



葡萄 Fe-S 簇装配基因的鉴定、克隆和表达特征分析

张璐^{1,2}, 宗亚奇^{1,2}, 徐维华², 韩蕾¹, 孙湏育^{1,2}, 陈朝晖³, 陈松利³, 张凯¹, 程杰山¹, 唐美玲^{1,2,3}✉, 张洪霞¹, 宋志忠¹✉

¹鲁东大学农林工程研究院/山东省高等学校重点实验室-作物高产抗逆分子模块育种实验室, 山东烟台 264025; ²烟台农业科学研究院葡萄研究所, 山东烟台 264000; ³招远市大戶庄园农林专业合作社, 山东烟台 264000

摘要:【目的】从葡萄中克隆并鉴定 Fe-S 簇装配基因, 在转录水平探索其组织特异性表达特征及其对缺铁胁迫的响应, 明确主效基因。【方法】通过同源克隆法, 在葡萄基因组中筛选并鉴定参与 Fe-S 簇装配的基因; 借助生物信息学软件分析葡萄 Fe-S 簇装配相关基因及其编码蛋白的详细特征; 利用实时荧光定量 PCR 分析 Fe-S 簇装配相关基因在葡萄不同组织部位的表达模式及其对缺铁胁迫的响应情况; 利用 MEGA 7.0 软件建立不同植物 ISU1 同源蛋白的系统进化树。【结果】在葡萄基因组中检索并克隆获得 46 个 Fe-S 簇装配基因, 分布于 16 条染色体上, 含有 1—21 个长度不一的内含子, 且主要分布于质体、线粒体和细胞质, 分别含有 14、21 和 11 个基因成员; 葡萄 Fe-S 簇装配蛋白在多种亚细胞结构中均有定位, 且不同装配机制中蛋白的亚细胞定位情况差异很大; 所选 10 种植物 ISU1 蛋白序列的一致性高达 77%, 系统发育树分析表明同一属的 ISU1 同源蛋白如十字花科的拟南芥和盐芥、禾本科的水稻和短柄草、蔷薇科的桃和苹果, 倾向于紧密聚在一起, 但葡萄 ISU1 和番茄 ISU1 紧密聚集在一起; 葡萄 Fe-S 簇装配基因在 3 年生‘马瑟兰’成年树体和组培幼苗不同组织中的表达水平差异较大, 其中, *ISU1* 整体水平的表达量最为丰富(尤其是成熟果实中的表达量最高), 其次是 *HSCA1*、*ISA2*、*NFU2*、*SUFA* 和 *SUFB* 等基因, 而 *SUFE2*、*NFS1*、*HSCA2*、*HSCA6*、*TAH18* 和 *CIA2* 在本研究所有葡萄组织中均未检测到表达量; 在‘马瑟兰’幼苗中, 葡萄 Fe-S 簇装配基因对缺铁处理较为敏感, 所有基因至少在 1 个检测的组织部位对缺铁处理有响应, 其中, 22 个基因的表达水平在所有检测组织中均受缺铁处理调控: 根部 Fe-S 簇装配基因的表达水平易受缺铁胁迫诱导而上调, 但地上部(茎和叶) Fe-S 簇装配基因的表达水平易受缺铁胁迫抑制而下调。【结论】从葡萄中克隆并鉴定了 46 个 Fe-S 簇装配基因, 分别定位于质体、线粒体和细胞质; 葡萄 Fe-S 簇装配基因在三年生成年树体和组培幼苗不同组织中的表达水平差异较大, 且在葡萄幼苗不同组织中的转录水平对缺铁胁迫的响应具有显著差异; *ISU1* 在葡萄所有组织中的整体表达量较高; 葡萄 ISU1 和番茄 ISU1 同源蛋白遗传进化距离最接近。

关键词: 葡萄; 铁代谢; 缺铁; Fe-S 簇; 装配机制; 基因克隆及表达

Identification, Cloning, and Expression Characteristics Analysis of Fe-S Cluster Assembly Genes in Grape

ZHANG Lu^{1,2}, ZONG YaQi^{1,2}, XU WeiHua², HAN Lei¹, SUN ZhenYu^{1,2}, CHEN ZhaoHui³, CHEN SongLi³, ZHANG Kai¹, CHENG JieShan¹, TANG MeiLing^{1,2,3}✉, ZHANG HongXia¹, SONG ZhiZhong¹✉

¹The Engineering Research Institute of Agriculture and Forestry, Ludong University/Key Laboratory of Molecular Module-Based Breeding of High Yield and Abiotic Resistant Plants in Universities of Shandong, Yantai 264025, Shandong; ²Institute of Grape, Yantai Academy of Agricultural Science, Yantai 264000, Shandong; ³Zhaoyuan Dahu Manor Agriculture and Forestry Professional Cooperative, Yantai 264000, Shandong

收稿日期: 2021-02-08; 接受日期: 2021-05-05

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-29-16)、山东省农业良种工程基金(2019LZGC009-2)、烟台市科技计划(2020XCZX036, 2018XSCC043)、国家重点研发计划(2019YFD1000500)、烟台市葡萄与葡萄酒局专项资金(50012305073)

联系方式: 张璐, Tel: 0535-6352051; E-mail: 1169464953@qq.com. 通信作者宋志忠, Tel: 0535-6664662; E-mail: szhzh2000@163.com. 通信作者唐美玲, Tel: 0535-6664662; E-mail: tmling1999@163.com

Abstract: 【Objective】 The aim of this study was to isolate and characterize grape Fe-S cluster assembly genes. The tissue-specific expression characteristics and differential response to iron depletion at the transcriptional level were analyzed to screen the dominant and candidate Fe-S cluster assembly genes in grape. **【Method】** The Fe-S cluster assembly genes were screened and identified in grape genome by homologous cloning. The detailed characteristics of Fe-S cluster assembly genes and their encoded proteins in grape were analyzed by using a variety of bioinformatics software. The expression patterns of Fe-S cluster assembly genes in different tissues of grape and their corresponding responses to iron deficiency stress were analyzed by using real-time fluorescent quantitative PCR. The phylogenetic trees of ISU1 homologous proteins from different plants were established by using MEGA 7.0 software. **【Result】** In total, 46 Fe-S cluster assembly genes were retrieved and cloned from grape, which were located on a total of 16 chromosomes, containing 1-21 introns with different lengths. Grape Fe-S cluster assembly genes were mainly distributed in plastid, mitochondrion and cytosol, containing 14, 21 and 11 genes, respectively. Grape Fe-S cluster assembly proteins were found with a variety of subcellular structures. Moreover, the subcellular localization of Fe-S cluster assembly proteins with different assembly mechanisms was quite distinct. The sequence identity of ISU1 homologous proteins from 10 plant species was as high as 77%. Phylogenetic tree analysis indicated that ISU1 members belonging to the same genus, such as *Arabidopsis* and the *Ilungia* of *Cruciferae*, rice and *Brachypodium* of *Gramineae*, and peach and apple of *Rosaceae*, were tended to be closely clustered together, while grape ISU1 was closely clustered with tomato ISU1. The expression levels of Fe-S cluster assembly genes were different among different tissues of 3-year-old adult tree and tissue culture seedling of Marselan grape, and the differences were significant. In particular, the expression level of *ISU1* gene was the most abundant (especially in the mature fruit), followed by *HSAC1*, *ISA2*, *NFU2*, *SUFA* and *SUFB*, while the expression levels of *SUFE2*, *NFS1*, *HSCA2*, *HSCA6*, *TAH18* and *CIA2* were not detected in tested tissues of grape. Grape Fe-S cluster assembly genes were more sensitive to iron deficiency treatment, and all genes responded to iron deficiency treatment in at least one detected tissue sample. Notably, the expression level of 22 Fe-S cluster assembly genes were significantly regulated by iron deficiency in all tested tissues, and the expression levels in roots were likely to be up-regulated by iron deficiency, while the expression levels in shoots (stems and leaves) were prone to be down-regulated. **【Conclusion】** 46 Fe-S cluster assembly genes were cloned and identified in grape, which were located in plastid, mitochondrion and cytosol, respectively. The expression levels of Fe-S cluster assembly genes were significantly distinct among different tissues of 3-year-old adult tree and tissue culture seedlings, while the transcription levels in different seedlings tissues were significantly different in response to iron deficiency. The overall expression level of *ISU1* gene was the highest in all tested tissues of grape. The genetic evolution distance between grape and tomato ISU1 homologous proteins was the closest.

Key words: grape; iron metabolism; iron depletion; Fe-S cluster; assembly mechanism; gene cloning and expression

0 引言

【研究意义】 铁是植物正常生命活动所必需的微量矿质元素^[1-2], 是细胞色素、铁硫 (Fe-S) 蛋白的组成成分^[3], 与植物生长发育、花的形成和果实品质与产量密切相关, 缺铁严重影响植物生长, 降低果实产量和品质^[4-7]。Fe-S 簇是 Fe-S 蛋白的活性部位, 虽然其组成元素和结构都较为简单, 但是 Fe-S 簇的组装是需多种组装蛋白参与的有序进行的催化反应, 是活细胞中一个高度复杂和协调的过程^[8-11]。由此可见, Fe-S 簇装配机制是植物铁素营养和铁代谢的核心环节, 在植物的生命过程中具有至关重要的作用。鉴定和克隆果树 Fe-S 簇装配基因为研究果树 Fe-S 簇装配机制提供参考, 并为解析果树铁素营养和代谢奠定理论基础。**【前人研究进展】** 在植物中, Fe-S 蛋白在呼吸、光合、硫和氮同化、氨基酸和嘌呤代谢、植物激素和辅酶合成, DNA 修复和翻译等过程中发挥重要作用

用^[8-10], 大多数代谢途径和细胞过程发生在亚细胞部位, 并依赖于 Fe-S 蛋白^[3,12]。研究表明 Fe-S 蛋白存在于质体、线粒体、细胞质和细胞核中, 对许多生理和代谢过程必不可少, 例如, 硝酸还原酶 (nitrite reductase, NIR) 在叶绿体中氮的同化过程至关重要, 乌头酸酶 (aconitase, ACO) 和琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDH) 是参与线粒体糖代谢柠檬酸循环的关键酶^[9]。特别地, Fe-S 簇是 Fe-S 蛋白的辅因子, 在光合作用、呼吸和 DNA 修复中起着不可或缺的作用^[11,13-15]。植物中, 一个高度保守的 Fe-S 簇装配过程包括在组装支架上形成 Fe-S 簇, 并转移到目标载体蛋白上, 涉及硫供体 (*NFS*)、铁供体、支架 (*SUFB*、*SUFC*、*SUFD*、*NFU* 等) 以及转运蛋白 (*ISA*、*GRX*、*HSCA*) 等 40 多个编码基因^[9,12], 其中, 模式植物拟南芥中 Fe-S 簇装配机制的研究最为深入和透彻, 目前已经确定了 3 种 Fe-S 簇装配机制, 即质体中存在 *SUF* (sulfur mobilization) 装配机制^[16], 线粒体中采用 *ISC*

