

葡萄 *ZTL*、*COPI* 基因的鉴定及其在不同光质和转光条件下的表达分析

马彦妮, 陈佰鸿*, 毛娟, 左存武, 吴金红, 杨始锦, 胡紫璟, 李婷婷

(甘肃农业大学园艺学院, 兰州 730070)

摘要:【目的】在葡萄试管苗离体培养下, 研究不同波长对基因 *ZTL*、*COPI* 表达的影响。【方法】以‘红地球’葡萄 (*Vitis vinifera* ‘Red Globe’) 试管苗为材料, 经 RT-PCR 法克隆获得葡萄 *ZTL*、*COPI* 基因全长 cDNA, 并利用生物信息学分析了以上基因的理化性质、蛋白质二级结构、亚细胞定位以及系统进化树。利用 qRT-PCR 技术分析了以上基因在不同光质处理下表达量的变化情况。利用荧光参数系统分析不同光质对葡萄试管苗生长的影响。【结果】*ZTL* 的分子式为 $C_{1972}H_{3107}N_{553}O_{576}S_{20}$, 是亲水性稳定蛋白, 脂溶性较差; *COPI* 的分子式为 $C_{832}H_{1291}N_{209}O_{225}S_9$, 是疏水性稳定蛋白, 脂溶性较好。*ZTL* 和 *COPI* 的二级结构均由 α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲和延伸链结构组成; 亚细胞定位分析结果显示, *ZTL*、*COPI* 均位于细胞质中; 系统进化分析表明, *ZTL* 与桃的亲缘关系最近, *COPI* 与其他物种的亲缘关系均较远, 单独聚为一个亚族。在不同光质处理后 *ZTL* 均为上调表达, 其中白光转蓝光、红光、红光转白光、红光转蓝光和蓝光转红光处理后分别上调达 11.2、22.3、12.0、32.9 和 19.6 倍。不同光质处理后 *COPI* 基因的表达呈现不同的变化趋势: 红光转蓝光处理后, *COPI* 上调 1.97 倍, 红光处理后表达量无显著变化, 其他光质处理后均为下调表达, 其中蓝光转白光和蓝光转红光处理后下调达 18 倍。荧光参数分析表明, qP、qN、NPQ 和 F_v/F_m 在转光培养中表达活跃, 均在红光转蓝光的转光培养下表达量最高。【结论】*ZTL* 在葡萄转光培养中表达活跃, 均呈显著上调趋势, 而 *COPI* 总体表现为下调趋势。

关键词: 葡萄试管苗; *ZTL* 基因; *COPI* 基因; 克隆; 表达分析

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)05-0541-11

Identification of the *ZTL* and *COPI* gene in *Vitis vinifera* and expression analysis of different light qualities and light transfers

MA Yanni, CHEN Baihong*, MAO Juan, ZUO Cunwu, WU Jinhong, YANG Shijin, HU Zijing, LI Tingting
(College of Horticulture, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: 【Objective】The *ZTL* and *COPI* genes in *Vitis vinifera* were identified. Furthermore, the expression levels were detected after the plantlets were treated with different light conditions. 【Methods】Full-length cDNA sequences of *ZTL* and *COPI* were successfully cloned from tissue cultural plantlets of the ‘Red Globe’ grape (*Vitis vinifera*). To understand their structure and function, physical and chemical characterization, protein secondary structure, sub-cellular localization, secondary structure and phylogenetic relationships of the two genes above were determined by using bioinformatic analysis. The expressions of the two genes were analyzed by using qRT-PCR and applying different treatments. In addition, the fluorescence expressions of the grape test-tube plantlets were analyzed by using a fluorescence parameter and applying different treatments. 【Results】The sequence analysis revealed that the open reading frame of *ZTL* was 1 239 bp in size, encoding 412 amino acids with ATG as the initiation codon and TAA astermination codon. *COPI* showed that the open reading frame was 486 bp, encoding 160 amino acids with ATG as the initiation codon and TGA and TAA astermination codons. The results showed that *ZTL* exhibited the molecular formula of $C_{1972}H_{3107}N_{553}O_{576}S_{20}$, which is a hydrophilic stable protein and also dis-

收稿日期: 2016-11-11 接受日期: 2017-01-31

基金项目: 国家自然科学基金(31401500)

作者简介: 马彦妮, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 果树生理与生物技术。Tel: 18298333016, E-mail: 1554932816@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13893210816, E-mail: bhch@gsau.edu.cn

played poor fat solubility. However, *COPI* showed a molecular formula of $C_{832}H_{1291}N_{209}O_{225}S_9$, which is a hydrophobic stable protein and showed favorable fat solubility. The protein of *ZTL* and *COPI* showed the same secondary structure, which is comprised of alpha helix, beta turn, random coil and an extended strand. However, the *ZTL* showed random coil > extended strand > alpha helix > beta turn, the *COPI* showed that the extended strand > random coil > alpha helix > beta turn. Transmembrane domain and signal peptide showed that *ZTL* was the membrane protein and *COPI* was the transmembrane protein. Subcellular localization analysis showed that the protein of the two genes was located in the cytoplasm. The functional domain showed that *ZTL* contains a highly conserved domain of F-box between the first to sixtieth amino acids. *COPI* contains a highly conserved domain of WD40/YVTN between the 20th to 123rd amino acids. Homology analysis showed that the total similarity between *ZTL* and other plant homologues exhibited a 74.59% identity relationship in amino acid sequences. While the total similarity between *COPI* and other plant homologues exhibited a 61.24% identity relationship in amino acid sequences. The phosphorylation site showed that *ZTL* consisted of 19 phosphorylation sites, including 9 serine phosphorylation sites, 9 threonine phosphorylation sites and 1 tyrosine phosphorylation site. *COPI* consisted of 5 phosphorylation sites, including 2 serine phosphorylation sites, 2 threonine phosphorylation sites and 1 tyrosine phosphorylation site. Phylogenetic analysis showed the most closely identified relationships between *ZTL* and the orthologous genes were in *Prunus persica*. While *COPI* was much further from orthologous in the other species, which could be clustered into an individual subgroup. Compared with the control (white light), the up-regulation of the *ZTL* gene were discovered within all treatments. Within them, the higher expressions were detected from white to red light, red light, red to white light and red to blue light treatments, which up-regulated 11.2, 22.3, 12.0, 32.9 and 19.6 folds, respectively. The different changes in *COPI* expression were discovered from distinguishable light treatments. The expression was up-regulated 1.97 folds and treated by blue light with no significant changes in the red light treatment. Down-regulation was detected within other treatments. Within them, the expressions were down-regulated 18 folds from blue to white light and blue to red light treatments. The fluorescence parameter showed that the different changes in the qP expression were discovered from distinguishable light treatments. After red to blue, red, blue to red and red to white were significantly higher than the control (white light), the expressions were up-regulated 1.97 folds treated by red to blue light. There was no significant difference between the expression level of the white light treatment and control (white). The expression level was significantly lower than that in the control (white) after the blue treatment. The different changes in qN and NPQ expressions were discovered from distinguishable light treatments. After red to blue, red and blue to red were significantly higher than the control (white), the expressions of qN and NPQ were up-regulated 1.41 and 1.79 folds and treated by red to blue light. The expression level was significantly lower than that in the control (white) after the blue to white treatment. The different changes in F_v/F_m expression were discovered from distinguishable light treatments. After red to blue and blue to red were significantly higher than the control (white), the expression of F_v/F_m was up-regulated 1.08 folds treated by red to blue light. There was no significant difference between the expression level of red, red to white, white to blue, blue and blue to white light treatment and the control (white). The expression level was significantly lower than that in the control (white) after the white to red treatment. 【Conclusion】 Comprehensive analysis showed that the *ZTL* expression was active in the light of the grapes, and showed a significant upward trend, while *COPI* showed a downward trend. Fluorescence parameter analysis showed that qP, qN, NPQ and F_v/F_m expressions were active in the red to blue light of the grapes, and showed a significant upward trend.

