

朱飞雪,郭 丽,程玉江. 蝴蝶兰 *WRKY57* 基因的克隆、亚细胞定位及响应脱落酸功能分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(18):54–62.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2023.18.008

蝴蝶兰 *WRKY57* 基因的克隆、亚细胞定位 及响应脱落酸功能分析

朱飞雪¹,程玉江²,郭 丽¹

(1. 河南农业职业学院园艺园林学院,河南中牟 451450; 2. 河南东宝园林绿化工程有限公司,河南郑州 451450)

摘要: *WRKY* 转录因子是植物生长发育及胁迫反应的重要调节因子,然而关于蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*) *WRKY* 家族的功能知之甚少。以蝴蝶兰品种满天红为试验材料,分析蝴蝶兰转录因子 *PaWRKY57* 的理化特性、亚细胞定位、组织表达及在脱落酸 (ABA) 处理下的响应机制,结果表明,从 *P. aphrodite* 克隆得到的 *PaWRKY57* 长度为 2 049 bp,编码 682 个氨基酸,为不稳定的亲水蛋白,亚细胞定位显示 *PaWRKY57* 位于细胞核内。结构域分析和同源性比较表明,*PaWRKY57* 蛋白具有 *WRKYGQK* 结构域,属于 *WRKY* 家族Ⅲ型亚家族;系统发育分析表明,*PaWRKY57* 与水稻 *OsWRKY47* 亲缘关系最近。qRT-PCR 分析显示,*PaWRKY57* 在叶片中表达水平最高,在 ABA 处理下表现出“升—降—升—降”的表达模式。与野生型品系 (WT) 相比,*PaWRKY57* 过表达植株的抑生植物激素 (ABA、GAs) 含量增加,叶绿素与促生植物激素 (BR、IAA) 含量降低,从而导致叶片黄化明显、植株衰老加快;在此基础上喷施 ABA 后,上述现象进一步加剧。综上,*PaWRKY57* 是一个响应 ABA 信号的转录因子,受 ABA 信号介导调控蝴蝶兰的衰老过程。

关键词: 蝴蝶兰; *WRKY57* 基因克隆; 脱落酸 (ABA); 叶片发育; 功能表达

中图分类号: S682.310.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2023)18–0054–08

脱落酸 (ABA) 是植物体内重要的天然激素,在植物细胞分化、休眠、组织发育等过程中发挥着至关重要的作用^[1]。当植物受到外部环境胁迫时,ABA 的合成、转运及分布会受到显著影响^[2]。*WRKY* 蛋白是植物中特异的转录因子家族,其特征为 *WRKY* 在蛋白质序列中存在高度保守的 *WRKY* 结构域,*WRKY* 结构域由 1 个保守的核心序列 *WRKY–GQK* 和 1 个锌指基序组成^[3]。*WRKY* 蛋白可根据 *WRKY* 保守结构域的数量和氨基酸序列分为 3 型:Ⅰ型 *WRKY* 蛋白包含 2 个 *WRKY* 结构域,而Ⅱ、Ⅲ型 *WRKY* 皆由 1 个 *WRKY* 结构域组成;但不同型 *WRKY* 的锌指基序不同,在Ⅰ、Ⅱ型 *WRKY* 蛋白的 C 末端具有 C2H2 基序,而Ⅲ型的 C 末端则为 C2HC^[4]。此外,根据序列相似性,Ⅱ型分为 a、b、c、d、e 5 个亚型^[5]。已有研究表明,*WRKY* 转录因子在应对生物胁迫和调控植物生长发育方

面发挥着重要作用,然而其对植物激素的串联反应鲜有研究涉及。

自从 *WRKY* 转录因子首次在兰科植物中被发现以来,关于 *WRKY* 基因的研究主要集中于生物学进展上,多项研究证实 *WRKY* 转录因子参与腺毛生长、种子萌发、果实成熟、叶片衰老等过程^[6–8]。Raineri 等研究表明,在水分胁迫下,*HaWRKY76* 转基因株系和野生型向日葵转基因植株表现出更强的抗逆性和更高的产量^[9]。王茹等发现,番茄 *SlWRKY6* 转录因子的过表达可诱导植株细胞壁螯合重金属,从而对植株重金属累积具有负调控作用^[10]。低温胁迫下,马铃薯 *StWRKY15* 基因的过表达可显著提高脯氨酸、可溶性糖、总蛋白含量,降低丙二醛分泌,从而减轻寒冷胁迫对植株带来的不利影响^[11]。在水稻中,*OsWRKY11* 可被热应激和转基因诱导上调表达,从而增强水稻幼苗对高温胁迫的耐受性^[12]。此外,*WRKY* 转录因子在病害^[13]、虫害^[7,14–15]等生物胁迫方面亦发挥着重要作用。

兰科是最大的被子植物之一,约占被子植物总量的 10%,在全世界约有 750 属 25 000 余种。目前关于兰科植物的研究主要集中在花朵发育、色素机制、菌根共生等方面^[16]。随着分子生物学技术特别是高通量测序技术的广泛应用,已经探索了兰科

收稿日期:2023–03–19

基金项目:河南省科技厅科技攻关重点研发与推广专项(编号:212102110188)。

作者简介:朱飞雪(1979—),女,河南平顶山人,硕士,讲师,主要从事园林植物育种与栽培研究。E-mail:heyu1126@163.com。

通信作者:郭 丽,硕士,副教授,主要从事植物育种和栽培研究。E-mail:guoli197979@163.com。

MADS-box、MYB 家族的全基因组特征和响应环境变化的功能分析^[17]。蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*) 是我国栽培的重要兰科植物,具有较高的观赏价值和经济价值。然而,该品种的过度挖取和生态环境恶化,使得蝴蝶兰种质资源和生存环境维护日趋严峻^[18]。WRKY 家族是植物中最大的超家族之一,然而对兰科植物 WRKY 转录因子的结构及功能却知之甚少。基于此,本研究从蝴蝶兰中克隆并分析了 *PaWRKY57* 基因,探索了该基因的理化特性、亚细胞定位、组织表达、响应脱落酸的功能分析,旨在为蝴蝶兰的育种和遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料处理

