

草莓 *FaWRKY31* 的克隆、亚细胞定位及表达特性分析

岳茂兰¹, 江雷雨¹, 刘 怡¹, 李 栋¹, 刘勇强¹, 陈 清¹, 林源秀^{1,2},
汤浩茹^{1,*}

(¹四川农业大学园艺学院, 成都 611130; ²四川农业大学果蔬研究所, 成都 611130)

摘 要: 为明确草莓 *FaWRKY31* 的序列特征、表达特性和亚细胞定位情况, 通过同源克隆的方法从八倍体草莓‘红颜’中得到 3 条长度为 1 644 bp、1 条长度为 1 669 bp 的 cDNA 序列和两条长度约为 2 000 bp 的启动子序列。生物信息学分析表明: 长度为 1 669 bp 的 *FaWRKY31-like* 因插入了一段 25 bp 的短序列导致开放阅读框提前终止, 缺失了 WRKY 结构域和 C2H2 锌指结构。启动子的序列分析结果表明: *FaWRKY31* 与森林草莓 *FvWRKY31* 的启动子序列存在较大差异, 相似性仅为 70%, *FaWRKY31* 的启动子序列发生了多个片段的缺失和插入, 可能导致其与森林草莓 *FvWRKY31* 有不同的诱导特性。qRT-PCR 结果表明: *FaWRKY31* 在草莓的根、茎、叶、花及果实中均有表达, 根中的表达量最高, 全红期果实中的最低。*FaWRKY31* 能同时响应红光和蓝光的调控, 抑制其在草莓果实中的表达。此外, *FaWRKY31* 能在不同程度上响应低钾、低磷、低温、ABA、盐害、干旱这 6 种非生物胁迫, 且低温、ABA 及干旱都显著抑制 *FaWRKY31* 的表达。亚细胞定位结果显示 *FaWRKY31* 蛋白定位于细胞核内。

关键词: 草莓; *FaWRKY31*; 序列特征; 表达分析; 亚细胞定位

中图分类号: S 668.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 10-1947-13

Cloning, Subcellular Location and Expression Analysis of *FaWRKY31* in *Fragaria* × *ananassa*

YUE Maolan¹, JIANG Leiyu¹, LIU Yi¹, LI Yue¹, LIU Yongqiang¹, CHEN Qing¹, LIN Yuanxiu^{1,2},
and TANG Haoru^{1,*}

(¹College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ²Institute of Pomology and Olericulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: To clarify the sequence characteristics, expression patterns and subcellular localization of *FaWRKY31* in octoploid strawberry cultivar ‘Benihoppe’, three CDS sequences with a length of 1 644 bp, one CDS sequence with a length of 1 669 bp and two promoter sequences about 2 000 bp were isolated by homology cloning strategy. Bioinformatics analysis indicated that the open reading frame of *FaWRKY31-like* with a length 1 669 bp was terminated prematurely because of a 25 bp sequence insertion, resulting the truncation of WRKY domain as well as C2H2 Zinc finger. Sequence analysis of

收稿日期: 2019-07-24; 修回日期: 2019-08-28

基金项目: 草莓 *FaWRKY44* 和 *FaWRKY46* 调控花青素代谢的机理研究 (31872083)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: htang@sicau.edu.cn)

promoter showed that there was a large divergence between *FaWRKY31* promoter sequence and *FvWRKY31*. The similarity of those two promoter sequences was 70%, *FaWRKY31* promoter existed some deletion and insertion of multiple fragments, which may lead to different inducing characteristics compared with *FvWRKY31* (*F. vesca*). The gene expression level of *FaWRKY31* evaluated by q-PCR showed that *FaWRKY31* was detected in all analyzed tissues. The highest relative expression level was in roots, followed by stems and functional leaves and the lowest relative expression was in fruits. *FaWRKY31* could be induced by red and blue light treatments, and be downregulated by blue and red light in strawberry fruits. *FaWRKY31* can also significantly induced by low potassium, low phosphorus, ABA, drought, salt stress and low temperature in different degrees, and low temperature, ABA, drought had negative effects on *FaWRKY31*. Subcellular location of *FaWRKY31* showed that *FaWRKY31* was a nuclear localized protein.

Keywords: strawberry; *FaWRKY31*; sequence characteristics; expression patterns; nuclear location

WRKY 是一类广泛存在于植物中的转录因子家族, 因含有保守的 WRKY 结构域及 C 端锌指结构而得名 (Eulgem et al., 2000)。不同植物, WRKY 转录因子的数量不同, 其中拟南芥、水稻、葡萄、黄瓜、欧洲油菜、大豆、本氏烟、玉米和小麦中 WRKYs 的数量分别为 74、96、59、55、285、296、133、161 和 171 个 (数据来自 Plant Transcription Factor Database)。根据含有的 WRKY 结构域数量和锌指结构的不同, WRKY 可以分成 3 类: 第 1 类含有 2 个 WRKY 结构域及 C2H2 锌指结构; 第 2 类含有 1 个 WRKY 结构域及 C2H2 锌指结构, 并可进一步分为 IIa、IIb、IIc、II d、II e 等 5 个亚类; 第 3 类含有 1 个 WRKY 结构域及 C2HC 锌指结构 (Rushton et al., 1996, 2010; Eulgem et al., 2000)。

研究发现, WRKY 转录因子能够特异性地与含有 W-box 的启动子区结合, 从而调控植物对细菌、真菌、干旱、冷冻、盐害和高温等生物或非生物胁迫的反应 (Eulgem & Somssich, 2007; Tan et al., 2016; Ramamoorthy et al., 2018)。迄今为止, 在拟南芥、烟草、水稻、小麦、大麦、玉米、葡萄和辣椒等多种植物中都发现了参与响应生物和非生物胁迫的 WRKY 基因, 有的 WRKY 基因还参与应答多种胁迫。在大豆中过表达 *GmWRKY31* 能显著提高植株对低磷胁迫的耐受性 (Fan et al., 2017); 过表达 *GmWRKY21* 的转基因拟南芥植株在 -20 °C 下 80 min 内未表现出明显冻害症状, 其生长和存活率显著高于野生型 (Zhou et al., 2010); 在拟南芥中, *AtWRKY28* 和 *AtWRKY46* 的表达受盐胁迫诱导, 其过表达的转基因植株表现出对盐离子的显著耐受性 (Babitha et al., 2013; Ding et al., 2015); 此外, 在葡萄中, *VvWRKY7*、*VvWRKY8* 和 *VvWRKY28* 在干旱胁迫下表达量上调 (Wang et al., 2014); 过表达 *TaWRKY2* 的小麦植株抗旱性显著增强 (Gao et al., 2018); 周鹏飞等 (2017) 研究发现, 接种溃疡病后, *CsWRKY50* 的表达量在抗病品种四季橘中明显上升, 表明其参与抗溃疡病的免疫应答反应; 过表达 *AtWRKY46*、*AtWRKY54* 和 *AtWRKY70* 的拟南芥对丁香假单胞菌均具有较强抗性 (Chen et al., 2017); 异源表达毛葡萄 *VqWRKY52* 的拟南芥植株对白粉病和丁香假单胞菌具有较强抗性, 但对灰霉病敏感 (Wang et al., 2017)。水稻 *OsWRKY67* 的过量表达能够显著提高水稻植株对稻瘟病和白叶枯病的耐受性 (Liu et al., 2018)。鉴于 WRKY 转录因子在植物应对生物和非生物胁迫过程中的重要作用, 发掘出有应用价值的 WRKY 基因尤为必要。目前, 对 WRKY 转录因子的研究主要集中在模式植物拟南芥以及小麦和水稻等粮食作物上。Wei 等 (2016) 从二倍体野生森林草莓 ‘黑龙江 3 号’ 基因组中分离鉴定出 62 个 WRKY 基因, 并对其在部分生物和非

