

## 细叶百合 *LpWRKY20* 基因的克隆和表达分析

杨柳慧<sup>1</sup>, 汪 王<sup>1</sup>, 刘艳秋<sup>2</sup>, 杨伊如<sup>1</sup>, 周蕴薇<sup>1\*</sup>

(1. 东北林业大学 园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150000; 2. 江西环境职业工程学院, 江西 赣州 341000)

**摘要:**从细叶百合(*Lilium pumilum*)中克隆得到 *LpWRKY20* 基因,该基因 ORF 全长为 1 899 bp,编码 632 个氨基酸,属于 WRKY 家族 Group1;蛋白相对分子量约为 68.36 ku,理论等电点为 5.45,为亲水性蛋白没有跨膜结构;同源氨基酸序列分析显示与海枣(*Phoenix dactylifera*)同源性达到 62%;亚细胞定位显示其在细胞核内表达,具有一般转录因子特性。qRT-PCR 分析显示随着鳞茎低温(4℃)储藏时间的增加,该基因的表达量逐渐升高并且在 S4 时期达到最大,表明其参与调控百合鳞茎休眠解除进程,为进一步了解该基因功能奠定基础。

**关键词:**细叶百合;休眠解除;WRKY 转录因子;克隆

中图分类号:S682.265

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2019)03-0104-07

### Cloning and Expression Analysis of *LpWRKY20* Gene from *Lilium pumilum*

YANG Liu-hui<sup>1</sup>, WANG Wang<sup>1</sup>, LIU Yan-qiu<sup>2</sup>, YANG Yi-ru<sup>1</sup>, ZHOU Yun-wei<sup>1\*</sup>

(1. College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150000, Heilongjiang, China;

2. Jiangxi Environmental Engineering Vocational College, Ganzhou 341000, Jiangxi, China)

**Abstract:** The *LpWRKY20* gene was cloned from *Lilium pumilum*, the complete ORF of this gene was found to be 1 899 bp, encoding 632 amino acids, belonging to the WRKY family Group 1; the relative molecular weight of the protein was about 68.36 ku, and the theoretical isoelectric was 5.45, it was hydrophilic protein with no transmembrane structure; the amino acid sequence had a homology of 62% with the *Phoenix dactylifera*; subcellular localization showed that it was expressed in the nucleus and had general transcription factor characteristics. qRT-PCR analysis showed that the expression of this gene gradually increased with the increase of bulb low temperature (4℃) storage time and reached the maximum in S4 period, indicating that it was involved in the regulation of dormancy release process. The study lays a foundation for further understanding of the gene function.

**Key words:** *Lilium pumilum*; dormancy release; WRKY transcription factor; cloning

细叶百合(*Lilium pumilum*)又名山丹,属于百合科百合属,其花下垂,花被片反卷,花朵娇艳,是重要的观赏性花卉,是百合抗性育种的重要亲本<sup>[1]</sup>。细叶百合在寒冷条件下可以自然露地越冬,地上植株秋季枯萎后地下鳞茎自发休眠,鳞茎需低温春化作用才能解除休眠。前期研究表明,百合鳞茎在 4℃低温储藏期间,随着储藏时间的延长休眠逐渐解除,在休眠解除转录组中发现 WRKY 转录因子在 4

个时期差异基因显著富集,且呈现复杂的差异变化趋势<sup>[2]</sup>;伴随着这个过程涉及众多的代谢相关、激素调控以及信号转导的等基因的活化和互作<sup>[3]</sup>。以往的研究发现一些基因可以介导与休眠相关的非生物胁迫从而影响植物的生长,如 *DELAY OF GERMINALION 1(DOG 1)* 参与低温从而增强休眠<sup>[4]</sup>; *MOTHER OF FT AND TFL1(MFT)* 基因可以调节拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和小麦(*Triticum*

收稿日期:2018-08-24 修回日期:2018-11-21

基金项目:国家自然科学基金(31470698)。

作者简介:杨柳慧,女,在读硕士,研究方向:园林植物种质资源。E-mail:1045793516@qq.com

\*通信作者:周蕴薇,女,教授,研究方向:园林植物种质资源。E-mail:dlzhyw@126.com

*aestivum*) 的萌发<sup>[5-6]</sup>, 但其在 ABA 信号转导途径中为负反馈的调节机制<sup>[7]</sup>。 *C-repeat binding factors* (CBFs) 是响应低温胁迫的转录因子, 其转录水平在低温条件下迅速增加, 且过表达 CBF 可提高植物对寒冷的耐受性<sup>[8]</sup>。在休眠及其解除的过程中往往伴随着逆境胁迫, 转录因子能通过调节其下游靶基因帮助植物适应恶劣的环境。WRKY 家族中多个成员被证实通过与 ABA 受体相互作用介导 ABA 信号途径, 参与休眠调控, 例如 *AtWRKY18*、*AtWRKY40* 和 *AtWRKY60* 基因敲除的突变体与野生型相比萌发推迟<sup>[9]</sup>; 同样 *AtWRKY2* 的突变体与野生型相比, 也表现为萌发推迟, 推测其负向调节 ABA 介导休眠; 然而 *AtWRKY41* 基因的缺乏则会降低种子的 ABI<sub>3</sub> 的转录丰度, 从而减少种子的初级休眠和热抑制<sup>[10]</sup>。

