

王垒, 姜丽娜, 闫立英, 等. 黄瓜果实发育早期 Aux/IAA 家族部分基因的差异表达分析 [J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(4): 13-17

黄瓜果实发育早期 Aux/IAA 家族部分基因的差异表达分析

王垒¹, 姜丽娜¹, 闫立英², 姜群峰¹, 陈劲枫^{1*}

(1. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/园艺学院, 江苏 南京 210095;

2. 河北科技师范学院园艺园林系, 河北 昌黎 066600)

摘要: 用生物信息学方法获得 28 个黄瓜 Aux/IAA 家族基因, 选取具有 Aux/IAA 蛋白典型特征及与单性结实基因 *SlIAA9* 亲缘关系最近的 6 个基因 (*Csa020459*、*Csa006680*、*Csa003118*、*Csa016715*、*Csa018571* 和 *Csa012115*), 并以单性结实和非单性结实自交系 6401 和 6429 为试材, 对这 6 个基因设计特异引物, 在黄瓜果实的 cDNA 中进行测序验证, 同时利用半定量 RT-PCR 技术在开花当天和花后第 2 和 4 天的 6401、6429 及授粉的 6429 果实中进行表达分析。结果显示: 有 5 个基因可以检测到表达情况, 其中 *Csa016715* 在未授粉的 6429 果实发育过程中表达丰度较低, 而在 6401 和授粉的 6429 果实中高水平表达。

关键词: 黄瓜; 单性结实; Aux/IAA; 表达分析; 果实发育

中图分类号: S642.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-2030(2011)04-0013-05

A differential expression analysis of some Aux/IAA family genes in cucumber fruit during the early development

WANG Lei¹, LOU Li-na¹, YAN Li-ying², LOU Qun-feng¹, CHEN Jin-feng^{1*}

(1. State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Department of Horticulture and Gardening, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600, China)

Abstract: Twenty-eight Aux/IAA family genes from cucumber genome database were identified based on bioinformatics, and six genes such as *Csa020459*, *Csa006680*, *Csa003118*, *Csa016715*, *Csa018571* and *Csa012115* were selected because of their typical characteristics of Aux/IAA protein and homology relationships with gene *SlIAA9* that could cause parthenocarpy. The specific primers were designed according to sequences of six genes and confirmed based on sequencing in the fruit's cDNA. The expression patterns of these genes were analyzed by semi-quantitative RT-PCR in the fruits of parthenocarpy inbred lines 6401, non-parthenocarpic inbred lines 6429 and 6429 with pollination during the early development. The results showed that the transcripts of five genes were detected in the fruits, and the expression levels of *Csa016715* were higher in the fruits of 6401 and 6429 with pollination than 6429 without pollination.

Key words: cucumber; parthenocarpy; Aux/IAA; expression analysis; fruit development

单性结实是指子房不经过授粉或别的刺激而发育成果实现象^[1]。单性结实性是保护地黄瓜专用新品种选育的主要目标性状之一。在低温、弱光和无虫媒的设施栽培条件下, 强单性结实品种无需采用植物生长调节剂蘸花即能座果结实, 对克服黄瓜“化瓜”、降低生产成本、实现高产稳产具有重要意义。

Gustafson^[2]最早提出天然单性结实的生长素学说, 这一学说认为能单性结实的植物在蕾期子房中含有较高浓度的生长素, 刺激子房发育成为果实。Kim 等^[3]发现, 天然单性结实黄瓜开花当天子房的生长素含量是非单性结实的 2 倍, 说明黄瓜天然单性结实与子房中的高含量 IAA 有关。曹础生等^[4]研究表明, 黄瓜单性结实品种花前 2 d 和花后 4 d 子房(幼果)中 IAA 含量显著高于非单性结实品种, IAA 与单果重呈显著正相关。生长素被认为是调控子房发育形成果实的最主要激素^[5]。

生长素的转录调控受 Aux/IAA(Auxin/indole-3-acetic acid)蛋白和转录因子 ARF(Auxin response factor)家族的影响^[6-7], Aux/IAA 能和 ARFs 形成杂合二聚体, 在生长素的作用下, Aux/IAA 被降解, 从而启动生长素信号途径, 启动果实发育。将番茄中的 *IAA9* 基因反义抑制后, 植株获得了单性结实特性^[8]。迄今为止在黄瓜中已经分离了 3 个 Aux/IAA 家族基因用于研究其对幼苗发育和胚轴形成所起的作用^[9-10]。关于 Aux/IAA 家族在黄瓜果实发育中所起作用的研究尚未见报道。本研究拟从 Aux/IAA 家族基因在黄

