

郑秋玲, 王建萍, 肖慧琳, 等. 葡萄 *IRT* 基因的克隆、鉴定及其对氨基酸-铁复合肥的响应特征[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(5): 913-921.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.05.016

# 葡萄 *IRT* 基因的克隆、鉴定及其对氨基酸-铁复合肥的响应特征

郑秋玲<sup>1,2</sup>, 王建萍<sup>1</sup>, 肖慧琳<sup>1</sup>, 史圣朋<sup>3</sup>, 宁友峥<sup>3</sup>, 杜远鹏<sup>4,5</sup>, 管雪强<sup>5</sup>,  
唐美玲<sup>1,2,5</sup>, 宋志忠<sup>1,2,3</sup>

(1. 山东省烟台市农业科学研究院葡萄良种选育与良法栽培山东省工程研究中心, 山东 烟台 265500; 2. 鲁东大学农林工程研究院, 山东 烟台 264025; 3. 剑桥大学植物系, 英国 剑桥 CB2 3EA; 4. 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018; 5. 山东省酿酒葡萄与葡萄酒技术创新中心/中粮长城葡萄酒(蓬莱)有限公司, 山东 烟台 264000)

**摘要:** 为揭示葡萄铁素吸收与转运的分子机制, 明确铁调节转运蛋白编码基因 *VvIRT* 在葡萄果实不同发育时期的表达差异及其对叶面喷施氨基酸-铁复合肥的响应特征, 本研究以烟酿 1 号为材料, 分离并克隆葡萄铁调节转运蛋白编码基因 *IRT*, 分析 *IRT* 基因分布、结构及其编码蛋白质的保守基序等特征; 设置叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理, 利用实时荧光定量 PCR 分析烟酿 1 号 *IRT* 基因在果实不同发育时期的表达差异及其对叶面喷施处理的响应特征。结果表明: 在葡萄基因组中克隆得到 10 个 *VvIRT* 基因(*VvIRT1*~*VvIRT10*), 分布在 7 条染色体上。其编码蛋白质均含有 Fe<sup>2+</sup> 转运蛋白或锌/铁转运体(PF02535), 属于典型的铁调节蛋白。*VvIRT1*、*VvIRT2*、*VvIRT4*、*VvIRT5*、*VvIRT8* 等基因编码的蛋白质属于碱性蛋白质, 而其他 5 个蛋白质属于酸性蛋白质。*VvIRT5* 蛋白和 *VvIRT8* 蛋白属于不稳定蛋白, 其他 8 个蛋白为稳定蛋白。*VvIRT7* 蛋白主要定位于液泡膜, 其他蛋白质均主要定位于细胞质膜。*VvIRT7* 在葡萄果实不同发育时期各组织中的整体表达水平都是最高的, 其次为 *VvIRT9* 和 *VvIRT6*, 而 *VvIRT1*、*VvIRT3*、*VvIRT5*、*VvIRT8* 和 *VvIRT10* 在葡萄果实发育过程中均无表达。叶面喷施铁肥处理下, 韧皮部中 *VvIRT7* 表达量和果实及韧皮部中 *VvIRT9* 表达量在花后 35 d(幼果期)至 70 d(转色期)明显增加, 而在花后 85 d(第 2 次膨大期)至 115 d(成熟期), 韧皮部和叶片中 *VvIRT7* 和 *VvIRT9* 表达量明显减少。因此, 葡萄 *VvIRT* 基因对叶面喷施铁肥的响应特征与果实发育时期及器官类型密切相关, *VvIRT7*、*VvIRT9* 基因编码蛋白质是葡萄果实发育过程中 2 个重要的铁调节转运蛋白。

**关键词:** 葡萄; 铁调节转运蛋白; 铁肥; *VvIRT* 基因

**中图分类号:** Q786; S663.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2024)05-0913-09

## Cloning and identification of *IRT* genes and their response to amino acid-iron compound fertilizer in grape

ZHENG Qiuling<sup>1,2</sup>, WANG Jianping<sup>1</sup>, XIAO Huilin<sup>1</sup>, SHI Shengpeng<sup>3</sup>, NING Youzheng<sup>3</sup>, DU Yuanpeng<sup>4,5</sup>,  
GUAN Xueqiang<sup>5</sup>, TANG Meiling<sup>1,2,5</sup>, SONG Zhizhong<sup>1,2,3</sup>

收稿日期: 2023-04-15

**基金项目:** 山东省重点研发计划项目(重大科技创新工程)(2022CXGC010605); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-29-17); 国家留学基金项目(202208370080); 烟台市科技计划项目(2020XCZX026)

**作者简介:** 郑秋玲(1983-), 女, 山东菏泽人, 硕士, 助理研究员, 主要从事葡萄遗传育种与分子生物学研究。(Tel) 15165769956; (E-mail) zhengql0225@163.com

**通讯作者:** 宋志忠, (E-mail) Szhzh2000@163.com

(1. Shandong Engineering Research Center for Grape Breeding and Cultivation, Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai 265500, China; 2. The Engineering Research Institute of Agriculture and Forestry, Ludong University, Yantai 264025, China; 3. Department of Plant Science, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EA, United Kingdom; 4. College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China; 5. Shandong Technology Innovation Center of Wine Grape and Wine/COFCO Great Wall Wine (Penglai) Co., Ltd., Yantai 264000, China)

**Abstract:** In order to reveal the molecular mechanism of iron absorption and transport in grape, and to clarify the expression difference of iron regulatory transporter gene *VvIRT* in different development stages of grape fruit and its response characteristics to foliar application of amino acid-iron compound fertilizer, Yanniang 1 was used as the material in this study. The *IRT* encoding iron regulatory transporter was isolated and cloned, and the distribution and structure of *IRT* gene and conserved motifs of proteins encoded by *IRT* gene were analyzed. The expression difference of *IRT* gene in different development stages of Yanniang 1 fruit and its response characteristics to foliar spraying treatment were analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. The results showed that 10 *VvIRT* genes (*VvIRT1*-*VvIRT10*) were cloned from the grape genome and distributed on seven chromosomes. The encoded proteins contained  $\text{Fe}^{2+}$  transporters or zinc/iron transporters (PF02535), which were typical iron regulatory proteins. The proteins encoded by *VvIRT1*, *VvIRT2*, *VvIRT4*, *VvIRT5* and *VvIRT8* were alkaline proteins, while the other five proteins were acidic proteins. *VvIRT5* protein and *VvIRT8* protein were unstable proteins, and the other eight proteins were stable proteins. The *VvIRT7* protein was mainly located in the vacuolar membrane, and the other proteins were mainly located in the plasma membrane. The overall expression level of *VvIRT7* was the highest in all tissues at different developmental stages of grape fruit, followed by *VvIRT9* and *VvIRT6*, while *VvIRT1*, *VvIRT3*, *VvIRT5*, *VvIRT8* and *VvIRT10* were not expressed during the development of grape fruit. Under foliar application of iron fertilizer, the expression levels of *VvIRT7* in phloem and *VvIRT9* in fruit and phloem increased significantly from 35 d after flowering (young fruit stage) to 70 d after flowering (veraison stage), while the expression levels of *VvIRT7* and *VvIRT9* in phloem and leaves decreased significantly from 85 d after flowering (second expansion stage) to 115 d after flowering (mature stage). Therefore, the response characteristics of *VvIRT* gene to foliar application of iron fertilizer are closely related to fruit development stage and organ type. The proteins encoded by *VvIRT7* and *VvIRT9* genes are two important iron regulatory transporters during grape fruit development.