WRKY 转录因子广泛存在于植物中, 拟南芥中有 72~74 个<sup>[11-12]</sup>, 水稻 (*Oryza sativa*) 中有 109 个, 而动物中缺乏这类转录因子<sup>[13]</sup>。该家族成员包含 60 个氨基酸组成的 WRKY 结构域, 其特征为 N 端高度保守的 WRKYGQK 基序和 Cys 2 His 2 或 Cys 2 HisCys 锌指结构<sup>[14]</sup>。根据所含 WRKY 结构域数量以及锌指结构的特点将 WRKY 转录因子分为 3 组(Group), Group 1 含有 2 个 WRKY 结构域, Group 2、Group 3 只含有 1 个 WRKY 结构域, 其中 Group 1 和 Group 2 锌指结构为 Cys 2 His 2, Group 3 锌指结构为 Cys 2 HisCys<sup>[15]</sup>。WRKY 转录因子通过 WRKY 结构域与下游目标基因启动子区的 W-box((C/T)TGAC(T/C)) 进行特异性结合从而调控目标基因的表达<sup>[14,16]</sup>。研究表明, WRKY 转录因子参与植物多种生理生化过程<sup>[14]</sup>。

前期研究发现, 无论是从细胞结构和鳞茎形态上的变化还是鳞茎内部的能量交换均表明, 低温储藏 90 d 时鳞茎的休眠完全解除, 0~30 d 鳞茎处于深休眠状态, 30~60 d 休眠逐渐解除<sup>[17-18]</sup>。本研究在已有百合休眠解除转录组的基础上, 对参与休眠解除过程中的 WRKY 差异表达基因进行筛选, 克隆得到 *LpWRKY20*。初步了解该基因在休眠解除过程中的调控作用, 为继续研究该基因的功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以东北林业大学园林学院苗圃引种野生细叶百合鳞茎为材料, 置于 4℃ 冰箱中冷藏处理, 以处理阶段第 0、30、60、90 天的鳞茎样品分别标记为 S1、S2、S3、S4 时期<sup>[19]</sup>, 构建休眠解除转录组, 每组设置 3

个重复, 转录组前期已构建完成<sup>[2]</sup>。

### 1.2 细叶百合总 RNA 提取与 cDNA 合成

总 RNA 提取使用试剂盒(天根)并依照说明进行, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 的完整性和纯度。反转录使用 TaKaRa 试剂盒, 合成 cDNA 第 1 链。

### 1.3 *LpWRKY20* 基因克隆及序列分析

从细叶百合休眠解除转录组 cDNA 文库中获得该基因最大开放阅读框(ORF), 利用 primer 5.0 设计特异性上下游引物 *LpWRKY-F* ACTTC-CCCCTCTCAATGTCG; *LpWRKY-R* CTACG-GCCCCATCACCATAT。以反转录 cDNA 为模板, 参照 KOD-Plus-Neo (东洋纺) 说明书克隆基因, 反应体系见表 1。采用三步法进行扩增, 反应程序见表 2。反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收目的片段, 与 pTA2 Vector(东洋纺) 载体连接, 利用大肠感受态 DH5 $\alpha$  将连接产物转化, 对其进行 PCR 并将阳性克隆送往博仕生物公司测序。

表 1 PCR 扩增反应体系

Table 1 PCR amplification reaction system

组分	体积/ $\mu$ L
distilled water	15.5
10 $\times$ PCR Buffer for KOD-Plus-Neo	2.5
2 mM dNTPs	2.5
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2
<i>LpWRKY-F</i> / <i>LpWRKY-R</i>	0.75
cDNA	0.5
KOD-Plus-Neo	0.5

表 2 PCR 扩增反应程序

Table 2 PCR amplification reaction procedure

反应步骤	反应条件
预变性	94℃ 2 min
变性	98℃ 10 s
退火	65℃~0.5℃/cycle 30 s
延伸	68℃ 1 min
最终延伸	72℃ 10 min
4℃	4℃ 保存

### 1.4 *LpWRKY20* 基因序列分析及其生物信息学分析

将测序结果与细叶百合休眠解除转录组数据库获得的 *LpWRKY20* 序列进行比对, 利用 NCBI 在线软件 Conserved Domains Search Service (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对基因保守结构域进行预测, DNA-MAN 软件推测基因编码的氨基酸序列, 利用 BlastX (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行同源序列比对, 并用 MEGA 7.0 构建系统进化树; 利用

ProtParam、TMHMM、SignalP、Plant-PLoc server 2.0 等分析软件对其蛋白进行生物信息学分析。

### 1.5 *LpWRKY20* 在不同休眠时期的表达

以 lilyActin(GenBank 登录号:JX826390) 基因作为内参<sup>[20]</sup>, 4 个时期(S1、S2、S3、S4)总 RNA 的反转录产物稀释 10 倍作为荧光定量模板, 使用 SYBR Green(TOYOBO)为荧光染料, 在 Roche LightCycler96 上进行 qRT-PCR, 反应程序见表 3。每组 3 个重复, 以 S1 时期表达量为对照, 利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算 *LpWRKY20* 基因在休眠不同时期的相对表达量并分析差异性, 使用 Excel 和 SPSS 进行数据分析。

