果 树 学 报 2023,40(1):13-24
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20220247

葡萄*PLATZ*家族基因鉴定及其在种子发育过程中的表达分析

向 锐,孙艺萌[a],梁 晨,师校欣,杜国强*,王 莉*

(河北农业大学园艺学院,河北保定 071000)

摘 要:【目的】鉴定葡萄PLATZ(Plant AT-rich sequence and zinc-binding protein)家族转录因子,并探究其在种子发育过程中与IAA处理下的表达模式变化。**【方法】**基于葡萄基因组数据,通过多种生物信息学方法对葡萄PLATZ家族成员进行鉴定和分析,利用qRT-PCR分析其在葡萄种子不同发育时期及IAA处理下的表达模式。**【结果】**葡萄全基因组范围内共鉴定到13个PLATZ成员,分布于9条染色体上。系统进化分析结果表明,葡萄PLATZ蛋白成员分为4组(A、B、C、D),无其他物种聚类的E组成员。蛋白保守基序分析表明葡萄PLATZ蛋白具有较强保守性,内含子-外显子分布表明葡萄*PLATZ*基因在进化上具有多样性。同线性分析发现,*VvPLATZ7*~*VvPLATZ8*和*VvPLATZ5*~*VvPLATZ11*存在并联重复。顺式作用元件分析发现该基因家族的启动子包含生长发育、光响应、激素响应及胁迫响应相关作用元件。qRT-PCR结果分析表明,*VvPLATZ5*在无核葡萄种子发育过程中表达水平显著高于有核葡萄,*VvPLATZ2*和*VvPLATZ6*在有核葡萄种子发育过程中表达水平显著高于无核葡萄;8个*VvPLATZ*基因均响应IAA处理,且*VvPLATZ5*和*VvPLATZ12*基因在处理后6 h表达水平上调幅度显著。**【结论】**在葡萄基因组共鉴定到13个*PLATZ*基因,进化上同组成员保守基序数目及类别具有保守性,基因内含子-外显子结构具有多样性。*PLATZ*基因在有核、无核葡萄种子发育不同时期表达模式存在差异,且显著响应IAA处理,推测其在葡萄种子发育过程中发挥作用。

关键词:葡萄;PLATZ;生物信息学;种子发育;表达分析

中图分类号:S663.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2023)01-0013-12

Genome-wide identification of grape *PLATZ* family genes and expression analysis during seed development

XIANG Rui, SUN Yimeng[a], LIANG Chen, SHI Xiaoxin, DU Guoqiang*, WANG Li*

(College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China)

Abstract:【Objective】PLATZ is a plant-specific zinc finger transcription factor and has important functions in many processes of plant growth and development. It has also been reported to be involved in the development of seeds in other plants, but the regulatory mechanism in the seed of grape berry development is still unclear. By identifying the structure and expression of the grapevine *PLATZ* gene family, this study aimed to lay a foundation for further understanding the role of *PLATZ* family genes in various plant growth and developmental processes especially in seed development.【Methods】Based on the grape genome data, basic local alignment search tool (BLAST) and Hidden Markov Models (HMM) profiles were used to identify the members of the grape PLATZ family. Online websites including Pfam, NCBI, SMART, Ex PASy, PSORT, GSDS 2.0, MEME and bioinformatics analysis software including SPDE, MEGA-X and TBtools were used to predict the physicochemical properties, gene structure, protein subcellular localization, phylogenetic relationship and distribution of cis-acting elements of grape

收稿日期:2022-05-07 **接受日期:**2022-08-20

基金项目:河北省高等学校科学技术青年基金项目(QN2020232);河北省青年科学基金项目(C2021204146);现代种业科技创新专项(21326310D);河北省现代农业产业技术体系项目(HBCT2018100204)

作者简介:向锐,男,在读硕士研究生,研究方向为果树生物技术与分子育种。Tel:18981024951,E-mail:xiangrui771@gmail.com。a为共同第一作者

*通信作者 Author for correspondence. Tel:17336424926,E-mail:vivi@hebau.edu.cn;Tel:13513220816,E-mail:gdu@hebau.edu.cn

PLATZ gene family. qRT-PCR was used to analysis the expression level of the *VvPLATZ* genes during seed development and in response to exogenous IAA.【Results】A total of 13 PLATZ members were identified in the whole grape genome, which were distributed on 9 chromosomes. The amino acid sequence length of family members was between 115 and 306 aa. The maximum molecular mass was 34 700.11 u and the minimum was 12 703.00 u. The isoelectric points were between 8.20 and 10.12, the instability factor was between 36.88 and 71.24, and the aliphatic index was between 62.37 and 85.96. The subcellular localization prediction results showed that 9 of the 13 grape PLATZ family members were localized in the nucleus, 2 in the cytoplasmic, 1 in the chloroplast, and 1 in the peroxisome. The phylogenetic analysis showed that grape PLATZ protein members were divided into four groups (A, B, C, D), subgroups A, B, C, and D contain 2, 3, 6, and 2 grape PLATZ members, respectively, and subgroup did not contain any grape PLATZ members, showing some evolutionary loss. The protein conservation motif analysis showed that grape PLATZ protein had strong conservation, while intron-exon distribution analysis suggested evolutionary diversity in grape *PLATZ* genes. The syntenic analysis found that *VvPLATZ7*- *VvPLATZ8* and *VvPLATZ5*- *VvPLATZ11* were segmental duplicated genes. In addition, the analysis of *cis*-acting elements found that there were 24 elements in *PLATZ* family, which were divided into 4 categories according to their functions: hormone response, light response, stress response, plant developmental regulation. Except for the *VvPLATZ6* gene, all other genes have hormone-responsive elements. Except for the *VvPLATZ11* and *VvPLATZ5*, most grape *PLATZ* genes contain stress-responsive cis-elements. The transcriptome data showed that the *VvPLATZ5*, *VvPLATZ11* and *VvPLATZ12* were significantly up-regulated during ovule development of the seedless progeny compared with the seeded progeny, while the *VvPLATZ2* was up-regulated in the seed progeny. The expression levels of the *VvPLATZ2* and *VvPLATZ6* were significantly higher in the seeded varieties than that in the seedless varieties, suggesting that they might play a role in the seed development. Compared with the seeded varieties, the expression level of the *VvPLATZ5* was significantly higher in the seed development of the two seedless grape varieties than that in the seeded varieties, suggesting that it might be related to ovule abortion. It was worth noting that the differential expression patterns of the *VvPLATZ2* and *VvPLATZ5* genes covered almost the entire developmental period, and the differential fold changes were quite large. The expression levels of the *VvPLATZ4/13*, *VvPLATZ11* and *VvPLATZ12* were significantly higher in the seedless varieties at the early stage of the seed development (20 and 30 DAF) than those in the seeded varieties. All 8 *VvPLATZ* genes were in response to IAA treatment, the expression levels of the *VvPLATZ5* and *VvPLATZ12* genes significantly increased 6 h post treatment.【Conclusion】A total of 13 *PLATZ* genes were identified in the grape genome, and the *VvPLATZ* genes showed differential expression during the process of the seed development, and it significantly responded to IAA treatment. Our result enriched the understanding of grape *PLATZ* gene, laid a theoretical foundation for further research on the function of grape *PLATZ* gene, and was conducive to provide high-quality genetic resources for grape molecular breeding.