(iron-sulfur cluster) 装配机制^[16], 这两种机制均以独立的方式运行, 而细胞质中的 Fe-S 簇组装是新出现的一种依赖于线粒体的 CIA (cytosolic iron-sulfur cluster assembly) 装配机制^[16]。在这 3 种机制中, Fe-S 簇的装配过程均可分为两个阶段: 第一阶段, 即 S 和 Fe 结合在支架蛋白上, 第二阶段, 将 Fe-S 簇转移到靶蛋白。其中, 第二阶段可能涉及具有特殊功能的不同的载体蛋白^[9-16]。【本研究切入点】近年来, 国内外对植物 Fe-S 簇装配分子机制的研究主要集中在一年生植物, 包括拟南芥^[12]、水稻^[17]和大豆^[18]等, 果树学中研究较少, 仅在桃^[19-20]中有报道, 葡萄中 Fe-S 簇装配机制及其分子基础依然未知。【拟解决的关键问题】本研究以‘马瑟兰’葡萄为材料, 克隆葡萄 Fe-S 簇装配机制相关基因并鉴定其生物信息学特征, 明确其在葡萄不同组织部位的表达特征, 为研究葡萄 Fe-S 簇装配和果树铁素营养与代谢的分子机制提供基因资源和理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于 2019 年 6 月至 2020 年 12 月在鲁东大学农林工程研究院和“十三五”山东省高等学校重点实验室——作物高产抗逆分子模块育种实验室进行。

1.2 试验材料 with 处理

供试材料为烟台地区主栽酿酒葡萄品种‘马瑟兰’, 由山东省烟台市农业科学研究院果树所提供, 种植在招远市大户庄园农林专业合作社试验基地, 树体健壮, 南北行向, 常规田间管理。分别于特定日期采集‘马瑟兰’的果实, 包括幼果期 (2019 年 6 月 30 日)、硬核期 (7 月 15 日)、膨大期 (8 月 3 日)、转色期 (8 月 17 日) 和成熟期 (9 月 15 日), 以及葡萄幼叶 (6 月 30 日) 和老叶 (9 月 15 日), 样品采集后立即液氮冷冻并保存于 -80℃ 低温冰箱中备用。

胁迫试验供试材料为山东省烟台市农业科学研究院果树所提供的‘马瑟兰’组培脱毒幼苗。自 2019 年 11 月起, 进行‘马瑟兰’组培脱毒苗的接种培养, 所用培养基为 1/2 MS 固体培养基。组培室环境温度为 25℃, 湿度 70%, 光照 3 000 lx。接种后的幼苗于一个月左右生根, 继而长叶。培养近两个月即可将培养瓶放置于普通室内环境中, 逐渐开盖进行 3 d 炼苗处理, 早晚喷洒去离子水。幼苗生长状况良好的情况下, 置于蛭石珍珠岩基质中, 用正常 MS 培养液作为对照处理, 用不含铁离子的 MS 培养液进行缺铁胁迫处理,

早晚浇营养液, 处理 96 h 后, 分别采集处理幼苗的根部、茎部和叶部材料, 立即液氮冷冻并保存于 -80℃ 冰箱中备用。

1.3 葡萄 Fe-S 簇装配基因克隆

以拟南芥中 43 个 Fe-S 簇装配基因的氨基酸序列为参考序列, 在 Phytozome Grape Genome Database (<http://www.phytozome.net>) 中检索葡萄基因组中相对应的 Fe-S 簇装配基因, 以与参考序列比对的覆盖面积 > 90% 且同源性 > 75% 为筛选参数。检索结果在 Pfam (<http://pfam.xfam.org/search>) 在线服务器预测功能结构域。根据 Phytozome 获得的葡萄 Fe-S 簇装配基因的 CDS (coding sequence) 电子序列, 分别设计上、下游引物 (表 1), 利用 Prime STARTM HS DNA 聚合酶 (TaKaRa, 大连) 从‘马瑟兰’整株组培苗中扩增目的基因, 送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序验证。

1.4 葡萄 Fe-S 簇装配基因的生物信息学分析

参考 LIANG 等^[17]和 SONG 等^[20]的报道, 在 Phytozome 葡萄基因组数据库中获得 Fe-S 簇装配基因的 CDS 编码区序列及基因组 DNA 序列和编码氨基酸序列, 然后通过 Gene Structure Display (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) 在线服务器进行基因结构分析; 利用 WoLF PSORT 在线服务器 (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 预测葡萄 Fe-S 簇装配基因的亚细胞定位; 参考 SONG 等^[20]报道, 在 Phytozome 基因组中下载拟南芥 AtISU1 (At4g22220)、水稻 OsISU1 (Os01g47340)、大豆 GmISU1 (Glyma05g02260.1)、短柄草 BdISU1 (Bra020855)、番茄 SlISU1 (Solyc03g112900)、柑橘 CsISU1 (orange1.1g030644m)、苹果 MdISU1 (MDP0000778166) 和桃 PeISU1 (ppa012356m), 根据王壮伟等^[21]描述, 利用分子进化遗传分析软件 MEGA 7.0 中的邻接法 (Neighbor-joining) 构建不同植物 ISU1 蛋白的系统进化树。

1.5 总 RNA 提取与实时荧光定量 PCR 分析

采集田间葡萄树体不同发育时期的果实和叶片, 通过 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (DP441) (TIANGEN, 北京) 提取葡萄样品的总 RNA, 并利用 Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (去基因组) 100rxn (TIANGEN, 北京) 合成第一链 cDNA 作为模板, 采用 Perfect Start Green qPCR Super Mix (TransGen, 北京) 进行实时荧光定量 PCR。利用 NCBI/PrimerBLAST 在线服务器, 设计葡萄 Fe-S 簇装配基因的特异性表达引物 (表 2)。以葡萄内参基因

表 1 葡萄 Fe-S 簇装配基因 CDS 扩增所需引物

Table 1 Primers used for CDS amplification of grape Fe-S cluster assembly genes

基因 Gene	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')	产物长度 Product length (bp)
<i>ADX1</i>	ATGTTTCGCTTCTAGACTTTCA	TTAGTGTGGTTTTGGAATAAA	597
<i>ADXR</i>	ATGGCGTTTTGTCTGCGAAG	TCATTCCATGGTAACTTTCAG	1461
<i>ATM3</i>	ATGGCGGGCGTTGCTTCTTGC	TCACGCCTCCAATTTAATGGT	2181
<i>ClA1</i>	ATGGATTCTCGGAAGAGGGC	TCAGGTTATAGAAGCCAGCTC	1035
<i>ClA2</i>	ATGTTTTTCCCTGAGGTGGAC	TTAGAGTTCATTGGAGTAGAG	360
<i>ClA3</i>	ATGTTCTTAAATCATATTAGA	TCAACCATATGATGGAGCCAG	363
<i>DRE2</i>	ATGTTGCAAAATAGCACATTG	TTAAATGTCAGCCACAAGAA	819
<i>ERV1</i>	ATGTCTGAAACCCCATTTTCAT	TTAATGTGATCTCTCACCAAA	597
<i>FH</i>	ATGGCTTCTGCTTCTTCTTCC	TTAGGAAAGGCTGATGGGTGT	594
<i>GRXS14</i>	ATGCTTATGCTTATATCAATA	TCAGGAGCACATCGCCTTCTC	552
<i>GRXS15</i>	ATGGCAAGGTCACTATCTAAC	TCATTCGGACTTTTCTGGGG	513
<i>GRXS16</i>	ATGGCAACAATCAGTCTATCT	CTACTTCTTAAATAAACCAAC	894
<i>HCF101</i>	ATGAGGCTAACAAACACTCTT	TCATGCCTGTGCAGGAGTTAG	1671
<i>HSCA1</i>	ATGGCTGCCTCCGTTTGCTC	CTACTTCTTCACCTCTTCATA	1842
<i>HSCA2</i>	ATGGCCACTTCGGTGCTTCTT	CTACTTCTTGGCCTGCTCATA	1716
<i>HSCA3</i>	ATGTCCGAGTGCCAGCGATC	TCACATCACCATCCGGTCCCTT	1503
<i>HSCA4</i>	ATGTACGTTGCGTGGGTCTA	CTACAGCTCATCATGGGAGTC	1947
<i>HSCA5</i>	ATGGACGAGGTGGGTGAGGA	TCACTTGCTCTCGGTGAAGTC	1677
<i>HSCA6</i>	ATGGAAAGCTCGTGGAGAAGA	TCAAAGTTCATCATGGGAATC	1821
<i>HSCA7</i>	ATGGCGGTGAAGAACAGGGCG	TCAGAACTGGAAGAAGCCCCA	1731
<i>HSCB</i>	ATGTGGAAGAAGAATCTATGG	TCAGAGTTTCTTCATGATTTC	804
<i>IBA57</i>	ATGGCCTCGCTTCTCAAGTCC	CTAAGCGGACGCAGTATCTTG	1113
<i>INDL</i>	ATGGAGTCAACGACCCAGGGA	TCACAGTGAAATCTCTGGCCG	1026
<i>ISA1</i>	ATGGCATCTTCATTTCTCGCG	CTACTTAGCAGCTCCAGGATT	402
<i>ISA2</i>	ATGCCCCAGCCCTCCACTTCG	TCACATTTACGAGCAAAGGA	453
<i>ISA3</i>	ATGTCAAGATCGGTGCTTCGG	CTATTCTTTACCATGAAAGA	465
<i>ISD11</i>	ATGGCATCAACACCTTCGAAA	TTATTCCAAGTGCCTTCTGGC	219
<i>ISU1</i>	ATGAAGCTTCAAATCAAGGTC	CTACTCAGTCTTTGCTCGCTT	273
<i>MMS19</i>	ATGGCACAACTGAGTCAATTG	TCAGAAATGAAGACTTCTGGA	3441
<i>NAR1</i>	ATGTCCGAGAAGTTCTCGGCA	TCACCAGTTGTGTAATTGAGA	1437
<i>NBP35-1</i>	ATGGAGAACGGCGACAGCAAT	TCAAGTGGTAGACAGTGCCTG	957
<i>NBP35-2</i>	ATGGAGTCAACGACCCAGGGA	TCACAGTGAAATCTCTGGCCG	1026
<i>NFS1</i>	ATGGCTTCCAGGCTTCATTCT	TTAGGTTATTGTTTTGTAG	3267
<i>NFS2</i>	ATGGCAAGTGTCTGAAATT	CTACTTGAAAGAAGAGAAGA	1392
<i>NFU1</i>	ATGGCGTCTCTACAGCAACA	CTAGTCACTGAAGACAACATT	642
<i>NFU2</i>	ATGCAAGGCGTGGTGGTGGCG	CTATAGAAGCTGAAGTGTGC	684
<i>NFU3</i>	ATGGGCTTCACAGCATTACACA	TTATCCATCTATCAACTGGAC	714
<i>NFU4</i>	ATGTTTCATCCAACTCAATCC	TTAATCCATCTGGCCAGATAG	609
<i>SUFA</i>	ATGCCCCAGCCCTCCACTTCG	TCACATTTACGAGCAAAGGA	453
<i>SUFB</i>	ATGGCTTCTCTACTGGCCAAC	CTAACCGACTGATCCTTCAAGC	1536
<i>SUFC</i>	ATGGCTCGATTCTGCTGCGCC	TTACAGTTGGGCTCAGAAAT	966
<i>SUFD</i>	ATGGCTGTACATTGCTTTCA	TCATGAGGAACCTTTAAGTGT	1443
<i>SUFE1</i>	ATGTCTCTGTCCAATCTCCAA	TCAACATAGATTTCCCAAGTTG	1224
<i>SUFE2</i>	ATGGACTCTGCAACTTTGGG	TCATATCCTGAAAGGACTCTG	855
<i>SUFE3</i>	ATGGGGTGTACGGCGCAGGTG	TCAACTTATTGAAGTTGATC	1806
<i>TAH18</i>	ATGAATGGGAGGGAGAAGCAG	TCAAGACCATGCTTCCACATG	1899

