

苹果*MdWRKY35*基因克隆与表达分析

苏梦雨¹, 慈志娟², 王楠¹, 房鸿成¹, 姜生辉¹, 岳璇璇¹, 陈学森^{1,*}

¹山东农业大学园艺科学与工程学院/作物生物学国家重点实验室, 山东泰安271018

²山东省烟台市农业科学研究院, 山东烟台265500

摘要: WRKY转录因子是植物中发现的一种新型转录调控因子, 在响应非生物胁迫、调控生长发育等方面具有重要作用。然而, WRKY基因如何调控开花及通过调控植物发育从而提高抗逆等方面的研究鲜有报道。本研究以新疆红肉苹果(*Malus neidzwetzkyana*)杂种二代群体(*M. niedzwetzkyana*/*M. pumila* ‘Fuji’/*M. pumila* ‘Gala’)的幼嫩叶片为试材, 克隆得到一个新的WRKY转录因子, 命名为*MdWRKY35*, 测序发现其包含804 bp的完整开放阅读框(ORF), 编码267个氨基酸, 预测其编码蛋白质分子质量为30.83 kDa, 理论等电点为4.81, 定位于苹果基因组的第11号染色体上, 由3个外显子和2个内含子构成。*MdWRKY35*与白梨(*Pyrus×bretschneideri*)的同源性高达93.28%, 具有WRKY转录因子家族典型的保守结构域, 属于第II组WRKY蛋白家族。组织特异性分析表明*MdWRKY35*在根中表达最高, 在茎尖及叶片的表达次之。多种逆境胁迫因子如高盐、干旱、低温以及脱落酸(ABA)等诱导后, ‘嘎啦’苹果(*M. pumila* ‘Gala’)组培苗中的*MdWRKY35*呈上调表达; *MdWRKY35*蛋白可能定位于细胞核中; 荧光素酶(LUC)活性检测试验表明, *MdWRKY35*可能促进*MdFT*的表达。研究*MdWRKY35*在抗逆调节及成花进程中的功能可以为进一步完善红肉苹果育种的理论与技术体系提供参考。

关键词: 苹果; *MdWRKY35*; 基因克隆; 表达模式; 亚细胞定位

苹果(*Malus* spp.)属于蔷薇科苹果亚科(Maloi-deae), 是世界上最重要的果树作物之一。开花是果树结果的前提, 对果树生产的经济效益有着至关重要的影响。苹果产业的发展涉及到诸多问题, 例如: 漫长的营养生长期、大小年更替等(邢利博2016)。在生产中, 人们主要通过使用植物生长调节剂、修剪整形等方式来缩短童期, 这意味着传统的育种方法效率低, 难以满足市场需求(Sun等2016)。因此, 阐明苹果开花调控的分子机制是促进苹果成花转变的一项重要基因工程。

在高等植物发育进程中成花转变是一个非常重要的环节, 由遗传和环境两种因素共同作用和相互协调完成。近年来, 有研究发现成花调控主要涉及7条途径, 即光周期途径、春化途径、自主途径、温敏途径、年龄途径、赤霉素途径和成花抑制途径(宋杨等2014), 这些途径最终通过作用于下游一些成花整合子如*FLOWERING LOCUS T (FT)*、*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*等来调控开花时间。其中涉及到一些主要的转录因子, MADS-box转录因子家族是其中最主要的转录因子家族之一(Smaczniak等2012)。此外, 其他家族成员在成花调控过程中也起着直接

或间接的作用, 例如MYBs (Shin等2002)、NACs (Yoo等2007)、DREBs (Tong等2009)、WRKYs (Xie等2016)等。目前, WRKY转录因子家族是研究的热点之一。WRKY转录因子为植物中发现的一种新型转录因子, 含有一或两个高度保守的WRKY结构域, 通常在N端有一个保守的WRKYGQK基序, 在C末端有一个C₂H₂或C₂HC锌指结构。WRKY蛋白通过结合目标启动子中的W-box (C/TTGACT/C)元件参与各种发育和生理过程(Eulgem等2000; 陈晓丽等2016)。迄今为止, 大量的研究表明, WRKY转录因子家族在各种生物和非生物胁迫反应以及若干生长和发育过程中起着重要作用(Rushton等2010; Miao和Zentgraf 2007; Zhou等2011; 肖培连等2015)。例如, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *WRKY46*、*WRKY54*和*WRKY70*参与了油菜(*Brassica napus*)甾体调控的植物生长和干旱反应(Chen等2017)。过表达*OsWRKY6*基因使转基因水稻(*Oryza sativa*)表现出更强的抗病性(Choi等2015)。除了病原防御,

