

芍药转录因子 *PIWRKY40* 的克隆及表达分析

李俊杰^{1*}, 韩璐璐^{1*}, 马燕¹, 姚汪劲松², 国静¹, 郭先锋^{1,**}

山东农业大学¹林学院; ²生命科学学院, 山东泰安271018

摘要: WRKY转录因子在植物休眠等生长发育过程中具有重要作用。本研究基于芍药芽转录组数据, 对芽休眠解除前后显著下调的编号为c22608.graph_c0的序列进行了qPCR验证分析, 结果表明其表达模式与转录组一致, 说明其与芍药芽休眠解除密切相关。为进一步挖掘和利用该基因, 从芍药‘大富贵’芽中克隆了该基因, 命名为 *PIWRKY40* (GenBank登录号: KU891820)。其cDNA全长1 347 bp, 开放阅读框882 bp, 编码293个氨基酸, 含有1个典型的WRKY结构域; 基因结构分析表明, *PIWRKY40*具有4个外显子和3个内含子, 其内含子具有特殊结构, 可能调控该基因表达; 以拟南芥WRKY蛋白的分类为参照, 聚类分析结果表明, *PIWRKY40*属于Group IIa亚族; 系统进化树分析表明, *PIWRKY40*与可可TcWRKY40具有最高的同源性; 亚细胞定位观测结果显示, *PIWRKY40*转录因子定位在细胞核上; 半定量PCR分析显示, *PIWRKY40*在芍药的不同组织器官中泛表达, 其中芽表达量最高。本研究为深入探索 *PIWRKY40* 的生理学功能奠定了基础。

关键词: 芍药; *PIWRKY40*; 克隆; 表达分析; 亚细胞定位

芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)是多年生的地下芽植物, 在生长发育周期中, 其地下芽每年冬季都将进入休眠状态(Hall等2007; 秦魁杰2004), 而且必须经过到一定的低温积累才能彻底解除休眠(Barzilay等2002; Halevy等2002; Fulton等2001; Evans等1990), 这种休眠称为内休眠(Lang等1987)。多年来, 芍药生产者和研究者一直致力于芍药芽内休眠解除过程中所需的低温量, 例如, ‘Festiva Maxima’ 5.6°C时冷藏4周可解除休眠(Byrne和Halevy 1986), 而晚花品种‘Sarah Berhardt’则在2或6°C的条件下分别冷藏60 d或70 d, 可解除休眠(Kamenetsky等2003), 本课题组及其他研究团队的研究结果表明, ‘大富贵’芍药在0~4°C时冷藏5周可完全解除其内休眠(黄雪2010; Cheng等2009)。但关于低温解除芍药芽内休眠的分子机理, 则还是未解决的科学问题。

为了分析低温解除芍药芽内休眠的可能机理, 我们针对性地对前期所测得的芍药芽内休眠解除前后的转录组数据进行了比较分析, 发现多个WRKY基因的表达量发生明显变化, 尤其是编号c22608.graph_c0的WRKY基因片段, 其在内休眠解除前后表达量相差达12倍之多, 因此推测其在芍药解除休眠进程中可能具有重要作用。

WRKY是植物中一个重要的转录因子家族(Eulgem等2000)。其蛋白质N端含有高度保守的WRKYGQK氨基酸序列, C端含有1个锌指型结构(C₂H₂或C₂HC), 通过特异性识别靶基因启动子区域W-box (C/TTGACT/C)调控下游功能基因或其他转录因子的表达(陈晓丽等2016; Ulker和Somssich

2004)。目前, WRKY转录因子已被证实参与植物生长发育过程中的多种调控(Koyama 2014; Chen等2012; Xu等2004), 在植物休眠方面, 研究者认为WRKY41通过调节ABI3表达调控种子休眠(Ding等2014), 而Chen等(2016)则发现有6个WRKYs转录因子基因可能参与了桃芽休眠进程的调控。目前为止, 尚未有芍药WRKY转录因子与其芽休眠之间的关系的相关研究报道。

为此, 本研究拟以变化显著的c22608.graph_c0的WRKY基因序列为研究对象, 进一步使用荧光定量PCR验证其在人工低温解除芍药芽内休眠进程中的表达量。在此基础上, 克隆其cDNA全长和从起始密码子至终止密码子的DNA序列, 并观测其组织表达模式及亚细胞定位情况, 对该WRKY基因开展初步研究, 以期为进一步的研究或应用提供参考。

材料与方法

1 实验材料与处理

以3年生的芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.) ‘大富贵’为实验材料, 种植于山东农业大学林学试验站。

2015年11月18日, 当日平均气温稳定通过10°C后, 将盆栽芍药移入0~4°C冷库进行5周的低温解除休眠处理, 并分别于0、7、14、21、28和35 d时采集芽样, 每次取芽样50个, 用于人工低温打破内休

收稿 2016-11-16 修定 2017-02-20
资助 山东省自然科学基金(ZR2014CM028)。
* 并列第一作者。
** 通讯作者(E-mail: guoxf@sdau.edu.cn)。

眠进程中的荧光定量表达分析。2015年11月,采集根颈芽用于基因克隆。2016年4月底分别取叶、萼片、外侧花瓣、内侧花瓣、茎及根,用于组织器官表达分析。所有样品均经液氮速冻后于 -80°C 保存备用,重复3次。