Key words: Grape; PLATZ; Bioinformatics; Seed development; Expression analysis

PLATZ（plant AT-rich sequence and zinc-binding protein）是一类新型的植物特异锌指类转录因子，具有PLATZ保守结构域（PF04640）。豌豆（*Pisum sativum*）PLATZ1是第一个被报道的PLATZ蛋白，是植物特异性、锌依赖DNA结合蛋白，可以非特异性地与富含A/T的碱基序列结合，发挥转录抑制作用，并具有C-X_2-H-X_{11}-C-X_2-C-$X_{(4-5)}$-C-X_2-C-$X_{(3-7)}$-H-X_2-H（CHC_4H_2）和C-X_2-C-$X_{(10-11)}$-C-X_3-C这两个高度保守的蛋白锌指基序[1]。

PLATZ家族鉴定分析已在拟南芥、水稻、玉米、

芜青、小麦和油橄榄等物种中开展[2-5]，并发现一系列在植物胁迫响应及生长发育调控方面具有重要功能的PLATZ转录因子。首先，在植物非生物胁迫响应方面，拟南芥*AtPLATZ1*和*AtPLATZ2*参与调控营养组织和种子的脱水抗性[6]；在拟南芥中过表达棉花*GhPLATZ1*基因能显著增强萌发期和苗期的渗透胁迫耐受性[7]。其次，在植物生长发育调控方面，异源表达水仙*NtPLATZ1*基因能抑制烟草生长，沉默*NtPLATZ1*基因能促进烟草生长[8]。玉米*Fl3*（*ZmPLATZ12*）基因在玉米胚乳淀粉细胞中特异性表达，影响种子胚乳发育和养分储藏[9]；水稻PLATZ转录因子GL6通过调控幼穗和谷粒的细胞增殖，决定籽粒长度和小穗数[10]；由此可见PLATZ转录因子在包括种子发育在内的多种生物学过程中有重要作用。

葡萄（*Vitis vinifera* L.）是世界上重要的果树作物之一，果实及其加工品具有极高的营养价值和经济价值。目前关于葡萄PLATZ转录因子家族的系统研究未见有报道，特别是参与种子发育的报道。笔者在本研究中利用生物信息学方法对葡萄PLATZ家族成员进行了鉴定，分析了基因结构、同线性关系、染色体定位、进化关系、蛋白质保守基序等，并对该家族成员在种子发育过程中与IAA处理下的表达模式进行了分析，为揭示葡萄PLATZ转录因子进化机制提供有用信息，为后续研究葡萄PLATZ家族基因的生物学功能奠定基础。

1　材料和方法

1.1　试验材料和处理

本试验于2021年4月—2021年10月在河北农业大学园艺学院生物技术实验室进行。试验材料为3个有核葡萄品种巨峰（Kyoho）、醉金香（Zuijinxiang）、红地球（Red Globe）和2个无核葡萄品种火焰无核（Flame Seedless）、克瑞森无核（Crimson Seedless），均种植保存于河北保定河北农业大学（E 115°29′，N 38°51′）葡萄资源圃，年平均气温13.4 ℃，年平均日照2511 h，年平均降水量498.9 mm。分别对无核品种火焰无核、克瑞森无核及有核品种巨峰、醉金香于盛花后20、30、40、50 d收集胚珠[11]。配制100 μmol·L^{-1} IAA溶液[12]均匀喷施于红地球葡萄植株嫩叶，以无菌水喷施嫩叶为对照，于处理1、3、6 h后收集嫩叶。每个处理设置3次生物学重复，收集的胚珠和叶片样品立即放入液氮中，并存于−80 ℃冰箱中备用。

1.2　葡萄PLATZ家族成员鉴定

通过Pfam数据库（http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab1）获取PLATZ家族蛋白保守结构域（PF04640）的隐马尔可夫（HMM）文件，利用SPDE[13]hmmersearch功能（HMMER 3.0）获得候选蛋白，以所有候选蛋白序列作为查询索引，使用国家生物技术信息中心（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）BLASTp程序默认设置下搜索葡萄基因组同源蛋白，将候选NCBI同源蛋白利用葡萄基因组数据库（http://www.genoscope.cn.fr）和葡萄基因组CRIBI生物技术网站（http://genomes.cribi.unipd.it/）进一步进行同源比对筛选，并利用SMART（http://smart.embl-heidelberg.de）和Pfam数据库（http://pfam.xfam.org/search#tabview=tab1）人为核对去除结构域不完整的蛋白，获得最终鉴定的PLATZ成员，并依据基因染色体位置命名[11]。利用Ex PASy数据库（https://web.expasy.org/protparam/）中的Prot Param功能对PLATZ蛋白质的等电点、分子质量、不稳定系数、脂肪系数等基本信息进行分析。使用PSORT在线网站（https://wolfpsort.hgc.jp/）进行葡萄PLATZ家族成员亚细胞定位预测。

1.3　PLATZ家族同线性分析

从植物基因组复制数据库（http://chibba.agtec.uga.edu/duplication/）下载葡萄PLATZ自身基因组间及葡萄与拟南芥基因组间的同线区域[14]，并用Circos 0.63（http://circos.ca/）绘图[15]。

1.4　葡萄PLATZ家族基因结构、蛋白保守基序及系统进化树分析

在葡萄基因组数据库（http://www.genoscope.cns.fr）获得葡萄基因组序列、CDS序列及蛋白序列。使用网站GSDS 2.0（http://gsds.gao-lab.org/index.php）开展外显子-内含子分析。利用在线网站MEME（http://meme-suite.org/）开展葡萄PLATZ家族蛋白保守基序分析，参数如下：高级选项默认，最大基序数7。使用SMART和Pfam数据库对MEME基序进行注释。利用TBtools[16]软件绘制motifs图。利用MEGA X软件[17]对葡萄、拟南芥、水稻、玉米、番茄和大豆共6个物种的PLATZ蛋白序列开展Clustal W多重序列比对，采用邻接法（Neighbor-joining Tree）构建系统进化树，bootstraps检验（n=1000）。

1.5 葡萄PLATZ家族基因启动子顺式作用元件分析

使用SPDE软件获取*VvPLATZs*上游2000 bp启动子序列，利用在线网站PlantCARE（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/）[18]预测启动子区域顺式作用元件种类及数量。

1.6 *VvPLATZ*基因有核无核葡萄子代种子发育转录组分析

通过已发表转录组数据（登陆号，PRJNA338255），分析*VvPLATZ*基因在有核葡萄红地球和无核葡萄森田尼无核杂交分离有核、无核子代种子发育的3个时期（盛花后24、30、39 d）的表达模式，所用材料、时期与已发表文献[19]一致，用TBtools软件绘制基因表达热图。

1.7 总RNA提取与qRT-PCR表达分析

RNA提取使用全能型植物RNA提取试剂盒（CWBIO，Beijing，China），并采用NanoDrop分光光度计（Thermo Fisher Scientific，Shanghai，China）测定RNA的OD值，琼脂糖凝胶电泳检测RNA样品质量。利用ScriptRTase（Trans Gen Biotech，Beijing，China）去除gDNA，使用UEIris II RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis试剂盒（US Everbright® Inc.）合成cDNA。用于qRT-PCR反应的特异性引物均用Primer 5软件设计，其中*VvPLATZ4*和*VvPLATZ13*的cDNA序列高度相似，因此共用一对引物，引物序列见表1，*Actin*（NC_012010）为内参基因。反应体系20 μL：上下游引物各1 μL，cDNA模板1 μL，2× Fast Super EvaGreen® qPCR Mastermix 10 μL，ddH_2O 7 μL。设置3次生物学重复和3次技术重复。qRT-PCR设备为LightCycler®96（Roche，Shanghai，China），反应程序：95 ℃ 120 s；95 ℃ 5 s；59 ℃ 30 s，45个循环。依据$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算基因的相对表达量[20]，并用Excel 2019进行整理及制图，运用SPSS软件进行显著性分析。