表 2 本研究所用特异性表达引物

Table 2 Specific expression primers used in this study

基因 Gene	上游引物 Forward primer (5'-3')	下游引物 Reverse primer (5'-3')	产物长度 Product length (bp)
<i>ADX1</i>	AACCACAATCGGGGACCAAG	GTGGAACAGGCAAGTGAACC	250
<i>ADXR</i>	TGGGCATCCAGACTGCAAAA	TGGTCCACGTCTTCTACCA	211
<i>ATM3</i>	CACCGACACCCTAGTTGGAC	TAGCCCCAACCAAGAAACCC	232
<i>CIA1</i>	GCAACGTTCTCCCTCCACTT	GACCCGGATGCATTCCAAGA	231
<i>CIA2</i>	TGTTTTTCCTGAGGTGGACAT	GCCAATTACTGTTGCCATGCT	164
<i>CIA3</i>	AAACTTCTGCGCAGTTTGCC	GGAGCCAGACATTCATCAACC	167
<i>DRE2</i>	ATAGCACATTGGCCCTCACA	TGTCCCACCAGGCTTCAAAA	248
<i>ERV1</i>	TCGGCAGCAGAAGAAGGATG	CCCCACCTTGCATCAACTCT	222
<i>FH</i>	GGCCGCCATTGATTACAGTTC	GCTCACAGGAGAGGACAACC	235
<i>GRXS14</i>	GGAACCAAGGAGTTCACACA	CGCCTTCTCCAAGTGTCTCT	243
<i>GRXS15</i>	TGAAAGGGGTGCCTGATGTG	TTGTGGAATGTGGGCCAGT	158
<i>GRXS16</i>	AAACTGAGCCGATTCCCCTG	CTCTGGCACCGATTTCCTGT	167
<i>HCF101</i>	GAGTGGGGAGAGCTGGACTA	AACAACAGCAACACAGGGGA	192
<i>HSCA1</i>	CTCGCTTCCCCTTCTCTCTC	CCACTGATGGTGTAGTCCGAG	235
<i>HSCA2</i>	CCATTCAGCTCAAAGCCTGC	GGGAGCTCTGAGTTAGTTCCA	243
<i>HSCA3</i>	AGAGAGGTTTGCAAAGGAGGA	GTCCCTTTCCTGATGACTTTCC	244
<i>HSCA4</i>	ACCAATGACAAGGAGGAAGACA	CACTCGAGGGCCTCTTTCAC	176
<i>HSCA5</i>	CAGAGACTGCCGAGAAAGCA	GCGTTGAACCACCAACAAGG	246
<i>HSCA6</i>	GTCAAGGCTGAGGACAAGGG	GACAGCTTCCACCTCATCAATC	165
<i>HSCA7</i>	TACACGAGTTTGAGAAGAGG	AGCCCCACCACTCCTCATAAA	177
<i>HSCB</i>	TCCATGTTCTCAACTGCCC	ACAAGAGTCGCAAGCCAGAA	181
<i>IBA57</i>	GTGGATGCCACTGTCTTGGA	ATGTGCCAGCAGGATCAACA	202
<i>INDL</i>	AGTGTTTCTCGGGGTTTAG	ATCAGCATCAAGCACACCCA	168
<i>ISA1</i>	CCTAACCTAACGGACGCTG	CCAATGACATGCATGAGAGCC	213
<i>ISA2</i>	GCCCTCCACTTCGGTTTCTC	CCAGAGCATCCACCCTGTTT	219
<i>ISA3</i>	TTGAGTGTGAGACTGGTGG	TGCTCACCAGGAAAGCAGAA	193
<i>ISD11</i>	ACGCGATTTCTCGACTACAAT	TATTCCTCACTGCCTTCTGGC	156
<i>ISU1</i>	CCATCGCCTCTTCCTGTGT	AGTCTTTGCTCGCTTGGCT	188
<i>MMS19</i>	AGCTTGCTGTGGGAGTTGT	GGGTTTGAGGACGAAGTGTCT	231
<i>NAR1</i>	AAAGCTGAGGTTGTGACGGG	AAAGGAAGCCCTTGACTGGG	204
<i>NBP35-1</i>	TTCCTAGTGTTGATGCCCC	ACACCTCACTGAAATCTGTCAC	232
<i>NBP35-2</i>	AGTGTTTCTCGGGGTTTAG	ATCAGCATCAAGCACACCCA	168
<i>NFS1</i>	GACAAATCAAAAAGCCATTTTCAA	CACGTACTGCTCTCGGGTT	150
<i>NFS2</i>	GTTCAGGTGGGGTTCCGTAG	AGGCTTCTGTGAGGTTGCTG	183
<i>NFU1</i>	CAAACTCAGCGTTTCGCTT	ATTTGTGGGCCGAGTAGAGC	163
<i>NFU2</i>	CCTACTGCTGCAGAGCCAAA	GCAACAGCCTTGACAACCTCG	172
<i>NFU3</i>	AAACACGCCCTAGAGCCTTC	AGCCTTGACAACCTCGGCTAC	150
<i>NFU4</i>	GGGAAGCCACTGTTCTTGA	CGATACTCGATGTCCCCACC	152
<i>SUFA</i>	GCCCTCCACTTCGGTTTCTC	CCAGAGCATCCACCCTGTTT	219
<i>SUFB</i>	ACAAAGTTTGAGATGACAGGA	CTAGCCCCACTGCATAGACC	221
<i>SUFC</i>	CCATGCAGTCATGGGGAAGA	ACCTGGGATCTCTACTGGGG	190
<i>SUFD</i>	AATTGCCCCTGGCGTTTTC	ATATCCCCACCCTCAACGGA	217
<i>SUFE1</i>	TGGACATGCAGGTGTTAGGG	TTCCCAAGTTGATTTCCCTGTCT	219
<i>SUFE2</i>	TGATTGGGTTTGGACGGA	AGATATTGCAGTGCCAGAGACA	227
<i>SUFE3</i>	TCCTGAGGTCCAAGGTGTCT	GCATCTGCCAAAGAGCAACC	243
<i>TAH18</i>	GCGCTATTTCTTTGAGGCAAG	AATGGCATTGCACTGAAGGG	174

Ubiquitin (GenBank No. MH114011) [21-22], 通过 BIO-RAD 实时荧光定量 PCR 仪检测葡萄 Fe-S 簇装配基因在不同组织部位的表达特征。反应体系参照商品说明书的描述, 反应程序为 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 60℃ 34 s (40 个循环); 72℃ 10 s。每个样品进行 3 次生物学重复, 不同样品在实时荧光定量 PCR 仪获得相应的 Ct 值, 经内参基因 *Ubiquitin* 均一化处理后, 采用 $2^{-\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量[21-22]。根据 DENG 等[23]描述, 通过 Log2 计算法分析缺铁胁迫前后表达倍数, 通过 HemI 软件制作表达差异变化的热图。分别以对照植物根、茎或叶的表达值设定为 1, 若缺铁胁迫条件下的表达值<1, 表示基因表达水平被下调; 表达值>1, 则表示基因表达水平被上调。

2 结果

2.1 葡萄 Fe-S 簇装配基因检索与鉴定

以拟南芥 Fe-S 簇装配基因的氨基酸序列为参考序列[12], 在葡萄基因组数据库中检索到 46 个 Fe-S 簇装配基因。其中, 14 个基因属于质体 SUF 机制, 21 个基因属于线粒体 ISC 机制, 11 个基因属于细胞质

CIA 机制(图 1、表 3)。与拟南芥相比, 葡萄基因组中缺少了 *ISU2*、*ISU3*、*NFU5* 和 *ADX2*, 但增加了拟南芥中没有的 *HSCA3-7*、*NBP35-2* 和 *CIA3*; 与桃相比[19-20], 葡萄基因组中缺少了 *ADX2*, 但增加了桃中没有的 *SUFU*、*HSCA6* 和 *HSCA7*; 与单子叶植物水稻相比[17], 葡萄基因组中缺少了 *ISU2* 和 *ADX2*, 但检索到水稻中没有的 *SUFE2*、*HSCA3-7*、*NBP35-2* 和 *CIA3* (表 3)。