Key words: Grape plantlets; *ZTL* gene; *COPI* gene; Cloning; Expression analysis

光照是植物生长发育过程中必需的环境因子之一。在光照条件下,植物叶片通过叶绿体完成光合作用,不仅为植物光合作用提供辐射能,也直接或间接地影响植物的形态建成、生长发育、光合作用、抗逆和衰老、物质代谢以及基因表达^[1-2]。

不同波普范围的光(光质)对植物的生长发育有较大影响。研究发现,蓝光抑制葡萄试管苗的伸长生长、促进光合色素的形成,而与蓝光相比,红光更有利于提高植物叶绿素含量^[3-4]。另外,红光对葡萄愈伤组织的生长有促进作用,同时提高植物干物质的积累,促进光合效率,提高总糖含量,却抑制了白藜芦醇的合成;蓝光对葡萄愈伤组织的生长无影响,但提高了白藜芦醇含量,可以抑制茎伸长、增加叶面积、提前花期等作用^[5],有利于光合基因的表达。

ZTL(ZEITLUPE)属于蓝光受体家族,参与了植物许多生长发育过程的调节,在光周期反应和开花途径中起重要作用,也可影响生物体内蛋白的稳定性、调节生物钟的功能和正常运转^[6]。COPI(CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1)是光调控植物发育的分子开关,为光形态建成的抑制子^[7]。在拟南芥、芜菁、甘蓝型油菜^[8-9]等多种植物中有研究表明光照下COPI表达量低于黑暗处理^[10]。

葡萄是继拟南芥、水稻、杨树之后进行全基因组测序的第四种开花植物,其测序的完成为开展葡萄分子生物学研究提供了极大便利^[11]。在对ZTL、COPI基因已有研究的植物中,以上2个基因均对光质较为敏感,并在光周期反应和光形态建成过程中起重要作用^[12-13]。然而在葡萄的研究中,以上两个基因的生物物理特性如何、对不同光质和不同波长下的转光处理是否敏感等,目前尚不明确。目前研究光合主要是测定叶片的光合速率和叶绿素荧光分

析。对葡萄光合特性及叶绿素荧光分析的研究已有大量报道^[14],但通过光质设置来调节葡萄试管苗的生长,达到对光能的最大利用率的研究较少。笔者旨在从葡萄中克隆获得ZTL、COPI基因全长,通过生物信息学分析及功能的鉴定,为ZTL、COPI在葡萄光质改良及功能研究中的应用奠定基础。通过光质转换对葡萄试管苗生长的影响,探讨不同光质对葡萄光合能力的调控机制,提高光合利用率,进而为葡萄的田间管理提供便利。

1 材料和方法

1.1 材料

试验所用材料为葡萄‘红地球’(*Vitis vinifera* ‘Red Globe’)试管苗,保存于甘肃农业大学果树生理与生物技术实验室。

大肠杆菌感受态细胞DH5 α 、TIANgel Midi Purification Kit琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自Tiangen(北京)公司;ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒购自Thermo Fisher Scientific(上海)公司;GEM-Teasy载体、2 \times LigBuffer、T₄DNA、2 \times EcoTaq PCR SuperMix、dd-H₂O购自TaKaRa(大连)公司;Marker V购自TransGen Biotech(北京)公司。

1.2 方法

1.2.1 试管苗培养及RNA提取 将‘红地球’葡萄试管苗茎段接种于GS液体培养基上,在LED白光(WLED 424~724 nm, 459 nm)、红光(RLED 606~657 nm, 635 nm)、蓝光(BLED 440~500 nm, 465 nm)的人工气候箱中培养。培条件为28℃, 220 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照16 h; 23℃暗培养8 h。

在上述条件下对葡萄试管苗进行不同光质和转光培养(表1),生长至35 d后取试管苗叶片,生物学3次重复,并用CTAB法提取总RNA^[15]。

表1 葡萄试管苗不同光质和转光处理条件

Table 1 Treatment conditions of grape plantlets under different light conversions

| 处理 Treatment | 处理条件 Treatment condition |
|--------------|--|
| L1 | 白光下生长至35 d Growth 35 days under white light |
| L2 | 白光下培养10 d转到红光下生长至35 d Growth 10 days under white light, and then transferred to growth the red light to 35 days |
| L3 | 白光下培养10 d转到蓝光下生长至35 d Growth 10 days under white light, and then transferred to growth the blue light to 35 days |
| L4 | 红光下生长至35 d Growth 35 days under red light |
| L5 | 红光下培养10 d转到白光下生长至35 d Growth 10 days under red light, and then transferred to growth the white light to 35 days |
| L6 | 红光下培养10 d转到蓝光下生长至35 d Growth 10 days under red light, and then transferred to growth the blue light to 35 days |
| L7 | 蓝光下生长至35 d Growth 35 days under blue light |
| L8 | 蓝光下培养10 d转到白光下生长至35 d Growth 10 days under blue light, and then transferred to growth the white light to 35 days |
| L9 | 蓝光下培养10 d转到红光下生长至35 d Growth 10 days under blue light, and then transferred to growth the red light to 35 days |

1.2.2 cDNA 链的合成 cDNA 的合成利用 Super-Script™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) 试剂盒进行, 操作过程参考说明书, 合成的 cDNA 用于基因扩增及 qPCR 检测。

1.2.3 葡萄 *ZTL*、*COPI* 基因的克隆 葡萄 *ZTL* 和 *COPI* 基因的引物在 Primer Premier 5.0 软件上进行^[16]。*ZTL* 上游引物 QS: 5'-GCATGCAATTGAGC-GATGAAGTCCTGT-3'; 下游引物 QA: 5'-GCTTAG-GTGACCGAACT-3'。*COPI* 上游引物 QS: 5'-GC-GATCATGATCACAAGATGGAGC-3'; 下游引物 QA: 5'-GCGAGCTCTTAAGCTATGGAGTAT-3'。

PCR 扩增程序为: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 100 s, 40 个循环; 最后再 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶回收试剂盒回收纯化 PCR 目的 DNA 条带, 与克隆载体 pGEM-Teasy 连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 蓝白斑筛选, 经菌液 PCR 鉴定均为阳性克隆^[17]送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.4 同源性比对及系统进化树构建 通过 NCBI 在线比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 找出与其同源性较高的其他植物的蛋白序列, 使用 DNAMAN 软件进行多序列比对, 并用 Clustalx 1.83 和 MEGA 5.0 软件进行同源性比较, 构建系统进化树。

