

## 三个葡萄WRKYs基因的克隆及表达特性分析

侯丽霞\*, 王文杰\*, 郭秀萍, 傅佩宁, 刘新\*\*

青岛农业大学生命科学院, 山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109

**摘要:** 以葡萄抗性品种‘左优红’组培苗为材料, 利用同源克隆法克隆*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*, 测序结果显示, *VvWRKY13*扩增片段大小为681 bp, 编码226个氨基酸; *VvWRKY45*扩增片段大小为549 bp, 编码182个氨基酸; *VvWRKY71*扩增片段大小为936 bp, 编码311个氨基酸序列。利用生物信息学分析*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*序列显示, 这3个蛋白均含有保守的WRKY结构域; 分子量分别为25.7、20.8和34.8 kDa, pI分别为9.08、9.41和6.94。实时定量PCR结果表明, 3个WRKYs均在叶片中表达量最高。逆境相关的信号物质, 如水杨酸、脱落酸、茉莉酸和一氧化氮以及高盐、低温和渗透等逆境胁迫均可诱导*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*的表达。推测3个基因均参与了葡萄抵御逆境胁迫的过程。

**关键词:** 葡萄; WRKYs; 基因克隆; 表达分析

## Gene Cloning and Expression Analysis of Three WRKYs in *Vitis vinifera* L.

HOU Li-Xia\*, WANG Wen-Jie\*, GUO Xiu-Ping, FU Pei-Ning, LIU Xin\*\*

Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

**Abstract:** WRKY is an important transcription factor that can regulate the expression of downstream stress resistance genes, it can be widely involved in plant biotic and abiotic stress resistance. Using homology cloning method, the full-length cDNA of *VvWRKY13*, *VvWRKY45* and *VvWRKY71* was cloned from leaves of *Vitis vinifera* cultivar ‘Zuoyouhong’ tissue culture seedling. Bioinformatic analysis indicated that *VvWRKY13*, *VvWRKY45* and *VvWRKY71* separately consisted of 681, 549, 936 nucleotides encoding 226, 182, 311 amino acid with molecular weight 25.7, 20.8, 34.8 kDa, isoelectric point 9.08, 9.41 and 6.94, respectively. Three *VvWRKYs* all possessed one conserved WRKY domain. Real-time PCR analysis showed that three *VvWRKYs* were expressed in all tested tissues, with the highest expression in leaves. *VvWRKY13*, *VvWRKY45* and *VvWRKY71* was significantly induced by stress-related signal substances such as salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA), jasmonate acid (JA), nitric oxide (NO). Moreover, three *VvWRKYs* were accumulated in response to salt stress, cold stress and osmotic stress. It suggested these three *VvWRKYs* were involved in resistance to various stresses in grape.

**Key words:** *Vitis vinifera* L.; WRKYs; gene clone; expression analysis

葡萄(*Vitis vinifera* L.)是具有优良的酿酒特性和较高食用价值、在世界范围内被广泛种植的主要经济果树之一。我国主栽的葡萄品种多为欧亚种, 抗性较弱, 在葡萄生长过程中极易受到各种生物胁迫和非生物胁迫。近年来, 葡萄的抗性相关基因陆续被克隆, 如与抗寒相关的转录因子VrCBF1、VrCBF2和VvCBF4 (Xiao等2006), 参与葡萄抗冷过程的*VvIPK2* (李希东等2011), 与抗病相关的*VvNPR1.1*、*Vvchit1b*和*VvPRI*等(Le Henanff等2009; Fernandez-Caballero等2009; 侯丽霞等2012)。有报道将35S::*VvCBF4*转入葡萄品种‘Freedom’获得转基因植株, 在-2 °C下处理24 h后恢复

14 d, 转基因植株的抗冻能力明显强于野生型(Tillett等2012)。因此克隆抗性相关基因, 研究其表达特性和作用机制, 将为葡萄的遗传改良提供基因资源和理论基础。

WRKY是主要存在于植物中的一类非常重要的转录因子, 其家族成员在N端含有WRKYGQK的

收稿 2013-01-10 修定 2013-01-22

资助 青岛市自然科学基金[10-3-4-5-5-jch和12-1-4-5-(12)-jch]和青岛农业大学高层次人才启动基金(630722)。

\* 共同第一作者。

\*\* 通讯作者(E-mail: liuxin6080@yahoo.com.cn; Tel: 0532-88030224)。

高度保守序列, C端含有C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>或C<sub>2</sub>HC的锌指纹(Eu-lgem等2000)。WRKY基因最早在甘薯中克隆出来(Ishiguro和Nakamura 1994), 随后在野燕麦(Rush-ton等1995)、拟南芥(de Pater等1996)、烟草(Kim和Zhang 2004)和水稻(Liu等2005)等10多种植物中都克隆出WRKY基因。目前发现在模式植物拟南芥中WRKY家族含有72个成员, 水稻中有100多个成员。并相继发现多个WRKY转录因子家族成员参与植物的生物和非生物胁迫、衰老和器官发育等一系列生理活动(Pandey和Somssich 2009; 郝林和徐昕2004)。如, *OsWRKY13*和*OsWRKY45*受NaCl、PEG、高温(40 °C)和低温(4 °C)的强烈诱导表达(仇玉萍等2004); 水稻叶片经ABA和GA处理后, *OsWRKY71*的表达量显著升高(Xie等2006); 过表达*OsWRKY45*的水稻植株其抗病和抗旱能力增强(Qiu和Yu 2009)。最近, 以中国野生葡萄‘Baihe-35-1’葡萄为实验材料, 克隆了*VpWRKY1*、*VpWRKY2*和*VpWRKY3*基因, 3个基因受到白粉病、干旱、高盐、冷、水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonate acid, JA)和乙烯等因子的诱导表达, 通过转基因实验进一步发现, 转*VpWRKY2*基因的拟南芥抗病和抗冷性均提高, 转*VpWRKY3*的烟草植株提高了抗病和抗盐害的能力, 推测WRKYs参与了葡萄的生物胁迫和非生物胁迫过程(Li等2010; Zhu等2012)。而葡萄的其他WRKY家族成员未见报道。那么葡萄的WRKY13、WRKY45和WRKY71与葡萄响应逆境胁迫是否有关呢?