表1 用于qRT-PCR反应的引物序列

Table 1 The primer sequences used for qRT-PCR amplification

基因 Gene	上游引物（5’-3’） Forward primer（5’-3’）	下游引物（5’-3’） Reverse primer（5’-3’）
VvPLATZ2	CACTCTGGACGGGAACTGAAT	TGTAGAAACTGCTGCGACCTT
VvPLATZ3	ACCTCATCTGAATCCTCGTCC	TTGAGCAGAAGCGATTAGGG
VvPLATZ4/13	TAACGACCGCCAAATGACC	AAAGGGAACCGAGGCACAG
VvPLATZ5	GCCTCTGTTCTCTCTGTCTGGG	AGCTTGCGCTGTTGATAATGTAG
VvPLATZ6	TATGTGGCGTTGGGTGCTT	TATGCTAACGGAGCGAGGG
VvPLATZ10	AACAGACAAGGCAATTCAGAGG	TGAGTCAGGCGTGAGTAAACC
VvPLATZ11	CGTGCTATTCAGATAAGGAGGTC	ACAAGTGAAGGAGTCAAGGAGG
VvPLATZ12	AGCGATCCTCGTACCACAAC	TCCAGCCCAAAGAACAGAAC
Actin	GATTCTGGTGATGGTGTGAGT	GACAATTTCCCGTTCAGCAGT

2 结果与分析

2.1 葡萄PLATZ家族成员鉴定、亚细胞定位预测及同线性分析

从葡萄全基因组中鉴定出13个PLATZ家族成员，分别命名为*VvPLATZ1*~*VvPLATZ13*。由表2可知，葡萄*VvPLATZs*基因不均匀地分布在9条染色体上，3个基因在1号染色体，9个基因分别位于2、3、6、8、11、15、16、18号染色体，*VvPLATZ13*基因未知。家族成员氨基酸序列长度为115（*VvPLATZ2*）~306（*VvPLATZ12*）aa，分子质量最大为34 700.11 Da（*VvPLATZ12*），最小为12 703.00 Da（*VvPLATZ2*），等电点为8.20（*VvPLATZ1*）~10.12（*VvPLATZ2*），不稳定系数为36.88（*VvPLATZ12*）~71.24（*VvPLATZ8*），脂肪系数为62.37（*VvPLATZ2*）~85.96（*VvPLATZ13*）。亚细胞定位预测结果表明，葡萄PLATZ家族13个成员中有9个定位于细胞核，2个定位于细胞质，1个定位于叶绿体，1个定位于过氧化物酶体。

根据葡萄自身基因组及葡萄与拟南芥PLATZ家族同线性分析（图1），发现葡萄基因组内*VvPLATZ5*~*VvPLATZ11*和*VvPLATZ7*~*VvPLATZ8*两组并联重复，未发现串联重复。葡萄与拟南芥基因组之间PLATZ家族同线性分析发现，*VvPLATZ3*与*AT2G01818*存在同线性区域。

表2　葡萄基因组PLATZ家族基因信息

Table 2　Genome-wide information of grape PLATZ family genes

基因 Gene	登录号 Accession No.	基因ID号 Gene locus ID	VCost.v3 ID	基因位置 Gene location	氨基酸数目 ORF/aa	分子质量 Molecular mass/Da	等电点 Theoretical isoelectric point	不稳定系数 The instability index	脂肪系数 Aliphatic index	亚细胞定位 Subcellular localization
VvPLATZ1	XP_002275249	GSVIVT01012125001	Vitvi01g00111	chr1:1 219 790 ~ 1 221 546	237	26 860.60	8.20	60.84	71.44	细胞核 Nucleus
VvPLATZ2	XP_010648455	GSVIVT01012050001	Vitvi01g00167	chr1:1 785 520 ~ 1 791 297	115	12 703.00	10.12	49.31	62.37	细胞核 Nucleus
VvPLATZ3	XP_010649544	GSVIVT01011622001	Vitvi01g00519	chr1:5 829 740 ~ 5 832 049	247	28 062.61	9.23	46.37	74.47	细胞核 Nucleus
VvPLATZ4	XP_010662296	GSVIVT01001279001	Vitvi02g01434	chr2:4 948 964 ~ 4 950 534	283	31 865.16	9.52	61.51	85.35	细胞核 Nucleus
VvPLATZ5	XP_010663463	GSVIVT01013149001	Vitvi02g00704	chr2:7 559 107 ~ 7 561 555	263	29 107.04	9.17	54.49	70.00	细胞核 Nucleus
VvPLATZ6	XP_003631604	GSVIVT01031929001	Vitvi03g00360	chr3:5 469 494 ~ 5 470 726	242	27 393.47	8.77	65.22	73.53	叶绿体 Chloroplast
VvPLATZ7	XP_002272234	GSVIVT01031446001	Vitvi06g01361	chr6:18 422 781 ~ 18 423 262	134	15 089.55	9.09	42.15	76.09	细胞质 Cytoplasm
VvPLATZ8	CBI30183.3	GSVIVT01033703001	Vitvi08g01579	chr8:18 472 901 ~ 18 474 970	205	23 000.21	8.71	71.24	68.33	细胞核 Nucleus
VvPLATZ9	XP_002268309	GSVIVT01012869001	Vitvi11g00585	chr11:6 377 416 ~ 6 378 932	246	27 936.20	8.43	64.17	69.96	细胞核 Nucleus
VvPLATZ10	XP_002280288	GSVIVT01027645001	Vitvi15g00710	chr15:14 718 053 ~ 14 719 849	251	28 163.32	8.75	65.53	74.88	细胞核 Nucleus
VvPLATZ11	XP_002271206	GSVIVT01024338001	Vitvi16g00083	chr16:1 155 005 ~ 1 159 362	179	20 365.70	9.25	50.42	81.57	细胞核 Nucleus
VvPLATZ12	XP_002277078	GSVIVT01013455001	Vitvi18g02472	chr18:320 109 ~ 322 487	306	34 700.11	8.65	36.88	82.39	细胞质 Cytoplasm
VvPLATZ13	XP_003635131	GSVIVT01004782001	Vitvi02g01691	chrUn:16 091 054 ~ 16 091 929	137	15 790.50	8.23	58.76	85.96	过氧化物酶体 Peroxisomal