2.2 葡萄 Fe-S 簇装配基因及其编码蛋白特征

除 *NFS1*、*HSCA2* 和 *NAR1* 染色体定位情况未知外, 其他 43 个葡萄 Fe-S 簇装配基因在除了 5 号染色体之外的 16 条染色体上均有分布; 其中, 8 号染色体含有的基因数目最多, 共 6 个 (*GRXS16*、*ISA1*、*ISA3*、*HSCB*、*CIA1* 和 *CIA3*), 7 号染色体含有 5 个 (*SUFA*、*NFU1*、*ISA2*、*INDL*、*NBP35-2*), 其他染色体上至少含有一个基因; 同一基因家族中的成员 *ISA1* 和 *ISA3*、*CIA1* 和 *CIA3* 均位于 8 号染色体(表 3), 然而, 同属于 HSCA 基因家族的 7 个成员分布于截然不同的染色体上, 但其 CDS 长度较为接近, 均在 1 500—2 000 bp (表 4)。

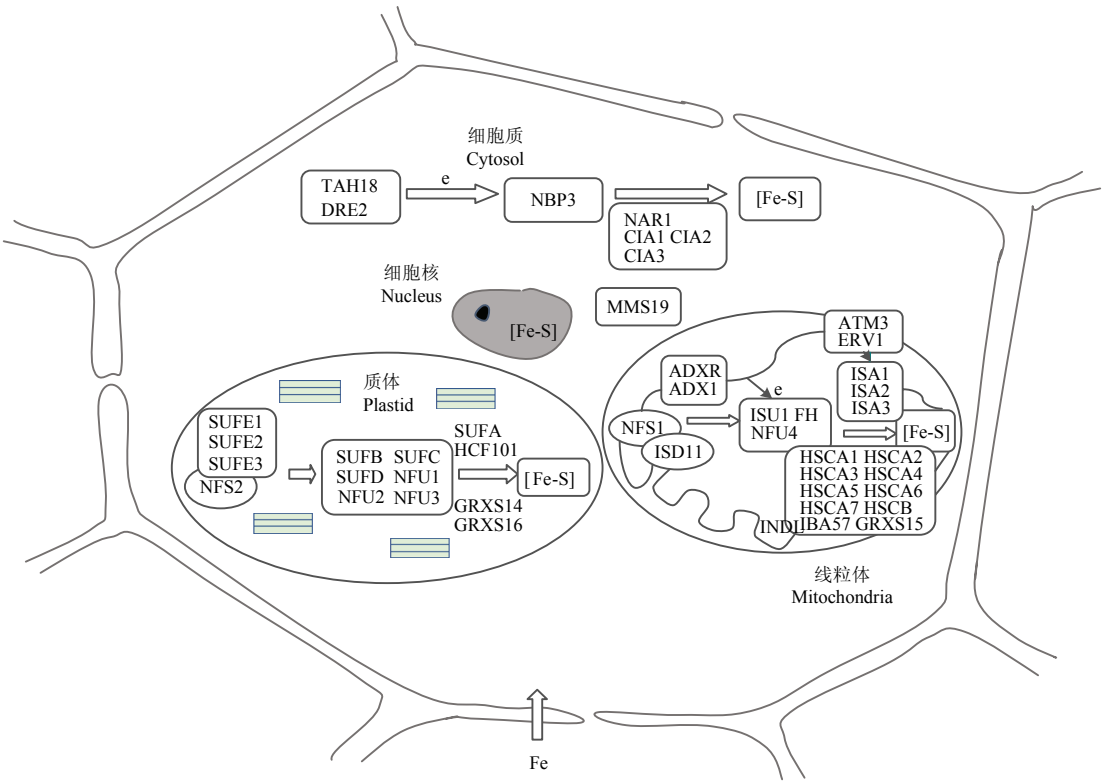


图 1 葡萄细胞中 Fe-S 簇装配基因功能模拟分布图

Fig. 1 The proposed function and distribution model of Fe-S cluster assembly genes in grape

表 3 葡萄、拟南芥和桃 Fe-S 簇装配基因对比
Table 3 Complete list of Fe-S cluster assembly genes in grape, *Arabidopsis* and peach species

位置 Location	基因 Gene	登录号 Locus ID			
		拟南芥 <i>Arabidopsis</i>	葡萄 Grape	桃 Peach	水稻 Rice
质体 Plastid	<i>NFS2</i>	At1g08490	GSVIVT01037384001	ppa005298m	Os12g18900
	<i>SUFE1</i>	At4g26500	GSVIVT01014835001	ppa007330m	Os09g09790
	<i>SUFE2</i>	At1g67810	GSVIVT01000550001	ppa017530m	-
	<i>SUFE3</i>	At5g50210	GSVIVT01007621001	ppa001921m	Os12g19304
	<i>SUFA</i>	At1g10500	GSVIVT01022247001	ppa012351m	Os06g05400
	<i>SUFB</i>	At4g04770	GSVIVT01012742001	ppa003788m	Os01g61400
	<i>SUFC</i>	At3g10670	GSVIVT01036588001	-	Os03g21490
	<i>SUFD</i>	At1g32500	GSVIVT01013180001	ppa004982m	Os01g03650
	<i>NFU1</i>	At4g01940	GSVIVT01028158001	ppa011214m	Os03g20010
	<i>NFU2</i>	At5g49940	GSVIVT01023274001	ppa011050m	Os11g07916
	<i>NFU3</i>	At4g25910	GSVIVT01029242001	ppa010743m	Os06g47940
	<i>HCF101</i>	At3g24430	GSVIVT01015424001	ppa006650m	Os01g52170
	<i>GRXS14</i>	At3g54900	GSVIVT01032936001	ppa012220m	Os03g63420
	<i>GRXS16</i>	At2g38270	GSVIVT01011178001	ppa009373m	Os12g07650
线粒体 Mitochondria	<i>NFS1</i>	At5g65720	GSVIVT01003603001	ppa005512m	Os09g16910
	<i>ISD11</i>	At5g61220	GSVIVT01007919001	ppa013993m	Os08g14070
	<i>ISU1</i>	At4g22220	GSVIVT01013764001	ppa012356m	Os01g47340
	<i>ISU2</i>	At3g01020	-	-	Os05g49300
	<i>ISU3</i>	At4g04080	-	-	-
	<i>ISA1</i>	At2g16710	GSVIVT01033834001	ppa013203m	Os12g30030
	<i>ISA2</i>	At2g36260	GSVIVT01022247001	ppa12351m	Os01g01610
	<i>ISA3</i>	At5g03905	GSVIVT01033842001	ppa012679m	Os08g28230
	<i>NFU4</i>	At3g20970	GSVIVT01011272001	ppa009781m	Os05g06330
	<i>NFU5</i>	At1g51390	-	-	-
	<i>ADX1</i>	At4g21090	GSVIVT01015024001	ppa012568m	Os09g26650
	<i>ADX2</i>	At4g05450	-	ppa012238m	Os07g01930
	<i>ADXR</i>	At4g32360	GSVIVT01015352001	ppa004960m	Os02g17700
	<i>FH</i>	At4g03240	GSVIVT01000441001	ppa011940m	Os01g57460
	<i>HSCA1</i>	At4g37910	GSVIVT01038517001	ppa002402m	Os02g53420
细胞质 Cytosol	<i>HSCA2</i>	At5g09590	GSVIVT01006769001	ppa001973m	Os03g02260
	<i>HSCA3</i>	-	GSVIVT01008331001	ppa002222m	Os09g31486
	<i>HSCA4</i>	-	GSVIVT01038580001	ppa002489m	-
	<i>HSCA5</i>	-	GSVIVT01026014001	ppa002572m	-
	<i>HSCA6</i>	-	GSVIVT01019607001	-	-
	<i>HSCA7</i>	-	GSVIVT01031125001	-	-
	<i>HSCB</i>	At5g06410	GSVIVT01022555001	ppa016242m	Os12g27070
	<i>INDL</i>	At4g19540	GSVIVT01000762001	ppa019981m	Os03g42880
	<i>IBA57</i>	At4g12130	GSVIVT01004911001	ppa006632m	Os06g04380
	<i>GRXS15</i>	At3g15660	GSVIVT01017244001	ppa012405m	Os01g07950
	<i>ATM3</i>	At5g58270	GSVIVT01024527001	ppa002114m	Os06g03770
	<i>ERV1</i>	At1g49880	GSVIVT01037859001	ppa012227m	Os03g10850
	<i>NAR1</i>	At4g16440	GSVIVT01007214001	ppa005089m	Os03g53750
	<i>NBP35-1</i>	At5g50960	GSVIVT01001845001	ppa005998m	Os04g40880
	<i>NBP35-2</i>	-	GSVIVT01000762001	ppa007759m	-
	<i>TAH18</i>	At3g02280	GSVIVT01031054001	ppa002941m	Os01g53250
	<i>DRE2</i>	At5g18400	GSVIVT01010181001	ppa009994m	Os04g57810
	<i>CIA1</i>	At2g26060	GSVIVT01033839001	ppa007909m	Os07g14830
	<i>CIA2</i>	At1g68310	GSVIVT01018962001	ppa012624m	Os04g50864
	<i>CIA3</i>	-	GSVIVT01034035001	ppa012667m	-
	<i>MMS19</i>	At5g48120	GSVIVT01016980001	ppa023072m	Os07g08050

