

苹果*MdWRKY53*基因克隆和功能鉴定

齐晨辉¹, 赵先炎², 姜翰², 郑朋飞¹, 刘海涛³, 李媛媛^{1*}, 郝玉金^{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, 农业部黄淮地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 山东泰安271018

²西北农林科技大学园艺学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室/陕西苹果重点实验室, 陕西杨凌712100

³山东熠辉检测技术有限公司, 山东泰安271000

摘要: 利用拟南芥WRKY53蛋白序列在苹果基因组中进行比对得到一个得分最高、同源性最高的序列, 将其命名为*MdWRKY53* (MDP0000299114)。根据*MdWRKY53*基因序列设计引物, 从‘皇家嘎啦’(*Malus × domestica*)苹果苗上克隆得到一个约1 000 bp的基因条带, 测序发现该基因包含长为1 056 bp的完整开放阅读框, 编码351个氨基酸, 和苹果基因组预测序列相符。进化树分析表明苹果WRKY53与白梨WRKY53亲缘关系最近, 且发现*MdWRKY53*含有一个保守的WRKY结构域。荧光定量PCR分析表明, *MdWRKY53*在苹果的不同组织中均有表达, 并且在果实中表达量最高, 茎中表达量最低, 并且*MdWRKY53*能够响应低温、盐胁迫、脱落酸、水杨酸、赤霉素和生长素信号。

关键词: 苹果; *MdWRKY53*; 生物胁迫; 非生物胁迫

高等植物在其整个生命周期中持续不断地面临着各种各样的胁迫, 包括生物胁迫和非生物胁迫, 如高温、低温、盐、干旱、病原菌的入侵等, 这些胁迫会影响到植物的正常生长发育(De Storme和Geelen 2014; Suzuki等2014)。脱落酸(abscisic acid, ABA)作为一种植物生长调节物质和化学信号在植物的生长和发育过程中能够响应环境刺激, 从而使得植物适应环境胁迫或者对环境胁迫做出应答反应(Robert-Seilaniantz等2007; Ton等2009)。例如: ABA在植物遭遇干旱情况时, 调控气孔关闭进而保持水分(Assmann 2003; Popko等2010)。ABA也能通过和其他植物生长调节物质相互作用调控病原菌反应, 如负调控水杨酸(salicylic acid, SA)介导的病原菌响应(Fan等2009)。这些研究表明ABA在植物的生长发育过程中起重要作用。

WRKY是植物转录因子最大的家族之一, WRKY转录因子能参与各种各样的生理过程, 包括抵御病原菌的侵染、参与植物的衰老过程、毛状体发育等(Eulgem等2000)。在拟南芥中, *AtWRKY46/54/70*在油菜素内酯(brassinosteroid, BR)信号中能够正调控植物生长, 并且通过抑制脱水相关基因的表达负调控植株的抗旱性(Chen等2017a)。 *AtWRKY45*是赤霉素(gibberellin, GA)介导的信号途径中的关键因子, 能和DELLA蛋白*RGL1*互作, 正

调控叶片衰老(Chen等2017b)。JASMONATE ZIM-DOMAIN 1 (JAZ1)和JAZ5是茉莉酸(jasmonic acid, JA)信号途径中的重要阻遏蛋白, WRKY57可以结合JAZ1和JAZ5的启动子, 激活它们的转录, 从而降低植物对葡萄孢菌的抵抗能力(Jiang和Yu 2016)。在短日照下, 拟南芥中*WRKY12*和*WRKY13*对于调节开花具有相反的功能, *WRKY12*被破坏后会延迟开花, 而*WRKY13*的缺失会促进拟南芥的开花(Li等2016)。AtWRKY6蛋白在抵御病原菌、磷酸易位和耐磷酸中起重要作用, 同时在种子萌发和幼苗早期发育中作为ABA信号途径中的正调控因子发挥作用(Huang等2016)。这些结果表明, 在拟南芥中WRKY家族中不同成员在植物的生长发育过程中起着不同的作用, 并且是对植物正常生长发育所必须的。

除拟南芥外, 其他物种的WRKY家族对于调控生长和参与抵御机制等过程也发挥重要的功能。比如: 小麦中, *TaWRKY1*受干旱和ABA诱导, 过表达*TaWRKY1*能减少水分散失, 增加渗透物质

收稿 2018-08-23 修定 2019-03-24

资助 国家自然科学基金(31772275)和山东省自然科学基金优秀项目(ZR2018JL014)。

* 共同通讯作者: 郝玉金(haoyujin@sdau.edu.cn)、李媛媛(liyy0912@163.com)。

的积累,植株具有更高的抗氧化酶活性以及较高的抗旱性(Ding等2016)。葡萄中, *VvWRKY30*能被盐及胁迫信号分子 H_2S 和 H_2O_2 诱导;过表达*VvWRKY30*能够通过清除活性氧和积累渗透物质增加植株的抗盐性(Zhu等2018)。水稻中,在低温条件下,过表达*OsWRKY71*植株明显高于野生型,并且光合能力、鲜重、干重均明显高于野生型,表明*OsWRKY71*在冷胁迫中起到正调控作用(Kim等2016)。金弹子中, *FcWRKY40*参与ABA信号途径,过表达*FcWRKY40*能够增加植物的抗盐性,而沉默*FcWRKY40*增加了对盐胁迫的敏感性,表明*FcWRKY40*能够提高植株的抗盐性(Dai等2018)。在‘秦冠’苹果中,当苹果感染链格孢菌时, *MdWRKY1*表达量显著升高,并且在烟草中过表达*MdWRKY1*能提高对烟草黑胥病菌的抗性,表明*MdWRKY1*在抵御病原菌反应中起正调控作用(Fan等2011)。M26砧木是苹果半矮化砧木, *MdWRKY9*能够通过抑制油菜素类固醇合酶*MdDWF4*的表达从而加剧M26砧木的矮化,为苹果砧木的选育提供了一个良好的理论基础(Zheng等2018)。而在苹果中*MdWRKY53*的功能至今还不是很清楚。

