

葡萄WRKY18基因的克隆及表达特性分析

肖培连, 冯睿杰, 侯丽霞, 吕晓彤, 朱丹, 刘新*

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

摘要: 以抗性品种‘左优红’组培苗为材料, 克隆得到WRKY18基因, 测序结果显示: *VvWRKY18*基因片段大小为954 bp, 编码317个氨基酸序列。生物信息学分析结果显示VvWRKY18蛋白分子量约为35.2416 kDa, 等电点为8.22, 不稳定系数为48.61, 推测为不稳定蛋白; 与已知的梗稻、高粱、毛果杨及拟南芥WRKY家族蛋白高度同源; 亚细胞定位预测结果显示主要存在于细胞核中, 属于第二类WRKY转录因子家族成员。实时荧光定量PCR分析显示, *VvWRKY18*在葡萄不同组织中均有表达, 在花中表达量最高; 多种逆境胁迫因子如盐、干旱和低温等诱导*VvWRKY18*上调表达, 且在低温胁迫6 h时诱导表达量最高。另外, *VvWRKY18*受胁迫信号分子水杨酸、脱落酸、一氧化氮和过氧化氢诱导上调表达, 且*VvWRKY18*在一氧化氮处理下的表达模式与低温诱导的类似, 推测*VvWRKY18*可能通过调控一氧化氮信号分子代谢途径来调节葡萄对低温胁迫应答。

关键词: 葡萄; WRKY18; 基因克隆; 表达特性分析

Gene Cloning and Expression Analysis of WRKY18 in *Vitis vinifera*

XIAO Pei-Lian, FENG Rui-Jie, HOU Li-Xia, LÜ Xiao-Tong, ZHU Dan, LIU Xin*

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

Abstract: Abiotic stress severely restrict the development of grape industry, so it will provide theoretical basis for grape breeding through gene cloning and studying its molecular mechanisms. We cloned the full-length cDNA of *VvWRKY18* from leaves of *Vitis vinifera* cultivar ‘Zuoyouhong’ tissue culture seedling. The results showed that *VvWRKY18* amplified fragment size of 954 bp, encoding a protein of 317 amino acids. Bioinformatic analysis indicated that VvWRKY18 with molecular weight 35.2416 kDa, isoelectric point 8.22 and instability coefficient 48.61, speculating it was unstable protein. Besides it shared high homology with WRKY18 in *Oryza sativa* Japonica Group, in *Sorghum bicolor*, in *Populus trichocarpa* and in *Arabidopsis thaliana*. Subcellular localization result indicated that it was located in nucleus. And it belonged to type II WRKY transcription factor. Real-time PCR analysis indicated that *VvWRKY18* expressed in different tissues, especially in flower. In addition, *VvWRKY18* was induced by low temperature (4 °C), salt stress, osmotic stress, salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA), nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂). Moreover, the expression of *VvWRKY18* was highly induced at 6 h by low temperature and the expression pattern of *VvWRKY18* under NO were similar to those of low temperature induction, which indicated that NO participated in the signal transduction process of grape response to low temperature stress.

Key words: *Vitis vinifera*; WRKY18; gene clone; expression analysis

葡萄(*Vitis vinifera*)属于葡萄科葡萄属, 多年生藤本植物, 葡萄品种繁多, 具有优良的酿酒特性和较高的食用价值, 在世界范围内被广泛种植, 也是我国的主要经济果树之一。目前葡萄的基因组测序工作已全部完成, 为挖掘葡萄耐逆相关基因、阐明基因调控植物胁迫耐性的分子机理提供了大量的信息资源。近年来人们利用分子生物学技术手段已经从葡萄中克隆了多个与逆境胁迫应答相关的基因, 并研究了其功能。如参与葡萄抵御低温过程的*VvIPK2* (李希东等2011)、*VvBAP1* (张广

科等2014)、*VvbZIP23* (Tak和Mhatre 2013)、*VrCBF1*、*VrCBF2*和*VvCBF4* (Xiao等2006); 与抗病相关的*VvNPRI.1*、*Vcchit1b*和*VvPRI*等(Le Henanff等2009; Fernandez-Caballero等2009; 侯丽霞等2012)。Siddigua和Nassuth (2011)将葡萄的*CBF1*和*CBF4*基因转入拟南芥中, 研究发现转基因植株的

