葡萄 *VvSUC27* 基因的克隆及病原响应表达分析

吴佳鸿， 黄金宝， 刘 梅， 彭军波， 乔广行， 邢启凯*

（北京市农林科学院植物保护环境保护研究所，北方果树病虫害绿色防控北京市重点实验室，北京 100097）

摘要 由葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae 真菌引起的葡萄溃疡病(Botryosphaeria dieback)是葡萄上的主要枝干病害之一，严重影响葡萄产业的健康发展。其中，致病力最强的为可可毛色二孢 *Lasiodiplodia theobromae*。糖转运蛋白在调节植物对病原菌的免疫过程中起着至关重要的作用，关于葡萄中糖转运蛋白参与植物免疫机制的研究尚未见报道。本试验从‘无核白’葡萄叶片中克隆得到蔗糖转运蛋白 *VvSUC27* 基因，其开放阅读框全长 1 515 bp，预测蛋白质分子量为 54 kD，理论等电点(pI)为 9.58。生物信息学预测该蛋白含有 12 个跨膜结构。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析表明：氨基环丙烷羧酸和脱落酸处理后 *VvSUC27* 的表达水平持续上调；水杨酸和茉莉酸甲酯处理后，*VvSUC27* 的表达呈现上调表现但无规律的变化特征；激发子 chitin 和 flg22 处理后，*VvSUC27* 基因信号响应快速且明显；感病品种‘夏黑’接种可可毛色二孢后，*VvSUC27* 被迅速诱导，3 h 时表达量达到最高，而后逐渐减弱。本研究将为今后阐明可可毛色二孢与葡萄互作的分子机制提供参考依据。

关键词 葡萄溃疡病； 可可毛色二孢； 蔗糖转运蛋白基因； 基因克隆； 表达分析

中图分类号： S 663.1 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2020165

Gene cloning and pathogenic response expression analysis of *VvSUC27* in grapevine

WU Jiahong， HUANG Jinbao， LIU Mei， PENG Junbo， QIAO Guanghang， XING Qikai*

(*Beijing Key Laboratory of Environment-Friendly Management of Fruit Diseases and Pests in North China*, *Institute of Plant and Environmental Protection*, *Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences*, *Beijing* 100097, *China*)

Abstract Botryosphaeria dieback seriously affects the healthy development of the grape industry, which is one of the main stem diseases on grapevines caused by Botryosphaeriaceae. *Lasiodiplodia theobromae* is the most pathogenic among them in China. Sugar transporters play a vital role in regulating plant immunity to the pathogens. However, the role of sugar transporters in the immune mechanisms of grapes has not been studied. In this study, the sucrose transporter *VvSUC27* gene was cloned from the cDNAs of grapevine leaves, with an open reading frame length of 1 515 bp. The predicted molecular weight of the protein was 54 kD and the theoretical isoelectric point (pI) was 9.58. Besides, the protein contained 12 transmembrane structures. Real-time quantitative PCR analysis was conducted in different treatments. The results showed that the expression level of *VvSUC27* was continuously up-regulated after treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and abscisic acid (ABA). After treated with salicylic acid (SA) and methyl jasmonate (MeJA), *VvSUC27* showed an up-regulation without regular changes. The response of *VvSUC27* gene signal was rapid and obvious after chitin or flg22 treatment. In addition, the gene in the susceptible cultivar ‘summer black’ was rapidly induced by inoculation with *L. theobromae*, and the expression level reached the highest 3 h after inoculation and then gradually weakened. This study provided a reference for elucidating the molecular mechanism of the interaction between *L. theobromae* and grapevine.

Key words Botryosphaeria dieback； *Lasiodiplodia theobromae*； sucrose transporter gene； gene cloning； expression analysis

收稿日期： 2020－04－01 **修订日期：** 2020－07－05

基金项目： 国家自然科学基金(31801686)；北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX20190406)；北京市农林科学院青年科研基金(QNJJ201904)

* 通信作者 E-mail：qikaixing@163.com

葡萄 *Vitis vinifera* 集鲜食与加工于一身，是全球广泛栽培的重要经济果树之一[1]。葡萄枝干病害(grapevine trunk diseases，GTDs)是由多种病原真菌引起的危害葡萄枝干的病害统称[2]。由葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae 真菌引起的葡萄溃疡病(Botryosphaeria dieback)是葡萄主产区最常见的枝干病害之一，病原菌主要通过伤口或自然孔口侵入，导致树干变色坏死、果实枯萎腐烂，严重的整株植株枯死[3-7]。近年来该病引起我国浙江、江苏、广西、湖南、河北等地葡萄减产 30%～50%。在我国葡萄产区，本研究团队对引起葡萄溃疡病的真菌进行了形态观察及分子鉴定，发现了包括葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*[8]、*Diplodia seriata*[9]、可可毛色二孢 *Lasiodiplodia theobromae*[10]、小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum*[11]、*Lasiodiplodia pseudotheobromae*[12] 和 *Neofusicoccum mangiferae*[13] 在内的 6 种葡萄座腔菌科真菌。其中，*L. theobromae* 和 *B. dothidea* 是主要优势种群，*L. theobromae* 是致病力最强的一种[5, 11]。葡萄溃疡病已成为我国葡萄健康发展的重大障碍，但目前对该病害的致病机理还不明晰，生产上也还没有建立起对应的高效防控措施。