**Key words:** grape; iron-regulated transporter; iron fertilizer; *VvIRT* gene

铁(Fe)是植物生长发育不可或缺的微量元素之一,参与植物光合作用、呼吸作用和 DNA 修复等多种代谢途径或生命过程<sup>[1-4]</sup>。水果生产中,铁肥的施用与果实品质和果实产量密切相关,土壤中铁素亏缺不但限制果树的生长和发育,还将导致水果产量减少和品质降低<sup>[5-8]</sup>。

土壤中的铁多为  $\text{Fe}^{3+}$ ,植物根系难以直接吸收和利用<sup>[5,7-9]</sup>。植物正常生长所需铁浓度为  $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ,而通常土壤中  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  的浓度通常低于  $1 \times 10^{-15} \text{ mol/L}$ ,远远不能满足植物生长的基本需求<sup>[6,9]</sup>。Romheld 等<sup>[10]</sup>最早提出了高等植物为适应缺铁环境而进化出的 2 种根际铁吸收策略:策略 I 是通过定位于根细胞膜表面的 *H-ATP* 酶向根际土壤分泌  $\text{H}^+$ ,降低根际土壤 pH 值,促进  $\text{Fe}^{3+}$  的溶解,并通过铁还原酶 *FRO* 将根系周围的  $\text{Fe}^{3+}$  还原为  $\text{Fe}^{2+}$ ,再通过定位于细胞膜上的铁调节转运蛋白 *IRT* (iron-regulated transporter) 转运至根系被植物吸收利用,此机制常见于双子叶植物和非禾本科的单子叶植物<sup>[5-6,9-10]</sup>;策略 II 是通过一系列酶促反应合成和分泌麦根酸类物质,与根际土壤的  $\text{Fe}^{3+}$  形成螯合物,由专一的铁载体 PS (Phytosiderophore) 吸收途径被根系吸收利用,此机

制多见于禾本科植物<sup>[5-6,9-10]</sup>。水稻等部分植物同时存在吸收策略 I 和吸收策略 II<sup>[5,6,9-12]</sup>。

铁调节转运蛋白 *IRT* 在策略 I 植物根系转运  $\text{Fe}^{2+}$  的过程中发挥重要作用,且能调控  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  等金属离子的转运<sup>[12-16]</sup>。目前,有关植物铁调节转运蛋白 *IRT* 的生物学功能研究主要集中在拟南芥、水稻等模式植物。Eide 等<sup>[14]</sup>最早从拟南芥根部外皮层中克隆到高表达基因 *AtIRT1*,其表达水平受缺铁胁迫诱导,敲除 *AtIRT1* 的拟南芥在缺铁土壤中表现出黄化症状,生长严重受阻甚至死亡<sup>[15]</sup>;酵母异源表达试验结果表明 *AtIRT1* 具有广泛的底物特异性,可高效转运  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  离子<sup>[14,16]</sup>。拟南芥 *AtIRT2* 在根表皮中的表达受缺铁胁迫的诱导,*AtIRT2* 蛋白定位于细胞囊泡中,不直接参与根系的  $\text{Fe}^{2+}$  吸收,可能通过区室化储存以防止表皮细胞吸收过多  $\text{Fe}^{2+}$  而造成的毒害<sup>[17]</sup>。水稻是特殊的策略 II 植物,虽然不能还原  $\text{Fe}^{3+}$ ,但能吸收  $\text{Fe}^{2+}$ ,水稻 *OsIRT1* 和 *OsIRT2* 蛋白定位在根表皮细胞质膜,具有类似策略 I 植物转运  $\text{Fe}^{2+}$  的功能,能够转运  $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$ <sup>[11-12]</sup>。此外,IRT1 同源蛋白在番茄 (*Solanum lycopersicum*)<sup>[18]</sup>、小金海棠 (*Malus xiaojinensis*)<sup>[19]</sup>、落花生

(*Arachis hypogaea*)<sup>[20]</sup>、杜梨(*Pyrus betulaefolia*)<sup>[21]</sup>等植物中被鉴定和报道。然而,有关 IRT 转运蛋白功能的研究全部集中于植物根部,而在植物其他部分的 IRT 转运蛋白作用尚未见报道。

葡萄(*Vitis vinifera* L.)是一种深受全球消费者喜爱的水果,其基因组信息已被注释和公布<sup>[22]</sup>。然而在葡萄铁调节转运蛋白编码基因 *VvIRT* 的特征、葡萄果实不同发育时期 *VvIRT* 基因的表达差异及其对叶面喷施氨基酸-铁复合肥的响应特征等方面还未见报道。本研究以山东省烟台市农业科学研究院自主培育的葡萄新品种烟酿 1 号为材料,克隆葡萄 IRT 基因(*VvIRT*),并通过实时荧光定量 PCR 分析烟酿 1 号花后不同发育时期不同组织 *VvIRT* 的表达差异及其对叶面喷施氨基酸-铁复合肥的响应特征,为解析葡萄铁素营养吸收与高效利用机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试材及采样

本研究的供试材料为山东省烟台市农业科学研究院葡萄资源圃中树体健壮的 5 a 生烟酿 1 号葡萄。葡萄资源圃中葡萄南北行向种植,常规田间管理。根据含氨基酸水溶肥料生产标准<sup>[23]</sup>配制氨基酸-铁水溶性复合肥<sup>[24-25]</sup>,肥料中 FeSO<sub>4</sub> 的终含量为 1 g/kg。选取长势一致的葡萄,分别于盛花后 28 d、63 d、78 d 上午 10:00 h (天气晴朗)进行氨基酸-铁水溶性复合肥叶面喷施处理,以叶片上的液体均匀滴落为准。以叶面喷施蒸馏水为对照(CK)。上述处理每 5 棵作为 1 组,共喷施 3 组。参照张璐等<sup>[26]</sup>方法,分别于盛花后 35 d (幼果期)、50 d (硬核期)、70 d (转色期)、85 d (第 2 次膨大期)、115 d (成熟期)采集叶面铁肥喷施处理和 CK 的果实、结果枝中间部分的叶片及韧皮部,迅速用液氮处理并置于 -80 °C 冰箱保存备用。试验重复 3 年(2019 至 2021 年),结果一致,本研究展示 2019 年的试验结果。

