

doi:10.11937/bfyy.20172624

## 葡萄 *VvWRKY13* 基因促进转基因 番茄果实的早熟

马倩, 张岁芳, 周佳旋, 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:**以葡萄品种‘左优红’和番茄品种‘Micro-Tom’为试材,采用转基因异源过表达和成熟相关生理性状监测的方法,研究了葡萄 *VvWRKY13* 过表达番茄株系的发育期,果实大小、种子数目和成熟相关基因的表达,以研究 *VvWRKY13* 在果实成熟中发挥的功能。结果表明:*VvWRKY13* 具有促进番茄发育期缩短,果实变小,种子变少,增加部分成熟相关基因表达的功能。

**关键词:**葡萄;*VvWRKY13*;发育周期;番茄;转基因

**中图分类号:**S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2018)01-0023-06

葡萄(*Vitis vinifera* L.)是一种世界性的果树,因其果实营养丰富、多汁味美而深受人们的喜爱。因此,对葡萄果树生长调控的研究具有十分重要的理论意义和潜在的应用前景。葡萄的生长发育受基因表达的影响,而转录因子通过结合基因的启动子序列,直接调控基因的表达。目前报道,植株中多个转录因子参与了对植物果实早熟的调控。如在猕猴桃中发现 AdEIL2 和 AdEIL3 转录激活乙烯合成关键基因 *AdACO1* 启动子,促进乙烯的生物合成,从而加速果实成熟<sup>[1]</sup>。番茄中的 MADS-Box 转录因子 RIN 抑制 *SlACS2* 和 *SlACS4* 表达,进而影响乙烯的合成<sup>[2]</sup>。同为番茄 MADS-Box 转录因子家族中的 SIMADS1 通过抑制乙烯生物合成途径中的 *SlACS1*、*SlACS2*、*SlACS6* 和 *SlACO1* 的表达,从而影响

乙烯的合成,最终推迟番茄果实的成熟<sup>[3]</sup>。番茄果实中的 SINAC1 抑制乙烯合成基因的表达,从而抑制果实的成熟<sup>[4]</sup>。香蕉中的 AP2/ERF 转录因子对乙烯生物合成的调控则更为复杂, MaERF9 激活 *MaACO1* 启动子,而 MaERF11 则抑制 *MaACS1* 和 *MaACO1* 启动子的活性,同时 MaERF9 和 MaERF11 在蛋白水平上与 *MaACO1* 互作,协同调控乙烯的生物合成,进而影响香蕉果实的成熟<sup>[5]</sup>。

WRKY 转录因子是植物中特有的一类转录因子,其 WRKY 结构域专一性结合下游基因启动子中的 W-盒<sup>[6]</sup>。目前已从葡萄中克隆出多个 *VvWRKY* 转录因子,并且它们大多被证实参与到植物抵御生物胁迫和非生物胁迫的过程中<sup>[7-9]</sup>。那么 *VvWRKY* 转录因子是否还存在其它的功能呢?课题组在前期研究中从酿酒葡萄品种‘左优红’中克隆出了 *VvWRKY13* 基因,该研究将 *VvWRKY13* 过量表达至番茄中,检测转基因番茄的生长发育状况,果实的发育周期,种子的数目和果实成熟相关基因的表达水平,研究其对促进转基因番茄果实早熟的功能,以期为早熟有利基因的挖掘,早熟良种培育及分子辅助育种提供参考依据。

**第一作者简介:**马倩(1979-),女,博士,副教授,现主要从事果实成熟及品质等研究工作。E-mail:maqian51856@126.com.

**责任作者:**刘新(1966-),女,博士,教授,现主要从事植物抗逆和营养等研究工作。E-mail:liuxin6080@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31540090);青岛农业大学高层次人才科研基金资助项目(6631113339)。

**收稿日期:**2017-09-26

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试番茄(*Lycopersicon esculentum*)品种为‘Micro-Tom’。供试所用野生型和其转基因番茄株系均在青岛农业大学生命科学学院人工气候室于光强  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 13 h 光照/11 h 黑暗的光周期条件下培养。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 转基因番茄株系的获得

将含有 *VvWRKY13* 的 CDS 序列转入质粒 p-Super1300 构建重组质粒, 之后将构建的重组质粒转入农杆菌菌株 EHA105 中。采用叶盘侵染法转化番茄品种‘Micro-Tom’<sup>[10-12]</sup>。通过