本实验以抗性葡萄品种‘左优红’为实验材料, 克隆抗逆相关基因*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*, 并检测其在不同组织中和不同的逆境条件下其表达特性, 为进一步分析其在抗逆信号转导中的调节机制和功能、利用基因资源改良葡萄品种, 提供重要参考。

## 材料与方 法

### 1 实验材料

以葡萄(*Vitis vinifera* L.)抗性品种‘左优红’为实验材料, 以其带芽新梢为供试外植体, 75%的乙醇处理30 s, 0.1%的升汞处理5 min, 无菌水充分冲洗3~5次。接种于1/2MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> IAA培养基上, 于光照培养箱[(25±1) °C, 200 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>]中培养。无菌条件下将生根根试管苗的顶芽切下, 接种

于1/2MS+0.1 mg·L<sup>-1</sup> IAA培养基上诱导生根, 30~50 d后使用。

### 2 材料处理

分别用一氧化氮(nitric oxide, NO)供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP) (0.1 mmol·L<sup>-1</sup>)、脱落酸(abscisic acid, ABA) (0.567 mmol·L<sup>-1</sup>)、茉莉酸(10 μmol·L<sup>-1</sup>)、水杨酸(1.81 mmol·L<sup>-1</sup>)、甘露醇(200 mmol·L<sup>-1</sup>)、NaCl (150 mmol·L<sup>-1</sup>)、4 °C低温处理‘左优红’葡萄组培苗叶片0、6、12、18、24、30 h后, 提取总RNA, 用于基因相对表达量的研究。

### 3 实验方法

#### 3.1 总RNA的提取和cDNA合成

按照李希东等(2011)方法提取葡萄总RNA, M-MLV反转录试剂盒合成cDNA第一条链作为模板。

#### 3.2 *VvWRKYs*基因的克隆及序列分析

采用同源克隆法, 以拟南芥中相应的CDS进行WU-BLAST序列比对, 检索到*VvWRKYs*基因同源序列, 并设计特异性引物。*VvWRKY13*: 正向, 5'-GCTCTAGAATGTCTACTACTTCTCAAGCC-3'。反向, 5'-GGGGTACCCTACCAAAGAAATTAT-TG-3'; *VvWRKY45*: 正向, 5'-GCTCTAGAATGGA-GAATTATCAGAACTTCTTC-3', 反向, 5'-GGGG-TACCTTAGGGAGCGTAGATT-3'; *VvWRKY71*: 正向, 5'-GCTCTAGAATGTCTGATGAGAATAG-GAGTACT-3', 反向, 5'-GGGGTACCTCATGGCTC-CTGCTTGC-3'。PCR引物由上海桑尼生物工程有限公司合成。PCR反应程序如下: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 62 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 最后72 °C延伸3 min, 4 °C保存。PCR产物利用北京博迈德试剂盒回收, 与pMD18-T载体连接。阳性克隆由上海英潍捷基生物技术有限公司测序。借助DNASTar软件分析基因序列并推导其编码的氨基酸序列, 并预测其分子量、pI及稳定性。

#### 3.3 *VvWRKYs*基因表达分析

利用实时荧光定量PCR检测*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*相对表达量变化, 引物如下。*VvWRKY13*: 正向, 5'-CGACTCGTTTCTT-TACGC-3', 反向, 5'-AGTGAGGTGGATGTTCT-TG-3'; *VvWRKY45*: 正向, 5'-AACCCATTTG-GAATACTG-3', 反向, 5'-GAACTTCTTCGCTTG-CTC-3'; *VvWRKY71*: 正向, 5'-TTGCTCTTATCG-

TAGCC-3', 反向, 5'-GAAGTTATTACAGATG-CACCAC-3'; *ACTIN*: 正向, 5'-AATGAGAGATGG-CTGGAAGAG-3', 反向, 5'-TACGAGCAAGA-GCTGGAAA-3'。荧光实时定量PCR程序为: 95 °C 60 s; 95 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 15 s, 40个循环。Melt曲线从72 °C至99 °C, 第1步维持45 s, 以后每升高1 °C维持5 s。每样品进行3次重复。以*ACTIN*为内参对基因进行相对定量, *VvWRKYs*表达量参考Livak的方法计算(Livak和Schmittgen 2001)。

## 实验结果

### 1 *VvWRKYs*基因的克隆

#### 1.1 *VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*全长序列扩增

分别以拟南芥的*WRKY13*、*WRKY45*和*WRKY71*的cDNA进行WU-BLAST序列比对, 检索到葡萄品种‘黑比诺’中*WRKY13*基因同源序列(XM\_002278988.1)、*WRKY45*基因同源序列(XM\_0022-

