

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2023)05-0385-12

遗传育种

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2023.05.001

马铃薯 *StWRKY57* 基因的生物信息学分析及亚细胞定位思星如¹, 陈 馨¹, 魏 涵^{2,3}, 司怀军^{1,2}, 张 宁^{1,2*}

(1. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 省部共建干旱生境作物学国家重点实验室/甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070)

摘 要: WRKY 转录因子对于植物抗逆境胁迫具有重要作用, 根据先前进行的转录组测序分析, 发现 *StWRKY57* 在干旱和盐胁迫条件下被诱导上调表达。以马铃薯 *StWRKY57* 为研究对象, 进行生物信息学分析、表达分析和亚细胞定位, 利用 qRT-PCR 技术分析其组织特异性和非生物胁迫下的表达情况。 *StWRKY57* 基因位于马铃薯第 8 号染色体上, CDS 区长 762 bp, 属于疏水性非跨膜蛋白; 同源性分析显示该蛋白与潘那利番茄 *SpWRKY40* 的同源性最高; 其启动子区包含光响应元件、胚乳表达、参与昼夜节律和激素响应等相关的顺式作用元件; qRT-PCR 分析显示该基因在叶中表达量最高, 在 200 mmol/L NaCl、20% PEG 6000 和 100 μ mol/L 脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 处理下, 均上调表达; 亚细胞定位显示该蛋白定位于细胞核中。该研究为马铃薯 *StWRKY57* 基因之后的试验提供了理论依据。

关键词: 马铃薯; *StWRKY57*; 生物信息学分析; 表达分析; 亚细胞定位

Bio-informatics Analysis and Sub-cellular Localization of the *StWRKY57* Gene in PotatoSI Xingru¹, CHEN Xin¹, WEI Han^{2,3}, SI Huaijun^{1,2}, ZHANG Ning^{1,2*}

(1. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. State Key Laboratory of Aridland Crop Science/Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: WRKY transcription factors play important roles in plant stress resistance. According to the previous transcriptome sequencing analysis, it was found that *StWRKY57* gene could up-regulate its expression under both drought and salt stress conditions. In this study, potato *StWRKY57* gene was studied for bio-informatics analysis, expression analysis and sub-cellular localization. qRT-PCR technology was used to analyze its tissue-specific and abiotic stress expression. *StWRKY57* gene is positioned on the chromosome 8 of potato, featuring a 762 bp coding sequence (CDS) region, and encoding a hydrophobic non-trans-membrane protein. Homology analysis showed that the protein had the highest homology with *SpWRKY40* of *Solanum pennellii*. The promoter region contains *cis*-acting elements related to photo response, endosperm expression, circadian rhythm and hormone response. qRT-PCR analysis showed that the expression of the gene was the highest in leaves, and the expression was up-regulated in 200 mmol/L NaCl, 20% PEG

收稿日期: 2023-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960444); 甘肃省科技重大专项计划(GZGG-2021-6)。

作者简介: 思星如(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向为马铃薯生物技术。

*通信作者(Corresponding author): 张宁, 博士, 教授, 主要从事马铃薯遗传育种研究, E-mail: ningzh@gsau.edu.cn。

6000 solution and 100 $\mu\text{mol/L}$ abscisic acid (ABA) treatment. The protein's sub-cellular localization assay reveals its presence within the cell nucleus. This study could provide a theoretical basis for the subsequent experiments.

Key Words: potato; *StWRKY57*; bio-informatics analysis; expression analysis; sub-cellular localization

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是茄科茄属的一年生草本植物,是继玉米、水稻和小麦之后的第四大粮食作物^[1,2]。马铃薯喜冷凉干燥气候,因其适应性广,耐贫瘠能力强,被广泛种植。干旱胁迫作为一种重要的非生物胁迫,能够对马铃薯的生长和生理代谢产生影响,影响程度与干旱胁迫的严重程度有关。干旱胁迫可以导致马铃薯生长受到抑制、光合作用效率降低、膜系统损伤、物质能量代谢失调,严重影响马铃薯的产量和块茎品质^[3]。

转录因子(Transcription factors, TFs)又名反式作用因子,可与顺势作用元件特异性结合,以确保目的基因以特定的强度在特定的时间与空间表达的蛋白质分子^[4]。转录因子结构通常由4个功能区组成^[5]。研究最多的DNA结合域有NAC结构域(NAC Apical Meristem)^[6]、WRKY结构域^[7]、AP2/EREBP结构域(APETALA2/ethylene-responsive element binding proteins)等^[8-16]。WRKY转录因子作为植物中较大的一类转录因子家族,自第一个WRKY转录因子家族成员SPF1(SWEET POTATO FACTOR1)从甘薯(*Ipomoea batatas* L.)中分离出来后^[17],其家族成员已在多个物种中得到鉴定,包含拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)^[18]、大豆(*Glycine max* L.)^[19]、黄瓜(*Cucumis sativus* L.)^[20]、番茄(*Solanum lycopersicum* L.)^[21]、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)^[22]、玉米(*Zea mays* L.)^[23]、水稻(*Oryza sativa* L.)^[24]、油菜(*Brassica napus* L.)^[25]和马铃薯^[26]等。大约60个氨基酸组成WRKY结构域^[27],且其N端具有与靶基因启动子序列中的W-box(TTGACC/T)特异性识别并结合的高度保守的WRKYGQK核心序列,进而激活或抑制下游基因的转录表达^[28];在C端则存在C₂H₂(C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H)或C₂HC(C-X₇-C-X₂₃-H-X₁-C)型的锌指类似结构。

WRKY转录因子家族在植物生长发育、叶片衰老、信号转导、新陈代谢、生物胁迫及非生物胁迫等过程中发挥重要作用。如苹果(*Malus domestica* B.)