表 4 葡萄 Fe-S 簇装配基因信息

Table 4 Information of Fe-S cluster assembly genes in grape

位置 Location	基因 Gene	GenBank 登录号 GenBank No.	染色体定位 Chromosome location	编码区 CDS (bp)	氨基酸数目 Amino acid No.	内含子数目 Intron No.
质体 Plastid	<i>NFS2</i>	GSVIVT01037384001	chr6:14614433..14627074 forward	1392	463	9
	<i>SUFE1</i>	GSVIVT01014835001	chr19:10332463..10337676 reverse	1224	407	5
	<i>SUFE2</i>	GSVIVT01000550001	chr1:7199706..7203084 forward	855	284	2
	<i>SUFE3</i>	GSVIVT01007621001	chr17:11153636..11159809 reverse	1806	601	6
	<i>SUFA</i>	GSVIVT01022247001	chr7:17815443..17819261 forward	453	150	2
	<i>SUFB</i>	GSVIVT01012742001	chr10:1165899..1176476 reverse	1536	511	3
	<i>SUFC</i>	GSVIVT01036588001	chr13:18723793..18744366 forward	966	321	5
	<i>SUFD</i>	GSVIVT01013180001	chr2:7019468..7043516 forward	1443	480	2
	<i>NFU1</i>	GSVIVT01028158001	chr7:4298897..4301308 forward	642	213	2
	<i>NFU2</i>	GSVIVT01023274001	chr12:20249550..20254467 reverse	684	227	3
	<i>NFU3</i>	GSVIVT01029242001	chr11:18133595..18136869 forward	714	237	3
	<i>HCF101</i>	GSVIVT01015424001	chr11:3539907..3550291 forward	1671	556	14
	<i>GRXS14</i>	GSVIVT01032936001	chr14:24341805..24359981 reverse	552	183	3
	<i>GRXS16</i>	GSVIVT01011178001	chr8:7822419..7828262 reverse	894	297	1
线粒体 Mitochondria	<i>NFS1</i>	GSVIVT01003603001	chrUn:11176164..11189530 forward	3267	1088	8
	<i>ISD11</i>	GSVIVT01007919001	chr17:7527950..7530932 reverse	219	72	1
	<i>ISU1</i>	GSVIVT01013764001	chr1:7813881..7823597 forward	273	90	2
	<i>ISA1</i>	GSVIVT01033834001	chr8:17357057..17361779 forward	402	133	2
	<i>ISA2</i>	GSVIVT01022247001	chr7:17815443..17819261 forward	453	150	2
	<i>ISA3</i>	GSVIVT01033842001	chr8:17302334..17306498 forward	465	154	3
	<i>NFU4</i>	GSVIVT01011272001	chr13:10306616..10320274 reverse	609	202	4
	<i>ADX1</i>	GSVIVT01015024001	chr11:532570..538242 forward	597	198	6
	<i>ADXR</i>	GSVIVT01015352001	chr11:2891542..2897423 reverse	1461	486	12
	<i>FH</i>	GSVIVT01000441001	chr12:8053062..8056733 reverse	594	197	4
	<i>HSCA1</i>	GSVIVT01038517001	chr3:10899748..10904643 forward	1842	613	7
	<i>HSCA2</i>	GSVIVT01006769001	chrUn:28290681..28295479 forward	1716	571	8
	<i>HSCA3</i>	GSVIVT01008331001	chr17:3189753..3194345 forward	1503	500	9
	<i>HSCA4</i>	GSVIVT01038580001	chr16:21738678..21742840 reverse	1947	648	8
	<i>HSCA5</i>	GSVIVT01026014001	chr18:25847096..25853527 forward	1677	558	7
	<i>HSCA6</i>	GSVIVT01019607001	chr2:1900757..1904873 forward	1821	606	8
	<i>HSCA7</i>	GSVIVT01031125001	chr14:1920620..1924241 forward	1731	576	8
	<i>HSCB</i>	GSVIVT01022555001	chr8:4909017..4918207 forward	804	267	5
	<i>INDL</i>	GSVIVT01000762001	chr7:498142..504281 reverse	1026	341	8
	<i>IBA57</i>	GSVIVT01004911001	chr2:4748585..4752156 forward	1113	370	4
细胞质 Cytosol	<i>GRXS15</i>	GSVIVT01017244001	chr9:5862839..5867495 reverse	513	170	5
	<i>ATM3</i>	GSVIVT01024527001	chr6:9155464..9213374 reverse	2181	726	19
	<i>ERV1</i>	GSVIVT01037859001	chr3:7051150..7055710 forward	597	198	7
	<i>NAR1</i>	GSVIVT01007214001	chrUn:30906448..30911807 forward	1437	478	10
	<i>NBP35-1</i>	GSVIVT01001845001	chr14:26263495..26271378 reverse	957	318	3
	<i>NBP35-2</i>	GSVIVT01000762001	chr7:498142..504281 reverse	1026	341	8
	<i>TAH18</i>	GSVIVT01031054001	chr14:21477906..21501706 reverse	1899	632	11
	<i>DRE2</i>	GSVIVT01010181001	chr1:16897462..16906512 reverse	819	272	6
	<i>CIA1</i>	GSVIVT01033839001	chr8:17322989..17332968 forward	1035	344	9
	<i>CIA2</i>	GSVIVT01018962001	chr4:18301283..18304437 reverse	360	119	5
	<i>CIA3</i>	GSVIVT01034035001	chr8:15682406..15687298 forward	363	120	3
	<i>MMS19</i>	GSVIVT01016980001	chr9:3133979..3155012 forward	3441	1146	21

基因结构分析结果表明葡萄 Fe-S 簇装配基因均含有内含子，其中，*GRXS16* 和 *ISD11* 仅含有 1 个内含子，而 *MMS19* 含有的内含子数目最多（21 个），且长度不一（表 4、图 2）。但 *SUFD* 含有 2 个内含子，第 2 个内含子的长度超过 20 kb。

2.3 葡萄 Fe-S 簇装配基因亚细胞定位预测

由亚细胞定位预测结果可知，葡萄 Fe-S 簇装配机制相关蛋白在多种亚细胞结构中均有定位，且不同装配机制的蛋白亚细胞定位情况差异很大（表 5）。其中，质体 SUF 装配机制的蛋白主要定位在叶绿体中，而 *SUFE1* 主要定位于细胞核，*SUFE3* 主要定位于细胞质，此外部分蛋白成员在线粒体、内质网膜、液泡

膜和细胞质膜也有不同比例的分布；线粒体 ISC 装配机制中，*HSCA4* 和 *HSCA6* 是 100% 定位在内质网膜，其他成员中，10 个主要定位于叶绿体，6 个主要定位于线粒体，3 个（*HSAC3*、*HSAC5* 和 *INDL*）主要定位于细胞质。此外，ISC 装配机制的蛋白在细胞核、液泡膜、细胞质膜和高尔基体有不同比例的定位；细胞质 CIA 装配机制中，*CIA3* 是 100% 定位在细胞质，其他成员中，6 个主要定位于细胞核，3 个（*NAR1*、*NBP35-2* 和 *CIA2*）主要定位于细胞质，*ATM3* 主要在细胞质膜，*NBP35-1* 主要在叶绿体；此外，CIA 装配机制的蛋白在液泡膜、内质网膜、线粒体和高尔基体也有不同比例的定位（表 5）。

