



董梦迪, 吴佳鸿, 周悦妍, 郝博雯, 张玮, 彭军波, 邢启凯. 葡萄 VvWRKY53 的分子特性与表达模式分析[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(02): 40-50.
DONG Mengdi, WU Jiahong, ZHOU Yueyan, HAO Bowen, ZHANG Wei, PENG Junbo, XING Qikai. Molecular characteristics and expression pattern analysis of grapevine VvWRKY53[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(02): 40-50.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.02.04

葡萄 VvWRKY53 的分子特性与表达模式分析

董梦迪^{1,2} 吴佳鸿^{1,3} 周悦妍¹ 郝博雯¹ 张玮¹ 彭军波¹ 邢启凯^{1*}

(1. 北京市农林科学院 植物保护研究所/北方果树病虫害绿色防控北京市重点实验室, 北京 100097;

2. 山西农业大学 植物保护学院, 山西 晋中 030801;

3. 国家林业和草原局生物灾害防控中心, 沈阳 110034)

摘要 为探究 VvWRKY53 生物学功能, 以葡萄品种‘无核白’为材料, 利用逆转录 PCR 技术 (Reverse transcription-PCR, RT-PCR) 成功克隆获得一条 CDS 长为 453 bp 的葡萄 WRKY53 基因。利用生物信息学手段对该基因及其编码蛋白的序列特征进行分析, 利用烟草瞬时表达方法对候选蛋白进行亚细胞定位分析, 通过实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术检测该转录因子在喷施水杨酸 (SA)、脱落酸 (ABA)、茉莉酸甲酯 (MeJA)、1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 4 种激素, 几丁质 (chitin) 和鞭毛蛋白 (flg22) 2 种激发子以及可可毛色二孢菌接种后的表达模式, 利用酵母系统确定其转录活性。结果表明: VvWRKY53 编码蛋白质分子质量为 18.1 ku, 理论等电点 (pI) 为 9.67。亚细胞定位结果显示 VvWRKY53 蛋白定位于烟草细胞核。系统进化树结果表明该转录因子与拟南芥 AtWRKY45、AtWRKY75 蛋白亲缘关系较近。qRT-PCR 结果表明 SA、MeJA 和 ACC 喷施‘无核白’葡萄叶片后, VvWRKY53 基因的相对表达水平均发生变化; ABA 喷施后, 该基因相对表达量逐渐上升; chitin 和 flg22 处理均能快速诱导该基因的相对表达。可可毛色二孢菌接种‘夏黑’半木质化枝条后, VvWRKY53 基因的相对表达持续上调; 在酵母中证实 VvWRKY53 具有转录激活活性。综上, 葡萄转录因子 VvWRKY53 在可可毛色二孢菌侵染的过程中发挥作用。

关键词 葡萄; 可可毛色二孢; WRKY 转录因子; 生物信息学分析; 基因表达

中图分类号 S436.631.1

文章编号 1007-4333(2025)02-0040-11

文献标志码 A

Molecular characteristics and expression pattern analysis of grapevine VvWRKY53

DONG Mengdi^{1,2}, WU Jiahong^{1,3}, ZHOU Yueyan¹, HAO Bowen¹, ZHANG Wei¹,
PENG Junbo¹, XING Qikai^{1*}

(1. Beijing Key Laboratory of Environment Friendly Management of Fruit Diseases and Pests in North China/Institute of Plant Protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China;

2. College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China;

3. Center for Biological Disaster Prevention and Control, National Forestry and Grassland Administration, Shenyang 110034, China)

Abstract To explore the biological function of VvWRKY53, the VvWRKY53 gene containing a coding sequence (CDS) of 453 bp was cloned by RT-PCR from the cDNA of ‘Thompson seedless’. The molecular characteristics of the VvWRKY53 gene and its encoded protein were analyzed using bioinformatics tools.

收稿日期: 2024-03-04

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助项目 (CARS-29); 国家自然科学基金项目 (31801686); 北京市农林科学院科技创新能力建设项目 (KJ CX20190406)

第一作者: 董梦迪 (ORCID: 0009-0004-1591-7521), 硕士研究生, E-mail: d2390308064@163.com

通讯作者: 邢启凯 (ORCID: 0009-0008-0523-016X), 副研究员, 主要从事植物与病原菌互作研究, E-mail: qikaixing@163.com

The subcellular localization of candidate protein was determined by transient expression in *Nicotiana benthamiana*. The expression patterns of the VvWRKY53 gene after spraying with four hormones: salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA), methyl jasmonate (MeJA), and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC); two elicitors: chitin and flg22, and after inoculation with *Lasiodiplodia theobromae* were detected using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The transcriptional activation or inhibitory activity of VvWRKY53 was determined by yeast system. The results showed that: The molecular weight of the VvWRKY53 protein is 18.1 ku, which has a theoretical isoelectric point (pI) of 9.67. The VvWRKY53 protein is located in the nucleus of *Nicotiana benthamiana*. The phylogenetic tree analysis indicates that VvWRKY53 has high similarity to AtWRKY45 and AtWRKY75 proteins. The results of qRT-PCR reveal that the relative expression level of VvWRKY53 changed after spraying SA, MeJA and ACC on 'seedless white' grape leaves. The relative expression level of VvWRKY53 gene is gradually increased after ABA treatment. Both chitin and flg22 can rapidly induce the expression of the gene. The relative expression of VvWRKY53 gene continued to be up-regulated after inoculation of 'summer black' semi-woody branches with *Lasiodiplodia theobromae*. It is confirmed that VvWRKY53 has transcriptional activation activity in yeast. The results indicate that the transcription factor VvWRKY53 may play an important role in the process of *Lasiodiplodia theobromae* infection.

Keywords grapevine; *Lasiodiplodia theobromae*; WRKY transcription factor; bioinformatics analysis; gene expression

葡萄在全球范围内种植广泛,是最重要的经济果树之一。截止2022年,我国葡萄园面积达70.51万hm²,葡萄产量为1537.79万t^[1]。近年来,葡萄枝干病害(Grapevine trunk diseases, GTDs)在全球各葡萄产区广泛流行。我国枝干病害的发生以葡萄溃疡病(*Botryosphaeria dieback*)为主,该病是葡萄产量和品质的限制因素^[2-3]。该病害由葡萄座腔菌科真菌引起,一般年份中该病造成的损失约为3%~8%,严重时可达10%~20%,极端环境条件造成损失高达100%^[4]。在葡萄主产地调查取样并鉴定发现,引起我国葡萄溃疡病的主要致病菌有:葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)^[5]、色二孢菌(*Diplodia seriata*)^[6]、可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)^[7]、假可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia pseudotheobromae*)^[2]、*Neofusicoccum mangiferae*^[3]和小新壳梭孢菌(*Neofusicoccum parvum*)^[8]。统计发现,可可毛色二孢是我国葡萄产区常见优势种群,致病力最强。每年我国因葡萄溃疡病造成的经济损失可达10亿元人民币以上,严重影响着葡萄产业的健康发展^[9]。目前对于该病原菌的研究方向主要集中在病原菌的分离与种类鉴定、种群的遗传结构、病原菌对寄主的侵染过程以及毒素产生等方面^[10],但对于寄主葡萄对可可毛色二孢菌的免疫调节机制还知之甚少。

