



葡萄全基因组 WRKY 转录因子鉴定和分析

苏 玲,王鹏飞,杨 阳,任凤山,王咏梅,陈万钧

(山东省葡萄研究院/山东省葡萄栽培与深加工工程技术研究中心/农业部华东都市农业重点实验室,山东 济南 250100)

摘要:为鉴定和分析葡萄全基因组中 WRKY 家族转录因子基因,利用生物信息学的方法,分析葡萄全基因组 WRKY 转录因子类型、进化分析、染色体定位、基因结构、保守元件和基因表达模式。结果表明:葡萄全基因组中有 56 个 WRKY 转录因子。序列比对和系谱进化表明,分为 I、II 和 III 三个组,II 组分为 II-a、II-b、II-c、II-d 和 II-e 五个亚组。染色体定位表明,存在串联复制和分布不均现象,但是在 3 号染色体上无该家族基因定位。结构域和保守元件分析都说明葡萄 WRKY(VvWRKY)家族的 WRKY 结构域是高度保守的。葡萄叶片中基因表达模式分析表明, VvWRKY 家族的部分基因参与非生物胁迫。

关键词:葡萄;WRKY;转录因子;进化分析;表达分析

WRKY 是植物中重要的转录因子家族之一,在植物很多发育和生理过程中具有转录激活或转录抑制的功能^[1-3],其通常含有长约 60 个氨基酸残基的 WRKY 保守区域,该区域内一般含有 WRKYGQK 七肽序列和锌指基序(CX₄₋₅CX₂₂₋₂₃HXH 和 CX₇CX₂₃HXC)^[1]。根据 WRKY 保守域的数量和锌指结构的类型,WRKY 蛋白被分为 3 种类型 Group I-III。类型 I 蛋白包含 2 个 WRKY 功能域和 1 个 C₂H₂型锌指基序,类型 II 和 III 都只含有 1 个 WRKY 功能域,但是两者分别具有 C₂H₂和 C₂HC 型锌指基序^[1-4]。WRKY 蛋白能够与靶基因启动子区域中的 W-box 元件((C/T)TGAC(T/C))或者顺式作用元件 SURE 特异性结合,进而调控下游目标基因的表达^[5]。

目前,WRKY 转录因子在很多植物基因组中已被鉴定和分离出来。研究者在甘薯(*Ipomoea batatas* Lam)中发现 WRKY 转录因子编码基因 SPF1^[6]后,WRKY 基因在拟南芥^[1]、水稻^[7]、大麦^[8]、白杨^[9]、番茄^[10]、黄瓜^[11]和咖啡^[12]等物种中均被克隆。前期大量研究表明,WRKY 蛋白在植物的生理过程中发挥着重要调控作用^[13-14],例如,生长发育过程中调控植物胚形态

发生,叶片衰老,激素信号转导等^[15-17],参与寒冷、干旱、盐^[18-21]等非生物和细菌、真菌、病毒等^[1-2]生物胁迫响应。

葡萄(*Vitis vinifera*)作为重要的落叶果树种类之一,在世界各地均有栽培,并且具有巨大的经济价值^[22]。然而,在葡萄的栽培过程中经常会遭遇病害、干旱和低温等胁迫,严重影响了葡萄的生长发育。各种逆境胁迫不仅造成了树体伤害和经济损失,而且严重制约着葡萄产业的可持续发展。WRKY 转录因子作为只存在于植物的基因家族,能够参与植物体内转录调控和许多信号转导过程^[1]。近年来的很多研究也表明 WRKY 参与调控植物的各种胁迫响应。例如,在拟南芥、玉米和大豆中参与调控微生物、病原菌和线虫的防御^[23-25];在柑橘、芝麻和水稻中调控激素响应和各种非生物胁迫^[26-28];此外,王丽娜等^[29]发现在葡萄中参与低温胁迫响应。本文根据葡萄的基因组测序数据,利用生物信息学的方法,鉴定和筛选葡萄 WRKY 转录因子家族,分析其进化关系、亚组分类、保守域结构、染色体定位等,并利用表达谱数据分析 WRKY 在非生物胁迫中的表达,以为下一步 WRKY 的功能解析和非生物胁迫响应研究提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄基因组 WRKY 转录因子序列信息从最新版本葡萄基因组数据库(<http://www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis/>)下载,数据库版本为 V2.0。拟南芥基因组 WRKY

收稿日期:2018-09-13

基金项目:山东省农业重大应用技术创新资助项目(特色酒用葡萄产期精准调控与产品创新研究应用资助项目(2017)、山东葡萄酒地标性酒种开发与关键技术集成应用资助项目(2016))。
第一作者简介:苏玲(1988-),女,博士,农艺师,从事葡萄酒分子生物学研究。E-mail:susulingzi@126.com。

通讯作者:陈万钧(1961-),男,学士,高级工程师。从事葡萄栽培研究。E-mail:sdvwac@139.com。

转录因子序列信息下载于 TAIR(<http://www.arabidopsis.org/>)。

1.2 方法

1.2.1 *VvWRKY* 基因鉴定 利用 Pfam 数据库(<http://pfam.sanger.ac.uk/>),下载 WRKY 保守域蛋白序列(序列号 PF03106)的 HMM 文件,使用 HMMER 3.0 软件(<http://hmmer.janelia.org/>)对葡萄基因组数据库中注释基因组序列进行 WRKY 基因的搜索,参数设置为默认参数;利用保守域预测软件 Pfam 和 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)确保上述候选基因含有完整的 WRKY 保守域^[30],进行初步的筛选和分类。

1.2.2 *VvWRKY* 进化分析和分组鉴定 利用在线软件 Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)将葡萄 WRKY 候选蛋白和拟南芥 WRKY 蛋白家族进行序列比对,并进行亚组分类。使用 MEGA 6.0 绘制进化树^[31],采用方法为 NJ(Neighbor-joining),执行参数为 Poission correction、pairwise deletion 和 bootstrap,重复设置是 1 000 次。

1.2.3 *VvWRKY* 定位分析 根据葡萄全基因组数据库中 *VvWRKY* 的定位情况,绘制染色体定位分布图。其中,“ChrN”(N 为编号 1-19)代表染色体序号。