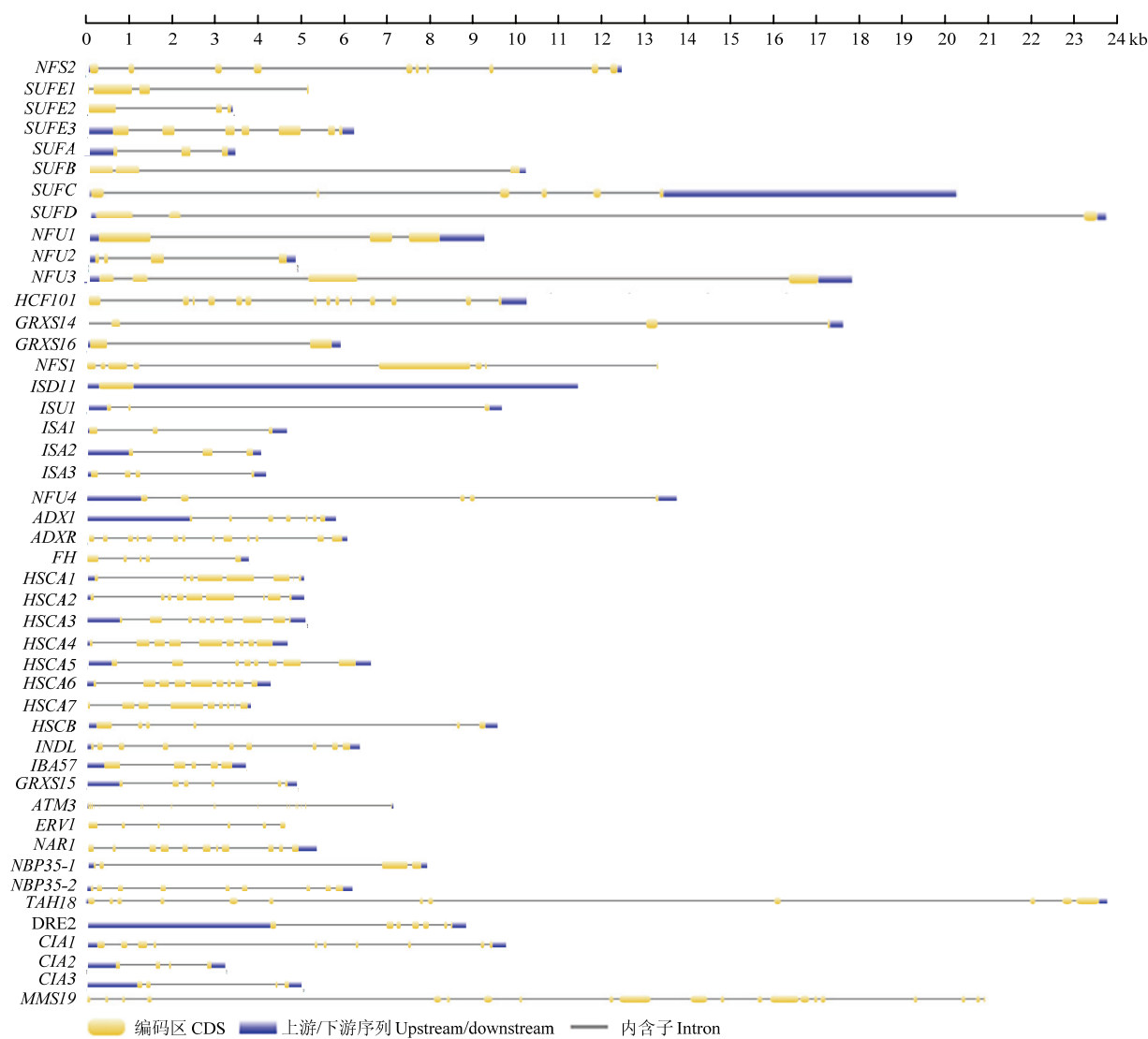


图 2 葡萄 Fe-S 簇装配基因的结构分析

Fig. 2 Gene structure of Fe-S cluster assembly genes in grape

表 5 Fe-S 簇装配基因亚细胞定位预测

Table 5 Subcellular localization prediction of Fe-S cluster assembly gene

蛋白位置 Protein location	蛋白 Protein	亚细胞定位 Subcellular localization (%)							
		叶绿体 Chloroplast	线粒体 Mitochondria	细胞质 Cytosol	细胞核 Nucleus	内质网膜 Endoplasmic reticulum	液泡膜 Vacular membrane	细胞质膜 Plasma membrane	高尔基体 Golgi
质体 Plastid	NFS2	71.43	28.57	-	-	-	-	-	-
	SUFE1	7.14	-	21.43	57.15	-	7.14	7.14	-
	SUFE2	92.86	7.14	-	-	-	-	-	-
	SUFE3	7.14	-	64.29	14.29	7.14	-	7.14	-
	SUFA	85.72	7.14	7.14	-	-	-	-	-
	NFU1	72	28	-	-	-	-	-	-
	NFU2	85.72	-	-	7.14	7.14	-	-	-
	NFU3	57.15	-	21.43	7.14	-	-	14.28	-
	SUFB	57.50	32.50	-	10.00	-	-	-	-
	SUFC	85.71	14.29	-	-	-	-	-	-
	SUFD	68.3	21.95	-	9.75	-	-	-	-
	HCF101	57.14	14.29	-	-	-	21.43	-	7.14
	GRXS14	92.86	-	-	-	-	7.14	-	-
	GRXS16	83.72	16.28	-	-	-	-	-	-
线粒体 Mitochondria	NFS1	35.71	35.71	-	28.58	-	-	-	-
	ISD11	-	77.42	-	16.13	-	-	6.45	-
	ISU1	85.72	-	14.28	-	-	-	-	-
	ISA1	92.85	7.15	-	-	-	-	-	-
	ISA2	78.57	7.15	14.28	-	-	-	-	-
	ISA3	21.63	45.94	27.03	5.40	-	-	-	-
	NFU4	50	14.28	-	14.28	-	7.14	-	-
	ADX1	14.28	78.58	-	7.14	-	-	-	-
	ADXR	50	35.72	7.14	7.14	-	-	-	-
	FH	50	35.72	-	14.28	-	-	-	-
	HSCA1	14.28	85.72	-	-	-	-	-	-
	HSCA2	14.28	85.72	-	-	-	-	-	-
	HSCA3	21.42	-	78.58	-	-	-	-	-
	HSCA4	-	-	-	-	100	-	-	-
	HSCA5	7.14	7.14	78.58	-	-	-	7.14	-
	HSCA6	-	-	-	-	100	-	-	-
	HSCA7	43.76	-	15.62	15.62	-	12.5	-	12.5
	HSCB	71.44	14.28	-	14.28	-	-	-	-
	INDL	14.28	-	78.58	7.14	-	-	-	-
	IBA57	64.30	14.28	7.14	7.14	-	-	7.14	-
	GRXS15	42.86	57.14	-	-	-	-	-	-
细胞质 Cytosol	ATM3	7.14	7.14	-	-	28.57	-	57.15	-
	ERV1	14.28	-	14.28	57.16	-	7.14	7.14	-
	NAR1	21.42	7.14	42.88	21.42	-	7.14	-	-
	NBP35-1	57.16	-	21.42	21.42	-	-	-	-
	NBP35-2	14.28	-	78.58	7.14	-	-	-	-
	TAH18	7.14	-	35.71	57.15	-	-	-	-
	DRE2	21.42	-	21.42	57.16	-	-	-	7.14
	CIA1	14.28	-	28.58	53	-	7.14	-	-
	CIA2	7.14	-	64.30	21.42	-	-	-	7.14
	CIA3	-	-	100	-	-	-	-	-
	MMS19	14.28	-	28.57	35.73	-	14.28	-	7.14

2.4 葡萄 Fe-S 簇装配基因的表达特征分析

实时荧光定量 PCR 分析结果表明, 葡萄 Fe-S 簇装配基因在成年 ‘马瑟兰’ 葡萄不同组织部位的表达水平差异较大: 其中, *ISU1* 在整体水平的表达量最高 (特别是在成熟果实、老叶和幼叶中的表达量极高),

其次是 *HSCA1*、*ISA2*、*NFU2*、*SUFA* 和 *SUFB* 等基因的整体表达水平较高, 而 *SUFE2*、*NFS1*、*HSCA2*、*HSCA6*、*TAH18* 和 *CIA2* 均未检测到表达量, 其他未提及的基因在本研究所有不同葡萄组织材料中有较低或极低的表达量 (图 3)。

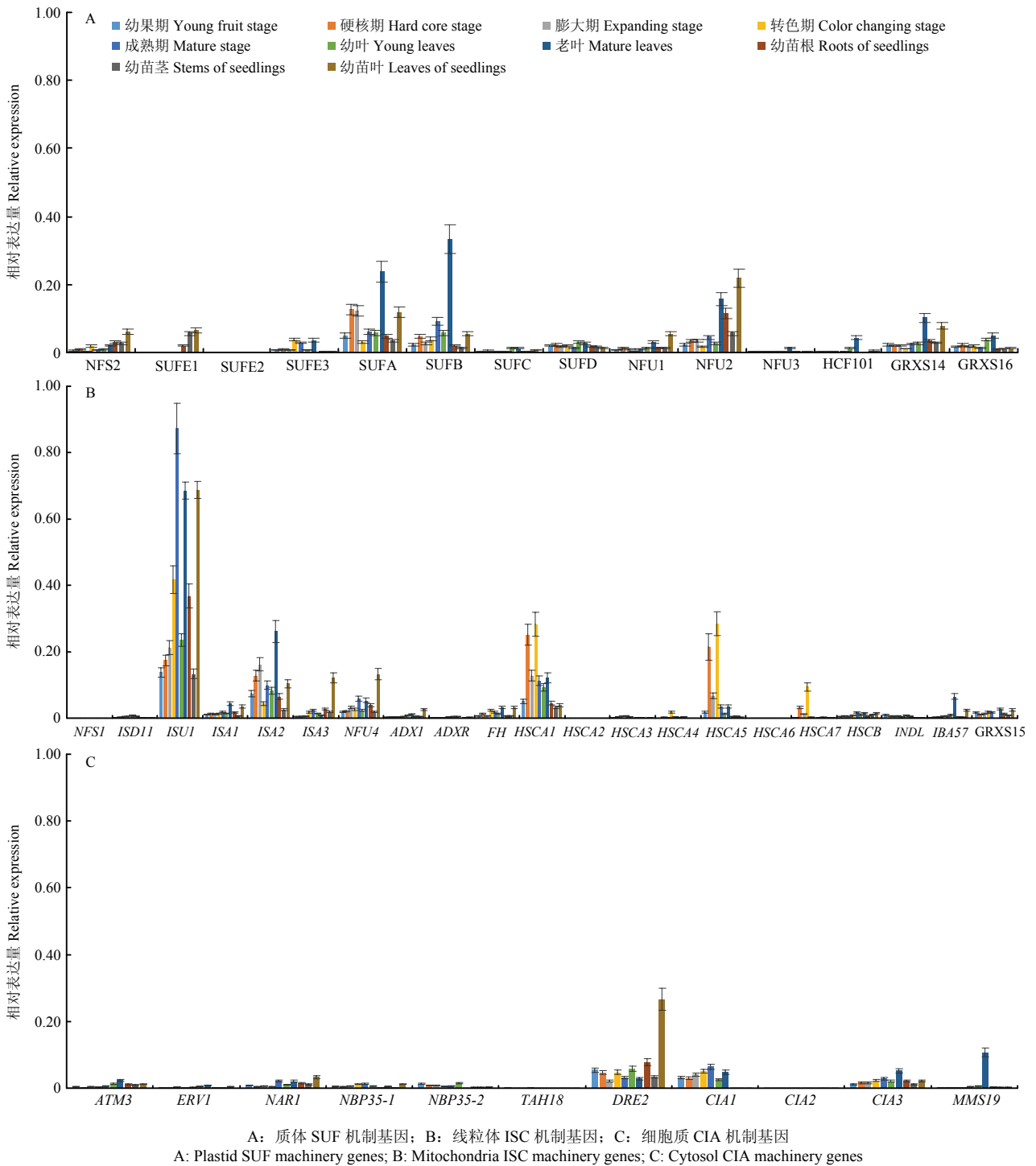


图 3 葡萄 Fe-S 簇装配基因组织特异性表达模式分析

Fig. 3 Tissue specific expression pattern analysis of Fe-S cluster assembly genes in grape

在本研究所检测的不同葡萄组织材料中, 13 个葡萄 Fe-S 簇装配基因 (*SUFA*、*SUFB*、*NFU3*、*HCF101*、*GRXS14*、*GRXS16*、*ISA1*、*ISA2*、*FH*、*IBA57*、*GRXS15*、*ATM3* 和 *MMS19*) 在成熟叶片中的表达量最高, *NFS2*、*SUFE1*、*NFU1*、*ISA3*、*NFU4*、*ADX1*、*NAR1* 和 *DRE2* 等 8 个基因在幼苗叶片的表达最高, 而 *ISD11*、*ISU1*、*IBA57*、*HSCB*、*NBP35-1*、*CIA1* 和 *CIA3* 等 6 个基因在成熟期果实中的表达量最高, 其表达水平随着果实的逐渐发育而递增, 均在成熟期果实中达到最高; 此外, 除 *HSCA2* 和 *HSCA6* 没有检测到外, 其他 5 个 *HSCA* 家族成员均在转色期果实中的表达量最高 (图 3)。

2.5 葡萄 Fe-S 簇装配基因对缺铁胁迫的响应差异分析

以 ‘马瑟兰’ 组培幼苗为材料, 通过实时荧光定量 PCR 分析葡萄 Fe-S 簇装配基因在转录水平对缺铁胁迫的响应情况。如图 4 所示, 葡萄 Fe-S 簇装配基因

对缺铁处理较为敏感, 所有 46 个基因至少在 1 个检测的组织部位对缺铁处理有响应, 表达量发生显著变化。其中, 22 个基因 (*NFS2*、*SUFE1*、*SUFE3*、*SUFB*、*SUFC*、*NFU1*、*NFU2*、*NFU3*、*GRXS14*、*NFS1*、*ISA1-3*、*FH*、*HSCA4*、*HSCA6*、*HSCA7*、*AMT3*、*NAR1*、*TAH18*、*CIA1* 和 *CIA2*) 对缺铁胁迫最敏感, 其表达水平在 ‘马瑟兰’ 幼苗所有检测组织中均受缺铁处理的影响而发生显著变化 (图 4)。根部中, 24 个葡萄 Fe-S 簇装配基因在转录水平的表达量受缺铁处理而降低, 12 个基因的表达量增强, 10 个基因的表达量没有显著变化; 茎部中, 14 个葡萄 Fe-S 簇装配基因在转录水平的表达量受缺铁处理而降低, 22 个基因的表达量增强, 10 个基因的表达量没有显著变化; 叶片中, 9 个葡萄 Fe-S 簇装配基因在转录水平的表达量受缺铁处理而降低, 27 个基因的表达量被增强, 10 个基因的表达量没有显著变化 (图 4)。