生物胁迫下的表达模式进行了分析; 在拟南芥中异源过表达森林草莓 *FvWRKY42* 的植株对白粉病的耐受性增强, 但对 ABA 敏感 (Wei et al., 2018)。在草莓中, 对 WRKY 基因的报道主要集中在二倍体野生草莓上, 其具体的功能和作用机制尚不清楚, 在八倍体栽培草莓上更缺乏相应的 WRKY 基因信息, 也未见相应的转 WRKY 基因的草莓植株出现, 草莓 WRKY 基因与拟南芥的同源基因功能上是否相似也不清楚。

本课题组前期对光质处理的栽培草莓果实转录组数据进行分析时, 筛选出1个在红蓝光下差异表达的WRKY基因*FaWRKY31* (Zhang et al., 2018), 初步推测其表达可能受不同光质的诱导, 并与果实花青素苷积累相关。在此基础上, 从八倍体栽培草莓‘红颜’中克隆得到了*FaWRKY31*的CDS和启动子序列, 并对其蛋白的定位、组织特异性以及在不同光质、低温、干旱、ABA和盐胁迫下的响应模式进行了研究, 以期为进一步研究该基因的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试材与处理

试验于 2017—2018 年在四川农业大学园艺学院生物技术实验室进行。材料为八倍体栽培草莓‘红颜’ (*Fragaria* × *ananassa* Duch. ‘Benihoppe’) 的生产苗和无菌组培苗。生产苗移栽至四川农业大学园艺学院生物技术人工培养室内, 无菌组培苗由生物技术组培室繁殖保存, 培养条件为光强 5 500 lx 的 LED 白光, 昼/夜温度 24 °C/18 °C, 相对湿度 75% ~ 85%, 光照 16 h, 常规管理。分别取生产苗的不同组织 (根、茎、匍匐茎、幼叶、功能叶和花) 及不同发育时期的果实 (小绿期、大绿期、白果期、始红期、片红期和全红期), 液氮速冻, -80 °C 保存, 参照 Jia 等 (2013) 和 Hou 等 (2009) 进行 *FaWRKY31* 的表达特性分析。不同光质处理取长势一致的白果期生产苗于 LED 光质培养箱内进行处理, 每个植株仅保留 2 个白果, 分别于白光、红光、蓝光、红白混合光 (红光: 白光 = 1:1) 和蓝白混合光 (蓝光: 白光 = 1:1) 下培养 10 d 至果实成熟, 取成熟果实, 液氮速冻, -80 °C 保存备用。非生物胁迫处理取 45 d 叶龄的组培苗, 接种于蔗糖浓度为 15 g · L⁻¹ 的 1/2 MS 基本培养基中适应 1 周, 再进行 ABA (100 μmol · L⁻¹)、4 °C、PEG6000 (400 μmol · L⁻¹, 模拟干旱)、NaCl (200 mmol · L⁻¹)、低 P (10 μmol · L⁻¹)、低 K⁺ (10 μmol · L⁻¹) 等处理, 分别在 0、6、12、24 和 48 h 时取地上部分的茎和叶, 液氮速冻, -80 °C 保存备用。上述所有处理均设置 3 次生物学重复, 每个重复包括 10 株生产苗或组培苗。

1.2 *FaWRKY31* 的克隆

采用 Chen 等 (2012) 改良的 CTAB 法提取样品总 RNA, 用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒 (TaKaRa 公司) 反转录合成 cDNA, -20 °C 保存备用。

参考前期课题组转录组测序结果 (张云婷 等, 2016; Zhang et al., 2018), 结合 GenBank 上登录的森林草莓同源基因 (XM_004294360), 利用 Oligo 7.0 软件设计两条特异引物 *FaWRKY31*-F 和 *FaWRKY31*-R (表 1), 采用高保真酶 I-5TM 2× High-Fidelity Master Mix (北京擎科新业生物技术有限公司) 扩增 *FaWRKY31*。反应体系 50 μL, 包括 I-5TM 2× High-Fidelity Master Mix 25 μL, 引物各 2 μL, cDNA 1 μL, 灭菌水 20 μL。扩增反应条件: 98 °C 预变性 2 min, 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 35 个循环。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目标条带, 然后连接至 pEASY-Blunt Cloning Vector

（北京全式金生物技术有限公司）并转化大肠杆菌 Top10，阳性克隆送上海生工进行测序。

表 1 本研究中所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物用途 Usage of primer	引物名称 Primer mane	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
启动子克隆 Promoter cloning	FaWRKY31Pro-F	ATATGTGCGTTTGCCCTAATTTTC
	FaWRKY31Pro-R	ATGATCACTAGCAGCAAGGTC
同源克隆 Homology cloning	FaWRKY31-F	CACCTAGCCTACGTATACCAAC
	FaWRKY31-R	TTATGTATTGTCATCACTACTGTTTCTTG
实时定量 PCR Real-time PCR	FaWRKY31-QF	CTTCATCATCCACAACCTG
	FaWRKY31-QR	TGAGGTCCAATGTAACTG
亚细胞定位 Subcellular location	FaWRKY31-BiF	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCATGGACCTTGCTGCTAGT
	FaWRKY31-BiR	CCCTTGCTCACCATCAGGATTGTATTGTCATCACTACTGTTTCTTG
实时定量 PCR 管家基因 Real-time PCR Housekeeping	26-18S RNA-QF	ACCGTTGATTTCGACAATTGGTCATCG
	26-18S RNA-QR	TACTGCGGGTCGGCAATCGGACG

1.3 *FaWRKY31* 启动子的克隆

采用 CTAB 法提取‘红颜’草莓幼叶 DNA，-20℃保存备用。参考 GDR（Genome Database for Rosaceae）上登录的森林草莓和栽培草莓的基因组序列，利用 Oligo 7.0 软件设计两条特异性引物 *FaWRKY31*Pro-F 和 *FaWRKY31*Pro-R（表 1），采用高保真酶 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase（TaKaRa 公司）扩增 *FaWRKY31* 启动子。反应体系 50 μL，包括 PrimeSTAR Max Premix (2×) 25 μL，引物各 1 μL，基因组 DNA 1 μL，灭菌水 22 μL。扩增反应条件：98℃预变性 2 min；98℃变性 10 s，55℃退火 5 s，72℃延伸 15 s，35 个循环。回收 PCR 产物并进行测序。