*MdWRKY18*和*MdWRKY40*基因受盐胁迫的诱导,能和自身互作形成同源二聚体或相互互作形成异源二聚体,从而增强愈伤对盐胁迫的耐性^[29]。大豆*GmWRKY21*基因异源转化拟南芥发现转基因拟南芥抗冷胁迫能力增强^[30]。许多研究发现WRKY转录因子在植物激素方面也发挥着重要作用。如Dong等^[31]研究了72个WRKY DNA结合转录因子的蛋白质基因,分析显示其中有49个在被水杨酸(Salicylic acid, SA)处理拟南芥后发生了明显变化。在拟南芥中,*AtWRKY57*基因的激活表达可以通过提高脱落酸(Abscissic acid, ABA)水平来改善拟南芥的耐旱性^[32];拟南芥*AtWRKY53*基因对干旱胁迫高度敏感,是通过降低H₂O₂的含量抑制气孔关闭,通过促进淀粉降解促进气孔打开,从而提高植物耐受性^[33]。在番茄中,*SlWRKY37*基因和*SlMYC2*基因的表达水平受茉莉酸甲酯(Methyl jasmonate, MeJA)和暗处理的诱导^[34]。旋蒴苣苔(*Boea hygrometrica* L.)*BhWRKY1*基因通过调节*BhGOLS1*基因的表达来调控干旱胁迫^[35]。小麦(*Triticum aestivum* L.)*TaWRKY75-A*在拟南芥中异源表达,可能通过调节茉莉酸(Jasmonic acid, JA)生物合成途径或其他途径,增强了干旱和耐盐性^[36]。二穗短柄草(*Brachypodium distachyon* L.)*BdWRKY36*基因过表达转基因烟草通过控制活性氧(Reactive oxygen species, ROS)平衡和调节压力相关基因的转录来增加干旱胁迫耐受性^[37]。过表达*TaWRKY2*基因的拟南芥表现出对盐和干旱的耐受性;过表达*TaWRKY19*基因增强植物抗盐、干旱和冷胁迫的能力,同时*TaWRKY2*与*STZ*和*RD29B*、*TaWRKY19*与*DREB2A*和*Cor6.6*的启动子结合来直接或间接调节下游基因从而增强植物抗非生物胁迫的能力^[38]。在番茄中,*SlWRKY23*基因在盐胁迫处理下其基因表达水平升高,在拟南芥中过表达*SlWRKY23*增强了其对盐胁迫的耐受性,影响其侧根生长^[39]。

根据先前转录组测序结果及Zhang等^[26]的研

究, 在干旱和盐胁迫条件下, *StWRKY57* 基因的表达是上调的。*StWRKY57* 基因属于 WRKY 转录因子 II a 亚组, 与同一亚组中的 *AtWRKY40* 基因相似, 在 ABA、盐和干旱等环境胁迫下, *StWRKY57* 基因也会上调表达。类似地, 大豆和烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 中 II a 亚组 WRKY 基因也能响应环境胁迫^[40]。苹果 II a 亚组 *MdWRKY30* 基因在拟南芥中过表达后, 通过对相关基因的转录调控, 增强其对盐胁迫的耐受性^[41]。本研究则对马铃薯中的 *StWRKY57* 基因进行了生物信息学分析和组织特异性表达分析, 通过进行亚细胞定位确定了 *StWRKY57* 蛋白在烟草细胞中的定位。为后续进一步研究 *StWRKY57* 基因的功能和调控途径提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料

马铃薯品种 ‘Atlantic’ 的试管苗和普通本氏烟草。

1.1.2 菌株及载体

大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101、载体 pEGFP 均由甘肃农业大学生命科学技术学院实验室保存。

1.1.3 主要试剂及培养基

硫酸卡那霉素 (Kanamycin sulfate, Kan)、利福平 (Rifampicin, Rif)、2-吗啉乙磺酸 (2-morpholine ethyl sulfonic acid, MES)、乙酰丁香酮 (Acetosyringone, ACE)、氯化镁 (MgCl₂) 均购自索莱宝科技有限公

司; KOD One™ PCR Master Mix 购自东洋纺生物科技有限公司, 限制性核酸内切酶 Xba I 购自 TaKaRa 公司; 同源重组酶 Uniclone Seamless Cloning Mix 购自北京金沙生物科技有限公司; 实时荧光定量试剂盒 SYBR® Green Premix Pro Taq HS 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司; RNA 提取试剂盒、第一链 cDNA 合成试剂盒购自塞维尔生物科技有限公司, 普通琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒购自天根生化科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 植物材料处理

将烟草种子放置于含 3% MS 固体培养基的培养皿中, 置于温度 (23 $\pm$ 2) °C、光照周期 16/8 h、光照强度 2 000 lx 下培养, 直至芽长为 2 cm 后种植在营养土中并于相同条件下生长, 用于后续试验。

将马铃薯品种 ‘Atlantic’ 试管苗种植至花盆中培养 (培养条件与烟草一致)。待植株长至 30 d 左右, 选取长势一致的植株进行 20% PEG 6000^[42]、200 mmol/L NaCl^[43]、100 μ mol/L ABA^[44] 处理。取样时间为 0, 3, 6, 12, 24 h, 随机采取植株顶端的第 1~3 片叶子, 每组 3 次重复; 待其结薯后, 采集其根、叶柄、茎、匍匐茎、块茎、叶和芽, 采集的样品于液氮速冻后存于 -80 °C 冰箱待用。

1.2.2 *StWRKY57* 基因的生物信息学分析

利用表 1 中的在线网址及软件, 对马铃薯 *StWRKY57* 基因 (GenBank accession No. XM_015315318.1) 进行生物信息学分析。

