

芥菜 *BjuWRKY75* 基因表达及其与开花整合子 *BjuFT* 互作

冯俊杰^{1,2}, 王远达^{1,2}, 邓琴霖^{1,2}, 翟海涛^{1,2}, 叶旭^{1,2}, 魏大勇^{1,2}, 王志敏^{1,2}, 汤青林^{1,2}

1 西南大学 园艺园林学院 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715

2 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715

冯俊杰, 王远达, 邓琴霖, 翟海涛, 叶旭, 魏大勇, 王志敏, 汤青林. 芥菜 *BjuWRKY75* 基因表达及其与开花整合子 *BjuFT* 互作. 生物工程学报, 2022, 38(8): 3029-3040.

FENG JJ, WANG YD, DENG QL, ZHAI HT, YE X, WEI DY, WANG ZM, TANG QL. Expression of *Brassica juncea* *BjuWRKY75* and its interactions with flowering integrator *BjuFT*. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 3029-3040.

摘要: 芥菜 (*Brassica juncea*) 是十字花科芸薹属一年或二年生蔬菜, 其产品器官的产量和品质会受到开花时间的影响。WRKY 家族成员具有响应生物和非生物胁迫、发育调控和信号转导等作用。WRKY75 是 WRKY 家族中能够调节开花的重要成员, 但在芥菜中的开花调控机制还未见报道。本研究克隆了芥菜 *BjuWRKY75* 基因, 发现其编码蛋白具有高度保守的 WRKY 结构域, 属于 II 类 WRKY 蛋白, 与黑芥 *BniWRKY75* 同源性最高。*BjuWRKY75* 在花中表达丰度显著高于叶和茎, 并且在叶中表达较为稳定。*BjuWRKY75* 定位于细胞核, 能够与含有 W-box 应答元件的开花整合子 *BjuFT* 的启动子相互作用, 且能转录激活下游基因表达。*BjuWRKY75* 转入拟南芥可显著提早开花。综上所述, *BjuWRKY75* 能够直接靶向 *BjuFT* 从而促进开花。这为深入研究 *BjuWRKY75* 开花分子调控奠定了基础。

关键词: 芥菜; *BjuWRKY75*; 表达模式; *BjuFT* 启动子; 开花

Received: April 16, 2022; **Accepted:** May 30, 2022; **Published online:** June 19, 2022

Supported by: Natural Science Foundation of Chongqing, China (cstc2019jcyj-zdxmX0022); Technology Innovation and Application Development Project of CQ CSTC, China (cstc2021jscx-gksbX0021)

Corresponding author: TANG Qinglin. Tel: +86-23-68251274; E-mail: tangql@swu.edu.cn

基金项目: 重庆市自然科学基金 (cstc2019jcyj-zdxmX0022); 重庆市技术创新与应用发展专项 (cstc2021jscx-gksbX0021)

Expression of *Brassica juncea* *BjuWRKY75* and its interactions with flowering integrator *BjuFT*

FENG Junjie^{1,2}, WANG Yuanda^{1,2}, DENG Qinlin^{1,2}, ZHAI Haitao^{1,2}, YE Xu^{1,2}, WEI Dayong^{1,2}, WANG Zhimin^{1,2}, TANG Qinglin^{1,2}

1 Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Chongqing Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715, China

Abstract: *Brassica juncea* is a yearly or biennial vegetable in *Brassica* of Cruciferae. The yield and quality of its product organs are affected by flowering time. WRKY proteins family can respond to biological and abiotic stresses, developmental regulation and signal transduction. WRKY75 is an important member of WRKY family which can regulate flowering, but the flowering regulation mechanism in *B. juncea* has not been reported. In this study, a gene *BjuWRKY75* in *B. juncea* was cloned, and the encoded-protein belonged to the group II of WRKY protein with highly conserved domain. *BjuWRKY75* had the highest homology with *BriWRKY75* of *Brassica nigra*. The relative expression level of *BjuWRKY75* in flowers was significantly higher than that in leaves and stems, and it was expressed stably in leaves. *BjuWRKY75* protein was localized in the nucleus and interacted with the promoter of the flowering integrator *BjuFT*, which contained the W-box response element for the interaction between protein and DNA. Thus, it could transcriptionally activate the expression of the downstream genes. The overexpression of *BjuWRKY75* in *Arabidopsis* led to earlier flowering significantly. In conclusion, *BjuWRKY75* could directly target the promoter of *BjuFT* and accelerate flowering. These results may facilitate further study on the regulation of flowering molecules of *BjuWRKY75*.

Keywords: *Brassica juncea*; *BjuWRKY75*; expression pattern; *BjuFT* promoter; flowering

开花是有性繁殖植物从营养阶段向生殖阶段的重要发育转变。适宜的开花时间不仅影响果实或种子发育,也会影响营养器官的产量和品质。例如,茎用芥菜(茎瘤芥、儿菜等)提早抽薹开花会导致茎用器官品质和产量降低。因此,开花调控研究一直以来被人们高度关注。开花受到复杂的外源信号和内源因子协同调控,形成5个主要的开花调节途径:自主途径、光周期途径、春化途径、年龄途径和赤霉素(GA)途径^[1-7]。尽管不同调控路径中

存在许多调节因子,但它们最终都将汇集到一些开花整合子,例如,*FLOWERING LOCUS T (FT)*、*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)*和*LEAFY (LFY)*,以调节开花时间。

WRKY蛋白家族包含众多成员,它们一般都具有一个或两个保守的WRKY结构域,此结构域能够与DNA结合以发挥功能。WRKY结构域通常在N端含有WRKYGQK基序,在C端具有C2H2或C2HC锌指基序^[8]。经过二十余年

