

葡萄 *VvWRKY70* 基因的克隆及表达特性分析

李莉娟,刘婧,郝丽宏,仪慧兰*

(山西大学 生命科学学院,山西 太原 030006)

摘要:鲜食葡萄需要适当的采后保鲜措施,保鲜剂处理引发的果实组织基因重编程在采后保鲜中发挥了重要作用。在二氧化硫(SO₂)保鲜剂诱导表达的葡萄基因中,我们筛选出与拟南芥 *AtWRKY70* 同源性最高的基因 *VvWRKY70*,生物信息学分析发现 *VvWRKY70* 基因启动子区含有响应脱落酸、水杨酸、茉莉酸甲酯和低温的顺式作用元件;通过农杆菌介导的遗传转化获得了高表达 *VvWRKY70* 的拟南芥植株,该转基因植株在低温和灰霉菌胁迫时 *VvWRKY70* 上调表达,在 SO₂ 暴露时 *VvWRKY70* 下调表达,说明 *VvWRKY70* 参与了植物对生物和非生物胁迫的应答。这些结果为进一步研究葡萄基因 *VvWRKY70* 的功能及其作用机制提供了依据。

关键词:WRKY;葡萄;异源表达;转录调控

中图分类号:Q786;S663.1; **文献标志码:**A **文章编号:**0253-2395(2024)05-1079-07

Analysis on Cloning and Expression Characteristics of *VvWRKY70* Gene in Grape

LI Lijuan, LIU Jing, HAO Lihong, YI Huilan*

(School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Fresh-eating grapes need appropriate post-harvest preservation, and the gene reprogramming of fruit tissue caused by preservative treatment plays an important role in post-harvest preservation. Among the grape genes responded to sulfur dioxide (SO₂) preservative, we screened the *VvWRKY70* gene (LOC100255013), which has the highest homology with *AtWRKY70* of *Arabidopsis*. The promoter region of gene *VvWRKY70* contained *cis*-acting elements in responses to abscisic acid, salicylic acid, methyl jasmonate and low temperature. The transgenic *Arabidopsis* expressing *VvWRKY70* were obtained through Agrobacterium-mediated genetic transformation. The expression levels of *VvWRKY70* in transgenic *Arabidopsis* plants were up-regulated under low temperature and *Botrytis cinerea* treatments, but down-regulated in SO₂ exposure, which indicated that *VvWRKY70* might participate in the responses of plants to biotic and abiotic stresses. These results provide a basis for further study on the function and mechanism of grape gene *VvWRKY70*.

Key words: WRKY; grape; heterologous expression; transcriptional regulation

0 引言

葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 是全球范围内主要的栽培果树之一,也是山西省重要的经济作物。由于葡萄果实生产的季节性,采后生理衰老和病原

菌侵染腐烂等问题,需要进行采后保鲜。二氧化硫(SO₂)类保鲜剂是葡萄产业传统的保鲜剂,也是目前为止最有效、应用最广泛的葡萄保鲜剂^[1-2]。传统观点认为 SO₂ 的防腐保鲜作用源于其对病原菌的直接毒性^[1]。近期研究发现,SO₂

收稿日期:2023-05-06;接受日期:2023-07-24

基金项目:国家自然科学基金(31972132);山西省专利推广实施资助专项(20210512);小店区科技计划项目(202003S01)

作者简介:李莉娟(1995-),女,山西晋城人,博士研究生,主要研究方向为植物逆境生物学。E-mail:954165117@qq.com

* 通信作者:仪慧兰(YI Huilan),E-mail:yihl@sxu.edu.cn

引文格式:李莉娟,刘婧,郝丽宏,等.葡萄 *VvWRKY70* 基因的克隆及表达特性分析[J].山西大学学报(自然科学版),2024,47(5):1079-1085. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2023125

保鲜处理能诱导葡萄果实细胞发生广泛的代谢重编程,出现典型的植物防御特征^[1-3]。采用RNA-seq检测对照组和SO₂保鲜组葡萄果实的基因表达谱发现,SO₂保鲜组中与氧化还原、激素信号、次生代谢和细胞壁合成等防御相关的多个基因表达上调,抗逆相关的转录因子WRKY、bHLH、AP2/ERF和MYB家族中有多个成员差异性表达^[4],因此,SO₂诱导的基因转录应答精细调控着果实的采后生理,进而达到防腐保鲜效果。