克隆载体为pMD19-T Vector;大肠杆菌感受态细胞为DH5 α ;农杆菌感受态细胞为GV3101;亚细胞定位载体为pROKII-GFP。

2 低温解除休眠进程中的表达

采用qRT-PCR法检测c22608.graph_c0基因在人工低温解除休眠过程中的表达情况,根据转录组数据,采用软件Primer 5.0设计上下游特异引物PIWRKY40 (q)F和PIWRKY40 (q)R (表1)。内参基因引物为PIActinF和PIActinR (表1)。PCR反应体系为20 μL : SYBR Green Master Mix 10 μL , cDNA 1 μL , 上下游引物各0.6 μL ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ddH₂O 7.8 μL 。反应程序为: 95°C 预变性5 min; 95°C 变性10 s, 60°C 退火30 s, 共39次循环;每次循环第3步进行荧光采集,最后退火至 65°C ,每隔5 s上升 0.5°C ,至 95°C 变性1 min。采用Bio-Rad CFX96TM系统进行荧光采集。cDNA标样和待测样均设置3次重复,数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法。

3 基因克隆

RNA提取参照艾德莱的EASYspin植物RNA快速提取试剂盒说明书操作,并采用全式金反转录试剂盒合成cDNA。基因组DNA的提取采用改良CTAB进行(苏华楠等2014)。

根据该基因转录组数据,预测其开放阅读框(open reading frame, ORF)序列并设计引物(表1)。以oligo dT反转录获得的cDNA为模板进行ORF及5'端序列的特异性扩增;以PCR引物B26反转录获得的cDNA第一条链为模板,利用巢式PCR,进行3'RACE扩增。PCR反应体系为25 μL : 2 \times Easy Taq Super Mix 12.5 μL , cDNA (3'RACE cDNA) 1 μL , 上下游引物各1 μL ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), dd H₂O 9.5 μL 。反应程序为: 94°C 预变性5 min; 94°C 变性1 min, 51°C 退火30 s, 72°C 延伸45 s, 共35个循环; 72°C 延伸10 min, 其中退火温度可根据引物不同进行变化。对PCR扩增产物进行琼脂糖电泳检测,使用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(艾德莱)进行目的片段回收纯化。并与pMD19-T载体连接,转化大肠杆菌DH5 α

感受态细胞,挑选阳性克隆,送华大基因公司测序。最后经过拼接、比对,得到PIWRKY40基因序列全长。

以基因组DNA为模板进行从起始密码子至终止密码子的DNA序列的扩增,反应体系与反应程序同上。将PCR扩增产物回收,连接,转化,测序(具体方法同上)。得到从起始密码子至终止密码子的DNA序列。

4 生物学信息分析

利用软件DNAMAN5.2.2进行ORF序列的查找和氨基酸序列的推导;利用ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)预测氨基酸序列的基本理化性质;利用SOMPA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)预测蛋白质二级结构;利用NLStradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>)查找核定位信号;利用WOLFPSORT (<http://www.genscript.com/psort.html>)预测亚细胞定位。

5 同源分析及系统进化分析

采用NCBI中Blast程序对所得氨基酸序列进行同源性比较,选择与芍药氨基酸序列同源性较高的氨基酸序列,利用DNAMAN软件进行多重比对,对该基因的结构域及其保守性进行分析;通过拟南芥基因组数据库(<http://www.arabidopsis.org/>)下载拟南芥WRKY家族氨基酸序列,利用MEGA5.0软件,采取Neighbor-Joining法(bootstrap设为1 000)构建系统进化树,对该基因所属的WRKY家族类型进行区分;通过GenBank中下载已公布的可可、川桑、葡萄、枣、油棕等10种物种的WRKY40基因的同源氨基酸序列,采用上述同样的方法构建进化树,对该基因与其他植物WRKY40的同源关系进行研究。

6 载体构建与亚细胞定位

根据PIWRKY40的ORF序列(去除终止密码子)设计分别含有BamHI和KpnI酶切位点的引物PIWRKY40 (B)F与PIWRKY40 (K)R (表1),以cDNA为模板进行扩增,扩增产物通过BamHI/KpnI双酶切作用后,利用T₄ DNA连接酶与同样双酶切的pROKII-GFP载体 22°C 水浴连接,转化大肠杆菌感受态细胞DH5 α ,挑选阳性克隆,经测序验证获得融合表达载体pROKII-PIWRKY40-GFP。

参照谭小丽等(2016)农杆菌介导侵染烟草表皮细胞瞬时表达蛋白定位方法, 将构建完毕的融合载体pROKII-PIWRKY40-GFP转入农杆菌GV3101中, 并对培养4周大小的烟草叶片进行侵染, 完成瞬时表达, 使用激光共聚焦显微镜, 观察荧光蛋白的亚细胞定位。

7 不同组织器官的表达

采用半定量PCR法检测器官包括叶、萼片、

外侧花瓣、内侧花瓣、茎、芽及根的表达情况, 采用软件Primer 5.0设计上下游特异引物(表1), 内参基因为PlActin (引物见表1)。PCR反应体系为25 μL : 2 \times Easy Taq Super Mix 12.5 μL , cDNA 1 μL , 上下游引物各1 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ddH₂O 9.5 μL 。PCR反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1 min, 51 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, 共35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。

表1 芍药PIWRKY40基因克隆及表达分析所用引物及其序列

Table 1 Primers used for cloning and expression analysis of PIWRKY40

引物名称	核苷酸序列(5'→3')	用途
PIWRKY40 (q)F	TGCTGCAGGTGCTGTTGT	RT-PCR及半定量引物
PIWRKY40 (q)R	GGTTTAGTCCCTTGCTCG	RT-PCR及半定量引物
PlActionF	ACTGCTGAAATT	内参引物
PlActionR	ATGGCTGGACTT	内参引物
PIWRKY40F	ATGGATTACTCAACATGGATGG	ORF及3'RACE PCR扩增
PIWRKY40R	CTATCTCTGGTACATTCT	ORF PCR扩增
PIWRKY40 (5')F	TCCTTACCCATTACAG	5'端PCR扩增
PIWRKY40 (5')R	GAGTTCTTCCTCCCAA	5'端PCR扩增
PIWRKY40 (3')F	ACTCTTGGTTCAGTCCCTTGCTC	3'RACE PCR扩增
B26	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT	3'RACE PCR扩增
PIWRKY40 (B)F	CGGGATCCATGGATTACTCAACATGG	GFP载体构建
PIWRKY40 (K)R	GGGGTACCTCTCTGGTACATTCTCC	GFP载体构建