糖类不仅是植物生长发育的必要因素，也是病原菌从宿主细胞吸收的主要碳源和能源物质[14-15]。糖转运蛋白不仅介导植物细胞内、细胞间糖的摄取与释放，也介导植物-病原体中糖的分配[16]，其在植物质膜上的分配是植物生长发育和应对生物及非生物胁迫时最重要的过程之一[17-18]。植物中糖转运蛋白主要分成单糖转运蛋白(MSTs)和蔗糖转运蛋白(sucrose transporters/sucrose carriers，SUTs/SUCs)两类，这两类糖转运蛋白都属于 MFS 蛋白超家族(Major facilitator superfamily)。蔗糖转运蛋白(SUTs/SUCs)包含 SUT1、SUT2、SUT3、SUT4 和 SUT5 5 个亚族[16]。已知的 SUTs 其氨基酸序列高度保守，为疏水性蛋白，包含由 12 个 α-螺旋组成的保守跨膜结构域，中间面向胞质的亲水胞质环将蛋白分为两部分，每部分含 6 个跨膜结构域，伸展的 N 端序列也定位于胞质。SUTs 基因家族成员在植物的不同生长阶段和不同部位表达，行使多种生物学功能，参与多种信号转导途径[19-20]。植物能够调节糖转运蛋白，将糖从感染部位重新分配出去，改变病原菌获得营养物质的途径，消除病原体的能量来源，来限制它们的扩散[21]。玉米黑粉菌蔗糖转运蛋白(UmSRT1)对蔗糖高度亲和，寄主植物的ZmSUT1 与其竞争蔗糖，病原菌通过直接吸收蔗糖来避免利用葡萄糖，进而诱导防御机制。*UmSRT*1 的缺失或 ZmSUT1 的上调表达都会造成病原菌毒力大大降低[22]。马铃薯中过表达蔗糖转运蛋白SoSUT1 导致丛枝菌根(arbuscular mycorrhizae，AM)真菌的定殖率增大[23]。

迄今为止，预测葡萄基因组中有 3 个蔗糖转运蛋白基因：*VvSUC*11，*VvSUC*12，*VvSUC*27，这 3 个基因均可在果实中表达，并且具有转运蔗糖的功能[24]。但对于葡萄中蔗糖转运蛋白参与免疫机制的调控目前还未见报道。前期的试验中以可可毛色二孢菌株 CSS-01s、高感葡萄‘夏黑’为研究对象，对可可毛色二孢侵染的‘夏黑’葡萄进行转录组分析，随后通过差异表达基因的比对注释，系统分析了侵染初期感病葡萄对可可毛色二孢防御反应相关基因的表达，发现蔗糖转运蛋白基因 *VvSUC*27 在感病样品中存在差异表达[25]。本研究从葡萄的 cDNA 中克隆获得葡萄蔗糖转运蛋白 *VvSUC*27 基因，利用生物信息学和实时荧光定量 PCR 方法对其进行结构和表达分析，研究结果为进一步阐明 *VvSUC*27 基因的生物功能奠定了基础，同时也为解析其参与免疫反应的调控机制提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验于 2019 年 9 月在北京市农林科学院植物保护环境保护研究所进行。葡萄‘夏黑’枝条由北京市农林科学院林果所提供。葡萄品种‘无核白’组培苗由中国农业科学院兴城果树研究所董雅凤研究员提供。

可可毛色二孢菌株 CSS-01s 由本实验室分离并保存。LA *Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、SYBR Premix Ex *Taq*™购自宝生物工程有限公司。反转录酶 SuperScript® Ⅲ购自 Invitrogen 公司。*E. coli* Trans5α 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。其他常规化学药品均为分析纯。农杆菌 EHA105 菌株和 Super-GFP 植物表达载体由本实验室保存。flg22(鞭毛蛋白 N 端含保守的 22 个氨基酸的多肽：QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA，纯度＞95%)由艾博抗(上海)贸易有限公司合成。几丁质 chitin(C9752)购自 Sigma 公司。植物激素，水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、氨基环丙

烷羧酸(ACC)购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 接种处理

葡萄'夏黑'休眠枝条种植于北京市农林科学院温室,将生根枝条以 20 cm×20 cm 的间距移栽至 25 cm×25 cm 的花盆中培养 3 个月。接种按照 Yan 等方法[8]稍作修改:将可可毛色二孢菌株 CSS-01s 在 PDA 培养基上于 28℃培养 2 d;半木质化新生嫩枝用 70%乙醇进行表面消毒后,在茎中间用打孔器制造 2 mm 深的伤口,取直径为 4 mm 的菌饼接种到伤口上并使用封口膜稍作固定,对照组接种无菌 PDA 培养基块;接种后的葡萄苗置于 26～28℃、光周期 L//D=12 h//12 h、相对湿度为 85%～95%的植物接种室中;接种 0、1、3、6、12 h 和 24 h 时以伤口为中心截取 4 cm 范围内全部韧皮组织,采集的样品在液氮中速冻,-80℃冰箱保存备用。

1.2.2 激素及激发子处理

参照 Jiao 等的方法[26],将生长情况一致的'无核白'组培苗移栽至 26～28℃人工气候室,光周期 L//D=16 h//8 h 下培养 3 个月后,对材料进行激素及激发子处理:将 100 μmol/L 水杨酸、100 μmol/L 脱落酸、100 μmol/L 茉莉酸甲酯、100 μmol/L 氨基环丙烷羧酸、1 μmol/L flg22 和 10 μg/mL 几丁质分别喷施在葡萄叶片上,喷施量为(1.5±0.1)mL/株,同时以等体积灭菌 ddH_2O 处理为对照;暗培养并分别在处理 0、1、3、6、12 h 和 24 h 时采集叶片,每种处理设置 3 组重复。采集的葡萄叶片用液氮速冻后,保存于-80℃冰箱备用。