表 1 生物信息学分析软件
Table 1 Softwares of bioinformatics analysis

工具 Tool	网址/软件 URL/Software	功能 Function
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	获取基因
ProtParam	https://expasy.org/tools/protparam.html	基本理化性质分析
Gene Structure Dispal Server	http://gsds.gao-lab.org/	基因结构分析
ProtScale	http://ca.expasy.org/tools/protscale.html	蛋白质疏水性分析
TMHMMServer v.2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/	氨基酸跨膜结构分析
MEGA7.0	https://www.megasoftware.net/	系统发育树构建
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html	二级结构
SWISS-MODEL	http://swissmodel.expasy.org/	三级结构
PlantCARE	https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/	顺式作用元件预测

1.2.3 *StWRKY57* 基因的表达分析及组织特异性分析

利用网站 Primer3Plus 设计 qRT-PCR 特异性引物(表 2)。用马铃薯 *Eflα* 作为内参基因^[45]。反应体系和反应条件参考王霄等^[46]。基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算^[47]。

表 2 qRT-PCR 特异性引物
Table 2 qRT-PCR specific primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
<i>StWRKY57</i> -F	ATCACCAAAGAGGCCAAGGG
<i>StWRKY57</i> -R	TGGGCATGTTGGTGCAAATG
<i>Eflα</i> -F	GATGGTCAGACCCGTGAACA
<i>Eflα</i> -R	CCTTGGAGTACTTCGGGGTG

1.2.4 马铃薯 RNA 的提取与 cDNA 链的合成

取马铃薯品种 ‘Atlantic’ 的试管苗, Trizol 法提取 RNA, 将提取的总 RNA 在超微紫外分光光度计下测其浓度, 然后使用 TIANGEN 公司的 cDNA 第一链 cDNA 合成试剂盒反转录, 具体操作根据产品说明书进行。

1.2.5 *StWRKY57* 基因亚细胞定位载体的构建

在 NCBI 中得到马铃薯 *StWRKY57* 基因。根据 pEGFP 载体序列和基因序列, 使用 TaKaRa 在线引物软件设计特异性引物扩增无终止子基因 CDS 序列, 引物序列为: *StWRKY57*-EGFP-F ggtaccgccggg atcctctagaATGGGAAACAAGTCTTTTTTTTATTGA 和 *StWRKY57*-EGFP-R getcaccatgtcgactctagaAAAAAG TAATCCTGAGATGGCTGTAG(小写字母为同源臂)。

选用马铃薯品种 ‘Atlantic’ 反转录得到的 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μ L KOD One™ PCR Master Mix、1.5 μ L F/R、3 μ L cDNA、19 μ L ddH₂O, 共 50 μ L; 反应条件为 95℃ 预变性 3 min, 以 98℃ 变性 10 s、62℃ 退火 5 s、

68℃ 延伸 10 s 为循环, 共 30 个、72℃ 终延伸 5 min、4℃ 保温。

用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收(按照 TIANGEN 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书操作)送往金唯智公司测序。将上述回收产物采用同源重组法构建亚细胞定位重组载体, 按 TIANGEN 质粒小提试剂盒说明书提取表达载体 pEGFP 的质粒并酶切后回收, 酶切反应体系为: 2 μ L *Xba* I、2 μ L 10 $\times$ Buffer、8 μ L Plasmid DNA (100 ng/ μ L)、8 μ L ddH₂O 共 20 μ L 的体系。重组反应体系 5 μ L 2 $\times$ Uniclone Seamless Cloning Mix、3 μ L 线性化载体、2 μ L 插入片段共 10 μ L 的体系。将以上重组体系加入后, 吸打混匀且短暂离心, 50℃ 反应 15 min, 置冰上冷却, 转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 具体操作参考王芳芳^[45]的方法。后选取阳性克隆的菌液测序, 并提取质粒进行酶切鉴定。

1.2.6 农杆菌转化烟草及荧光观察

将构建好的 pEGFP-*StWRKY57* 质粒转化感受态农杆菌, 具体操作参考王芳芳^[45]。用制备好的含有重组载体和空载体农杆菌菌液作为浸染液, 后用注射器注射入(5~6 周)烟草的叶片中, 暗培养 2 d。将浸染后的烟草叶片用激光共聚焦扫描电子显微镜在 488 nm 激光波长下观察, 确定其表达位置。

1.3 数据处理

采用 Excel 2023 及 IBM SPASS 26 软件进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 *StWRKY57* 基因的生物信息学分析

2.1.1 *StWRKY57* 基因结构分析

在 NCBI 网站中获得该基因, 显示其定位于马铃薯第 8 号染色体上, CDS 区长 762 bp, 锌指结构为 C₂H₂, 属于 WRKY 转录因子的 II a 亚组(图 1)。



图 1 *StWRKY57* 基因结构分析
Figure 1 Analysis of gene structure of *StWRKY57*

2.1.2 *StWRKY57* 蛋白质特性

使用在线软件ProtParam对马铃薯 *StWRKY57* 所编码的蛋白理化性质分析。根据分析结果, *StWRKY57* 编码的蛋白由 253 个氨基酸组成, 相对分子量为 28.72 kU, 理论等电点为 8.84。该蛋白总共含有 28 个负电荷残基 (Asp + Glu) 和 33 个正电荷残基 (Arg + Lys), 分子式为 $C_{1259}H_{2015}N_{353}O_{396}S_9$ 。该蛋白的不稳定系数为 57.47, 脂肪系数为 75.53, 总平均亲水性为 -0.653, 表明该蛋白具有疏水性。通过在线软件TMHMM对蛋白的跨膜区域进行分析, 发现 *StWRKY57* 蛋白不含有跨膜区域, 属于非跨膜蛋白。