研究,人们根据 WRKY 结构域的数量和 C 端锌指基序的结构,将 WRKY 家族分为 3 类: I、II 和 III 类。根据氨基酸 (AA) 的主要序列,II 类蛋白又被分为 II a、II b、II c、II d 和 II e 亚类^[9]。大量的分子和遗传学研究表明,WRKY 转录因子在许多生物和非生物胁迫响应、植物信号转导和植物发育调控等方面发挥着重要作用。例如,在拟南芥中 *AtWRKY33* 能够参与防御病原体入侵;*AtWRKY63* 参与响应 ABA 和干旱胁迫;*AtWRKY25*、*AtWRKY26* 和 *AtWRKY33* 在耐热胁迫的调节中发挥作用;*AtWRKY71* 通过转录调节 RAX 基因来控制茎的分枝等^[10-19]。

WRKY75 属于 WRKY 蛋白家族,具有保守的 WRKY 结构域和 C2H2 锌指结构,被归为 II 类 WRKY 蛋白,已经被证明在诱导植物开花中具有重要作用,并参与胁迫响应^[20-24]。例如,在杨树中,*PagWRKY75* 可以通过调节多种生理过程来负向调节植物的耐盐性和渗透性^[20]。据报道,*AtWRKY75* 可能是茉莉酸或水杨酸介导的 *Pcc* (*Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*) 防御信号反应的正调节因子^[22]。花生中 *AhWRKY75* 能够增强植株对盐胁迫的耐受性^[23]。在拟南芥中,*WRKY75* 基因缺失导致开花延迟,而 *WRKY75* 基因的过表达则显著提早开花,并且 *WRKY75* 蛋白能够激活 *FT* 的转录,这种激活作用可以通过与 DELLA 蛋白 (如 RGL1 和 GAI) 互作而被抑制^[24]。但是,芥菜 (*Brassica juncea*) 中 *WRKY75* 参与开花调控的分子机制还未得到深入诠释。

芥菜是十字花科芸薹属蔬菜,在我国长江流域广泛栽培。大面积生产上常发生的“未熟抽薹”或“提早开花”会严重影响芥菜产量及品质。因此,开花调控一直以来是科研工作者关注的热点,深入开展相关研究对生产、育种和产业发展均意义重大。本文克隆了芥菜 *BjuWRKY75*

(*BjuB035948*) 基因,分析了该基因的表达规律、亚细胞定位及其功能,并解析了芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白与开花整合子 *BjuFT* (*BjuB048175*) 之间的蛋白-DNA 互作机制。这将为芥菜 *BjuWRKY75* 开花分子调控以及耐抽薹新种质创制等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

芥菜、拟南芥和本氏烟均来源于重庆市蔬菜学重点实验室,种植于 RXZ 型人工气候箱。

高保真酶 Easy Pfu DNA Polymerase 购自北京全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒以及胶回收纯化试剂盒购自 Vazyme 公司。酵母菌株 Y1HGold、酵母单杂交质粒 (pGADT7、pAbAi、p53-AbAi) 和金担子素 (Aureobasidin A, AbA) 均购自 Clontech 公司。农杆菌 GV3101 和 pSoup 菌株、双萤光素酶载体 pGreenII 62-SK、pGreenII 0800-LUC 由本实验室保存。

1.2 基因克隆、多序列比对及进化树构建

对芥菜 *WRKY75* 基因序列 (源于 Brassicaceae 数据库) 进行分析,根据其保守区域设计引物 (表 1)。以芥菜成熟的花器官为材料提取 RNA,并反转录以获得 cDNA,以此为模板克隆芥菜 *BjuWRKY75* 的 cDNA 序列。

利用 BioXM2.7 软件对十字花科不同植物 (*Bju* 芥菜、*Bra* 白菜、*Bna* 油菜、*Bni* 黑芥和 *Bo* 甘蓝) 的 *WRKY75* 蛋白全长序列进行比对分析。系统发育分析采用邻接法 (neighbor-joining, NJ),使用 MEGA10.2.0 构建系统发育树 (1 000 个 bootstrap 重复)。使用在线网站 EvolView 进行进化树美化。

1.3 载体构建

以表 1 中的对应引物组合对 *BjuWRKY75* 进行 PCR 扩增以得到亚克隆产物。对亚克隆产物

和载体空载分别进行双酶切,经电泳分析条带后对分子量大小正确的条带进行产物纯化,使用 Solution I 连接酶进行基因与载体的连接(16 °C 金属浴 2 h),转化大肠杆菌后进行测序,对测序结果正确的菌液进行质粒提取,并对质粒进行双酶切电泳分析。

其中,添加酶切位点 *Xba* I 和 *Kpn* I 的亚克隆产物连接至 pCAMBIA1300-*GFP*,含酶切位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I 的亚克隆产物分别连接至 pGADT7、pGreenII 62-SK 和 pBin35SRed3 载体。此外,使用表 1 中 *BjuFT* 启动子的克隆引物进行启动子亚克隆,并在克隆引物上添加相应酶切位点,将启动子序列分别连接至 pAbAi (*Hind* III 和 *Xho* I) 和 pGreenII 0 800-LUC (*Kpn* I 和 *Hind* III) 载体,带有酶切位点的亚克

隆引物如表 1 所示。所有实验环节均正确的质粒将用于进一步的实验(酵母单杂、亚细胞定位、双荧光素酶检测以及转基因实验)。

1.4 亚细胞定位

将芥菜 *BjuWRKY75* 去掉末端终止密码子的 cDNA 序列融合到亚细胞定位载体 pCAMBIA1300-*GFP*,获得重组质粒 pCAMBIA1300-*BjuWRKY75-GFP*,并转入农杆菌菌株 GV3101,侵染烟草叶片 48 h 后取样,激光共聚焦显微镜观察烟草叶片的荧光。

1.5 实时荧光定量分析

取不同部位和不同发育时期的芥菜样品,冻存于-80 °C 备用。以 TIANGEN 生物公司的 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (YEASEN)

