

葡萄 *COR27* 基因的克隆与抗寒功能研究

范高韬^{1,2}, 孙小明², 任小蝶³, 李绍华², 辛海平^{2*}, 王万军^{1*}

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; 2. 中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室, 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 3. 中国地质大学环境学院, 武汉 430074)

摘要: 冬季低温是制约我国葡萄和葡萄酒产业发展的主要因素之一, 揭示葡萄在冷胁迫下的信号转导通路、挖掘抗寒相关基因并解析其功能, 对高耐寒品种的培育具有重要的理论和应用价值。本研究在欧亚种‘玫瑰香’葡萄 (*Vitis vinifera* L. ‘Muscat Hamburg’) 冷胁迫相关转录组分析的基础上, 鉴定了一个抗寒候选基因, 通过同源性分析将其命名为 *VvCOR27*。*VvCOR27* 基因的 cDNA 序列 (1082 bp) 中, 其开放阅读框 (ORF) 为 909 bp, 编码 302 个氨基酸。同源性分析显示, 13 个物种的 *COR27* 蛋白均具有 3 个特有的保守结构域。定量 RT-PCR 分析表明, *VvCOR27* 在 4℃ 低温处理 24 h 后大量表达。基于基因组序列的启动子基序分析表明, *VvCOR27* 启动子区均只含有 1 个 EE、EEL、G-box、ABREL 元件, 其数量少于 *AtCOR27*, 这可能是 *VvCOR27* 响应冷胁迫较 *AtCOR27* 滞后的原因。对 3 个超表达 *VvCOR27* 转基因拟南芥株系的抗寒性鉴定表明, *VvCOR27* 参与了植株对冷胁迫的应答并作为正调控因子增强了植株对冷胁迫的耐受能力。

关键词: 葡萄; *COR27* 基因; 冷处理; 抗寒性; 转基因拟南芥

中图分类号: Q943.2; S663.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)03-0346-09

Cloning and Functional Analysis of *COR27* from *Vitis vinifera*

FAN Gao-Tao^{1,2}, SUN Xiao-Ming², REN Xiao-Die³, LI Shao-Hua²,
XIN Hai-Ping^{2*}, WANG Wan-Jun^{1*}

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;
2. Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanical Garden,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 3. School of Environmental Studies,
China University of Geosciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: Low winter temperature is one of the main factors that affect the development of grapes and the wine industry in China. Understanding the signal transduction pathway during cold stress will help in the breeding of high cold-resistance cultivars. Based on our previous transcriptome analysis, a gene that showed increased expression pattern in *Vitis vinifera* L. ‘Muscat Hamburg’ during cold treatment was identified and named *VvCOR27* according to homological analysis. The whole length of *VvCOR27* cDNA was 1082 bp, which contained a 909 bp open reading frame (ORF) and encoded 302 amino acids. Homological analysis of *COR27*s from thirteen species showed that they contained three *COR27*-specific conservative domains. Real time RT-PCR indicated that the transcript abundance of *VvCOR27* was highly increased at 24 h after cold treatment. Four motifs, including EE, EEL, G-box and ABREL, were found in the promoter regions (from published *Vitis vinifera* genome sequences) of *VvCOR27* but at less quantity than that in the promoter regions of *AtCOR27*. This may be why *AtCOR27* showed more timely responses to cold treatment than did *VvCOR27*. Phenotypic

收稿日期: 2015-01-20, 退修日期: 2015-02-14。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (31130047); 国家科技支撑计划 (2013BAD02B04)。

作者简介: 范高韬 (1989-), 男, 硕士, 研究方向为葡萄抗逆机理 (E-mail: fangaotao@126.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: xinhaiping215@hotmail.com; wanjunwang@home.swjtu.edu.cn)。

analysis of three overexpression lines under cold treatment indicated that *VvCOR27* was involved in responses to cold stress and enhanced cold tolerance in plants.

Key words: *COR27*; Cold treatment; Cold tolerance; Transgenic *Arabidopsis*

中国葡萄主栽区主要分布在北纬 45° ~ 25° 范围内^[1,2], 冬季低温是影响我国葡萄及葡萄酒产业发展的重要环境因子之一。而目前主栽的欧亚种 (*Vitis vinifera* L.) 和欧美杂交种 (hybrid between *V. vinifera* L. and *V. labrusca* L.) 品种抗寒能力差, 冬季需在植株基部覆土防寒, 否则在温度低于 -15°C 时会发生严重冻害, 严重影响葡萄生产, 甚至会导致树体死亡, 因此提高葡萄的抗寒性是我国葡萄产业中亟待解决的重要课题。选育并推广高抗寒葡萄品种能够大幅度地降低生产成本 (如覆土及去土成本), 提高我国葡萄产业在国内外市场上的竞争力, 对实现我国葡萄产业的可持续发展具有十分重要的意义。

我国于 20 世纪 50 年代开始进行葡萄抗寒育种^[3-5]。山葡萄 (*V. amurensis* Rupr.) 是葡萄属中最抗寒的品种, 可耐受 -40°C ~ -50°C 的极端低温^[6], 因此被广泛作为杂交亲本, 并从山欧杂种中选育出了数个抗寒优良酿酒品种^[2,3]。但由于杂交育种工作量大、周期长、调控植株耐寒性和果实品质性状的基因间存在连锁等原因^[5], 选育的抗寒品种无论在数量上或综合性状上都远远不能满足我国葡萄产业的需求。通过揭示葡萄对冷胁迫的响应机制, 深入挖掘冷胁迫下信号转导通路中的关键基因, 利用转基因技术改良其抗寒性, 在葡萄抗寒育种中具有极大的优势与广阔的应用前景^[7,8]。