WRKY作为植物特有的一类转录因子,是植物天然免疫系统的核心成员,在复杂的防御应答网络中起着正向或负向的调控作用,参与植物对生物和非生物胁迫应答^[5]。研究表明,草莓FaWRKY25负向调节草莓果实对灰霉菌的抗性^[6];番茄*SlWRKY70*基因沉默减弱了植株对番茄蚜虫和线虫的抗性^[7];在水稻中,*O_sWRKY89*的过表达能增强对稻瘟病和白背飞虱的抗性、对紫外线的耐受性^[8];野生毛葡萄基因*V_vWRKY31*能激活欧洲葡萄水杨酸信号转导和特定代谢物合成,提高其对白粉病的抗性^[9]。研究较多的拟南芥*AtWRKY70*被证实参与植物的免疫激活,通过水杨酸和茉莉酸依赖的防御途径对抗病基因(*R*)介导的抗性和诱导系统抗性(ISR)进行调控^[10-12]; *AtWRKY70*还与*AtWRKY54*互作,共同调节植物对渗透胁迫的耐受性^[13],表明*AtWRKY70*在植物响应生物和非生物胁迫中发挥了重要的调节作用。

依据WRKY家族基因的序列特征在葡萄基因组中鉴定到了59个潜在的*V_vWRKY*基因,其中70%~90%对生物或非生物胁迫应答,说明它们广泛参与植物对逆境的响应^[14-16]。目前,与拟南芥*AtWRKY70*序列相似、参与葡萄采后保鲜的*V_vWRKY70*功能尚属未知。因此,本研究从“玫瑰香”葡萄叶片cDNA克隆获得基因*V_vWRKY70*,农杆菌介导转化拟南芥,并以高表达*V_vWRKY70*拟南芥纯合株系为实验材料,检测在SO₂、低温及灰霉菌暴露时*V_vWRKY70*的表达特性,为进一步研究*V_vWRKY70*的功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 葡萄叶片总RNA的提取和cDNA合成

用TransZol Plant试剂盒提取“玫瑰香”葡萄

叶片总RNA,酶标仪和琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的浓度和完整性。以质量合格的总RNA为模板,用PrimeScript RT reagent Kit (Takara, Japan)试剂盒合成cDNA。

1.2 *V_vWRKY70*基因的克隆及启动子区生物信息学分析

从NCBI (National Center of Biotechnology Information) 数据库 中 找 出 *V_vWRKY70* (LOC100255013)的可编码序列(Coding Sequence, CDS),使用Vector NTI设计两端带attB位点的特异性引物*V_vWRKY70* CDSNS F/R(表1)。以cDNA为模板,用高保真克隆酶进行多聚酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)扩增,PCR产物用质量分数1%琼脂糖凝胶电泳分析后切胶回收,获得目的片段。用Plantcare软件对*V_vWRKY70*基因启动子区的顺式元件进行分析。

1.3 *V_vWRKY70*异源高表达拟南芥植株的获得

利用Gateway技术构建*V_vWRKY70*基因的植物表达载体Pro35S::V_vWRKY70-GFP。首先通过BP反应将目的片段与载体pDONR221连接,转化大肠杆菌DH5 α 。利用两对引物M13F/*V_vWRKY70* 427R和*V_vWRKY70* 562F/M13R(表1)进行菌落PCR验证,挑选阳性克隆提取质粒测序,得到中间载体。中间载体通过LR反应与载体pB7FWG2连接,用*V_vWRKY70* 562F/eGFP R引物(表1)进行菌落PCR,筛选阳性菌落。选酶切和测序合格的质粒用于转化农杆菌GV3101。

利用农杆菌介导法将构建好的植物表达载体导入Columbia野生型(Col-0)拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)中,经除草剂(PPT, 45 mg/L)筛选、DNA鉴定获得T3代拟南芥纯合株系(L1、L2和L3)。