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Names	Sequences (5'→3')
BjuWRKY75-F	ATGGAGGGATATGATGATGG
BjuWRKY75-R	AAAAGAAGAGTAGATTTGCA
BjuWRKY75-qPCR-F	TTCAACTCCCTGCTTTCTCG
BjuWRKY75-qPCR-R	TATGCTCCGTTTCTGTCCG
BjuACTIN2-qPCR-F	GCTGACCGTATGAGCAAAGA
BjuACTIN2-qPCR-R	GTTGGAAAGTGCTGAGGGAT
p1300-WRKY75-F	TGCTCTAGAAATGGAGGGATATGATGATGGA
p1300-WRKY75-R	CGGGGTACCAAAGAAGAGTAGATTTGCA
pGADT7-WRKY75-F	CGCGGATCCATGGAGGGATATGATGATGGA
pGADT7-WRKY75-R	CCGGAATTCAAAAGAAGAGTAGATTTGCA
pGreenII 62-SK-WRKY75-F	CGCGGATCCATGGAGGGATATGATGATGGA
pGreenII 62-SK-WRKY75-R	CCGGAATTCAAAAGAA GAGTAGATTTGCA
pBin35SRed3-WRKY75-F	CGCGGATCCATGGAGGGATATGATGATGGA
pBin35SRed3-WRKY75-R	CCGGAATTCAAAAGAAGAGTAGATTTGCA
ProBjuFT-F	TGTCTATATATTGATGCATTGTC
ProBjuFT-R	ATTTGATCTAAAACAAACAGGTGG
pAbAi-BjuFT-F	CCCAAGCTTTGTCTATATATTGATGCATTGTC
pAbAi-BjuFT-R	CCGCTCGAGATTTGATCTAAAACAAACAGGTGG
pGreenII 0800-LUC-BjuFT-F	CGGGGTACCTGTCTATATATTGATGCATTGTC
pGreenII 0800-LUC-BjuFT-R	CCCAAGCTTATTTGATCTAAAACAAACAGGTGGT

The restriction enzymes are underlined.

去除 DNA 污染, 并逆转录成 cDNA 后保存。以 *BjuACTIN2* 基因作为内参对照, 使用 SYBR qPCR SuperMix Plus (novoprotein scientific) 在 CFX96tm 实时荧光定量 PCR 检测系统 (Bio-Rad) 上进行定量 PCR (RT-qPCR) 实验, 引物参见表 1。PCR 程序采用高特异性“两步扩增”, 分别为 95 °C 1 min; 95 °C 20 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相对表达量^[25]。利用 GraphPad Prism 5 软件构建图表, SPSS 软件进行方差分析、Duncan 差异显著性检验, 显著水平 $\alpha=0.05$ 。

1.6 转基因植株鉴定

利用冻融法将构建好的 pBin35SRed3-*BjuWRKY75* 转基因载体导入根癌农杆菌 GV3101, 再用农杆菌沾花法转化哥伦比亚型拟南芥 (WT)。对侵染后的植株所收获的种子进行筛选, 选择荧光蛋白激发光源 (RFP, 红色荧光蛋白) LUYOR-3410 作为筛选仪器。阳性种子播种成苗后, 提取叶片 DNA 并再次 PCR 检测和鉴定。

1.7 酵母单杂交实验

参考“酵母单杂交试剂盒操作手册”, 使用 *BstB* I 限制性内切酶将 pAbAi-*ProBjuFT* 质粒单酶切后转入 Y1HGold 菌株, 以此制备酵母感受态细胞。将 pGADT7-*BjuWRKY75* 转入上述感受态细胞, 获得 Y1HGold 融合菌株 (pAbAi-*ProBjuFT*+pGADT7-*BjuWRKY75*)。将该菌液先后涂布于酵母培养基 SD/-Leu 和 SD/-Leu/AbA⁶⁰⁰, 30 °C 培养 3–5 d。以酵母单杂交系统中的阴性、阳性菌液作为对照, 观察培养基上的菌落情况。

1.8 萤火虫素酶实验和双荧光素酶报告实验

将融合载体 pGreenII 62-SK-*BjuWRKY75*、pGreenII 62-SK 和 pGreenII 0800-LUC-*ProBjuFT* 分别转化 GV3101 菌株 (pSoup)。单菌落经 PCR

阳性鉴定后扩大培养, 按 OD_{600} 的比值 1 : 9, 将 pGreenII 62-SK-*BjuWRKY75* 与 pGreenII 0800-LUC-*ProBjuFT* 菌液混匀, 作为实验组; 将 pGreenII 62-SK 和 pGreenII 0800-LUC-*ProBjuFT* 菌液混匀作为对照。两组菌液分别侵染本氏烟叶片, 同一个叶片一半注射实验组, 一半注射对照组, 注射后 48 h 取样, 置于 GloMax[®]-Multi⁺ 多功能检测仪, 测定双荧光素酶并计算酶活性比值, SPSS 软件方差分析和多重比较, 显著性水平为 0.05。

此外, 使用活体成像仪对叶片的萤火虫素酶活性进行鉴定, 萤火虫素酶的底物为 D-萤光素 (D-luciferin) 钾盐形式, 购于 APEX BIO 公司。

2 结果与分析

2.1 芥菜 *BjuWRKY75* 基因克隆及进化树分析

本研究克隆了芥菜 *BjuWRKY75* 基因 438 bp 的 cDNA 序列, 与 Brassicaceae 数据库中的相应序列 (*BjuWRKY75-2*, Bju035949) 一致。结合该基因 1 226 bp 的 DNA 序列分析发现, 该基因包含 2 个外显子和 3 个内含子, 编码 146 个氨基酸。

BjuWRKY75 的蛋白质的分子量估计为 16.96 kDa, 等电点为 9.33。保守结构域是赋予蛋白质与 DNA 或其他蛋白质结合能力的关键, 因此本研究利用 Pfam 在线网站分析了 *BjuWRKY75* 的保守结构域及其在蛋白中的位置。本文从十字花科植物数据库获取了油菜、白菜、黑芥等与芥菜亲缘关系较近的物种的氨基酸序列, 并以此构建了进化树。进化树表明, 芥菜 *BjuWRKY75-2* 与黑芥 *BniWRKY75-1* 具有较高同源性 (图 1)。