试验于 2021 年 6—10 月在河南农业职业学院人工气候室中进行。蝴蝶兰品种为满天红,为河南东宝绿化工程园林有限公司培养的二年生组培苗。供试野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 种子为拟南芥 Col-0 生态型,过表达拟南芥种子为 *PaWRKY57* 转化型,供试烟草品种为本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*),购自福州爱若莎生物科技有限公司。供试脱落酸 (ABA, C15H20O4) 购自 Sigma-Aldrich 化工试剂公司。供试培养基质为泥炭、蛭石按体积比 2:1 复配。

将二年生的蝴蝶兰组培苗置于 75% 相对湿度的人工气候室中培养,光—暗周期为 16 h—8 h,光照度为 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,昼、夜温度分别为 26、22 $^{\circ}\text{C}$;并在 0、2、4、8、12、24、48 h 取样保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 环境。用于瞬时转化的本氏烟草培养环境同蝴蝶兰组培苗。

将野生 Col-0 生态型拟南芥种子置于装满培养基质的钵体中,标记为 WT,基质含水量为 75%,转移至人工气候室中。相关过表达转化品系培养方式同 Col-0 生态型。对于过表达拟南芥的外源脱落酸处理:采用 10 mmol/L ABA 喷洒拟南芥的叶子直至滴落,并在处理后 0、12、24、48 h 取样。

1.2 WRKY 基因克隆及序列分析

1.2.1 WRKY 基因的克隆 采用 MiniBEST Plant RNA 提取试剂盒[TaKaRa,宝生物工程(大连)有限公司]对蝴蝶兰进行总 RNA 提取,采用 PrimeScript RT Master Mix 试剂盒[TaKaRa,宝生物工程(大连)有限公司]逆转录合成第一链 cDNA,将 cDNA 稀释 100 倍以适合 PCR 反应,引物由 Oligo5.0 软件根据

PaWRKY57 基因序列设计(表 1),并通过 RT-PCR 克隆全长 *PaWRKY57* 基因。PCR 反应程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,32 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量和纯度。将扩增的片段纯化并连接到 pEASYBlunt 载体,然后将该载体转化到 Trans5 α 细胞中,并测试其克隆阳性反应。

1.2.2 WRKY 基因的序列分析 通过 Expasy 系统 (http://web.expasy.org/compute_pi/) 在线预测氨基酸序列的物理和化学性质,包括分子量和等电点^[19]。使用 WOLF PSORT (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html) 对蛋白质亚细胞定位进行在线预测。使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对保守域进行在线预测。多序列比对通过 Clustal W (<http://www.clustal.org/clustal2/>) 和 DNAMAN5.0 软件(Lynnon Biosoft, <https://www.lynnon.com/dnaman.html>) 进行。AtWRKY 和 OsWRKY 转录因子的氨基酸序列从 TAIR 9.0 (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) 和植物转录因子数据库(<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>) 下载。采用 MEGA 7.0 软件的邻接法 (NJ) 构架系统发育树,bootstrap 设置为 1 000^[20]。

1.3 亚细胞定位测定

利用在线软件 Plant-mPLOC 9.0 (<http://linux1.softberry.com/all.htm>) 和 Cell-PLOC 2.0 软件^[21] (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLOC-2/>) 对蝴蝶兰 *PaWRKY57* 蛋白进行亚细胞定位。根据 *PaWRKY57* 序列设计不含有终止密码子 (ORF) 的 XbaI/SmaI 酶切位点特异性引物(表 1),并以蝴蝶兰 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,利用双酶切技术 (NEB) 将产物与 pBI121-绿色荧光蛋白 (GFP) 载体用 T3 连接酶连接,最终构建 pBI121-GFP:*PaWRKY57* 融合表达载体。将新鲜的表达载体转化到根癌农杆菌菌株 GV3101 中,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,在沉淀物中加入新鲜的烟草浸润缓冲液 (0.15 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 乙酰丁香酮、10 mmol/L MgCl_2 、10 mmol/L MES (吗啉乙磺酸),pH 值为 5.6),最终 $D_{600\text{nm}}$ 调节为 0.8。室温静置 2 h 后接种至 5 叶龄的健康本式烟叶表皮。采用共聚焦激光扫描显微镜 (LSM710, Carl Zeiss, Jena, 德国) 观察。

1.4 实时定量 PCR 分析

采用同基因克隆方式提取植物 RNA,合成 cDNA,使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (南京诺

唯赞生物科技股份有限公司)在 Step One Plus 实时 PCR 系统(Thermo Fisher, Waltham, MA, 美国)上进行 RT-qPCR 分析。反应程序如下:95 ℃ 5 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 40 个循环。在分析 *PaWRKY57*

的表达水平时,使用蝴蝶兰的 18S-1300 作为内参基因(表 1)。qRT-PCR 结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 算法进行相对表达量分析。

表 1 qRT-PCR 引物序列信息

功能类型	引物名	引物序列(5'→3')
基因克隆	<i>WRKY57</i> -F1	GAGAACACGGGACTCTAGAATGGCTTTGTCCTCTCT
	<i>WRKY57</i> -R1	ATAAGGGACTGACCACCCGGGACATCTTTGTCGGCC
荧光定量	<i>WRKY57</i> -F2	GAACCTTCATCCATTTCACGACC
	<i>WRKY57</i> -R2	TGAAGTGGTGGTTTCTCGTGTTT
亚细胞定位	<i>WRKY57</i> -F3	ATACACCAAATCGACTCTAGAATGGCTTTTGCTCCTCT
	<i>WRKY57</i> -R3	TATTTAAATGTCGACCCCGGGACATCTTTGTCGGCCTGGT
内参基因	<i>qUBI300</i> -F	AACGCTTTACAGCAAGAACGGAATG
	<i>qUBI300</i> -R	TAGGTCAGGCTGGTCACGAGGCT

1.5 *PaWRKY57* 的拟南芥植株转化

pBI121-35S: *PaWRKY57* 通过根癌农杆菌介导的花朵浸泡法转化拟南芥^[13]。感染拟南芥花朵 45~60 s 后,在黑暗中培养 20 h,在含有 50 mg/L 卡那霉素(C₁₈H₃₈N₄O₁₅S)的 MS 培养基上筛选转基因种子,并将传代植物用于进一步试验。