在本文的研究中,我们克隆了*MdWRKY53*基因,发现*MdWRKY53*蛋白有一个WRKY保守结构域,与白梨的*PbWRKY53*亲缘关系最近。苹果*MdWRKY53*和拟南芥*AtWRKY53*蛋白3D结构高度重叠,表明它们可能有相似的功能。研究发现*MdWRKY53*能够响应ABA、SA、GA、生长素(indoleacetic acid, IAA)、低温和盐胁迫, *MdWRKY53*转基因苹果愈伤组织对ABA不敏感,同时发现,GA和IAA负调控*MdWRKY53*转基因愈伤组织细胞系生长。这些结果为进一步鉴定*MdWRKY53*的功能奠定了理论基础,为苹果的遗传改良提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

取生长健壮的苹果‘皇家嘎啦’(*Malus × domestica* Borkh.)组培苗叶片,利用RNA plant plus Reagent试剂盒(天根)提取总RNA,然后利用反转录试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time, TaKaRa)进行反转录,得到的

cDNA用作基因克隆的模板。取生长于山东省泰安市果树研究所果树试验田实生‘皇家嘎啦’苹果树的根、茎、叶、花和果实,用于检测基因的组织表达模式。分别用 H_2O (CK)、 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA、 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA、 $200 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠(NaCl)、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA、正常温度(28°C)和低温(4°C)处理生根后的‘皇家嘎啦’苹果组培苗0、1、3、6、12和24 h后,整株迅速取样,用液氮冷冻,用于检测基因的非生物胁迫响应。生长状态良好的苹果‘王林’愈伤组织用于表型实验检测。

1.2 *MdWRKY53*基因克隆

根据在苹果基因组数据库(<https://www.rosaceae.org/>, GDR)中检索到的序列,设计*MdWRKY53*基因全长引物,上游引物:5' ATGGATTCTGGTAA-GAGCTGG 3';下游引物:5' TAAGAAAAATCCT-GGGGAGTCAA 3'。以‘皇家嘎啦’cDNA为模板进行PCR反应。反应条件: 94°C 预变性5 min; 95°C 变性30 s, 56°C 退火30 s, 72°C 延伸1 min, 33次循环; 72°C 延伸10 min。用TaKaRa凝胶回收试剂盒回收PCR产物,连接到pMD18-T克隆载体,转化大肠杆菌trans5 α ,筛菌后进行测序。

1.3 *MdWRKY53*生物信息学分析

利用MEGA 5.0软件分析苹果*MdWRKY53*蛋白序列与其他物种的WRKY53蛋白序列之间的亲缘关系,构建进化树。利用DNAMAN比对苹果*MdWRKY53*蛋白序列与其他物种的WRKY53蛋白序列。用在线软件PHYRE 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)分析苹果*MdWRKY53*和拟南芥*AtWRKY53*蛋白三级结构。利用PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对*MdWRKY53*启动子上的顺式作用元件进行分析。利用SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)分析*MdWRKY53*蛋白的保守结构域。

1.4 *MdWRKY53*表达载体的构建及农杆菌介导苹果愈伤组织遗传转化

*MdWRKY53*开放阅读框(ORF)序列上加酶切位点*Sma*I和*Eco*RI后,连接到表达载体pRI 101-AN载体上,获得*MdWRKY53*-pRI表达载体。将*MdWRKY53*-pRI表达载体及pRI 101-AN空载体分别

转入到农杆菌LBA4404后, 参照Hu等(2015)方法侵染苹果‘王林’愈伤组织, 获得转基因愈伤组织MdWRKY53-OE-1、MdWRKY53-OE-2和MdWRKY53-OE-3。

1.5 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)

采用qRT-PCR的方法, 用cDNA模板检测*MdWRKY53*在苹果不同组织表达水平、对非生物胁迫的响应以及转基因苹果‘王林’愈伤组织的表达量, 以*MdActin* (GenBank登录号CN938024)作为内参基因。做qRT-PCR分析的特定的引物序列为, 上游引物: 5' AAAATCGTCAGCAGACACCA 3'; 下游引物: 5' CGCGCTAGCAATTGCTCTGA 3'。用UltraSYBR Mixture (with ROX)试剂盒(康为世纪)进行实时qRT-PCR分析。20 μL 反应体系为: 2 \times UltraSYBR Mixture 10 μL 、上游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和下游引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各1.0 μL 、cDNA 1.0 μL 和ddH₂O 7.0 μL 。每样本3次技术重复。qRT-PCR反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 s, 40次循环, 每次循环第3步进行荧光采集; 最后, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行定量数据分析(Livak和Schmittgen 2001)。

1.6 植物生长调节物质处理苹果愈伤组织及鲜重测定

将苹果愈伤组织分别置于不同植物生长调节物质的愈伤组织培养基(表1)中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗室培养, 每个板重复3次。3周后分别称量鲜重, 3个愈伤组织为一组, 测其鲜重, 测3组(为3个重复), 计算平均值。

