

蔡继鸿,徐鹏,张香桂,等. 盐胁迫下陆地棉耐盐相关 *WRKY* 基因的表达分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):28-32.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.008

盐胁迫下陆地棉耐盐相关 *WRKY* 基因的表达分析

蔡继鸿^{1,2}, 徐鹏², 张香桂², 郭琪², 徐珍珍², 沈新莲²

(1. 南京农业大学, 江苏南京 210095; 2. 江苏省农业科学院经济作物研究所/农业部长江下游棉花油菜重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要:为深入研究棉花逆境胁迫下的分子机制,利用耐盐陆地棉品种 K368 和盐敏感陆地棉品种苏棉 12 号为材料,以 0 h 为对照,利用实时荧光定量 PCR 技术在不同盐处理时期(6、24、72 h)对前期鉴定的 28 个耐盐相关 *WRKY* 基因进行表达分析,同时对耐盐相关 *WRKY* 基因在 K368 和苏棉 12 号品种间差异表达情况进行比较分析,揭示耐盐品种 K368 和盐敏感品种苏棉 12 号在应答盐害方面的差异情况,初步探讨棉花耐盐的分子机制。

关键词:盐胁迫;陆地棉;耐盐机制;*WRKY* 基因;盐害

中图分类号: S562.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0028-04

为适应不良生长环境,植物在长期的进化过程中形成了一系列复杂而有效的应对机制。现有的研究表明,这种由于自身进化而获得的应对机制主要是通过转录激活或转录抑制相关基因的表达发生作用的。而在这一过程中,转录因子发挥重要作用,通过与其他相关蛋白或自身之间的相互作用激活或抑制相关靶基因的表达。近年来,研究显示 *WRKY* 转录因子家族中众多成员都参与植物的非生物胁迫响应机制^[1],目前已经成为植物抗性功能研究中的一个热点。

WRKY 转录因子作为一个重要的转录因子超家族,除了参与植物的生长发育、物质代谢途径及在抗病毒、细菌等方面发挥重要的调节作用外,还参与应答环境信号刺激,如低温、高盐、干旱等非生物胁迫逆境^[2]。近年来,由于盐碱化对我国农业的影响,植物耐盐机制的研究已成为热点。目前很多研究都表明 *WRKY* 参与植物对盐胁迫的响应。在前期的研究中,基于盐胁迫下旱地棉转录组测序,共鉴定了 28 个受盐胁迫诱导的 *WRKY* 基因^[3]。本研究对耐盐陆地棉品种 K368 和盐敏感品种苏棉 12 号的 28 个耐盐相关 *WRKY* 基因进行表达分析,为棉花耐盐机制的研究提供有力的理论依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

供试材料为陆地棉品种 K368 和苏棉 12 号(简称:苏 12)。将种子播于盆钵中,待长至 2 叶 1 心时开始盐处理,将小苗浸在含 200 mmol/L NaCl(其中 $\text{Na}^+ : \text{Ca}^{2+}$ 浓度比为 15 : 1)的营养液中,分别处理 0、6、24、72 h,取不同时期的根液氮速冻后于 -70 °C 保存备用。

收稿日期:2017-03-30

基金项目:江苏省自然科学基金(编号: BK20160580);国家转基因生物新品种培育重大专项(编号: 2014ZX08005-004-002);江苏省协同创新中心项目。

作者简介:蔡继鸿(1990—),男,江西赣州人,硕士,主要从事棉花分子育种研究。Tel: (025) 84390291; E-mail: 15951917980@163.com。