### 1.2 葡萄 IRT 基因克隆

以拟南芥 AtIRT1 (AT4G19690)、AtIRT2 (AT1G05300)和 AtIRT3 (AT1G60960)的氨基酸序列为参考<sup>[5,14,17]</sup>,在葡萄基因组数据库 Phytozome (<http://www.phytozome.net>)中检索获得 10 个潜在的葡萄 IRT 家族蛋白,检索结果在 Pfam (<http://pfam.xfam.org/search>)在线服务器均检测到 Fe<sup>2+</sup> 转运蛋白或锌/铁转运载体 (PF02535)功能结构域,属

于典型的铁调节转运蛋白 IRT。根据获得的葡萄 IRT 家族基因的编码区序列 (CDS, coding sequence),分别设计上下游引物(表 1)。利用 MiniBEST 植物 RNA 提取试剂盒(宝生物工程大连有限公司产品)提取烟酿 1 号组培幼苗的总 RNA,通过 PrimeScript RT 试剂盒(宝生物工程大连有限公司产品)合成第一链 cDNA,并以其为模板,借助 Prime STAR HS DNA 高保真聚合酶(宝生物工程大连有限公司产品)进行葡萄 IRT 家族基因的 PCR 扩增,扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序和验证。

表 1 葡萄 IRT 家族基因 PCR 扩增所用引物

Table 1 Primers for PCR amplification of grape IRT family genes

基因	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)
<i>VvIRT1</i> -F	ATGGCAACTTCACCTCTCAAA	1 047
<i>VvIRT1</i> -R	TCAAGCCCATTITGCCATTAC	
<i>VvIRT2</i> -F	ATGGCTTCCTTGAAAAACCT	1 052
<i>VvIRT2</i> -R	TTAGGCCCATTITGCCATCAA	
<i>VvIRT3</i> -F	ATGGCTTCCTTGAAAAACGTT	1 065
<i>VvIRT3</i> -R	TCACGCCCATTITGCCATCAC	
<i>VvIRT4</i> -F	ATGGTGGTCTTTGAGGAATTG	1 062
<i>VvIRT4</i> -R	CTAAGCCCAGATGGCAAGAG	
<i>VvIRT5</i> -F	ATGCACCCAGCTTCAGAGTTG	1 025
<i>VvIRT5</i> -R	TTATGCCCATTITGGCAATA	
<i>VvIRT6</i> -F	ATGGAAGCTTTTGGCGACTGG	1 571
<i>VvIRT6</i> -R	TTAAGCCCATTITGGCCAAGAG	
<i>VvIRT7</i> -F	ATGGCCTCGTGCCTAGGCGA	1 008
<i>VvIRT7</i> -R	TCAGGCCCAAAGGGCCAGA	
<i>VvIRT8</i> -F	ATGGACTGTGAAGACCAAGA	1 982
<i>VvIRT8</i> -R	TTATACTCCAACCAAAAAC	
<i>VvIRT9</i> -F	ATGTCTCGCTCTCTCTCACC	969
<i>VvIRT9</i> -R	CAGGTGTCCAGATCATCACA	
<i>VvIRT10</i> -F	ATGAAATCATGGGCACACACC	1 155
<i>VvIRT10</i> -R	CTAATCCCAATCATAACAA	

### 1.3 葡萄 IRT 家族基因生物信息学分析

在葡萄基因组数据库 Phytozome 中获得葡萄 IRT 基因的 CDS 序列及 DNA 序列,利用 Gene Structure Display (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>)软件分析葡萄 IRT 基因的结构;使用 Expasy (<http://web.expasy.org/program/>)软件预测葡萄 IRT 蛋白的理论等电点、稳定性、总平均亲水性 (GRAVY, Grand average of hydropathicity)、不稳定指数等理化性质;再利用 MEME (<http://meme-suite.org/>)

tools/meme)、PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>)、Mpredict ([http://ch.emblnet.org/software/TM-PRED\\_form.html](http://ch.emblnet.org/software/TM-PRED_form.html)) 和 SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) 等软件预测葡萄 IRT 蛋白的保守基序 (Motif)、保守结构域、亚细胞定位、跨膜结构域和信号肽等。

#### 1.4 实时荧光定量 PCR 分析

利用美国国家生物信息中心 (NCBI) 网站的 Primer-BLAST 软件设计葡萄 IRT 基因的特异性表达引物 (表 2), 以葡萄 *Ubiquitin* (GenBank No. MH114011) 作为内参基因<sup>[26-29]</sup>。利用 SYBR Premix *Ex Taq* 荧光染料 (宝生物工程大连有限公司产品), 在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品) 上检测不同处理不同组织 (果实、韧皮部和叶片等) 葡萄 IRT 基因的表达特征。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 34 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 s。根据实时荧光定量 PCR 仪得到的各处理 *Ct* 值, 经 *Ubiquitin* 均一化处理后, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  算法得到不同处理不同组织葡萄 IRT 基因的相对表达量及其对叶面喷施氨基酸-铁复合肥的响应差异<sup>[24-30]</sup>。通过  $\log_2 FC$  ( $FC$  为差异倍数) 计算叶面喷施氨基酸-铁复合肥前后表达倍数的变化比值 (比值为 1, 表示没有显著性差异, >1 表示上升, <1 表示降低), 并通过 HemI 软件绘制表达倍数变化热图<sup>[26-27]</sup>。试验设 3 个生物学重复。

#### 1.5 数据统计

利用 SPSS 19.0 (美国 IBM 公司产品) 软件, 选择 *t*-检验法进行处理间差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄 IRT 家族基因的克隆及生物信息学分析

从烟酿 1 号葡萄中克隆得到 10 个 IRT 基因, 分别命名为 *VvIRT1* ~ *VvIRT10* (图 1 和表 3)。*VvIRT* 基因主要定位于 1 号 (*VvIRT6*)、3 号 (*VvIRT5*)、4 号 (*VvIRT4*)、6 号 (*VvIRT7* 和 *VvIRT10*)、10 号 (*VvIRT1* 和 *VvIRT2*)、13 号 (*VvIRT8*) 和 19 号 (*VvIRT3* 和 *VvIRT9*) 染色体上 (表 3), 每个基因至少含有 2 个长度不一的内含子 (图 2)。葡萄 *VvIRT1* ~ *VvIRT8* 蛋白含有 7 个保守基序 (Motif 1 ~ Motif 7), *VvIRT9* 和 *VvIRT10* 蛋白仅含有 5 个保守基序, 缺少 Motif 1 和 Motif 3 (图 2)。*VvIRT1*、*VvIRT2*、*VvIRT4*、*VvIRT5* 和