下划线部分“GGATCC”和“GGTACC”分别为添加的BamHI和KpnI酶切位点。

实验结果

1 c22608.graph_c0基因在低温解除休眠进程中的表达分析

利用qRT-PCR技术测定芍药地下芽在低温解除内休眠进程的6个时期中c22608.graph_c0基因相对表达情况。结果如图1所示, 该基因在0 d时处于最高水平, 7 d内剧烈下降, 14 d后迅速回升到次高峰, 之后一直呈现下降趋势, 至35 d时处于最低水平, 较低温处理前相差11倍。可见, 该基因与转录组数据得到的分析结果相一致, 总体呈现波动下降趋势。

2 PIWRKY40的克隆和基因组结构分析

以芍药cDNA为模板, 扩增获得882 bp的ORF序列(图2-B); 基于ORF序列的两次扩增, 则分别获得260 bp的5'序列及576 bp的3'序列(图2-A和C), 三者拼接后得到1 347 bp的cDNA全长。序列与可可*TcWRKY40*、枣*ZjWRKY40*基因较高度同源, 同源

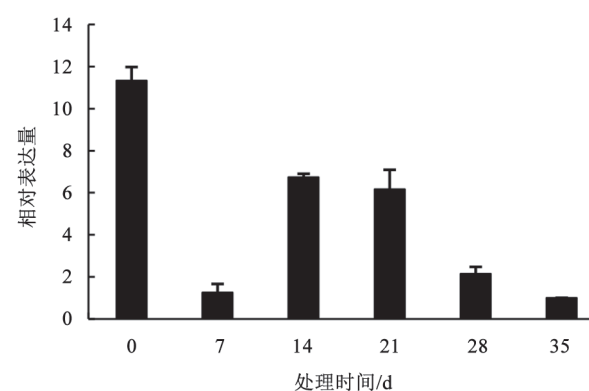


图1 PIWRKY40在低温解除芍药休眠进程中的表达特性
Fig.1 Expression characteristics of PIWRKY40 during peony bud dormancy release by chilling

性分别为65%和64%, 因而将其命名为PIWRKY40 (在GenBank登录号为KU891820)。

以芍药基因组DNA为模板, 扩增得到1 371 bp从起始密码子至终止密码子的DNA序列(图2-D)。

对比ORF序列发现, *PIWRKY40*含有4个外显子和3个内含子(图3), 其中4个外显子的碱基序列长度分别为135、288、117和342 bp, 内含子分别为110、142和237 bp。3个内含子中AT碱基含量丰富(67.1%~73.9%), 明显高于外显子AT的含量(57.4%), 符合非编码区AT含量高的特点; 内含子和外显子交界处5'端均为GT, 3'端为AG, 符合5'GT-AG3'剪切规则; 3个内含子中, 第3个内含子位于WRKY保守结构域中, 属于典型的V型内含子。

进一步通过Plant CARE对内含子序列进行分析, 结果显示(表2), 该基因的3个内含子中具有19个

转录起始处启动子核心元件TATA-box, 9个启动子、增强子区域常见顺式作用元件CAAT-box, 还具有多个光应答元件如Box 4、Box I等, 2个赤霉素应答元件GARE-motif, 以及低温顺式元件LTR, MYB参与抗旱诱导元件MBS, 胁迫相关应答元件TC-rich repeats, 昼夜调控顺式作用元件circadian等。

3 *PIWRKY40*蛋白基本理化性质分析

ProtParam分析表明, *PIWRKY40*蛋白的分子式为 $C_{1420}H_{2280}N_{400}O_{474}S_{15}$, 相对分子量为33 021.0 Da, 原子总数为4 589个, 理论等电点pI值为8.05, 不稳定指数为48.39 (>40), 总平均疏水指数为-0.861,

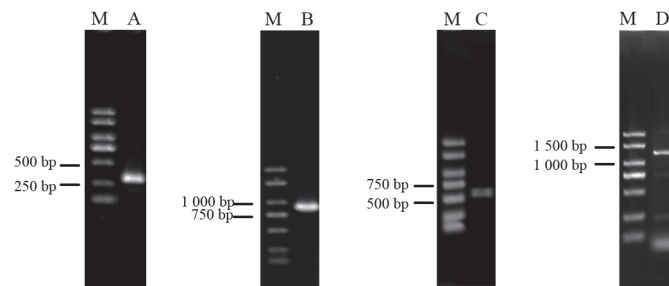


图2 *PIWRKY40*基因的扩增

Fig.2 PCR amplification of *PIWRKY40*

M: 分子量标准DL2000; A: 5'端特异扩增产物; B: ORF扩增产物; C: 3'-RACE产物; D: 从起始子到终止子的DNA扩增产物。

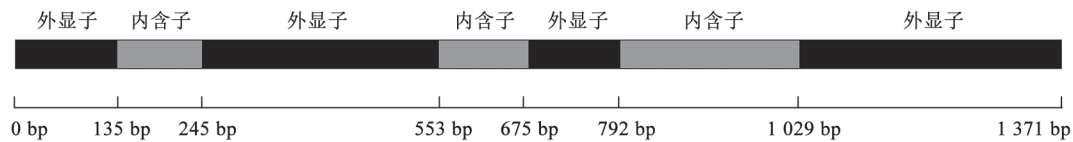


图3 *PIWRKY40*基因组序列结构

Fig.3 Genomic structure of *PIWRKY40* gene

表2 芍药*PIWRKY40*基因内含子中顺式元件预测

Table 2 Predicted *cis*-elements in the introns of the *PIWRKY40* gene from peony