74351.1)和*WRKY71*基因同源序列(XM\_0022-83567.1)。利用葡萄品种‘左优红’为材料, 利用生物学软件(Primer Premier 5.0)分别设计*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*特异引物, 以反转录的cDNA为模板进行PCR扩增, 产物经1%的琼脂糖凝胶电泳分离。结果表明, 分别在约700、500和1 000 bp处有一条清晰的条带, 片段大小分别与*VvWRKY13*基因681 bp、*VvWRKY45* 549 bp和*VvWRKY71* 936 bp的大小一致(图1)。

#### 1.2 pMD18-T-*VvWRKYs*重组质粒的酶切鉴定

上述PCR产物连接pMD18-T载体, 提取质粒, 经*Xba*I和*Kpn*I双酶切鉴定, 结果如图2所示。提交测序的结果表明, *VvWRKY13*扩增片段大小为681 bp, 经DNASTar软件分析可知, GenBank中所提交的基因序列第607位为C, 而扩增目的片段为A, 一致性为99.85%, 但所编码的蛋白质完全一致; *VvWRKY45*扩增片段大小为549 bp, 经DNASTar软件分析可知, GenBank中提交的基因序列, 第339位

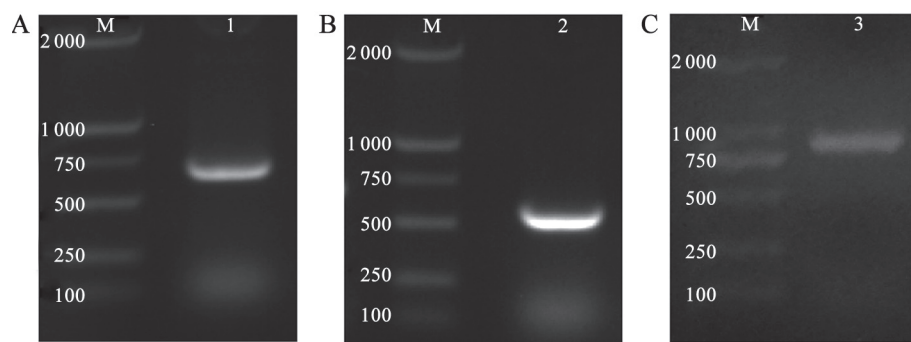


图1 葡萄*VvWRKY13* (A)、*VvWRKY45* (B)和*VvWRKY71* (C)基因CDS序列的PCR扩增

Fig.1 RT-PCR amplification products of *VvWRKY13* (A), *VvWRKY45* (B) and *VvWRKY71* (C)

M: DL 2000 DNA marker; 1~3: 分别是*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*扩增产物。图上数字单位为bp。

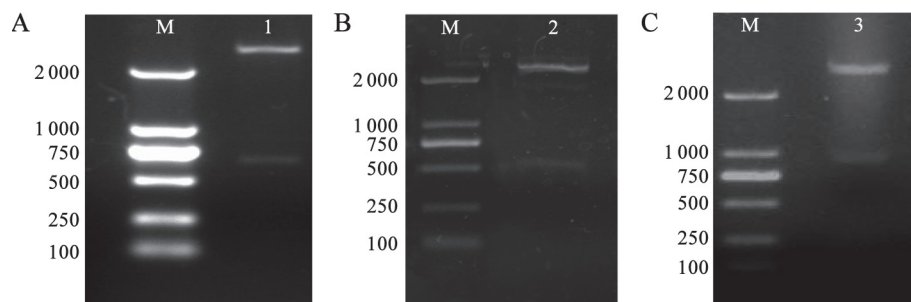


图2 *VvWRKY13* (A)、*VvWRKY45* (B)和*VvWRKY71* (C)重组质粒的酶切鉴定

Fig.2 Restriction digestion analysis of recombinant plasmids of *VvWRKY13* (A), *VvWRKY45* (B) and *VvWRKY71* (C)

M: DL 2000 DNA marker; 1~3: 分别是*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*的酶切产物。图上数字单位为bp。



为C, 扩增目的片段为T, 483位GenBank中为T, 而扩增片段为C, 一致性为99.64%, 所编码的蛋白质完全一致; *VvWRKY71*扩增片段为936 bp, GenBank中提交的基因序列, 第186、349和883位分别为A、A和T, 而我们克隆的片段则分别为T、G和C, 一致性为99.68%, 所编码蛋白质完全一致。

## 2 VvWRKYs序列分析

用DNASTar软件中的ORF Finder和Editseq程序分析核酸序列及其推导的氨基酸序列的组成及理化性质, 如表1所示。将VvWRKY13、VvWRKY45和VvWRKY71的序列分别与拟南芥、杨毛果、蓖麻、大豆和玉米的WRKY13、WRKY45和WRKY71氨基酸序列比对, 结果发现, 葡萄3个WRKYs家族成员的氨基酸序列均存在保守的WRKYGQK结构域, 分别位于第155~161位氨基酸(图3结构域I)、第110~116位氨基酸(图4结构域I)和第178~184位(图5结构域I), 由此可知它们都属于

表1 VvWRKYs氨基酸序列的组成和理化性质

Table 1 Amino acid composition and physicochemical properties of VvWRKYs

WRKY种类	氨基酸残基数/个	分子量/kDa	pI	不稳定系数
VvWRKY13	226	25.72	9.08	60.87
VvWRKY45	182	20.79	9.41	49.81
VvWRKY71	311	34.78	6.94	60.46

WRKY转录因子家族, 而且在结构域II中存在C-X<sub>4-5</sub>-C-X<sub>22-23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H序列, 所以属于第2类WRKY转录因子。

