

• 药材与资源 •

8个茶树 WRKY 转录因子基因的克隆与表达分析

王鹏杰, 陈 笛, 林 滢, 郑知临, 郑玉成, 杨江帆, 岳 川*, 叶乃兴*

福建农林大学园艺学院, 茶学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350002

摘要:目的 克隆茶树 WRKY 转录因子 (CsWRKYs) 家族中的 8 个成员, 并对其进行生物信息学和非生物胁迫下的表达分析。方法 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术从“铁观音”茶树品种中克隆 8 个 WRKY 基因, 运用生物信息学的方法对 8 个 WRKY 基因编码的蛋白进行理化性质分析, 同时通过与拟南芥同源基因的比较进行进化树的构建、多序列比对及保守基序分析。采用 qRT-PCR 方法检测 8 个 WRKY 基因在低温、干旱和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 胁迫处理下的表达量。结果 8 个 WRKY 转录因子基因开放阅读框 (ORF) 长度分别为 1 407、2 208、1 302、849、978、879、1 443 和 810 bp, 分别编码 468、735、433、282、325、292、480 和 269 个氨基酸, GenBank 登录号分别为 MG298951、MG298952、MG298955、MG298956、MG298957、MG298959、MG298960 和 MG298963。系统进化树及序列比对分析显示, 8 个 CsWRKYs 可以分成了 2 个大组; 除 CsWRKY39 缺少锌指结构外, 其他 CsWRKYs 均含有 WRKYGQK 保守七肽结构域及锌指结构组成的 WRKY 结构域。非生物胁迫下的表达模式显示, CsWRKYs 基因在低温、干旱和 ABA 胁迫处理下均有表达且表达受到不同程度的诱导; CsWRKY2、CsWRKY21、CsWRKY23、CsWRKY44 和 CsWRKY65 基因在低温处理后表达量上调超过 2, 显著响应低温胁迫; CsWRKY21、CsWRKY23、CsWRKY39 和 CsWRKY65 在干旱胁迫处理 12 h 及 ABA 处理 6 h 时均上调表达。结论 克隆获得来自不同组的 8 个茶树 WRKY 基因, 推测与茶树抗逆密切相关。

关键词: 茶树; WRKY 转录因子; 克隆; 生物信息学; 非生物胁迫**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)03-0685-09**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.023Cloning and expression analysis of eight WRKY genes in *Camellia sinensis*

WANG Peng-jie, CHEN Di, Lin Yi, ZHENG Zhi-lin, ZHENG Yu-cheng, YNAG Jiang-fan, YUE Chuan, YE Nai-xing

Key Laboratory of Tea Science at Universities in Fujian, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: **Objective** To clone eight members of WRKY of transcription factor family in *Camellia sinensis*, and analyze their bioinformatics and expression under abiotic stress. **Methods** Eight WRKY transcription factor genes were cloned from Tieguanyin cultivar by RT-PCR, and the physicochemical properties of the eight WRKY protein were analyzed by bioinformatics methods. At the same time, the establishment of phylogenetic tree, comparison of multiple sequences, and analysis of conserved motifs were carried out by comparing WRKY of *C. sinensis* with homologous genes of *Arabidopsis thaliana*. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of eight WRKY genes under low temperature, drought, and ABA stress treatment. **Results** The ORF lengths of eight WRKY genes were 1 407, 2 208, 1 302, 849, 978, 879, 1 443, and 810 bp, encoding 468, 735, 433, 282, 325, 292, 480, and 269 amino acids, respectively. GenBank accession numbers were MG298951, MG298952, MG298955, MG298956, MG298957, MG298959, MG298960, and MG298963, respectively. Phylogenetic tree and sequence alignment analysis showed that eight CsWRKYs could be divided into two groups and contained WRKYGQK conserved domain and zinc finger structures, except that CsWRKY39 lacked zinc finger structure. The expression pattern of CsWRKYs was induced under the condition of low temperature, drought, and ABA stress. The expression of CsWRKY2, CsWRKY21, CsWRKY23, CsWRKY44 and CsWRKY65 increased to

收稿日期: 2018-06-09**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31600555); 福建省“2011 协同创新中心”中国乌龙茶产业协同创新中心专项 (闽教科[2015]75 号); 福建农林大学科技创新专项基金项目 (CXZX2017181)**作者简介:** 王鹏杰 (1993—), 男, 硕士研究生, 主要从事茶树栽培育种和生物技术研究。E-mail: 494928025@qq.com***通信作者** 叶乃兴, 男, 教授, 主要从事茶树和茉莉资源利用研究。E-mail: ynxtea@126.com

岳 川, 男, 博士, 讲师, 主要从事茶树种质资源利用与茶叶品质调控研究。E-mail: yccyyx@126.com

more than 2 after low temperature treatment with significant response to low temperature stress. The expression of CsWRKY21, CsWRKY23, CsWRKY3,9 and CsWRKY65 was up-regulated under 12 h of drought stress and 6 h of ABA treatment. This result indicated that CsWRKYs might be closely related to stress response in *C. sinensis*. **Conclusion** Eight CsWRKY genes from different groups were cloned, and this result indicated that CsWRKYs might be closely related to stress response in *C. sinensis*.