1.6 转化植株叶绿素含量及内源性技术含量测定

叶绿素含量(叶绿素 a、叶绿素 b)测定皆采用乙醇丙酮浸提法,采用紫外分光光度计(UV-1800, 上海美谱达仪器有限公司)在 663、646 nm 处测定,具体步骤参照李合生的方法^[22]。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定拟南芥叶片中内源激素脱落酸(ABA)、油菜素内酯(BR)、赤霉素(GA)、吲哚乙酸(IAA)的含量,具体步骤参考 Xu 等所述^[23]。

1.7 数据处理与统计分析

采用 Microsoft Excel 2020 对试验数据进行整理,采用 SPSS 23.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA),采用邓肯氏多重比较进行统计分析

($\alpha=0.05$),采用 Origin 2022 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 蝴蝶兰 *PaWRKY57* 基因克隆及蛋白质理化性质分析

以蝴蝶兰 cDNA 为模板用 *PaWRKY57* 的特异性引物 *PaWRKY57*-F/R 进行 PCR 扩增,然后采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到全长 2 049 bp 的特异性条带(图 1-A)。*PaWRKY57* 具有 1 个开放阅读框(ORF),编码 682 个氨基酸。利用 ExPASy 在线工具预测结果表明,*PaWRKY57* 蛋白的理论等电点为 6.17,分子质量为 76 416.43 ku,不稳定指数为 45.24,脂肪系数为 45.79,平均亲水性系数为 -0.906,显示 *PaWRKY57* 蛋白是一种不稳定的亲水蛋白。二级结构由 19.50% 的 α -螺旋、15.25% 延伸链、4.84% β -转角和 60.41% 的无规则卷曲结构组成(图 1-B)。

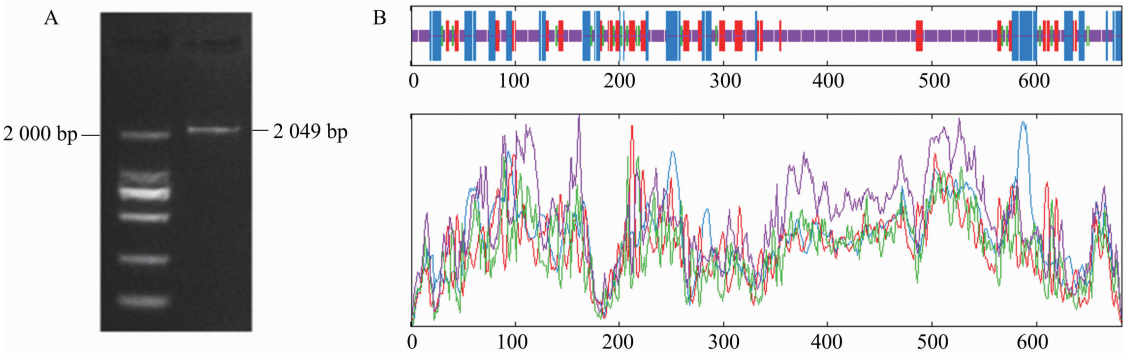


图1 蝴蝶兰 *PaWRKY57* 基因克隆条带分析及蛋白质理化性质分析

2.2 蝴蝶兰 *PaWRKY57* 基因序列和系统发育树分析

根据 SMART 在线工具分析,选取与 *PaWRKY57* 同源植物的 WRKY 保守结构域构建系统发育树。结果表明, *PaWRKY57* 与 WRKY 家族Ⅲ型的水稻 *OsWRKY45*, 拟南芥的 *AtWRKY30*、*AtWRKY41*、*AtWRKY53*、*AtWRKY70* 进行序列对比,发现其皆具有 WRKY 家族典型的“WRKYGQK”域,表明 *PaWRKY57* 属于Ⅲ型家族(图 2-A)。为进一步确

定 *PaWRKY57* 的分类地位,采用 MEGA 7.0 软件对 WRKY 之间的进化关系进行系统发育树分析,结果显示 13 个蝴蝶兰 WRKY 转录因子分别属于Ⅲ型 (*PaWRKY70*、*PaWRKY57*、*PaWRKY53*)、Ⅰ型 (*PaWRKY2*、*PaWRKY3*、*PaWRKY24*、*PaWRKY4*)、Ⅱa 型 (*PaWRKY40*)、Ⅱb 型 (*PaWRKY31*)、Ⅱc 型 (*PaWRKY49*)、Ⅱd 型 (*PaWRKY21*、*PaWRKY11*)、Ⅱe 型 (*PaWRKY65*)。总而言之,确定 *PaWRKY57* 属于Ⅲ型亚家族(图 2-B)。

A

亚家族Ⅲ

Pa WRKY 53	WRKYGQKDI LGAKFPRGYRCTYRHTHGCLATKQVQRSDDNSLFDTYRGAHTC	55
Pa WRKY 57	WRKYGQKEI FSAKYPRSYERCTHKFDQGCKASKQVQRSEDDPSSEFVI TYFGHTC	55
Pa WRKY 70	WRKYGQKEI FSAKYPRSYERCTHKFDQGCKASKQVQRSEDDPSSEFVI TYFGHTC	55
At WRKY 30	WRKYGQKDI LGAKFPRGYRCTYRKSQGCEATKQVQRSDENQMLEI SYRGLHSC	55
At WRKY 41	WRKYGQKDI LGAKFPRSYRCTFRNTQYCVATKQVQRSDGDPPTI FEVYTRGHTC	55
At WRKY 53	WRKYGQKDI LGAKFPRSYRCTHRS TQNCVATKQVQRSDGDPATFEVYTRGHTC	55
At WRKY 70	WRKYGQKEI LNAKFPRSYERCTHKYTGCKATKQVQKVELEPKMFSI TYI GNHTC	55
Os WRKY 45	WRKYGQKEI QNSKHPKAYRCTHKYDQMCTAQRQVQRCDPPAS YRVTYI GEHTC	55
共有序列	wrkygqk i k p y r c t c a q v q y g h c	

