

番茄 *WRKY41* 基因的克隆、 表达分析与转基因植株的获得^①

魏娟娟, 杨伟, 潘宇, 张兴国, 李金华

西南大学 园艺园林学院/南方山地园艺学重点实验室, 重庆 400715

摘要: 基于前期基因芯片结果, RT-PCR 获得栽培品种番茄 M82 和近缘野生种潘那利的一个 *WRKY* 基因的全长 cDNA 序列, 分别命名为 *SlWRKY41* 和 *SpWRKY41*. 序列分析表明, 番茄 *WRKY41* 基因长为 1011bp, 编码 336 个氨基酸. 该氨基酸序列含有 5'-N 端 *WRKYGQK* 核心结构域和 *CX₇CX₂₃HX₁C* 锌指结构, 具有 *WRKY* 家族的典型结构特征. 同源分析表明, 该氨基酸序列与多种植物的 *WRKY* 类蛋白具有较高的同源性, 并且在普通栽培番茄品种 M82 和野生种潘那利中, 只有 5 个氨基酸位点的差异. 进化树分析表明, *WRKY41* 在番茄中属于第 III 类 *WRKY* 蛋白, 这类蛋白为植物所特有. 表达分析结果表明, *WRKY41* 在普通栽培番茄品种 M82 和野生种潘那利中, 不仅在不同组织器官中的表达存在差异, 而且在逆境(干旱和氧化逆境)和一些调节因子(SA、GA、乙烯)的处理下也有不同的表达模式. 其在野生种潘那利中能够迅速响应相关调节因子(SA、GA、乙烯), 推测 *WRKY41* 在番茄抗逆响应过程中具有很重要的作用, *SpWRKY41* 可能是一个较好的改良普通栽培种抗逆性的候选基因. 通过构建超量表达载体, 成功地将 *SpWRKY41* 转化到番茄 M82 中, 以期深入研究该基因的功能和提高番茄的抗逆性.

关键词: 番茄; 野生种潘那利; *WRKY41*; 表达模式; 抗旱

中图分类号: Q785; S641.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)01-0046-09

植物在长期进化过程中, 会逐步形成对自身有益、适宜自身生长发育的一系列调节机制, 转录因子在这些调控过程中具有重要的作用. 转录因子也称为反式作用因子, 能够与真核基因启动子区域中顺式作用元件特异性结合, 并激活或抑制基因的转录^[1]. *WRKY* 作为一种重要的锌指蛋白类转录因子, 近年来研究的较为广泛. 其编码基因最先在甘薯^[2]中被克隆到, 随后约在 20 多种植物中证实存在 *WRKY* 蛋白^[3]. *WRKY* 转录因子最显著的特征是含有一个由 60 个氨基酸组成的多肽, 这个多肽 N 端至少含有一个 *WRKY* 的核心结构域 *WRKYGQK*, C 端含有一个非典型的锌指结构^[4]. 根据 *WRKY* 锌指结构的特征及 *WRKY* 结构域的数量, 将 *WRKY* 蛋白分为 3 类: 第 I 类含有 1 个 *WRKY* 结构域, 锌指结构为 *CX₄₋₅CX₂₂₋₂₃HX₁H*; 第 II 类含有 2 个 *WRKY* 结构域, 其锌指结构是 *CX₄₋₅CX₂₂₋₂₃HX₁H*, 与第 I 类的结构相同; 第 III 类与第 I 类同样含有 1 个 *WRKY* 结构域, 但是锌指结构不同, 为 *CX₇CX₂₃HX₁C*^[4]. 大多数的 *WRKY* 转录因子属于第 II 类, 而第 III 类 *WRKY* 转录因子一般只存在于高等植物中, 并且能响应多种生物胁迫^[5].

近年来, 研究发现 *WRKY* 基因广泛存在于各个物种中: 拟南芥中有 72 个^[6], 水稻中有 102 个, 大豆中有 197 个^[7], 番茄中有 81 个^[8]. 对这些 *WRKY* 基因的表达研究表明, 它不仅能在植物受到生物胁迫和非生物胁迫时诱导表达, 还能受到外源施加激素的诱导表达. 现有的研究表明, *WRKY* 基因在植物生物胁迫

① 收稿日期: 2016-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301779); 西南大学博士启动金项目(SWU113023); 中央高校基本业务费专项基金项目(XDJK2014B045).

作者简介: 魏娟娟(1990-), 女, 新疆乌鲁木齐人, 硕士研究生, 主要从事蔬菜基因工程和遗传育种研究.

通信作者: 张兴国, 研究员, 博士生导师; 李金华, 副教授, 硕士生导师.

迫或非生物胁迫过程中具有很重要的作用. 在生物胁迫方面, 超表达辣椒的 WRKY 基因 *CaWRKY40* 能增强烟草对茄科雷尔氏菌的抵抗力^[9]; 拟南芥中超表达 *AtWRKY38* 和 *AtWRKY62* 后, 植株对丁香假单胞菌的侵染更加敏感^[10]; 同样, 将辣椒的一个 WRKY 基因 *CaWRKY27* 在烟草里面超量表达, 提高了烟草抗青枯病的能力^[11]. 在非生物胁迫方面, 拟南芥的 *AtWRKY57* 通过提高拟南芥 ABA 水平来增强其对干旱的耐受性^[12]; 小麦中的 *TaWRKY44* 在烟草中超量表达提高了烟草抗多种非生物逆境的能力^[13]; 棉花中的 *GhWRKY34* 基因在拟南芥中超量表达提高了其抗盐碱的能力^[14]. 此外, 有些 WRKY 基因既在生物逆境中又在非生物逆境中有作用, 如棉花的 *GhWRKY25* 可以调节 SA 和 JA 信号途径来降低植物对病原菌的抵抗能力和抗旱能力^[15].