植物响应冷信号的机理在模式植物拟南芥中研究最为集中。目前已经确立了以 *CBFs* (CRT/DRE Binding Factors) 转录因子为核心, 以 *HOS1* (High Expression of Osmotically Responsive Genes 1)、*ICE1* (Inducer of CBF Expression) 等基因为 *CBFs* 上游调控信号, 以 *RD29A* (Response to Dehydration 29A)、*COR15A* (Cold-Regulated Gene 15A) 等为 *CBFs* 下游调控信号的基因调控网络^[9]; 同时也发现存在其他调控途径, 并共同在冷驯化过程中起作用^[10]。而葡萄耐寒机制的研究基本上处于起步阶段, Xiao 等^[11,12]分离了河岸葡萄 (*V. riparia*) 和欧亚种葡萄的 *CBF/*

DREB1-like 基因 *CBF1-4*, 发现低温处理后 *CZBF4* 上调表达且能够维持一定的表达水平, 据此推测 *CBF4* 可能和葡萄越冬相关; Li 等^[13,14]从欧亚种葡萄‘玫瑰香’中克隆了 *ICE1* 和 *HOS1* 基因, 并通过拟南芥转基因系统验证了其在冷胁迫响应中的功能; Tillett 等^[8]利用过表达 *VvCBF4* 的葡萄植株, 通过转录组分析对 *VvCBF4* 的下游基因进行了初步鉴定。此外, 由于山葡萄抗寒性极强, 近年来对其耐寒机理的研究也成为了热点^[15], 目前已完成了山葡萄中 *CBFs* 和 *ICE1* 基因的克隆和功能验证^[16-20]。但整体而言, 我们对葡萄冷胁迫下相关基因的功能及响应冷胁迫的信号转导通路了解甚少。

笔者所在课题组分析‘玫瑰香’葡萄 (*V. vinifera* L. ‘Muscat Hanburg’) 的转录组数据时发现了一个在冷处理后期显著上调表达的基因, 通过在 NCBI 数据库中比对发现其序列与 *COR27* (Cold-Regulated Gene 27) 基因具有较高的同源性, 因此将其命名为 *VvCOR27*。*COR27* 为植物中发现的受冷胁迫诱导的小分子量蛋白^[21-22]。Mikkelsen^[21]基于芯片数据的分析结果对 *AtCOR27* (*Arabidopsis thaliana*) 基因的表达模式进行了研究, 发现其在拟南芥中只对冷胁迫有响应; *COR27* 基因启动子区域含有 EE (Evening Element, 序列为 AAAATATCT) 顺式作用元件, 其表达受昼夜节律调控信号的影响。目前还未见 *COR27* 可以增加植物抗寒性的报道。

为深入了解 *VvCOR27* 基因编码区结构特点, 本研究拟从‘玫瑰香’葡萄中克隆其编码序列, 并与已公布的‘黑比诺’葡萄 (PN40024) 基因组注释信息进行比较; 对 *VvCOR27* 可能编码的氨基酸序列进行分析, 并与其他物种中已经报道的 *COR27* 基因序列进行同源比对; 同时收集‘玫瑰香’葡萄 4°C 低温下不同处理时间点的叶片, 检测 *VvCOR27* 在表达水平上对冷胁迫的响应; 利用 *VvCOR27* 编码区核苷酸序列构建 35S 启动子驱动的过表达载体转化拟南芥, 并对阳性植株的抗寒能力进行评

估, 以验证 *VvCOR27* 基因在葡萄响应冷胁迫中的作用, 同时也为揭示葡萄响应冷胁迫的信号通路提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

‘玫瑰香’葡萄为中国科学院武汉植物园园艺作物生物学课题组保存的组培苗, 其培养基为 1/2 B5 培养基 + 30 g/L 蔗糖, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 培养温度为 26°C 。培养 30 d 后以茎段作为外植体继代一次。

转化材料拟南芥为 Columbia-0 野生型。将拟南芥种子置于 4°C 冰箱中 2 ~ 3 d 完成春化处理, 然后播种在装有泥炭土的塑料盆中(口径 10 cm), 25°C 条件下暗培养 2 d 后再置于湿度为 40% ~ 60% 的人工气候室中培养(16 h 光照/8 h 黑暗)。

1.2 实验方法

1.2.1 低温处理

将‘玫瑰香’葡萄组培苗(具有 5 片展开的功能叶)放入光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗、光强为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的 4°C 低温光照培养箱中进行冷处理, 并在 0、2、4、8、24、48 h 时收集植株顶芽及第一片展开叶(每一处理时间点取 3 个重复样品), 液氮速冻后 -70°C 超低温冰箱保存、备用。

1.2.2 总 RNA 提取和 cDNA 合成

分别取冷处理 0、2、4、8、24、48 h 时的‘玫瑰香’葡萄样品, 用北京天恩泽柱式植物总 RNAOUT 2.0 试剂盒分别提取每一处理时间点 3 个样品的总 RNA; 采用 RQ1 Rnase-free Dnase I