## 3 VvWRKYs基因表达特性分析

### 3.1 VvWRKYs组织表达特异性分析

以‘左优红’为实验材料, 检测VvWRKY13、VvWRKY45和VvWRKY71在不同组织器官中的表达特性。结果表明VvWRKY13、VvWRKY45和VvWRKY71在根茎叶中均有表达, 并且在根中的相对表

VvWRKY13	MSTTSCA.MLNQG.LFEDGE.MPSQLGFY...SFHPNLSFPQVG.....CQOSLKA	45
PtrWRKY13	MAAAPQATVNLNQQPLFEDGE.MPTQMGEF...SFPSHLTYPQLGS.....CHQSSKG	48
GmWRKY13	MSTTSQT.NVNHS.LFEEQDQIPTQMGLFNI...FPNQTYPPLGC.....QTGTLKS	49
AtWRKY13	MGAINQGISLFDSEQTVINPINTNHLGFE.FSEPSHSLSSSSSSSSSSSLVSPFLGHNSLNS	64
ZmWRKY13	.....MLLQMPFVKEQA...ANNHGLMLSSDHHHSGLLYP.....LLLP	38
VvWRKY13	F...NIPESLAADAPSS...LT...EALISSAPT.KORE...DITPHL...GGAQLLSLQSRANLW	96
PtrWRKY13	F...IIPESLAADAPSTTNIAE...TLIISATH.KOREG.TFASDL...GGPHLLSLQSRANLW	103
GmWRKY13	IS.AIAESLSSATSFS.....ETLITAVQ.RPRE...DLTSLNLAGGGQLLSLNRSRVNSW	102
AtWRKY13	FLHNNPSEFISHPQDSINLMTNLPETLISLSSSKQRDDHDGFLNLDHHRITGSISSQPLSNPW	129
ZmWRKY13	IP...FCFVAAACEKT.....TTTCSGALDAGEAG....TSSA.....AAKATGFIATAAT	84
VvWRKY13	ANGEVNECLSSKRS.....IGGD.DHLC.....VSA	121
PtrWRKY13	ANGEVNECLSRKRS.....GSGE.DHLC.....LSS	128
GmWRKY13	AEEVSDCLMGKRI.....GGDNHHLG.....VSA	128
AtWRKY13	AMSCQAGYGSSOKNNHGSEIDVDDNDDEVGDDGGINDDDNGRHHHHTPSRHDKHNTASLGVVSS	194
ZmWRKY13	ACNSPSSNWWKGP.....AAAAAGEKG.....	107
VvWRKY13	MKMKKIKARRKWRPRFCFKTMSVDVLDGGYKWRKYGQKVVKNLCHPRSYYRCTODNCRVKKRV	186
PtrWRKY13	IKMKKIKARRKWRPRFCFKTMSVDVLDGGYKWRKYGQKVVKNLCHPRSYYRCTODNCRVKKRV	193
GmWRKY13	MKMKKIKARRKWRPRFCFKTMSVDVLDGGYKWRKYGQKVVKNLCHPRSYYRCTODNCRVKKRV	193
AtWRKY13	LKMKKIKARRKWRPRFCFKTMSVDVLDGGYKWRKYGQKVVKNLCHPRSYYRCTODNCRVKKRV	259
ZmWRKY13	...GRMKWRKWRPRFCFKTMSVDVLDGGYKWRKYGQKVVKNLCHPRSYYRCTODNCRVKKRV	169
	I	II
VvWRKY13	ERLAEDPRMVTTYEGRHHSPSHDLLE.....SOAPSHLNFFW	226
PtrWRKY13	ERLAEDPRMVTTYEGRHHSPSLDLEE.....SOAPSLSNFFF	233
GmWRKY13	ERLAEDPRMVTTYEGRHHSPSNELED.....SQTPELSNFW	233
AtWRKY13	ERLAEDPRMVTTYEGRHHSPSNHLDDSLSTSHLHPPLSNFFW	304
ZmWRKY13	ERLSEDCRMVVTTYEGRHHSFCSDADAGGGDHTGSCAFTSL	212
	II	

图3 VvWRKY13与其他物种基因序列的同源性分析

Fig.3 Alignment of the predicted amino acid sequences of VvWRKY13 and other WRKYs

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): AtWRKY13 (GenBank登录号AEE87071.1); 杨毛果(*Populus trichocarpa*): PtrWRKY13 (GenBank登录号EEE90494.1); 大豆(*Glycine max*): GmWRKY13 (GenBank登录号XP\_003523252.1); 玉米(*Zea mays*): ZmWRKY13 (GenBank登录号ACN34879.1)。I代表WRKYGQK保守结构域; II代表C-X<sub>4-5</sub>-C-X<sub>22-23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H保守结构域。