1.2.4 *VvWRKY* 蛋白 WRKY 保守结构域分析 分别利用序列分析软件(DNAMAN V6)和在线软件 WebLogo 3(<http://weblogo.threeplusone.com/>)^[24]分析 *VvWRKY* 蛋白的结构域,汇总分析结果,绘制保守结构域的结构图。

1.2.5 *VvWRKY* 家族间进化及内含子与外显子分析 利用 Clustal 和 MEGA 6.0 构建 *VvWRKY* 的

进化树。利用葡萄基因组数据库中的内含子和外显子信息,整理得到 Exon-Intron 结构图。

1.2.6 *VvWRKY* 保守元件(motif)分析 利用在线软件 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>)分析 *VvWRKY* 的保守基序(motif)^[23],根据分析结果,得到蛋白保守元件结构图。

1.2.7 *VvWRKY* 家族基因在非生物胁迫下的表达分析 从植物表达分析数据库(<http://www.plexdb.org/>)和 NCBI 网站上的 GEO 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/)下载正常培养、Cold(5℃)、120 mM PEG 和 120 mM NaCl 处理 *VvWRKY* 家族基因表达的芯片表达谱数据,登录号为 GSE31594。利用 Mev4.0 软件绘制基因表达热图。

2 结果与分析

2.1 *VvWRKY* 基因序列鉴定

利用 WRKY 结构域的 HMM(PF03106)文件,使用 HMMER 3.0 软件对葡萄全基因组数据库进行 WRKY 基因的序列比对搜索,得到 56 个 *VvWRKY* 基因(表 1)。进一步通过 Pfam 分析确定葡萄 WRKY 基因存在的 WRKY 保守域,证明序列比对搜索的正确性。根据它们在葡萄基因组中的顺序,分别将其命名为 *VvWRKY*1~*VvWRKY*56(表 1)。研究表明,葡萄 WRKY 基因家族的氨基酸数目最小的是 102(*VvWRKY*15),最大的是 747(*VvWRKY*54),平均氨基酸数目是 320,其分子量(MW)大小从 12 097.7 Da 到 80 269.7 Da 变动,对其蛋白的等电点预测发现,它们的等电点之间也存在很大的差异,*VvWRKY*37 的 pI 是 4.93, *VvWRKY*15 和 *VvWRKY*24 都是 9.83,它们分别是 WRKY 家族中最小和最大的等电点。

表 1 葡萄中的 WRKY 转录因子
Table 1 The WRKY transcription factors ingrape

基因名称 Gene name	定位名称 Locus name	染色体定位 Chromosome location	类型 Type	氨基酸 aa	分子量/Da Molecular weight	等电点 PI
<i>VvWRKY</i> 1	VIT_200s0463g00010	Un;29694084-29699952	I	613	66502.4	6.37
<i>VvWRKY</i> 2	VIT_201s0010g03930	1;21460152-21461423	II-c	190	21258.9	9.01
<i>VvWRKY</i> 3	VIT_201s0011g00220	1_random;297588-311938	I	503	54608.3	7.74
<i>VvWRKY</i> 4	VIT_201s0011g00720	1;628681-633595	II-c	306	33358.6	5.76
<i>VvWRKY</i> 5	VIT_201s0026g01730	1;10977206-10982627	II-b	595	64339.4	6.25
<i>VvWRKY</i> 6	VIT_202s0025g00420	2;512179-513535	II-e	332	36585.0	5.86
<i>VvWRKY</i> 7	VIT_202s0025g01280	2;1228115-1229951	III	343	38561.9	6.32
<i>VvWRKY</i> 8	VIT_204s0008g01470	4;1210142-1211252	II-c	167	18916.7	5.16

