

红花 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因的克隆及功能分析

鲁丹丹, 苏小雨, 谭政委, 余永亮, 李磊, 许兰杰, 杨青, 梁慧珍^①

(河南省农业科学院中药材研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 根据前期对红花 (*Carthamus tinctorius* Linn.) *WRKY* 基因家族的鉴定结果, 利用 RT-PCR 技术克隆了红花 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因, 其蛋白质编码序列 (CDS) 长度分别为 600 和 861 bp, 全长序列均含有 3 个外显子和 2 个内含子。 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 蛋白分别含有 199 和 286 个氨基酸残基, 且二者均无跨膜结构和信号肽, 定位于细胞核, 二级结构主要由无规卷曲组成, 三级结构较为松散。多序列比对及系统进化分析结果显示: *CtWRKY7* 与菊花 [*Chrysanthemum × morifolium* (Ramat.) Hemsl.] *CmWRKY15* 和莴笋 (*Lactuca sativa* var. *angustata* Irish ex Bremer) *LsWRKY18* 的亲缘关系最近, 均属于 II a 类 *WRKY*; *CtWRKY72* 与拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] *AtWRKY70* 和 *AtWRKY54* 的亲缘关系最近, 均属于 III 类 *WRKY*。启动子分析结果显示: *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 的启动子均含有多种逆境胁迫应答元件, 且 *CtWRKY7* 的启动子含有 W-box, 而 *CtWRKY72* 的启动子无 W-box。基因表达分析结果显示: *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 在红花的不同组织中均有表达, 其中, *CtWRKY7* 在根中表达量最高, *CtWRKY72* 在叶中表达量最高; 且二者均在花组织形成过程中表达量逐渐下降, 在花开放过程中表达量逐渐上升。此外, *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 均响应多种逆境胁迫和外源激素诱导, 但表达模式不同, 总体上上调表达, 仅 *CtWRKY7* 在外源 ABA 诱导下下调表达。综上所述, *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 可能参与红花花早期发育及衰老过程, *CtWRKY7* 可能存在自我调节或与其他 *WRKY* 蛋白存在交叉调节; 并且, *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 能响应多种逆境胁迫, 但作用机制不同。

关键词: 红花; *WRKY*; 表达模式; 花发育; 逆境胁迫

中图分类号: Q943.2; Q786; S567.21⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2024)04-0012-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2024.04.02

Cloning and function analysis of *CtWRKY7* and *CtWRKY72* genes from *Carthamus tinctorius* LU Dandan, SU Xiaoyu, TAN Zhengwei, YU Yongliang, LI Lei, XU Lanjie, YANG Qing, LIANG Huizhen^① (Institute of Chinese Herbal Medicines, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2024, 33(4): 12-20

Abstract: Based on previous identification result of the *WRKY* gene family of *Carthamus tinctorius* Linn., *CtWRKY7* and *CtWRKY72* genes were cloned from *C. tinctorius* by RT-PCR technology. The protein coding sequences (CDS) of *CtWRKY7* and *CtWRKY72* genes are 600 and 861 bp in length, and their full-length sequences all contain 3 exons and 2 introns. *CtWRKY7* and *CtWRKY72* proteins have 199 and 286 amino acid residues respectively, both of them have no transmembrane structures or signal peptides, with nuclear localization, major random coils of secondary structure, and loose tertiary structure. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis results show that *CtWRKY7* is most closely related to *CmWRKY15* from *Chrysanthemum × morifolium* (Ramat.) Hemsl. and *LsWRKY18* from *Lactuca sativa* var. *angustata* Irish ex Bremer, which all belong to class II a *WRKY*; *CtWRKY72* is most closely related to *AtWRKY70* and *AtWRKY54* from *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., which all belong to class III

收稿日期: 2023-11-21

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-21); 河南省重大科技专项 (221100310400); 河南省重点研发专项 (231111110800); 名贵中药资源可持续利用能力建设项目 (2060302); 河南省科技攻关项目 (242102110248; 242102310531)

作者简介: 鲁丹丹 (1989—), 女, 河南周口人, 硕士, 助理研究员, 主要从事药用植物功能基因方面的研究。

^①通信作者 E-mail: lhzh66666@163.com

引用格式: 鲁丹丹, 苏小雨, 谭政委, 等. 红花 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因的克隆及功能分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(4): 12-20.

WRKY. Promoter analysis result shows that both *CtWRKY7* and *CtWRKY72* contain multiple adversity stress response elements in their promoters, and *CtWRKY7* has W-box in its promoter, while *CtWRKY72* has no W-box in its promoter. Gene expression analysis result shows that *CtWRKY7* and *CtWRKY72* are expressed in different tissues of *C. tinctorius*, in which, the expression of *CtWRKY7* is the highest in roots, and that of *CtWRKY72* is the highest in leaves. Their expressions gradually decrease during the formation process of flower tissues, and gradually increase during the process of flower blooming. Furthermore, both *CtWRKY7* and *CtWRKY72* response to various adversity stresses and exogenous hormone induction, but their expression patterns are different, with overall upregulation, except for downregulation of *CtWRKY7* after exogenous ABA induction. In conclusion, *CtWRKY7* and *CtWRKY72* can be involved in the early development and senescence processes of *C. tinctorius* flowers. *CtWRKY7* can self-regulate or cross-regulate with other WRKY proteins; moreover, both *CtWRKY7* and *CtWRKY72* can respond to various adversity stresses, but their mechanisms are different.