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是世界性的重要的蔬菜作物, 全球番茄产量达到 1.6 亿吨, 其中超过 30% 产自我国 (FAO, 2015), 在我国农业产业中具有重要的地位. 随着全球气候变化的加剧, 非生物逆境越来越成为农作物产量和品质提高的严重制约因素, 也影响着植物的进化和分布^[16-17]. 利用野生番茄种质资源探索植物抗逆分子机制, 可为创造抗逆新品种奠定理论基础及提供实践价值. 普通栽培番茄 (*S. lycopersicum*) 对干旱和高盐较为敏感^[18], 而其近缘野生种潘那利番茄 (*S. pennellii*) 起源于秘鲁安第斯山脉, 可在干旱和半干旱环境中生存, 对高盐和干旱不敏感^[19]. 分析抗旱野生种和普通栽培种在干旱响应基因中的差异, 通过转基因的方法将野生种相关基因转化到普通栽培番茄种中, 是提高栽培番茄抗逆性的一种非常有效的方法. 本研究分别从抗旱野生种番茄和栽培番茄中分离出一个 WRKY 基因, 分析了它们的表达特性, 并构建了超量表达载体, 成功转化进普通栽培番茄 M82 中, 为今后深入研究该基因的抗逆功能和提高番茄的抗逆性奠定基础.

1 材料与方法

1.1 *SIWRKY41* 基因的克隆和序列分析

基于前期的干旱基因芯片结果, 我们分离得到 1 个在普通番茄栽培品种 *S. lycopersicum* cv. M82 和野生番茄品种 *S. pennellii* LA0716 在干旱处理下有表达差异的基因 *WRKY41* (Unigene SGN-U212725, <https://solgenomics.net>). 根据 Unigene 序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计引物, 用 RT-PCR 得到基因的全长 ORF. 在番茄五叶一心时, 采集番茄从上到下第三片功能叶, 用液氮保存, 研磨. RNA 采用 Trizol (Invitrogen, USA) 一步法提取. 约 1 μg 总 RNA 样品经 1U 的 DNaseI (Fermentas, USA) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后, 加入 1 μl EDTA (50 mM), 于 65 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min. 取各样品总 RNA, 以 Oligo-d(T) 为引物, 用 AMV 反转录酶进行反转录, 参照 PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 方法进行. 扩增基因 *WRKY41* 引物对为: *WRKY41* 正向引物 5'-TTAGCAACTTCCCCCTTCA-3'; *WRKY41* 反向引物 5'-TGAATTCATCGACGTTACAATTT-3'. 利用 PrimerSTAR HS 高保真酶 (Takara, 大连) 按说明书进行 PCR 扩增. PCR 产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后, 回收特异性条带. 将回收后的片段与 pEASY-Blunt (TransGen) 克隆载体进行连接. 热击转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆进行测序验证.

利用 *WRKY41* 氨基酸序列对 NCBI 的蛋白质序列数据库进行 BLAST, 得到序列和其他物种相似性较高的氨基酸序列, 然后用 ClustalW 进行多序列比对. 利用 SGN (<https://solgenomics.net>) 数据库找出番茄所有的 WRKY 基因, 利用 MEGA5.1 构建 Neighbor-Joining 系统进化树.

1.2 *SIWRKY41* 表达模式分析

番茄常规品种 M82 和野生番茄品种 LA0716 用于表达分析, 常规栽培管理, 于 2014 年 5—6 月栽培在西南大学蔬菜实验室温室. 在植株开花结果时, 收集地上部分的茎 (ST)、幼叶 (YL)、成熟叶 (ML)、老叶 (OL) 花 (FL) 和果实 (FR), 将材料立即放入液氮中速冻, 并保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用, 用于分析 *SIWRKY41* 的组织表达特性. 当植株长至五叶一心时取样, 用于各种调控因子下的表达分析. 各种处理具体如下: 干旱脱水 (DH) 胁迫的是将离体植株放在滤纸上, 环境条件为 70% 的相对湿度, 室温 25 $^{\circ}\text{C}$; ABA (脱落酸)、SA (水杨酸)、GA (赤霉素) 处理、Eth (乙烯) 和氧化处理, 采取直接喷施 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA、100 $\mu\text{mol/L}$ SA、100 $\mu\text{mol/L}$ GA、1 mM 乙烯利 (乙烯 Eth 释放剂) 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的甲基紫精 MV (含 0.2% Tween-20), 过量喷施, 直到叶片滴水为止. 每次重复分别采集三棵植株的三片叶, 在设计好的时间

点收集样品按上述方法保存样品备用。

1.3 半定量和实时荧光定量 PCR

分别提取番茄不同组织器官和各种处理材料的总 RNA, 并进行反转录, 方法如 1.1 所述. 根据 Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) 设计半定量和实时定量引物. 在 *WRKY41* 开放读码框内设计基因引物 *WRKY41*(Q): 正向引物 5'-ATTCCCTCCTGCACCACTAC-3, 反向引物 5'-TAATCCACCCCTTCTC-CACC-3, 扩增长度 213 bp. 以番茄 β -Actin (SGN-U580609) 作为内参基因校正, 正向引物 5'-ATG-GCAGACGGAGAGGATATTCA-3, 反向引物 5'-GCCTTTGCAATCCACATCTGCTG-3. 半定量首先用 β -Actin 进行 PCR 校正各个组织的 cDNA (27 个循环), 校正一致后, 通过目的基因的 PCR 扩增, 通过电泳图来确定基因在各个组织中的表达情况.

实时定量 PCR 按照 SYBR® Premix Ex Taq™ 操作说明, 在 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪上进行, 检测目的基因的相对表达量. 荧光定量 PCR 反应体系为 10 μ L: 2 \times SsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad) 5 μ L, 正向反向引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 2 μ L, 超纯水 2 μ L. PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 65 $^{\circ}$ C 延伸 5 s, 39 次循环. 每个试验设置 3 次重复. 为了消除光周期对基因表达的影响, 在每个时间点分别取未处理和处理的样品, 每个时间点的表达量以未处理的表达量为 1, 处理之后和未处理相比计算得到相对表达量.

