

葡萄转录因子数据库中17个MADS-box成员在果实发育成熟过程中的表达特征分析

崔梦杰¹, 王晨^{1*}, 吴伟民², 王洁³, 汤巍¹, 张文颖¹,
朱旭东¹, 贾海锋¹, 沈文彪⁴, 房经贵¹

(¹南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ²江苏省农业科学院, 南京 210014; ³南京林业大学林学院, 南京 210037;
⁴南京农业大学生命科学学院, 南京 210095)

摘要:【目的】了解17个MADS-box转录因子成员在葡萄果实发育成熟过程中的调控作用。【方法】利用Plantcare软件分析了葡萄类型转录因子的启动子元件, 预测其与果实发育、成熟过程相关的潜在作用; 以二倍体欧亚种葡萄品种‘魏可’为试材, 采用qRT-PCR技术分析了17个MADS-box成员在葡萄果实发育成熟过程中8个重要时期的时空表达模式, 初步鉴定参与葡萄果实发育成熟调控的重要成员; 果实转色前7 d通过ABA、NAA处理进一步验证其在葡萄果实发育与成熟中的作用。【结果】MADS-box成员的启动子均含有与果实发育、成熟相关的motif作用元件, 且其含有的元件个数存在差异, 表明其可能在调控葡萄果实发育与成熟过程中功能存在冗余, 同时各自的作用可能存在一定的差异; qRT-PCR分析显示, 所有成员均在葡萄果实发育成熟过程中表达, 且在不同时期呈现差异表达; 其中, *VvAG*和*VvFBP24*在果实硬核期高表达, 而在果实转色和成熟中几乎不表达, 表明其可能参与果实生长发育的正调控; 而*VvMADS1*、*VvMADS9*、*VvSVP-like1*和*VvAP3*只在果实转色与成熟过程中高表达, 说明它们可能促进了果实的转色与成熟; ABA在果实转色特定时期上调了MADS-box家族6个成员的表达, 而NAA下调其表达; 另一方面, NAA上调了MADS-box家族8个成员的表达, 相反ABA下调其表达, 表明这些成员可能响应ABA/NAA调控葡萄果实发育与成熟过程。【结论】葡萄转录因子MADS-box的17个成员均参与了果实发育过程的调控。其中, 6个成员可能参与了葡萄果实的成熟过程的正调控, 而另外8个成员可能促进了葡萄果实的生长发育从而抑制了果实的转色与成熟过程。

关键词: 葡萄; 转录因子; 荧光定量PCR; 启动子元件; 果实发育与成熟

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2017)12-1497-12

Expression characteristic analysis of MADS-box family members of grape transcription factors in berry development and ripening process

CUI Mengjie¹, WANG Chen^{1*}, WU Weimin², WANG Jie³, TANG Wei¹, ZHANG Wenying¹, ZHU Xudong¹, JIA Haifeng¹, SHEN Wenbiao⁴, FANG Jinggui¹

(¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China; ²Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China; ³College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; ⁴College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: 【Objective】Fruit development and maturation are important stages for fruit quality formation. Fruit ripening regulation is valuable for commercial production of grape. MADS-box Transcription factors are a class of proteins which directly or indirectly interact with specific cis acting function in promoter region, and regulate the initiation of gene transcription. However, its function may vary greatly with different family members and regenerate different regulation modes during grape berry, non-climacteric fruit, development and ripening. In this study, the regulation function of 17 MADS-box transcription fac-

收稿日期: 2017-06-06 接受日期: 2017-09-03

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金(CX(16)1013); 中国博士后特别资助(2014T70533); 国家博士后基金面上项目(2013M531373)

作者简介: 崔梦杰, 女, 硕士, 研究方向为果树分子生物学。Tel: 18251908980, E-mail: cui2015104035@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 15951817539, E-mail: succforever123@163.com

tors during ‘Wink’ grape berry development and maturation were investigated. 【Methods】The potential functions of MADS-box transcription factor members in the processes of grape development and maturation were predicted by analyzing their promoter motif elements using the Plantcare software. The variety ‘Wink’ (‘Muscat Bailey A’ × ‘Rubel Muscat X’) was used as experimental material. The berry samples were collected in eight development stages. ABA and NAA were sprayed one week before color change stage. The fruit size, firmness, content of soluble solids, glucose, sucrose, and fructose were measured. We analyzed the different spatial and temporal expression modes of various transcription factor members in eight developmental stages of grape berry to preliminarily screen the vital members participating in berry development process and verify the regulation function acting importantly in coloration and ripening process of grape berry. 【Results】Promoters of MADS-box members contained elements related to grape berry development and ripening and the different number of each type of elements, indicating that they participated in regulating berry development and ripening process, although their function were different. MADS-box members expressed in berry development and exhibited different expression modes in different stages. *VvAG* and *VvFBP24* had high expression level only in hard stone stage, indicating the positive regulation role on fruit development. *VvMADS1*, *VvMADS9*, *VvSVP-like1* and *VvAP3* only exhibited high expression level in the stages of berry veraison and ripening, indicating the positive regulatory function on fruits ripening. ABA up-regulated the expression levels of 6 members of MADS-box in certain stages, while NAA down regulated their expression. At the same time, NAA up-regulated the expression levels of 8 members of MADS-box in certain stages, while ABA down regulated their expression, indicating that the members would probably regulate grape berry development and ripening by responding to ABA/NAA. 【Conclusion】MADS-box members act importantly in regulating fruits development and maturation, among which 6 members positively promote fruits’ coloration and ripening and another 8 members positively promote berry development and negatively regulate fruit ripening.

Key words: Grape; Transcription factor; qRT-PCR; Promoter element; Berry development and maturation

果实发育与成熟是果树生长发育的重要阶段,是果实品质形成的生物学基础。果实发育成熟调控是果树生产的核心问题,开展相关研究具有重要的理论与实践意义。MADS-box (MCM1、AGAMOUS、DEFICIENS、SRF4) 转录因子在植物中广泛存在,且在植物生长发育的多个方面起着重要作用^[1-4]。据报道,番茄^[5]、水稻^[6]等植物中已鉴定了大量的 MADS-box 类转录因子,它们参与调节开花时间、影响花器官的形成、植株对光周期的反应、影响花粉育性等方面,决定着植物的产量、品质、抗逆性等多种性状^[7],参与调控植物的光合作用和营养代谢^[8]、种皮发育、胚形态建成、子房发育、根的生长发育甚至根瘤的发生^[1-2]、植物顶端分生组织的分化^[3]、果实的生长发育^[9]和裂果形成^[10]等,并且可以调控植物体参与激素信号转导过程^[4],感受高低温、干旱涝害、盐胁迫、重金属离子积累、过酸过碱等信号相关基因的表达。目前,模式植物中已鉴定出大量的 MADS-box 家族成员,但不同物种间家族成员的数量与功能