续表 1

基因名称	定位名称	染色体定位	类型	氨基酸	分子量/Da	等电点
Gene name	Locus name	Chromosome location	Type	aa	Molecular weight	PI
VvWRKY9	VIT_204s0008g05750	4:5247432-5248815	Ⅱ-a	263	29006.9	8.97
VvWRKY10	VIT_204s0008g05760	4:5265887-5267902	Ⅱ-a	318	35263.7	8.11
VvWRKY11	VIT_204s0008g06600	4:6569931-6576445	I	492	54313.0	8.63
VvWRKY12	VIT_204s0023g00470	4:16664476-16666517	I	687	74223.6	6.66
VvWRKY13	VIT_204s0069g00920	4:9363044-9365026	Ⅱ-d	339	36569.3	9.44
VvWRKY14	VIT_204s0069g00970	4:9399822-9400803	Ⅱ-c	192	21502.7	5.74
VvWRKY15	VIT_204s0069g00980	4:9409805-9411286	Ⅱ-c	102	12097.7	9.83
VvWRKY16	VIT_205s0077g00730	5:530097-531696	Ⅱ-c	310	34408.3	5.87
VvWRKY17	VIT_206s0004g07500	6:8290089-8292826	I	604	66284.7	6.71
VvWRKY18	VIT_207s0005g01520	7:4044185-4045807	Ⅱ-d	243	27548.6	6.09
VvWRKY19	VIT_207s0005g01710	7:4200461-4202183	Ⅱ-c	303	33761.7	7.06
VvWRKY20	VIT_207s0005g02570	7:4899940-4903113	Ⅱ-b	507	54660.3	7.87
VvWRKY21	VIT_207s0031g00080	7:16322554-16324062	Ⅱ-d	337	36616.5	9.52
VvWRKY22	VIT_207s0031g01710	7:17794621-17797164	Ⅱ-c	194	21255.8	6.59
VvWRKY23	VIT_207s0031g01840	7:17958339-17960800	Ⅱ-c	220	25011.4	8.91
VvWRKY24	VIT_207s0141g00680	7:381054-383675	Ⅱ-d	341	38041.1	9.83
VvWRKY25	VIT_208s0007g00570	8:14828036-14830056	Ⅱ-c	300	33157.9	5.14
VvWRKY26	VIT_208s0040g03070	8:14033449-14039296	I	478	52303.7	8.64
VvWRKY27	VIT_208s0058g00690	8:9796097-9798804	I	553	61001.0	7.55
VvWRKY28	VIT_208s0058g01390	8:10843800-10846082	Ⅲ	358	40423.9	5.93
VvWRKY29	VIT_209s0018g00240	9:16094245-16096198	Ⅱ-a	312	34403.5	8.56
VvWRKY30	VIT_210s0003g01600	10:3008699-3010258	Ⅱ-e	279	30939.4	5.07
VvWRKY31	VIT_210s0003g02810	10:4894494-4896041	Ⅱ-c	320	35000.9	7.10
VvWRKY32	VIT_210s0003g05740	10:10756001-10759241	Ⅱ-e	439	47526.7	5.08
VvWRKY33	VIT_210s0116g01200	10:618665-621093	Ⅱ-b	538	57460.1	6.28
VvWRKY34	VIT_211s0037g00150	11:7838041-7845641	I	500	53814.7	6.36
VvWRKY35	VIT_212s0028g00270	12:878978-881517	Ⅱ-c	312	34788.5	7.22
VvWRKY36	VIT_212s0055g00340	12:13065135-13067116	Ⅱ-b	488	53643.5	5.18
VvWRKY37	VIT_212s0057g00550	12:9116720-9122740	I	408	44767.1	4.93
VvWRKY38	VIT_212s0059g00880	12:5678804-5681082	Ⅱ-b	594	64115.4	6.76
VvWRKY39	VIT_213s0067g03130	13:1716836-1718877	Ⅲ	365	40288.2	6.21
VvWRKY40	VIT_213s0067g03140	13:1719393-1720803	Ⅲ	314	35309.3	5.50
VvWRKY41	VIT_214s0068g01770	14:25479103-25481917	Ⅱ-c	183	20787.4	9.38
VvWRKY42	VIT_214s0081g00560	14:8753748-8755749	Ⅱ-d	366	41640.5	9.65
VvWRKY43	VIT_214s0108g00120	14:28924779-28926499	Ⅱ-b	556	59696.3	6.01
VvWRKY44	VIT_214s0108g01280	14:29916401-29920389	I	530	57714.2	7.81
VvWRKY45	VIT_215s0021g01310	15:11499221-11503179	Ⅱ-c	229	26125.8	7.72
VvWRKY46	VIT_215s0046g01140	15:18191021-18193470	Ⅲ	350	39246.7	4.94
VvWRKY47	VIT_215s0046g02150	15:18940954-18942146	Ⅱ-c	202	22617.9	9.22
VvWRKY48	VIT_215s0046g02190	15:18957235-18958812	Ⅱ-e	349	37990.2	5.95
VvWRKY49	VIT_216s0050g01480	16:18360079-18360711	Ⅱ-d	183	20505.6	5.27
VvWRKY50	VIT_216s0050g02510	16:19477129-19479547	Ⅲ	365	40043.5	5.49
VvWRKY51	VIT_217s0000g01280	17:922644-925087	Ⅱ-c	152	17713.1	9.69
VvWRKY52	VIT_217s0000g05810	17:6316168-6320034	Ⅱ-b	606	65179.1	7.57
VvWRKY53	VIT_218s0001g10030	18:8392053-8393721	Ⅱ-d	348	38086.3	9.24
VvWRKY54	VIT_219s0015g01870	19:10665189-10669055	I	747	80269.7	5.88
VvWRKY55	VIT_219s0090g00840	19:6882399-6884987	Ⅱ-b	552	59250.1	9.13
VvWRKY56	VIT_219s0090g01720	19:7760183-7767013	I	503	55152.4	6.41

2.2 VvWRKY 进化树分析和分组鉴定

为了进一步分析 VvWRKY 家族的进化关系,利用已知的 75 个 AtWRKY 和 56 个 VvWRKY 蛋白构建进化树进行聚类分析,并确定 VvWRKY 蛋白类型和分组情况。进化树结

果(图 1)显示,VvWRKY 蛋白与拟南芥的 AtWRKY 蛋白一样,分为类型 I、II 和 III,类型 II 又分为 II-a、II-b、II-c、II-d 和 II-e 五个亚组。其中,类型 I、II 和 III 分别包括 12、38 和 6 个成员,每个 VvWRKY 所属类型详见表 1 和图 2。