1.4 *FaWRKY31* 和启动子的生物信息学分析

利用 ORFfinder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)、Conserved domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)、ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、Predict Protein (<https://ppopen.rostlab.org/>)、NPS (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopm.html) 等生物学在线网站对 *FaWRKY31* 进行蛋白质分子量、等电点、跨膜区、信号肽和保守结构域的预测，根据得到的 *FaWRKY31* 氨基酸序列，利用 MEGA 6 软件进行氨基酸序列的同源性比对并构建系统进化树。并利用 PlantCARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析 *FaWRKY31* 启动子的序列特征。

1.5 *FaWRKY31* 的荧光定量分析

提取各样品 RNA 并进行反转录（方法同上），cDNA 模板 -20℃保存备用。根据克隆得到的 *FaWRKY31* cDNA 序列，利用 Beacon Designer 8 软件在保守区设计荧光定量引物 *FaWRKY31*-QF 和 *FaWRKY31*-QR（表 1），以草莓的 26-18S interspacer RNA 为内参基因（Wei et al., 2017），采用 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪，检测草莓不同组织和不同处理 *FaWRKY31* 的转录水平。荧光定量 PCR 采用 10 μL 体系，其中包括 SYBR Green 荧光染料 5 μL，上、下游引物各 0.4 μL，cDNA 1 μL，灭菌水补足至 10 μL。扩增程序为 95℃预变性 30 s；95℃变性 5 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 30 s，40 个循环。以不加 cDNA 模板的体系为阴性对照，4 孔重复，采用 2^{-ΔΔCt} 法（Livak & Schmittgen, 2001）计算相对表达量。采用单因素方差分析数据（ $P < 0.05$ ； $P < 0.01$ ）。

1.6 *FaWRKY31* 亚细胞定位检测

利用 Oligo 7.0 软件设计两条特异性引物 *FaWRKY31*-BiF 和 *FaWRKY31*-BiR, 以获得的 *FaWRKY31* 阳性克隆载体为模板, 采用高保真酶 PrimeSTAR® Max DNA Polymerase 扩增目标片段, 电泳检测后切胶回收。采用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对亚细胞定位载体进行双酶切, 切胶回收目标片段。采用 ClonExpress II One Step Cloning Kit (南京诺唯赞生物科技有限公司) 同源重组上述回收片段, 阳性克隆鉴定测序后提取质粒, -20 ℃ 保存备用。将添加核定位信号的 NLS-GFP 对照质粒和得到的阳性重组质粒采用冻融法分别转化入农杆菌 GV3101, 参照于一帆等 (2014) 的方法侵染本氏烟草叶片, 3 d 后在 ZEISS 800 激光共聚焦显微镜下观察并拍照, 黄色荧光蛋白激发波长为 514 nm, 发射波长为 527 nm; 绿色荧光蛋白激发波长为 490 nm, 发射波长为 509 nm。

2 结果与分析

2.1 *FaWRKY31* 的克隆和序列分析

以栽培草莓 ‘红颜’ 的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *FaWRKY31* 的 CDS 序列 (图 1)。测序得到 3 条长度为 1 644 bp 和 1 条长度为 1 669 bp 的目标序列, 经 NCBI 网站在线比对后确认均为 *FaWRKY31* 的 cDNA 序列, 分别命名为 *FaWRKY31* isoform X1、*FaWRKY31* isoform X2、*FaWRKY31* isoform X3 和 *FaWRKY31*-like。

进一步分析显示, 前三者的开放阅读框 ORF (Open Reading Frame) 均为 1 644 bp, 编码 1 条含 547 aa 的多肽链, 其 ORF 序列共有 45 个 SNP 位点, 编码的多肽链在 29 个位置存在氨基酸差异, 推测导致该差异的主要原因是栽培草莓是异源八倍体。*FaWRKY31*-like 相对于其他 3 条序列, 在 890 bp 处插入了 1 段长度为 25 bp 的序列 (图 2), 该序列的插入导致阅读框移码, 翻译提前终止, 编码的多肽链由 547 aa 缩短至 298 aa。

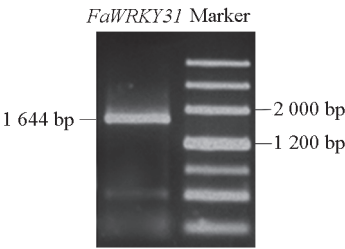


图 1 *FaWRKY31* 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of *FaWRKY31* gene

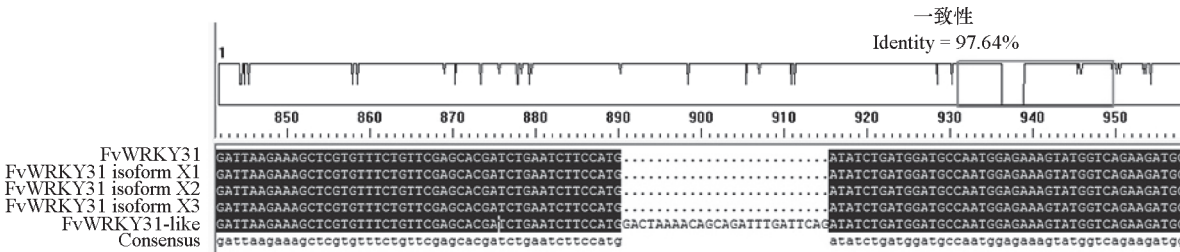


图 2 *FaWRKY31* isoform X1、X2、X3 和 *FaWRKY31*-like 的碱基序列比对
Fig. 2 Comparison of base sequence of *FaWRKY31* isoform X1, X2, X3 and *FaWRKY31*-like

Conserved domains 在线分析显示 *FaWRKY31* isoform X1、*FaWRKY31* isoform X2 和 *FaWRKY31* isoform X3 分别含有 1 个 WRKY 结构域及 1 个 C2H2 锌指结构, 属于 Group II 类型 (Eulgem et al.,

2000), *FaWRKY31*-like 缺失了 WRKY 结构域和 C2H2 锌指结构。FaWRKY31 isoform X1 与森林草莓 *FvWRKY31* CDS 序列的相似性为最高, 为 98.36%, 故以 *FaWRKY31* isoform X1 的序列做进一步分析 (以下称之为 *FaWRKY31*)。ProtParam tool 预测 *FaWRKY31* 蛋白质的分子量为 59.776 kD, 理论等电点为 6.24, 分子式为 $C_{2547}H_{4066}N_{764}O_{839}S_{30}$, 不稳定指数为 40.34, 总平均亲水性值为 -0.583, 推测此蛋白为亲水性蛋白质。HMMER 和 SignalP 分析显示, *FaWRKY31* 无跨膜结构和信号肽, 为非分泌型蛋白。NPS 二级结构预测结果显示, *FaWRKY31* 所编码的 547 个氨基酸中, 有 200 个氨基酸属于 α 螺旋, 占 36.56%; 82 个氨基酸属于延伸链, 占 14.99%; 46 个氨基酸属于 β 折叠, 占 8.41%; 219 个氨基酸属于无规则卷曲, 占 40.04%。

将获得的 *FaWRKY31* 氨基酸序列及与其同源的森林草莓 *FvWRKY31*、野樱 *PyWRKY31* isoformX1、桃 *PpWRKY31* isoformX1、中国梅 *PmWRKY31*、苹果 *MdWRKY31*、中国白梨 *PbWRKY31*、月季 *RcWRKY31* isoformX1、枣 *ZjWRKY31*、榴莲 *DzWRKY31*、拟南芥 *AtWRKY31*、玉米 *ZmWRKY6*、葡萄 *VvWRKY31*、胡桃 *JrWRKY31* 以及水稻 *OsWRKY31* isoformX2 的氨基酸序列通过 ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) 进行同源建模, 分析其 WRKY 结构域特征 (图 3)。