1.4 *V_vWRKY70*异源高表达拟南芥植株的培养与处理

取拟南芥野生型(WT)和*V_vWRKY70*转基因株系的种子,经4℃春化1d后播种于混合营养土中,置于植物培养间培养,采用光/暗周期16 h/8 h,光照度 ≥ 3000 lx,培养温度为(23 \pm 1)℃,相对湿度60%~70%^[17]。植株4周龄时用于不同逆境的胁迫实验。

(1)SO₂暴露实验参照课题组前期方法^[17],将植株分为SO₂熏气组和对照组,SO₂暴露浓度

采用 30 mg/m³, 对照组置于洁净空气中。熏气 24 h 后取植株地上部分用于实验。

(2) 冷胁迫实验中, 低温处理组植株于 4 °C 培养, 对照组于 22 °C 培养, 胁迫 24 h 后取植株地上部分用于测定。

(3) 灰霉菌实验中, 接菌组在拟南芥叶片背面中央接种 10 μL 灰霉菌孢子悬液 (5 × 10⁶ mL⁻¹), 对照植株接种 10 μL 无菌水, 避光 24 h 后光照培养 24 h, 取植株地上组织用于检测。

1.5 基因表达水平分析

用 TransZol 试剂提取拟南芥植株地上组织总 RNA, 反转录为 cDNA。通过反转录-多聚酶链式反应 (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 和琼脂糖凝胶电泳验证转基因株系中 *VvWRKY70* 的表达水平; qRT-PCR (Bio-Rad, USA) 检测不同条件下拟南芥植株中 *VvWRKY70* 的相对表达量, 以 *AtActin2* 为内参, 计算方法参考 Livak 和 Schmittgen (2001)^[18], 所用扩增引物见表 1。

1.6 数据处理与分析

利用 SPSS 软件对数据进行统计分析, 计算各组的平均值和标准误, 用 Duncan 方法进行多重比较, 分析差异显著性。在图中, * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 基因 *VvWRKY70* 启动子区顺式作用元件分析

分析显示, 基因 *VvWRKY70* 启动子区除了常

规启动子元件外, 还含有大量与胁迫响应、激素调节相关的作用元件 (表 2), 包括脱落酸响应元件 (Abscisic Acid Responsive Element, ABRE)、水杨酸响应元件 TCA-element、茉莉酸甲酯响应元件 TGACG-motif 和 CGTCA-motif、干旱响应的 MYB 结合位点 MBS (MYB binding site) 以及低温响应元件 (Low Temperature Responsive Element, LTR) 等。这些作用元件的存在说明 *VvWRKY70* 可能在植物抵御多种逆境中发挥作用。

2.2 *VvWRKY70* 基因的克隆

从鲜食葡萄品种“玫瑰香”的 cDNA 模板中扩增 *VvWRKY* 基因 CDS 序列, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后出现长度约 969 bp 的一条清晰条带, 片段大小与预期片段一致 (图 1)。

2.3 Pro35S::VvWRKY70-GFP 表达载体的构建

胶回收试剂盒纯化 *VvWRKY70* 目的片段, 与载体 pDONR221 连接, 转化大肠杆菌 DH5α。经菌落 PCR 验证挑选出阳性克隆, 提取质粒进行测序验证, 得到了中间载体 pENTRWRKY70 (图 2(a))。中间载体通过 LR 反应与载体 pB7FWG2 连接, 转化大肠杆菌, 用 *VvWRKY70* 562F/eGFP R 引物进行 PCR 鉴定, 筛选阳性菌落, 提取质粒, 经酶切得到一个 1 500 bp 左右的片段 (图 2(b)), 且测序结果符合预期, 说明 Pro35S::VvWRKY70-GFP 表达载体 (图 2(c)) 构建成功。