Key words: *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze; WRKY transcription factors; cloning; bioinformatics; abiotic stress

非生物胁迫, 如干旱、低温、高盐和氧损伤等能够对植物的生长发育造成严重的危害^[1]。植物受到胁迫时会产生相应的应答反应, 减少或消除对植物造成的危害, 其中转录因子调控作为重要的胁迫应答方式主要通过转录因子作为反式作用因子与相应的顺式作用元件特异结合来调控胁迫应答反应^[2]。WRKY 转录因子作为植物特有的一大类转录因子家族, 在植物的生长发育及胁迫响应过程中起重要调控作用。WRKY 转录因子因其拥有长约 60 个氨基酸的高度保守的 WRKY 结构域而得名, 包括 1 个或 2 个保守的 7 肽 WRKYGQK 基序, 且 C 端通常有锌指结构 C_2H_2 或 C_2HC ^[3], 通过特异地结合靶基因启动子区域的 W-box 元件进而调控基因表达^[4]。目前已知, 在拟南芥中有 74 个 WRKY 家族成员^[5], 水稻中超过 100 个^[6], 葡萄中有 59 个^[7]。

大量的研究显示, WRKY 转录因子广泛参与植物的非生物胁迫响应。植物感受干旱和低温等非生物胁迫信号, 传递到细胞内部改变钙离子、活性氧自由基或环腺苷酸, 激活 MAPKs 和 CDPKs 等蛋白激酶, 调控 WRKY 等相关转录因子活性, 并进一步特异地结合调控应激反应基因转录以应对非生物胁迫^[8]。Ramamoorthy 等^[9]分析水稻的 103 个 WRKY 转录因子在冻害和干旱下的表达情况, 发现其中的 54 个基因在不同的非生物胁迫下会诱导表达, 对植物的非生物胁迫响应有正调控和负调控之分, 同时还发现有的 WRKY 只受一种胁迫因子的诱导, 有的同时可受几种胁迫因子的诱导, 说明 WRKY 转录因子的调控具有一定特异性。其他植物中的研究报道了芜菁的 41 个 WRKY 转录因子提高或降低了植株对冷害和干旱等胁迫的抗性^[10], 15 个葡萄 WRKY 基因响应了葡萄应答低温胁迫机制^[11]。研究人员还通过将 WRKY 转录因子过表达至拟南芥或烟草等模式植物中, 研究其在提高植株对非生物胁迫抗性过程中的分子机制。Song 等^[12]发现干旱和高盐处理可使水稻 WRKY8 基因在转基因拟南芥中的表达量升高, 并诱导 AtCOR47 和 AtRD21 基因的表达改善植株对渗透

胁迫的耐受性; Zhou 等^[13]过表达大豆的 3 个转录因子 GmWRKY13、GmWRKY21、GmWRKY54 到拟南芥中, 发现过表达 GmWRKY21 的转基因植株抗低温, 过表达 GmWRKY54 的植株对干旱和高盐均有一定的耐受性, 过表达 GmWRKY13 的植株对高盐和甘露醇胁迫易感; Ren 等^[14]报道 AtWRKY63 通过参与脱落酸 (abscisic acid, ABA) 介导的种子萌发、根系生长发育等信号转导途径, 在植物干旱应答途径中发挥着重要作用。

茶树 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze 作为多年生常绿木本植物, 其芽叶经加工成为重要的无酒精饮料。茶叶中含有丰富的生物活性成分, 包括茶多酚、咖啡碱、氨基酸、矿物质和芳香物质等, 其药理作用和保健功效越来越受到人们的广泛关注^[15-16]。然而茶树作为喜温、喜湿植物, 易受干旱、高温、冻害等极端环境因素的影响, 导致茶叶产量和品质的降低。虽然已有部分研究显示 WRKY 转录因子在茶树抵御非生物胁迫中具有重要作用^[17-19], 但茶树中该基因家族仍有待研究。本研究基于茶树基因组数据库^[20]中检索到的 WRKY 基因序列, 以“铁观音”cDNA 为模板, 克隆获得了茶树中 8 条 CsWRKYs 同源基因的 cDNA 序列。对它们的生物信息学特征进行分析, 并预测了 CsWRKYs 同源基因的生物学功能。采用实时荧光定量 PCR 技术 (qRT-PCR) 研究 CsWRKYs 基因在低温、干旱和 ABA 胁迫下的表达模式, 为系统研究 CsWRKYs 在茶树非生物胁迫中的功能提供理论参考。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

以生长良好、大小一致、无病原菌的 2 年生盆栽“铁观音”茶树为材料, 经笔者鉴定为茶树 *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze。多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 DP441 购于北京天根生化科技有限公司, pEASYT®-T1 载体、T1 感受态细胞、Easyscript One-step gDNA Removal and cDNA synthesis superMix 试剂盒、TransTaq HiFi DNA Polymerase Transstart® Tip Green qPCR SuperMix 等

购于北京全式金生物有限公司。

1.2 仪器

IMS-20 制冰机（常熟市雪科电器有限公司）；TGL-16 台式高速冷冻离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；UUS-666B-1-SS 超低温冰箱（新加坡艺思高科技有限公司）；NanoDrop 2000 核酸/蛋白定量仪（美国 Thermo 公司）；CFX96 Touch™ 荧光定量 PCR 检测系统[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 样品处理

参照姚雪倩等^[21]的方法对 3 种非生物胁迫处理后的茶树幼嫩叶片进行取样：（1）将茶苗移至 4 ℃ 的人工气候室，使用日光灯模拟光照，光强为 8 000 lx，在处理后的 0、6、12、24、48、72 h 取样；（2）在干旱（10% PEG6000）处理后的 0、6、12 h 取样；（3）在 100 μmol/L ABA 溶液处理后的 0、6、12、24、48、72 h 取样。实验设 3 次重复，锡箔纸包裹标记，液氮速冻后存于-80 ℃冰箱备用。

2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

按天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 DP441 的方法提取茶树总 RNA，并使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度，用 1%凝胶电泳检测 RNA 质量，使用全式金

Easyscript One-step gDNA Removal and cDNA synthesis superMix 试剂盒合成 cDNA 用于 RT-PCR 及 qRT-PCR。

2.3 CsWRKY 基因的克隆

在已公布的茶树基因组数据库中，根据序列注释的信息筛选出相关的 WRKY 编码序列，通过 BLASTn 与其他植物中报道的 WRKY 转录因子比对得到更为详细的注释，获得 8 个包含完整开放阅读框（ORF）的 cDNA 序列。为进一步验证序列准确性，参照王鹏杰等^[22]的方法进行克隆验证。在 ORF 两端设计 RT-PCR 引物（表 1），以铁观音芽叶 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，反应程序为 95 ℃、30 s；56 ℃、30 s；72 ℃、2 min，35 个循环，PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后进行回收纯化、连接、转化、测序，验证得到 8 个茶树 WRKY 基因包含完整 ORF 的 cDNA 序列。