1.2.5 生物信息学分析 利用 Expasy 工具 (<http://ca.expasy.org/tools.protscale.htm>) 中提供的 ProtParam 和 ProtScale 在线分别进行氨基酸残基的数目、分子量、理论等电点、脂溶指数、不稳定指数和氨基酸的亲、疏水性的分析。蛋白质的二级结构预测使用 SOPMA (<http://www.predictprotein.org/>) 完成。基因的亚细胞定位、跨膜结构域、信号肽和功能域的分析分别采用在线分析软件 WoLF PSORT (<http://psort.hgo.jp/form.html>)、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)、SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 InterPro: protein sequence analysis & classification (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)。

1.2.6 葡萄 *ZTL*、*COPI* 基因的实时荧光定量 PCR 根据 CDS 区及其功能域设计上下游引物, *ZTL* 上游引物 QS: 5'-CATCGGCTCTGTCTGT-3'; 下游引物 QA: 5'-TCATTGAGTAAACCCTGT-3'。*COPI* 上游引物 QS: 5'-TTTACATTCTGGTGGCC-3'; 下游引物

QA: 5'-AACGCATCTTGTTTCTG-3'。

qPCR 分析使用仪器为 Bio-Rad iCycler iQ 实时定量 PCR 仪, 对葡萄试管苗不同转光培养及不同组织下的表达水平进行分析, 以葡萄看家基因 *UBQ* 为内参基因。扩增体系含 1 μ L cDNA, 上下游引物各 0.8 μ L, 10 μ L 反应 MIX, 7.4 μ L ddH₂O, 总体积 20 μ L。反应程序为 95 °C 1 min, 95 °C 10 s, 50 °C 20 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。试验设置 3 次生物学重复, 采用 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法分析数据, 计算每个基因的相对表达量。

1.2.7 荧光参数 全程在暗处进行荧光参数的测定, 选取不同光质培养 30 d、长势均匀的‘红地球’试管苗 1 瓶, 从任选 3 株试管苗, 随机选取试管苗任意叶片的任一部位进行测定。过程中应注意记录顺序以便与数据对照。

1.2.8 数据统计分析 用 Microsoft Excel 2007 软件进行数据整理, 用 SPSS 19.0 对数据进行统计分析, 采用 Duncan 法进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 葡萄 *ZTL*、*COPI* 基因的克隆

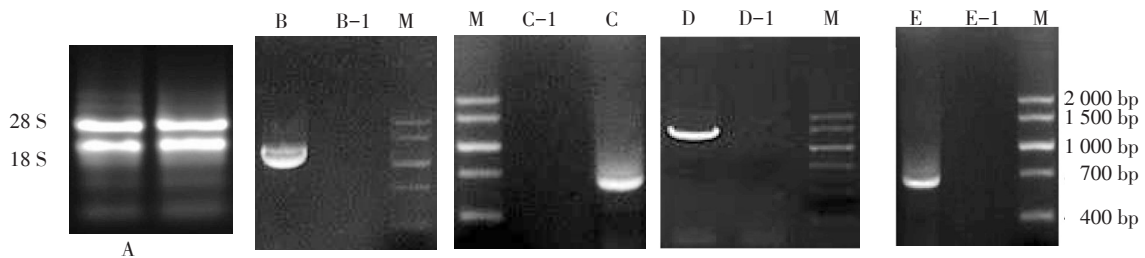
提取的总 RNA 经过琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 条带完整, 未发生降解, 纯度和完整性均符合本试验要求。以 cDNA 为模板, 用特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增结果符合预期值。以菌液为模板进行 PCR 扩增, 获得与目的条带大小一致的单一条带 (图 1)。测序结果为 *ZTL* 基因片段大小为 1 239 bp, *COPI* 基因片段大小为 423 bp。

2.2 葡萄 *ZTL*、*COPI* 基因的序列分析

基因测序结果如图 1 所示。*ZTL* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 1 239 bp, 包括 412 个氨基酸编码区、1 个起始密码子 ATG 和 1 个终止子 TAA。*COPI* 基因的 ORF 为 486 bp, 包括 160 个氨基酸编码区、1 个起始密码子 ATG 和 2 个终止子 TGA、TAA。

2.3 同源性比对及系统进化分析

将‘红地球’葡萄 *ZTL* 编码的氨基酸序列与相近物种的氨基酸序列进行多序列比对分析 (图 2), 结果显示 *ZTL* 与其他物种的总相似度达到 74.59%, 其与桃 (*Prunus persica* XP_007225643.1) 同源性最高, 为 78.89%, 与欧洲山杨 (*Populus tremula* AEA_50890.1) 为 72.34%, 与棉 (*Gossypium arboreum*