Key words: *Carthamus tinctorius* Linn.; WRKY; expression pattern; flower development; adversity stress

红花 (*Carthamus tinctorius* Linn.) 为菊科 (Asteraceae) 红花属 (*Carthamus* Linn.) 一年生双子叶草本植物,其干燥花为中国传统中药材,药用历史长达 2 100 多年,具有散瘀止痛、改善心肌缺血、调节免疫应答等功效^[1]。红花喜温暖、干燥的气候,耐干旱、贫瘠、盐碱、寒冷等,具有在干旱、极端温度和高盐等非生物胁迫下生长且产量不会受严重影响的潜力^[2]。因此,红花被认为是一种抗逆性植物,其自身多重抗逆性状使其在基因特异性方面的开发潜力非常大。挖掘和开发红花特异性抗逆基因有助于提高红花的农艺性能,改善红花的品质,并可应用于其他大宗作物,提高其抗逆性,在植物抗逆改良研究及植物育种方面具有极高的应用价值,亦可为植物分子育种奠定基础。

转录因子对于基因表达调控至关重要,在植物应对逆境胁迫的响应中具有关键作用。WRKY 转录因子是一类主要的植物特异性转录调控因子,在植物不同生长发育过程中发挥重要功能,如种子的休眠萌发^[3]、开花时间^[4]、果实成熟^[5]和衰老^[6]等。此外,许多研究发现 WRKY 转录因子在植物对生物和非生物胁迫的响应中也起着重要的调控作用,且能广泛参与多种生物和非生物胁迫的信号传导过程^[7]。例如:柳叶马鞭草 (*Verbena bonariensis* Linn.) *VbWRKY32* 的过表达增强了植株的耐寒性^[8];番茄 (*Solanum lycopersicum* Linn.) *SlWRKY81* 的沉默增强了植株对干旱的耐受性^[9];在拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 和杜梨 (*Pyrus betulifolia* Bunge) 中过表达 *PbWRKY40* 可以增强拟南芥植株和杜梨愈伤组织对盐胁迫的抗性,而沉默该基因则使植株和愈伤组

织对盐胁迫更敏感^[10];甜橙 [*Citrus sinensis* (Linn.) Osbeck] 中 *CsWRKY33* 通过结合自身启动子的 W-box 激活苯丙氨酸代谢和次生代谢等抗病途径正调控柑橘抗病过程^[11];棉花 (*Gossypium hirsutum* Linn.) *GhWRKY3* 在病菌侵染时表达量显著上调,其表达也受水杨酸 (SA)、茉莉酸甲酯 (MeJA)、脱落酸 (ABA) 等激素诱导^[12];菊花 [*Chrysanthemum × morifolium* (Ramat.) Hemsl.] *CmWRKY1* 在盐胁迫、低温胁迫、水分胁迫及黑斑病菌和枯萎病菌侵染后表达上调,而在高温胁迫和机械损伤后表达下调^[13];过表达西瓜 [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] WRKY III 家族的 *ClWRKY20* 能提高拟南芥植株对盐和低温胁迫的耐受性^[14]。

自第 1 个 WRKY 超家族成员 *SPF1* 从甘薯 [*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill] 中被分离和鉴定以来,目前,其他植物越来越多的 WRKY 基因被分离鉴定^[15],然而红花中 WRKY 的克隆鉴定却鲜有报道。2019 年, Sivakumar 等^[16]通过 EST 数据集对红花中的 21 个 *CtWRKYs* 进行了多序列比对和系统进化分析,并检测了 5 个 *CtWRKYs* 编码基因在非生物胁迫下的表达量,但并未对基因进行克隆及深入研究。为进一步研究红花 *CtWRKYs* 的功能和抗逆性,本研究在前期对红花 WRKY 基因家族鉴定的基础上,筛选出 2 个特异性基因 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72*,克隆了其蛋白质编码序列 (CDS),并进行了生物信息学分析、多重比对及系统进化分析;检测了这 2 个基因在不同组织及花期的表达量,并分析了其在低温、干旱、盐胁迫下及 MeJA、吲哚乙酸 (IAA)、ABA 诱导下的响应情况,以期深入解析红花 WRKY 转录因子的功能及阐明红

花抗逆的分子机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料红花品种‘豫红花4号’(‘Yuhonghua No. 4’)经河南省农业科学院梁慧珍研究员鉴定。于2021年10月下旬播种于河南省农业科学院现代农业研究开发基地。待幼苗长至4~6枚真叶时,采集幼嫩的根、茎、叶;现蕾后,采集苞片以及不同发育时期的花。以上样品均为5株植株的混合样,液氮速冻后于-80℃冰箱中保存、备用。

挑选籽粒饱满、大小均一的‘豫红花4号’种子播种于装有蛭石的花盆中。发芽6d后将幼苗从蛭石中取出,用自来水冲洗根部,移栽至Hoagland营养液中进行水培。2周后,选取长势一致的幼苗分别移到含有质量体积分数10%PEG6000、100 mmol·L⁻¹ NaCl、100 μmol·L⁻¹ MeJA、100 μmol·L⁻¹ IAA、100 μmol·L⁻¹ ABA的Hoagland营养液中培养;低温处理时,将幼苗放在4℃培养箱中。分别在处理0(对照)、3、6、12、24和48h摘取植株从下向上第3枚真叶,每个处理取5株混匀,放入液氮中速冻后移至-80℃冰箱中保存、备用。实验于恒温光照培养箱中进行,培养条件如下:温度(25±2)℃,空气相对湿度60%~70%,光照度10 000 lx,光照时间16 h·d⁻¹。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取及cDNA合成 按照课题组先前的方法^[17]提取红花根、茎、叶、花蕾及不同花期和胁迫处理样品总RNA,并选择A₂₆₀/A₂₈₀为1.8~2.0,总量1 μg的总RNA反转录为cDNA。

1.2.2 目的基因克隆 以课题组前期红花花冠转录组测序获得的unigene序列为参考序列,使用Primer Premier 5软件设计特异性引物(表1),以‘豫红花4号’叶片cDNA为模板,使用GenStar高保真酶(河南宝格生物技术有限公司)进行PCR扩增。反应体系总体积50 μL,包含2×SuperStar Plus PCR Mix 25 μL、cDNA 4 μL、10 μmol·L⁻¹正向和反向引物各3 μL、ddH₂O 15 μL。反应程序:98℃预变性30 s;98℃变性10 s、55℃退火30 s、72℃延伸1 min,共35个循环;72℃终延伸8 min。将PCR扩增产物按照文献^[17]的方法进行TA克隆后送河南尚亚生物技术公司测序。

表1 用于红花*CtWRKY7*和*CtWRKY72*CDS扩增和基因表达分析的引物序列

Table 1 Primer sequences used for CDS amplification and gene expression analysis of *CtWRKY7* and *CtWRKY72* from *Carthamus tinctorius* Linn.