2.1.3 *StWRKY57* 编码蛋白同源性分析

与潘那利番茄 (*Solanum pennellii*) 的 *SpWRKY40* 编码的蛋白相比, *StWRKY57* 编码的蛋白与其具有

95.3% 的同源性, 与番茄 *SlWRKY40* 同源性达到 94.5%, 而与马铃薯 *StWRKY40* 蛋白的同源性为 77.4% (图 2)。

2.1.4 *StWRKY57* 蛋白二、三级结构分析

StWRKY57 基因编码蛋白的二级结构和三级结构, 分别用SOPMA和SWISS-MODEL预测。根据结果 (图 3 和图 4) 发现, 该蛋白含有 α -螺旋、 β -转角、无规卷曲、延伸链 4 种, 分别有 76 个占 30.04%、5 个占 1.98%、144 个占 56.92%、28 个占 11.07%。

2.1.5 顺式作用元件分析

马铃薯 *StWRKY57* 基因启动子区, 上游 2 000 bp 序列利用 Plant-CARE 网站分析, 结果表明该基因启动子区包含光响应元件、胚乳表达、参与昼夜节律和激素响应等相关的顺式作用元件 (表 3)。其中 MeJA 和 ABA 激素类元件较多。

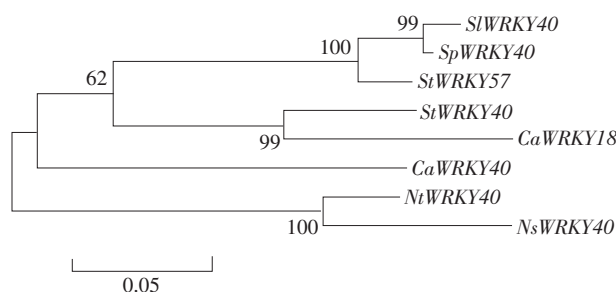


图 2 马铃薯 *StWRKY57* 蛋白的系统进化树分析

Figure 2 Analysis of the evolutionary relationship depicted by the phylogenetic tree of *StWRKY57* protein in potato

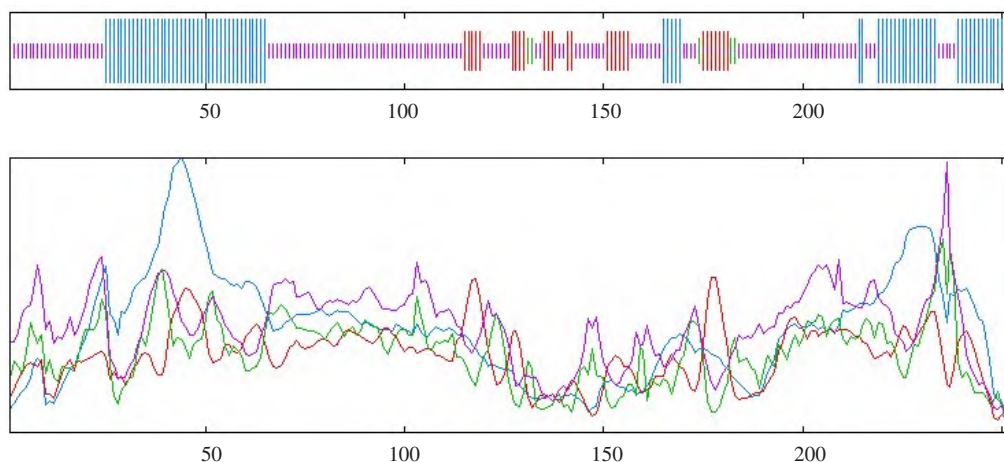


图 3 *StWRKY57* 基因编码蛋白二级结构

Figure 3 *StWRKY57* gene encodes the secondary structure of protein



图 4 *StWRKY57* 基因编码蛋白三级结构
Figure 4 *StWRKY57* gene encodes the tertiary structure of protein

表 3 *StWRKY57* 基因启动子区顺式作用元件预测
Table 3 Forecasting cis-acting elements present in the promoter region of *StWRKY57*

名称 Name	序列 Sequence	数量 Number	功能 Function
ABRE	GACACGTGGC/ CACGTG/ GCAACGTGTC/ ACGTG	4	Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
CGTCA-motif	CGTCA	3	Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
GCN4-motif	TGAGTCA	2	Cis-regulatory element involved in endosperm expression
GT1-motif	GGTTAA/ GGTAAAT	2	Light responsive element
MRE	AACCTAA	1	MYB binding site involved in light responsiveness
MYB	CAACCA/TAACCA	4	Homeopathic factors involved in ABA reactivity
MYC	CATTTG/CATGTG	3	Core regulatory factors involved in JA signal transduction pathway
P-box	CCTTTTG	1	Gibberellin-responsive element
TCA-element	TCAGAAGAGG	1	Cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness
TCT-motif	TCTTAC	1	Part of a light responsive element
TGACG-motif	TGACG	3	Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
TGA-box	TGACGTAA	1	Part of an auxin-responsive element
circadian	CAAAGATATC	1	Cis-acting regulatory element involved in circadian control

2.2 *StWRKY57* 基因表达分析及组织特异性分析

取不同时间段用 200 mmol/L NaCl、20% PEG 6000 和 100 μmol/L ABA 处理的马铃薯品种‘Atlantic’，用 qRT-PCR 技术将提取的 RNA 且反转录为 cDNA 的产物进行检测，并测定其基因表达量。结果(图 5)表明，该基因在盐胁迫下上调表达；在 20% PEG 6000 处理下，其表达量呈先上升后下降再上升的趋势，且在 24 h 时表达量最高，是对照组(0 h)的 6.1 倍；在 ABA 处理下，其基因表达量呈先上升后下降再上升的趋势，且 ABA 处理在 6 h 时其表达