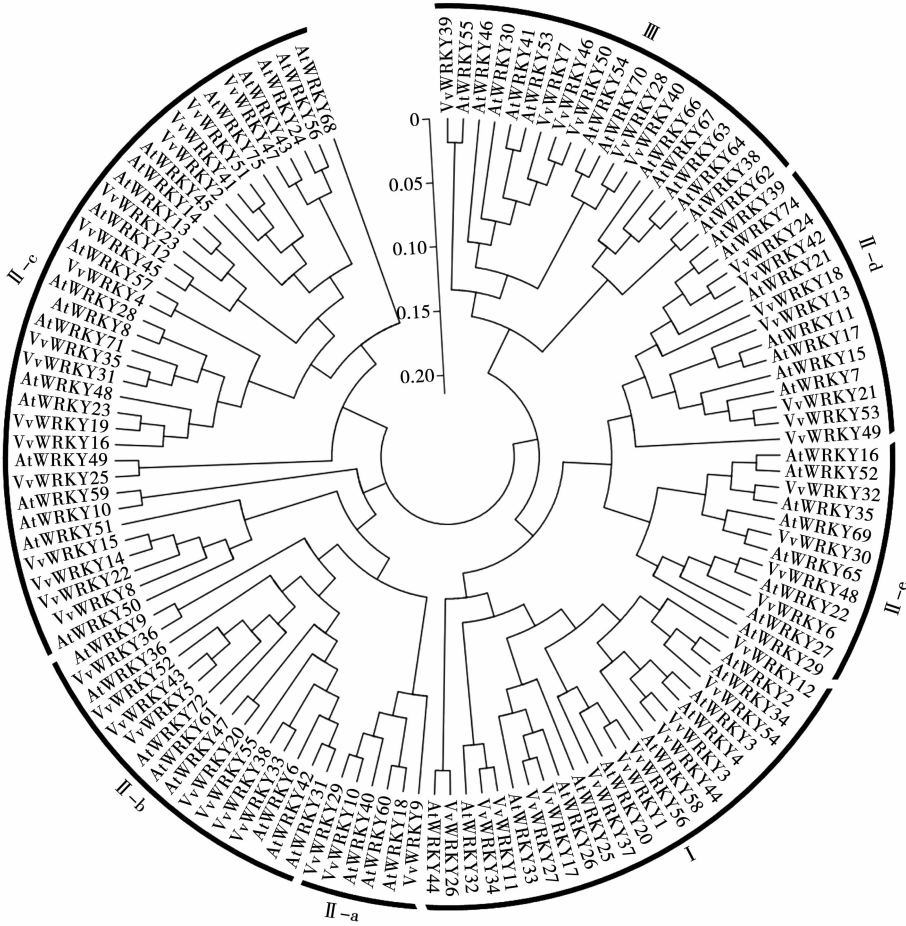


图 1 葡萄和拟南芥 WRKY 蛋白的 WRKY 保守域进化关系和亚组分类

Fig. 1 Phylogenetic relationship and subgroup classification of WRKY proteins in grape and Arabidopsis

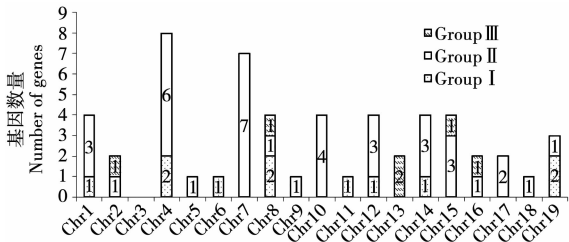


图 2 VvWRKY 基因数量和分布直方图

Fig. 2 Histogram of the number and distribution of the VvWRKY genes

2.3 VvWRKY 染色体定位分析

根据葡萄 WRKY 基因家族的相关染色体定位信息,制作染色体定位分布图。由图 2 中可以看出,56 个 VvWRKY 基因不均匀分布在 18 条染色体上(VvWRKY1 无法确定染色体位置),3 号

染色体上不存在 VvWRKY 基因。4 号和 7 号染色体上分布最多,分别为 8 和 7 个;其次是 1、8、10、12、14 号染色体上都各分布 4 个;19 号染色体上存在 3 个;2、13、16、17 号染色体上都各分布 2 个;5、6、9、11、18 号染色体都各分布 1 个 WRKY 基因。

2.4 VvWRKY 蛋白的 WRKY 保守结构域分析

分别利用序列分析软件(DNAMAN V6)和在线软件 WebLogo 3(<http://weblogo.threeplu-sone.com/>)分析 VvWRKY 蛋白的结构域。结果表明,VvWRKY 家族 WRKY 结构域是高度保守的(图 3)。其中,类型 I 的七肽域是 WRKYGQK,锌指结构包括 CX4CX22HXX 和 CX4CX23HXH(VvWRKY11 和 VvWRKY34);类型 II 的 a、

b、d、e 亚组的七肽域和锌指结构分别是 WRKYGQK 和 CX₅CX₂₃HXH, 类型 II-c 亚组的七肽域包括 WRKYGQK 和 WRKYGKK 两种形式, 锌指结构为 CX₄CX₂₃HXH; 类型 III 的七肽域和锌指结构是分别是 WRKYGQK 和 CX₇CX₂₃HXC。但是, WRKY 结构域中 WRKY 七肽域和

锌指结构存在部分变异, 其中类型 II-c 亚组中的 *VvWRKY8/14/15/22* 基因的 WRKY 七肽域变异为 WRKYGKK, 类型 I 的 *VvWRKY11/34* 和类型 III 的 *VvWRKY7/28/39/40/46/50* 的锌指结构变异为 CX₄CX₂₃HXH 和 CX₇CX₂₃HXC(表 2)。