收稿 2018-09-26 修定 2019-02-25

资助 国家重点研究计划项目(2016YFC0501505)和国家自然科学基金(31572091和31730080)。

* 通讯作者(chenxs@sdau.edu.cn)。

一些WRKY基因如WRKY6、WRKY30、WRKY53、WRKY93等也参与非生物胁迫(Shen等2012; Tripathi等2015; Qin等2015)。另外,近年来关于WRKY转录因子的报道主要在参与各种生物以及非生物胁迫等方面,在响应各种胁迫与调控植物开花之间的关系还鲜有报道。一些与抗性相关的WRKY基因超量表达,经常导致转基因植株矮小并且几乎所有的株系都表现出叶形和花期的变化(Li等2004),这表明一些生物及非生物胁迫与成花之间可能存在一定联系。已有研究发现过表达WRKY25导致拟南芥在长光照下开花提前(王芳秀等2011); 35S::AtWRKY45转基因株系的花期和野生型相比略有提前(宋钰2008); WRKY12和WRKY13在短日照条件下可以通过调节FUL表达调控拟南芥成花(Li等2016); WRKY71可以在高盐胁迫下通过直接激活FT及LFY的表达来促进拟南芥开花(Yu等2017); WRKY75通过直接激活FT表达使拟南芥提早开花等(Zhang等2018)。拟南芥中AtWRKY35被报道主要参与一些抗病反应(伍林涛等2014),但与AtWRKY35同源性较近的AtWRKY22/29被激活后可以诱导开花提前(范邓鹏等2010)。AtWRKY35是否参与非生物胁迫及调控植物生长发育等方面的研究还鲜有报道。

本研究以红肉苹果幼嫩叶片及‘嘎啦’苹果(*M. pumila* ‘Gala’)组培苗为试材,对苹果WRKY转录因子MdWRKY35进行生物信息学及表达水平的分析,进一步验证MdWRKY35与多种逆境胁迫因子之间的关系,并通过荧光素酶(luciferase, LUC)活性试验验证其与成花整合子之间的关系,旨在为进一步研究MdWRKY35转录因子在红肉苹果抗逆调节及成花进程中的功能以及完善苹果育种的理论与技术体系提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与处理

试验于2017和2018年在山东农业大学作物生物学国家重点实验室和聊城市冠县果树育种基地(36°29'N 115°27'E)完成。取材于新疆红肉苹果杂种二代[红肉苹果(*Malus niedzwetzkyana* Dieck ex Koehne)‘富士’苹果(*M. pumila* Mill. cv. Fuji)‘嘎啦’

苹果(*M. pumila* cv. Gala)]群体的根、叶片、茎尖以及花、果实,液氮速冻,带回实验室-80°C保存。

将光照培养箱(16 h光照/8 h黑暗, 24°C)中长势均匀一致的‘嘎啦’苹果组培苗分别经过脱落酸(abscisic acid, ABA; 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、NaCl (250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、聚乙二醇6000 (polyethylene glycol 6000, PEG6000; 20%)、低温(4°C)处理0、0.5、1、1.5、2、4、8、12、24 h以及4 d之后,取大小及节位基本一致的叶片液氮速冻, -80°C保存备用,每个处理至少重复3次。‘王林’苹果(*M. pumila* cv. Orin)愈伤组织在继代培养基[MS+0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-苄氨基嘌呤(6-benzylamino-purine, 6-BA)+1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)]上24°C、暗处培养,每隔15 d继代一次。

1.2 总RNA提取与实时荧光定量PCR分析

总RNA提取方法均参照康为世纪OminiPlant RNA Kit操作说明。反转录合成cDNA利用Fermentas公司RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒来完成。实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)使用伯乐CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System进行,总反应体系20.0 μL ,包括10.0 μL 2.5 \times RealMaster Mix/20 \times SYBR Solution、7.0 μL 重蒸水(ddH₂O)、1.0 μL cDNA模板(50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、上下游引物各1.0 μL (5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。运行程序为: 95.0°C预变性30 s; 95.0°C变性5 s, 58°C退火10 s, 72.0°C延伸30 s, 45个循环; 65°C孵育20 s (熔解温度从55°C到95°C每升高0.5°C保持1 s, 然后停止反应)。每个样品设置3个重复。以苹果肌动蛋白MdActin (Wang等2017)作为内参,数据的分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法(Livak和Schmittgen 2001)。

1.3 MdWRKY35克隆与生物信息学分析

利用拟南芥AtWRKY35的编码序列(coding sequence, CDS)在苹果基因组(GDR数据库, <http://www.rosaceae.org/>)中比对,获得一个序列号为MDP00-00202292的基因,命名为MdWRKY35,分别设计上下游引物F (5'-ATGGATGAAACCCTTTCTCCA-3')和R (5'-AGAAGGGACAGAGGGAATCCT-3')。具体反应体系: 1 μL cDNA、上下游引物各1 μL 、5 μL 5 \times HF Buffer、2.5 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP、0.5 μL 酶、14.5 μL ddH₂O。PCR程序为: 98°C 30 s;

98°C 10 s, 58°C 30 s, 72°C 45 s, 35个循环; 72°C 10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶进行电泳并回收目的条带, 连接pLB零背景载体(VT205)进行测序。

MdWRKY35蛋白通过ExPASy网站(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行理化性质分析, 用DNA-MAN软件比对蛋白质氨基酸序列, 用MEGA 5.1软件构建系统进化树。

1.4 载体构建和亚细胞定位

为进一步验证MdWRKY35蛋白在细胞中的位置, 设计亚细胞定位引物F (5'-GTTCGACATGGATGAAACCCTTTCTCCA-3')和R (5'-GGATCCAG-AAGGGACAGAGGGAATCCT-3'), 将MdWRKY35全长CDS (不含终止密码子)连接到pRI101-AN载体上, 构建35S:MdWRKY35-GFP融合载体并转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404。然后转化‘王林’原生质体, 室温避光培育12 h, 在荧光显微镜(Olympus BX53F, Tokyo, Japan)下检测原生质体中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的荧光。使用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)对细胞核进行染色。