2.4 Pro35S::VvWRKY70-GFP 异源过表达拟南芥植株的获得

将构建好的 *VvWRKY70* 表达载体通过农

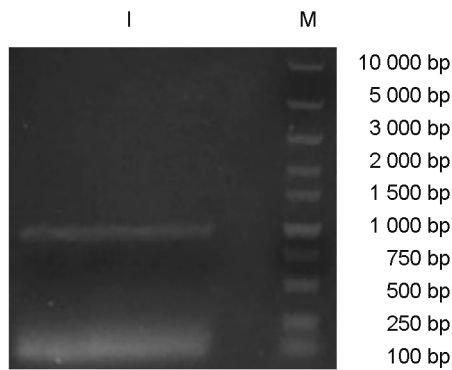
表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>VvWRKY70</i> CDSNS F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGAGA GGCACACAGAC
<i>VvWRKY70</i> CDSNS R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAACACTCAA AACCGATAAG
M13 F	CAGGAAACAGCTATG ACC
M13 R	TGTAACACGACGGCCAGT
eGFP F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
eGFP R	TTACTTGTACAGCTCGTCCA
<i>VvWRKY70</i> CDSNS 427R	TTCGCCAGGCATAACCGTCA
<i>VvWRKY70</i> CDSNS 562F	ACATACCACGGCCAGCACAC
<i>VvWRKY70</i> F	CCATACCAATAACAACAACAAGAACAAC
<i>VvWRKY70</i> R	AAACCGATAAGAACATCATCAAAGTCC
<i>AtActin2</i> F	TGCGATAATGGAAGTGGTATGG
<i>AtActin2</i> R	AAGACAGCCCTGGGCGCATCA

表2 *VvWRKY70* 基因启动子区顺式作用元件Table 2 *Cis-acting promoter elements of VvWRKY70 gene*

顺式元件	位置	序列	功能
ABRE	-1 794	CACGTG	脱落酸响应
	+1 795,+1 935	ACGTG	
TCA-element	-1 631	TCAGAAGAGG	水杨酸响应
CGTCA-motif	-157,-1 312,+1 716	CGTCA	茉莉酸甲酯响应
TGACG-motif	+157,+1 312,+1 716	TGACG	
ARE	-201,-407	AAACCA	厌氧诱导
LTR	-1 721	CCGAAA	低温响应
MBS	-956,+1 382,+1 393	CAACTG	MYB结合位点参与干旱诱导
GARE-motif	+402	TCTGTTG	赤霉素响应
O ₂ -site	-1 549	GATGACATGG	参与玉米醇溶蛋白代谢调节
CCAAT-box	-1 624	CAACGG	MYBHv1 结合位点
MYB recognition site	+1 624	CCGTTG	MYB 识别位点
W-box	+997	TTGACC	



M: Super DNA Marker; I: 扩增产物。

图1 *VvWRKY70* 基因的扩增产物Fig. 1 Amplification product of *VvWRKY70* gene

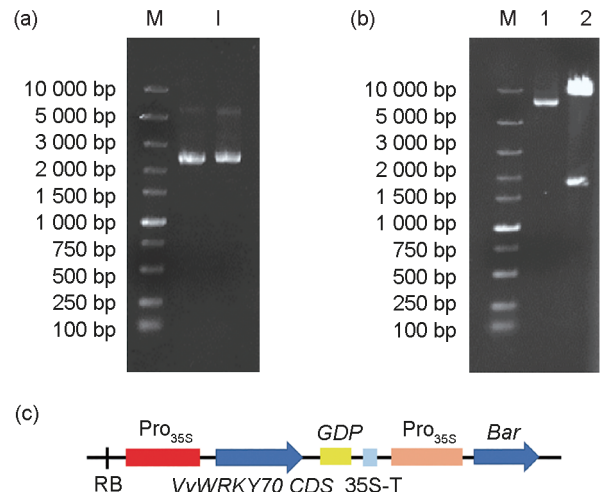
杆菌 GV3101 介导的遗传转化方法转入野生型拟南芥中,通过抗生素筛选和 DNA 鉴定获得了稳定遗传的 T3 代转基因纯合株系 L1, L2 和 L3, RT-PCR 检测证实三个转基因拟南芥株系中 *VvWRKY70* 高表达。

2.5 不同胁迫处理对 *VvWRKY70* 转录水平的影响

转基因拟南芥植株地上组织中基因 *VvWRKY70* 受 SO₂、低温和灰霉菌处理的影响差异表达,其中低温和灰霉菌处理诱导 *VvWRKY70* 表达上调,而 SO₂ 处理组 *VvWRKY70* 表达下调。由此推测,葡萄 *VvWRKY70* 可能参与植株对生物和非生物胁迫的响应。

