

## 桃转录因子*PpWRKY11*的克隆及表达分析

王庆杰, 张泽杰, 高彦刚, 陈修德, 肖伟, 付喜玲, 李玲, 李冬梅\*, 高东升\*

作物生物学国家重点实验室, 山东果蔬优质高效生产协同创新中心, 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018

**摘要:** WRKY转录因子能够响应生物及非生物胁迫。本研究基于前期实验室桃花芽休眠解除前后表达量明显下调的Prupe.1G071400基因进行研究, 通过定量PCR表明此结果与前期实验结果相符合, 证明该基因可能与桃花芽休眠解除密切相关。从桃‘中油四号’叶片克隆了Prupe.1G071400基因, 通过生物信息学分析, 命名此基因为*PpWRKY11*; *PpWRKY11*蛋白编码282个氨基酸, 包含特有WRKY结构域。进化树分析发现*PpWRKY11*与蔷薇科苹果和梨等亲缘关系最为相近; 亚细胞定位显示*PpWRKY11*定位于细胞核中; 酵母双杂显示*PpWRKY11*蛋白没有自主激活活性, 进一步对*PpWRKY11*进行筛库, 筛选出互作的蛋白; 构建PGEX-*PpWRKY11*原核表达载体, 转化大肠杆菌Rosetta (DE3)诱导出符合大小的蛋白, 发现*PpWRKY11*蛋白主要在沉淀中。

**关键词:** 桃; *PpWRKY11*; 芽休眠; 基因克隆; 亚细胞定位; 基因表达

多年生温带植物在生长的过程中, 会受到各种环境因子的影响。为了正常的生长发育, 植物在长期的演化过程中形成了休眠的机制, 通过物质及能量代谢调节自身生理活动, 以应对不利环境条件的影响。根据生理生态变化, 休眠可以分为抑制性休眠、自然休眠和生态休眠(Niu等2016)。桃是多年生温带木本植物, 其在冬天为了抵抗不利的环境, 进入了自然休眠的状态。进入自然休眠后, 只有获得足够的需冷量以后, 桃芽才能在正常的环境下生长, 因此休眠是桃产量和质量的保证(Saure等1985)。在自然休眠的过程中, 植物受到温度、光照等多种因素的影响, 调控细胞内一系列的物质和代谢运动, 在这个进程中, 转录因子在其中起到关键作用。

WRKY基因是一类被广泛研究的转录因子家族, 其在调控植物生物及非生物胁迫响应中起到了关键作用(Rushton等2010; Phukan等2016)。近几年发现WRKY转录因子能够调控种子的休眠进程(Rushton等2012)。例如: 拟南芥*AtWRKY2*基因受脱落酸(abscisic acid, ABA)的诱导; 添加ABA后, 拟南芥*wrky2*突变体相比于野生型, 萌芽率明显降低(Jiang和Yu 2009)。拟南芥中的*wrky18*、*wrky4*以及*wrky60*基因的突变体均表现为对ABA高度敏感的表型; *AtWRKY18*、*AtWRKY40*和*AtWRKY60*基因作为ABA信号传导的负调节因子, 能够抑制ABA信号的传导, 在种子的萌发及发育进程中起

到重要作用(Rushton等2012)。Ding等(2016)发现拟南芥中*WRKY21*能够调控*ABI3*基因的表达, 从而和ABA协同调控种子的休眠及发育。拟南芥中*AtWRKY11*基因属于WRKY家族中IId家族, 在拟南芥中*WRKY11*基因能够调控植物对丁香假单胞菌的防御反应(Journot-Catalino等2006), 而且*wrky11*突变体表现出对线虫敏感的表型(Ali等2014)。Ali等(2018)发现*WRKY11*基因不仅能够调控植物本身的防御反应, 而且能够响应非生物胁迫。Chen等(2014)通过对桃中WRKY转录因子在休眠进程中的表达分析, 发现了6个在休眠进程中明显变化的WRKY基因, 这表明WRKY基因在桃休眠解除过程起到重要的作用。

为此, 本研究以在桃花芽休眠时期变化显著的*PpWRKY11*基因(Prupe.1G071400)作为研究对象(Chen等2016), 克隆此基因, 对其进行生物信息学分析, 并观察其在桃花芽休眠期的表达模式及亚细胞定位情况, 在大肠杆菌中诱导蛋白表达, 进行酵母自激活验证并筛选相关互作基因, 为进一步挖