收稿日期: 2010-08-03

基金项目: 国家 973 计划项目(2009CB119001-01); 国家自然科学基金项目(30830079)

作者简介: 王垒, 硕士研究生。* 通讯作者: 陈劲枫, 教授, 主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn。

瓜果实发育中的表达特点为出发点,试图探讨黄瓜单性结实形成的分子机制,从而为黄瓜单性结实品种的选育及果实品质的改良提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以南京农业大学黄瓜课题组选育的强单性结实自交系 6401 和非单性结实的自交系 6429 为材料,于 2009 年秋季将黄瓜定植在南京农业大学江浦园艺农场,对次日将开的花做夹花处理,其中对 6429 做授粉与不授粉处理。开花当天和花后第 2 和 4 天取花,样品经液氮处理并于 -70 ℃ 保存备用。

1.2 总 RNA 提取及反转录

按改良 CTAB 法提取 RNA,并参照 TaKaRa 公司的 DNase I 试剂盒说明书消除微量 DNA 污染。参照 全式金公司反转录试剂盒说明书进行反转录反应。

1.3 Aux/IAA 家族成员确认和 PCR 引物设计

根据 GenBank 上登录的黄瓜 CSIAA1 的氨基酸序列以及 <http://datf.cbi.pku.edu.cn/browsefamily.php?familyname=Aux-IAA> 和 <http://drf.cbi.pku.edu.cn/familyview.php?fn=Aux/IAA> 2 个网站上登录的拟南芥和水稻 Aux/IAA 家族蛋白的氨基酸序列,分别检索黄瓜基因组数据库(<http://cucumber.genomics.org.cn/page/cucumber/index.jsp>),经过序列分析去除冗余序列,共得到 28 个黄瓜 Aux/IAA 家族基因,选取与 GenBank 上已经登录的番茄单性结实基因 *SlIAA9* (登录号: AJ937282.1) 的亲缘关系较近且结构域完整的 6 个基因: *Csa018571*、*Csa012115*、*Csa016715*、*Csa006680*、*Csa003118*、*Csa020459*,用 Primer Premier 5.0 设计特异引物(表 1),引物委托上海英杰生命技术有限公司合成。

1.4 PCR 反应体系和扩增程序

PCR 反应体系总体积为 20 μL: 10 × PCR Buffer(2.0 μL)、dNTP mix(1.5 μL)、10 mmol·L⁻¹ Forward Primer(1 μL)、10 mmol·L⁻¹ Reverse Primer(1 μL)、0.2 μL *Taq* 酶、2.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂(2 μL)、1 μL cDNA 模板,无菌去离子水(补足到 20 μL)。PCR 反应扩增程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s,退火温度见表 1,退火 30 s,最后 72 ℃ 延伸 7 min。为防止扩增达到平台期,分别进行了 27、29、31、33、35 和 37 个循环的扩增,最后采用 31 个循环的检测结果,重复 3 次。以黄瓜肌动蛋白 Actin(AB010922) 为内标,即 5′-TGACGCAGATAATGTTTGAGA-3′ 和 5′-AGAGATGGCTGGAATAGAACT-3′。PCR 扩增平台期的确定是半定量 PCR 成功的关键,对内参 *actin* 分别进行 22、25、28、31、34 个循环的扩增,最后选择 28 个循环。

1.5 PCR 产物回收、阳性克隆筛选及测序

分别对 6401 和 6429 的 cDNA PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的片段。将其与 pMD19-T 载体在 16 ℃ 下连接过夜。连接产物转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中,经 Amp 抗性筛选和菌落 PCR 筛选,取阳性克隆送上海英骏生物技术公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 序列分析

以 DNAMAN 6.0 软件对 6 个黄瓜 Aux/IAA 家族基因及番茄、拟南芥和烟草 *IAA9* 基因的氨基酸序列进行多重比对分析(图 1)。所选的 6 个基因具有 Aux/IAA 蛋白典型的 4 个保守结构域,以及 2 个核定位信号(nuclear localization signal,NLS)、1 个 β 折叠与 2 个 α 螺旋(α1 与 α2) 基序(βαα 基序),作为 DNA 的结合结构域,Aux/IAA 蛋白中的 1 个 β 折叠与 2 个 α 螺旋构成的 βαα 基序在 Aux/IAA 蛋白的二聚化中发挥重要作用。