表 3 PCR 三步法扩增

Table 3 Three-step PCR amplification

反应步骤	反应条件
预变性	95°C 30 s
三步法	95°C 5 s
	57°C 15 s 40 cycles
	72°C 30 s
溶解	95°C 10 s
	65°C 60 s
	97°C 1 s
冷却	37°C 30 s

### 1.6 pBI121-*LpWRKY20*-GFP 植物表达载体

以测序比对正确的 *LpWRKY20* 质粒为模板, 设计添加特异性酶切位点 Kpn I 和 Spe I (*LpWRKY20*-F: GGTACCATGTCGGAAAATCC 和 *LpWRKY20*-R: ACTAGTCGGCCCCATCACCA) 进行 PCR 扩增反应。对已添加酶切位点的中间表达载体和带有 GFP 绿色荧光蛋白的 pBI121-MCS-GFP 载体分别经 Kpn I + Spe I (NEB) 双酶切 37°C 45 min, 酶切体系如表 4。琼脂糖凝胶电泳回收后 T4 连接酶过夜连接, 构建 pBI121-*LpWRKY20*-GFP 植物表达载体。

表 4 双酶切体系

Table 4 Double digestion system

组分	体积/ $\mu$ L
pTA2- <i>LpWRKY20</i> /pBI121-MCS-GFP	9
KpnI+SpeI	2
Cut Smart Buffer	2
distilled water	7

### 1.7 亚细胞定位

采用基因枪法, 将以构建的 pBI121-*LpWRKY20*-GFP 融合表达载体和 pBI121-MCS-GFP 空载转入洋葱表皮细胞, 28°C 暗培养 12~16 h, 在荧光显微镜下观察其表达情况, 方法参照“GJ-1000 高压气体基因枪”说明书。

## 2 结果与分析

### 2.1 *LpWRKY20* 基因的克隆

采用天根试剂盒提取 RNA, 所得 RNA 条带清晰、完整性好, D260/D280 在 1.8~2.0, 无蛋白污染, 符合后续试验要求。以第 1 链 cDNA 为模板, 获得目的基因扩增片段, 结果显示, 在 2 000 bp 处有 1 条清晰条带(图 1)。将获得的拼接结果与已知 ORF 序列比对, 结果吻合。该基因 ORF 长度为 1 899 bp, 预测编码氨基酸 632 个氨基酸(图 2)含有 2 个 WRKY 结构域(图 3), 属于 WRKY 家族 Group 1。

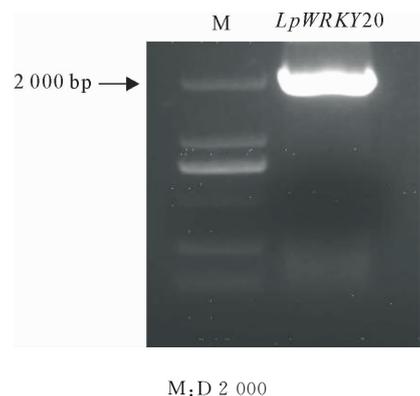


图 1 *LpWRKY20* 基因扩增片段

Fig. 1 The amplified fragment of *LpWRKY20*

### 2.2 *LpWRKY20* 生物信息学分析

通过 NCBI 上 Blastx 对 *LpWRKY20* 进行同源序列比对, 发现该序列与海枣(*Phoenix dactylifera*) 同源性较高达到 62%, 与其他物种油棕(*Elaeis guineensis*)、铁皮石斛(*Dendrobium catenatum*)、芭蕉(*Musa acuminata*)、菠萝(*Ananas comosus*)、小兰屿蝴蝶兰(*Phalaenopsis equestris*)、荷花(*Nelumbo nucifera*)、高粱(*Sorghum bicolor*)等也具有较高的同源性, 将 *LpWRKY20* 推测的氨基酸序列与这些物种的 WRKY 蛋白序列利用 DNAMAN 软件对多序列比对, 一致性达到 62.34%。同源物种间进化树结果显示, 细叶百合 *LpWRKY20* 蛋白与海枣和油棕亲缘关系最近(图 4)。将该基因命名为 *LpWRKY20*(GenBank 登录号:MK085063)

