化性质, 结果显示, 该蛋白质分子式为 C₅₆₅₂H₈₈₁₅N₁₆₅₁O₁₇₈₁S₃₇, 相对分子质量为 12 958, 蛋白质等电点为 6.66, 不稳定系数为 76.67, 脂肪系数为 68.39, 平均亲水系数为 -0.739, 属于酸性不稳定亲水蛋白质。*VvARF7* 的氨基酸组成中, Q 谷氨酰胺 (Gln) 占比最高, 为 17.2%, C 半胱氨酸 (Cys) 占比最低, 为 1.1%。分析 *VvARF7* 蛋白结构域, 结果 (图 2a) 显示, 该蛋白质含有 ARF 转录因子特有的 B3 DNA 结合结构域 (126~227 aa)、Auxin_resp 域 (258~334 aa) 以及 AUX_IAA 结构域 (1 040~1 112 aa)。对 *VvARF7* 蛋白二级结构进行预测, 结果如图 2b 所示, *VvARF7* 蛋白的结构分为 α -螺旋结构、延伸链、 β -旋转以及无规则卷曲, 氨基酸残基所占比例分别为 27.27%、14.63%、8.14% 和 49.96%。最后, 对 *VvARF7* 蛋白三级结构进行预测, 发现葡萄 *VvARF7* 基因编码蛋白质为多链折叠结构, 该蛋白质多肽链的主要结构元件是无规则卷曲 (图 3c)。

VvARF7 基因的启动子序列的分析结果 (表 2) 表明, 葡萄 *VvARF7* 基因启动子区域除存在 TATA-box、CAAT-box 等一些基本顺式作用元件 (表中未列出) 外, 还存在光响应元件 G-Box、Box 4、chs-CMA1a、TCT-motif 和 AAAC-motif, 激素响应元件 TGACG-motif、ABRE、AuxRR-core 和 TCA-element。



a 为 VvARF7 蛋白的保守结构域分析;b 为 VvARF7 蛋白的二级结构(蓝色为 α -螺旋,紫色为无规则卷曲,红色为延伸链;绿色为 β -旋转);c 为 VvARF7 蛋白的三级结构。

图 2 葡萄 VvARF7 蛋白特征分析
Fig.2 Characteristics analysis of VvARF7 protein in *Vitis vinifera* L.

表 2 VvARF7 基因启动子顺式作用元件分析
Table 2 Analysis of cis-acting elements of VvARF7 gene promoter

元件类型	元件名称	功能	数量
光调控元件	G-Box	参与光响应的顺式调节元件	6
	Box 4	与光反应有关的保守 DNA 模板一部分	9
	chs-CMA1a	光响应元件的一部分	1
	TCT-motif	光响应元件的一部分	1
	AAAC-motif	光响应元件	2
激素响应元件	TGACG-motif	参与茉莉甲酯响应的顺式调控元件	8
	ABRE	参与脱落酸合成代谢的顺式作用元件	4
	AuxRR-core	参与生长素合成代谢的顺式作用元件	1
	TCA-element	参与水杨酸合成代谢的顺式作用元件	1