2.2　葡萄*PLATZ*家族基因结构及蛋白保守基序分析

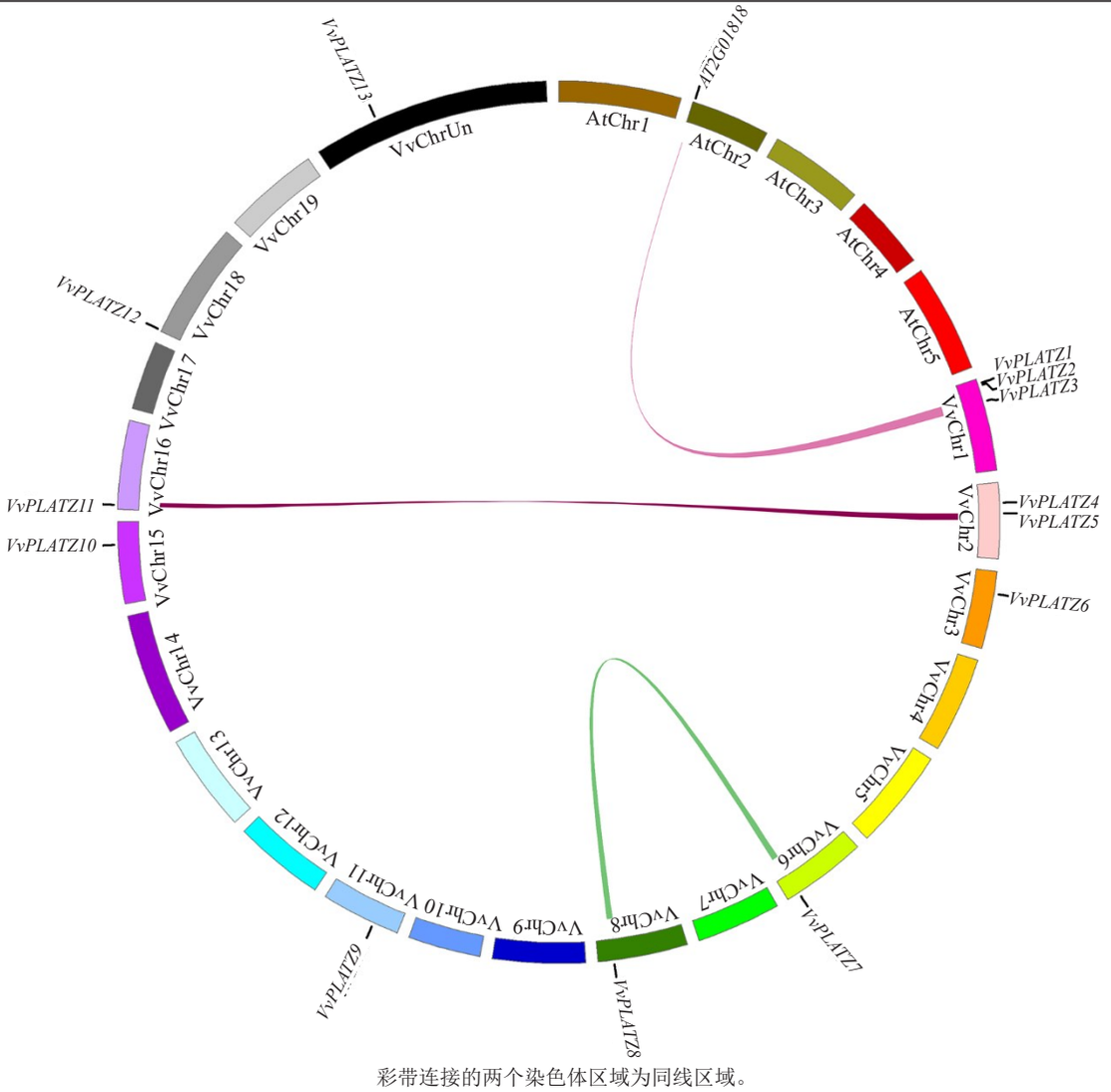
为了更好地了解基因进化过程，对PLATZ家族成员的基因结构信息进行分析。系统进化树分析（图2-A）表明，A组*PLATZ*基因均含有5个外显子，表现出一定结构保守性，其他组PLATZ同组基因外显子-内含子结构具有多样性，例如B组*PLATZ*基因外显子数目为2~7个不等（图2-B）；C组*PLATZ*基因外显子数目为3~6个不等，D组的*VvPLATZ2*和*VvPLATZ3*分别含有3个和5个外显子。蛋白保守基序分析（图2-C）表明，葡萄PLATZ家族整体上在蛋白保守基序分布模式和数量上呈现较强保守性，均含有PLATZ保守结构域。

2.3　葡萄PLATZ家族系统进化分析

为了研究葡萄与其他物种PLATZ家族成员的进化关系，将源于葡萄（13个）、拟南芥（12个）、番茄（21个）、大豆（30个）、水稻（15个）和玉米（15个）的PLATZ蛋白序列开展系统进化树分析（图3），研究发现，来自不同物种的106个PLATZ家族成员可分为5个亚族（A~E），亚族A、B、C、D分别包含2、3、6和2个葡萄PLATZ成员，亚族E不包含任何葡萄PLATZ成员，表现出一定的进化遗失。与单子叶植物水稻与玉米相比，大部分葡萄PLATZ家族成员与双子叶植物大豆、番茄和拟南芥PLATZ亲缘关系更近，例如亚族A的VvPLATZ5和SlPLATZ19，亚族B的VvPLATZ12和AtPLATZ5、VvPLATZ8和SlPLATZ20，以及亚族D的VvPLATZ2和GmPLATZ5具有较高的序列相似性，而单子叶植物水稻与玉米PLATZ成员相似性较高。这一现象与单子叶植物与双子叶植物进化上的亲缘关系一致，与单子叶植物相比，双子叶植物之间起源于更近的祖先。

2.4　葡萄PLATZ家族基因启动子顺式作用元件分析

不同类型的顺式作用调控元件在基因启动子区域的分布模式一定程度上能揭示基因潜在的生物学功能和调控差异。通过对葡萄*PLATZ*家族基因启动子区顺式作用元件分析（图4），共鉴定出24种元件，按功能分为4类，激素响应类元件（茉莉酸甲酯、脱落酸、生长素、水杨酸、赤霉素）、光响应类元件、胁迫响应类元件（防御和胁迫、厌氧、干旱、低温、伤口反应）、植物发育调控类元件（胚乳表达、分生组织表达、种子特异性调控、昼夜节律控制、玉米醇溶蛋白

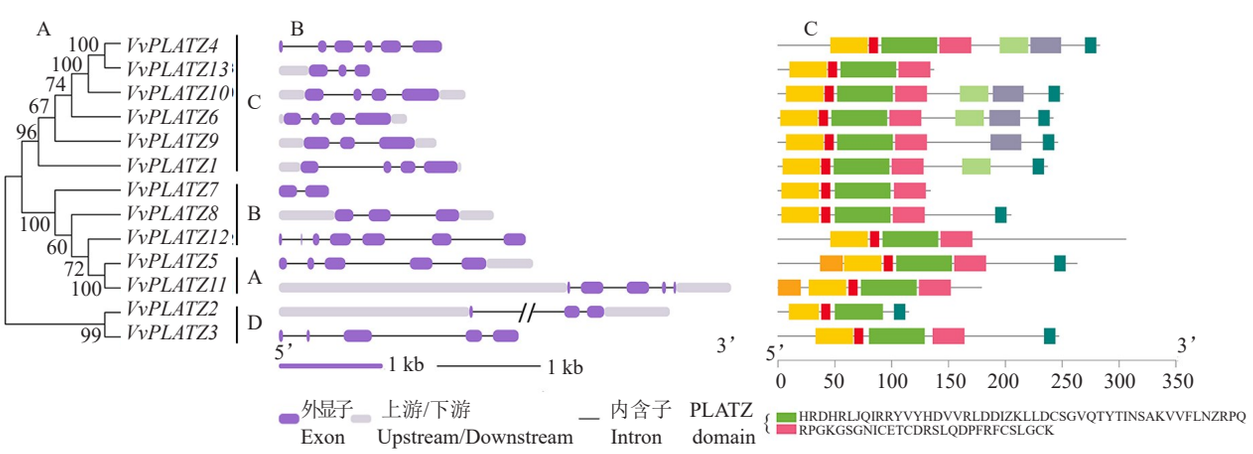


彩带连接的两个染色体区域为同线区域。

The two chromosomal regions connected by the ribbon are syntenic regions.

图 1　葡萄自身基因组及葡萄与拟南芥 *PLATZ* 基因同线性分析

Fig. 1　Synteny analysis of *PLATZ* genes within grape genome and between grape and *Arabdopsis* genome



A. 葡萄 PLATZ 家族进化树；B. 外显子-内含子分布，过长的内含子用双斜线代替；C. 蛋白保守基序分布。

A. Phylogenetic tree of PLATZ family in grape; B. Exon-intron distribution, overlong introns are replaced by double slashes; C. Distribution of protein conserved motifs.