利用 ProtParam 软件分析显示, 该蛋白分子量为 68.36 ku, 理论等电点为 5.45, 分子式为  $C_{2933}H_{4550}N_{866}O_{974}S_{26}$ , 正负电荷残基总数分别为 77 和 56, 表明其在中性环境中带正电, 亲水性平均系数为 -0.813, 不稳定系数为 46.63, 为不稳定蛋白, 其中丝氨酸含量最高, 占 10.1%, 其次为甘氨酸(9.7%)和脯氨酸(9.3%)。

```

1  ATGTCGAAAAATCCCGCCGACCCGGAGAGCCCGCGGGCGGTGCGCCGGAGGATGCTCCT  961  CAAGGAGAGAAAGGCCTGACGATTTTCTCCATTAAGTCATAGTACAGATAAGCCATCA
1  M S E N P A D T G E P G G G A P E D A P  321  Q G E E R P D D F P P L S H S T D K P S
61  CCACACCAGGAGCTCGGGTTCGAGGCTTCGGGGCGCTCCGGGAGGGCGGATCCGAGG  1021  AATGCGCATGGTCAGACATCTCATCATTGATCCCAATGGTACTCAGGAGCTATCTCCT
21  P P P E L R F E G F G G A P G R A D P R  341  N A H G Q T S H H I D P N G T Q E L S P
121  GTCTCTCGCTCGCCGGCGCAAGGTACAAGCGGATGTCGCGGGCGGCTCCCGATC  1081  GTTCTATAAGTGATGATGAACAAGAAGTTGGAGGTGGCCAGTCCAAACCATATTTGGTGAT
41  V S S L A G G A R Y K A M S P A R L P I  361  V S I S D D E Q E V G G G Q S N H I G D
181  ACTCGTTCGCAATCGTACCATCCCGGGGTCAGTCCCTCGGCGTCTCGAGTCC  1141  GTTGGTGGTATGATGATGACGATGATCCAGAATCTAAACGAGGAAAAGGATGGTGT
61  T R S P C V T I P P G F S P S A L L E S  381  V G G D D D D D D P E S K R R K K D A V
241  CCGTCTCTCCACCAACATCAAGGAGAGGCTTCCCAACACCGGAACTTCTCAATG  1201  ACTATTGATGCTACTCTCTCGGTAACACTAACCGGAAACACGTTGTTGTACAACC
81  P V L L T N I K A E P S P T T G T F S M  401  T I D A T P L G K P N R E P R V V V Q T
301  CCTTCAGTACAAATAACAGTAACACTTATCTTCCCAAGGATGCTTCAAATTACAAT  1261  ATAAGTGAAGTTGATATCTGGATGATGGTATCGCTGGCGCAAAATAGGGCAGAAGTT
101  P S V T N N S N T L S S P R D A S N Y N  421  I S E V D I L D D G Y R W R K Y G Q K V
361  GCATTGATAATGGGATCCTGGGTGATTTGAGTTAAACACATGTTTGGCCGCAATG  1321  GTAAAAGGGAATCAAATCCAAGGAGCTACTACAAATGCACAAATGCTGGATGCCCGTC
121  A F D N G I L G D F E F K P H V W P A M  1381  AGGAAACATGTGGAGAGGGCGTCAAATGATCCAAAAGCAGTAAATAACACATATGAAGGC
421  AGTTCAGGCTTCTCTCTTTAGGCGCTCTGGTGTAGCTGCAACAGCCAGAAAAAC  461  R K H V E R A S N D P K A V I T T Y E G
141  S S G F S S L R P L G C V S S N S Q E N  1441  AAGCACAACCATGACGTACCTGTGGCGAGGAATATCAACATGACACATCCACAAAAATG
481  GTAOCCTACACAGATGCAAGCCAACTACTCCCACTGTGTTAATGGTGTGGAGGAT  481  K H N H D V P V A R N I N H D T S T Q Q
161  V P Y T Q M Q S Q T T P Q S V N G V E D  1501  TTCAAGGACGGTGGTGGCAATGCTCTTAAACCAAGATGTCGTTAGCCCTAAGTAATATG
541  ATAGTCACTCTTCTCATGCACTGCTTTATCGATACCAGCTTCAAATCCACCGATTGAA  501  F K D G G G N A L N N R M S L A L S N M
181  I V H S S H A L S L S I P A S N P P I E  1561  CTGAGGACCTCGGACCCAGTGGCCACCTCAAACCTTATGCTCAACCGGATGAAAGCGAT
601  ACTTACTCTGAGGCAATGAACCTGCTGAAGTTGCGATGGAGGACAGCACAACCATCA  521  L R T C D P V G T S N P Y A Q P D E S D
201  T S T L E A N E P A E V A M D E A Q P S  1621  AGAATTAGCTCGATTTGGCGTGGTGGGACTTAATGAACATCAACAGGCACAACAA
661  ATGGGCTTTGAGAATGGTACACAGGACAGCTCCCTGAACTAATGGATCTGCTCTCTG  541  R I S L D L G V G V G L N E H Q Q A Q Q
221  M G F E N G T Q A A L P E T N G S A S L  1681  GACCGAGGACAAGCCATAACCATCAGATGCAAGTTCGATTATAATAACATGGTAATG
721  TCTGTAGTGGAGAAGTATCAGATGGATACAACCTGGAGAAAATATGGACAGAAACAT  561  D R G Q A H N H Q M Q P S D Y N N M V M
241  S V V E K S S D D G Y N W R K Y G Q K H  1741  CAAGGGATTCCGAGAAATCAATTTATGGTGGCTCAGTAAATGGTATGATGGTCTGGAA
781  GTGAAGGGAAGTGAATTTCTAGAAGCTATTACAAGTGACACATCCAAATGCCAAATG  581  Q G I P R N S I Y G G S V N G M Y G P G
261  V K G S E F P R S Y Y K C T H P N C Q M  1801  GAAGCACAAGGAGGAGGTTTCATTTAATCCCGCAATAAACCATCTGAAAACCTA
841  AAAAAAGCATTTCGACGCTCTCTTGCAGTCAGATAACAGAGATTATATATAAGGCAGG  601  E D K G E G F S F N P Q P I N H S E N L
281  K K H L E R S L D G Q I T E I I Y K G R  1861  TATTACTCGAATGCAAGAAATATGGTATGGGGCCGTAG
901  CACGATCATCTAAGCCTCAGCCAGTCGCGGAATGGGAGTTGGTCTATTATGTTGGC  621  Y Y S N A G N M V M G P *
301  H D H P K P Q P S R R M G V G A I M F G