位点名称	数量/个	核心序列	功能注释
TATA-box	19	TATAAAA/TTTAA/TATAA/TAATA/TATAAA/ TATA/ATTATA/ATATAT	转录起始处是启动子核心元件
CAAT-box	9	CAAT/CAATT/CCAAT/CAAAT	启动子、增强子区域常见顺式作用元件
Box 4	1	ATTAAT	部分光应答元件
chs-CMA1a	1	TTACTTAA	部分光应答元件
Box I	1	TTTCAAA	光响应元件
GARE-motif	2	AAACAGA/AAACAGA	赤霉素响应元件
LTR	1	CCGAAA	低温顺式响应元件
MBS	1	CAACTG	MYB参与干旱胁迫响应元件
TC-rich repeats	1	ATTTTCTTCA	防御应激顺式作用元件
circadian	1	CTAAGTCAAC	昼夜调控顺式作用元件

由此推测该蛋白为不稳定的亲水性蛋白。构成WRKY40蛋白的293个氨基酸中, 包括20种氨基酸, 其中丝氨酸出现最多(35个), 所占比例最高, 达到11.9%; 其次是赖氨酸(27个)和苏氨酸(26个), 所占比例分别是9.2%和8.9%; 出现最少的是组氨酸(2个), 所占比例仅为0.7%。从氨基酸的类型上看, 酸性氨基酸残基(Asp+Glu)共有39个, 碱性氨基酸残基(Arg+Lys)共有41个。

SOPMA预测发现, PIWRKY40蛋白的二级结构中无规则卷曲(random coil)和 α -螺旋(α -helix)为主, 延伸链(extended strand)和 β -转角(β -turn)则散布在蛋白中。其中无规则卷曲137个(46.76%)、 α -螺旋99个(33.79%)、延伸链44个(15.2%)和 β -转角13个(4.44%)。

NLStradamus在线预测表明, PIWRKY40蛋白

序列96~99位包含一个核定位信号KKRK, 推测PIWRKY40蛋白位于细胞核内。进一步通过WOLF-PSORT亚细胞定位分析发现, 该蛋白定位于细胞核中的可能性为82.6%, 定位于细胞质中的可能性为13%, 与核定位信号预测一致。

4 PIWRKY40蛋白序列的结构域及系统发育分析

多重比对分析发现(图4), PIWRKY40基因编码区含有一个WRKY结构域, 由59个(第143~201位)氨基酸组成, 该结构域与其他植物已克隆得到的WRKY40转录因子的保守结构域有很高的同源性。在其保守结构域的N端, 含有一个高度保守的WRK-YGQK七肽序列, 其C端具有 C_2H_2 型($CX_5CX_{23}HNH$)锌指结构。除具有典型的WRKY保守结构域外, 在蛋白序列的N端还存在一个LZ结构域。推测该基因为典型的WRKY40转录因子。

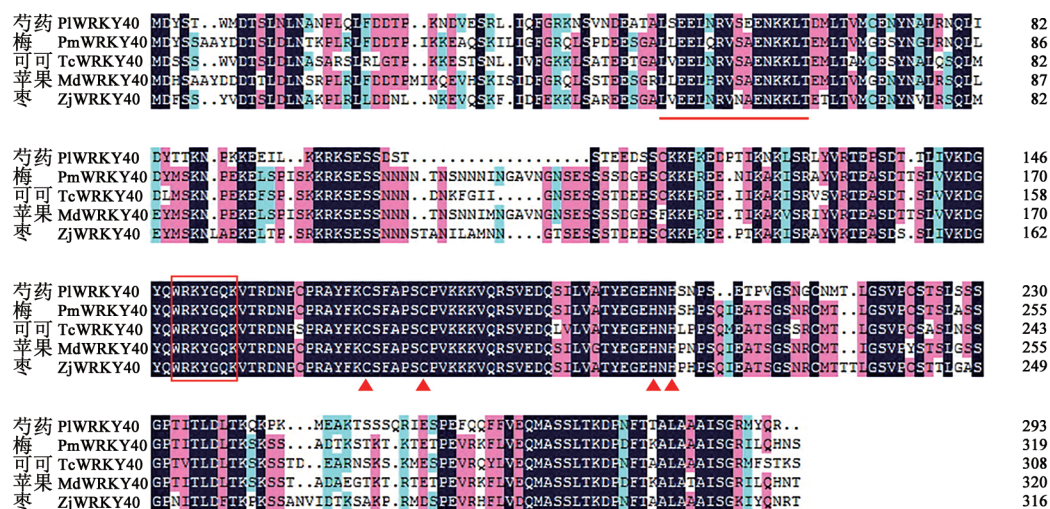


图4 芍药与其他物种WRKY40转录因子氨基酸的多重比对

Fig.4 Multiple alignment of deduced PIWRKY40 amino acid sequences with the homologs

方框表示WRKYGQK七肽序列; 三角形表示锌指结构; 横线表示LZ结构。

为研究该基因所属的WRKY家族类型, 按照Eulgem等(2000)对拟南芥WRKY的分类标准, 利用MEGA5.0对PIWRKY40和拟南芥WRKY家族基因构建系统进化树, 进行系统进化分析和聚类(图5)。结果表明: PIWRKY40与AtWRKY40聚为一支(图4), 两者与AtWRKY60及AtWRKY18聚合在一起, 共同构成WRKY家族的第II类a亚族, 因此PIWRKY40属于WRKY家族中的第II类a亚族。