PCR 鉴定和反复自交获得 3 个独立的纯合的 *VvWRKY13* 转基因株系, 待用。扩增和鉴定所用的引物序列见表 1。收集花后 7 d, 转色期和成熟期的果实进行试验<sup>[13]</sup>。

#### 1.2.2 实时定量 PCR 分析

CTAB 法提取番茄叶片中的总 RNA, 利用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒合成 cDNA 第一条链。以此作为模板, 进行实时荧光定量 PCR 试验。实时荧光定量 PCR 程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 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。每个样品进行 3 次重复。实时定量 PCR 引物如表 1 中所示。基因相对表达量以目的基因的表达相对于对照组 *Actin* 的变化倍数, 按  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Name and sequences of primers

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	用途 Use
VvWRKY13-FP	GAATTCATGTCTACTACTTCTCAAGCC	Construct assembly, PCR
VvWRKY13-RP	CTCGAGCCTACCAAAAGAAATTATTG	Construct assembly, PCR
VvWRKY13-FP1	GCTCTAGAATGTCTACTACTTCTCAAGCC	PCR
VvWRKY13-RP1	GCTCTAGAATGTCTACTACTTCTCAAGCC	PCR
VvWRKY13-FP	GGTTGCCAACAATCCCT	qRT-PCR
VvWRKY13-RP	GTCATCTCCACCGATACTTC	qRT-PCR
SIE4-FP	GAGGGTTGGAGGAGTAGTGAAG	qRT-PCR
SIE4-RP	CCTGGCGATTTAGAGTGGTC	qRT-PCR
SIE3-FP	CCACCATGTCCTCAGCCAG	qRT-PCR
SIE3-RP	CTTTCACCGAAGAAGCAG	qRT-PCR
SIPG1-FP	TGAGGACCAAATCGGAATC	qRT-PCR
SIPG1-RP	TGTCGGACTAAGAAAGAATAACC	qRT-PCR
SIPG3-FP	ATACAACAGTTTTCAGCAGTTCAAGT	qRT-PCR
SIPG3-RP	GGTTTTCCACTTTCCCTACTAA	qRT-PCR
SlActin-FP	GGAATGGGACAGAAGGAT	qRT-PCR
SlActin-RP	CAGTCAGGAGAACAGGGT	qRT-PCR

### 1.3 数据分析

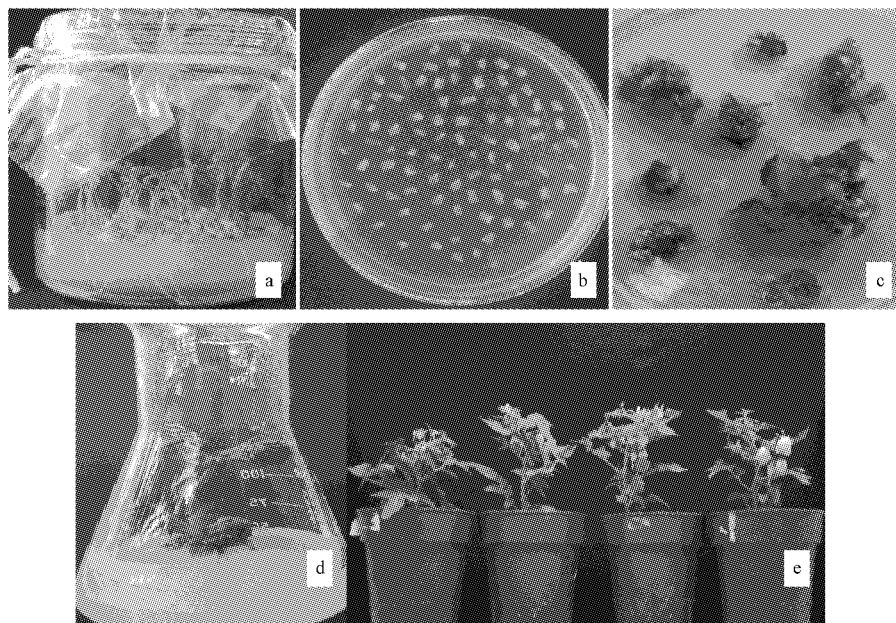
运用 SAS 软件对试验数据进行方差分析和多重比较。所有试验结果均为 3 次或 3 次以上重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 *VvWRKY13* 转基因番茄的获得和鉴定