通信作者:沈新莲,博士,研究员,主要从事棉花分子育种研究。Tel: (025) 84390291; E-mail: xlshen68@126.com。

1.2 耐盐鉴定

耐盐鉴定试验于 2006 年 12 月在江苏省农业科学院经济作物研究所培养室进行。将预发芽的 K368 和苏 12 种子播于土质盆钵中,将盆钵放于 28 °C 光照培养箱中培养,待长至 2 叶 1 心时开始盐处理,盐处理浓度为 350 mmol/L。处理当天取 10 株幼苗作为对照,测定相关指标,包括植株高度、地上部生长量等。处理 7 d 后测定盐胁迫下和清水对照的 10 株植株相关指标,计算植株相对高度、地上部相对生长量等。性状相对值为胁迫环境下某性状表型值与对照环境下某性状表型值的比率,计算公式:某性状相对值 = 某一性状盐胁迫时表型值/对照环境表型值。

1.3 实时荧光定量 PCR

不同盐处理时期根样 RNA 提取参照文献[4]。以反转录获得的 cDNA 为实时荧光定量 PCR 的模板,以棉花的 *Actin* 作为内参基因,根据 *WRKY* 基因的非保守区设计特异性引物,对 *WRKY* 基因进行荧光定量 PCR 扩增,检测基因受盐胁迫诱导时的表达情况。实时荧光定量 PCR 分析方法参照文献[3],数据分析通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算基因的相对表达量^[5]。

1.4 数据统计

采用 Excel 2010 进行数据处理及统计分析。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下 K368 和苏 12 表型比较

由图 1 可知,与对照相比,经 350 mmol/L 盐处理 7 d 后, K368 和苏 12 均出现明显的盐害胁迫症状,生长均受到明显抑制。与 K368 相比,苏 12 在生长上受到的抑制更明显。盐处理 7 d 后测定相关指标来评价 2 个品种的耐盐性,包括植株相对高度、相对地上部鲜质量和相对地上部干质量等。由表 1 可知, K368 和苏 12 相对株高、相对地上部鲜质量、相对地上部干质量差异极显著。因此,认为 K368 相对于苏 12 表现出更好的耐盐性。

2.2 盐胁迫下耐盐相关 *WRKY* 基因在耐盐品种 K368 和盐敏感品种苏 12 根部的表达分析

利用实时荧光定量 PCR 对耐盐品种 K368 的 28 个耐盐相关 *WRKY* 基因进行表达分析,由图 2 可知,较之对照(盐处

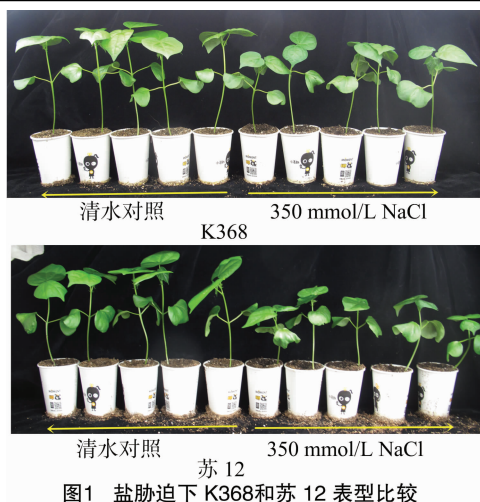


图1 盐胁迫下 K368和苏 12 表型比较

表 1 盐胁迫下 K368 和苏棉 12 号表型比较

材料名称	相对株高	相对地上部鲜质量	相对地上部干质量
K368	0.502 ± 0.069 6	0.602 ± 0.183 0	0.733 ± 0.121 0
苏 12	0.270 ± 0.038 1	0.173 ± 0.084 9	0.303 ± 0.025 3
均值差	0.232 **	0.429 **	0.430 **

注: ** 表示品种间在 0.01 水平上差异极显著。

理 0 h), 27 个 *WRKY* 基因在盐处理不同时期 (6、24、72 h) 诱导表达中仅 *WRKY22* 表达差异不显著。大部分耐盐相关 *WRKY* 基因随着盐处理时间延长, 其相对表达量表现为逐步上升的趋势, 且大部分 *WRKY* 基因在盐处理 24 h 后其相对表达量达到最高, 其中 *WRKY5*、*WRKY6* 以及 *WRKY38* 在盐处理 24 h 后其相对表达量上调 300 倍以上; 仅 *WRKY107* 随着盐处理时间延长, 其相对表达量表现为逐步下调趋势。