```

图 2 *LpWRKY20* 的 cDNA 及其氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *LpWRKY20*

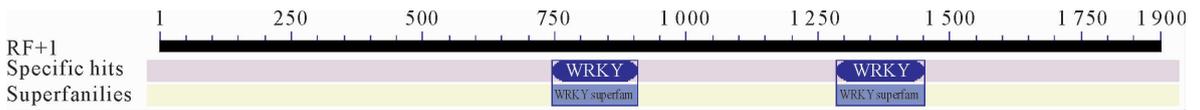


图 3 *LpWRKY20* 保守结构域

Fig. 3 The conserved domain prediction of *LpWRKY20*

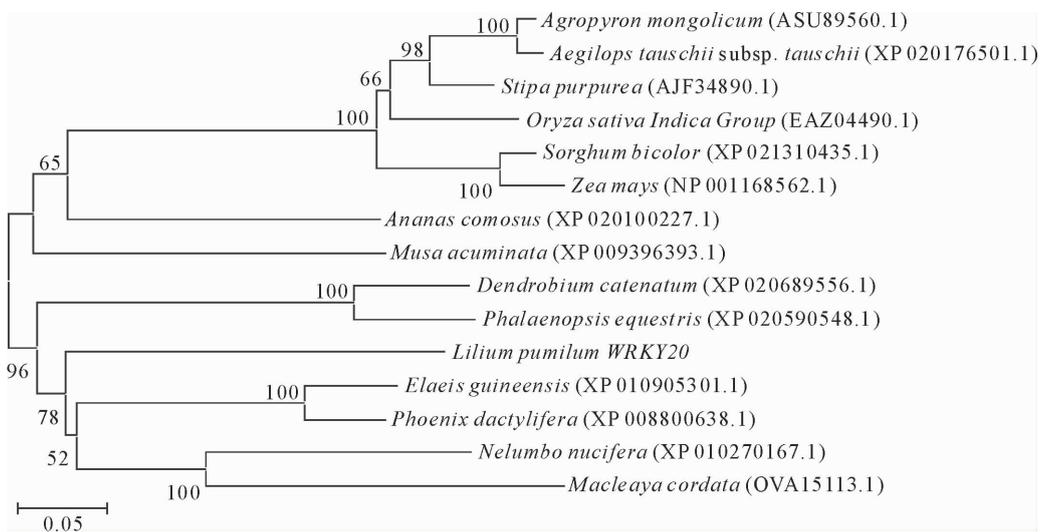


图 4 *LpWRKY20* 及其他物种 WRKY 基因氨基酸序列系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of *LpWRKY20* and other plants

利用 ProtScale 软件分析显示, 该蛋白在第 316 位氨基酸残基处疏水性最强, 最高值为 1.767; 在第

393 位氨基酸残基处亲水性最强, 最低值为 -3.344, 亲水区蛋白占大多数, 表明其为亲水性蛋白。

注: 沙芦草: *Agropyron monglicum*; 节节麦: *Aegilops tauschii*; 紫花针茅: *Stipa purpurea*; 水稻: *Oryza sativa*; 玉米: *Zea mays*; 博落回: *Macleaya cordata*。

利用 TMHMM 对跨膜结构预测显示该蛋白氨基酸链位于膜外,说明不存在跨膜结构域,属于非跨膜类蛋白。Signa IP 预测显示该蛋白不含有信号肽,为非分泌蛋白。亚细胞定位推测该蛋白定位于细胞核中,该结论有待进一步验证。

蛋白质二级结构按照所螺旋、折叠、卷曲和线圈所占百分比划分为 4 种类型:“all-alpha”“all-beta”“alpha-mixed”和“mixed”<sup>[21]</sup>。二级蛋白结构预测显示,a-螺旋 72 个(11.39%)、延伸链 107 个(16.93%)、无规卷曲 453 个(71.68%)该蛋白为“mixed”型蛋白。

### 2.3 *LpWRKY20* 在不同休眠时期的表达特性分析

选取百合休眠解除的 4 个时期(S1、S2、S3、S4)进行 qRT-PCR 分析(图 5),*LpWRKY20* 基因在休眠解除的过程中表达量总体呈现增长的趋势,S2 与 S1 时期相对表达量相比表达量无明显差异,S3 时期是 S1 时期的 4.8 倍,差异性显著,S4 时期相对表达量显著升高,是 S1 时期的 22.7 倍,此时百合鳞茎休眠完全解除。