收稿 2018-09-27 修定 2019-03-15

资助 国家自然科学基金(31872041)、山东省自然科学基金(ZR2018MC023和ZR201702200074)和山东省现代农业产业技术体系果品创新团队项目(SDAIT-06-01)。

\* 共同通讯作者: 李冬梅(dmli2002@163.com)、高东升(dsgao@sdau.edu.cn)。

掘和利用此基因,探讨*PpWRKY11*在桃自然休眠中的功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与处理

实验材料为9年生桃树‘中油四号’(*Prunus persica* L. cv. Zhongyou 4)一年生枝条,从2016年10月1日到2017年2月15日每隔15 d左右取桃花芽,并将花芽用液氮速冻后置于-80°C冰箱保存。取一年生桃枝条放置于水溶液中,间隔2 d切掉底部,置于光照培养箱内,长日照(16 h/8 h),培养25 d后观察花芽萌芽率。

实验用克隆载体为pEASY-Blunt Zero Cloning Kit (全式金),酵母双杂载体为PGBKT7和PGADT7 (Takara);诱导蛋白载体为PGEX4T-1和亚细胞定位载体为pPZP211 (实验室保存)。大肠杆菌Trans1-T1和表达感受态Transetta (DE3)购买于北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 RNA提取及基因的克隆

按照RNA prep Pure Plant Kit (DP441, TIANGEN)试剂盒所提供的方法提取桃花芽RNA,测定RNA的浓度及质量。然后利用TaKaRa公司的PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser反转录试剂盒反转录成cDNA。利用桃基因登录号(Prupe.1G07140)在Phytozome 12网站查找CDS序列。利用DNAMAN软件设计引物(表1),然后以桃cDNA为模板进行PCR扩增,扩增体系为10 μL 5×HF Phusion Buffer、1 μL 10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs、2.5 μL Forward

primer、2.5 μL Reverse primer、1 μL Template DNA、0.5 μL Phusion DNA Polymerase,加水到50 μL。反应程序为:98°C预变性30 s;98°C变性10 s,58°C退火30 s,72°C延伸1 min (共35个循环);72°C延伸10min。扩增后的PCR产物进行琼脂糖电泳检测,使用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(TIANGEN)对目的片段回收纯化;将目的片段连接pEASY-Blunt Zero载体,转化Trans1-T1,挑选阳性克隆,送到北京擎科新业生物技术有限公司(青岛)测序,得到所需的基因。

### 1.3 生物信息学分析

利用PlantTFDB网站([http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/help\\_famschema.php](http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/help_famschema.php)) BLAST查找苹果、梨、葡萄、烟草和拟南芥中与桃Prupe.1G07140基因相似的序列,利用MEGA 6 (Tamura等2013)软件构建进化树,通过DNAMAN软件分析其保守序列。

### 1.4 亚细胞定位

亚细胞定位所用载体为带绿色荧光蛋白的pPZP211质粒。根据*PpWRKY11*基因的全长序列(去掉终止密码子)和载体图谱设计引物(表1)。扩增获得正确的阳性克隆后,利用*Bam*HI和*Sa*II限制性内切酶酶切阳性克隆及表达载体pPZP211,通过T4 DNA连接酶连接得到*PpWRKY11*-GFP融合表达载体。

### 1.5 农杆菌侵染法转化烟草叶片

参照Chen等(2018)农杆菌介导的侵染烟草叶片的方法,将*PpWRKY11*-GFP质粒转入3101农杆菌感受态,利用PCR鉴定阳性克隆;挑取阳性农杆菌

表1 桃*PpWRKY11*基因克隆及表达分析所用引物及序列

Table 1 Primers used for cloning and expression of *PpWRKY11*

引物名称	核苷酸序列(5'→3')	用途
WRKY11(EX32)-F	<u>GGATCC</u> ATGGCTATTGATCTCGTCGG	诱导蛋白、亚细胞定位
WRKY11(EX32)-R	<u>GTCGAC</u> CTGGAAAACAAGGCCACAG	诱导蛋白、亚细胞定位
WRKY11(BK)-F	<u>CATATG</u> ATGGCTATTGATCTCGTCGG	酵母双杂
WRKY11(BK)-R	<u>GGATCC</u> CTGGAAAACAAGGCCACAG	酵母双杂
UBQ-F	CGAACCCTAGCCGATTACAA	内参引物
UBQ-R	AGTGGTTCGCCATGAAAGTC	内参引物
RT WRKY11-F	ACTATGCTCGTCTACTTACG	定量引物
RT WRKY11-R	CCTCCCATTCCCATTACA	定量引物

