

• 药材与资源 •

人参 *PgWRKY22* 基因的克隆及在磷胁迫下的表达分析梁 浩¹, 孙 海¹, 邵 财¹, 钱佳奇¹, 张亚玉^{1,2*}

1. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 长春 130112

2. 成都大学药学与生物工程学院, 四川 成都 610106

摘要:目的 克隆人参 *Panax ginseng* 转录因子基因 *PgWRKY22*, 进行生物信息学、亚细胞定位及外源磷胁迫表达分析。方法 根据人参转录组数据库设计特异性引物, PCR 扩增 *PgWRKY22* 全长 cDNA 序列, 命名为 *PgWRKY22*, 并对其生物信息分析; 构建绿色荧光融合表达载体 *PgWRKY22-eGFP*, 利用农杆菌侵染烟草叶片的瞬时表达法分析亚细胞定位; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 *PgWRKY22* 在人参组织中的表达特异性以及在外源磷作用下的表达模式。结果 人参转录因子基因 *PgWRKY22* 的 cDNA 序列为 975 bp, 编码 324 个氨基酸; *PgWRKY22* 蛋白属于 WRKY 超家族蛋白, 具有典型的 WRKY 结合域, 该蛋白不稳定, 属于亲水性蛋白, 无规则卷曲为主要组成部分; *PgWRKY22* 蛋白与丹参 *SmWRKY*、葡萄 *VvWRKY22*、长春花 *CrWRKY22*、独脚金 *SaWRKY27* 蛋白具有较高的同源性, 与西洋参 *PqWRKY1*、*PqWRKY2*, 人参 *PgWRKY1*、*PgWRKY3*、*PgWRKY4* 具有较近的系统发育关系; 亚细胞定位显示 *PgWRKY22* 定位于细胞核上; qRT-PCR 表明 *PgWRKY22* 在人参的侧根和主根中表达较高, 在叶和茎中次之; 在外源磷浓度为 2 mmol/L 下的表达显著高于其他磷浓度下的表达。结论 克隆获得 *PgWRKY22* 的 cDNA 序列及表达信息, 可为后续进行基因功能鉴定和人参栽培的磷营养调控提供参考。

关键词: 人参; 转录因子; 生物信息学; 亚细胞定位; 表达分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4286-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.021

Molecular cloning of *PgWRKY22* from *Panax ginseng* and its expression in response to external phosphorus supplyLIANG Hao¹, SUN Hai¹, SHAO Cai¹, QIAN Jia-qi¹, ZHANG Ya-yu^{1,2}

1. Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

2. College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: Objective To clone a transcription factor gene *PgWRKY22* from *Panax ginseng* followed by bioinformatics, subcellular localization and expression in response to external phosphorus supply were performed. **Methods** According to *Panax ginseng* transcriptome database to design the specific primer, by PCR to amplify the cDNA sequence of *PgWRKY22*, which was named as *PgWRKY22*, and its bioinformatics was analyzed. Enhanced green fluorescent protein (eGFP) fused expression vector *PgWRKY22-eGFP* was constructed and subcellular localization of *PgWRKY22* was observed by *Agrobacterium tumefaciens* transient expression method in tobacco. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression specificity of *PgWRKY22* in plant tissues and its expression in response to external phosphorus supply. **Results** The cDNA sequence of the *Panax ginseng* transcription factor gene *PgWRKY22* was 975bp, encoding 324 amino acids; *PgWRKY22* protein was a WRKY superfamily protein with a typical WRKY binding domain. It was an unstable hydrophilic protein with random coils as its main component; *PgWRKY22* protein has high homology with *Salvia miltiorrhiza* *SmWRKY*, *Vitis vinifera* *VvWRKY22*, *Catharanthus roseus* *CrWRKY22*, *Striga asiatica* *SaWRKY27* protein, and has a close phylogenetic relationship with *Panax quinquefolius* *PqWRKY1*, *PqWRKY2*, *Panax*

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系 (CARS-21); 中国农业科学院科技创新工程协同创新任务 (CAAS-XTCX20190025-6); 国家重点研发计划项目子课题 (2021YFD1600902); 非林地老参地再利用研究与示范项目 (LNFYZBDL-JL18-246C)

作者简介: 梁 浩 (1991—), 男, 博士研究生, 研究方向为药用植物栽培。E-mail: 380278954@qq.com

***通信作者:** 张亚玉, 研究员, 研究方向为药用植物栽培。E-mail: zyy1966999@sina.com

ginseng PgWRKY1, PgWRKY3, PgWRKY4; subcellular localization shows that PgWRKY22 was localized to the nuclei; real-time fluorescence quantitative PCR showed that PgWRKY22 was highly expressed in the lateral roots and main roots of *Panax ginseng*, followed by the leaves and stems; the expression at exogenous phosphorus concentration of 2 mmol/L was significantly higher than that at other phosphorus concentrations. **Conclusion** The cDNA sequence and expression information of PgWRKY22 were obtained by cloning, which could provide reference for gene function identification and phosphorus nutrition regulation in *Panax ginseng* cultivation.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Meyer; transcription factor; bioinformatics; subcellular localization; expression analysis

人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 为五加科多年生草本植物, 具有“百草之王”的美誉, 作为珍贵的药用植物在中国、韩国、日本等国颇受欢迎。人参的生物活性成分包括皂苷、多糖、多肽等, 其中人参皂苷作为人参的主要活性成分, 由于其独特的药理功效及在保健食品中的应用潜能, 目前已被广泛研究^[1]。人参的有效成分为次生代谢产物, 其生物合成和积累过程受到植物生长环境中各种生物和非生物胁迫的调节^[2]。在这些环境胁迫中, 植物体内的相关基因会启动表达, 以此来适应逆境^[3]。