1.5 LUC活性检测试验

用引物5'-GGATCCATGGATGAAACCCTTTCTCCA-3'和5'-AGGCCTAGAAGGGAGGGAATCCT-3'扩增MdWRKY35的编码区序列, 用引物5'-GGATCCCAACGGAAAAGCCTTCCTTA-3'和5'-CCATGGCTTGAAGGAGCTTGAGCTTG-3'扩增MdFT的启动子序列, 之后连接pLB零背景载体。用BamHI和StuI对MdWRKY35-pLB和pHBT-AvrRpm1-HA载体分别进行双酶切, 用BamHI和NcoI对MdFT-pLB和pFRK1-LUC-nos分别进行双

酶切, 构建MdWRKY35-pHBT-AvrRpm1-HA和MdFT-pFRK1-LUC-nos重组载体。来自‘王林’愈伤组织的原生质体被用作瞬时转化的材料, 每次转化都要使用用于标准化含 β -葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, GUS)的质粒。对于瞬时转化, 将1 μ L GUS质粒、3 μ L LUC报告基因和6 μ L效应基因混和在一起, 并使用40% PEG转化原生质体。在24°C孵育6 h后, 使用Multi-Mode Plate Readers (Victor X4, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)测定LUC和GUS活性。根据LUC与GUS活性的比率计算启动子相对活性。

1.6 数据分析

用Excel 2007作图和进行数据分析, 用DPS 7.05软件进行显著性分析。不同小写字母或者“*”表示在 $P < 0.05$ 水平下具有显著差异, 不同大写字母或者“**”表示在 $P < 0.01$ 水平下具有极显著差异。

2 实验结果

2.1 MdWRKY35的克隆与生物信息学分析

如图1所示, 以红肉苹果幼嫩叶片cDNA为模板, 利用逆转录PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR)技术克隆得到一条大小约800 bp的条带。对克隆片段进行胶回收测序, 发现该基因的开放阅读框长度为804 bp, 编码267个氨基酸, 蛋白质分子质量为30.83 kDa, 理论等电点为4.81。

2.2 MdWRKY35基因组结构及进化树与结构功能域分析

利用GDR数据库分析MdWRKY35的染色体位置和基因结构。如图2所示, MdWRKY35位于苹果基因组的第11号染色体上, 由3个外显子和2个内含子构成。

表1 基因克隆和qRT-PCR所用引物序列

Table 1 Primers used for cloning and qRT-PCR analysis

引物名称	正向序列(5'→3')	反向序列(5'→3')
MdWRKY35	ATGGATGAAACCCTTTCTCCA	CAACGGAAAAGCCTTCCTTA
ProMdFT	GGTCCTCTGATGTGAAT	ACCGATATTCCAGCAACT
MdWRKY35-(qRT)	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTA	AGAAGGGACAGAGGGAATCCT
MdFT-(qRT)	CTTGAAGGAGCTTGAGCTTG	TCTTCTGTCTTGTCTTTG
MdActin-(qRT)	GGCGAAGTCTCTGGTATT	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC

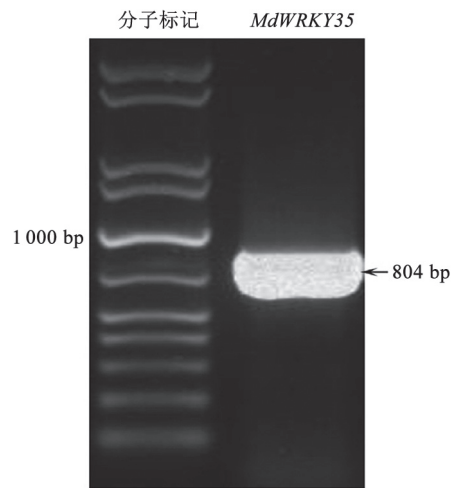


图1 *MdWRKY35*编码区全长的RT-PCR扩增
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of *MdWRKY35* RT-PCR products

如图3所示,对来自不同物种的WRKY构建系统发育进化树,发现苹果中的*MdWRKY35*与白梨(*Pyrus × bretschneideri*)中的*PbWRKY35*亲缘关系最近,与西洋参(*Panax quinquefolius*)中的*PqWRKY35*亲缘关系最远。结构功能域分析发现*MdWRKY35*含有一个典型的WRKYGQK七肽序列和一个C₂H₂类型的锌指结构,属于WRKY转录因子Group II家族(图4)。