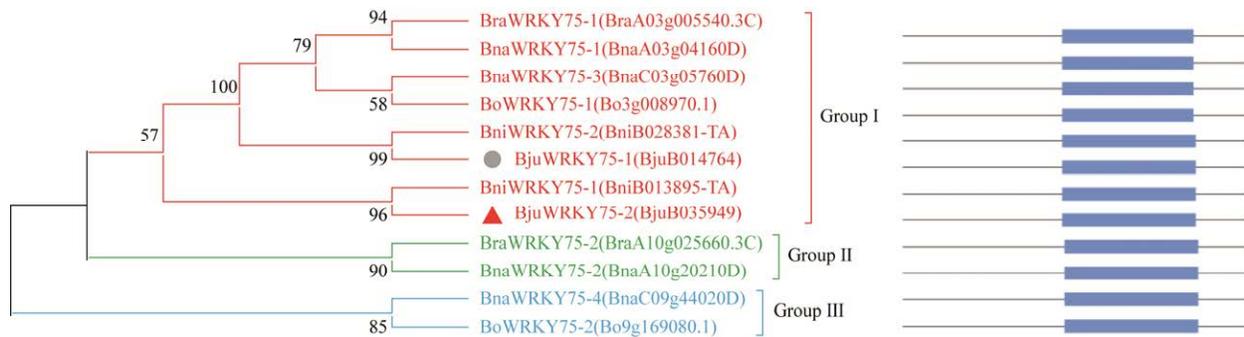


图 1 十字花科作物 WRKY75 蛋白进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of WRKY75 proteins from different cruciferous species. The solid gray circle indicates homologous genes of *BjuWRKY75* in *B. juncea*, and the solid red triangle indicates gene studied in this study. Genes ID are shown in the tree.

使用 BioXM 软件将其与所克隆芥菜 *BjuWRKY75-2* 的编码蛋白进行多序列比对, 发现芥菜 *BjuWRKY75-2* (后续试验中简称为 *BjuWRKY75*) 分别包含 1 个保守的 WRKY 结构域和 C2H2 锌指结构基序 (图 2), 因此芥菜 *BjuWRKY75-2* 属于 WRKY 家族 II 类成员^[26]。

2.2 芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白亚细胞定位

转录因子需要在细胞核内才能正常地发挥调控功能。首先, 利用 NovoPro 在线网站对芥菜 *BjuWRKY75* 的氨基酸序列进行了核定位信号预测。发现该蛋白的第 38–55 位氨基酸 (REGSSRSRELKKGKQK) 具有核定位信号。为了检测 *BjuWRKY75* 是否定位在细胞核内, 本研究进一步将 *BjuWRKY75* 融合到亚细胞定位载体 pCAMBIA1300-*GFP*, 并瞬时转化烟草叶片细胞, 在黑暗环境下生长 12 h 后, 转于正常光照下继续生长 12 h。激光共聚焦显微镜

观察发现: 含有 *BjuWRKY75* 的重组载体的绿色荧光信号集中在细胞核内, 而空载对照的荧光信号分布于整个细胞 (图 3)。由此表明: 芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白定位于细胞核内。

2.3 芥菜 *BjuWRKY75* 基因表达分析

利用 RT-qPCR 研究了芥菜 *BjuWRKY75* 基因在不同部位 (叶、花和茎) 及不同生长阶段 (出苗后 8 d、15 d、25 d 和 35 d) 的表达水平。芥菜 *BjuWRKY75* 基因在不同部位中的表达水平存在差异。其中在花中的表达水平显著高于叶和茎, 但是在叶和茎中的表达水平差异不显著 (图 4A), 暗示芥菜 *BjuWRKY75* 有可能参与了开花调控。对不同生长阶段芥菜叶片的 *BjuWRKY75* 基因表达检测发现: 在 8 d 时表达水平最高, 15 d 时最低; 但在 25 d 和 35 d 时表达水平有所升高, 它们彼此之间差异不显著 (图 4B)。



图 2 十字花科作物 WRKY75 氨基酸序列比对

Figure 2 Alignment of amino acid sequences among WRKY75s of cruciferous species. WRKY domain and C2H2 structure are marked in the picture.

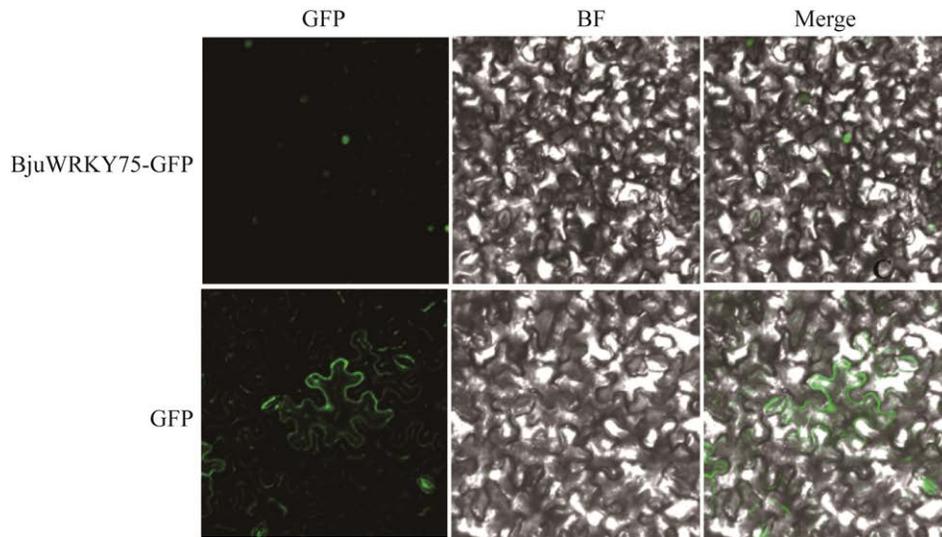


图3 *BjuWRKY75* 蛋白亚细胞定位

Figure 3 Subcellular localization of the protein encoded by *BjuWRKY75*. GFP: Green Fluorescent Protein; BF: bright-field; Merge: merged image of GFP and BF.