转录因子在植物应对各种生物和非生物胁迫的响应中发挥着关键作用^[4]。WRKY 是一类重要的转录因子, 广泛参与植物的发育和逆境响应^[5]。WRKY 蛋白在 N 端含有保守的 WRKYGQK 延伸, 在 C 端含有锌指基序 Cx4-5Cx22-23HxH 或 Cx7Cx23HxC^[6]。WRKY 根据其结构可分为 3 类 (I、II 和 III)^[7]。WRKY 蛋白通过与启动子区域的 W-box 元件 (T) TGAC (C/T) 特异性结合来调控靶基因的转录, 这些序列元件 (T) TGAC (C/T) 包含响应生物胁迫转录反应的 TGAC 核心序列, 所以 TGAC 核心序列被认为是在启动子区域响应植物参与防御相关基因的启动表达。大量的体内和体外结合实验已证明 WRKY 结构域和 W-box 之间的相互作用以响应植物生长发育和各种生物或非生物胁迫反应。随着高通量技术的发展, 在植物中参与生长发育和逆境响应的 WRKY 型转录因子已从多种植物中鉴定出来, 其中拟南芥中有 74 个, 水稻中有 103 个, 双穗短柄草中有 86 个, 大豆中有 197 个, 菠萝中有 54 个^[8]。此外, WRKY 型转录因子参与植物生长发育和逆境响应的机制也被进一步研究。例如, 在拟南芥中, *AtWRKY12* 可以部分介导 GA3 对拟南芥开花时间和次生壁形成的调控作用^[9-11]; *AtWRKY53*、*AtWRKY54*、*AtWRKY70*、*AtWRKY71* 参与叶片衰老的调控^[8, 12-14]。在水稻中, *OsWRKY71* 通过调节下游靶基因正向调控水稻的耐寒性^[15]。在葡萄中, *VvWRKY30* 过表达系在盐胁迫下具有较高的抗氧化活性和较低的活性氧含量, 从而增强了其对盐胁迫

的抗性^[16]。在大豆的全基因组鉴定中发现, 66 个 *GmWRKY* 响应盐胁迫的表达模式不同, 其中 12 个无显著变化, 35 个下调, 19 个上调^[17]。

磷是植物必需的大量营养元素, 在植物中参与多种代谢过程, 对其生长发育起着至关重要的作用。植物对磷环境的适应包括形态生理基础和基因表达调控^[18]。例如, 磷转运体的调控, 氨基酸及衍生物、类黄酮、磷酸酶的分泌以及根结构的改变^[19]。磷的代谢途径受多种基因调控, 在不同的磷条件下, 这些基因的表达也不同^[20]。如在水稻中, 低磷反应的主要转录调节因子 OsPHR2 (phosphate starvation response 2) 通过激活磷饥饿诱导的基因 *PHT1* (phosphate transporter 1) 与基因启动子区域中的 P1BS (PHR1 结合序列: GNATATNC) 基序结合^[21-22], 以此来调控对磷环境的适应^[23-28]。也有研究在玉米^[29]、大豆^[30]、黑麦草^[31]、大麦^[32-33]和小麦等作物中分析了植物对磷胁迫反应的分子机制^[34]。由于 WRKY 型转录因子具有 W-box (含 TTGAC 序列) 的蛋白特异识别元件, 因此, 在磷胁迫下也发现该类转录因子能够与磷转运相关基因启动子的 W-box 相结合, 进而参与调控植物磷胁迫响应。在拟南芥中, *AtWRKY6*、*AtWRKYa*、*AtWRKY42* 均能与 *AtPHO1* 基因启动子结合, 进而参与磷胁迫响应; *AtWRKYb*、*AtWRKYc*、*AtWRKY28* 也参与 *AtPHO1* 基因的表达调控, 以响应磷饥饿过程; *AtWRKYd*、*AtWRKYe*、*AtWRKY42*、*AtWRKY45* 等还可通过与磷转运体 *PHT1*; 1 或 *PHT1*; 4 的互作, 参与拟南芥低磷胁迫的诱导响应^[35-37]。此外, 在水稻中过表达 *OsWRKY21* 和 *OsWRKY108* 能显著增加低磷胁迫条件下水稻体内磷的积累量, 而将这 2 个基因突变则使水稻体内磷积累量显著减少^[38]。水稻的 *OsWRKY75* 也有类似的功能, 过表达 *OsWRKY75* 不仅能显著提高水稻对磷饥饿的耐受性, 且使水稻根系和地上部的生物量以及磷含量均高于野生型^[39]。鉴于 WRKY 在响应磷胁迫中的重要作用, 本研究进行 *PgWRKY22* 基因克隆, 分析其亚细胞定位、组织表达及磷胁迫表达特征, 为

进一步研究 WRKY 型转录因子应答人参营养胁迫的分子机制提供科学依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

二年生人参苗采自人参主产区吉林省抚松县人参种植基地,经中国农业科学院特产研究所张亚玉研究员鉴定为五加科草本植物人参 *P. ginseng* C. A. Meyer。

1.2 试剂、载体及菌株

RNAsimple Total RNA Kit 试剂盒(天根生物科技有限公司); FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒(天根生物科技有限公司); 2×Trans Taq®High Fidelity (HiFi) PCR SuperMixII (北京全式金生物科技有限公司); TIANgel Midi Purification Kit 试剂盒(天根生物科技有限公司); pEASY®-T5 Zero Cloning Kit 试剂盒(北京全式金生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 样品处理

将从种植基地所采的人参苗置于实验室的智能人工气候室(温度 20, 光照 2000 lx)内使用不同磷浓度的霍格兰氏营养液进行水培,设置 5 个磷浓度水平处理: P0 (0 mmol/L)、P1 (0.5 mmol/L)、P2 (1.0 mmol/L)、P3 (2.0 mmol/L)、P4 (4.0 mmol/L), 每个处理 3 次重复, 将人参苗水培至第 8 周 1 次性取样。

2.2 RNA 提取与纯化

参照天根的 RNAsimple Total RNA Kit 试剂盒提取样品总 RNA 并纯化,采用微量核酸蛋白仪和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。反转录参照天根生物有限公司的 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 试剂盒说明进行。