下划线部分为酶切位点。

单菌落分别置于含奇霉素(50 mg·L<sup>-1</sup>)和利福平(50 mg·L<sup>-1</sup>)的YEB液体培养基中, 放置摇床中28°C活化2次, 当菌液浓度为OD<sub>600</sub>=0.8左右, 离心5 min, 收集菌体, 用侵染缓冲液(10 mmol·L<sup>-1</sup> MES-KOH、10 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>、0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酰丁香酮)重悬菌体至OD<sub>600</sub>为0.5~0.6, 室温静置4 h后将重悬菌液注射到本式烟草(*Nicotiana benthamiana*)叶片背面。培养箱培养2 d后, 在激光共聚焦显微镜下观察GFP信号并拍照记录。

### 1.6 *PpWRKY11*自激活鉴定及酵母筛库

根据*PpWRKY11*基因的全长和载体图谱设计引物(表1)。将*PpWRKY11*基因连接到PGBKT7载体质粒。

利用采用LiAc法转化酵母感受态细胞, 将*PpWRKY11*-BK和空AD质粒转移到Y2H Gold酵母细胞内, 然后进行自主激活的验证: 转化好的酵母细胞涂到二缺(SD/-Trp-Leu)和四缺(SD/-Trp-His-Ade-Leu)培养基上培养, 观察是否有酵母细胞的生长。如果酵母细胞在二缺培养基生长, 在四缺培养基没有生长, 则表明基因没有自主激活; 如果酵母细胞在二缺和四缺培养基上正常生长, 则表明具有该基因有自主激活的活性。利用桃组织构建cDNA文库(TaKaRa), 按Clontech公司酵母手册, 用*PpWRKY11*-BK初步筛选互作的蛋白。

### 1.7 *PpWRKY11*蛋白的表达及SDS-PAGE检测

构建*PpWRKY11*的蛋白表达所用的载体为pGEX-4T-1。将重组质粒转化到表达感受态细胞Transetta (DE3)中。当菌液浓度OD<sub>600</sub>达到0.6~0.8后, 加入1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG, 在30°C条件下诱导蛋白, 分别在0和6 h时取样。6 h后离心收集菌体, 用5

mL PBS缓冲液悬浮, 超声破碎6 s, 停9 s (25个循环), 分离可溶性蛋白和包涵体, 4°C、10 000×g离心10 min, 收集上清和沉淀。经SDS-PAGE分离后将蛋白转移到考马斯亮蓝液体中染色30 min, 然后进行脱色观察, 拍照。

## 2 实验结果

### 2.1 *PpWRKY11*基因的克隆及生物信息学分析

在PlantTFDB网站BLAST桃Prupe.1G07140基因序列, 发现Prupe.1G07140基因与拟南芥的*AtWRKY11*基因具有较高同源性, 将其命名为*PpWRKY11*。为了进一步探究*PpWRKY11*蛋白与其他物种的WRKY11转录因子的进化关系, 我们利用MEGA 6软件对桃、苹果、梨、葡萄、烟草和拟南芥的WRKY11氨基酸序列进行分析, 结果(图1)显示桃与苹果和梨的WRKY11蛋白在同一个进化枝上, 说明蔷薇科亲缘关系较近且基因功能可能最为相似; 相比于葡萄及烟草, 桃*PpWRKY11*与拟南芥*AtWRKY11*蛋白的亲缘关系较近。进一步通过DNAMAN对6个物种的WRKY11进行保守序列分析, 发现桃*PpWRKY11*含有WRKY家族保守的WRKYGQK七肽序列(图2)。

以桃cDNA为模板, 以其CDS序列设计特异引物扩增基因, 获得了846 bp的序列(图3), 将其连接pEASY-Blunt Zero Cloning Kit载体, 然后进行测序, 证明扩增出的目的片段为所需的基因*PpWRKY11*。