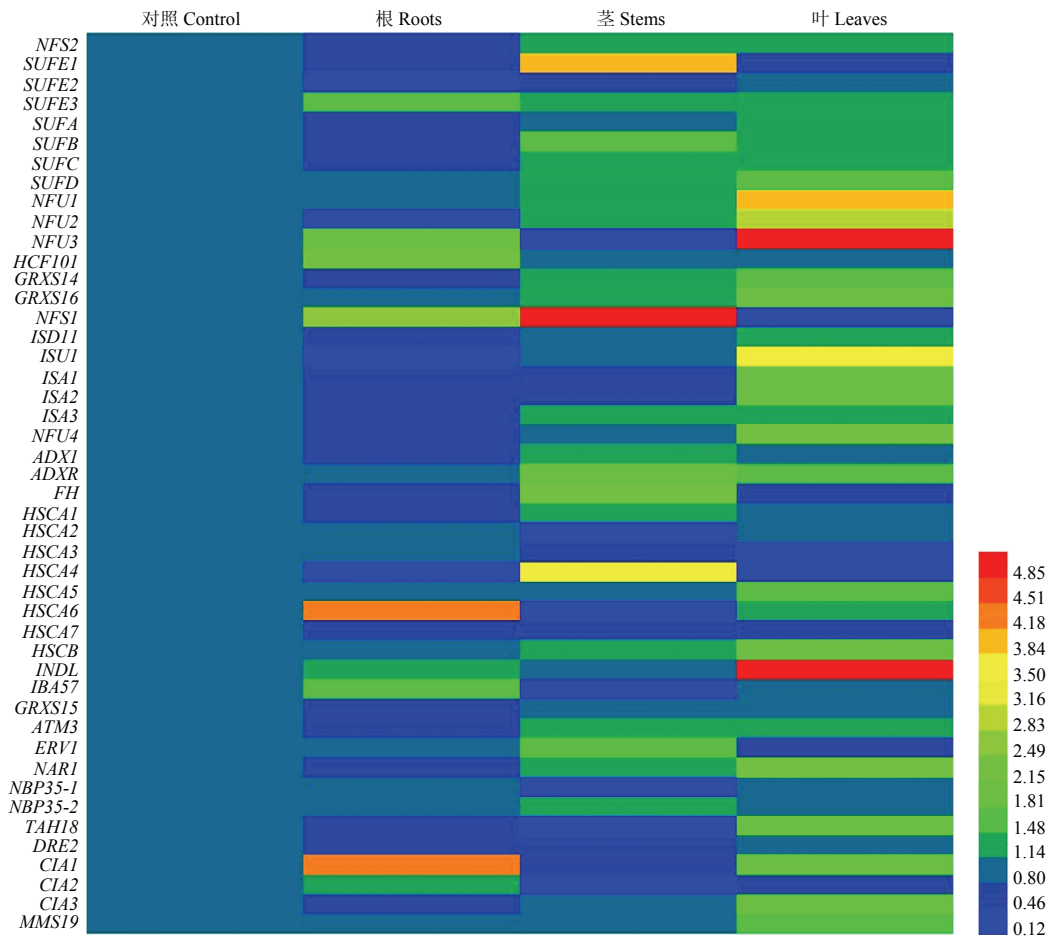


图 4 利用组培幼苗分析葡萄 Fe-S 簇装配基因对缺铁胁迫的响应差异

Fig. 4 Analysis of differential responses of Fe-S cluster assembly genes under iron deficiency in grape tissue culture seedlings

3 讨论

不管是原核生物还是真核生物, Fe-S 簇装配机制是极其复杂和高度保守的^[9,11-12]。植物中, 拟南芥 Fe-S 簇装配机制的研究最为透彻^[9,12], 果树学中 Fe-S 簇装配机制的研究较稀缺。葡萄中缺乏 *ADX2*, 仅含有 *ADX1*, 而 *ADX* 作为铁氧还蛋白起到电子转移体的作用, 暗示葡萄 *ADX1* 可能功能独特或者能够独当一面; 此外, 葡萄中含有更多数目的 *HSCA*, 揭示葡萄 Fe-S 簇装配过程中需要更多的 HSP70 型伴侣蛋白^[11-12]。但 ISU 和 NFU 家族基因均编码 Scaffold 支架蛋白进而参

与植物 Fe-S 簇装配^[9,11-14], 然而, 本研究意外发现多年生木本果树相较于一年生草本植物少了一些典型的支架蛋白, 即 ISU2、ISU3 和 NFU5 丢失 (表 6), 这些丢失的支架蛋白在本研究选定的木本果树作物中肯定不是 Fe-S 簇装配途径所必需的。其他支架蛋白, 包括 SUFB、SUFC、SUFD、NFU1-4、ISU1、NBP35-1 和 NBP35-2 均存在, 表明这 10 个基因在功能上对葡萄 Fe-S 簇装配及铁代谢途径是足够的。因此, 推测高等植物 Fe-S 簇装配机制可能经历了复杂而长期的进化过程, 特别是在线粒体 ISC 装配机制中, 多年生木本植物更有可能进化出“非功能性”支架蛋白丢失的策略。

表 6 9 种高等植物 ISU 和 NFU 家族同源基因分析
Table 6 Orthologs analysis of ISU and NFU members in 9 species of higher plants

基因 Gene	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	盐芥 <i>Thellungiella halophila</i>	短柄草 <i>Brachypodium sylvaticum</i>	水稻 Rice	番茄 Tomato	柑橘 Orange	苹果 Apple	桃 Peach	葡萄 Grape
<i>ISU1</i>	At4g22220	Thhalv10026418m	Bra020855	Os01g47340	Solyc03g112900	orange1.1g030644m	MDP0000778166	ppa012356m	GSVIVT01013764001
<i>ISU2</i>	At3g01020	Thhalv10028164m	Bra013601	Os05g49300	Solyc07g007450	-	-	-	-
<i>ISU3</i>	At4g04080	Thhalv10029418m	Bra029483	-	-	-	-	-	-
<i>NFU1</i>	At4g01940	Thhalv10028839m	Bra000905	Os03g20010	Solyc01g079220	orange1.1g027469m	MDP0000245391	ppa011214m	GSVIVT01028158001
<i>NFU2</i>	At5g49940	Thhalv10014572m	Bra037947	Os11g07916	Solyc01g103710	orange1.1g026830m	MDP0000285539	ppa011050m	GSVIVT01023274001
<i>NFU3</i>	At4g25910	Thhalv10026125m	Bra013933	Os06g47940	Solyc05g044630	orange1.1g038446m	MDP0000952041	ppa010743m	GSVIVT01029242001
<i>NFU4</i>	At3g20970	Thhalv10021272m	Bra031245	Os05g06330	Solyc11g007120	orange1.1g023823m	MDP0000150995	ppa009781m	GSVIVT01011272001
<i>NFU5</i>	At1g51390	Thhalv10011711m	Bra018906	-	-	-	-	-	-

基因表达模式分析结果表明葡萄 Fe-S 簇装配基因在葡萄不同年龄、不同部位组织材料中的表达量差异很大 (图 3), 且在幼苗不同部位对缺铁胁迫转录水平的响应差异明显, 在幼苗根、茎、叶中均有 36 个基因的表达水平受缺铁处理调控: 其中, 根部 Fe-S 簇装配基因的表达水平易受缺铁胁迫诱导而上调, 而地上部 (茎和叶) Fe-S 簇装配基因的表达水平易受缺铁胁迫抑制而下调 (图 4)。特别值得注意的是, *ISU1* 在‘马瑟兰’葡萄组织中的表达量都是最丰富的, 其次是 *HSCA1* 和 *ISA2*, 这一发现与水稻^[17]和桃^[19-20]中 Fe-S 簇装配基因的表达特征较为相似, 而与大豆^[18]略有差异, 大豆 *HSCA1* 表达量最高, 其次是 *HSCA2*; 值得一提的是, *ISU1*、*HSCA1* 和 *ISA2* 都属于线粒体 ISC 机制的成员^[9-12], 暗示线粒体 ISC 机制需要更多功能性的支架蛋白、伴侣蛋白和电子转移体。

由于 *ISU1* 在‘马瑟兰’葡萄果实发育不同时期、

叶片发育不同阶段和幼苗组织中的表达量均最高 (图 3), 暗示 *ISU1* 是线粒体 ISC 装配也是葡萄 Fe-S 簇装配机制不可或缺的支架蛋白, 在葡萄铁代谢方面可能发挥关键作用。本研究所分析 10 种植物 *ISU1* 蛋白序列的一致性高达 77%, 且具有多处高度保守的结构域区域 (图 5), 这些发现暗示了遗传距离较近的不同物种之间的 *ISU1* 同源蛋白在长期的进化过程中可能具有相同或相近的功能。进一步的系统发育树分析表明葡萄 *ISU1* 和番茄 *ISU1* 紧密聚集在一起 (图 6), 而番茄作为典型的模式作物, 研究其 *ISU1* 蛋白功能可能为揭示葡萄 *ISU1* 功能提供理论依据。

此外, 本研究表明葡萄 Fe-S 簇装配基因在‘马瑟兰’成年树体与幼苗中的表达模式有所不同 (图 3)。但 *SUFE2* 编码叶绿体类 SufE 蛋白^[9,12], 其在‘马瑟兰’葡萄组织材料中均未检测到表达量, 相比之下, *SUFE1* 仅在‘马瑟兰’葡萄幼苗中检测到表达量, 而