转录因子是能够与目标基因启动子区的顺式作用元件特异结合从而对该基因表达进行转录调控的蛋白分子^[11]。WRKY类转录因子可通过其WRKY结构域(WRKYGQK)识别并与自身或下游靶基因启动子的顺式作用元件W-box特异性结合,以此调控(激活或阻遏)目标基因转录水平^[12-13]。WRKY类转录因子最显著的结构特征为:N端至少含有60个氨基酸的高度保守的WRKY结构域^[14];羧基端含有1个C₂H₂或C₂HC型锌指基序。据此将该家族蛋白分为I~III3个亚组,来自亚组I的蛋白质包含2个WRKY域和1个Cys2His2锌指基序,而来自亚组II和III的蛋白质分别包含1个WRKY域和1个Cys2His2或Cys2His-Cys。在寄主植物和病原菌互作过程中,WRKY转录因子既可作为植物免疫调节的正调控因子,也可作为负调控因子发挥作用。此外,WRKY转录因子还可参与茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)和脱落酸(ABA)等多种激素级联信号通路的转导^[15]。拟南芥AtWRKY70是作用于水杨酸信号通路介导的抗病反应的关键调控因子(Non-expressor of pathogenesis-related genes 1, *NPR1*)下游的转录因子之一,AtWRKY70的超表达会显著提高与水杨酸信号转导途径相关的病程相关基因(*PR*)的表达,最终增强超表达植株对丁香假单胞菌的抗性^[16]。在大豆中,*GmWRKY40*在脱落酸和1-氨基

环丙烷-1-羧酸(ACC)处理后1 h内表达上调最为显著,响应迅速^[17]。据报道,葡萄WRKY转录因子还参与植物的免疫调节,如:赤霞珠 *VvWRKY1* 基因的表达受双氧水、乙烯与水杨酸诱导,在烟草中过表达该基因后发现植株对霜霉菌(*Peronospora tabacina*)和白粉菌(*Erysiphe cichoracearum*)的抗病性增强^[18]。*VvWRKY1*的过表达可上调茉莉酸途径中抗病基因的表达,从而提高了转基因株系对灰霉病和霜霉病的抗性^[19]。赤霞珠 *VvWRKY2* 基因在健康葡萄的不同组织器官中差异表达,并且受葡萄霜霉菌和创伤诱导,在烟草中过表达该基因可以降低葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)对烟草叶片的侵染,提高烟草根部对腐霉菌(*Pythium* spp.)以及种子对链格孢菌(*Alternaria tenuis*)的抗病性^[20]。华东葡萄 *VpWRKY3* 基因受病原菌、乙烯、水杨酸和干旱的诱导表达,该基因的烟草过表达植株增强了对青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)的抗性^[21]。中国野生华东葡萄‘白河-35-1’的 *VpWRKY1* 和 *VpWRKY2* 受水杨酸及灰霉菌的诱导表达,其在拟南芥中的异源表达可以提高转基因植株对白粉病的抗性^[22]。中国野生毛葡萄 *VqWRKY52* 基因受水杨酸诱导表达,该基因的拟南芥过表达植株显著提高了对白粉病菌(*Golovinomyces cichoracearum*)和丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)番茄变种DC3000的抵抗力,但增加了其对灰霉病的易感性^[23]。利用CRISPR/Cas9技术敲除 *VvWRKY52* 可以提高转基因葡萄对灰霉病的抗性^[24]。

本研究前期通过高通量转录组测序技术(RNA-Seq),比较分析了可可毛色二孢侵染葡萄抗病品种‘梅鹿辙’和感病品种‘品丽珠’的差异表达基因,发现多个WRKY基因在抗感品种间存在差异表达^[25]。其中 *VvWRKY53* 在抗病品种‘梅鹿辙’的表达量是感病品种‘品丽珠’的5.3倍,表明 *VvWRKY53* 转录因子可能参与了葡萄对可可毛色二孢的免疫调节。因此,本研究通过克隆葡萄 *VvWRKY53*,对其分子结构特征、亚细胞定位和转录活性进行分析,同时利用qRT-PCR检测该基因在多种激素、病原激发子以及病原菌侵染条件下的表达模式,以期对 *VvWRKY53* 的分子功能研究和抗病葡萄新品种的培育提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试可可毛色二孢菌株CSS-01s由本实验室分离并继代培养,葡萄基因功能研究的模式种之一‘无核白’组培苗由本实验室继代培养,易感可可毛色二孢葡萄品种‘夏黑’栽培于北京市农林科学院林业果树研究所试验基地。于Invitrogen公司购买反转录酶SuperScript® III,于宝生物工程有限公司(大连)购买LA Taq聚合酶、SYBR® Premix Ex Taq™ II、T4 ligase、限制性内切酶、pMD18-T载体等。几丁质chitin(来源于虾壳,C9752)购买自Sigma公司,鞭毛蛋白flg22(QRLSTGSRIN-SAKDDAAGLQIA,纯度>95%)和试验所需引物的合成委托生工生物工程(上海)股份有限公司,大肠杆菌感受态(*Escherichia coli*)菌株Trans5α购买于北京全式金生物技术有限公司。用于亚细胞定位分析的pCam35S-GFP载体、农杆菌菌株EHA105由本实验室保存备用。常规化学药品均为分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 激素、激发子及接种处理

根据Jiao等^[26]提供的方法进行激素及激发子处理,将葡萄‘无核白’组培苗置于26℃人工气候室,于光照14 h/黑暗10 h条件下培养2个月。分别将浓度为100 μmol/L的脱落酸、茉莉酸甲酯、水杨酸、1-氨基环丙烷-1-羧酸、10 μg/mL几丁质和1 μmol/L flg22喷施于葡萄‘无核白’叶片上,以喷施等体积灭菌ddH₂O作为对照组;取样时间为上述处理完成后的0、1、3、6、12和24 h,收集叶片并经液氮速冻后保存于-80℃冰箱备用,每个处理设置重复3次。按照Yan等^[5]所述的接种方法,将可可毛色二孢CSS-01s菌块转移至马铃薯葡萄糖(Potato dextrose agar, PDA)培养基上,26℃暗培养48 h。选择一年生的葡萄‘夏黑’半木质化枝条,75%乙醇表面消毒处理,用孔径5 mm的打孔器在枝条茎节中间处制造伤口后接种5 mm直径的CSS-01s菌饼;以接种同等大小的无菌PDA块作为对照。将接种材料置于温度为26℃、相对湿度为90%、光周期16 h/8 h的接种室培养,随后于0、1、3、6、12和24 h时,收集接种点上下2.0 cm范围内的枝条韧皮组织,液氮速冻后于-80℃保存备用。