收稿 2015-01-07 修定 2015-01-30

资助 国家自然科学基金(31401844)、山东省科技攻关项目(2013-GNC11016)和山东省高等学校科技计划项目(J14LE12)。

* 通讯作者(E-mail: liuxin6080@126.com; Tel: 0532-88030311)。

抗寒和抗旱能力增强。因此,克隆与抗性相关基因,研究其表达特性及其作用机制,对提高葡萄的抗逆能力具有重要意义。

WRKY转录因子为近年来发现的一种植物特有的新型转录调控因子,目前研究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。WRKY转录因子最主要的结构特点是其家族成员在N-端含有WRKYGQK的高度保守序列,C端含有C₂H₂或C₂HC的锌指纹(Eulgem等2000)。近年来越来越多的研究表明WRKY家族参与调控植物对于干旱、冷害、高温和病原菌等逆境胁迫的应答。如,过表达甘蓝菜的*BcWRKY46*的烟草植株其抗冷、耐盐和抵御渗透胁迫能力增强(Wang等2012);*AtWRKY3*和*AtWRKY4*的双突变体植株的抗病性较野生型明显下降(Lai等2008);*AtWRKY18*能够调控ABA抑制拟南芥种子萌发、根生长及对盐胁迫和渗透胁迫的敏感性(Chen等2010)并改变其抵御丁香假单细菌(*Pseudomonas syringae*)侵染的能力(Chen和Chen 2002)。预测葡萄中有59个葡萄WRKY基因(Guo等2014),从酿酒葡萄品种‘赤霞珠’分别克隆得到*VvWRKY1* (Marchise等2007)和*VvWRKY2* (Mzid等2007),并发现异源表达*VvWRKY1*和*VvWRKY2*后增强烟草对真菌感染的抵抗力;从中国野生葡萄中克隆得到*VpWRKY1*和*VpWRKY2*,证明*VpWRKY1*和*VpWRKY2*的过表达拟南芥植株具有较好抗冷性和抗盐性(Li等2010);从‘北峰’葡萄品种中克隆得到*VvWRKY11*,发现转基因的拟南芥植株抵御干旱胁迫能力提高(Liu等2011);本实验室从‘左优红’葡萄品种中克隆得到的*VvWRKY13*、*VvWRKY45*和*VvWRKY71*,证明其受NaCl、低温、甘露醇和脱落酸(abscisic acid, ABA)等逆境相关因子的诱导(侯丽霞等2013),然而至今未见葡萄WRKY18基因功能的研究。为此,本实验以抗性葡萄品种‘左优红’为实验材料,从葡萄叶片cDNA克隆获得抗逆相关基因*VvWRKY18*,并利用荧光定量PCR技术检测其在逆境相关因子作用下的表达特性,为进一步探究其在逆境胁迫中的调节机制提供基础,同时为葡萄的遗传改良提供候选基因。

材料与方 法

1 实验材料

以葡萄(*Vitis vinifera* L.)抗性品种‘左优红’

(‘Zuoyouhong’)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5~6次。将材料两端切取2~3 mm,去除被乙醇和升汞杀死的组织,剩余部分接种于含有0.1 mg·L⁻¹生长素(auxin, IAA)的1/2MS培养基上,置于培养室中(温度25 °C±1 °C,光强200 μmol·m⁻²·s⁻¹,12 h光照/12 h黑暗)培养,30~50 d后使用。

2 材料处理

取生长4~5周龄的‘左优红’葡萄组培苗分别经过水杨酸(salicylic acid, SA) (1 mmol·L⁻¹)、脱落酸(abscisic acid, ABA) (0.5 mmol·L⁻¹)、一氧化氮(nitric oxide, NO)供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP) (0.1 mmol·L⁻¹)、过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂) (0.1%)、硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)供体硫氢化钠(sodium hydrosulfide, NaHS) (0.1 mmol·L⁻¹)、甘露醇(200 mmol·L⁻¹)、NaCl (150 mmol·L⁻¹)、4 °C低温处理0、3、6、9、12、24、48 h后,提取叶片总RNA,反转为cDNA,荧光定量PCR用于基因相对表达量的研究。每处理至少重复3次。

取‘左优红’盆栽苗一年生枝条的根、卷须、茎、叶、叶柄、花芽、花以及小果,提取总RNA,反转为cDNA。实时荧光定量PCR检测*VvWRKY18*相对表达量变化,研究*VvWRKY18*基因组织表达特异性,每处理至少重复3次。