量最高，为对照组(0 h)的 13.6 倍。表明马铃薯 *StWRKY57* 基因可能响应盐、干旱和 ABA 通路的非生物胁迫。

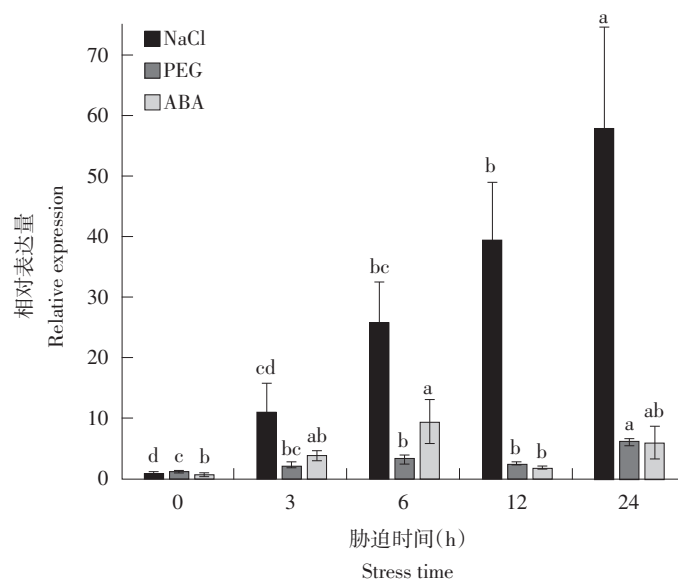
用 qRT-PCR 技术分析马铃薯 *StWRKY57* 基因在不同组织中的表达情况(图 6)，结果为此基因在叶中表达量最高，在叶柄、块茎、根、匍匐茎、茎中的表达量次之，在芽中的表达量最低。

2.3 亚细胞定位荧光观察

以 pEGFP 空载体为空白对照，通过农杆菌浸染在烟草叶片细胞中瞬时表达 pEGFP-WRKY 融合

蛋白, 使用激光共聚焦显微镜在 488 nm 激发波长下观察其表达情况。在对照组中, 烟草细胞中的 EGFP 信号在细胞膜和细胞核中可见, 而在试验组

中, pEGFP-WRKY 编码的荧光蛋白主要分布于细胞核上, 表明马铃薯 *StWRKY57* 蛋白在细胞核上表达(图7)。



注: 相同组织不同胁迫时间之间基因相对表达量差异显著 ($P < 0.05$)。不同小写字母表示差异显著, 采用邓肯法。误差线代表标准误。下同。

Note: The relative expression of genes varies significantly between different stress times in the same tissues ($P < 0.05$). Significant differences are denoted by distinct lowercase letters as tested using Duncan's multiple range method. The error bar represents standard error. The same below.

图5 非生物胁迫条件下 *StWRKY57* 基因表达量变化

Figure 5 Changes in *StWRKY57* gene expression under abiotic stress

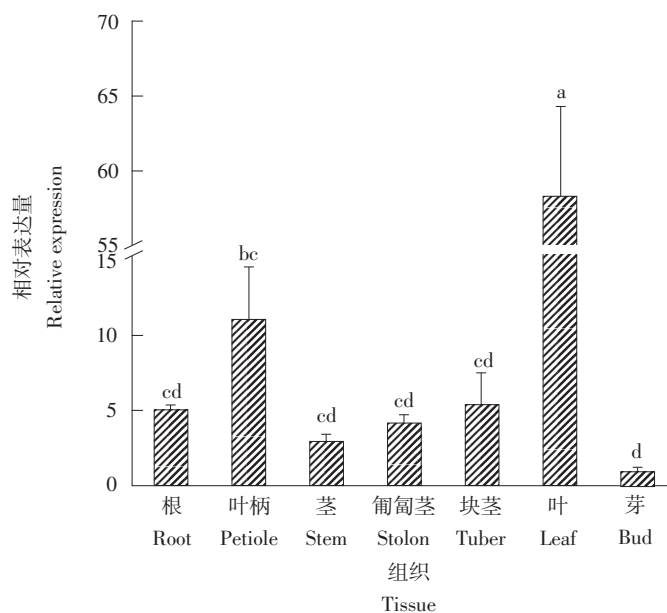
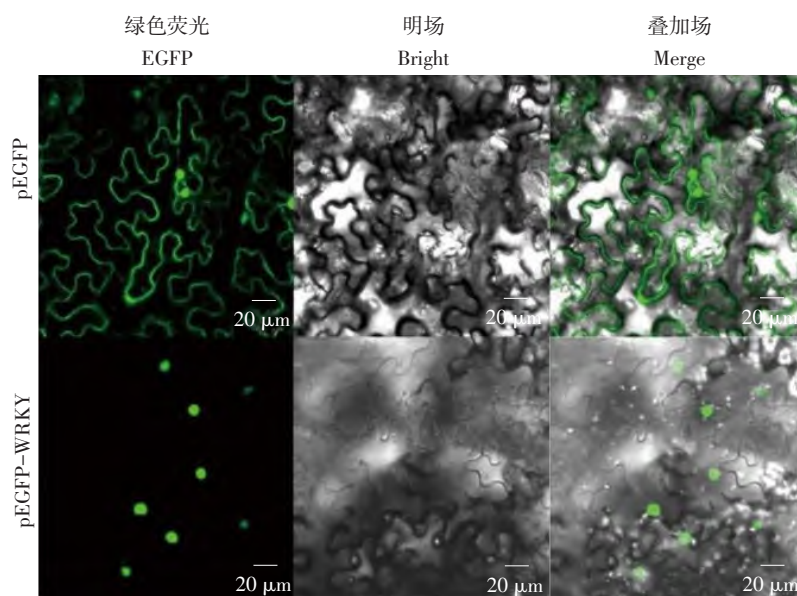


图6 *StWRKY57* 基因在马铃薯品种 'Atlantic' 的组织特异性表达分析

Figure 6 Analysis of tissue-specific expression profile of the gene *StWRKY57* in potato variety 'Atlantic'



注: pEGFP. 空白对照; pEGFP-WRKY. StWRKY57与EGFP的融合蛋白(标尺 = 20 μm)。

Note: pEGFP. Blank control; pEGFP-WRKY. Fusion protein of StWRKY57 and EGFP (bar = 20 μm).