该研究构建了 pSuper1300-*VvWRKY13* 过表达载体, 并转入农杆菌 EHA105 中。以观赏番

茄品种‘Micro-Tom’为受体材料, 利用叶盘侵染法转化番茄, 并得到了具有潮霉素抗性的芽(图 1)。从发芽的愈伤组织上选取生长状态良好的芽, 切下并移入生根培养基中(图 1)。生根培养 2~3 周后, 提取野生型‘Micro-Tom’和转基因植株叶片的 DNA, 进行 PCR 扩增鉴定(图 2)。之后对鉴定过的转基因植株进行反复自交直至获得至少 3 个独立的纯合的 *VvWRKY13* 过表达转基因株系。

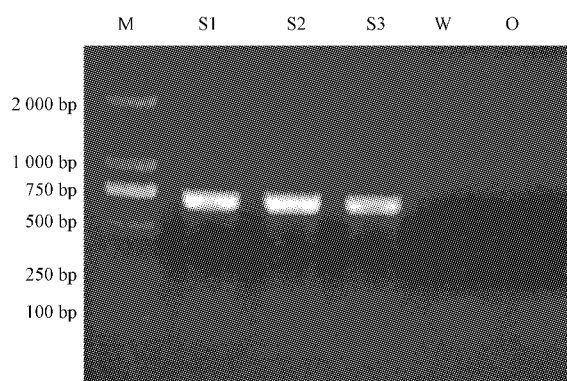


注:a. 番茄幼苗;b. 待侵染子叶;c. 抗性芽;d. 生根的幼苗;e. 转基因植株。

Note:a. Tomato seedlings;b. Cotyledon for infiltration;c. Resistant bud;d. Rooting seedlings;e. Transgenic plants.

图1 叶盘法获得转基因番茄株系

Fig. 1 Genetic transformation of tomato by leaf disc infiltration method



注:M. 标记;S1、S2、S3 分别表示样品 1、样品 2、样品 3;  
W. 野生型对照;O. 阴性对照。

Note:M. Marker; S1. Sample 1; S2. Sample 2; S3. Sample 3; W. Wild type; O. Negative control.

图2 *VvWRKY13* 基因番茄过表达植株 PCR 检测

Fig. 2 Analysis of PCR products of *VvWRKY13* ectopic over-expression plants

由图 3 可知,转基因株系中 *VvWRKY13* 的相对表达量均显著高于野生型,并且在株系间 *VvWRKY13* 的表达量存在差异,因此选择 L3、L9 和 L14 作为后续探究 *VvWRKY13* 功能的异源过表达番茄株系。

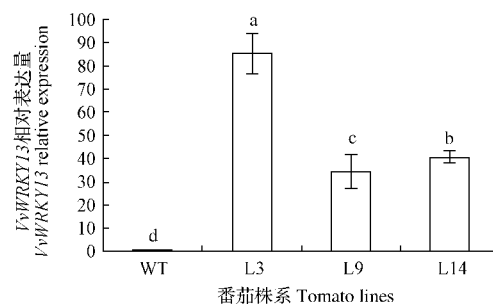


图3 转基因番茄植株 *VvWRKY13* 相对表达量

Fig. 3 qRT-PCR analysis of *VvWRKY13* ectopic over-expression plants

## 2.2 *VvWRKY13* 促进转基因番茄生活周期缩短

### 2.2.1 *VvWRKY13* 促进转基因番茄花期提前

由图 4 可知,*VvWRKY13* 过表达番茄株系在苗期的生长情况同野生型无差异,但是 *VvWRKY13* 过表达番茄株系出现第一朵花的时间比野生型番茄植株显著性提前。从表 2 对出苗至开花时间的统计显示,*VvWRKY13* 过表达番茄株系出现第一朵花的时间早于野生型 4~6 d。由此可知,*VvWRKY13* 具有促进转基因番茄花期提前功能。

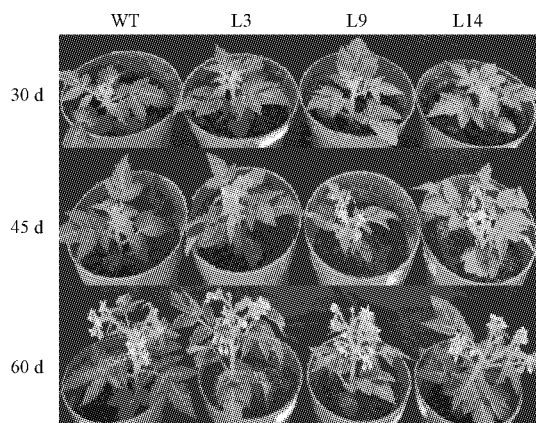


图4  $VvWRKY13$  过表达番茄株系的生长及开花情况  
Fig. 4 Growth and flowering condition of  $VvWRKY13$  over-expression tomato lines