3 讨论

生理衰老和病原菌侵染可导致葡萄果实采



M: Super DNA marker; I: 中间载体; 1: 质粒图谱; 2: 酶切后质粒图谱。

图2 Pro35S::VvWRKY70-GFP 表达载体的构建

(a) 中间载体 pENTRVvWPKY70; (b) 表达载体的酶切图谱; (c) 表达载体示意图

Fig. 2 Construction of Pro35S::VvWRKY70-GFP expression vector

(a) Intermediate vector pENTRVvWPKY70; (b) Enzymatic digestion map of expression vector; (c) Schematic diagram of expression vector

后腐败,基因的差异表达参与调节果实的采后生理^[1-3]。WRKY 家族在植物应对多种逆境胁迫中发挥调控作用^[5],拟南芥 *AtWRKY70* 是植物免疫和防御相关的调节基因,我们从 SO₂ 保鲜组葡萄果实中筛选出与 *AtWRKY70* 序列高度相似的差异表达基因 *VvWRKY70* 进行功能研究。由于葡萄遗传转化困难^[19],大部分葡萄

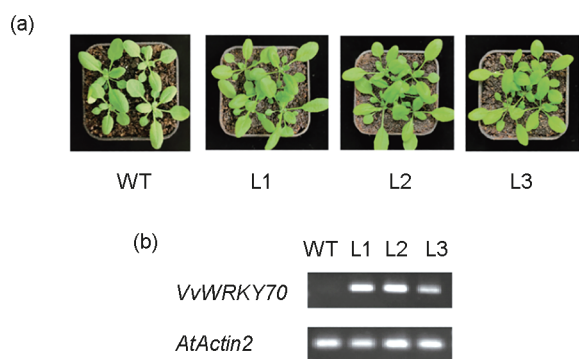


图3 野生型和Pro35S::VvWRKY70-GFP转基因拟南芥植株表型及 *VvWRKY70* 的表达量

(a) 植株表型; (b) *VvWRKY70* 的表达量

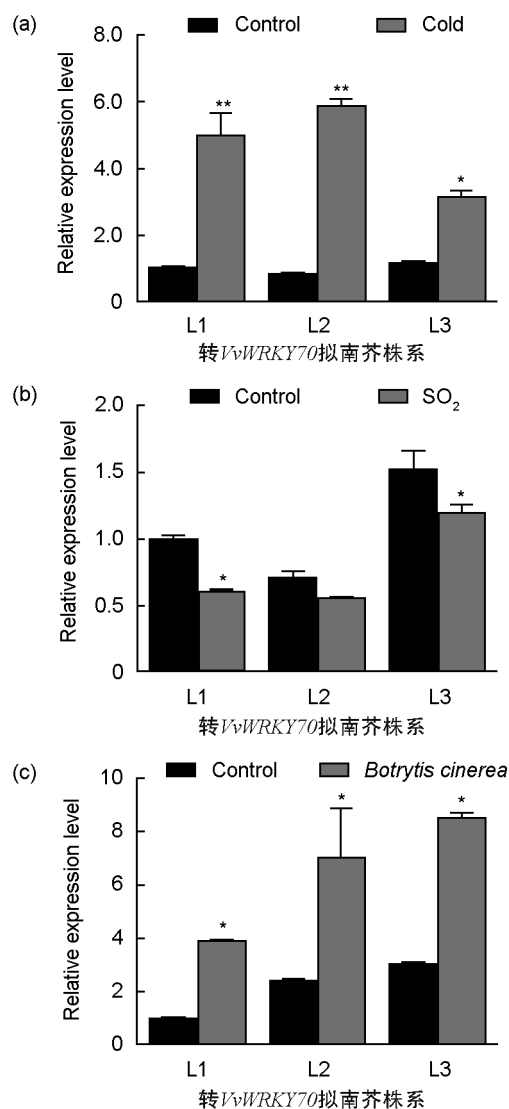
Fig. 3 The phenotype and *VvWRKY70* expression levels of wild-type and Pro35S::VvWRKY70-GFP transgenic *Arabidopsis* plants