B

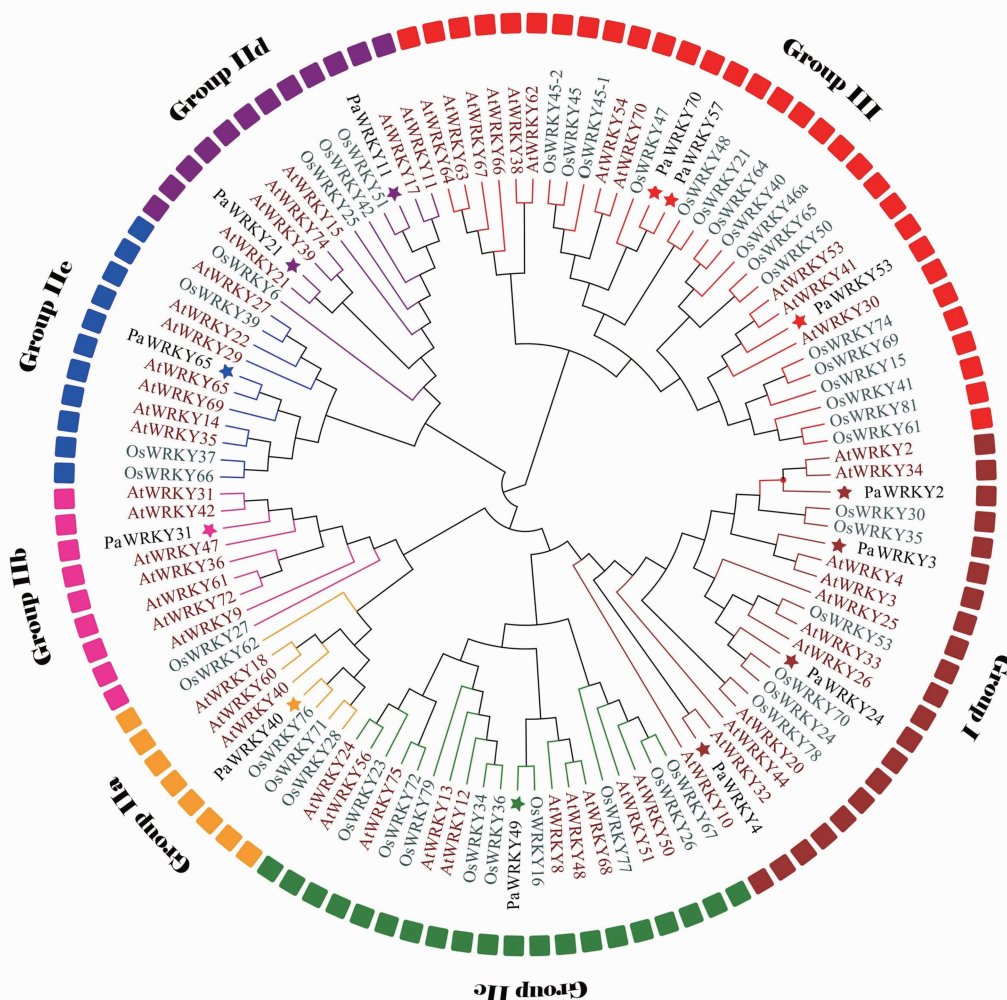


图2 蝴蝶兰 *PaWRKY57* 基因序列和系统发育树分析

2.3 *PaWRKY57* 在不同组织和 ABA 处理下的叶片表达模式

基因表达模式通常与基因功能密切相关。为了更好地了解 *PaWRKY57* 的功能,分析了其在蝴蝶兰不同组织(根系、假鳞茎、叶片、花朵)中的表达水平。结果表明,*PaWRKY57* 基因在所有组织中都有阳性表达,但在这 4 个器官中表现出不同的表达水平,其中在假鳞茎中表达水平最低,在叶片中相对

表达量最高(图 3 - A),表明 *PaWRKY57* 与叶片发育最为相关。作为一种植物激素反应因子,*PaWRKY57* 对外源性脱落酸反应强烈,喷施 ABA 后 *PaWRKY57* 的表达水平显著增加,并在处理后 2 h 达到峰值,而其在 12 h 的表达水平与 2 h 相当,此后急剧下降(图 3 - B),这种“升—降—升—降”的表达模式表明 *PaWRKY57* 与外源脱落酸之间存在较为复杂的调控关系。

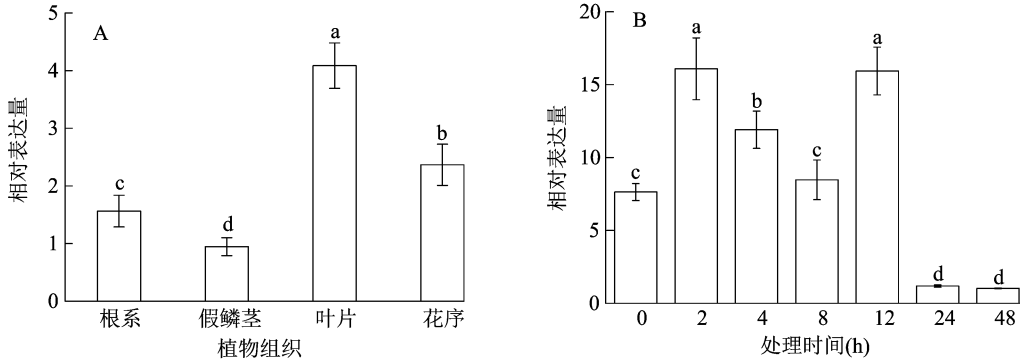


图3 *PaWRKY57*在不同组织和 ABA 处理下的叶片表达模式

2.4 *PaWRKY57* 的亚细胞定位

为了在蛋白质水平上探索 *PaWRKY57* 在细胞中的可能驻位点,借助在线分析工具 WoLF PSORT 预测了 *PaWRKY57* 蛋白的分布位置。如图 4 所示, *PaWRKY57* 可能存在于细胞核中;为了确定 *PaWRKY57* 的亚细胞准确位置,构建了一个

PaWRKY57 : GFP 融合蛋白,通过农杆菌介导浸润在本氏烟草中瞬时表达。结果表明,在激光共聚焦显微镜下,细胞核 DNA 被二脒基 - 2 - 苯基吡啶的蓝色荧光(DAPI)染色,*PaWRKY57* : GFP 绿色荧光与蓝色荧光大部分重叠,表明 *PaWRKY57* 位于细胞核内。