### 2.4 植物表达载体构建及亚细胞定位

将重组的植物表达载体进行双酶切鉴定并送质

粒于博仕生物公司测序,鉴定和测序结果均显示植物表达载体构建成功。

通过荧光显微镜观察见图 6-A1,pBI121-MCS-GFP 空载质粒打入洋葱表皮后绿色荧光分布于整个细胞中,而融合表达载体(图 6-B1) pBI121-*LpWRKY20*-GFP 仅在细胞核中有明显的绿色荧光,并且能同时检测到多个洋葱表皮细胞中出现绿色荧光,说明该基因定位在细胞核上,具有一般转录因子特性,与预测结果相吻合。

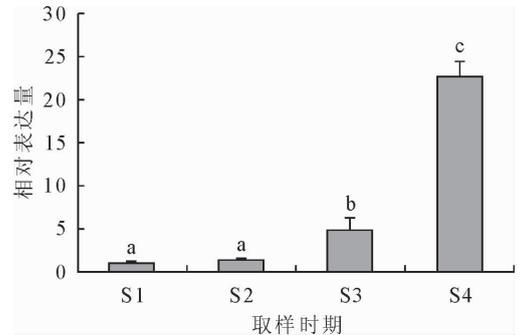
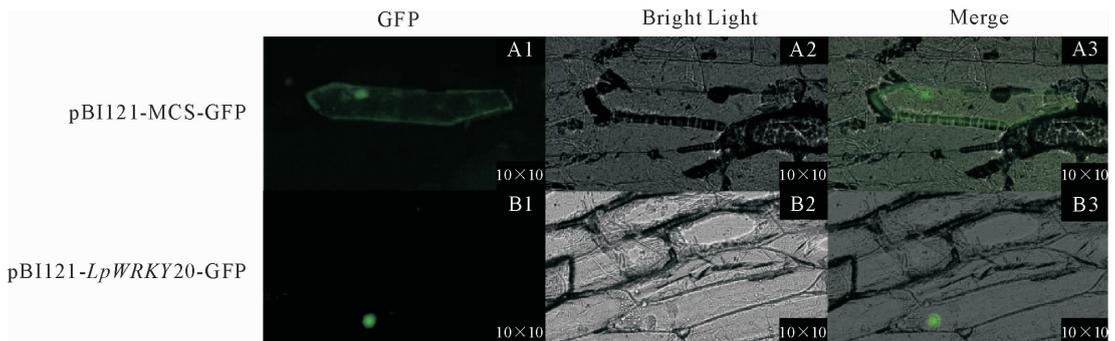


图 5 *LpWRKY20* 不同时期的定量分析

Fig. 5 The expression analysis of *LpWRKY20* in different periods ( $P < 0.05$ )



注:A1、A2、A3 为 pBI121-MCS-GFP 在洋葱表皮细胞中荧光、白光和重叠视野下表达情况;B1、B2、B3 为 pBI121-*LpWRKY20*-GFP 的洋葱表皮细胞中荧光、白光和重叠视野下表达情况。

图 6 *LpWRKY20* 基因在洋葱表皮细胞中的瞬时表达

Fig. 6 Transient expression of *LpWRKY20* gene in onion epidermal cells

## 3 结论与讨论

从细叶百合转录组 WRKY 转录因子家族克隆得到的 *LpWRKY20* 基因具有完整的开放阅读框,编码 632 个氨基酸,具有 2 个 WRKY 结构域属于 WRKY 家族的 Group1。通过蛋白同源性比对,发现其与棕榈、海枣亲缘关系最为接近。亚细胞定位显示空载体在洋葱整个细胞都能看到绿色荧光,为组成型表达;而重组融合载体 pBI121-*LpWRKY20*-GFP 只能在细胞核中看到绿色荧光,进一步证明该蛋白定位于细胞核中且不具有跨膜蛋白结构。休眠不同时期荧光定量分析显示该基因在这

4 个时期具有差异性,特别是在 S2、S3、S4 时期表达量的逐步增加进一步证实它参与了休眠解除这一过程。细叶百合 *LpWRKY20* 基因的克隆,为探讨其在休眠解除与非生物胁迫的关系奠定基础。

WRKY 基因家族是转录因子中最大的家族之一,既可以通过自身调节以抵御植物在逆境中受到的胁迫,又可与其他转录因子互作共同调控植物的防御反应<sup>[14]</sup>。它所具有的 W-box 结构可以识别或者结合其靶基因和其他家族成员一起调节植物对各种胁迫的防御<sup>[22]</sup>。在水稻中过表达 *OsWRKY45* 可提高拟南芥的抗病性和耐旱性<sup>[23]</sup>,旋蒴苣苔(*Boea hygrometrica*)的 *BhWRKY1* 转录因子可以与 *Bh-*