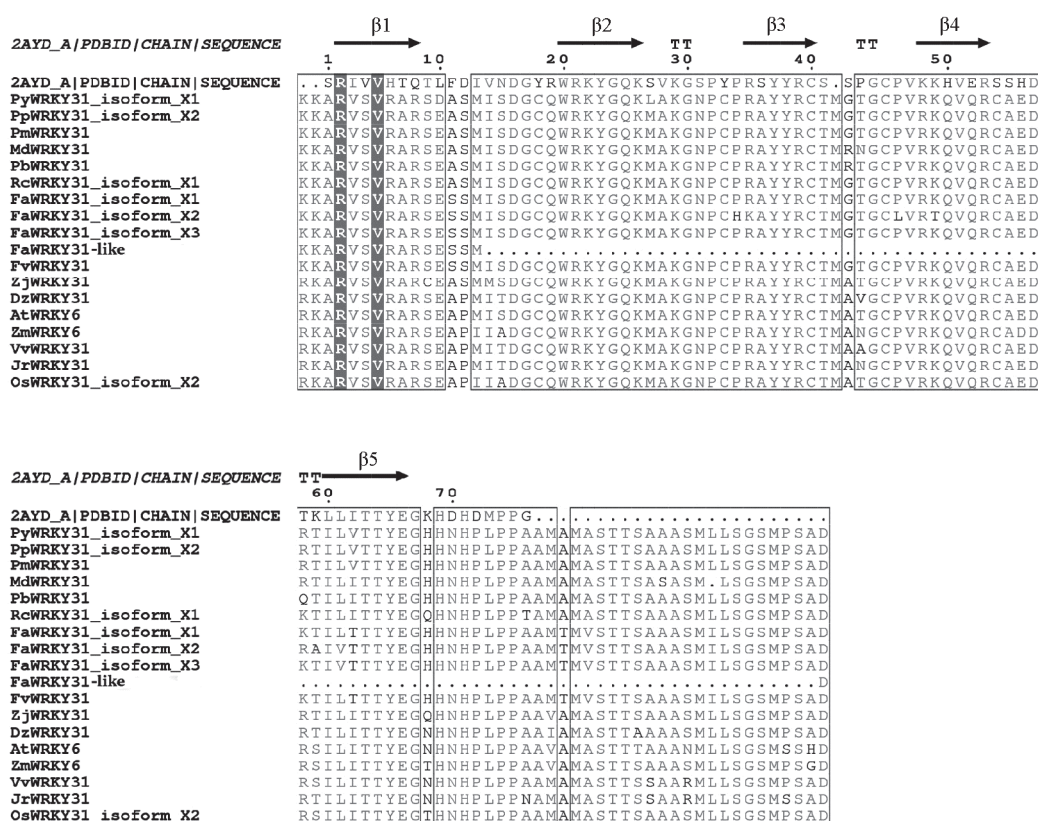


图 3 *FaWRKY31* 与不同植物氨基酸序列的多重比对及同源建模

Fa: 栽培草莓, Fv: 森林草莓, Py: 野樱, Pp: 桃, Pm: 中国梅, Md: 苹果, Pb: 中国白梨, Rc: 月季, Zj: 枣, Dz: 榴莲, At: 拟南芥, Zm: 玉米, Vv: 葡萄, Jr: 胡桃, Os: 水稻。

Fig. 3 Multiple sequence alignment and homology modeling of *FaWRKY31* from different plants

Fa: *Fragaria × ananassa*; Fv: *Fragaria vesca*; Py: *Prunus yedoensis*; Pp: *Prunus persica*; Pm: *Prunus mume*; Md: *Malus × domestica*; Pb: *Pyrus bretschneideri*; Rc: *Rosa chinensis*; Zj: *Ziziphus jujuba*; Dz: *Durio zibethinus*; At: *Arabidopsis thaliana*; Zm: *Zea mays*; Vv: *Vitis vinifera*; Jr: *Juglans regia*; Os: *Oryza sativa*.

结果 (图 3) 显示: *FaWRKY31-like* 与其他同源序列相比, 在 $\beta 2$ 折叠处缺失了 WRKY 转录因子家族特有的“WRKYGQK”保守氨基酸序列, 因此推测 *FaWRKY31-like* 可能部分功能缺失或无功能。‘红颜’草莓 *FaWRKY31* 的 WRKY 结构域与其他物种的 WRKY 结构域相差不大, 说明该结构域相对保守。

利用 MEGA 6 软件对草莓 *FaWRKY31* 及其与森林草莓、枣、月季、中国白梨、苹果、中国梅、桃、野樱、榴莲、葡萄、胡桃、拟南芥、玉米和水稻等植物中的同源基因采用邻接法 (Neighbor-Joining method) 进行聚类分析并构建系统进化树。结果 (图 4) 表明: ‘红颜’草莓与森林草莓和月季聚为一类, 说明它们同源性较高, 在功能上也更加相似; ‘红颜’草莓与玉米、拟南芥、水稻未聚为一类, 说明它们可能存在功能上的差异。

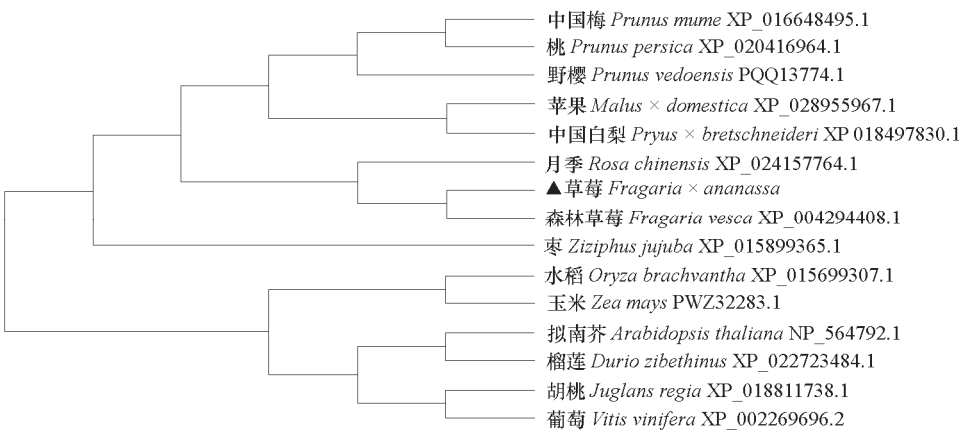


图 4 不同植物中 WRKY 与其同源氨基酸序列的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree of WRKY from different plants