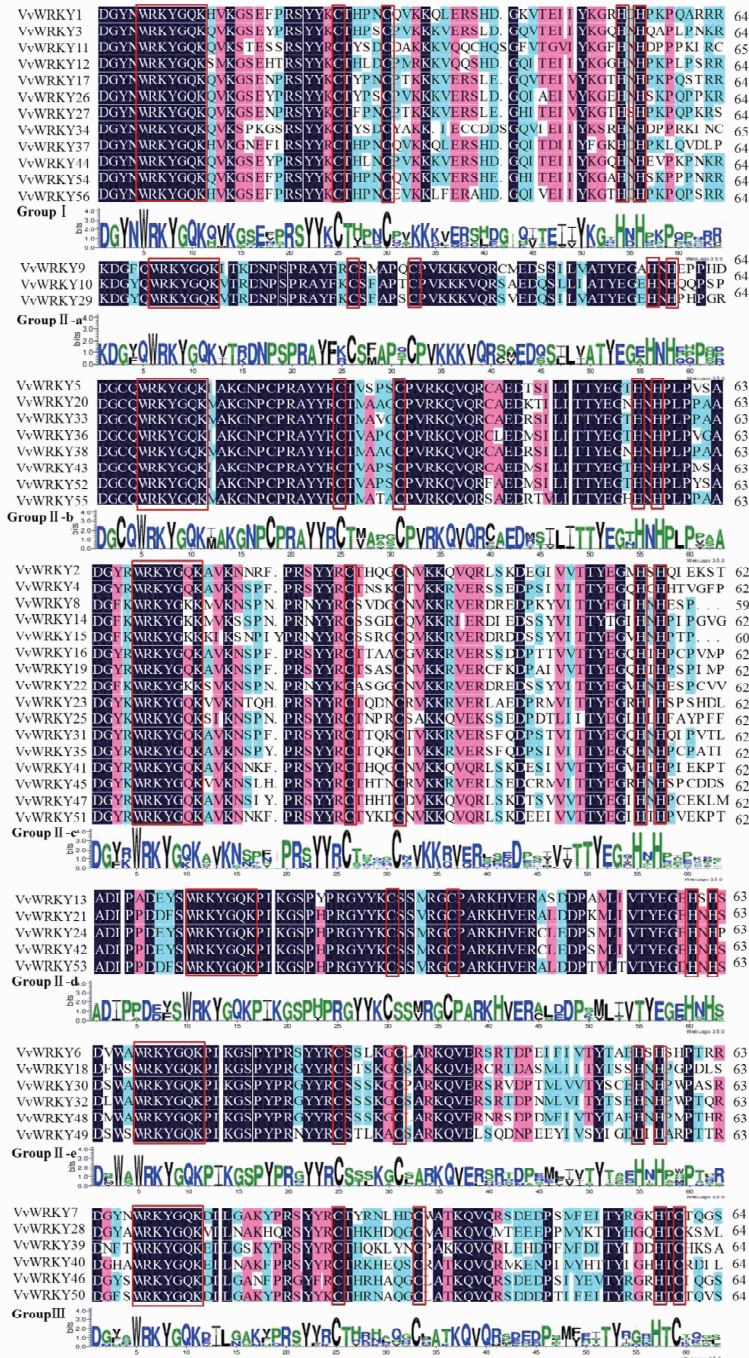


图 3 *VvWRKY* 蛋白的 WRKY 保守结构域分析

Fig. 3 Sequence analysis of the WRKY conservative domains in grape WRKY proteins

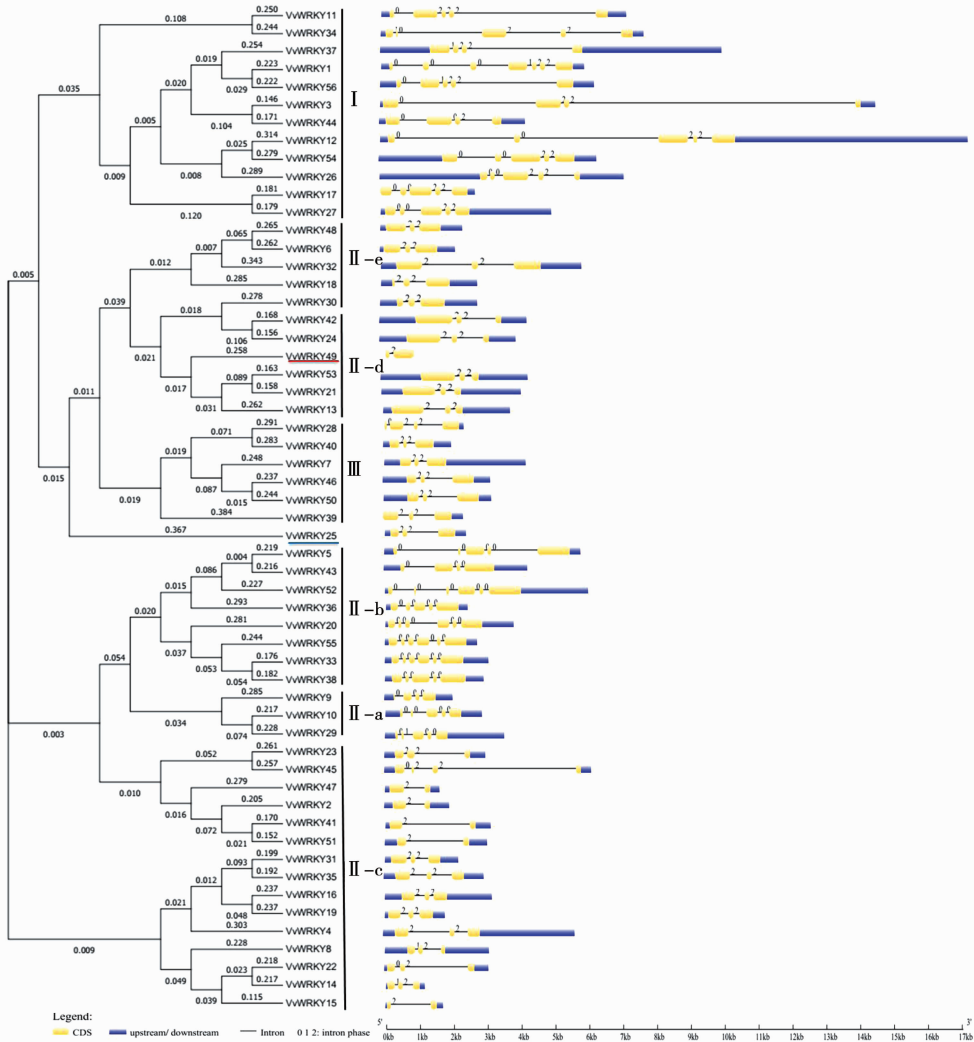
表 2 VvWRKY 蛋白的 WRKY 结构域中 WRKY 七肽域和锌指结构的变异
Table 2 Variation of the heptapeptide WRKYGQK and zinc-finger structure in WRKY domains of VvWRKYs

正常结构 Normal structure	变异结构 Variant structure	基因 Gene	分组 Grouping
WRKYGQK	WRKYGKK	VvWRKY8/14/15/22	Group II -c
CX ₄ CX ₂₃ HXH	CX ₄ CX ₂₃ HXH	VvWRKY11/34	I
CX ₇ C ₂₃ HXH	CX ₇ CX ₂₃ HXC	VvWRKY7/28/39/40/46/50	III

2.5 VvWRKY 的进化及内含子与外显子分析

为了进一步了解 VvWRKY 的进化关系,利用 MEGA6.0 构建 VvWRKY 家族进化树。进化关系表明,VvWRKY 家族分为 I、II (II-a、II-b、II-c、II-d 和 II-e)和 III 组,这与图 1 的进化分析结

果基本一致(除了 VvWRKY25 和 VvWRKY49),说明 WRKY 蛋白在进化中是高度保守的。同时,通过葡萄功能基因组数据库分析得到 VvWRKY 的外显子和内含子结构分布情况,整理得到图 4。VvWRKY 家族成员的外显子数量不定,由 2~7 个



系统进化树采用邻接法由MEGA6.0序构建,数值代表分支长度。
The phylogenetic tree is constructed by MEGA 6.0 program with the neighbor-joining method, and the numbers represent the length of the branch.