VvWRKY45	.....MENYQNFACSSSAPP.ASMGFTSNMESSNVFGNVHGS.IPNGFL	45
PtrWRKY45	.....MSLNMVFNSTASTDLEGAKG.....NGFL	24
ReWRKY45	.....MEKFQMLFPFSSTTEPSSATYPISSNMINSHALSNFEGIN.DSYGFL	46
ZmWRKY45	MENYHMLFGRPSTQPSSAATSNSYNEMLPATAGSTSGGGGLRDHRRGGQHSAGGVSSSSFF	65
AtWRKY45	.....ME	2
GmWRKY45	.....AYT	3
VvWRKY45	GLKSTEIHVPTG.....QEVENIS.....RSSGGFGR.SENEVKSCKKKYEKKIRKPRYAFO	96
PtrWRKY45	GLMQEMEAPAAS.....LNVDNIS.....QNRGFVGS.ITSEGRLEKKRGEKKIRKPKYAFO	75
ReWRKY45	GLKIENDHQVASSVSRTEVFNNNDLKS...TQSHAHIAIGSESETKSSKKKGEKKIRKPRYAFO	107
ZmWRKY45	AEPSNTSSKDSGAAASSP.PPAAGIGRGEPAAGTPPAAAEVDGRLQAGKRKGEKKERPRFAFO	129
AtWRKY45	DRRCDFVLFPCSS.....SVDPRLTE...FHGVDNSAQPTTSSEKPRSKKKKEREARYAFO	56
GmWRKY45	SSYEFRAWEVVS.....DCLMGKRIGG.....DDNHHLGV...SAMKMKMKARRKVREPRFCBK	55
VvWRKY45	TRSOVDLDDGYWRKYGQKAVKNNKPRSYRCTHQCNVKKVCRITKDEGIVVTTYEGTHH	161
PtrWRKY45	TRSOVDLDDGYWRKYGQKAVKNNKPRSYRCTHQCNVKKVCRITKDEGIVVTTYEGTHH	140
ReWRKY45	TRSOVDLDDGYWRKYGQKAVKNNKPRSYRCTHQCNVKKVCRITKDEGIVVTTYEGTHH	172
ZmWRKY45	TRSOVDLDDGYWRKYGQKAVKNNKPRSYRCTHQCNVKKVCRITKDEGIVVTTYEGTHH	194
AtWRKY45	TRSOVDLDDGYWRKYGQKAVKNNKPRSYRCTHQCNVKKVCRITKDEGIVVTTYEGTHH	121
GmWRKY45	TRSDVDLDDGYWRKYGQKAVKNNKPRSYRCTHQCNVKKVCRITKDEGIVVTTYEGTHH	120
VvWRKY45	PIEKPTDNFEHILNMQIYAP.....	182
PtrWRKY45	QIEKSTDNFEQILRQMQIYS.....	160
ReWRKY45	PIEKPTDNFEHILSOMQIYTF.....	194
ZmWRKY45	PIEKSDNFEHILTQMQIYSGMGSTFSSSSHNMF	228
AtWRKY45	AVDKPSDNFHHILTQMHIFPPFCLKE.....	147
GmWRKY45	SPSN.ELEYSQTPSELNFW.....	140

图4 VvWRKY45与其他物种基因序列的同源性分析

Fig.4 Alignment of the predicted amino acid sequences of VvWRKY45 and other WRKYs

拟南芥: AtWRKY45 (GenBank登录号AEE73742.1); 杨毛果: PtrWRKY45 (GenBank登录号EEE84126.1); 大豆: GmWRKY45 (GenBank登录号ABS18441.1); 蓖麻(*Ricinus communis*): RcWRKY45 (GenBank登录号EEF50882.1); 玉米: ZmWRKY45 (GenBank登录号AFW60747.1)。I代表WRKYGQK保守结构域; II代表C-X<sub>4</sub>-C-X<sub>2,23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H保守结构域。

达量最小, 在叶中的相对表达量最大。其中VvWRKY45在叶片中相对表达量最高, 与根部和茎部比较, 差异显著。而VvWRKY13和VvWRKY71虽在叶片中的相对表达量最大, 但是与根部和茎部比较, 差异不显著(图6)。

### 3.2 几种逆境胁迫对葡萄叶片VvWRKYs相对表达量的影响

经甘露醇、NaCl和低温处理‘左优红’叶片, 实时荧光定量PCR检测VvWRKY13、VvWRKY45和VvWRKY71的相对表达量。由图7可以看出, 低温、高盐和干旱胁迫均可不同程度的诱导VvWRKYs基因的表达, 其中低温和NaCl的作用最为显著。NaCl处理后3个基因均在6 h相对表达量最大, 尤其是VvWRKY45和VvWRKY71表达量更为显著。而低温处理后, VvWRKY13和VvWRKY45分别在12和24 h达到最高值, 与对照相比, 差异显著。推测VvWRKYs参与葡萄抵御非生物胁迫的过程。

### 3.3 几种逆境相关信号物质对葡萄叶片VvWRKYs相对表达量的影响

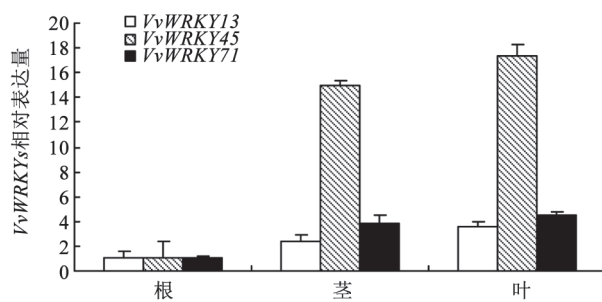
由图8可知, 逆境相关的信号物质SA、ABA和NO均可诱导‘左优红’叶片中3个VvWRKYs相对表达量的增加, 诱导表达的时间分别是6、18和24 h。但表达量变化存在差异, 其中SA诱导的3个基因的相对表达量相差不大; ABA诱导的VvWRKY45和VvWRKY71表达量与对照相比, 差异显著, 而且相对于ABA诱导的VvWRKY13表达量而言, 差异显著; 而NO诱导的3个基因表达量变化较小。此外, 不同WRKY基因受JA诱导的表达时间不同, VvWRKY13、VvWRKY45和VvWRKY71分别在12、12和18 h相对表达量最大, 其中VvWRKY13的相对表达量最大。推测3个VvWRKYs基因参与了SA、ABA、NO和JA介导的葡萄响应逆境胁迫过程, 但在不同逆境条件下其信号转导途径可能存在差异。