表2  $VvWRKY13$  过表达番茄从出苗至开花时间

Table 2 Period from seedling to flowering of  $VvWRKY13$  over-expression tomato lines

番茄株系 Tomato lines	第一朵开花时间 Time of first flower bloom/d
WT	48.33a $\pm$ 0.58
L3	44.33b $\pm$ 0.58
L9	43.00b $\pm$ 1.73
L14	42.00b $\pm$ 1.73

### 2.2.2 $VvWRKY13$ 促进转基因番茄发育期缩短

观察同时期的野生型和  $VvWRKY13$  过表达番茄株系果实的发育情况,结果如表3所示,  $VvWRKY13$  过表达番茄株系果实的发育期比野生型缩短。野生型番茄从开花到果实成熟需要52.67 d,而  $VvWRKY13$  过表达番茄株系果实仅需46.33~49.33 d。这些结果说明  $VvWRKY13$  参与了果实发育并缩短果实的发育时间。而果实

表3  $VvWRKY13$  过表达番茄株系果实发育的总时间

Table 3 Total growth period of  $VvWRKY13$  over-expression tomato lines

株系 Lines	果实发育时间 Fruits growth period/d
WT	52.67a $\pm$ 1.15
L3	46.33b $\pm$ 1.52
L9	49.33ab $\pm$ 4.00
L14	46.33b $\pm$ 1.52

的发育时间决定着果实的上市时间和市场价格,是衡量经济果树价值的一项重要指标。由此说明  $VvWRKY13$  可以缩短果实发育期来提高果树的市场经济价值。

### 2.3 $VvWRKY13$ 调控转基因番茄株系果实和种子生长

选取大小均匀的野生型和  $VvWRKY13$  过表达番茄株系的果实10个,统计转色10 d后完熟时期果实的质量和含有的种子数目。由图5、6可知,  $VvWRKY13$  过表达番茄株系的果实质量和每个果实中含有的种子数目都显著低于野生型。表明  $VvWRKY13$  不仅影响了果实的发育时间,还调控了果实的质量和种子的数目。

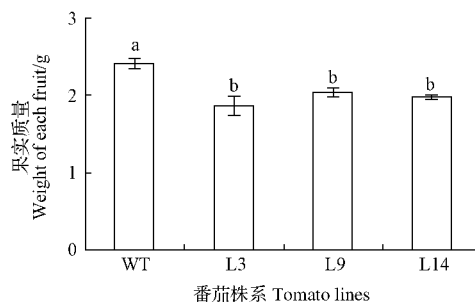


图5  $VvWRKY13$  过表达番茄株系的果实质量变化情况

Fig. 5 Change of fruits weight of  $VvWRKY13$  over-expression tomato lines

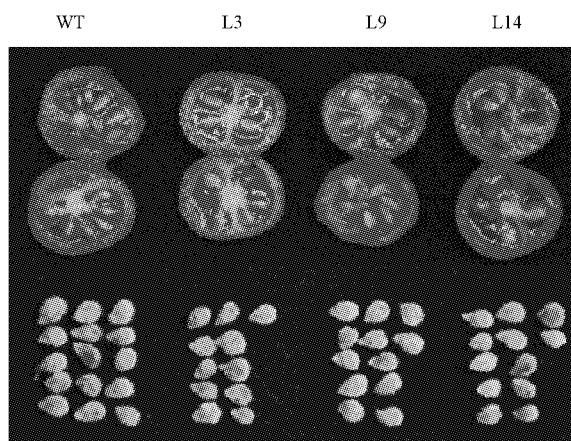


图6  $VvWRKY13$  过表达番茄株系果实种子数量变化

Fig. 6 Number change of seeds in  $VvWRKY13$  over-expression tomato lines

## 2.4 *VvWRKY13* 促进部分成熟相关基因的表达

在番茄果实的发育过程中有一个果实颜色由绿转红的时期,称作转色期。从转色期开始番茄果实的乙烯释放量增加,糖分开始积累,酸度降低,花色苷合成,果皮变软。该研究检测了花后7 d,转色期与转色10 d后的完熟时期果实中成熟相关基因 *SIE4*、*SIE8*、*SIPG1* 和 *SIPG3* 的表达量。结果显示,*SIE4* 在完熟时期,*SIE8* 在转色期与完熟期的表达量在转基因株系中显著高于野生型(图7A、B)。*VvWRKY13* 在番茄果实中对 *SIE8*

