



葡萄*NCED*基因家族进化及表达分析

王小龙, 刘凤之, 史祥宾, 王孝娣, 冀晓昊, 王志强, 王宝亮, 郑晓翠, 王海波*

中国农业科学院果树研究所, 农业部园艺作物种质资源利用重点实验室, 辽宁省落叶果树矿质营养与
肥料高效利用重点实验室, 兴城 125100

摘要 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(*NCED*)是植物体内ABA生物合成的关键限速酶, 参与植物对干旱、外源ABA和高盐的响应过程, 降低环境胁迫对植株的危害。基于全基因组鉴定分析葡萄(*Vitis vinifera*) *NCED*基因家族成员, 探讨各成员的物种进化关系及各个基因成员在不同组织中的时空表达模式及对干旱、ABA和高盐(NaCl)胁迫的响应, 为进一步揭示该基因家族成员的生物学功能奠定基础。在葡萄基因组中共发现12个*NCED*基因。其推测的编码蛋白质长度在510 (Vv*NCED2*)–625 aa (Vv*NCED10*)之间。Vv*NCED*蛋白的分子量最大值是70.53 kDa (Vv*NCED10*), 最小值是57.85 kDa (Vv*NCED2*)。在从祖先基因分化之后, 葡萄*NCED*基因发生了5次复制事件, 同时有2次丢失事件。*NCED1/2*、*NCED3/4*、*NCED6/7*和*NCED9/10*基因对被认为是通过片段复制产生。上述4对复制基因复制时间分布在3.08–120.0百万年前, 晚于单子叶植物分化的时间。与对照相比, Vv*NCED1*在ABA处理48小时后显著上调(72.1%), 而Vv*NCED2*显著下调(84.0%)。Vv*NCED6*只在干旱处理14、21和28天的根系中表达量高于对照, 分别为对照的2.49、1.05和1.09倍。Vv*NCED7*只在干旱处理14天的根系中表达量高于对照, 为对照的1.07倍。在ABA处理72小时后, Vv*NCED3*表达量较对照显著下调(59.5%), 而Vv*NCED4*较对照显著上调(169.9%)。Vv*NCED3*/Vv*NCED4*分别在NaCl处理24和48小时出现显著性峰值, 较对照分别上调219.2%和114.4%。保守结构域不同组成和不同胁迫处理下差异表达模式是*NCED*蛋白发生功能分化的基础。推测*NCED*在进化过程中发生的分化有利于复制事件的发生。

关键词 *NCED*基因家族, 葡萄, 非生物胁迫, 基因表达

王小龙, 刘凤之, 史祥宾, 王孝娣, 冀晓昊, 王志强, 王宝亮, 郑晓翠, 王海波 (2019). 葡萄*NCED*基因家族进化及表达分析. 植物学报 54, 474–485.

近年来, 超过10%的耕地遭受干旱和高盐等环境胁迫, 由于土壤含水量低导致植物光合作用及有效养分下降, 从而引起全球作物产量损失50%以上 (Roychoudhury et al., 2013)。脱落酸(ABA)在植物生命周期、胁迫信号调节及内源性提示, 包括水分限制、种子发育、休眠和性别等方面发挥重要作用 (McAdam and Brodribb, 2015; McAdam et al., 2016), 一直被认为是通用的胁迫激素 (Raghavendra et al., 2010)。9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, *NCED*)能够切割质体中的C40 9-顺式-环氧类胡萝卜素, 以释放C15的中间体黄原胶毒素。这一步骤是ABA生物合成途径中的限速步骤,

在叶片与空气蒸气压差较大时, 至少1个编码9-顺式-环氧类胡萝卜素限速酶的*NCED*基因会快速显著上调表达 (Sussmilch et al., 2017)。大多数植物都含有1个受干旱胁迫诱导的*NCED*基因, 它的表达水平与响应干旱而积累的ABA含量相关, 是ABA生物合成的关键基因。此外, Ahrazem等(2012)研究表明, 番红花 (*Crocus sativus*)中*CstNCED*基因受盐、低温、干旱和外源ABA等非生物胁迫的诱导表达。Wang等(2018)研究表明, 梅花 (*Prunus mume*)中*PmNCED1*基因的表达量与PEG胁迫相关, 并随处理时间的增加而升高。徐学中等(2018)的研究证明水稻 (*Oryza sativa*)中*OsNCED*基因在ABA合成和抗旱方面发挥重要作用。

收稿日期: 2018-09-19; 接受日期: 2019-01-15

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(No.nycyt-x-29-zp)、国家科技支撑项目(No.2014BAD16B05-2)、中国农业科学院创新工程(No.CAAS-ASTIP-2017-RIP-04)和农业部948重点项目(No.2011-G28)

* 通讯作者。E-mail: haibo8316@163.com

在植物体中, 干旱胁迫通过大量表达 *NCED* 基因提高内源ABA水平, 促使大量ABA诱导基因表达; 而ABA则通过调节离子通道的活性以促进气孔闭合, 这样可减少叶表面的蒸腾作用进而防止水分过度流失。

目前, 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻和烟草(*Nicotiana tabacum*)基因组中分别发现9、5和18个 *NCED* 基因(白戈等, 2017; 徐学中等, 2018)。葡萄(*Vitis vinifera*)属于葡萄科(Vitaceae)葡萄属多年生落叶藤本植物, 作为四大水果之一, 目前全世界葡萄栽培面积已超过1 000 hm², 年产量约6.8×10⁷ t, 占世界水果总产量的1/4。我国地域广阔, 土壤和气候条件差异大, 存在多种不利自然条件。例如, 病虫害及干旱、高温、多湿和盐碱, 严重影响我国葡萄产业的发展。因此, 明确ABA的生物合成关键基因 *NCED* 是否与植物抗逆性有关对于葡萄优质高产具有重要意义。本研究全面分析了 *NCED* 基因的扩增模式、基因结构、保守结构域分布和功能分化, 以期对葡萄中该基因功能的鉴定及应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 葡萄 *NCED* 基因鉴定

为鉴定葡萄黑比诺(*Vitis vinifera* cv. 'PN40024')全基因组(v2.1)中 *NCED* 基因家族成员, 从CRIBI数据库(<http://genomes.cribi.unipd.it/grape/>)中获得其基因组数据。首先将拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)中9个和水稻(*Oryza sativa* L.)中5个 *NCED* 氨基酸序列作为索引, 通过BioEdit (v7.0.9.0)进行本地Blastp, 阈值设定为≤1.0E⁻¹⁰。其次, 将上述输出序列通过在线软件Pfam 31.0 (<http://pfam.xfam.org/>)和Batch Web CD-Search Tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)鉴定 *NCED* 蛋白特定结构域(PF03055), 其阈值设定为E<1.0。最后, 去除冗余、结构域不完整和错误序列, 其余序列可视为Vv*NCED*基因序列。候选Vv*NCED*氨基酸的数目、分子量、等电点及亲水性等理化性质均来源于ExPASy网站(<http://web.expasy.org/protparam/>)。基因在染色体上的定位信息来自基因组中GFF3数据。

1.2 *NCED* 基因的系统发育、基因结构及结构域分析

葡萄、拟南芥和水稻中的 *NCED* 氨基酸序列通过

MEGA 7.0软件中的Clustal W序列比对和NJ (neighbor-joining)法构建系统发育树。NJ分析时选择No. of difference、1 000次bootstrap和pairwise deletion等程序来支撑系统发育树中的每个节点。将进化树中出现的直系同源基因对(节点值≥90)定义为复制基因对。其中, 基因对位于同一条染色体上且基因对之间距离小于100 kb被定义为串联复制, 其它被定义为片段复制。通过在线网站PGDD (<http://chibba.agt-ec.uga.edu/duplication/>)计算复制基因对的K_s值, 根据公式 $T=K_s/2\lambda\times 10^{-6}$ Mya (葡萄的λ值为6.5×10⁻⁹)计算复制基因对复制事件的发生时间(T) (Gaut et al., 1996)。