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 *VvWRKY18*基因的克隆及序列分析

以拟南芥*AtWRKY18*进行WU-BLAST序列比对,检索到葡萄品种‘黑比诺’基因组数据库中*VvWRKY18*基因同源序列,并利用生物学软件(Primer Premier 5.0)设计*VvWRKY18*基因特异引物,引物如下: Sense, 5'-CGGGATCCATGGAATTCGAATTTATTGATAC-3'; Anti-sense, 5'-GGGGTACCTCACCATTTTCTATCTGAG-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, 53 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 35个循环; 最后72 °C延伸10 min, 4 °C保存。PCR产物利用宝生物工程(大连)有限公司试剂盒回收,与pMD18-T载体连接。阳性克隆由上海桑尼生物工程有限公司测序。

3.3 VvWRKY18的生物信息学分析

利用在线软件ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)对氨基酸序列进行分析; 利用NCBI网站在线软件Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测保守结构域; 利用在线软件NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)分析磷酸化位点; 利用ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)分析氨基酸序列的疏水性/亲水性; 利用<http://wolfpsort.org/>进行亚细胞定位的预测; 利用软件MEGA4.0采用N-J法构建进化树。

3.4 VvWRKY18基因表达分析

利用实时荧光定量PCR检测VvWRKY18相对表达量变化, 引物如下: Sense, 5'-CTGCTTCTGAAGGACGGATA-3', Anti-Sense, 5'-GCCTAATGACACCTCAACTG-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, VvWRKY18表达量参考Livak和Schmittgen (2001)方法计算。

实验结果

1 VvWRKY18基因的克隆

从抗性葡萄品种‘左优红’的cDNA模板中扩增得到目的基因VvWRKY18, 结果显示: 在约900 bp处有一条清晰的条带, 片段大小与预期的VvWRKY18基因全长序列954 bp一致(图1)。

将上述VvWRKY18 PCR扩增产物连接pMD18-T载体, 提取重组质粒, 经BamHI和KpnI双酶切鉴定, 结果如图2所示, 将鉴定正确的转化子送交测序, 测序结果表明: VvWRKY18扩增片段大小为954 bp。经DNASTAR软件分析可知, GenBank中所公布的‘黑比诺’品种VvWRKY18基因序列第208位为T, 第218位为T, 第450位为A, 第829位为A, 而从‘左优红’品种中扩增得到的目的基因片段则分别为A、G、C和G, 一致性为99.58%。该基因编码317个氨基酸, 与数据库中公布的氨基酸序列相比, 70位为甲硫氨酸、73位为丝氨酸、277位为缬氨酸, 而数据库中对对应位置的氨基酸分别为亮氨酸、苏氨酸和异亮氨酸。

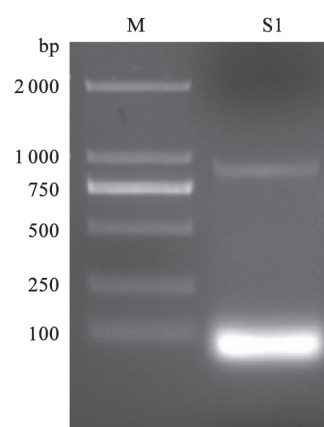


图1 葡萄VvWRKY18基因CDS全长序列的扩增
Fig.1 PCR amplification production of VvWRKY18 CDS
M: DL 2000 DNA Marker; S1: VvWRKY18的扩增产物。

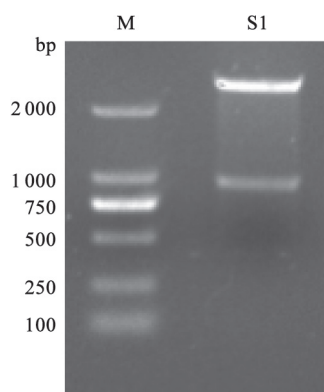


图2 VvWRKY18重组质粒的酶切鉴定
Fig.2 Restriction digestion analysis of recombinant plasmids of VvWRKY18

M: DL 2000 DNA Marker; S1: VvWRKY18的酶切产物。

2 VvWRKY18的生物信息学分析

2.1 VvWRKY18蛋白的序列分析

利用在线软件ProtParam对VvWRKY18进行氨基酸组成分析。结果表明, VvWRKY18的分子式组成为C₁₅₂₄H₂₄₅₈N₄₄₄O₄₉₃S₁₁, 氨基酸数为317, 分子量约为35.2416 kDa, 等电点为8.22, 不稳定系数为48.61 (40以下为稳定蛋白), 推测为不稳定蛋白。