1.2.3 RNA 提取及 cDNA 合成

取上述激素处理、激发子处理和接种处理后的植物组织,采用多糖多酚/复杂植物 RNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)提取样品总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量及完整性。NanoDrop 2000(Thermo)对 RNA 进行定量后,利用 SuperScript Ⅲ反转录试剂盒(Invitrogen)反转录合成 cDNA,-20℃保存备用。

1.2.4 *VvSUC27* 基因 ORF 的克隆及生物信息学分析

根据 *VvSUC27* 序列(GenBank 登录号:AF021810.2)设计特异性引物:上游引物 SUC27-F:5′-ATGGAGTTAGCCAAGCCTTCTTCAG-3′,下游引物 SUC27-R:5′-AGACGACGGCTGAGTCCTCTCATCC-3′。以葡萄'无核白'cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应体系(50 μL):10×PCR buffer 5 μL;2.5 mmol/L dNTPs 2 μL;10 μmol/L 上游和下游引物各 1 μL;LA *Taq* 0.4 μL;cDNA 模板 2 μL;补水至 50 μL。反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,32 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测后,用胶回收试剂盒(Qiagen)回收目的片段,连接到 pMD-18T 载体上,定名为 SUC27-T,转化大肠杆菌 Trans5α 感受态细胞,单克隆鉴定为阳性后送北京擎科新业生物技术有限公司测序。采用 DNAMAN 6.0、ProtParam 等软件对其蛋白序列进行生物信息学分析;利用 MEGA 7 构建系统进化树。

1.2.5 基因表达分析

根据 *VvSUC27* 基因序列设计实时荧光定量 PCR 特异引物,上游引物 qS27-F:5′-ATCACCTACAGCATTCCAT-3′,下游引物 qS27-R:5′-CTACCGACACCATCATCT-3′。以 1.2.3 制备的 cDNA 作为模板,每个样品设 3 次重复,用 *VvEF1-γ*(AF176496)作为内参基因。参照 TaKaRa 说明书,采用 SYBR Green I 染料法进行荧光定量 PCR,反应在 ABI7500 Real-time PCR 检测系统上进行。PCR 反应体系:SYBR Premix Ex *Taq*™ 10 μL;10 μmol/L上游和下游引物各 0.5 μL;ROX Reference Dye Ⅱ 0.4 μL;cDNA 模板 0.5 μL;补 ddH_2O 至 20 μL。反应程序为:95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火 34 s,40 个循环;熔解曲线为 95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 30 s,60℃ 15 s。*VvSUC27* 基因的相对表达水平用 $2^{-\triangle\triangle Q}$ 法计算。

2 结果与分析

2.1 葡萄 *VvSUC27* 基因的克隆

以葡萄品种'无核白'cDNA 为模板,SUC27-F/-R 为引物扩增得到 1 条 1 500 bp 左右的片段,测序并通过 DNAMAN 软件将得到的序列与'黑比诺'参考序列(PN40024)进行比对发现,其开放阅读框(ORF)序列长度一致,为1 515 bp;第 164 位核苷酸与参考序列存在差异,'黑比诺'中该位置为 T,对应氨基酸为亮氨酸(Leu);'无核白'中为 A,对应氨基酸为组氨酸(His)(图 1)。

2.2 VvSUC27 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 VvSUC27 蛋白的理化性质分析

VvSUC27 基因编码 505 个氨基酸,包含 22 个酸性氨基酸(Asp+Glu),36 个碱性氨基酸(Arg+Lys),编码蛋白相对分子量为 54 kD,理论等电点