2.3 PgWRKY22 基因的克隆及测序

基于本实验室前期经高通量测序所得的转录组数据库,筛选出 *PgWRKY22* 基因为模板,利用 DNAMAN 和 Primer Premier 6 软件设计扩增引物(*PgWRKY22*-F: 5'-ATGGGAGAATTTGTTAGTATGGAG-3', *PgWRKY22*-R: 5'-TTACCTAAAATGTTCCGTAGAGCA-3')。以人参根茎 cDNA 为模板,配制反应体系: 12.5 μL 2×Trans Taq®High Fidelity (HiFi) PCR SuperMixII, 上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 模板 1 μL, 9.5 μL 的 ddH₂O。PCR 扩增反应程序为: 95℃预变性 4 min; 95℃、30 s, 51℃、30 s, 72℃、90 s, 进行 35 个循环; 72℃、

7 min。反应结束后用琼脂糖凝胶电泳检测并切胶纯化回收 PCR 产物,使用 pEASY®-T5 Zero Cloning Kit 试剂盒将目的片段连接到 T5 载体上,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞涂板,挑取阳性菌株提取质粒送上海生工测序。

2.4 PgWRKY22 基因的生物信息分析

将 *PgWRKY22* 基因编码的氨基酸序列分别提交到 NCBI 和 ProtParam 上在线分析其理化性质; SOPMA 分析蛋白二级结构;采用 SWISS-MODEL 在线工具进行三维同源建模; TMHMM 在线预测跨膜结构域; SMART 在线分析保守结构域;利用 DNAMAN 软件对 *PgWRKY22* 与其他物种 WRKY 蛋白的氨基酸序列进行同源性分析;利用 MEGA6.0 软件构建 *PgWRKY22* 蛋白家族的系统进化树。

2.5 PgWRKY22 基因的亚细胞定位

根据 *PgWRKY22* 基因的 CDS 区设计含有 EcoRI 和 XbaI 酶切位点的引物(*PgWRKY22*-EcoRI-F: 5'-GGAATTCATGGGAGAATTTGTTAGTA-3'; *PgWRKY22*-XbaI-R: 5'-CTCTAGAGCCTAAAATGTTCCGTAGAG-3'; 划线部分为酶切位点),通过同源重组方法连接至 pCambia2300-35S-eGFP 载体的 EcoRI 和 XbaI 酶切位点之间,获得重组质粒 pCambia 2300-35S-eGFP-*PgWRKY22*,然后连接 pEASY®-T5 载体转化大肠杆菌涂板,挑取阳性克隆进行测序验证。将测序正确的载体通过农杆菌 GV3101 介导注射烟草叶片,空载体作为对照同时注射烟草,然后将注射的烟草叶片制作成玻片,在激光共聚焦显微镜下观察 eGFP 信号。

2.6 PgWRKY22 基因的组织及磷胁迫表达分析

使用 LightCycler®96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士)分析 *PgWRKY22* 基因在人参不同组织中及磷胁迫下的表达模式。依据 *PgWRKY22* 的 CDS 区设计 qRT-PCR 特异性引物(*PgWRKY22*q-F: 5'-TCATTCGGTTCCTGGATTACA-3'; *PgWRKY22*q-R: 5'-GCTCATCTAACTCATCCACAAG-3'),以 *GAPDH* 为内参基因(*GAPDH*-F: 5'-ATGGACCATCAGCAAAGGAC-3'; *GAPDH*-R: 5'-GGTAGCACTTTCCTCAACAGC-3')。反应体系为: FastStart Universal 2×SYBR Green (金佰特;北京) 12.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), cDNA 模板 1 μL, 10.5 μL 的 ddH₂O,同时以 1 μL 的 ddH₂O 代替模板作为阴性对照。反应程序: 94℃、2 min; 94℃、15 s,

55 ℃、20 s, 72 ℃、30 s, 进行 40 个循环; 72 ℃、7 min。每个样品分别设置 3 次技术性和生物学重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[40]计算相对表达水平。

3 结果与分析

3.1 *PgWRKY22* 基因的克隆及序列分析

基于实验室测序得到的转录组数据库设计扩增引物, 以反转录的 cDNA 做模板进行 PCR 扩增, 得到 *PgWRKY22* 的扩增条带 (图 1)。将 PCR 产物切胶纯化回收并连接到 pEASY®-T5 载体, 转化提质粒测序显示: *PgWRKY22* 基因的全长为 975 bp, 编码 324 个氨基酸 (图 2)。