图 4 VvWRKY 基因家族内含子和外显子结构图

Fig. 4 Intron-exon structures of VvWRKY family

外显子组成。其中,大多数 I 组和 II-b 亚组家族成员多具有 4~5 个(除 *VvWRKY1* 有 7 个外显子), II-a 亚组多具有 4~6 个, II-c 亚组多具有 2~3 个(除 *VvWRKY45* 有 4 个外显子), II-d、II-e 亚组和 III 组的家族成员都具有 3 个(除 *VvWRKY28* 和 *VvWRKY49* 分别具有 4 和 2 个外显子)。

2.6 *VvWRKY* 保守元件分析

利用在线软件(MEME)鉴定 *VvWRKY* 家

族的保守结构域。结果显示,*VvWRKY* 家族包含 10 个保守元件:元件 1、2、3、4、5 和 6 为 WRKY 盒;元件 7、8、9/10 为功能未知盒(图 5)。由图看出,*VvWRKY* 家族都包含 WRKY 盒, I 组中含有 2 个 WRKY 盒;II 组中除了都含有 1 个 WRKY 盒外,II-a 和 II-b 部分基因含有未知元件 7、8, II-b、II-d 和 II-e 的部分基因含有未知元件 9, II-c 含有未知元件 10;III 组中含有 1 个 WRKY 盒和未知元件 7、9。

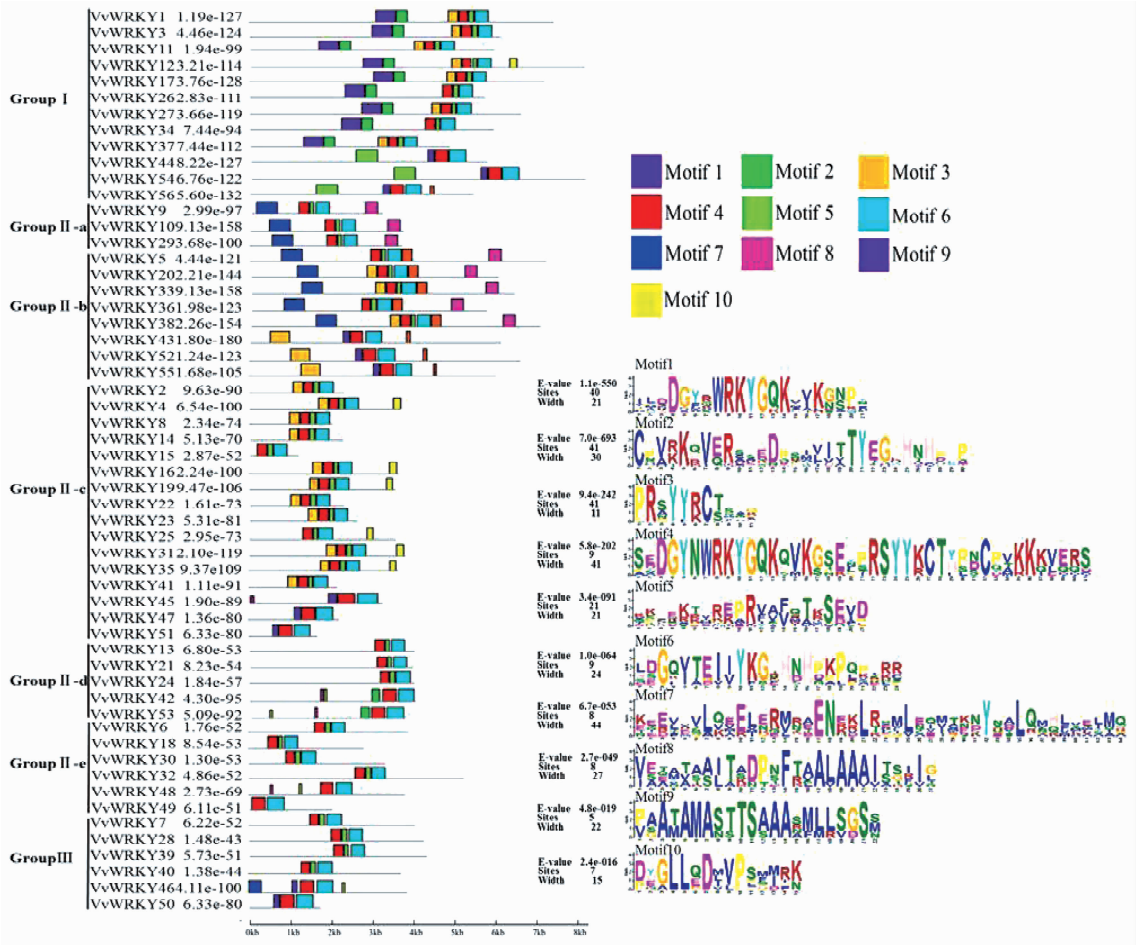


图 5 *VvWRKY* 家族保守元件分析

Fig. 5 Conserved motif analysis of the *VvWRKY* family

2.7 *VvWRKY* 家族基因在非生物胁迫下的表达

利用前人研究的基因芯片表达谱数据,分别对在 5℃ 低温胁迫、120 mmol·L⁻¹ PEG 处理和 120 mmol·L⁻¹ NaCl 处理的葡萄叶中 *VvWRKY* 基因的表达变化进行了分析,构建表达分析热图。基因表达量的变化用颜色来表示,蓝色和黄色分别代表基因表达的下调和上调,黑色代表没有检测到表达,颜色的亮度代表信号强弱。结果显示,

在低温胁迫条件下,*VvWRKY1/5/12/21/23/38/42/43/49/52* 的表达量明显上升,*VvWRKY16/28/30/32/46* 的表达量略有上升,而 *VvWRKY10* 和 *VvWRKY13* 的表达量下降;PEG 处理下 *VvWRKY24* 和 *VvWRKY49* 表达量上升,其它基因无明显变化;盐胁迫下,*VvWRKY1/5/12/23/28/30/32/38/43/49/52* 的表达量略有上升,*VvWRKY10/13/21* 表达量略有下降,其它基因无明显变化(图 6)。