本研究同样对盐敏感品种苏 12 的 28 个 *WRKY* 基因进行了表达分析, 由图 3 可知, 25 个 *WRKY* 基因盐胁迫诱导表达中仅 *WRKY9*、*WRKY75*、*WRKY105* 表达差异不显著。大部分 *WRKY* 基因盐胁迫后其相对表达量表现为上调表达, 其中 *WRKY31* 在盐处理 24 h 后上调表达 800 倍以上; 仅 *WRKY22*、*WRKY52*、*WRKY90* 盐处理后表现为下调表达。

2.3 耐盐相关 *WRKY* 基因在 K368 和苏 12 中差异表达分析

本研究分别对 28 个 *WRKY* 基因在耐盐品种 K368 和盐敏感品种苏 12 中进行了差异表达分析, 其中 22 个 *WRKY* 基因在品种间表达趋势表现一致, 即盐处理后 *WRKY* 基因在 K368 和苏 12 较之对照均表现为上调表达或下调表达, 仅仅在表达量上存在差异。其中 12 个 *WRKY* 基因在耐盐品种 K368 中相对表达量更高, 如 *WRKY6* 在耐盐品种 K368 中盐处理 24 h 后其相对表达量达到了 300 倍以上, 在盐敏感品种苏 12 中, 其相对表达量在盐处理 72 h 后最高, 与对照相比较, 其表达量仅上调了 6 倍。5 个 *WRKY* 基因在盐敏感品种苏 12 中相对表达量更高, 如 *WRKY43* 在苏 12 中其相对表达量在盐处理 24 h 达到约 600 倍, 而在耐盐品种 K368 中, 其相对表达量在盐处理 24 h 后仅上调了不到 10 倍。5 个 *WRKY* 基因在 K368 和苏 12 中表达量相当, 无明显差异。此外, 有 6 个 *WRKY* 基因在 K368 和苏 12 中表达不一致, *WRKY52*、*WRKY90* 盐处理后在 K368 中表现为上调表达, 而在苏 12 中则表现为下调表达; *WRKY9*、*WRKY75*、*WRKY105* 盐处理后在 K368 中表现为上调表达, 而在苏 12 中差异表达不显著; *WRKY22* 盐处理后在苏 12 中表现

下调表达, 而在 K368 中差异表达不显著。综上所述, 盐胁迫后总共有 23 个 *WRKY* 基因在耐盐品种 K368 和盐敏感品种苏 12 中差异表达, 仅 *WRKY5*、*WRKY27*、*WRKY28*、*WRKY51* 及 *WRKY104* 无明显差异。推测该 23 个 *WRKY* 基因可能与陆地棉耐盐性有一定的关联。