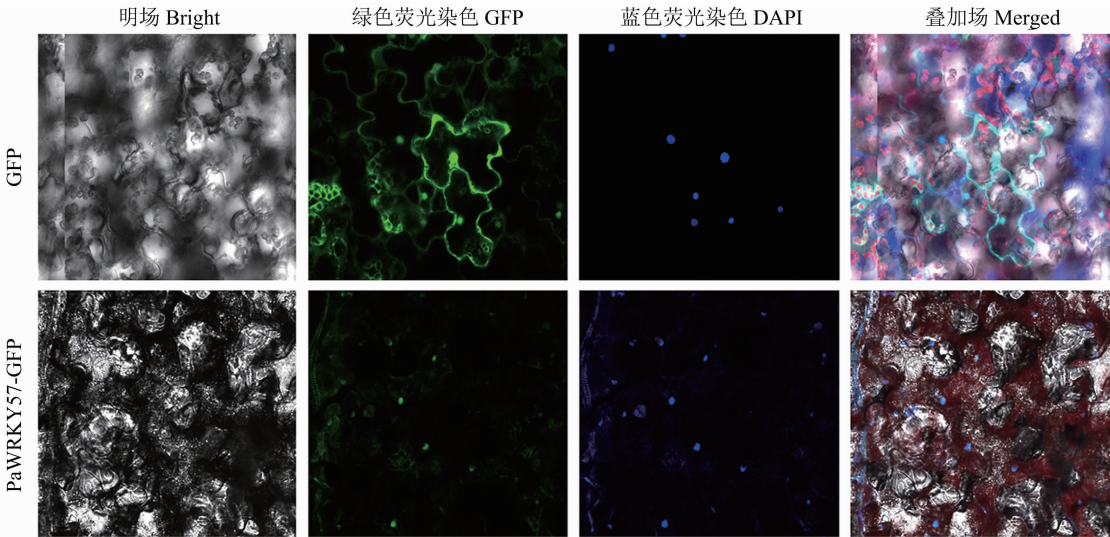


图4 *PaWRKY57* 的亚细胞定位

2.5 过表达 *PaWRKY57* 及响应 ABA 处理的表型分析

选择来自 T2 代的独立转基因系进行表型观察。通过观察拟南芥的整个生长周期,发现过表达

PaWRKY57 的转基因植株比野生生态型(WT)植株开花更早(图 5 - A),同时叶片衰老黄化更迅速(图 5 - B、图 5 - C),喷施 ABA 进一步加快了叶片的衰老;即相同培养周期内,过表达 *PaWRKY57* 或过表

达喷施 ABA 其叶形无明显变化,但叶黄化更明显。为此测定了植株叶片叶绿素含量,结果表明,*PaWRKY57* 过表达以及喷施 ABA 条件下均显著降低了拟南芥叶片叶绿素 a、叶绿素 b 含量(图 5 - D ~ E)。在叶绿素 a 与叶绿素 b 含量比值中,转基

因与野生型拟南芥无明显差异,且均显著低于 ABA + *PaWRKY57* 处理(图 5 - G)。综上,过表达 *PaWRKY57* 使植株生长史时间缩短,在此基础上喷施 ABA 则加速叶片衰老。