2.3 *MdWRKY35*组织表达特性分析

*MdWRKY35*的组织特异性表达模式分析表明(图5),该基因在被检测的各种组织器官中均有表达,其中在根中表达量最高,在茎尖和叶片中的表达次之。

2.4 逆境胁迫诱导下*MdWRKY35*在短时间内的表达模式

在ABA、低温、NaCl和PEG胁迫诱导下,*Md-*

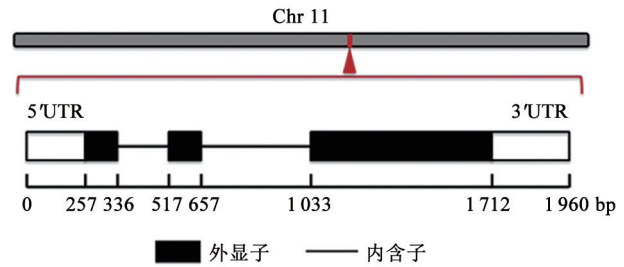


图2 *MdWRKY35*基因组结构
Fig.2 Genomic structure of *MdWRKY35*
UTR表示非翻译区。

*WRKY35*的表达量均显著变化,表明*MdWRKY35*可能参与对这几种逆境胁迫的应答。在外源ABA诱导下,*MdWRKY35*的表达在2 h时达到一个初级峰值,而后逐渐降低,8 h时表达量降至最低,随后逐步回升,表明*MdWRKY35*可能在ABA信号通路中起作用(图6-A)。*MdWRKY35*对低温胁迫也比较敏感,低温处理1 h时其表达量即达到最大值,随后急剧下降,表达呈波浪式变化(图6-B)。NaCl胁迫下,*MdWRKY35*的表达在1 h时达到初级峰值,后逐渐降低,2 h时表达量降至最低,随后又逐步回升,24 h时再次达到峰值,表明*MdWRKY35*可能在NaCl信号通路中起作用(图6-C)。在PEG处理1.5 h时,*MdWRKY35*表达量达到第一个高峰,随后下降,而后又逐渐升高(图6-D),说明*MdWRKY35*可能受渗透胁迫诱导表达。

2.5 *MdWRKY35*可能参与红肉苹果的成花调控

为研究*MdWRKY35*基因在红肉苹果中与成花之间的关系,我们观察了在不同逆境胁迫诱导下*MdWRKY35*与成花关键整合子*MdFT*的表达趋势变化。在大部分逆境胁迫诱导4 d后,我们发现*Md-*



图3 不同物种间WRKY蛋白的系统进化树
Fig.3 Phylogenetic tree of WRKY proteins among different species



图4 不同物种间WRKY蛋白序列比对

Fig.4 Sequence alignment of WRKY proteins among different species

红色框部分表示WRKYGQK氨基酸序列, 黑色框部分表示C₂H₂锌指结构基序。

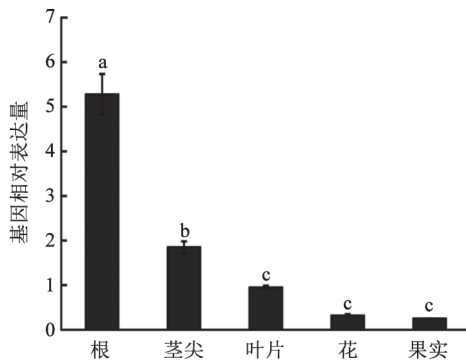


图5 MdWRKY35在红肉苹果不同组织中的相对表达量
 Fig.5 Relative expression levels of MdWRKY35 in different tissues of red-fleshed apple

WRKY35与MdFT的表达均显著升高(图7-A、B和D), 但在NaCl胁迫诱导后, MdWRKY35的表达上升, 而MdFT的表达受到抑制(图7-C)。因此, 我们推测MdWRKY35可能通过响应不同的逆境胁迫进而参与不同的成花进程。

2.6 MdWRKY35蛋白的亚细胞定位

为了检测MdWRKY35蛋白在细胞中的定位, 构建35S:MdWRKY35-GFP融合蛋白。无终止密码子的MdWRKY35开放阅读框与pRI101-AN载体中GFP开放阅读框的5'末端融合。具有单独驱动GFP的花椰菜花叶病毒(Cauliflower mosaic virus, CaMV) 35S启动子的pRI101-AN载体用作对照(图8-A)。

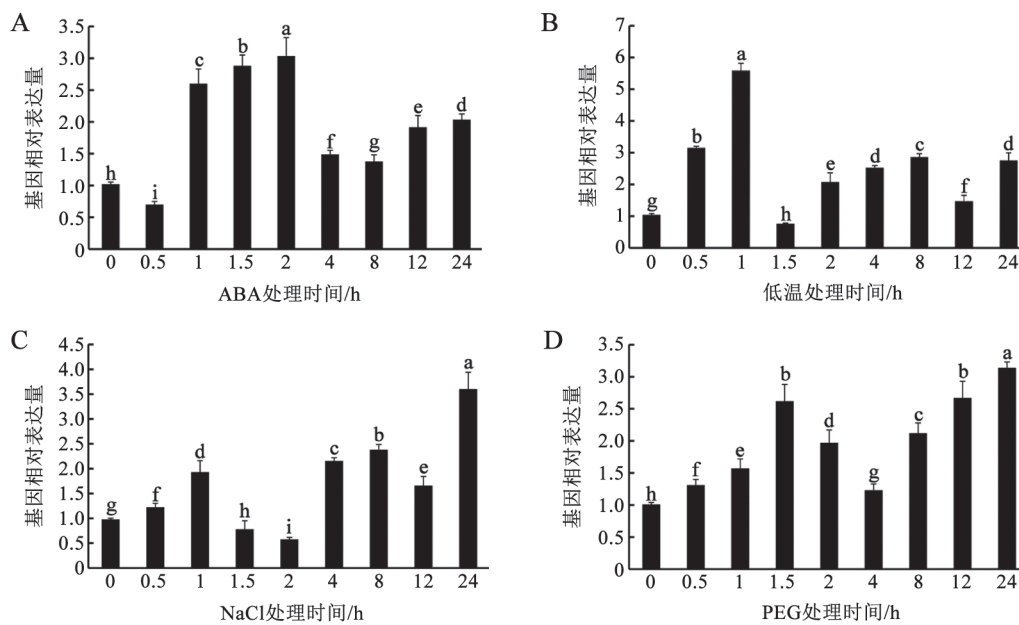


图6 胁迫条件下‘嘎啦’组培苗中MdWRKY35的表达模式

Fig.6 Expression patterns of MdWRKY35 in ‘Gala’ tissue culture seedlings under different stresses