1.4 转基因植株的获得及鉴定

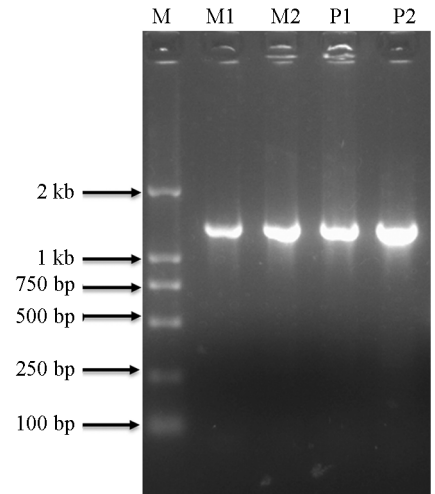
将 1.1 得到的 *S_pWRKY41* 经过克隆质粒用限制性内切酶 SalI 和 KpnI 酶切. 电泳切胶回收得到目的片段, 用 T4 连接酶连接到用 XhoI 和 KpnI 酶切双元载体 pBI121 的载体框架上. 得到的载体经过 PCR 验证后, 抽提好质粒电击法转到农杆菌 C58 感受态细胞, 保存用于番茄的遗传转化. 利用农杆菌介导法转化到番茄 M82 中, 具体的操作流程参考欧阳波的方法^[20]. 得到转基因植株后, 利用 35S(5'-TTCGCAAGAC-CCTTCCTCTA-3) 加上基因反向引物进行 PCR 验证.

2 结果与分析

2.1 番茄 *WRKY41* 基因全长序列的克隆

基于前期干旱芯片分析结果, *WRKY41* (SGN-U212725) 受到干旱诱导并且在番茄野生种和栽培种中有表达差异. 根据其基因片段设计引物 *WRKY41* 正向和反向引物, 以普通番茄 M82 和野生种番茄潘那利叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增后的片段回收, 然后连接到克隆载体上, 在板上挑取单克隆进行 PCR 鉴定, 菌落 PCR 结果得到一条大约长 1 271 bp 的特异条带 (图 1). 测序结果表明, 基因的全长 ORF 为 1011bp, 编码 336 个氨基酸. 通过与 NCBI 数据库进行 BLAST 后, 该蛋白与其他物种中的这类蛋白都含有一个保守的 WRKY 结构域, 并且具有很高的保守性 (图 2), 如马铃薯和烟草的相似性最高, 分别达到了 90.48% 和 53.27%, 另外和葡萄、可可、咖啡、丹参、菊花、桉树、棉花、杨树、蓖麻、苹果的相似性也达了 30% 左右.

普通栽培种中克隆到的 *SlWRKY41* 和野生种中的 *S_p-WRKY41* 的相似性达到 97.62%, 只有 5 个氨基酸的差异 (图 2). 具体的差异为: 第 87 位在 M82 中的 Ser 丝氨酸而在潘那利 (P) 中是 Asn 天冬酰胺, 第 244 位点天冬氨酸 Asp (M) 突变成谷氨酸 Glu (P), 第 275 位点谷氨酸 Glu (M) 突变成丙氨酸 Ala (P), 第 281 位点丙氨酸 Ala (M) 突变成苏氨酸 Thr (P), 第 283 位点脯氨酸 Pro (M) 突变成谷氨酰胺 Gln (P); 其中在 281 和 283 位点的两个疏水性氨基酸 (Ala 和 Pro) 突变成了亲水性的氨基酸 (Thr 和 Gln). 这些突变可能会造成氨基酸结构和功能的差异, 从而导致在番茄栽培种和野生种中 *WRKY41* 基因功能的差异.



M: DL2000; M1 和 M2: 以 M82 为模板克隆得到的基因片段; P1 和 P2: 以潘那利为模板克隆得到的基因片段.

图 1 菌落 PCR 扩增 *WRKY41* 电泳验证

NtWRKY : --MEVKVKAWEKMTITL...
StWRKY : --MEVKVSMKKKML...
SlWRKY : --MEVKVSMKKKML...
SpWRKY : --MEVKVSMKKKML...
SmWRKY : --MEKIVGVSFKKTV...
EgWRKY : --MEKIVGVSFKKTV...
CmWRKY : --METGKRRP...
GhWRKY : --MENMVKWGGT...
CcWRKY : --MEKIVNPSDQKN...
PtWRKY : --MANMGDWBQKN...
PpWRKY : MEKRRNMEWQK...
MnWRKY : --MERTVNLQK...
DlWRKY : --MDRLMVEK...
VaWRKY : --MEMAREWHNT...
VvWRKY : --MEMAREWHNT...

NtWRKY : ---SEGSDLDYS-RDQGNMVF...
StWRKY : ---SEV-FDSSRDQLDNMVS...
SlWRKY : ---SEV-FDSSREKLDNMVS...
SpWRKY : ---SEV-FDSSREKLDNMVS...
SmWRKY : ---SEGS---DHNSKRRKKTQ...
EgWRKY : ---DEGDA-CRRKRTMP...
CmWRKY : IQVSEPEDSNSP-HNSHRW...
GhWRKY : ---SDLEK-D-NQDIDW...
CcWRKY : ---NSSFQSKD-QCNQIDW...
PpWRKY : ---SEDSDRTR-DQRIQ...
MnWRKY : ---SEISDQCK---NMD...
DlWRKY : ---SIFDQDYS---KH...
VaWRKY : ---SEGSNLS---DK...
VvWRKY : ---SEGSNLDCE-DQ...
VvWRKY : ---SEGSNLDCE-DQ...

NtWRKY : HSCIKIAQSEIFSLVTKRQKH...
StWRKY : HSCIKVAQSEIFSLNNQKQKCN...
SlWRKY : HSCIKVAQSEIFSLNNQKQKCN...
SpWRKY : HSCIKVAQSEIFSLNNQKQKCN...
SmWRKY : HSCIKRQERLRQSKERK...
EgWRKY : HSCIKIQAQSSAISPPDI...
CmWRKY : HSCIKIHAATQLSKALAKPK...
GhWRKY : HSCIKANGNPVAPVSPK...
CcWRKY : HSCIKIQAQSSAISRSDG...
PpWRKY : HSCIKIQASNLPLTLQ...
MnWRKY : HSCIKSRAPQLAMASANS...
DlWRKY : HSCIKNQVSHFAVTSVP...
VaWRKY : HSCIKQNSNPATVASPSV...
VvWRKY : HSCIKIQGSRVAPASV...
VvWRKY : HSCIKIQGSRVAPAS...