存在重要差异。

葡萄是世界第二大栽培果树,在我国果树产业中占据重要地位,开展其果实发育成熟的分子调控研究对葡萄果实品质性状的发育与形成具有重要意义。目前,葡萄中已鉴定出的少数 MADS-box 转录因子成员主要集中在花发育^[11]、无核葡萄胚珠发育^[12-13]方面;也有报道称在酿酒葡萄中,*VvMADS4*、*VvMADS5* 在葡萄果实及种子中具有一定的表达^[14]。这些研究表明, MADS-box 可能在葡萄不同组织的不同发育阶段起着重要作用。笔者实验室近期对鲜食葡萄的研究也发现,随着葡萄果实的发育成熟, MADS-box 家族的 *VvAP3*、*VvFUL* 的表达量呈下降趋势^[15],这表明它们可能参与了鲜食葡萄果实发育成熟过程的调控,但它们以及 MADS-box 家族的其他成员如何调控葡萄的发育与成熟尚不清楚。为此,笔者实验拟以转录因子数据库最初释放的 17 个成员为研究对象开展相关研究,以‘魏可’葡萄为试验材料,在果实转色前约 7 d,利用萘乙酸(NAA)、脱落

酸(ABA)处理果实,分析17个MADS-Box转录因子成员在葡萄果实发育成熟过程的时空表达图谱,初步鉴定其在葡萄发育成熟过程中潜在的作用;同时,了解其在葡萄果实发育成熟过程中应答ABA/NAA模式;结合葡萄果实发育成熟过程中生理形态指标分析,综合阐释MADS-box转录因子家族成员在葡萄果实发育成熟过程中的潜在调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

试验于2016年5月31日—2016年9月4日在江苏省农博园葡萄园内进行。园区位于句容市,属于亚热带季风气候,年均气温15.4℃,年降雨量1150 mm。试材为5 a(年)生、欧亚种葡萄‘魏可’(‘Muscat Bailey A’×‘Rubel Muscat X’),株行距为1 m×2.5 m,双十字V形架,避雨栽培。供试葡萄植株生长健壮、常规管理。根据生产经验,设置100 mg·L⁻¹脱落酸(ABA)和200 mg·L⁻¹萘乙酸(NAA)水溶液处理,清水处理作为对照,每个处理选定6株长势较为一致的植株,每2株为1个重复,共设3次重复。于果实转色前7 d(7月28日)进行喷施果穗处理,每小时喷施1次,共喷施3次,每次均喷施果穗至完全淋湿状态。

1.2 方法

1.2.1 样品采集 参照文献[16]报道,结合生产经验将葡萄果实生长发育过程划分为8个时期:幼果期(BPP,花后10 d,5月31日)、第1次果实膨大期(BBT,花后17 d,6月10日)、硬核期(SHS,花后37 d,7月4日)、果皮褪绿期(BTC,花后47 d,7月14日)、转色前7 d(BPR,花后61 d,7月28日)、转色初期(ECP,花后69 d,8月5日)、转色中期(CCP,花后84 d,8月20日)、完熟期(BRP,花后99 d,9月4日)。其中,转色初期至转色中期的果实发育期为果实的第2次膨大期。

试验分别从每组对照与处理的植株中随机选择4个果穗,每穗上、中、下3个部位分别随机采取3个果粒。样品采集后分成2部分保存,一部分放入冰盒,带回实验室;另一部分立即投入液氮中速冻后带回实验室于-70℃冰箱中保存,备用于分子实验。

1.2.2 葡萄果实品质测定 用电子游标卡尺测定果粒纵横径,用电子天平(精度0.01)测定单果质量。用手持测糖仪和硬度计分别测定果实中可溶性固形物含量及其硬度;再取若干粒果实,参照王西成等^[17]的方法略有改进,测定果实中3种可溶性糖含量。

试验设置3次重复。

1.2.3 葡萄MADS-box家族成员启动子作用元件分析 从葡萄转录因子数据库(<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>)下载MADS-box家族成员的基因编号,再在Grape Genome Browser (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>)中寻找每一个基因序列上游1 500 bp的片段,即获得基因的启动子序列,将其放入PlantCARE中(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>),即可查找到每个基因的启动子所对应的作用元件,从而预测每个基因潜在的生物学功能。

1.2.4 总RNA的提取和荧光定量PCR 利用CTAB方法^[18]提取葡萄果实8个发育时期样品,以及ABA、NAA处理和对照果实样品的总RNA。cDNA的合成以提取的果实总RNA为模板,参考TaKaRa Prime Script™ RT-PCR试剂盒说明书进行反转录。

分别从葡萄转录因子数据库中(<http://plantfdb.cbi.pku.edu.cn/>)下载到17个MADS-box家族成员序列,并根据基因序列在NCBI中进行比对(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome),鉴定到各个转录因子成员所对应的基因家族名称如MADS-box1、SVP-like1等。根据定量PCR引物的设计原则,利用Primer3 Input(<http://primer3.ut.ee/>)对上述家族成员设计定量PCR引物(表1)。以葡萄ACTIN为内参基因,按照SYBR Premix ExTaq™试剂盒(购自宝生物工程有限公司)操作指导,采用实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)方法,检测基因的相对表达量。扩增体系为20 μL:1 μL cDNA,上、下游引物各0.4 μL,10 μL 2×TransStart® Tip Green qPCR SuperMix, 8.2 μL ddH₂O。反应程序为94℃ 30 s;94℃ 5 s,60℃ 15 s,72℃ 10 s,40个循环。试验设置3次重复。反应结束后分析荧光值变化曲线以及溶解曲线^[19]。试验数据用ΔΔCT法^[20]分析。

1.3 数据处理

测得数据应用方差分析软件进行分析,采用新复极差法进行显著性检验,采用Excel 2013进行绘图。

2 结果与分析

2.1 ‘魏可’葡萄果实发育过程中的品质变化

根据葡萄果实生长发育特点并结合生产经

表 1 MADS-box 家族成员荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers of MADS-box family members used for real-time quantitative PCR

基因名称 Gene name	登录号 ID	正向引物序列 Forward primer sequence	反向引物序列 Reverse primer sequence
<i>Vv-ACTIN</i>	XM_002273532	GCTCGCTGTTTTGCAGTTCTAC	AACATAGGTGAGGCCGCACTT
<i>VvMADS1</i>	GSVIVT01000802001	TCTCATCGTCTTCTCCAGCC	GATTTGACGGCGCAATTTGG
<i>VvMADS2-like1</i>	GSVIVT01008139001	AATGCCCTGAGAAGGAAGCT	TCCTGCAGCATTTGTATCCCA
<i>VvMADS2-like2</i>	GSVIVT01036551001	CTTGAGCAGCTTGAACGTCA	GAACCCCTGAGACTGAGCTT
<i>VvMADS4</i>	GSVIVT01010521001	GCGATTTGAGCGTTGAGGAA	CTCCATTGTCCACTAGCCCA
<i>VvMADS5</i>	GSVIVT01025945001	CGAGAACAGGCTTGAACGAG	AGCCTCTCCACTTCTGCAAT
<i>VvMADS9</i>	GSVIVT01008806001	ATGGGAAAAGTGGTGAGCAGA	TTTTGGGCATTACTCGGAGC
<i>VvSVP-like1</i>	GSVIVT01001701001	ACTCCAGAGAAACCAGAGCC	TTTTCTTCCACAACGCTGCA
<i>VvSVP-like2</i>	GSVIVT01001701001	CTTCCACTGGCAAGCTCTTC	ACTTCCTTGTCTCAACCTGGA
<i>VvSVP-like3</i>	GSVIVT01009171001	GGGACCATCACTTGAAGTGC	TTTGCTTGGAGAGTGGCGAT
<i>VvSVP-like4</i>	GSVIVT01011300001	TCCACAGACTCCAGGGAAC	GTGACACAGACCAGCTTCAA
<i>VvSVP-like5</i>	GSVIVT01015641001	TCAAGTGTGAGCCAGGTGAT	CCTTTTCTTCCACGACGCTG
<i>VvAPI</i>	GSVIVT01012250001	GGAACAGCAGCTTGATACCG	TTTGCTGCTCCCAATGTGTC
<i>VvAP3</i>	GSVIVT01009815001	GCGATTTGAGCGTTGAGGAA	CTCCATTGTCCACTAGCCCA
<i>VvFBP24</i>	GSVIVT01012110001	TTCTGTGCTTTGTGATGCC	ATGCAGTTGTTCGATGGCTC
<i>VvCMB1</i>	GSVIVT01012249001	GTGGAGCTGAAGAGGATCGA	ACCTCTCAAAGTGTCTTGGC
<i>VvAG</i>	GSVIVT01021303001	TCAAGGACCTCAAGAGCCTG	TAGCTCTCTGGCATCAAG
<i>VvTT16</i>	GSVIVT01026207001	CCAGATCGGGCTCATCATCT	CCTCACCTGTGTAGCCTCTC