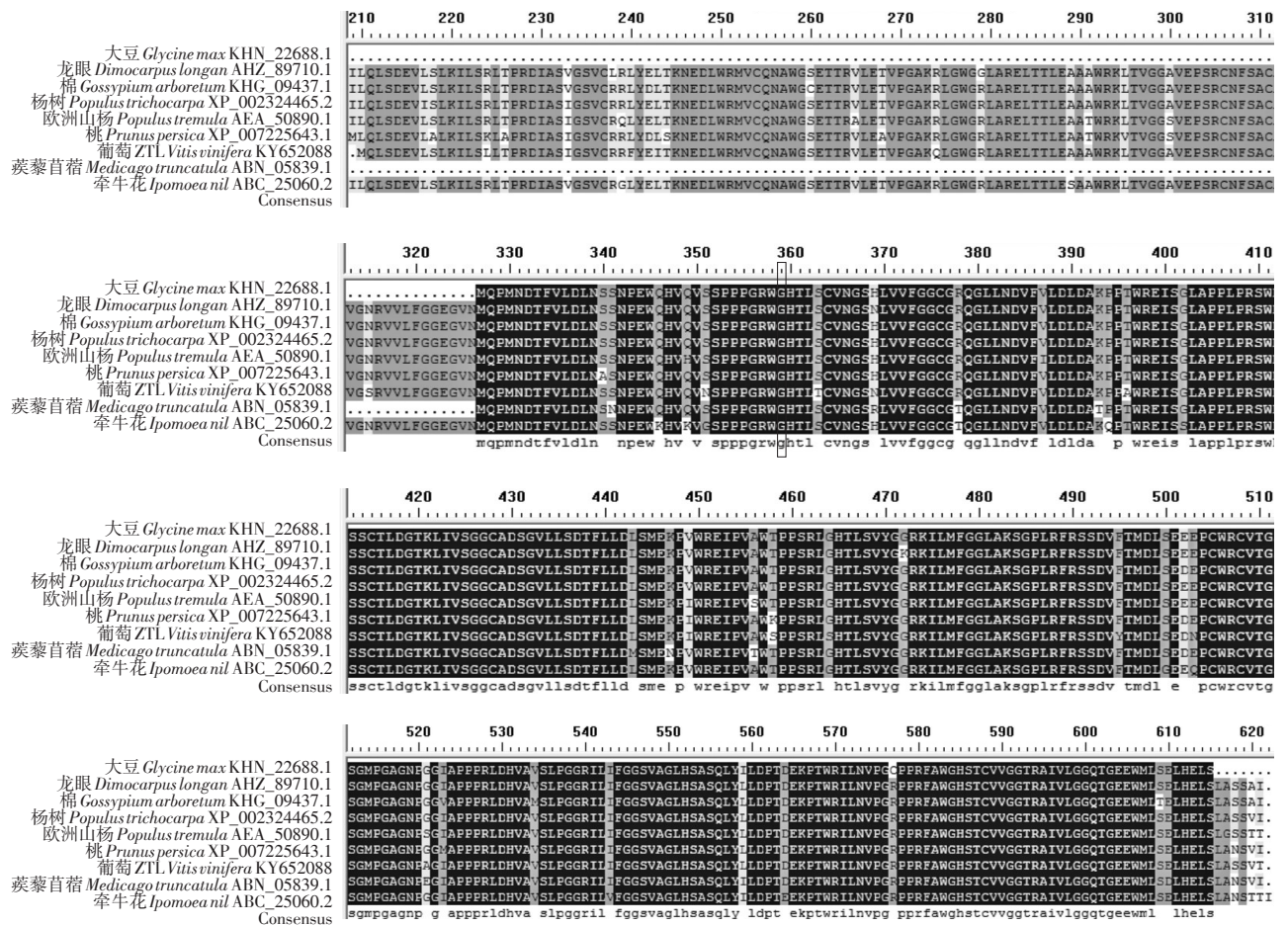


A 为葡萄叶片总 RNA 电泳图;M. DNA Marker V;B-1 和 C-1 分别为 ZTL 和 COPI 的 PCR 扩增的阴性对照;D-1 和 E-1 为分别 ZTL 和 COPI 的菌液 PCR 扩增的阴性对照;B 和 C 分别为 ZTL 和 COPI 的目的条带扩增带;D 和 E 分别为 ZTL 和 COPI 的菌液 PCR 扩增带。

A is the electrophoretogram of the total RNA isolated from the *Vitis vinifera* leaf;M. DNA Marker V;B-1 and C-1 were the blank control of the genes ZTL and COPI, respectively;B and C were the amplified target band of the genes ZTL and COPI, respectively;D-1 and E-1 were the bacteria PCR amplified blank control of the genes ZTL and COPI, respectively;D and E were the bacteria PCR amplified band, respectively.

图 1 葡萄 RNA 的提取及 ZTL、COPI 目的条带的扩增和菌液 PCR 的检测

Fig. 1 RNA extraction, target band and bacteria PCR amplification of ZTL and COPI from the grape



边框标注 ZTL 苏氨酸磷酸化位点。

The ZTL threonine phosphorylation site is marked in the frame.

图 2 葡萄 ZTL 与其他植物 ZTL 同源蛋白的多序列比对分析 (部分结果)

Fig. 2 Multiple sequence alignment analysis of VvZTL with ZTL homologs from other plants (partial results)

KHG_09437.1) 为 71.19%, 与大豆 (*Glycine max* KHN_22688.1) 为 67.96%, 与蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* ABN_05839.1) 为 66.75%, 与杨树 (*Popu-*

lus trichocarpa XP_002324465.2) 为 64.11%, 与龙眼 (*Dimocarpus longan* AHZ_89710.1) 为 64.04%。磷酸化位点分析结果显示,对于 ZTL 有 19 个磷酸化位

点,包括 9 个丝氨酸磷酸化位点(Ser⁹、Ser²⁰¹、Ser²¹⁶、Ser²³⁵、Ser²⁵⁵、Ser²⁵⁹、Ser²⁸³、Ser²⁹¹、Ser³²⁶),9 个苏氨酸磷酸化位点(Thr¹⁷、Thr³⁵、Thr⁵³、Thr⁵⁴、Thr⁷⁶、Thr⁸⁷、Thr³⁵⁹、Thr³⁷⁸、Thr³⁹³)和 1 个酪氨酸磷酸化位点(Tyr²⁸⁶)。

将‘红地球’葡萄 COP1 编码的氨基酸序列与相近物种的氨基酸序列进行多序列比对分析(图 3),结果显示 COP1 与其他物种的总相似度达到 61.24%,其与烟草(*Nicotiana sylvestris* XP_009625385.1)同源性为 15.66%,与马铃薯(*Solanum tuberosum*XP_006358977.1)为 12.14%,与柑橘

(*Citrus sinensis*KD_62498.1)为 11.72%,与芝麻(*Sesamum indicum*XP_011089302.1)为 11.43%,与番茄(*Solanum lycopersicum* XP_010313898.1)为 11.38%,与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*NP_683567.1)为 11.23%,与甜菜(*Beta Vulgaris subsp*XP_010694977.1)为 10.90%。磷酸化位点分析结果表明,对于 COP1 有 5 个磷酸化位点,包括 2 个丝氨酸磷酸化位点(Ser⁶¹、Ser¹³⁵)、2 个苏氨酸磷酸化位点(Thr²⁴、Thr⁹⁴)和 1 个酪氨酸磷酸化位点(Tyr⁴³)。

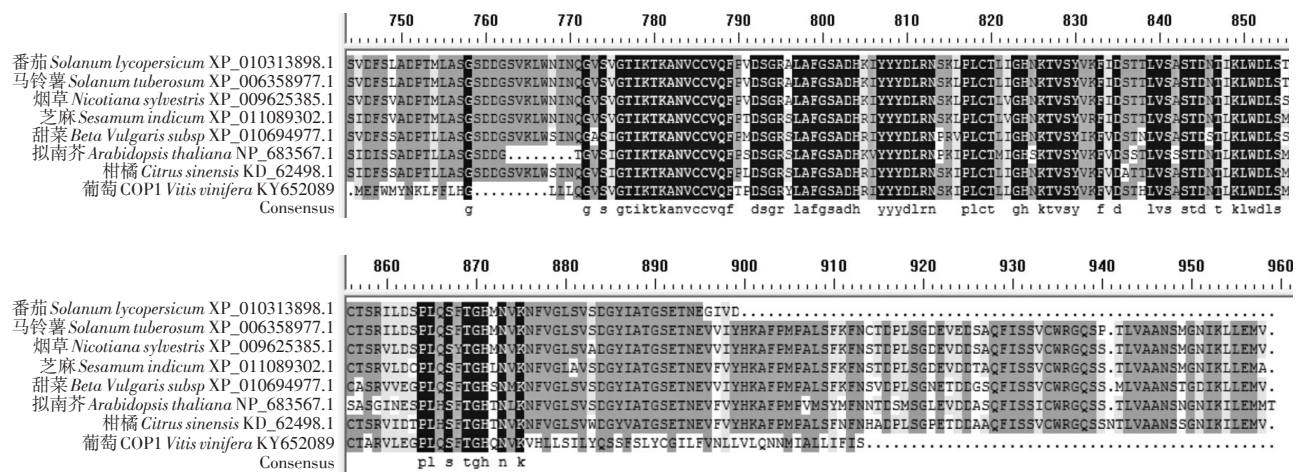


图 3 葡萄 COP1 与其他植物 COP1 同源蛋白的多序列比对分析 (部分结果)