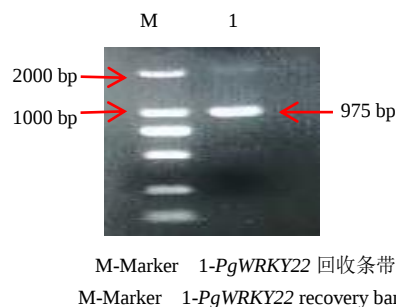


图 1 *PgWRKY22* 的 PCR 产物胶回收电泳检测
Fig. 1 PCR product gel recovery electrophoresis detection of *PgWRKY22*

```

1 ATCGGAGAATTTGTTAGTATGGAGGAAGATTGGGGTCTGCAAGCTATTGTCAGAGGATCC
1 M G E F V S M E E D W G L Q A I V R G S
61 ACCGATTATTTTGATGATCCGACTATTCTTCATTCGGTTCCTGATTACATTCAGAAT
21 T D Y F D D P T I S S F G S L D Y I Q N
121 AATAATAACGATGATGATTTCATTCACCTTTCTTAATCTTTTGAAGCCAATTATAAC
41 N N N D D D F H F T F P N L F E A N Y N
181 AGTAATGATAAAGTTCTTGTGGATGAGTTAGATGAGCTTTACAAGCCCTTTTATCCCATG
61 S N D K V L V D E L D E L Y K P F Y P M
241 TTAAATCTTTTCCCAACAAGCTCCCATTTATACCTCCTCCTCCTCCGATTCTTCCCT
81 F N S F S P Q A P I I T S S S S D S F P
301 GAAGAAGTCTGAAGTTAAAGCCAGAAAATCAAGAGATCGAAGTTATCCAGAAGCACACA
101 E E V L K L K P E N Q E I E V I Q K H T
361 ATTCCTGCTAAAGCTGCTAGTCTCTAATAAAAGTAATACTGCCCATGCAGCTAAATATAAA
121 I P A K A A S P N K S N T A H A A K Y K
421 AGGAAGAACCAACACAAAAGGGTGGTGGTCAAGTAAGTCTGCTGCTCTTCTTCTGAT
141 R K N Q H K R V V V Q V T A D G L S S D
481 TTGTGGGCTTGGCGTAAATATGGTCAGAAACCCATTAAAGGATCACCTTATCCAAGGAGC
161 L W A W R K Y G Q K P I K G S P Y P R S
541 TATTATAGGTGTAGTAGCTTAAAGGATGTTTGGCAAGGAAGCAAGTTGAACAAAGCTGT
181 Y Y R C S S L K G C L A R K Q V E Q S C
601 AATGATCCCGGAATGTTTATCATAACCTATTCCGGGGAACATAGCCACAGCCATCCAAC
201 N D P G M F I I T Y S G E H S H S H P T
661 CGACGGAGTTCTCTTGGCGGTACAAACCGGCACAAGTTCATCACCCGAAAAGCCCTCA
221 R R S S L A G T N R H K F I T P K S P S
721 TCGGTCAATACCAGTACTATTGTGGCAACACCCAAAGACTCCAGTTGCTCTCCAACATCA
241 S V N T S T I V A T P K D S S C S P T S
781 GATATCAGTGAAGAAGTAGTAATTCACAGCAGCCATTAACATGAAGAAGAGGCTGAA
261 D I S E E V V I P Q Q P I K H E E E A E
841 GGAATCGGCAAGGATGCTGAATTTGTTATATCAGATATGATCTTGAACGACGATTTCTTT
281 I G K D A E F V I S D M I L N D D F F
901 GTGGAATTAGAGGAGTTGGATTCCCTAATTTCAACTTCAACCTTTTACAATTGCTCTACG
301 V E L E E L D S L I S T S T F Y N C S T
961 GAACATTTTAGCTAA
321 E H F R *
    
```

方框分别代表起始密码子和终止密码子
The boxes represent the starter and terminator, respectively

图 2 *PgWRKY22* 的氨基酸序列及全长 cDNA 序列
Fig. 2 Deduced amino acid sequence of *PgWRKY22* and overall length c DNA sequence

3.2 *PgWRKY22* 基因的生物信息学分析

3.2.1 *PgWRKY22* 编码蛋白的理化性质及结构分析 将 *PgWRKY22* 编码的氨基酸序列分别提交到 NCBI 和 ProtParam 上进行在线分析, 结果显示其编码的蛋白属于 WRKY 超家族蛋白, 具有 WRKY

DNA 结合域 (图 3-A)。*PgWRKY22* 编码蛋白的相对分子质量为 36 539.53, 理论等电点为 5.17, 分子式为 $C_{1616}H_{2465}N_{431}O_{518}S_{10}$, 该蛋白的不稳定系数为 49.75, 属于不稳定蛋白。脂肪指数为 64.69, 总平均亲水性为 -0.632, 属于亲水性蛋白。SOPMA 在线

分析显示, PgWRKY22 编码蛋白的二级结构包含 85 个 α 螺旋(25.63%), 209 个无规则卷曲(64.51%)、18 个折叠形态延伸链(5.56%)以及 12 个 β 转角(3.70%), 无规则卷曲是主要组成部分(图 3-B)。利用 SWISS-MODEL 在线建立 PgWRKY22 蛋白的三维结构模型(图 3-C)。TMHMM 在线预测 PgWRKY22 蛋白的跨膜结构域显示该蛋白不含跨膜区域, 属于非跨膜蛋白(图 4-A)。SMART 在线分析发现 PgWRKY22 蛋白具有 2 个结构域, 分别是组成复杂性较低域和 WRKY 域(图 4-B)。

3.2.2 PgWRKY22 编码蛋白的同源性及系统进化树分析 将 PgWRKY22 编码蛋白序列提交到 NCBI 数据库与其他植物的 WRKY 蛋白序列进行序列比对, 发现 PgWRKY22 蛋白与丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge (AKA27922.1)、葡萄 *Vitis vinifera* L. (RVX04199.1)、长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (AFK88675.1) 和独脚金 *Striga asiatica* (L.) Kuntze. (GER33041.1) 中的 WRKY 蛋白具有较高的同源性(图 5-A)。将 PgWRKY22 与人参和西洋参中的 WRKY 蛋白进行进化树分析显示, PgWRKY22 蛋白与西洋参 PqWRKY1、PqWRKY2, 人参 PgWRKY1、PgWRKY3、PgWRKY4 具有较近的系统发育关系, 与人参 PgWRKY2, 西洋参 PqWRKY5、PqWRKY8 关系较远(图 5-B)。

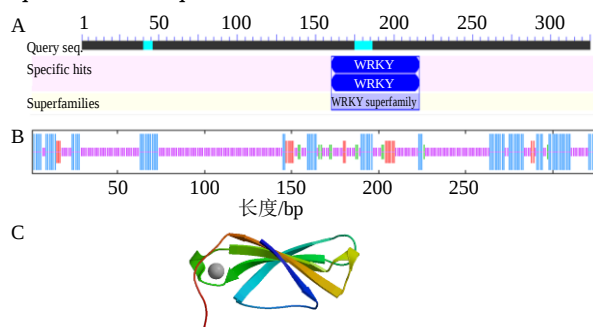


图 3 PgWRKY22 编码蛋白的二级结构 (A, B) 及三级结构预测 (C)

Fig. 3 Secondary structure (A, B) and predicted tertiary structure (C) of the protein encoded by PgWRKY22

3.3 PgWRKY22 蛋白的亚细胞定位

为了确定该蛋白在细胞中的分布情况, 构建 pCAMBIA2300-35S-eGFP-PgWRKY22 载体, 并通过根癌农杆菌介导烟草叶片的瞬时转化体系, 在激光共聚焦显微镜下观察发现 eGFP-PgWRKY22 融合蛋白在细胞核内具有明显的 GFP 信号(图 6-A), 对照组 pCAMBIA2300-35S-eGFP 载体在整个细胞中均能观察到 GFP 信号(图 6-B), 初步表