图 2　葡萄 PLATZ 家族系统进化树、基因结构及蛋白保守基序分析

Fig. 2　Phylogenetic tree, gene structure and protein conserved motif analysis of grapevine PLATZ family

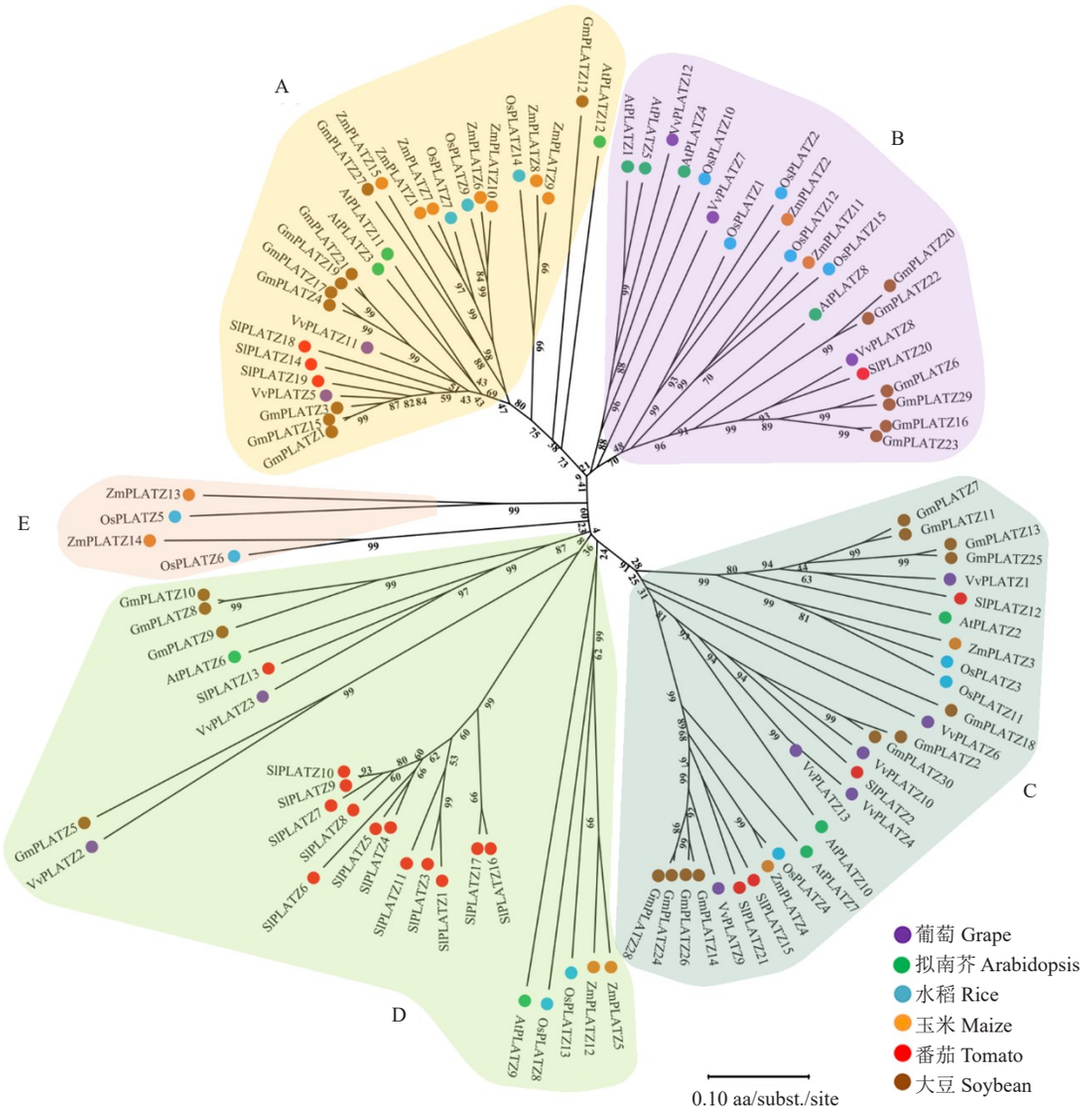


图 3　葡萄与其他物种 PLATZ 家族的系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic analysis of PLATZ family in grape and other plants

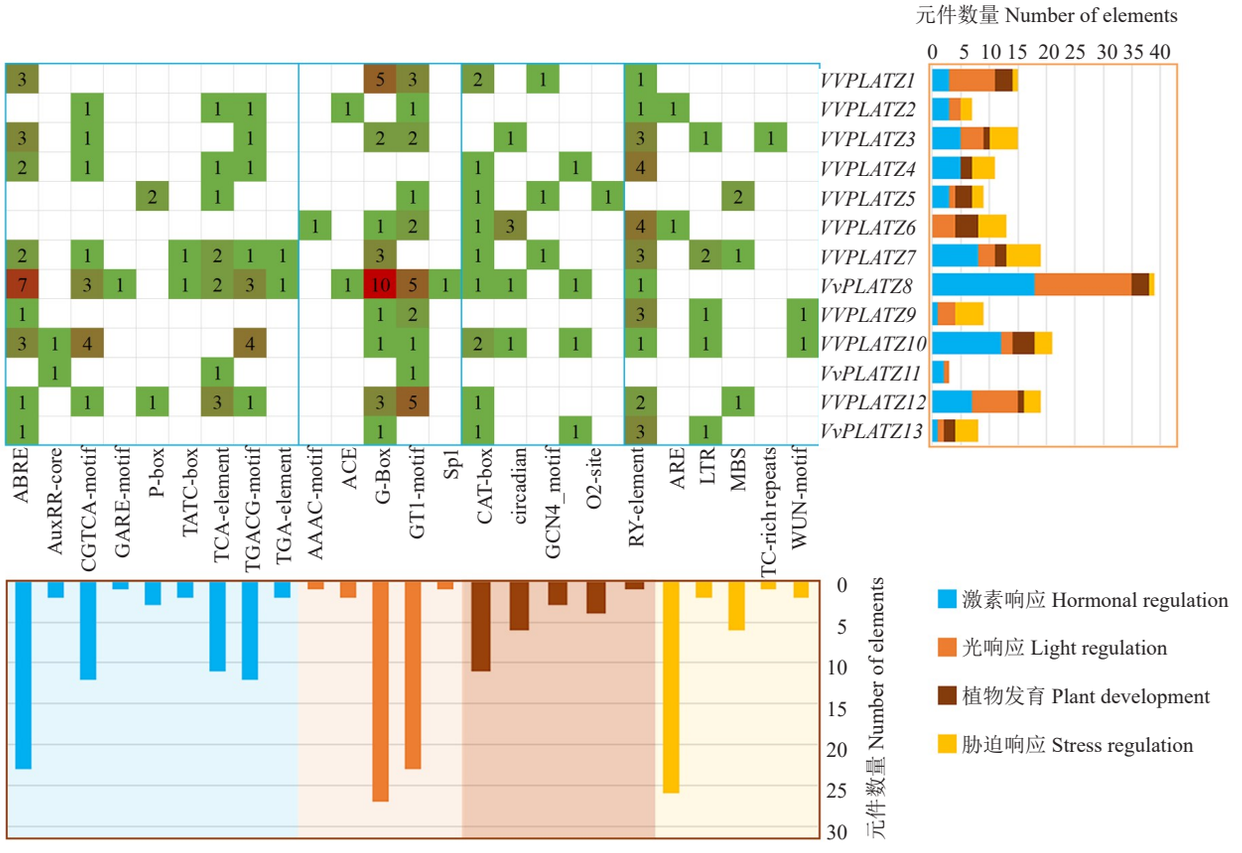
代谢）。

除 *VvPLATZ6* 基因外，其余基因均有激素响应元件，包括茉莉酸甲酯响应元件（CGTCA-motif，TGACG-motif）、脱落酸响应元件（ABRE）、生长素响应元件（TGA-element、AuxRR-core）、水杨酸响应元件（TCA-element）和赤霉素响应元件（GARE-motif、P-box、TATC-box）（图 4）。茉莉酸甲酯响应元件最为丰富（24 个），脱落酸响应元件次之（23 个），含有最多激素响应元件的基因为 *VvPLATZ8*（图 4），推测大多数 *VvPLATZ* 基因在激素调控途径中具有重要作用。

除 *VvPLATZ11* 和 *VvPLATZ5* 以外，大多数葡萄 *PLATZ* 基因均含有胁迫响应顺式元件，如厌氧诱导元件（ARE）、低温响应元件（LTR）、干旱诱导元件（MBS）、伤口反应元件（WUN-motif）和防御与胁迫响应元件（TC-rich repeats）。此外，植物生长发育相关元件（CAT-box、circadian、GCN4_motif、O2-site 及 RY-elements）的存在表明 *PLATZ* 基因很可能参与葡萄生长发育。