验^[21],共选择了8个典型的果实发育时期作为试验材料(图1,表2)。‘魏可’葡萄果实生长发育呈现双“S”曲线,第1次果实快速增长阶段是从花后10~17 d,果实的纵横径、可溶性固形物含量及3种可溶性糖

含量增长迅速;花后17~37 d,果实生长速度减慢,果皮颜色变深;之后的10 d内,果皮颜色由深绿变为亮绿色;从花后69 d开始,果实开始进入转色期,果实生长速度再次加快,果实中可溶性固形物含量、果糖



1~8 为‘魏可’葡萄果实生长发育的8个典型时期。1. BPP(小果,花后10 d);2. BBT(第1次膨大期的果实,花后17 d);3. SHS(硬核期的果实,花后37 d);4. BTC(果皮褪绿期的果实,花后47 d);5. BPR(转色前7 d的果实,花后61 d);6. ECP(转色初期的果实,花后69 d);7. CCP(转色中期的果实,花后84 d);8. BRP(完熟期的果实,花后99 d)。下同。

1-8 is the eight typical development stages of grape fruits. 1. BPP (Berry pea size period/small berry, 10 days after anthesis); 2. BBT (begin of berry touch/first enlargement of berry, 17 days after anthesis); 3. SHS (stone hardening stage/small hard, 37 days after anthesis); 4. BTC (berry touch complete/peel green fading stage, 47 days after anthesis); 5. BPR (begin period of ripening/one week before veraison, 61 days after anthesis); 6. ECP (early color-change period, 69 days after anthesis); 7. CCP (color-change period/mid coloring stage, 84 days after anthesis); 8. BRP (berry ripening period/mature berry, 99 days after anthesis). The same below.

图 1 ‘魏可’葡萄果实生长发育过程中形态的变化

Fig. 1 Morphological change of ‘Wink’ grape at grape berry eight development and maturation stages

表 2 葡萄果实生长过程中相关生理指标的变化

Table 2 Changes of physiological indexes during grape fruits development process

生理指标 Physiological indexes	生长时期 Development stages							
	BPP	BBT	SHS	BTC	BPR	ECP	CCP	BRP
果实纵径 Longitudinal diameter/mm	0.60 eF	1.00 dE	1.67 dDE	1.99 cCD	2.05 cCD	2.10 cBC	2.50 bB	2.90 aA
果实横径 Transverse diameter/mm	0.45 fF	0.92 eE	1.43 deDE	1.70 cdCD	1.92 bcBC	1.99 bcBC	2.20 bAB	2.50 aA
ω(可溶性固形物) Soluble solids content/%	6.50 eE	7.20 eE	10.27 dD	11.39 dCD	12.00 cdBCD	13.27 bcBC	14.18 bB	17.90 aA
硬度 Fruit firmness/(kg·cm ⁻²)	16.00 aA	14.00 abA	13.50 abA	12.00 bAB	9.00 cB	8.50 cB	4.00 dC	1.10 dC
ω(葡萄糖) Glucose content/(mg·g ⁻¹)	1.90 fF	2.10 fEF	3.00 eFEF	3.80 eE	6.00 dD	8.00 cC	30.30 bB	38.70 aA
ω(蔗糖) Sucrose content/(mg·g ⁻¹)	0.01 eC	0.30 dC	0.80 cB	1.00 bB	1.25 aA	1.30 aA	4.05 aA	4.23 aA
ω(果糖) Fructose content/(mg·g ⁻¹)	0.90 fF	1.20 fF	1.70 fF	3.00 eE	6.20 dD	7.60 cC	28.50 bB	37.50 aA

注:小写字母代表不同生长时期生理指标值差异达 5% 的显著水平;大写字母代表不同生长时期生理指标值差异达 1% 的显著水平。下同。

Note: Values followed by different small letters in table are significantly different among different development stages at 5% level; Values followed by different capital letters in table are significantly different among different development stages at 1% level. The same below.

和葡萄糖含量急剧增加;该时期亦是果实的第 2 次膨大期。在果实的整个生长发育阶段,果实的硬度逐渐降低,与此同时,可溶性固形物含量和 3 种可溶性糖含量逐渐升高,果实完熟期,2 者含量达到最高。由于任何性状都是由基因控制的,葡萄果实发育过程中形态和生理的剧烈变化也是由一批葡萄果实发育成熟相关的基因表达水平的剧烈变化引起的。基于模式植物 MADS-box 转录因子在花果发育的重要作用,笔者分析了其在葡萄果实发育成熟过程中的表达图谱,从而了解其在该过程的调控作用。

2.2 激素处理对葡萄果实品质的影响

脱落酸(ABA)是一种抑制生长的植物激素,能促进果实转色和成熟^[22]。萘乙酸(NAA)是一种生长素类似物,可促进果实生长从而抑制果实成熟^[23]。由表 3 可以看出,在果实转色前 7 d 利用 ABA 或 NAA 处理葡萄果穗,结果发现 NAA 处理葡萄果实后,可溶性固形物和 3 种可溶性糖含量与对照相比下降,而 ABA 处理与之有相反作用,即促进果实转色和成熟。

2.3 葡萄 MADS-box 家族成员启动子作用元件分析

启动子是决定基因转录起始的重要作用因素,其序列中包含着的一些基本作用元件,该作用元件能够反映基因的潜在功能。笔者分析了 MADS-box 家族成员的启动子作用元件。结果显示,该转录因子家族所含有的启动子作用元件大致可分为 5 类,分别为光反应相关响应元件(light-related elements),ATCT-motif、Box 4、CATT-motif、G-box、GAG-motif、GATT-motif、GGA-motif 等;激素相关的响应元件(hormone-related elements),CGTCA-mo-