VvWRKY71	MSDENRSTPYHHDPFCHDQNRVSG...AGFPFFCEKPAIFNQVTPSPQGLHATDPSYMTFTDYF	62
PtrWRKY71	MSNE.KEDPYHYDPFHYNIQQGANRPVSVFPFFNDNLSMYNQ.QAPTQNLQGFSDPSFMSFTDCL	63
RcWRKY71	MSDDHSRDLYYHAPFHEDHQFILG.....SSTNYGS.....SQGLDPSSFLSFTTECL	47
AtWRKY71	.....MDDHVEHN.....YNT.....SLEEVHFKSLSDCL	25
ZmWRKY71	MDPWISSQPSLSLDLRVGLPPLSLHQAPVAVALARPKVLVEEN....FLLPPKKEPEVAAALESE	61
VvWRKY71	HGSLD..YNTLSKAFDMSCSSSEVISPVNDND.....SGKGTASHEH.PSTPN.SLDTSSSTE	115
PtrWRKY71	HGSMDH.YNTLSRALDVSCSSSEVISPVQDGS..RKIGAGESAATNQYTPSTPNSSVSNSSSND	125
RcWRKY71	HGSMD..YNSLSKAFGMSPSSSEVISMEGNPKPLEIGDLGGGENSEN.PVTPNSSASFSSEA	109
AtWRKY71	QSSLVMDYNSLEKVFKEFPYSSPFQSVSPS.....VNNPYLNLISNSPVVSSSNE	76
ZmWRKY71	LRRMSEENRRLAELAAVVSKEYALRSQHT.....EMVAASSASEGGSVSES.RKRKSESAD	117
VvWRKY71	AVTE.DSGKSK.HKPDQLGGCEDGDENSKKANKSKKKGEKRPKEPRFA..FMTKSEIDH...LE	173
PtrWRKY71	GATEEDPGKSKKHKQPKESTEDGDI DGDAKKVSKTKKK.EKRQKEPRFA..FLTKEIDH...LE	184
RcWRKY71	GGEE.DSGKTA.TKKGNQPKGSEDE.CSKKDGKTKKKGEKREPRFA..FMTKSEVDH...LE	166
AtWRKY71	GEPKENTNDKSDQMEDNEGDLHGVESSKQLTKQKKKGEKREPRFA..FMTKSEIDH...LE	136
ZmWRKY71	TAPVQRLHQHAAADLSECTSGGEPCKRVRDRAEVEE.EEECRPRVSKLYVRADPADLSLAVR	182
VvWRKY71	DGYRWRKYGQKAVKNSPYPRSYRCT.TQFCTVKKRVERSFDPSIVITTYEGOHNHPCFATIRG	237
PtrWRKY71	DGYRWRKYGQKAVKNSPYPRSYRCT.TQCMVKKRVERSFDPSIVITTYEGOHNHPCFATLRG	248
RcWRKY71	DGYRWRKYGQKAVKNSPYPRSYRCT.TQFCTVKKRVERSFDPSIVITTYEGOHNHPIEATLRG	230
AtWRKY71	DGYRWRKYGQKAVKNSPYPRSYRCT.TQGNVKKRVERSFDPSIVITTYEGOHNHPIEATLRG	200
ZmWRKY71	DGYQWRKYGQKVTKDNECPRAYTRGSFAPACPVKKRVERSAHDASVLVATYEGDHTHGPEPSGSG	247
	I	II
VvWRKY71	NAAAMLPTSFSSAT...VGSSEF...QEFITQMLPENNSQSGPNSMYYHN.ITPHH...QQQFQL	292
PtrWRKY71	NAAGMLSPSLLASTS...IGQSFE...QDFITRLLPESNQGQDQTSIFYQN.HDPQY...QHQLYA	303
RcWRKY71	NAAAMFSSMLTPANPMVTRPTFF...QEILVQLPHLSNAGTGSIFYQS.VNHQHHLHQYHHQV	291
AtWRKY71	TVAAEHLVHRGGGS...LLHSFPRHQDFIMMKHSFANYQSVGSLSYEHGHGTSSYNFNNSQPV	263
ZmWRKY71	SGSGASSKNAAKPPS...PPRRQE...AAVAVTAAAAASEMVRNLAEQMAVTLAR...DPSFKA	303
VvWRKY71	PDHGLQDIDVPSFIRKQEP	311
PtrWRKY71	PDYGLQDLVPSFIHKQEP	322
RcWRKY71	PDYGLQDIDVPSMFFKQEP	310
AtWRKY71	VDYGLQDIDVPSMFSKNES	282
ZmWRKY71	ALVSAISGRILELSPTKD.	321

图5 VvWRKY71与其他物种基因序列的同源性分析

Fig.5 Alignment of the predicted amino acid sequences of VvWRKY71 and other WRKYs

拟南芥: AtWRKY71 (GenBank登录号AEE31143.1); 杨木果: PtrWRKY71 (GenBank登录号EEE93739.1); 蓖麻: RcWRKY71 (GenBank登录号EEF42706.1); 玉米: ZmWRKY71 (GenBank登录号NP\_001147732.1)。I代表WRKYGQK保守结构域; II代表C-X<sub>4-5</sub>-C-X<sub>22-23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H保守结构域。