2.4 CsWRKYs 的生物信息学分析

采用 UltraEdit 软件分析茶树基因组数据；ORFfinder 在线查询 ORF；核酸序列及氨基酸序列分别进行 BLASTn 和 BLASTp 同源性分析；采用在线软件 ProtParam 进行蛋白理化性质分析；采用 SignalP 4.1 Server 进行信号肽在线分析；采用 WOLF PSORT 进行亚细胞定位预测；采用 DNAMAN 软件对 WRKY 结构域进行多序列比对，

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物	序列（5'→3'）	引物	序列（5'→3'）
WRKY1-RT-F	CATGGTTACTTTTGGGGAAGC	WRKY1-qRT-R	CTGTCCATATTTGCGCCAGC
WRKY1-RT-R	CTTGCAGCTCAGTTTGCAC	WRKY2-qRT-F	GAACCAACCGGGACTTGCTA
WRKY2-RT-F	TATCATGGGTGGGTTTGATG	WRKY2-qRT-R	GACAGAGGCTCCATCTTCGG
WRKY2-RT-R	TTACATATGTGGTCCAAGAG GC	WRKY20-qRT-F	TACAGGTGCTCAAACGGTGG
WRKY20-RT-F	TCACGA TCCAATCAAG ATGG	WRKY20-qRT-R	GTTACCGTCCTAGCAAGGGG
WRKY20-RT-R	TGCTGAGAGCTTGACATGT	WRKY21-qRT-F	TATCGGCAGAGCAATAGCGG
WRKY21-RT-F	GATGAAGAATTTTCAAGCCCC	WRKY21-qRT-R	AAGAGCCAGCTGTCCCAATC
WRKY21-RT-R	GGTGAGGCTATCCATTAGATTCA	WRKY23-qRT-F	AGGCAAACACACCCATCCAA
WRKY23-RT-F	GGAGTTGTGT TGAATCCATGG	WRKY23-qRT-R	TGACAGAGCAAAAGCGGTGT
WRKY23-RT-R	CTAGTCATCCTTTGTAACAAGTGATGA	WRKY39-qRT-F	GATGGCTGTAGTTCCGCACA
WRKY39-RT-F	CATGGAGGTTGTTGAAGAA GC	WRKY39-qRT-R	CTTCCTGGATTGTTGCGACG
WRKY39-RT-R	TTAGATATACCTAGGATGTGGTGAACC	WRKY44-qRT-F	GCCCCGTGCTGAGTAACAA
WRKY44-RT-F	ATGGAGGTTAAAGAGGCAGA GA	WRKY44-qRT-R	TTGACCGCTCTACCACCAAC
WRKY44-RT-R	TACCAATCAT CACGGTTTGC	WRKY65-qRT-F	GTCTCGCCGCTCTACTTTT
WRKY65-RT-F	CCCT AGCTATGGAA GGACGA	WRKY65-qRT-R	CCACCACCGCTATCCAACAT
WRKY65-RT-R	AAGATCTCAC CCTGTGGTCC	TBP-qRT-F	GGCGGATCAAGTGTGGAAGGGAG
WRKY1-qRT-F	AGTGCGGTTCCAGACACAAA	TBP-qRT-R	ACGCTTGGGATTGTATTCGGCATT

并通过 WebLogo 网站 (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) 进行在线分析; 在 MEGA 5.0 软件中用邻近相连法构建系统进化树, bootstrap 值为 1 000。通过 MEME 在线网站 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 分析保守基序。

2.5 CsWRKYs 基因非生物胁迫表达分析

以 3 种非生物胁迫处理的样品总 RNA 为模板, 使用全式金的 Easyscript One-step gDNA Removal and cDNA synthesis superMix 试剂盒合成 cDNA 作为荧光定量 PCR 模板。选取茶树 TATA-box binding protein gene (TBP) 作为内参基因^[23], 设计 8 个 CsWRKY 的荧光定量引物 (表 1), 设置 3 个生物学重复。使用 Bio-Rad 的 CFX96 Touch 荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 反应, 反应体系参照 Transstart[®] Tip Green qPCR superMix 试剂盒的方法, 反应程序: 94 °C、30 s; 94 °C、5 s; 60 °C、30 s, 40 个循环。数据结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法^[24]进行分析。

3 结果与分析

3.1 茶树 8 个 WRKY 基因的克隆及序列分析

通过对茶树基因组已注释的数据进行分析, 分别获得 8 条 WRKY 包含完整 ORF 的 cDNA 序列。以“铁观音”芽叶 cDNA 为模板经 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测, 长度与预期相符 (图 1)。测序结果拼接后获得 8 条 WRKY 转录因子 cDNA 序列, 对其核酸序列及氨基酸序列分别进行 BLAsTn 和 BLAsTp 同源性分析, 根据与拟南芥 WRKY 家族的同源性分别命名为 CsWRKY1、CsWRKY2、CsWRKY20、CsWRKY21、CsWRKY23、CsWRKY39、CsWRKY44 和 CsWRKY65, GenBank 登录号分别为 MG298951、MG298952、MG298955、MG298956、MG298957、MG298959、MG298960

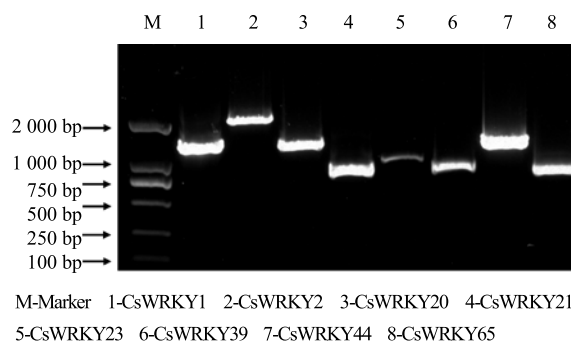


图 1 茶树 WRKY 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of WRKY in tea plants