利用ClustalX 2.0软件分析比较VvWRKY18所编码的氨基酸序列, 结果发现VvWRKY18的氨基酸序列存在位于第165~171位氨基酸的保守WRKY结构域(图3-A结构域I), 并且存在C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H的锌指结构(图3-A结构域II), 因此可

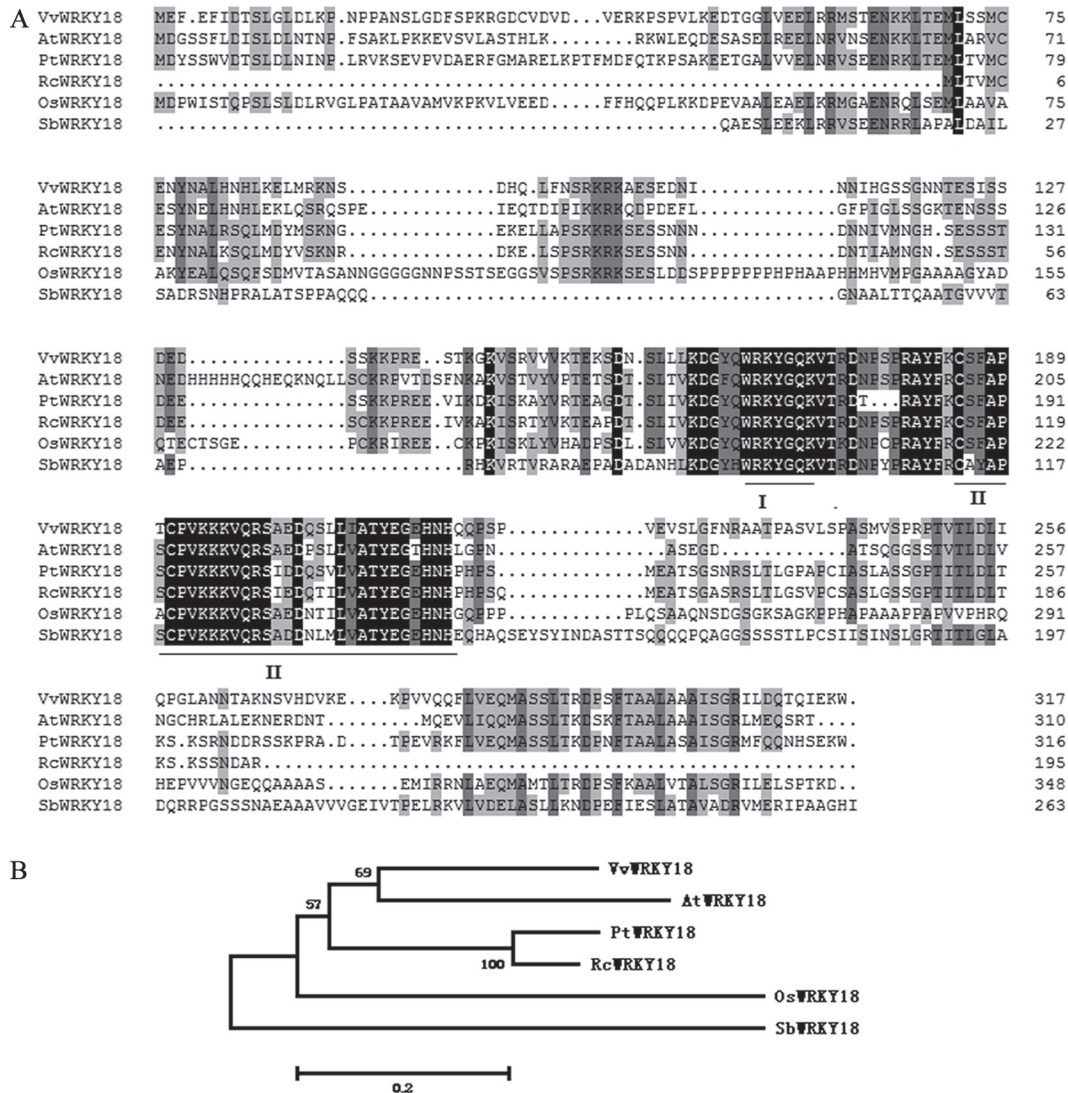


图3 葡萄与其他物种中WRKY18氨基酸序列同源进化分析(A)和进化树(B)

Fig.3 Alignment of the predicted amino acid sequences (A) and phylogenetic tree (B) of WRKY18 in grapevine and other species