*VvIRT8* 等 5 个蛋白质的等电点 > 7.00, 含有的碱性氨基酸较多; *VvIRT7*、*VvIRT3*、*VvIRT6*、*VvIRT9* 和 *VvIRT10* 等 5 个蛋白质的等电点 < 7.00, 含有酸性氨基酸较多。*VvIRT* 蛋白均含有 7 ~ 11 个跨膜区, 仅 *VvIRT1*、*VvIRT2*、*VvIRT3* 和 *VvIRT10* 蛋白拥有信号肽。*VvIRT1* ~ *VvIRT10* 蛋白的总平均亲水性指数均大于 0, 属于疏水蛋白质; *VvIRT5* 和 *VvIRT8* 的不稳定指数 > 40, 属于不稳定蛋白质, 而其他 8 个成员不稳定指数均 < 40, 属于稳定蛋白质 (表 3)。

表 2 实时荧光定量 PCR 所用特异性引物

Table 2 Specific primers used for real-time quantitative PCR

基因	引物序列 (5'→3')	预期产物大小 (bp)
<i>VvIRT1</i> -F	GTGTAGGACTACTGAACGCC	159
<i>VvIRT1</i> -R	CAGACATGCCACCAGCACCC	
<i>VvIRT2</i> -F	CACATGTGTACAGTGACAAC	189
<i>VvIRT2</i> -R	CACTCACACCCAATAACAC	
<i>VvIRT3</i> -F	GGCAAGGACGAAGGCCATCA	146
<i>VvIRT3</i> -R	CAGCAGATGTAGCGTTCAGC	
<i>VvIRT4</i> -F	CGACTGCGTCTCAGCCGGCA	147
<i>VvIRT4</i> -R	GCAGACATCATGCCAGCTCC	
<i>VvIRT5</i> -F	GCTGCATCGGCCGGAATCTT	158
<i>VvIRT5</i> -R	GCCCATTTGGCAATAAGGGAC	
<i>VvIRT6</i> -F	CAACTCAGCCTCAGCTGGGA	152
<i>VvIRT6</i> -R	CCAAGAGGGACATGCAGGCT	
<i>VvIRT7</i> -F	GCGACAGGTTACGATGACAG	143
<i>VvIRT7</i> -R	GCTGAAGCCATCATCTTGTT	
<i>VvIRT8</i> -F	CATGATCACTGGAGGCAAAT	159
<i>VvIRT8</i> -R	CGGATTGCCCAAGTCCCCG	
<i>VvIRT9</i> -F	GGAGTGCCCATCGGTATTGT	146
<i>VvIRT9</i> -R	CTCTGGCAAGTGATCCCTT	
<i>VvIRT10</i> -F	GCTGCTGAGGAGGTCGCAC	176
<i>VvIRT10</i> -R	GTCCACAGGTTCTCCATGC	

### 2.2 VvIRT 蛋白亚细胞定位预测

不同 *VvIRT* 蛋白呈现不同的亚细胞定位特征。*VvIRT7* 蛋白主要定位于液泡膜和细胞质膜。其余 *VvIRT* 蛋白全都主要定位于细胞质膜, 其次是内质网膜 (*VvIRT1*、*VvIRT4*、*VvIRT5*、*VvIRT8*、*VvIRT9* 和 *VvIRT10*)、高尔基体 (*VvIRT1*、*VvIRT2*、*VvIRT3*、*VvIRT6* 和 *VvIRT9*) 和液泡膜 (*VvIRT1*、*VvIRT4* 和 *VvIRT6*); 此外, *VvIRT5*、*VvIRT10* 和 *VvIRT9* 在叶绿体上、*VvIRT4* 和 *VvIRT8* 在细胞核上也有少量分布, *VvIRT4* 和 *VvIRT5* 分别在细胞质和线粒体上也有少量分布 (表 4)。



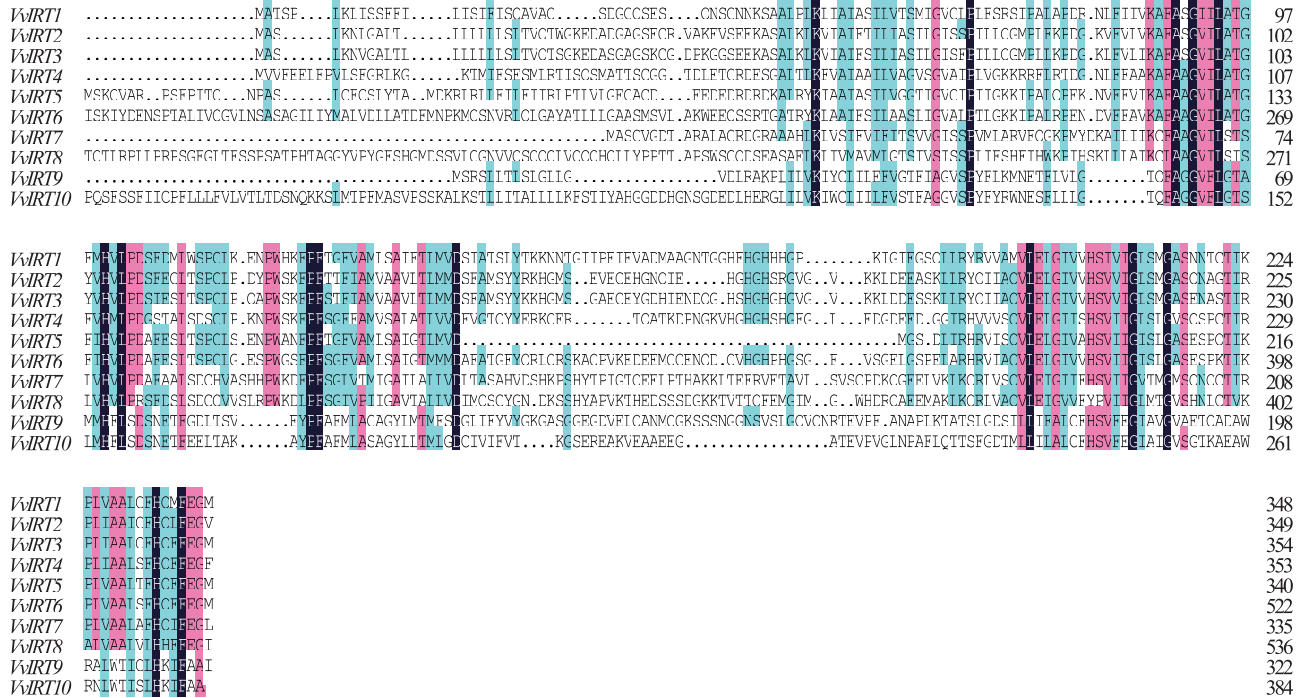


图 1 葡萄 *IRT* 基因编码蛋白质的氨基酸序列比对及保守基序位置

Fig.1 Amino acid sequence alignment and conserved motif position of proteins encoded by grape *IRT* genes