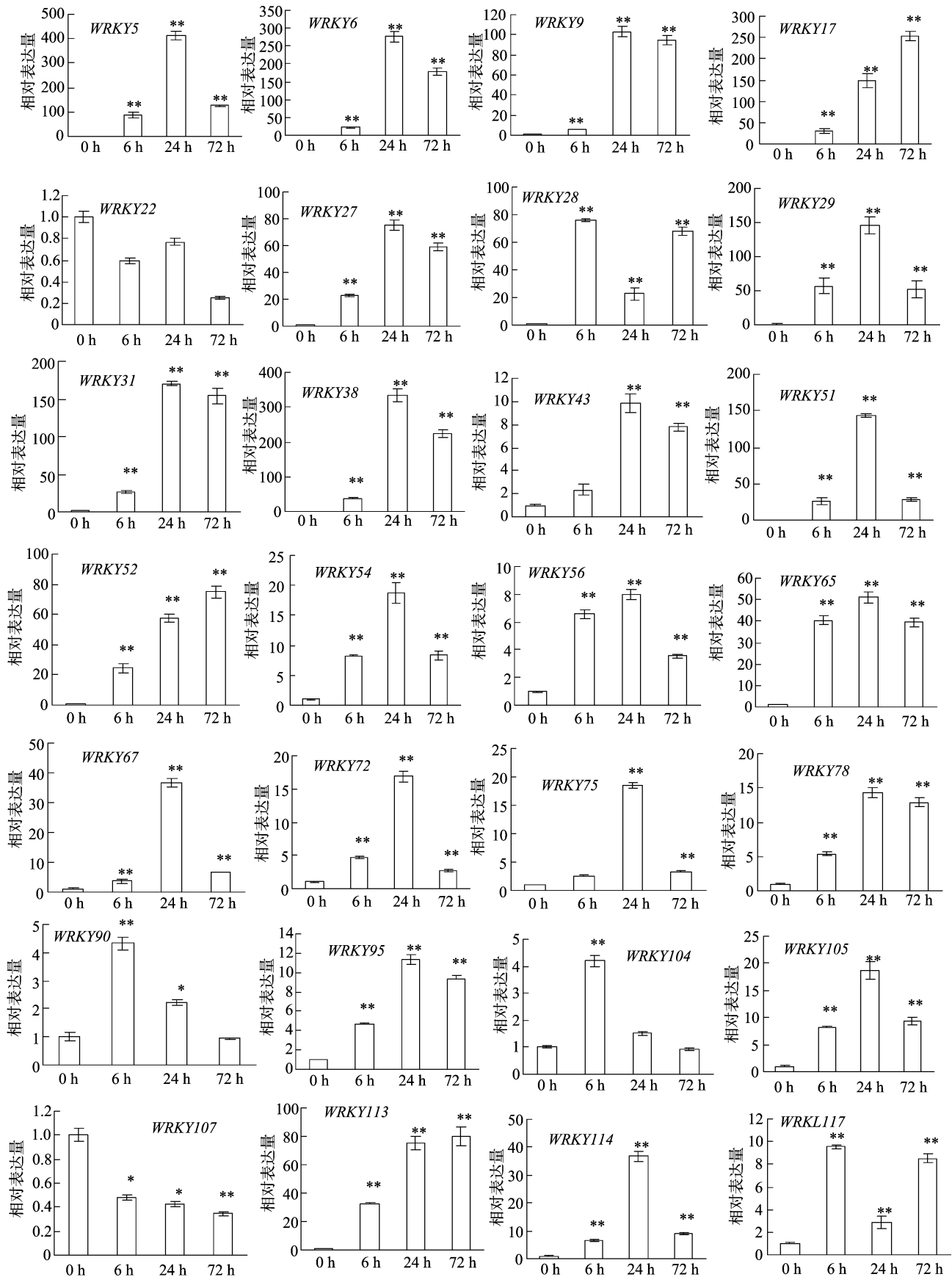
3 讨论与结论

许多研究已报道了 *WRKY* 基因可能参与盐胁迫诱导表达, 在植物中过量表达一些 *WRKY* 基因能够改良植物的耐盐能力。在拟南芥中, 35 个 *WRKY* 基因中有 18 个基因被盐胁迫诱导表达, 过量表达 *WRKY25*、*WRKY33* 可明显提高拟南芥的耐盐性^[6]。Qiu 等研究发现, 水稻的 13 个 *WRKY* 基因中有 9 个应答 NaCl 处理, 过量表达 *OsWRKY45* 可提高拟南芥的耐盐性^[7]。大豆中 64 个 *WRKY* 转录因子中的 22 个在盐胁迫下差异表达, 过量表达大豆 *GmWRKY54* 可提高拟南芥的耐盐性^[8]。过量表达玉米 *ZmWRKY33* 可改善拟南芥的耐盐性^[9]。这些都说明 *WRKY* 转录因子家族成员是响应盐胁迫反应的重要调控因子。本研究在前期研究的基础上继续对受盐胁迫诱导的 28 个 *WRKY* 基因在陆地棉中进行表达分析, 大部分 *WRKY* 基因均表现为不同程度的诱导表达, 推测可能与陆地棉耐盐特性有一定关联性, 但是表达强度的差异是否影响到基因功能, 对此还需要进一步研究。