(Promega, USA) 去除基因组 DNA 后, 再用 SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) 将 RNA 反转录成 cDNA。

1.2.3 *VvCOR27* 基因的克隆

以‘玫瑰香’葡萄转录组数据库中得到的 *VvCOR27* 序列片段为基础, 结合已公布的‘黑比诺’葡萄基因组注释信息, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计扩增 *VvCOR27* 编码区全长的引物 (*VvCOR27F*-Sac I 和 *VvCOR27R*-Kpn I, 表 1)。引物由武汉擎科创新生物科技有限公司合成(下同)。以冷处理 24 h 时的‘玫瑰香’葡萄 cDNA 为模版进行编码区扩增; 利用 TIANGel Midi Purification kit DP209 试剂盒对得到的 PCR 扩增产物进行割胶回收; 将回收产物连接到 pGEM-T-easy 载体上并利用 T7 和 SP6 引物进行测序。

1.2.4 生物信息学分析

利用 ORF finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 预测 *VvCOR27* 的编码区序列(开放阅读框)。使用 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>) 对蛋白质的基本理化性质进行分析。在 NCBI 数据库中利用 blastp 搜索 *VvCOR27* 的同源蛋白后, 使用 MEME 软件 (<http://meme.nbcr.net/meme/>) 对其氨基酸序列进行相似性比对和保守结构域预测; 并采用 MEGA 5.1 软件对不同物种中 *COR27* 蛋白进行系统发育分析。基于葡萄基因组数据库的序列信息, 利用 PlantCare 在线分析 *VvCOR27* 基因的启动子区域顺式作用元件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)。

表 1 *VvCOR27* 基因序列及定量 RT-PCR 扩增引物

Table 1 Primers used in *VvCOR27* sequence amplification and real-time RT-PCR analysis

引物 Primers	序列 Sequence(5' - 3')	产物长度 (bp) Length of products
<i>VvCOR27F</i> -Sac I	GAGCTCATGGCCGAGAATCTTCGTC	921
<i>VvCOR27R</i> -Kpn I	GGTACCAAGGAATTCAGCTCTCATCAAAC	
<i>VvCOR27F</i> -RT	GAGGGTTGTGGGAGTGCG	139
<i>VvCOR27R</i> -RT	AACTGTGCTTCTCATCTGTCCAT	
<i>VvActin</i> -F	CTTGCATCCCTCAGCACCTT	63
<i>VvActin</i> -R	TCCTGTGGACAATGGATGGA	
<i>AtACT2</i> -F	TTACCCGATGGGCAAGTCA	75
<i>AtACT2</i> -R	AAACGAGGGCTGGAACAAGA	
<i>hptII</i> -F	CTTCTGCGGGCGATTTGT	213
<i>hptII</i> -R	GCCGTGGTTGGCTTGATG	

1.2.5 定量 RT-PCR 分析

依据克隆得到的 *VvCOR27* 基因序列信息设计定量 RT-PCR 引物 (*VvCOR27* F-RT 和 *VvCOR27* R-RT, 表 1)。以 *VvActin* 基因 (引物为 *VvActin*-F 和 *VvActin*-R, 表 1) 为内参, 参照 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 试剂盒说明书, 运用 ABI StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪检测 *VvCOR27* 基因在‘玫瑰香’葡萄分别冷处理 0、2、4、8、24、48 h 时的表达水平。

1.2.6 超表达 *VvCOR27* 转基因拟南芥的获得

利用扩增基因片段的 PCR 引物 (*VvCOR27* F-Sac I 和 *VvCOR27* R-Kpn I, 表 1) 上的酶切位点 (Sac I 和 Kpn I), 将 *VvCOR27* 编码区序列连接到 pCambia1301s 载体中, 构建超表达载体 pCambia1301s::*VvCOR27*; 采用电击法将质粒转化到农杆菌菌株 GV3101 中, 再用浸花法将超表达载体导入拟南芥中; 收取 T_0 代种子, 播种后利用潮霉素筛选出 T_1 代转基因拟南芥株系。提取野生型和 3 个超表达 *VvCOR27* 转基因拟南芥株系的基因组 DNA, 利用 PCR 扩增 *VvCOR27* (引物为 *VvCOR27* F-Sac I 和 *VvCOR27* R-Kpn I, 表 1) 和潮霉素基因 (引物为 *hpt II*-F 和 *hpt II*-R, 表 1), 则潮霉素基因和 *VvCOR27* 基因扩增均为阳性的植株是成功转化植株。当阳性植株成熟后收取 T_2 代种子, 继续播种、筛选获得 T_3 代转基因株系纯合植株。

提取野生型和 3 个超表达 *VvCOR27* 转基因拟南芥株系新鲜叶片的总 RNA, 用 SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) 将其反转录成 cDNA (方法同 1.2.2) 后, 以 *Actin* 基因为内参进行 RT-PCR 扩增 (引物为 *VvCOR27* F-RT 和 *VvCOR27* R-RT, 表 1), 检测 T_3 转基因拟南芥株系中 *VvCOR27* 基因的表达水平。

1.2.7 转基因拟南芥植株的抗寒表型鉴定

将野生型和 3 个超表达 *VvCOR27* 转基因拟南芥株系的 T_3 种子置于 4℃ 春化 2 d 后, 播种在装有泥炭土的塑料盆 (口径 10 cm) 中, 每盆留苗 7 株; 21 d 后将拟南芥植株置于低温光照培养箱中进行梯度冷处理, 即: -1℃ 8 h、-3℃ 3 h、-5℃ 3 h、-7℃ 3 h、-9℃ 2 h; 然后将拟南芥植株置于 4℃