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
CDS 扩增 CDS amplification	
<i>CtWRKY7</i> -F	ATGCTTACGATCATATGGGACCA
<i>CtWRKY7</i> -R	TTACAAATCGAATCCAGAATCCTA
<i>CtWRKY72</i> -F	ATGATGGAACATCATCATCACC
<i>CtWRKY72</i> -R	TTATAAAAATACGTTTTCTCAAACCTG
基因表达分析 Gene expression analysis	
q <i>CtWRKY7</i> -F	AGGAGAGCACAAACCACAAAA
q <i>CtWRKY7</i> -R	AGTAGAAATGGCAGCAGCAA
q <i>CtWRKY72</i> -F	TGCAGGTTCCAGCTTGTCC
q <i>CtWRKY72</i> -R	AATCTTCGGTTTTCCGCTCTT
<i>Ct60S</i> -F	TGGAGCTCATCAAGAAGGG
<i>Ct60S</i> -R	GGTAAGGACCACAAGACCCTA

1.2.3 生物信息学分析 将目的基因FASTA格式的核苷酸序列导入DNAMAN 6.0软件,对其编码的氨基酸序列进行预测;蛋白质的理化性质、二级结构、跨膜结构和信号肽预测参考文献^[17]的方法。使用Plant-mPLoc在线软件(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)预测蛋白质的亚细胞定位情况。将测序得到的CDS序列与红花基因组数据比对后得到相应的基因组序列,提交GSDS2.0在线软件(<http://gsds.gao-lab.org/>)进行基因结构分析。使用SWISS-MODEL在线软件(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测目的基因编码蛋白质的三级结构;使用PlantCARE在线软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)分析启动子中的顺式作用元件。通过NCBI数据库搜索文献中已报道功能的其他植物WRKY氨基酸序列,使用DNAMAN 6.0软件进行氨基酸序列多重比对分析,并使用MEGA 6.0软件中的Neighbor-joining法构建WRKY蛋白的系统进化树,bootstrap值设为1 000。

1.2.4 实时荧光定量PCR分析 根据测序得到的CDS序列的保守区域,使用Primer Premier 5软件设计实时荧光定量PCR引物(表1),以红花*Ct60S*作为内参基因。扩增反应在QIAquant 96 2 plex real-time Detection System仪器(德国凯杰生物工程有限公司)上完成。反应体系总体积10.0 μL,包含MonAmpTM SYBR[®] Green qPCR Mix 5.0 μL、cDNA (10×) 1.0 μL、10 μmol·L⁻¹正向和反向引物各0.3 μL、Rnase free ddH₂O 3.4 μL。反应程序:95℃预变性30 s;95℃变性10 s、60℃退火30 s,共40个循环。每个

样品设3个生物学重复和3个技术重复,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量^[18],使用IBM SPSS Statistics 20软件进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因的克隆和结构分析

克隆到目的基因后,经测序比对确定 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 的 CDS 序列长度分别为 600 和 861 bp。基因结构分析结果(图 1)显示: *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 全长序列相差较大,长度分别为 1 390 和 2 660 bp,均包含 3 个外显子和 2 个内含子,且均符合 GT-AG 法则。

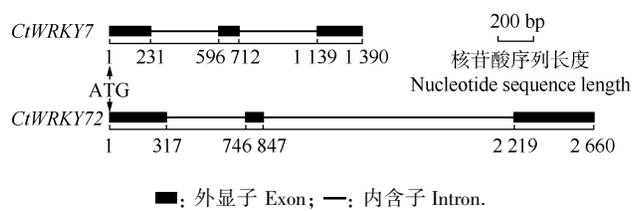


图 1 红花 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因的结构
Fig. 1 Structure of *CtWRKY7* and *CtWRKY72* genes from *Carthamus tinctorius* Linn.

2.2 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 基本理化性质分析 结果(表 2)显示: *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 分别含有 199 和 286 个氨基酸残基。 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 的理论相对分子质量分别为 22 977.65 和 31 985.62,理论等电点分别为 pI 9.39 和 pI 6.33;总平均亲水性值均为负值,不稳定指数均大于 40,表明 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 均为不稳定的亲水性蛋白质。另外, *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 均不存在跨膜结构域且不含信号肽;亚细

表 2 红花 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 蛋白的理化性质¹⁾
Table 2 Physical and chemical properties of *CtWRKY7* and *CtWRKY72* proteins from *Carthamus tinctorius* Linn.¹⁾

蛋白 Protein	<i>n</i>	<i>m</i>	pI	GRAVY	I
<i>CtWRKY7</i>	199	22 977.65	9.39	-0.998	50.52
<i>CtWRKY72</i>	286	31 985.62	6.33	-0.670	49.76

¹⁾ *n*: 氨基酸残基数 Amino acid residue number; *m*: 理论相对分子质量 Theoretical relative molecular mass; pI: 理论等电点 Theoretical isoelectric point; GRAVY: 总平均亲水性值 Grand average of hydrophobicity; I: 不稳定指数 Instability index.

胞定位预测结果显示二者均定位于细胞核。

2.2.2 结构分析 蛋白质二级结构预测结果(图 2-A)显示: *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 的二级结构元件及占比极其相似,无规卷曲占比最大(分别为 52.26% 和 54.90%), α 螺旋占比较大(分别为 31.16% 和 23.43%),延伸链占比较小(分别为 13.07% 和 15.03%), β 折叠占比最小(分别为 3.52% 和 6.64%)。

分别以菜蓟 (*Cynara scolymus* Linn.) A0A124SD22 和 A0A124SGQ1 蛋白为模板,利用 SWISS-MODEL 预测并构建 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 的三级结构模型, *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 与模板的氨基酸序列相似性分别为 79.08% 和 84.81%,GMQE 值分别为 0.77 和 0.62,表明预测结果可靠。如图 2-B 所示, *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 的无规卷曲所占比例较大,均超过 50%,因此形成的三级结构较为松散,中间均由大小不一反向平行的 β 折叠形成包围空间,可与 DNA 特异序列结合。此外, *CtWRKY7* 的 N 端和 C 端均盘旋环绕形成 α 螺旋,而 *CtWRKY72* 仅 N 端含 α 螺旋。

2.2.3 氨基酸序列比对 结果(图 3)显示: *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 都含有高度保守的 WRKY 结构域 (WRKYGQK)。 *CtWRKY7* 与菊花 *CmWRKY15* 的同源性相对最高,序列一致性为 45.09%,含有 CX₅CX₂₃HNH 型锌指结构域,属于 II a 类 WRKY。 *CtWRKY72* 与拟