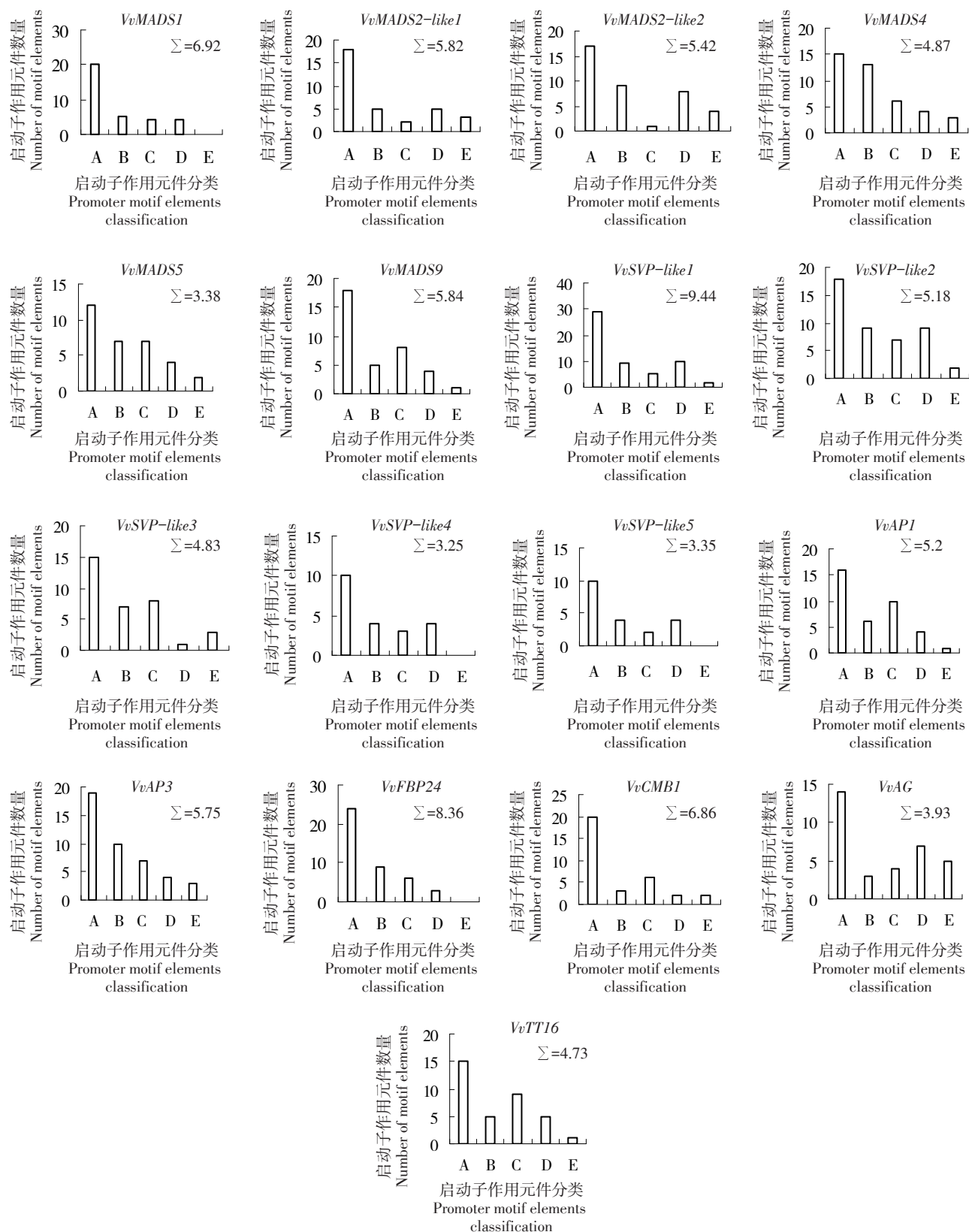
表 3 不同激素处理对‘魏可’葡萄果实品质的影响

Table 3 Effects of different hormone on fruit quality of ‘Wink’ grape

品质指标 Quality index	脱落酸 Absciscic acid	清水 Water	萘乙酸 Naphthylacetic acid
果实纵径 Longitudinal diameter/mm	3.30 cBC	2.90 aA	2.60 bB
果实横径 Transverse diameter/mm	2.70 bcBC	2.50 aA	2.30 bAB
ω(可溶性固形物) Soluble solids content/%	19.10 dCD	17.90 aA	13.18 bB
硬度 Fruit firmness/(kg·cm ⁻²)	0.80 cB	1.10 dC	8.20 cB
ω(葡萄糖) Glucose content/(mg·g ⁻¹)	43.50 bB	38.70 aA	24.00 cC
ω(蔗糖) Sucrose content/(mg·g ⁻¹)	6.30 aA	4.23 aA	2.43 aA
ω(果糖) Fructose content/(mg·g ⁻¹)	42.50 bB	37.50 aA	25.20 bB

tif、GARE-motif、O2-site、P-box、TCA-element、TGA-element、TGACG-motif 等;胁迫相关响应元件(stress-related elements),ARE、HSE、LTR、TC-rich repeats 等;组织特异性响应元件(tissue-specific elements),CAT-box、Skn-1-motif、GCN4-motif 等;周期节律相关的元件(circadian-related elements),circadian 等。对比转录因子家族成员中不同类型作用元件的个数发现,每个基因启动子基本上都含有上述 5 类作用元件,其中光响应元件数量最多,激素相关响应元件和胁迫相关响应元件的数量次之,其次是组织特异性响应元件,周期节律性相关元件数量最少,甚至个别基因为 0(图 2)。

有趣的是,这些转录因子都含有激素相关响应元件,且这些元件可分为 7 类,分别为生长素(auxin, IAA)、玉米素(zeatin, ZT)、赤霉素(gibberellin, GA)、水杨酸(salicylic acid, SA)、脱落酸(ABA)、乙烯(eth-



A. 光响应相关元件; B. 激素响应元件; C. 胁迫响应元件; D. 组织特异性响应元件; E. 周期性相关元件。Σ代表标准差。

A. Light-related elements; B. Hormone-related elements; C. Stress-related elements; D. Tissue specific elements; E. Circadian-related elements.

Σ represent the standard deviation.

图2 MADS-box 家族不同成员基因的启动子元件分类及功能数量分析

Fig. 2 Promoter motif elements classification and function quantification analysis of MADS-box family members

ylene, C₂H₄)、茉莉酸甲酯(methyljasmonate, MeJA)。其中,前 4 类主要是可以促进果实生长发育的元件,列为第 1 组(表 4 中浅色阴影部分),而后 3 类主要是促进转色成熟的元件,列为第 2 组(表 4 中深色阴影部分)。这说明 MADS-box 家族成员可能通过响应不同的激素信号,在果实发育成熟过程起着不同的调控作用。整体来看,第 2 组元件个数要多于第 1

组,如 *VvMADS4* 含有最多的第 2 组元件为 10 个,而 *VvFBP24* 含有最多的第 1 组元件 7 个,因而前者可能在促进果实成熟方面具有较强的潜在作用,而后者可能更多地抑制果实成熟。此外,笔者还发现该家族成员启动子作用元件中还有较多的组织特异性元件,其中胚乳发育相关的元件不仅在每个成员中都存在,且该元件的数量较多,表明这些基因可能与葡

表 4 MADS-box 家族不同成员激素相关和组织特异性相关启动子元件分析
Table 4 Hormone-related and tissue-specific elements analysis of MADS-box family members