和 MG298963。茶树中 8 条 CsWRKYs 转录因子的 ORF 长度为 810~2 208 bp, 编码氨基酸个数为 269~735 (表 2), 与拟南芥中 WRKY 同源基因的序列相似度为 43%~58%, 覆盖度为 64%~100%。

3.2 茶树 8 个 WRKY 蛋白的生物信息学分析

蛋白质理化性质分析表明, 8 个茶树 WRKY 转录因子的相对分子质量在 29 730~79 520; 理论等电点为 5.68~10.00; 不稳定系数均大于 40.00, 表明蛋白是不稳定的; 平均疏水性均为负值, 亲水性域大于疏水性域, 为亲水性蛋白。蛋白信号肽预测结果显示, 这 8 个 WRKY 蛋白均无信号肽, 推测其为非分泌性蛋白; 亚细胞定位预测结果显示均位于细胞核, 这与 WRKY 转录因子行使功能相关 (表 2)。通过 NCBI 网站上的 CCD 数据库进行蛋白结构域预测, 结果表明茶树 WRKY 蛋白与拟南芥 WRKY 同源性较高, 其中 CsWRKY1、CsWRKY2、CsWRKY20 和 CsWRKY44 具有 2 个 WRKY 结构域, 其余 WRKY 蛋白具有 1 个。

3.3 茶树 WRKY 蛋白的系统进化树分析

将 8 个茶树 WRKY 转录因子与 68 个拟南芥

表 2 茶树 WRKY 转录因子生物信息学分析

Table 2 Bioinformatics analysis of WRKY transcription factors in tea plants

基因	ORF/bp	氨基酸	相对分子质量	理论等电点	原子总数	不稳定系数	平均疏水性	信号肽	亚细胞定位	同源基因	WRKY 结构域
CsWRKY1	1 407	468	51 710	6.05	7 144	48.51	-1.079	无	细胞核	AtWRKY1	2
CsWRKY2	2 208	735	79 520	5.96	10 910	53.66	-0.765	无	细胞核	AtWRKY2	2
CsWRKY20	1 302	433	48 370	8.88	6 714	46.37	-1.124	无	细胞核	AtWRKY20	2
CsWRKY21	849	282	31 810	9.71	4 394	52.32	-0.937	无	细胞核	AtWRKY21	1
CsWRKY23	978	325	36 190	7.73	5 029	45.59	-0.594	无	细胞核	AtWRKY23	1
CsWRKY39	879	292	32 990	10.00	4 625	56.10	-0.686	无	细胞核	AtWRKY39	1
CsWRKY44	1 443	480	52 370	8.83	7 249	41.08	-0.890	无	细胞核	AtWRKY44	2
CsWRKY65	810	269	29 730	5.68	4 083	68.98	-0.807	无	细胞核	AtWRKY65	1

WRKY 转录因子通过 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。结果显示, CsWRKY1 与 AtWRKY1, CsWRKY2 与 AtWRKY2, CsWRKY20 与 AtWRKY20, CsWRKY21 与 AtWRKY21, CsWRKY23 与 AtWRKY23, CsWRKY39 与 AtWRKY39, CsWRKY44 与 AtWRKY44, CsWRKY65 与 AtWRKY65 关系最近, 并因此命名。根据拟南芥 WRKY 的分类^[25], 茶树 WRKY 转录因子可分为 2 个大类 (组 I、II, 图 2)。组 I 类 WRKY 转录因子

包含 2 个 WRKY 保守域和 C₂H₂ 型锌指结构 (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H), CsWRKY1、CsWRKY2、CsWRKY20 和 CsWRKY44 属于组 I。组 II 包含单个 WRKY 保守域和 C₂H₂ 型锌指结构 (C-X₄₋₅-C-X₂₂₋₂₃-H-X₁-H), 根据其 WRKY 结构域的氨基酸序列相似性, 组 II 可进一步细分成 5 个亚组: II-a、II-b、II-c、II-d、II-e, CsWRKY23 属于组 II-c, CsWRKY21 和 CsWRKY39 属于组 II-d, CsWRKY65 属于组 II-e。