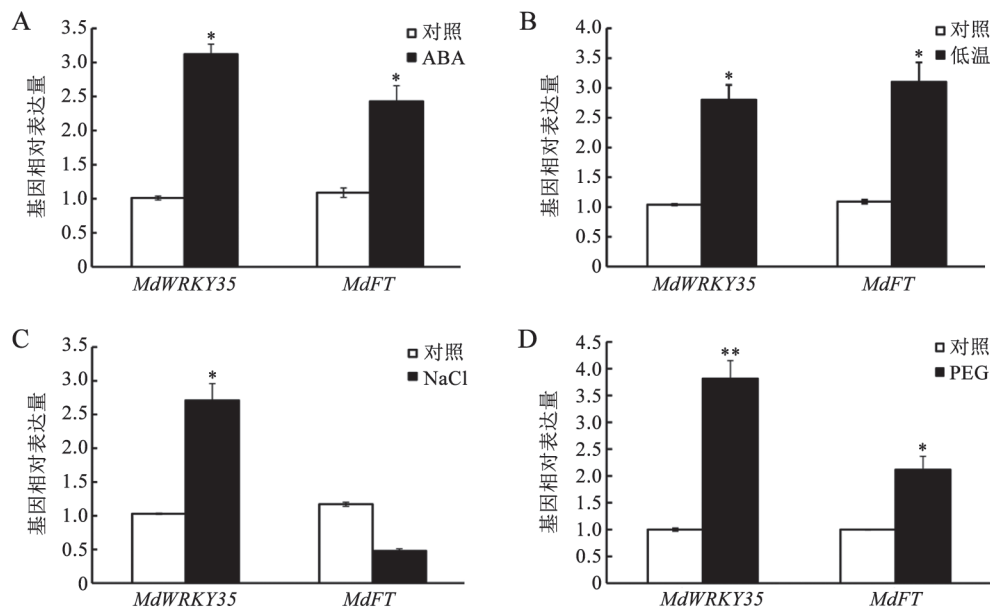


图7 不同胁迫处理4 d后‘嘎啦’组培苗中MdWRKY35与MdFT的表达模式

Fig.7 Expression patterns of *MdWRKY35* and *MdFT* in ‘Gala’ tissue culture seedlings under different stresses for 4 days

*表示指标间差异显著($P < 0.05$), **表示指标间差异极显著($P < 0.01$)。图9同。

然后将两组融合蛋白分别转化‘王林’愈伤组织,用荧光显微镜观察转基因‘王林’原生质体,发现35S:MdWRKY35-GFP只在细胞核中有荧光信号,细胞质和细胞膜中均无GFP信号,而在35S:GFP对照组中,整个细胞中均能观察到GFP信号,表明MdWRKY35蛋白可能定位于细胞核上(图8-B)。