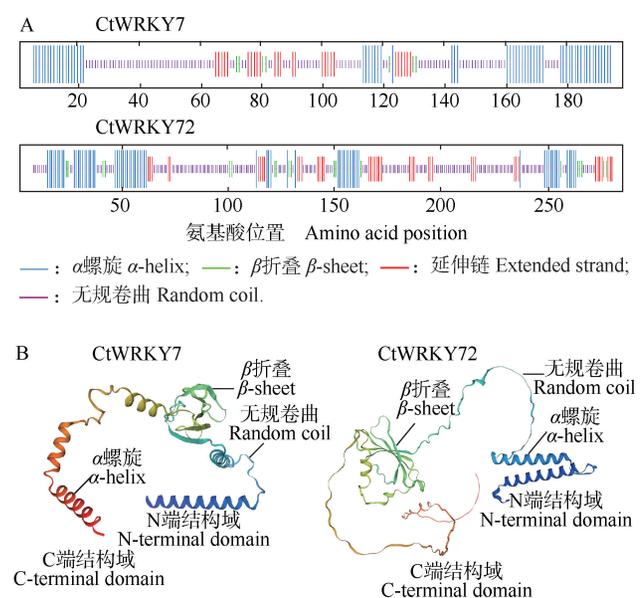
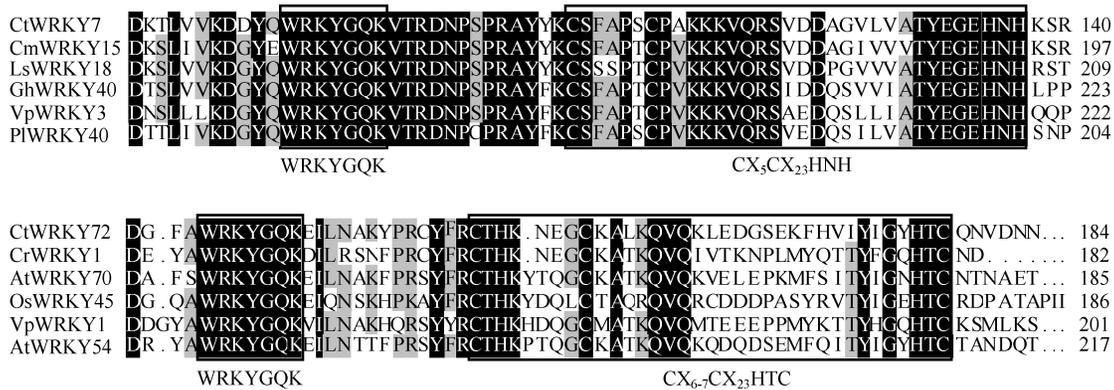


图 2 红花 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 蛋白的二级结构 (A) 和三级结构 (B) 预测

Fig. 2 Prediction of secondary structure (A) and tertiary structure (B) of *CtWRKY7* and *CtWRKY72* proteins from *Carthamus tinctorius* Linn.



Ct: 红花 *Carthamus tinctorius* Linn.; Cm: 菊花 *Chrysanthemum × morifolium* (Ramat.) Hemsl.; Ls: 莴笋 *Lactuca sativa* var. *angustata* Irish ex Bremer; Gh: 棉花 *Gossypium hirsutum* Linn.; Vp: 华东葡萄 *Vitis pseudoreticulata* W. T. Wang; Pl: 芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.; Cr: 长春花 *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don; At: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; Os: 水稻 *Oryza sativa* Linn.

图3 红花 CtWRKY7 和 CtWRKY72 蛋白与其他物种 WRKY 蛋白保守结构域多序列比对
Fig. 3 Multiple sequence alignment of conserved domains of CtWRKY7 and CtWRKY72 proteins from *Carthamus tinctorius* Linn. with WRKY proteins from other species

南芥 AtWRKY70 的同源性相对最高, 序列一致性为 31.58%, 含有 CX₆₋₇CX₂₃HTC 型锌指结构域, 属于 III 类 WRKY。

2.2.4 系统进化分析 结果(图 4)显示: CtWRKY7 与 II a 类 WRKY 蛋白聚在一起, 且与菊花 CmWRKY15 和莴笋(*Lactuca sativa* var. *angustata* Irish ex Bremer) LsWRKY18 首先聚为一支, 亲缘关系最近。CtWRKY72 与拟南芥 AtWRKY70 和 AtWRKY54 聚为一支, 亲缘关系最近, 与华东葡萄 (*Vitis pseudoreticulata* W. T. Wang) VpWRKY1、菊花 CmWRKY11、长春花 [*Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don] CrWRKY1 同属于 III 类 WRKY。

2.3 CtWRKY7 和 CtWRKY72 基因的启动子分析

结果(图 5)显示: CtWRKY7 和 CtWRKY72 基因的启动子序列均包含 TATA-box 和 CAAT-box 等基本核心元件, 此外, 2 个启动子序列均含有 LTR、ARE、STRE 等逆境胁迫应答元件, ABRE、TCA-element、TGACG-motif 等激素响应元件以及 Box 4、G-Box、Sp1 等光响应元件。而 ERE、O₂-site、W-box 等只存在于 CtWRKY7 的启动子中, GC-motif、motif I 等只存在于 CtWRKY72 的启动子中。

2.4 CtWRKY7 和 CtWRKY72 基因在不同组织中的表达分析

组织表达分析结果(图 6)显示: CtWRKY7 和 CtWRKY72 在红花的各组织中均有表达, 其中, CtWRKY7 在根中的相对表达量最高, 分别是茎、叶、