图7 pEGFP-WRKY的亚细胞定位

Figure 7 Sub-cellular localization of pEGFP-WRKY

3 讨论

在植物中, 非生物胁迫通过抑制光合作用和释放能量的分解代谢反应来减少能量供应^[48]。干旱胁迫降低了植物的相对生长速度、干物质的量、叶面积以及产量^[49]。WRKY转录因子在甘薯中第1次被发现之后^[17], 后续研究表明, 该转录因子在植物中参与其生长发育以及非生物胁迫反应^[50-52]。

生物信息学分析显示马铃薯StWRKY57为疏水性非跨膜蛋白, 在进化程度上与潘那利番茄SpWRKY40的同源性最高, 达到95.3%。ABA可促进休眠、减少水分散失、抑制植物生长、诱导胁迫相关基因的表达等, 同时可以促进植物对胁迫环境的适应, 是植物重要的“抗逆激素”^[53]。对马铃薯StWRKY57基因启动子区顺式作用元件分析发现, 其中含有光响应元件、胚乳表达、参与昼夜节律和激素响应等相关的顺式作用元件, 这些元件可以通过结合其他转录因子或基因调控马铃薯的干旱胁迫, 其中所包含的有参与ABA反应和SA反应的顺式作用元件ABRE、TCA-element。据研究

报道, 在白桦(*Betula platyphylla* Suk L.)中BpHsfB1转录因子能与耐盐相关基因SOD、POD、P5CS和SOS启动子上的ABRE元件结合, 加强下游基因的表达, 从而提高白桦的耐盐能力^[54]。水稻中OsWRKY5直接与OsMYB2启动子区域的W-box序列结合, 抑制了OsMYB2的表达, 从而降低了ABA信号通路中OsMYB2下游基因的表达^[55]。大豆中GsWRKY20通过促进和抑制ABA的负调控以及正调控的表达介导ABA信号, 进而提高大豆GsWRKY20的干旱胁迫能力^[56]。干旱胁迫下外源MeJA处理可通过降低ABA的含量, 提高水稻幼苗的抗旱性^[57]。在紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)中, 可通过外源施用适当浓度的水杨酸增加抗氧化酶的活性并且有利于积累非酶类抗氧化物质, 进而缓解干旱胁迫所造成的细胞膜损伤; 水杨酸还可以通过促进渗透调节物质积累和调节无机离子浓度, 从而缓解干旱胁迫所造成的细胞膜损伤^[58]。综上所述, 马铃薯StWRKY57基因可能参与ABA、MeJA、SA等激素水平的调控, 从而影响马铃薯的耐干旱胁迫。因此, 在之后的研究中可以从

StWRKY57 基因的激素信号通路中进一步研究其所参与的非生物胁迫过程。

本研究通过 qRT-PCR 分析了马铃薯 *StWRKY57* 基因在叶中非生物胁迫下和在同一品种不同组织中的表达, 结果表明该基因在叶中表达量最高, 在盐、PEG 和 ABA 胁迫处理下, 均上调表达, 说明马铃薯 *StWRKY57* 基因可能响应盐、干旱和 ABA 通路的非生物胁迫。这与 Zhang 等^[26] 马铃薯 WRKY 转录因子家族响应非生物胁迫的研究结果一致。研究发现杉木 (*Cunninghamia lanceolata* L.) *ClWRKY19* 基因在叶中表达量最高, 且通过 PEG 模拟干旱和不同磷浓度处理下, 发现其受干旱胁迫诱导及随着磷浓度的增加表达量呈上升趋势^[59]。向日葵 (*Helianthus annuus* L.) *HaWRKY33* 基因在 SA、JA、ABA 胁迫处理下均有表达^[60]。玉米 *ZmWRKY114* 基因在茎和叶中的表达水平较高; 在 ABA 处理下, 其表达量上调, 在盐处理下下调, 表明其可能通过 ABA 介导的信号途径负调控水稻对盐胁迫的应答反应^[61]。通过在异源植物烟草中过表达紫穗槐 (*Amorpha fruticosa* L.) *AfWRKY42* 基因, NaCl 和 NaHCO₃ 胁迫处理后, 植株叶片明显萎蔫变黄, 说明其响应盐碱胁迫^[62]。干旱和 ABA 诱导的葡萄树 (*Vitis vinifera* L.) *VvWRKY18* 基因在拟南芥中过表达后, 可降低其干旱胁迫耐受性^[63]。过表达枇杷 (*Eriobotrya japonica* L.) *EjWRKY17* 降低了转基因拟南芥对 ABA 的敏感性, 还可通过促进 ABA 诱导的气孔关闭从而激活胁迫相关基因, 提高了转基因拟南芥的耐旱性^[64]。菊花 (*Chrysanthemum morifolium* R.) *CmWRKY10* 基因通过调节 ABA 信号通路基因的转录水平来启动转录活性, 从而正调控其对干旱胁迫的耐受性^[65]。

亚细胞定位结果表明马铃薯 *StWRKY57* 蛋白定位于细胞核中, 该结果与目前研究报道的 WRKY 转录因子大部分定位于细胞核中研究结果相似, 如水稻 *OsWRKY71* 蛋白定位在细胞核中^[66]。甘蓝型油菜 *BnaWRKY72* 作为转录因子在细胞核中发挥作用^[67]。橄榄 (*Canarium album* L.) *CaWRKY50* 属于第三类植物 WRKY 转录因子, 磷酸化分析其可能定位于细胞质中; *CaWRKY33* 蛋白可能定位于内质