表 3 葡萄 *IRT* 基因及其编码的蛋白质理化特征

Table 3 Physicochemical characteristics of grape *IRT* genes and their encoded proteins

基因	登录号	所在染色体	所在染色体位置 (bp)	编码大小 (bp)	编码蛋白质理化特征					
					氨基酸数	等电点	跨膜区	总平均亲水性指数	不稳定性指数	信号肽含氨基酸数
<i>VvIRT1</i>	GSVIVT01026252001	10	14 924 782~14 928 263	1 047	348	8.92	9	0.66	36.72	1~25
<i>VvIRT2</i>	GSVIVT01026250001	10	14 851 574~14 852 877	1 050	349	7.10	9	0.61	33.88	1~25
<i>VvIRT3</i>	GSVIVT01014337001	19	2 760 837~2 762 169	1 065	354	6.75	9	0.58	32.62	1~26
<i>VvIRT4</i>	GSVIVT01035402001	4	1 036 988~1 039 484	1 062	353	7.07	8	0.49	36.32	-
<i>VvIRT5</i>	GSVIVT01015884001	3	18 936 110~18 943 597	1 023	340	8.09	8	0.62	43.48	-
<i>VvIRT6</i>	GSVIVT01012141001	1	1 086 665~1 093 073	1 569	522	6.71	11	0.42	39.07	-
<i>VvIRT7</i>	GSVIVT01024696001	6	7 660 435~7 661 925	1 008	335	6.85	7	0.73	33.29	-
<i>VvIRT8</i>	GSVIVT01032785001	13	782 570~793 285	1 980	659	9.11	8	0.05	47.74	-
<i>VvIRT9</i>	GSVIVT01014656001	19	8 237 667~8 239 566	969	322	5.31	8	0.77	28.71	-
<i>VvIRT10</i>	GSVIVT01024922001	6	6 012 398~6 014 634	1 155	3 845	6.70	10	0.66	30.42	1~20

-表示无信号肽。

### 2.3 *VvIRT* 在果实发育不同时期的表达模式

花后不同时期,烟酿 1 号葡萄果实、韧皮部、叶片 *VvIRT1*~*VvIRT10* 基因的表达量存在差异(图 3)。在葡萄花后不同时期各组织中 *VvIRT7* 基因的整体表达水平都是最高的,且相对表达量最大值出现在花后 70 d(转色期)的葡萄果实中;表达水平次之的是 *VvIRT9* 和 *VvIRT6*,相对表达量最大值分别出现在

花后 50 d(硬核期)的叶片中和花后 70 d(转色期)的葡萄果实中。在花后 70 d(转色期)的叶片中 *VvIRT2* 基因和花后 85 d(第 2 次膨大期)和 115 d(成熟期)的葡萄果实、韧皮部、叶片中 *VvIRT4* 基因均有微量表达(相对表达量<0.065);而 *VvIRT1*、*VvIRT3*、*VvIRT5*、*VvIRT8* 和 *VvIRT10* 等 5 个基因在不同时期的葡萄采样组织中均无表达。从发育时期上

看,在花后 35 d(幼果期)到 50 d(硬核期),*VvIRT7*、*VvIRT9* 和 *VvIRT6* 在叶片中的相对表达量远高于果实和韧皮部,其中以 *VvIRT7* 和 *VvIRT9* 尤为突出;而花后 70 d(转色期)至 115 d(成熟期),*VvIRT7* 在葡萄果实中相对表达最高,其次为韧皮部和叶片,且始终维持较高的表达水平(相对表达量>1.00),而

*VvIRT9* 在韧皮部和叶片中特异表达,而果实中的相对表达量极低;*VvIRT6* 仅在花后 70 d(转色期)的果实中相对表达量较高,而从花后 85 d(第 2 次膨大期)至 115 d(成熟期)在葡萄果实、韧皮部、叶片中的相对表达量都在 0.07 以下(图 3)。

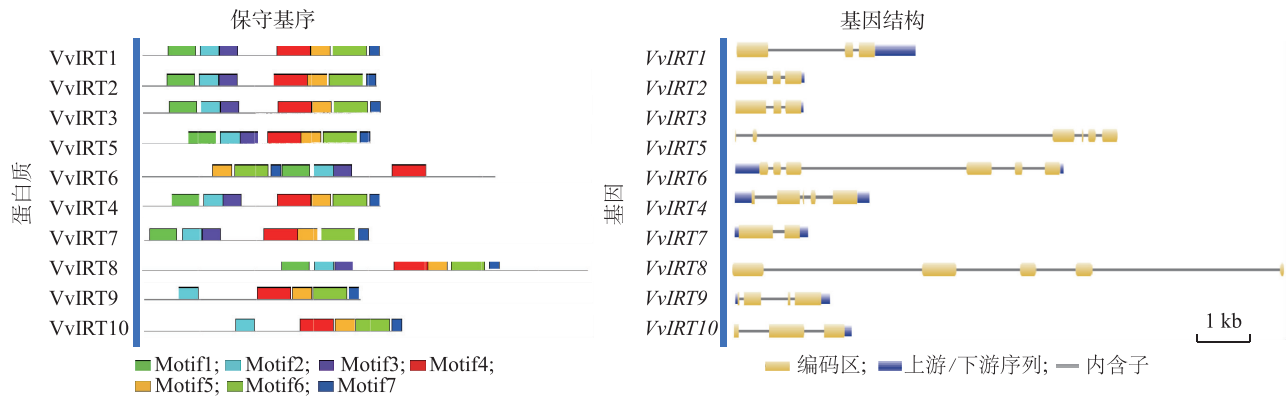


图 2 葡萄 *IRT* 基因结构及其编码蛋白质的保守基序

Fig.2 Structure of grape *IRT* genes and conserved motifs of their encoded proteins