1.2.2 RNA提取及cDNA合成

将上述收集的‘无核白’葡萄组织样品用液氮研磨至粉末,参照植物多糖多酚 RNA 提取试剂盒(Aidlab biotechnologies)说明书,进行 RNA 提取。用 1% 变性琼脂糖凝胶电泳检测上述 RNA 的质量及完整性,随后使用 NanoDrop 2000 (Thermo scientific)测量提取 RNA 的浓度。参照 SuperScript III 反转录试剂盒(Invitrogen)说明书,将提取的 RNA 反转录为第一链 cDNA,于 -20°C 冰箱低温保存备用。

1.2.3 VvWRKY53 基因的克隆及生物信息学分析

将上述反转录得到的‘无核白’葡萄 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增反应,50 μL 扩增体系包含: $10\times\text{PCR buffer}(\text{Mg}^{2+} \text{ plus})$ 5.0 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物各 1.0 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 4.0 μL , cDNA 1 μL , LA Taq 0.5 μL , 补充 ddH₂O 至 50.0 μL 。扩增程序如下:首先 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 设置 32 个循环;随后 72°C 终延伸 10 min。进一步将获得的 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测后,利用 DNA 凝胶纯化回收试剂盒(Qiagen)将候选基因片段回收,然后将回收片段连接至 pMD18-T 载体,最后将终载体定名为 WRKY53-T,转化 Trans5 α 大肠杆菌感受态,于北京诺赛基因组研究中心有限公司测序验证。采用 DNAMAN6.0 软件将 VvWRKY53 基因序列翻译成蛋白序列,使用 ProtParam 分析预测该蛋白的分子量、等电点和保守功能域,使用 MEGA 7 软件构建蛋白系统进化树。

1.2.4 VvWRKY53 蛋白的亚细胞定位

根据 VvWRKY53 基因序列,分别在正向和反向引物引入 BamHI 和 SalI 酶切位点设计特异引物:上游引物 W53-BF: 5'-AGGATCCATGGAAGGCCACCAAATAC-3';下游引物 W53-SR: 5'-AGTCGACTGAGATGGGAAAATATG-3'(下划线分别为 BamHI 和 SalI 酶切序列)。以 WRKY53-T 质粒为模板进行 PCR 扩增,回收片段连接至 T 载体,利用 BamHI 和 SalI 对其进行双酶切,将酶切回收产物插入至 pCam35S-GFP 载体相同的酶切位点间,将该重组载体命名为 W53-GFP。测序比对正确后将 W53-GFP 质粒转化农杆菌 EHA105 感受态。挑取单克隆菌落并过夜培养,配

制浓度分别为 100 mmol/L 乙酰丁香酮(AS)、2.5 mol/L MgCl₂ 和 1 mol/L MES(pH 5.8)的农杆菌侵染液,将农杆菌菌液 OD₆₀₀ 调至 0.5 后注射到本生烟表皮细胞,48 h 后置于激光共聚焦扫描显微镜(Zeiss lsm880)观测并拍照。

1.2.5 VvWRKY53 基因在激素、病原激发子以及可可毛色二孢侵染下的表达特性分析

根据 VvWRKY53 基因序列设计实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)特异引物,正向引物 W53-qF: 5'-GCAGAAAGCAGTCAAGAA-3', 反向引物 W53-qR: 5'-GCCTCAAGATGTGTTCAA-3'。以葡萄延伸因子 VvEF1 γ 为内参基因,正向引物 VvEF1 γ -qRT-F: 5'-GCGGGCAAGAGATACCTCAA-3', 反向引物 VvEF1 γ -qRT-R: 5'-TCAATCTGTCTAGGAAAGGAAG-3'。利用 SYBR Green 染料法,参照试剂盒提供的说明书,使用 ABI7500qRT-PCR 仪器进行特异性扩增。20 μL 反应体系如下:cDNA 模板 0.5 μL , SYBR Premix Ex TaqTM 10 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的正向和反向引物各 0.5 μL , ROX Reference Dye II 0.4 μL , 最后补 ddH₂O 至终体积 20 μL 。每个样品设置 3 次重复。qRT-PCR 的反应程序: 95°C 预变性 30 s, 95°C 5 s, 60°C 10 s, 72°C 延伸 10 s, 扩增 42 个循环。最后用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算 VvWRKY53 基因的相对表达水平。

1.2.6 VvWRKY53 酵母杂交载体构建及转录活性分析

引入 EcoRI 和 SalI 酶切位点,以 WRKY53-T 质粒为模板进行 PCR 扩增,正向引物序列 W53-EF: 5'-AGAATTTCATGGAAGGCCACCAAATAC-3', 反向引物序列 W53-SR: 5'-AGTCGACTGAGATGGGAAAATATG-3'(下划线分别代表 EcoRI 和 SalI 酶切序列)。琼脂糖凝胶回收 VvWRKY53 的扩增片段,将其连接到 T 载体上,经 EcoRI 和 SalI 双酶切后回收目的基因片段,将其插入至 pGBKT7-BD 载体相同的酶切位点间,获得融合载体,测序验证载体构建正确并将其命名为 BD-W53。将 pGADT7-AD(AD)和 BD-W53 载体配对共转化酵母菌株 Y₂HGold 感受态。质粒 pGADT7-T(简称为 AD-T7)与 pGBKT7-Lam(简称为 BD-Lam)组合配对作为本试验阴性对照组,AD-T7 与 pGBKT7-53(简称为 BD-53)配对组合作为阳性对照组。采用

PEG/LiAc法将载体组合转化至酵母菌感受态细胞,将各组合涂布于SD/-Leu/-Trp固体培养基上,30℃培养箱培养4~5 d。使用SD/-Leu/-Trp液体培养基将上述生长出来的转化子摇培14 h,离心收集菌体,用0.9% NaCl将培养液OD₆₀₀调至0.5,进一步稀释培养液至初始浓度的1/10、1/100和1/1 000,分别转移到SD/-Trp和SD/-Trp/-His/-Ade固体缺失培养基中,30℃培养箱静置培养4~5 d,检测酵母菌落生长情况并记录。