1.7 数据分析

使用DPS 7.05数据分析软件和单因素Tukey

表1 不同愈伤培养基的组分

Table 1 The components of different callus media

编号	培养基
1	基本培养基(MS+0.5 mg·L ⁻¹ 6-BA+1.5 mg·L ⁻¹ 2,4-D+30 g·L ⁻¹ 蔗糖+8 g·L ⁻¹ 琼脂)
2	基本培养基+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA
3	基本培养基+150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA
4	基本培养基+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA
5	基本培养基+30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA
6	基本培养基+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA
7	基本培养基+150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA

法分析相对表达水平, 不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2 实验结果

2.1 *MdWRKY53*基因克隆和进化树分析

利用拟南芥AtWRKY53的蛋白序列在苹果基因组中进行Blast获得同源性最高、得分最高的苹果序列(MDP0000299114), 并将其命名为*MdWRKY53*。根据*MdWRKY53*基因序列, 设计上下游引物进行PCR扩增后得到一条约1 056 bp的条带(图1), 编码351个氨基酸, 分子质量为39 416.73 Da, 等电点为-6.598。

利用*MdWRKY53*蛋白序列在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上比对, 找到12个不同的物种的WRKY53蛋白序列, 利用MEGA 5.0软件建立进化树, 发现*MdWRKY53*和白梨PbWRKY53亲缘关系最近(图2-A), 表明*MdWRKY53*与PbWRKY53可能有相似的功能, 通过DNAMAN比对12个不同物种的WRKY53蛋白序列发现在150~184位置上有一段保守的序列(图2-B)。

2.2 *MdWRKY53*蛋白保守结构域及三级结构分析

利用SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1)分析*MdWRKY53*蛋白的保守结构域, 发现在第129到191个氨基酸含有一个WRKY保守结构域, 表明*MdWRKY53*可能通过该保守结构域结合到其下游靶基因的启动子区域的顺式作用元件W-box上, 促进或抑制该基因的表达进而影响植物的生长发育。

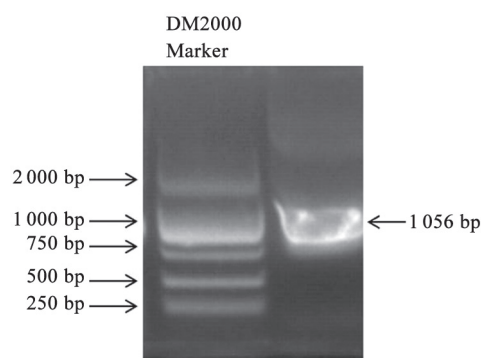


图1 *MdWRKY53*编码区全长的PCR扩增

Fig.1 Amplification of the full length of *MdWRKY53* gene with PCR

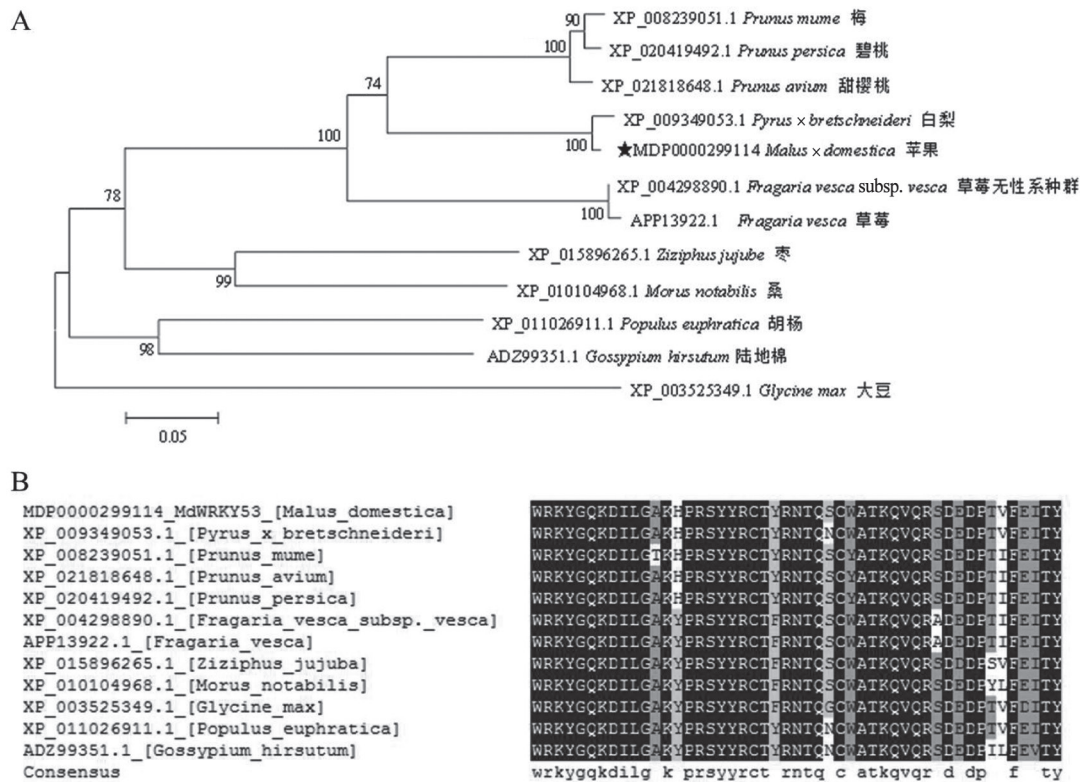


图2 苹果MdWRKY53与其他物种WRKY53蛋白系统进化树分析(A)及序列比对(B)