目前, 棉花中已经有很多关于 *WRKY* 响应盐胁迫反应报道。Shi 等从陆地棉中分离出 *GhWRKY39*, 该基因被病原菌以及盐胁迫诱导, 在拟南芥中过量表达该基因能够提高其耐盐性^[10]。Zhou 等从陆地棉中鉴定了 26 个 *WRKY* 基因, 在 NaCl 诱导下其中的 5 个基因在根中上调表达^[11]。Cai 等在全基因组范围内分析雷蒙德氏棉 *WRKY* 基因家族, 同时也在陆地棉中分析了这些基因在非生物胁迫下的表达情况^[12-13]。所有这些结果表明 *WRKY* 基因参与了棉花对盐胁迫网络调控的应答。

参考文献:

- [1] 金 慧. 水杨酸诱导番茄 *WRKY* 转录因子的克隆及功能分析 [D]. 大连: 大连理工大学, 2011.
- [2] Ulker B, Somssich I E. *WRKY* transcription factors: from DNA binding towards biological function [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(5): 491-498.
- [3] Fan X Q, Guo Q, Xu P, et al. Transcriptome-wide identification of salt-responsive members of the *WRKY* gene family in *Gossypium aridum* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126148.
- [4] 胡根海, 喻树迅. 利用改良的 CTAB 法提取棉花叶片总 RNA [J]. *棉花学报*, 2007, 19(1): 69-70.
- [5] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [6] Jiang Y, Deyholos M K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes [J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6(1): 25.
- [7] Qiu Y P, Yu D Q. Over-expression of the stress-induced *OsWRKY45* enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 65(1): 35-47.