### 2.2 休眠期界定及*PpWRKY11*在休眠期的表达分析

如图4-A所示, 2016年10月1日至2016年11月22日采集的油桃‘中油四号’一年生桃枝条培养25 d后花芽没有萌发, 说明此阶段桃花芽仍处在自然

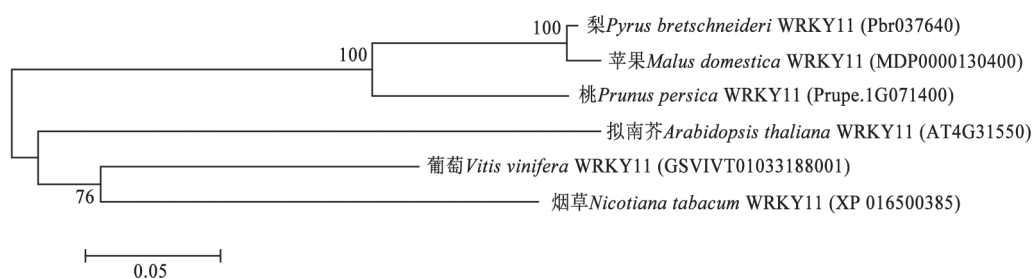


图1 *PpWRKY11*进化树分析

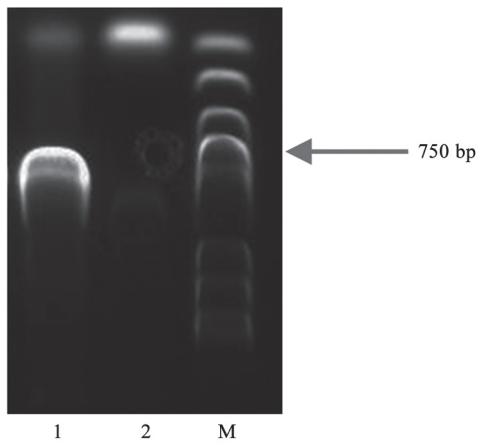
Fig.1 Phylogenetic tree analysis of *PpWRKY11*

桃 <i>PpWRKY11</i>	SKRRKTKVRRITIRVPAISSKIADIPSEDEFWRKYGQKPIKGSFYPRGYKCSVRCGPARKHVERAODDPTMLVVTYEAE	263
梨 <i>PbrWRKY11</i>	SKRRKSKVKRTIRVPAVSSKLDLPADEFWRKYGQKPIKGSFYPRGYKCSVRCGPARKHVERAODDPTMLVVTYEAE	258
苹果 <i>MdWRKY11</i>	SKRRKSKVKRTIRVPAVSSKLDLPADEFWRKYGQKPIKGSFYPRGYKCSVRCGPARKHVERAODDPTMLVVTYEAE	258
葡萄 <i>VvWRKY11</i>	SKRRRSRVKKTIRVPAISSKIADIPADEYWRKYGQKPIKGSFYPRGYKCSVRCGPARKHVERASDDPAMLIIVTYEAE	243
烟草 <i>NtWRKY11</i>	KRRKLSRVKVVRIIPAISSRIADIPGDEFWRKYGQKPIKGSFYPRGYKCSVRCGPARKHVERAMDDPAMLIIVTYEAE	306
拟南芥 <i>AtWRKY11</i>	KRSRKNRMKRTIRVPAISSKIADLIPDEYWRKYGQKPIKGSFYPRGYKCSVRCGPARKHVERALDDPAMLIIVTYEAE	300
Consensus	k r p a s i a d i p d e w r k y g q k p i k g s p r g y y k c s r g c p a r k h v e r a d p m l v t y e e	
桃 <i>PpWRKY11</i>	HRHRHPSTAGSVG.....LVFQ.....	281
梨 <i>PbrWRKY11</i>	HHHPHPSLTAANVG.....LVFQSSKE..	280
苹果 <i>MdWRKY11</i>	HHHPHPSLTAANVG.....LVFQSSKE..	280
葡萄 <i>VvWRKY11</i>	HSHSQVAMQEMIPHGGV.GLVFEST....	267
烟草 <i>NtWRKY11</i>	HRHTIGAMQENNSQ...MVVFGSTEERK	331
拟南芥 <i>AtWRKY11</i>	HRHQSAMQENISSSGINDLVFASA....	325
Consensus	h h v f	

图2 桃与其他物种转录因子WRKY11氨基酸序列比对

Fig.2 Amino acid sequence alignment of peach and other species transcription factor WRKY11