Fig.2 Phylogenetic tree analysis (A) and sequence alignment (B) of apple MdWRKY53 and other species WRKY53 proteins

利用Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)分析AtWRKY53和MdWRKY53蛋白3D结构,将拟南芥WRKY53和苹果WRKY53蛋白3D结构进行融合,发现AtWRKY53和MdWRKY53结构高度重叠,表明这两种蛋白可能有相似的功能。

2.3 *MdWRKY53*启动子顺式作用元件分析

利用PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对*MdWRKY53*上游的启

动子序列进行分析,发现*MdWRKY53*启动子上有与ABA响应相关的顺式作用元件ABRE,这表明*MdWRKY53*可能响应ABA。同时*MdWRKY53*启动子上含有与干旱诱导相关的MYB绑定位点CAA-CTG,这表明可能有MYB转录因子能够结合到*MdWRKY53*启动子上,调控*MdWRKY53*的转录。同时,*MdWRKY53*启动子上还含有LTR、CGTCA-motif、TCA-element和TC-rich repeats元件(表1),这表明*MdWRKY53*可能响应低温和JA信号,并参与SA介导的生物胁迫途径。

表1 *MdWRKY53*基因上游调控序列顺式作用元件分析Table 1 Analysis of *cis*-acting regulatory elements in the upstream regulatory sequences of *MdWRKY53* gene

顺式元件名称	信号序列	功能	起始位点/bp	终止位点/bp
ABRE	AGTACGTGGC	与ABA响应相关的作用元件	-1 076	-1 085
CGTCA-motif	CGTCA	JA响应元件	-1 144	-1 149
LTR	CCGAAA	低温响应元件	-238	-244
TCA-element	CAGAAAAGGA	参与SA的作用元件	-538	-547
MBS	CAACTG	与干旱诱导相关的MYB绑定位点	-47	-53
TC-rich repeats	ATTTCTTCA	参与抵御反应和胁迫响应的的作用元件	-1 171	-1 180

2.4 *MdWRKY53*组织表达模式及对生物和非生物胁迫的响应

为了研究*MdWRKY53*组织表达模式, 我们用qRT-PCR检测*MdWRKY53*在‘皇家嘎啦’不同组织中的表达量, 发现*MdWRKY53*在根、茎、叶、花和果实中均有表达, 并且在果实中表达量最高, 其次是花、根和叶片, 在茎中表达量最低(图3)。

为了研究*MdWRKY53*的功能, 我们检测了*MdWRKY53*基因在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA、 $150 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA、 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA、 $200 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl和 4°C 低温下的表达情况。结果发现, 不同处理下*MdWRKY53*的表达量均显著低于对照。而且随着处理时间的增加, *MdWRKY53*的表达量逐渐降低, 其中GA和IAA处理的下降程度最大(图4)。这表明*MdWRKY53*能响应ABA、GA、

SA和IAA等植物生长调节物质信号, 同时能够响应盐胁迫和低温胁迫。

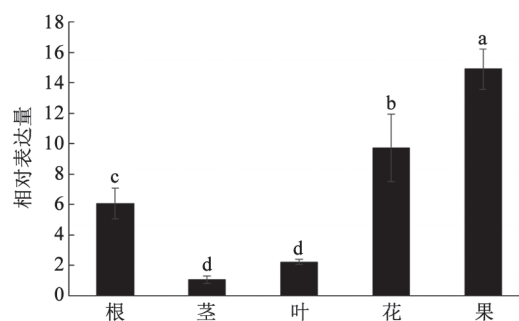


图3 *MdWRKY53*在苹果不同组织中的表达水平
Fig.3 Expression of *MdWRKY53* gene in different tissues of apple