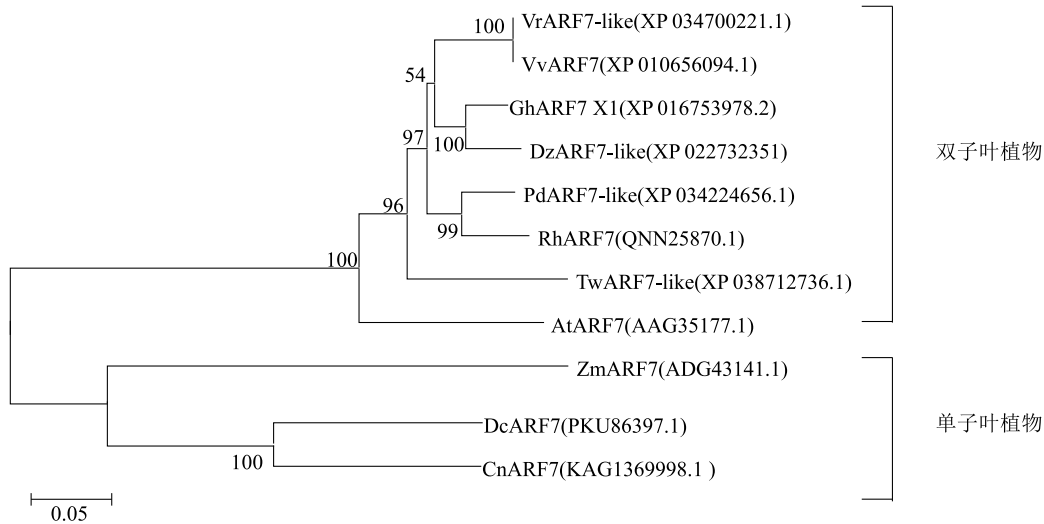
2.3 VvARF7 蛋白进化树和多序列比对分析

为了确定葡萄 VvARF7 蛋白与其他植物中 VvARF7 蛋白的进化关系,在 NCBI 中下载得到河岸葡萄(XP 034700221.1)、棉花(XP 016753978.2)、榴莲(XP 022732351)、扁桃(XP 034224656.1)、蔷薇(QNN25870.1)、雷公藤(XP 038712736.1)、拟南芥(AAG35177.1)、玉米(ADG43141.1)、铁皮石斛(PKU86397.1)以及椰子(KAG1369998.1)的 ARF7

蛋白序列,利用 MEGA 12.0 软件,采用邻接法对葡萄的 VvARF7 (XP 010656094.1)蛋白和其他物种的 ARF7 蛋白进行系统进化树分析,结果(图 3)显示,与葡萄 VvARF7 同源的蛋白质可聚为 2 类,其中葡萄 VvARF7 与河岸葡萄 VrARF7 亲缘关系最近,并与棉花、榴莲、扁桃、蔷薇、雷公藤、拟南芥聚为双子叶植物类,而玉米、铁皮石斛与椰子聚为单子叶植物类。

将 *VvARF7* 蛋白与其他 7 条相似度高的双子叶植物 ARF7 蛋白进行氨基酸多重序列比对,结果(图 4)显示序列一致性为 76.36%,均含有 ARF 转录因

子特有的 B3 DNA 结合结构域、Auxin_resp 结构域和 AUX_IAA 结构域。



VrARF7-like(XP 034700221.1): 河岸葡萄; *VvARF7*(XP 010656094.1): 葡萄; *GhARF7* X1(XP 016753978.2): 棉花; *DzARF7*-like(XP 022732351): 榴莲; *TwARF7*-like(XP 038712736.1): 雷公藤; *PdARF7*-like(XP 034224656.1): 扁桃; *AtARF7*(AAG35177.1): 拟南芥; *RhARF7*(QNN25870.1): 蔷薇; *ZmARF7*(ADG43141.1): 玉米; *DcARF7*(PKU86397.1): 铁皮石斛; *CnARF7*(KAG1369998.1): 椰子。

图 3 葡萄 *VvARF7* 蛋白与其他植物 ARF7 蛋白的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of *VvARF7* protein of *Vitis vinifera* L. and other related plant species

2.4 葡萄 *VvARF7* 基因表达模式分析

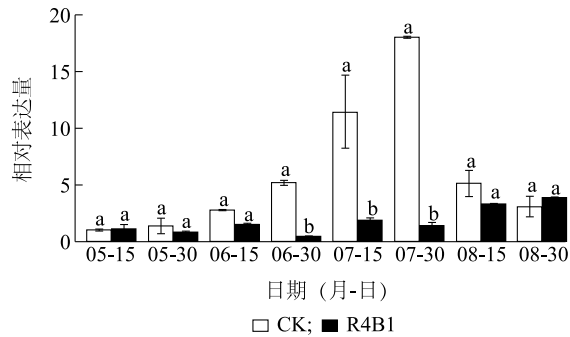
葡萄花芽分化的关键阶段是花序分化,该阶段是决定葡萄有无花的关键^[34]。在补光处理期间,本研究发现,在 5 月 30 日-8 月 15 日葡萄花芽分化过程中红蓝(4:1)复合光处理(R4B1)的 *VvARF7* 基因相对表达量低于不补光的对照组(CK)(图 5),红地球葡萄花芽 6 月 15 日处于始分化期,6 月 15 日及之前 *VvARF7* 相对表达量与对照组无显著差异。6 月 30 日-7 月 30 日花芽分化阶段处于原始体发育期、花序主轴发育和花序二级轴发育时期,在红蓝(4:1)复合光处理下, *VvARF7* 相对表达量显著低于 CK 且维持在一个低水平状态,表明 *VvARF7* 相对表达量低有利于葡萄花芽分化。较低水平的 IAA 有利于花芽分化^[35],在整个花芽分化过程中, *VvARF7* 基因在红蓝(4:1)复合光处理下,在 5 月 30 日-8 月 15 日较 CK 均下调表达,推测 *VvARF7* 有可能响应红蓝光并整合生长素和光信号参与葡萄花芽分化过程。