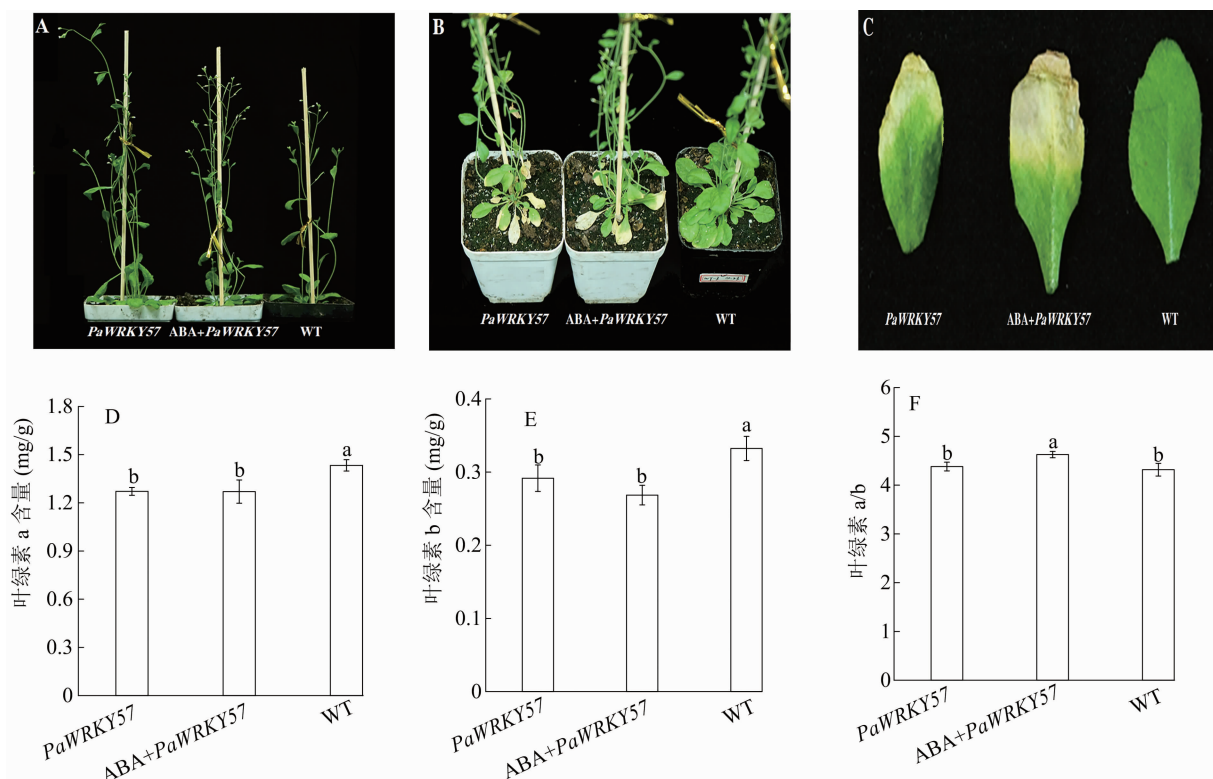


图5 ABA 处理与过表达 *PaWRKY57* 的表型观察及对叶绿素含量的影响

2.6 ABA 处理下过表达拟南芥叶片激素变化分析

由图 6 所示,在拟南芥的叶片中检测到了内源激素,包括脱落酸、赤霉素、油菜素内酯、吲哚乙酸。结果显示,脱落酸喷施处理下,转化拟南芥中的 ABA、GAs 含量呈相同变化趋势,即随着脱落酸喷施处理时间的延长,ABA、GAs 含量呈先升高后降低的趋势,脱落酸处理后各处理 ABA、GAs 含量均表现为 ABA + *PaWRKY57* > *PaWRKY57* > WT,且 ABA + *PaWRKY57* 均在处理后 12 h 出现峰值,此时 *PaWRKY57*、ABA + *PaWRKY57*、WT 间两两均差异显著(图 6 - A、图 6 - B)。而在脱落酸喷施处理后,各处理 BR 含量均呈上升趋势,且各处理 BR 含量均呈 WT > *PaWRKY57* > ABA + *PaWRKY57*(图 6 - C)。IAA 含量与 BR 含量存在相反变化趋势,即随着处理时间延长,IAA 含量均呈下降趋势,但同时各处理 IAA 含量均呈 WT > *PaWRKY57* > ABA + *PaWRKY57*(图 6 - D)。

3 讨论

蝴蝶兰为兰科 (Orchidaceae) 蝴蝶兰属 (*Phalaenopsis*) 多年生观赏性草本植物,蝴蝶兰以其花姿优美、叶色翠绿、香气馥郁、叶艺优雅等特点深受园艺爱好者喜爱^[24]。本研究从蝴蝶兰中克隆得到 *PaWRKY57* 蛋白,生物学信息表明:*PaWRKY57* 理论等电点为 6.17,分子质量为 76 416.43 ku,脂肪系数为 45.79,且不稳定指数大于 40(45.24)、平均亲水性系数为负值(-0.906)。根据 ExPASy 系统标准判别显示,*PaWRKY57* 蛋白是一种不稳定的亲水蛋白^[19]。

本研究序列对比分析表明,蝴蝶兰 WRKY 蛋白存在完整的 WRKYGQK 序列。前人研究发现不同植物 WRKY 转录因子的基序保守序列不同,而被子植物进化而来的 WRKY 蛋白发生突变、存在大概率事件^[25]。然而,本研究中 *PaWRKY57* 结构域的核心

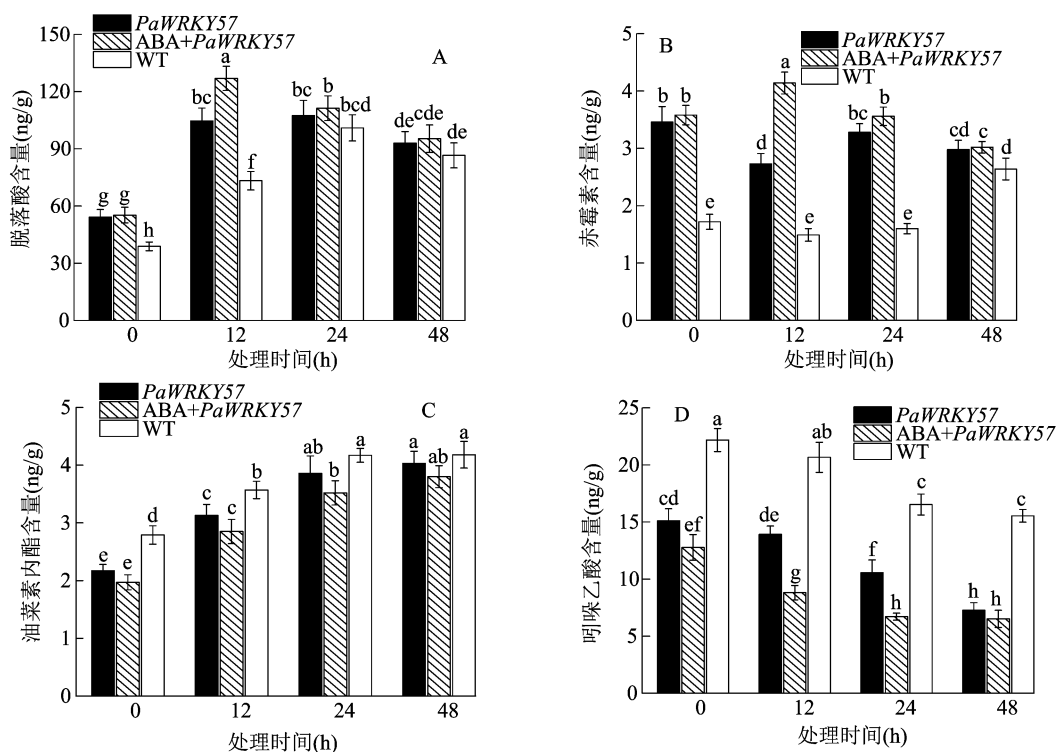


图6 ABA 处理与过表达 *PaWRKY57* 对植物激素含量的影响

序列不包含突变序列(图2-A),表明 *PaWRKY57* 结构域高度保守且其氨基酸序列在进化过程中没有发生大量变化。系统发育分析显示 *PaWRKY57*、*AtWRKY53* 等隶属于 WRKY 转录因子家族的Ⅲ型家族;而 *PaWRKY57*、*OsWRKY47* 同属一个小分支中,说明两者在功能上可能与水稻 *OsWRKY47* 相似。基于双酶切技术构建 pBI121-GFP: *PaWRKY57* 融合表达载体,双荧光染色分析显示在本氏烟叶叶片中 *PaWRKY57* 存在于细胞核内。

基因表达模式是反映基因功能表达导向的重要指标,在植物组织中高表达的 WRKY 家族往往主导该组织的生长发育^[26]。如编码拟南芥 WRKY 转录因子的 TESTA GLABRA2 (TTG2) 早期存在于种皮中,而进入生长期后则主要在叶片中表达^[27]。拟南芥 WRKY 转录因子家族的 37 个成员中有 32 个存在于叶片表达域中,表明 WRKY 在叶细胞成熟中发挥特殊作用^[28]。本研究,组织表达分析表明, *PaWRKY57* 在根系、假鳞茎、叶片、花序中均有表达,但在叶片中的表达水平显著高于其他组织,表明其在叶片相关生理调控中扮演着重要角色。脱落酸喷施处理下叶片 *PaWRKY57* 表现出“升—降—升—降”的表达模式,同时在喷施 ABA 后 *PaWRKY57* 基因在 2、12 h 具有最高的表达水平;双峰的表达模式