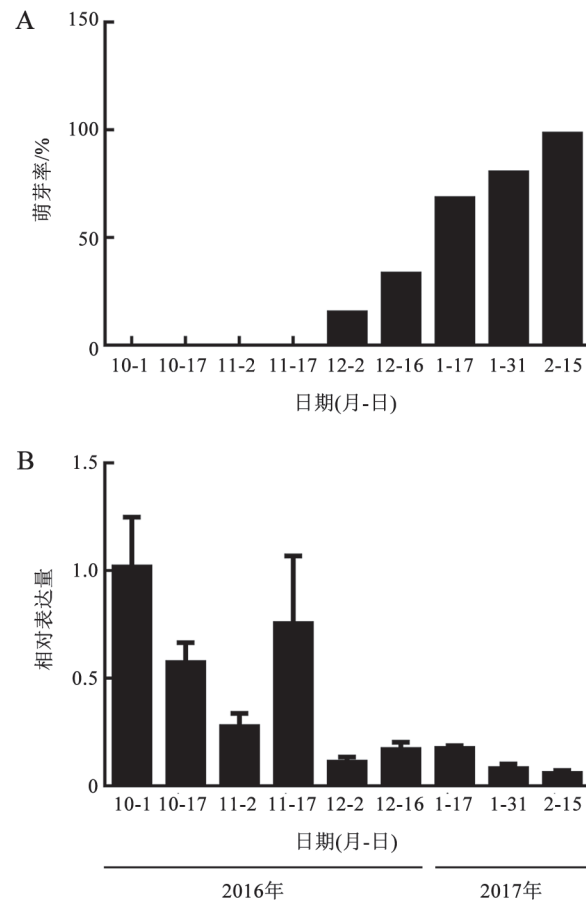
方框表示WRKYGQK七肽序列。

图3 桃中*PpWRKY11*基因的cDNA扩增电泳  
Fig.3 cDNA amplification and electrophoresis of *PpWRKY11* gene in peach

1: CDS扩增产物; 2: 空对照; M: 分子量标准DL2000。

休眠期。随着环境温度逐渐降低, 桃的需冷量慢慢积累, 到2017年1月17日萌芽率为68%, 超过50%, 说明休眠已解除, 所以2016年11月17日到2017年1月17日为自然休眠解除期, 2017年1月17日以后由于自然条件下花芽受制于环境条件还不能萌发, 这段时间为生态休眠期。

利用定量PCR测定*PpWRKY11*基因在桃花芽休眠时期表达情况。如图4-B所示, 在自然休眠时期*PpWRKY11*基因高表达; 随着桃花芽进入休眠解除期, *PpWRKY11*基因的表达量迅速降低。并且发现*PpWRKY11*基因随着桃休眠进程呈现下降趋势, 这

图4 休眠期界定及*PpWRKY11*基因的表达分析  
Fig.4 Identification of dormancy period and expression analysis of *PpWRKY11* geneA: 一年生桃枝条花芽萌芽率; B: *PpWRKY11*基因在休眠期的表达情况。



表明*PpWRKY11*基因可能在休眠解除期起着重要作用。

### 2.3 *PpWRKY11*蛋白的亚细胞定位

为确定*PpWRKY11*蛋白在细胞的定位情况,通过农杆菌注射烟草叶片的方法,在超高分辨率激光共聚焦显微镜下观察*PpWRKY11*蛋白的定位。结果(图5)显示,*PpWRKY11*-pPZP211的融合蛋白在烟草中只有在细胞核能观察到绿色荧光,使用DAPI(核特异染料)染色发现信号重叠。综上所述,表明*PpWRKY11*蛋白定位于细胞核中。

### 2.4 *PpWRKY11*蛋白自激活与酵母筛库

为了进一步验证*PpWRKY11*蛋白在酵母的自主激活活性,利用LiAc转化方法将*PpWRKY11*-BK和AD转化到Y2H酵母细胞中。如图6所示,转化酵母细胞在二缺培养基上能生长,但是不能在四缺培养基上生长,表明*PpWRKY11*蛋白没有自主激活活性。

为了研究*PpWRKY11*蛋白的调控网络,利用LiAc转化酵母的方法对*PpWRKY11*-PGBKT7基因进行筛库,筛选出20个可能互作的基因,通过PCR进行测序,然后利用NCBI的BLAST搜索出两个基因:*Prunus persica* hsp70-Hsp90 organizing protein 3 (LOC18776912)和*Prunus persica* protein OBERON 3 (LOC18789922),这两个基因可能在休眠中有重要作用。