(pI)为 9.58。VvSUC27 蛋白包含 44.36%的 α 螺旋(*alpha* helix)、14.65%的延伸链区(extended strand)、4.16%的 β 转角(*beta* turn)和 36.83%的无规则卷曲(random coil)。应用在线工具(http://wlab.ethz.ch/protter/start/)预测 VvSUC27 蛋白含有 12 个跨膜区(图 2)。

```
1     ATGGAGTTAGCCAAGCCTTCTTCAGTGTTTGCTATTCAAGACCACCAATCCTCTTCTCCTCCCACTCCCATATGGAAAACGGTGGTTGTG
       M  E  L  A  K  P  S  S  V  F  A  I  Q  D  H  Q  S  S  S  P  P  T  P  I  W  K  T  V  V  V
91    GCCTCCATCGCCGCCGGGATTCAGTTCGGATGGGCGTTGCAGCTGTCGTTGCTGACCCCCTACGTTCAGCTTCACGGCATTCCCCACAAG
       A  S  I  A  A  G  I  Q  F  G  W  A  L  Q  L  S  L  L  T  P  Y  V  Q  L  H  G  I  P  H  K
181   TGGGCTGCTTTTATCTGGCTCTGTGGTCCCATCTCCGGCATGATTGTGCAGCCGGTAGTTGGTTACCACAGCGACCGCTGCACATCCCGG
       W  A  A  F  I  W  L  C  G  P  I  S  G  M  I  V  Q  P  V  V  G  Y  H  S  D  R  C  T  S  R
271   TTTGGGCGTCGCCGCCCCTTCATCGCCGCCGGGGCTGTTCTCGTTGCCATCGCTGTGTTTCTCATCGGCTACGCAGCCGACATCGGAAGG
       F  G  R  R  R  P  F  I  A  A  G  A  V  L  V  A  I  A  V  F  L  I  G  Y  A  A  D  I  G  R
361   GTTTCCGGCGACCCCCTCCATAATACTATCAAAACCAGGGCGGTTGCGGTGTTCGTGGTTGGGTTTTGGATTCTGGATGTGGCTAATAAT
       V  S  G  D  P  L  H  N  T  I  K  T  R  A  V  A  V  F  V  V  G  F  W  I  L  D  V  A  N  N
451   ATGCTTCAAGGCCCTTGCCGAGCCCTCCTAGCGGATCTCTCCGGCACCAGCGCTCGGCGGACTCGAACGGCGAACGCGCTGTATTCGTTT
       M  L  Q  G  P  C  R  A  L  L  A  D  L  S  G  T  S  A  R  R  T  R  T  A  N  A  L  Y  S  F
541   TTCATGGCCGTCGGCAACGTCCTCGGCTACGCTGCCGGCTCCTTCAGCAAACTCCACAAGATGTTCCCCTTCGCCAGAACCCAAGCCTGC
       F  M  A  V  G  N  V  L  G  Y  A  A  G  S  F  S  K  L  H  K  M  F  P  F  A  R  T  Q  A  C
631   GACCTCTATTGCGCCAATCTCAAAAGCTGCTTTTTCCTTTCTATCGCACTTCTTCTAATTCTGACAATCATCGCATTCGCCACCGTGCAC
       D  L  Y  C  A  N  L  K  S  C  F  F  L  S  I  A  L  L  L  I  L  T  I  I  A  F  A  T  V  H
721   GAAACCCCGCTCAACAGAGCCGACATCGCCGTCGTCGAAGCCGGACAACCGTTCTATTCCCAGATGATGAATGCCTTCAGGCAGCTGAGA
       E  T  P  L  N  R  A  D  I  A  V  V  E  A  G  Q  P  F  Y  S  Q  M  M  N  A  F  R  Q  L  R
811   AGGCCCATGTGGGTGCTTCTCCTTGTGACGTGTCTCAACTGGATTGGCTGGTTCCCTTTCCTTCTCTTCGACACCGATTGGATGGGCAGA
       R  P  M  W  V  L  L  L  V  T  C  L  N  W  I  G  W  F  P  F  L  L  F  D  T  D  W  M  G  R
901   GAGGTGTACGGAGGCACCGTCGGAGAAGGCCCCAGAGGAAGGCTGTACGATCTGGGAGTCCGCGCGGGTTCATTGGGGCTGATGCTGAAC
       E  V  Y  G  G  T  V  G  E  G  P  R  G  R  L  Y  D  L  G  V  R  A  G  S  L  G  L  M  L  N
991   TCTGTGGTTCTGGGGTTGATGTCTCTCGGAGTTGAGTTCTTTGGCCGTGGGGTTGGCGGCGTGAAGCGCCTCTGGGGTGGCGTCAATTTT
       S  V  V  L  G  L  M  S  L  G  V  E  F  F  G  R  G  V  G  G  V  K  R  L  W  G  G  V  N  F
1081  CTGCTGGCGCTGTGCTTGGCACTGACGGTACTTGTTAGCAAGTTGGCAGCGTCGTGGCGGCACAGCCTTGGCGGAGAGCTTCACCCACCG
       L  L  A  L  C  L  A  L  T  V  L  V  S  K  L  A  A  S  W  R  H  S  L  G  G  E  L  H  P  P
1171  CCGATCGGCATCAAGGCTGGAGCGTTATCTCTGTTCGCTGTTATGGGGGTACCTCTTGCGATCACCTACAGCATTCCATTTGCTCTGGCT
       P  I  G  I  K  A  G  A  L  S  L  F  A  V  M  G  V  P  L  A  I  T  Y  S  I  P  F  A  L  A
1261  TCCATATTTTGCCACAGTTCTGGTGCAGGCCAAGGACTTTCTCTTGGAGTTCTAAATCTTGCAATTGTTGTACCGCAGATGATGGTGTCG
       S  I  F  C  H  S  S  G  A  G  Q  G  L  S  L  G  V  L  N  L  A  I  V  V  P  Q  M  M  V  S
1351  GTAGCGAGCGGGCCATGGGACGCGCGATTTGGGGGCGGCAACCTTCCCGCGTTTGTAGTGGGTGCGTTTGCAGCCGCGCTGAGCGGAGTG
       V  A  S  G  P  W  D  A  R  F  G  G  G  N  L  P  A  F  V  V  G  A  F  A  A  A  L  S  G  V
1441  TTGGCGCTGACTATGCTCCCAGCTCCTCCTCCTGATGTCCCCAACACCAAGGATGAGAGGACTCAGCCGTCGTCT
       L  A  L  T  M  L  P  A  P  P  P  D  V  P  N  T  K  D  E  R  T  Q  P  S  S
```

方框内为品种‘无核白’中与‘黑比诺’有差异的位置
The boxes indicate the difference in varieties ‘Thompson seedless’ *vs*. ‘Pinot Noir’

图 1　*VvSUC27* 基因 ORF 及其推导的氨基酸序列

Fig. 1　The open reading frame of *VvSUC27* and the sequence of deduced amino acids