黑色表示完全相同的氨基酸残基,灰色程度越浅氨基酸残基保守性越低。粳稻OsWRKY18 (*Oryza sativa* Japonica Group, GenBank 登陆号BK005021); 高粱SbWRKY18 (*Sorghum bicolor*, GenBank 登陆号NC_012871); 毛果杨PtWRKY18 (*Populus trichocarpa*, GenBank 登陆号NW_001492687); 拟南芥AtWRKY18 (*Arabidopsis thaliana*, GenBank 登陆号NC_003075); 蓖麻RcWRKY18 (*Ricinus communis*, GenBank 登陆号NW_002994295)。I代表WRKYGQK保守结构域,II代表C-X_{4,5}-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H保守结构域。

知VvWRKY18属于WRKY转录因子家族的第二类WRKY转录因子。利用MEGA4.0软件分别与拟南芥、水稻、高粱和毛果杨中的WRKY18氨基酸序列比较,发现与粳稻、高粱、毛果杨及拟南芥高度同源(图3-B)。

2.2 VvWRKY18氨基酸序列翻译后的磷酸化修饰预测

细胞内蛋白质磷酸化在信号转导中发挥着重要的作用,研究报道一共有3种主要的磷酸化部位

包括丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸结合位点。大多数蛋白质是在丝氨酸和苏氨酸残基上磷酸化,而许多与信号转导有关的蛋白质还在酪氨酸位置上被磷酸化。利用NetPhos分析可看出VvWRKY18存在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸3个磷酸化位点,但是各个磷酸化位点的数目不同,其中丝氨酸磷酸化位点20个,苏氨酸磷酸化位点7个,酪氨酸磷酸化位点1个(图4);WRKY蛋白磷酸化后可改变蛋白质的活性,这种改变可能为激活作用,也可能是抑制作

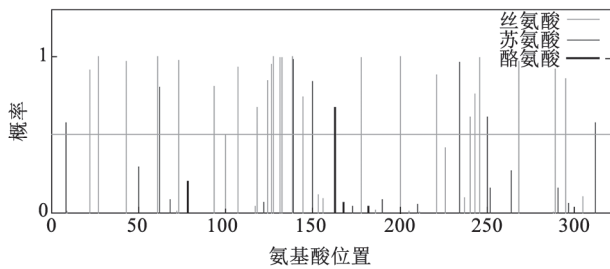


图4 VvWRKY18氨基酸序列翻译后的磷酸化修饰预测
Fig.4 Phosphorylation site prediction of VvWRKY18

用, 这种蛋白质活性的改变在植物的生理生化应答反应过程中起到重要作用。

2.3 VvWRKY18氨基酸序列疏水性/亲水性预测和分析

蛋白质结构的特征是亲/疏水间的平衡, 了解氨基酸序列中亲/疏水性有助于预测蛋白质的结构和功能。用ProtScale分析WRKY氨基酸序列的亲/疏水性, 预测结果表明VvWRKY18 N端含有亲水头部, C端为疏水头部, 而中间氨基酸部分则表现为亲水性, 整个多肽表现出VvWRKY18是一个亲水性的蛋白(图5)。

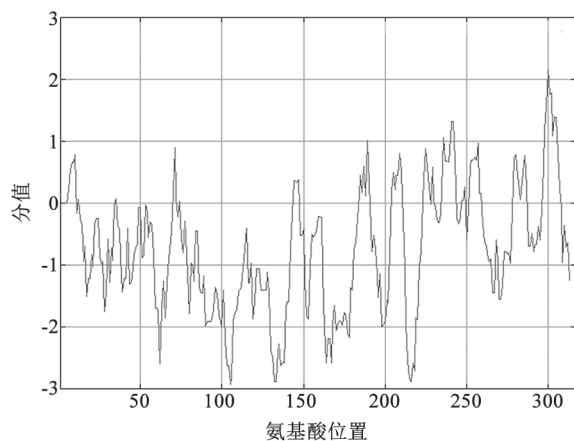


图5 VvWRKY18氨基酸序列的疏水性/亲水性预测
Fig.5 Analysis of VvWRKY18 hydrophobic/hydrophilic nature

2.4 VvWRKY18蛋白的亚细胞定位预测

为进一步研究蛋白发挥生物学功能的作用位置, 利用在线软件WoLF PSORT对VvWRKY18进行了亚细胞定位预测。结果显示, VvWRKY18定位细胞核的预测值为12.0, 而定位在细胞质、叶绿素、线粒体中的预测值为1.0, 推测VvWRKY18主要存在于细胞核中。