*GolS1* 结合, 从而激活 *BhGolS1* 对干旱的响应<sup>[24]</sup>。WRKY 转录因子也可通过转录参与植物的不同应激反应, 同一基因可能参与多个非生物胁迫, 拟南芥中的 *AtWRKY46*、*AtWRKY54*、*AtWRKY70* 属于 Group3 类转录因子, 在油菜素类固醇调节的生长中发挥积极作用, 并通过与 BES1 合作在干旱反应中起负面作用<sup>[25]</sup>。然而 WRKY 转录因子家族对于植物的调控并不是单向的, 过表达 *OsWRKY72* 会干扰转基因拟南芥中 ABA 信号和生长素转运途径之间的信号串扰<sup>[26]</sup>。有研究表明 *AtWRKY46* 对干旱、盐胁迫敏感, 又可与 *AtWRKY70* 和 *AtWRKY53* 共同调控植物对细菌的耐受性<sup>[27-28]</sup>。在棉花 (*Gossypium hirsutum*) 中 *GhWRKY17* 虽然能提高转基因植株对于干旱和盐的耐受力, 但降低了对 ABA 的敏感性<sup>[29]</sup>, 类似表达模式在水稻中也被发现, 表明 WRKY 转录因子对于植物在逆境中的调控往往不是一一对应。面对外界复杂的生存环境 WRKY 转录因子家族通过自身强大的调控功能在植物处于逆境时发挥重要作用。

以往的研究表明通过外源激素的诱导可以打破种子休眠以提高种子的萌发率和缩短休眠的时间<sup>[30-31]</sup>, 但这种方式的应用范围较窄且不同物种间差别较大。在休眠解除的过程中也会伴随着非生物胁迫, 前人的研究表明转录因子可通过介导与休眠相关的非生物胁迫, 参与到休眠调控中, 如 WRKY、MYB、CBF 和 bZIP<sup>[10, 32-33]</sup>。这些转录因子参与整个过程但又不依赖这些应激反应, 如 *DOG1* 虽然参与低温介导休眠, 但在 *dog1* 的突变体中发现脱落酸 (ABA) 的含量减少, 赤霉素 (GA) 的含量增加, *DOG1* 调控休眠的过程是不依赖激素的而是通过改变激素的含量参与整个过程<sup>[34]</sup>; 同样, 过表达 *CBF* 基因和低温会促进 GA 的分解代谢导致生长迟缓<sup>[8]</sup>。梅花 (*Prunus mume*) 的 *PmDAM6* 是一个休眠调节因子, 而 *CBF/DREB1* 则参与了冷的响应与 *DAM* 基因的调控, 特别是 *DAM6*, *CBF* 基因可以与 *DAM* 家族基因互作, 响应寒冷并且调控休眠的解除<sup>[35]</sup>。*LpWRKY20* 在休眠解除的过程中表达量逐渐升高, 与 S1 时期相比表达量有了显著地增加, 表明它参与了这一过程, 然而 *LpWRKY20* 是否也参与了某一非生物胁迫从而在休眠解除的过程中发挥着重要的作用, 有待进一步研究。

## 参考文献:

[1] STRAATHOF T P, LOFFLER H J M. Screening for fusarium resistance in seedling populations of asiatic hybrid lily[J]. *Euphytica*, 1994, 78: 43-51.

[2] WANG W, SU X, TIAN Z, *et al.* Transcriptome profiling provides insights into dormancy release during cold storage of *Lilium pumilum*[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19: 196.

[3] 刘芳, 田忠平, 于明斌, 等. 百合鳞茎休眠解除过程中差异蛋白表达分析[J]. *草业科学*, 2016, 33(9): 1665-1672.

LIU F, TIAN Z P, YU M B, *et al.* The analysis of differential proteins in lily bulbs during dormancy breaking[J]. *Practical Science*, 33(9): 1665-1672. (in Chinese)

[4] CHIANG G C, BARTSCH M, BARUA D, *et al.* *DOG1* expression is predicted by the seed-maturation environment and contributes to geographical variation in germination in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Ecology*, 2011, 20: 3336-3349.

[5] VAISTIJIJA F E, GANA Y, PENFIELD S, *et al.* Differential control of seed primary dormancy in *Arabidopsis* ecotypes by the transcription factor spatula[J]. *PNAS*, 2013: 110.

[6] NAKAMURA S, ABE F, KAWAHIGASHI H, *et al.* A wheat homolog of mother of FT and TFL1 acts in the regulation of germination[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23: 3215-3229.

[7] XI W, LIU C, HOU X, H, *et al.* Mother of FT and TFL1 regulates seed germination through a negative feedback loop modulating ABA signaling in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22: 1733-1748.

[8] WISNIEWSKI M, NORELLI J, BASSETT C, *et al.* Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus x domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness[J]. *Planta*, 2011, 233: 971-983.

[9] RUSHTON D L, TRIPATHI P, RABARA R C, *et al.* WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10: 2-11.

[10] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, *et al.* WRKY transcription factors[J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 247-258.

[11] WEN F, ZHU H, LI P, *et al.* Genome-wide evolutionary characterization and expression analyses of WRKY family genes in *Brachypodium distachyon*[J]. *DNA Research*, 2014, 21: 327-339.

[12] DONG J, CHEN C, CHEN Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51: 21-37.

[13] 陈思雀, 翁群清, 曹红瑞, 等. WRKY 转录因子在生物和非生物胁迫中的功能和调控机理的研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(4): 668-682.