低温条件下避光放置 8 h, 再移至温室观察其生长情况, 并统计存活率。

2 结果与分析

2.1 *VvCOR27* 的 cDNA 克隆及同源比对分析

根据‘玫瑰香’葡萄转录组测序得到的 *COR27* 序列片段设计特异引物, 通过同源克隆扩增出该基因全长。其序列与‘黑比诺’葡萄基因组上编号为 *GSVIVT01031734001* 的编码区序列完全一致; 再通过 NCBI 数据库中利用 blastp 进行同源比对, 发现其蛋白序列与 *TcCOR27* (XP_007042434.1) 基因具有 40% 的一致性, 故命名为 *VvCOR27*。该基因的 cDNA 序列全长为 1082 bp, 其开放阅读框 (ORF, 图 1) 为 909 bp, 编码 302 个氨基酸。通过对 *GSVIVT01031734001* 的 DNA 序列分析发现, *VvCOR27* 由 5 个外显子 (exon) 和 4 个内含子 (intron) 构成 (图 1), 其中第 1 个内含子的序列最长,

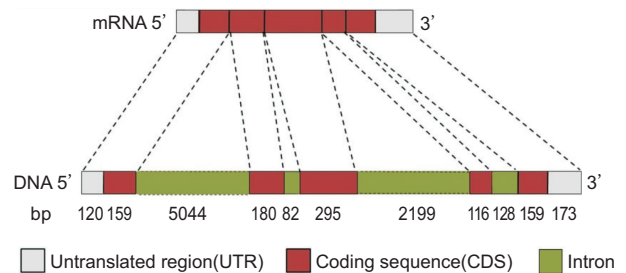


图 1 *VvCOR27* 基因结构

Fig. 1 Gene structure of *VvCOR27*

为 5044 bp。ProtParam 分析结果显示, *VvCOR27* 编码的蛋白质分子量为 33 kD, 理论 pI 为 6.8; 氨基酸组成上以丝氨酸 (Ser) 含量为最高, 达 14.2%, 其次为亮氨酸 (Leu) 和丙氨酸 (Ala), 分别为 8.3% 和 7.0%; 不稳定系数 (instability index, II) 为 52.24, 表明其稳定性较差; 平均疏水性系数 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.747, 表明其为亲水性蛋白。对 *VvCOR27* 的氨基酸序列进行的亚细胞定位分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 表明, 未发现定位到细胞器的功能元件。

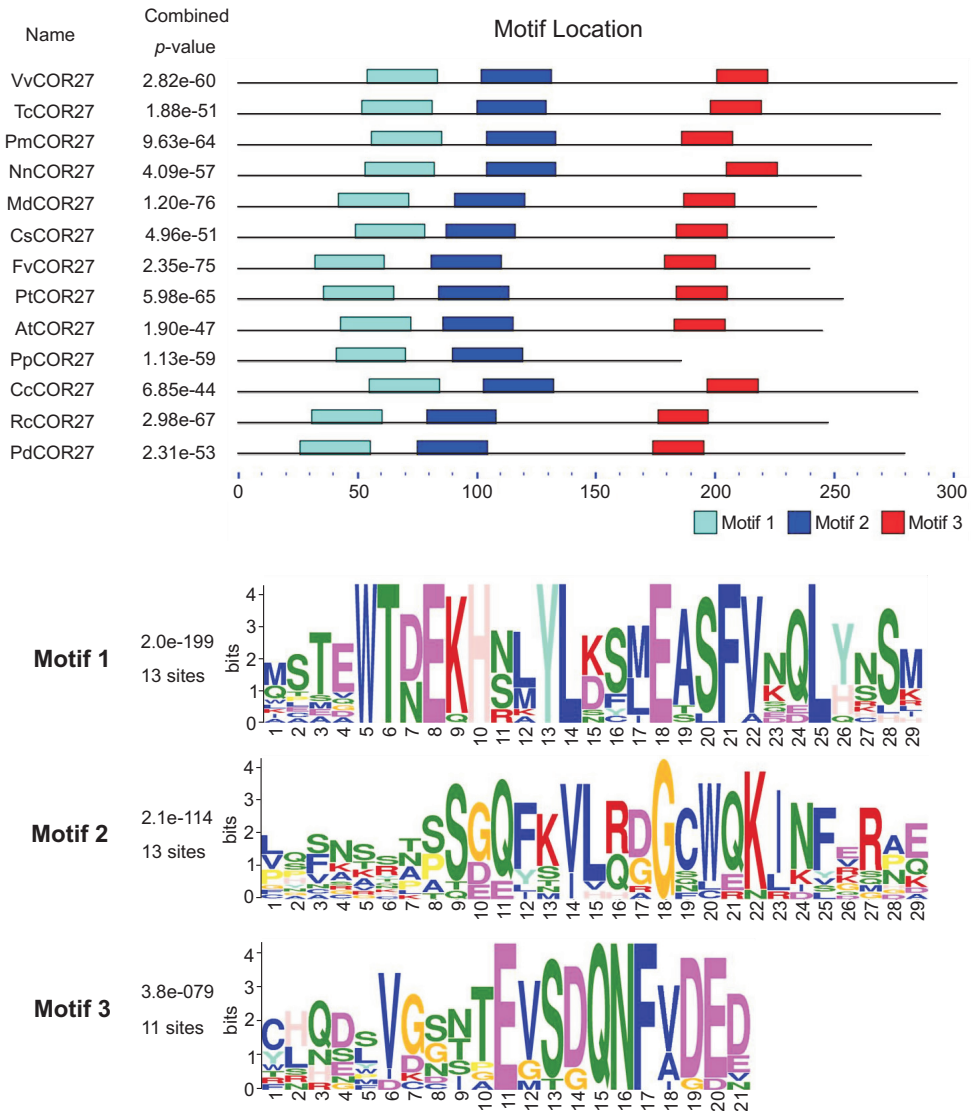
利用推测的 *VvCOR27* 氨基酸序列在 NCBI 数据库中进行 blastp 搜索, 并从其序列比对结果中挑选相似性较高的 12 条 *COR27* 蛋白序列, 进一