### 2.5 *PpWRKY11*原核表达和SDS-PAGE

将*PpWRKY11*全长基因序列连接到质粒PGEX-4T-1,经测序验证,结果表明与原始序列一致,证明原核表达载体PGEX-*PpWRKY11*构建成功。将重组质粒PGEX-*PpWRKY11*转化表达感受态细胞Transsetta (DE3), $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG诱导6 h取样,进行SDS-PAGE检测。如图7显示,在0 h没有IPTG诱导的时候,没有目的大小相关的蛋白表达;但是6 h后重组质粒经IPTG诱导后产生了一条分子量大于50 kDa的特异性条带,由于载体中GST表达标签为26 kDa左右,所诱导蛋白的实际大小约为56 kDa,与*PpWRKY11*预测蛋白大小一致。综上所述, $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的IPTG可诱导*PpWRKY11*融合蛋白的表达,6 h后出现蛋白条带,进行超声波破碎以后,蛋白主要出现在沉淀中。

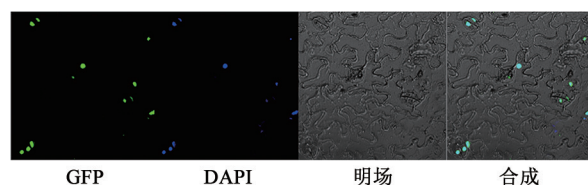


图5 *PpWRKY11*的亚细胞定位

Fig.5 Subcellular localization of *PpWRKY11*

A: 注射*PpWRKY11*的烟草叶片在荧光显微镜下GFP融合蛋白荧光; B: 注射*PpWRKY11*的烟草叶片DAPI染色; C: 注射*PpWRKY11*空明场照片; D: 注射*PpWRKY11*的烟草叶片细胞核定位信号和GFP融合蛋白荧光融合图片。

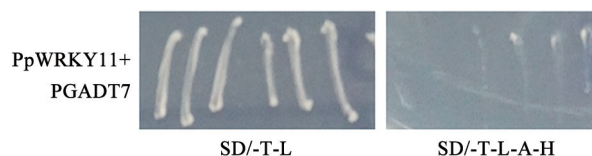


图6 *PpWRKY11*酵母自主激活验证

Fig.6 The transcription activity detection of *PpWRKY11*

转*PpWRKY11*和PGADT7质粒的Y2H菌株在二缺和四缺培养基生长。

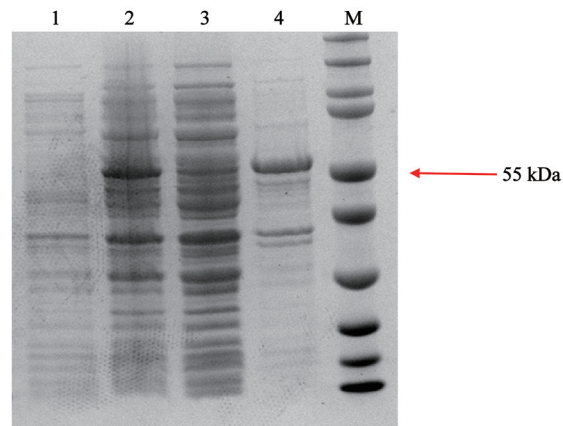


图7 在大肠杆菌中表达蛋白的SDS-PAGE检测

Fig.7 SDS-PAGE analysis of recombinant

*PpWRKY11* protein in *E. coli*

M: 蛋白分子量标准; 1: PGEX-*PpWRKY11*诱导0 h; 2: PGEX-*PpWRKY11*于30°C诱导6 h; 3和4: 30°C诱导6 h后菌液超声破碎后的上清和沉淀。

## 3 讨论

自然休眠是植物为了抵御不利环境而形成的适应性机制。植物在自然休眠进程中,只有满足

一定的需冷量才能在正常的条件下生长,从而提高产量与品质(Wang等2016),因此植物自然休眠的机制对于植物的发育起着重要作用。早期研究发现转录因子MADS-box家族的*PpDAMI-6s*基因在常绿桃中缺失(Li等2009),进一步研究发现*PpDAM5*和*PpDAM6*基因在桃休眠中起到关键作用(Yamane等2011)。*PpDAMI*基因通过调控ABA的合成,调控梨花芽自然休眠进程(Tuan等2017)。这些表明转录因子在休眠中起到关键的作用。前人研究发现*WRKY*基因主要调控植物的生长和发育(Zhao等2015),而对于其调控休眠的机制研究较少。*AtWRKY2*在拟南芥种子萌发进程中起着调节作用(Jiang和Yu 2009)。目前发现拟南芥*AtWRKY41*能够调控种子休眠(Ding等2014),芍药*PIWRKY40*可能调控地下芽的休眠(李俊杰等2017);Chen等(2016)发现桃中有6个WRKYs转录因子在休眠解除中起到关键作用,而其中*PpWRKY11* (Prupe.1G071400)基因属于WRKYIIId家族,它在自然休眠中上调,而在生态休眠中下调。这表明*PpWRKY11*基因可能参与到桃花芽的自然休眠进程。