不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下图同此。

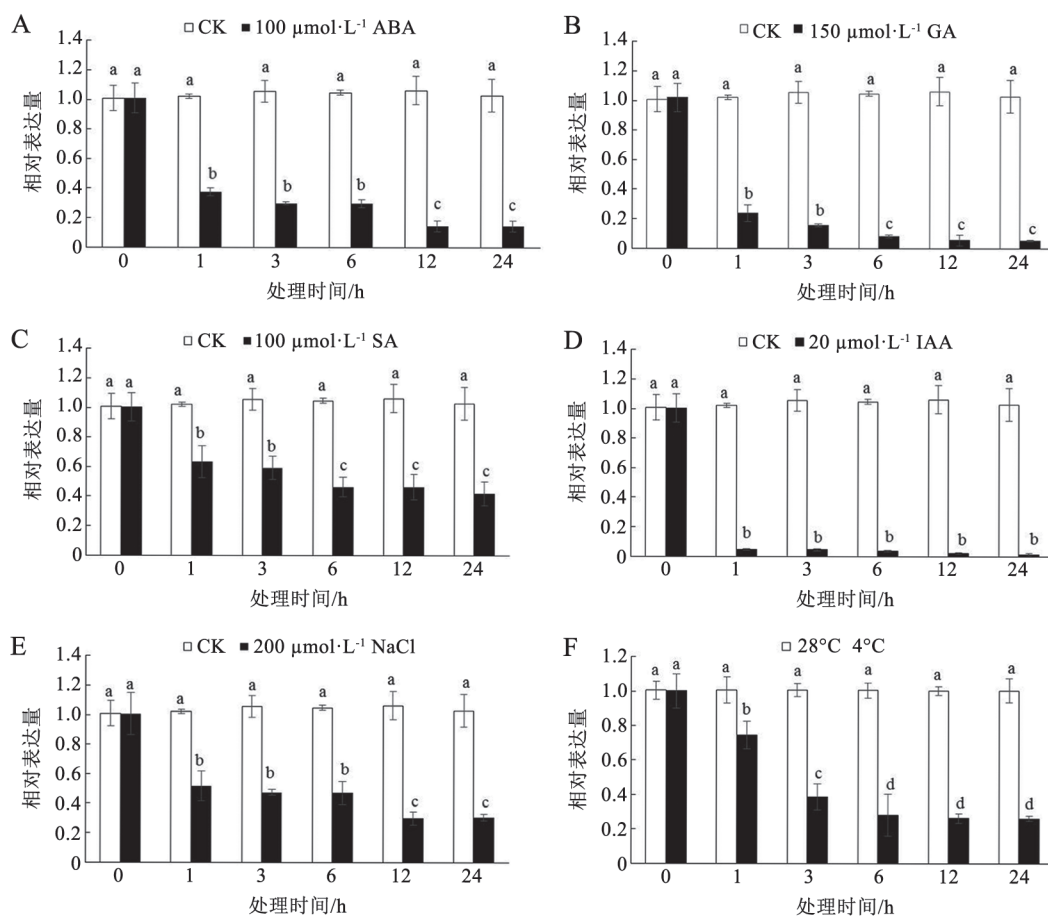


图4 ABA、GA、SA、IAA、盐和低温胁迫下*MdWRKY53*的表达水平变化

Fig.4 Changes in expression level of *MdWRKY53* gene under ABA, GA, SA, IAA, salt and low temperature stresses

2.5 *MdWRKY53*转基因苹果愈伤组织与植物生长调节物质的关系

2.5.1 *MdWRKY53*转基因苹果愈伤组织的获得

为了进一步研究*MdWRKY53*的功能,我们获得了3个*MdWRKY53*转基因愈伤组织细胞系MdWRKY53-OE-1、MdWRKY53-OE-2和MdWRKY53-OE-3。qRT-PCR检测*MdWRKY53*的表达量,发现相比于转入空载体的愈伤组织,转基因愈伤组织细胞系中*MdWRKY53*表达显著增加(图5)。

2.5.2 ABA处理下*MdWRKY53*转基因苹果愈伤组织的生长情况

由于*MdWRKY53*能够响应ABA信号(图4-A),所以我们检测了*MdWRKY53*转基因愈伤组织细胞系在ABA处理下的表型。结果(图6-A)发现,愈伤组织随ABA浓度增加,长势减缓。在正常愈伤组织培养基上,转入空载体的愈伤组织以及3个转基因愈伤组织细胞系生长状态相差不大。在100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA的愈伤组织培养基上,转基因细胞系明显比空载体的生长良好;150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA培养基上也是如此。

图7-A显示,愈伤组织鲜重随ABA浓度增加而下降。在正常愈伤组织培养基上,转入空载体的愈伤组织以及3个转基因愈伤组织的鲜重相差不大,而在100和150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA的培养基上,3个转基因愈伤组织株系鲜重均显著高于空载体的(图7-A)。这说明与对照相比,*MdWRKY53*转基因愈伤

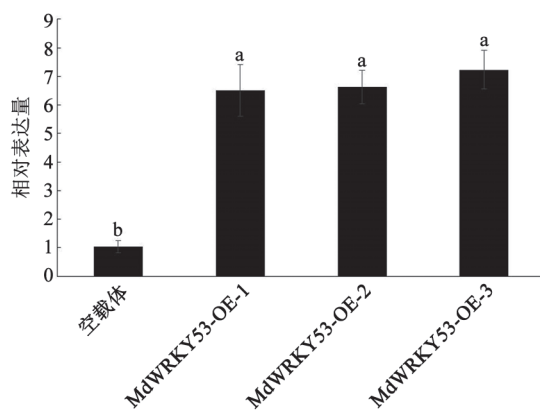


图5 不同转基因愈伤组织的*MdWRKY53*基因表达
Fig.5 Expression level of *MdWRKY53* in different transgenic calli

组织对ABA不敏感,ABA对其生长的抑制作用明显减弱。

2.5.3 GA处理下*MdWRKY53*转基因苹果愈伤组织的生长情况

图6-B显示,苹果愈伤组织在正常和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA的愈伤组织培养基上生长良好,而在150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA的培养基上转基因愈伤组织明显不如空载体。对愈伤组织鲜重的研究结果发现,在正常及加入100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA的愈伤组织培养基上,转入空载体的以及3个转基因的愈伤组织细胞系鲜重相差不大,但在150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA的培养基上,转基因愈伤组织细胞系的鲜重显著低于转入空载体的愈伤组织(图7-B)。这个结果表明,高浓度GA负调控*MdWRKY53*转基因愈伤组织细胞系的生长。

2.5.4 IAA处理下*MdWRKY53*转基因苹果愈伤组织的生长情况

在正常愈伤组织培养基上,转入空载体的愈伤组织以及3个转基因愈伤组织细胞系长势和鲜重相差不大。随IAA浓度增加,愈伤组织的鲜重下降,生长情况明显减缓,并且转基因愈伤组织细胞系鲜重显著低于转入空载体的愈伤组织(图6-C和图7-C)。这表明,IAA能够负调控*MdWRKY53*转基因愈伤组织细胞系的生长。