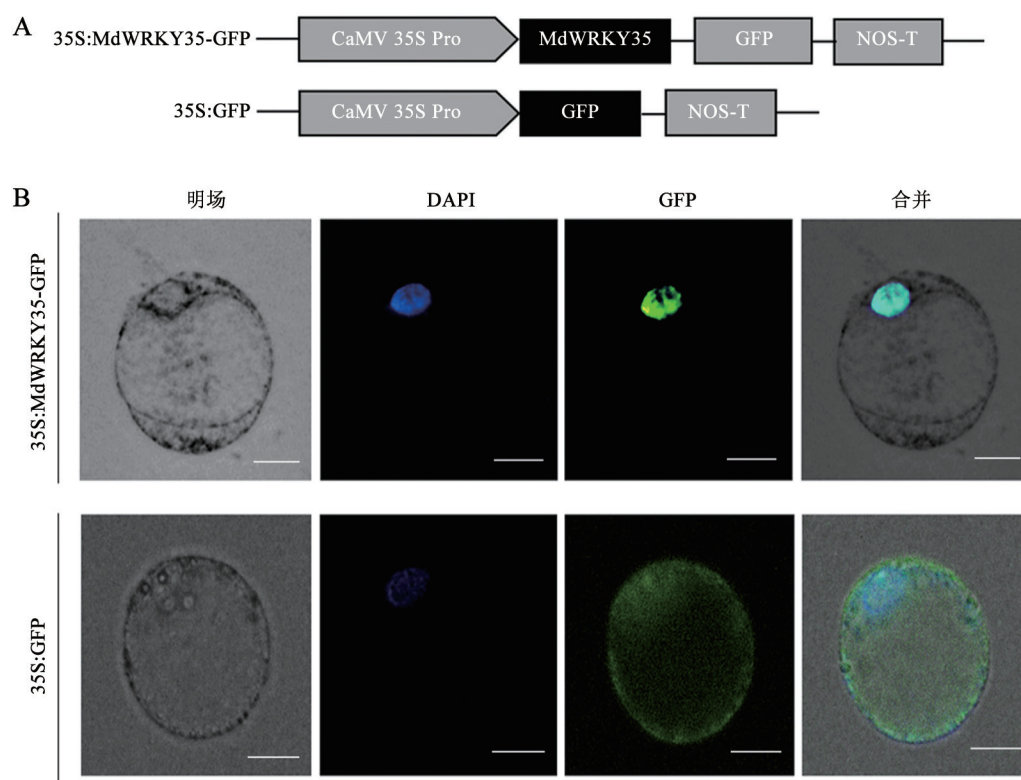
2.7 *MdWRKY35*可能激活*MdFT*的表达

为了验证*MdWRKY35*对*MdFT*启动子活性的影响,将*MdWRKY35*插入到pHBT-AvrRpm1-HA载体,构建融合载体MdWRKY35-pHBT-AvrRpm1-HA,将*MdFT*启动子插入到pFRK1-LUC-nos载体上,构建ProMdFT-pFRK1-LUC-nos融合载体(图9-A)。然后将两种质粒瞬时转化‘王林’愈伤组织提取的原生质体,利用酶标仪测定LUC与GUS的活性。结果表明,*MdWRKY35*可以显著提高*MdFT*启动子的活性(图9-B)。

3 讨论

成花转变是决定开花植物生殖成功的一个重要过程。开花时间的遗传调控和开花相关基因的鉴定和阐明,对缩短童期及提高果树产量等具有重要意义(Sun等2016)。近年来,对WRKY转录因

子及其在各种生物/非生物胁迫下的功能认识有所拓展,然而,对WRKY基因家族在植物发育中的作用知之甚少。本研究从红肉苹果中克隆得到一个新的WRKY转录因子*MdWRKY35*,其可能在苹果抗逆调节及成花进程中扮演着重要的角色。在不同逆境胁迫诱导下,基因的功能不同,其表达也就不同,调节基因通常在逆境胁迫的早期表达,而功能基因的表达相对较晚(Pandey和Somssich 2009)。本研究发现*MdWRKY35*受ABA、PEG、NaCl、低温等多种逆境胁迫诱导表达,不同逆境胁迫诱导下基因的表达模式差异显著,说明该基因可能参与对多种逆境胁迫的应答,并且*MdWRKY35*在不同的逆境胁迫应答途径中参与的调节机制可能不同。有研究表明,拟南芥中可以通过DELLA蛋白参与盐度调控推迟成花(Apse等1999);也可以通过NTM1-LIKE 8 (NLT8)介导盐胁迫,通过抑制FT表达来延迟开花(Kim等2007);另外BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)也可以受高盐度诱导表达,在高盐度下通过与FT竞争与FD结合而延迟开花等(Ryu等2014)。本研究发现高盐处理‘嘎啦’组培苗后,*MdFT*的表达也受到相应程度的抑制,这可能是由

图8 *MdWRKY35*蛋白在转基因‘王林’原生质体中的定位Fig.8 Localization of *MdWRKY35* protein in protoplasts of transgenic ‘Orin’

A: 35S:*MdWRKY35*-GFP与35S:GFP结构示意图; CaMV 35S Pro是指来自花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子, GFP表示绿色荧光蛋白, NOS-T表示终止子序列端。B: *MdWRKY35*蛋白的亚细胞定位; DAPI为蓝色荧光, GFP为绿色荧光, 标尺代表20 μm 。

于在高盐胁迫下, 一些成花抑制基因的高度表达所造成的。众所周知, 基因表达模式通常与基因功能密切相关(Fornara等2008)。本研究发现*MdWRKY35*在红肉苹果的根中表达最高, 在茎尖以及叶片中的表达次之, 这表明*MdWRKY35*可能在根系的生长发育及抗逆调节进程中扮演着重要的角色, 并且它可能通过在叶片或者茎尖影响成花整合子*MdFT*的活性来参与开花时间的调控。

目前, 有研究发现不同的WRKY蛋白通过调节不同的成花整合子或花分生组织特征基因的表达来参与不同的开花途径。例如Li等(2016)发现*WRKY12*和*WRKY13*在短日照条件下通过直接调节*FUL*的表达调控拟南芥成花。Yu等(2016)发现*WRKY71*主要通过激活*FT*以及*LFY*的表达促进拟南芥开花。Zhang等(2018)发现*WRKY75*通过直接激活*FT*的表达促进拟南芥开花。本研究发现*Md-*

*WRKY35*可能通过激活*MdFT*的表达来调控苹果成花进程, 但是它对成花进程的具体调控还有待进一步挖掘。更多的功能验证如过表达苹果组培苗及模式植物拟南芥等有待进一步开展。

借鉴模式植物的最新研究进展与成果, 结合现代分子生物技术, 完善理论体系解决生产难题, 是近年来果树研究领域理论联系实践的重要趋势。果树的抗逆调节及成花调控已成为近年来的研究热点, 本研究结果旨在为完善红肉苹果育种体系提供理论参考。

参考文献(References)