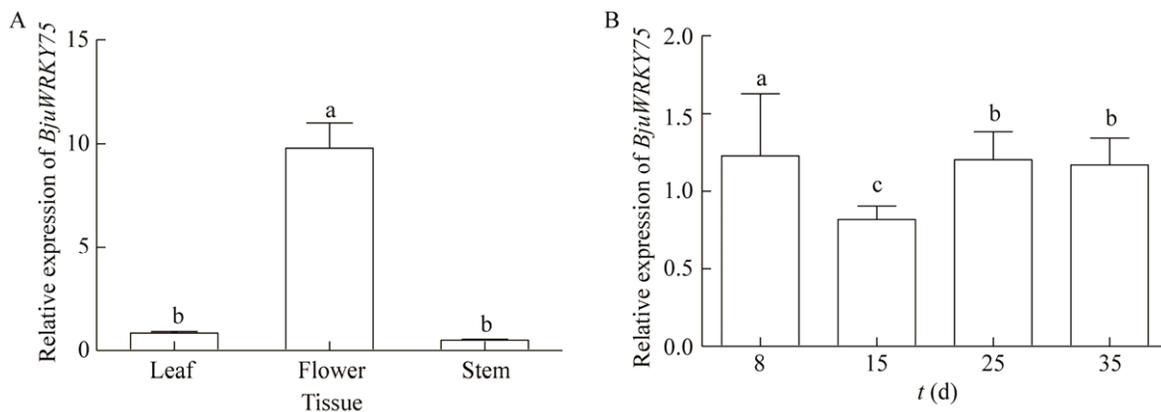


图4 *BjuWRKY75* 在不同组织和不同时期的相对表达量

Figure 4 Relative expression level of *BjuWRKY75* in different tissue or phases.

2.4 芥菜 *BjuFT* 启动子分析

芥菜 *BjuFT* 是开花整合因子，具有促进开花的作用。芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白是否结合到 *BjuFT* 基因的启动子上，从而调节开花呢？本研究进一步克隆了芥菜 *BjuFT* (*BjuB048175*) 基因的启动子序列 2 001 bp。启动子元件分析表明，芥菜 *BjuFT* 的启动子序列中含有 1 个完整的 TTGACT 基序和多个 TGACC/T 基序

(图 5)。

Jang 等研究表明，WRKY 家族蛋白具有 W-box 结构域，能够与含有 (T)(T)TGAC(C/T) 基序的 DNA 片段结合，发生相互作用^[26]。由此表明，芥菜 *BjuFT* 的启动子中具有与 *BjuWRKY75* 蛋白相互作用的特征序列，推测芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白很可能与 *BjuFT* 的启动子发生相互作用。

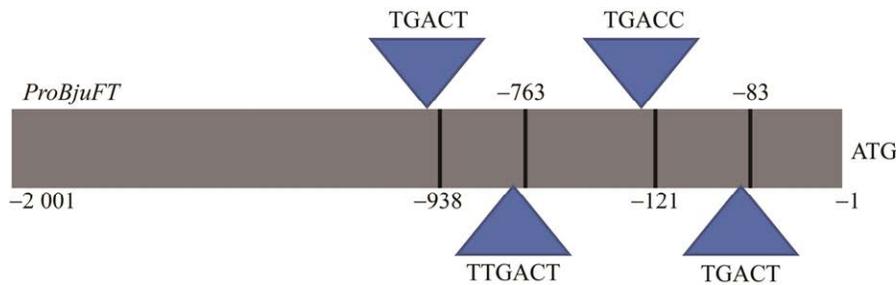


图5 芥菜 *BjuFT* 启动子 W-box 元件分析

Figure 5 W-box motif analysis in the promoter of *BjuFT*. W-box: (T) (T) TGAC (C/T).

2.5 芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白与 *BjuFT* 启动子相互作用

2.5.1 酵母单杂互作检测

为了验证芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白与 *BjuFT* 的启动子之间的相互作用, 我们构建了酵母单杂交表达载体 pGADT7-*BjuWRKY75* 和 pAbAi-*ProBjuFT*。酵母单杂交表明, 含有 pGADT7-*BjuWRKY75* 和 pAbAi-*ProBjuFT* 的融合酵母菌株能在 SD/-Leu/AbA⁶⁰⁰ 培养基上长斑, 说明 *BjuWRKY75* 能与 *BjuFT* 启动子发生相互作用, 激活酵母报告基因表达 (图 6A)。

2.5.2 双荧光素酶系统检测

为了进一步探究芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白与 *BjuFT* 启动子之间的作用关系, 本研究采用双荧光素酶报告系统进行验证^[27]。在构建了 *ProBjuFT*-LUC 报告基因和效应质粒 35S::*BjuWRKY75* 基础上 (图 6B), 我们将其瞬时侵染烟草叶片, 然后使用酶标仪测量萤火虫素酶和海肾荧光素酶活性。结果表明, 与对照相比, *BjuWRKY75* 与 *BjuFT* 启动子的混合菌液能够显著增强双荧光素酶活性比值 (LUC/REN), 说明芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白与 *BjuFT* 能够相互结合且具有激活作用 (图 6B), 这与酵母单杂交实验结果相吻合。