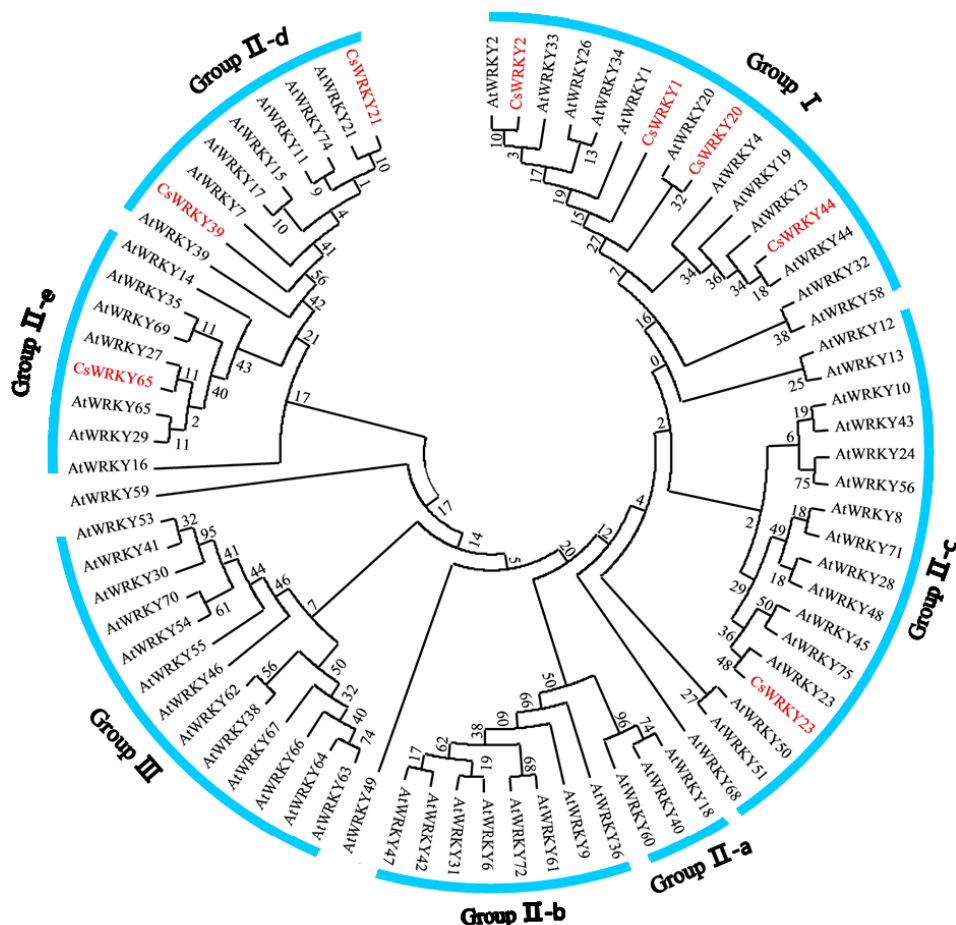


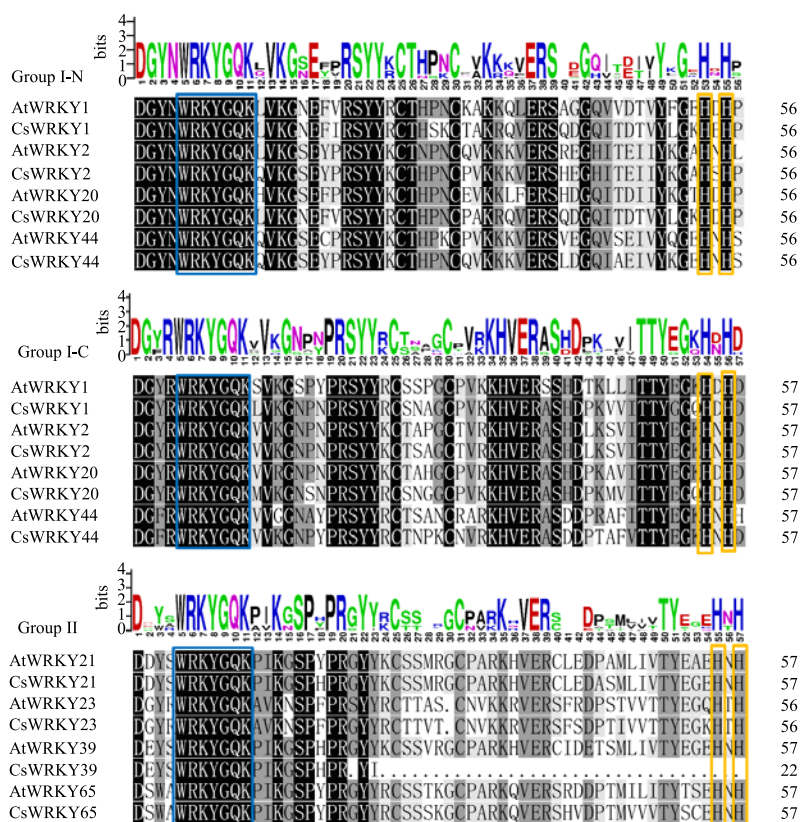
图 2 茶树与拟南芥 WRKY 转录因子的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of WRKY transcription factors in tea plants and *Arabidopsis thaliana*

3.4 茶树 8 个 WRKY 蛋白的结构域分析

茶树和拟南芥 WRKY 蛋白的序列比对结果表明 (图 3), 在组 I 类 WRKY 转录因子中, CsWRKY1、CsWRKY2、CsWRKY20 和 CsWRKY44 的 N 端和 C 端各含有 1 个 WRKYGQK 的 DNA 结合域, N 端和 C 端的锌指结构略有不同, N 端为 C-X₄-C-X₂₂-H-X₁-H, C 端为 C-X₄-C-X₂₃-H-X₁-H。组 II 类中, CsWRKY21、CsWRKY23、CsWRKY39 和 CsWRKY65 含有 1 个 WRKYGQK 的 DNA 结合

域, CsWRKY21、CsWRKY23 和 CsWRKY65 存在 1 个 C₂H₂ 锌指结构 (C-X₅-C-X₂₃-H-X₁-H); CsWRKY39 没有锌指结构, 可能会影响该基因的功能。除 CsWRKY39 外, 其他 7 个均含有高度保守的 DNA 结合域 (WRKYGQK) 和锌指结构组成的 WRKY 结构域。此外, 还使用序列 Logo 检查 WRKY 结构域每一个氨基酸残基的保守性 (图 3), 发现 WRKYGQK 七肽和锌指结构的关键氨基酸残基尤其保守。



蓝色方框表示 WRKYGQK 保守七肽，桔色方框表示锌指结构的保守氨基酸残基

Blue boxes indicate WRKYGQK conserved heptapeptides, orange boxes indicate conserved amino acid residues of zinc finger structures

图 3 茶树 WRKY 保守结构域序列比对

Fig. 3 Alignment of conserved motifs of WRKY in tea plants

3.5 茶树 8 个 WRKY 蛋白的保守基序分析

通过 MEME 程序在 8 个茶树 WRKY 及其对应的拟南芥 WRKY 蛋白中发现了 8 个保守基序 (图 4)。除了 WRKY 结构域不完整的 CsWRKY39 外, 在所有的 WRKY 序列中发现 motif 1 和 motif 2。motif 1 和 motif 2 组合成完整的 C 端 WRKY 结构域, 而 motif 3 和 motif 6 组合成完整的 N 端 WRKY 结构域并特异的存在于组 I 中的 WRKY 蛋白中。从图 3 中可以清楚看出, 一些基序会特定的存在于一个组中, 例如 motif 4 存在于组 II 的蛋白中, 而 motif 5 只存在于组 I 中, 这表明了它们在进化 and 功能上存在差异。