Fig. 3 Multiple sequence alignment analysis of VvCOP1 with COP1 homologs from other plants (partial results)

为分析‘红地球’葡萄 ZTL 与其他 8 种相近物种同源蛋白的系统进化关系,用 Clustalx1.83 和 MEGA5.0 软件对这些氨基酸序列进行多序列比对,然后用 Maximum Likelihood 法(参数为 500)构建进化树,结果显示这 9 种 ZTL 可以划分为 3 个亚家族,‘红地球’葡萄与蔷薇科的桃亲缘关系最近,归为 1 个亚家族;杨树、棉、龙眼以及大豆归为 1 个亚家族;其余的 2 种可以归为 1 个亚家族(图 4)。

对‘红地球’葡萄 COP1 与其他 7 种相近物种同源蛋白的系统进化关系,用 Clustalx1.83 和 MEGA5.0 软件对这些氨基酸序列进行多序列比对,然后用 Maximum Likelihood 法(参数为 500)构建进化树,结果显示这 8 种 COP1 可以划分为 3 个亚家族,‘红地球’葡萄与其他物种的亲缘关系均较远,单独聚为一个亚族;柑橘、拟南芥以及甜菜归为 1 个亚家族;其余的 4 种可以归为 1 个亚家族(图 5)。

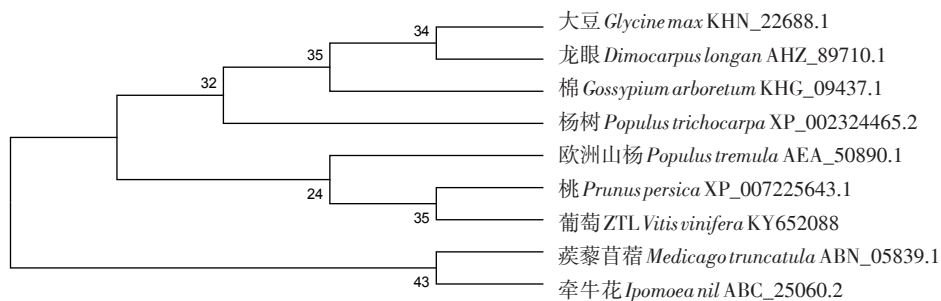


图 4 葡萄 ZTL 与其他物种 ZTL 同源蛋白的系统发育树分析

Fig. 4 The Phylogenetic tree analysis of ZTL and ZTL homologs from other species

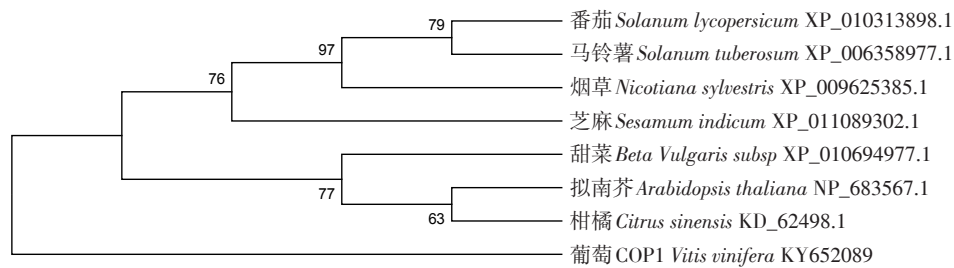


图5 葡萄COP1与其他物种COP1同源蛋白的系统发育树分析

Fig. 5 The Phylogenetic tree analysis of COP1 and COP1 homologs from other species

2.4 生物信息学分析

2.4.1 葡萄ZTL、COP1的结构预测分析 ZTL、COP1编码蛋白的二级结构均由 α -螺旋、 β -折叠、无规则卷曲和延伸链结构组成,ZTL:无规则卷曲>延伸链结构> α -螺旋> β -转角;COP1:延伸链结构>无规则卷曲> α -螺旋> β -转角。

跨膜域与信号肽的预测结果显示,ZTL不跨膜,且无信号肽,因此可推测是膜内蛋白;COP1的跨膜域在第137~159个氨基酸区,有1个信号肽,因此可推测是跨膜蛋白。

2.4.2 葡萄ZTL、COP1的理化性质及亚细胞定位分析 ZTL分子式为 $C_{1972}H_{3107}N_{553}O_{576}S_{20}$,总疏水性为-0.026,表明为亲水性蛋白;脂溶指数为89.88,表明脂溶性较差。不稳定指数为37.55,是稳定蛋白(参数大于40是不稳定蛋白)^[18]。COP1分子式为 $C_{832}H_{1291}N_{209}O_{225}S_9$,总疏水性为0.374,表明为疏水性蛋白;脂溶指数为110.19,表明脂溶性较好。不稳定指数为35.13,是稳定蛋白。

亚细胞定位预测结果显示:葡萄ZTL和COP1均定位于细胞质的可信度最高,分别达69.6%和26.1%,而定位于细胞核和线粒体的可信度较低。因此,以上两个基因均定位于细胞质。

2.4.3 葡萄ZTL、COP1的功能域分析 功能域分析结果表明:ZTL含有高度保守结构域F-box domain,保守结构域在第1~60个氨基酸之间,COP1含有高度保守结构域WD40/YVTN domain,保守结构域在第20~123个氨基酸之间。这个非常强的保守区是ZTL、COP1主要功能的信息区,从而构成了植物特异性,在维持生物光周期反应中发挥着重要的作用。

2.5 葡萄ZTL、COP1基因在不同光质和转光下的表达分析

不同光质条件下,葡萄ZTL的表达分析表明(图

6),ZTL在白光转红光、白光转蓝光、红光、红光转白光、红光转蓝光、蓝光、蓝光转白光和蓝光转红光处理后相对表达水平显著上调,分别为对照(白光)的4.7、11.2、22.3、12.0、32.9、8.3、1.8和19.6倍。葡萄COP1的时空表达分析表明(图7),COP1在白光转红光、白光转蓝光、蓝光、红光转白光、蓝光转白光和蓝光转红光处理后,表达水平均下调,并且在蓝光转红光处理后表达水平最低,下调水平为对照(白光)

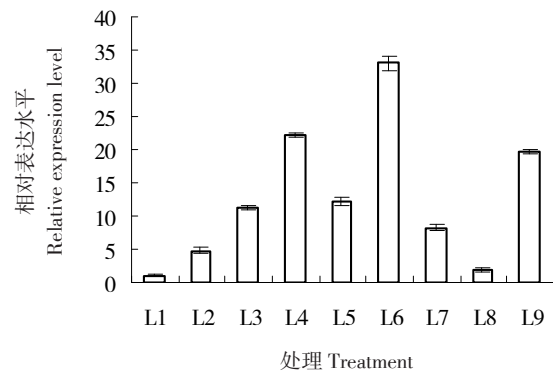


图6 葡萄ZTL基因在不同光质和转光下的表达情况

Fig. 6 Expression profiles of the ZTL gene from grapes under different light quality and light conversion treatments