步与 VvCOR27 进行同源比对和保守结构域分析 (图 2)。结果显示, 13 条 COR27 蛋白共有 3 个结构域, 其中第 1、2 个结构域存在于所有分析成员中, 而第 3 个结构域在 PpCOR27 中缺失; 这 3 个保守的结构域可能与 COR27 的功能密切相关。利用 MEGA 5.1 软件对 13 条 COR27 蛋白序列进行系统发育分析, 发现 COR27 蛋白可被分为 2 大类 (图 3), 其中 PmCOR27、VvCOR27、CsCOR27、

CcCOR27 和 TcCOR27 聚为一枝, 其余 COR27 蛋白聚为一枝; VvCOR27 与梅的 PmCOR27 (*Prunus mume*) 同源性最高。

2.2 冷处理下 VvCOR27 基因的表达分析

‘玫瑰香’葡萄 VvCOR27 基因在 4℃ 低温下不同冷处理时间点的定量 RT-PCR 分析 (图 4) 表明, 冷处理早期 (0 ~ 8 h), VvCOR27 基因的表达量并没有发生明显变化; 至冷处理 24 h 和 48 h 时, 其



TcCOR27: *Theobroma cacao* (GenBank accession No.: XP_007042434); PmCOR27: *Prunus mume* (XP_008236586); NnCOR27: *Nelumbo nucifera* (XP_010269865); MdCOR27: *Malus domestica* (XP_008378045); CsCOR27: *Citrus sinensis* (XP_006487109); FvCOR27: *Fragaria vesca* subsp. *vesca* (XP_004291104); PtCOR27: *Populus trichocarpa* (XP_006374936); AtCOR27: *Arabidopsis thaliana* (NP_851121); PpCOR27: *Prunus persica* (XP_007227547); CcCOR27: *Coffea canephora* (CDO97180); RcCOR27: *Ricinus communis* (XP_002510212); PdCOR27: *Phoenix dactylifera* (XP_008805274). Same below.

图 2 不同植物 COR27 蛋白氨基酸序列的保守结构域分析

Fig. 2 Conserved domain analysis of COR27 amino acid sequences from thirteen plant species

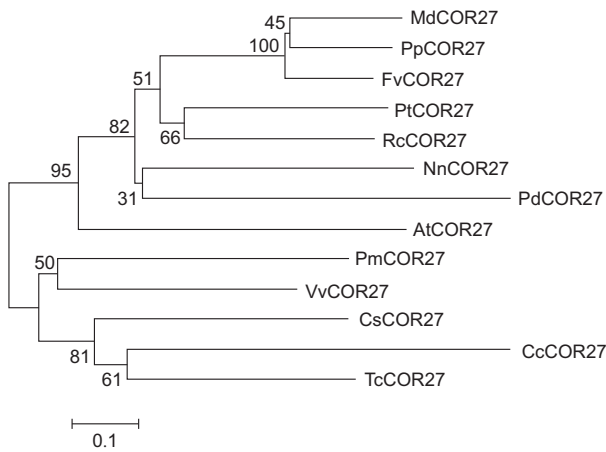


图3 不同植物COR27 NJ进化树分析
Fig. 3 Neighbor-joining phylogenetic tree of COR27 from thirteen plant species

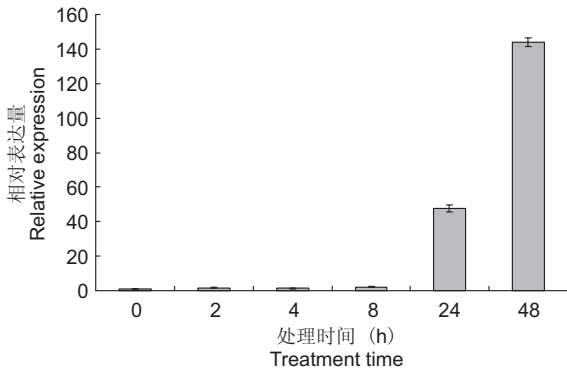


图4 qRT-PCR分析低温诱导下VvCOR27的表达
Fig. 4 qRT-PCR analysis of the expression of VvCOR27 under cold treatment