为了进一步了解PIWRKY40蛋白与其他植物WRKY40蛋白的亲缘关系, 从GenBank中下载与

PIWRKY40同源性较高(>50%)的可可、川桑等10种植物WRKY40家族基因的同源蛋白序列, 利用MEGA5构建系统进化树(图6)。结果显示: 在供分析的11种WRKY40蛋白中, 芍药PIWRKY40与可可的TcWRKY40亲缘关系最近, 归为1个分支, 与同属于原始花亚纲的川桑、葡萄、枣归为一支; 辣椒、烟草、番茄与黄花蒿等合瓣花亚纲植物共同构成另一支; 两支聚合成双子叶植物亚支。相比之下, 单子叶植物油棕、小果野蕉与海枣自成一支, 亲缘关系较远。

5 *PIWRKY40*载体构建与亚细胞定位分析

为明确*PIWRKY40*蛋白在植物细胞内的分布, 将构建成功的亚细胞定位载体pROKII-*PIWRKY40*-GFP与空载体pROKII-GFP转入农杆菌GV3101, 利用农杆菌介导法侵染本氏烟叶片, 结果发现GFP获得高效表达, 在荧光共聚焦显微镜下观察, 结果如图7所示: 转入pROKII-GFP空载体的细胞中, 绿色荧光信号呈弥散状态分布, 且定位不清晰, 而转入pROKII-*PIWRKY40*-GFP融合表达载体的细胞内, 绿色荧光信号大部分分布

于细胞核中, 这与先前核定位分析及亚细胞定位预测的结果一致, 因而推断该基因定位于细胞核中。

6 *PIWRKY40*在不同组织器官中的表达

通过半定量PCR分析*PIWRKY40*基因的组织表达特性(因芍药‘大富贵’心皮退化, 雄蕊退化或瓣化成内侧花瓣, 故无种子和雄蕊的表达分析), 结果显示: 该基因在芽中表达量最高; 其次是叶片、萼片, 表达量较高; 在不同轮次的花瓣、茎及根中也有一定表达(图8)。

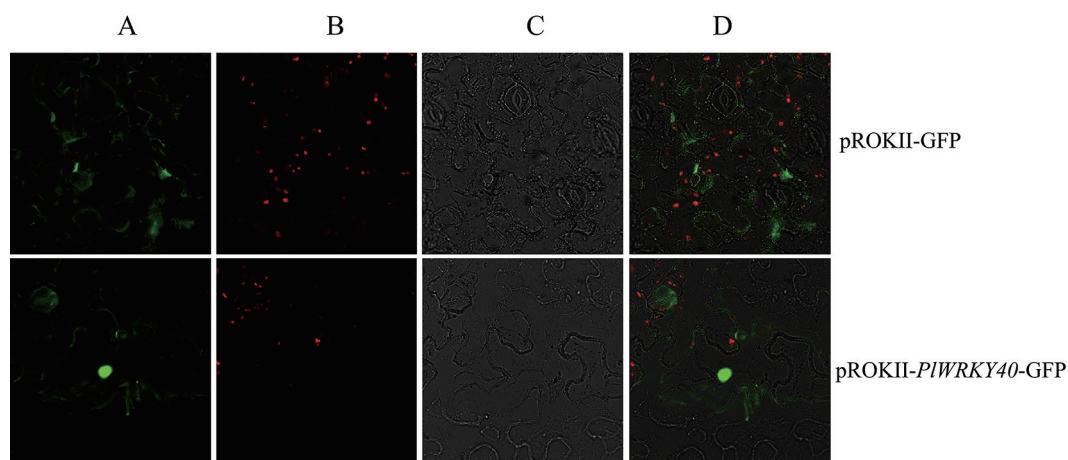


图7 *PIWRKY40*在本氏烟叶片细胞中的定位

Fig.7 Subcellular localization of *PIWRKY40* in leaves of *Nicotiana benthamiana*

A: 荧光信号图; B: 叶绿体自发荧光图; C: 明图视野图; D: A、B、C叠加图。

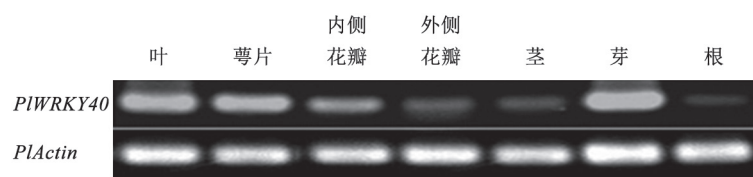


图8 *PIWRKY40*在芍药不同器官中的表达特性

Fig.8 Expression characteristics of *PIWRKY40* in peony organs

讨 论

WRKY基因家族作为一类广谱调控因子, 在植物生长发育、形态建成、代谢调控和逆境胁迫等多种生理生化过程发挥重要作用(祖倩丽等2015; 肖培连等2015; Niu等2012), 但关于其调控休眠解除的研究报道则相对较少。*PIWRKY40*在低温解除芍药芽休眠进程中的表达研究实际上是一种

重要补充。早期研究一致表明, 在模式植物拟南芥中, *AtWRKY40*在种子萌发以及萌发后生长过程中对脱落酸有负调控作用(Rushton等2012; Shang等2010), 因此推测芍药*PIWRKY40*也可能与其种子萌发或休眠相关。qRT-PCR检测证实, *PIWRKY40*表达水平在芽内休眠解除前后发生较大幅度的变化, 表明其可能在芍药芽内休眠的解除进程中发挥重要作用, 因而具有潜在的研究和开发利用价值。