2.2 *FaWRKY31* 启动子的克隆和分析

以 ‘红颜’ 草莓的基因组 DNA 为模板, 扩增 *FaWRKY31* 起始密码子至上游 1 500 ~ 2 000 bp 的序列 (图 5)。测序得到 2 012 bp 和 2 006 bp 的序列, 其相似性为 97.58%, NCBI 在线比对后确认其均为 *FaWRKY31* 的启动子序列。进一步比对分析发现, *FaWRKY31* 启动子序列与森林草莓 *FvWRKY31* 启动子序列存在较大差异, 其相似性仅为 70%, *FaWRKY31* 启动子序列在起始密码子上游约 300 和 1 530 bp 处分别插入了一段约为 120 和 200 bp 的片段, 同时在上游约 740 和 1 120 bp 处分别缺失了约为 240 和 260 bp 的序列, 这可能导致 *FaWRKY31* 与 *FvWRKY31* 存在不同的表达特性。利用 Plant CARE 对 *FaWRKY31* 启动子重要元件进行分析, 发现 *FaWRKY31* 启动子序列含有大量光响应元件 G-Box 以及激素响应元件, 如 ABA 响应元件 ABRE, 生长素响应元件 AuxRR-core 以及茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif 等 (表 2)。表明 *FaWRKY31* 很可能受光的诱导并能参与一系列非生物胁迫, 与草莓的抗逆性密切相关。

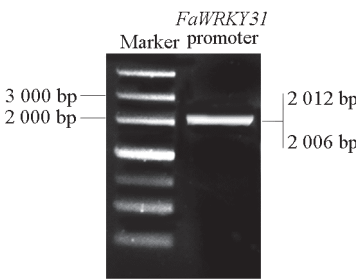


图 5 *FaWRKY31* 启动子的 PCR 扩增
Fig. 5 PCR amplification of *FaWRKY31* promoter

表 2 *FaWRKY31* 启动子序列重要顺式作用元件分析
Table 2 Some important *cis*-acting regulatory elements in the promoter sequences of *FaWRKY31*

顺式作用元件名称 <i>cis</i> -acting element	位点功能 Function of site	序列 Sequence	数量 Number
ABRE	ABA 响应 <i>cis</i> -acting element involved in the abscisic acid responsiveness	ACGTG	7
ARE	厌氧响应 <i>cis</i> -acting regulatory element essential for the anaerobic induction	AAACCA	2
AuxRR-core/ TGA-element	生长素响应 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in auxin responsiveness	GGTCCAT/ AACGAC	1/2
Box 4	光响应 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	ATTAAT	3
CGTCA-motif/ TGACG-motif	茉莉酸甲酯响应 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	CGTCA/ TGACG	2/2
G-Box/G-box/ GATA-motif	光响应 <i>cis</i> -acting regulatory element involved in light responsiveness	CACGTG/ TACGTG/ GATAGGA	1/6/3
GARE-motif/P-box	赤霉素响应 Gibberellin-responsive element	TCTGTTG/ CCTTTTG	1/2

2.3 *FaWRKY31* 的表达特性分析

荧光定量结果（图 6）表明，*FaWRKY31* 在‘红颜’草莓的根、茎、匍匐茎、幼叶、功能叶、花和果实中均有表达，其在根中表达量最高，在全红期果实中最低，这预示着 *FaWRKY31* 可能主要参与草莓植株根系相关的生理过程。

鉴于 *FaWRKY31* 启动子序列上含有大量的光响应元件，同时在前期用红蓝光处理‘丰香’草莓果实进行转录组测序分析时发现，*FaWRKY31* 在红蓝光处理的果实中表达量均显著下降(张云婷 等，2016, Zhang et al., 2018)。因此，为了阐明 *FaWRKY31* 在不同光质下的表达特性，分别采用不同光质处理了‘红颜’草莓的果实。荧光定量结果（图 7）表明：相对于白光处理，*FaWRKY31* 的相对表达量在蓝光、红光及白 + 蓝（1:1）的处理下显著下调，其中蓝光和白 + 蓝（1:1）处理下调较多，这与前期的转录组测序结果相符。上述结果表明，蓝光和红光能够显著抑制果实中 *FaWRKY31* 的表达，但其中的机制尚不明确。

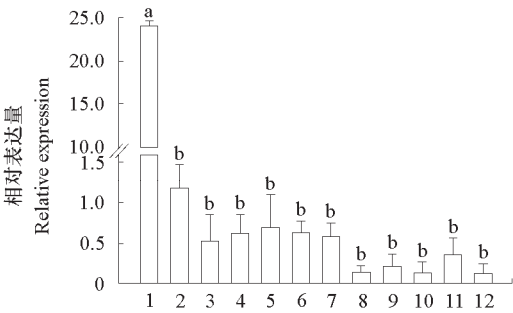


图 6 *FaWRKY31* 在草莓不同组织和果实发育阶段的表达模式
1: 根; 2: 茎; 3: 匍匐茎; 4: 幼叶; 5: 功能叶; 6: 花; 7: 小绿期;
8: 大绿期; 9: 白果期; 10: 始红期; 11: 片红期; 12: 全红期。
Fig. 6 Expression patterns of *FaWRKY31* in different tissues and different developmental stages of strawberry
1: Root; 2: Stem; 3: Runner; 4: Young leaf; 5: Functional leaf;
6: Flower; 7: Small green; 8: Big green; 9: White; 10: Initialilly red;
11: Partially red; 12: Full red.

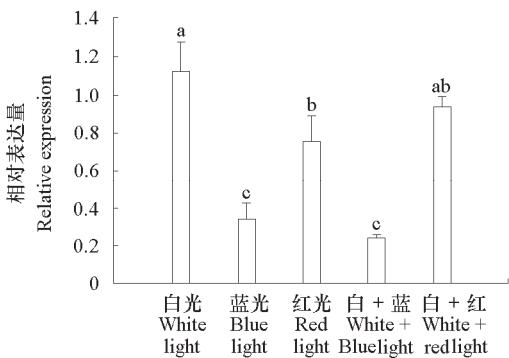


图 7 不同光质处理草莓成熟果实中 *FaWRKY31* 的表达模式
Fig. 7 Effects of different light quality on *FaWRKY31* gene expression in strawberry full red fruits

启动子分析结果表明, *FaWRKY31* 启动子序列上含有与抗逆相关的 ABA 响应元件 ABRE 和茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif 等, 因此进一步研究了 *FaWRKY31* 在低磷、低钾、低温、ABA、盐和干旱这 6 种非生物胁迫下的表达特性。荧光定量结果(图 8)分析显示, 在低磷胁迫下, *FaWRKY31* 的相对表达量在 0 ~ 24 h 内无明显变化, 而在 48 h 时显著上调, 约为对照的 8.5 倍, 这可能是由于 *FaWRKY31* 的表达调节了草莓对于低磷胁迫的耐受性。在低钾胁迫下, *FaWRKY31* 的表达量在 0 ~ 24 h 内下调, 但在 48 h 时显著上调, 表明随着低钾胁迫时间的延长, *FaWRKY31* 在响应低钾信号转导途径中的作用由负调控转变为正调控。在低温处理下, *FaWRKY31* 的相对表达量下调, 表明低温对