(a) Plant phenotype; (b) the expression levels of *VvWRKY70*

基因功能未知,有关基因功能的研究多限于在拟南芥、烟草等模式植物中进行^[20-22],因此本文利用拟南芥转基因植株来分析 *VvWRKY70* 的功能,首先从“玫瑰香”葡萄中克隆到 *VvWRKY70* 目的片段并构建了 *VvWRKY70* 异源表达的拟南芥纯合株系,利用 *VvWRKY70* 高表达的转基因拟南芥株系来研究葡萄基因 *VvWRKY70* 对环境因子 (SO_2 、低温和灰霉菌) 的响应特征,为揭示 *VvWRKY70* 在逆境胁迫中的调节作用提供了依据。

WRKY 作为植物特有的一类转录因子家族,广泛参与了植物对多种逆境胁迫的响应。研究证实外施水杨酸或茉莉酸可诱导 WRKY 基因转录,植物抗逆性增强^[23-26]。在本文中, *VvWRKY70* 启动子区含有脱落酸、水杨酸、茉莉酸甲酯等激素应答元件,及逆境响应的顺式元件,在葡萄保鲜组 *VvWRKY70* 上调表达,可能是 SO_2 和低温等环境因子激活了 *VvWRKY70* 启动子区存在的逆境响应元件,在保鲜组葡萄中水杨酸和茉莉酸激素信号转导途径相关基因的差异表达提示有可能该基因受这两种激素调节,从而调控下游功能基因的表达,提高果实组织细胞的逆境适应性。因此,克隆葡萄 *VvWRKY70* 基因,并对其表达特性进行分析,将有助于揭示该基因在葡萄保鲜中的调控作用,并为改良葡萄抗病性提供新的候选基因。

在 SO_2 联合低温保鲜葡萄果实的过程中,



*代表 $P < 0.05$; **代表 $P < 0.01$

图4 转基因拟南芥中 *VvWRKY70* 基因对逆境胁迫的转录应答

(a) 冷处理; (b) SO_2 处理; (c) 灰霉菌处理

Fig. 4 Transcriptional responses of *VvWRKY70* gene to stresses in transgenic *Arabidopsis* plants

(a) Cold treatment; (b) SO_2 treatment;

(c) *Botrytis cinerea* treatment

包括 *VvWRKY70* 在内的多个逆境响应基因上调表达。 SO_2 、低温和灰霉菌是葡萄保鲜过程中主要的环境因子,而 *VvWRKY70* 基因是葡萄 SO_2 保鲜过程中诱导表达的基因,可能是葡萄受这三种胁迫共同作用的结果。 *VvWRKY70* 的上调表达可能参与了葡萄果实保鲜过程中对包括灰霉菌在内的多种致病菌的防御应答。本文利用异源表达 *VvWRKY70* 拟南芥植株对该基因在不同逆境下的表达情况进行分析,发现

拟南芥叶片中 *VvWRKY70* 受灰霉菌诱导表达增强,说明该基因表达参与调节组织的抗病生理过程。低温诱导转基因拟南芥中 *VvWRKY70* 表达上调,与我们先前 SO_2 联合低温保鲜葡萄果实诱导 *VvWRKY70* 基因表达上调结果相同,并与文献报道的“玫瑰香”葡萄 *VvWRKY42* (与 *VvWRKY70* 序列相似性最高) 在冷胁迫下表达上调的结果一致^[15],说明 *VvWRKY70* 基因可能通过调控葡萄对低温胁迫的应答,参与调节葡萄果实保鲜过程。在转基因拟南芥中 SO_2 胁迫组 *VvWRKY70* 表达下调,与 SO_2 保鲜组葡萄果实中 *VvWRKY70* 基因上调表达不一致,可能与葡萄暴露的 SO_2 浓度和时间^[2] 与拟南芥植株不同有关。因此, *VvWRKY70* 广泛参与了植物对灰霉病、低温及 SO_2 等环境胁迫的响应。在低温联合 SO_2 保鲜葡萄果实的过程中, *VvWRKY70* 可能通过这几种环境因子的诱导作用,调控下游与逆境胁迫相关的功能基因表达,提高了葡萄果实抵御病原菌的抗性,进而发挥保鲜功能,具体的调控机制还需进一步的深入研究。