包含内含子相位的基因结构通过在线网站GSDS (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)完成。Vv*NCED*蛋白中保守结构通过在线网站MEME (<http://meme-suite.org/>)提取, 其相关参数the largest number of discovered and conserved motif设定为8; motif width设定在30–50个氨基酸之间; 其它参数为默认设置。

1.3 *NCED* 基因的表达分析

通过在线网站GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>)下载标准化转录表达数据(Fasoli et al., 2012), 分析 *NCED* 基因在54种不同组织中的表达特征(GSE-36128)。使用本地序列BLAST, 比对候选 *NCED* 基因相应的探针, 探针序列来自Affymetrix网站(<http://www.affymetrix.com>)。采用MeV (v4.9.0)软件构建热图(Saeed et al., 2006)。

非生物胁迫处理: 选取以贝达为砧木盆栽的巨峰葡萄, 待其新梢长出10–12片叶时进行ABA (0.1 mmol·L⁻¹)、NaCl (200 mmol·L⁻¹)和干旱处理, 其中ABA处理采取叶片喷施, 直至滴水; NaCl处理采取根灌方式, 直至饱和, 分别在处理前(对照)及处理后24、48和72小时取功能叶(新梢底部向上3–5片叶位置)。干旱处理为自然干旱, 分别在处理前(对照、0天和D1)以及处理7 (D2)、14 (D3)、21 (D4)和28 (D5)天取功能叶和根系, 并在北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行转录组测序分析。每个处理均设3次生物学重复。

使用北京华越洋生物科技有限公司RNA提取试剂盒提取葡萄叶片总RNA, 之后用TaKaRa试剂盒将总RNA反转录成cDNA, -20℃保存备用。利用Beacon Designer 7软件根据葡萄 *NCED* 家族基因预

测的mRNA设计其特异性引物。所用引物由上海英骏生物技术有限公司(Invitrogen)合成。基因名称和引物序列见表1。qRT-PCR按照SYBR Green 试剂盒(TaKaRa公司)说明书操作,反应在Mx3005p荧光定量PCR仪(Stratagene, 美国)上进行。每个样品设3次技术重复。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达量(Ye et al., 2009)。使用Excel 2007和SPASS 23软件进行数据整理、图表绘制和差异显著性检验(Duncan's)。

2 结果与讨论

2.1 葡萄NCED基因的鉴定和特征分析

我们在葡萄基因组中共发现12个NCED基因。由表2可知, VvNCED基因所编码的氨基酸残基数在510 (VvNCED2)–625 aa (VvNCED10) 之间, 平均为

580 aa。VvNCED蛋白的分子量最大值是70.53 kDa (VvNCED10), 最小值是57.85 kDa (VvNCED2); 等电点分布在5.57 (VvNCED5)–8.24 (VvNCED8)之间; 亲水性最大值是–0.187 (VvNCED4), 最小值是–0.365 (VvNCED7)。在第4号染色体上分布的NCED基因最多(3个), 分别为NCED9、NCED10和NCED11; 其次是13号和2号染色体, 均有2个NCED基因分布; 在5、10、15、16和19号染色体上各只有1个NCED基因分布。

2.2 葡萄、拟南芥和水稻中NCED基因扩增模式

为探究NCED基因在葡萄、拟南芥和水稻中的扩增模式, 我们构建了上述3个物种NCED基因的系统发育树(图1)。由图1可知, 能够形成葡萄、拟南芥和水稻NCED基因特异性亚家族的分化节点共有9个, 该特

表1 RT-PCR分析所用引物序列
Table 1 The primer sequences used for quantitative RT-PCR

Gene name	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
VvNCED1	GCTGGAGAAGCTGATAGTGAAG	GAAGATACCCAATGACCGGAAG
VvNCED2	GGCACTTTCGGAGGTTGATAA	TGGATGAGCAGTGAAGGAATG
VvNCED3	CGGTGGAGATGGTGAGAATAGA	CACTGCTGCGTACACGTATTT
VvNCED4	CTCAGCAGTAGGTGATCCTTTG	CAGGCTCGTACATTCTCTTAGC
VvNCED6	CTCGTGATTTGGGCTCTTTCT	GCTTGATGATGTGTGCTTTGG
VvNCED7	CGCTCTTCTTCTTCTACTAC	GGCGTTCCTCTTCTACTATTG
VvNCED9	CCATGGACTTCCCGATGATAAA	ATCCCACAAGTAGAGCTTGC
VvNCED10	CAGGGAGGTGTTGAAGAAGATG	CCCTTTGAGGCAGTGTGATT
VvActin	TACAATTCCATCATGAAGTGTGATG	TTAGAAGCACTTCTGTGAACAATG

表2 葡萄候选NCED基因及其详细信息
Table 2 NCED genes identified in grapevine and their detailed information

Gene name	Accession No.	Chromosome location (start, end)	Length of amino acids (aa)	Molecular weight (kDa)	Theoretical pI	GRAVY
VvNCED1	VIT_213s0064g00840.1	Chr.13 (22672994, 22681910)	546	61.63	6.13	–0.271
VvNCED2	VIT_213s0064g00810.1	Chr.13 (22587965, 22596719)	510	57.85	6.23	–0.250
VvNCED3	VIT_202s0087g00910.1	Chr.2 (18560696, 18562591)	599	65.90	6.88	–0.236
VvNCED4	VIT_202s0087g00930.1	Chr.2 (18588853, 18590786)	589	65.61	6.63	–0.187
VvNCED5	VIT_216s0039g01370.1	Chr.16 (789473, 791221)	558	62.09	5.57	–0.197
VvNCED6	VIT_219s0093g00550.1	Chr.19 (17645348, 17647649)	609	67.13	6.38	–0.317
VvNCED7	VIT_210s0003g03750.1	Chr.10 (6374432, 6376728)	605	67.34	6.36	–0.365
VvNCED8	VIT_205s0051g00670.1	Chr.5 (11589343, 11591102)	575	63.14	8.24	–0.202
VvNCED9	VIT_204s0008g03510.1	Chr.4 (2883265, 2886523)	567	63.72	5.73	–0.335
VvNCED10	VIT_204s0008g03480.1	Chr.4 (2873553, 2878309)	625	70.53	6.43	–0.305
VvNCED11	VIT_204s0008g03380.1	Chr.4 (2784465, 2788790)	563	62.34	7.27	–0.339
VvNCED12	VIT_215s0021g02190.1	Chr.15 (13131078, 13135539)	610	68.46	7.31	–0.313