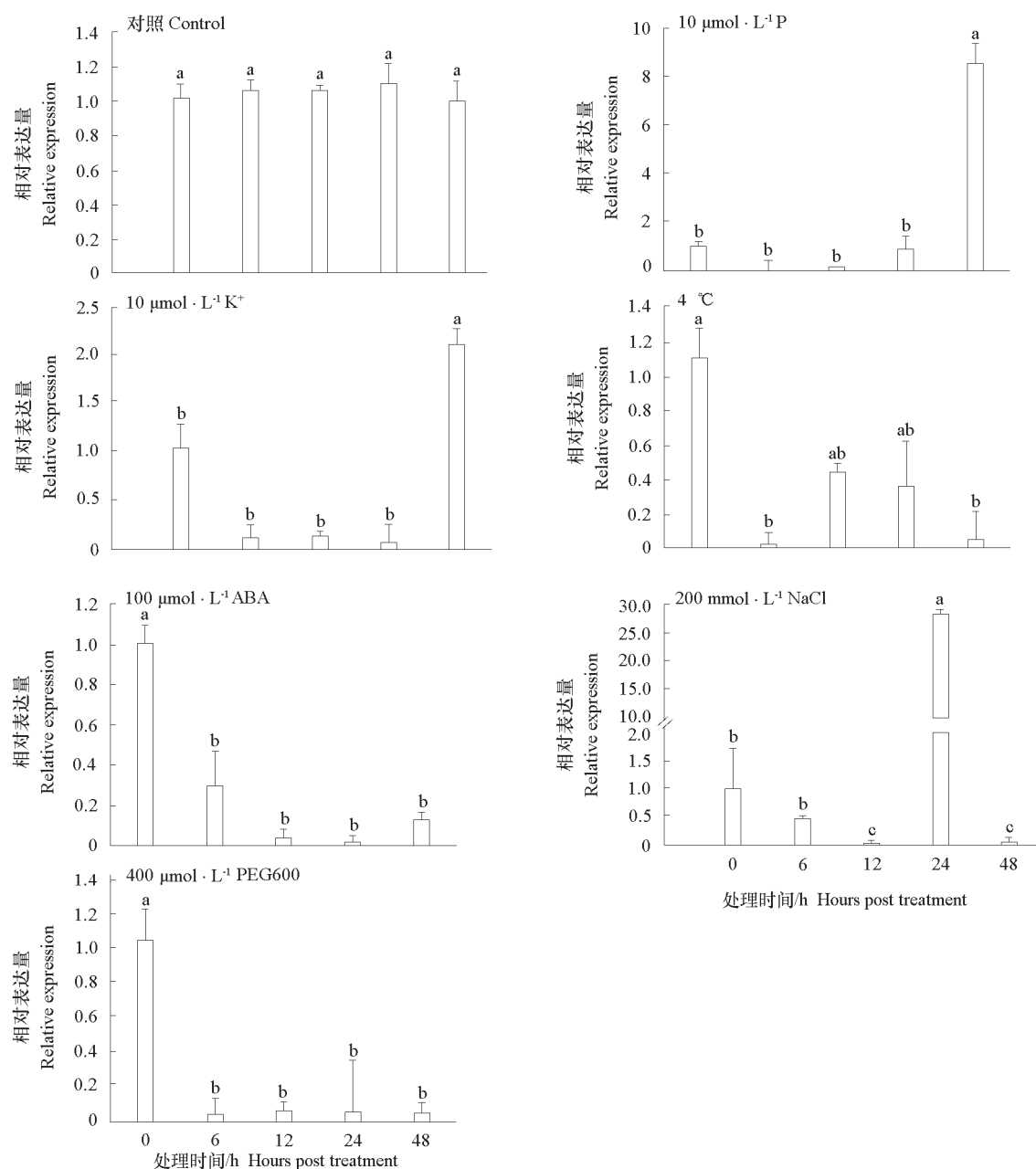


图 8 不同非生物胁迫下草莓 *FaWRKY31* 的表达模式

Fig. 8 Expression patterns of *FaWRKY31* under different abiotic stress

FaWRKY31 的表达起抑制作用。在外源 ABA 处理下, *FaWRKY31* 的表达下调, 呈现的表达规律能够间接反映其在植物应对 ABA 胁迫中的作用, 表明 ABA 对 *FaWRKY31* 起到了负调控的作用。在高盐胁迫下, *FaWRKY31* 的相对表达量在 6、12、48 h 时下调, 但在 24 h 时显著上调, 这可能是由于该基因的表达调节了草莓对于高盐胁迫的耐受性。在干旱处理下, *FaWRKY31* 在 48 h 内下调水平几乎一致, 表明干旱抑制了 *FaWRKY31* 基因的表达。综上, *FaWRKY31* 能够响应低磷、低钾、低温、ABA、盐害、干旱这 6 种非生物胁迫, 且在不同的非生物胁迫下呈现出不同的表达规律, 表明 *FaWRKY31* 在响应不同胁迫中的功能各异。

2.4 *FaWRKY31* 的亚细胞定位

利用同源重组技术将 *FaWRKY31* 融合至 EYFP 蛋白的 N 端, 获得 *FaWRKY31*-EYFP 亚细胞定位载体 (图 9)。

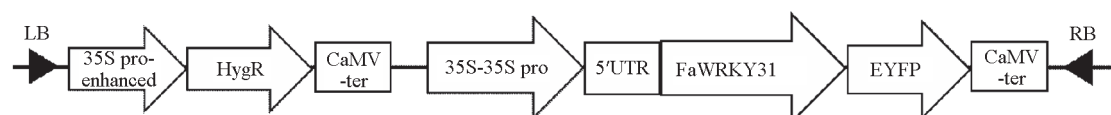


图 9 *FaWRKY31*-EYFP 亚细胞定位载体模式图

Fig. 9 Subcellular location vector pattern of *FaWRKY31*-EYFP protein

以添加 SV40 核定位信号的 NLS-GFP 亚细胞定位载体为 Marker, 分别转入农杆菌感受态细胞 GV3101, 然后共侵染烟草叶片, 在 ZEISS 800 共聚焦显微镜下观察 *FaWRKY31* 在烟草叶片中的定位情况 (图 10)。

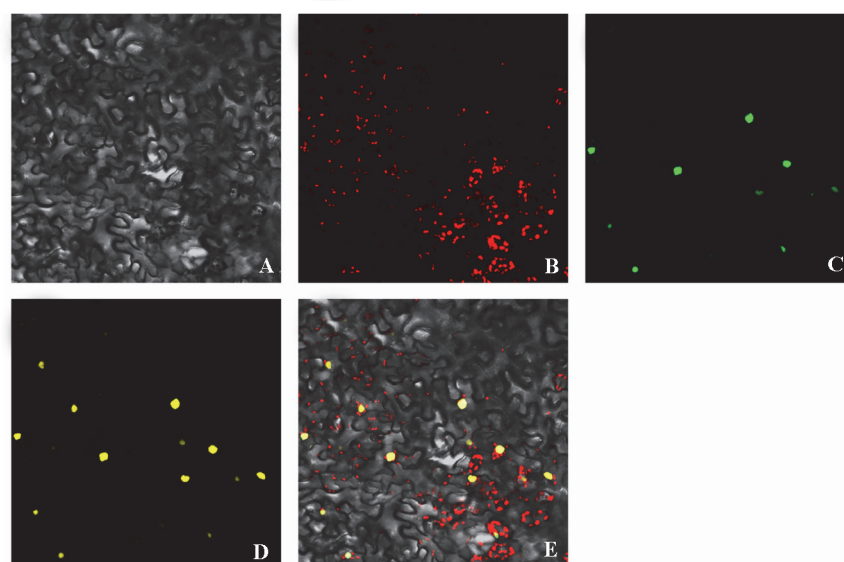


图 10 *FaWRKY31* 蛋白在烟草叶片中的亚细胞定位

A: 明场; B: 叶绿体自发荧光; C: NLS-GFP 荧光; D: *FaWRKY31*-EYFP; E: 融合。

Fig. 10 Subcellular location of *FaWRKY31* protein in tobacco

A: Bright field; B: Spontaneous fluorescence of chloroplasts; C: NLS-GFP; D: *FaWRKY31*-EYFP; E: Merge.