表 4 *VvIRT* 蛋白亚细胞定位预测

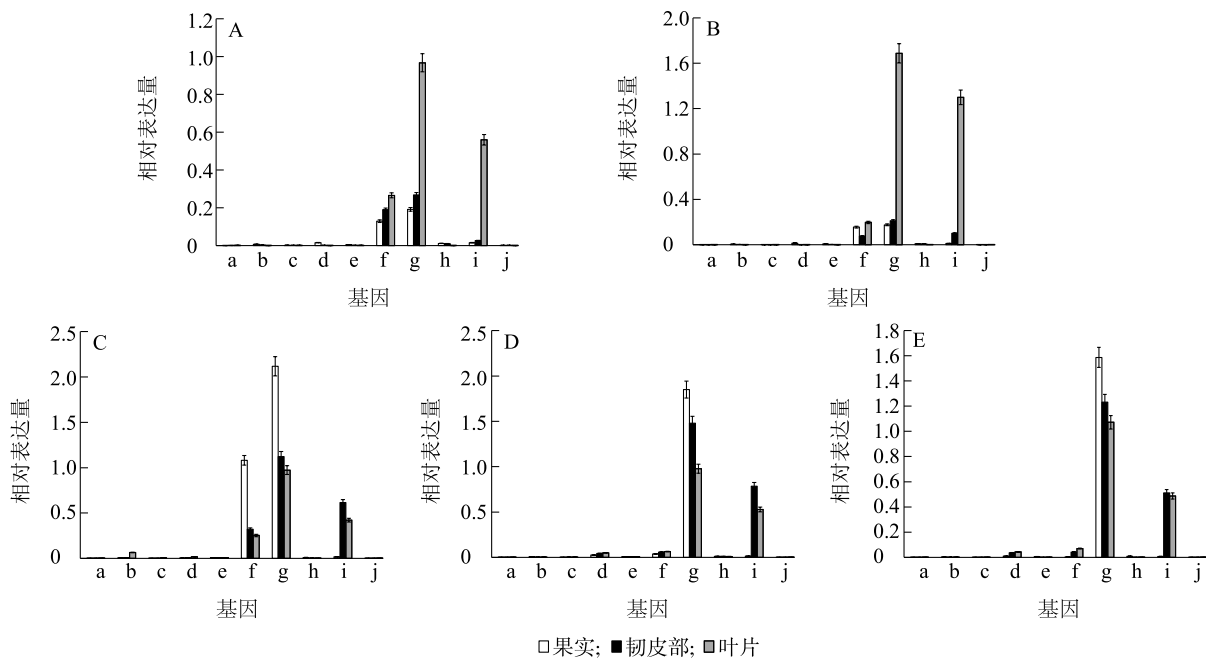
Table 4 Subcellular localization prediction of *VvIRT* proteins

蛋白	不同位置的分布比例(%)							
	细胞质膜	内质网膜	液泡膜	高尔基体	叶绿体	细胞核	细胞质	线粒体
<i>VvIRT1</i>	64.28	7.14	14.28	14.28	—	—	—	—
<i>VvIRT2</i>	85.71	—	—	14.28	—	—	—	—
<i>VvIRT3</i>	78.57	—	—	14.28	—	—	—	—
<i>VvIRT4</i>	57.14	7.14	21.42	—	—	7.14	7.14	—
<i>VvIRT5</i>	50.00	21.42	—	—	21.42	—	—	7.14
<i>VvIRT6</i>	78.57	—	7.14	14.28	—	—	—	—
<i>VvIRT7</i>	35.71	—	64.28	—	—	—	—	—
<i>VvIRT8</i>	64.28	14.28	—	—	—	21.42	—	—
<i>VvIRT9</i>	64.28	14.28	—	14.28	7.14	—	—	—
<i>VvIRT10</i>	85.71	7.14	—	—	7.14	—	—	—

## 2.4 *VvIRT* 对叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理的响应差异

叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理后,花后不同发育时期烟酿 1 号葡萄果实、韧皮部、叶片中 *VvIRT1*~*VvIRT10* 基因的表达倍数存在较大的差异(图 4)。叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理后,花后 35 d(幼果期)至 70 d(转色期),果实、韧皮部、叶片中 *VvIRT7* 和 *VvIRT9* 基因的表达水平显著增强,其中,以韧皮部最为明显;而花后 85 d(第 2 次膨大期)至 115 d

(成熟期),韧皮部和叶片中 *VvIRT7* 和 *VvIRT9* 的表达水平显著降低;同样,叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理后韧皮部和叶片中 *VvIRT6* 的表达水平在花后 35 d(幼果期)至 70 d(转色期)内得到增强。虽然 *VvIRT2* 整体表达量相对较低,但在叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理后,韧皮部和叶片中的表达量在花后 35 d(幼果期)至 115 d(成熟期)都得到提升;而同样整体表达量相对较低的基因 *VvIRT4*,在叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理后,表达量变化不大。虽然



A:花后 35 d(幼果期);B:花后 50 d(硬核期);C:花后 70 d(转色期);D:花后 85 d(第2次膨大期);E:花后 115 d(成熟期)。a:*VvIRT1*;b:*VvIRT2*;c:*VvIRT3*;d:*VvIRT4*;e:*VvIRT5*;f:*VvIRT6*;g:*VvIRT7*;h:*VvIRT8*;i:*VvIRT9*;j:*VvIRT10*。

图 3 花后不同发育时期不同组织 *VvIRT* 基因的表达模式  
Fig.3 Expression patterns of *VvIRT* gene in different tissues at different developmental stages after anthesis

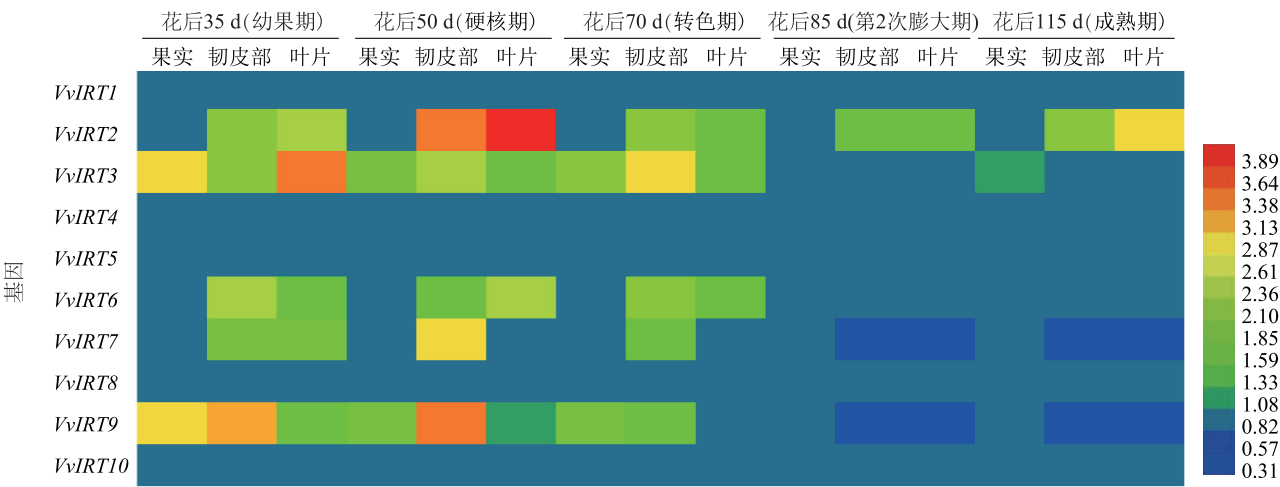


图 4 叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理后花后不同发育时期葡萄果实、叶片、韧皮部 *VvIRT* 基因表达倍数变化热图  
Fig.4 Heat map of *VvIRT* gene fold change in grape fruit, leaf and phloem at different developmental stages after anthesis under the treatment of foliar spraying amino acid-iron compound fertilizer