- Achard P, Cheng H, De Grauwe L, et al (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311 (5757): 91–94
- Chen L, Xiang S, Chen Y, et al (2017). *Arabidopsis* WRKY45 interacts with the DELLA protein RGL1 to positively

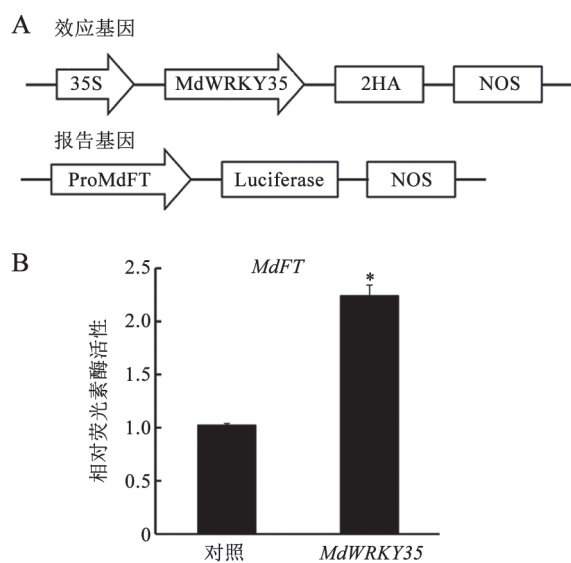


图9 LUC活性试验验证MdWRKY35促进MdFT启动子的活性
Fig.9 *MdWRKY35* promotes the activity of *MdFT* promoter using LUC activity assay

A: 效应基因MdWRKY35和报告基因MdFT载体构建; 35S表示强启动子, HA表示带有HA标签的蛋白, Luciferase表示荧光素酶(LUC), NOS表示终止子序列。B: LUC活性试验检测MdWRKY35对MdFT启动子的影响。

- regulate age-triggered leaf senescence. *Mol Plant*, 10 (9): 1174–1189
- Chen XL, Yan D, Sun LN, et al (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, 孙丽娜等(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]
- Choi C, Hwang SH, Fang IR, et al (2015). Molecular characterization of *Oryza sativa* WRKY6, which binds to W-box-like element 1 of the *Oryza sativa* pathogenesis-related (*PR*) 10a promoter and confers reduced susceptibility to pathogens. *New Phytol*, 208 (3): 846–859
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, et al (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 5 (5): 199–206
- Fan D (2010). The role of dehydroascorbate in tobacco early flowering induced by low-temperature and DHA signaling pathways (dissertation). Zhengzhou: Henan Agricultural University (in Chinese with English abstract) [范邓鹏(2010). 脱氢抗坏血酸在低温诱导烟草早花过程中的作用及其信号途径分析(学位论文). 郑州: 河南农业大学]
- Fornara F, Gregis V, Pelucchi N, et al (2008). The rice *St-*

- MADS11*-like genes *OsMADS22* and *OsMADS47* cause floral reversions in *Arabidopsis* without complementing the *svp* and *agl24* mutants. *J Exp Bot*, 59 (8): 2181–2190
- Kim SG, Kim SY, Park CM (2007). A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *Planta*, 226 (3): 647–654
- Li J, Brader G, Palva ET (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell*, 16 (2): 319–331
- Li W, Wang H, Yu D (2016). *Arabidopsis* WRKY transcription factors WRKY12 and WRKY13 oppositely regulate flowering under short-day conditions. *Mol Plant*, 9 (11): 1492–1503
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Miao Y, Zentgraf U (2007). The antagonist function of *Arabidopsis* WRKY53 and ESR/ESP in leaf senescence is modulated by the jasmonic and salicylic acid equilibrium. *Plant Cell*, 19 (3): 819–830
- Pandey SP, Somssich IE (2009). The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol*, 150 (4): 1648–1655
- Qin Y, Tian Y, Liu X (2015). A wheat salinity-induced WRKY transcription factor TaWRKY93 confers multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 464 (2): 428–433
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, et al (2010). WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci*, 15 (5): 247–258
- Ryu JY, Lee HJ, Seo PJ, et al (2014). The *Arabidopsis* floral repressor BFT delays flowering by competing with FT for FD binding under high salinity. *Mol Plant*, 7 (2): 377–387
- Shen H, Liu C, Zhang Y, et al (2012). OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. *Plant Mol Biol*, 80 (3): 241–253
- Shin B, Choi G, Yi H, et al (2002). *AtMYB21*, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *Plant J*, 30 (1): 23–32
- Smaczniak C, Immink RGH, Muiño JM, et al (2012). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109 (5): 1560–1565
- Song Y (2008). The function exploration of four plant WRKY transcription factors (dissertation). Mengla: Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, CAS (in Chinese with English abstract) [宋钰(2008). 四个植物WRKY转录调控因子的功能初探(学位论文). 勐腊: 中国科学院西双版纳热带植物园]