表 1 半定量 RT-PCR 分析所用引物
Table 1 Primers in RT-PCR method

基因 Gene	引物 Primer(5′→3′)	退火温度/℃ Annealing temperature	产物大小/bp Product size
<i>Csa003118</i>	GAAACGCCAACGACTATCT TTCGCTCTTGCTCTGCTT	53.0	163
<i>Csa012115</i>	TGTGAGCCAAGGGAAGTT AGCAGGAGCATTGTTGTG	52.5	187
<i>Csa016715</i>	AGAAGATGGGATTTGAAGAG GATCAGCGGTGAGGACAG	53.5	249
<i>Csa020459</i>	GCGACTGTTGCAGTTTAA CTCCGTCCTCATCCTCA	53.0	112
<i>Csa006680</i>	ACTTCACCCGACGATCAAT GCATTTGGAGGTATCAGAGTT	54.0	126
<i>Csa018571</i>	AATCTGATGGAACAACCC AGAAGAGCTACGCAGCCAAT	54.0	113

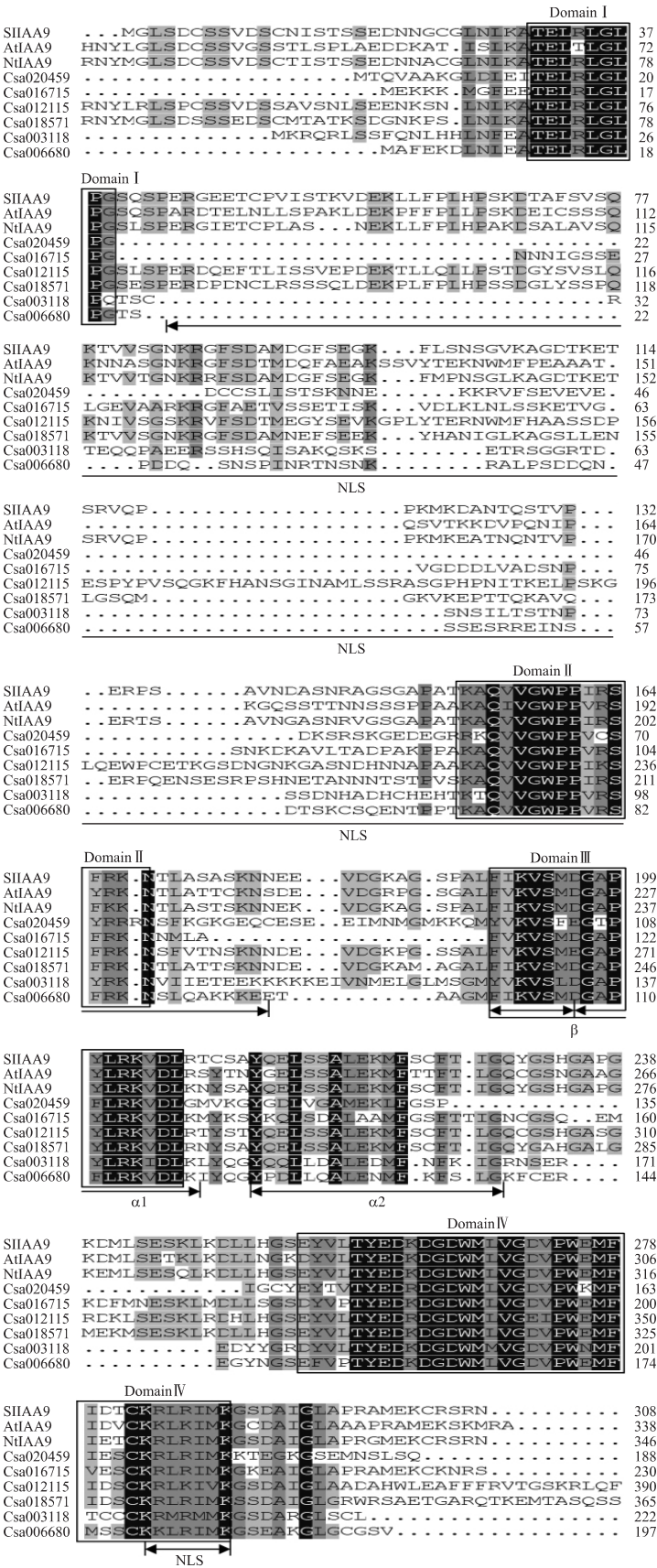


图 1 Aux/IAA 家族基因的氨基酸序列对比

Fig.1 Multiple alignment of amino acid sequences of Aux/IAA family proteins

4 个保守域(I ~ IV) 以黑方框表示,2 个核定位信号及 $\beta\alpha$ 基序用双向箭头表示,图中黑色阴影部分为保守序列,灰色显示相似性在 50% ~ 99% 的残基。Conserved domains I to IV among Aux/IAA genes are shown in black boxes,two NLSs and one $\beta\alpha$ motif are showed by bidirectional arrows,and conserved residues are shaded in black,gray shading indicates similar residues between 50% ~ 99% .