图 6 非生物胁迫处理与对照样品中 *VvWRKYs* 基因的表达热图
Fig. 6 Expression profiles of *VvWRKYs* genes under abiotic stress

3 讨论与结论

3.1 讨论

WRKY 家族不仅在植物的生长发育中具有重要作用, 涉及参与植物的胚、种皮和表皮发育和衰老等过程^[15,32]; 而且在各种生物与非生物胁迫响应也具有至关重要的作用^[1]。WRKY 基因在植物中分布很广, 且不同物种间的数目存在差异。目前, 拟南芥^[20]、番茄^[10]、黄瓜^[11]、棉花^[33]、苹果^[34]、蒺藜苜蓿^[35]和桃^[36]中分别鉴定到 72、81、55、116、132、81 和 61 个 WRKY 基因。本研究从葡萄基因组中鉴定到 56 个 *VvWRKY* 基因, 并对其进行了生物信息学的分析验证, 证明所得 *VvWRKY* 基因数目真实可靠。

本文将鉴定出的 56 个 *VvWRKY* 基因, 与拟南芥 WRKY 家族聚类分析, 初步分为 I、II 和 III

组 3 个组, 与拟南芥全基因组进一步比对, 又将 II 组分为 II-a/b/c/d/e 五个亚组, 这与其它物种中类似, 说明 WRKY 在植物中广泛存在, 并具有一定的相似性。通过进化树分析结果, 表明这些基因在进化过程中具有保守性; 分析染色体定位发现葡萄 WRKY 家族在染色体上存在串联复制和分布不均匀的现象, 这可能与进化及响应生物和非生物胁迫的基因扩增有关; 此外, Chr3 上不存在 WRKY 基因, 而拟南芥、苹果和桃物种中 WRKY 基因在其染色体上均有分布, 表明葡萄基因组在长期的进化过程中, 可能由于面对选择压力导致 *VvWRKY* 基因在 Chr3 上的缺失; 同时, *VvWRKY1* 的染色体定位无法确定, 说明目前葡萄基因组的测序和序列组装还存在不足之处, 需研究者们进一步完善。

本文在对 *VvWRKY* 基因进行初步鉴定和分

析后,进一步进行保守结构域、基因结构和保守元件分析。结构域结构分析,发现葡萄 WRKY 家族是高度保守,并统计解析了 WRKY 结构域的变异,这在拟南芥^[20]、番茄^[10]、黄瓜^[11]、苹果^[34]和桃^[36]基因组中也是存在的,但不同物种中变异差别较大。上述结果再次表明 WRKY 家族在植物中的高度保守性,但是也表明了 WRKY 家族在进化过程中表现出多样性;染色体片段的重组会导致基因外显子和内含子的获得或缺失,因此外显子和内含子的结构分析能为植物基因家族的进化关系提供有力的证据^[37]。本文分析 *VvWRKY* 基因外显子和内含子结构和大小,发现 *VvWRKY* 含有 2~7 个外显子,此发现对于研究葡萄与其他物种中 WRKY 的进化关系提供了参考。保守元件分析发现, *VvWRKY* 都存在 WRKY 保守域,为后序转录因子功能验证和下游靶基因的确定提供了参考序列;此外,还存在几个未知元件,未知元件中可能存在激活和抑制激活元件 LXXLL 和 LXLXLX, *VvWRKY* 作为转录因子,通过转录激活或转录抑制调控植物响应^[37],这还需要进一步的验证;不同的亚组成员间存在特异元件,说明它们可能存在功能的差异。

前人的研究证明 WRKY 参与调控植物非生物胁迫诱导的防御响应^[18]。例如,拟南芥中研究发现 *AtWRKY* 家族中 80% 的基因响应细菌感染^[19], *AtWRKY25* 和 *AtWRKY33* 能够通过与其上下游靶基因的互作调控抗盐性^[38], *GhWRKY39-1* 基因异位表达提高烟草的抗盐性^[39],干旱胁迫下 *GsWRKY18* 基因的表达迅速上调^[11]等等。本文发现不同非生物胁迫(低温干旱和盐)下,多个 *VvWRKY* 基因的表达量发生显著变化并各有异同,说明可能不同的 *VvWRKY* 基因参与相同或不同胁迫响应时存在差异,且调控网络是复杂多样的,这可能是受基因本身的结构或绑定的下游不同靶基因的直接影,和其它转录因子的间接影响^[40]。

3.2 结论

本文鉴定并获得了 56 个 *VvWRKY* 转录因子家族基因,分析发现它们在进化过程中高度保守,并分布于葡萄的 18 条染色体上,表达模式受非生物胁迫诱导,参与非生物胁迫响应。综上所述,不仅丰富了对 *VvWRKY* 转录因子基因家族的认识,也为进一步研究葡萄中 *VvWRKY* 转录因子的功能和非生物胁迫响应分子机制的研究奠定基础。

参考文献:

[1] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY su-

perfamily of plant transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(5): 199-206.