柱上*、**分别表示在0.05、0.01水平上差异显著。图3同

图2 耐盐品种 K368 根部 *WRKY* 基因的表达情况

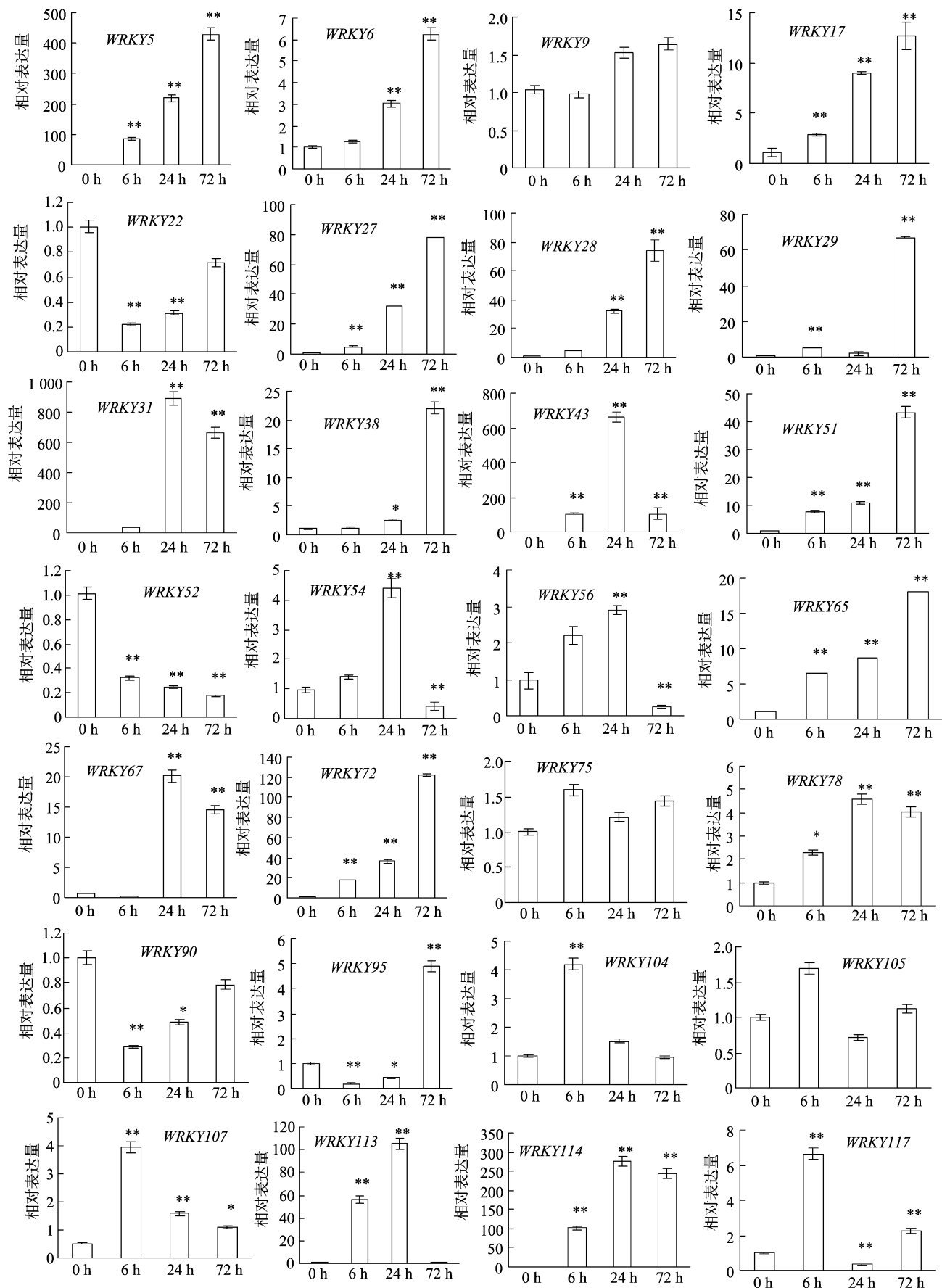


图3 盐敏感品种苏 12 根部 WRKY 基因的表达情况

胡风越,刘廷武,周曼丽,等. 二穗短柄草 *Trihelix* 转录因子家族的基因组学分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):32-37.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.009

二穗短柄草 *Trihelix* 转录因子家族的基因组学分析

胡风越,刘廷武,周曼丽,周颖君,周芮,杨立明,纪剑辉

(淮阴师范学院生命科学学院,江苏淮安 223300)

摘要: *Trihelix* 转录因子是一类与植物光应答反应、逆境胁迫应答和生长发育调控密切相关的转录调控蛋白家族,首先在植物中被发现。为深入了解 *Trihelix* 转录因子家族,便于植物 *Trihelix* 基因克隆并鉴定其功能,选用禾本科模式植物二穗短柄草,采用生物信息学相关方法,在二穗短柄草中鉴定出 28 个 *Trihelix* 转录因子家族基因,并依据蛋白保守域序列特点将其分为 5 个亚家族(I~V),这 28 个 *Trihelix* 转录因子基因在染色体上均有分布且出现部分聚集现象。依据二穗短柄草、水稻、高粱和玉米中聚类分析及染色体区段复制分析所得结果,判断 *Trihelix* 基因家族在二穗短柄草、水稻、高粱和玉米中的进化关系,并推测 *Trihelix* 转录因子家族在物种演变过程中发生了基因的进化。