芍药*PIWRKY40*基因含有3个内含子,具有典型的5'GT-AG3'内含子特征(赵永斌等2006),这一序列特征与其剪接机制有关;第3个内含子位于WRKY保守结构域中,属于典型的V型内含子,其剪接位点在锌指结构C₂H₂的第2个半胱氨酸(C)之后的第6个位点即编码缬氨酸(V)的位点之前,与水稻IIa亚族WRKY转录因子内含子保守插入位点相一致(Wu等2005)。内含子是隔断基因线性表达的冗余序列,不具备基因的功能,然而越来越多的证据显示内含子在基因转录、表达及调控方面都具有重要的生物学功能,是真核生物基因中重要的组成结构(房婉萍等2012;杨寅桂等2007)。目前,许多基因的内含子中均发现了基因表达的调控元件,如雷晨等(2016)发现沙冬青*AmCIP*基因内含子中存在重要的调控元件,可以调控转录来增强基因的表达。芍药*PIWRKY40*的内含子中含TATA等真核生物启动子调控元件、激素调控相关的元件和非生物胁迫应答元件等三类元件,暗示“沉默”的基因内含子其实并不沉默,*PIWRKY40*基因内含子可能具有增强该基因转录、参与激素调控和逆境响应等植物生长发育进程相关的作用,但具体的功能还需要进一步的研究证实。

依据*PIWRKY40*与拟南芥WRKY转录因子家族的聚类结果,*PIWRKY40*属于Group IIa亚族。因此推测*PIWRKY40*和拟南芥WRKY转录因子IIa亚族基因可能具有相似的功能。前人研究表明Group IIa亚族WRKY转录因子不仅能通过调控胁迫相关的信号通路或调控胁迫相关的一些关键基因而参与植物非生物胁迫,而且能通过调控重要的抗病调控网络中的关键基因或蛋白来调控植物的抗病性(罗昌国等2015;Chen等2010;Pandey等2010;Xu等2006),由此推测*PIWRKY40*可能参与了植物生长发育过程中的各种逆境响应等过程。

NLStradamus分析发现,*PIWRKY40*蛋白序列在其N端第96~99位包含一个假定的核定位信号KKRK,进一步通过WOLFP SORT在线预测得到*PIWRKY40*蛋白定位于细胞核中的可能性为82.6%。为了明确*PIWRKY40*蛋白在植物细胞内的分布,利用农杆菌介导侵染烟草表皮细胞瞬时表达蛋白定位方法,进行亚细胞定位。结果表明其表达的蛋白定位于细胞核中,与已报道的拟南芥(Xu等

2006)、棉花(Wang等2014)等物种的亚细胞定位结果一致,推测WRKY40蛋白很可能是起转录调节因子的作用,通过与靶基因的W-box元件相结合,从而激活目标靶基因的转录表达。

*PIWRKY40*基因在不同组织器官中泛表达,其中,芽、叶片及萼片的表达量较高,而在茎与根中表达量较低,这与雷蒙德氏棉在叶片中表达最高、在根中表达量最少的结果类似(Cai等2014);而在湖北海棠中,*WRKY40*基因在花萼中表达最高,在根中表达量最少(罗昌国等2013),表明不同物种之间WRKY40基因在不同组织中的表达存在差异。

综上,本研究通过荧光定量分析验证了芍药WRKY40转录因子参与芍药芽内休眠的解除,具有深入挖掘利用的价值。为此,我们进一步成功分离了芍药*PIWRKY40*的cDNA全长序列及从起始子到终止子的DNA序列,并对其进行生物信息学分析及组织表达模式分析。这是有关芍药转录因子WRKY家族的首篇报道,研究结果为深入研究该转录因子的生理功能等奠定了基础。关于*PIWRKY40*如何参与休眠调控的信号途径及其在芍药抗逆性方面的作用,尚待进一步探索。

参考文献

- Barzilay A, Zerah H, Kamenetsky R, Ran I (2002). Annual life cycle and floral development of 'Sarah Bernhardt' peony in Israel. *HortScience*, 37 (2): 300-303
- Byrne T, Halevy A (1986). Forcing herbaceous peonies. *J Am Hort Sci*, 111 (3): 379-383
- Cai CP, Niu EL, Du H, Zhao L, Feng Y, Guo WZ (2014). Genome-wide analysis of the WRKY transcription factor gene family in *Gossypium raimondii* and the expression of orthologs in cultivated tetraploid cotton. *Crop*, 2: 87-101
- Chen H, Lai Z, Shi J, Xiao Y, Chen Z, Xu X (2010). Roles of Arabidopsis *WRKY18*, *WRKY40* and *WRKY60* transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biol*, 10: 20-26
- Chen LG, Song Y, Li SJ, Zhang LP, Zou CS, Yu DQ (2012). The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochim Biophys Acta*, 1819 (2): 120-128
- Chen M, Tan QQ, Sun MY, Li DM, Fu XL, Chen XD, Xiao W, Li L, Gao DS (2016). Genome-wide identification of WRKY family genes in peach and analysis of WRKY expression during bud dormancy. *Mol Genet Genomics*, 291: 1319-1332
- Chen XL, Yan D, Sun LN, Zeng RZ, Yang LF (2016). Cloning and expression analysis of *HbWRKY75* gene in leaf from *Hevea brasiliensis*. *Plant Physiol J*, 52 (3): 250-258 (in Chinese with English abstract) [陈晓丽, 闫栋, 孙丽娜, 曾日中, 杨礼富(2016). 橡胶