以分子进化遗传分析软件 MEGA4.0 根据邻接法(neighbor-joining method) 构建系统发育树,并用 Bootstrapping(1 000 重复) 来评估支持程度。*Csa018571* 与 *SlIAA9* 最先聚类在一起,其次为 *Csa012115*,结果见图 2。NCBI 比对结果表明, *Csa018571* 与 番 茄 *SlIAA9*、烟 草 *NtIAA9* (AJ417876. 1) 及拟南芥 *AtIAA9*(U18411. 1) 核苷酸的同源性分别是 80%、80% 和 50%,也是黄瓜 28 个 Aux/IAA 家族基因中与 *SlIAA9* 亲缘关系最近的 1 个基因。

2.2 cDNA 克隆

由于 *Csa020459* 与 GenBank 上已经登录的黄瓜 *CsIAA1* 的同源性达到 100%,我们认为是同一基因,其引物依据 *CsIAA1* 的 cDNA 序列设计而来,所以没有对其进行回收测序。用同一引物对 6401 和 6429 果实的 cDNA 分别扩增并回收目的片段进行测序,测序结果与黄瓜基因组数据库中公布的基因序列吻合,且这 5 个基因的扩增产物在 6401 和 6429 的 cDNA 序列上没有差异。5 个基因片段的 GenBank 登录号分别为: HQ285891 (*Csa003118*)、HQ285892 (*Csa016715*)、HQ285893 (*Csa012115*)、HQ285894 (*Csa006680*)、HQ285895(*Csa018571*)。

2.3 RT-PCR 验证

半定量 RT-PCR 分析结果显示: *Csa020459* 基因在发育初期的 6401 和授粉与未授粉 6429 的果实中都检测不到; *Csa006680* 和 *Csa003118* 及 *Csa018571* 这 3 个基因在这 2 个材料发育初期的果实中都表达,且表达丰度较高。在 6401 和授粉及未授粉处理的 6429 果实中没有检测出显著的表达差异; *Csa012115* 在 6401 开花的当天检测不到表达情况,在花后第 2 和 4 天检测到表达,在 6429 的开花当天和花后第 2、4 天都有表达,且在 6429 授粉的果实中表达水平较高; *Csa016715* 基因在 6401 的开花当天和花后第 2、4 天果实中表达丰度都很高,在第 2 和 4 天的表达水平高于开花当天。 *Csa016715* 在 6429 授粉的第 2 和 4 天果实中表达丰度很高,而在未授粉的 6429 的第 2 和 4 天果实中微量表达,推测这个基因的表达可能与黄瓜果实的膨大相关。

3 讨论

单性结实性是保护地黄瓜专用新品种选育的主要目标性状之一,而生长素是引起黄瓜单性结实的最重要激素,番茄生长素信号传导途径中 *IAA9* 的负调控在授粉之前便可启动果实发育,从而产生单性结实^[8]。2009 年底由中国农业科学院主持的黄瓜基因组测序计划完成^[1],这为黄瓜作物的基因克隆提供了很大便利。

本试验通过生物信息学方法在黄瓜基因组数据库中检索到 28 个 Aux/IAA 家族基因,本研究所选 6 个基因中有 5 个在黄瓜中尚未被分离出。 *Csa020459* 表现出组织表达特异性,即在果实中未检测到表达,而在黄瓜幼苗中受生长素诱导表达^[8]。 *Csa012115* 基因在 6401 开花当天表达甚微,几乎检测不到,而在花后第 2 和 4 天表达较高; 在 6429 开花当天和花后第 2、4 天都有表达,在授粉处理的果实中 mRNA 表达水平比较高,这个基因的表达可能受材料的影响及发育信号的调控,授粉可能对其表达有诱导作用。 *Csa006680* 和 *Csa003118* 表达特点相似,即在 2 个材料的果实中没有检测出表达差异。 *Csa018571* 是黄瓜 Aux/IAA 家族基因中与番茄单性结实基因 *SlIAA9* 亲缘关系最近的 1 个基因,但这个基因的表达在 2 个材