3 VvWRKY18的表达特异性分析

3.1 VvWRKY18的组织表达特性分析

以葡萄品种‘左优红’为实验材料, 检测VvWRKY18在不同组织器官中的表达特性。由图6可知, VvWRKY18在根、茎、叶、卷须、叶柄、花芽、花以及小果中均有表达, 但是在不同的组织中相对表达量存在差异, 其中VvWRKY18在花、叶柄和叶中相对表达量较高。推测VvWRKY18参与葡萄的开花进程和叶的生长发育。

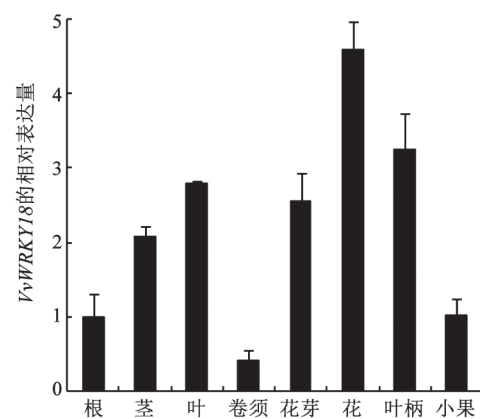


图6 VvWRKY18的组织表达特性分析
Fig.6 Characterization of VvWRKY18 expression in tissues of grape

3.2 几种逆境因子对VvWRKY18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VvWRKY18的相对表达量。由图7可知, 甘露醇、NaCl和低温均可不同程度的诱导VvWRKY18的表达, 其中低温诱导VvWRKY18

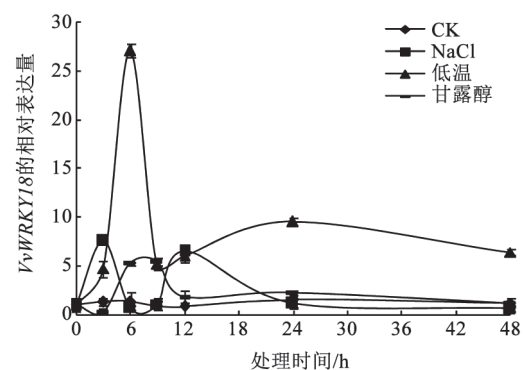


图7 几种逆境因子对葡萄叶片VvWRKY18相对表达量的影响
Fig.7 Quantitative RT-PCR analysis of some stresses-induced VvWRKY18 expression in leaves of grape

表达的效果最为显著,在4 °C处理后6 h相对表达量达到最大,约为对照的27倍。而NaCl和模拟干旱诱导分别在3 h和9 h达到最大值。由此推测 *VvWRKY18*可能参与葡萄抵御多种非生物胁迫逆境,特别是低温胁迫的过程。

3.3 几种逆境信号分子对*VvWRKY18*表达量的影响

植物对逆境胁迫的响应是一个复杂的信号转导过程,本实验研究了多种逆境信号分子对*VvWRKY18*表达量的影响。从图8可以看出,逆境相关的信号物质SA、ABA、NO供体SNP和H₂O₂均可诱导‘左优红’叶片中*VvWRKY18*相对表达量的增加,并分别在12、9、6和12 h的相对表达量达到最大值,表达量变化存在差异;但H₂S供体NaHS对*VvWRKY18*的相对表达量没有影响。推测SA、ABA、SNP和H₂O₂均可能参与*VvWRKY18*介导的葡萄抵御非生物胁迫的过程。

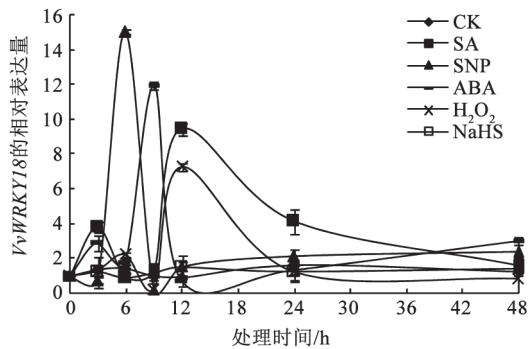


图8 几种逆境相关信号物质对葡萄叶片*VvWRKY18*相对表达量的影响

Fig. 8 Quantitative RT-PCR analysis of growth regulating substances-induced *VvWRKY18* expression in leaves of grape