名称 Name	激素响应 元件数量 Number of hormone- related elements	生长 素 Auxin	玉米 素 Zein	赤霉素 Gibber- ellin	水杨酸 Salicylic acid	脱落酸 Absciscic acid	乙烯 Ethyl- ene	茉莉酸 甲酯 Meja	组织特异性 元件数量 Number of tissue specific elements	栅栏 叶肉 Palisade meso- phyll	根 Root	种子 Seed	胚乳 Endos- perm	叶片 Leaf	分生 组织 Meris- tem
<i>VvMADS1</i>	5	1		1	1			2	3				2		1
<i>VvMADS2-like1</i>	5	1				2		2	2				1		1
<i>VvMADS2-like2</i>	9		1		2	1	1	4	8			1	6		1
<i>VvMADS4</i>	13			1	2	5	1	4	3				3		
<i>VvMADS5</i>	7			3	1	2	1		4				4		
<i>VvMADS9</i>	5			1		3	1		3				2		1
<i>VvSVP-like1</i>	9	1		1	1	4		2	10				10		
<i>VvSVP-like2</i>	9			2		5		2	8	1			6	1	
<i>VvSVP-like3</i>	7	3		2				2	3				2		1
<i>VvSVP-like4</i>	4			1			1	2	3				3		
<i>VvSVP-like5</i>	4			1			1	2	3				3		
<i>VvAPI</i>	6	1	1			2		2	4				2		2
<i>VvAP3</i>	10	1		1	3	5			4				3		1
<i>VvFBP24</i>	9			1	6	2			3				2		1
<i>VvCMB1</i>	3			1		1	1		2				2		
<i>VvAG</i>	3			1	1	1			6				5		1
<i>VvTT16</i>	5		1	1		1		2	5			1			4

萄种子及果实的发育密切相关。

2.4 MADS-box 家族不同成员在葡萄果实发育不同时期的表达图谱

利用实时荧光定量 qRT-PCR 技术分析了上述 17 个 MADS-box 基因在葡萄果实发育不同发育时期的时空表达,并鉴定了其对 ABA 和 NAA 处理的应答模式,为了解它们在葡萄果实发育成熟过程的调控作用提供理论依据。

2.4.1 葡萄 MADS-box 家族基因在果实发育不同时期的表达分析 葡萄 MADS-box 家族基因的 qRT-PCR 结果表明,它们在果实发育不同时期的表达具有时空特异性(图 3),几乎每个家族成员在果实发育的不同阶段均有一定的表达。综合分析其表达图谱大致可以归为 5 类:(1)*VvAG* 和 *VvFBP24* 在果实的硬核期有表达高峰(图 3-A1、A2);(2)*VvSVP-like2*、*VvSVP-like4* 和 *VvCMB1* 除了在果实硬核期有表达高

峰,在果实转色初期或中期亦高表达(图 3-B1~B3);(3)*VvSVP-like1*、*VvMADS1*、*VvAP3* 和 *VvMADS9* 只在果实的转色期高表达(图 3-C1~C4);(4)*VvMADS4* 和 *VvMADS5* 除了在果实的转色期高表达,在第 2 次果实膨大期亦有表达高峰(图 3-D1、D2);(5)*VvMADS2-like2*、*VvSVP-like3* 和 *VvTT16* 在果实转色前,其表达量呈现逐渐降低的趋势,转色前 7 d 出现表达量低谷,而在果实转色期又升高,完熟期降至最低(图 3-E1~E3)。此外,*VvSVP-like5* 在第 2 次果实膨大期具有表达高峰,其余时期几乎不表达(图 3-F);*VvMADS2-like1* 在果实的第 2 次果实膨大到转色初期,表达量较高,其余发育时期,表达量均较微弱(图 3-G);*VvAPI* 在幼果中几乎不表达,从果实硬核期开始,表达量均较高(图 3-H)。这些表达图谱表明 MADS-box 家族的不同成员在果实发育的特定时期具有特异的调控作用,不同成员可能在葡萄果实

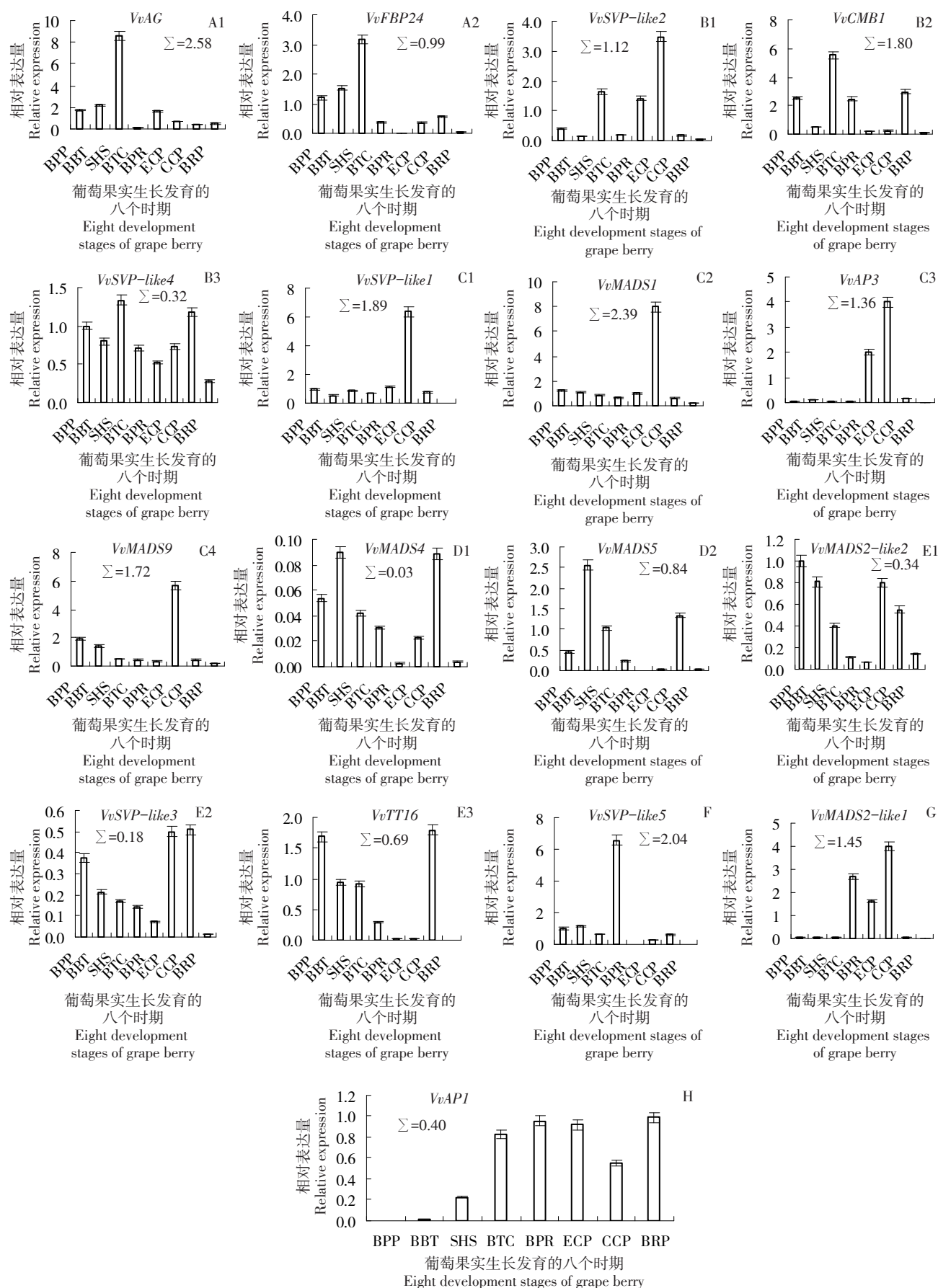


图3 17个MADS-box家族不同成员基因在‘魏可’葡萄果实八个生长时期的表达模式

Fig. 3 Expression modes of 17 MADS-box family members genes during ‘wink’ eight developments stages