3 讨论

WRKY转录因子能够调控植物的生长发育,并且在植物的抗逆、抗病中起着非常重要的作用。在马铃薯中,*ScWRKY1*虽然在种子中的表达量几乎检测不到,但是它能在已受精的胚珠中受诱导,这表明*ScWRKY1*在胚胎发育阶段起作用(Lagacé和Matton 2004)。在拟南芥中,*WRKY25*和*WRKY26*的表达受高温处理诱导,而*WRKY33*的表达在高温处理后表达受抑制,但是*WRKY33*、*WRKY26*和*WRKY25*都能增加拟南芥对高温胁迫的抵抗能力(Li等2011)。在水稻中,过表达*WRKY76*能增加对稻瘟病的敏感性,而且能够提高水稻的耐冷性(Yokotani等2013)。

在拟南芥中,*WRKY33*参与植物生长调节物质信号转导及植物抗毒素的生物合成,并且在抵抗葡萄孢菌2100时,负调控ABA(Liu等2015)。在

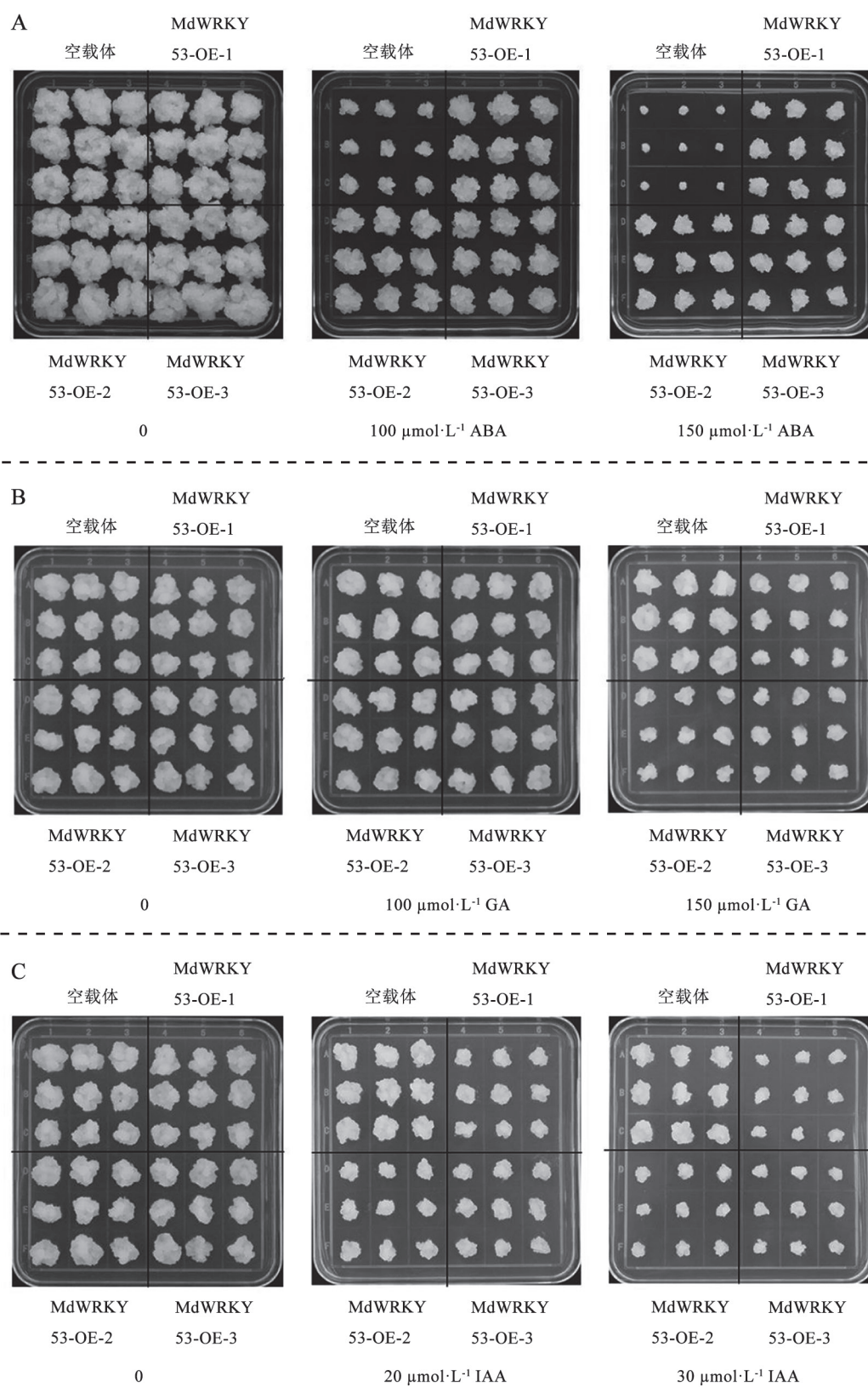


图6 ABA、GA和IAA处理下愈伤组织的生长变化

Fig.6 Changes in growth of calli under treatments of ABA, GA and IAA

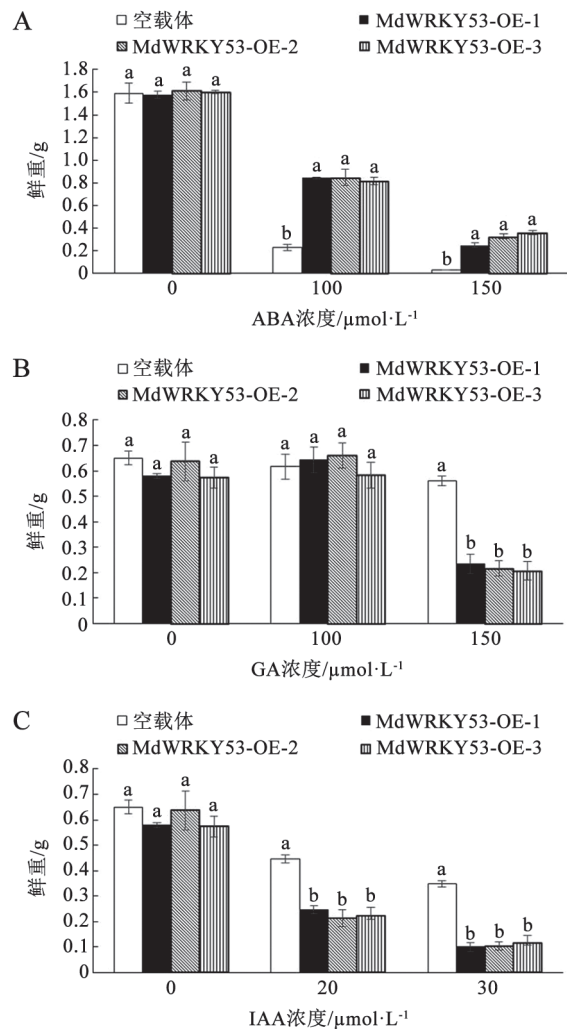


图7 ABA、GA和IAA处理下愈伤组织的鲜重变化
Fig.7 Changes in fresh weights of calli under treatments of ABA, GA and IAA

水稻中, 过表达 *WRKY24*、*WRKY53* 和 *WRKY70* 能够抑制 ABA 和 GA 信号 (Zhang 等 2015)。在烟草中, *WRKY-RI* 能够通过调控 IAA 和 JA 信号转导来调控尼古丁的合成 (Jin 等 2017)。在拟南芥中, *WRKY46* 能够被 SA 诱导, 并且过表达 *WRKY46* 能够提高拟南芥对丁香假单胞菌的抗性 (Hu 等 2012)。在棉花中, *WRKY17* 能被干旱、盐、 H_2O_2 和 ABA 诱导, 并且在烟草中过表达 *GhWRKY17* 能够显著减少植物对盐和干旱的抗性 (Yan 等 2014)。在茶树中, *WRKY2* 能被低温、干旱和外源 ABA 诱导, 并且在抵御干旱和低温胁迫中起了重要作用 (Wang 等 2016)。本实

验结果发现, *MdWRKY53* 不仅能响应低温、NaCl、ABA、IAA、GA 和 SA 信号, 并且随着处理时间的增加, 响应愈发明显 (图 4), 这表明 *MdWRKY53* 可能参与到低温、盐胁迫、ABA、IAA、GA 和 SA 信号途径, 从而调控植物的生长发育和适应环境胁迫。