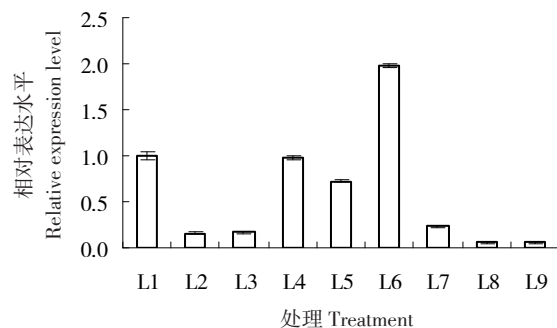


图7 葡萄COP1基因在不同光质和转光下的表达情况

Fig. 7 Expression profiles of the COP1 gene from grapes under different light quality and light conversion treatments

的 18 倍。红光处理后, *COP1* 的表达水平与对照(白光)无显著差异,在红光转蓝光处理后, *COP1* 表达上调,上调水平约为对照(白光)的 1.97 倍。因此, *ZTL*、*COP1* 均在由长波光向短波光的转光培养过程中红光转蓝光的相对表达水平显著上调,在单色光培养过程中红光培养下的相对表达水平均高于蓝光培养下的相对表达水平,说明红光和蓝光均在转光培养过程中对基因的表达发挥重要作用。

2.6 不同光质对‘红地球’葡萄试管苗荧光参数的影响

不同光质及转光培养对‘红地球’葡萄试管苗荧光参数 qP 、 qN 、 NPQ 和 F/F_m 表达水平有不同的影响。对 qP 的分析表明(图 8-A),在红光转蓝光、红光、蓝光转红光和红光转白光转光处理后 qP 的表达水平显著高于对照(白光),红光转蓝光处理后, qP 上调 11.79 倍;在白光转蓝光、蓝光转白光和白光转红光转光处理后 qP 表达水平与对照(白光)无显著差异;在蓝光处理后 qP 表达水平显著低于对照(白光)。对 qN 的分析表明(图 8-B),在红光转蓝光、红光和在蓝光转红光处理后 qN 的表达水平显著高于对照(白光),红光转蓝光处理后, qN 上调 1.41 和 1.79 倍;在红光转白光处理后与对照(白光)无显著性差异;白光转红光、白光转蓝光和蓝光转光处理后 qN 表达水平低于对照(白光),但差异不显著;在蓝光转白光处理后 qN 表达水平显著低于对照(白光)。对 NPQ 的分析表明(图 8-C),在红光转蓝光、红光、蓝光转红光和红光转白光转光处理后 NPQ 的表达水平显著高于对照(白光),红光转蓝光处理后, NPQ 上调 1.41 和 1.79 倍;在白光转红光和白光转蓝光处理后与对照(白光)无显著性差异;在蓝光和蓝光转白光处理后 NPQ 表达水平显著低于对照(白光)。对 F/F_m 的分析表明(图 8-D),在红光转蓝光和蓝光转红光转光处理后 F/F_m 的表达水平显著高于对照(白光),红光转蓝光处理后, F/F_m 上调 1.08 倍;在红光、红光转白光、白光转蓝光、蓝光、蓝光转白光处理后表达水平低于对照(白光),但差异不显著;在白光转红光处理后 F/F_m 表达水平显著低于对照(白光)。因此,荧光参数 qP 、 qN 、 NPQ 和 F/F_m 均在由长波光向短波光的转光培养过程中红光转蓝光的表达水平显著上调,在单色光培养过程中红光培养下的相对表达水平均高于蓝光培养下的相对表达水平,说明红光和蓝光均在转光培养过程中对荧光参数的

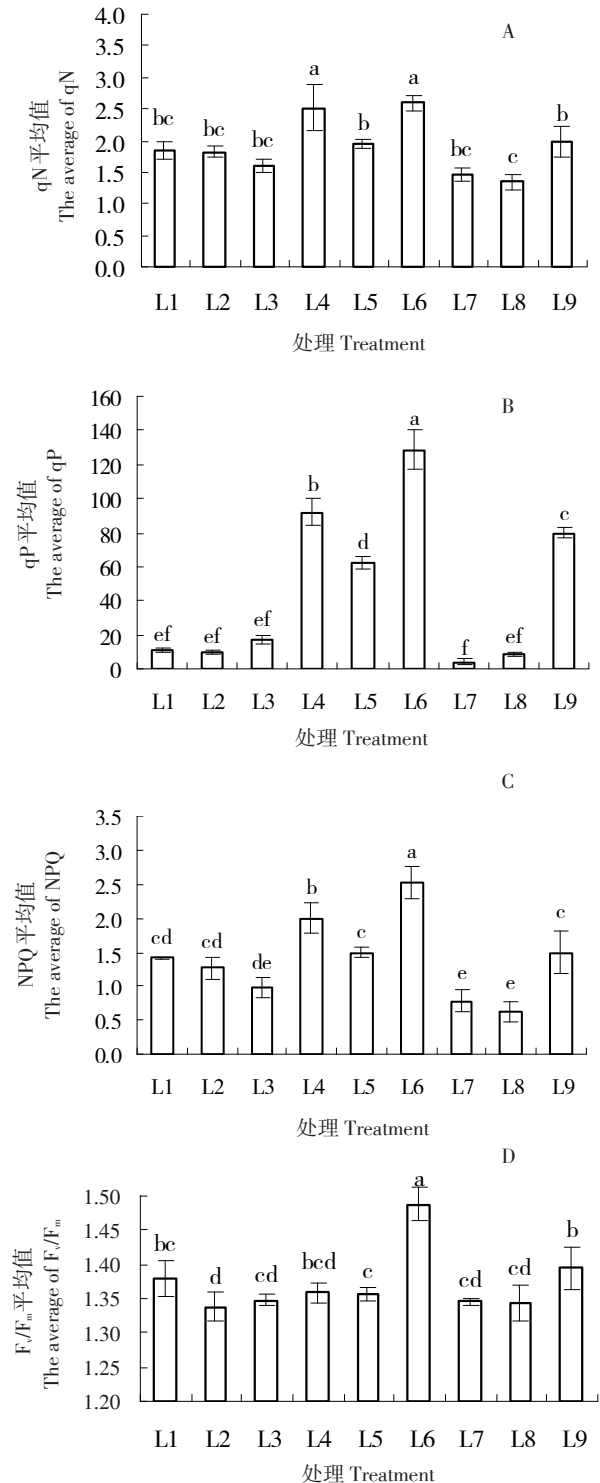


图 8 ‘红地球’葡萄荧光参数在不同光质和转光下的表达情况
Fig. 8 Expression profiles of the fluorescence parameter from ‘Red Globe’ grapes under different light quality and light conversion treatments

表达发挥重要作用。

3 讨论

在不利的环境因素条件下,植物将会启动相关

基因,从而改变蛋白结构等来保护细胞内的各种新陈代谢反应,以维持植物体结构与功能的完整性。蛋白质的可逆磷酸化是高等植物受渗透逆境诱导的主要信号转导机制之一^[19]。通过蛋白质的磷酸化,可以调节细胞中的一系列生命活动,对植物的生长发育起到了重要的调控作用^[20]。本试验对葡萄*ZTL*与其他物种同源蛋白相似序列进行多序列比对,发现具有较高的序列相似性,且与桃的同源性最高,*ZTL*有9个丝氨酸磷酸化位点、9个苏氨酸磷酸化位点和1个酪氨酸磷酸化位点;在第359位有1个苏氨酸(Thr)磷酸化位点。对葡萄*COPI*与其他物种同源蛋白相似序列进行多序列比对发现,具有较高的序列相似性,但与其他物种同源性均较低,*COPI*有2个丝氨酸磷酸化位点、2个苏氨酸磷酸化位点和1个酪氨酸磷酸化位点。由此推断,*ZTL*、*COPI*可能也是通过磷酸化反应对光质反应条件进行感知和应答的。