NtWRKY : -----MVPSPPIITSELS...
StWRKY : -----MAPSSPIASELPL...
SlWRKY : -----SELPLL-L-ASPL...
SpWRKY : -----SALPLL-L-ITSL...
SmWRKY : T-----SYSPSSSLSATS...
EgWRKY : DGF-----TSSPATS-G...
CmWRKY : -----DST-----T...
GhWRKY : YNIFGGSFSP-PESSP...
CcWRKY : CDMMGGSFSP-TSP...
PpWRKY : NSFVGFSP-PSP...
MnWRKY : -----LMDGYSP-T...
DlWRKY : NQIAGFSP-P...
VaWRKY : NIMDGNLSP-T...
VvWRKY : NSLMGGFSP-S...

红色线条表示 WRKY 基因的核心基序, 长方形表示锌指结构特征, 红色小方框表示 M82 和潘那利氨基酸的序列差异位点. SlWRKY(S. lycopersicum cv. M82); SpWRKY(S. pennellii LA0716); StWRKY(马铃薯 Solanum tuberosum |M0ZH04|); NtWRKY(烟草 Nicotiana tabacum |A0A076L4Q2|) VaWRKY(夏葡萄 Vitis aestivalis |Q6R7N3|); TeWRKY(可可 Theobroma cacao |A0A061E01|) CmWRKY(咖啡 Coffea canephora |A0A068UKB5|) PpWRKY(桃 Prunus persica |M5X010|); MnWRKY(桑 Morus notabilis |W9RNA2|) SmWRKY(丹参 Salvia miltiorrhiza |A0A0D5Y996|); CmWRKY(菊花 Chrysanthemum morifolium |A0A088BK74|) DlWRKY(龙眼 Dimocarpus longan |G3FF79|); VvWRKY(葡萄 Vitis vinifera |F616B1|) EgWRKY(桉树 Eucalyptus grandis |A0A059CI26|) GhWRKY(棉花 Gossypium hirsutum |A0A068L173|); PtWRKY(杨树 Populus trichocarpa |B9I540|).

图 2 番茄与其他植物 WRKY 蛋白氨基酸序列的同源比对

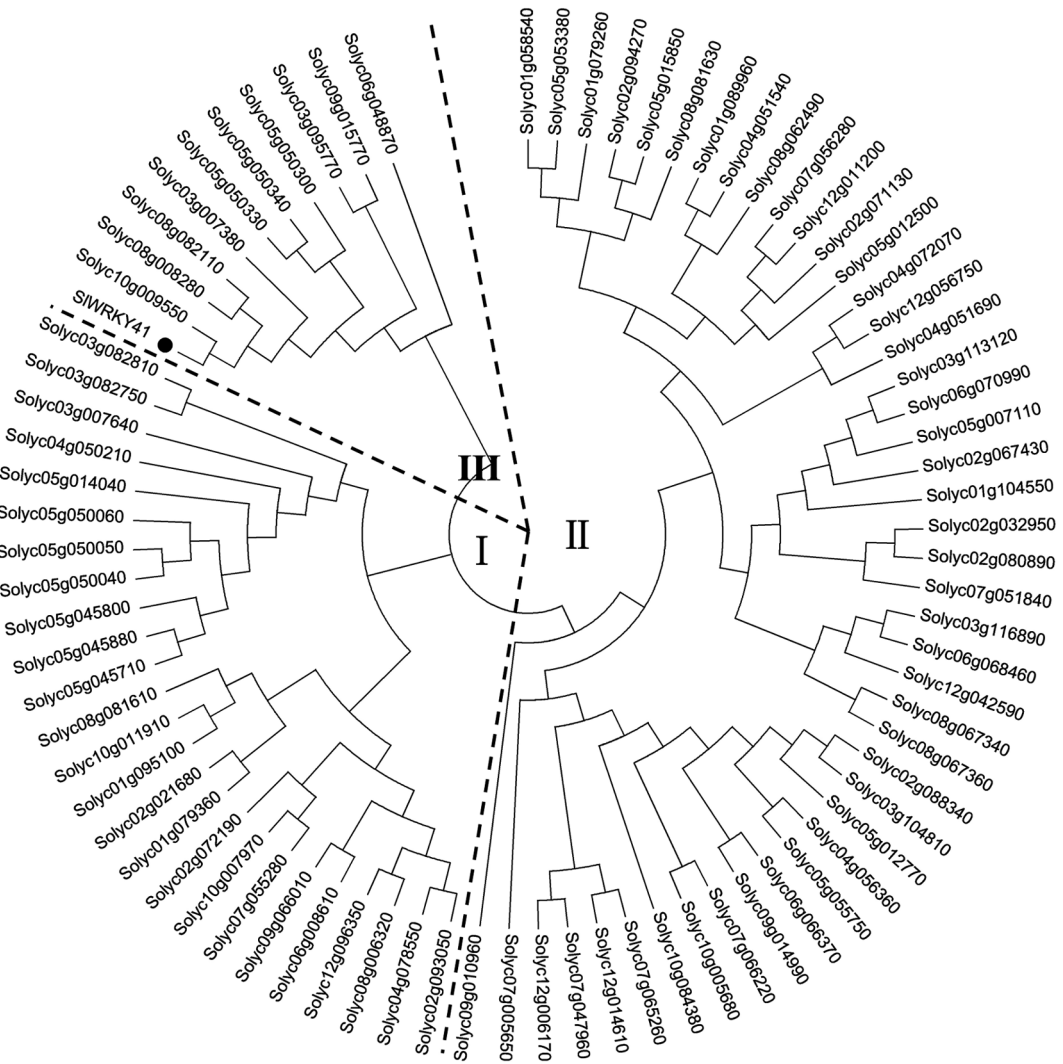
2.2 番茄 WRKY41 编码进化树分析

通过生物信息学的方法, 从番茄的基因组中分离出来了 81 个 WRKY 基因. 这些基因编码的蛋白最长的达到 739 个氨基酸(Solyc07g066220. 2. 1), 最短的只有 131 个氨基酸(Solyc02g094270. 1. 1), 平均氨基酸长度为 354 个. 系统进化树分析表明, 发现番茄中的 WRKY 蛋白可分为三大类, 第 I 类含 25 个 WRKY 蛋白, 第 II 类有 45 个 WRKY. WRKY41 属于第 III 类, 这类蛋白包含有 11 个 WRKY 蛋白, 他们都只含有一个 WRKY 结构域, 并且其锌指结构为 CX7CX23-24HX1C 或者 CX4CX23HX1C.