2 结果与分析

2.1 VvWRKY53的蛋白特性

对以葡萄‘无核白’cDNA为模板扩增得到的目的片段进行测序,使用DNAMAN 6.0软件将该测

序序列与NCBI网站参考序列(NM_001281289)进行比对发现,二者CDS编码序列长度一致,均为453 bp(图1)。对VvWRKY53编码氨基酸序列进行分析,结果表明该转录因子编码151个氨基酸。分析发现该蛋白碱性氨基酸(R和K)共有27个,酸性氨基酸(D和E)共有16个,推测VvWRKY53为碱性蛋白。使用ProtParam在线软件预测分析VvWRKY53编码蛋白特征:VvWRKY53编码蛋白分子式为C₇₉₂H₁₂₁₉N₂₂₇O₂₂₅S₆,相对分子量为18.1 ku,推定其等电点(pI)为9.67。理论上,VvWRKY53蛋白脂肪系数(Aliphatic index)为49.07,推定的亲水性平均值(Grand average of hydropathicity, GRAVY)是-1.048,不稳定指数48.40,推定该蛋白为亲水不稳定蛋白。

```

1      ATGGAAGGCCACCAATTACTTTTCTGTTTCATCAAAATCACCCGCAAAATCCTTTTCCA
      M E G H Q L L F P G S S K S P A N P F P
61     CCAAAACATGGCAAATTTTCATGCTATGAACATTTATAAGAGTGCTGGTTTGTGCTCTCT
      P N M A N F H A M N I Y K S A G F D A S
121    GAGACCAAGGAAAAACCAGGTAAAAAGGAAGTCAAAAGAGATTAGAAAGCACAGATT
      E T K E K P G K K E G Q K K I R K H R F
181    GCGTTTCAACGAGGAGCCATGTTGATATCCTTGATGATGGGTATCGATGGAGGAATAT
      A F Q T R S H V D I L D D G Y R W R K Y
241    GGGCAGAAAGCAGTCAAGAACAAATTTCCAGAAAGTACTACCGGTGCAGGTATAAA
      G Q K A V K N N K F P R S Y Y R C T Y K
301    GACTGCAATGTGAAGAACGAGGTCCAACGCTCTCAAAAGATGAAGAGATTGTAGTCACA
      D C N V K K Q V Q R L S K D E E I V V T
361    ACCTATGAAGGCATTATACACACCTGTGGAGAAGCCACCGAGAACTTTGAACACATC
      T Y E G I H T H P V E K P T E N F E H I
421    TTGAGGCAGATGCAATCATATTTTCCATCTCA
      L R Q M Q S Y F P I S

```

方框:WRKYQK保守结构;下划线:锌指结构。

Box indicates the WRKYQK conserved domain; Underline indicates the zinc finger motif.

图1 VvWRKY53基因ORF及其推导的氨基酸序列

Fig. 1 The open reading frame of VvWRKY53 and the sequence of deduced amino acid

2.2 VvWRKY53系统进化树分析

将VvWRKY53基因序列在NCBI中进行Blast比对获得其在拟南芥、烟草、葡萄、水稻和小麦5种植物中的WRKY同源基因。为了确认葡萄VvWRKY53蛋白的系统进化位置,利用MEGA 7软件将该蛋白与其WRKY同源蛋白比对分析并构建系统进化树(图2)。结果发现,葡萄VvWRKY53蛋白与拟南芥中的AtWRKY45和AtWRKY75蛋白亲缘关系相近,相似度分别为54.88%和60%。

2.3 VvWRKY53蛋白的亚细胞定位

将对照载体pCam35S-GFP和融合表达载体W53-GFP转化农杆菌EHA105感受态,调整菌液

浓度后注射到本生烟草叶片的表皮细胞中瞬时表达。培养48 h后,通过激光共聚焦显微镜观察发现,VvWRKY53和对照GFP在本生烟草叶片中的亚细胞定位不同(图3)。在本生烟草细胞核和细胞质中均可观察到对照GFP的绿色荧光,而在注射W53-GFP载体的本生烟草叶片中,仅在细胞核内可观察到绿色荧光信号,并且该绿色荧光信号与细胞核定位蛋白(dsRed-NLS)的红色荧光信号重叠,因而推定VvWRKY53蛋白是细胞核定位蛋白。

2.4 VvWRKY53转录激活活性分析

为了检测VvWRKY53是否存在自激活活性,将BD-W53重组质粒和AD空载体、BD-53和AD-T7、BD-Lam和AD-T7分别配对后共同转入酵母

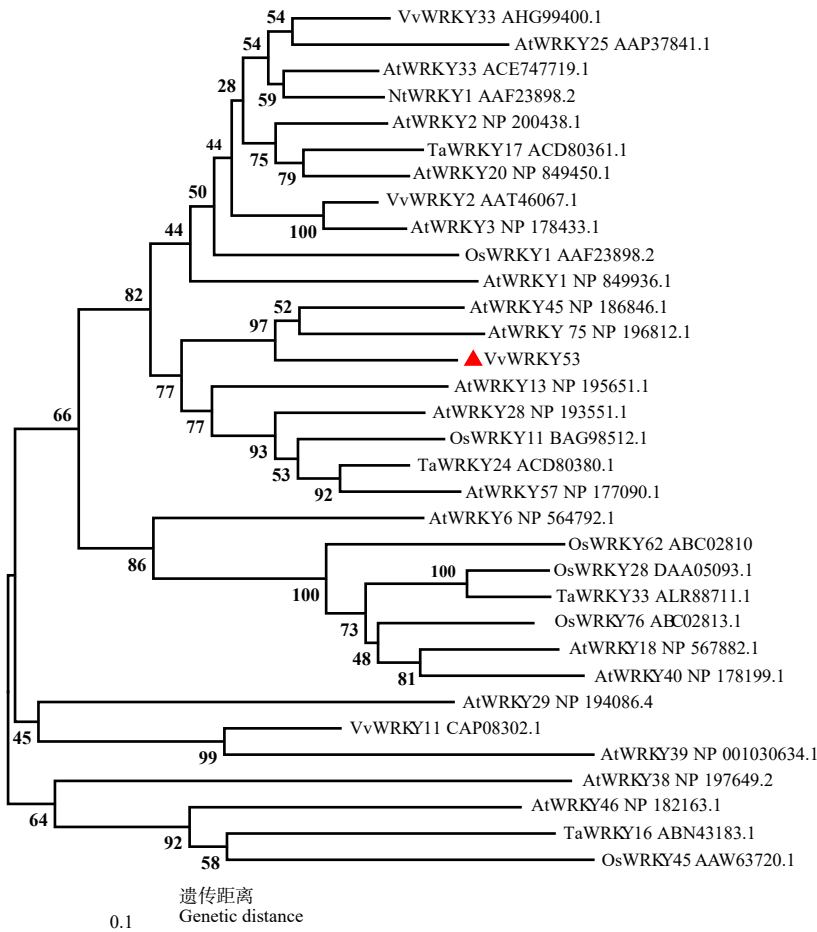


图 2 葡萄 VvWRKY53 蛋白与其他物种 WRKY 蛋白的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of VvWRKY53 in grapevine and the WRKY protein amino acid sequence in other species