- Song Y, Dou LD, Zhang HJ (2014). Molecular and genetic mechanisms of control of floral induction in higher plants. *Plant Physiol J*, 50 (10): 1459–1468 (in Chinese with English abstract) [宋杨, 窦连登, 张红军(2014). 高等植物成花诱导调控的分子和遗传机制. *植物生理学报*, 50 (10): 1459–1468]
- Sun LM, Zhang JZ, Hu CG, et al (2016). Characterization and expression analysis of *PtAGL24*, a *SHORT VEGETATIVE PHASE/AGAMOUS-LIKE 24 (SVP/AGL24)*-type MADS-box gene from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Front Plant Sci*, 7: 823–835
- Tong Z, Hong B, Yang Y, et al (2009). Overexpression of two chrysanthemum *DgDREB1* group genes causing delayed flowering or dwarfism in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 71: 115–129
- Tripathi P, Rabara RC, Choudhary MK, et al (2015). The interactome of soybean GmWRKY53 using yeast 2-hybrid library screening to saturation. *Plant Signal Behav*, 10 (7): e1028705
- Wang FX, Li SJ, Yu DQ (2011). Overexpression of *WRKY25* causes early flowering in *Arabidopsis* under long-day conditions. *Plant Divers Resour*, 33 (6): 653–659 (in Chinese with English abstract) [王芳秀, 黎舒佳, 余迪求(2011). *WRKY25*过量表达导致拟南芥在长光照下开花提前. *植物分类与资源学报*, 33 (6): 653–659]
- Wang N, Xu H, Jiang S, et al (2017). MYB12 and MYB22 play essential roles in proanthocyanidin and flavonol synthesis in red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant J*, 90 (2): 276–292
- Wu L, Kang G, Feng B, et al (2014). Sequence analysis of transcription factor *AtWRKY35* and construction of prokaryotic expression vector. *Agr Sci Technol*, 15 (10): 1649–1650
- Xiao PL, Feng RJ, Hou LX, et al (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, 侯丽霞等(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]
- Xie ZW, Wang LJ, Chen JY, et al (2016). Studies on WRKY transcription factors and their biological functions in plants. *J Agr Sci Technol*, 18 (3): 46–54 (in Chinese with English abstract) [谢政文, 王连军, 陈锦洋等(2016). 植物WRKY转录因子及其生物学功能研究进展. *中国农业科技导报*, 18 (3): 46–54]
- Xing L (2016). Analysis of gene expression pattern of flower bud induction and molecular mechanism of promoting flowering with shoot bending in ‘Nagafu No. 2’ apple variety (dissertation). Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [邢利博(2016). ‘长富2号’苹果花芽孕育基因表达模式分析与拉枝调控成花的分子机制(学位论文). 杨凌: 西北农林科技大学]
- Yoo SY, Kim Y, Kim SY, et al (2007). Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 2 (7): e642
- Yu Y, Liu Z, Wang L, et al (2016). WRKY71 accelerates flowering via the direct activation of *FLOWERING LOCUS T* and *LEAFY* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 85 (1): 96–106
- Yu Y, Wang L, Chen J, et al (2017). WRKY71 acts antagonistically against salt-delayed flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 59 (2): 414–422
- Zhang L, Chen L, Yu D (2018). Transcription factor WRKY75 interacts with DELLA proteins to affect flowering. *Plant Physiol*, 176: 790–803
- Zhou X, Jiang Y, Yu D (2011). WRKY22 transcription factor mediates dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Mol Cells*, 31 (4): 303–313

Cloning and expression analysis of *MdWRKY35* gene in apple

SU Meng-Yu¹, CI Zhi-Juan², WANG Nan¹, FANG Hong-Cheng¹, JIANG Sheng-Hui¹,
YUE Xuan-Xuan¹, CHEN Xue-Sen^{1,*}

¹College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University / State Key Laboratory of Crop Biology, Taian, Shandong 271018, China

²Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai, Shandong 265500, China

Abstract: WRKY transcription factor is a novel transcriptional regulator found in plants, which plays an important role in responding to abiotic stress and regulating growth and development. However, there are few reports on how *WRKY* gene regulates flowering and enhances stress resistance by regulating plant development. In this study, the young leaves of hybrid second generation group of *Malus neidzwetzkyana* (*M. niedzwetzkyana*/*M. pumila* 'Fuji')/*M. pumila* 'Gala') were used as test materials, a new WRKY transcription factor was cloned and named *MdWRKY35*. It was sequenced and found to contain a complete 804 bp open reading frame (ORF), encoding 267 amino acids. It was predicted that the protein molecular mass is 30.83 kDa and the isoelectric point is 4.81, which was located on chromosome 11 of the apple genome and consisted of three exons and two introns. *MdWRKY35* shares 93.28% homology with *Pyrus × bretschneideri*, has a typical conserved domain of WRKY transcription factor family, and belongs to group II WRKY protein family. Tissue specificity analysis showed that *MdWRKY35* was the highest in roots and highly expressed in stem tips and leaves. The expression of *MdWRKY35* in 'Gala' plantlet was significantly increased after induction by many stress factors such as high salt, drought, low temperature and abscisic acid (ABA) treatment. *MdWRKY35* protein might be localized in the nucleus. Luciferase activity assay showed that *MdWRKY35* might promote the expression of *MdFT*. Studying the function of *MdWRKY35* in the process of stress tolerance and flowering could provide a reference for further improving the theory and technical system of red-fleshed apple breeding.

Key words: apple; *MdWRKY35*; gene cloning; expression pattern; subcellular localization

Received 2018-09-26 Accepted 2019-02-25

This work was supported by the National Key Research and Development Project (2016YFC0501505), and the National Natural Science Foundation of China (31572091 and 31730080).

*Corresponding author (chenxs@sdau.edu.cn).