光对葡萄试管苗的生长发育起到了重要的调节作用,对植物体内的次生代谢物产生影响。不同光质的效应受不同波长和辐照度的调控。不同光质条件下,光质对愈伤组织的质量及形成均有促进作用,其大小依次为红光、绿光、蓝光和白光。在单色光中,红光较其他光更有利于试管苗的增殖^[21]。光质被认为是影响植物形态建成的重要因子。已有研究认为红光更有利于根和茎的伸长生长,长波光(红光)不利于白藜芦醇的合成,促进试管苗的伸长,短波光(蓝光)能明显提高葡萄愈伤组织中的白藜芦醇含量,抑制试管苗的伸长生长,促进光合色素的形成,叶绿素总量在红、蓝光并存的条件下最高,其次为蓝光,再次为红光^[22-23]。

本研究不同波长及转光培养*ZTL*、*COPI*基因表达量结果表明,*ZTL*在葡萄转光培养中表达活跃,红光转蓝光、蓝光转红光均使得*ZTL*基因表达量上调。与柯海燕^[24]在大豆中研究结果相近,由此推断*ZTL*主要在葡萄试管苗蓝光与红光的转光培养中发挥主要作用,对试管苗的生长有重要作用。与他人研究不同的是,*GmZTL*对蓝光/紫外光较为敏感,发挥形态作用,诱导光形态产生胚轴扩张,具有抑制植物光周期的作用^[25-26],*ZTL*突变体在红光下下胚轴生长受到抑制,但在蓝光下却和野生型(对照)十分类似。以上说明*ZTL*的表达受到不同物种及红光、蓝光转光培养的影响。红光转蓝光使得*COPI*基因表

达量上调,蓝光转红光使得*COPI*基因表达量下调。与Ang等^[27-28]的研究结果一致,植株在暗培养时,*COPI*基因位于幼苗下胚轴细胞的细胞核内,且表型为光形态建成,在光照培养下则位于细胞质内,表型为暗形态建成。由此推断*COPI*主要在葡萄试管苗光培养下在抑制光形态建成中起关键作用,是光信号转导的关键因子,在蓝光与红光的转光离体培养中发挥重要作用。*COPI*基因不仅可以作为光形态的建成抑制子,同样在植物的正常生长发育中扮演着重要的角色^[29]。从拟南芥中提取的*COPI*基因是光形态建成的关键基因,所编码的*COPI*是调节植物生长发育的分子开关,*COPI*在蓝光单色光处理后表达水平与太阳光照无明显差异^[30]。与本研究结果不同的是,*COPI*蓝光单色光处理后与对照(白光)有明显差异,蓝光培养表达量下调,经红光转蓝光培养表达量显著上调,这可能与植物对光质的响应机制有关。*ZTL*在葡萄转光培养中表达活跃,均呈显著上调趋势,且与同属蔷薇科桃的亲缘关系较近;在不同光质培养下*COPI*表达量总体表现为下调趋势,起到抑制光形态建成的作用,且与其他物种的亲缘关系较远。对于葡萄*COPI*在蓝光相关转光培养的表达,还需与其他光质条件下的表达模式对比做进一步研究。

叶绿素荧光参数是对通过植物体内叶绿素反应对光合作用利用率,近几年在国内外得到了广泛的应用^[31]。光能被植物光合色素吸收会参与光化学反应、荧光耗散等,植物叶片荧光参数的变化在一定程度上反映了光合机构的运转状况与机制^[32]。本研究不同波长及转光培养葡萄试管苗荧光参数结果表明,qP、qN、NPQ和F_v/F_m的表达量在葡萄转光培养中表达活跃,由长波光红光向短波光蓝光的转光培养下荧光参数表达量均上调。

本文通过RT-PCR法克隆获得基因*ZTL*和*COPI*全长,并证明*ZTL*和*COPI*均为光质相关基因,通过荧光参数进一步证明了实时荧光定量的结论,即长波光较短波光在*ZTL*和*COPI*基因的表达中扮演着重要的角色。为保证试验的准确性,笔者将在以后的研究中对*ZTL*和*COPI*进行基因的遗传转化,多方面进行基因功能的验证。

参考文献 References:

- [1] 蒲高斌,刘世琦,刘磊,任丽华.不同光质对番茄幼苗生长和生理特性的影响[J].园艺学报,2005,32(3):420-425.