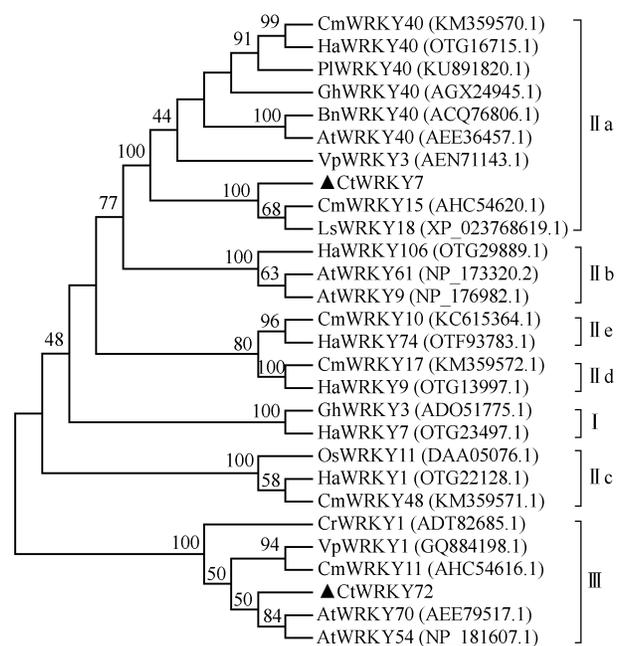
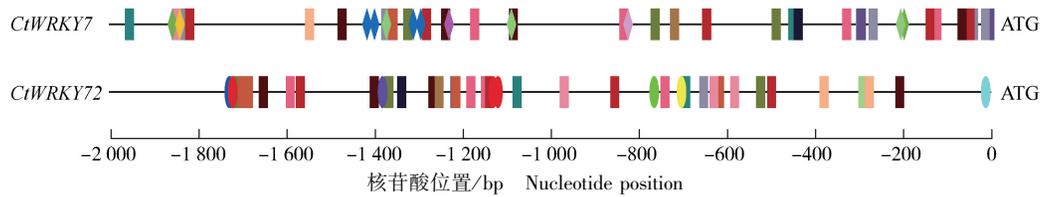


图4 红花 CtWRKY7 和 CtWRKY72 蛋白与其他物种 WRKY 蛋白的系统进化分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis of CtWRKY7 and CtWRKY72 proteins from *Carthamus tinctorius* Linn. and WRKY proteins from other species



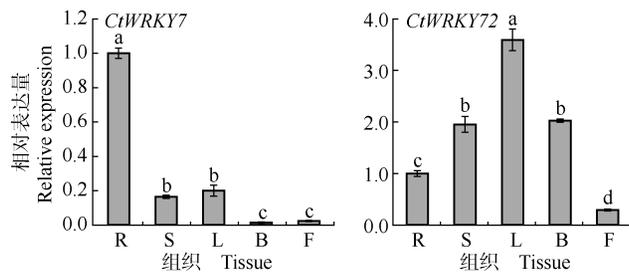
◆: TCT-motif(部分光响应元件 Part of light responsive elements); ◆: CAT-box(分生组织表达相关调控元件 Regulatory element related to meristem expression); ◆: MRE(参与光反应的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light reaction); ◆: ERE(乙烯响应元件 Ethylene responsive element); ◆: O2-site(玉米醇溶蛋白代谢调控元件 Zein metabolism regulatory element); ◆: W-box(防卫和胁迫响应调控元件 Defense and stress response regulatory element); ◆: AAAC-motif(光响应元件 Light responsive element); ◆: ATC-motif(参与光反应的保守 DNA 模块的部分元件 Part of conserved DNA modules involved in light reaction); ◆: GATA-motif(部分光响应元件 Part of light responsive elements); ◆: I-box(部分光响应元件 Part of light responsive elements); ◆: GC-motif(参与缺氧特异性诱导的类增强子元件 Enhancer-like element involved in anoxic specific inducibility); ◆: motif I(根特异性调控元件 Root specific regulatory element); ◆: MYC(干旱响应调控元件 Drought response regulatory element); ◆: MYB(干旱、高盐和低温响应调控元件 Drought, high-salt, low-temperature response regulatory element); ◆: LTR(低温响应调控元件 Low-temperature response regulatory element); ◆: ARE(厌氧诱导所必需的调控元件 Regulatory element essential for anaerobic induction); ◆: WUN-motif(创伤响应元件 Wound responsive element); ◆: STRE(胁迫响应元件 Stress responsive element); ◆: ABRE(脱落酸响应调控元件 Abscisic acid response regulatory element); ◆: Box 4(参与光反应的保守 DNA 模块的部分元件 Part of conserved DNA modules involved in light reaction); ◆: Sp1(光响应元件 Light responsive element); ◆: TCA-element(水杨酸响应调控元件 Salicylic acid response regulatory element); ◆: CGTCA/TGACG-motif(茉莉酸甲酯响应调控元件 Methyl jasmonate response regulatory element); ◆: G-box(光响应元件 Light responsive element); ◆: GT1-motif(光响应元件 Light responsive element).

菱形代表 *CtWRKY7* 特有元件, 椭圆代表 *CtWRKY72* 特有元件, 矩形代表 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 共有元件 Rhombuses represent elements unique to *CtWRKY7*, ovals represent elements unique to *CtWRKY72*, and rectangles represent elements common to *CtWRKY7* and *CtWRKY72*.

图 5 红花 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因启动子顺式作用元件分析

Fig. 5 Analysis on *cis*-acting elements in promoters of *CtWRKY7* and *CtWRKY72* genes from *Carthamus tinctorius* Linn.

苞片、花的 6.06、4.98、72.46、41.15 倍; *CtWRKY72* 在叶中的相对表达量最高, 分别是根、茎、苞片、花的 3.60、1.84、1.77、12.25 倍。



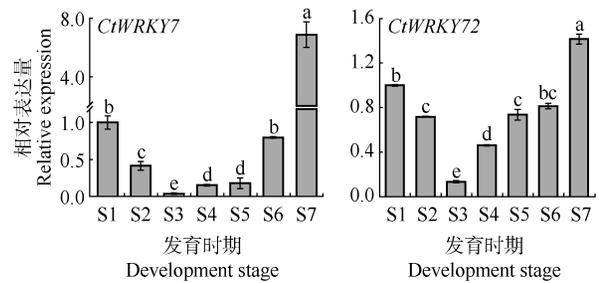
R: 根 Root; S: 茎 Stem; L: 叶 Leaf; B: 苞片 Bract; F: 花 Flower. 不同小写字母表示在不同组织间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases represent the significant differences ($P < 0.05$) between different tissues.

图 6 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因在红花不同组织的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *CtWRKY7* and *CtWRKY72* genes in different tissues of *Carthamus tinctorius* Linn.