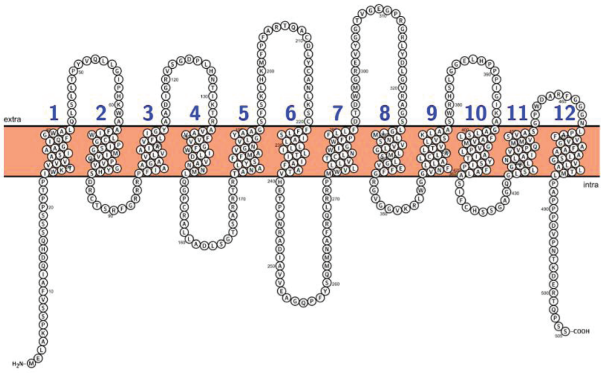


图 2　葡萄 VvSUC27 蛋白跨膜结构预测

Fig. 2　The prediction of trans-membrane structure of VvSUC27 in grapevine

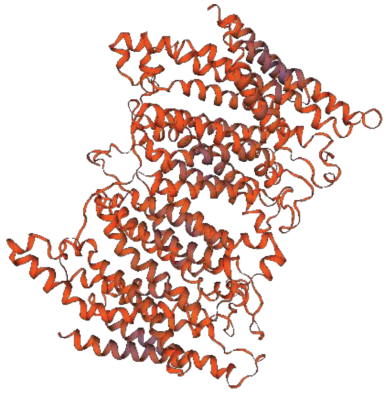


图 3　葡萄 VvSUC27 蛋白的预测三维结构图

Fig. 3　Predicted three-dimensional structure of VvSUC27 in grapevine

2.2.2　VvSUC27 蛋白三级结构预测

用 SWISS-MODEL 对 *VvSUC27* 编码氨基酸的三级结构进行预测，结果如图 3 所示。葡萄 VvSUC27 蛋白的三级结构域呈现复杂弯曲的交叉螺旋状结构，有 12 个明显的 α 螺旋。

2.2.3　VvSUC27 蛋白的系统进化树

通过同源性比对分析表明，葡萄 VvSUC27 蛋白与烟草 NtSUC1a(CAA57727)蛋白和拟南芥 AtSUC5(AEE35248)同源性最高分别为 63.92%和 61.43%，说明其亲缘关系最近(图 4)。

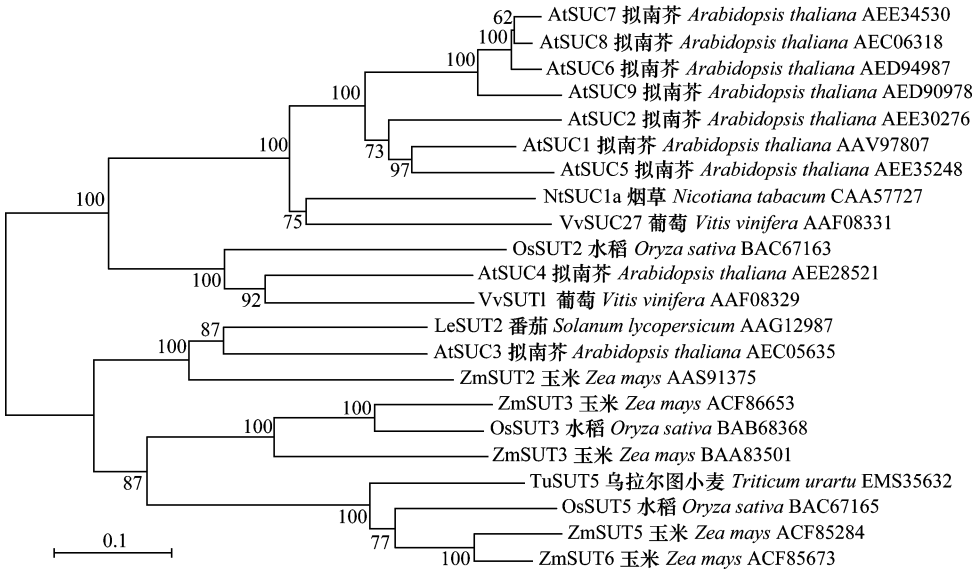
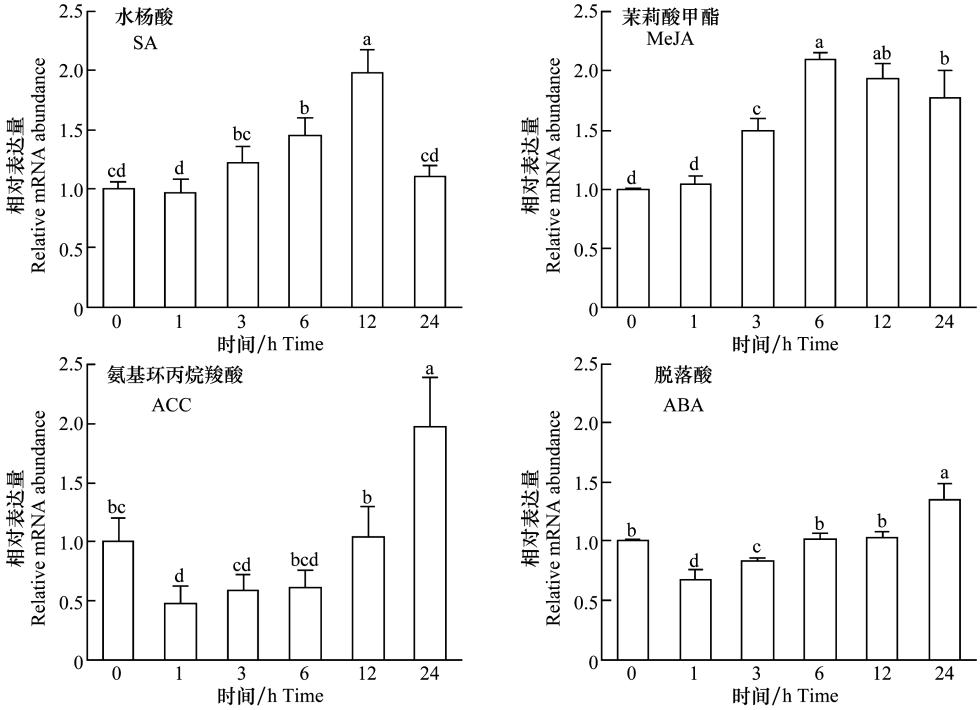


图 4　葡萄 VvSUC27 蛋白与其他物种 SUT(SUC)蛋白氨基酸序列的系统进化树

Fig. 4　Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of VvSUC27 in grapevine and the SUT(SUC) proteins in other species