2.5.3 萤火虫素酶活性鉴定

萤火虫素酶实验与双荧光素酶报告实验相似, 是通过萤火虫素酶的活性检测来分析蛋白对启动子下游基因的转录活性。烟草的一半

叶片注射 pGreenII SK-*BjuWRKY75* 与 pGreenII 0800-*ProBjuFT* 的混合农杆菌菌液, 另一半只注射 pGreenII 0800-*ProBjuFT* 菌液。本研究在瞬时侵染烟草叶片后, 对侵染部位喷洒萤火虫素酶的底物, 黑暗放置数分钟, 活体成像仪观察萤火虫素酶活性。结果表明, 芥菜 *BjuWRKY75* 蛋白可在植物体内促进 *BjuFT* 基因的转录, 与对照相比显示出更强的荧光 (图 6C)。

2.6 *BjuWRKY75* 基因异源表达促进开花

为了进一步检测 *BjuWRKY75* 基因调节开花的功能, 本研究构建了过表达红光检测载体 pBin35SRed3-*BjuWRKY75*, 并侵染转化拟南芥, 对收获种子进行红光筛选后繁育 (红光激发源下能观察到荧光种子为阳性转基因), 直至 T3 代。对 T3 代转基因拟南芥植株的叶片 DNA 进行 PCR 扩增检测, 结果表明, *BjuWRKY75* 过表达融合载体确实整合到了拟南芥基因组 DNA 上并稳定遗传 (图 7A)。对开花时间统计发现, 转基因拟南芥植株开花明显早于野生型植株 (WT) (图 7B、7C), 说明 *BjuWRKY75* 具有促进早花的作用。

3 讨论与结论

3.1 芥菜 *BjuWRKY75* 基因在开花中的作用及其机制

芥菜 *BjuWRKY75* 是我们最初所预测的开花相关基因, 属于 WRKY 转录因子超家族, 编

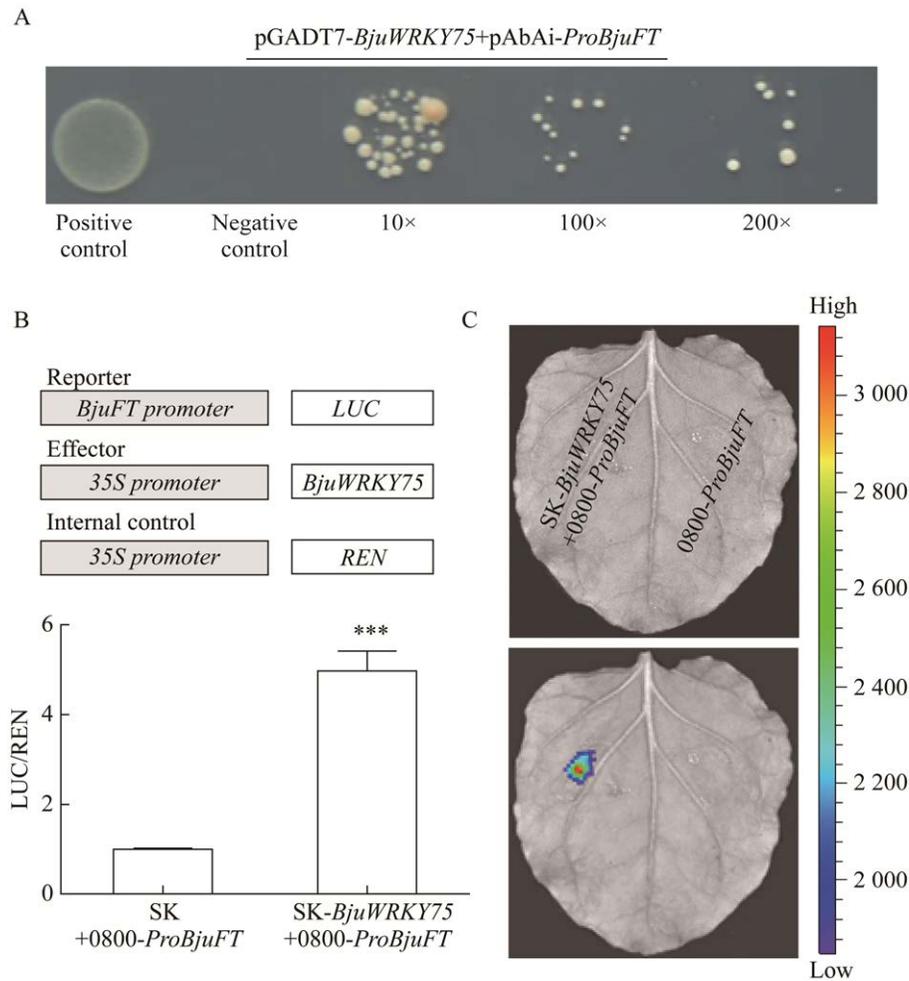


图 6 芥菜 *BjuFT* 启动子与 *BjuWRKY75* 蛋白互作鉴定

Figure 6 Detection of interaction between *BjuWRKY75* and *BjuFT* promoter. (A) Yeast one-hybrid assay, the transformed strains grew on SD/-Leu selective medium containing 600 µg/L aureobasidin A (AbA). (B) Dual-luciferase reporter assay, schematic diagram of experimental design and comparison of LUC/REN were shown in the picture. (C) LUC activity assay.

码的蛋白质具有一个保守的 WRKY 结构域和 C2H2 锌指结构, 被归于 II 类 WRKY 蛋白, 与黑芥 *BniWRKY75* 蛋白具有较高的同源性 (图 1 和图 2)。本研究克隆了芥菜 *BjuWRKY75* 基因, 发现其编码的蛋白定位在细胞核中 (图 3), 这与拟南芥、油菜和菜薹等植物中的 WRKY75 亚细胞定位结果一致。本研究通过实时荧光定量技术分析了 *BjuWRKY75* 基因在芥菜各个组织中的相对表达量, 发现其在花中的表达丰度显著高

于叶片和茎, 这与最初的猜测相吻合 (图 4A)。接着本研究分析了不同时期 *BjuWRKY75* 在叶片中的表达丰度, 发现其在各个时期的表达量相对较稳定, 这与组织特异性定量分析结果一致 (图 4B)。