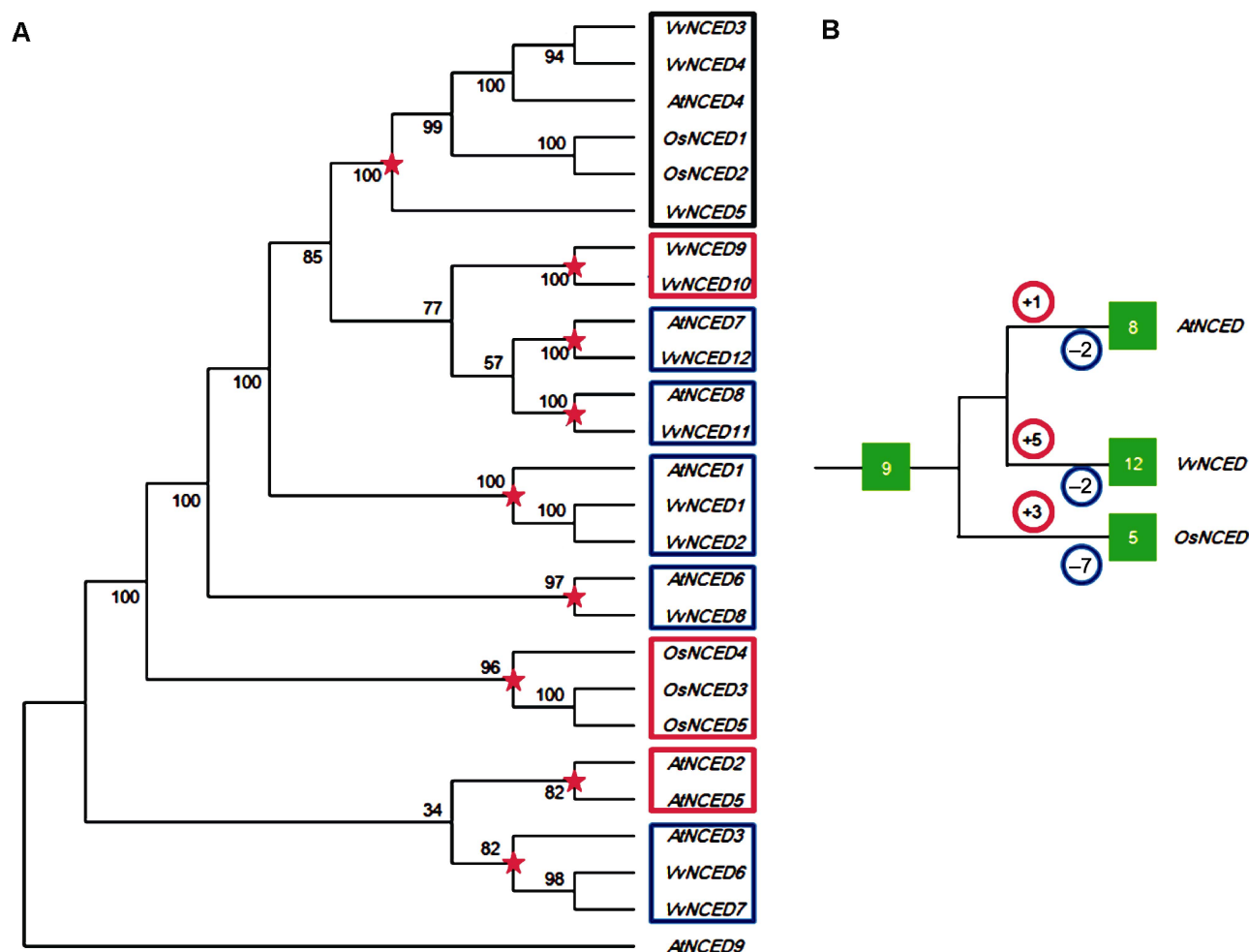


图1 葡萄、拟南芥和水稻*NCED*基因系统发育树(A)和扩增模式(B)

图中红色五角星代表物种分化前最近的共同祖先分化节点。红色和蓝色圆圈内的数字分别代表该物种在分化节点后发生的复制和丢失事件次数。绿色实心方框内的数字代表*NCED*基因的个数。

Figure 1 Joint phylogenetic tree (A) and amplification model (B) of *NCED* gene from grape, *Arabidopsis* and rice

The red five-pointed stars in the figure represent the most recent common ancestral differentiation node before species differentiation. The numbers in the red and blue circles represent the number of duplication and loss events that occur after the species differentiated nodes, respectively. The numbers in the green solid box represent the number of *NCED* genes.

异性分化节点代表*NCED*基因在3个物种分化前最近的共同祖先(most recent common ancestors, MRCAs)。其中,一些*NCED*基因在MRCAs出现之前就存在(黑色方框内),但是部分特异性物种的*NCED*基因会发生丢失事件。在分化节点之后,仅含有葡萄、拟南芥或水稻特异性物种*NCED*基因均只有1组(红色方框内);仅含有葡萄和拟南芥的*NCED*基因有5组(蓝色方框内)。由图1和图2可知,9个特异性分化节点说明在葡萄、拟南芥和水稻分化前至少存在9个祖先*NCED*基因。从祖先基因

分化之后,水稻*NCED*基因发生丢失事件最多(7次),其次是拟南芥和葡萄(均为2次);此外,葡萄*NCED*基因发生的复制事件最多(5次),其次是水稻(3次),拟南芥最少(1次)。

2.3 葡萄*NCED*基因结构和复制事件

根据Vv*NCED*氨基酸全长序列构建的系统发育树结构和bootstrap值(>60%),可将Vv*NCED*基因分成3个亚家族,分别命名为亚家族1、2和3,其成员分别为8、2和2个(图2A)。在12个Vv*NCED*基因中,我们发现5

对旁系同源基因中有4对所对应的bootstrap值 $\geq 99\%$ 。此外,亚家族3所对应的支长较其它亚家族长,且位于系统发育树的外围,这说明亚家族3的起源相对古老。为进一步验证亚家族分类的准确性,我们对*VvNCED*基因结构进行了分析。结果(图2B)表明,旁系同源基因对*VvNCED6/VvNCED7*与*VvNCED3/VvNCED4*基因结构相同,均不含启动子;*VvNCED1/VvNCED2*内含子数量最多,均有13个,且内含子相位分布相同;*VvNCED9/VvNCED10*在*VvNCED*基因特异结构域(RPE65)中的内含子数量和相位分布相同,但是在该结构域的上游编码区序列中*VvNCED9*较*VvNCED10*少1个内含子;*VvNCED11/VvNCED12*的内含子数量和相位分布完全不同。

经比对*VvNCED1/VvNCED2*、*VvNCED3/VvNCED4*、*VvNCED6/VvNCED7*和*VvNCED9/VvNCED10*的核苷酸,发现其identity值较高($>70\%$),分别为89.80%、74.10%、72.50%和75.30%,由此可认为这4个基因对是通过复制事件产生。根据表1染色体定位信息可以推断上述基因对均为片段复制。根据

identity值可以推断基因对复制事件的发生时间由早到晚依次为:*VvNCED6/VvNCED7*、*VvNCED3/VvNCED4*、*VvNCED9/VvNCED10*和*VvNCED1/VvNCED2*。为证明上述假设,我们计算了这4组基因对所对应的*K_s*值,分别为1.56、0.85、0.48和0.04,据此推算出其复制时间依次为120.0、65.38、36.92和3.08百万年前。

2.4 葡萄NCED蛋白保守结构域

为进一步探明*VvNCED*基因的分化规律,我们鉴定出该蛋白保守结构域组成。由图3可知,*VvNCED*蛋白保守结构域的分布和组成规律基本符合系统发育树(图2)中亚家族的分类关系。例如, Motif1和Motif3只存在于亚家族1中; Motif9、Motif11、Motif12、Motif14和Motif15只存在于亚家族2中; Motif6和Motif8在各亚家族中均有出现; Motif2、Motif4、Motif5和Motif7同时存在于亚家族1和亚家族2中。此外, Motif10和Motif13只存在于亚家族1的NCED6、NCED7和NCED8中。