2.3　*VvSUC27* 基因的表达分析

激素处理后，*VvSUC27* 基因表达量发生变化(图 5)：水杨酸(SA)处理后，*VvSUC27* 基因表达量呈先上升后下降的趋势，处理 12 h 后表达量最高，约为对照的 2 倍；茉莉酸甲酯(MeJA)处理后，*VvSUC27* 基因表达量呈先上升后下降的趋势，处理 6 h 后表达量最高，约为对照的 2 倍；乙烯前体氨基环丙烷羧酸(ACC)处理后，*VvSUC27* 基因在 1 h 时表达量最低，低于对照的 1/2；处理 12 h 后基因表达量上调。脱落酸(ABA)处理后，*VvSUC27* 基因表达量有所下降，6 h 后恢复为与对照相当水平，而后不断上升，处理 24 h 后达到峰值。



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

Different lowercase letters indicate significant difference in the relative expression at 0.05 level. The same applies below

图 5　不同激素处理后葡萄 *VvSUC27* 基因的表达分析

Fig. 5　Expression analysis of *VvSUC27* after different hormonal treatments

如图 6 所示，在 chitin 诱导下，*VvSUC*27 基因信号响应十分快速且明显，表达量在 3 h 时达到峰值，约是对照的 6 倍，而后表达量逐渐降低；在 flg22 处理下，*VvSUC*27 基因表达量升高，其中 12 h 时表达量最高，约为对照的 4 倍，处理 24 h 后表达量则基本恢复至与对照水平相当。

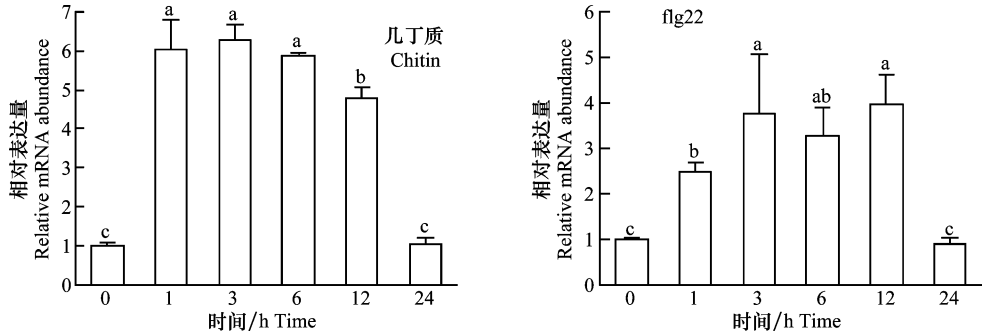


图 6　不同激发子处理后葡萄 *VvSUC*27 基因的表达分析

Fig. 6　Expression analysis of *VvSUC*27 after different elicitor treatments

接种可可毛色二孢后，*VvSUC*27 表达量先升高，3 h 时达到峰值，约为对照的 2.5 倍；随后表达量开始下降，接种 12 h 时最低，约为对照的 2 倍(图 7)。

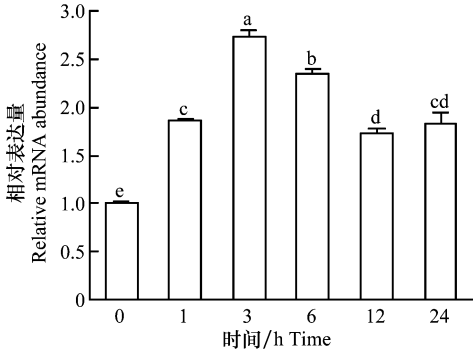


图 7　接种可可毛色二孢 CSS-01s 后葡萄 *VvSUC*27 基因的表达分析

Fig. 7　Expression analysis of *VvSUC*27 upon inoculation with *Lasiodiplodia theobromae* CSS-01s

3　讨论

蔗糖转运蛋白(SUTs/SUCs)是植物中特有的一类跨膜蛋白，在植物中广泛存在，负责蔗糖经韧皮部从源到库的运输以及库组织的蔗糖供给，还参与蔗糖在库组织的贮存[27-28]。蔗糖转运蛋白是一个十分庞大的家族，他们的共同特点是具有 12 个跨膜区的蛋白质，在 12 个跨膜区域中，氨基酸是极为保守的，其中的疏水氨基酸几乎完全不变，而 N 端与 C 端为高变异区。最保守的跨膜区为第 1、2 和 11 跨膜区[29]，但不同植物或相同植物的不同基因存在功能上的差异。Davies 等[24]于 1999 年从葡萄果实中克隆得到了 3 个推测可能是葡萄蔗糖转运蛋白的基因。张雅丽等[30]研究发现：*VvSUC*27 在葡萄的根、幼叶以及果实等库器官中大量表达，而在叶片中表达量很少，与 Davies 结果一致，初步认为该基因很可能编码特异性存在于库组织中的蔗糖转运蛋白；于菲等 2011 年对 *VvSUC*27 启动子进行了初步的功能预测分析[31]。本研究克隆了葡萄 *VvSUC*27 基因，利用生物信息学方法对该蛋白的理化性质、三级结构进行了预测分析。结果表明其 cDNA 全长为 1 515 bp，编码 505 个氨基酸，VvSUC27 蛋白具有 12 个跨膜结构，与烟草蔗糖转运蛋白 NtSUC1a 的亲缘关系最近，为 63.92%，*VvSUC*27 基因与许多已经验证功能的糖转运蛋白基因都有很高的同源性，具有糖转运蛋白的活性。