FT 是一个重要的开花整合子 (水稻中被称为 *Hd3a*)。 *FT* 及其同源基因在植物从营养生长向生殖生长的转变中起重要作用^[3,28-30]。拟南芥 WRKY75 蛋白能够与 *FT* 的启动子结合并促进

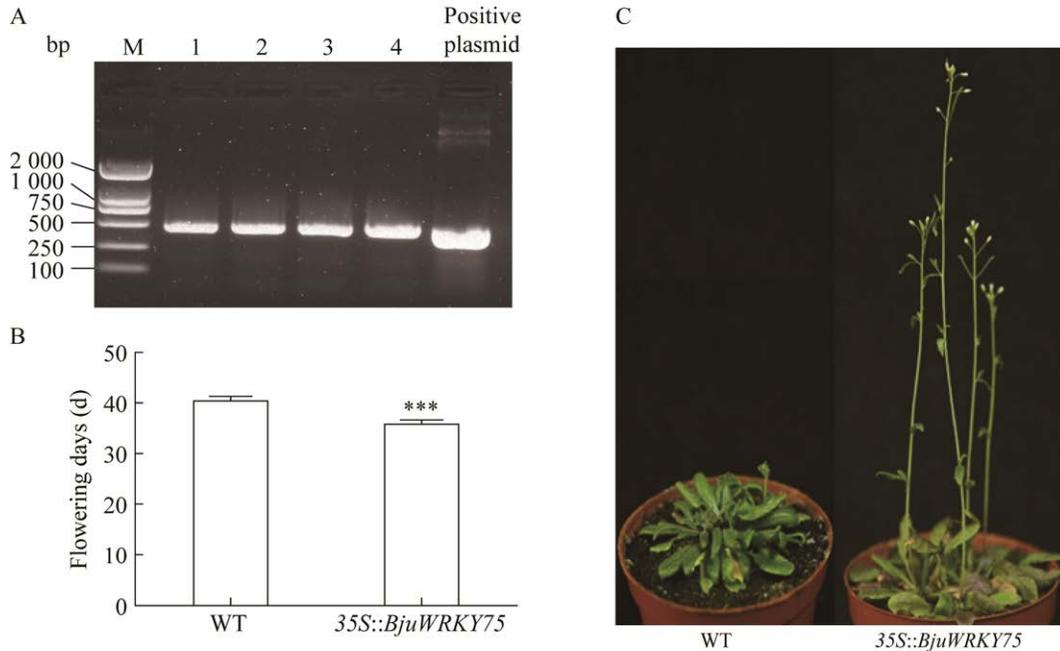


图7 *BjuWRKY75* 转拟南芥促进开花

Figure 7 Transgenic *BjuWRKY75* promotes early flowering of *Arabidopsis*. (A) Detecting positive transgenic *Arabidopsis* via PCR. (B) Statistic of flowering days between WT and transgenic *Arabidopsis*. (C) Phenotype of flowering time between WT and transgenic *Arabidopsis*. “***” indicates significant difference, $P < 0.001$, by Student’s *t*-test.

FT 的转录从而加速拟南芥开花^[21]。为了探究芥菜 *BjuWRKY75* 是否与拟南芥 *AtWRKY75* 蛋白具有类似作用, 本研究克隆了芥菜 *BjuFT* 的启动子序列, 对其序列进行分析, 发现其含有潜在的与 WRKY 蛋白互作的 W-box 元件 (图 5), 并构建了 *BjuFT* 启动子的酵母表达载体 (pAbAi-*ProBjuFT*) 以及萤火虫素酶载体 (pGreenII 0800-*ProBjuFT*-LUC), 通过酵母单杂交、双荧光素酶和萤火虫素酶活性实验证明: *BjuWRKY75* 蛋白能够与 *BjuFT* 的启动子互作, 并促进 *BjuFT* 下游基因的转录 (图 6), 这与拟南芥中的研究一致, 因此 *BjuWRKY75* 很有可能促进芥菜开花。

为进一步验证 *BjuWRKY75* 蛋白的生物学功能, 本研究构建了过表达载体 pBin35SRed3-*BjuWRKY75*, 侵染野生型拟南芥植株 (WT) 获

得转基因种子, 通过荧光蛋白激发光源 LUYOR-3410 进行阳性种子筛选, 并以 T3 代植株的叶片 DNA 为模板进行 PCR 扩增鉴定, 在 DNA 水平再次鉴定阳性植株 (图 7A)。转基因拟南芥与野生型拟南芥的开花时间比较分析发现, *BjuWRKY75* 在拟南芥中的过表达加速了开花 (图 7B、7C), 这与拟南芥中 *AtWRKY75* 促进开花的表型一致。此外, 腊梅 *CpWRKY75* 在拟南芥中的异源过表达促进了拟南芥的早花^[31], 这与本文的结果一致。

综上所述, *BjuWRKY75* 蛋白能够结合到 *BjuFT* 的启动子区域并促进 *BjuFT* 的转录, 因此 *BjuWRKY75* 极有可能具有促进芥菜开花的生物学功能。前人的研究表明, 拟南芥中 WRKY75 能够与 DELLA 蛋白 (如 GAI、RGA 等) 发生相互作用, 从而导致其活性被抑制^[21],

在芥菜中是否也有相同或者类似的机理仍然是未知的, 还需要进一步研究。

3.2 *BjuWRKY75* 蛋白在芥菜中可能存在其他功能

在拟南芥中, *WRKY75* 作为 *FT* 的上游基因在开花中发挥作用, 本研究得到了相同的结论, 并且拟南芥 *WRKY75* 蛋白能够与生长抑制因子 *DELLA* 蛋白发生相互作用从而导致其作用被抑制^[21]。那么在芥菜中是否也有相同或者类似的机制? *DELLA* 蛋白广泛地参与赤霉素(主要)、脱落酸、油菜素内脂、茉莉酸等植物激素信号以及光、糖信号和非生物胁迫等多种环境信号的调控过程, 那么作为潜在的与 *DELLA* 蛋白互作的 *BjuWRKY75* 蛋白又可能涉及了哪些信号途径以响应植物生长发育过程呢? 在很多植物中, *WRKY75* 蛋白参与了多种胁迫响应, 而在芥菜中未见报道。作为一种异源四倍体, 芥菜在进化过程中发生一些分子调控机理的改变是不容置疑的, 因此, 对于芥菜 *BjuWRKY75* 进行更加深入地研究是非常有必要的。