发育成熟过程中具有不同的作用。

2.4.2 MADS-box 家族基因对 ABA、NAA 的应答模式 为了验证 MADS-box 家族成员在葡萄果实发育与成熟过程中的作用,对 ABA 和 NAA 处理的葡萄果实,分别在果实转色初期、转色中期和完熟期,进行了实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 分析。结果(图4)表明,果实经过 ABA 和 NAA 处理后,几乎所有的 MADS-box 转录因子成员的表达量与其对照相比均具有较大的差异。分析发现,ABA 在果实转色初期促进了 *VvMADS4* 的表达(图4-A),在果实转色中期,促进了 *VvMADS5*、*VvCMB1*、*VvSVP-like5*、*VvAPI* 和 *VvTT16* 的表达(图4-B1~B5),而 NAA 则分别在相应时期抑制了这些基因的表达;此外,NAA 在果实转色初期,促进了 *VvMADS1*、*VvSVP-like1*、*VvSVP-like2*、*VvSVP-like3*、*VvAG* 和 *VvFBP24* 的表达(图4-C1~C6),在果实转色中期,促进了 *VvMADS2-like2* 和 *VvMADS9* 的表达(图4-D1、D2),而 ABA 则分别在相应时期抑制了对应基因的表达。结合 ABA、NAA 对葡萄果实的生理作用,可推测 MADS-box 家族大部分成员可能参与调控葡萄果实的转色与成熟。

3 讨论

MADS-box 是植物特有的一类重要的转录因子,广泛存在于植物中,并在植物生长发育的多个方面起着非常重要的调控作用,它们在不同物种中具有不同的成员,且功能上存在一定的差异。笔者通过对 MADS-box 家族成员启动子元件的分析,预测了这2个家族不同成员在果实发育与成熟过程中可能存在的功能;并系统分析了 MADS-box 家族成员在葡萄果实发育与成熟过程中的时空表达模式,揭示了其不同的家族成员在葡萄果实发育过程中的作用,为深入了解 MADS-box 在非呼吸跃变型果实发育与成熟中的功能奠定重要基础。为了探索其在果实转色与成熟过程中的作用,笔者分析了葡萄果实转色前7 d,ABA 和 NAA 处理对其成员基因表达水平的影响,从而验证了它们在葡萄果实转色与成熟过程中的调控作用。

转录因子启动子元件分析为预测基因的潜在功能提供了一个重要的参考信息,同时,为揭示基因的作用机制提供了重要的理论依据^[24-25]。笔者对每个转录因子成员对应的启动子元件分析,发现每个基因的启动子均含有5类 motif 作用元件,表明它们潜

在的功能具有较强的保守性。其中,光响应作用元件在每个转录因子启动子元件中均含有最多的数量,原因可能是光作为植物生长所必需的元素,在葡萄果实生长发育、转色与成熟过程中起着不可替代的作用。

有趣的是,每个转录因子的启动子元件中均含有一定数量的组织特异性元件,如分生组织元件(CAT-box、CCGTCC-box 等),控制着果实生长过程中分生组织的分化和生长;胚乳表达顺式作用元件(GCN4_motif、Skn-1_motif 等),控制着果实种子中胚乳的生长发育。本研究发现,上述组织特异性元件数量较多时,其对应基因在幼果中表达量较高,反之,在幼果中表达较弱。如在幼果中几乎不表达的成员 *VvMADS1*、*VvMADS9*、*VvAP3*、*VvSVP-like5*、*VvAPI*,其启动子元件中,组织特异性元件数量分别为1、1、1、0、2;而在幼果中表达量较高的成员 *VvAG*、*VvMADS2-like2*、*VvTT16*,其启动子元件中,组织特异性元件数量均 ≥ 5 。该现象说明启动子元件潜在功能与基因表达功能的一致性,也为通过启动子作用元件预测基因的潜在功能提供一定的依据。研究还发现,MADS-box 转录因子家族均只有一半数量成员的启动子元件中含有分生组织作用元件,且该类型元件数量多为1个,这些成员在葡萄果实的膨大期具有表达高峰,如 *VvMADS2-like1*、*VvAPI*、*VvTT16* 等,这表明分生组织作用元件在果实膨大中起着重要的作用。此外,胚乳是种子的重要组成部分,在果实的生长发育过程中发挥着重要的作用。前人^[26-27]研究发现,种子的有无会促进或阻碍果实膨大,启动子元件分析可以看出,几乎所有的转录因子成员均含有一定数量的胚乳表达响应元件,表明其与果实生长发育相关,且部分 MADS-box 转录因子家族成员,如 *VvAG*、*VvFBP24*、*VvSVP-like2*、*VvCMB1* 和 *VvSVP-like1*,其对应基因在硬核期出现表达高峰,而硬核期是种子发育的关键时期,表明胚乳表达响应元件在种子发育中占有重要地位。

本研究发现启动子元件中激素响应元件的功能、数量与该基因在葡萄果实发育不同时期的表达模式具有一定的相关性,表明这些转录因子可能响应相应的激素参与葡萄果实不同发育时期的调控。前人研究表明,赤霉素、生长素、细胞分裂素具有促进果实生长发育,但是延迟果实转色与成熟的作用^[28-29]。乙烯、茉莉酸甲酯、脱落酸能够促进果实的