本研究从桃中克隆WRKY家族转录因子*PpWRKY11*基因的全长序列。它全长894 bp,编码约298个氨基酸序列。*PpWRKY11*蛋白含有保守的WRKY结构域,含有3个外显子和2个内含子,属于*PpWRKYIIId*转录因子(Chen等2016)。与拟南芥*AtWRKY11*基因最为相似,桃*PpWRKY11*基因在自然休眠解除时期表达量明显下降,而拟南芥*wrky11*突变体受到ABA等非生物胁迫发芽率明显降低(Ali等2018),这表明*PpWRKY11*可能受到ABA等信号物质调控导致在自然休眠解除时期表达量下降。进化树比对分析,桃的*PpWRKY11*蛋白与梨与苹果在同一个进化枝上,说明蔷薇科的不同种同源性较高,亲缘关系较近,且功能可能具有相似性。为了明确*PpWRKY11*蛋白在细胞中的定位,利用农杆菌瞬时侵染烟草叶片的方法,通过激光共聚焦显微镜发现其定位于细胞核,表明*PpWRKY11*转录因子具有核定位的特征,这与WRKY转录因子*PIWRKY40*定位于细胞核是一致的(李俊杰等2017)。核桃*JrWRKY7*没有转录激活活性(Yang等2017),通过酵母双杂实验发现,同属于*PpWRKYIIId*家族的*PpWRKY11*转

录因子同样没有转录激活活性;通过酵母筛库筛选出和*PpWRKY11*互作的基因:热休克蛋白相关的基因(NCBI LOC18776912)。Takemura和Tamura(2016)发现落叶果树中热休克蛋白在芽休眠阶段通过维持蛋白质功能构象,抑制冷应激蛋白质的降解,从而使植物提高对寒冷的耐受性,这表明热休克蛋白与休眠密切相关。通过原核诱导蛋白的方法诱导出相关的蛋白,发现*PpWRKY11*蛋白能够通过 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的IPTG诱导,蛋白位于包涵体内,为研究其蛋白功能打好了良好基础。

综上,本研究获得了桃*PpWRKY11*基因序列,对其进行了生物信息学和表达分析,对深入探索*PpWRKY11*基因在桃花芽自然休眠中的作用奠定了基础。

#### 参考文献(References)

- Ali MA, Azeem F, Nawaz MA, et al (2018). Transcription factors *WRKY11* and *WRKY17* are involved in abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*, 226: 12–21
- Ali MA, Wiecezorek K, Kreil DP, et al (2014). The beet cyst nematode *Heterodera schachtii* modulates the expression of WRKY transcription factors in syncytia to favour its development in *Arabidopsis* roots. *PLoS ONE*, 9 (7): e102360
- Chen M, Tan Q, Sun M, et al (2016). Genome-wide identification of WRKY family genes in peach and analysis of WRKY expression during bud dormancy. *Mol Genet Genomics*, 291 (3): 1319–1332
- Chen M, Liu X, Jiang S, et al (2018). Transcriptomic and functional analyses reveal that *PpGLK1* regulates chloroplast development in peach (*Prunus persica*). *Front Plant Sci*, 9: 34
- Ding ZJ, Yan JY, Li GX, et al (2014). *WRKY41* controls *Arabidopsis* seed dormancy via direct regulation of ABI3 transcript levels not downstream of ABA. *Plant J*, 79 (5): 810–823
- Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, et al (2006). The transcription factors *WRKY11* and *WRKY17* act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 18 (11): 3289–3302
- Jiang W, Yu D (2009). *Arabidopsis WRKY2* transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid. *BMC Plant Biol*, 9 (1): 96
- Li JJ, Han LL, Ma Y, et al (2017). Cloning and expression analysis of transcription factor *PIWRKY40* in peony. *Plant*