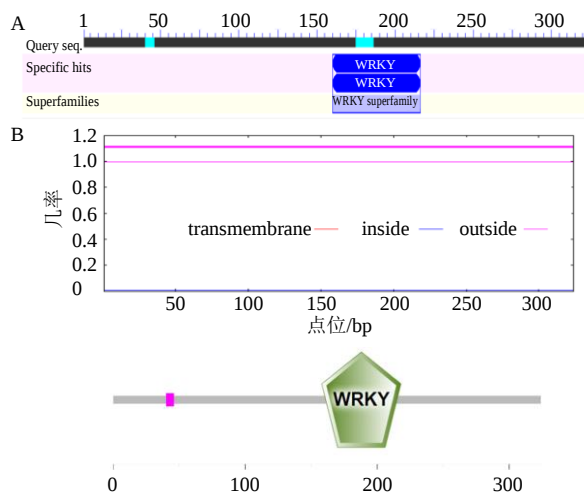


图 4 PgWRKY22 编码蛋白的跨膜结构域 (A) 和保守结构域分析 (B)

Fig. 4 Analysis of the transmembrane domain (A) and conserved domain (B) of the protein encoded by PgWRKY22

明 PgWRKY22 蛋白定位在细胞核上。

3.4 PgWRKY22 基因的组织表达及磷酸胁迫表达分析

为进一步分析 PgWRKY22 的表达模式, 采用天根 RNAsimple Total RNA Kit 试剂盒提取人参的主根、侧根、茎、叶以及不同磷处理的侧根组织的 RNA, 反转录为 cDNA 后作为模板, 通过 qRT-PCR 技术检测 PgWRKY22 在不同组织和不同磷浓度下的表达量。实验结果表明, PgWRKY22 在人参的主根、侧根、茎和叶组织中均有表达, 但表达存在明显的差异, 在侧根和主根中的表达量最高, 其次是叶, 在茎中的表达量最低(图 7-A)。在外源磷处理下, 各部位 PgWRKY22 在 P3 (2.0 mmol/L) 浓度下表达量最高, P4 (4.0 mmol/L) 浓度下次之, 在 P0 (0 mmol/L)、P1 (0.5 mmol/L) 和 P2 (1.0 mmol/L) 浓度下表达量相对较低(图 7-B)。

4 讨论

植物在生长发育过程中会遭受各种生物或非生物胁迫, 这些环境胁迫会影响植物体内的转录和代谢过程, 尤其在药用植物中会影响有效成分的形成和积累, 而植物为了避免和缓解各种胁迫, 便会启动一系列的基因进行表达调控, 在这些调控中, WRKY 型转录因子发挥了重要作用。本研究通过人参转录组数据库克隆了一个人参 WRKY 型转录因子基因 PgWRKY22, 该基因编码 324 个氨基酸, 具有典型的 WRKY 保守结构域, 该基因编码蛋白与丹参、葡萄、长春花和独脚金中的 WRKY 家族蛋

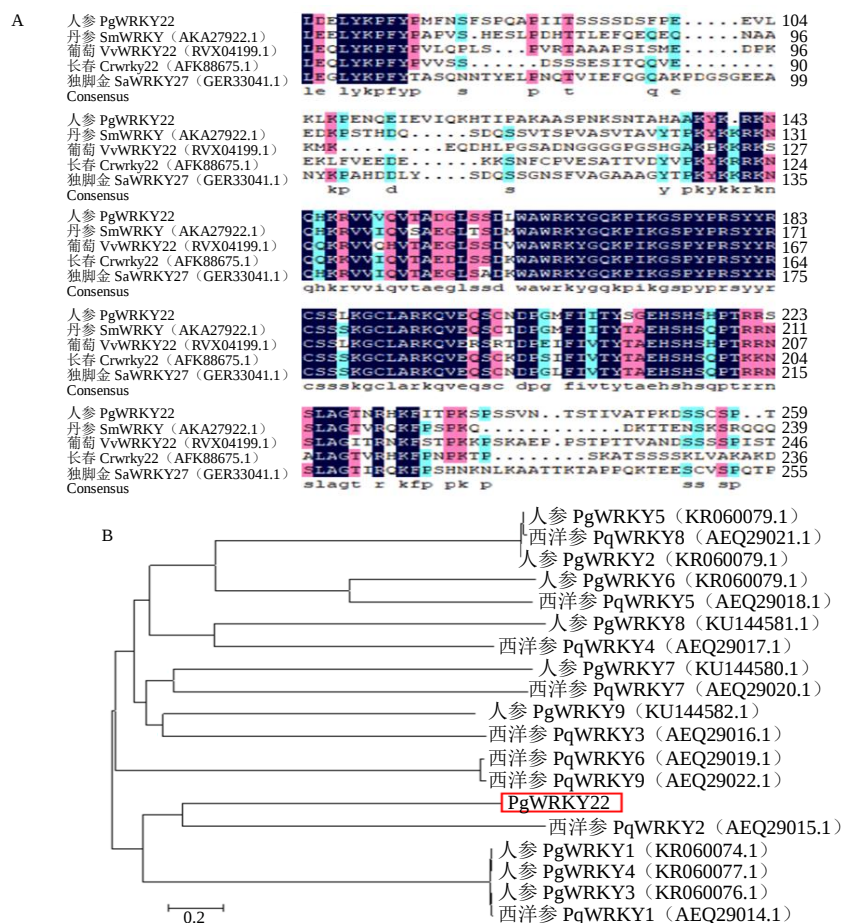


图 5 PgWRKY22 与其他植物氨基酸序列比对 (A) 和进化树分析 (B)

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of PgWRKY22 and other plants (A) and phylogenetic tree analysis (B)