为了进一步研究 *MdWRKY53* 与植物生长调节物质的关系, 我们获得了 3 个 *MdWRKY53* 转基因愈伤组织细胞系 (图 5)。研究 ABA 处理下转入空载体及 *MdWRKY53* 转基因愈伤组织的生长, 发现 *MdWRKY53* 转基因愈伤组织鲜重显著高于转入空载体的愈伤组织 (图 7), 这表明 *MdWRKY53* 对 ABA 不敏感。同时, 发现 *MdWRKY53* 启动子序列上含有 ABRE 顺式作用元件, 推测 ABA 信号可能通过 ABI5 等激活或抑制 *MdWRKY53* 的转录, 调控其 ABA 响应。GA、IAA 负调控 *MdWRKY53* 转基因愈伤组织细胞系生长。本研究揭示了 *MdWRKY53* 与 ABA、GA 和 IAA 的关系, 并且研究了 *MdWRKY53* 对生物和非生物胁迫的响应, 为苹果的遗传育种和品种改良奠定了良好的基础。

参考文献 (References)

- Assmann SM (2003). *OPEN STOMATAL* opens the door to ABA signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Trends Plant Sci*, 8 (4): 151–153
- Chen JN, Nolan TM, Ye HX, et al (2017a). *Arabidopsis WRKY46*, *WRKY54*, and *WRKY70* transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses. *Plant Cell*, 29 (6): 1425–1439
- Chen LG, Xiang SY, Chen YL, et al (2017b). *Arabidopsis WRKY45* interacts with the DELLA protein RGL1 to positively regulate age-triggered leaf senescence. *Mol Plant*, 10 (9): 1174–1189
- Dai WH, Wang M, Gong XQ, et al (2018). The transcription factor FcWRKY40 of *Fortunella crassifolia* functions positively in salt tolerance through modulation of ion homeostasis and proline biosynthesis by directly regulating *SOS2* and *P5CSI* homologs. *New Phytol*, 219 (3): 972–989
- De Storme N, Geelen D (2014). The impact of environmental stress on male reproductive development in plants: biological processes and molecular mechanisms. *Plant Cell Environ*, 37 (1): 1–18
- Ding WW, Fang WB, Shi SY, et al (2016). Wheat WRKY type transcription factor gene *TaWRKY1* is essential in mediat-