为进一步了解 *VvARF7* 基因在葡萄不同组织

中的表达情况,采用 qRT-PCR 对 *VvARF7* 在叶、花芽、根等组织中的相对表达量进行分析,结果(图 6)显示, *VvARF7* 基因在葡萄的各个组织中均有不同程度的表达,其中在卷须中的相对表达量最高,其次是根中,而在叶片中的相对表达量最低。这说明 *VvARF7* 基因在不同组织中的相对表达量存在差异,且可能在植物生长发育的不同阶段具有不同的作用。

2.5 葡萄 *VvARF7* 蛋白亚细胞定位

为探究 *VvARF7* 蛋白的亚细胞定位情况,将去除终止子密码子的 CDS 通过同源重组法与瞬时表达载体 pBI221-GFP 连接,形成重组质粒 pBI221-GFP-*VvARF7*,经菌落 PCR、酶切、测序鉴定正确后进行扩大培养,提取重组质粒,通过电击法将重组质粒转化至农杆菌 EH105 感受态,将农杆菌菌液注射到 4~6 周的本氏烟草叶片中,培养 3 d 后观察。结果如图 7 所示,融合蛋白 *VvARF7*-GFP 的绿色荧光分布在细胞核上,说明 *VvARF7* 蛋白定位于细胞核中,这与其作为转录因子的功能特点相符。



CK: 不补光处理; R4B1: 红蓝光补光处理。

图5 *VvARF7* 基因在花芽分化不同时期的表达

Fig.5 Expression of *VvARF7* gene during different stages of flower bud differentiation