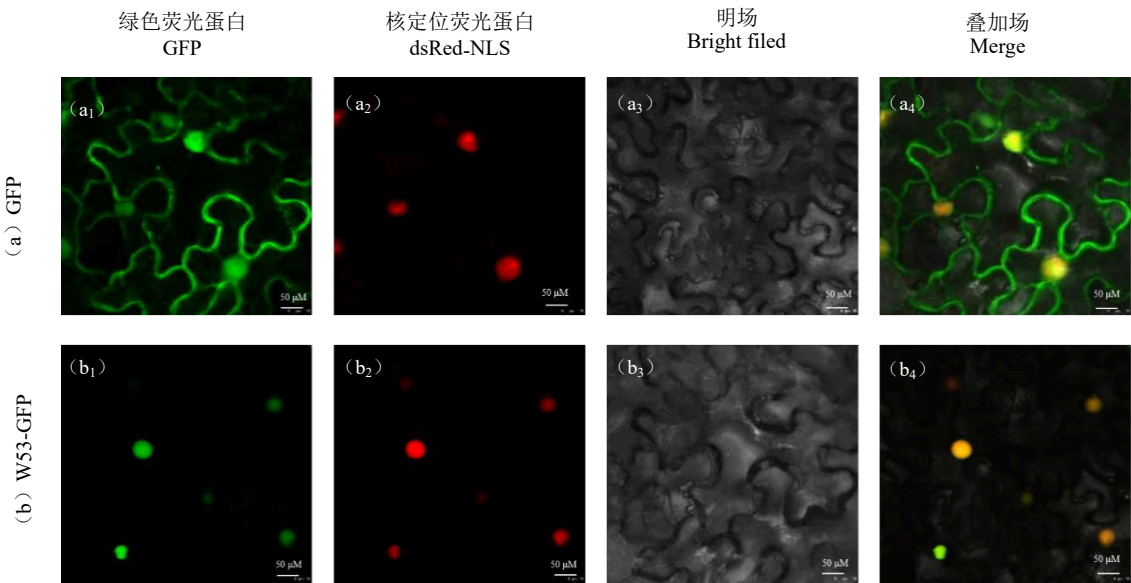
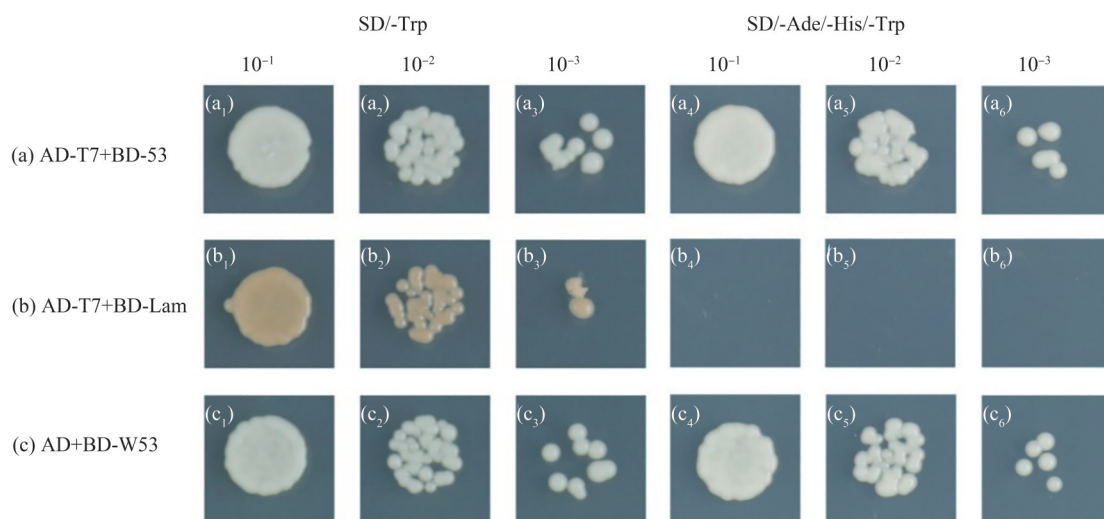


图 3 VvWRKY53 蛋白在本生烟表皮中的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of VvWRKY53 in leaf tissue of tobacco

感受态细胞(图4)。3个组合的酵母菌落均可在SD/-Trp缺失培养基上生长,表明各组合质粒都成功在酵母细胞中表达;在SD/-Ade/-His/-Trp三缺培养基上,转化阴性对照BD-Lam和AD-T7的酵母

菌生长受限,而转化BD-W53和AD的载体组合、阳性对照BD-53和AD-T7载体组合的酵母可以正常生长。以上研究结果说明VvWRKY53在酵母中具有转录激活活性。



AD-T7+BD-53为阳性对照组;AD-T7+BD-Lam为阴性对照组;AD+BD-W53为试验组。 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 分别代表酵母菌液稀释10倍、100倍、1 000倍。

AD-T7+BD-53 is positive control group. AD-T7+BD-Lam is negative control group. AD+BD-W53 is experimental group. 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} represent $10\times$, $100\times$ and $1\,000\times$ dilutions of the yeast solution, respectively.

图4 VvWRKY53转录因子的自激活活性验证

Fig. 4 Auto-activity assays of VvWRKY53 transcription factor

2.5 VvWRKY53基因的表达分析

为了探究VvWRKY53基因对激素的应答情况,对‘无核白’组培苗进行激素喷施后定量分析该基因的表达变化。结果显示:茉莉酸甲酯处理后,VvWRKY53的相对表达量呈先上升后下降的趋势,在12 h时表达量达到最大,是0 h的20倍,24 h时下降为0 h的10倍左右(图5(a));脱落酸处理后,VvWRKY53的相对表达量逐渐上升,处理24 h后其表达量达到峰值,为0 h的5倍表达水平(图5(b));水杨酸处理后,VvWRKY53基因的相对表达量先上升后下降,在6 h时达到峰值,是0 h表达量的15倍(图5(c));1-氨基环丙烷-1-羧酸处理后,VvWRKY53的相对表达量先显著下调后再逐渐上升,24 h时其相对表达量上调至0 h的2倍(图5(d))。