CK 中,在不同时期的葡萄果实、韧皮部、叶片中 *VvIRT3* 基因均无表达,但在叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理中,花后 35 d(幼果期)至 70 d(转色期)内葡萄果实、韧皮部和叶片中 *VvIRT3* 基因均有表达。在叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理中,葡萄果实、韧皮部和叶片中均没有检测到 *VvIRT1*、*VvIRT5*、*VvIRT8*

和 *VvIRT10* 等 4 个基因的表达,与 CK 一致。

### 3 讨论

#### 3.1 *VvIRT* 蛋白结构及定位特征

铁在水果果实品质和产量形成方面发挥重要作用<sup>[1-6]</sup>。然而,果树中铁素吸收与转运相关基因的生

物学功能依然研究甚少。葡萄属于双子叶植物,其铁素吸收方式属于策略 I<sup>[5-6,9-10]</sup>,但目前葡萄铁吸收与转运的分子机制尚未见报道。

本研究从烟酿 1 号葡萄中克隆并鉴定出 10 个 *VvIRT* 基因,葡萄不同 *VvIRT* 蛋白含有的保守基序数量存在差异,进化关系较近的 *VvIRT9* 和 *VvIRT10* 蛋白质具有一致的保守基序,比 *VvIRT1*~*VvIRT8* 蛋白少 2 个保守基序,这可能会导致这些蛋白质具有不同的生物学功能,这也说明同一家族的葡萄铁调节转运蛋白质(*IRT*)不同成员之间虽然遗传关系相近,但在长期进化过程中其功能可能发生了演变。小金海棠<sup>[19]</sup>、落花生<sup>[20]</sup>、拟南芥<sup>[14-16]</sup>、水稻<sup>[11-12]</sup>等植物的 *IRT* 蛋白主要定位于根表皮细胞质膜上,本研究发现葡萄中除 *VvIRT7* 蛋白主要定位于液泡膜外,其他 *VvIRT* 蛋白亦主要分布在细胞质膜上,这与拟南芥和水稻中的报道相一致。

### 3.2 *VvIRT* 基因在葡萄果实发育不同时期表达特征差异显著

拟南芥 *AtIRT1* 和 *AtIRT2*<sup>[14-16]</sup>、水稻 *OsIRT1* 和 *OsIRT2*<sup>[11,12]</sup>、落花生 *AhIRT1*<sup>[20]</sup>、小金海棠 *MxIRT1*<sup>[19]</sup>、杜梨 *PbIRT1*<sup>[21]</sup>、萝卜 *RsIRT1*<sup>[31]</sup> 等基因均在根部有特异性表达,且在缺铁环境中表达量显著增加。但 *IRT* 基因在葡萄果实发育过程中的表达特征及其生物学功能未见报道。本研究发现在葡萄花后不同发育时期,果实、韧皮部和叶片中 *VvIRT7* 基因均有较高的表达水平,在转色期至成熟期葡萄果实中的相对表达量高于韧皮部和叶片。由于 *VvIRT7* 蛋白仅定位于液泡膜和细胞质膜,说明该基因可能在葡萄果实发育过程中(特别是转色期至成熟期)参与果肉细胞液泡膜和质膜中  $\text{Fe}^{2+}$  的转运,进而调节或维持果肉细胞铁素动态平衡。此外,烟酿 1 号葡萄叶片中 *VvIRT9* 基因在花后不同发育时期的相对表达量均保持较高水平,韧皮部 *VvIRT6* 基因在转色期有高表达量,说明这 2 个基因在葡萄花后特定时期叶片或韧皮部  $\text{Fe}^{2+}$  转运中亦发挥作用。

### 3.3 *VvIRT* 基因对叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理的响应差异

果树生长中,秋季发生的养分回流可保障多年生木本树体实现养分的循环利用<sup>[30,32-33]</sup>。进入秋季后,桃树叶片中的铁含量开始降低<sup>[25]</sup>,而叶面喷施氨基酸-铁复合肥能提升桃果实的内在品质,促进桃叶片的发育、改善树体铁素营养状况,并增强  $\text{Fe-S}$

簇装配机制相关基因的表达<sup>[24-25]</sup>。本研究发现叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理下,不同组织中 *VvIRT* 基因的表达倍数随花后发育时间呈现不同的特征。从幼果期至转色期,韧皮部 *VvIRT7*、*VvIRT9* 和 *VvIRT6* 基因的表达水平及葡萄幼果中 *VvIRT9* 的表达水平受叶面喷施氨基酸-铁复合肥的诱导而显著增强,而从第 2 次膨大期至成熟期,韧皮部和叶片中 *VvIRT7* 和 *VvIRT9* 的表达水平在叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理下显著降低,而葡萄果实、韧皮部和叶片中 *VvIRT6* 的表达水平不受叶面喷施氨基酸-铁复合肥影响。尽管在 CK 的葡萄果实、韧皮部和叶片中没有检测到 *VvIRT3* 的表达量,但在叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理下从幼果期至转色期,葡萄果实、韧皮部和叶片中 *VvIRT3* 表达量得到诱导。在葡萄发育初期至转色期,葡萄树体可能需要更多的  $\text{Fe}^{2+}$  用于果实发育和品质形成,叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理后,*VvIRT* 的表达水平大多受诱导而增强,进而发挥其转运  $\text{Fe}^{2+}$  的功能。而转色期至成熟期,果实、韧皮部和叶片中 *VvIRT7* 基因持续稳定的高表达,韧皮部和叶片中 *VvIRT9* 特异高表达,从而能够满足葡萄这一发育时期对铁调节转运的需求。