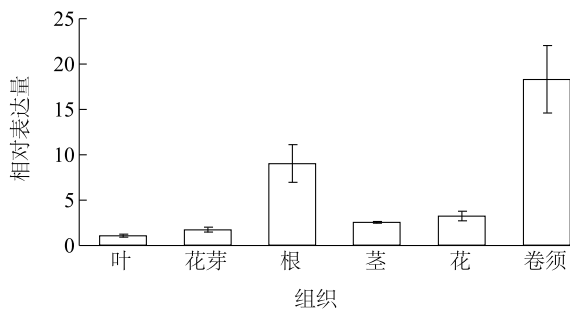


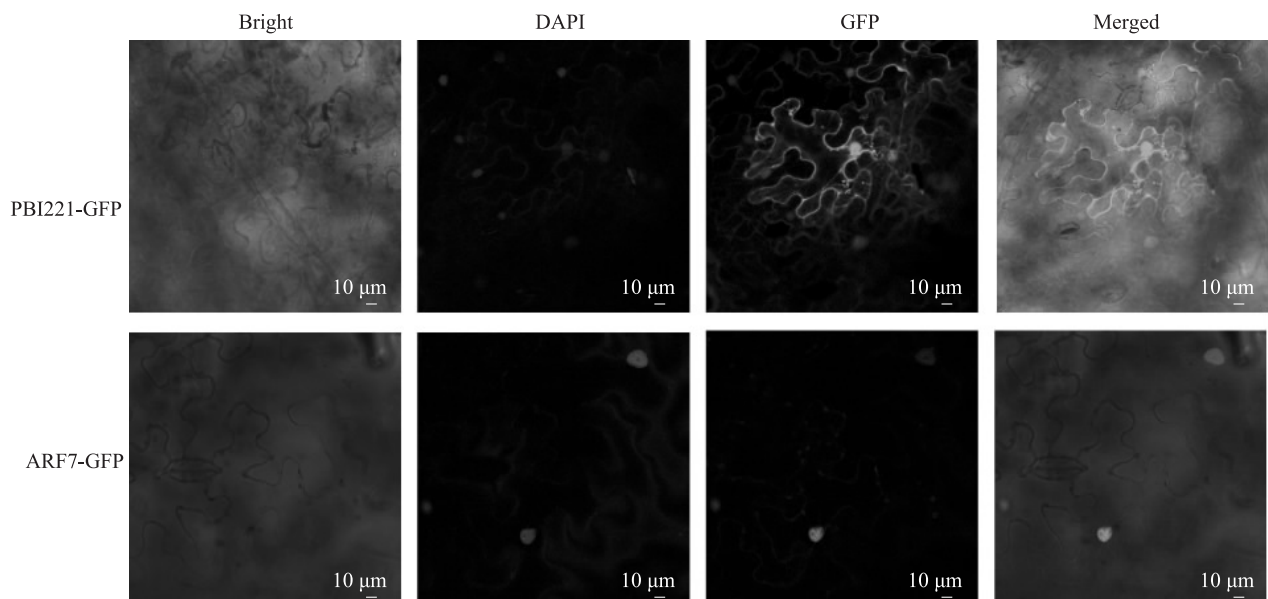
图6 *VvARF7* 基因在葡萄不同组织中的表达量

Fig.6 Expression amount of *VvARF7* gene in different tissues of grapes

3 讨论

研究结果表明,光质可以调控生长素相关基因,并且可以介导光反应,两者相互作用共同调控植物的生长^[36]。生长素相关基因响应光处理并参与植物的生长发育在模式植物拟南芥中有较多研究,Tian等^[37]研究发现 *AtARF8* 基因表达受多种外源光的影响,如受红光、远红光、白光及蓝光诱导,从而导致拟南芥 *arf8* 突变体子叶伸长,进而影响到拟南芥幼苗的正常生长发育;Vert 等^[38]研究发现在光诱导拟南芥幼苗发育过程中,*AtARF2* 基因参与生长素途径和油菜素内酯途径,且与 SK21 蛋白存在相互作用;Folta 等^[39]发现蓝光诱导 *IAA1*、*IAA5* 和 *IAA18* 等基因,其相对表达量较对照组均有显著变化,表明这些基因参与拟南芥下胚轴生长的过程;Sun 等^[40]研究发现,*IAA19* 的转录水平受到 PIF4 的调控,并且 *IAA19* 参与生长素介导的向光性生长反应。此外,刘帅等^[31]发现植物激素信号转导相关基因响应红蓝复合光,参与葡萄花芽分化过程;Wang 等^[41]研究发现,与光照相比,*OSARF1*、*OSARF2*、*OSARF16*、*OSARF21* 和 *OSARF23* 在黑暗条件下的相对表达量增加。

Reed^[36]建议未来关于 ARFs 蛋白和 Aux/IAA 蛋白的研究应该侧重于其与生长素以及光信号的关系。



PBI221 为阴性对照,Merged 为 GFP 和 DAPI 信号融合;GFP 为绿色荧光信号;DAPI 为细胞核染料。比例尺 = 10 μm 。

图7 *VvARF7* 蛋白亚细胞定位

Fig.7 Subcellular localization of *VvARF7* protein

系,并具体探究它们之间的相互作用机制。本试验克隆了设施红地球葡萄 *VvARF7* 基因,使用生物信息学分析软件对 *VvARF7* 蛋白进行生物信息学分析,结果表明,*VvARF7* 基因编码 1 155 个氨基酸,该蛋白质的相对分子质量为 12 958,由蛋白质结构预测结果可知,其含有 β -旋转 (8.14%)、延伸链 (14.63%)、 α -螺旋 (27.27%)、无规则卷曲 (49.96%)。系统进化树分析结果表明,*VvARF7* 与河岸葡萄 *VrARF7-like* 进化距离最近,并且 *VvARF7* 蛋白定位于细胞核中,符合转录因子的特点。启动子分析结果表明,*VvARF7* 基因的启动子区域具有大量光响应元件、茉莉酸甲酯和脱落酸等激素响应相关元件。本研究初步分析了 *VvARF7* 基因在设施栽培红地球葡萄花芽不同发育时期的表达情况,发现在花芽分化后期,*VvARF7* 相对表达量在红蓝复合光处理下显著低于对照组,说明 *VvARF7* 基因可能响应红蓝光参与葡萄花芽分化。本研究结果显示,*VvARF7* 基因在葡萄的多种组织中均有不同程度的表达,表明葡萄 *VvARF7* 参与多种组织生物学过程。花芽分化是大量基因参与调控形成的复杂的调控网络,课题组后期将对该类基因在花芽分化过程中的调控机理进行深入研究,并且进行转基因功能验证,以期明确该基因的功能、解析设施红地球葡萄花芽分化分子机制提供理论参考。