3.6 茶树 8 个 WRKY 基因的非生物胁迫分析

3.6.1 CsWRKYs 应答低温胁迫表达模式 在低温胁迫条件下, 8 个茶树 WRKY 转录因子均被诱导表达, 但表达水平在处理的不同时间段内均有差异。处理 0~12 h 的时间段内, 8 个基因的表达量均有上调, 其中 CsWRKY2、CsWRKY21、CsWRKY23、CsWRKY44 和 CsWRKY65 上调超过 2; 处理 12~72 h 的过程中,

大部分 WRKYs 的表达量显著下降, 仅有 CsWRKY21 和 CsWRKY23 仍有上调, 其中 CsWRKY23 在 24 h 表达量最高, 达 3.96。结果见图 5。

3.6.2 CsWRKYs 应答干旱胁迫表达模式 在干旱胁迫条件下, 多数基因表达水平的变化没有超过 2 倍。CsWRKY1、CsWRKY20 和 CsWRKY44 的表达量持续下调; CsWRKY2、CsWRKY21、CsWRKY23 和 CsWRKY39 的表达量呈先降低后升高的趋势, 其中 CsWRKY2 和 CsWRKY23 在 12 h 时表达量最高, 达 2.04 倍和 1.93 倍; CsWRKY65 在 0~12 h 时间段内表达量持续上调, 12 h 时达 1.41 倍。

3.6.3 CsWRKYs 应答 ABA 胁迫表达模式 在 ABA 处理条件下, CsWRKYs 主要呈不同表达模式。组 I 类的 CsWRKY1、CsWRKY2、CsWRKY20 和 CsWRKY44 表达量呈先下降后升高的趋势, 且最高均不超过 1。组 II 类中的 CsWRKY21、CsWRKY23、CsWRKY39 和 CsWRKY65 在 ABA 处理的 6 h 均上调表达, 6~72 h 表达量则小幅度下调。结果见图 5。

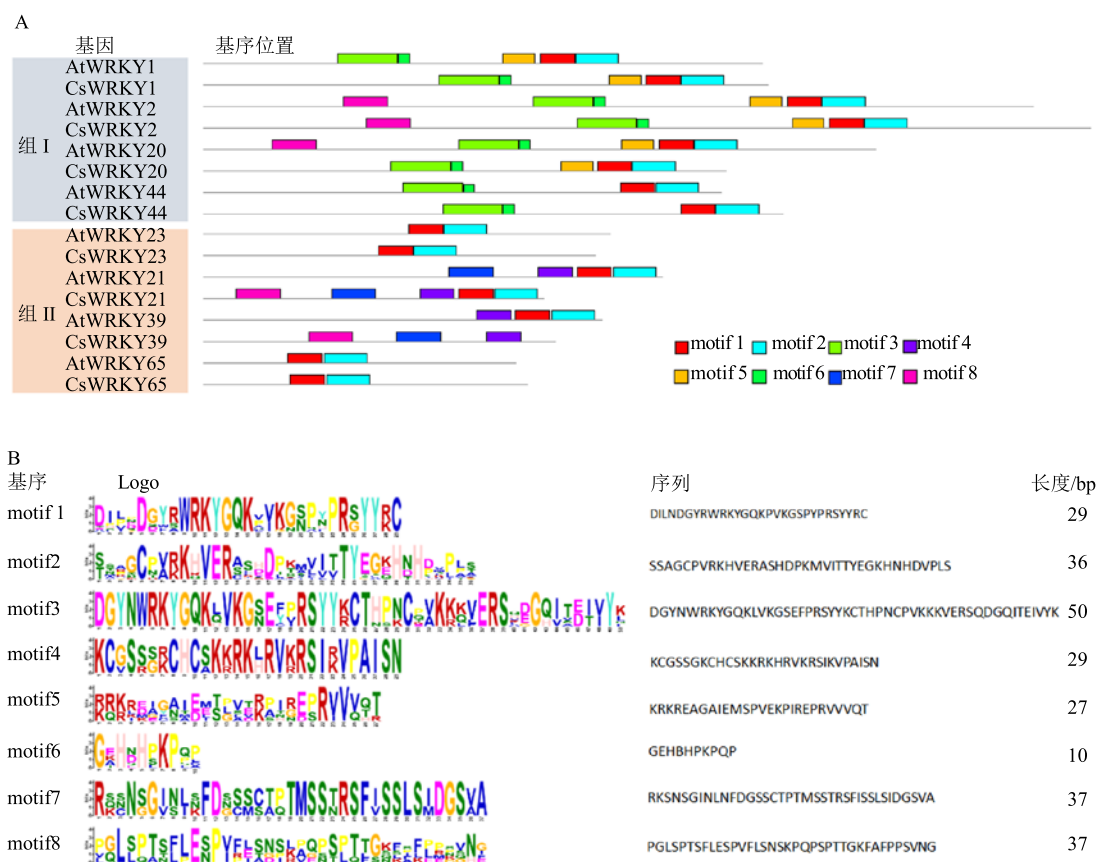


图 4 茶树与拟南芥 WRKY 转录因子的保守基序分析

Fig. 4 Conservative motif analysis of WRKY transcription factors in tea plant and *Arabidopsis thaliana*