2.5 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因在不同发育时期花中的表达分析

结果(图 7)显示:*CtWRKY7* 在红花花发育过程中(即花组织形成初期、花组织形成中期、花蕾期)相对表达量逐渐下降,而在花开放的过程中(即露瓣期、初开期、盛花期、初衰期)相对表达量又逐渐上升,至初衰期相对表达量达到最大。*CtWRKY72* 相对表达量变化趋势与 *CtWRKY7* 相似。



S1: 花组织形成初期 Initial stage of flower tissue formation; S2: 花组织形成中期 Middle stage of flower tissue formation; S3: 花蕾期 Bud stage; S4: 露瓣期 Petal exposing stage; S5: 初开期 Initial opening stage; S6: 盛花期 Blooming stage; S7: 初衰期 Initial decline stage. 不同小写字母表示在不同发育时期间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases represent the significant differences ($P < 0.05$) between different development stages.

图 7 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因在红花不同发育时期花中的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *CtWRKY7* and *CtWRKY72* genes in flowers at different development stages of *Carthamus tinctorius* Linn.

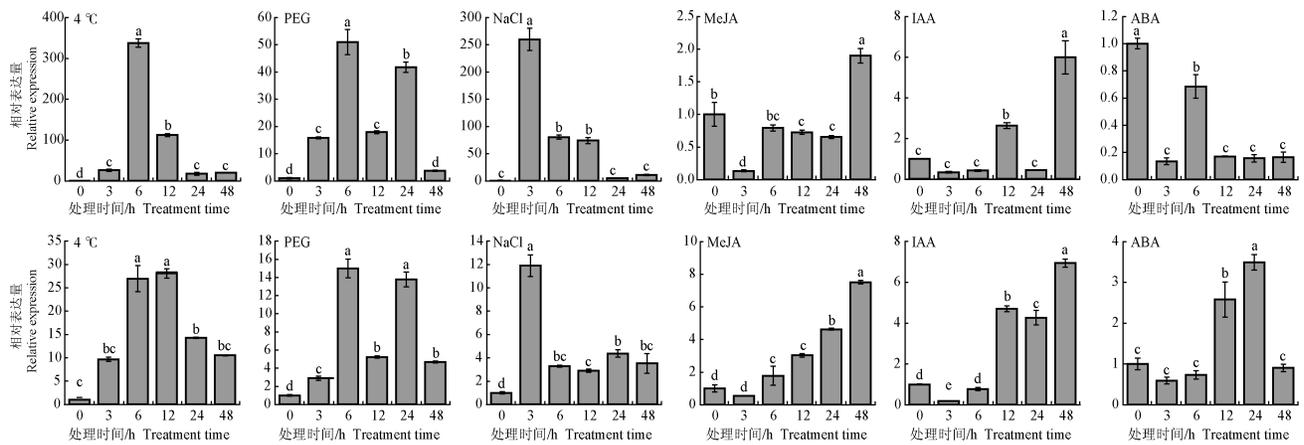
2.6 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因在逆境胁迫和激素诱导下的表达分析

结果(图 8)显示:*CtWRKY7* 的相对表达量在低温 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 胁迫后急剧上升,在 6 h 达到峰值,约为对照 (0 h) 的 338 倍,随后逐渐下降。在干旱(质量体积分数 10% PEG6000)的胁迫下,*CtWRKY7* 的相对表达量逐渐上升,也在 6 h 达到峰值,约为对照的 51 倍,随后迅速下降,在 24 h 再次升高,约为对照的 42 倍,随后急剧下降。在 NaCl 胁迫下,*CtWRKY7* 的相对表达

量在 3 h 显著 ($P < 0.05$) 上升且达到峰值, 约为对照的 260 倍, 而后迅速下降。在外源 MeJA 诱导下, *CtWRKY7* 的相对表达量在 3 h 迅速下降, 随后恢复至接近对照水平, 而在 48 h 显著上调, 约为对照的 2 倍。在外源 IAA 诱导下, *CtWRKY7* 的相对表达量在 3 和 6 h 略微降低, 12 h 明显上调, 约为对照的 2.5 倍, 随后迅速下降, 48 h 再次上调达到最大值, 约为对照的 6 倍。在外源 ABA 诱导下, *CtWRKY7* 的相对表达量显著低于对照。

CtWRKY72 的相对表达量在低温胁迫 12 h 达到高峰 (与 6 h 差异不显著), 约为对照的 28 倍, 随后逐

渐下降。在干旱胁迫 6 h, *CtWRKY72* 的相对表达量达到第 1 个高峰, 约为对照的 15 倍, 随后迅速下降, 在 24 h 再次升高, 约为对照的 14 倍, 随后急剧下降。*CtWRKY72* 的相对表达量在 NaCl 胁迫 3 h 即达到最大值, 约为对照的 12 倍, 随后急剧下降。在外源 MeJA 诱导下, *CtWRKY72* 的相对表达量整体呈逐渐上升的趋势, 48 h 达到最大值, 约为对照的 8 倍。*CtWRKY72* 在外源 IAA 诱导下的表达情况与 MeJA 相似, 同样在 48 h 达到最大, 约为对照的 7 倍。在外源 ABA 诱导下, *CtWRKY72* 的相对表达量在 24 h 达到最大值, 约为对照的 3.5 倍, 随后迅速下降。



PEG: 聚乙二醇 Polyethylene glycol; MeJA: 茉莉酸甲酯 Methyl jasmonate; IAA: 吲哚乙酸 Indoleacetic acid; ABA: 脱落酸 Abscisic acid. 不同小写字母表示在不同处理时间间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases represent the significant differences ($P < 0.05$) between different treatment times.