参考文献:

- [1] BERNIER G H A, HOUSSA C, PETITJEAN A, et al. Physiological signals that induce flowering[J]. *Plant Cell*, 1993, 5(10): 1147-1155.
- [2] HANKE MV F H, PEIL A, HÄTTASCH C. No flower no fruit-genetic potentials to trigger flowering in fruit trees[J]. *Genes Genom Genomics*, 2007, 1: 1-20.
- [3] SONG Y H, ITO S, IMAIZUMI T. Flowering time regulation: photo-period-and temperature-sensing in leaves[J]. *Trends Plant Sci*, 2013, 18(10): 575-583.
- [4] GUPTA S D, SAHOO T K. Light emitting diode (LED)-induced alteration of oxidative events during *in vitro* shoot organogenesis of curculigo orchioidees gaertn [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2015, 37(11): 233.
- [5] 王海波,王 帅,王孝娣,等. 光质对设施葡萄叶片衰老与内源激素含量的影响[J]. *应用生态学报*, 2017, 28(11): 3535-3543.
- [6] 郑冬梅,林志斌,陈艺群,等. 不同光质对樱桃番茄产量及品质的影响[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(8): 567-571.
- [7] 樊小雪,杨亚娜,徐 刚. 不同光质处理对樱桃番茄生长发育和叶绿素荧光的影响[J]. *福建农业学报*, 2019, 34(9): 1026-1031.
- [8] 余 阳,刘 帅,李春霞,等. LED 光质对夏黑葡萄光合特性和生理指标的影响[J]. *果树学报*, 2015, 32(5): 879-884.
- [9] 陈心源,田忍国,沈林章,等. 不同蓝红光比例发光二极管对火龙果花芽分化和果实品质的影响[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2019, 45(1): 14-22.
- [10] 李 茹,李枝林,商正蕊,等. 不同 LED 光质对铁皮石斛瓶内开花的影响[J]. *南方农业学报*, 2019, 50(7): 1550-1556.
- [11] 樊小雪,宋 波,徐 海,等. LED 光源对不结球白菜和番茄内源激素含量的影响[J]. *浙江农业学报*, 2015, 27(11): 1927-1931.
- [12] 段 娜,贾玉奎,徐 军,等. 植物内源激素研究进展[J]. *中国农学通报*, 2015, 31(2): 159-165.
- [13] KESY J, FRANKOWSKI K, WILMOWICZ E, et al. The possible role of *PnACS2* in IAA-mediated flower inhibition in *Pharbitis nil* [J]. *Plant Growth Regulation*, 2010, 61(1): 1-10.
- [14] ZHANG D, REN L, YUE J H, et al. GA4 and IAA were involved in the morphogenesis and development of flowers in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171(11): 256-267.
- [15] XING L B, ZHANG D, LI Y M, et al. Genome-wide identification of vegetative phase transition-associated microRNAs and target predictions using degradome sequencing in *Malus hupehensis* [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1-22.
- [16] CASADEVALL R, RODRIGUEZ R E, DEBERNARDI J M, et al. Repression of growth regulating factors by the microRNA396 inhibits cell proliferation by UV-B radiation in *Arabidopsis* leaves [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(9): 3570-3583.
- [17] ELLIS C M, NAGPAL P, YOUNG J C, et al. *Auxin response factor1* and *auxin response factor2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 2005, 132(20): 4563-4574.
- [18] OKUSHIMA Y, OVERVOORDE P J, ARIMA K, et al. Functional genomic analysis of the *auxin response factor* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(2): 444-463.
- [19] WAN S B, LI W L, ZHU Y Y, et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the auxin response factor gene family in *Vitis vinifera* [J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(8): 1365-1375.
- [20] LI S B, OUYANG W Z, HOU X J, et al. Genome-wide identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (*ARF*) gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*) [J]. *Front Plant Science*, 2015, 6: 119.
- [21] WANG D K, PEI K M, FU Y P, et al. Genome-wide analysis of the auxin response factors (*ARF*) gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Gene*, 2007, 394(1/2): 13-24.
- [22] WU J, WANG F Y, CHENG L, et al. Identification, isolation and