相对表达量分别上调约50倍和140倍，说明VvCOR27能够响应冷胁迫，且其表达受到其他冷胁迫相关基因的诱导，即在冷处理后期才开始大量表达。

2.3 VvCOR27启动子调控元件分析

基于VvCOR27在冷胁迫(4℃低温)下的表达量变化，和‘黑比诺’葡萄基因组上GSVIVT010317

34001序列翻译起始位点ATG前面的一段1200 bp序列，并结合AtCOR27(At5g42900)的启动子序列分析结果^[21]，我们对VvCOR27的启动子序列进行了分析(图5)。就EE、EEL(Evening Element-like)、G-box和ABREL(ABA Response Element-like)4种基序而言，AtCOR27和VvCOR27的启动子序列间存在明显差异。AtCOR27启动子区含有2个EE、2个EEL和2个G-box元件，而VvCOR27启动子区均只含有一个EE、EEL和G-box元件；与AtCOR27启动子序列相比，VvCOR27启动子区EEL元件的位置更靠近翻译起始位点。AtCOR27和VvCOR27在启动子区的序列差别可能是其响应冷胁迫表达模式不同的原因，其中拟南芥AtCOR27对冷胁迫的响应较早，4℃低温处理1h时其表达量迅速上调并随处理时间的延长而持续增加^[21]。

2.4 超表达VvCOR27转基因拟南芥株系的抗寒性鉴定

为了进一步验证VvCOR27的基因功能，我们构建了35S启动子驱动的VvCOR27超表达载体，并采用浸花法将其导入拟南芥；以野生型和T₁代转基因拟南芥株系的基因组DNA为模版分别对VvCOR27和潮霉素抗性基因进行扩增(图6: A, B)，结果表明所选择的3个株系(图6: Line 1~3)均含有转基因序列。以拟南芥ACT2为内参基因，对Line 1~3的T₃代植株VvCOR27基因表达水平的RT-PCR分析表明(图6: C, D)，VvCOR27在3个株系的T₃代植株中表达正常。

将野生型和T₃代转基因拟南芥株系Line 1~3的纯合植株进行梯度低温处理并统计存活率(图7)，发现野生型拟南芥叶片均出现水渍状伤害，而超表达VvCOR27转基因拟南芥株系受伤害程度小于野生型；结束低温胁迫恢复正常生长后，野生

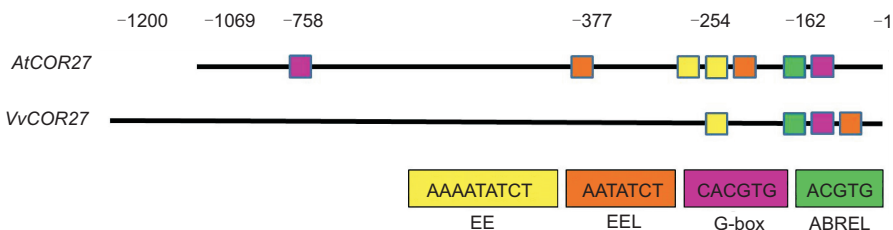
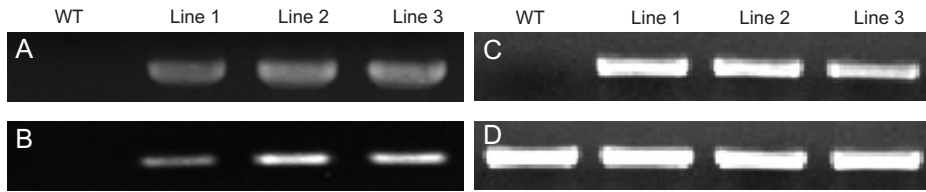


图5 AtCOR27和VvCOR27启动子区的基序比较分析
Fig. 5 Comparison of the motifs in the promoter region of AtCOR27 and VvCOR27

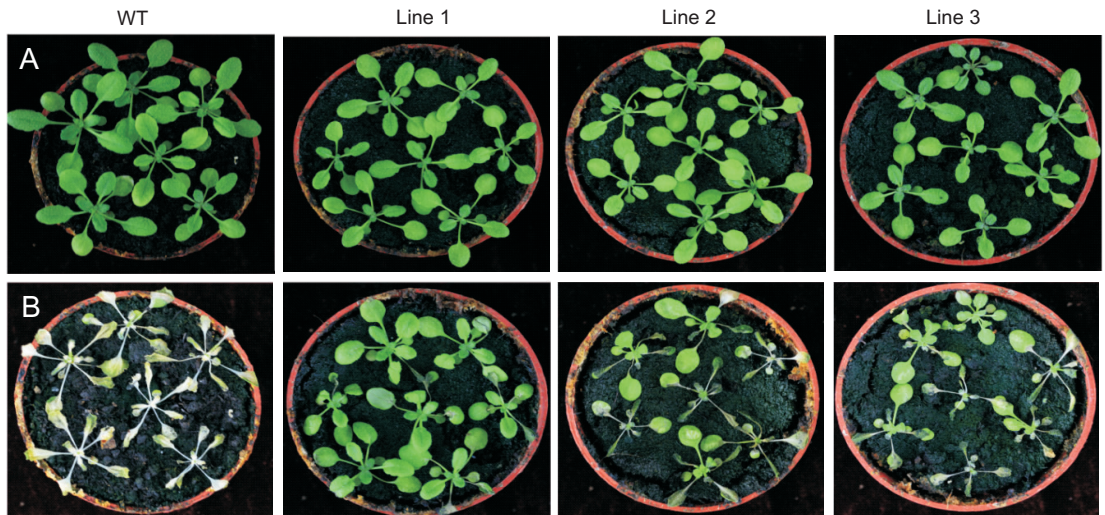


WT: 野生型拟南芥; Line 1~3: 超表达 *VvCOR27* 转基因拟南芥株系。A: *VvCOR27* 插入片段在野生型和 T_1 代转基因拟南芥株系 DNA 中的扩增; B: 潮霉素 B 抗性基因 *hpt II* 在野生型和 T_1 代转基因拟南芥株系 DNA 中的扩增; C: *VvCOR27* 在野生型和 T_3 代转基因拟南芥株系中的表达水平检测; D: 拟南芥 *ACT2* 作为内参基因。