的影响较 *SIE4* 明显,而二者均为乙烯诱导基因,进一步说明 *VvWRKY13* 影响了果实发育中乙烯的生成。多聚半乳糖醛酸酶属于果胶酶类,能降解细胞壁中的果胶使细胞壁分解,参与果实的软化,其合成酶基因为 *SIPG*。检测其合成过程发挥主要作用的基因 *SIPG1* 和 *SIPG3* 的表达量发现在野生型和 *VvWRKY13* 过表达番茄株系中表达量无差异,均随果实发育在转色期和成熟期高表达(图7C、D)。

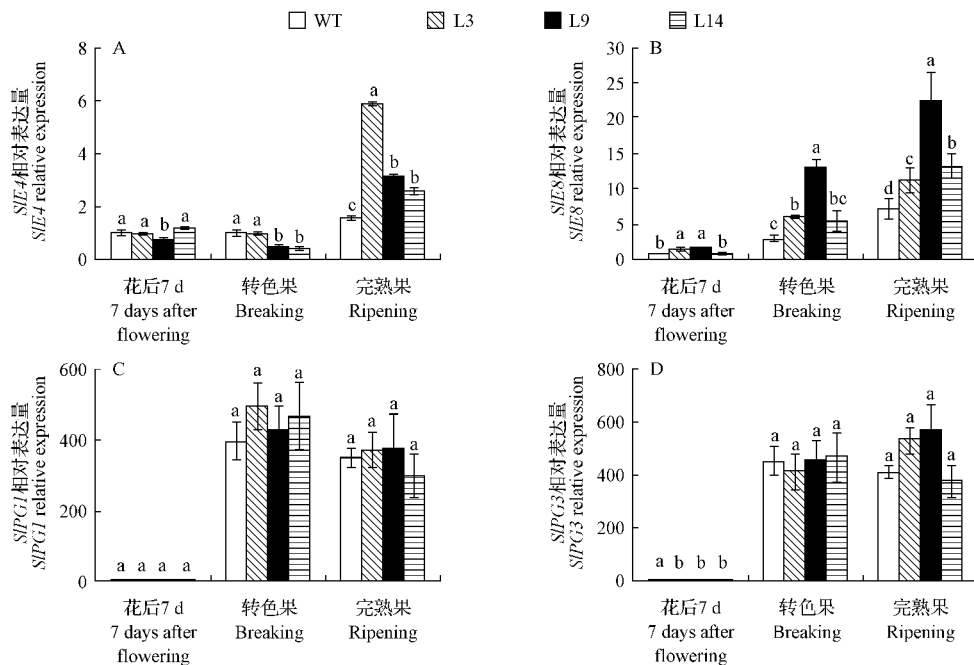


图7 *VvWRKY13* 过表达番茄植株系中成熟相关基因的表达

Fig. 7 Expression of ripening related genes in *VvWRKY13* over-expression tomato lines

## 3 讨论

葡萄作为一种世界性果树,以其多汁味美、营养丰富、用途广泛,深受人们喜爱。葡萄的早熟可以提前占领市场,缓解成熟期相对集中,销售旺季供应过多的情况,提升葡萄的潜在价值,为果农带来经济利益。葡萄的生长发育受转录因子的调控,而葡萄中已克隆的 WRKY 转录因子主要参于葡萄抵御生物胁迫和非生物胁迫<sup>[7-9]</sup>。WRKY 转录因子与葡萄果实发育方面的报道则更是鲜见。DIEGO 等<sup>[14]</sup>通过基因芯片技术和 qRT-PCR 验证,结果显示有些 WRKY 转录因子在果实中特异表

达。WANG 等<sup>[15]</sup>又对葡萄中的所有 WRKY 转录因子做了一个转录组学的分析,发现一部分 WRKY 转录因子,如 *VvWRKY05*、*VvWRKY47*、*VvWRKY41*、*VvWRKY25* 和 *VvWRKY28* 等在葡萄果实转色期前大量表达;还有一部分 WRKY 转录因子,如 *VvWRKY14*、*VvWRKY19* 和 *VvWRKY52* 在葡萄果实的转色期和成熟期大量表达。该研究在前期克隆葡萄 *VvWRKY13* 基因的基础上,对 *VvWRKY13* 转基因番茄株系表型性状和成熟相关基因表达进行了检测。结果发现,*VvWRKY13* 具有促进番茄发育期缩短,果实变小,种子变少,增加部分成熟相关基因表达的功