- PU Gaobin, LIU Shiqi, LIU Lei, REN Lihua. Effects of different light qualities on growth and physiological characteristics of tomato seedlings[J]. Acta Horticultural Sinica, 2005, 32(3): 420-425.
- [2] 张勇, 叶芝兰, 杨峰, 张丽君, 聂邵仙, 杨文钰. 不同光质对比大豆幼苗形态及光合生理参数的影响[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(3): 343-348.
- ZHANG Yong, YE Zhilan, YANG Feng, ZHANG Lijun, NIE Shaoxian, YANG Wenyu. Effects of different light qualities on morphological and photosynthetic physiological parameters of soybean seedlings[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2014, 36(3): 343-348.
- [3] STEIMETZ E, TROUVELOT S, GINDRO K, BORDIER A, POINSSOT B, ADRIAN M, DAIRE X. Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2012, 79(1): 89-96.
- [4] 余阳, 刘帅, 李春霞, 辛守鹏, 王小青, 陶建敏. 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.
- YU Yang, LIU Shuai, LI Chunxia, XIN Shoupeng, WANG Xiaoping, TAO Jianmin. Effect of LED light quality on the photosynthetic properties and physiological indexes of ‘summer black’ grapes[J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(5): 879-884.
- [5] ADAM K, ADAM B, MARIA L. Light and temperature conditions affect bioflavonoid accumulation in callus cultures of *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014, 118(3): 589-593.
- [6] GENG R. Characterization and functional analysis of ZEITLUPE in the regulation of the circadian clock and plant development [D]. Ohio State University, 2006.
- [7] 沈辰. 山核桃 *COPI* 等成花相关基因的克隆及其表达特性分析[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
- SHEN Chen. Cloning and expression analysis of flowering genes in *Carya cathayensis*[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2014.
- [8] HSIEH L C, LIN S I, SHIH A C, CHEN J W, LIN W Y, TSENG C Y, LI W H, CHIOU T J. Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in Arabidopsis by deep sequencing[J]. Plant Physiology, 2009, 151: 2120-2132.
- [9] SCHRADER A. Identification of novel regulators of *COPI* controlled morphogenesis in Arabidopsis thaliana [D]. Universität zu Köln, 2011.
- [10] VON ARNIM A G, DENG X W. Light inactivation of Arabidopsis photomorphogenic repressor *COPI* involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning[J]. Cell, 1994, 79(6): 1035-45.
- [11] 曹雪. 葡萄两个重要 *SBP* 基因的克隆、亚细胞定位及表达分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- CAO Xue. Cloning, subcellular localization and expression analysis of two important *SBP* genes from grape (*V. vinifera* × *V. labrusca*) [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.
- [12] MARTIN T, ELLEN L. The Arabidopsis circadian clock: New insights revealed from a genetic screen[D]. Davis: University of California, 2008.
- [13] LIU L L, SCOTT G, CHRIS W, BRIAN J. From UVR8 to flavonol synthase: UV-B-induced gene expression in Sauvignon blanc grape berry[J]. Plant Cell and Environment, 2014, 38(5): 905-919.
- [14] 赵海亮, 赵文东, 孙凌俊, 高圣华, 马丽. 不同架式红地球葡萄光合特性与叶绿素荧光参数研究[J]. 河北林业科技, 2015, 43(4): 27-30.
- ZHAO Hailiang, ZHAO Wendong, SUN Lingjun, GAO Shenghua, MA Li. Study on the characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of different type of grape photosynthesis[J]. The Journal of Hebei Forestry Science and Technology, 2015, 43(4): 27-30.
- [15] 米宝琴, 毛娟, 申鹏, 陈佰鸿, 郝燕, 杨瑞. 山葡萄‘通化-3’抗寒相关基因 SSH 文库的构建及分析[J]. 果树学报, 2015, 32(4): 546-554.
- MI Baoqin, MAO Juan, SHEN Peng, CHEN Baihong, HAO Yan, YANG Rui. Construction and analyses of SSH libraries of cold resistance related genes in *Vitis amurensis* accession ‘Tonghua-3’ [J]. Journal of Fruit Science, 2015, 32(4): 546-554.
- [16] 余义和, 李秀珍, 陈迪新, 李桂荣, 李学强, 张国海. ‘巨峰’葡萄细胞分裂素氧化酶基因 *CKX3* 的克隆与表达分析[J]. 园艺学报, 2013, 42(7): 1233-1240.
- YU Yihe, LI Xiuzhen, CHEN Dixin, LI Guirong, LI Xueqiang, ZHANG Guohai. Isolation and expression analysis of cytokinin oxidase gene *CKX3* in Kyoho grapevine[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 42(7): 1233-1240.
- [17] 崔亚东, 刘生杰, 聂传朋. PCR 法快速鉴定阳性克隆实验的改进[J]. 阜阳师范学院学报(自然科学版), 2010, 27(2): 51-54.
- CUI Yadong, LIU Shengjie, NIE Chuanming. Improving of experiment on PCR rapid screening for recombinant clones[J]. Journal of Fuyang Normal University (Natural Science), 2010, 27(2): 51-54.
- [18] 刘宏德, 王睿, 卢小泉, 陈晶, 刘秀辉, 丁兰. 跨膜蛋白结构预测新方法[J]. 科学通报, 2007, 52(23): 2742-2745.
- LIU Hongde, WANG Rui, LU Xiaoquan, CHEN Jing, LIU Xiuhui, DING Lan. The new method on membrane protein structure prediction[J]. Chinese Science Bulletin, 2007, 52(23): 2742-2745.
- [19] CHAE E, TAN Q K G, HILL T A, IRISH V F. An Arabidopsis F-box protein acts as a transcriptional co-factor to regulate floral development[J]. Development, 2008, 135(7): 1235-1245.
- [20] FLORINA V, BENJAMIN E T, PHILIPPE P, JEFFREY L, SYLVAIN M. A versatile strategy to define the phosphorylation preferences of plant protein kinases and screen for putative substrates [J]. Plant Journal, 2008, 55(1): 104-117.

- [21] YUSUKE S, JAMES A S, WANG H Y, YANG J P, SHEN Y P, VICENTE R, MA L G, UTE H, DENG X W. The *COPI-SPA1* interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of *HY5* activity[J]. *Genes & Development*, 2003, 17 (21): 2642-2647.
- [22] 刘媛. 不同光质对葡萄试管苗和愈伤组织增殖及白藜芦醇积累效应的研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2009.
LIU Yuan. Effect of different light qualities on multiplication and resveratrol accumulation of grape Test-tube plantlets and its callus [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2009.
- [23] KONG S S, HOSAKATTE N M, JEONG W H, EUN H H, KEE Y P. The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultured Doriaenopsis plants[J]. *Acta Physiol Plant*, 2008, 30 (3): 339-343.
- [24] 柯海燕. 大豆生物钟基因-ZEITLUPE 同源基因的克隆及其功能分析[D]. 福州:福建农林大学, 2006.
KE Haiyan. Cloning and function analysis of a homologous gene ZEITLUPE involed in circadian clock in soybean[D]. Fuzhou: Fujian Agricultural University, 2006.
- [25] XUE Z G, ZHANG X M, LEI C F, CHEN X J, FU Y F. Molecular cloning and functional analysis of one ZEITLUPE homolog GmZ-TL3 in soybean[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (2): 1411-1418.
- [26] KIM W Y, HICKS K A, SOMERS D E. Independent roles for *EARLY FLOWERING 3* and *ZEITLUPE* in the control of circadian timing, hypocotyl length, and flowering time[J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(3): 1557-1569.
- [27] ANG L H, DENG X W. Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci: allele-specific and light dependent interaction between the *HY5* and *COPI* Loci[J]. *The Plant Cell*, 1994, 6(5): 613-628.
- [28] ANG L H, CHATTOPADHYAY S, WEI N, OYAMA T, OKADA K, BATSCHAUER A, DENG X W. Molecular interaction between *COPI* and *HY5* defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development[J]. *January*, 1998, 1(2): 213-222.
- [29] TIMOTHY W M, ALBRECHT G von A, TAKASHI A, YOSHIBUMI K SIMON M, DENG X W. Genetic and molecular analysis of an allelic series of *COPI* mutants suggests functional roles for the multiple protein domains[J]. *The Plant Cell*, 1994, 6 (4): 487-500.
- [30] DENISE C H, DAVID J B. Light quality influences the polyamine content of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledon explants during shoot production *in vitro*[J]. *Plant Growth Regulation*, 2005, 45 (1): 53-61.
- [31] 曹刚, 张国斌, 郁继华, 马彦霞. 不同光质 LED 光源对黄瓜苗期生长及叶绿素荧光参数的影响[J]. *中国农业科学*, 2013, 46 (6): 1297-1304.
CAO Gang, ZHANG Guobin, YU Jihua, MA Yanxia. Effects of different LED light qualities on cucumber seedling growth and chlorophyll fluorescence parameters[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(6): 1297-1304.
- [32] 赵海亮, 赵文东, 孙凌俊, 高圣华, 马丽, 刘晓菊. 不同架式巨峰葡萄光合特性与叶绿素荧光参数研究[J]. *西南农业学报*, 2015, 28(6): 2691-2695.
ZHAO Hailiang, ZHAO Wendong, SUN Lingjun, GAO Shenghua, MA Li, LIU Xiaojun. Study on photosynthetic characteristics and chlorophyll fluorescence parameters of kyoho grape in different trellis[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 28(6): 2691-2695.