讨 论

已有研究证明WRKY家族基因在植物应对多种逆境胁迫过程中都起着正向调控的作用。本研究从葡萄抗性品种‘左优红’中克隆得到*VvWRKY18*,其基因全长CDS序列大小为954 bp,编码317个氨基酸序列,与数据库中公布的品种‘黑比诺’氨基酸序列相比,存在3个氨基酸的差异,分别为:70位为甲硫氨酸、73位为丝氨酸、277位为缬氨酸,而数据库中对应该位置的氨基酸分别为亮氨酸、苏氨酸和异亮氨酸。*VvWRKY18*蛋白含有保守的WRKY结构域;主要存在于细胞核中,属于WRKY转录因

子家族的第二类WRKY转录因子(图3-A)。

WRKY家族成员众多,其表达受到真菌、高盐、干旱和机械创伤等的诱导。有报道拟南芥的*AtWRKY18*在调节植物生长及应答干旱、盐胁迫和渗透胁迫等发挥着重要作用,以拟南芥*wrky18*突变体为材料发现其对盐胁迫和渗透胁迫的敏感性减弱(Chen等2010),但WRKY18的功能研究还刚起步,亦不清楚葡萄WRKY18的功能。本研究从葡萄中克隆得到的*VvWRKY18*,其荧光定量PCR结果显示该基因在盐和干旱胁迫下均有一定程度的诱导表达,且首次发现低温能够显著诱导*VvWRKY18*表达(图7),暗示该基因可能参与葡萄对低温的胁迫应答反应。此外,*VvWRKY18*在不同组织中的表达特性结果显示:*VvWRKY18*在不同组织中均有表达,但表达量存在差异,其中在花、叶柄和叶中表达量较高,推测*VvWRKY18*可能调控葡萄的开花进程和叶的生长发育过程(图6)。

植物经一系列信号转导过程参与与逆境胁迫的应答,ABA、SA、NO、H₂O₂和H₂S均是与逆境应答密切相关的重要信号分子。研究发现*AtWRKY18*受ABA和SA的诱导(Chen等2010);*AtWRKY18*和*AtWRKY40*、*AtWRKY60*相互作用,与ABA信号途径中*ABI4*、*ABI5*的W-box结合并抑制*ABI4*和*ABI5*的表达(Liu等2012)。本实验通过定量PCR检测发现*VvWRKY18*受ABA诱导上调表达,推测*VvWRKY18*可能通过参与ABA信号途径,调控葡萄的胁迫应答或生长发育。NO是一种重要的气体信号分子,有研究证实NO参与植物抗冷过程。来自硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)途经的NO参与拟南芥低温驯化过程,并通过诱导脯氨酸含量增加提高植物抗冻性(Zhao等2009);1 °C低温处理能诱导枇杷果实冷藏过程中内源NO含量,施加NO清除剂咪唑-1-氧-3-氧化物(tramethylimidazole-1-oxyl-3-oxidepotassium salt, cPTIO)能逆转低温诱导的NO含量增加,且cPTIO还能够显著增强低温下细胞膜脂过氧化程度和超氧阴离子含量,同时降低内源NO含量,还能降低超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性(Xu等2012);Zhao等(2011)在分子水平上证明,NO通过促进*CBF* (C-repeat binding factor)基因表达提高收获后番茄对低温的抵御能力。本研究中NO的供体

SNP能诱导VvWRKY18在处理6 h时显著上调表达,与低温诱导VvWRKY18表达显著上调时间相一致,说明VvWRKY18可能通过调控NO信号分子代谢途径来调节葡萄对低温胁迫应答。H₂S是继NO与一氧化碳(carbon monoxide, CO)之后的第3种气体信号分子。有研究发现H₂S能直接提高烟草悬浮细胞对高温胁迫的抗性(Li等2012), Fu等(2013)发现内源H₂S能参与到葡萄应答低温胁迫的过程,本实验定量PCR结果表明VvWRKY18不受外源H₂S的诱导表达,推测H₂S可能作为VvWRKY18下游发挥作用。H₂O₂亦作为信号分子参与调控一系列胁迫响应的信号转导,李希东等(2011)在葡萄中研究表明内源H₂O₂参与植物应答低温胁迫过程,发现H₂O₂不仅通过平衡体内活性氧含量降低低温对其损害,也可通过提高低温相关基因表达提高葡萄抗低温能力。本实验中发现H₂O₂能诱导VvWRKY18的表达,推测VvWRKY18可能通过H₂O₂诱导保护酶活性的升高,提高葡萄抵御的低温的能力。葡萄转录因子WRKY18是否是葡萄抵御逆境胁迫的正向调控因子,及其调控的分子机制等还有待进一步研究。