- expression analysis of auxin response factor (*ARF*) genes in *Solanum lycopersicum* [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(11): 2059-2073.
- [23] ROOSJEN M, PAQUE S, WEIJERS D. Auxin response factors: output control in auxin biology [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(2): 179-188.
- [24] SI B, LI D X, ZONG Z, et al. A review of auxin response factors (*ARFs*) in plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7(742): 47-54.
- [25] NAGPAL P, ELLIS C M, WEBER H, et al. Auxin response factors *ARF6* and *ARF8* promote jasmonic acid production and flower maturation [J]. *Development*, 2005, 132(18): 4107-4118.
- [26] WANG B, XUE J S, YU Y H, et al. Fine regulation of *ARF17* for anther development and pollen formation [J]. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 243.
- [27] NAGPAL P, ELLIS C M, WEBER H, et al. Auxin response factors *ARF6* and *ARF8* promote jasmonic acid production and flower maturation [J]. *Development*, 2005, 132(18): 4107-4118.
- [28] CHEN G W, YUE Y Z, LI L, et al. Genome-wide identification of the auxin response factor (*ARF*) gene family and their expression analysis during flower development of *Osmanthus fragrans* [J]. *Forests*, 2020, 11(2): 245-260.
- [29] 李艳林, IQBAL S, 侍 婷, 等. 梅 *PmARF17* 克隆及其在花发育中与内源激素的调控模式 [J]. *中国农业科学*, 2021, 54(13): 2843-2857.
- [30] 王景超, 程 彬, 于晓菲, 等. 玉米 *ARF* 家族基因在雌花序发育过程中的表达分析 [J]. *安徽农业科学*, 2021, 49(24): 132-135.
- [31] 刘 帅, 徐伟荣, 张亚红, 等. 基于转录组研究补光对设施‘红地球’葡萄萌芽的影响 [J]. *果树学报*, 2021, 38(3): 305-317.
- [32] 刘 帅, 张亚红, 刘 鑫, 等. 不同光源补光对设施红地球葡萄果实品质的影响 [J]. *江苏农业学报*, 2021, 37(4): 949-956.
- [33] 路 瑶, 段 慧, 刘昆玉, 等. 红地球葡萄花芽分化的观察 [J]. *湖南农业科学*, 2017(9): 77-79.
- [34] 贾 楠. 葡萄花芽分化及其主要影响因素的研究进展 [J]. *河北果树*, 2020(1): 1-3.
- [35] 林 玲. 一年两收栽培模式下摘心和生长调节剂对‘夏黑’葡萄花芽分化规律影响的研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2017.
- [36] REED J W. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Science*, 2001, 6(9): 420-425.
- [37] TIAN C E, MUTO H, HIGUCHI K, et al. Disruption and overexpression of *auxin response factor 8* gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition [J]. *Plant Journal*, 2004, 40(3): 333-343.
- [38] VERT G, WALCHER C L, CHORY J, et al. Integration of auxin and brassinosteroid pathways by *Auxin Response Factor 2* [J]. *Pnas*, 2008, 105(28): 9829-9834.
- [39] FOLTA K M, PONTIN M A, KarliN-NEUMANN G, et al. Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light [J]. *Plant Journal*, 2010, 36(2): 203-214.
- [40] SUN J, QI L, LI Y, et al. *PIF4* and *PIF5* transcription factors link blue light and auxin to regulate the phototropic response in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(6): 2102-2114.
- [41] WANG D, PEI K, FU Y, et al. Genome-wide analysis of the auxin response factors (*ARF*) gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Gene*, 2007, 394(1/2): 13-24.

(责任编辑:陈海霞)