- Physiol J, 53 (4): 609–618 (in Chinese with English abstract) [李俊杰, 韩璐璐, 马燕等(2017). 芍药转录因子 *PtWRKY40* 的克隆及表达分析. 植物生理学报, 53 (4): 609–618]
- Li Z, Reighard GL, Abbott AG, et al (2009). Dormancy-associated MADS genes from the EVG locus of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] have distinct seasonal and photoperiodic expression patterns. J Exp Bot, 60 (12): 3521–3530
- Niu QF, Li JZ, Cai DY, et al (2016). Dormancy-associated MADS-box genes and microRNAs jointly control dormancy transition in pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) flower bud. J Exp Bot, 10: 1–19
- Phukan UJ, Jeena GS, Shukla RK (2016). WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants. Front Plant Sci, 7: 760
- Rushton DL, Tripathi P, Rabara RC, et al (2012). WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signaling. Plant Biotechnol J, 10 (1): 2–11
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, et al (2010). WRKY transcription factors. Trends Plant Sci, 15 (5): 247–258
- Takemura Y, Tamura F (2016). Induction of Heat Shock Proteins During the Bud Dormancy Stage in Woody Fruit Plants. In: Asea AAA, Kaur P, Calderwood SK (eds). Heat Shock Proteins and Plants. Cham: Springer, 65–67
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol, 30 (12): 2725–2729
- Saure MC (1985). Dormancy release in deciduous fruit trees. Horticult Rev, 7: 239–300
- Tuan P A, Bai S, Saito T, et al (2017) Dormancy-associated mads-box (Dam) and the abscisic acid pathway regulate pear endodormancy through a feedback mechanism. Plant Cell Physiol, 58 (8): 1378–1390
- Wang D, Gao Z, Du P, et al (2016). Expression of ABA metabolism-related genes suggests similarities and differences between seed dormancy and bud dormancy of peach (*Prunus persica*). Front Plant Sci, 6: 1248
- Yamane H, Ooka T, Jotatsu H, et al (2011). Expressional regulation of *PpDAM5* and *PpDAM6*, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. J Exp Bot, 62 (10): 3481–3488
- Yang G, Zhang W, Liu Z, et al (2017). Both JrWRKY2 and JrWRKY7 of *Juglans regia* mediate responses to abiotic stresses and abscisic acid through formation of homodimers and interaction. Plant Biol, 19 (2): 268–278
- Zhao TT, Zhang J, Liang LS, et al (2015). Expression and functional analysis of WRKY transcription factors in Chinese wild hazel, *Corylus heterophylla* Fisch. PLoS ONE, 10 (8): e0135315

## Cloning and expression analysis of peach transcription factor *PpWRKY11*

WANG Qing-Jie, ZHANG Ze-Jie, GAO Yan-Gang, CHEN Xiu-De, XIAO Wei, FU Xi-Ling, LI Ling, LI Dong-Mei\*, GAO Dong-Sheng\*

*State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Collaborative Innovation Center for Fruit and Vegetable Production with High Quality and Efficiency, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China*

**Abstract:** WRKY transcription factors are capable of responding to plant biotic and abiotic stresses. This study was based on the Prupe.1G071400 gene whose expression was significantly down-regulated in the peach flower bud dormancy. The results were consistent with the previous experimental results by quantitative PCR, which proved that the gene may be closely related to the dormancy release of peach flower bud. The Prupe.1G071400 gene was cloned from the leaves of the peach 'Zhong You 4', and the gene was named *PpWRKY11* by bioinformatics analysis. The *PpWRKY11* protein encodes 282 amino acids, including the unique WRKY domain. Phylogenetic tree analysis showed that *PpWRKY11* was most closely related to Rosaceae apples and pears. Subcellular localization showed that *PpWRKY11* was localized in the nucleus; yeast double hybrid showed that *PpWRKY11* protein had no autonomous activation activity, and further utilize *PpWRKY11* to screen for interaction proteins; The construct PGEX-*PpWRKY11* prokaryotic expression vector transform *E. coli* Rosetta (DE3) to induce size-matched protein, and found that *PpWRKY11* protein is mainly in precipitation. This study laid the foundation for further exploration of the function of the *PpWRKY11* gene.

**Key words:** *Prunus persica*; *PpWRKY11*; bud dormancy; gene cloning; subcellular localization; gene expression

---

Received 2018-09-27 Accepted 2019-03-15

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872041), Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2018MC023 and ZR201702200074), and Shandong Province Modern Agricultural Technology System Fruit Innovation Team (SDAIT-06-01).

\*Co-corresponding authors: Li DM (dmli2002@163.com), Gao DS (dsgao@sdau.edu.cn).