网膜, 其含有由内到外和由外到内的跨膜螺旋结构^[68]。菊花 *CmWRKY10* 基因属于 II e 亚组成员, 其蛋白定位显示在细胞核中^[65]。番木瓜 (*Carica papaya* L.) *CpWRKY11* 蛋白亚细胞定位结果显示, 其定位于细胞核中^[69]。细胞核是细胞遗传与代谢的调控中心, 而基因的功能表达主要靠蛋白调控^[70], 所以亚细胞定位可以通过定位蛋白的位置, 从而确定 *StWRKY57* 基因通过细胞核参与调控植物生长发育活动, 为其之后的试验提供理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] 朱永琪. 马铃薯生长素抑制蛋白基因 *StARP1* 调控晚疫病机制分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [2] Scaramagli S, Biondi S, Leone A, et al. Acclimation to low-water potential in potato cell suspension cultures leads to changes in putrescine metabolism [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2000, 38(4): 345–351.
- [3] 王芳. 干旱胁迫对马铃薯的危害 [C]//屈冬玉, 陈伊里. 马铃薯产业与小康社会建设. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2014.
- [4] 李洁. 植物转录因子与基因调控 [J]. 生物学通报, 2004, 39(3): 9–11.
- [5] Schwechheimer C, Zourelidou M, Bevan M W. Plant transcription factor studies [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1998, 49(1): 127–150.
- [6] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(2): 79–87.
- [7] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, et al. WRKY transcription factors [J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(5): 247–258.
- [8] 赵利锋, 柴团耀. AP2/EREBP 转录因子在植物发育和胁迫应答中的作用 [J]. 植物学通报, 2008(1): 89–101.
- [9] Riechmann J L, Meyerowitz E M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors [J]. Biological Chemistry, 1998, 379: 633–646.
- [10] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2001, 4(5): 447–456.
- [11] Satoh R, Fujita Y, Nakashima K, et al. A novel subgroup of bZIP

- proteins functions as transcriptional activators in hyposmolarity-responsive expression of the *ProDH* gene in *Arabidopsis* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2004, 45(3): 309–317.
- [12] Kapoor S, Kobayashi A, Takatsuji H. Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene *TAZI* causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in *petunia* [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(10): 2353–2367.
- [13] Parenicová L, de Folter S, Kieffer M, *et al.* Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(7): 1538–1551.
- [14] Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, *et al.* Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(10): 1859–1868.
- [15] Meijer A H, de Kam R J, d'Erfurth I, *et al.* HD-Zip Proteins of families I and II from rice: interactions and functional properties [J]. *Molecular and General Genetics*, 2000, 263: 12–21.
- [16] 韩荣鹏, 汤程, 杨一字, 等. Homeobox 转录因子在植物根生长发育中的研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(23): 7760–7769.
- [17] 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]. *Molecular General Genetics*, 1994, 244: 563–571.
- [18] Kalde M, Barth M, Somssich I E, *et al.* Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(4): 295–305.
- [19] Schmutz J, Cannon S B, Schlueter J, *et al.* Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2010, 463(7278): 178–183.
- [20] Ling J, Jiang W, Zhang Y, *et al.* Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus* [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 471.
- [21] Huang S, Gao Y, Liu J, *et al.* Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287: 495–513.
- [22] Dou L, Zhang X, Pang C, *et al.* Genome-wide analysis of the WRKY gene family in cotton [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289: 1103–1121.
- [23] Wei K F, Chen J, Chen Y F, *et al.* Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize [J]. *DNA Research*, 2012, 19(2): 153–164.
- [24] Ross C A, Liu Y, Shen Q. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Interaction Plant Biology*, 2007, 49(6): 827–842.
- [25] Yang B, Jiang Y, Rahman M H, *et al.* Identification and expression analysis of WRKY transcription factor genes in canola (*Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments [J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9: 1–19.
- [26] Zhang C, Wang D, Yang C, *et al.* Genome-wide identification of the potato WRKY transcription factor family [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181573.
- [27] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, *et al.* WRKY transcription factors [J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 247–258.
- [28] 吴雨捷, 吴健, 王幼平, 等. WRKY 转录因子在植物抗逆反应中的功能研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(22): 7413–7422.
- [29] 许海峰, 杨官显, 张静, 等. 苹果 *MdWRKY18* 和 *MdWRKY40* 参与盐胁迫途径分子机理研究 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(23): 4514–4521.
- [30] Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F, *et al.* Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2008, 6(5): 486–503.
- [31] Dong J, Chen C, Chen Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response [J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 51: 21–37.
- [32] Jiang Y, Liang G, Yu D. Activated expression of *WRKY57* confers drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2012, 5(6): 1375–1388.
- [33] Sun Y, Yu D. Activated expression of *AtWRKY53* negatively regulates drought tolerance by mediating stomatal movement [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34: 1295–1306.
- [34] Wang Z, Gao M, Li Y, *et al.* The transcription factor *SlWRKY37* positively regulates jasmonic acid- and dark- induced leaf senescence in tomato [J]. *Journal Experimental Botany*, 2022, 73(18): 6207–6225.
- [35] Wang Z, Zhu Y, Wang L, *et al.* A WRKY transcription factor participates in dehydration tolerance in *Boea hygrometrica* by