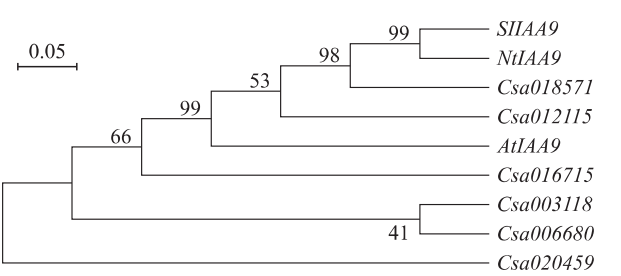


图 2 Aux/IAA 家族部分基因进化树分析
Fig.2 Phylogenetic tree analysis of Aux/IAA family genes

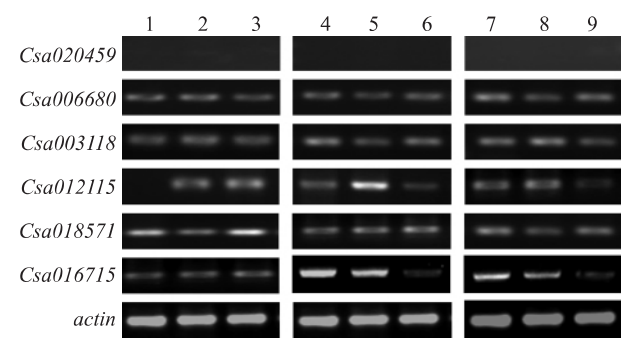


图 3 黄瓜果实中 6 个 Aux/IAA 家族基因的 RT-PCR 分析
Fig.3 RT-PCR analysis of six Aux/IAA family genes in cucumber fruits

1、4、7 表示 6401 花后第 0、2 和 4 天的果实; 2、5、8 表示授粉的 6429 花后第 0、2 和 4 天的果实; 3、6、9 表示未授粉的 6429 花后第 0、2 和 4 天的果实。 1,4,7 indicate fruits of 6401 during 0,2,4 days; 2,5,8 indicate fruits of 6429 with pollination during 0,2,4 days; 3,6,9 indicate fruits of 6429 without pollination during 0,2,4 days.

料中没有差异,表现出了与 *Csa006680* 和 *Csa003118* 一样的表达特点。*Csa016715* 基因在 2 个材料开花的当天没有检测出 mRNA 积累水平的差异,但在第 2 和 4 天的 6401 和授粉的 6429 中都表达水平较高,而在未授粉的 6429 果实中表达水平较低,很可能与黄瓜果实的发育及单性结实形成有关。下一步将通过转基因手段在 6429 中进行功能分析,直接证明其在果实发育中所起的作用,以期为黄瓜单性结实品种的选育及果实品质的改良提供理论基础。

参考文献:

- [1] Gustafson F G. Parthenocarpy; natural and artificial [J]. The Botanical Review, 1942, 8: 598 – 654
- [2] Gustafson F G. The cause of natural parthenocarpy [J]. American Journal of Botany, 1939, 26: 135 – 138
- [3] Kim I S, Okubo H, Fujieda K. Endogenous levels of IAA in relation to parthenocarpy in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 1992, 52: 1 – 8
- [4] 曹础生, 缪昱琨, 陈学好, 等. 黄瓜子房(幼果)中内源激素含量和过氧化物酶活性变化及其与单性结果的关系 [J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(5): 347 – 349
- [5] Pandolfini T, Molesini B, Spena A. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation [J]. Trends in Plant Science, 2007, 12(8): 327 – 329
- [6] Dharmasiri N, Estelle M. Auxin signaling and regulated protein degradation [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9(6): 302 – 308
- [7] Leyser O. Dynamic integration of auxin transport and signalling [J]. Current Biology, 2006, 16(11): R424 – R433
- [8] Wang Hua, Jones B, Li Zhengguo, et al. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis [J]. Plant Cell, 2005, 17: 2676 – 2692
- [9] Fujii N, Kamada M, Yamasaki S, et al. Differential accumulation of Aux/IAA mRNA during seedling development and gravity response in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(5): 731 – 740
- [10] Shimizu M, Miyazawa Y, Fujii N, et al. p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response for gravity-regulated peg formation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings [J]. Journal of Plant Research, 2008, 121(1): 107 – 114
- [11] Huang Sanwen, Li Ruiqiang, Zhang Zhonghua, et al. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. Nature Genetics, 2009, 41: 1275 – 1281

责任编辑: 范雪梅