综上所述,葡萄 *VvWRKY70* 基因可能受环境诱导表达,参与植物细胞逆境生理过程的调节,影响植物的抗逆性。 SO_2 作为目前为止最有效的葡萄保鲜剂,克隆和分析在 SO_2 保鲜中具有重要作用的葡萄基因,为研究葡萄保鲜机理提供了实验依据,对进一步利用功能基因创制新的葡萄种质资源具有借鉴意义。

参考文献:

- [1] GIRAUD E, IVANOVA A, GORDON C S, *et al.* Sulphur Dioxide Evokes a Large Scale Reprogramming of the Grape Berry Transcriptome Associated with Oxidative Signalling and Biotic Defence Responses[J]. *Plant Cell Environ*, 2012, **35**(2): 405–417. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2011.02379.x.
- [2] XUE M Z, Yi H L. Induction of Disease Resistance Providing New Insight into Sulfur Dioxide Preservation in *Vitis vinifera* L.[J]. *Sci Hort*, 2017, **225**: 567–573. DOI: 10.1016/j.scienta.2017.07.055.
- [3] DUARTE-SIERRA A, AISPURO-HERNÁNDEZ E, VARGAS-ARISPURO I, *et al.* Quality and PR Gene Expression of Table Grapes Treated with Ozone and Sulfur Dioxide to Control Fungal Decay[J]. *J Sci Food Agric*, 2016, **96**(6): 2018–2024. DOI: 10.1002/jsfa.7312.
- [4] YAN D M, Yi H L. Transcriptome Analysis Provides Insights into Preservation Mechanism of Postharvest Muscat Hamburg Grapes Treated with SO_2 [J]. *Sci Hort*, 2024, 331. DOI: 10.1016/j.scienta.2024.113108.
- [5] JIANG J J, MA S H, YE N H, *et al.* WRKY Transcription Factors in Plant Responses to Stresses[J]. *J Integr Plant Biol*, 2017, **59**(2): 86–101. DOI: 10.1111/jipb.12513.
- [6] JIA S Z, WANG Y H, ZHANG G, *et al.* Strawberry *FaWRKY25* Transcription Factor Negatively Regulated the Resistance of Strawberry Fruits to *Botrytis cinerea*[J]. *Genes*, 2020, **12**(1): 56. DOI: 10.3390/genes12010056.
- [7] ATAMIAN H S, EULGEM T, KALOSHIAN I. *SlWRKY70* is Required for *Mi-1*-mediated Resistance to Aphids and Nematodes in Tomato[J]. *Planta*, 2012, **235**(2): 299–309. DOI: 10.1007/s00425-011-1509-6.
- [8] WANG H H, HAO J J, CHEN X J, *et al.* Overexpression of Rice WRKY89 Enhances Ultraviolet B Tolerance and Disease Resistance in Rice Plants[J]. *Plant Mol Biol*, 2007, **65**(6): 799–815. DOI: 10.1007/s11103-007-9244-x.
- [9] YIN W C, WANG X H, LIU H, *et al.* Overexpression of *VqWRKY31* Enhances Powdery Mildew Resistance in Grapevine by Promoting Salicylic Acid Signaling and Specific Metabolite Synthesis[J]. *Hortic Res*, 2022, **9**: uhab064. DOI: 10.1093/hr/uhab064.
- [10] ZHANG Y X, YANG Y A, FANG B, *et al.* *Arabidopsis snrc2-1D* Activates Receptor-like Protein-mediated Immunity Transduced through WRKY70[J]. *Plant Cell*, 2010, **22**(9): 3153–3163. DOI: 10.1105/tpc.110.074120.
- [11] LI J, BRADER G, KARIOLA T, *et al.* WRKY70 Modulates the Selection of Signaling Pathways in Plant Defense[J]. *Plant J*, 2006, **46**(3): 477–491. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.02712.x.
- [12] JIANG C H, HUANG Z Y, XIE P, *et al.* Transcription Factors WRKY70 and WRKY11 Served as Regulators in Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156-induced Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* Pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis*[J]. *J Exp Bot*, 2016, **67**(1): 157–174. DOI: 10.1093/jxb/erv445.
- [13] LI J, BESSEAU S, TÖRÖNEN P, *et al.* Defense-related Transcription Factors WRKY70 and WRKY54 Modulate Osmotic Stress Tolerance by Regulating Stomatal Aperture in *Arabidopsis*[J]. *New Phytol*, 2013, **200**(2): 457–472. DOI: 10.1111/nph.12378.
- [14] WANG M, VANNOZZI A, WANG G, *et al.* Genome and Transcriptome Analysis of the Grapevine (*Vitis vinifera* L.) WRKY Gene Family[J]. *Hortic Res*, 2014, **1**: 14016. DOI: 10.1038/hortres.2014.16.
- [15] WANG L N, ZHU W, FANG L C, *et al.* Genome-wide