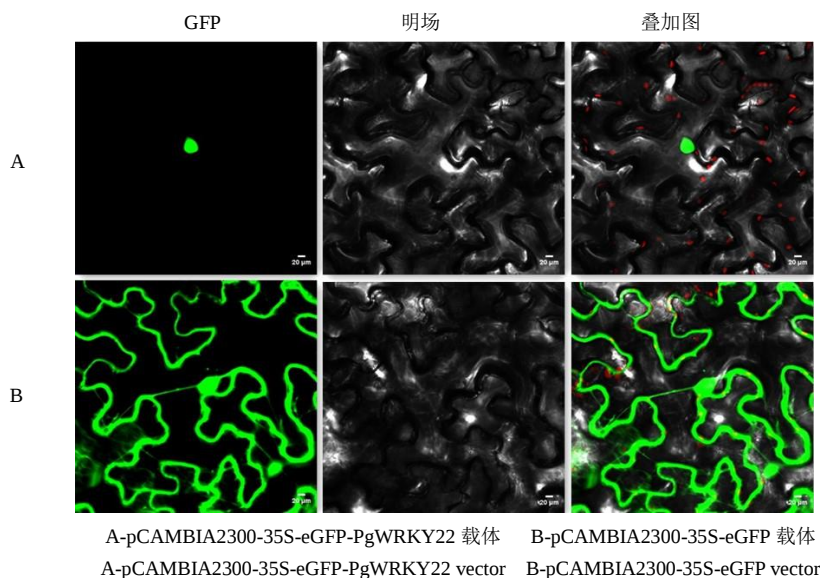


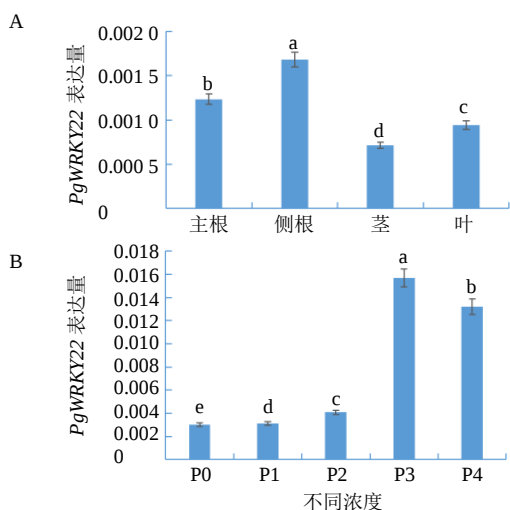
图 6 PgWRKY22 在烟草中的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of PgWRKY22 in tobacco

白成员具有较高的同源性，而目前在丹参和葡萄中也有较多关于 WRKY 型转录因子的研究，如丹参 SmWRKY14、SmWRKY40、SmWRKY44 等^[41-43]；

葡萄 VvWRKY54、VvWRKY48 等^[44-45]。

已有研究从人参中鉴定并克隆了 9 个 WRKY 型转录因子 (PgWRKY1~9)，并确定了这 9 个



不同字母表示经多重 *t* 检验分析各组间差异显著 ($P < 0.05$)
Different letters indicate significant differences between groups after multiple *t*-test analysis ($P < 0.05$)

图 7 *PgWRKY22* 在人参不同组织中 (A) 和各部位不同磷浓度下 (B) 的表达分析

Fig. 7 Expression analysis of *PgWRKY22* in different tissues of *Panax ginseng* (A) and under different phosphorus concentrations (B)

WRKY 型转录因子在水杨酸、脱落酸、NaCl 和茉莉酸甲酯处理下的表达模式^[46-47]。基于进化树分析呈现的 *PgWRKY22* 蛋白与 *PgWRKY1*、*PgWRKY3*、*PgWRKY4* 具有较近的系统发育关系，比较了 *PgWRKY22* 蛋白与 *PgWRKY1*、*PgWRKY3*、*PgWRKY4* 在盐胁迫下的表达特征，即使用磷酸盐处理能诱导 *PgWRKY22* 的表达，这与使用 NaCl 处理诱导 *PgWRKY1*、*PgWRKY3*、*PgWRKY4* 的表达结果相似，但前人研究还表明茉莉酸甲酯处理能下调 *PgWRKY1*、*PgWRKY3*、*PgWRKY4* 的表达，因此，当植株受到钠盐或磷酸盐胁迫时，通过茉莉酸甲酯处理可能是一种有效的缓解途径，但这仍然需要进一步的实验去证实。

WRKY 型转录因子是一种细胞核靶向蛋白且具有组织特异性^[48-49]。在人参中已鉴定了 1 个 WRKY 型转录因子 *PgWRKY1*，亚细胞定位表明 *PgWRKY1* 定位于细胞核，是一种核定位蛋白，*PgWRKY1* 在各种组织中的表达分析表明，与叶、茎和种子相比，它优先在侧根和根中表达^[46]。本研究结果也显示，*PgWRKY22* 属于一种核定位蛋白，并与 *PgWRKY1* 具有较近的系统进化关系，且在侧根和主根中的表达优先于在叶和茎中的表达。这些结果显示 *PgWRKY22* 在各种组织中广泛表达，表明

它可能在人参器官组织的多个发育阶段发挥调节作用，且可能对人参的高价值根具有重要意义。

基因表达分析是了解基因可能的生物学功能所必需的^[50]。磷已被证明影响许多基因的表达，调节植物的多种发育过程以及植物对逆境的反应。最典型的便是 *PHT1*（无机磷酸盐转运蛋白 1）基因，在拟南芥中，*AtPHT1*、*AtPHT5* 在衰老叶片的维管束韧皮部中表达，介导磷从源向库器官的再分配^[51-52]。除了 *PHT1* 基因，在高等植物中，许多转录因子也参与了磷信号途径，如拟南芥中的 *AtPHL1*、*AtPHL2*、*AtPHR1*，水稻中的 *OsMYB2P-1*、*OsMYB4P*、*OsPHR1* 等^[39, 53-55]。此外，WRKY 型转录因子也被报道参与低磷胁迫响应，在拟南芥中有 *AtWRKY6*、*AtWRKY45*、*AtWRKY42*、*AtWRKY75*，在水稻中有 *OsWRKY74*^[56-60]。本实验研究了 *PgWRKY22* 的表达谱是否与磷胁迫有关，根据研究结果显示，*PgWRKY22* 转录本的表达在 P3（2.0 mmol/L）和 P4（4.0 mmol/L）磷浓度下显著上调，且表达从 P0（0 mmol/L）浓度至 P3（2.0 mmol/L）浓度呈上升趋势，从 P3（2.0 mmol/L）浓度至 P4（4.0 mmol/L）浓度呈下降趋势。这与拟南芥和水稻等植物中低磷诱导相关 WRKY 型转录因子表达上调相比，似乎呈现出一种相反的趋势，因此，推测 *PgWRKY22* 可能是一个高磷诱导表达的转录本，而不是受低磷诱导，但这仍需要进一步通过基因功能研究去证实。