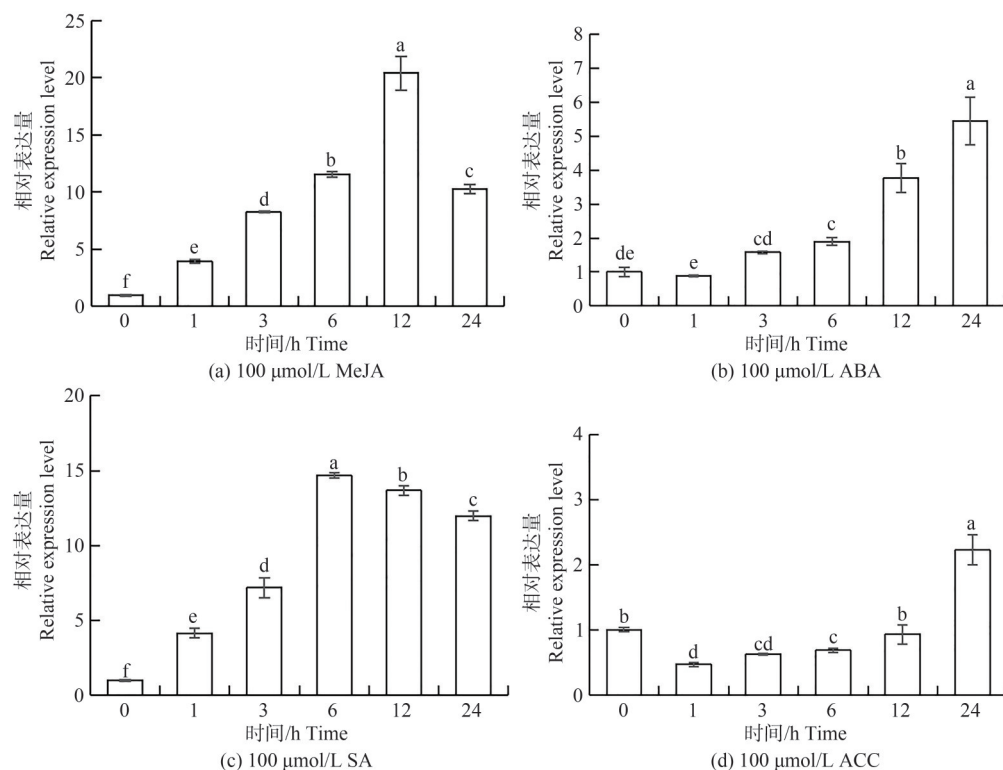
激发子 flag22 和 chitin 处理‘无核白’叶片后,VvWRKY53基因对 flg22 和 chitin 处理表现出显著的表达响应,处理后其相对表达量上升,均在12 h时达到峰值,分别为0 h表达量的25倍(图6(a))和

15倍(图6(b)),并在处理24 h后表达量有所下降。

接种可可毛色二孢CSS-01s后,结果如图7所示,VvWRKY53的相对表达量在侵染后持续升高,24 h时表达量约是0 h的2.5倍,推测VvWRKY53基因可能参与可可毛色二孢菌侵染葡萄的过程。

3 讨论

可可毛色二孢是引起我国葡萄溃疡病的关键病原菌,有效防控可可毛色二孢对葡萄溃疡病的防治具有重要意义。深入研究植物抗病性不仅有助于我们更好地理解植物与病原菌之间的相互作用,揭示植物免疫系统的机制,还能为农业病害管理提供新的思路和方法。本研究从葡萄中克隆了VvWRKY53并分析了其不同激素和激发子以及接种可可毛色二孢处理后的相对表达情况,研究发现该转录因子在MeJA、SA、ABA和ACC等多种激素以及不同激发子处理下

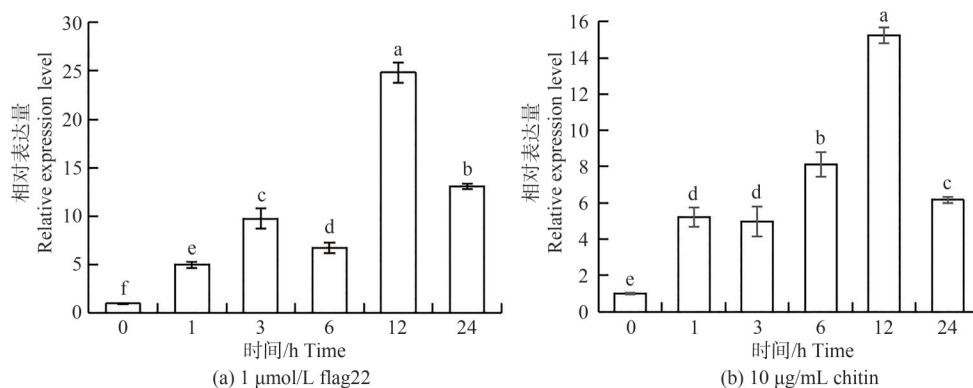


MeJA: 茉莉酸甲酯; ABA: 脱落酸; SA: 水杨酸; ACC: 1-氨基环丙烷-1-羧酸。不同小写字母代表相对表达量在 0.05 水平上差异显著。下同。

MeJA, methyl jasmonate; ABA, abscisic acid; SA, salicylic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Different lowercase letters indicate significant differences for the relative expression at 0.05 levels. The same below.

图5 不同激素处理后葡萄 *VvWRKY53* 基因的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of *VvWRKY53* in different hormonal treatments



flag22: 鞭毛蛋白激发子; chitin: 几丁质激发子。

flag22, flagellin elicitor; chitin, chitin elicitor.

图6 不同激发子处理后葡萄 *VvWRKY53* 基因的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *VvWRKY53* in different elicitor treatments

其表达模式有明显差异,在 MeJA、flag22 和 chitin 处理后 12 h 时 *VvWRKY53* 相对表达量都达到峰值,随后下调,但接种可可毛色二孢后该基因的表达量持续上升。有研究表明这些激素和激发子在植物的免疫反应中扮演着关键角色,它们能

够激活或调节植物的防御机制,增强植物对病原菌的抵抗力^[27-28]。例如,MeJA 和 SA 在植物对多种病原体的防御反应中起着核心作用。MeJA 通常与植物对昆虫和真菌病原体的防御反应相关^[29],SA 则与植物对细菌和真菌病原体的防御

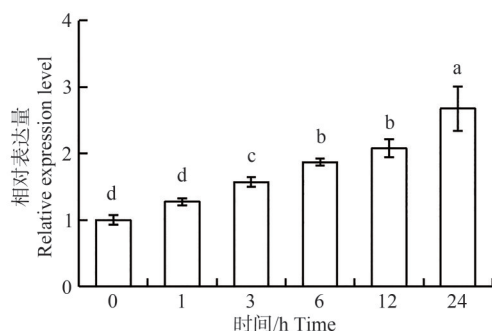


图7 接种可可毛色二孢菌处理后葡萄VvWRKY53基因的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of VvWRKY53 upon *Lasiodiplodia theobromae* CSS-01s inoculation

相关^[30]。ABA作为另一种重要的植物激素,虽然主要与植物的非生物胁迫反应相关,但也被发现在植物的生物防御中发挥作用^[31]。此外,ACC不仅作为乙烯的前体,也参与调节植物的防御反应^[32]。激发子如flg22(来自细菌鞭毛蛋白的肽段)和chitin(真菌细胞壁的组成部分)是植物识别的PAMPs,它们能够触发植物的PTI反应^[33]。通过qRT-PCR技术,本研究揭示了VvWRKY53基因在多种植物激素和激发子处理下的表达模式,特别是在可可毛色二孢菌侵染过程中的持续表达上调,说明该基因可能参与葡萄对生物胁迫的应答,在葡萄免疫途径中扮演着重要的角色并且在不同途径中参与的调节机制可能不同。