目前糖转运蛋白在生理以及非生物胁迫方面的作用已经有了较深入的研究。植物中经光合作用产生的糖分需要其运输调控以保证自身各部分的营养供应，非生物胁迫条件下糖转运蛋白也会参与以适应逆境[32-33]。在玉米[22]、小麦[34]、马铃薯[23]等植物中发现了参与植物与病原菌互作过程相关的糖转运蛋白基因。本研究通过对葡萄受可可毛色二孢侵染后不同时间 *VvSUC*27 基因表达量的检测，证实病菌侵染诱导寄主植株 *VvSUC*27 基因的表达量增加，推测 *VvSUC*27 基因参与了寄主对可可毛色二孢的调控。水杨酸、脱落酸、茉莉酸以及乙烯是植物免疫相关的激素，在不同病原菌侵染过程中，其在寄主体内通过信号分子积累的改变来调节植物的免疫反应[35-36]。本研究结果表明，SA 和 MeJA 处理 6 h 即可诱导 *VvSUC*27 上调表达；而 ABA 和 ACC 处

理 24 h 后，*VvSUC*27 基因才出现诱导表达。在病原菌与寄主的互作过程中，寄主植物细胞表面的模式受体(pattern recognition receptors，PRR)通过识别病原菌保守的病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns，PAMPs)激发 PAMPs 诱导的免疫(PAMP-triggered immunity，PTI)[37]，其中细菌的鞭毛蛋白(flagellin)、真菌的几丁质(chitin)、肽聚糖(peptidoglycan，PGN)等都是常见的病原菌保守组分。*VvSUC*27 受 flg22 和 chitin 的诱导表达，推测其参与寄主植物的 PTI 反应。

本文克隆了 *VvSUC*27 基因并分析了其在接种可可毛色二孢后以及不同激素和激发子处理下的表达情况。下一步将开展基因编辑、蛋白互作等工作，对葡萄中蔗糖转运蛋白的功能及作用机理进行深入研究。通过探索 *VvSUC*27 基因在可可毛色二孢与葡萄互作中的作用机制，为葡萄中其他蔗糖转运蛋白调控机制研究提供一个新的切入点，为葡萄的遗传改良提供理论参考。

参考文献

[1] 晁无疾. 中国葡萄品牌建设现状及发展展望[J]. 中外葡萄与葡萄酒，2016(5)：135－140.

[2] BERTSCH C，RAMÍREZ S M，MAGNIN R M，et al. Grapevine trunk diseases：complex and still poorly understood [J]. Plant Pathology，2013，62(2)：243－265.

[3] PHILLIPS A J L，ALVES A，ABDOLLAHZADEH J，et al. The Botryosphaeriaceae：genera and species known from culture [J]. Studies in Mycology，2013，76(1)：51－167.

[4] URBEZTORRES J R，LEAVITT G M，VOEGEL T M，et al. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California [J]. Plant Disease，2006，90(12)：1490－1503.

[5] ÚRBEZTORRES J R，LEAVITT G M，GUERRERO J C，et al. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*，the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico [J]. Plant Disease，2008，92(4)：519－529.

[6] ÚRBEZTORRES J R. The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines [J]. Phytopathologia Mediterranea，2011，50：5－45.

[7] LUQUE J，MARTOS S，AROCA A，et al. Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain [J]. Journal of Plant Pathology，2009，91(2)：381－390.

[8] YAN Jiye，XIE Yue，YAO Shengwei，et al. Characterization of *Botryosphaeria dothidea*，the causal agent of grapevine canker in China [J]. Australasian Plant Pathology，2012，41(4)：351－357.

[9] YAN Jiye，PENG Youliang，XIE Yue，et al. First report of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria obtusa* in China [J]. Plant Disease，2011，95(5)：616.

[10] YAN Jiye，LI Xinghong，KONG Fanfang，et al. Occurrence of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria rhodina* in China [J]. Plant Disease，2011，95(2)：219.

[11] YAN Jiye，XIE Yue，ZHANG Wei，et al. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China [J]. Fungal Diversity，2013，61(1)：221－236.

[12] DISSANAYAKE A J，ZHANG Wei，LIU Mei，et al. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes pedicel and peduncle discolouration of grapes in China [J/OL]. Australasian Plant Disease Notes，2015，10：21. DOI：10.1007/s13314－015－0170－5.

[13] DISSANAYAKE A J，ZHANG Wei，LI Xinghong，et al. First report of *Neofusicoccum mangiferae* associated with grapevine dieback in China [J]. Phytopathologia Mediterranea，2015，54(2)：414－419.

[14] LASTDRAGER J，HANSON J，SMEEKENS S. Sugar signals and the control of plant growth and development [J]. Journal of Experimental Botany，2014，65(3)：799－807.

[15] SMEEKENS S. Sugar-induced signal transduction in plants [J]. Annual Review of Plant Biology，2000，51(1)：49－81.

[16] CHEN Liqing，Cheung L S，Feng Liang，et al. Transport of sugars [J]. Annual Review of Biochemistry，2015，84：865－894.

[17] LEMOINE R，LA CAMERA S，ATANASSOVA R，et al. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors [J/OL]. Frontiers in Plant Science，2013，4：272. DOI：10.3389/fpls.2013.00272.

[18] LALONDE S，WIPF D，FROMMER W B. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink [J]. Annual Review of Plant Biology，2004，55(1)：341－372.

[19] KÜHN C，GROF C P L. Sucrose transporters of higher plants [J]. Current Opinion in Plant Biology，2010，13(3)：287－297.

[20] REDDY V S，SHLYKOV M A，CASTILLO R，et al. The major facilitator superfamily (MFS) revisited [J]. The FEBS Journal，2012，279(11)：2022－2035.