综上所述，本研究克隆了 1 个人参 WRKY 型转录因子基因 *PgWRKY22*，该基因主要在人参根中表达，且编码的蛋白可能参与磷胁迫相关途径。虽然 *PgWRKY22* 的基因功能仍需要进一步通过实验验证，但本研究可为深入探究该基因参与人参代谢途径中元素转运的分子机制提供理论基础，同时也为在人参健康栽培中开展营养调控提供重要参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Park J, Kim J, Ko E S, et al. Enzymatic bioconversion of ginseng powder increases the content of minor ginsenosides and potentiates immunostimulatory activity [J]. *J Ginseng Res*, 2022, 46(2): 304-314.
- [2] Afrin S, Zhu J, Cao H Z, et al. Molecular cloning and expression profile of an abiotic stress and hormone responsive MYB transcription factor gene from *Panax ginseng* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2015, 47(4): 267-277.
- [3] 王文清. 玉米根系耐旱的分子机制研究 [D]. 济南: 山东师范大学, 2021.

- [4] 马进, 郑钢. 利用转录组测序技术鉴定紫花苜蓿根系盐胁迫应答基因 [J]. 核农学报, 2016, 30(8): 1470-1479.
- [5] 方韦博. 小麦 TaWRKY1、TaMYB1 和 TaSPX129 基因特征及抵御干旱和低磷逆境的功能 [D]. 保定: 河北农业大学, 2016.
- [6] 温秀萍. ‘云香’水仙 WRKY 转录因子的克隆及功能研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2017.
- [7] 肖罗丹. 茶树 CsWRKYIIc 转录因子的鉴定及 CsWRKYIIc6 的功能分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020.
- [8] Wen F, Wu X Z, Li T J, *et al.* Characterization of the WRKY gene family in *Akebia trifoliata* and their response to *Colletotrichum acutatum* [J]. *BMC Plant Biol*, 2022, 22(1): 115.
- [9] Li W, Wang H P, Yu D Q. *Arabidopsis* WRKY transcription factors WRKY12 and WRKY13 oppositely regulate flowering under short-day conditions [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(11): 1492-1503.
- [10] Ma Z B, Li W, Wang H P, *et al.* WRKY transcription factors WRKY12 and WRKY13 interact with SPL10 to modulate age-mediated flowering [J]. *J Integr Plant Biol*, 2020, 62(11): 1659-1673.
- [11] Wang H Z, Avci U, Nakashima J, *et al.* Mutation of WRKY transcription factors initiates pith secondary wall formation and increases stem biomass in dicotyledonous plants [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(51): 22338-22343.
- [12] Besseau S, Li J, Palva E T. WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(7): 2667-2679.
- [13] Miao Y, Laun T, Zimmermann P, *et al.* Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(6): 853-867.
- [14] Ülker B, Somssich I E. The WRKY70 transcription factor of *Arabidopsis* influences both the plant senescence and defense signaling pathways [J]. *Planta*, 2007, 226(1): 125-137.
- [15] Kim C Y, Vo K T X, Nguyen C D, *et al.* Functional analysis of a cold-responsive rice WRKY gene, OsWRKY71 [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2016, 10(1): 13-23.
- [16] Zhu D, Hou L X, Xiao P L, *et al.* VvWRKY30, a grape WRKY transcription factor, plays a positive regulatory role under salinity stress [J]. *Plant Sci*, 2019, 280: 132-142.
- [17] Yu Y C, Wang N, Hu R B, *et al.* Genome-wide identification of soybean WRKY transcription factors in response to salt stress [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 920.
- [18] Vance C P, Uhde-Stone C, Allan D L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource [J]. *New Phytol*, 2003, 157(3): 423-447.
- [19] Bernardino K C, Pastina M M, Menezes C B, *et al.* The genetic architecture of phosphorus efficiency in sorghum involves pleiotropic QTL for root morphology and grain yield under low phosphorus availability in the soil [J]. *BMC Plant Biol*, 2019, 19(1): 87.
- [20] Sun T T, Zhang J K, Zhang Q, *et al.* Transcriptome and metabolome analyses revealed the response mechanism of apple to different phosphorus stresses [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2021, 167: 639-650.
- [21] Rubio V, Linhares F, Solano R, *et al.* A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(16): 2122-2133.
- [22] Zhou J, Jiao F C, Wu Z C, *et al.* OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1673-1686.
- [23] Bustos R, Castrillo G, Linhares F, *et al.* A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(9): e1001102.
- [24] Ruan W Y, Guo M N, Wu P, *et al.* Phosphate starvation induced OsPHR4 mediates Pi-signaling and homeostasis in rice [J]. *Plant Mol Biol*, 2017, 93(3): 327-340.
- [25] Ai P H, Sun S B, Zhao J N, *et al.* Two rice phosphate transporters, OsPht1;2 and OsPht1;6, have different functions and kinetic properties in uptake and translocation [J]. *Plant J*, 2009, 57(5): 798-809.
- [26] Wang X F, Wang Y F, Piñeros M A, *et al.* Phosphate transporters OsPHT1;9 and OsPHT1;10 are involved in phosphate uptake in rice [J]. *Plant Cell Environ*, 2014, 37(5): 1159-1170.
- [27] Chang M X, Gu M, Xia Y W, *et al.* OsPHT1;3 mediates uptake, translocation, and remobilization of phosphate under extremely low phosphate regimes [J]. *Plant Physiol*, 2019, 179(2): 656-670.
- [28] Yang S Y, Grønlund M, Jakobsen I, *et al.* Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the phosphate transporter1 gene family [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(10): 4236-4251.
- [29] Du Q G, Wang K, Xu C, *et al.* Strand-specific RNA-Seq transcriptome analysis of genotypes with and without low-phosphorus tolerance provides novel insights into phosphorus-use efficiency in maize [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16(1): 222.
- [30] Zeng H Q, Wang G P, Zhang Y Q, *et al.* Genome-wide identification of phosphate-deficiency-responsive genes in soybean roots by high-throughput sequencing [J]. *Plant Soil*, 2016, 398(1): 207-227.
- [31] Byrne S L, Foito A, Hedley P E, *et al.* Early response mechanisms of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) to phosphorus deficiency [J]. *Ann Bot*, 2011, 107(2): 243-254.
- [32] Alexova R, Nelson C J, Millar A H. Temporal development of the barley leaf metabolic response to Pi