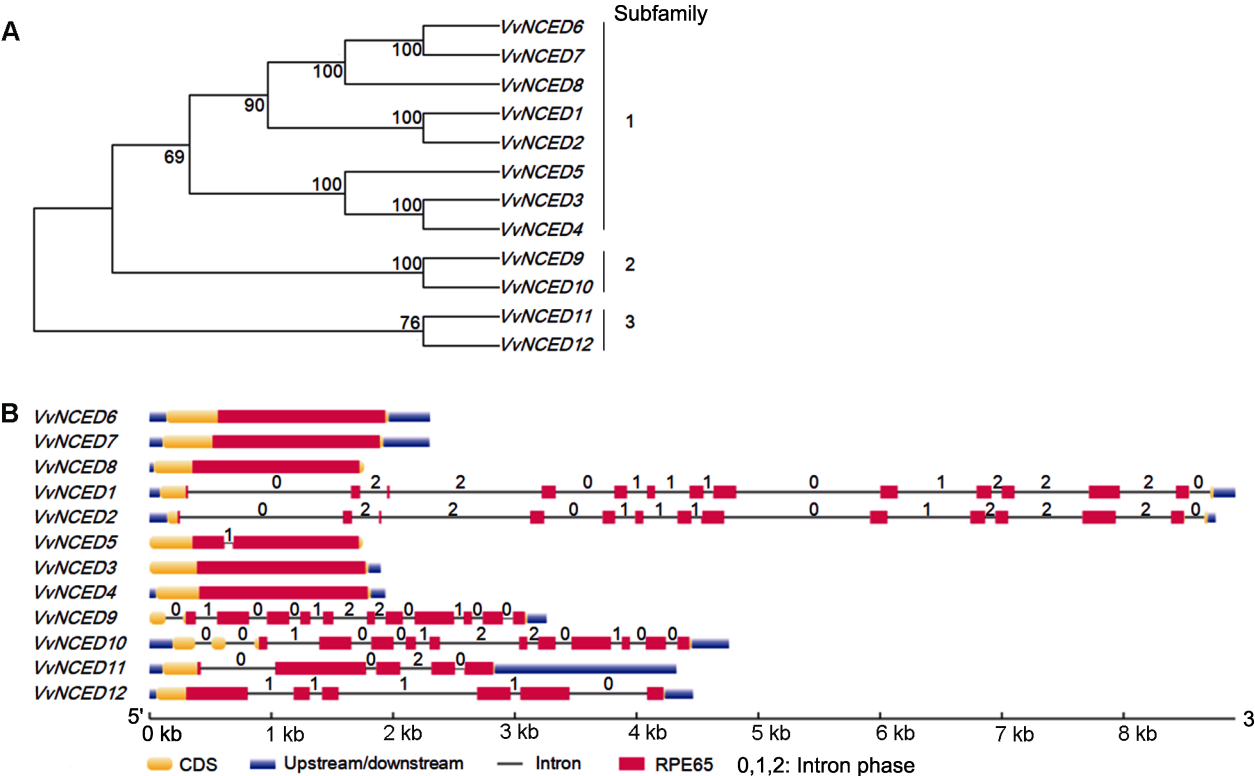


图2 葡萄NCED基因系统发育关系(A)和基因结构(B)

Figure 2 Phylogenetic relationship (A) and gene structure (B) of grape NCED genes

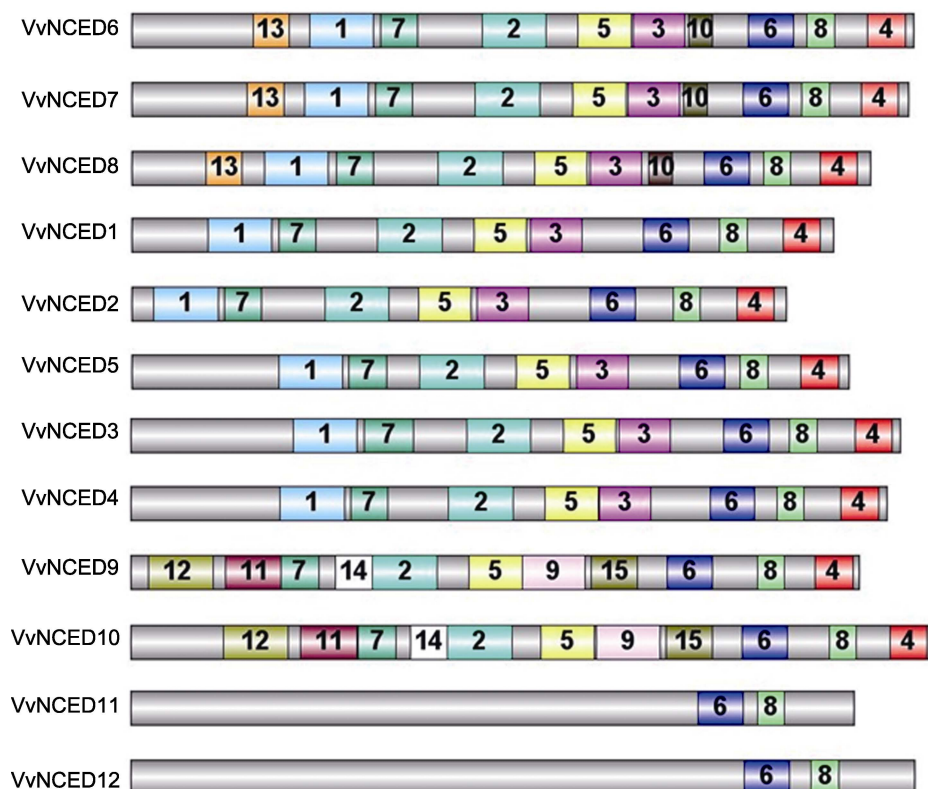


图3 葡萄NCED蛋白保守结构域示意图

灰色条形框代表NCED蛋白全长, 其它彩色框中的数字是NCED蛋白保守结构域的随机编号。相同的数字代表相同的结构域。

Figure 3 Schematic structure of conserved motifs identified in grapevine NCED proteins

The grey bars represent the full length of NCED proteins, and the numbers in the other colored boxes are random numbers for the conserved domains located at NCED protein. The same number represents the same conserved domain.

2.5 葡萄NCED基因组织特异性表达

由图4可知, *VvNCED* 基因家族成员在葡萄器官和组织发育的不同阶段具有广泛的表达模式, 且复制基因对在表达过程中出现不同程度的功能分化。*VvNCED6* 和 *VvNCED7* 基因在花、种子、花轴、卷须、叶片、茎和芽中表达模式相似, 均维持在较高水平; 然而, *VvNCED6* 基因在果肉成熟期(BerryFlesh-R)、采后枯萎1个月(BerryFlesh-PHWI)和采后枯萎2个月(BerryFlesh-PHWII)时的表达水平明显低于 *VvNCED7*。*VvNCED2* 基因在所有的器官和组织中均有较高的表达水平; *VvNCED1* 基因在大部分器官和组织中的表达水平均低于 *VvNCED2* 基因。*VvNCED3* 在各器官和组织中的表达量均较高, 而 *VvNCED4* 在个别器官中表达量较低, 如花瓣(petal)、花粉(pollen)和心皮(carpel)。亚家族2中 *VvNCED9* 与 *VvNCED10* 基因和亚家族3中 *VvNCED11* 与 *VvNCED12* 基因在54

种器官和组织中的表达量明显低于亚家族1中的其它成员。由此可见, 旁系同源 *NCED* 基因在组织发育过程中发挥不同程度的作用, 尤其是在亚家族之间的功能差异更明显。

2.6 葡萄NCED基因干旱胁迫响应

图5显示, *VvNCED* 基因在叶片和根系中均对干旱有不同程度的响应。亚家族1中除 *VvNCED5/8* 外, 其它各成员均在叶片或根系中具有较高的表达量。*VvNCED6* 在叶片和根系中均大量表达, 但只有在D3、D4和D5干旱处理下的根系中表达量高于对照, 其表达量分别为对照的2.49、1.05和1.09倍。*VvNCED7* 在根系中的表达量显著高于相同干旱处理的叶片, 其中只有在D3干旱处理下的根系中表达量高于对照, 其表达量为对照的1.07倍。*VvNCED1/2* 在叶片中的表达量均显著高于根系, 且干旱处理后在叶片中显著上调表达