- binding to the W-box elements of the galactinol synthase (*BhGolS1*) promoter [J]. *Planta*, 2009, 230: 1155–1166.
- [36] Ye H, Qiao L, Guo H, *et al.* Genome-wide identification of wheat *WRKY* gene family reveals that *TaWRKY75-A* is referred to drought and salt resistances [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 663118.
- [37] Sun J, Hu W, Zhou R, *et al.* The *Brachypodium distachyon* *BdWRKY36* gene confers tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants [J]. *Plant Cell Reports*, 2015, 34: 23–35.
- [38] Niu C F, Wei W, Zhou Q Y, *et al.* Wheat *WRKY* genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Plant Cell and Environment*, 2012, 35(6): 1156–1170.
- [39] Singh D, Debnath P, Sane A P, *et al.* Tomato (*Solanum lycopersicum*) *WRKY23* enhances salt and osmotic stress tolerance by modulating the ethylene and auxin pathways in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2023, 195: 330–340.
- [40] 罗昌国, 袁启凤, 裴晓红, 等. 植物 *WRKY* 转录因子家族 *Group IIa* 基因研究进展 [J]. *热带作物学报*, 2015, 36(3): 629–637.
- [41] Dong Q, Zheng W, Duan D, *et al.* *MdWRKY30*, a group IIa *WRKY* gene from apple, confers tolerance to salinity and osmotic stresses in transgenic apple callus and *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant Science*, 2020, 299: 110611.
- [42] 曹清河, 李雪华, 戴习彬, 等. PEG-6000 模拟干旱胁迫对甘薯近缘野生种 *Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don 幼苗生理生化指标的影响 [J]. *西南农业学报*, 2016, 29(11): 2536–2541.
- [43] Fidalgo F, Santos A, Santos I, *et al.* Effects of long-term salt stress on antioxidant defence systems, leaf water relations and chloroplast ultrastructure of potato plants [J]. *Annals of Applied Biology*, 2015, 145(2): 185–192.
- [44] 濮雪, 王凯彤, 张宁, 等. 马铃薯 *StMAPKK4* 基因表达分析及互作蛋白筛选与鉴定 [J]. *作物学报*, 2023, 49(1): 36–45.
- [45] 王芳芳. 马铃薯 *StERF109* 基因的功能鉴定 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021.
- [46] 王霄, 魏涵, 李世贵, 等. 马铃薯休眠解除相关基因 *StNF-YA8* 的表达分析 [J/OL]. *农业生物技术学报*: 1–10 [2023–10–15]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3342.S.20230306.1106.002.html>.
- [47] Rao X, Huang X, Zhou Z, *et al.* An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis [J]. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 2013, 3(3): 71.
- [48] Earl H J, Davis R F. Effect of drought stress on leaf and whole canopy radiation use efficiency and yield of maize [J]. *Agronomy Journal*, 2003, 95(3): 688–696.
- [49] Batool T, Ali S, Seleiman M F, *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 16975.
- [50] 史先飞, 高宇, 黄旭升, 等. 油莎豆 *CeWRKY* 转录因子响应非生物胁迫的功能表征 [J]. *草业学报*, 2023, 32(8): 186–201.
- [51] 段俊枝, 杨翠苹, 王楠, 等. *WRKY* 转录因子在植物耐盐基因工程中的应用进展 [J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(5): 71–80.
- [52] 张军保, 陈宇姝, 于梦迪, 等. *WRKY* 转录因子家族对植物非生物胁迫响应研究进展 [J]. *高师理科学刊*, 2023, 43(2): 72–75.
- [53] Lin Z, Li Y, Wang Y, *et al.* Initiation and amplification of *SnRK2* activation in abscisic acid signaling [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 2456.
- [54] 李新苹. 白桦 *BpHsfB1* 转录因子耐盐功能初步分析 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- [55] Lim C, Kang K, Shim Y, *et al.* Inactivating transcription factor *OsWRKY5* enhances drought tolerance through abscisic acid signaling pathways [J]. *Plant Physiology*, 2022, 188(4): 1900–1916.
- [56] Luo X, Bai X, Sun X, *et al.* Expression of wild soybean *WRKY20* in *Arabidopsis* enhances drought tolerance and regulates ABA signalling [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(8): 2155–2169.
- [57] 董桃杏, 蔡昆争, 曾任森. 茉莉酸甲酯 (MeJA) 对干旱胁迫下水稻幼苗光合作用特性的影响 [J]. *生态环境学报*, 2009, 18(5): 1872–1876.
- [58] 徐楠. 水杨酸对干旱胁迫下紫花苜蓿种子萌发和幼苗生长的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- [59] 欧剑萍. 杉木 *CtWRKY19* 基因的克隆及其功能初步研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2023.
- [60] 李会园. 向日葵 *HaWRKY33* 的克隆及表达分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022.
- [61] 陈浩伟. 玉米转录因子 *ZmWRKY114* 基因的克隆及功能研究 [D].

- 合肥: 安徽农业大学, 2022.
- [62] 孙宇, 张艺腾, 成慧慧. 紫穗槐 *WRKY42* 基因耐盐碱性的功能研究 [J]. 植物研究, 2023, 43(4): 612–621.
- [63] Zhang L, Zhang R, Ye X, *et al.* Overexpressing *VvWRKY18* from grapevine reduces the drought tolerance in *Arabidopsis* by increasing leaf stomatal density [J]. Journal of Plant Physiology, 2022, 275: 153741.
- [64] Wang D, Chen Q, Chen W, *et al.* A WRKY transcription factor, *EjWRKY17*, from *Eriobotrya japonica* enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 5593.
- [65] Jaffar M A, Song A, Faheem M, *et al.* Involvement of *CmWRKY10* in drought tolerance of chrysanthemum through the ABA–signaling pathway [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5): 693.
- [66] Zhang Z L, Xie Z, Zou X, *et al.* A rice *WRKY* gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1500–1513.
- [67] 李琪, 李翠, 王琛, 等. 甘蓝型油菜转录因子 *WRKY72* 的基因克隆、表达分析及互作蛋白鉴定 [J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(5): 761–772.
- [68] 赖瑞联, 冯新, 程春振, 等. 橄榄 *WRKY* 转录因子的克隆及其在低温胁迫下的表达分析 [J]. 果树学报, 2018, 35(12): 1455–1466.
- [69] 杨敏, 李庆萌, 周陈平, 等. 番木瓜 *WRKY* 转录因子 *CpWRKY11* 的克隆和表达 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2023, 51(5): 119–138.
- [70] Zhang Y, Wang L. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants [J]. BMC Evolutionary Biology, 2005, 5: 1–12.