REFERENCES

- [1] Amasino R. Vernalization, competence, and the epigenetic memory of winter. *Plant Cell*, 2004, 16(10): 2553-2559.
- [2] Blázquez MA, Ahn JH, Weigel D. A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet*, 2003, 33(2): 168-171.
- [3] Fornara F, de Montaigu A, Coupland G. SnapShot: control of flowering in *Arabidopsis*. *Cell*, 2010, 141(3): 550.e1-2.
- [4] Halliday KJ, Salter MG, Thingnaes E, et al. Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator *FT*. *Plant J*, 2003, 33(5): 875-885.
- [5] Han P, García-Ponce B, Fonseca-Salazar G, et al. *AGAMOUS-LIKE 17*, a novel flowering promoter, acts in a *FT*-independent photoperiod pathway. *Plant J*, 2008, 55(2): 253-265.
- [6] Kumar SV, Lucyshyn D, Jaeger KE, et al. Transcription factor *PIF4* controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, 2012, 484(7393): 242-245.
- [7] Simpson GG, Dean C. *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science*, 2002, 296(5566): 285-289.
- [8] 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. *Mol Gen Genet*, 1994, 244(6): 563-571.
- [9] Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, et al. *WRKY* transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(5): 247-258.
- [10] Zheng ZY, Qamar SA, Chen ZX, et al. *Arabidopsis WRKY33* transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J*, 2006, 48(4): 592-605.
- [11] Yu YC, Wang L, Chen JC, et al. *WRKY71* acts antagonistically against salt-delayed flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 2018, 59(2): 414-422.
- [12] Yu YC, Hu RB, Wang HM, et al. *MIWRKY12*, a novel *Miscanthus* transcription factor, participates in pith secondary cell wall formation and promotes flowering. *Plant Sci*, 2013, 212: 1-9.
- [13] Yu YC, Liu ZH, Wang L, et al. *WRKY71* accelerates flowering via the direct activation of *FLOWERING LOCUS T* and *LEAFY* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2016, 85(1): 96-106.
- [14] Yang L, Zhao X, Yang F, et al. *PtrWRKY19*, a novel *WRKY* transcription factor, contributes to the regulation of pith secondary wall formation in *Populus trichocarpa*. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 18643.
- [15] Yang JN, Chen H, Yang CL, et al. A *WRKY* transcription factor *WRKY184* from *Brassica napus* L. is involved in flowering and secondary wall development in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul*, 2020, 92(2): 427-440.
- [16] Li W, Wang HP, Yu DQ. *Arabidopsis WRKY* transcription factors *WRKY12* and *WRKY13* oppositely regulate flowering under short-day conditions. *Mol Plant*, 2016, 9(11): 1492-1503.
- [17] Li SJ, Fu QT, Chen LG, et al. *Arabidopsis thaliana WRKY25*, *WRKY26*, and *WRKY33* coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta*, 2011, 233(6): 1237-1252.
- [18] Hu YR, Dong QY, Yu DQ. *Arabidopsis WRKY46*

- coordinates with WRKY70 and WRKY53 in basal resistance against pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci*, 2012, 185/186: 288-297.
- [19] Cai YH, Chen XJ, Xie K, et al. Dlf1, a WRKY transcription factor, is involved in the control of flowering time and plant height in rice. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102529.
- [20] Zhao K, Zhang DW, Lv KW, et al. Functional characterization of poplar WRKY75 in salt and osmotic tolerance. *Plant Sci*, 2019, 289: 110259.
- [21] López-Galiano MJ, González-Hernández AI, Crespo-Salvador O, et al. Epigenetic regulation of the expression of WRKY75 transcription factor in response to biotic and abiotic stresses in Solanaceae plants. *Plant Cell Rep*, 2018, 37(1): 167-176.
- [22] Choi C, Park YH, Kwon SI, et al. Identification of AtWRKY75 as a transcriptional regulator in the defense response to Pcc through the screening of *Arabidopsis* activation-tagged lines. *Plant Biotechnol Rep*, 2014, 8(2): 183-192.
- [23] Zhu H, Jiang YN, Guo Y, et al. A novel salt inducible WRKY transcription factor gene, AhWRKY75, confers salt tolerance in transgenic peanut. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 160: 175-183.
- [24] Zhang LP, Chen LG, Yu DQ. Transcription factor WRKY75 interacts with DELLA proteins to affect flowering. *Plant Physiol*, 2018, 176(1): 790-803.
- [25] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] Jang JY, Choi CH, Hwang DJ. The WRKY superfamily of rice transcription factors. *Plant Pathol J*, 2010, 26(2): 110-114.
- [27] Hellens RP, Allan AC, Friel EN, et al. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*, 2005, 1(1): 13.
- [28] Amasino RM, Michaels SD. The timing of flowering. *Plant Physiol*, 2010, 154(2): 516-520.
- [29] Tamaki S, Matsuo S, Wong HL, et al. Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*, 2007, 316(5827): 1033-1036.
- [30] Wickland DP, Hanzawa Y. The flowering locus t/terminal flower 1 gene family: functional evolution and molecular mechanisms. *Mol Plant*, 2015, 8(7): 983-997.
- [31] Huang RW, Sui SZ, Liu HM, et al. Overexpression of *CpWRKY75* from *Chimonanthus praecox* promotes flowering time in transgenic *Arabidopsis*. *Genes*, 2021, 13(1): 68.

(本文责编 陈宏宇)