参考文献

- 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
- 侯丽霞, 王文杰, 郭秀萍, 傅佩宁, 刘新(2013). 三个葡萄WRKYs基因的克隆及表达特性分析. 植物生理学报, 49 (3): 289~296
- 李希东, 侯丽霞, 刘新, 卢江(2011). H₂O₂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
- 张广科, 肖培连, 侯丽霞, 王文杰, 马倩, 刘新(2014). 葡萄VvBAP1基因的克隆及表达特性分析. 植物生理学报, 50 (6): 829~934
- Chen C, Chen Z (2002). Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol*, 129 (2): 706~716
- Chen H, Lai ZB, Shi J, Shi JW, Xiao Y, Chen ZX, Xu XP (2010). Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biol*, 10: 281
- 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
- Fu PN, Wang WJ, Hou LX, Liu X (2013). Hydrogen sulfide is involved in the chilling stress response in *Vitis vinifera* L. *Acta Soc Bot Pol*, 82 (4): 295~302
- Guo C, Guo R, Xu X, Gao M, Li X, Song J, Zheng Y, Wang X (2014). Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family. *J Exp Bot*, 65 (6): 1513~1528
- Lai ZB, Vinod KM, Zheng ZY, Fan BF, Chen ZX (2008). Roles of *Arabidopsis* WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant responses to pathogens. *BMC Plant Biol*, 8: 68
- 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
- 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 (6): 1325~1337
- Li ZG, Gong M, Xie H, Yang L, Li J (2012). Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced heat tolerance in tobacco (*Nicotiana tabacum* L) suspension cultured cells and involvement of Ca²⁺ and calmodulin. *Plant Sci*, 185: 185~189
- Liu H, Yang W, Liu D, Han Y, Zhang A, Li S (2011). Ectopic expression of a grapevine transcription factor VvWRKY11 contributes to osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Biol Rep*, 38 (1): 417~427
- Liu ZQ, Yan L, Wu Z, Mei C, Lu K, Yu YT, Liang S, Zhang XF, Wang XF, Zhang DP (2012). Cooperation of three WRKY-domain transcription factors WRKY18, WRKY40, WRKY60 in repressing two ABA-responsive genes *ABI4* and *ABI5* in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 63 (18): 6371~6392
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25: 402~408
- Marchive C, Mzid R, Deluc L, Barrieu F, Pirrello J, Gauthier A, Corio-Costet MF, Regad F, Cailleateau B, Hamdi S et al (2007). Isolation and characterization of a *Vitis vinifera* transcription factor, VvWRKY1, and its effect on responses to fungal pathogens in transgenic tobacco plants. *J Exp Bot*, 58 (8): 1999~2010
- Mzid R, Marchive C, Blancard D, Deluc L, Barrieu F, Corio-Costet MF, Drira N, Hamdi S, Lauvergeat V (2007). Overexpression of VvWRKY2 in tobacco enhances broad resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Physiol Plant*, 131 (3): 434~447
- Siddig M, Nassuth A (2011). *Vitis CBF1* and *Vitis CBF4* differ in their effect on *Arabidopsis* abiotic stress tolerance, development and gene expression. *Plant Cell Environ*, 34 (8): 1345~1359
- Tak H, Mhatre M (2013). Cloning and molecular characterization of a

- putative *bZIP* transcription factor *VvbZIP23* from *Vitis vinifera*. *Protoplasma*, 250 (1): 333~345
- Wang F, Hou X, Tang J, Wang Z, Wang S, Jiang F, Li Y (2012). A novel cold-inducible gene from Pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*), *BcWRKY46*, enhances the cold, salt and dehydration stress tolerance in transgenic tobacco. *Mol Biol Rep*, 39 (4): 4553~4564
- 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
- Xu MJ, Dong JF, Zhang M, Xu XB, Sun L (2012). Cold-induced endogenous nitric oxide generation plays a role in chilling tolerance of loquat fruit during postharvest storage. *Postharvest Biol Technol*, 65: 5~12
- Zhao MG, Chen L, Zhang LL, Zhang WH (2009). Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 151 (2): 755~767
- Zhao RR, Sheng JP, Lv SN, Zheng Y, Zhang J, Yu MM, Shen L (2011). Nitric oxide participates in the regulation of *LeCBF1* gene expression and improves cold tolerance in harvested tomato fruit. *Postharvest Biol Technol*, 62 (2): 121~126