[21] DODDS P N，LAGUDAH E S. Starving the enemy [J]. Science，2016，354(6318)：1377－1378.

[22] WAHL R，WIPPEL K，GOOS S，et al. A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis* [J/OL]. PLoS Biology，2010，8(2)：el000303. DOI：10.1371/journal.pbio.1000303.

[23] GABRIEL-NEUMANN E，NEUMANN G，LEGGEWIE G，et al. Constitutive overexpression of the sucrose transporter SoSUT1 in potato plants increases arbuscular mycorrhiza fungal root colonization under high，but not under low，soil phosphorus availability [J]. Journal of Plant Physiology，2011，168(9)：911－919.

[24] DAVIES C，WOLF T，ROBINSON S P. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tis-

sues [J]. Plant Science, 1999, 147(2): 93 - 100.

[25] XING Qikai, ZHANG Wei, LIU Mei, et al. Genome-wide identification of long non-coding RNAs responsive to *Lasiodiplodia theobromae* infection in grapevine [J/OL]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2019, 15: 1176934319841362. DOI: 10.1177/1176934319841362. eCollection 2019.

[26] JIAO Yuntong, WANG Dan, WANG Lan, et al. VqMAPKKK38 is essential for stilbene accumulation in grapevine [J/OL]. Horticulture Research, 2017, 4: 17058. DOI: 10.1038/hortres.2017.58.

[27] SRIVASTAVA A C, GANESAN S, ISMAIL I O, et al. Functional characterization of the *Arabidopsis* AtSUC2 sucrose/H+symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport [J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 200 - 211.

[28] SCHMITT B, STADLER R, SAUER N. Immunolocalization of solanaceous SUT1 proteins in companion cells and xylem parenchyma: new perspectives for phloem loading and transport [J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 187 - 199.

[29] WILLIAMS L E, LEMOINE R, SAUER N. Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation [J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(7): 283 - 290.

[30] 张雅丽，孟庆勇，曲桂芹，等. 葡萄蔗糖转运蛋白在烟草中的反义表达及其对转基因烟草的影响[J]. 生物化学与生物物理进展，2006，33(7)：699 - 705.

[31] 于菲，卢江，张雅丽. 葡萄中蔗糖转运蛋白家族的序列分析及功能推测[J]. 生物信息学，2011，9(1)：35 - 38.

[32] 袁进成，刘颖慧. 植物糖转运蛋白研究进展[J]. 中国农学通报，2013，29(36)：287 - 294.

[33] 齐素坤，侯夫云，秦桢，等. 植物蔗糖转运蛋白研究进展[J]. 山东农业科学，2016，48(2)：149 - 153.

[34] HUAI Baoyu, YANG Qian, QIAN Yingrui, et al. ABA-induced sugar transporter TaSTP6 promotes wheat susceptibility to stripe rust [J]. Plant Physiology, 2019, 181(3): 1328 - 1343.

[35] CORNÉ M J P, DOES D V D, ZAMIOUDIS C, et al. Hormonal modulation of plant immunity [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2012, 28(1): 489 - 521.

[36] DENANCE N, SANCHEZVALLET A, GOFFNER D, et al. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 155. DOI: 10.3389/fpls.2013.00155.

[37] BOLLER T, FELIX G. A Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors [J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60(1): 379 - 406.

（责任编辑：杨明丽）

（上接 19 页）

[16] WOOD E J. Molecular cloning: A laboratory manual [J]. Biochemical Education, 1983, 11(2): 182 - 183.

[17] LI Lianwei, CHEN Xiaolin, ZHANG Shengpei, et al. MoCAP proteins regulated by MoArk1-mediated phosphorylation coordinate endocytosis and actin dynamics to govern development and virulence of *Magnaporthe oryzae* [J/OL]. PLoS Genetics, 2017, 13(5): e1006814. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006814.

[18] PAUL H, KEUN-JOON P, TAKESHI O, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J/OL]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(Web Server issue): W585 - 7. DOI: 10.1093/nar/gkm259.

[19] MADDEN L V, WHEELIS M. The threat of plant pathogens as weapons against U. S. crops [J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 41(1): 155 - 176.

[20] ZHANG Qifa. Strategies for developing green super rice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(42): 16402 - 16409.

[21] YOSHIDA K, SAITOH H, FUJISAWA S, et al. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* [J]. The Plant Cell, 2009, 21(5): 1573 - 1591.

[22] SAITOH H, FUJISAWA S, MITSUOKA C, et al. Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens [J/OL]. PLoS Pathogens, 2012, 8(5): e1002711. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002711.

[23] MOSQUERA G, GIRALDO M C, KHANG C H, et al. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease [J]. The Plant Cell, 2009, 21(4): 1273 - 1290.

[24] XUE Chaoyang. Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus [J]. The Plant Cell, 2002, 14(9): 2107 - 2119.

[25] CATANZARITI A M. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors [J]. The Plant Cell, 2006, 18(1): 243 - 256.

[26] 郑斌，詹希美. 信号肽序列及其在蛋白质表达中的应用[J]. 生物技术通讯，2005，16(3)：296 - 298.

[27] XIAO Xueqiong, XIE Jiatao, CHENG Jiasen, et al. Novel secretory protein Ss-Caf1 of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is required for host penetration and normal sclerotial development [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014, 27(1): 40 - 55.

[28] JACOBS K A, COLLINSRACIE L A, COLBERT M, et al. A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins [J]. Gene, 1997, 198(1/2): 289 - 296.

[29] 叶方寅. 信号肽假说的提出及证实：1999 年诺贝尔生理学医学奖获得者 Günter Blobel 简介[J]. 国外医学：分子生物学分册，1999，21(6)：377 - 379.

（责任编辑：杨明丽）