- 树WRKY家族转录因子*HbWRKY75*基因的克隆及表达分析. 植物生理学报, 52 (3): 250–258]
- Cheng FY, Zhong Y, Long F, Yu X, Kamenetsky R (2009). Chinese herbaceous peonies: cultivar selection for forcing culture and effects of chilling and gibberellin on plant development. *Israel J Plant Sci*, 57 (4): 357–367
- Ding ZJ, Yan JY, Li GX, Wu ZC, Zhang SQ, Zheng SJ (2014). *WRKY41* controls Arabidopsis seed dormancy via direct regulation of *ABI3* transcript levels not downstream of ABA. *Plant J*, 79: 810–823
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factor. *Trends Plant Sci*, 5: 199–206
- Evans M, Anderson N, Wilkins H (1990). Temperature and GA₃ effects on emergence and flowering of potted *Paeonia lactiflora*. *HortScience*, 25 (8): 923–924
- Fang WP, Zhang Y, Ruan GX, Chen X, Wang YH, Zhuang J, Li XH (2012). Analysis of genomic structure and introns of *CsHI* gene from tea plant. *J Nanjing Agric Univ*, 35 (4): 37–40 (in Chinese with English abstract) [房婉萍, 张玥, 阮光兴, 陈暄, 王玉花, 庄静, 黎星辉(2012). 茶树*CsHI*基因结构及其内含子信息分析. 南京农业大学学报, 35 (4): 37–40]
- Fulton TA, Hall AJ, Catley JL (2001). Chilling requirements of *Paeonia* cultivars. *Sci Hortic*, 89 (3): 237–248
- Halevy AH, Levi M, Cohen M, Naor V (2002). Evaluation of methods for flowering advancement of herbaceous peonies. *HortScience*, 37 (6): 885–889
- Hall AJ, Catley JL, Walton EF (2007). The effect of forcing temperature on peony shoot and flower development. *Sci Hortic*, 113 (2): 188–195
- Huang X (2010). The researches on the selection of herbaceous peony cultivars in greenhouse and the matched techniques (Master's thesis). Taian, Shandong: Shandong Agricultural University (in Chinese with English abstract) [黄雪(2010). 芍药温室栽培品种的筛选及配套技术的研究(硕士学位论文). 山东泰安: 山东农业大学]
- Kamenetsky R, Barzilay A, Erez A, Halevy AH (2003). Temperature requirements for floral development of herbaceous peony cv. 'Sarah Bernhardt'. *Sci Hortic*, 97 (3): 309–320
- Koyama T (2014). The roles of ethylene and transcription factors in the regulation of onset of leaf senescence. *Front Plant Sci*, 5: 650
- Lang G, Early J, Martin G, Darnell R (1987). Endo-, para-, and ecdormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortscience*, 22: 371–377
- Lei C, Liu SL, Yu TQ, Chen YZ, Lu CF (2016). Bioinformatics analysis of genomic structure and introns of *AmCIP* gene from *Ammopiptanthus mongolicus*. *Biotechnol Bull*, 32 (9): 1–6 (in Chinese with English abstract) [雷晨, 刘胜利, 于婷乔, 陈玉珍, 卢存福(2016). 沙冬青*AmCIP*基因结构及其内含子生物信息学分析. 生物技术通报, 32 (9): 1–6]
- Luo CG, Qu SC, Zhang JY, Wang SH, Qiao YS, Zhang SJ, Liu D, Zhang Z (2013). Expression analysis of *Mauls humpehesis* (Pamp) Rehd. *MhWRKY40b* gene in response to several stresses. *Acta Hortic Sin*, 40 (1): 1–9 (in Chinese with English abstract) [罗昌国, 渠慎春, 张计育, 王三红, 乔玉山, 张仕杰, 刘丹, 章镇(2013). 湖北海棠*MhWRKY40b*在几种胁迫下的表达分析. 园艺学报, 40 (1): 1–9]
- Luo CG, Yuan QF, Pei XH, Wu YW, Zheng W, Zhang Z (2015). Research progress on WRKY transcription factors GroupIIa gene in plants. *Chin J Tropic Agric*, 36 (3): 629–637 (in Chinese with English abstract) [罗昌国, 袁启凤, 裴晓红, 吴亚维, 郑伟, 章镇(2015). 植物WRKY转录因子家族GroupIIa基因研究进展. 热带作物学报, 36 (3): 629–637]
- Niu CF, Wei W, Zhou QY, Tian AG, Hao YJ, Zhang WK, Ma B, Lin Q, Zhang ZB, Zhang JS, et al (2012). Wheat WRKY genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell Environ*, 35: 1156–1170
- Pandey SP, Roccaro M, Schon M, Logemann E, Somssich IE (2010). Transcriptional reprogramming regulated by *WRKY18* and *WRKY40* facilitates powdery mildew infection of Arabidopsis. *Plant J*, 64 (6): 912–923
- Qin KJ (2004). Peony. Beijing: China Forestry Publishing House, 18–42 (in Chinese) [秦魁杰(2004). 芍药. 北京: 中国林业出版社, 18–42]
- Rushton DL, Tripathi P, Rabara RC, Lin J, Ringler P, Boken AK, Langum TJ, Smidt L, Boomsma DD, Emme NJ, et al (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signaling. *Plant Biotechnol J*, 10 (1): 2–11
- Shang Y, Yan L, Liu ZQ, Cao Z, Mei C, Xin Q, Wu FQ, Wang XF, Du SY, Jiang T, et al (2010). The Mg-chelatase H subunit of Arabidopsis antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell*, 22 (6): 1909–1935
- Su HN, Wang XF, Huang AJ, Li ZA, Tang KZ, Zhou CY (2014). High quality total nucleic acid extraction method from citrus for disease detection. *Acta Hortic Sin*, 41 (11): 2342–2352 (in Chinese with English abstract) [苏华楠, 王雪峰, 黄爱军, 李中安, 唐科志, 周常勇(2014). 高质量提取柑橘样品中病原总核酸方法的建立. 园艺学报, 41 (11): 2342–2352]
- Tan XL, Fan ZQ, Li LL, Wu Y, Kuang JF, Lu WJ, Chen JY (2016). Molecular characterization of a transcription factor *BrWRKY75* related to leaf senescence of Chinese flowering cabbage. *Acta Hortic Sin*, 43 (6): 1089–1098 (in Chinese with English abstract) [谭小丽, 范中奇, 李露露, 吴亚, 邝健飞, 陆旺金, 陈建业(2016). 菜薹叶片衰老相关转录因子*BrWRKY75*的特性分析. 园艺学报, 43 (6): 1089–1098]
- Ulker B, Somssich IE (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 491–498
- Wang XL, Yan Y, Li YZ, Chu XQ, Wu CG, Guo XQ (2014). *GhWRKY40*, a multiple stress-responsive cotton WRKY gene, plays an important role in the wounding response and enhances susceptibility to *Ralstonia solanacearum* infection in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 9 (4): e93577
- Wu KL, Guo ZJ, Wang HH, Li J (2005). The WRKY family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins. *DNA Res*, 12 (1): 9–26
- Xiao PL, Feng RJ, Hou LX, Lü XT, Zhu D, Liu X (2015). Gene cloning and expression analysis of *WRKY18* in *Vitis vinifera*. *Plant Physiol J*, 51 (3): 391–398 (in Chinese with English abstract)