2.3 WRKY41 的表达特性分析

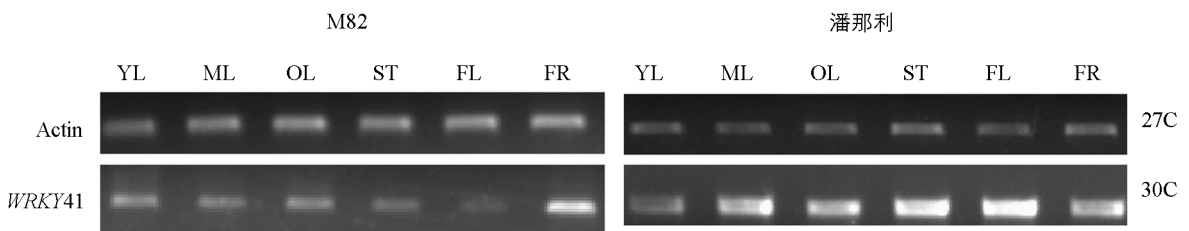
以番茄 Actin 为内参, 半定量 RT-PCR 分析了 WRKY41 基因在普通栽培番茄品种 M82 和野生抗旱番茄潘那利中的组织表达特性. 从图 4 可以看出, 在 M82 中, WRKY41 在叶片(包括老叶、成熟叶和嫩叶)和

果实中表达量比较高,但是在潘那利中表达模式和在 M82 中有差异,它主要在成熟叶、茎和花中表达量高。这些表达模式的差异可能是由于品种的差异造成的。



根据 SGN 数据库获得番茄 81 个 *WRKY* 基因。

图 3 番茄中已发现的 *WRKY* 蛋白的系统进化分析



YL(Young Leaves: 幼叶); ML(Mature Leaves: 成熟叶); OL(Old Leaves: 老叶); ST(Stem: 茎); FL(Flower: 花); FR(Fruit: 果实)。

图 4 *WRKY41* 在番茄 *S. lycopersicum* cv. M82 和 *S. pennellii* LA0716 中的组织表达分析

为了探索 *WRKY41* 在多种逆境下和调节因子处理下的表达模式,我们分别做了一系列处理和不同时间点分析,这些处理包括脱水处理(DH)、ABA、SA、乙烯利(Eth)、GA 和氧化逆境(甲基紫精 MV)处理。从图 5 中可以看出,在脱水处理 M82 植株的情况下,在 1 h 时 *WRKY41* 的表达迅速提高,表达量比未处理的植株提高了近 150 倍,但在 4h 后基因表达迅速下降到原来未经诱导之前的水平,无明显的上调表达趋势;在野生抗旱番茄品种潘那利中,*WRKY41* 一直处于比较高的上调表达水平;这些结果说明,无论是野

生种还是普通栽培品种中,在脱水的情况下,WRKY41 均能够被诱导表达,并且在潘那利中能够稳定地提高表达.在 ABA 处理下,在 M82 和潘那利中,WRKY41 都呈现上调表达趋势,表达模式基本相同,都在 12 h 时表达量达到最高.在 SA 处理下,在 M82 和潘那利中,WRKY41 基因的表达模式也基本一致,呈负调控表达趋势,在 M82 中 6 h 时基因显著下调表达(<2 倍),但在潘那利处理 1 h 时,基因达到了显著的下调表达,说明基因在潘那利中对 SA 响应比较快.乙烯利和 GA 处理 M82 时,WRKY41 基因的表达没有显著的差异,但是在处理潘那利的过程中,在刚开始处理 1 h 后,基因迅速的被抑制表达(>5 倍),而且在 GA 处理 24 h 后,基因还是处于被抑制表达的状态,这说明 WRKY41 在潘那利中对乙烯和 GA 能够迅速响应,但是在 M82 中无明显变化.在氧化逆境的情况下,基因都被诱导表达,只是在 M82 中,基因在 6 h 时表达量最高,在潘那利中 12 h 时表达量最高.上述结果表明,WRKY41 能被多种逆境和调节因子的诱导表达,而且它在普通栽培番茄 M82 和野生种番茄潘那利中呈现不同的表达模式.