尽管花后不同发育时期,烟酿 1 号不同组织中 *VvIRT4* 的整体表达量相对较低,但其表达非常稳定,且在叶面喷施氨基酸-铁复合肥处理下,其表达倍数没有明显变化,说明 *VvIRT4* 蛋白在葡萄花后不同发育时期能持续发挥  $\text{Fe}^{2+}$  转运作用。同样,葡萄不同组织中 *VvIRT2* 的整体表达量亦相对较低,但该基因对叶面喷施氨基酸-铁复合肥最为敏感;从幼果期至成熟期,特别是在韧皮部和叶片中该基因的表达量持续得到诱导增强,说明该基因更倾向于在外界  $\text{Fe}^{2+}$  供应丰富的情况下发挥作用。此外,烟酿 1 号不同组织中均没有检测到 *VvIRT1*、*VvIRT5*、*VvIRT8* 和 *VvIRT10* 等 4 个基因的表达,且其对叶面喷施氨基酸-铁复合肥也没有响应,说明这些基因编码的铁调节转运蛋白在葡萄果实发育过程中发挥的功能较少。

### 参考文献:

- [1] LILL R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins[J]. Nature, 2009, 460(7257): 831-838.
- [2] BARTO L L, ABADIA J. Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms[M]. New York: Springer-Verlag, 2006: 85-101.
- [3] BALK J, PILON M. Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants[J]. Trends in Plant Science, 2011, 16:



- 218-226.
- [4] COUTURIER J, TOURAINE B, BRIAT J F, et al. The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: Current knowledge and open questions[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4:259.
  - [5] 张妮娜,上官周平,陈娟. 植物应答缺铁胁迫的分子生理机制及其调控[J]. *植物营养与肥料学报*, 2018, 24(5):1365-1377.
  - [6] 李俊成,于慧,杨素欣,等. 植物对铁元素吸收的分子调控机制研究进展[J]. *植物生理学报*, 2016, 52(6):835-842.
  - [7] TAGLIAVINI M, ABADIÁ J, ROMBOLÀ A D, et al. Agronomic means for the control of iron deficiency chlorosis in deciduous fruit trees[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 2000, 23:2007-2022.
  - [8] TAGLIAVINI M, ROMBOLÀ A D. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems[J]. *European Journal of Agronomy*, 2001, 15:72-92.
  - [9] KOBAYASHI T, NISHIZAWA N K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63:131-152.
  - [10] ROMHELD V, MARSCHNER H. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses[J]. *Plant Physiology*, 1986, 80(1):175-180.
  - [11] ISHIMARU Y, SUZUKI M, TSUKAMOTO T, et al. Rice plants take up iron as an  $\text{Fe}^{3+}$ -phytosiderophore and as  $\text{Fe}^{2+}$ [J]. *Plant Journal*, 2006, 45(3):335-346.
  - [12] NAKANISHI H, OGAWA I, ISHIMARU Y, et al. Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by  $\text{Fe}^{2+}$  transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2006, 52:464-469.
  - [13] ZELAZNY E, VERT G. Regulation of iron uptake by IRT1: Endocytosis pulls the trigger[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8:977-979.
  - [14] EIDE D, BRODERIUS M, FETT J, et al. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(11):5624-5628.
  - [15] VERT G, GROTZ N, DÉDALDÉCHAMP F, et al. IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(6):1223-1233.
  - [16] FOURCROY P, TISSOT N, GAYMARD F, et al. Facilitated Fe nutrition by phenolic compounds excreted by the *Arabidopsis* ABCG37/PDR9 transporter requires the IRT1/FRO2 high-affinity root  $\text{Fe}^{2+}$  transport system[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(3):485.
  - [17] VERT G, BARBERON M, ZELAZNY E, et al. *Arabidopsis* IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells[J]. *Planta*, 2009, 229:1171-1179.
  - [18] ECKHARDT U, MARQUES A M, BUCKHOUT T J. Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 45:437-448.
  - [19] LI P, QI J L, WANG L, et al. Functional expression of MxIRT1, from *Malus xiaojinensis*, complements an iron uptake deficient yeast mutant for plasma membrane targeting via membrane vesicles trafficking process[J]. *Plant Science*, 2006, 171:52-59.
  - [20] DING H, DUAN L H, LI J, et al. Cloning and functional analysis of the peanut iron transporter *AhIRT1* during iron deficiency stress and intercropping with maize[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(12):996-1002.
  - [21] 金昕,刘娜,申长卫,等. 杜梨 *IRT1* 基因的克隆及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(5):739-749.
  - [22] JAILLON O, AURY J M, NOEL B, et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla[J]. *Nature*, 2007, 449(7161):463-467.
  - [23] 王旭,封朝晖,刘蜜,等. 含氨基酸水溶肥料: NY 1429-2007[S]. 北京:中华人民共和国农业部, 2007.
  - [24] SONG Z Z, MA R J, ZHANG B B, et al. Differential expression of iron-sulfur cluster biosynthesis genes during peach fruit development and ripening, and their response to iron compound spraying[J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 207:73-81.
  - [25] SHENG Y T, CHENG H, WANG L M, et al. Foliar spraying with compound amino acid-iron fertilizer increases leaf fresh weight, photosynthesis and *Fe-S* cluster gene expression in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch][J]. *Biomed Research International*, 2020, 2020:2854795.
  - [26] 张璐,宗亚奇,徐维华,等. 葡萄 *Fe-S* 簇装配基因的鉴定、克隆和表达特征分析[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(23):5068-5082.
  - [27] TANG M L, LI Y H, CHEN Y H, et al. Characterization and expression of ammonium transporter in peach (*Prunus persica*) and regulation analysis in response to external ammonium supply[J]. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 2020, 89(4):925-941.
  - [28] 王壮伟,王庆莲,夏瑾,等. 葡萄 *KEA* 家族基因的克隆、鉴定及表达分析[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(23):4522-4534.
  - [29] 沈静沅,唐美玲,杨庆山,等. 葡萄钾离子通道基因 *VviSKOR* 的克隆、表达及电生理功能[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(15):3158-3168.
  - [30] 宋志忠,马瑞娟,张斌斌,等. *KT/HAK/KUP* 家族基因在桃叶片发育过程中的表达及其对钾肥施放的响应[J]. *果树学报*, 2016, 33(6):257-267.
  - [31] 贺晓燕,龚义勤,徐良,等. 萝卜铁转运蛋白基因 *RsIRT1* 分子特征分析[J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36(6):13-18.
  - [32] 李志安,王伯荪,林永标,等. 植物营养转移研究进展[J]. *武汉植物学研究*, 2000, 18:229-236.
  - [33] JEONG J, MERKOVICH A, CLYNE M, et al. Directing iron transport in dicots: regulation of iron acquisition and translocation[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 39:106-113.

(责任编辑:石春林)