- [肖培连, 冯睿杰, 侯丽霞, 吕晓彤, 朱丹, 刘新(2015). 葡萄 *WRKY18* 基因的克隆及表达特性分析. 植物生理学报, 51 (3): 391–398]
- Xu XP, Chen CH, Fan BF, Chen ZX (2006). Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis *WRKY18*, *WRKY40*, and *WRKY60* transcription factors. *Plant Cell*, 18: 1310–1326
- Xu YH, Wang JW, Wang S, Wang JY, Chen XY (2004). Characterization of *GaWRKY1*, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene(+)- δ -cadinene synthase-A. *Plant Physiol*, 135: 507–515
- Yang YG, Lou QF, Chen JF, Liu Q, Li WG (2007). Structural analysis of the introns of cucumber *CSHSP70* gene. *Sci Agr Sin*, 40 (12): 2915–2919 (in Chinese with English abstract) [杨寅桂, 娄群峰, 陈劲枫, 刘强, 李为观(2007). 黄瓜 *CSHSP70* 基因内含子结构分析. 中国农业科学, 40 (12): 2915–2919]
- Zhao YB, Zhu LQ, Wang XJ (2006). Cloning and sequences analysis of *M Locus Protein Kinase* gene from *Brassica oleracea*. *Acta Agronomica sinica*, 32 (1): 46–50 (in Chinese with English abstract) [赵永斌, 朱利泉, 王小佳(2006). 甘蓝 *MLPK* 基因的克隆与序列分析. 作物学报, 32 (1): 46–50]
- Zu QL, Yin LJ, Xu ZS, Chen M, Zhou YB, Li LC, Ma YA, Min DH, Zhang XH (2015). Molecular characteristics and functional identification of foxtail millet transcription factor *WRKY36*. *Sci Agr Sin*, 48 (5): 851–860 (in Chinese with English abstract) [祖倩丽, 尹丽娟, 徐兆师, 陈明, 周永斌, 李连城, 马有志, 闵东红, 张小红(2015). 谷子 *WRKY36* 转录因子的分子特性及功能鉴定. 中国农业科学, 48 (5): 851–860]

Cloning and expression analysis of transcription factor *PIWRKY40* in peony

LI Jun-Jie^{1,*}, HAN Lu-Lu^{1,*}, MA Yan¹, YAO Wang-Jin-Song², GUO Jing¹, GUO Xian-Feng^{1,**}

¹College of Forestry, ²College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

Abstract: WRKY transcription factors play great roles in plant dormancy and other processes of growth and development. Based on our previous transcriptome data, the c22608.graph_c0 gene sequence which was significantly down-regulated during endodormancy release in peony buds was investigated using qRT-PCR method. The results corresponded to the transcriptome data, implying that the gene might be closely associated with peony bud dormancy release. The transcription gene, designated as *PIWRKY40* (accession number KU891820), was then cloned from *Paeonia lactiflora* ‘Da Fugui’ for further exploration and utilization. The full length of its cDNA sequence was 1 347 bp, with an open reading frame of 882 bp, encoding a protein of 293 amino acids with a typical WRKY domain. Gene structural analysis demonstrated that *PIWRKY40* contained 4 exons and 3 introns. And these introns included many *cis*-acting elements, which inferred meaningful in gene expression regulation. Phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of *PIWRKY40* and the WRKY family genes in *Arabidopsis thaliana* suggested that *PIWRKY40* belong to IIa type, whereas the clustering tree of *WRKY40* from peony and other plant species showed that *PIWRKY40* had the highest similarity with *TcWRKY40* from *Theobroma cacao*. Subcellular localization analysis revealed that the *PIWRKY40* protein was mainly detected in the nuclear. Semi-quantitative PCR analysis showed that *PIWRKY40* was expressed in each organs and extremely high in buds. This study laid an important foundation for further exploration of the physiological functions of *PIWRKY40*.

Key words: *Paeonia lactiflora*; *PIWRKY40*; cloning; expression analysis; subcellular localization

Received 2016-11-16 Accepted 2017-02-20

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (Grant No. ZR2014CM028).

*Co-first authors.

**Corresponding author (E-mail: guoxf@sdau.edu.cn).