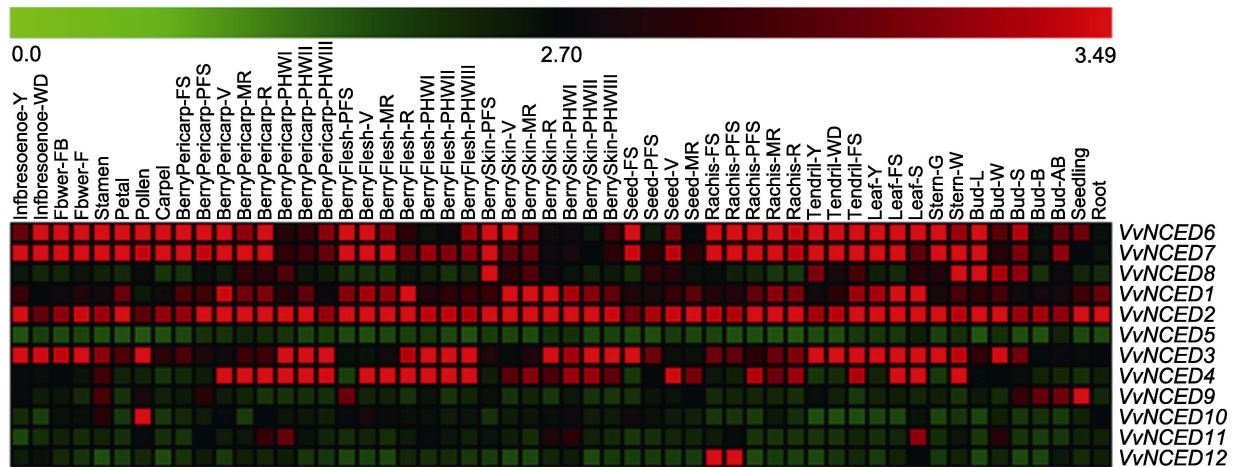


图4 *NCED*基因在葡萄不同发育阶段和组织中的表达模式
54种组织名称和基因名称分别位于热图的上方和右侧。热图上方比例尺表示基因表达量0.0–3.49。

Figure 4 Expression pattern of *NCED* genes at different developmental stages and in some specialized tissues of grapevine
The 54 tissue names and gene names are located above and to the right of the heat map, respectively. The scale bar above the heat map indicates the gene expression level from 0.0 to 3.49.

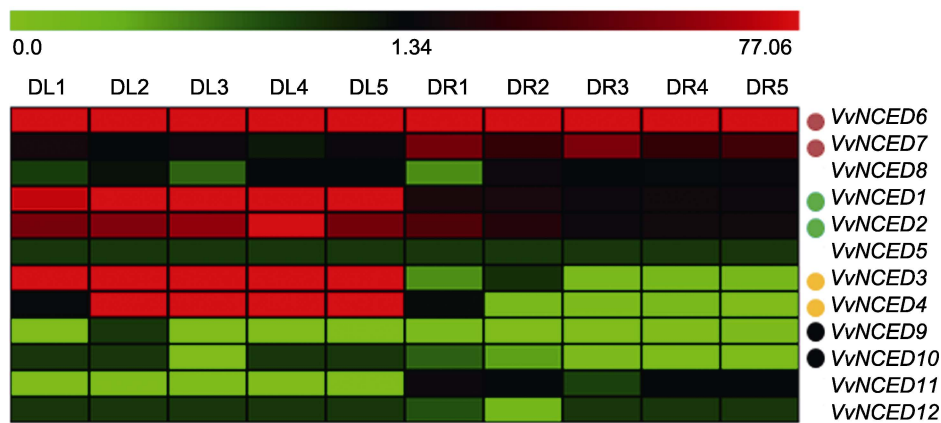


图5 葡萄*NCED*基因在干旱条件下的表达模式
干旱处理名称(DL1–DL5分别表示干旱处理0、7、14、21和28天叶组织; DR1–DR5分别表示干旱处理0、7、14、21和28天根组织)和基因名称分别位于热图的上方与右侧。热图上方比例尺表示基因表达量0.0–77.06。相同颜色的实心圆点代表复制基因对。

Figure 5 Expression pattern of grapevine *NCED* genes under drought treatments
The drought treatments (DL1–DL5 indicate drought treatment for 0, 7, 14, 21 and 28 days of leaf tissue, respectively; DR1–DR5 indicate drought treatment for 0, 7, 14, 21 and 28 days of root tissue, respectively) and gene names are located above and to the right of the heat map, respectively. The scale bar above the heat map indicates the gene expression level from 0.0 to 77.06. Solid dots of the same color represent duplicated gene pairs.

(*VvNCED2*在D5干旱处理下除外), 在根系中显著下调表达。*VvNCED1/2*在D2、D3、D4和D5干旱处理条件下叶片中的表达量分别是对照的1.85/1.09、1.24/1.18、3.13/1.26和1.58/0.99倍。*VvNCED3/4*表达模式与*VvNCED1/2*类似, 在叶片中表达量显著高于根系; 但干旱条件下只有*VvNCED4*在叶片中的表

达量一直高于对照, 分别是对照的60.54、78.73、202.13和31.04倍, 而*VvNCED3*只有在D2和D4干旱处理下的叶片中表达量高于对照, 分别为对照的2.37和2.80倍。亚家族2的*VvNCED9/10*和亚家族3的*VvNCED11/12*在叶片和根系中的表达量均维持在较低水平。由此表明, 在干旱胁迫响应过程中, *VvNCED*

基因的功能差异不仅出现在同源基因对之间, 而且在亚家族之间也很明显。

为探明 *NCED* 复制基因对在进化过程中的功能分化, 我们以 *VvNCED6/VvNCED7*、*VvNCED3/VvNCED4* 和 *VvNCED1/VvNCED2* 为研究对象进行检测。由图6可知, *NCED* 复制基因对对 ABA 的响应模式既有相似性, 也有特异性。例如, *VvNCED1/VvNCED2* 表达量均在 ABA 处理 24 小时后出现峰值, 分别为对照的 2.10 和 1.74 倍; 与对照相比, *VvNCED1* 在

ABA 处理 48 小时后显著上调 72.09%, 而 *VvNCED2* 显著下调 84.04%。*VvNCED3/VvNCED4* 表达量均在 ABA 处理 24 小时显著上调, 较对照分别上调 51.04% 和 159.32%; ABA 处理 72 小时, *VvNCED3* 表达量较对照显著下调 59.47%, 而 *VvNCED4* 较对照显著上调 169.89%。*VvNCED6/VvNCED7* 表达模式具有明显特异性, *VvNCED6* 在 ABA 处理后均显著上调, 而 *VvNCED7* 一直表现下调。与对照相比, *VvNCED9/VvNCED10* 在 ABA 处理 24 和 72 小时出现显著性峰值,