图6 *VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*组织表达特性分析Fig.6 Characterization of *VvWRKY13*, *VvWRKY45* and *VvWRKY71* expression in tissues

## 讨 论

近年来在多种植物中都克隆到了不同WRKY基因家族成员,但鲜见葡萄中WRKY的克隆和分析的报道。本实验以抗性较强的品种‘左优红’为实验材料,克隆*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*基因,与数据库中提交的葡萄品种‘黑比诺’的WRKY基因序列XP\_002279024、XP\_002274387、XP\_002283603比对发现,氨基酸序列完全一致。软件分析表明,这3个基因均含有1个保守的WRKY结构域,在C末端含有的锌指结构模式为C-X<sub>4-5</sub>-C-X<sub>22-23</sub>-H-X<sub>1</sub>-H,都属于第二类亚家族成员(图3~5)。



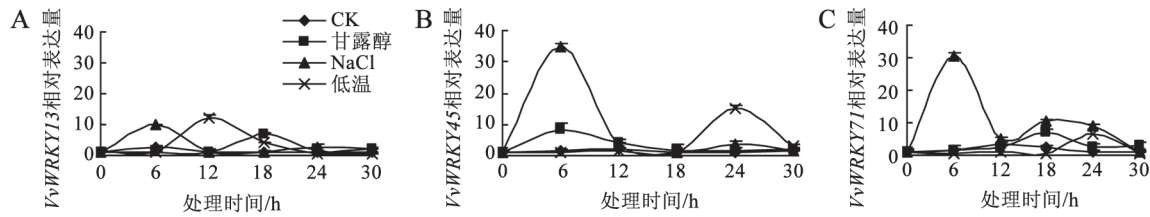
图7 几种逆境胁迫对葡萄叶片*VvWRKY13* (A)、*VvWRKY45* (B)和*VvWRKY71* (C)相对表达量的影响

Fig.7 Effects of some adversity stresses on the expression of *VvWRKY13* (A), *VvWRKY45* (B) and *VvWRKY71* (C) in leaves of grape

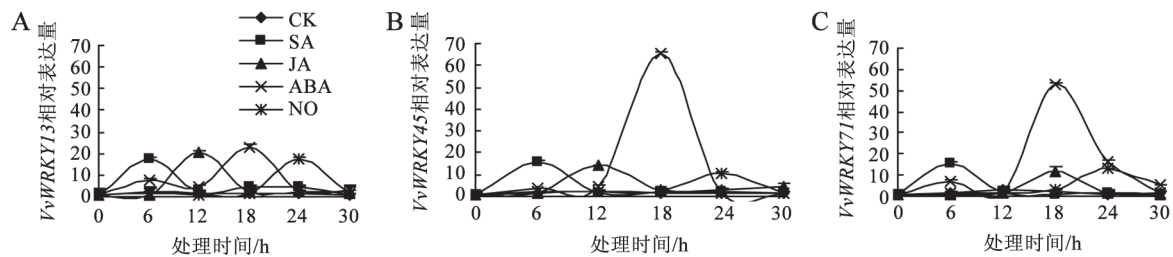
图8 几种逆境相关信号物质对葡萄叶片*VvWRKY13* (A)、*VvWRKY45* (B)和*VvWRKY71* (C)相对表达量的影响

Fig.8 Effects of some stress-related signal substances on expression of *VvWRKY13* (A), *VvWRKY45* (B) and *VvWRKY71* (C) in leaves of grape

以拟南芥和水稻等为材料的研究结果显示, WRKY转录因子超家族参与应答环境刺激, 如高温、低温、高盐、干旱和渗透等非生物胁迫(Chen等2012)。已见水稻等植物中WRKY基因家族成员表达特性的研究报道, 如*OsWRKY45*受高盐、干旱、冷和渗透等非生物胁迫的诱导而高表达(Qiu和Yu 2009); Shekhawat等(2011)克隆并分析香蕉中*MaWRKY71*, 研究发现低温处理24 h后, 在根和叶中表达量最高, 且持续表达。本实验利用荧光定量PCR的方法检测了葡萄根、茎和叶中*VvWRKYs*基因的表达特性, 结果表明*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*在根茎叶中均有表达, 并且3个基因在叶中的表达量最大(图6)。低温、高盐和渗透等逆境条件也可不同程度的诱导*VvWRKYs*基因的表达, 说明不同的WRKYs参与了不同的生理过程, 但它们之间也有交叉反应。其中*VvWRKY45*和*VvWRKY71*对NaCl反应较快且表达量高(图7-B、C), 推测2个基因与葡萄对盐胁迫的响应密切相关。*VvWRKY13*和*VvWRKY45*受到低温诱导后表达量变化显著(图7-A、B), 推测两者在葡萄抵御低温过程中起重要作用。

业已证明, 拟南芥中多个WRKYs家族成员受

到ABA、SA和JA等信号分子的诱导。其中*AtWRKY25*和*AtWRKY33*受ABA的诱导表达量升高显著, 且转*AtWRKY25*和*AtWRKY33*的拟南芥增强了对盐的忍耐力(Li等2011)。本实验中ABA预处理葡萄叶片后, 检测到*VvWRKY45*和*VvWRKY71*表达量显著升高(图8-B、C), 业已证明ABA与干旱和盐胁迫密切相关, 我们的实验结果也证明了2个基因均最早响应盐胁迫(图7-B、C)。那么在葡萄抵御盐胁迫过程中是否存在“盐胁迫-ABA-WRKY45/71”这条信号链呢? 有报道水稻中103个WRKYs中41个成员受到了ABA、SA和JA等信号分子诱导表达量升高(Ramamoorthy等2008)。其中, 利用SA处理后*OsWRKY03*和*OsWRKY71*分别在6和0.5 h表达量达到最高(Liu等2005, 2007)。本实验的3个基因都迅速对SA做出响应, 大约在6 h表达量最高, 而对其他信号分子响应较慢(图8)。SA是植物对病原菌侵染过程中产生的重要信号分子, 过表达*OsWRKY03*和*OsWRKY71*植株中的病程相关蛋白*OsPRI*等被诱导, 推测*OsWRKY03*和*OsWRKY71*作为转录因子作用于*OsPRI*上游参与了病原菌侵染过程(Liu等2005, 2007)。且葡萄叶片接种霜霉病后*VvPRI*的表达量在24 h达到最高(侯丽霞等2012),