关键词: 二穗短柄草; *Trihelix*; 转录因子; 生物信息学; 物种演变

中图分类号: Q344⁺.13 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0032-06

在植物的转录因子家族中,研究得较为全面的是与逆境相关的转录因子,如 ABF、MYB、NAC、DREB、DOF、WRKY 等转录因子家族,对这些转录因子相关基因的恰当的转化运用,可以提高植物对逆境胁迫的耐受性^[1-6]。*Trihelix* 转录因子是与抗逆相关的转录因子家族之一,目前在拟南芥、水稻、棉花、高粱等植物中均有相关研究。研究显示,拟南芥中有 30 个 *Trihelix* 转录因子,而水稻中含有 31 个^[7]。此外,由于 *Trihelix* 转录因

子在光应答反应、植物生长发育和逆境胁迫中显著的调控作用^[8-12],它们对生产实践中的品种改良应用具有重要意义。二穗短柄草由于具有植株矮小、生育期短、遗传转化率高以及其与小麦基因组相似度高达 95%、能同样感染小麦易感的各种细菌的特点,成为继拟南芥和水稻之后新型模式植物的理想植株,并能有效弥补模式植物水稻的不足^[13-14]。本研究利用生物信息学分析手段,对二穗短柄草 *Trihelix* 转录因子家族基因进行结构特征、进化情况及染色体定位等分析,并对该基因家族在水稻、二穗短柄草以及玉米等物种染色体区段的复制作了分析,以期更全面地了解禾本科植物 *Trihelix* 基因家族。

收稿日期:2017-04-17

基金项目:国家自然科学基金(编号:41501262、31400169);江苏省淮安市科技支撑项目(编号:HAN201604);江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(编号:201610323026Y);江苏省自然科学基金(编号:BK20140455);江苏省高等学校自然科学研究重大项目(编号:17KJA180002);江苏高校品牌专业建设工程(编号:PPZY2015A018);江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心;江苏省高校“青蓝工程”。

作者简介:胡风越(1995—),女,江苏扬州人,主要从事水稻分子生物学研究, E-mail:1134741304@qq.com;共同第一作者:刘廷武(1984—),男,博士,副教授,主要从事植物分子生物学研究, E-mail:tingwuliu@163.com。

通信作者:纪剑辉,博士,副教授,主要从事水稻分子生物学研究。 E-mail:jijianhui@hytc.edu.cn。

1 材料与与方法

1.1 数据的收集与分析

在植物转录因子数据库(Plant Transcription Factor Database,简称 TFDB)中获取水稻、二穗短柄草、玉米、高粱及拟南芥中的 *Trihelix* 基因序列,随后对相关数据进行整合分析,利用 Pfam 方法在水稻中检测是否存在此家族蛋白的特征结构域,借助同样的方法,完成对 *Trihelix* 特殊结构域的序列筛选,进而得到不同物种 *Trihelix* 蛋白的全部序列^[15]。利用 ExPASy 数据库(<http://www.expasy.org/>)对二穗短柄草 *Trihelix* 蛋白的分子量、染色体位置、等电点等基因组信息进

[8] Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F, et al. Soybean WRKY - type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6(5):486-503.

[9] Li H, Gao Y, Xu H, et al. *ZmWRKY33*, a WRKY maize transcription factor conferring enhanced salt stress tolerances in *Arabidopsis* [J]. Plant Growth Regulation, 2013, 70(3):207-216.

[10] 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.

[11] Zhou L, Wang N N, Kong L, et al. Molecular characterization of 26 cotton WRKY genes that are expressed differentially in tissues and are induced in seedlings under high salinity and osmotic stress [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 2014, 119(1):141-156.

[12] Cai C P, Niu E, Du H, et al. Genome-wide analysis of the WRKY transcription factor gene family in *Gossypium raimondii* and the expression of orthologs in cultivated tetraploid cotton [J]. The Crop Journal, 2014, 2(2/3):87-101.

[13] 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.