WT: Wild *Arabidopsis* type; Line 1 - 3: Over-expressed *VvCOR27* transgenic *Arabidopsis* plant. A: Amplification of *VvCOR27* in wild *Arabidopsis* type and over-expressed transgenic *Arabidopsis* plant; B: Amplification of hygromycin B resistant *hpt II* gene in wild *Arabidopsis* type and over-expressed transgenic *Arabidopsis* plant; C: Expression of *VvCOR27* in wild *Arabidopsis* type and over-expressed transgenic *Arabidopsis* T_3 plant; D: *ACT2* in *Arabidopsis* was used as an internal control.

图 6 超表达 *VvCOR27* 拟南芥株系的 PCR 扩增鉴定及转基因表达检测

Fig. 6 Validation of insert and expression for *VvCOR27* in transgenic *Arabidopsis* plant



A: 对照; B: 冷处理; C: 成活率。
A: CK; B: Cold treatment; C: Survival rate.

图 7 转基因拟南芥植株的抗寒性鉴定

Fig. 7 Cold tolerance identification of transgenic *Arabidopsis* plants

型拟南芥的存活率为 43.88%，而超表达 *VvCOR27* 转基因拟南芥株系 (Line 1~3) 的存活率显著高于野生型，分别为 79.55%、82.86% 和 78.25%

(图 7: C)。这说明超表达 *VvCOR27* 增强了拟南芥的抗寒能力，即 *VvCOR27* 参与了植株对冷胁迫的应答并作为正调控因子增强了植株对冷胁迫的耐

受能力。

3 讨论

植物对低温的响应是一个复杂的过程,包括低温感受和早期信号转导、基因表达水平变化、蛋白质修饰和代谢、初生和次生代谢产物的变化、植物细胞结构的改变等^[9,10]。从目前报道的拟南芥转录组水平的分析来看,冷胁迫下至少有上千种基因的表达水平发生了变化,并且其表达谱随着冷处理时间的延长而持续变化^[22]。葡萄响应冷胁迫的转录组数据分析也得到了类似的结果^[23,24],但这些基因是如何参与植物响应冷胁迫的过程我们仍知之甚少,因此冷胁迫相关基因的克隆和功能分析对解析植物应对低温的反应机制具有重要作用。

COR27 基因是根据其蛋白质分子量及对冷胁迫的响应而命名的^[21]。本实验克隆的 VvCOR27 基因编码 302 个氨基酸,其蛋白预测分子量(33 kD)大于 AtCOR27,但它和已报道或者推测的 COR27 基因成员具有相同的保守结构域(图 2)。在这 3 个保守结构域序列在 NCBI 等数据库中进行的检索结果中,未找到相关的注释,我们初步预测这 3 个保守结构域和 COR27 的功能密切相关,但需进一步的实验来验证。启动子区域顺式作用元件的分析结果表明, VvCOR27 与 AtCOR27 启动子序列之间存在部分共线性关系(图 5);与 AtCOR27 启动子序列相比, VvCOR27 启动子区均只含有一个 EE、EEL 和 G-box 元件,且其 EEL 元件的位置更靠近翻译起始位点,两者在启动子区的序列差别可能是拟南芥和葡萄对冷胁迫响应速度不同的原因。作为植物低温响应过程中重要的转录因子, CBF 通过结合下游基因启动子 CRT/DRE 作用元件来调控其表达水平^[9,10]。而对 VvCOR27 启动子区域调控元件的分析发现,其启动子区不存在 CBF 基因可以结合的 CRT/DRE 作用元件,表明 VvCOR27 在冷胁迫下的表达不受 CBF 基因的直接调控。此外,对 VvCOR27 启动子区域反式作用因子的鉴定和顺式作用元件的缺失、增加以及相应的转录活性测定,有助于解释其在冷胁迫下的基因表达模式成因。

‘玫瑰香’属于欧亚种葡萄,果实香味浓郁,

可鲜食、制汁和酿酒,但其枝条和休眠芽在冬季温度低于-15℃时将会发生严重冻害。山葡萄是葡萄属中最抗寒的品种,可抵御冬季-40℃低温而不影响翌年的丰产^[1-6],因此研究山葡萄的高抗寒性机理将进一步定向改良优质、低抗寒性的欧亚种葡萄提供重要理论依据。作为响应冷胁迫且能够增加植株抗寒性的 VvCOR27 基因,在山葡萄中的编码序列特征和表达模式还未见报道,故克隆山葡萄的 COR27 基因并检测其在冷胁迫下的响应模式,比较其编码区和启动子区与 VvCOR27 之间的序列差别,也将为揭示山葡萄的高抗寒机理提供支持。