今后可以进一步利用转基因植物来验证这3个基因是否与抗病有关,并探明在葡萄抵御霜霉病的过程中是否存在霜霉病-SA-*VvWRKY13/45/71-VvPRI*信号通路。随着这些科学问题的解决,将为葡萄的遗传改良提供新的途径。

### 参考文献

- 仇玉萍, 荆邵娟, 付坚, 李璐, 余迪求(2004). 13个水稻WRKY基因的克隆及其表达谱分析. 科学通报, 49 (18): 1860~1869
- 郝林, 徐昕(2004). 植物转录因子WRKY家族的结构及功能. 植物生理学通讯, 40 (2): 260~265
- 侯丽霞, 高超, 车永梅, 赵方贵, 刘新(2012). 葡萄病程相关蛋白1基因的克隆和表达分析. 植物生理学报, 48 (1): 57~62
- 李希东, 侯丽霞, 刘新, 卢江(2011). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>与葡萄*VvIPK2*基因表达及其低温胁迫响应的关系. 园艺学报, 38 (6): 1052~1062
- Chen LG, Song Y, Li SJ, Zhang LP, Zou CS, Yu DQ (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochim Biophys Acta*, 1819 (2): 120~128
- de Pater S, Greco V, Pham K, Memelink J, Kijne J (1996). Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res*, 24 (23): 4624~4631
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 5 (5): 199~206
- Fernandez-Caballero C, Romero I, Goñi O, Escribano MI, Merodio C, Sanchez-Ballesta MT (2009). Characterization of an antifungal and cryoprotective class I chitinase from table grape berries (*Vitis vinifera* cv. Cardinal). *J Agric Food Chem*, 57 (19): 8893~8900
- Ishiguro S, Nakamura K (1994). Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and  $\beta$ -amylase from sweet potato. *Mol Gen Genet*, 244 (6): 563~571
- Kim CY, Zhang S (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J*, 38 (1): 142~151
- Le Henanff G, Heitz T, Mestre P, Mutterer J, Walter B, Chong J (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of *pathogenesis-related* gene expression. *BMC Plant Biol*, 9: 54~64
- Li H, Xu Y, Xiao Y, Zhu ZG, Xie XQ, Zhao HQ, Wang YJ (2010). Expression and functional analysis of two genes encoding transcription factors, *VpWRKY1* and *VpWRKY2*, isolated from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Planta*, 232: 1325~1337
- Li SJ, Fu QT, Chen LG, Huang WD, Yu DQ (2011). *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta*, 233: 1237~1252
- Liu XQ, Bai XQ, Qian Q, Wang XJ, Chen MS, Chu CC (2005). OsWRKY03, a rice transcriptional activator that functions in defense signaling pathway upstream of OsNPR1. *Cell Res*, 15: 593~603
- Liu XQ, Bai XQ, Wang XJ, Chu CC (2007). OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *J Plant Physiol*, 164 (8): 969~979
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method. *Methods*, 25: 402~408
- Pandey SP, Somssich IE (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol*, 150 (4): 1648~1655
- Qiu YP, Yu DQ (2009). Over-expression of the stress-induced *OsWRKY45* enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Environ Exp Bot*, 65: 35~47
- Ramamoorthy R, Jiang SY, Kumar N, Venkatesh PN, Ramachandran S (2008). A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol*, 49: 865~879
- Rushton PJ, Macdonald H, Huttly AK, Lazarus CM, Hooley R (1995). Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved *cis*-element in the promoters of  *$\alpha$ -Amy2* genes. *Plant Mol Biol*, 29 (4): 691~702
- Shekhawat UKS, Ganapathi TR, Srinivas L (2011). Cloning and characterization of a novel stress-responsive WRKY transcription factor gene (*MusaWRKY71*) from *Musa* spp. cv. *Karibale Montahan* (ABB group) using transformed banana cells. *Mol Biol Rep*, 38 (6): 4023~4035
- Tillett RL, Wheatley MD, Tattersall EA, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC (2012). The *Vitis vinifera* C-repeat binding protein 4 (*VvCBF4*) transcriptional factor enhances freezing tolerance in wine grape. *Plant Biotechnol J*, 10 (1): 105~124
- Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, Nassuth A (2006). Three grape CBF/DREB1 genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant Cell Environ*, 29 (7): 1410~1421
- Xie Z, Zhang ZL, Zou X, Yang G, Komatsu S, Shen QJ (2006). Interactions of two abscisic-acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells. *Plant J*, 46 (2): 231~242
- Zhu ZG, Shi JL, Cao JL, He MY, Wang YJ (2012). *VpWRKY3*, a biotic and abiotic stress-related transcription factor from the Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*. *Plant Cell Rep*, 31: 2109~2120