此外,本研究通过对VvWRKY53进行分析,VvWRKY53的开放阅读框(ORF)为453 bp,推测编码151个氨基酸,其编码蛋白质分子质量为18.1 ku,推定的理论等电点为9.67。VvWRKY53蛋白定位于细胞核,并具有转录激活活性,与拟南芥中的AtWRKY45和AtWRKY75蛋白亲缘关系密切。有研究报道AtWRKY45蛋白定位于细胞核,其主要在根中表达,能够正向调节拟南芥对磷的吸收^[34]。拟南芥AtWRKY75蛋白发挥功能位置位于细胞核内^[35],通过生化和遗传学分析证实,AtWRKY75可能参与了JA信号通路调节,使植物获得了芸蓼生链格孢和灰葡萄孢的抗性^[36]。今后,可进一步通过基因编辑、蛋白互作和转录组学等技术方法,深入解析VvWRKY53转录因子的生物学功能和调控机制,为葡萄分子抗病育种提供理论基础和技术支持。

4 结论

本研究成功克隆获得一个葡萄转录因子VvWRKY53,并证实其蛋白定位于细胞核,与拟南芥中AtWRKY45和AtWRKY75蛋白亲缘关系较近,通过酵母系统检测发现该蛋白具有转录激活活性。VvWRKY53基因在免疫反应相关的4种激素(SA、ABA、MeJA、ACC)及2种激发子(flgl22和chitin)处理下均表现出响应,尤其是在可可毛色二孢菌接种后,VvWRKY53的相对表达量逐渐上升,说明VvWRKY53转录因子可能在葡萄响应可可毛色二孢菌侵染过程中发挥重要作用。

参考文献 References

- [1] 国家统计局. 葡萄园面积、葡萄产量 [EB/OL]. [2024-09-28]. <https://data.stats.gov.cn/adv.htm?m=advquery&cn=C01>
- [2] National Bureau of Statistics. Vineyard Area, Grape Production [EB/OL]. [2024-09-28]. <https://data.stats.gov.cn/adv.htm?m=advquery&cn=C01> (in Chinese)
- [3] Dissanayake A J, Zhang W, Liu M, Chuksatirote E, Yan J Y, Li X H, Hyde K D. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes pedicel and peduncle discoloration of grapes in China [J]. *Australasian Plant Disease Notes*, 2015, 10(1): 21
- [4] Dissanayake A J, Zhang W, Li X H, Zhou Y, Chethana T, Chuksatirote E, Hyde K, Yan J Y, Zhang G Z, Zhao W S. First report of *Neofusicoccum mangiferae* associated with grapevine dieback in China [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2015, 54: 414-419
- [5] 叶清桐, 李亚萌, 周悦妍, 李兴红, 张玮, 孙倩, 韩昌坪, 燕继晔. 国内外葡萄枝干病害的发生危害与病原菌种类 [J]. *果树学报*, 2021, 38(2): 278-292
- [6] Ye Q T, Li Y M, Zhou Y Y, Li X H, Zhang W, Sun Q, Han C P, Yan J Y. Occurrence of grapevine trunk diseases caused by fungal pathogens in the domestic and overseas [J]. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(2): 278-292 (in Chinese)
- [7] Yan J Y, Xie Y, Yao S W, Wang Z Y, Li X H. Characterization of *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of grapevine canker in China [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2012, 41(4): 351-357
- [8] Yan J Y, Peng Y L, Xie Y, Li X H, Yao S W, Tang M L, Wang Z Y. First report of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria obtusa* in China [J]. *Plant Disease*, 2011, 95(5): 616
- [9] Yan J Y, Li X H, Kong F F, Wang Z Y, Gong L Z, He H P. Occurrence of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria rhodina* in China [J]. *Plant Disease*, 2011, 95(2): 219
- [10] Yan J Y, Xie Y, Zhang W, Wang Y, Liu J K, Hyde K D, Seem R C, Zhang G Z, Wang Z Y, Yao S W, Bai X J, Dissanayake A J, Peng Y L, Li X H. Species of *Botryosphaeriaceae* involved in grapevine dieback in China [J]. *Fungal Diversity*, 2013, 61(1): 221-236
- [11] 张玮, 姚晨伟, 张国军, 谢悦, 李兴红, 徐海英. 中国葡萄主要品种对葡萄座腔菌的抗性评价 [J]. *植物保护*, 2017, 43(3): 177-180, 212
- [12] Zhang W, Yao S W, Zhang G J, Xie Y, Li X H, Xu H Y. Resistant