亚细胞定位结果表明: 在黄色荧光通道下, *FaWRKY31*-EYFP 融合蛋白被激发出黄色荧光, 绿色荧光通道下定位于细胞核的 NLS-GFP 被激发出绿色荧光, 且两者能重叠在同一位置 (图 10), 故可表明 *FaWRKY31*-EYFP 融合蛋白定位于细胞核, 推测 *FaWRKY31* 可能参与基因的表达调控。

3 讨论

目前, 草莓 *WRKY31* 在野生和栽培草莓中的功能均没有相关报道, *FaWRKY31* 更缺乏必要的序列和诱导特性等信息, 这对进一步推测和研究 *FaWRKY31* 基因的功能带来了极大的不便。有鉴于此, 本研究中从栽培草莓‘红颜’中克隆得到了 *FaWRKY31* 的 CDS 和启动子序列, 分析了其序列特征, 并对 *FaWRKY31* 在草莓中的组织特异性、红蓝光下以及部分非生物胁迫下的诱导特性进行了研究。

本研究中在克隆 *FaWRKY31* 基因的 CDS 全长序列时, 共得到了 4 条序列, 其中 3 条均为 1 644 bp, 其序列间的差异表现为多个位点的 SNP, 还有一条长度为 1 669 bp 的序列在 $\beta 2$ 折叠处缺失了 *WRKY* 转录因子家族特有的‘*WRKYGQK*’保守氨基酸序列, 其编码的氨基酸序列由 547 aa 缩短至 298 aa, 因此推测该 1 669 bp 的序列编码的蛋白相对于 *FaWRKY31* 可能部分功能缺失或无功能。例如, 在森林草莓中, *FvWRKY31* 在花中表达量最高, 根和茎中次之 (Zhou et al., 2016), 而在栽培草莓中, *FaWRKY31* 在根中的表达量极显著高于其他组织部分 ($P < 0.01$), 表明其可能与根系活动相关。此外, 本研究发现, 栽培草莓 *FaWRKY31* 与森林草莓 *FvWRKY31* 启动子存在较大差异, 其相似性仅为 70%, *FaWRKY31* 的启动子发生了较长片段的插入和缺失, 直接导致部分重要响应元件的增加或缺失, 由此造成 *FaWRKY31* 与 *FvWRKY31* 诱导特性的差异。例如, *FvWRKY31* 在干旱、低温、ABA 和盐胁迫下 0 ~ 48 h 内表达量均无显著变化 (Wei et al., 2016), 而在本研究中, *FaWRKY31* 在上述条件下的某个特定时间内表达量变化显著, 表明 *FaWRKY31* 可能参与了干旱、低温、ABA 和盐胁迫等相关的逆境响应过程。

草莓 *FaWRKY31* 与拟南芥同源基因 *AtWRKY6* 的氨基酸序列相似性仅为 40%, 其在聚类分析时相距较远, 表明 *FaWRKY31* 与 *AtWRKY6* 可能存在功能上的差异。Chen 等 (2009) 研究发现, 拟南芥 *AtWRKY6* 通过调控 *PHO1* 基因的表达来响应低磷胁迫, 可能存在以下响应低磷胁迫的调控机制: 在正常供磷条件下, *AtWRKY6* 结合 *PHO1* 启动子上的 W-box, 进而抑制 *PHO1* 基因的表达; 在低磷胁迫下, *AtWRKY6* 蛋白被降解, 解除了对 *PHO1* 基因的抑制作用, *PHO1* 表达增强, 使植物能在一定程度上提高其耐受低磷胁迫的能力。在本研究中, *FaWRKY31* 的表达水平在低磷胁迫前期变化不明显, 48 h 后表达水平上调, 这与 *AtWRKY6* 响应低磷胁迫的机制可能存在一定的差异, 尽管 *AtWRKY6* 是 *FaWRKY31* 的同源基因, 但 *FaWRKY31* 响应低磷胁迫的作用机制与 *AtWRKY6* 是否相同, 还有待进一步研究。Huang 等 (2016) 研究发现, 在外源 ABA 的诱导下, *AtWRKY6* 的表达在拟南芥种子萌发和幼苗早期发育时期受到抑制, 且 *Atwrky6* 过表达株系在这两个时期表现出 ABA 超敏感型, 其响应 ABA 的机制是 *WRKY6* 与 *RAV1* 启动子结合, 抑制 *RAV1* 在 *Atwrky6* 中的表达, 而直接被 *RAV1* 下调的 *ABI3*、*ABI4*、*ABI5* 在 *Atwrky6* 突变体中的表达增强, 从而表现出与 *RAV1* 突变体相似的 ABA 超敏表型。同样, Zhao 等 (2019) 发现 *MdWRKY31* 转基因苹果中 ABA 信号相关基因 *MdRAV1* 和 *MdRAV2* 的表达水平明显受到抑制, 进一步实验证明 *MdWRKY31* 能结合到 *MdRAV1* 的启动子上抑制其转录, *MdRAV1* 则通过抑制 *MdABI3* 和 *MdABI4* 的表达进而参与 ABA 信号途径。综上所述, 拟南芥 *WRKY6* 转录因子通过直接下调 *RAV1* 的表达, 在 ABA 信号通路中发挥重要作用。

本研究发现, 外源 ABA 能够负调控 *FaWRKY31* 的表达, 这与 Huang 等 (2016) 和 Zhao 等 (2019) 的研究结果一致。但 *FaWRKY31* 响应 ABA 的作用机制与其同源基因 *AtWRKY6* 和 *MdWRKY31* 是否一致需进一步研究。Zhao 等 (2019) 发现 *MdWRKY31* 在响应 ABA 诱导的同时还能够响应模拟干旱 PEG6000, 且两个信号通路之间存在交叉对话。本研究中进行 ABA 和模拟干旱处理后, *FaWRKY31* 表现出相同的诱导特性, 即 ABA 和模拟干旱都能够负调控其表达, 这与前人的研究结果一致 (Zhao et al., 2019), 而在高盐胁迫下, *MdWRKY31* 的表达量显著上调, *FaWRKY31* 的相对表达量在 6、12、48 h 时下调, 在 24 h 时显著上调, 可能是因为 *FaWRKY31* 在不同物种中对高盐胁迫的响应有差异。