2.5　葡萄 *PLATZ* 家族基因在种子发育过程中的表达模式分析

利用已发表转录组数据[19]，开展 *VvPLATZs* 基因在杂交分离有核、无核子代种子发育表达模式分析（图 5- A），发现除 *VvPLATZ2*、*VvPLATZ5*、



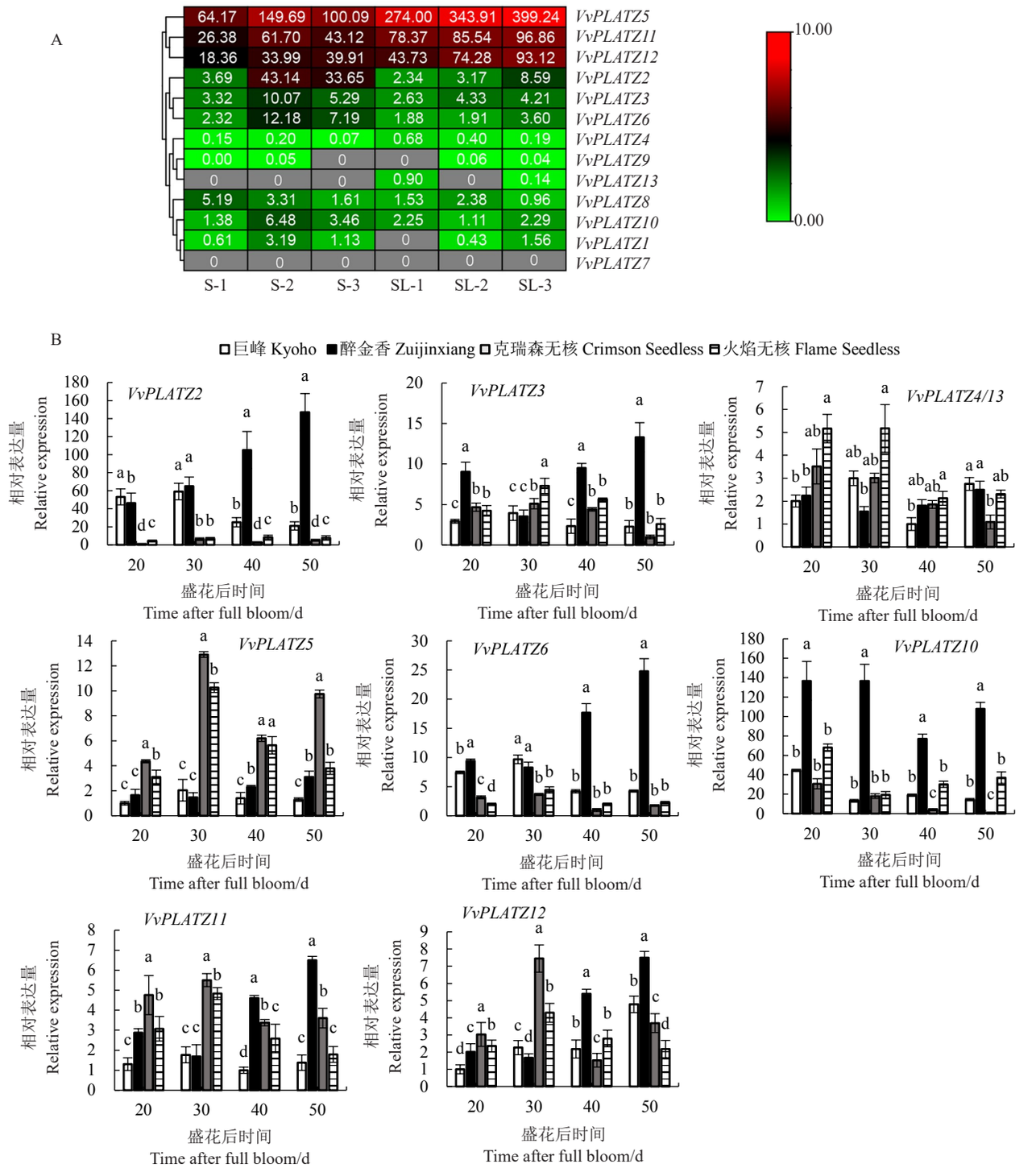
蓝色框区域为 *PLATZ* 家族基因启动子顺式作用元件数量，橙色框区域的不同色块指示基因响应不同类型元件的数量，棕色框区域为不同顺式作用元件的数量；激素响应类元件 ABRE. 脱落酸响应；AuxRR-core. 生长素响应；CGTCA-motif. 茉莉酸甲酯响应；GARE-motif. 赤霉素响应；P-box. 赤霉素响应；TATC-box. 赤霉素响应；TCA-element. 水杨酸响应；TGACG-motif. 茉莉酸甲酯响应；TGA-element. 生长素响应；植物发育类元件 CAT-box. 分生组织表达；circadian. 昼夜节律；GCN4_motif. 胚乳表达；O2-site. 玉米醇溶蛋白代谢；RY-element. 种子特异性调控；胁迫响应类元件 ARE. 厌氧诱导；LTR. 低温响应；MBS. 干旱诱导；TC-rich repeats. 防御与胁迫响应；WUN-motif. 伤口反应。

The blue box region indicates the number of *cis*-acting elements in the *PLATZ* family gene promoter, the different color patches in the orange box indicate the number of different elements types the gene in response, and the brown box area indicates the number of different *cis*-acting elements. Hormone-responsive element ABRE. Abscisic acid responsiveness; AuxRR-core. Auxin responsiveness; CGTCA-motif. MeJA-responsiveness; GARE-motif. Gibberellin responsiveness; P-box. Gibberellin responsiveness; TATC-box. Gibberellin responsiveness; TCA-element. Salicylic acid responsiveness; TGACG-motif. MeJA-responsiveness; TGA-element. Auxin responsiveness. Plant developmental elements CAT-box. Meristem expression; circadian. circadian rhythm; GCN4_motif. Endosperm expression; O2-site. Zein metabolism; RY-element. Seed-specific regulation. Stress-responsive elements ARE. Anaerobic induction; LTR. Low temperature responsiveness; MBS. Drought induction; TC-rich repeats. Defense and stress responsiveness; WUN-motif. Wound responsiveness.

图 4 葡萄 *PLATZ* 家族基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 4 Analysis of *cis*-acting elements in the promoter of grape *PLATZ* family genes

VvPLATZ11、*VvPLATZ12* 外，其他 *VvPLATZ* 基因在有核、无核子代种子发育过程中RPKM表达量均较低或未检测出。与有核子代相比，*VvPLATZ5*、*VvPLATZ11* 及 *VvPLATZ12* 在无核子代种子发育过程中均显著上调表达；而 *VvPLATZ2* 在有核子代种子较无核子代上调表达。基于转录组数据，笔者在本研究中进一步选取8个基因在两个有核葡萄（巨峰、醉金香）和两个无核葡萄（火焰无核、克瑞森无核）中开展种子发育qRT-PCR分析，以验证基因表达模式在多个品种中的广谱性。结果表明（图5-B），*VvPLATZ2* 和 *VvPLATZ6* 在有核品种种子发育过程中表达量显著高于无核品种，推测其可能在种子发育过程中发挥作用。与有核品种相比，*VvPLATZ5* 在两个无核葡萄品种种子发育过程中表达量均显著高于有核品种，暗示其可能与胚珠败育有关。值得注意的是，*VvPLATZ2* 和 *VvPLATZ5* 基因



A. 有核无核子代种子发育转录组热图；红色和绿色分别表示高和低表达水平；S. 有核子代；SL. 无核子代；*VvPLATZs* 的 RPKM（每百万 reads 中来自于某基因每千碱基长度的 reads 数）显示在矩形块上。B. 4 个品种种子发育过程中 *VvPLATZ* 基因的 qRT-PCR 分析；不同小写字母表示数据差异显著（Tukey 方差分析，$p<0.05$）。

A. Heat map of transcriptome analysis during seed development in seeded and seedless progenies. Red and green color scale indicates high and low expression levels, respectively. S. Seeded progeny; SL. Seedless progeny; RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) of *VvPLATZs* is shown on rectangular blocks. B. qRT-PCR analysis of *VvPLATZ* genes during seed development in four cultivars. Different small letters indicate statistically significant differences (ANOVA with a Tukey post-hoc analysis, $p<0.05$).