- evaluation of main grape cultivars in China to *Botryosphaeria dothidea* [J]. *Plant Protection*, 2017, 43 (3): 177-180, 212 (in Chinese)
- [10] Zhou Y Y, Zhang W, Wu L N, Zhang J, Tan H Y, Chethana K, Manawasinghe I S, Liu M, Li X H, Yan J Y. Diversity of fungal communities associated with grapevine trunk diseases in China [J]. *Mycosphere*, 2023, 14(1): 1340-1435
- [11] 颜培涵, 罗健铭, 郝晨星, 孙紫青, 叶蕃春, 李益, 刘恋, 盛玲, 马先锋, 邓子牛. 枸橼 C-05 CmPR4A 上游转录因子 CmWRKY75 的筛选及其抗溃疡病功能分析[J]. 中国农业科学, 2023, 56(21): 4304-4317
Yan P H, Luo J M, Hao C X, Sun Z Q, Ye R C, Li Y, Liu L, Sheng L, Ma X F, Deng Z N. Identification of the transcription factor WRKY75 of CmPR4A in Citron C-05 and its function analysis in resistance to citrus canker disease [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2023, 56 (21): 4304-4317 (in Chinese)
- [12] 思星如, 陈馨, 魏涵, 司怀军, 张宁. 马铃薯 *StWRKY57* 基因的生物信息学分析及亚细胞定位[J]. 中国马铃薯, 2023, 37(5): 385-396
Si X R, Chen X, Wei H, Si H J, Zhang N. Bio-informatics analysis and sub-cellular localization of the *StWRKY57* gene in potato [J]. *Chinese Potato Journal*, 2023, 37(5): 385-396 (in Chinese)
- [13] 叶红, 王斌, 任飞, 朱云娜, 肖艳辉, 何金明, 王玉昆. 园艺植物 WRKY 基因功能研究进展[J]. 广东农业科学, 2023, 50(9): 68-78
Ye H, Wang B, Ren F, Zhu Y N, Xiao Y H, He J M, Wang Y K. Research progress of WRKY gene functions in horticultural plants [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2023, 50(9): 68-78 (in Chinese)
- [14] Chen C B, Xie F F, Shah K, Hua Q Z, Chen J Y, Zhang Z K, Zhao J T, Hu G B, Qin Y H. Genome-wide identification of *WRKY* gene family in pitaya reveals the involvement of *HmoWRKY42* in betalain biosynthesis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(18):10568
- [15] 邓江霞, 张国良, 李边豪, 黄志炜, 赵宏亮, 张叶. WRKY 类转录因子在植物激素 ABA, SA 和 JA 信号转导中的作用[J]. 黑龙江农业科学, 2023 (10):138-144
Deng J X, Zhang G L, Li B H, Huang Z W, Zhao H L, Zhang Y. Role of WRKY transcription factors in plant hormone ABA, SA and JA signal transduction [J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2023(10): 138-144 (in Chinese)
- [16] Li J, Brader G, Palva E T. The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(2): 319-331
- [17] 王玉斌, 张彦威, 刘薇, 李伟, 王彩洁, 徐冉, 戴海英, 张礼凤. 大豆盐胁迫响应 *WRKY* 基因的筛选及 *GmWRKY40* 的克隆和表达 [J/OL]. 分子植物育种, 2023, 1-10 [2024-09-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231016.1019.006.html>
Wang Y B, Zhang Y W, Liu W, Li W, Wang C J, Xu R, Dai H Y, Zhang L F. Screening of soybean salt stress responsive *WRKY* genes and cloning and expression of *GmWRKY40* [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 1-10 [2024-09-28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231016.1019.006.html> (in Chinese)
- [18] Marchive C, Mzid R, Deluc L, Barrieu F, Pirrello J, Gauthier A, Corio-Costet M F, Regad F, Cailleteau B, Hamdi S, Lauvergeat V. Isolation and characterization of a *Vitis vinifera* transcription factor, VvWRKY1, and its effect on responses to fungal pathogens in transgenic tobacco plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(8): 1999-2010
- [19] Marchive C, Léon C, Kappel C, Coutos-Thévenot P, Corio-Costet M F, Delrot S, Lauvergeat V. Over-expression of VvWRKY1 in grapevines induces expression of jasmonic acid pathway-related genes and confers higher tolerance to the downy mildew [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54185
- [20] Mzid R, Marchive C, Blancard D, Deluc L, Barrieu F, Corio-Costet M F, Drira N, Hamdi S, Lauvergeat V. Overexpression of *VvWRKY2* in tobacco enhances broad resistance to necrotrophic fungal pathogens [J]. *Physiologia Plantarum*, 2007, 13(3): 434-447
- [21] Zhu Z G, Shi J L, Cao J L, He M Y, Wang Y J. *VpWRKY3*, a biotic and abiotic stress-related transcription factor from the Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* [J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(11): 2109-2120
- [22] Li H E, Xu Y, Xiao Y, Zhu Z G, Xie X Q, Zhao H Q, Wang Y J. Expression and functional analysis of two genes encoding transcription factors, *VpWRKY1* and *VpWRKY2*, isolated from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* [J]. *Planta*, 2010, 232(6): 1325-1337
- [23] Wang X H, Guo R R, Tu M X, Wang D J, Guo C L, Wan R, Li Z, Wang X P. Ectopic expression of the wild grape WRKY transcription factor VqWRKY52 in *Arabidopsis thaliana* enhances resistance to the biotrophic pathogen powdery mildew but not to the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 97
- [24] Wang X H, Tu M X, Wang D J, Liu J W, Li Y J, Li Z, Wang Y J, Wang X P. CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16 (4): 844-855
- [25] Xing Q K, Zhang W, Liu M, Li L X, Li X H, Yan J Y. Genome-wide identification of long Non-coding RNAs responsive to *Lasiodiplodia theobromae* infection in grapevine [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2019, 15: 1176934319841362
- [26] Jiao Y T, Wang D, Wang L, Jiang C Y, Wang Y J. *VqMAPKKK38* is essential for stilbene accumulation in grapevine [J]. *Horticulture Research*, 2017, 4: 17058
- [27] 赵娅玲, 王莹, 陈彪, 周国辉, 张彤. 病毒-植物-媒介昆虫跨界互作与病毒病害流行 [J]. 中国科学: 生命科学, 2024, 54(5): 769-788
Zhao Y L, Wang Y, Chen B, Zhou G H, Zhang T. Trans-kingdom interactions between viruses-plants-vector insects and viral disease epidemics [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2024, 54(5): 769-788 (in Chinese)
- [28] 刘冬. 激发子及其诱导的植物免疫反应概述 [J]. 生物学教学, 2021, 46 (9): 21-23
Liu D. A summary of elicitors and the induced plant immune response [J]. *Biology Teaching*, 2021, 46(9): 21-23 (in Chinese)
- [29] 徐伟, 严善春. 茉莉酸在植物诱导防御中的作用 [J]. 生态学报, 2005, 25 (8): 2074-2082
Xu W, Yan S C. The function of Jasmonic acid in induced plant defence [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(8): 2074-2082 (in Chinese)
- [30] Mishra A K, Baek K H. Salicylic acid biosynthesis and metabolism: A divergent pathway for plants and bacteria [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (5): 705
- [31] Hu Y Z, Ding Y X, Cai B Y, Qin X H, Wu J N, Yuan M H, Wan S W, Zhao Y, Xin X F. Bacterial effectors manipulate plant abscisic acid signaling for creation of an aqueous apoplast [J]. *Cell host & microbe*, 2022, 30(4): 518-529. e6
- [32] Mou W S, Kao Y T, Michard E, Simon A A, Li D D, Wudick M M, Lizzio M A, Feijó J A, Chang C R. Ethylene-independent signaling by the ethylene precursor ACC in *Arabidopsis* ovular pollen tube attraction [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4082
- [33] Tang B Z, Liu C Y, Li Z Q, Zhang X X, Zhou S Q, Wang G L, Chen X L, Liu W D. Multilayer regulatory landscape during pattern-triggered immunity in rice [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(12): 2629-2645
- [34] Wang H, Xu Q, Kong Y H, Chen Y, Duan J Y, Wu W H, Chen Y F.

- Arabidopsis WRKY45 transcription factor activates *PHOSPHATE TRANSPORTER1*;1 expression in response to phosphate starvation[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(4): 2020-2029
- [35] Devaiah B N, Karthikeyan A S, Raghothama K G. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(4): 1789-1801
- [36] Chen L G, Zhang L P, Xiang S Y, Chen Y L, Zhang H Y, Yu D Q. AtWRKY75 positively regulates jasmonate-mediated plant defense to necrotrophic fungal pathogens [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(4): 1473-1489

责任编辑:董金波



第一作者简介:董梦迪,硕士研究生,就读于山西农业大学植物保护学院植物保护专业,为北京市农林科学院植物保护研究所联合培养生。2021—2022年评选为“优秀研究生”。以第一作者发表学术论文1篇、第三作者发表学术论文2篇。



通讯作者简介:邢启凯,博士研究生,副研究员,就职于北京市农林科学院植物保护研究所,硕士研究生导师。主要从事植物抗病性、植物与病原菌互作等研究工作。曾主持国家自然科学基金、北京市自然科学基金等科研项目5项,参与省部级及市厅级以上项目8项。在 *Journal of Experimental Botany*、*DNA Research*、《中国农业科学》等期刊发表论文20余篇。获批国家发明专利3件。