意味着 ABA 在诱导 *PaWRKY57* 的过程中可能存在多激素潮汐式的波动影响^[29]。

WRKY 转录因子在植物生长发育中的作用已被众多研究证实,最新的研究发现 WRKY 在植物叶片衰老、矮化等表型的形态建成方面起着关键作用^[30]。一些研究表明,拟南芥 *AtWRKY53* 在叶片衰老早期显著上调,其在转基因拟南芥植物中的过表达加速了叶片衰老进程,而沉默 *AtWRKY53* 则延缓了叶片衰老^[31]。Besseau 等研究发现,敲除 *AtWRKY54*、*AtWRKY70* 的双突变体植株衰老更快^[32]。为进一步研究 *PaWRKY57* 转录因子的功能,通过花浸泡法获得过表达 *PaWRKY57* 植株,与 WT 拟南芥相比,同一培养期内,过表达 *PaWRKY57* 的转基因植物开花提前且叶片黄化明显,表明该基因的过表达可能正调控植物的衰老过程。

ABA 是 WRKY 调控网络中的关键节点之一,在转录信号通路中充当催化剂或抑制剂^[33]。茶树的 *CsWRKY2* 基因在叶片中的表达量较高,ABA 信号通路通过调控 *CsWRKY2* 基因在植物对寒冷和干旱胁迫的响应中发挥重要作用^[34]。铁皮石斛的 *DoWRKY5* 抑制 *ABI5* 基因响应 ABA 的表达,并与 ABAR 调节因子负调控 ABA 信号转导通路^[35]。本研究中,在转基因植株上喷施 ABA,转基因植株叶

片黄化加剧、叶绿素 a/b 含量比值更高;此外,液相色谱分析显示,喷施 ABA 条件下过表达植株抑生型激素(ABA、GAs)含量更高,而促生长激素(BR、IAA)含量更低。表明 *PaWRKY57* 是一个衰老基因且对 ABA 反应敏感,ABA 作为促进剂正向调控着 *PaWRKY57* 的功能表达。

4 结论

本研究表明,蝴蝶兰 *PaWRKY57* 是一种不稳定的亲水性蛋白,具有一个开放阅读框(ORF),编码 682 个氨基酸。亚细胞定位显示,*PaWRKY57* 蛋白位于细胞核中,根据其预测的亚细胞定位可能在细胞内发挥作用。结构域分析和同源性比较表明,*PaWRKY57* 蛋白具有 WRKYGQK 结构域,属于 WRKY 家族 III 型家族,系统发育分析表明 *PaWRKY57* 与水稻 *OsWRKY47* 在生物学功能上密切相关。实时荧光 PCR 分析显示,*PaWRKY57* 在根系、假鳞茎、叶片、花序中表达,在叶片中表达量最高,且在 ABA 处理下波动较大。与野生型拟南芥品系(WT)相比,*PaWRKY57* 过表达品系的生育周期缩短、叶片黄化严重、叶绿素含量降低、促生型植物激素含量降低、抑生型植物激素含量增加。综上,*PaWRKY57* 是一个响应 ABA 信号的转录因子,可能参与了 ABA 信号介导调控的蝴蝶兰衰老过程。期待研究结果可为进一步研究 *PaWRKY57* 的功能和为未来蝴蝶兰的遗传改良与培育提供理论依据。

参考文献:

- [1] 刘 晏,李俊德,李家儒.脱落酸和赤霉素调控种子休眠与萌发研究进展[J]. 生物资源,2020,42(2):157-163.
- [2] 李钱峰,鲁 军,余佳雯,等.油菜素内酯与脱落酸互作调控植物生长与抗逆的分子机制研究进展[J]. 植物生理学报,2018,54(3):370-378.
- [3] Rinerson C I, Rabara R C, Tripathi P, et al. The evolution of WRKY transcription factors[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15:66.
- [4] Yang Y, Liu J, Zhou X H, et al. Identification of WRKY gene family and characterization of cold stress - responsive WRKY genes in eggplant[J]. PeerJ, 2020, 8:e8777.
- [5] Rashad Y M, Abdel Razik E S, Darwish D B. Essential oil from *Lavandula angustifolia* elicits expression of three SbWRKY transcription factors and defense - related genes against sorghum damping - off[J]. Scientific Reports, 2022, 12:857.
- [6] Zou X H, Dong C, Liu H T, et al. Genome - wide characterization and expression analysis of WRKY family genes during development and resistance to *Colletotrichum fructicola* in cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(6):1658-1672.
- [7] 徐金鹏,祁亚男,于延冲.盐、干旱胁迫对拟南芥 *WRKY71* 基因突变体种子萌发的影响[J]. 山东农业科学, 2020, 52(3):34-37.
- [8] Yuan Y, Ren S Y, Liu X F, et al. *SlWRKY35* positively regulates carotenoid biosynthesis by activating the MEP pathway in tomato fruit [J]. New Phytologist, 2022, 234(1):164-178.
- [9] Raineri J, Ribichich K F, Chan R L. The sunflower transcription factor *HaWRKY76* confers drought and flood tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants without yield penalty[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(12):2065-2080.
- [10] 王 茹,陈 超,于丽杰,等.番茄 *SlWRKY6* 基因克隆及其在重金属胁迫下的表达分析[J]. 华北农学报, 2021, 36(1):54-62.
- [11] 冯月娟,杨振红,王 芳.马铃薯 *SlWRKY15* 在转基因烟草的耐寒性分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(21):7101-7112.
- [12] Wu X L, Shioto Y, Kishitani S, et al. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing *OsWRKY11* under the control of *HSP101* promoter [J]. Plant Cell Reports, 2009, 28(1):21-30.
- [13] 贾志强,许云玉,高 雪,等.辣椒 *CaWRKY30* 转录因子的克隆、亚细胞定位及番茄斑萎病毒侵染下的表达分析[J]. 华北农学报, 2022, 37(3):186-192.
- [14] Hu L, Wu Y, Wu D, et al. The coiled - coil and nucleotide binding domains of BROWN PLANTHOPPER RESISTANCE14 function in signaling and resistance against planthopper in rice[J]. The Plant Cell, 2017, 29(12):3157-3185.
- [15] Zhang J Y, Huang S N, Mo Z H, et al. *De novo* transcriptome sequencing and comparative analysis of differentially expressed genes in kiwifruit under waterlogging stress [J]. Molecular Breeding, 2015, 35(11):208.
- [16] 单婷婷,陈彤垚,陈晓梅,等.菌根真菌与兰科植物氮营养关系的研究进展[J]. 植物生态学报, 2022, 46(5):516-528.
- [17] 欧 悦,陈明望,柯玉洁,等.基于 CiteSpace 兰科植物功能基因的研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(3):654-669.
- [18] 曲晓慧,张宇宁,刘 晨,等.不同低温与肥水处理对蝴蝶兰生长及开花的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(12):168-172.
- [19] Wei W, Hu Y, Han Y T, et al. The WRKY transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*: identification and expression analysis under biotic and abiotic stresses [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2016, 105:129-144.
- [20] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7):1870-1874.
- [21] Chou K C, Shen H B. Plant - mPLOC: a top - down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization[J]. PLoS One, 2010, 5(6):e11335.
- [22] 李合生.植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社, 2000:212-215.
- [23] Xu Z H, Li F, Li M, et al. Functional analysis of ARF₁ from *Cymbidium goeringii* in IAA response during leaf development[J]. PeerJ, 2022, 10:e13077.