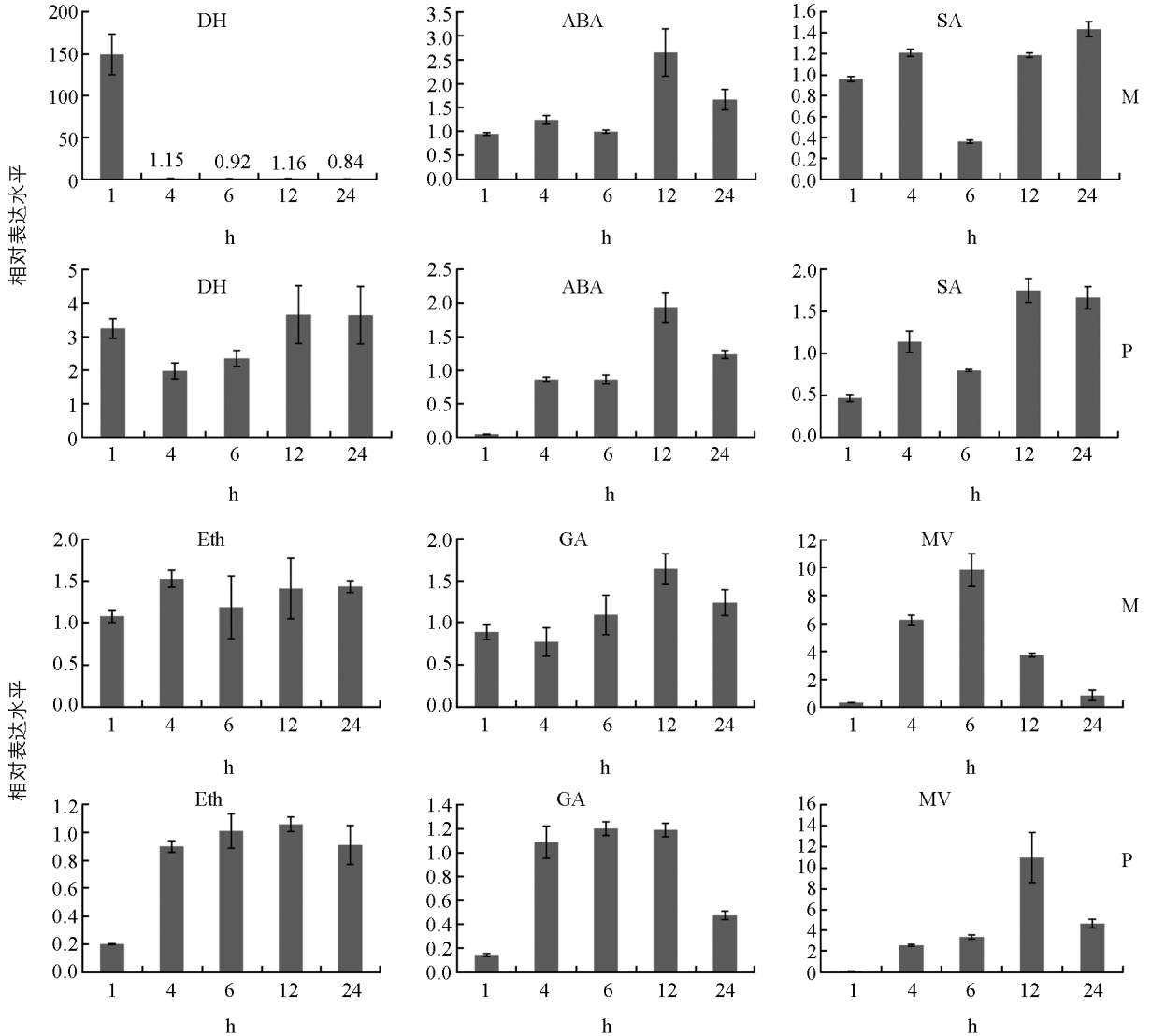


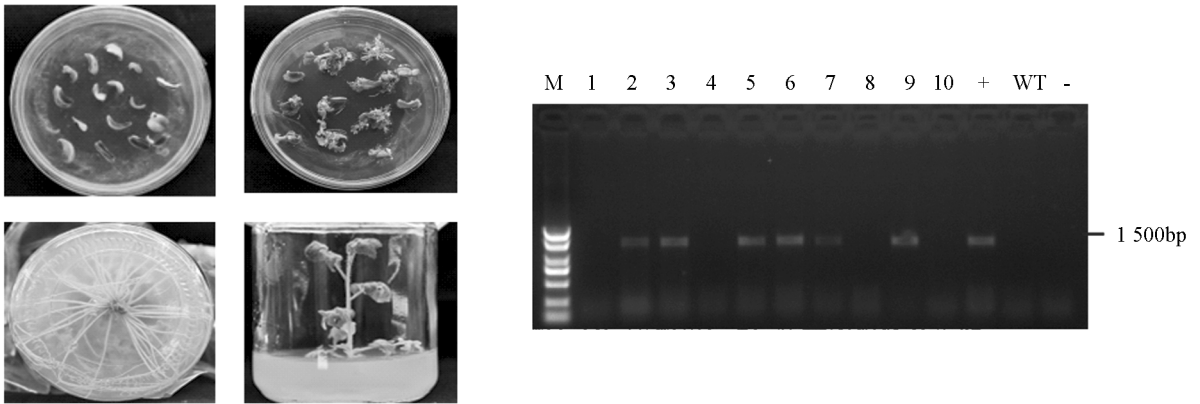
图 5 WRKY41 在逆境(干旱脱水 DH, 甲基紫精 MV)和调节因子(脱落酸 ABA、水杨酸 SA、赤霉素 GA、乙烯 Eth)的处理下,在番茄 M82 和潘那利中的表达分析

2.4 转基因植株的获得及鉴定

将潘那利番茄的 *SpWRKY41* 构建了超量表达载体,通过农杆菌介导法转化番茄栽培种 M82. 图 6 为番茄转化的几个阶段.

提取 DNA 后,以未经转化的植株为对照,利用 35S 加 WRKY41 基因反向引物对转基因植株进行 PCR 鉴定,经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,得到 PCR 扩增出 1 500 bp 左右的目标条带(图 6),10 株番茄抗性组培

苗中有 6 株获得了预期大小的目标条带, 表明目的基因 *S_pWRKY41* 已整合到番茄基因组中.



M: BM2000; +: 阳性对照(质粒); WT: 野生型植株; -: 阴性对照(水).

图 6 转基因植株的获得与鉴定

3 讨 论

WRKY 转录因子广泛存在于植物中, 大多数是受外界环境的激发而诱导表达, 参与植物生物与非生物胁迫应答反应、植物衰老以及果实发育等一系列生理活动^[21]. 在本研究中, 我们从普通栽培番茄品种 M82 和野生耐旱番茄潘那利中分别克隆得到了一个 *WRKY* 基因 *WRKY41*, 命名为 *S_tWRKY41* 和 *S_pWRKY41* (图 1), 这个基因具有典型的 *WRKY* 结构域和 *CX₇CX₂₃HX₁C* 锌指结构域, 这和前人的报道一致^[4]. 进一步分析发现, 来自栽培种和野生种番茄的 *WRKY* 在核苷酸序列上是不一样的, 核苷酸序列的变异造成 5 个氨基酸的差异(图 2), 这些氨基酸的差异可能会导致蛋白与蛋白之间的相互作用, 从而导致不同近缘种之间的功能差异^[22], 这些变异可能是植物在长期的进化过程中造成的.