- limitation [J]. *Plant Cell Environ*, 2017, 40(5): 645-657.
- [33] Ren P R, Meng Y X, Li B C, *et al*. Molecular mechanisms of acclimatization to phosphorus starvation and recovery underlying full-length transcriptome profiling in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 500.
- [34] Wang J, Qin Q, Pan J J, *et al*. Transcriptome analysis in roots and leaves of wheat seedlings in response to low-phosphorus stress [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19802.
- [35] Li L Q, Huang L P, Pan G, *et al*. Identifying the genes regulated by AtWRKY6 using comparative transcript and proteomic analysis under phosphorus deficiency [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 1046.
- [36] 王慧. 拟南芥 WRKY45 转录因子参与响应低磷胁迫的实验证据 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [37] 张飞萃. 拟南芥 WRKY28 和 WRKY42 调控磷吸收和转运的机制研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [38] Zhang J, Gu M, Liang R, *et al*. OsWRKY21 and OsWRKY108 function redundantly to promote phosphate accumulation through maintaining the constitutive expression of OsPHT1;1 under phosphate-replete conditions [J]. *New Phytol*, 2021, 229(3): 1598-1614.
- [39] Dai X Y, Wang Y Y, Zhang W H. OsWRKY74, a WRKY transcription factor, modulates tolerance to phosphate starvation in rice [J]. *J Exp Bot*, 2016, 67(3): 947-960.
- [40] Kenneth J, Livak K. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [41] 陈尘, 张燕, 李林, 等. 丹参转录因子 SmWRKY14 基因的克隆及表达分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(21): 5590-5597.
- [42] 吴可薇. 丹参转录因子 SmWRKY40 抑制丹参酮生物合成的分子机制 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [43] 邢丙聪, 苏立样, 万思琦, 等. 金线莲中调控胚胎发育 WRKY 转录因子筛选及克隆分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(12): 3745-3754.
- [44] 肖培连, 吕晓彤, 侯丽霞, 等. 葡萄 WRKY54 基因克隆及表达特性分析 [J]. *核农学报*, 2017, 31(1): 21-28.
- [45] 赵姣. 苹果 bZIP 家族基因的鉴定、表达分析及葡萄 WRKY48 基因的功能分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [46] Nuruzzaman M, Cao H Z, Xiu H, *et al*. Transcriptomics-based identification of WRKY genes and characterization of a salt and hormone-responsive PgWRKY1 gene in *Panax ginseng* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(2): 117-131.
- [47] Xiu H, Nuruzzaman M, Guo X Q, *et al*. Molecular cloning and expression analysis of eight PgWRKY genes in *Panax ginseng* responsive to salt and hormones [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3): 319.
- [48] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, *et al*. The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(4): 2081-2093.
- [49] de Pater S, Greco V, Pham K, *et al*. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis* [J]. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(23): 4624-4631.
- [50] Mudge S R, Rae A L, Diatloff E, *et al*. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2002, 31(3): 341-353.
- [51] Nagarajan V K, Jain A, Poling M D, *et al*. *Arabidopsis* Pht1;5 mobilizes phosphate between source and sink organs and influences the interaction between phosphate homeostasis and ethylene signaling [J]. *Plant Physiol*, 2011, 156(3): 1149-1163.
- [52] Bakshi M, Vahabi K, Bhattacharya S, *et al*. WRKY6 restricts Piriformospora indica-stimulated and phosphate-induced root development in *Arabidopsis* [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15: 305.
- [53] Wang H, Xu Q, Kong Y H, *et al*. *Arabidopsis* WRKY45 transcription factor activates Phosphate Transporter1; 1 expression in response to phosphate starvation [J]. *Plant Physiol*, 2014, 164(4): 2020-2029.
- [54] Su T, Xu Q, Zhang F C, *et al*. WRKY42 modulates phosphate homeostasis through regulating phosphate translocation and acquisition in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2015, 167(4): 1579-1591.
- [55] Devaiah B N, Karthikeyan A S, Raghothama K G. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(4): 1789-1801.
- [56] Rubio V, Linhares F, Solano R, *et al*. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(16): 2122-2133.
- [57] Bustos R, Castrillo G, Linhares F, *et al*. A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis* [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(9): e1001102.
- [58] Zhou J, Jiao F C, Wu Z C, *et al*. OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants [J]. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1673-1686.
- [59] Sun L C, Song L, Zhang Y, *et al*. *Arabidopsis* PHL2 and PHR1 act redundantly as the key components of the central regulatory system controlling transcriptional responses to phosphate starvation [J]. *Plant Physiol*, 2016, 170(1): 499-514.
- [60] Guo M N, Ruan W Y, Li C Y, *et al*. Integrative comparison of the role of the PHOSPHATE RESPONSE1 subfamily in phosphate signaling and homeostasis in rice [J]. *Plant Physiol*, 2015, 168(4): 1762-1776.

[责任编辑 时圣明]