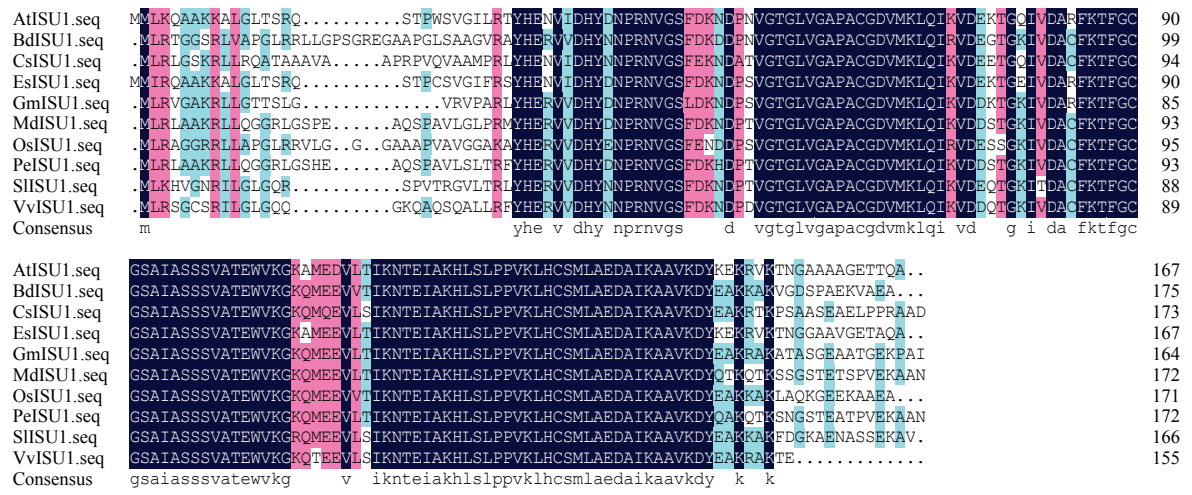


图 5 不同植物 ISU1 蛋白序列一致性分析

Fig. 5 Identity analysis of ISU1 protein sequences from different species

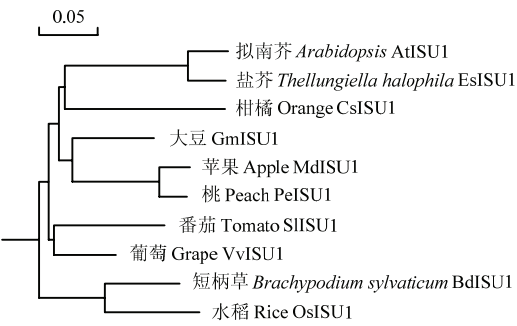


图 6 不同植物 ISU1 蛋白系统进化树建立

Fig. 6 Phylogenetic tree construction of ISU1 protein from different species

SUFE3 在葡萄组织中广泛表达，尽管表达水平相对较低（图 3），并且 *SUFE* 不同基因成员在转录水平对缺铁胁迫的响应情况较为复杂，且差异明显（图 4），这些结果表明同一基因家族不同成员之间的表达模式具有较强的组织特异性。已有研究表明，*AtSUFE2* 表达具有花特异性，在拟南芥花粉中大量表达^[20,24]。由此测，葡萄 *SUFE2* 可能也有类似特殊的功能，即参与葡萄花粉的发育，但需要进一步的后续功能验证。*CIA* 基因家族编码 WD40 蛋白、DUF59 功能域，在细胞质 *CIA* 装配机制中发挥重要功能^[11-14]，本研究中发现 *CIA1* 仅在‘马瑟兰’成年葡萄果实和叶片中检测到表达量，*CIA2* 在所有检测组织中均没有表达，而 *CIA3* 在所有检测组织中的表达量较为均匀（图 3），且仅有 *CIA1* 在幼苗根部受缺铁胁迫强烈诱导外，*CIA* 家

族基因在不同组织中易受缺铁胁迫抑制而降低（图 4），再次表明同一基因家族不同成员之间的表达模式具有较强的组织特异性，也暗示葡萄 *CIA* 基因功能的发挥依赖于适量的铁素供应。此外，*SUFB*、*SUFC*、*SUFD*、*NFUI-4*、*ISU1*、*NBP35-1* 和 *NBP35-2* 等支架蛋白编码基因在‘马瑟兰’葡萄不同组织中的表达量较为适中，且易受缺铁胁迫调控，再次暗示这 10 个基因直接参与葡萄 Fe-S 簇装配机制。

4 结论

从葡萄中克隆并鉴定了 46 个 Fe-S 簇装配基因，其在葡萄果实和叶片发育不同时期的表达水平差异很大，并在葡萄幼苗中对缺铁胁迫在转录水平的响应差异显著；*ISU1* 在葡萄所有组织中的整体表达量较高，且葡萄 *ISU1* 和番茄 *ISU1* 之间的遗传进化距离最为接近，推测 *ISU1* 在葡萄铁代谢方面可能发挥关键作用。

参考文献 References

[1] 李俊成, 于慧, 杨素欣, 冯献忠. 植物对铁元素吸收的分子调控机制研究进展. 植物生理学报, 2016, 52(6): 835-842.

LI J C, YU H, YANG S X, FENG X Z. Research progress of molecular regulation of iron uptake in plants. Plant Physiology Journal, 2016, 52(6): 835-842. (in Chinese)

[2] BARTON L L, ABADIA J. Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms. Springer-Verlag, New York, 2006: 85-101.

[3] COUTURIER J, TOURAINE B, BRIAT J F, GAYMARD F,

- ROUHIER N. The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: Current knowledge and open questions. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 259.
- [4] TAGLIAVINI M, ABADÍA J, ROMBOLÀ A D, ABADÍA A, TSIPOURIDIS C, MARANGONI B. Agronomic means for the control of iron deficiency chlorosis in deciduous fruit trees. *Journal of Plant Nutrition*, 2000, 23(11/12): 2007-2022.
- [5] JIMÉNEZ S, GOGORCENA Y, HÉVIN C, ROMBOLÀ A D, OLLAT N. Nitrogen nutrition influences some biochemical responses to iron deficiency in tolerant and sensitive genotypes of *Vitis*. *Plant and Soil*, 2007, 290(1): 343-355.
- [6] CHEN Y, BARAK P. Iron Nutrition of pants in calcareous soils. *Advances in Agronomy*, 1982, 35: 217-240.
- [7] PESTANA M, BEJA P, CORREIA P J, DE VARENNES A, FARIA E A. Relationships between nutrient composition of flowers and fruit quality in orange trees grown in calcareous soil. *Tree Physiology*, 2005, 25(6): 761-767.
- [8] NETZ D J A, MASCARENHAS J, STEHLING O, PIERIK A J, LILL R. Maturation of cytosolic and nuclear iron-sulfur proteins. *Trends in Cell Biology*, 2013, 24(5): 303-312.
- [9] BALK J, LOBRÉAUX S. Biogenesis of iron-sulfur proteins in plants. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(7): 324-331.
- [10] 杜璟, 李艳纯, 任雪莹, 谭国强, 吕建新. 真核细胞中铁硫簇的组装机制及相关铁硫蛋白疾病. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(9): 1323-1333.
- DU J, LI Y C, REN X Y, TAN G Q, LÜ J X. Mechanisms of iron-sulfur clusters assemble in eukaryotes and related diseases. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2015, 37(9): 1323-1333. (in Chinese)
- [11] LILL R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, 2009, 460(7257): 831-838.
- [12] BALK J, PILON M. Ancient and essential: The assembly of iron-sulfur clusters in plants. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(4): 218-226.
- [13] JOHNSON D C, DEAN D R, SMITH A D, JOHNSON M K. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry*, 2005, 74: 247-281.
- [14] LILL R, MÜHLENHOFF U. Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: Components and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2006, 22: 457-486.
- [15] ROUAULT T A, TONG W H. Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends in Genetics*, 2008, 24(8): 398-407.
- [16] BERNARD D G, NETZ D J A, LAGNY T J, PIERIK A J, BALK J. Requirements of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly pathway in *Arabidopsis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2013, 368(1622): 20120259.
- [17] LIANG X J, QIN L, LIU P W, WANG W H, YE H. Genes for iron-sulphur cluster assembly are targets of abiotic stress in rice, *Oryza sativa*. *Plant, Cell & Environment*, 2014, 37(37): 780-794.
- [18] QIN L, WANG M H, CHEN L Y, LIANG X J, WU Z G, LIN Z H, ZUO J, FENG X Y, ZHAO J, LIAO H, YE H. Soybean Fe-S cluster biosynthesis regulated by external iron or phosphate fluctuation. *Plant Cell Reports*, 2015, 34(3): 411-424.
- [19] SONG Z Z, MA R J, ZHANG B B, GUO S L, YU M L, KORIR N K. Differential expression of iron-sulfur cluster biosynthesis genes during peach fruit development and ripening, and their response to iron compound spraying. *Scientia Horticulturae*, 2016, 207: 73-81.
- [20] SONG Z Z, YANG Y, XU J L, MA R J, YU M L. Physiological and transcriptional responses in the iron-sulphur cluster assembly pathway under abiotic stress in peach (*Prunus persica* L.) seedlings. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2014, 117(3): 419-430.
- [21] 王壮伟, 王庆莲, 夏瑾, 王西成, 宋志忠, 吴伟民. 葡萄 KEA 家族基因的克隆、鉴定及表达分析. *中国农业科学*, 2018, 51(23): 4522-4534.
- WANG Z W, WANG Q L, XIA J, WANG X C, SONG Z Z, WU W M. Cloning, characterization and expression analysis of K⁺/H⁺ antiporter genes in grape. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(23): 4522-4534. (in Chinese)
- [22] 沈静沅, 唐美玲, 杨庆山, 高雅超, 刘万好, 程杰山, 张洪霞, 宋志忠. 葡萄钾离子通道基因 VviSKOR 的克隆、表达及电生理功能. *中国农业科学*, 2020, 53(15): 3158-3168.
- SHEN J Y, TANG M L, YANG Q S, GAO Y C, LIU W H, CHENG J S, ZHANG H X, SONG Z Z. Cloning, expression and electrophysiological function analysis of potassium channel gene VviSKOR in grape. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(15): 3158-3168. (in Chinese)
- [23] DENG W K, WANG Y B, LIU Z X, CHENG H, XUE Y. HemI: A toolkit for illustrating heatmaps. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): e11988.
- [24] MURTHY U M N, OLLAGNIER-DE-CHOUDENS S, SANAKIS Y, ABDEL-GHANY S E, ROUSSET C, YE H, FONTECAVE M, PILON-SMITS E A H, PILON M. Characterization of *Arabidopsis thaliana* SufE2 and SufE3: Functions in chloroplast iron-sulfur cluster assembly and Nad synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(25): 18254-18264.

(责任编辑 赵伶俐)