李 雷,王 悦,李晓悦,等. 哈萨克羊骨骼肌差异表达基因的筛选及功能分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(18):62-67.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.18.009

哈萨克羊骨骼肌差异表达基因的筛选及功能分析

李 雷,王 悦,李晓悦,刘开平,戴继鸿,李村院,胡圣伟

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003)

摘要:骨骼肌是家畜重要的器官,直接影响家畜的产肉量和品质。骨骼肌的生长取决于胎儿期纤维的数量和成年期的肥大程度,因此,研究骨骼肌胎儿期发育时的调控基因有助于改善家畜的生产性能。利用 RNA-seq 技术分析胎儿期和成年期哈萨克羊骨骼肌的转录组数据,筛选出 2 692 个差异表达基因。对差异表达的基因使用 GO 和 KEGG 富集分析发现,被显著富集的包括细胞周期、钙信号通路、cGMP-PKG 信号通路、p53 信号通路、ECM-受体相互作用、PI3K-Akt 信号通路等在调控骨骼肌生长发育中发挥重要功能的信号通路。且本研究筛选了 5 个与肌肉发育相关的候选基因: *POSTN*、*MYL4*、*ARHGAP36*、*BCAT1* 和 *FBN2*。不仅为绵羊的分子选育提供科学依据,并且为肌肉生长机制的深入研究、提高绵羊生产性能打下良好基础。

关键词:绵羊;骨骼肌;转录组;胎儿期;成年期

中图分类号:S813.3;S826.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)18-0062-06

绵羊由于其具有能够为人们提供毛、皮、肉、奶等各类产品的优势,目前已成为我国乃至世界上具有重大经济价值的家畜动物之一^[1]。同时,作为畜

牧业大省,绵羊是新疆维吾尔自治区畜牧业发展的重要家畜之一,也是当地牧民的主要收入来源^[2]。近些年,随着经济的快速发展,人们对含有较高水平必需氨基酸和较低水平胆固醇的羊肉的需求愈来愈大。虽然我国是世界上最大的羊肉生产和消费大国,但与肉羊养殖业发达的国家相比,我国绵羊有羊肉品质不高、产肉率低、生长速度慢等缺点,这均对我国绵羊养殖行业的可持续发展有着不可忽视的制约作用^[3]。因此,选育出高产肉量和高肉质性状的肉羊品种是我国畜牧工作者不懈的追求。

收稿日期:2022-12-19

基金项目:新疆生产建设兵团科技攻关计划项目(编号:2019AB034、2021CB033)。

作者简介:李 雷(1995—),男,山西长治人,硕士,研究方向为动物学。E-mail:2390235140@qq.com。

通信作者:李村院,博士,研究方向为动物遗传育种与繁殖,E-mail:3180869341@qq.com;胡圣伟,博士,教授,研究方向为肠道微生物功能基因挖掘,E-mail:hushengwei@163.com。

[24] 吴 婷,贾瑞冬,杨树华,等. 蝴蝶兰多倍体育种研究进展与展望[J]. 园艺学报,2022,49(2):448-462.

[25] Mohanta T K, Park Y H, Bae H H. Novel genomic and evolutionary insight of WRKY transcription factors in plant lineage [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37309.

[26] Yu F F, Huaxia Y F, Lu W J, et al. GhWRKY15, a member of the WRKY transcription factor family identified from cotton (*Gossypium hirsutum* L.), is involved in disease resistance and plant development[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12(1):144.

[27] Liu B, Jiang Y Z, Tang H, et al. The ubiquitin E3 ligase SRI1 modulates the submergence response by degrading phosphorylated WRKY33 in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2021, 33(5):1771-1789.

[28] Xiang X Y, Chen J, Xu W X, et al. Dehydration-induced WRKY transcriptional factor *MjWRKY70* of *Myrothamnus flabellifolia* enhanced drought and salinity tolerance in *Arabidopsis* [J]. Biomolecules, 2021, 11(2):327.

[29] Shu P, Zhang S J, Li Y J, et al. Over-expression of *SlWRKY46* in

tomato plants increases susceptibility to *Botrytis cinerea* by modulating ROS homeostasis and SA and JA signaling pathways [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2021, 166:1-9.

[30] 黄 幸,丁 峰,彭宏祥,等. 植物 WRKY 转录因子家族研究进展[J]. 生物技术通报,2019,35(12):129-143.

[31] Miao Y, Laun T, Zimmermann P, et al. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 55(6):853-867.

[32] Besseau S, Li J, Palva E T. WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(7):2667-2679.

[33] 杨 阳,李玥莹,张 颖. WRKY 转录因子与脱落酸在调控低温中的作用[J]. 中国农学通报,2017,33(29):31-35.

[34] Wang T, Song Z, Wei L, et al. Molecular characterization and expression analysis of WRKY family genes in *Dendrobium officinale* [J]. Genes & Genomics, 2018, 40(3):265-279.

[35] 赵 俊,孙时伟,孟灿灿,等. 铁皮石斛转录因子基因 *DoWRKY1* 的克隆与表达分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(14):2807-2813.