能。该研究从分子和生理的角度证实了葡萄 *VvWRKY13* 促进转基因番茄果实的早熟,为将来探明葡萄果实早熟的调控机制,提高我国葡萄在国内和国际市场的竞争力提供参考依据和技术支持。

### 参考文献

- [1] YIN X R, ALLAN A C, CHEN K S, et al. Kiwifruit *EIL* and *ERF* genes involved in regulating fruit ripening[J]. *Plant Physiol*, 2010(153):1280-1292.
- [2] QIN G, WANG Y, CAO B, et al. Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening[J]. *Plant J*, 2012(70):243-255.
- [3] DONG T, HU Z, DENG L, et al. A tomato MADS-box transcription factor, SIMADS1, acts as a negative regulator of fruit ripening[J]. *Plant Physiol*, 2013(163):1026-1036.
- [4] MA N, FENG H, MENG X, et al. Overexpression of tomato SINAC1 transcription factor alters fruit pigmentation and softening[J]. *BMC Plant Biol*, 2014(14):351.
- [5] XIAO Y, CHEN J, KUANG J, et al. Banana ethylene response factors are involved in fruit ripening through their interactions with ethylene biosynthesis genes[J]. *J Exp Bot*, 2013(64):2499-2510.
- [6] EULGEM T, RUSHTON P J, SCHMELZER E, et al. Early nuclear events in plant defence signalling: Rapid gene activation by WRKY transcription factors[J]. *EMBO J*, 1999(18):4689-4699.
- [7] MARCHIVE C, MZID R, DELUC L, et al. Isolation and characterization of a *Vitis vinifera* transcription factor, *VvWRKY1*, and its effect on responses to fungal pathogens in transgenic tobacco plants[J]. *J Exp Bot*, 2007(58):1999-2010.
- [8] MZID R, MARCHIVE C, BLANCARD D, et al. Overexpression of *VvWRKY2* in tobacco enhances broad resistance to necrotrophic fungal pathogens[J]. *Physiol Plant*, 2007(131):434-447.
- [9] MERZ P R, MOSER T, HOLL J, et al. The transcription factor *VvWRKY33* is involved in the regulation of grapevine (*Vitis vinifera*) defense against the oomycete pathogen *Plasmopara viticola*[J]. *Physiol Plant*, 2015(153):365-380.
- [10] MCCORMICK S. Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*[M]//Plant Tissue Culture Manual. Springer: Netherlands, 1991:311-319.
- [11] IOVIENO P, NURCATO R, MASSARELLI I, et al. Production of tomato transgenic plants for the functional analysis of the transcription factor *Hsfa2* gene in response to heat stress[J]. *Minerva Biotec*, 2010(22):38-39.
- [12] QIU Z, WANG X, GAO J, et al. The tomato huffman's anthocyaninless gene encodes a bHLH transcription factor involved in anthocyanin biosynthesis that is developmentally regulated and induced by low temperatures[J]. *PLoS One*, 2016(11):e0151067.
- [13] MA Q, DU W, BRANDIZZI F, et al. Differential control of ethylene responses by GREEN-RIPE and GREEN-RIPE LIKE1 provides evidence for distinct ethylene signaling modules in tomato[J]. *Plant Physiol*, 2012(160):1968-1984.
- [14] DIEGO L, PABLO C, JEROME G, et al. Berry flesh and skin ripening features in *Vitis vinifera* as assessed by transcriptional profiling[J]. *PLoS One*, 2012(7):e39547.
- [15] 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.

## *VvWRKY13* Gene of Grape Promotes Fruits Ripening for Transgenic Tomato

MA Qian, ZHANG Suifang, ZHOU Jiaxuan, LIU Xin

(Life Science College, Qingdao Agricultural University/Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract:** The grape cultivar ‘Zuoyouhong’ and tomato cultivar ‘Micro-Tom’ were used as materials, the development period, fruits size, seeds number and the mature related gene expression level in *VvWRKY13* transgenic lines and wild type tomato were researched via mature related phenotypes detection in *VvWRKY13* tomato over expression lines. The results indicated that *VvWRKY13* shortened tomato fruits development period, decreased fruits size and seed number, increased expression of mature related gene expression, but did not change the photosynthetic rate of leaves.

**Keywords:** grape; *VvWRKY13*; developmental period; tomato; transgenic