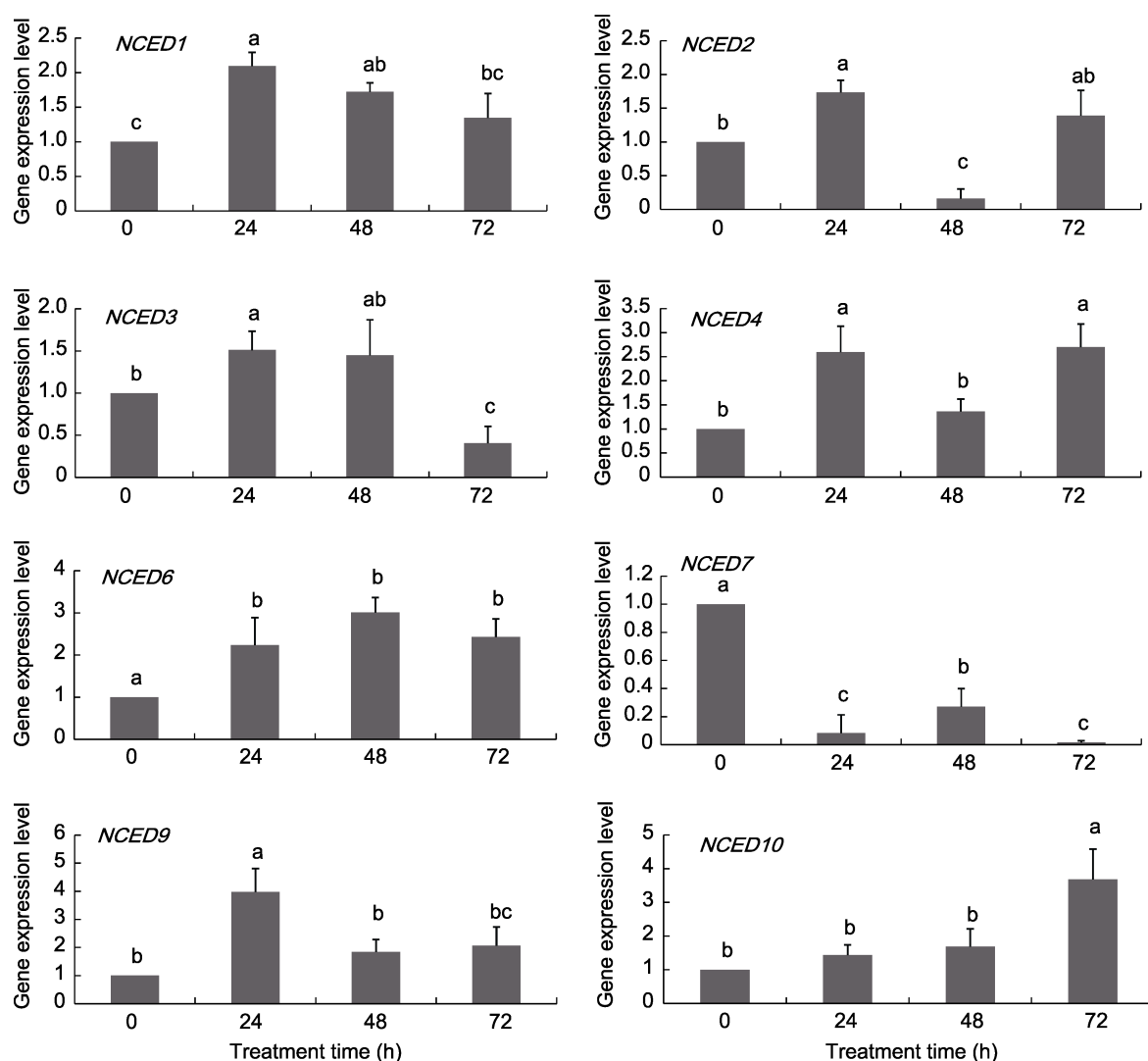


图6 葡萄 *NCED* 基因在 ABA 处理下的表达模式
不同小写字母表示不同处理时间点之间差异显著 ($P < 0.05$)。

Figure 6 Expression pattern of grapevine *NCED* genes under ABA treatments
Different lowercase letters above the histogram indicate significant differences among the different time points of the treatment ($P < 0.05$).

分别上调298.01%和268.09%。

由图7可知,与ABA处理相似,*NCED*复制基因对响应NaCl的模式也存在相似性和特异性。*VvNCED1*在NaCl处理24和48小时出现显著上调,72小时与对照无显著差异;*VvNCED2*在处理24、48和72小时较对照分别显著上调448.45%、448.65%和305.56%。与对照相比,*VvNCED3/VvNCED4*在NaCl处理24和48小时出现显著性峰值,较对照分别上调219.19%和114.38%。*VvNCED6/VvNCED7*的表达量在NaCl

处理后出现明显差异,*VvNCED6*在各处理点的表达量较对照均显著上调,而*VvNCED7*在各处理点的表达量较对照均显著下调。与对照相比,*VvNCED9*在NaCl处理各个点均出现显著下调表达,分别下调64.62%、78.70%和96.34%;而*VvNCED10*的显著性变化仅出现在处理后48小时,其表达量较对照提高了632.36%。上述干旱、ABA和NaCl处理结果表明,复制基因对之间对不同非生物胁迫的响应模式具有明显差异。

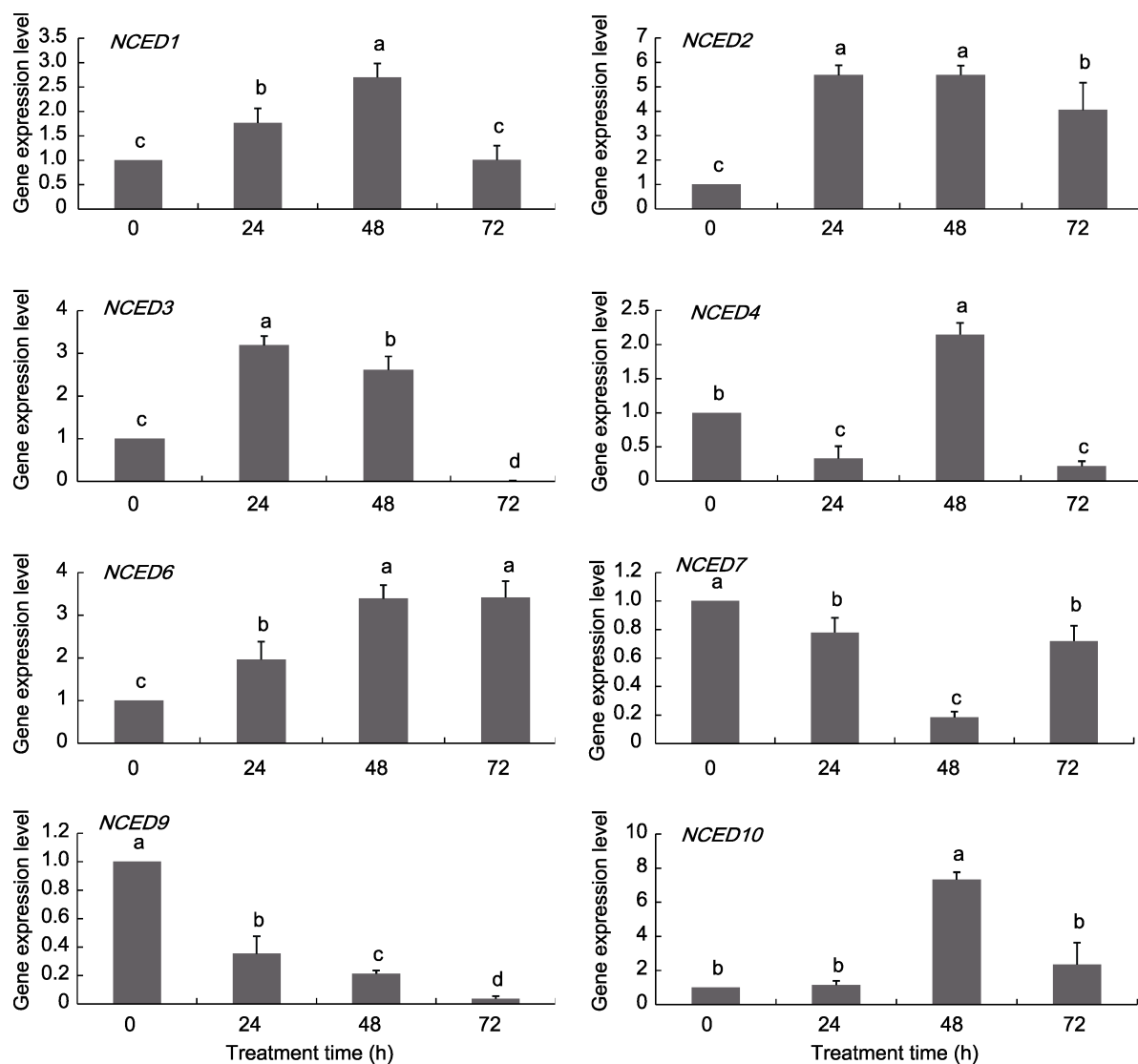


图7 葡萄*NCED*基因在NaCl处理下的表达模式
不同小写字母表示不同处理时间点之间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 7 Expression pattern of grapevine *NCED* genes under NaCl treatments
Different lowercase letters above the histogram indicate significant differences among the different time points of the treatment ($P < 0.05$).