- Identification of WRKY Family Genes and Their Response to Cold Stress in *Vitis vinifera*[J]. *BMC Plant Biol*, 2014, **14**(1): 1-14. DOI: 10.1186/1471-2229-14-103.
- [16] GUO C L, GUO R R, XU X Z, *et al.* Evolution and Expression Analysis of the Grape (*Vitis vinifera* L.) *WRKY* Gene Family[J]. *J Exp Bot*, 2014, **65**(6): 1513-1528. DOI: 10.1093/jxb/eru007.
- [17] LI L J, YI H L. Photosynthetic Responses of *Arabidopsis* to SO₂ were Related to Photosynthetic Pigments, Photosynthesis Gene Expression and Redox Regulation [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 203:111019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111019.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [19] 刘昱, 付濛濛, 安栋梁, 等. 葡萄体细胞胚发生及遗传转化体系研究进展[J]. 分子植物育种, 2018, **16**(18): 6068-6079. DOI: 10.13271/j.mpb.016.006068.
- LIU Y, FU M M, AN D L, *et al.* Research Progress on Somatic Embryogenesis and Genetic Transformation System of Grape[J]. *Mol Plant Breed*, 2018, **16**(18): 6068-6079. DOI: 10.13271/j.mpb.016.006068.
- [20] WANG L, LIU W D, WANG Y J. Heterologous Expression of Chinese Wild Grapevine *VqERFs* in *Arabidopsis thaliana* Enhance Resistance to *Pseudomonas syringae* Pv. *tomato* DC3000 and to *Botrytis cinerea*[J]. *Plant Sci*, 2020, **293**:110421. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110421.
- [21] JIANG C Y, WANG D, ZHANG J, *et al.* *VqMYB154* Promotes Polygene Expression and Enhances Resistance to Pathogens in Chinese Wild Grapevine[J]. *Hortic Res*, 2021, **8**: 151. DOI: 10.1038/s41438-021-00585-0.
- [22] LI W, DANG C X, YE Y X, *et al.* Overexpression of Grapevine *VvIAA18* Gene Enhanced Salt Tolerance in Tobacco[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(4): 1323. DOI: 10.3390/ijms21041323.
- [23] BARI R, JONES J D G. Role of Plant Hormones in Plant Defence Responses[J]. *Plant Mol Biol*, 2009, **69** (4): 473-488. DOI: 10.1007/s11103-008-9435-0.
- [24] 张洁, 王文静, 张鼎宇, 等. *WRKY* 转录因子在烟草受 CMV 侵染和激素处理中的表达模式初步分析[J]. 植物保护, 2017, **43**(3): 55-59. DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.03.009.
- ZHANG J, WANG W J, ZHANG D Y. *et al.* Expression Patterns of *WRKY* Transcription Factor Genes in Tobacco Plants Upon CMV Infection and Phytohormone Treatment[J]. *Plant Prot*, 2017, **43**(3): 55-59. DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.03.009.
- [25] WANG X H, GUO R R, TU M X, *et al.* 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]. *Front Plant Sci*, 2017, **8**: 97. DOI: 10.3389/fpls.2017.00097.
- [26] JAVED T, GAO S J. *WRKY* Transcription Factors in Plant Defense[J]. *Trends Genet*, 2023, **39**(10): 787-801. DOI: 10.1016/j.tig.2023.07.001.