课题组前期对不同光质处理下的草莓果实进行转录组测序分析时发现, *FaWRKY31* 在红光和蓝光下的表达量均显著下调, 推测其可能与红蓝光下果实花青素苷的差异积累相关。为了进一步证实 *FaWRKY31* 的表达是否受不同光质的影响, 本研究结果显示 *FaWRKY31* 在蓝光和红光处理的草莓果实中表达量均受到抑制, 这与本课题组前期研究结果一致 (Zhang et al., 2018), 表明 *FaWRKY31* 能同时响应蓝光和红光, 而导致该现象出现的原因是否与果实花青苷的差异积累相关, 还需进一步研究。

References

- Babitha K C, Ramu S V, Pruthvi V. 2013. Co-expression of *AtbHLH17* and *AtWRKY28* confers resistance to abiotic stress in *Arabidopsis*. *Transgenic Research*, 22 (2): 327 – 341.
- Chen Q, Yu H W, Wang X R, Xie X L, Yue X Y, Tang H R. 2012. An alternative cetyltrimethylammonium bromide-based protocol for RNA isolation from blackberry (*Rubus* L.). *Genetics and Molecular Research*, 11 (2): 1773 – 1782.
- Chen Y F, Li L Q, Xu Q, Kong Y H, Wang H. 2009. The WRKY6 transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 3554 – 3566.
- Chen J, Nolan T, Ye H. 2017. *Arabidopsis* WRKY46, WRKY54 and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought response. *Plant Cell*, 29: 1425.
- Ding Z J, Yan J Y, Li C X. 2015. Transcription factor WRKY46 modulates the development of *Arabidopsis* lateral roots in osmotic/salt stress conditions via regulation of ABA signaling and auxin homeostasis. *Plant Journal*, 84 (1): 56 – 69.
- Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, Somssich I E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 5: 199 – 206.
- Eulgem T, Somssich I E. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 366 – 371.
- Fan S, Dong L, Han D. 2017. GmWRKY31 and GmHDL56 enhances resistance to *Phytophthora sojae* by regulating defense-related gene expression in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 12 (8): 781.
- Gao H, Wang Y, Xu P. 2018. Overexpression of a WRKY transcription factor TaWRKY2 enhances drought stress tolerance in transgenic wheat. *Frontiers in Plant Science*, 9: 997.
- Hou Y X, Tang H R, Zhang Y. 2009. Cloning and expression analysis of ascorbate peroxidase gene during fruit development and ripening in *Fragaria × ananassa* cv. Toyonaka. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (6): 675 – 679.
- Huang Y, Feng C Z, Ye Q, Wu W H, Chen Y F. 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.
- Jia H F, Lu D, Sun J H. 2013. Type 2C protein phosphatase ABI1 is a negative regulator of strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 64 (6): 1677 – 1687.
- Liu Q, Li X, Yan S. 2018. OsWRKY67 positively regulates blast and bacteria blight resistance by direct activation of PR genes in rice. *BMC Plant Biology*, 18 (1): 257.

- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 – 408.
- Ramamoorthy R, Jiang S Y, Kumar N. 2018. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol*, 49 (6): 865 – 879.
- Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, Shen Q J. 2010. WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science*, 15 (5): 247 – 258.
- Rushton P J, Torres J T, Parniske M. 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO Journal*, 15: 5690 – 5700.
- Tan Xiaoli, Fan Zhongqi, Li Lulu, Wu Ya, Kuang Jianfei, Lu Wangjin, Chen Jianye. 2016. Molecular characterization of a leaf senescence-related transcription factor BrWRKY75 of Chinese flowering cabbage. *Horticultural Plant Journal*, 2: 272 – 278.
- Wang X, Guo R, Tu M. 2017. Ectopic expression of the wild grape WRKY Transcription factor VqWRKY52 in *Arabidopsis thaliana* enhances resistance to the biotrophic pathogen powdery mildew but not to the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*, 8 (1379): 97.
- Wang M, Vannozzi A, Wang G. 2014. Genome and transcriptome analysis of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family. *Horticulture Research*, 1 (1401): 6.
- Wei W, Yang H, Han Y T. 2016. The WRKY transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*: identification and expression analysis under biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105: 129 – 144.
- Wei W, Chai Z, Xie Y. 2017. Bioinformatics identification and transcript profile analysis of the mitogen-activated protein kinase gene family in the diploid woodland strawberry *Fragaria vesca*. *PLoS ONE*, 12 (5): e0178596.
- Wei W, Cui M Y, Hu Y, Gao K, Xie Y G, Jiang Y, Feng J Y. 2018. Ectopic expression of FvWRKY42, a WRKY transcription factor from the diploid woodland strawberry (*Fragaria vesca*), enhances resistance to powdery mildew, improves osmotic stress resistance, and increases abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 275: 60 – 74.
- Yu Yi-fan, Zhu Xiao-bing, Ge Hui-min. 2014. Plant subcellular localization method based on the instantaneous expression of green fluorescent protein. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 42 (12): 58 – 61. (in Chinese)
- 于一帆, 朱小彬, 葛会敏. 2014. 基于绿色荧光蛋白瞬时表达的植物亚细胞定位方法. *江苏农业科学*, 42 (12): 58 – 61.
- Zhao X Y, Qi C H, Jiang H, You C X, Guan Q M, Ma F W, Li Y Y, Hao Y J. 2019. The MdWRKY31 transcription factor binds to the MdRAV1 promoter to mediate ABA sensitivity. *Horticulture Research*, 6: 66.
- Zhang Yun-ting, Song Xia, YE Yun-tian, Feng Chen, Sun Bo, Wang Xiao-rong, Tang Hao-ru. 2016. Effects of light quality on physiological and biochemical indexes in strawberry leaves under low temperature stress. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 28 (5): 790 – 796. (in Chinese)
- 张云婷, 宋 霞, 叶云天, 冯 琛, 孙 博, 王晓蓉, 汤浩茹. 2016. 光质对低温胁迫下草莓叶片生理生化特性的影响. *浙江农业学报*, 28 (5): 790 – 796.
- Zhang Y, Jiang L, Li Y, Chen Q, Ye Y. 2018. Effect of red and blue light on anthocyanin accumulation and differential gene expression in strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Molecules*, 23: 820.
- Zhou H Y, Li Y X, Zhang Q, Ren S Y, Shen Y Y, Qin L, Xing Y. 2016. Genome-wide analysis of the expression of WRKY family genes in different developmental stages of wild strawberry (*Fragaria vesca*) fruit. *PLoS ONE*, 11 (5): e0154312.
- Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F, Xie Z M, Lei G, Huang J, Wang C M, Wang H W, Zhang J S, Chen S Y. 2010. Soybean WRKY - type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnology Journal*, 6 (5): 486 – 503.
- Zhou Peng-fei, Jia Rui-rui, Chen Shan-chun, Xu Lan-zhen, Peng Ai-hong, Lei Tian-gang, Li Qiang, Chen Min, Bai Xiao-jing, Zou Xiu-ping, He Yong-rui. 2017. Cloning and expression analysis of four citrus WRKY genes responding to *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (3): 452 – 462. (in Chinese)
- 周鹏飞, 贾瑞瑞, 陈善春, 许兰珍, 彭爱红, 雷天刚, 李 强, 陈 敏, 白晓晶, 邹修平, 何永睿. 2017. 柑橘 4 个 WRKY 转录因子基因的克隆及其响应柑橘溃疡病菌侵染的表达分析. *园艺学报*, 44 (3): 452 – 462.