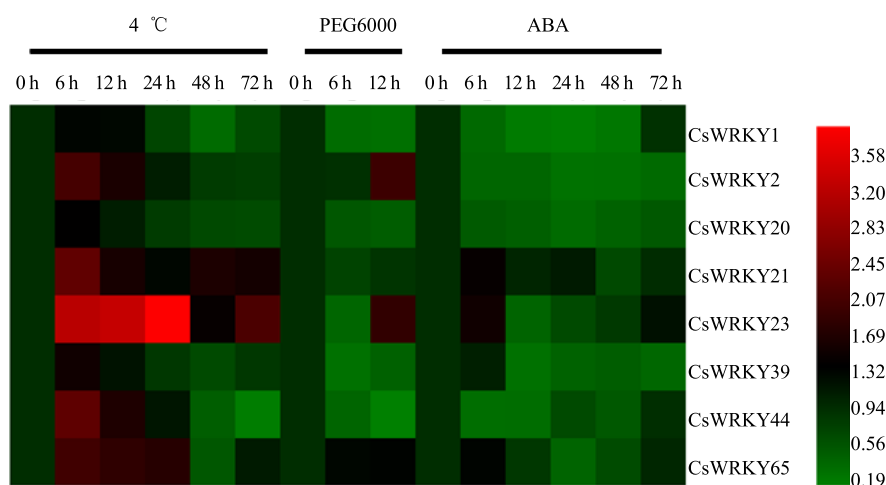


图 5 CsWRKYs 基因在 3 种非生物胁迫处理下的表达谱

Fig. 5 Expression profiles of CsWRKYs genes in tea plants under three abiotic stresses

4 讨论

WRKY 转录因子是植物转录因子家族中最大的家族之一，参与一系列植物生长发育调控和应答非生物胁迫，但在茶树上鲜见报道。本研究在对茶树基因组数据分析的基础上通过 qRT-PCR 技术克

隆获得 8 个茶树 WRKY 基因，与拟南芥 WRKY 基因同源基因均有较高同源性。亚细胞定位预测结果显示均位于细胞核，这与 WRKY 作为转录因子的功能密切相关^[26]。与拟南芥相似，系统进化树及序列比对分析显示这 8 个茶树 WRKY 基因可以分成 2

种不同的类型。CsWRKY1、CsWRKY2、CsWRKY20 和 CsWRKY44 属于组 I，具有 2 个高度保守的 WRKYGQK 7 肽及锌指结构组成的 WRKY 结构域；CsWRKY21、CsWRKY23、CsWRKY39 和 CsWRKY65 属于组 II，具有 1 个 WRKY 结构域，但是 CsWRKY39 的 WRKY 结构域并不完整，缺少锌指结构。此外，通过对茶树 WRKY 蛋白保守基序的鉴定，发现了特定存在某个组里的保守基序，例如组 I 中的 motif 5 和组 II 的 motif 4 及 motif 7，这些基序可能具有一些迄今尚未表征的功能。

近年来，大量植物中关于 WRKY 的报道认为 WRKY 转录因子参与植物多种非生物胁迫应答和植物生长发育的调控并发挥着重要的作用^[27-28]。本研究结果也表明，CsWRKYs 在低温、干旱和 ABA 胁迫处理下均有表达且表达受到不同程度的诱导。4℃处理 6 h 时，CsWRKYs 的表达均受诱导且显著上调，随着时间延长，表达量降低，这与前人对 AtWRKY33 响应低温的表达模式研究结果相同^[29]。低温处理后期对 CsWRKYs 的影响较小，预示着 CsWRKYs 对低温胁迫前期更敏感，这可能与表达快速和瞬时的动力学特点有关^[30]。水稻 WRKY 基因家族中有 16 个响应低温胁迫^[9]；有 15 个葡萄 VvWRKYs 参与应答冷害胁迫的过程^[11]；番茄在 48 h 冷应激过程中有 10 个 WRKYs 上调 2 倍以上，与其低温调控密切相关^[31]；Zhou 等^[13]研究发现超表达大豆 GmWRKY21 的转基因拟南芥可增强对低温胁迫的耐受性。CsWRKY2、CsWRKY21、CsWRKY23、CsWRKY44 和 CsWRKY65 上调超过 2，显著响应低温胁迫，推测参与了低温胁迫下的防御应答反应。

干旱胁迫可诱导 ABA 的积累，导致气孔关闭，减少由于蒸腾导致的水分损失，有助于在缺水条件下保持植物内细胞的水分状态^[32]。WRKY 转录因子是 ABA 信号调控过程中的关键节点，参与 ABA 信号转导途径。研究表明 AtWRKY18、AtWRKY40、AtWRKY60 与脱落酸结合蛋白 ABAR 受体作为 ABA 信号传导的负调节器诱导 ABA 应激基因 ABF4、ABI4、ABI5、DREB1A、MYB2 和 RAB18 的表达以提高对胁迫的耐受性^[33]。T-DNA 插入突变体分析表明，ABA 诱导 AtWRKY63 表达，其缺失突变体对 ABA 更敏感，抗旱性降低^[14]。本研究中，组 II 类的 CsWRKY21、CsWRKY23、CsWRKY39 和 CsWRKY65 应答干旱胁迫及外源 ABA 处理的表

达模式相近，干旱胁迫处理 12 h 及 ABA 处理 6 h 时均上调表达，ABA 处理后期表达量均有下降，前人研究茶树组 II 类的 WRKY57 在干旱及 ABA 胁迫处理下的表达模式也是先升高再降低^[19]。CsWRKY39 对这些非生物胁迫响应表达程度均较弱，推测 WRKY 结构域中锌指结构的缺失影响了其调节目标基因转录的功能。组 I 类中的 CsWRKY1、CsWRKY2、CsWRKY20 和 CsWRKY44 在干旱及 ABA 胁迫处理过程中表达量显著降低；ABA 处理后期表达量有所上调，CsWRKY1、CsWRKY20 和 CsWRKY44 仍显著低于处理前，预示着干旱和 ABA 胁迫处理抑制其表达。相关研究表明，组 I 类 WRKY 很可能是 WRKY 基因的原始祖先，组 II 类 WRKY 为适应环境进化产生^[34]。因此，不同类别的 WRKY 因其 WRKY 结构域的差异导致了它们在响应非生物胁迫时具有不同的表达模式，推测组 II 类 WRKY 对调控适应非生物胁迫环境更为重要。