2.7 讨论

2.7.1 葡萄 *NCED* 基因家族的扩增模式

目前葡萄单倍体基因组被认为起源于2个祖先基因组(Jaillon et al., 2007)。葡萄共有19条稳定进化的染色体结构, 它们的同源三联体由2条Vc和1条Va染色体组成, 基因顺序高度保守, 只有罕见的易位才会被中断(Giulia et al., 2012)。本研究发现4个(*NCED1/2*、*NCED3/4*、*NCED6/7*和*NCED9/10*)基因对被认为通过复制事件产生, 且均仅2个拷贝, 这可能与定位在Vc或Va染色体上的三联重复基因发生丢失有关。与Yang等(2008)的研究相似, 祖先同源连锁群往往分散在许多经过重排的染色体上, 期间基因组经历了大量基因丢失事件。上述4个旁系同源基因对的复制时间分布在3.08–120.0百万年前, 晚于单双子叶植物分化的时间(大约在150百万年前)(Chaw et al., 2004)。这表明, *NCED*基因家族的扩增主要发生在单双子叶分化之后。拟南芥、水稻和葡萄联合系统发育树的结构显示, *NCED*祖先基因在单双子叶分化前就存在。在从祖先基因分化之后, 水稻*NCED*基因发生的丢失事件最多(7次), 其次是拟南芥和葡萄(均为2次); 葡萄*NCED*基因发生的复制事件最多(5次), 其次是水稻(3次), 最少是拟南芥(1次)。本研究表明, 片段复制为*NCED*基因家族扩增作出主要贡献。

2.7.2 葡萄 *NCED* 基因功能分化

Zhang (2003)研究表明复制事件并不完全稳定, 会随着选择压变化和长时间进化历程而被固定或丢失。如果复制事件发生在有利的时间和高表达的基因中, 它们很可能会被保留; 对植物生长发育造成负面影响的复制事件将被从基因组中删除或在复制事件后发生功能分化(Guo et al., 2014)。时空表达和对各种环境压力的反应分化是基因组中重复基因得以保留的主要原因之一(Gu et al., 2002)。通过比较旁系同源基因在葡萄54种组织中的表达水平, 我们发现这些旁系同源基因对在葡萄生长发育过程中出现了功能差异。*VvNCED6*基因在果肉成熟期(Berry Flesh-R)、采后枯萎1个月(BerryFlesh-PHWI)和采后枯萎2个月(BerryFlesh-PHWII)的表达水平明显低于*VvNCED7*。Tan等(2010)通过*GUS*报告基因分析发现, *AtNCED*基因表现出更加受限的表达模式, 如拟南芥中*VvNCED6/7*的同源基因仅有*AtNCED3*能够在根系中

表达。*VvNCED2*基因在所有器官和组织中均有较高的表达水平。*VvNCED1*基因在大部分器官和组织中的表达水平均低于*VvNCED2*基因。*VvNCED3*在各器官和组织中表达量较高, 而*VvNCED4*在个别器官中表达量较低, 如花瓣(petal)、花粉(pollen)和心皮(carpel)。与之相似, 在干旱、ABA和NaCl处理条件下复制基因对之间的功能有差异。*AtNCED3* (*VvNCED6/7*的同源基因)转录水平在水分胁迫下显著升高, 而其它*AtNCED*基因表现出小幅上调。*VvNCED6/VvNCED7*的表达量在NaCl处理各时间点出现明显差异, 较对照分别显著上调和显著下调。与对照相比, *VvNCED1*在ABA处理48小时显著上调72.09%; 而*VvNCED2*则显著下调84.04%。由此可见, *VvNCED*复制基因对表达水平的多样性可能是由于葡萄*NCED*基因家族在长期进化过程中发生了功能分化。此外, 亚家族2中*VvNCED9*与*VvNCED10*在干旱处理和组织中的表达量明显低于亚家族1中的其它成员, 说明在*NCED*基因亚家族分化过程中也存在功能分化现象。

2.7.3 适应性需求推动*NCED*基因复制事件发生

划分在同一亚家族的*NCED*基因, 由于其相对保守的结构域组成, 此类结构域可能在亚家族特异性功能上发挥重要作用。*NCED*蛋白的保守结构域组成在各亚家族之间有特异性。例如, 亚家族1中特异性存在的Motif1和Motif3。亚家族1中成员(*VvNCED5*除外)在54种组织中的表达量普遍高于亚家族2和3, 说明上述成员在葡萄组织发育过程中发挥较为重要的作用, 并可能与Motif1和Motif3相关。Motif9、Motif11、Motif12、Motif14和Motif15只出现在亚家族2中, 这些结构域可能与*VvNCED9/10*基因的组织特异性表达有关, 如*VvNCED10*仅在花粉中具有较高的表达水平。亚家族3中除Motif6和Motif8外不存在其它保守结构域。Motif6和Motif8在各亚家族中均有出现; Motif2、Motif4、Motif5和Motif7同时存在于亚家族1和2中。由此可见, 保守结构域的不同组成是*NCED*蛋白发生功能分化的基础。

基因复制是物种适应性进化的主要动力。通常, 由基因复制所产生的几个拷贝基因来维持其功能特异性, 该特异性为适应环境变化提供了更大的机会(Cohen-Gihon et al., 2011)。这种适应性的分化通常反映在复制基因的表达模式上(Gu et al., 2004)。同源基因的表达可以在基因之间进行分化, 使得一个拷贝

仅在某些器官中表达,而另一个拷贝仅在其它器官中表达,即亚功能化(Adams et al., 2003)。此外,同源基因对的表达模式变化也进一步证实了这种适应性分化。例如, *VvNCED3/VvNCED4* 表达量均在ABA处理24小时出现显著上调,较对照分别上调51.04%和159.32%; ABA处理72小时, *VvNCED3* 表达量较对照显著下调59.47%,而 *VvNCED4* 较对照显著上调169.89%。*VvNCED3/VvNCED4* 在NaCl处理后出现的显著性峰值分别在24和48小时,较对照上调219.19%和114.38%。由此可见,复制基因对在响应环境胁迫时出现的差异性表达模式可能有利于进化过程中发生基因复制事件。

3 结论

本研究从葡萄全基因组中鉴定出12个*NCED*基因,发现4对复制基因对,分别为 *VvNCED1/2*、*VvNCED-3/4*、*VvNCED6/7*和*VvNCED9/10*,保守结构域不同组成和不同胁迫处理下差异表达模式是*NCED*蛋白发生功能分化的基础。由此推测*NCED*在进化过程中发生的功能分化有利于复制事件的发生。