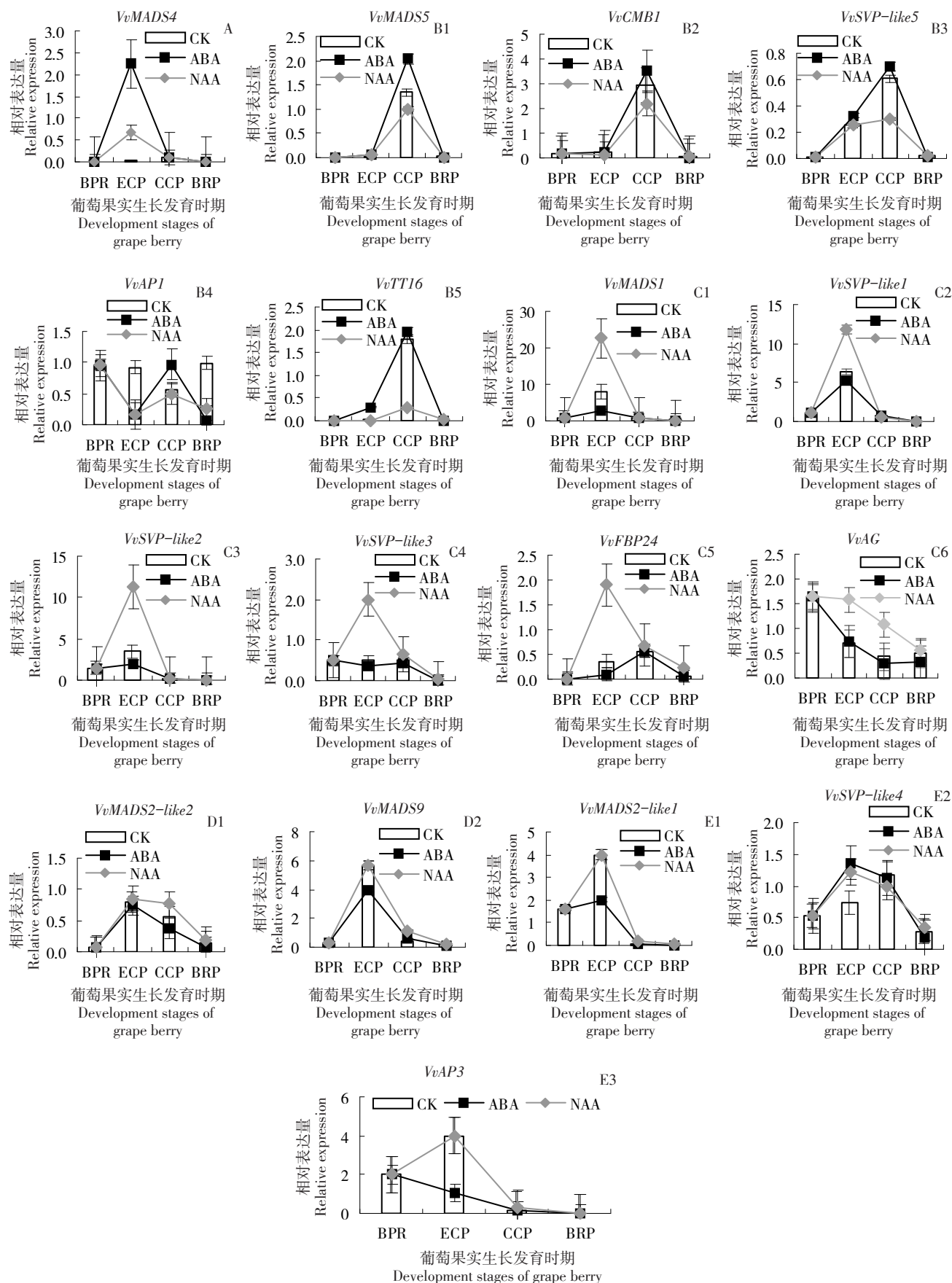


图 4 经 ABA/NAA 处理后‘魏可’葡萄果实 MADS-box 家族不同成员基因的表达

Fig. 4 Expression level of MADS-box family members genes after the treatment of ABA/NAA

转色与成熟^[30-32]。这种抑制或者促进的关系主要是果实中内源激素与外源激素之间的一种相互作用形成的,而这种相互作用归根结底是果实内源基因的时空表达引起的^[33-34]。当促进果实生长发育却抑制果实转色成熟的激素相关元件较多时,其对应基因在果实生长发育前期表达量较高。如 *VvSVP-like3*、*VvAG*,其启动子元件中促进果实生长发育的激素响应元件数量是抑制果实生长发育的激素响应元件数量的2倍,甚至更多。相应的,*VvSVP-like3*、*VvAG*在幼果发育期也具有较高的表达量;而当抑制果实生长发育却促进果实转色成熟的激素相关元件较多时,其对应基因在果实转色期表达量较高,如:*VvMADS2-like2*、*VvMADS4*、*VvMADS9*、*VvSVP-like1*、*VvSVP-like4*、*VvCMB1*。因此,MADS-box 基因启动子中激素响应元件可能是预测其功能的重要元件,包括其在果实发育过程中的作用,当促进果实生长发育的激素响应元件数量多于抑制果实生长发育的激素响应元件数量时,其对应基因主要在果实幼果期起着重要作用;反之,在成熟期发挥重要作用。

4 结 论

葡萄转录因子MADS-box家族成员在果实的生长发育与成熟的特定时期起着重要的调控作用。其中,MADS-box 家族中有6个成员(*VvMADS4*、*VvMADS5*、*VvCMB1*、*VvSVP-like5*、*VvAPI*和*VvTT16*)在果实转色特定时期正调控葡萄果实的转色与成熟;另外8个成员(*VvMADS1*、*VvMADS2-like2*、*VvMADS9*、*VvSVP-like1*、*VvSVP-like2*、*VvSVP-like3*、*VvAG*和*VvFBP24*)在果实转色特定时期负调控果实的转色与成熟。

参考文献 References:

- [1] KU A T, HUANG Y S, WANG Y S, MA D, YEH K W. *Ipomoea batatas* MADS-box1 gene is involved in tuberous root initiation in sweet potato (*Ipomoea batatas*) [J]. Annals of Botany, 2008, 102(1): 57-67.
- [2] BENLLOCH R, ROQUE E, FERRANDIZ C, COSSON V, CABALLERO T, PENMETS R V, BELTRAN J P, CANAS L A, RATET P, MADUENO F. Analysis of B function in legumes: PISTILLATA proteins do not require the PI motif for floral organ development in *Medicago truncatula* [J]. Plant Journal, 2009, 60(1): 102-111.
- [3] FERRARIO S, SHCHENNIKOVA A V, FRANKEN J, IMMINK G H, ANGENT G C. Control of floral meristem determinacy in petunia by MADS-box transcription factors [J]. Plant Physiology, 2006, 140(3): 890-898.
- [4] KAUFMANN K, MUIÑO J M, JAUREGUI R, AIROLDI C A, SMACZNAK C, KRAJEWSKI P, ANGENT G C. Target genes of the MADS transcription factor SEPALLATA3: Integration of developmental and hormonal pathways in the *Arabidopsis* flower [J]. PLoS Biology, 2009, 7(4): 854-875.
- [5] 黎卡, 李珊, 罗云波, 田慧琴, 朱本忠. 番茄果实成熟关键调控因子 MADS-RIN 的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(18): 126-131.
- [6] LI Ka, LI Shan, LUO Yunbo, TIAN Huiqin, ZHU Benzong. Research progress on tomato fruit ripening regulator MADS-RIN [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(18): 126-131.
- [7] 胡圣国. 水稻 MADS-box 家族基因克隆和 *OsMADS6* 转基因水稻的分子鉴定与表型初步分析 [D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
- [8] HU Shengguo. Cloning the MADS-box family genes in rice (*Oryza sativa* L.) and molecular identification, preliminary phenotype analysis of *OsMADS6* (*Os1g18440*) transgenic rice [D]. Jilin: Jilin University, 2013.
- [9] 段远霖, 李维明, 吴为人, 刘华清. 植物 MADS-box 基因的研究进展 [J]. 福建农业大学学报, 2003, 32(1): 104-109.
- [10] DUAN Yuanlin, LI Weiming, WU Weiren, LIU Huaqing. Advances in MADS-box genes in plants [J]. Journal of Fujian Agricultural University, 2003, 32(1): 104-109.
- [11] MARA C D, IRISH V F. Two GATA transcription factors are downstream effectors of floral homeotic gene action in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2008, 147(2): 707-718.
- [12] MOYLE R, FAIRBAIRN D J, RIPI J, CROWE M, BOTELLA J R. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein [J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(409): 101-112.
- [13] FERRANDIZ C, LILJEGREN S J, YANOFSKY M F. Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during *Arabidopsis* fruit development [J]. Science, 2000, 289(5478): 436-438.
- [14] 沙玉芬, 郑秋玲, 张超杰, 范书亭, 唐美玲. 2个 MADS-box 基因在山葡萄雌花和雄花中的表达分析 [J]. 中国农学通报, 2016, 32(22): 122-126.
- [15] SHA Yufen, ZHENG Qiuling, ZHANG Chaojie, FAN Shuting, TANG Meiling. Two MADS-box genes expression analysis in male and female floral development of *Vitis amurensis* Rupr. [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(22): 122-126.
- [16] 杨堃, 张朝红, 李树秀, 张旭彤, 王跃进. 葡萄 SVP 类 MADS-box 基因的克隆及表达分析 [J]. 西北林学院学报, 2012, 27(4): 117-123.
- [17] YANG Kun, ZHANG Chaohong, LI Shuxiu, ZHANG Xutong, WANG Yuejin. Cloning and expression analysis of grape SVP-like MADS-box gene [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(4): 117-123.
- [18] 冉国栋. 无核葡萄 D 类 MADS-box 基因的克隆与序列分析 [J]. 青海农技推广, 2015(3): 31-36.
- [19] RAN Guodong. Cloning and sequence analysis of class MADS-box D gene in seedless grapes [J]. Qinghai Agro-Technology Extension, 2015(3): 31-36.
- [20] BOSS P K, SENSI E, HUA C, DAVIES C, THOMASSET M R. Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development [J]. Plant Science, 2002, 162(6): 887-895.
- [21] 杨光, 曹雪, 房经贵, 黄振喜, 陶建敏, 王晨. 葡萄花发育基因的