- [2] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, et al. WRKY transcription factors[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 247-258.
- [3] Rushton D L, Tripathi P, Rabara R C, et al. WRKY transcription factors: Key components in abscisic acid signalling[J]. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10(1): 2-11.
- [4] Zhang Y, Wang L. The WRKY transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants[J]. BMC Evolutionary Biology, 2005, 5: 1.
- [5] Sun C, Palmqvist S, Olsson H, et al. A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter[J]. The Plant Cell, 2003, 15(9): 2076-2092.
- [6] Shiguro S, Nakamura K. 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 β -amylase from sweet potato[J]. Molecular and General Genetics, 1994, 244(6): 563-571.
- [7] Wu K, Guo Z, Wang H, Li J. The WRKY family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins[J]. DNA Research, 2005, 12(1): 9-26.
- [8] Mangelsen E, Kilian J, Berendzen K W. Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 194.
- [9] He H, Ding Q, Shao Y, et al. Genome-wide survey and characterization of the WRKY gene family in *Populus trichocarpa*[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(7): 1199-1217.
- [10] Huang S, Gao Y, Liu J, et al. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2012, 287(6): 495-513.
- [11] Ling J, Jiang W, Zhang Y, et al. Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus*[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 471.
- [12] Raniero D, Jalloul A, Petitot A S, et al. Identification of coffee WRKY transcription factor genes and expression profiling in resistance responses to pathogens[J]. Tree Genetics and Genomes, 2010, 6(5): 767-781.
- [13] Eulgem T, Somssich I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(4): 366-371.
- [14] Pandey S P, Somssich I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. Plant Physiology, 2009, 150: 1648-1655.
- [15] Lagace M, Matton D P. Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*[J]. Planta, 2004, 219(1): 185-189.
- [16] Robatzek S, Somssich I E. Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense[J]. Genes and Development, 2002, 16(9): 1139-1149.
- [17] Xie Z, Zhang Z L, Zou X, et al. Interactions of two abscisic acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells[J]. The Plant Journal, 2006, 46(2): 231-242.

- [18] Chen L, Song Y, Li S, et al. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2012, 1819(2): 120-128.
- [19] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51(1): 21-37.
- [20] Ülker B, Somssich I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(5): 491-498.
- [21] 付乾堂, 余迪求. 拟南芥 AtWRKY25, AtWRKY26 和 AtWRKY33 在非生物胁迫条件下的表达分析[J]. *遗传*, 2010, 32(8): 848-856.
- [22] Jaillon O, Aury M, Noel B, et al. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla[J]. *Nature*, 2007, 449(7161): 463-467.
- [23] Birkenbihl R P, Kracher B, Somssich I E. Induced genome-wide binding of three *Arabidopsis* WRKY transcription factors during early MAMP-triggered immunity[J]. *The Plant Cell*, 2016: tpc. 00681. 2016.
- [24] Fountain J C, Raruang Y, Luo M, et al. Potential roles of WRKY transcription factors in regulating host defense responses during *Aspergillus flavus* infection of immature maize kernels[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2015, 89: 31-40.
- [25] Yang Y, Zhou Y, Chi Y, et al. Characterization of soybean WRKY gene family and identification of soybean WRKY genes that promote resistance to soybean cyst nematode[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 17804.
- [26] Vives-Peris V, Marmaneu D, Gómez-Cadenas A, et al. Characterization of citrus WRKY transcription factors and their responses to phytohormones and abiotic stresses[J]. *Biologia Plantarum*, 2018, 62(1): 33-44.
- [27] Li D, Liu P, Yu J, et al. Genome-wide analysis of WRKY gene family in the sesame genome and identification of the WRKY genes involved in responses to abiotic stresses[J]. *BMC plant biology*, 2017, 17(1): 152.
- [28] Ramamoorthy R, Jiang S Y, Kumar N, et al. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(6): 865-879.
- [29] Wang L, Zhu W, Fang L, et al. Genome-wide identification of WRKY family genes and their response to cold stress in *Vitis vinifera*[J]. *BMC plant biology*, 2014, 14(1): 103.
- [30] Tian Y, Dong Q, Ji Z, et al. Genome-wide identification and analysis of the *MADS-box* gene family in apple[J]. *Gene*, 2015, 555(2): 277-290.
- [31] 董庆龙, 王海荣, 安森, 等. 苹果 NADP 依赖的苹果酸酶基因克隆、序列和表达分析[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(9): 1857-1866.
- [32] Gao X, Zhu L, Zhou Y, et al. Advances in research on function of WRKY transcription factor genes in plant resistance[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(1): 80-85.
- [33] Dou L, Zhang X, Pang C, et al. Genome-wide analysis of the WRKY gene family in cotton[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289(6): 1103-1121.
- [34] 谷彦冰, 冀志蕊, 迟福梅, 等. 苹果 WRKY 基因家族生物信息学及表达分析[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(16): 3221-3238.
- [35] 宋辉, 南志标. 藜藜苜蓿全基因组中 WRKY 转录因子的鉴定和分析[J]. *遗传*, 2014, 36(2): 152-168.
- [36] 谷彦冰, 冀志蕊, 迟福梅, 等. 桃 WRKY 基因家族全基因组鉴定和表达分析[J]. *遗传*, 2016, 38(3): 254-270.
- [37] Guo C, Guo R, Xu X, et al. Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(6): 1513-1528.
- [38] Jiang Y, Deyholos M K. Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses[J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69(1-2): 91-105.
- [39] Shi W, Hao L, Li J, et al. The *Gossypium hirsutum* WRKY gene *GhWRKY39-1* promotes pathogen infection defense responses and mediates salt stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(3): 483-498.
- [40] Yang B, Jiang Y, Rahman M H, et al. Identification and expression analysis of WRKY transcription factor genes in canola (*Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9(1): 68.

Genome-wide Identification and Analysis of WRKY Transcription Factors in Grape

SU Ling, WANG Peng-fei, YANG Yang, REN Feng-shan, WANG Yong-mei, CHEN Wan-jun
(Shandong Academy of Grape, Shandong Engineering Research Center for Grape Cultivation and Deep-processing, MOA Key Laboratory of East China Urban Agriculture, Jinan 250100, China)

Abstract: In order to identify and analyze WRKY transcription factor family in grape genome, gene classification, phylogenetic analysis, chromosome location, sequence alignment, conserved motif analysis and expression profiles of VvWRKY proteins were analyzed by bioinformatics method. The results showed that there were 56 WRKY genes in the *Vitis vinifera* genome. Sequence alignment and phylogenetic analysis showed that they were divided into three main groups (group I, II and III), with five subgroups (group II-a, II-b, II-c, II-d and II-e) in group II. The chromosome localization was found that they were localized in all chromosomes except chromosome 3, and these genes were duplicated and distributed in chromosomes. The WRKY domain analysis demonstrated that the WRKY regions were highly conserved. Expression analysis indicated that the expression levels of most VvWRKY genes were altered in response to abiotic stress response.

Keywords: grape; WRKY; transcription factor; phylogenetic analysis; expression analysis