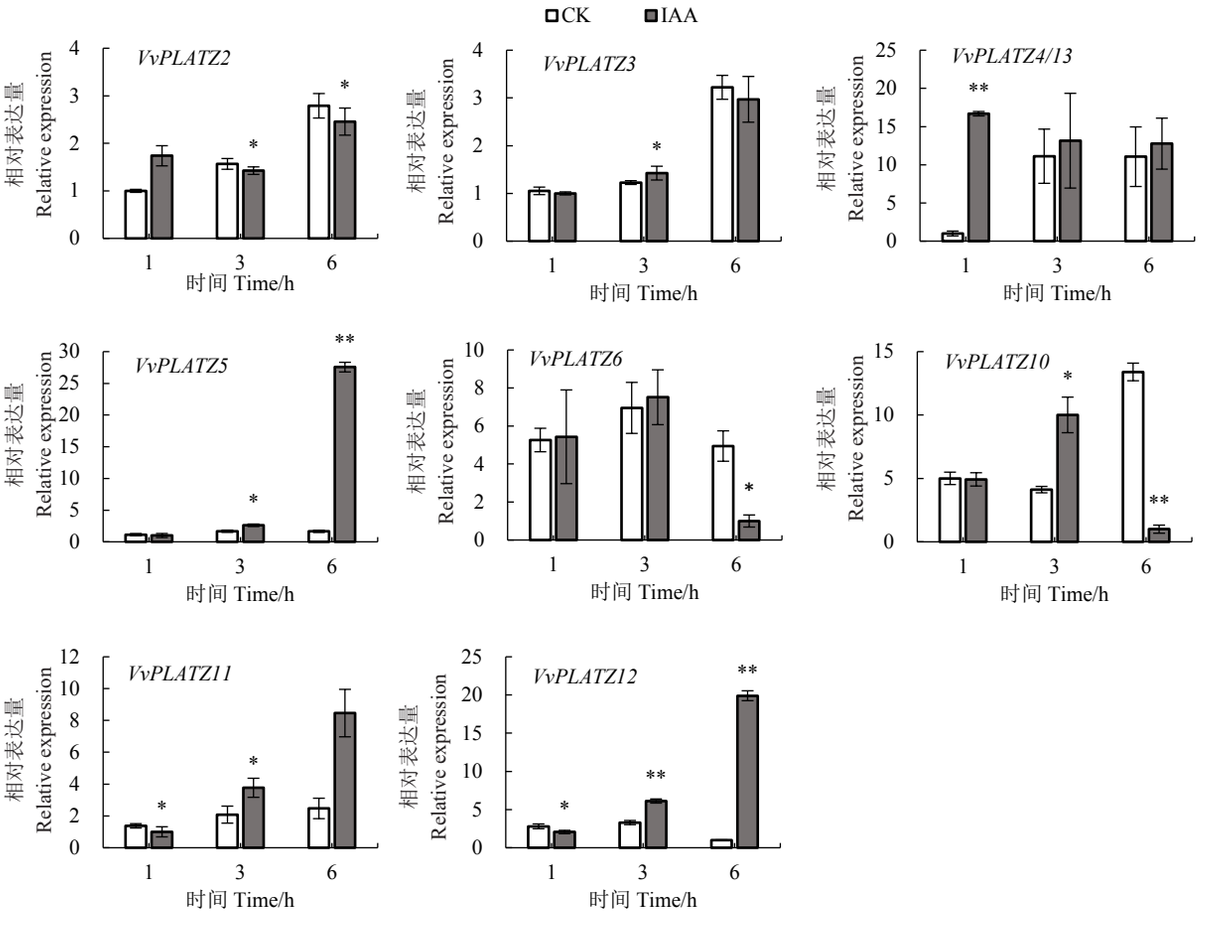
图 5　葡萄 *PLATZ* 家族基因在种子发育过程中的表达分析

Fig. 5　Expression patterns of grape *PLATZ* family genes during seed development

呈现的差异表达模式几乎涵盖整个发育时期，且差异变化倍数较大。*VvPLATZ4/13*、*VvPLATZ11* 和 *VvPLATZ12* 在无核品种种子发育前期（20、30 d）表达量均显著高于有核品种。以上qRT-PCR结果与转录组结果基本一致。

2.6 IAA处理后葡萄 *PLATZ* 家族基因表达模式分析

通过开展葡萄 *PLATZ* 家族基因在IAA处理下的表达模式分析（图6），发现8个 *VvPLATZs* 均响应IAA处理，*VvPLATZ4/13* 在IAA处理后1 h响应且表达水平显著大幅度上调，*VvPLATZ2*、*VvPLATZ6* 和 *VvPLATZ10* 在IAA处理后6 h表达水平显著下调，



星号代表 *t* 检验下数据差异显著（*α = 0.05, **α = 0.01）。

Asterisks indicate statistically significant differences by t-test (*α = 0.05, **α = 0.01).

图6 IAA处理后葡萄 *PLATZ* 家族基因在叶片中的qRT-PCR分析

Fig. 6 qRT-PCR analysis of grape *PLATZ* family genes in grape leaves treated with IAA

VvPLATZ5 和 *VvPLATZ12* 在IAA处理后3和6 h表达水平显著上调，且上调倍数较大。因此，推测 *VvPLATZ4/13*、*VvPLATZ5* 和 *VvPLATZ12* 基因可能在IAA信号调节途径中起重要作用。

3 讨 论

PLATZ 家族基因系统鉴定已在多种植物中开展，不同物种鉴定到的成员数各不相同。前人在拟南芥、水稻、小麦、番茄、油橄榄和芜青中分别鉴定出12、15、49、21、29和24个 *PLATZ* 基因[2,5,21]，笔者在葡萄全基因组中共鉴定出13个 *PLATZ* 家族基因，推测 *PLATZ* 家族基因在植物进化上具有多样性。系统进化树分析发现，6个物种的PLATZ蛋白分为5个亚族，而亚族E不包含任何葡萄PLATZ成员，表现出一定的进化缺失，其余亚族双子叶植物的PLATZ蛋白同源性更高，且VvPLATZ和SlPLATZ蛋白的亲缘关系更密切，推测 *PLATZ* 基因在两个物种分化前有共同的双子叶祖先。

在进化上，基因复制事件后重复基因之间存在的功能保守和功能分化基本上取决于3种进化命

运：缺失、亚功能化和新功能化[22]。共线性分析结果表明，葡萄PLATZ家族存在两组并联重复基因，无串联重复基因，这与Azim等[2]在芜青*PLATZ*基因家族的研究结果一致，表明并联重复事件在葡萄PLATZ家族成员扩增过程中起主要作用。并联重复基因*VvPLATZ5*-*VvPLATZ11*表现出结构和功能的保守性：结构上，这对并联重复基因均含5个外显子，蛋白保守基序分布保持一致，启动子顺式作用元件均仅含光响应元件GT1-motif且无胁迫相关的元件；功能上，并联重复基因*VvPLATZ5*~*VvPLATZ11*表达模式相似，均在无核品种种子发育过程中较有核品种显著高表达，且IAA处理后3 h均显著高表达。