参考文献:

- [1] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] 孔庆山. 中国葡萄志[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2004.
- [3] 宋润刚, 路文鹏, 王军, 沈育杰, 林兴桂, 葛玉香, 李晓红, 孙克娟. 山葡萄品种选育回顾与展望[J]. 北方园艺, 1999, 129: 36-38.
- [4] 林兴桂. 我国酿酒葡萄抗寒育种的回顾与展望[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 89-93.
- [5] 刘军, 王小伟, 魏钦平, 鲁韧强, 高照全. 世界葡萄抗寒育种的成就与展望[J]. 果树学报, 2004, 21(5): 461-466.
- [6] 贺普超, 牛立新. 我国葡萄属野生种抗寒性的研究[J]. 园艺学报, 1989, 11(1): 81-88.
- [7] Jin WM, Dong J, Hu YL, Lin ZP, Xu XF, Han ZH. Improved cold-resistant performance in transgenic grape (*Vitis vinifera* L.) overexpressing cold-inducible transcription factors *AtDREB1b*[J]. *Hortscience*, 2009, 44(1): 35-39.
- [8] Tillett LR, Wheatley MD, Tattersall EAR, Schlauch KA, Cramer GR, Cushman JC. The *Vitis vinifera* C-repeat binding protein 4 (*WCBF4*) transcriptional factor enhances freezing tolerance in wine grape[J]. *Plant Biotechnology J*, 2012, 10(1): 105-124.
- [9] Zhang JZ, Creelman RA, Zhu JK. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops[J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(2): 615-621.
- [10] Zhou MQ, Shen C, Wu LH, Tang KX, Lin J. CBF-

- dependent signaling pathway: a key responder to low temperature stress in plants[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2011, 31(2): 186–92.
- [11] Xiao H, Siddiqua M, Braybrook S, Nassuth A. Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature, drought and abscisic acid[J]. *Plant Cell Environ*, 2006, 29(7): 1410–1421.
- [12] Xiao H, Tattersall EA, Siddiqua MK, Cramer GR, Nassuth A. *CBF4* is a unique member of the *CBF* transcription factor family of *Vitis vinifera* and *Vitis riparia*[J]. *Plant Cell Environ*, 2008, 31(1): 1–10.
- [13] Li JT, Wang LN, Zhu W, Wang N, Xin HP, Li SH. Characterization of two *VvICE1* genes isolated from ‘Muscat Hamburg’ grapevine and their effect on the tolerance to abiotic stresses[J]. *Sci Hortic*, 2014a, 165(22): 266–273.
- [14] Li JT, Wang N, Wang LN, Xin HP, Li SH. Molecular cloning and characterization of the *HOS1* gene from ‘Muscat Hamburg’ grapevine[J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 2014b, 139(1): 54–62.
- [15] Liu LY, Li H. Research progress in amur grape, *Vitis amurensis* Rupr. [J]. *Can J Plant Sci*, 2013, 93(4): 565–575.
- [16] Dong C, Tao JM, Zhang M, Qin Y, Yu ZY, Wang BL, Cai BH, Zhang Z. Isolation and expression characterization of *CBF2* in *Vitis amurensis* with stress[J]. *Agr Sci*, 2013a, 4(9): 466–472.
- [17] Dong C, Zhang M, Yu ZY, Ren JP, Qin Y, Wang BL, Xiao LZ, Zhang Z, Tao JM. Isolation and expression analysis of *CBF4* from *Vitis amurensis* associated with stress[J]. *Agr Sci*, 2013b, 4(5): 224–229.
- [18] Dong C, Zhang Z, Qin Y, Ren JP, Huang JF, Wang BL, Lu HL, Cai BH, Tao JM. *VaCBF1* from *Vitis amurensis* associated with cold acclimation and cold tolerance[J]. *Acta Physiol Plant*, 2013c, 35(10): 2975–2984.
- [19] Dong C, Zhang Z, Ren JP, Qin Y, Huang JF, Wang Y, Cai BH, Wang BL, Tao JM. Stress-responsive gene *ICE1* from *Vitis amurensis* increases cold tolerance in tobacco[J]. *Plant Physiol Bioch*, 2013d, 71(2013): 212–217.
- [20] Li JT, Wang N, Xin HP, Li SH. Overexpression of *VaCBF4*, a transcription factor from *Vitis amurensis*, improves cold tolerance accompanying increased resistance to drought and salinity in *Arabidopsis*[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2013, 31(6): 1518–1528.
- [21] Mikkelsen MD, Thomashow MF. A role for circadian evening elements in cold-regulated gene expression in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2009, 60(2): 328–339.
- [22] Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weini S, Batistic O, D’Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses[J]. *Plant J*, 2007, 50(2): 347–363.
- [23] Xin HP, Zhu W, Wang LN, Xiang Y, Fang LC, Li JT, Sun XM, Wang N, Londo J, Li SH. Genome wide transcriptional profile analysis of *Vitis amurensis* and *V. vinifera* in response to cold stress[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58740.
- [24] Xu W, Li R, Zhang N, Ma F, Jiao Y, Wang Z. Transcriptome profiling of *Vitis amurensis*, an extremely cold-tolerant Chinese wild *Vitis* species, reveals candidate genes and events that potentially connected to cold stress[J]. *Plant Mol Biol*, 2014, 86(4–5): 527–541.