图 8 不同处理下红花幼苗叶片 *CtWRKY7* (第 1 行) 和 *CtWRKY72* (第 2 行) 基因的表达模式

Fig. 8 Expression pattern of *CtWRKY7* (the first line) and *CtWRKY72* (the second line) genes in leaves of *Carthamus tinctorius* Linn. seedlings under different treatments

3 讨论和结论

WRKY 转录因子通常包含 1 或 2 个约 60 个保守氨基酸组成的 WRKY 结构域, 而 WRKY 结构域包含 1 个高度保守的 WRKYGQK 基序和 1 个 C2-H2 或 C2-HC 类型的锌指状基序^[19]。根据 WRKY 结构域的数量和锌指结构类型, WRKY 转录因子成员可分为 I、II 和 III 类。有 2 个 WRKY 结构域的属于 I 类, 只有 1 个 WRKY 结构域的属于 II 或 III 类。I 和 II 类成员均具有锌指状基序 C2-H2 (C-X₄₋₅-CX₂₂₋₂₃-H-X-H), 其中 X 可以是任何氨基酸; III 类 WRKY 蛋白含有 1 个 C2-HC (C-X₇-CX₂₃-H-X-C) 锌指状基序^[20]。基于 WRKY 结构域的系统发育分析、保守结

构域和内含子位置等, 可以将 II 类进一步细分为 II a、II b、II c、II d、II e 亚类^[11], 本研究系统进化分析结果验证了这一分类, 且多序列比对和系统进化分析结果表明红花 *CtWRKY7* 与菊花 *CmWRKY15*、拟南芥 *AtWRKY40*、棉花 *GhWRKY40*、芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) *PlWRKY40*、华东葡萄 *VpWRKY3* 和欧洲油菜 (*Brassica napus* Linn.) *BnWRKY40* 均属于 II a 类 WRKY。

研究发现: 过表达 *CmWRKY15* 增强了菊花对黑斑病的敏感性, 且转基因株系中 ABA 正调控基因及合成相关基因的表达被抑制, 导致 ABA 浓度降低, 气孔开放, 黑斑病菌容易侵入^[13]。拟南芥 *AtWRKY40* 通过下调 ABA 响应基因的表达来抑制 ABA 信号以促进种子萌发和萌发后生长, 同时参与干旱胁迫的响

应^[21-22]。华东葡萄 *VpWRKY3* 在 SA 和乙烯诱导及干旱胁迫下特异性积累,且其编码基因在烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) 中过表达增强了烟草对青枯雷尔氏菌的抗性;此外, *VpWRKY3* 还参与 ABA 信号通路和盐胁迫调控^[23]。棉花 *GhWRKY40* 的表达量也在外源 SA、MeJA、乙烯诱导下升高^[24]。本研究中,红花 *CtWRKY7* 的表达量在外源 ABA 诱导下降低,在干旱胁迫、盐胁迫和 MeJA 诱导下升高,这与上述研究结果相似。推测 *CtWRKY7* 可能也在红花多种逆境胁迫中发挥重要作用,且与 ABA 合成途径相关,需要进一步实验验证。

系统进化分析结果显示:红花 *CtWRKY72* 与拟南芥 *AtWRKY54* 和 *AtWRKY70* 首先聚为一支,亲缘关系最近,同属于Ⅲ类 WRKY;据报道拟南芥 *AtWRKY54* 和 *AtWRKY70* 相互作用可以延缓拟南芥叶片衰老^[6],表明 *CtWRKY72* 可能也有延缓衰老的功能。基因表达分析结果显示:*CtWRKY72* 在花组织形成过程中表达量逐渐下降,在花开放过程中表达量逐渐上升,在花初衰期表达量最高。蜡梅 [*Chimonanthus praecox* (Linn.) Link] *CpWRKY46* 在花萼及雌蕊原基分化期表达量较高,花瓣及雄蕊原基的表达量相对较低,花开放过程中表达量逐渐增加;*CpWRKY71* 在花初衰期表达量最高,在花蕾期、露瓣期及初开期表达量最低^[25],与本研究结果相似。因此推测 *CtWRKY72* 可能参与调控红花的花早期发育和花衰老。此外, *CtWRKY7* 在红花不同花期的表达模式与 *CtWRKY72* 相似,推测 *CtWRKY7* 也有类似功能。

启动子在基因的表达调控中至关重要,启动子分析可以揭示基因在不同生长阶段、不同环境下的表达变化情况,为后续基因功能的研究奠定基础。本研究中 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因启动子含有多种逆境胁迫响应元件,暗示 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 能及时响应外界环境的变化,在红花的生长发育和环境胁迫响应过程中发挥重要作用,本研究中逆境胁迫下的基因表达模式分析证实了这一结果。研究发现, W-box 是 WRKY 转录因子家族成员的结合位点,在结构基因的启动子区域,甚至在 WRKY 基因启动子区域,存在多个 W-box^[26]。WRKY 转录因子可以顺式或反式结合 W-box,实现自我和交叉调节,从而引起级联反应^[11]。本研究的启动子分析结果显示: W-box 只存在于 *CtWRKY7* 的启动子中,表明 *CtWRKY7* 可能存在自我调节或与其他 WRKY 蛋白存在交叉调节,而

CtWRKY72 不存在自我和交叉调节,因此二者响应逆境胁迫的机制可能不同。

组织特异性表达分析结果显示: *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 在红花的不同组织中均有表达,其中 *CtWRKY7* 在根中表达量最高、在苞片中表达量最低,而 *CtWRKY72* 在叶中表达量最高、在花中表达量最低。这与芍药 *PlWRKY40* 在叶和萼片中表达量较高,茎和根中表达量较低^[27]及紫穗槐 (*Amorpha fruticosa* Linn.) *WRKY42* 在叶和花中表达量高,根中表达量最低^[28]的结果不一致;而与长春花 *CrWRKY1* 在根中表达量最高,在花中表达量最低^[29]及紫花苜蓿 (*Medicago sativa* Linn.) *MsWRKY42* 在根、叶和茎中表达量较高,在花中表达量较低^[30]的结果相似。茶树 [*Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze] 的 9 个 WRKY 基因中, *CsWRKY1*、*CsWRKY8* 和 *CsWRKY9* 在花中表达量最高,其他 6 个基因在根中表达量最高,表现出不同的组织表达模式^[31]。因此,不同物种之间 WRKY 在不同组织中的表达存在差异,同一物种的不同 WRKY 在不同组织中的表达也存在差异。