*PLATZ*基因在胚乳发育等生物学过程中具有重要作用[3]。前人分别在玉米、棉花和水稻中发现*PLATZ*基因对胚乳发育、养分储存[9]、种子萌发[7]、种子成熟[10]等具有重要作用。笔者在本研究中发现*VvPLATZ2*和*VvPLATZ6*在有核葡萄种子发育过程中表达量显著高于无核葡萄，推测这些基因与种子发育有关，而*VvPLATZ5*在无核葡萄种子发育过程中表达量显著高于有核葡萄，且*VvPLATZ5*具有胚乳表达（GCN4_motif）和种子特异调控（RY-element）相关顺式作用元件，推测该基因与胚珠败育有关。目前鲜见果树PLATZ基因响应激素处理的研究报道，本研究发现大部分葡萄*PLATZ*基因响应IAA处理，且*VvPLATZ4/13*、*VvPLATZ5*及*VvPLATZ12*响应幅度可观，推测葡萄*PLATZ*家族基因可能通过影响IAA途径调控种子发育过程。本研究首次报道了葡萄*PLATZ*基因响应IAA处理，填补了此方面研究的空白。笔者在本研究中筛选出一些有核和无核葡萄种子发育差异表达基因，为后续无核分子育种提供基因资源，但这些候选基因的具体生物学功能及调控机制仍需要进一步研究。

4　结　论

在葡萄全基因组范围内共鉴定到13个*PLATZ*基因，通过生物信息学分析，将其分为4组，同组家族成员保守基序数目及类别具有保守性，基因结构分析表明除A组外葡萄*PLATZ*基因在进化上具有多样性。基因表达分析显示*PLATZ*基因在有核、无核葡萄种子发育不同时期表达模式存在差异且显著响应IAA处理，推测其在葡萄种子发育过程中发挥作用。本研究加深了对葡萄*PLATZ*基因的认知，为进一步开展葡萄*PLATZ*基因功能研究奠定了理论基础，有利于为葡萄无核分子育种提供优质基因资源。

参考文献 References:

[1] NAGANO Y，FURUHASHI H，INABA T，SASAKI Y. A novel class of plant-specific zinc-dependent DNA-binding protein that binds to A/T-rich DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research，2001，29(20)：4097-4105.

[2] AZIM J B，KHAN M F H，HASSAN L，ROBIN A H K. Genome-wide characterization and expression profiling of plant-specific platz transcription factor family genes in *Brassica rapa* L.[J]. Plant Breeding and Biotechnology，2020，8(1)：28-45.

[3] FU Y X，CHENG M P，LI M L，GUO X J，WU Y R，WANG J R. Identification and characterization of PLATZ transcription factors in wheat[J]. International Journal of Molecular Sciences，2020：21(23)：8934.

[4] WANG J C，JI C，LI Q，ZHOU Y，WU Y R. Genome-wide analysis of the plant-specific PLATZ proteins in maize and identification of their general role in interaction with RNA polymerase III complex[J]. BMC Plant Biology，2018，18(1)：221.

[5] 杨艺杰，聂永心 . 油橄榄 PLATZ 基因家族的鉴定及表达模式[J/OL]. 分子植物育种：1-10[2022-10-10]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210827.1019.002.html.
YANG Yijie，NIE Yongxin. Identification and expression pattern of PLATZ gene family in *Olea europaea*[J/OL]. Molecular Plant Breeding，1- 10[2022- 10- 10]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210827.1019.002.html.

[6] GONZÁLEZ-MORALES S I，CHÁVEZ-MONTES R A，HAYANO- KANASHIRO C，ALEJO- JACUINDE G，RICO- CAMBRON T Y，DE FOLTER S，HERRERA-ESTRELLA L. Regulatory network analysis reveals novel regulators of seed desiccation tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences，2016，113(35)：E5232-E5241.

[7] ZHANG S C，YANG R，HUO Y Q，LIU S S，YANG G D，HUANG J G，ZHENG C C，WU C G. Expression of cotton PLATZ1 in transgenic Arabidopsis reduces sensitivity to osmotic and salt stress for germination and seedling establishment associated with modification of the abscisic acid，gibberellin，and ethylene signalling pathways[J]. BMC Plant Biology，2018，18(1)：218.

[8] 王伟英，李海明，戴艺民，林江波 . 中国水仙 *NtPLATZ1* 正、反义植物表达载体构建及转化烟草的研究[J]. 园艺学报，2017，44(12)：2399-2407.
WANG Weiying，LI Haiming，DAI Yimin，LIN Jiangbo. Research on construction of sense and antisense plant expression vectors of *NtPLATZ1* gene in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and genetic transformation to tobacco plants[J]. Acta Horticulturae Sinica，2017，44(12)：2399-2407.

[9] LI Q，WANG J C，YE J W，ZHENG X X，XIANG X L，LI C S，

FU M M，WANG Q，ZHANG Z Y，WU Y R. The maize imprinted gene *Floury3* encodes a PLATZ protein required for tRNA and 5S rRNA transcription through interaction with RNA polymerase Ⅲ[J]. The Plant Cell，2017，29(10)：2661-2675.

[10] WANG A H，HOU Q Q，SI L Z，HUANG X H，LUO J H，LU D F，ZHU J J，SHANGGUAN Y Y，MIAO J S，XIE Y F，WANG Y C，ZHAO Q，FENG Q，ZHOU C C，LI Y，FAN D L，LU Y Q，TIAN Q L，WANG Z X，HAN B. The PLATZ transcription factor GL6 affects grain length and number in rice[J]. Plant Physiology，2019，180(4)：2077-2090.

[11] WANG L，AHMAD B，LIANG C，SHI X X，SUN R Y，ZHANG S L，DU G Q. Bioinformatics and expression analysis of histone modification genes in grapevine predict their involvement in seed development，powdery mildew resistance，and hormonal signaling[J]. BMC Plant Biology，2020，20(1)：412.

[12] AI G，ZHANG D D，HUANG R，ZHANG S Q，LI W F，AHIAKPA J K，ZHANG J H. Genome-wide identification and molecular characterization of the growth-regulating factors-interacting factor gene family in tomato[J]. Genes，2020，11(12)：1435.

[13] XU D，LU Z C，JIN K M，QIU W M，QIAO G R，HAN X J，ZHUO R Y. SPDE：A multi-functional software for sequence processing and data extraction[J]. Bioinformatics，2021：btab235.

[14] LEE T H，TANG H B，WANG X Y，PATERSON A H. PGDD：a database of gene and genome duplication in plants[J]. Nucleic Acids Research，2013，41(D1)：D1152-D1158.

[15] KRZYWINSKI M，SCHEIN J，BIROL I，CONNORS J，GASCOYNE R，HORSMAN D，JONES S J，MARRA M A. Circos：An information aesthetic for comparative genomics[J]. Genome Research，2009，19(9)：1639-1645.

[16] CHEN C J，CHEN H，ZHANG Y，THOMAS H R，FRANK M H，HE Y H，XIA R. TBtools：an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Molecular Plant，2020，13(8)：1194-1202.

[17] KUMAR S，STECHER G，LI M，KNYAZ C，TAMURA K. MEGA X：Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution，2018，35(6)：1547-1549.

[18] LESCOT M，DÉHAIS P，THIJS G，MARCHAL K，MOREAU Y，VAN DE PEER Y，ROUZÉ P，ROMBAUTS S. PlantCARE，a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research，2002，30(1)：325-327.

[19] WANG L，HU X Y，JIAO C，LI Z，FEI Z J，YAN X X，LIU C H，WANG Y J，WANG X P. Transcriptome analyses of seed development in grape hybrids reveals a possible mechanism influencing seed size[J]. BMC Genomics，2016，17(1)：898.

[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] HE X H，LIU M J，FANG Z W，MA D F，ZHOU Y L，YIN J L. Genome-wide analysis of a plant AT-rich sequence and zinc-binding protein (PLATZ) in *Triticum aestivum*[J]. Phyton，2021，90(3)：971-986.

[22] AIROLDI C A，DAVIES B. Gene duplication and the evolution of plant MADS-box transcription factors[J]. Journal of Genetics and Genomics，2012，39(4)：157-165.