参考文献

- 白戈, 杨大海, 姚恒, 谢贺 (2017). 烟草*NtNCED*基因的鉴定分析. 分子植物育种 15, 3907–3912.
- 徐学中, 汪婷, 万旺, 李思慧, 朱国辉 (2018). 水稻ABA生物合成基因*OsNCED3*响应干旱胁迫. 作物学报 44, 24–31.
- Adams KL, Cronn R, Percifield R, Wendel JF (2003). Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4649–4654.
- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Trapero A, Gómez-Gómez L (2012). Developmental and stress regulation of gene expression for a 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, *Cst NCED*, isolated from *Crocus sativus* stigmas. *J Exp Bot* 63, 681–694.
- Chaw SM, Chang CC, Chen HL, Li WH (2004). Dating the monocot-dicot divergence and the origin of core eudicots using whole chloroplast genomes. *J Mol Evol* 58, 424–441.
- Cohen-Gihon I, Sharan R, Nussinov R (2011). Processes of fungal proteome evolution and gain of function: gene duplication and domain rearrangement. *Phys Biol* 8, 035009.
- Fasoli M, Dal Santo S, Zenoni S, Tornielli GB, Farina L, Zamboni A, Porceddu A, Venturini L, Bicego M, Murino V, Ferrarini A, Delledonne M, Pezzotti M (2012). The grapevine expression atlas reveals a deep transcriptome shift driving the entire plant into a maturation program. *Plant Cell* 24, 3489–3505.
- Gaut BS, Morton BR, McCaig BC, Clegg MT (1996). Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcL*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10274–10279.
- Gu ZL, Nicolae D, Lu HHS, Li WH (2002). Rapid divergence in expression between duplicate genes inferred from microarray data. *Trends Genet* 18, 609–613.
- Gu ZL, Rifkin SA, White KP, Li WH (2004). Duplicate genes increase gene expression diversity within and between species. *Nat Genet* 36, 577–579.
- Guo CL, Guo RR, Xu XZ, Gao M, Li XQ, Song JY, Zheng Y, Wang XP (2014). Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) *WRKY* gene family. *J Exp Bot* 65, 1513–1528.
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C, Vezzi A, Legeai F, Hugueney P, Dasilva C, Horner D, Mica E, Jublot D, Poulain J, Bruyère C, Billault A, Segurens B, Gouyvenoux M, Ugarte E, Cattonaro F, Anthouard V, Vico V, Del Fabbro C, Alaux M, Di Gaspero G, Dumas V, Felice N, Paillard S, Juman I, Moroldo M, Scalabrin S, Canaguier A, Le Clainche I, Malacrida G, Durand E, Pesole G, Laucou V, Chatelet P, Merdinoglu D, Delledonne M, Pezzotti M, Lecharny A, Scarpelli C, Artiguenave F, Pè ME, Valle G, Morgante M, Caboche M, Adam-Blondon AF, Weissenbach J, Quétier F, Wincker P (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463–467.
- Malacarne G, Perazzolli M, Cestaro A, Sterck L, Fontana P, Van de Peer Y, Viola R, Velasco R, Salamini F (2012). Deconstruction of the (Paleo) polyploid grapevine genome based on the analysis of transposition events involving *NBS* resistance genes. *PLoS One* 7, e29762.
- McAdam SAM, Brodribb TJ (2015). The evolution of mechanisms driving the stomatal response to vapor pressure deficit. *Plant Physiol* 167, 833–843.
- McAdam SAM, Brodribb TJ, Banks JA, Hedrich R, Atallah NM, Cai C, Geringer MA, Lind C, Nichols DS, Stachowski K, Geiger D, Sussmilch FC (2016). Absciscic acid controlled sex before transpiration in vascular plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 12862–12867.
- Raghavendra AS, Gonugunta VK, Christmann A, Grill E (2010). ABA perception and signaling. *Trends Plant Sci* 15, 395–401.
- Roychoudhury A, Paul S, Basu S (2013). Cross-talk between abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways during abiotic stress. *Plant Cell Rep* 32, 985–1006.

- Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li JW, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J (2006). TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* **411**, 134–193.
- Sussmilch FC, Brodribb TJ, McAdam SAM (2017). What are the evolutionary origins of stomatal responses to abscisic acid in land plants? *J Integr Plant Biol* **59**, 240–260.
- Tan BC, Joseph LM, Deng WT, Liu LJ, Li QB, Cline K, McCarty DR (2010). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*cis* epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* **35**, 44–56.
- Wang RY, Yang Y, Wang HG, Chen L, Wang L, Lu P, Liu MX, Qiao ZJ (2018). Cloning of gene *PmNCED1* and its response to PEG stress in common millet. *J Nuclear Agric Sci* **32**, 244–256.
- Yang SH, Zhang XH, Yue JX, Tian DC, Chen JQ (2008). Recent duplications dominate NBS-encoding gene expansion in two woody species. *Mol Genet Genom* **280**, 187–198.
- Ye X, Kang BG, Osburn LD, Li Y, Cheng ZM (2009). Identification of the flavin-dependent monooxygenase-encoding *YUCCA* gene family in *Populus trichocarpa* and their expression in vegetative tissues and in response to hormone and environmental stresses. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **97**, 271–283.
- Zhang JZ (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol* **18**, 292–298.

Evolution and Expression of *NCED* Family Genes in *Vitis vinifera*

Xiaolong Wang, Fengzhi Liu, Xiangbin Shi, Xiaodi Wang, Xiaohao Ji, Zhiqiang Wang, Baoliang Wang, Xiaocui Zheng, Haibo Wang*

Key Laboratory of Mineral Nutrition and Fertilizers Efficient Utilization of Deciduous Fruit Tree, Liaoning Province, Key Laboratory of Germplasm Resources Utilization of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture, Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, China

Abstract 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*), a key rate-limiting enzyme in ABA biosynthesis in plants, is involved in plant drought, exogenous abscisic acid (ABA) and high salt response, and can reduce the damage of environmental stress on plants. With genome-wide identification and analysis of the grape *NCED* gene family, we aimed to understand the species evolution relationship and study the expression patterns of various genes in different tissues and under drought, ABA and high salt (NaCl) stress treatment, to lay the foundation for further study of the biological functions of *NCED* genes. A total of 12 *NCED* genes were found in the grape genome. The amino acid residues encoded by the genes are distributed between 510 aa (VvNCED2) and 625 aa (VvNCED10). The maximum molecular weight of the VvNCED protein was 70.53 kDa (VvNCED10) and the minimum was 57.85 kDa (VvNCED2). After differentiation from the ancestral gene, the grape *NCED* genes had five replication events with two loss events. The *NCED1/2*, *NCED3/4*, *NCED6/7* and *NCED9/10* gene pairs are thought to be produced by segmental duplication. The replication time of segmental duplication ranged from 3.08 to 120.0 million years ago, which is later than the differentiation of monocotyledons. As compared with the control, VvNCED1 was significantly upregulated by 72.1% after 48 h of ABA treatment, whereas VvNCED2 was significantly downregulated by 84.0%. The expression of VvNCED6 was higher in only roots under drought treatment for 14, 21 and 28 days than in the control: 2.49, 1.05 and 1.09 times of control values, respectively. The expression of VvNCED7 was only 1.07 times higher than the control value in roots under drought treatment for 14 days. After 72 h of ABA treatment, the expression of VvNCED3 was significantly downregulated by 59.5% as compared with the control, whereas VvNCED4 was significantly upregulated by 169.9% as compared with the control. The significant peaks in expression of VvNCED3/VvNCED4 after NaCl treatment were 24 and 48 h, respectively, up by 219.2% and 114.4%. The differential conserved-domain expression patterns with different stress treatments are the basis for the functional differentiation of *NCED* proteins. The functional differentiation of *NCED* during evolution may be conducive to the occurrence of replication events.

Key words *NCED* gene family, grapevine, abiotic stress, gene expression

Wang XL, Liu FZ, Shi XB, Wang XD, Ji XH, Wang ZQ, Wang BL, Zheng XC, Wang HB (2019). Evolution and expression of *NCED* family genes in *Vitis vinifera*. *Chin Bull Bot* **54**, 474–485.

* Author for correspondence. E-mail: haibo8316@163.com