CHEN S Q, WEN Q Q, CAO H R, *et al.* The functions and regulation mechanisms of WRKY transcription factors in response to biotic and abiotic stresses[J]. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(4): 668-682. (in Chinese)

[14] JIANG J, MA S, YE N, *et al.* WRKY transcription factors in plant responses to stresses[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 59: 86-101.

[15] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, *et al.* The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5: 199-206.

[16] MALECK K, LEVINE A, EULGEM T, *et al.* The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance

- [J]. *Nature Genetics*, 2000, 26: 403.
- [17] 刘芳, 王家艳, 王晓丽, 等. 细叶百合鳞茎在低温解除休眠过程中茎尖细胞超微结构的变化[J]. *园艺学报*, 2013, 40(6): 1110-1118.
- [18] 刘芳, 田忠平, 蔡英杰, 等. 细叶百合低温解除休眠过程中鳞茎细胞淀粉粒及花芽分化的变化[J]. *草业学报*, 2015, 24(9): 154-162.
- LIU F, TIAN Z P, CAI Y J, *et al.* Change in starch grains and flower bud differentiation of *Lilium pumilum* bulbs during breaking of dormancy under refrigerated conditions[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(9): 154-162. (in Chinese)
- [19] 汪王, 田忠平, 苏小霞, 等. 细叶百合 *LpAGD14* 基因的克隆与表达分析[J]. *草业学报*, 2018, 27(2): 117-123.
- WANG W, TIAN Z P, SU X X, *et al.* Cloning and expression analysis of *LpAGD14* gene from *Lilium pumilum* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(2): 117-123. (in Chinese)
- [20] 梁云, 袁素霞, 冯慧颖, 等. 百合肌动蛋白基因 *lilyActin* 的克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 2013, 40(7): 1318-1326.
- LIANG Y, YUAN S X, FENG H Y, *et al.* Cloning and expression analysis of actin gene (*lilyActin*) from lily [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(7): 1318-1326. (in Chinese)
- [21] SKOLNICK J, FETROW J S. From genes to protein structure and function novel applications of computational approaches in the genomic era[J]. *Trends in Biotechnology*, 2000, 18.
- [22] ZENTGRAF U, LAUN T, MIAO Y. The complex regulation of WRKY53 during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana* [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2010, 89: 133-137.
- [23] QIU Y, YU D. Over-expression of the stress-induced Os-WRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 65: 35-47.
- [24] WANG Z, ZHU Y, WANG L, *et al.* A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* by binding to the w-box elements of the galactinol synthase (*BhGolS1*) promoter [J]. *Planta*, 2009, 230: 1155-1166.
- [25] CHEN J, NOLAN T M, YE H *et al.* *Arabidopsis* WRKY46, WRKY54 and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses [J]. *The Plant Cell*, 2017, 29: 1425-1439.
- [26] SONG Y, CHEN L, ZHANG L, *et al.* Overexpression of Os-WRKY72 gene interferes in the abscisic acid signal and auxin transport pathway of *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biosciences*, 2010, 35: 459-471.
- [27] HU Y, DONG Q, YU D. *Arabidopsis* WRKY46 coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae* [J]. *Plant Science*, 2012, 185-186: 288-297.
- [28] DING Z J, YAN J Y, XU X Y, *et al.* Transcription factor WRKY46 regulates osmotic stress responses and stomatal movement independently in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2014, 79: 13-27.
- [29] YAN H, JIA H, CHEN X, *et al.* The cotton WRKY transcription factor GhWRKY17 functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2014, 55: 2060-2076.
- [30] 芦建国, 张振玲. 刻叶紫堇种子休眠特性及解除方法研究[J]. *西北林学院学报*, 2016, 31(2): 175-180.
- LU J G, ZHANG Z L. Study on seed dormancy characteristics and remove methods of *Corydalis incisa* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2016, 31(2): 175-180. (in Chinese)
- [31] 郭丽萍, 张延龙, 牛立新, 等. 凤丹种子休眠特性研究[J]. *西北林学院学报*, 2016, 31(4): 165-169.
- GUO L P, ZHANG Y L, NIU L X, *et al.* Dormancy properties of *Paeonia ostii* 'Feng Dan' [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2016, 31(4): 165-169. (in Chinese)
- [32] WISNIEWSKI M, NORELLI J, ARTLIP T. Overexpression of a peach CBF gene in apple: a model for understanding the integration of growth, dormancy and cold hardiness in woody plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 85.
- [33] CADMAN C S, TOOROP P E, HILHORST H W, *et al.* Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism [J]. *The Plant Journal*, 2006, 46: 805-822.
- [34] NAKABAYASHI K, BARTSCH M, XIANG Y, *et al.* The time required for dormancy release in *Arabidopsis* is determined by delay of germination1 protein levels in freshly harvested seeds [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24: 2826-2838.
- [35] ZHAO K, ZHOU Y, AHMAD S, *et al.* PmCBFs synthetically affect PmDAM6 by alternative promoter binding and protein complexes towards the dormancy of bud for *Prunus mume* [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 4527.