综上所述,本研究首次克隆了红花的 *CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 基因,二者均含有 3 个外显子和 2 个内含子,其编码蛋白无跨膜结构和信号肽,定位于细胞核;二级结构均主要由无规卷曲组成,三级结构均较为松散。*CtWRKY7* 的启动子含有 W-box,可能存在自我和交叉调节,其编码氨基酸序列与已知功能的菊花 *CmWRKY15* 的同源性最高;*CtWRKY72* 与拟南芥中调控叶片衰老的 *AtWRKY70* 及 *AtWRKY54* 亲缘关系最近;*CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 分别属于 WRKY 转录因子的Ⅱa 和Ⅲ类。*CtWRKY7* 和 *CtWRKY72* 可能参与红花的花早期发育及花衰老过程,且能响应多种逆境胁迫,但作用机制不同。

参考文献:

- [1] TU Y H, XUE Y R, GUO D D, et al. *Carthami flos*: a review of its ethnopharmacology, pharmacology and clinical applications [J]. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2015, 25(5): 553-566.
- [2] HUSSAIN M I, LYRA D A, FAROOQ M, et al. Salt and drought stresses in safflower: a review [J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2016, 36: 4.
- [3] HUANG S Z, HU L J, ZHANG S H, et al. Rice OsWRKY50 mediates ABA-dependent seed germination and seedling growth, and ABA-independent salt stress tolerance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22: 8625.
- [4] HUNG F Y, SHIH Y H, LIN P Y, et al. WRKY63 transcriptional

- activation of *COOLAIR* and *COLDIAIR* regulates vernalization-induced flowering[J]. *Plant Physiology*, 2022, 190: 532–547.
- [5] JIA C H, WANG Z, WANG J Y, et al. Genome-wide analysis of the banana WRKY transcription factor gene family closely related to fruit ripening and stress[J]. *Plants*, 2022, 11: 662.
- [6] BESSEAU S, LI J, PALVA E T. WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7): 2667–2679.
- [7] GOYAL P, DEVI R, VERMA B, et al. WRKY transcription factors: evolution, regulation, and functional diversity in plants[J]. *Protoplasma*, 2023, 260: 331–348.
- [8] WANG M Q, HUANG Q X, LIN P, et al. The overexpression of a transcription factor gene *VbWRKY32* enhances the cold tolerance in *Verbena bonariensis* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 10: 1746.
- [9] AHAMMED G J, LI X, YANG Y X, et al. Tomato *WRKY81* acts as a negative regulator for drought tolerance by modulating guard cell H₂O₂-mediated stomatal closure [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2020, 171: 103960.
- [10] LIN L K, YUAN K L, HUANG Y D, et al. A WRKY transcription factor *PbWRKY40* from *Pyrus betulaefolia* functions positively in salt tolerance and modulating organic acid accumulation by regulating *PbVHA-B1* expression [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2022, 196: 104782.
- [11] WANG W J, LI T, CHEN J L, et al. A self-regulated transcription factor *CsWRKY33* enhances resistance of citrus fruit to *Penicillium digitatum* [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 198: 112267.
- [12] GUO R Y, YU F F, GAO Z, et al. *GhWRKY3*, a novel cotton (*Gossypium hirsutum* L.) WRKY gene, is involved in diverse stress responses[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 38(1): 49–58.
- [13] SONG A P, LI P L, JIANG J F, et al. Phylogenetic and transcription analysis of chrysanthemum WRKY transcription factors [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(8): 14442–14455.
- [14] ZHU L, LI S L, OUYANG M Z, et al. Overexpression of watermelon *CiWRKY20* in transgenic *Arabidopsis* improves salt and low-temperature tolerance [J]. *Scientia Horticulturae*, 2022, 295: 110848.
- [15] 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 β -amylase from sweet potato [J]. *Molecular and General Genetics*, 1994, 244: 563–571.
- [16] SIVAKUMAR M, PANDURANGIAH M, JAYAMMA N, et al. Identification of WRKY transcription factors from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and their expression in response to abiotic stress[J]. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 2019, 20(23/24): 1209–1219.
- [17] 鲁丹丹, 谭政委, 余永亮, 等. 红花 *CtANR2* 和 *CtANR3* 基因的克隆、结构及表达模式分析[J]. *华北农学报*, 2023, 38(1): 84–93.
- [18] RAO X Y, HUANG X L, ZHOU Z C, 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): 71–85.
- [19] WANI S H, ANAND S, SINGH B, et al. WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects[J]. *Plant Cell Reports*, 2021, 40(7): 1071–1085.
- [20] 郑浩杰, 杭 焯, 王晓红, 等. 药用植物 WRKY 转录因子家族研究进展[J]. *植物生理学报*, 2022, 58(6): 1055–1067.
- [21] CHEN H, LAI Z B, SHI J W, et al. Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10: 281.
- [22] 车永梅, 孙艳君, 卢松冲, 等. *AtWRKY40* 参与拟南芥干旱胁迫响应过程[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(3): 456–464.
- [23] ZHU Z G, SHI J L, CAO J L, et al. *VpWRKY3*, a biotic and abiotic stress-related transcription factor from the Chinese wild *Vitis pseudoreticulata*[J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31: 2109–2120.
- [24] WANG X L, YAN Y, LI Y Z, et al. *GhWRKY40*, a multiple stress-responsive cotton WRKY gene, plays an important role in the wounding response and enhances susceptibility to *Ralstonia solanacearum* infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e93577.
- [25] 黄仁维. 蜡梅 *CpWRKY46* 和 *CpWRKY71* 基因的克隆及功能分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2020: 40–42.
- [26] GOYAL P, MANZOOR M M, VISHWAKARMA R A, et al. A comprehensive transcriptome-wide identification and screening of WRKY gene family engaged in abiotic stress in *Glycyrrhiza glabra* [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 373.
- [27] 李俊杰, 韩璐璐, 马 燕, 等. 芍药转录因子 *PiWRKY40* 的克隆及表达分析[J]. *植物生理学报*, 2017, 53(4): 609–618.
- [28] 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.
- [29] SUTTIPANTA N, PATTANAIAK S, KULSHRESTHA M. The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiology*, 2011, 157: 2081–2093.
- [30] 刘佼佼, 王学敏, 马 琳, 等. 紫花苜蓿 *MsWRKY42* 的分离、鉴定及其对非生物胁迫的响应[J]. *中国农业科学*, 2020, 53(17): 3455–3466.
- [31] 王鹏杰, 陈 笛, 林 滢, 等. 8个茶树 WRKY 转录因子基因的克隆与表达[J]. *中草药*, 2019, 50(3): 685–693.

(责任编辑: 吴蕊夷)