进化分析表明, *WRKY41* 属于第 III 类 *WRKY* 转录因子, 这类转录因子是高等植物所特有的^[23], 响应多种逆境和调节因子. 有研究证明, 拟南芥基因 *AtWRKY18* 经过 2 mmol/L SA 处理 3h 后能快速被诱导表达, 此时 mRNA 积累达到高峰^[24]. 王彦华等研究表明, 白菜中获得的 *WRKY1* 基因的 cDNA 片段, 在 2 mmol/L SA 处理 4h 后被快速诱导表达^[25]. Ryu 等在研究中发现水稻中的 *OsWRKY45* 和 *OsWRKY62* 在 SA 处理 12 h 后表达量增加^[26]; 厚叶悬菟苣苔的 *WRKY* 基因 *BcWRKY1* 在 2 mmol/L 的 SA 处理 8 h 后才被诱导表达, 但在 24 h 后, 表达量降低. 同样, *BcWRKY1* 可在 JA 和 ABA 处理后被诱导表达^[27]; 喷洒乙烯利 8 h 后葡萄的 *VvWRKY1* 表达量显著增高, 而经过 SA 处理后 2 h 才开始表达, 但在 4 h 和 8 h 后达到最大值^[28]. 我们从前期干旱芯片中分离出来的这个 *WRKY* 基因, 经过验证确实受到干旱脱水的诱导表达, 并且在栽培番茄品种 M82 和野生番茄潘那利中表达模式存在差异(图 5), 在 M82 中, 基因处理 1 h 后表达迅速提高, 但在 1 h 后一直到 24 h, 基因表达量降低或很难检测到其表达, 可能是干旱脱水后, M82 植株迅速萎焉, 基因不表达或表达量非常低, 但是在潘那利中, *WRKY41* 一直稳定上调表达, 因为潘那利在干旱脱水的情况下, 不会迅速萎焉, 推测潘那利之所以抗旱, 可能是因为很多抗旱相关基因一直稳定表达所造成的. 植物在非生物逆境发生时, 自身会生成超氧自由基, 并产生氧化逆境, 在氧化逆境处理中, *WRKY41* 基因在两个番茄材料中都被诱导表达. 同样, 在 ABA 诱导下, *WRKY41* 在两个番茄材料中也被诱导表达, 表达模式基本一致. 但在 SA、Eth 和 GA 的处理下, 潘那利番茄中的 *WRKY41* 在 1 h 时便迅速响应而下调表达; 而在 M82 中, 该基因在 Eth 和 GA 诱导下, 无差异表达, 在 SA 诱导下的 6 h 时才响应并下调表达, 这些都说明在潘那利中, *WRKY41* 能迅速响应表达来适应不利的环境. 这说明在野生种中, 抗逆基因是通过迅速响应不利环境信号来表达的, 这个可能在植物抗逆中有着重要的意义.

栽培种番茄经过长期的环境条件以及人工的选择, 导致很多重要的抗旱性状遗传基因的等位变异和丢失, 造成育种的遗传资源匮乏, 也容易出现“平台效应”. 有些番茄的野生种由于长期生长在高山、沙漠等极端恶劣的环境中, 经过环境的变化与自身的适应性, 会使其携带一些抗性基因, 因此, 利用野生抗逆基因及优异的等位变异, 是加速番茄抗逆育种的关键. 采用传统的有性杂交育种方式, 可以转育野生种的抗性

基因到栽培番茄中,但由于连锁累赘问题,通常也会带入一些野生种的不利性状.目前,通过转基因的方法提高植物的抗逆性是最有效的方法之一,我们可以通过分析野生种和栽培种之间重要基因的结构和表达差异,再将来自野生种的基因转化到普通栽培番茄,这将是改良番茄植株的一个有效的方法,本研究已经将来自于潘那利的基因 SpWRKY41 通过转基因的方法转化到 M82 中,后期将对其进行功能分析,确定基因功能,改良番茄抗旱性.

参考文献:

- [1] 郝中娜,陶荣祥. WRKY 转录因子超家族的研究 [J]. 生命科学, 2006, 18(2): 175—179.
- [2] ISHIGURO S, NAKAMURA K. Characterization of a cDNA Encoding a Novel DNA-Binding Protein, SPF1, That Recognizes SP8 Sequences in the 5' Upstream Regions of Genes Coding for Sporamin and Beta-Amylase from Sweet Potato [J]. Mol Gen Genet, 1994, 244(6): 563—571.
- [3] WU K L, GUO Z J, WANG H H, et al. The WRKY Family of Transcription Factors in Rice and Arabidopsis and Their Origins [J]. DNA Res, 2005, 12(1) 12: 9—26.
- [4] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY Superfamily of Plant Transcription Factors [J]. Trends Plant Sci, 2000, 5(5): 199—206.
- [5] 苏琦,尚宇航,杜密英,等. 植物 WRKY 转录因子研究进展 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 94—98.
- [6] EULGEM T, SOMSSICH I E. Networks of WRKY Transcription Factors in Defense Signaling. Curr Opin Plant Biol, 2007, 10(4): 366—371.
- [7] SCHMUTZ J, CANNON S B, SCHLUETER J, et al. Genome Sequence of the Palaeopolyploid Soybean [J]. Nature, 2010, 463(7278): 178—183.
- [8] 万红建,俞 鏊,袁 伟,等. 番茄 WRKY 转录因子 in silico 鉴定及表达分析 [J]. 分子植物育种, 2013, 11(1): 90—98.
- [9] DANG F F, WANG Y N, YU L, et al. CaWRKY40, a WRKY Protein of Pepper, Plays an Important Role in the Regulation of Tolerance to Heat Stress and Resistance to Ralstonia Solanacearum Infection [J]. Plant Cell Environment, 2013, 36(4): 757—774.
- [10] KIM KC, LAI Z, FAN B, et al. Arabidopsis WRKY38 and WRKY62 Transcription Factors Interact with Histone Deacetylase 19 in Basal Defense [J]. Plant Cell, 2008, 20(9): 2357—2371.
- [11] DANG F, WANG Y, SHE J, et al. Overexpression of CaWRKY27, a Subgroup IIe WRKY Transcription Factor of Capsicum Annum, Positively Regulates Tobacco Resistance to Ralstonia Solanacearum Infection [J]. Physiol Plant, 2014, 150(3): 397—411.
- [12] JIANG Y, LIANG G, YU D. Activated Expression of WRKY57 Confers Drought Tolerance in Arabidopsis [J]. Mol Plant, 2012, 5(6): 1375—1388.
- [13] WANG X, ZENG J, LI Y, et al. Expression of TaWRKY44, a Wheat WRKY Gene, in Transgenic Tobacco Confers Multiple Abiotic Stress Tolerances [J]. Front Plant Sci, 2015(6): 615.
- [14] ZHOU L, WANG N N, GONG S Y, et al. Overexpression of a Cotton (Gossypium Hirsutum) WRKY Gene, GhWRKY34, in Arabidopsis Enhances Salt-Tolerance of the Transgenic Plants [J]. Plant Physiol Biochem, 2015(96): 311—320.
- [15] LIU X, SONG Y, XING F, et al. GhWRKY25, a Group I WRKY Gene from Cotton, Confers Differential Tolerance to Abiotic and Biotic Stresses in Transgenic Nicotiana Benthamiana [J]. Protoplasma, 2016, 253(5): 1265—1281.
- [16] 孙 凡,赵靖明,姚小华,等. 水分胁迫逆境处理对水土保持经济树种长山核桃的生理特性的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(4): 1—7.
- [17] 曹岩坡,代 鹏,戴素英. 盐胁迫对芦笋幼苗生长和体内 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^+ 分布的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(10): 31—36.
- [18] GONG P, ZHANG J, LI H, et al. Transcriptional Profiles of Drought-Responsive Genes in Modulating Transcription Signal Transduction, and Biochemical Pathways in Tomato [J]. J Exp Bot, 2010, 61(13): 3563—3575.
- [19] RICK C M. Potential Genetic Resources in Tomato Species: Clues from Observations in Native Habitats [J]. Basic Life Sci, 1973(2): 255—269.
- [20] 欧阳波. 几种病程相关蛋白基因转化番茄的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2002.
- [21] BANERJEE A, ROYCHOUDHURY A. WRKY Proteins: Signaling and Regulation of Expression During Abiotic Stress Responses [J]. The Scientific World Journal, 2015: 807560. doi: 10.1155/2015/807560.

- [22] MA Y, SLEWINSKI T L, BAKER R F, BRAUN D M. Tie-Dyed1 Encodes a Novel, Phloem-Expressed Transmembrane Protein That Functions in Carbohydrate Partitioning [J]. *Plant Physiol*, 2009, 149(1): 181–194.
- [23] 李淑敏, 茆振川, 李 蕾, 等. 辣椒抗根结线虫相关 WRKY 基因的分离 [J]. *园艺学报*, 2008, 35(10): 1467–1472.
- [24] CHEN C, CHEN Z. Potentiation of Developmentally Regulated Plant Defense Response by AtWRKY18, a Pathogen-Induced Arabidopsis Transcription Factor. *Plant Physiol* [J]. 2002, 129(2): 706–716.
- [25] 王彦华, 侯喜林, 申书兴. 白菜 WRKY 转录因子 cDNA 全长的克隆及分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2007, 15(5): 810–815.
- [26] RYU H S, HAN M, LEE S K, et al. A Comprehensive Expression Analysis of the WRKY Gene Superfamily in Rice Plants During Defense Response [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(8): 836–847.
- [27] 刘戈宇, 胡鸢雷, 赵 锋, 等. 厚叶悬菟苣苔 BcWRKY1 转录因子基因的克隆及初步的功能分析 [J]. *北京大学学报(自然科学版)*, 2007, 43(4): 446–452.
- [28] MARCHIVE C, MZID R, DELUC L, et al. Isolation and Characterization of a Vitis Vinifera Transcription Factor, VvWRKY1, and Its Effect on Responses to Fungal Pathogens in Transgenic Tobacco Plants [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(8): 1999–2010.

Cloning and Expression Analysis of a WRKY41 Gene in Tomato and Its Transfer into a Tomato Cultivar

WEI Juan-juan, YANG Wei, PAN Yu,
ZHANG Xing-guo, LI Jin-hua

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwestern University/Key Laboratory of Horticultural Science in Southern Mountainous Region, Chongqing 400715, China

Abstract: Based on the results of microarray transcriptional analysis, a full-length cDNA sequence of the WRKY gene from M82, a cultivar of *Solanum lycopersicum*, and from the wild species *S. pennellii* LA0716 by RT-PCR, which were named as *SlWRKY41* and *SpWRKY41*, respectively. Sequence analysis showed that *SlWRKY41* and *SpWRKY41* gene contained a 1 011-bp open reading frame (ORF) encoding 336 amino acids. As the typical structure features of the WRKY family, a 5'-N WRKYGQK domain and a central zinc finger region CX₇CX₂₃HX₁C were identified in the amino acid sequence of WRKY41 protein. The deduced *SlWRKY41* and *SpWRKY41* protein was found to be highly homologous to the WRKY proteins from many other plants, and these two putative amino acids shared 97.62% similarity, differing only in five residues. Phylogenetic tree analysis indicated that WRKY41 fell into Group III, which is unique to plants. The real-time PCR results suggested that the WRKY41 gene showed differential expression patterns in M82 and LA0716 not only in different tissues and organs but also in various stress or regulator treatments. Interestingly, *SpWRKY41* was responded very quickly by SA, GA and Eth. It is conjectured that *SpWRKY41* may play a crucial role in resistance to abiotic stress and is a good candidate gene for improving stress-resistance of cultivated tomato. Furthermore, an overexpression vector was constructed, which then successfully transferred *SpWRKY41* to tomato M82 to enhance its abiotic tolerance.

Key words: *Solanum lycopersicum*; wild species *S. pennellii*; WRKY41; expression pattern; drought resistance