- 亚细胞定位和表达分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(3): 641–650.
- YANG Guang, CAO Xue, FANG Jinggui, HUANG Zhenxi, TAO Jianmin, WANG Chen. Sub-cellular localization and expression analysis of genes involved in grapevine floral development[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(3): 641–650.
- [16] LORENZD H, EICHHORN K W, BLEIHOLDER H, KLOSE R, MEIER U, WEBER E. Growth stages of the grapevine: phenological growth stages of the grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*)—Codes and descriptions according to the extended BBCH scale[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2010, 1(2): 100–103.
- [17] 王西成, 吴伟民, 赵密珍, 钱亚明, 王壮伟. NAA 对葡萄果实中糖酸含量及相关基因表达的影响[J]. 园艺学报, 2015, 34(3): 425–434.
- WANG Xicheng, WU Weimin, ZHAO Mizhen, QIAN Yaming, WANG Zhuangwei. Effect of NAA treatment on sugar acid content and related gene expression in grape berries[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2015, 34(3): 425–434.
- [18] 张彦苹, 王晨, 于华平, 蔡斌华, 房经贵. 适于葡萄不同组织 RNA 提取方法的筛选[J]. 西北农业学报, 2010, 19(11): 135–140.
- ZHANG Yanping, WANG Chen, YU Huaping, CAI Binhua, FANG Jinggui. Screening of RNA extraction methods for various grapevine organs and tissues[J]. Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(11): 135–140.
- [19] MATSUI K, TANAKA H, OHME-TAKAGI M. Suppression of the biosynthesis of proanthocyanidin in *Arabidopsis* by a chimeric PAP1 repressor[J]. Plant Biotechnology Journal, 2004, 2(6): 487–493.
- [20] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402–408.
- [21] 许雪峰, 罗国光, 彭宜本. 玫瑰香葡萄浆果生长发育动态及其变化特点[J]. 园艺学报, 1995, 22(4): 318–322.
- XU Xuefeng, LUO Guoguang, PENG Yiben. Growth and development characteristics and variation of berry in Muscat grape[J]. Acta Horticulturae Sinica, 1995, 22(4): 318–322.
- [22] 晁无疾, 陆家云. 脱落酸(ABA)对葡萄上色和果实品质的影响[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2008(2): 285–287.
- CHAO Wuji, LU Jiayun. Effects of abscisic acid (ABA) on grape color and fruit quality[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2008(2): 285–287.
- [23] 周莉, 王军. NAA 和 ABA 处理对‘京优’葡萄花色苷生物合成相关基因表达的影响[J]. 中国农业大学学报, 2011, 16(4): 30–37.
- ZHOU Li, WANG Jun. Effects of NAA and ABA treatments on the expression of anthocyanin biosynthetic genes in ‘Jing You’ grape berry skin[J]. Journal of China Agricultural University, 2011, 16(4): 30–37.
- [24] HUDSON M E, QUAIL P H. Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome, A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data[J]. Plant Physiology, 2003, 133(4): 1605–1616.
- [25] SWINGLE B, THETE D, MOLL M, MYERS C R, SCHNEIDER D J, CARTINHO S. Characterization of the *PvdS*-regulated promoter motif in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals regulon members and insights regarding *PvdS* function in other pseudomonads[J]. Molecular Microbiology, 2008, 68(4): 871–889.
- [26] 孙其宝, 俞飞飞, 孙俊. 葡萄无核化研究进展[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(2): 360–362.
- SUN Qibao, YU Feifei, SUN Jun. Research progress of seedless grape[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2004, 32(2): 360–362.
- [27] 王庆莲, 赵密珍, 袁华招, 吴伟民, 钱亚明, 王西成. 花后 GA₃ 对无核葡萄果实膨大和品质的影响[J]. 安徽农业大学学报, 2014, 41(6): 971–975.
- WANG Qinglian, ZHAO Mizhen, YUAN Huazhao, WU Weimin, QIAN Yaming, WANG Xicheng. Effect of postbloom GA₃ treatment on fruit enlargement and quality of seedless grape[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2014, 41(6): 971–975.
- [28] 刘佳, 刘晓, 陈建. 四川地区赤霉素和链霉素处理对巨峰葡萄无核化及果实发育的影响[J]. 西南农业学报, 2011, 24(1): 220–224.
- LIU Jia, LIU Xiao, CHEN Jian. Effect of GA₃ and SM treatment on inducing seedless and berry growth of Kyoho grape in Sichuan area[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2011, 24(1): 220–224.
- [29] HAN D H, LEE C H. The effects of GA₃, CPPU and ABA applications on the quality of Kyoho (*Vitis vinifera* L. × *V. labrusca* L.) grape[J]. Acta Horticulturae, 2004, 653: 193–197.
- [30] 高江曼. 赤霞珠葡萄果实生长过程中内源激素的变化及外源 ABA 和 EBR 对其的作用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- GAO Jiangman. Dynamic change of endogenous hormones in *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon and effect of EBR and ABA to the endogenous hormones[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016.
- [31] SANDHU A K, GRAY D J, LU J, GU L. Effects of exogenous abscisic acid on antioxidant capacities, anthocyanins, and flavonol contents of Muscadine grape (*Vitis rotundifolia*) skins[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 982–988.
- [32] 肖永英, 甘立军, 夏凯. 茉莉酸酯类和 6-BA 对葡萄果实品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2008(6): 153–155.
- XIAO Yongying, GAN Lijun, XIA Kai. Effects of jasmonate and 6-BA on grape fruit quality[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2008(6): 153–155.
- [33] BOTTCHE C, BURBIDGE C A, BOSS P K, DAVIES C. Interactions between ethylene and auxin are crucial to the control of grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1): 222.
- [34] 王西成, 吴伟民, 赵密珍, 钱亚明, 王壮伟. 激素调控葡萄果实发育与成熟的生理与分子机制研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(4): 604–611.
- WANG Xicheng, WU Weimin, ZHAO Mizhen, QIAN Yaming, WANG Zhuangwei. Progress in the research of physiological and molecular mechanism in development and ripening of grape fruit regulated by hormones[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2015, 37(4): 604–611.