- ing drought tolerance associated with an ABA-dependent pathway. *Plant Mol Biol Rep*, 34 (6): 1111–1126
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, et al (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 5 (5): 199–206
- Fan HK, Wang F, Gao H, et al (2011). Pathogen-induced *MdWRKY1* in ‘Qinguan’ apple enhances disease resistance. *J Plant Biol*, 54(3): 150–158
- Fan J, Hill L, Crooks C, et al (2009). Abscisic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. *Plant Physiol*, 150 (4): 1750–1761
- Hu DG, Sun MH, Sun CH, et al (2015). Conserved vacuolar H⁺-ATPase subunit B1 improves salt stress tolerance in apple calli and tomato plants. *Sci Hortic*, 197: 107–116
- Hu YR, Dong QY, Yu DQ (2012). *Arabidopsis WRKY46* coordinates with *WRKY70* and *WRKY53* in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci*, 185: 288–297
- Huang Y, Feng CZ, Ye Q, et al (2016). *Arabidopsis WRKY6* transcription factor acts as a positive regulator of abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *PLoS Genet*, 12 (2): e1005833
- Jiang YJ, Yu DQ (2016). *WRKY57* regulates JAZ genes transcriptionally to compromise *Botrytis cinerea* resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, doi: 10.1104/pp.16.00747
- Jin WH, Zhou Q, Wei YF, et al (2017). *NtWRKY-R1*, a novel transcription factor, integrates IAA and JA signal pathway by topping damage in *Nicotiana tabacum*. *Front Plant Sci*, 8: 2263–2273
- Kim CY, Vo KTX, Nguyen CD, et al (2016). Functional analysis of a cold-responsive rice WRKY gene, *OsWRKY71*. *Plant Biotechnol Rep*, 10 (1): 13–23
- Lagacé M, Matton DP (2004). Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. *Planta*, 219 (1): 185–189
- Li SJ, Fu QT, Chen LG, et al (2011). *Arabidopsis thaliana WRKY25*, *WRKY26*, and *WRKY33* coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta*, 233 (6): 1237–1252
- Li W, Wang HP, Yu DQ (2016). *Arabidopsis* WRKY transcription factors *WRKY12* and *WRKY13* oppositely regulate flowering under short-day conditions. *Mol Plant*, 9 (11): 1492–1503
- Liu S, Kracher B, Ziegler J, et al (2015). Negative regulation of ABA signaling by *WRKY33* is critical for *Arabidopsis* immunity towards *Botrytis cinerea* 2100. *eLife*, 4: e07295
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Popko J, Hänsch R, Mendel RR, et al (2010). The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant Biol*, 12 (2): 242–258
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, et al (2007). Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol*, 10 (4): 372–379
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, et al (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol*, 203 (1): 32–43
- Ton J, Flors V, Mauch-Mani B (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends Plant Sci*, 14 (6): 310–317
- Wang Y, Shu Z, Wang W, et al (2016). *CsWRKY2*, a novel WRKY gene from *Camellia sinensis*, is involved in cold and drought stress responses. *Biol Plantarum*, 60 (3): 443–451
- Yan HR, Jia HH, Chen XB, et al (2014). 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. *Plant Cell Physiol*, 55 (12): 2060–2076
- Yokotani N, Sato Y, Tanabe S, et al (2013). *WRKY76* is a rice transcriptional repressor playing opposite roles in blast disease resistance and cold stress tolerance. *J Exp Bot*, 64 (16): 5085–5097
- Zhang LY, Gu LK, Ringler P, et al (2015). Three WRKY transcription factors additively repress abscisic acid and gibberellin signaling in aleurone cells. *Plant Sci*, 236: 214–222
- Zheng XD, Zhao Y, Shan DQ, et al (2018). *MdWRKY9* overexpression confers intensive dwarfing in the M26 rootstock of apple by directly inhibiting brassinosteroid synthetase *MdDWF4* expression. *New Phytol*, 217 (3): 1086–1098
- Zhu D, Hou LX, Xiao PL, et al (2018). *VvWRKY30*, a grape WRKY transcription factor, plays a positive regulatory role under salinity stress. *Plant Sci*, 280: 132–142

Cloning and functional identification of *MdWRKY53* gene in apple

QI Chen-Hui¹, ZHAO Xian-Yan², JIANG Han², ZHENG Peng-Fei¹, LIU Hai-Tao³, LI Yuan-Yuan^{1,*}, HAO Yu-Jin^{1,*}

¹State Key Laboratory of Crop Biology, National Research Center for Apple Engineering and Technology, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China

²State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas/Shaanxi Key Laboratory of Apple, College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

³Shandong Yihui Detection Technology Co. Ltd., Taian, Shandong 271000, China

Abstract: The *Arabidopsis* WRKY53 protein sequence was used as a query to search its homologue in the apple genome. We obtained a sequence with the highest score and highest homology, which was named as *MdWRKY53* (MDP0000299114). The *MdWRKY53* gene contained a complete open reading frame of 1 056 bp in length and encoded 351 amino acids, which was consistent with the predicted sequence of the apple genome. Phylogenetic analysis showed that the sequence of *MdWRKY53* exhibited the closest relationship with *PbWRKY53* in pear. The *MdWRKY53* contained a conserved WRKY domain. Quantitative real-time PCR analysis showed that *MdWRKY53* was expressed in different apple tissues, and the expression was the highest in apple fruit and the lowest in stem. At the same time, it was found that *MdWRKY53* could respond to low temperature, salt stress, abscisic acid, salicylic acid, gibberellin, and auxin signal.

Key words: apple; *MdWRKY53*; biological stress; abiotic stress

Received 2018-08-23 Accepted 2019-03-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31772275), and the Natural Science Fund for Excellent Young Scholars of Shandong Province (ZR2018JL014).

*Corresponding author: Hao YJ (haoyujin@sdau.edu.cn), Li YY (liyy0912@163.com).