本研究克隆了茶树中 8 个 WRKY 基因，分析了其在低温、干旱及 ABA 胁迫处理下的表达模式。同时，发现 CsWRKY21、CsWRKY23 和 CsWRKY65 等在逆境胁迫下的表达模式变化显著，推测它们可能在茶树抵御非生物胁迫中具有重要的作用。后续将对其功能及其调控机制进行研究，为抗逆茶树品种选育提供参考。

参考文献

- [1] 李书粉, 孙富丛, 肖理慧, 等. 植物对非生物胁迫应答的转录因子及调控机制 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(6): 1295-1300.
- [2] Leetong I, Young R A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes [J]. *Ann Rev Genet Cs*, 2000, 34(1): 77-137.
- [3] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(5): 199-206.
- [4] Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl R P, et al. Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 68(1/2): 81-92.
- [5] Wu K L, Guo Z J, Wang H H, et al. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins [J]. *Dna Res An Inter J Rapid Publ Reports Genes Genomes*, 2005, 12(1): 9-26.
- [6] Berri S, Abbruscato P, Faivre-Rampant O, et al. Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and *Arabidopsis* [J]. *Bmc Plant Biol*, 2009, 9(1): 120.

- [7] Guo C, Guo R, Xu X, *et al.* Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family [J]. *J Exper Bot*, 2014, 65(6): 1513-1528.
- [8] Wang H, Wang H, Shao H, *et al.* Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology [J]. *Frontiers Plant Sci*, 2016, 7(248): 67.
- [9] Ramamoorthy R, Jiang S Y, Kumar N, *et al.* A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(6): 865-879.
- [10] Kayum M A, Jung H J, Park J I, *et al.* Identification and expression analysis of WRKY family genes under biotic and abiotic stresses in *Brassica rapa* [J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290(1): 79-95.
- [11] Wang L, Zhu W, Fang L, *et al.* Genome-wide identification of WRKY family genes and their response to cold stress in *Vitis vinifera* [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14(1): 103.
- [12] Song Y, Jing S J, Yu D Q, *et al.* Overexpression of the stress-induced *OsWRKY08* improves osmotic stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Chin Sci Bull*, 2009, 54(24): 4671-4678.
- [13] 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 Biotechnol J*, 2008, 6(5): 486-503.
- [14] Ren X, Chen Z, Liu Y, *et al.* ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 2010, 63(3): 417-429.
- [15] 王蔚, 郭雅玲. 茶功能性成分对肺癌作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3654-3661.
- [16] 胡雅琼, 罗理勇, 曾亮. 茶叶提取物对帕金森病的防治作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1342-1348.
- [17] Wu Z J, Li X H, Liu Z W, *et al.* Transcriptome-wide identification of *Camellia sinensis* WRKY transcription factors in response to temperature stress [J]. *Mol Genet Genomics*, 2016, 291(1): 255-269.
- [18] Wang Y, Shu Z, Wang W, *et al.* CsWRKY2, a novel WRKY gene from *Camellia sinensis*, is involved in cold and drought stress responses [J]. *Biol Plant*, 2016, 60(3): 1-9.
- [19] 郭俊红, 王伟东, 谷星, 等. 茶树 WRKY 转录因子基因 CsWRKY57 的克隆及表达分析 [J]. 茶叶科学, 2017, 37(4): 2201-2209.
- [20] Sheng J, Kim C, Zhang Y, *et al.* The tea tree genome provides insights into tea flavor and independent evolution of caffeine biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(6): 866-877.
- [21] 姚雪倩, 陈丹, 岳川, 等. 茶树烯醇酶基因 CsENO 的克隆及其在非生物胁迫中的表达分析 [J]. 园艺学报, 2017, 44(3): 537-546.
- [22] 王鹏杰, 陈丹, 俞滢, 等. 茶树单萜合成酶 CsTPS 基因的克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2017, 37(8): 1465-1473.
- [23] Wu Z J, Tian C, Jiang Q, *et al.* Selection of suitable reference genes for qRT-PCR normalization during leaf development and hormonal stimuli in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *Sci Reports*, 2016, 6: 19748.
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method [J]. *Method*, 2001, 25(4): 402-408.
- [25] Zhang Y, Wang L. The WRKY transcription factor superfamily: Its origin in eukaryotes and expansion in plants [J]. *BMC Evol Biol*, 2005, 5(1): 1-19.
- [26] 钟贵买, 伍林涛, 王健美, 等. 转录因子 AtWRKY28 亚细胞定位及在非生物胁迫下的表达分析 [J]. 中国农业科技导报, 2012, 14(5): 57-63.
- [27] 李笑, 成玉富, 杨旭. 茄科植物 WRKY 转录因子的研究进展 [J]. 园艺学报, 2017, 44(1): 170-178.
- [28] Agarwal P, Reddy M P, Chikara J. WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(6): 3883-3896.
- [29] 付乾堂, 余迪求. 拟南芥 AtWRKY25、AtWRKY26 和 AtWRKY33 在非生物胁迫条件下的表达分析 [J]. 遗传, 2010, 32(8): 848-856.
- [30] 李蕾, 谢丙炎, 戴小枫, 等. WRKY 转录因子及其在植物防御反应中的作用 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(3): 401-408.
- [31] Chen L, Yang Y, Liu C, *et al.* Characterization of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum* reveals collinearity and their expression patterns under cold treatment [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(3): 962-968.
- [32] Rushton D L, Tripathi P, Rabara R C, *et al.* WRKY transcription factors: Key components in abscisic acid signalling [J]. *Plant Biol J*, 2012, 10(1): 2-11.
- [33] Shang Y, Yan L, Liu Z Q, *et al.* The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(6): 1909-1935.
- [34] Ulker B, Somssich I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function [J]. *Curr Opinion Plant Biol*, 2004, 7(5): 491-498.